



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

PATRÍCIA COELHO DO NASCIMENTO NOGUEIRA

ESTUDO CROMATOGRÁFICO, ESPECTROSCÓPICO E FARMACOLÓGICO
DE ALCALOIDES PLUMERANOS DAS SEMENTES DE
***ASPIDOSPERMA PYRIFOLIUM* MART.**

FORTALEZA

2014

PATRÍCIA COELHO DO NASCIMENTO NOGUEIRA

**ESTUDO CROMATOGRÁFICO, ESPECTROSCÓPICO E FARMACOLÓGICO
DE ALCALOIDES PLUMERANOS DAS SEMENTES DE
ASPIDOSPERMA PYRIFOLIUM MART.**

Tese apresentada à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Química. Área de concentração: Química Orgânica

Orientador: Prof. Edilberto Rocha Silveira.

Co-orientadora: Profa. Renata Mendonça Araújo.

FORTALEZA

2014

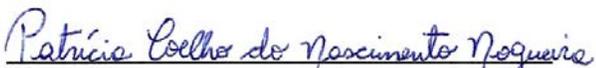
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

N714e Nogueira, Patrícia Coelho do Nascimento.
Estudo cromatográfico, espectroscópico e farmacológico de alcaloides plumeranos das sementes de *Aspidosperma pyriforme* Mart. / Patrícia Coelho do Nascimento Nogueira. – 2014. 255 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2014.
Área de Concentração: Química Orgânica.
Orientação: Prof. Dr. Edilberto Rocha Silveira.
Coorientação: Prof. Dr. Renata Mendonça Araújo.

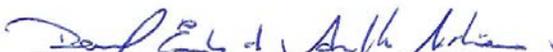
1. Alcalóides 2. Química vegetal. 3. Química orgânica. I. Título.

Esta Tese foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Doutor em Química, área de concentração Química Orgânica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e em cuja Biblioteca Central encontra-se à disposição dos interessados.

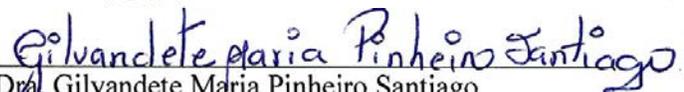

Patrícia Coelho do Nascimento Nogueira

Tese aprovada em: 08/09/2014


Dr. Edilberto Rocha Silveira
(Orientador - UFC)


Dr. Daniel Esdras de Andrade Uchoa
(UFC)


Dr. Frederico Guare Cruz
(UFBA)


Dra. Gilvandete Maria Pinheiro Santiago
(UFC)


Dra. Nilce Viana Gramosa Pompeu de Sousa Brasil
(UFC)

A Deus.

Ao meu esposo, Júnior Nogueira.

À minha família.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por seu imenso amor e misericórdia, e por me dar forças para que eu chegasse até aqui.

À minha família, que, embora distante na maior parte do tempo, sempre me incentivou e torceu pela minha vitória.

Ao meu amado esposo e amigo, Júnior Nogueira, que durante toda a minha caminhada acadêmica esteve comigo, me apoiando e incentivando a chegar mais longe.

Ao meu orientador, prof. Edilberto Rocha Silveira, por toda orientação a mim concedida durante esses anos de convivência, pela amizade conquistada e por seus conselhos de vida.

À minha co-orientadora, Renata Mendonça Araújo, pela amizade, ajuda, apoio e por todos os ensinamentos.

Às professoras Otilia Pessoa, Nilce Sousa Brasil e Mary Anne Lima, pela convivência e pela aprendizagem adquirida.

Ao prof. Daniel Uchoa, pela amizade e ajuda concedida sempre que precisei dele.

Aos demais professores do curso de Pós-Graduação em Química, pelos ensinamentos transmitidos.

Às amigas e companheiras de laboratório, Nayara Aquino e Karísia Sousa, pela amizade, apoio e ajuda nos momentos que precisei.

Aos colegas da turma de doutorado, pela amizade conquistada.

A todos os colegas dos laboratórios LAFIPLAM, pelo companheirismo, pelo ambiente de trabalho harmonioso e por todos os momentos alegres que tivemos.

Aos companheiros operadores do CENAUREMN, pela convivência e momentos de aprendizagem.

Aos funcionários Aurilana, Célia Sena e José Orlando Oliveira, pelos serviços prestados.

À profa. Glauce Viana, e sua doutoranda Dayane Pessoa, pela realização dos testes farmacológicos.

À FUNCAP e ao CNPq, pelo suporte financeiro e pelas bolsas concedidas.

À CAPES e ao PRONEX, pelo apoio financeiro.

A todos os professores da banca examinadora deste trabalho, por aceitarem o convite.

RESUMO

Este trabalho relata o estudo fitoquímico das sementes de *Aspidosperma pyrifolium* (Apocinaceae), descrevendo o isolamento e a determinação estrutural de um alcaloide inédito com esqueleto plumerano rearranjado, o (-)-(3*S*,7*S*,21*R*)-*rel*-(3*α**H*)-15(14→3)-abeo-2,16,17,20,6,7-hexahidro-15*H*,8*aH*,16*a*,20*a*-etano-1*H*-indolizino[3,1-*cd*]carbazol, além de onze compostos conhecidos, seis alcaloides plumeranos identificados como aspidospermina, desmetoxiaspidospermina, pirifolina, 15-desmetoxipirifolina, aspidofractinina e *N*-acetilaspidofractinina; um alcaloide tetra-hidro- β -carbolínico, a *N*-metilacuamidina; dois iridoides glicosilados, ácido logânico e loganina; um derivado do ácido salicílico, o ácido 2-hidróxi-3-*O*- β -D-glicopiranosilbenzóico; e um derivado metilado do inositol, o 2-*O*-metil-L-*quiro*-inositol. Os compostos foram isolados por técnicas cromatográficas, principalmente a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, e suas estruturas foram determinadas através de análises por RMN, uni e bidimensionais, IV e EMAR, além da comparação com dados da literatura. Apesar de já descritos na literatura, cinco compostos são relatados pela primeira vez para a espécie, e um está sendo relatado pela primeira vez como produto natural, de origem vegetal. A revisão dos dados de RMN da literatura de alguns alcaloides isolados, e as correspondentes correlações estruturais, juntamente com um levantamento bibliográfico (de 1973 a 2013) dos dados de RMN ¹³C de alcaloides plumeranos isolados da família Apocinaceae, também são descritos neste trabalho. A fração aquosa resultante da partição líquido-líquido do extrato etanólico das sementes de *A. pyrifolium*, fonte da maioria dos compostos isolados, apresentou atividades antinociceptiva e anti-inflamatória nos testes de formalina, contorção abdominal induzida pelo ácido acético e edema de pata por carragenina.

Palavras-chave: Alcaloides plumeranos. *Aspidosperma pyrifolium*. Atividade biológica. Dados de RMN ¹H e ¹³C.

ABSTRACT

This work reports the phytochemical analysis from seeds of *Aspidosperma pyrifolium* (Apocynaceae), describing the isolation and the structural characterization of a unknown alkaloid with a rearranged plumeran skeleton, the (-)-(3*S*,7*S*,21*R*)-*rel*-(3*αH*)-15(14→3)-abeo-2,16,17,20,6,7-hexahydro-15*H*,8*aH*,16*a*,20*a*-ethano-1*H*-indolizino[3,1-*cd*]carbazole, in addition to eleven known compounds, six plumeran alkaloids identified as aspidospermine, demethoxyaspidospermine, pirifoline, 15-demethoxypirifoline, aspidofractinine and *N*-acetylaspidofractinine; a tetrahydro-β-carboline alkaloid, the *N*-methylakuammidine; the glycosides of two iridoids, loganic acid and loganin; a salicylic acid derivative, 2-hydroxy-3-*O*-β-D-glucopyranosylbenzoic acid; and a methyl inositol derivative, the 2-*O*-methyl-L-*chiro*-inositol. The compounds were isolated by chromatographic techniques, especially High Performance Liquid Chromatography, and their structures were characterized by 1D and 2D NMR spectroscopy, FT-IR and HRESIMS, and comparison with data from literature. Although already reported in the literature, five compounds are being reported for the first time for the species, and one is being reported from a natural source. The NMR data, and the correspondent assignments of some alkaloids already reported in the literature, together with a bibliographic survey (from 1973-2013) of the ¹³C NMR data of plumeran alkaloids isolated from the Apocynaceae family, are presented in this work. The residual aqueous fraction of the liquid-liquid partition of the ethanol extract from seeds of *A. pyrifolium*, source of most compounds isolated, showed antinociceptive and anti-inflammatory activities in the formalin test, abdominal writhing induced by acetic acid, and paw edema induced by carrageenan.

Keywords: Plumeran alkaloids. *Aspidosperma pyrifolium*. Biological activity. ¹H and ¹³C NMR data.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estruturas dos alcaloides coniina (1) e estriquinina (2).....	26
Figura 2 - Núcleos básicos das diferentes subclasses de alcaloides.	26
Figura 3 - Estruturas dos alcaloides camptotecina (3), topotecan (4), efedrina (5), papaverina (6) e caféina (7).....	27
Figura 4 - Estruturas dos alcaloides indólicos reserpina (8), ramiflorina A (9), ioimbina (10), olivacina (11) e elipticina (12).	28
Figura 5 - Mapa mostrando a distribuição geográfica de plantas do gênero <i>Aspidosperma</i>	29
Figura 6 - Plantas da família Apocinaceae usadas na decoração de ambientes: <i>Alamanda</i> (A), <i>Catharantus</i> (B) e <i>Plumeria</i> (C), conhecidas popularmente como alamanda rosa, boanoite e jasmim-manga, respectivamente.	30
Figura 7 - Estruturas dos alcaloides indólicos vimblastina e vincristina, isolados de <i>Catharanthus roseus</i>	31
Figura 8 - Prancha revelando as características botânicas de plantas da família Apocinaceae.	31
Figura 9 - Estruturas de alcaloides representando os tipos de esqueletos característicos de algumas séries de <i>Aspidosperma</i>	33
Figura 10 - Fotos de <i>Aspidosperma pyriformium</i> , mostrando parcialmente seu habitat natural (A e B), folhas (C), flores (D) e frutos, com detalhes de suas sementes (E).....	34
Figura 11 - Prancha revelando as características botânicas de <i>Aspidosperma pyriformium</i>	35
Figura 12 - Mapa mostrando a distribuição geográfica de <i>Aspidosperma pyriformium</i> na caatinga e no cerrado brasileiro.	35
Figura 13 - Gráfico de barras representando a quantidade de registros encontrados para <i>Aspidosperma pyriformium</i> por estados e regiões do Brasil (Sul: 18; Sudeste: 58; Centro-Oeste: 100; Nordeste: 1.062; Norte: 7).	36
Figura 14 - Estruturas dos alcaloides plumeranos aspidospermina (21), aspidocarpina (22) e 11-metoxitabersonina (23).....	37
Figura 15 - Estruturas dos alcaloides isolados a partir das folhas, raízes e casca do caule de <i>Aspidosperma pyriformium</i>	38
Figura 16 - Estrutura básica dos alcaloides com esqueleto plumerano e estruturas dos alcaloides pentacíclicos (-)-vincadiformina (25) e (+)-aspidospermidina (29), e hexacíclico (-)-aspidofractinina (46).	39

Figura 17 - Estruturas do L-triptofano (50), do ácido antranílico (51) e da triptamina (52).	40
Figura 18 - Tipos estruturais principais de alcaloides indólicos terpenoídicos: Corinanto, Aspidosperma e Iboga.....	40
Figura 19 - Esquema de rota biossintética mostrando as trocas estruturais envolvidas na conversão do esqueleto do tipo Corinanto para os esqueletos dos tipos Aspidosperma e Iboga.....	42
Figura 20 - Reação Diels-Alder do <i>N</i> -tosila-3-nitro-indol (I) com o ciclopentadieno (II) para gerar um derivado do carbazol (III).	43
Figura 21 - Estruturas dos enantiômeros do alcaloide aspidospermina. A) (+)-aspidospermina; B) (-)-aspidospermina.	44
Figura 22 - Estruturas do núcleo indólico (I) e do alcaloide di-hidroobscurinervina (II), isolado de <i>Aspidosperma obscurinervium</i>	44
Figura 23 - Estruturas dos alcaloides plumeranos aspidospermina (21) e aspidofractinina (46).....	45
Figura 24 - Subestrutura característica dos alcaloides conhecidos como kopsifolinas.	47
Figura 25 - Esqueleto básico dos derivados do alcaloide cilindrocarina.	47
Figura 26 - Esqueleto básico dos derivados do alcaloide vindolinina.	48
Figura 27 - Levantamento bibliográfico dos dados de RMN ¹³ C de alcaloides plumeranos isolados de plantas da família Apocinaceae, ou sintetizados. Asteriscos nas estruturas indicam valores de carbonos não detectados.....	50
Figura 28 - Subestruturas sugeridas a partir da análise do espectro de RMN ¹ H do composto AP-9.	68
Figura 29 - Estrutura básica de um alcaloide plumerano pentacíclico.	69
Figura 30 - Subestruturas com setas mostrando as correlações à longa distância ¹ H- ¹³ C, observadas no espectro bidimensional HMBC do composto AP-9.....	70
Figura 31 - Estruturas dos enantiômeros do alcaloide aspidofractinina. A) (+)-aspidofractinina; B) (-)-aspidofractinina.....	70
Figura 32 - Fragmentos de massa obtidos a partir do íon precursor em <i>m/z</i> 281,00.	71
Figura 33 - Comparação dos valores de deslocamentos químicos de RMN ¹ H e ¹³ C (500 e 125 MHz) do composto AP-9 protonado (I) e desprotonado (II e III) com o alcaloide aspidofractinina, relatado por ARAÚJO JR. <i>et al.</i> , 2007 (IV) e OLIVEIRA, 1999 (V) (I e II em CD ₃ OD; III a V em CDCl ₃).	72

Figura 34 - Estruturas tridimensionais do composto AP-9 desprotonado, com setas duplas mostrando os acoplamentos dipolares detectados no experimento NOESY (A), e modelos moleculares 3D construídos pelo programa “ChemSketch” (B).....	73
Figura 35 - Estrutura do composto AP-9, identificado como o alcaloide (-)-aspidofractinina.....	75
Figura 36 - Espectro de massa de alta resolução de AP-9, obtido por ESI (A), e espectro de massa EM/EM obtido a partir do íon precursor em m/z 281,00 (B).....	76
Figura 37 - Espectro de absorção na região do infravermelho de AP-9 (obtido no suporte UATR).....	76
Figura 38 - Espectro de RMN ^1H de AP-9 protonado (CD_3OD , com supressão do sinal da água, 500 MHz) e detalhe para a expansão da região entre 7,5 e 6,8 ppm.	77
Figura 39 - Expansão do espectro de RMN ^1H de AP-9 protonado (CD_3OD , 500 MHz), correspondente à região entre 4,0 e 1,3 ppm.....	77
Figura 40 - Espectro de RMN ^{13}C -CPD (A) e DEPT 135 (B) de AP-9 protonado (CD_3OD , 125 MHz).	78
Figura 41 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC de AP-9 protonado (CD_3OD , 500 x 125 MHz) e expansão.	78
Figura 42 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY de AP-9 protonado (CD_3OD , 500 x 500 MHz) e expansão.	79
Figura 43 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de AP-9 protonado (CD_3OD , 500 x 125 MHz) e expansões.....	79
Figura 44 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -NOESY de AP-9 protonado (CD_3OD , 500 x 500 MHz) e expansão.	80
Figura 45 - Espectro de RMN ^1H de AP-9 desprotonado (CD_3OD , com supressão do sinal da água, 500 MHz) e detalhe para a expansão da região entre 7,4 e 6,6 ppm.	81
Figura 46 - Expansões do espectro de RMN ^1H de AP-9 desprotonado (CD_3OD , 500 MHz), correspondente às regiões entre 3,5 e 2,8 ppm (esquerda) e 2,3 e 1,2 ppm (direita).	81
Figura 47 - Espectro de RMN ^{13}C -CPD (A) e APT (B) de AP-9 desprotonado (CD_3OD , 125 MHz).	82
Figura 48 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC de AP-9 desprotonado (CD_3OD , 500 x 125 MHz) e expansão.	82
Figura 49 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY de AP-9 desprotonado (CD_3OD , 500 x 500 MHz) e expansão.	83

Figura 50 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de AP-9 desprotonado (CD_3OD , 500 x 125 MHz) e expansões.	83
Figura 51 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -NOESY de AP-9 desprotonado (CD_3OD , 500 x 500 MHz) e expansão.	84
Figura 52 - Estrutura proposta para o composto AP-10.....	86
Figura 53 - Importantes correlações à longa distância ^1H - ^{13}C observadas no espectro HMBC do composto AP-10 protonado.....	87
Figura 54 - Estruturas tridimensionais do composto AP-10 protonado, com setas duplas mostrando os acoplamentos dipolares detectados nos experimentos NOESY e NOE Seletivo (A), e modelos moleculares 3D obtidos pelo programa “ChemSketch” (B).....	88
Figura 55 - Comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C dos compostos protonados AP-10 (I: 500 e 75 MHz, CD_3OD) e AP-9 (II: 500 e 125 MHz, CD_3OD), e valores de deslocamentos químicos de AP-10 desprotonado em CD_3OD (III: 500 e 125 MHz) e CDCl_3 (IV: 300 e 75 MHz). Asteriscos indicam hidrogênios e/ou carbonos não detectados.....	89
Figura 56 - Espectros parciais (δ 7,0-8,0) de RMN ^1H do composto AP-10 protonado [500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$], obtidos com variação de temperatura (25-80 °C), mostrando o aparecimento do duplete correspondente a H-12, o qual está ausente no espectro obtido à temperatura ambiente.....	90
Figura 57 - Estrutura do composto AP-10, identificado como o alcaloide plumerano (+)- <i>N</i> -acetilaspidofractinina.	91
Figura 58 - Espectro de massa de alta resolução de AP-10 (A) e espectro de massa EM/EM obtido a partir do íon precursor em m/z 323,00 (B).....	92
Figura 59 - Espectro de absorção na região do infravermelho de AP-10 (obtido no suporte UATR).....	92
Figura 60 - Espectro de RMN ^1H de AP-10 protonado (CD_3OD , com supressão do sinal da água, 500 MHz).	93
Figura 61 - Expansão do espectro de RMN ^1H de AP-10 protonado (CD_3OD , 500 MHz), correspondente à região entre 4,0 e 1,4 ppm.....	93
Figura 62 - Espectro de RMN ^{13}C -CPD (A) e APT (B) de AP-10 protonado (CD_3OD , 75 MHz).	94
Figura 63 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC de AP-10 protonado (CD_3OD , 500 x 125 MHz) e expansão.	94
Figura 64 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY de AP-10 protonado (CD_3OD , 500 x 500 MHz) e expansão.	95

Figura 65 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de AP-10 protonado (CD_3OD , 500 x 125 MHz) e expansões.....	95
Figura 66 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -NOESY de AP-10 protonado (CD_3OD , 500 x 500 MHz) e expansão.	96
Figura 67 - Espectro de NOE Seletivo de AP-10 protonado, obtido por irradiação no hidrogênio em δ_{H} 3,99 (H-21) (CD_3OD , 500 MHz).....	96
Figura 68 - Espectro de RMN ^1H de AP-10 desprotonado (CD_3OD , 500 MHz) e expansão da região entre 3,5 e 1,2 ppm.	97
Figura 69 - Espectro de RMN ^{13}C -CPD de AP-10 desprotonado (CD_3OD , 125 MHz).....	98
Figura 70 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC de AP-10 desprotonado (CD_3OD , 500 x 125 MHz) e expansão.	98
Figura 71 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY de AP-10 desprotonado (CD_3OD , 500 x 500 MHz) e expansão.	99
Figura 72 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de AP-10 desprotonado (CD_3OD , 500 x 125 MHz) e expansões.....	99
Figura 73 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -NOESY de AP-10 desprotonado (CD_3OD , 500 x 500 MHz) e expansão.	100
Figura 74 - Espectro de RMN ^1H de AP-10 protonado [$(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 500 MHz] a 80 °C e expansão da região correspondente aos hidrogênios aromáticos em δ_{H} 7,0-7,9.	100
Figura 75 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY de AP-10 protonado [$(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 500 x 500 MHz] a 70 °C e expansão da região aromática.....	101
Figura 76 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMQC de AP-10 protonado [$(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 500 x 125 MHz] a 70 °C e expansão da região aromática.....	101
Figura 77 - Espectro de RMN ^{13}C -CPD de AP-10 protonado [$(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 125 MHz] a 70 °C.....	102
Figura 78 - Subestruturas com setas mostrando algumas importantes correlações à longa distância ^1H - ^{13}C observadas no espectro HMBC do composto AP-2.	104
Figura 79 - Estrutura do composto AP-2.	105
Figura 80 - Estruturas dos compostos AP-9 e AP-10.	105
Figura 81 - Comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C dos compostos protonados AP-10 (I: 500 e 75 MHz, CD_3OD) e AP-2 (II: 500 e 75 MHz, CD_3OD), e comparação de AP-2 (III) com dados da literatura para o alcaloide 15-desmetoxipirifolina (IV; ARAÚJO JR. <i>et al.</i> , 2007), ambos em CDCl_3 a 500 e 125 MHz. Asterisco indica hidrogênio não detectado. .	106

Figura 82 - Estrutura tridimensional do composto AP-2 protonado, com setas duplas mostrando acoplamentos dipolares observados no espectro NOESY (A), e modelo molecular 3D obtido pelo programa “ChemSketch” (B).	106
Figura 83 - Estrutura do composto AP-2, em sua forma neutra, identificado como o alcaloide plumerano (+)-15-desmetoxipirifolina.....	108
Figura 84 - Espectro de massa de alta resolução de AP-2, obtido por ESI, mostrando o pico da molécula protonada $[M + H]^+$ em m/z 353,2287.....	109
Figura 85 - Espectro de absorção na região do infravermelho de AP-2 (obtido no suporte UATR).....	109
Figura 86 - Espectro de RMN 1H de AP-2 protonado (CD_3OD , com supressão do sinal da água, 500 MHz) e expansões.....	110
Figura 87 - Espectro de RMN ^{13}C -CPD (A) e DEPT 135 (B) de AP-2 protonado (CD_3OD , 75 MHz).	111
Figura 88 - Espectro de RMN 2D $^1H, ^{13}C$ -HSQC de AP-2 protonado (CD_3OD , 500 x 125 MHz) e expansão.	111
Figura 89 - Espectro de RMN 2D $^1H, ^{13}C$ -HMBC de AP-2 protonado (CD_3OD , 500 x 125 MHz) e expansões.....	112
Figura 90 - Espectro de RMN 2D $^1H, ^1H$ -COSY de AP-2 protonado (CD_3OD , 500 x 500 MHz) e expansão.	112
Figura 91 - Espectro de RMN 2D $^1H, ^1H$ -NOESY de AP-2 protonado (CD_3OD , 500 x 500 MHz) e expansão.	113
Figura 92 - Estrutura do alcaloide pirifolina.	115
Figura 93 - Estrutura tridimensional do composto AP-3 protonado, mostrando setas duplas que indicam os acoplamentos dipolares vistos no espectro NOESY (A), e modelo molecular 3D obtido no programa “ChemSketch” (B).....	116
Figura 94 - Comparação dos dados de RMN 1H e ^{13}C do composto AP-3 protonado (II e III) com aqueles descritos anteriormente para AP-2 protonado (I), e dados da literatura para o alcaloide pirifolina (IV; OLIVEIRA, 1999) (I: 500 e 75 MHz, CD_3OD ; II: 500 e 125 MHz, C_5D_5N ; III: 300 e 75 MHz, $CDCl_3$; IV: 300 e 75 MHz, $CDCl_3$).....	117
Figura 95 - Estrutura do composto AP-3, em sua forma neutra, identificado como o alcaloide plumerano (+)-pirifolina.....	118
Figura 96 - Espectro de massa de alta resolução de AP-3, obtido por ESI, mostrando o pico da molécula protonada $[M + H]^+$ em m/z 383,2386.....	119

Figura 97 - Espectro de massa de baixa resolução de AP-3, obtido por impacto eletrônico a 70 eV.	119
Figura 98 - Espectro de absorção na região do infravermelho de AP-3 (obtido no suporte UATR).....	119
Figura 99 - Espectro de RMN ^1H de AP-3 protonado ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, com supressão do sinal da água, 500 MHz) e expansão da região entre 3,8 e 1,0 ppm.	120
Figura 100 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY de AP-3 protonado ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 x 500 MHz) e expansão.	121
Figura 101 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC de AP-3 protonado ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 x 125 MHz) e expansão.	121
Figura 102 - Espectro de RMN ^{13}C -CPD (A) e DEPT 135 (B) de AP-3 protonado ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz).	122
Figura 103 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de AP-3 protonado ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 x 125 MHz) e expansões.....	122
Figura 104 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -NOESY de AP-3 protonado ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 x 500 MHz) e expansão.	123
Figura 105 - Estrutura proposta para o composto AP-1.....	125
Figura 106 - Subestruturas com setas mostrando algumas importantes correlações à longa distância ^1H - ^{13}C vistas no espectro HMBC de AP-1.....	126
Figura 107 - Estrutura tridimensional do composto AP-1, com setas duplas mostrando os acoplamentos dipolares observados no experimento NOESY (A), e modelo molecular 3D obtido pelo programa “ChemSketch” (B).	126
Figura 108 - Comparação dos valores de deslocamentos químicos de RMN ^1H e ^{13}C do composto AP-1 (I: $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 e 125 MHz; II: CDCl_3 , 500 e 125 MHz) com os dados publicados por ZÈCHES <i>et al.</i> (1995) para o alcaloide aspidoespermina (III: CDCl_3 , 300 e 75 MHz).	127
Figura 109 - Estrutura do composto AP-1, identificado como o alcaloide plumerano (+)-aspidoespermina.	128
Figura 110 - Espectro de massa de alta resolução de AP-1, obtido por ESI no modo positivo.	129
Figura 111 - Espectro de absorção na região do infravermelho de AP-1 (obtido no suporte UATR).....	129
Figura 112 - Espectro de RMN ^1H de AP-1 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz).	130

Figura 113 - Expansão da região entre 3,2 e 0,7 ppm do espectro de RMN ^1H de AP-1 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz).	130
Figura 114 - Espectro de RMN ^{13}C -CPD de AP-1 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz).	131
Figura 115 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC de AP-1 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 x 125 MHz). ...	131
Figura 116 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC de AP-1 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 x 125 MHz) editado com CH_2 (A) e editado sem CH_2 (B).	132
Figura 117 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de AP-1 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 x 125 MHz) e expansões.	133
Figura 118 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -NOESY de AP-1 (CD_3OD , 500 x 500 MHz) e expansão.	134
Figura 119 - Estrutura do alcaloide desmetoxiaspidospermina.	136
Figura 120 - Subestruturas com setas mostrando principais correlações a mais de uma ligação observadas no espectro HMBC do composto AP-4.	137
Figura 121 - Comparação dos valores de deslocamentos químicos de RMN ^1H e ^{13}C do composto AP-4 protonado (I: $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 e 125 MHz; II: CDCl_3 , 300 e 75 MHz) com os dados publicados por ATTA-UR-RAHMAN <i>et al.</i> (1991) para o alcaloide desmetoxiaspidospermina (III: CDCl_3 , 400 e 100 MHz). Asteriscos indicam carbonos não detectados.	138
Figura 122 - Estrutura tridimensional do composto AP-4 protonado, mostrando setas duplas que indicam as interações NOE vistas no espectro NOESY (A), e modelo molecular 3D obtido no programa “ChemSketch” (B).	138
Figura 123 - Estrutura do composto AP-4, em sua forma neutra, identificado como o alcaloide plumerano (+)-desmetoxiaspidospermina.	139
Figura 124 - Espectro de massa de alta resolução de AP-4, obtido por ESI, mostrando o pico da molécula protonada $[\text{M} + \text{H}]^+$ em m/z 325,2325.	140
Figura 125 - Espectro de absorção na região do infravermelho de AP-4 (obtido no suporte UATR).	140
Figura 126 - Espectro de RMN ^1H de AP-4 protonado ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz).	141
Figura 127 - Expansões do espectro de RMN ^1H de AP-4 protonado ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz).	142
Figura 128 - Espectro de RMN ^{13}C -CPD (A) e DEPT 135 (B) de AP-4 protonado ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz).	143
Figura 129 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC de AP-4 protonado ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 x 125 MHz) e expansão.	143

Figura 130 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY de AP-4 protonado ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz) e expansão.	144
Figura 131 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de AP-4 protonado ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 x 125 MHz) e expansões.	144
Figura 132 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -NOESY de AP-4 protonado ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 x 500 MHz) e expansão.	145
Figura 133 - Estrutura proposta para o composto AP-8.	148
Figura 134 - Importantes correlações a duas e três ligações ^1H - ^{13}C observadas no espectro HMBC de AP-8.	148
Figura 135 - Comparação dos deslocamentos químicos de RMN ^1H e ^{13}C dos compostos AP-9 (I: CD_3OD , 500 e 125 MHz) e AP-8 protonado (II: CD_3OD , 500 e 75 MHz) e desprotonado (III: CD_3OD , 500 e 125 MHz).	149
Figura 136 - Estrutura tridimensional do composto AP-8 desprotonado, mostrando setas que indicam os acoplamentos dipolares vistos no espectro NOESY (A), e modelo molecular 3D obtido no programa “ChemSketch” (B).	149
Figura 137 - Sistemas de numeração de alcaloides de esqueleto plumerano, baseados no sistema de nomenclatura IUPAC (a) e na biogenética desses alcaloides (b).	150
Figura 138 - Mecanismo hipotético para o rearranjo radicalar biogenético sugerido para a constrição do anel D do alcaloide plumerano AP-8.	150
Figura 139 - Estrutura do composto AP-8, um novo alcaloide denominado (-)-(3 <i>S</i> ,7 <i>S</i> ,21 <i>R</i>)- <i>rel</i> -(3 <i>aH</i>)-15(14→3)-abeo-2,16,17,20,6,7-hexahidro-15 <i>H</i> ,8 <i>aH</i> ,16 <i>a</i> ,20 <i>a</i> -etano-1 <i>H</i> -indolizino[3,1- <i>cd</i>]carbazol.	152
Figura 140 - Espectro de massa de alta resolução de AP-8, obtido por ESI (A), e espectro de massa EM/EM obtido a partir do íon precursor em <i>m/z</i> 281,00 (B).	153
Figura 141 - Espectro de absorção na região do infravermelho de AP-8 (obtido no suporte UATR).	153
Figura 142 - Espectro de RMN ^1H de AP-8 protonado (CD_3OD , 500 MHz), com detalhe para a expansão entre 7,3 e 6,7 ppm (A), e expansão da região entre 4,2 e 2,9 ppm (B). ..	154
Figura 143 - Expansão da região entre 2,2 e 1,5 ppm do espectro de RMN ^1H de AP-8 protonado (CD_3OD , 500 MHz).	155
Figura 144 - Espectro de RMN ^{13}C -CPD (A) e DEPT 135 (B) de AP-8 protonado (CD_3OD , 75 MHz).	155
Figura 145 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC de AP-8 protonado (CD_3OD , 500 x 125 MHz) e expansão.	156

Figura 146 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY de AP-8 protonado (CD_3OD , 500 x 500 MHz) e expansão.	156
Figura 147 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de AP-8 protonado (CD_3OD , 500 x 125 MHz) e expansões.....	157
Figura 148 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -NOESY de AP-8 protonado (CD_3OD , 500 x 500 MHz) e expansão.	158
Figura 149 - Espectro de RMN ^1H de AP-8 desprotonado (CD_3OD , 500 MHz), com detalhe para a expansão entre 7,3 e 6,6 ppm (A), e expansão da região entre 3,7 e 2,7 ppm (B).	159
Figura 150 - Expansão da região entre 2,2 e 1,2 ppm do espectro de RMN ^1H de AP-8 desprotonado (CD_3OD , 500 MHz).	160
Figura 151 - Espectro de RMN ^{13}C -CPD (A) e DEPT 135 (B) de AP-8 desprotonado (CD_3OD , 125 MHz).....	160
Figura 152 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC de AP-8 desprotonado (CD_3OD , 500 x 125 MHz) e expansão.	161
Figura 153 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY de AP-8 desprotonado (CD_3OD , 500 x 500 MHz) e expansão.	161
Figura 154 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de AP-8 desprotonado (CD_3OD , 500 x 125 MHz) e expansões.....	162
Figura 155 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -NOESY de AP-8 desprotonado (CD_3OD , 500 x 500 MHz) e expansão.	162
Figura 156 - Estrutura do alcaloide <i>N</i> -metilacuamidina.	164
Figura 157 - Estruturas com setas mostrando importantes correlações ^1H - ^{13}C à longa distância, observadas no espectro HMBC de AP-11.	165
Figura 158 - Assinalamento dos deslocamentos químicos de RMN ^1H e ^{13}C do composto AP-11 (CD_3OD , 500 e 125 MHz).....	165
Figura 159 - Estruturas com setas duplas mostrando os acoplamentos dipolares observados no espectro NOESY do composto AP-11 (A), e modelo molecular 3D obtido no programa “ChemSketch” (B).	166
Figura 160 - Estrutura de AP-11, identificado como o alcaloide quaternário (-)- <i>N</i> -metilacuamidina.....	167
Figura 161 - Espectro de massa de alta resolução de AP-11, obtido por ESI no modo positivo (A), e espectro de massa EM/EM obtido a partir do íon precursor em m/z 367,00 (B).	168

Figura 162 - Espectro de absorção na região do infravermelho de AP-11 (obtido no suporte UATR).....	168
Figura 163- Espectro de RMN ^1H de AP-11 (CD_3OD , 500 MHz).....	169
Figura 164 - Expansões do espectro de RMN ^1H de AP-11 (CD_3OD , 500 MHz).	169
Figura 165 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY de AP-11 (CD_3OD , 500 x 500 MHz) e expansão.	170
Figura 166 - Espectro de RMN ^{13}C -CPD (A) e APT (B) de AP-11 (CD_3OD , 125 MHz).	170
Figura 167 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC de AP-11 (CD_3OD , 500 x 125 MHz) e expansão.	171
Figura 168 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de AP-11 (CD_3OD , 500 x 125 MHz) e expansões.	172
Figura 169 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -NOESY de AP-11 (CD_3OD , 500 x 500 MHz) e expansão.	173
Figura 170 - Esqueleto básico de um iridoide.	175
Figura 171 - Estruturas mostrando importantes correlações ^1H - ^{13}C a duas e três ligações observadas no espectro HMBC de AP-5.....	176
Figura 172 - Acoplamentos dipolares observados nos espectros de NOE Seletivo do composto AP-5 (A) e modelo molecular 3D obtido no programa “ChemSketch” (B).	176
Figura 173 - Estrutura do composto AP-5, identificado como o iridoide (-)-ácido logânico.	178
Figura 174 - Espectro de massa de alta resolução de AP-5, obtido por ESI operando em modo positivo (A) e modo negativo (B).	179
Figura 175- Espectro de absorção na região do infravermelho de AP-5 (obtido no suporte UATR).....	179
Figura 176 - Espectro de RMN ^{13}C -CPD (A) e APT (B) de AP-5 (CD_3OD , 125 MHz).	180
Figura 177 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC de AP-5 (CD_3OD , 500 x 125 MHz) e expansão.	180
Figura 178 - Espectro de RMN ^1H de AP-5 (CD_3OD , com supressão do sinal da água, 500 MHz).	181
Figura 179 - Expansão do espectro de RMN ^1H de AP-5 mostrando a região entre 4,1 e 1,0 ppm.	181
Figura 180 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY de AP-5 (CD_3OD , 500 x 500 MHz)....	182
Figura 181 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de AP-5 (CD_3OD , 500 x 125 MHz) e expansões.	182

Figura 182 - Espectro de NOE Seletivo de AP-5, com irradiação no hidrogênio em δ_H 1,65 (H-6 α) (CD ₃ OD, 500 MHz).	183
Figura 183 - Espectro de NOE Seletivo de AP-5, com irradiação no hidrogênio em δ_H 1,87 (H-8) (CD ₃ OD, 500 MHz).	183
Figura 184 - Espectro de NOE Seletivo de AP-5, com irradiação no hidrogênio em δ_H 2,03 (H-9) (CD ₃ OD, 500 MHz).	184
Figura 185 - Espectro de NOE Seletivo de AP-5, com irradiação no hidrogênio em δ_H 2,24 (H-6 β) (CD ₃ OD, 500 MHz).....	184
Figura 186 - Espectro de NOE Seletivo de AP-5, com irradiação no hidrogênio em δ_H 3,09 (H-5) (CD ₃ OD, 500 MHz).	185
Figura 187 - Comparação dos valores de deslocamentos químicos de RMN ¹ H e ¹³ C dos compostos AP-5 e AP-7 (CD ₃ OD, 500 e 125 MHz).	187
Figura 188 - Estrutura do composto AP-7, identificado como o iridoide (-)-loganina.	188
Figura 189 - Espectro de massa de alta resolução de AP-7, obtido por ESI operando em modo positivo (A) e modo negativo (B).	189
Figura 190 - Espectro de absorção na região do infravermelho de AP-7 (obtido no suporte UATR).....	189
Figura 191 - Espectro de RMN ¹ H de AP-7 (CD ₃ OD, 500 MHz).....	190
Figura 192 - Expansão da região entre 5,3 e 3,1 ppm do espectro de RMN ¹ H de AP-7 (CD ₃ OD, 500 MHz).....	190
Figura 193 - Expansão da região entre 2,3 e 1,0 ppm do espectro de RMN ¹ H de AP-7 (CD ₃ OD, 500 MHz).....	191
Figura 194 - Espectro de RMN ¹³ C-CPD (A) e APT (B) de AP-7 (CD ₃ OD, 125 MHz). .	191
Figura 195 - Espectro de RMN 2D ¹ H, ¹³ C-HSQC de AP-7 (CD ₃ OD, 500 x 125 MHz) e expansão.	192
Figura 196 - Espectro de RMN 2D ¹ H, ¹³ C-HMBC de AP-7 (CD ₃ OD, 500 x 125 MHz) e expansões.	192
Figura 197 - Espectro de RMN 2D ¹ H, ¹ H-COSY de AP-7 (CD ₃ OD, 500 x 500 MHz) e expansão.	193
Figura 198 - Espectro de NOE Seletivo de AP-7, com irradiação no hidrogênio em δ_H 5,27 (H-1) (CD ₃ OD, 500 MHz).	193
Figura 199 - Espectro de NOE Seletivo de AP-7, com irradiação no hidrogênio em δ_H 4,65 (H-1') (CD ₃ OD, 500 MHz).	194

Figura 200 - Espectro de NOE Seletivo de AP-7, com irradiação no hidrogênio em δ_H 4,04 (H-7) (CD ₃ OD, 500 MHz).	194
Figura 201 - Espectro de NOE Seletivo de AP-7, com irradiação no hidrogênio em δ_H 3,11 (H-5) (CD ₃ OD, 500 MHz).	195
Figura 202 - Espectro de NOE Seletivo de AP-7, com irradiação no hidrogênio em δ_H 2,03 (H-9) (CD ₃ OD, 500 MHz).	195
Figura 203 - Espectro de NOE Seletivo de AP-7, com irradiação no hidrogênio em δ_H 1,87 (H-8) (CD ₃ OD, 500 MHz).	196
Figura 204 - Espectro de NOE Seletivo de AP-7, com irradiação no hidrogênio em δ_H 1,62 (H-6 α) (CD ₃ OD, 500 MHz).	196
Figura 205 - Espectro de NOE Seletivo de AP-7, com irradiação no hidrogênio em δ_H 1,09 (H-10) (CD ₃ OD, 500 MHz).....	197
Figura 206 - Estruturas com setas mostrando correlações ¹ H- ¹³ C à longa distância, observadas no espectro HMBC de AP-6.....	199
Figura 207 - Estrutura do composto AP-6, identificado como o ácido 2-hidroxi-3- <i>O</i> - β -D-glicopiranosiloxi-benzóico.	200
Figura 208 - Espectro de massa de alta resolução de AP-6, obtido por ESI em modo positivo (A) e modo negativo (B).	201
Figura 209 - Espectro na região do infravermelho de AP-6 (obtido no suporte UATR)...	201
Figura 210 - Espectro de RMN ¹ H de AP-6 (CD ₃ OD, 300 MHz).....	202
Figura 211 - Espectro de RMN 2D ¹ H, ¹ H-COSY de AP-6 (CD ₃ OD, 300 x 300 MHz)....	202
Figura 212 - Espectro de RMN ¹³ C-CPD (A) e DEPT 135 (B) de AP-6 (CD ₃ OD, 75 MHz).	203
Figura 213 - Espectro de RMN 2D ¹ H, ¹³ C-HSQC de AP-6 (CD ₃ OD, 300 x 75 MHz) e expansão.	203
Figura 214 - Espectro de RMN 2D ¹ H, ¹³ C-HMBC de AP-6 (CD ₃ OD, 300 x 75 MHz) e expansões.	204
Figura 215 - Correlações à longa distância observadas no espectro HMBC do composto AP-12.	206
Figura 216 - Estrutura do composto AP-12, identificado como o ciclitol (-)-2- <i>O</i> -metil-L- <i>quiro</i> -inositol.	207
Figura 217 - Espectro de massa de alta resolução de AP-12, obtido por ESI em modo positivo.	208
Figura 218 - Espectro de RMN ¹ H de AP-12 (D ₂ O, 300 MHz).	208

Figura 219 - Expansão do espectro de RMN ¹ H de AP-12 (D ₂ O, 300 MHz).	209
Figura 220 - Espectro de RMN ¹³ C-CPD de AP-12 (D ₂ O, 75 MHz).	209
Figura 221 - Espectro de RMN ¹³ C-DEPT 135 de AP-12 (D ₂ O, 75 MHz).	210
Figura 222 - Espectro de RMN 2D ¹ H, ¹³ C-HSQC de AP-12 (D ₂ O, 300 x 75 MHz).	210
Figura 223 - Espectro de RMN 2D ¹ H, ¹ H-COSY de AP-12 (D ₂ O, 300 x 300 MHz).	211
Figura 224 - Espectro de RMN 2D ¹ H, ¹³ C-HMBC de AP-12 (D ₂ O, 300 x 75 MHz).	211
Figura 225 - Compostos isolados a partir do estudo fitoquímico do extrato etanólico das sementes de <i>Aspidosperma pyrifolium</i>	212
Figura 226 - O efeito de APSE-Aq na contorção abdominal induzida por ácido acético. Os valores são expressos como média ± EPM do número de observações. a) versus controle (n = 6); b) versus APSE-Aq 50 mg/Kg (n = 6); c) versus APSE-Aq 100 mg/Kg (n = 5); P < 0,0001 (one-way ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keul's <i>pos hoc</i>).	213
Figura 227 - Estruturas do anti-inflamatório indometacina e do analgésico morfina.	214
Figura 228 - O efeito de APSE-Aq no teste da formalina. A figura mostra o tempo de lambertura da pata (em segundos) nas fases inicial e final. Os valores são expressos como média ± EPM do número de observações. a) versus controle; b) versus APSE-Aq 1 mg/Kg; c) versus APSE-Aq 10 mg/Kg; P < 0,0001 (one-way ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keul's <i>pos hoc</i>).	214
Figura 229 - Curso de tempo do efeito do tratamento de APSE-Aq sobre o edema de pata induzido por carragenina (1%). Os valores são expressos como média ± EPM do número de observações. * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001 versus controle (two-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni <i>post hoc</i>).	215
Figura 230 - Cromatograma resultante da eluição isocrática da fração APSE-D(7)-(32-35), com solução aquosa ácida de TFA 0,1% em CH ₃ CN (73:27). Varredura de 215-400 nm.	223
Figura 231 - Cromatograma resultante da eluição isocrática da fração APSE-Aq-S(6)-1, com solução aquosa ácida de TFA 0,2% em CH ₃ CN (90:10). Varredura de 200-400 nm.	226
Figura 232 - Cromatograma resultante da eluição isocrática da fração APSE-Aq-TR 3,5, com solução aquosa ácida de TFA 0,2% em CH ₃ CN (85:15). Comprimento de onda: 262 nm.	227
Figura 233 - Cromatograma obtido por eluição isocrática da fração APSE-Aq-TR 7,0, utilizando mistura ternária composta por 15% de CH ₃ CN-CH ₃ OH (40:60) e 85% de solução aquosa ácida de TFA 0,2%. Comprimento de onda: 254 nm.	227

Figura 234 - Cromatograma resultante da eluição isocrática da fração APSE-Aq-TR 8,7, utilizando solução aquosa ácida de TFA 0,2% em CH ₃ CN (70:30). Comprimento de onda: 254 nm.....	228
Figura 235 - Cromatograma resultante da eluição isocrática da sub-fração APSE-PID-R-E-(15-18)-(11-12), utilizando solução aquosa ácida de TFA 0,1% em CH ₃ OH (65:35). Comprimento de onda: 254 nm.	232
Figura 236 - Cromatograma resultante da eluição isocrática da fração DEC-APS-M(17), utilizando solução aquosa ácida de TFA 0,1% em CH ₃ OH (65:35). Comprimento de onda: 254 nm.....	233
Figura 237 - Fluxograma representando o procedimento experimental utilizado para o isolamento dos compostos AP-1 a AP-12, a partir do estudo fitoquímico das sementes de <i>Aspidosperma pyrifolium</i>	234
Figura 238 - Continuação do fluxograma representando o procedimento experimental realizado a partir da fração APSE-Aq.....	235

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação quimiotaxonômica das espécies de <i>Aspidosperma</i> em séries.....	33
Tabela 2 - Quantidade de registros encontrados para <i>Aspidosperma pyrifolium</i> por estados e regiões do Brasil.....	36
Tabela 3 - Espécies da família Apocinaceae contidas no levantamento bibliográfico e alcaloides isolados das mesmas.....	49
Tabela 4 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C do composto AP-9 protonado (500 e 125 MHz, CD_3OD) e correlações a mais de uma ligação observadas no espectro HMBC.....	75
Tabela 5 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C do composto AP-10 protonado (500 e 75 MHz, CD_3OD), e correlações a mais de uma ligação observadas no espectro HMBC.....	91
Tabela 6 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C do composto AP-2 protonado (500 e 75 MHz, CD_3OD), e correlações a mais de uma ligação observadas no espectro HMBC.....	108
Tabela 7 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C do composto AP-3 protonado (500 e 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$), e correlações a mais de uma ligação observadas no espectro HMBC.....	118
Tabela 8 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C do composto AP-1 (500 e 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$), e correlações a mais de uma ligação observadas no espectro HMBC.....	128
Tabela 9 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C do composto AP-4 protonado (500 e 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$), e correlações a mais de uma ligação observadas no espectro HMBC.....	139
Tabela 10 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C do composto AP-8 protonado (500 e 75 MHz, CD_3OD), e correlações a mais de uma ligação observadas no espectro HMBC.....	152
Tabela 11 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C de AP-11 (500 e 125 MHz, CD_3OD), e correlações a mais de uma ligação observadas no espectro HMBC.....	167
Tabela 12 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C do composto AP-5 (500 e 125 MHz, CD_3OD), correlações à longa distância vistas no espectro HMBC e comparação com os dados de RMN ^{13}C registrados na literatura.....	178
Tabela 13 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C do composto AP-7 (500 e 125 MHz, CD_3OD), correlações à longa distância vistas no espectro HMBC e comparação com os valores de RMN ^{13}C da literatura registrados por LIN <i>et al.</i> (2011).....	188
Tabela 14 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C do composto AP-6 (300 e 75 MHz, CD_3OD), correlações à longa distância vistas no espectro HMBC e comparação com os valores de RMN ^{13}C da literatura.....	200

Tabela 15 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C do composto AP-12 (300 e 75 MHz, D_2O), correlações à longa distância vistas no espectro HMBC e comparação com os dados de RMN ^{13}C da literatura.	207
Tabela 16 - Frações provenientes das partições líquido-líquido de alíquotas do extrato etanólico das sementes de <i>Aspidosperma pyrifolium</i>	221
Tabela 17 - Frações coletadas por cromatografia de desadsorção seletiva de APSE-D....	222
Tabela 18 - Frações coletadas a partir da cromatografia em cartucho C18 de APSE-D(7).	223
Tabela 19 - Frações obtidas por CLAE de APSE-D(7)-(32-35) utilizando solução aquosa ácida de TFA 0,1% em CH_3CN (73:27).....	224
Tabela 20 - Frações resultantes da cromatografia de exclusão molecular da fração APSE-Aq.....	224
Tabela 21 - Frações resultantes da cromatografia de exclusão molecular da fração APSE-Aq-S(4-5).	225
Tabela 22 - Frações coletadas por cromatografia de desadsorção seletiva de APSE-Aq-Sol-D.....	229
Tabela 23 - Frações coletadas a partir da cromatografia em coluna de APSE-Aq-Sol-D(6)-12.	230
Tabela 24 - Frações resultantes da cromatografia de exclusão molecular da fração APSE-PID-R.	231
Tabela 25 - Frações coletadas por cromatografia de desadsorção seletiva de APSE-PID-R-E.	231

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1D e 2D	Unidimensional e Bidimensional
APSE	Extrato Etanólico das Sementes de <i>Aspidosperma pyrifolium</i>
APSH	Extrato Hexânico das Sementes de <i>Aspidosperma pyrifolium</i>
APT	<i>Attached Proton Test</i>
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CENAUREMN	Centro Nordeste de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
CPD	<i>Composite Pulse Decoupling</i>
D1	<i>Relaxation Delay</i> (Tempo de espera da relaxação)
DEC-APS	Decocto das Sementes de <i>Aspidosperma pyrifolium</i>
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
EM	Espectrometria de Massa
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
IDH	Índice de Deficiência de Hidrogênio
IE	Impacto Eletrônico
IV	Infravermelho
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
NOE	<i>Nuclear Overhauser Effect</i> (Efeito Overhauser Nuclear)
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>
NS	<i>Number of Scans</i> (Número de pulsos)
P1	<i>f1 channel - 90 degree high power pulse</i>
PDA	<i>Photo Diodo Array</i>
ppm	Parte Por Milhão
RMN ¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Prótio
SI	<i>Size of the real spectrum</i>
TD	<i>Time Domain, number of acquired data points</i>
TFA	<i>Trifluoroacetic Acid</i> (Ácido Trifluoroacético)
UATR	<i>Universal Attenuated Total Reflectance Accessory</i>

SUMÁRIO

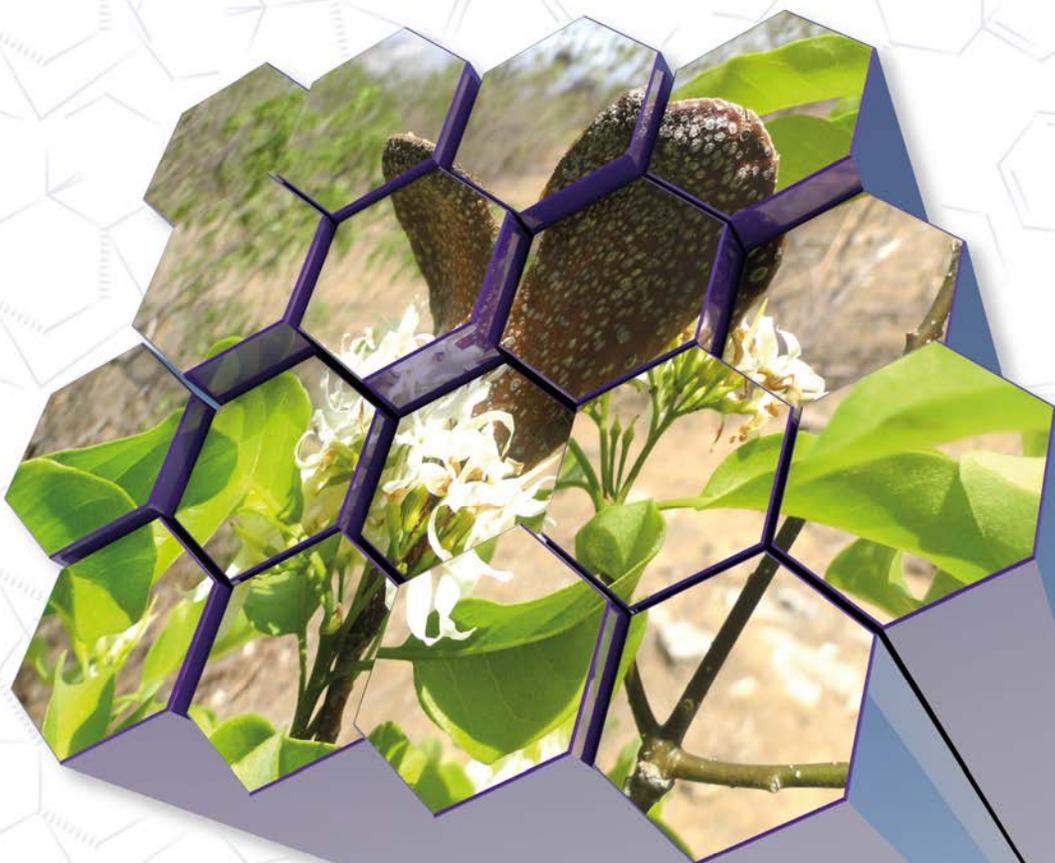
1	INTRODUÇÃO.....	25
2	CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE <i>ASPIDOSPERMA PYRIFOLIUM</i> MART..	30
2.1	CONSIDERAÇÕES SOBRE A FAMÍLIA APOCINACEAE	30
2.2	CONSIDERAÇÕES SOBRE O GÊNERO <i>ASPIDOSPERMA</i>	32
2.3	CONSIDERAÇÕES SOBRE <i>ASPIDOSPERMA PYRIFOLIUM</i> MART.	33
3	LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO: ALCALOIDES PLUMERANOS	39
3.1	BIOSSÍNTESE	40
3.2	CARACTERÍSTICAS ESPECTROSCÓPICAS	44
3.3	DADOS DE RMN RELATADOS NA LITERATURA	46
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
4.1	DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE AP-9.....	67
4.2	DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE AP-10.....	85
4.3	DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE AP-2.....	103
4.4	DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE AP-3.....	114
4.5	DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE AP-1.....	124
4.6	DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE AP-4.....	135
4.7	DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE AP-8.....	146
4.8	DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE AP-11.....	163
4.9	DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE AP-5.....	174
4.10	DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE AP-7.....	186
4.11	DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE AP-6.....	198
4.12	DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE AP-12.....	205
4.13	ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA	213
5	PARTE EXPERIMENTAL.....	216
5.1	MATERIAL VEGETAL	216
5.2	MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	216
5.2.1	<i>Cromatografia de exclusão molecular</i>	216
5.2.2	<i>Cromatografia em Camada Delgada (CCD)</i>	216
5.2.3	<i>Cromatografia em coluna</i>	216
5.2.4	<i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)</i>	216
5.3	MÉTODOS ESPECTROMÉTRICOS E ESPECTROSCÓPICOS.....	217
5.3.1	<i>Espectroscopia na região do infravermelho (IV)</i>	217

5.3.2	<i>Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Prótio (RMN ¹H) e de Carbono-13 (RMN ¹³C)</i>	217
5.3.3	<i>Espectrometria de massa (EM)</i>	219
5.4	MÉTODOS FÍSICOS DE ANÁLISE.....	219
5.4.1	<i>Determinação do ponto de fusão (p.f.)</i>	219
5.4.2	<i>Determinação da rotação óptica</i>	220
5.5	ESTUDO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DE <i>ASPIDOSPERMA PYRIFOLIUM</i> MART.	220
5.5.1	<i>Preparação dos extratos hexânico (APSH) e etanólico (APSE) das sementes de A. pyrifolium e isolamento de AP-12</i>	220
5.5.2	<i>Preparação do decocto das sementes de A. pyrifolium (DEC-APS)</i>	220
5.5.3	<i>Partição líquido-líquido de APSE</i>	221
5.5.4	<i>Partição sólido-líquido de DEC-APS</i>	221
5.6	ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS.....	222
5.6.1	<i>Cromatografia de desadsorção seletiva da fração APSE-D e isolamento de AP-1</i>	222
5.6.2	<i>Cromatografia em cartucho C18 da fração APSE-D(7)</i>	222
5.6.3	<i>CLAE da fração APSE-D(7)-(32-35) e isolamento de AP-2, AP-3 e AP-4</i>	223
5.6.4	<i>Cromatografia de exclusão molecular de APSE-Aq</i>	224
5.6.5	<i>Cromatografia de exclusão molecular de APSE-Aq-S(4-5)</i>	225
5.6.6	<i>CLAE das frações APSE-Aq-S(3), APSE-Aq-S(4-5)-3, APSE-Aq-S(4-5)-4 e APSE-Aq-S(6)</i>	225
5.6.7	<i>CLAE de APSE-Aq-S(6)-1 e isolamento de AP-5</i>	226
5.6.8	<i>CLAE de APSE-Aq-TR 3,5 e isolamento de AP-6 e AP-7</i>	226
5.6.9	<i>CLAE de APSE-Aq-TR 7,0 e isolamento de AP-8 e AP-9</i>	227
5.6.10	<i>CLAE de APSE-Aq-TR 8,7 e isolamento de AP-10</i>	228
5.6.11	<i>Partição líquido-líquido de APSE-Aq em solução saturada de NaCl</i>	228
5.6.12	<i>Cromatografia de desadsorção seletiva de APSE-Aq-Sol-D</i>	229
5.6.13	<i>Cromatografia em coluna de APSE-Aq-Sol-D(6)-12 e isolamento de AP-11</i>	229
5.6.14	<i>Partição sólido-líquido de APSE-PID</i>	230
5.6.15	<i>Cromatografia de exclusão molecular de APSE-PID-R</i>	230
5.6.16	<i>Cromatografia de desadsorção seletiva de APSE-PID-R-E</i>	231
5.6.17	<i>CLAE de APSE-PID-R-E-(15-18)-(11-12) e re-isolamento de AP-2, AP-6 e AP-10</i>	231
5.6.18	<i>Cromatografia de exclusão molecular de DEC-APS-M</i>	232

5.6.19	<i>CLAE de DEC-APS-M(17) e re-isolamento de AP-6</i>	232
5.6.20	<i>Tratamento dos compostos AP-8, AP-9 e AP-10</i>	233
5.7	ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA	236
5.7.1	<i>Animais</i>	236
5.7.2	<i>Protocolo experimental</i>	236
5.7.3	<i>Contorção abdominal induzida por ácido acético</i>	236
5.7.4	<i>Teste da formalina</i>	236
5.7.5	<i>Edema de pata induzido por carragenina</i>	237
5.7.6	<i>Análises estatísticas</i>	237
6	CONCLUSÃO	238
	REFERÊNCIAS	239

Capítulo 1

Introdução



1 INTRODUÇÃO

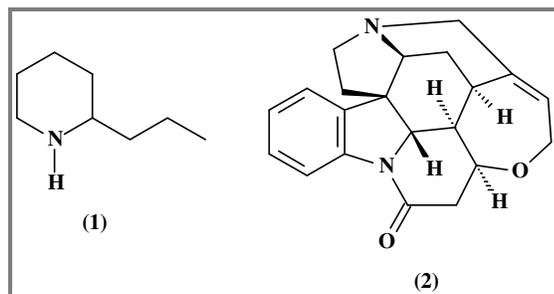
As plantas ainda permanecem como uma das mais importantes fontes de compostos biologicamente ativos, contribuindo, ao longo dos anos, para a obtenção de vários fármacos, até hoje amplamente utilizados. Elas têm sido empregadas pelo homem no tratamento de numerosas enfermidades, abrangendo desde o combate ao câncer até o combate a microrganismos patogênicos (FOGLIO *et al.*, 2006).

No Brasil, grande parte da população encontra nas plantas medicinais a única fonte de recursos terapêuticos. Essa alternativa é utilizada tanto dentro de um contexto cultural, na medicina popular, quanto na forma de fitoterápicos. Muitas espécies de plantas são usadas empiricamente, sem respaldo científico quanto à sua eficácia e segurança. Apesar da diversidade da flora brasileira, poucas plantas foram estudadas quanto ao seu uso medicinal e, na maioria dos casos, sem grande aprofundamento nos aspectos fitoquímicos e farmacológicos, demonstrando o enorme potencial das plantas para a descoberta de novos fitoterápicos (FOGLIO *et al.*, 2006).

Dentre as diversas classes de compostos orgânicos bioativos, de origem natural, relatados na literatura, os alcaloides constituem a classe que mais contribui para a produção de medicamentos e preparações farmacêuticas (HEINRICH *et al.*, 2004). A prospecção química em espécies produtoras dessa classe de compostos é crescente e inúmeros trabalhos são relatados na literatura.

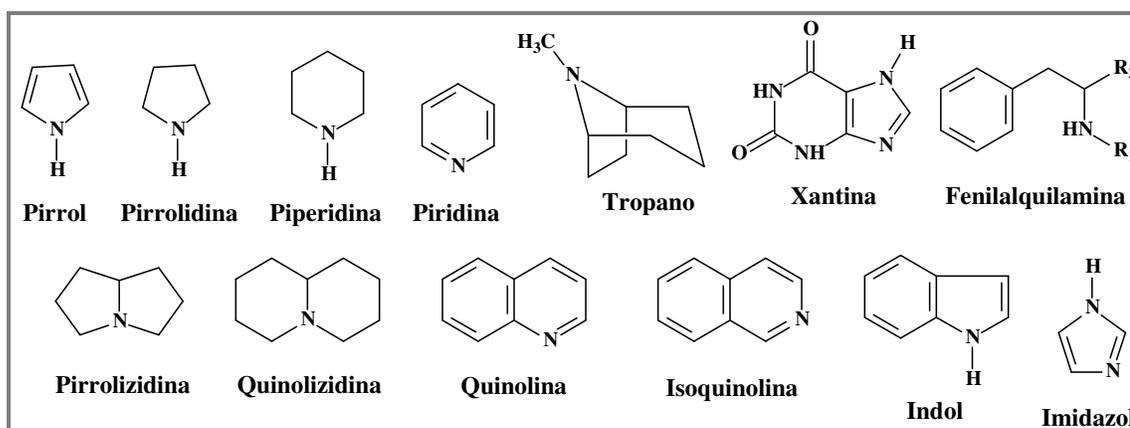
Os alcaloides constituem uma das maiores classes de metabólitos secundários, apresentando uma ampla diversidade estrutural e um elevado número de atividades biológicas. Eles são encontrados predominantemente em plantas angiospermas, e são biossinteticamente formados a partir de aminoácidos (FUMAGALI *et al.*, 2008; SIMÕES *et al.*, 2004). Quimicamente, variam desde compostos simples como a coniina (**1**), um alcaloide altamente venenoso isolado de *Conium maculatum*, até compostos bastante complexos como a estriquinina (**2**), uma toxina isolada da casca de *Strychnos* sp. (Figura 1, p. 26) (HARBORNE, 1984).

Figura 1 - Estruturas dos alcaloides coniina (1) e estriquinina (2).



A característica estrutural básica desses compostos é a presença de um ou mais átomos de nitrogênio heterocíclico, que lhes conferem características básicas, que são importantes para a química desses metabólitos, principalmente quando são envolvidas reações do tipo ácido-base (EL-SAYED; VERPOORTE, 2007). As inúmeras modificações do núcleo heterocíclico básico, e as diversas possibilidades de substituições, geraram uma subdivisão dos alcaloides em diferentes subclasses (Figura 2), baseada em núcleos básicos com precursores biossintéticos diferentes, cada uma delas podendo ser representada por substâncias medicamentosas bastante eficientes para determinados usos na medicina (HEINRICH *et al.*, 2004).

Figura 2 - Núcleos básicos das diferentes subclasses de alcaloides.



Por exemplo, dentre os alcaloides quinolínicos destaca-se a camptotecina (3) (Figura 3, p. 27), isolada de *Camptotheca acuminata* (Nyssaceaea), que possui grande atividade antitumoral. Devido à alta toxicidade e baixa solubilidade da camptotecina, a mesma foi substituída pelo seu derivado topotecan (4) (Figura 3, p. 27), utilizado para o

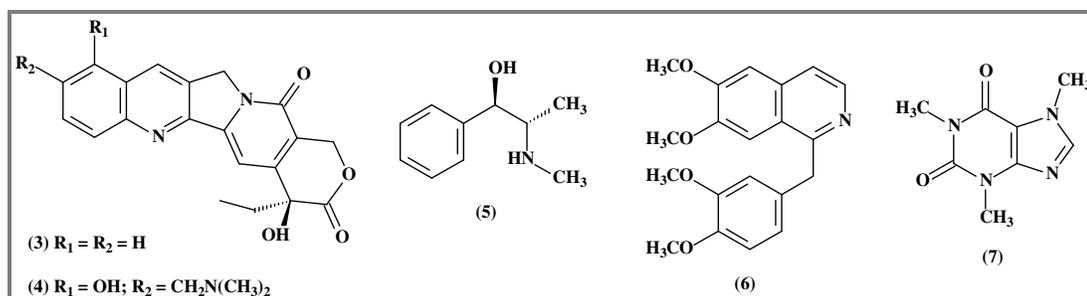
tratamento de casos avançados de câncer do ovário (HOSTETTMANN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003).

Na subclasse dos alcaloides fenilalquilamínicos convém destacar a efedrina (5) (Figura 3), isolada de *Ephedra sinica*, que é estimulante do Sistema Nervoso Central, além de apresentar propriedades vasoconstritora e broncodilatadora (HEINRICH *et al.*, 2004).

Dentre os alcaloides isoquinolínicos destaca-se a papaverina (6) (Figura 3), um agente antiespasmódico, presente nas formulações de alguns analgésicos, além de ser usada no tratamento de impotência sexual masculina (HEINRICH *et al.*, 2004).

Na subclasse xantina, um alcaloide bem conhecido é a cafeína (7) (Figura 3), que além das funções estimulante e diurética, é usado em combinação com alguns analgésicos (HEINRICH *et al.*, 2004).

Figura 3 - Estruturas dos alcaloides camptotecina (3), topotecan (4), efedrina (5), papaverina (6) e cafeína (7).

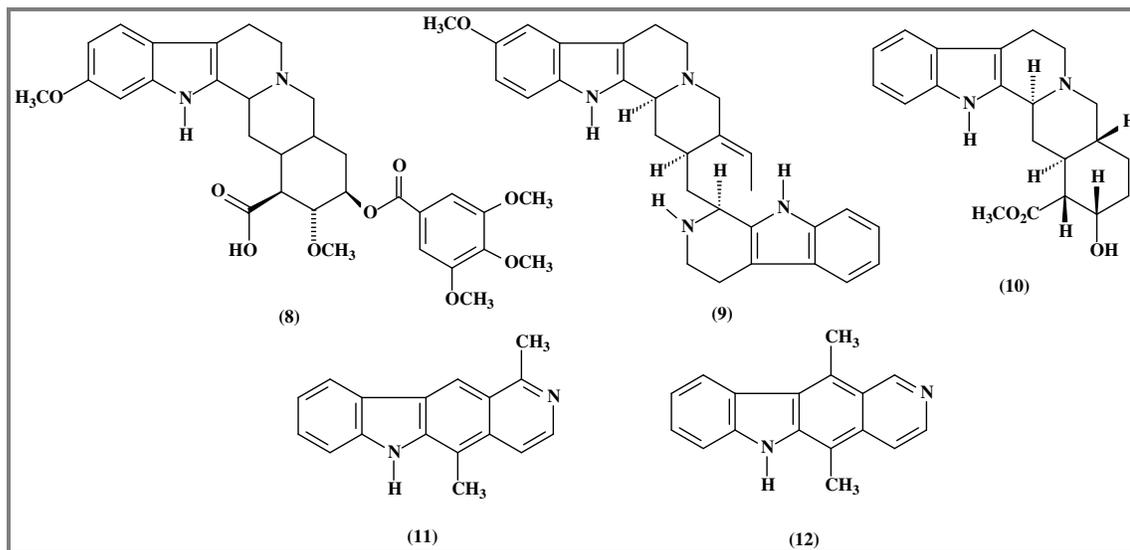


Uma subclasse bastante interessante é a dos alcaloides indólicos, encontrada principalmente em plantas das famílias Apocinaceae, Loganiaceae, Rubiaceae e Nissaceae, que tem sido alvo de muitos estudos devido à grandeza de suas diversidades estrutural e farmacológica (EL-SAYED; VERPOORTE, 2007). Como mostra a Figura 2 (p. 26), os alcaloides indólicos caracterizam-se estruturalmente pela presença de um sistema bicíclico, formado pelo anel benzênico fundido com o anel pirrólico, gerando o esqueleto que dá o nome a classe, conhecido como núcleo 1*H*-indol.

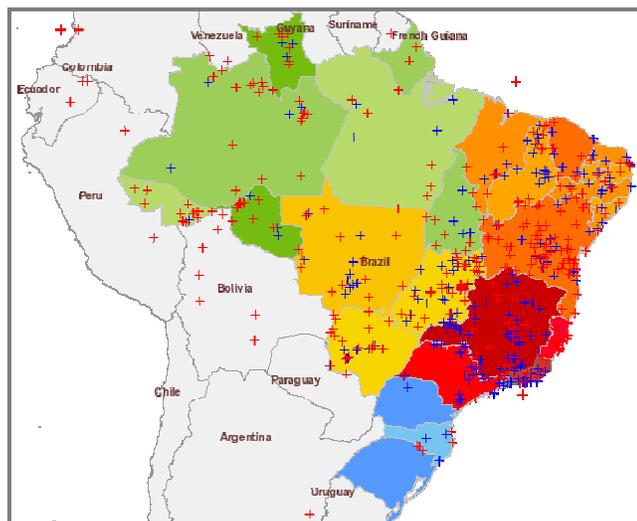
Diversas atividades biológicas são atribuídas aos alcaloides indólicos, como as atividades anti-hipertensiva do alcaloide reserpina (8) (GILANI; ATTA-UR-HAHMAN, 2005), antileishmania (TANAKA *et al.*, 2007), antibacteriana e antifúngica (OLIVEIRA *et al.*, 2009a) do alcaloide ramiflorina A (9), bloqueadora dos receptores α -adrenérgicos do alcaloide ioimbina (10) (OLIVEIRA *et al.*, 2009a), anticancerígena do alcaloide olivacina

(11) (FUMAGALI *et al.*, 2008) e antimalárica do alcaloide elipticina (12) (HENRIQUE; NUNOMURA; POHLIT, 2010) (Figura 4).

Figura 4 - Estruturas dos alcaloides indólicos reserpina (8), ramiflorina A (9), ioimbina (10), olivacina (11) e elipticina (12).



Na família Apocinaceae, destacam-se os gêneros *Catharanthus*, *Rauwolfia*, *Alstonia*, *Kopsia* e *Aspidosperma* como ricas fontes de alcaloides indólicos (ARAÚJO JR. *et al.*, 2007). O gênero *Aspidosperma* apresenta distribuição neotropical, se concentrando desde o México até a Argentina (exceto no Chile), sendo a maioria de suas espécies encontradas no Brasil (MATOZINHOS; KONNO, 2011) (Figura 5, p. 29). Vários estudos comprovam que os alcaloides indólicos são marcadores quimiotaxonômicos das espécies de *Aspidosperma*, devido à grande diversidade estrutural destes metabólitos isolados a partir de plantas desse gênero. Diversas atividades biológicas foram atribuídas aos alcaloides indólicos isolados de diferentes espécies de *Aspidosperma*, como as atividades hipotensora, analgésica e pró-erétil de *A. quebracho-blanco*, antimicrobiana e citotóxica de *A. marcgranianum*, antimicrobiana frente a *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* de *A. excelsum* (PEREIRA *et al.*, 2007), além das atividades anti-inflamatória, anticâncer, antimalárica, antiúlcera, antileishmania e cicatrizante (GUIMARÃES; BRAZ-FILHO; VIEIRA, 2012; MACABEO *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2009a).

Figura 5 - Mapa mostrando a distribuição geográfica de plantas do gênero *Aspidosperma*.

Fonte: www.splink.org.br. (Acesso em 03/09/2014)

Aspidosperma pyriforme, popularmente conhecida como pereiro-preto, é uma espécie bastante encontrada no Nordeste brasileiro e, embora já tenha sido muito estudada (CRAVEIRO; MATOS; SERUR, 1983; MITAINE *et al.*, 1996; PEREIRA *et al.*, 2007; SERUR; MATOS, 1981), ainda não existe relato na literatura do estudo fitoquímico de suas sementes, fato que motivou o presente estudo, a fim de investigar os metabólitos existentes nesta parte da planta, e, assim, contribuir com a quimiotaxonomia da espécie. Em virtude do uso etnofarmacológico de plantas do gênero *Aspidosperma* relatado na literatura, e da forte colaboração dos pesquisadores do LAFIPLAM-UFC com o grupo de pesquisa em Farmacologia da UFC, foi iniciado o estudo das atividades antinociceptiva e anti-inflamatória da fração aquosa do extrato etanólico das sementes de *A. pyriforme*, e de algumas substâncias isoladas a partir da mesma, visando contribuir com a caracterização dos possíveis constituintes químicos, ou princípio(s) ativo(s), responsáveis pelo uso etnofarmacológico de *A. pyriforme*.

Capítulo 2

Considerações Gerais Sobre Aspidosperma pyriformium Mart.



2 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE *ASPIDOSPERMA PYRIFOLIUM* MART.

2.1 Considerações sobre a família Apocinaceae

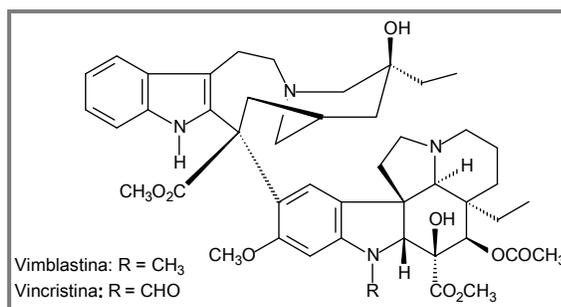
A família Apocinaceae pertence ao reino Plantae, divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, subclasse Asteridae e ordem Gentianales (BARROSO, 1991). Apocinaceae encontra-se entre as 10 maiores famílias de angiospermas e está predominantemente distribuída na região pantropical, com poucos representantes na região temperada. Ela inclui aproximadamente 424 gêneros e 3700 espécies, existindo no Brasil cerca de 95 gêneros e 850 espécies, sendo a maior concentração na região amazônica (SOUSA; LORENZI, 2008).

Várias árvores de Apocinaceae são utilizadas na decoração de ambientes, devido à beleza de suas flores, citando-se as plantas dos gêneros *Alamanda*, *Tabernaemontana*, *Catharanthus*, *Plumeria*, *Mandevilla* e *Nerium* (Figura 6). Outras plantas desta família são fornecedoras de madeira de ótima qualidade, muito utilizadas na fabricação de móveis e na construção civil, citando-se as perobas e guatambus (*Aspidosperma* spp.) (GUIMARÃES; BRAZ-FILHO; VIEIRA, 2012). Outras fornecem látex para a produção de borracha, como algumas espécies do gênero *Landolphia*, e para o preparo da goma de mascar, como *Apocynum* spp. e *Asclepias* spp. O fruto de *Hancornia speciosa*, conhecida por mangabeira, é utilizado na alimentação, geralmente no preparo de sucos e sorvetes (SANTOS *et al.*, 2013).

Figura 6 - Plantas da família Apocinaceae usadas na decoração de ambientes: *Alamanda* (A), *Catharanthus* (B) e *Plumeria* (C), conhecidas popularmente como alamanda rosa, boa-noite e jasmim-manga, respectivamente.

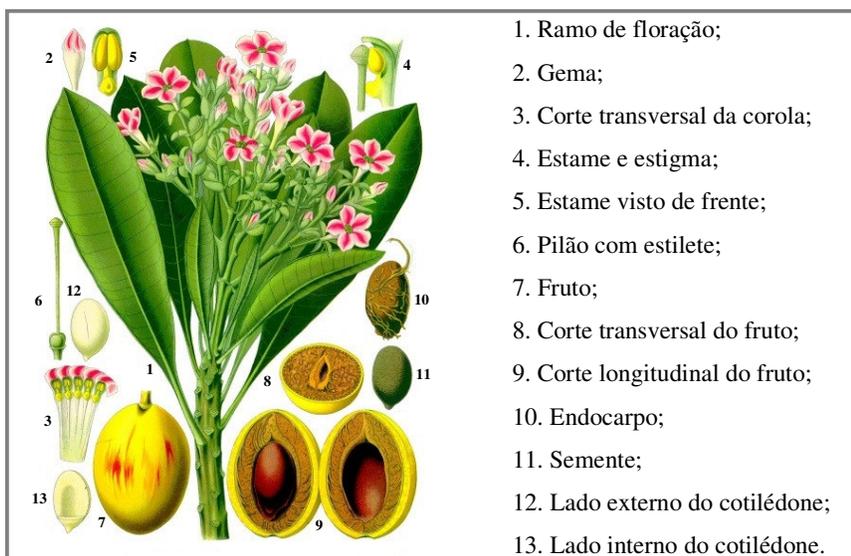


As plantas de Apocinaceae produzem compostos químicos como iridoides, glicosídeos cardioativos e alcaloides, sendo caracterizadas, principalmente, pela abundância de alcaloides. Destacam-se os gêneros *Catharanthus*, *Rauwolfia*, *Alstonia*, *Kopsia* e *Aspidosperma* como principais fontes daqueles compostos (ARAÚJO JR. *et al.*, 2007). Entre as principais substâncias extraídas de Apocinaceae estão os alcaloides indólicos vimblastina e vincristina (Figura 7, p. 31), isolados de *Catharanthus roseus*, dois importantes agentes quimioterapêuticos de uso clínico corrente no tratamento da leucemia (ALMEIDA *et al.*, 2005).

Figura 7 - Estruturas dos alcaloides indólicos vimblastina e vincristina, isolados de *Catharanthus roseus*.

As plantas pertencentes à família Apocinaceae são árvores, arbustos, lianas, trepadeiras ou ervas, latescentes. Apresentam folhas simples, alternas, opostas ou verticiladas, geralmente com coléteres nas axilas e/ou na base da lâmina foliar. Flores solitárias ou em cimeiras, hermafroditas, actinomorfas, pentâmeras. Corola gamopétala, tubo de várias formas, com escamas, saliências ou cristas, por vezes com uma corona na fauce. Estames inseridos no tubo da corola, filetes curtos, livres ou raramente conatos num cone com apêndices apicais. Ovário súpero ou semi-ífero, bicarpelar, geralmente apocárpico, glabro ou piloso; nectários ou discos nectaríferos geralmente presentes. Folículos secos ou carnosos, por vezes moniliformes, lomentos, drupas e bagas, sementes nuas, plumosas, por vezes ariladas, geralmente comprimidas e aladas ou com apêndices munidos de longos pêlos sedosos numa ou por vezes nas duas extremidades (Figura 8) (MARTINS; DINIZ; GONÇALVES, 2000; MATOZINHOS; KONNO, 2008).

Figura 8 - Prancha revelando as características botânicas de plantas da família Apocinaceae.



Fonte: Wikipédia (Acesso em 21/05/2014).

2.2 Considerações sobre o gênero *Aspidosperma*

O gênero *Aspidosperma* pertence à família Apocinaceae, subfamília Plumerioidea e Tribo Plumerieae (BARROSO, 1991). As plantas deste gênero são conhecidas por apresentarem madeiras de ótima qualidade e grande durabilidade, fato este que as colocam sob risco de extinção, citando-se *Aspidosperma ramiflorum* como exemplo de espécie que está seriamente ameaçada de extinção (FUMAGALI *et al.*, 2008).

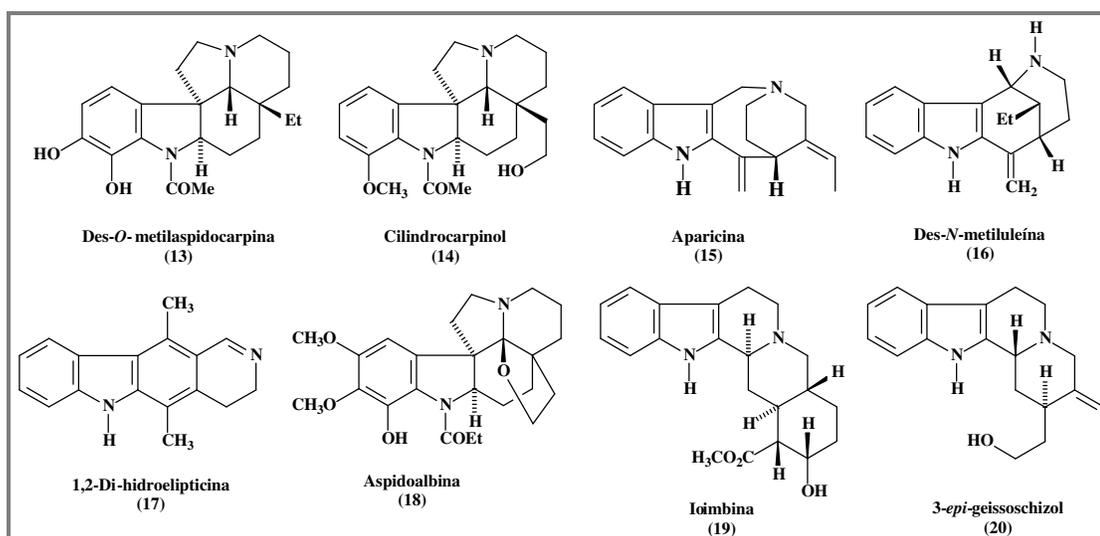
As cascas de espécies de *Aspidosperma* são usadas na forma de infusão, na medicina popular da região amazônica, citando-se o uso de *A. ramiflorum* no tratamento de leishmaniose, o uso de *A. nitidum* no tratamento de inflamações de útero e ovário, diabetes, problemas estomacais, câncer, reumatismo, entre outros, o uso de *A. album*, *A. discolor*, *A. excelsum* e *A. polineuron* no tratamento de malária, e o uso de *A. quebracho-blanco* no tratamento de impotência, bronquite e pneumonia (PEREIRA *et al.*, 2007).

A morfologia das flores das plantas de *Aspidosperma* é de significativa importância para a distinção das espécies, pois fornece caracteres morfológicos menos variáveis (GOMES; CAVALCANTI, 2001).

Estudos do ponto de vista taxonômico foram realizados com espécies de *Aspidosperma*. Woodson, em 1951, classificou 52 espécies de *Aspidosperma* em 9 séries. De acordo com Robert e colaboradores, em 1983 foram incluídas mais 18 espécies no gênero, e, em 1987, uma nova classificação quimiotaxonômica foi feita por Bolzani e colaboradores, agrupando-se 47 espécies em 7 séries: Rígida, Nitida, Quebrachines, Polyneura, Pyricolla, Nobile e Macrocarpa. O aprimoramento da classificação de Bolzani culminou com a divisão de 52 espécies em 8 séries, após a inclusão da série Tomentosa (GARCIA; RUBEN; BROWN, 1976) (Tabela 1, p. 33). Algumas destas séries apresentam esqueletos alcaloidais característicos, como, por exemplo, na série Polyneura predominam os esqueletos do tipo pirifolidano (**13**) e aspidospermano (**14**), na série Pyricolla, os esqueletos pirifolidano, apariçano (**15**), uleínano (**16**) e eliptiçano-olivaçano (**17**), na série Nobile, o esqueleto aspidoalbano (**18**), e na série Nitida, os esqueletos aspidospermano, ioimbano (**19**) e geissoschizoano (**20**) (Figura 9, p. 33) (GUIMARÃES; BRAZ-FILHO; VIEIRA, 2012; PEREIRA *et al.*, 2007).

Tabela 1 - Classificação quimiotaxonômica das espécies de *Aspidosperma* em séries.

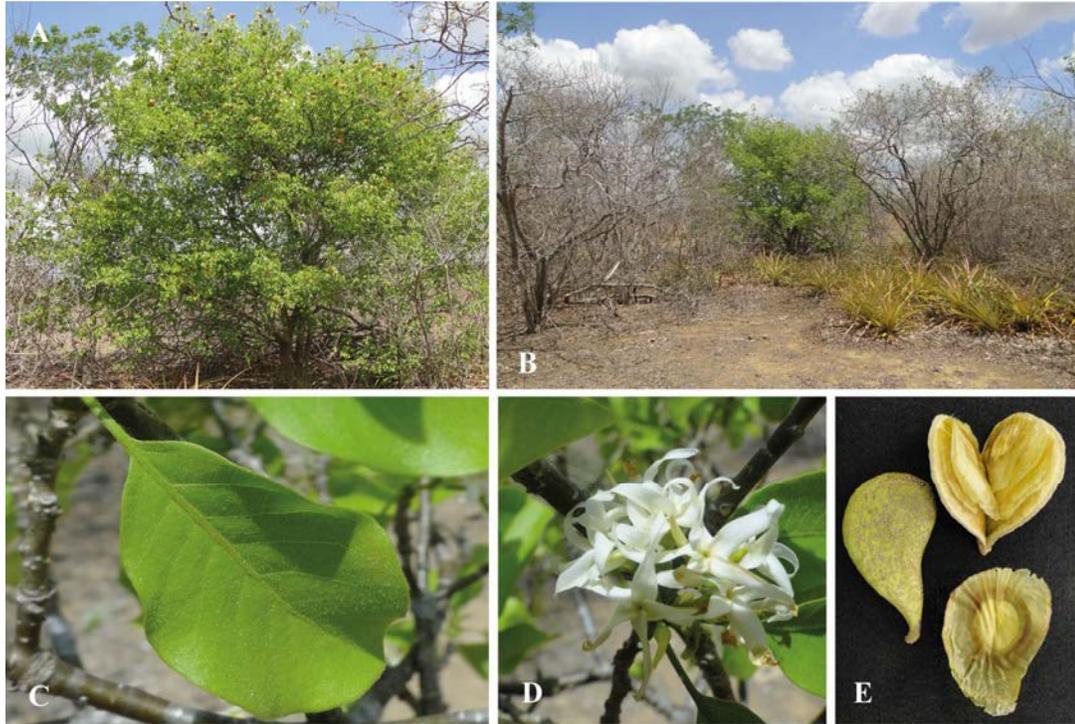
Série	Espécie de <i>Aspidosperma</i>
Rígida	<i>A. rigidum</i>
Nítida	<i>A. nitidum</i> , <i>A. auriculatum</i> , <i>A. excelsum</i> , <i>A. spegazzinii</i> , <i>A. carapanauba</i> , <i>A. marcgravianum</i> , <i>A. oblongum</i> , <i>A. discolor</i> , <i>A. eburneum</i> , <i>A. compactinervium</i>
Quebrachines	<i>A. quebracho-blanco</i> , <i>A. chakensis</i>
Polyneura	<i>A. sessiliflorum</i> , <i>A. peroba</i> , <i>A. polyneuron</i> , <i>A. cylidrocarpon</i> , <i>A. cuspa</i> , <i>A. dispernum</i>
Pyricolla	<i>A. quirandy</i> , <i>A. pyricollum</i> , <i>A. multiflorum</i> , <i>A. pyrifolium</i> , <i>A. tomentosum</i> , <i>A. refractum</i> , <i>A. populifolium</i> , <i>A. australe</i> , <i>A. gomesianum</i> , <i>A. olivaceum</i> , <i>A. rhombeosignatum</i> , <i>A. parvifolium</i> , <i>A. vargasii</i> , <i>A. ulei</i> , <i>A. subincanum</i> , <i>A. campus-belus</i> , <i>A. nigricans</i>
Nobile	<i>A. sandwithianum</i> , <i>A. megalocarpon</i> , <i>A. melanocalyx</i> , <i>A. desmanthum</i> , <i>A. spruceanum</i> , <i>A. fendleri</i> , <i>A. obscurinervium</i> , <i>A. neblinae</i> , <i>A. limae</i> , <i>A. exalatum</i> , <i>A. album</i>
Macrocarpa	<i>A. verbascifolium</i> , <i>A. macrocarpon</i> , <i>A. duckei</i>
Tomentosa	<i>A. formosanum</i> , <i>A. dasycarpon</i>

Figura 9 - Estruturas de alcaloides representando os tipos de esqueletos característicos de algumas séries de *Aspidosperma*.

2.3 Considerações sobre *Aspidosperma pyrifolium* Mart.

Aspidosperma pyrifolium Mart. (Figura 10), pertencente à série Pyricolla, é uma árvore ou arvoreta, de cerca de 3 a 8 metros de altura, que floresce no período de setembro a janeiro (OLIVEIRA, 1999). Esta espécie é muito usada em serviços de marcenaria e carpintaria, devido à ótima qualidade de suas madeiras, sendo utilizada principalmente na confecção de cadeiras (BRAGA, 1960).

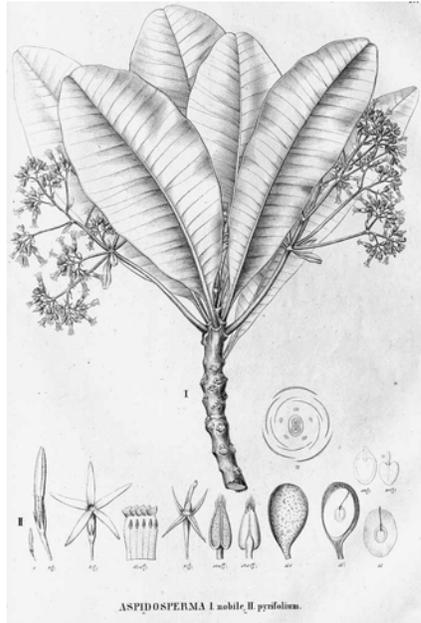
Figura 10 - Fotos de *Aspidosperma pyrifolium*, mostrando parcialmente seu habitat natural (A e B), folhas (C), flores (D) e frutos, com detalhes de suas sementes (E).



Fotos: Prof. Edilberto Rocha Silveira (DQOI/UFC).

A. pyrifolium apresenta ramos castanhos, glabros e com algumas lenticelas; folhas ovais a obovadas, membranáceas cartáceas, glabras ou pilosas; flores com corola brancacenta, pubérula a tomentosa externamente, anteras ovais; e folículos de cerca de 6 cm, lenhosos, piriformes, castanhos, glabros e com lenticelas (OLIVEIRA, 1999). Sua casca é lisa e acinzentada, e possui cerne amarelo e um pouco elástico (BRAGA, 1960). Suas sementes são ovais, estenospérmicas, aladas, com formas arredondadas ou cordiformes, discoides e lenticulares. Normalmente são encontradas de 4 a 5 sementes para cada fruto (FERREIRA; CUNHA, 2000) (Figura 11, p. 35).

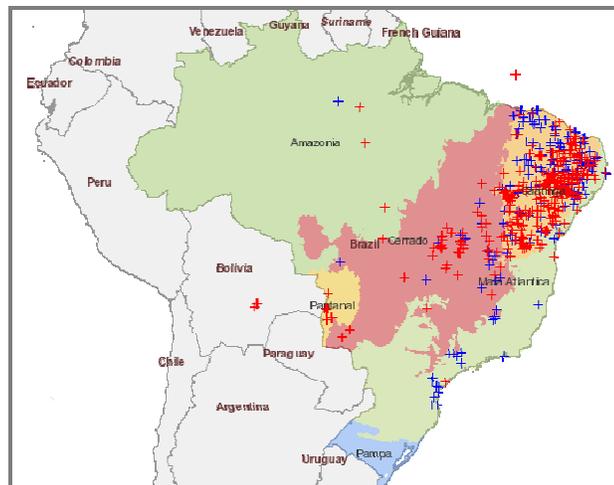
Figura 11 - Prancha revelando as características botânicas de *Aspidosperma pyriforme*.



Fonte: <http://florabrasiliensis.cria.org.br>. (Acesso em 02/07/2014)

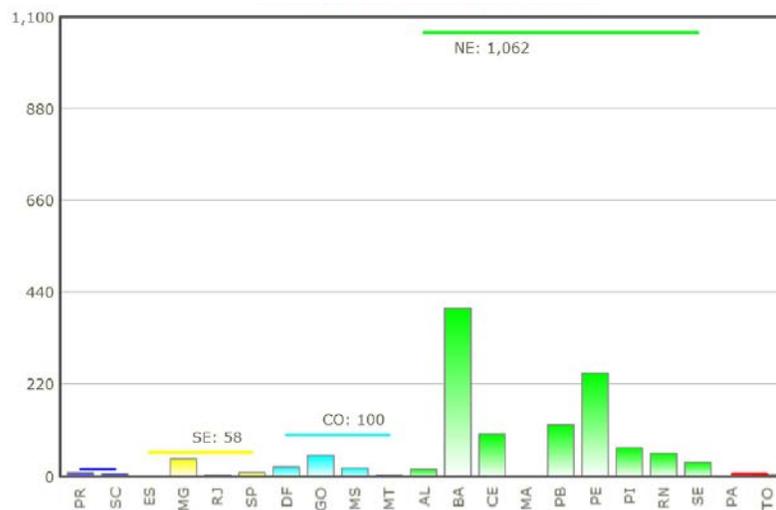
A. pyriforme é encontrada nas vegetações da caatinga e do cerrado brasileiro (Figura 12), distribuindo-se pela região Nordeste nos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Bahia e Alagoas, sendo o estado do Ceará o quarto com maior número de registros (103). No Centro-Oeste é encontrada nos estados Goiás, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso, assim como no Distrito Federal, enquanto que no Sudeste só é relatada no estado de Minas Gerais (Figura 13 e Tabela 2, p. 36) (SANTOS *et al.*, 2013).

Figura 12 - Mapa mostrando a distribuição geográfica de *Aspidosperma pyriforme* na caatinga e no cerrado brasileiro.



Fonte: www.splink.org.br. (Acesso em 02/07/2014)

Figura 13 - Gráfico de barras representando a quantidade de registros encontrados para *Aspidosperma pyrifolium* por estados e regiões do Brasil (Sul: 18; Sudeste: 58; Centro-Oeste: 100; Nordeste: 1.062; Norte: 7).



Fonte: www.splink.org.br. (Acesso em 12/09/2014)

Tabela 2 - Quantidade de registros encontrados para *Aspidosperma pyrifolium* por estados e regiões do Brasil.

Região	Estado	Nº de registros
Sul	Paraná (PR)	10
	Santa Catarina (SC)	8
Sudeste	Espírito Santo (ES)	1
	Minas Gerais (MG)	43
	Rio de Janeiro (RJ)	4
	São Paulo (SP)	10
	Distrito Federal (DF)	24
Centro-Oeste	Goiás (GO)	51
	Mato Grosso do Sul (MS)	21
	Mato Grosso (MG)	4
	Alagoas (AL)	18
Nordeste	Bahia (BA)	403
	Ceará (CE)	103
	Maranhão (MA)	2
	Paraíba (PB)	125
	Pernambuco (PE)	249
	Piauí (PI)	70
	Rio Grande do Norte (RN)	57
	Sergipe (SE)	35
Norte	Pará (PA)	2
	Tocantins (TO)	5

Fonte: www.splink.org.br. (Acesso em 12/09/2014)

Nascimento e Conceição (2011) relatam em seu artigo um levantamento etnobotânico de 83 espécies de plantas medicinais usadas pela comunidade Quilombola Olho D'água do Raposo, localizada em Caxias/Maranhão. Nesse levantamento, registrou-se o uso

popular das folhas de *A. pyrifolium*, conhecida pela comunidade como “cunhão de bode”, para curar coceira, através de aplicação direta das folhas. Outro estudo realizado por Dantas e colaboradores (2008) relata que *Aspidosperma pyrifolium* está entre as 79 espécies de plantas utilizadas por raizeiros, na cidade de Campina Grande (PB), no preparo de garrafadas, bebidas medicamentosas compostas por uma combinação de plantas medicinais para variados fins terapêuticos. Santos e colaboradores (2013) relatam o uso popular de *A. pyrifolium* no tratamento de inflamação do trato urinário, dermatite, dor de estômago, cólicas, coceira, problemas cardíacos, aflições, diarreia e como sedativo. Segundo Santos, já foram isolados desta espécie fenóis, taninos, triterpenos, quinonas e alcaloides indólicos. Os alcaloides revelaram o maior índice de ocorrência em *A. pyrifolium*, sendo relatado na literatura o isolamento de 27 alcaloides plumeranos (compostos **21** e **24-49**), obtidos a partir das folhas, raízes e casca do caule desta espécie (Figura 15, p. 38).

Embora bastante estudada quimicamente, ainda há poucos relatos de estudos biológicos para *A. pyrifolium*. A literatura relata o efeito hipotensivo mostrado por uma mistura de alcaloides presentes na casca da raiz e nas folhas de *A. pyrifolium* (CRAVEIRO; MATOS; SERUR, 1983; MITAINE *et al.*, 1996; PEREIRA *et al.*, 2007), assim como a atividade antiplasmódica revelada pelo alcaloide aspidospermina (**21**) (Figura 14), isolado a partir da casca do caule (MITAINE-OFFER *et al.*, 2002). Porém, diante da diversidade de atividades biológicas comprovadas para alcaloides plumeranos, como antimalárica para (+)-aspidocarpina (**22**) (HENRIQUE; NUNOMURA; POHLIT, 2010), diurética e hipotensiva para (+)-aspidospermina (FUMAGALI *et al.*, 2008), e citotóxica para (-)-11-metoxitabersonina (**23**) (FENG *et al.*, 2010) (Figura 14), vê-se a grande necessidade da investigação química e biológica de espécies de *Aspidosperma* na busca por novos compostos bioativos.

Figura 14 - Estruturas dos alcaloides plumeranos aspidospermina (21), aspidocarpina (22) e 11-metoxitabersonina (23).

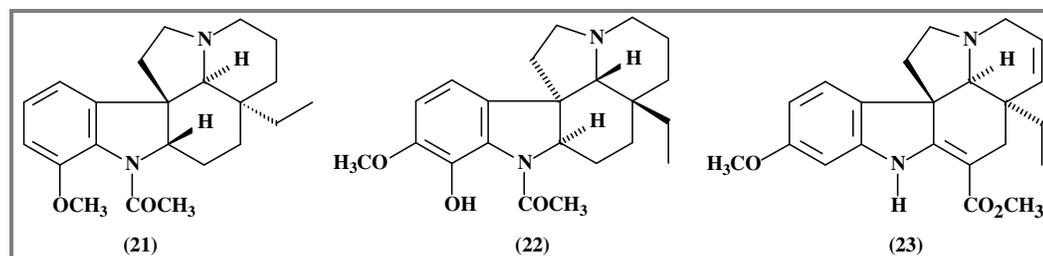
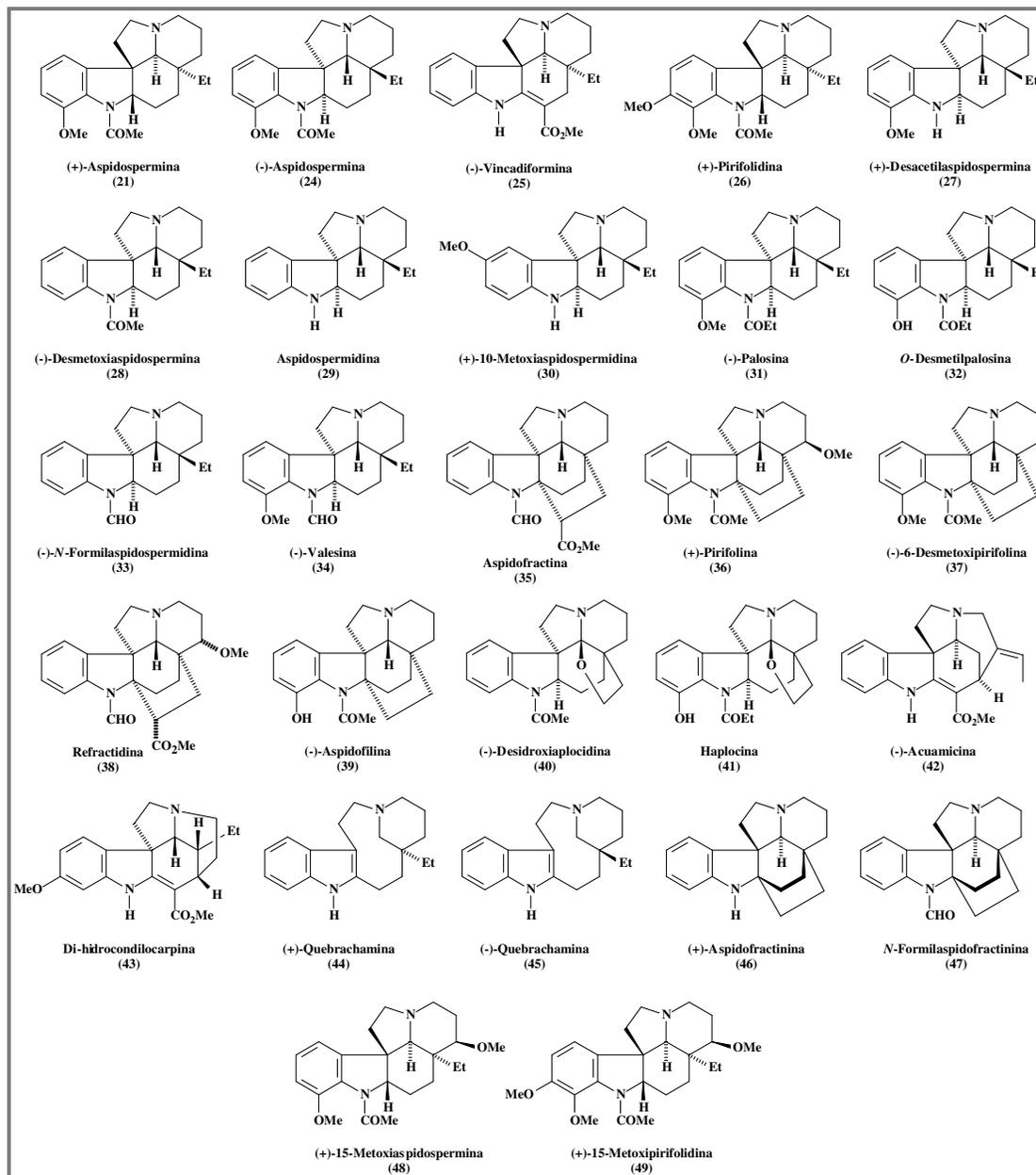
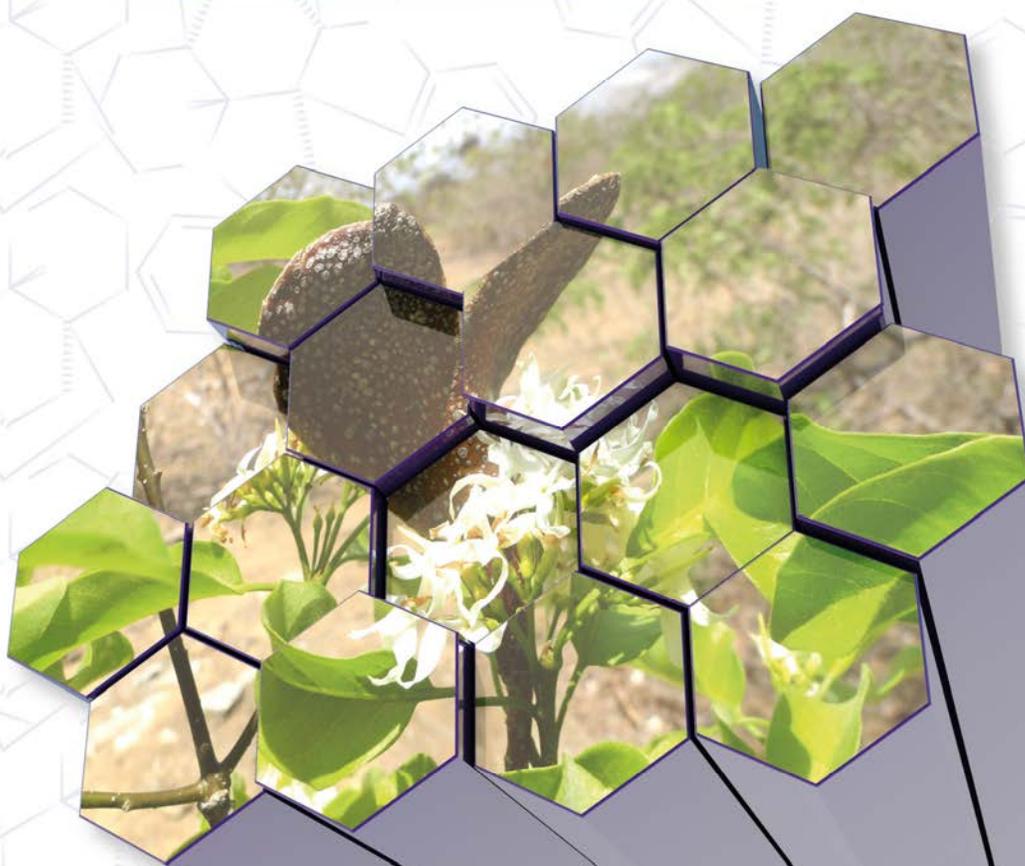


Figura 15 - Estruturas dos alcaloides isolados a partir das folhas, raízes e casca do caule de *Aspidosperma pyrifolium*.



Capítulo 3

Levantamento Bibliográfico: Alcaloides Plumeranos

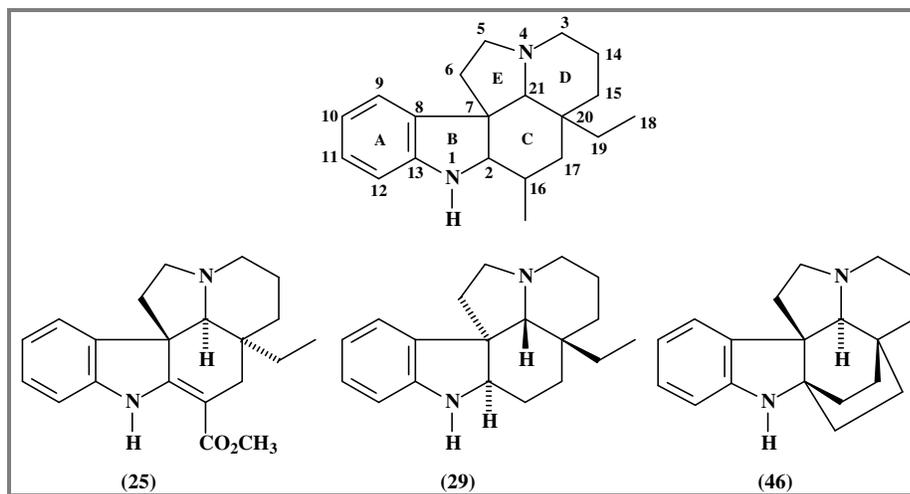


3 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO: ALCALOIDES PLUMERANOS

Os alcaloides plumeranos mais simples possuem de 19 a 21 átomos de carbono. Eles podem ser classificados em dois tipos principais de esqueletos, pentacíclicos e hexacíclicos. Os alcaloides plumeranos pentacíclicos são estruturalmente caracterizados pelo anel benzênico (anel A) condensado ao anel di-hidropirrólico (anel B), e três outros anéis (C-E), e podem ou não apresentar o carbono ligado a C-16, proveniente da função éster da secologanina, pois este carbono pode sofrer reação de hidrólise, seguido de descarboxilação, suprimindo, assim, um átomo de carbono da cadeia terpenoídica. Os exemplos mais simples destes alcaloides são (-)-vincadiformina e (+)-aspidospermidina (Figura 16).

Os alcaloides plumeranos hexacíclicos possuem o carbono C-18 ligado ao carbono nitrogenado C-2, formando outro anel de seis membros, o anel F. O exemplo mais simples destes alcaloides é representado pela (-)-aspidofractinina, também referido como cicloaspidospermidina (Figura 16).

Figura 16 - Estrutura básica dos alcaloides com esqueleto plumerano e estruturas dos alcaloides pentacíclicos (-)-vincadiformina (25) e (+)-aspidospermidina (29), e hexacíclico (-)-aspidofractinina (46).

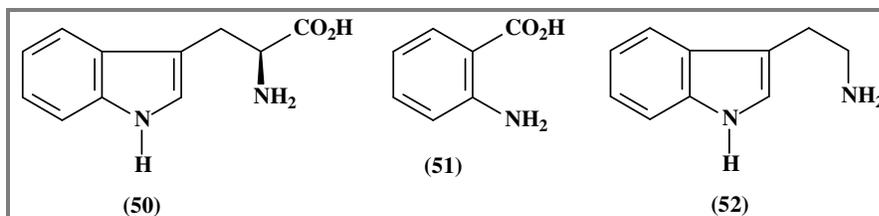


É bastante comum encontrar-se nos alcaloides plumeranos o grupo acetílico ligado ao átomo de nitrogênio N-1. Substituições dos hidrogênios ligados a carbonos aromáticos (H-9 a H-12) por grupos metoxílico e/ou hidroxílico também são comuns nestes compostos, principalmente nas posições 11 e 12.

3.1 Biossíntese

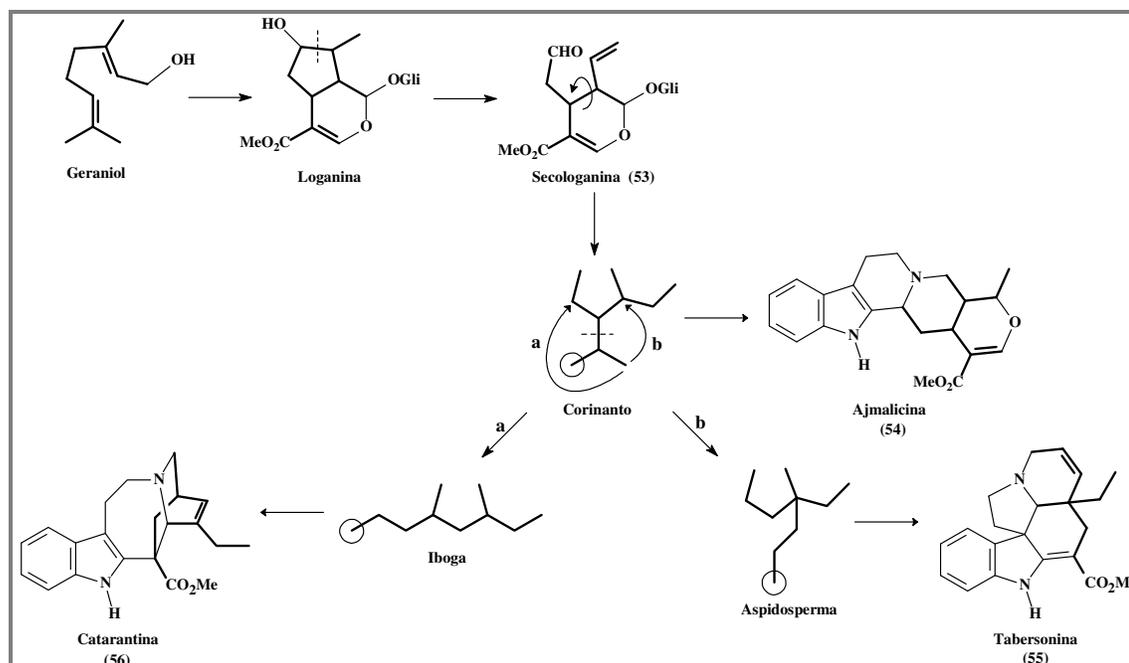
Os alcaloides indólicos têm como precursor biossintético o L-triptofano (**50**), um aminoácido aromático que contém em sua estrutura um núcleo indólico, e é originado pelo caminho do chiquimato, pela via do ácido antranílico (**51**) (Figura 17) (DEWICK, 2002).

Figura 17 - Estruturas do L-triptofano (**50**), do ácido antranílico (**51**) e da triptamina (**52**).



Os alcaloides indólicos terpenoídicos são biossinteticamente originados a partir de uma unidade de triptamina (**52**) (Figura 17), formada por descarboxilação do L-triptofano, e um fragmento C₉ ou C₁₀, proveniente do secoiridoide secologanina (**53**), originando três tipos estruturais principais: Corinanto, Aspidosperma e Iboga, representados pelos alcaloides ajmalicina (**54**), tabersonina (**55**) e catarantina (**56**), respectivamente (Figura 18) (BATTERSBY; BURNETT, PARSONS, 1969; DEWICK, 2002; LOBO; LOURENÇO, 2007).

Figura 18 - Tipos estruturais principais de alcaloides indólicos terpenoídicos: Corinanto, Aspidosperma e Iboga.



Fonte: LOBO; LOURENÇO, 2007.

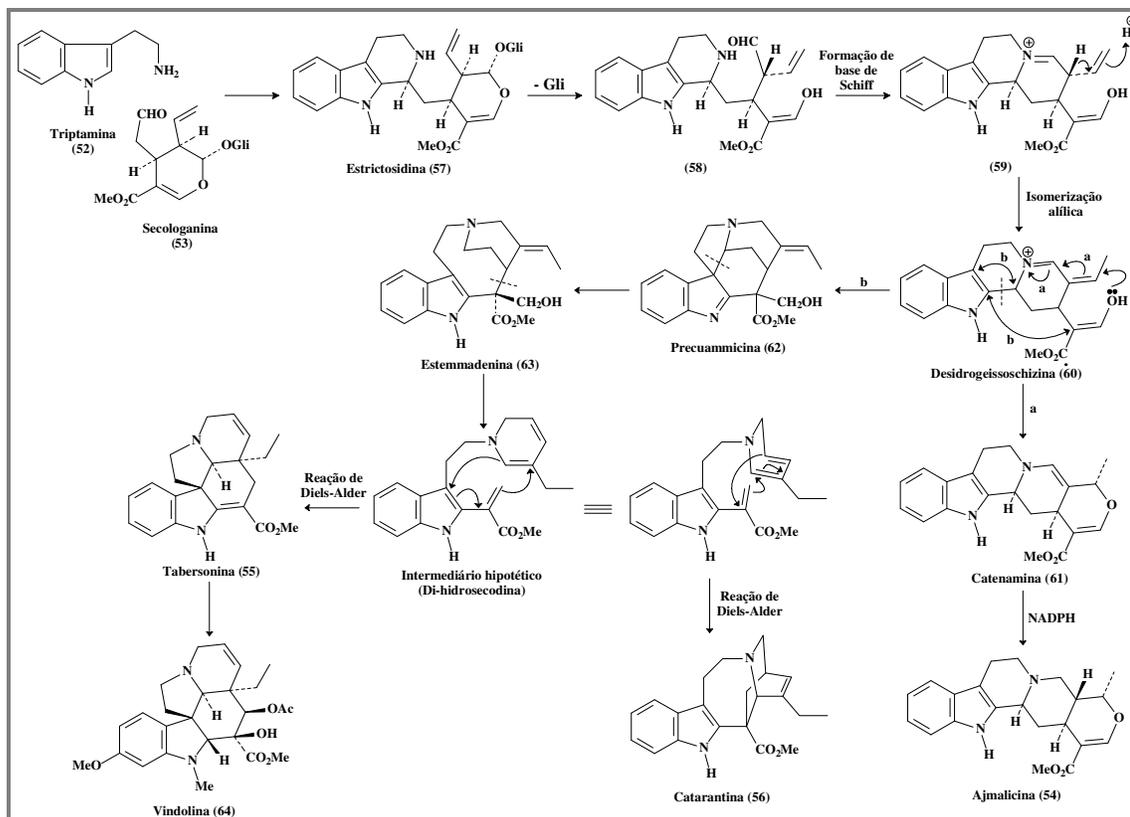
O tipo Corinanto possui o mesmo esqueleto carbônico da secologanina, enquanto os tipos Aspidosperma e Iboga provêm de rearranjos no esqueleto Corinanto, através da migração de uma unidade de três átomos de carbono provenientes do grupo isopropílico. Sempre que forem observadas unidades terpenoídicas C₉, os alcaloides perderam um carbono, provavelmente o carbono da função carboxilato da secologanina (representado por um círculo na Figura 18, p. 40), por hidrólise e posterior descarboxilação (LOBO; LOURENÇO, 2007). Essas três classes são divididas em nove outras subclasses e o esqueleto do tipo Aspidosperma gera a subclasse dos alcaloides plumeranos (GUIMARÃES; BRAZ-FILHO; VIEIRA, 2012).

A condensação da triptamina (**52**) com a secologanina (**53**) gera o sistema tetra-hidro- β -carbolínico (BATTERSBY; BURNETT; PARSONS, 1969) e produz o alcaloide strictosidina (**57**) (Figura 19, p. 42). A hidrólise da função glicosídica permite a abertura do grupo hemiacetal, produzindo os grupos aldeído e enol (**58**). O aldeído pode reagir com a função amina secundária do anel piperidínico, gerando uma base de Schiff quaternária (**59**). A isomerização alílica da base de Schiff favorece o deslocamento da ligação dupla vinílica, que ficará conjugada com o íon imínio, formando o alcaloide desidrogeissoschizina (**60**). O ataque nucleofílico da hidroxila enólica ao íon imínio α,β -insaturado forma o alcaloide catenamina (**61**), que sofre redução na presença de NADPH para gerar o alcaloide ajmalicina (**54**). Quando a migração da unidade C₃ de desidrogeissoschizina (**60**) segue pelo caminho b, se ligando ao carbono α ao átomo de nitrogênio do indol, há a formação do alcaloide intermediário precuammicina (**62**), que sofre fissão da ligação no carbono β para gerar o alcaloide estemmadenina (**63**) (DEWICK, 2002). Este sofre abertura heterocíclica do anel, seguido de desidratação, produzindo o intermediário hipotético di-hidrosecodina, que apresenta a unidade C₃ clivada do resto da unidade carbônica terpenoídica. Esse intermediário pode sofrer dois modos diferentes de reações Diels-Alder: se o anel di-hidropiridina reagir como dienófilo serão produzidos os alcaloides do tipo Aspidosperma, representado pela tabersonina (**55**), que é o precursor da vindolina (**64**), e se o anel di-hidropiridina reagir como dieno serão produzidos os alcaloides do tipo Iboga, representado pela catarantina (**56**) (STOCKING; WILLIAMS, 2003).

Diversos estudos mostraram que as reações Diels-Alder estão envolvidas na biossíntese das principais classes de produtos naturais, como policetídeos, terpenoides, fenilpropanoides e alcaloides (OIKAWA; TOKIWANO, 2004). Os alcaloides dos tipos Iboga e Aspidosperma são provavelmente os melhores exemplos de produtos naturais provenientes de reações biossintéticas de Diels-Alder (STOCKING; WILLIAMS, 2003). Tratam-se de reações pericíclicas de cicloadição [4+2], inter- e intramoleculares, eficientes na formação de

ligações carbono-carbono. Elas estão entre as reações mais utilizadas em síntese orgânica, em virtude da possibilidade de formação de sistemas carbocíclicos com alta regio- e estereosseletividade, sob condições suaves, formando quatro centros quirais ou estereogênicos (OIKAWA; TOKIWANO, 2004).

Figura 19 - Esquema de rota biossintética mostrando as trocas estruturais envolvidas na conversão do esqueleto do tipo Corinanto para os esqueletos dos tipos Aspidosperma e Iboga.



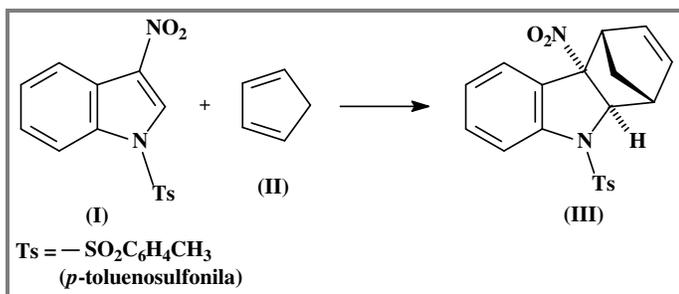
Fonte: DEWICK, 2002.

Reações Diels-Alder ocorrem na natureza através das enzimas Diels-Alderases (BROCKSON *et al.*, 2010). A função e o modo de ação das Diels-Alderases naturais têm atraído grande interesse devido à diversidade estrutural dos adutos Diels-Alder. Solanapirona sintase, lovastatina nonacetídeo sintase e macrofomato sintase são algumas Diels-Alderases naturais recentemente utilizadas na biossíntese de produtos naturais. As duas primeiras catalisam reações Diels-Alder intramoleculares, enquanto a enzima macrofomato sintase catalisa reações Diels-Alder intermoleculares (OIKAWA; TOKIWANO, 2004).

Derivados indólicos têm sido utilizados como dienófilos em reações Diels-Alder para a preparação de carbazóis, cujas estruturas estão relacionadas com vários produtos naturais, como os alcaloides plumeranos. Essas reações exigem condições como altas

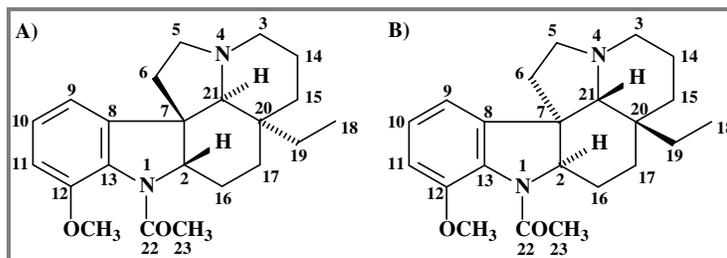
temperaturas (150-200 °C) ou pressões (10-11,5 kbar), grupos eletroretiradores nas posições 1 e 3 do indol, tempo de reação longo (26-96 horas) e o uso de dienos ricos em elétrons e reativos. As reações de cicloadição de nitroindóis e nitropirróis, sob irradiação com micro-ondas e na ausência de solventes, resultam nos carbazóis aromáticos e indóis, respectivamente, através da eliminação do grupo nitro, seguido de aromatização. Um exemplo é a reação do *N*-tosila-3-nitro-indol com o ciclopentadieno para produzir o estereoisômero *endo* do derivado do carbazol, através do conjunto de reações cicloadição [4+2] e rearranjo sigmatrópico [3,3] (Figura 20) (GÓMEZ *et al.*, 2009).

Figura 20 - Reação Diels-Alder do *N*-tosila-3-nitro-indol (I) com o ciclopentadieno (II) para gerar um derivado do carbazol (III).



Então, a estereoquímica dos alcaloides do tipo *Aspidosperma* pode ser interpretada com base em suas origens biossintéticas, sendo definida após a reação de cicloadição de Diels-Alder, como mostra a Figura 19 (p. 42) (WENKERT, 1962). Verifica-se que todos os alcaloides desse tipo de esqueleto possuem configuração relativa similar à configuração do alcaloide *aspidospermina* (Figura 21, p. 44), ou seja, o carbono C-6 encontra-se em posição oposta ao hidrogênio H-21 e à cadeia lateral etila em C-20, que se encontram direcionados para um mesmo lado. Observa-se ainda que o sinal (+) ou (-) que antecede o nome do alcaloide está relacionado com a sua rotação específica, porém não há nenhuma relação com o esqueleto e com as configurações dos centros quirais C-2, C-7, C-20 e C-21. Por exemplo, analisando a Figura 15 (p. 38) observa-se que os alcaloides (+)-*aspidospermina* (21) e (+)-*desacetilaspidospermina* (27) apresentam as configurações dos quatro centros quirais invertidas, porém possuem valores positivos de rotação específica.

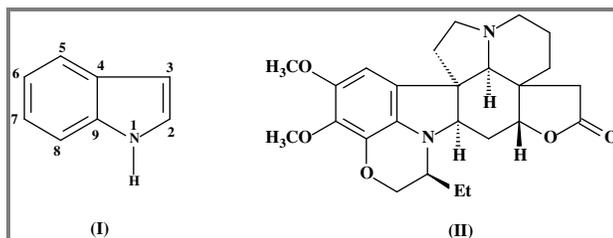
Figura 21 - Estruturas dos enantiômeros do alcaloide aspidospermina. A) (+)-aspidospermina; B) (-)-aspidospermina.



3.2 Características espectroscópicas

A ampla diversidade estrutural dos alcaloides indólicos é proveniente de variadas substituições nas posições 2 e 3 do núcleo indólico (Figura 22, I), além de também poder ocorrer substituições do hidrogênio ligado ao nitrogênio, como se pode ver no alcaloide di-hidroobscurinervina (Figura 22, II), isolado de *Aspidosperma obscurinervium* (MORALES-RÍOS; ESPÍÑEIRA; JOSEPH-NATHAN, 1987). O espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Próton (RMN ^1H) desses compostos, sem substituintes no anel benzênico do indol, é caracterizado pelos hidrogênios contíguos H-5 a H-8, que se apresentam como dois duplos dupletos (H-5 e H-8) e dois tripletos de dupletos (H-6 e H-7), em deslocamentos químicos entre 6,5 e 8,0 ppm, com constantes de acoplamento típicas de acoplamentos *orto* e *meta*. Porém, muitas vezes são visualizados apenas dois dupletos e dois tripletos. A ausência deste padrão de multiplicidade é indicativa da substituição de algum(ns) hidrogênio(s) aromático(s), sendo muito comum substituições por grupos hidroxílico e/ou metoxílico, principalmente nas posições 7 e 8.

Figura 22 - Estruturas do núcleo indólico (I) e do alcaloide di-hidroobscurinervina (II), isolado de *Aspidosperma obscurinervium*.

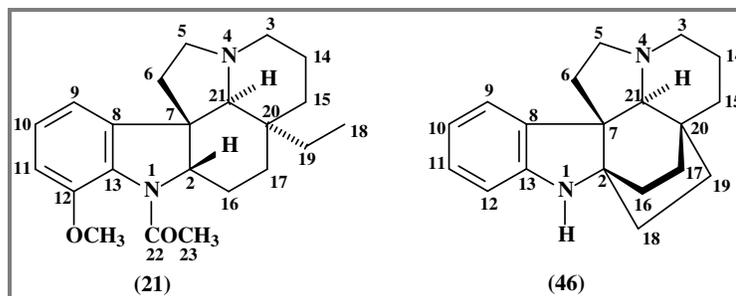


O espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 (RMN ^{13}C) do indol di-substituído no pirrol mostra quatro sinais de carbonos sp^2 mono-hidrogenados, cujos deslocamentos são de aproximadamente 110,0, 120,0, 122,0 e 128,0 ppm. Os sinais dos

carbonos C-8 e C-6 normalmente são mais blindados, em relação a C-5 e C-7, devido ao efeito mesomérico do átomo de nitrogênio. O sinal do carbono não-hidrogenado C-4 geralmente aparece em torno de 130-140 ppm, enquanto o sinal de C-9 aparece em torno de 140-150 ppm, pois este carbono está diretamente ligado ao átomo de nitrogênio.

Além dos sinais típicos do sistema di-hidroindólico, os alcaloides plumeranos possuem sinais característicos nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C . O sinal do hidrogênio H-2 é bastante característico nos alcaloides plumeranos pentacíclicos, como, por exemplo, no alcaloide aspidospermina (**21**) (Figura 23), sendo detectado em torno de 4,5 ppm, devido está ligado a um carbono nitrogenado, e, caso o composto não tenha substituição no carbono C-16, ele aparece como um duplo duplete, devido ao acoplamento vicinal com os dois hidrogênios diastereotópicos do carbono metilênico C-16. Os hidrogênios do tripleto (3H-18) são bons indicadores da presença da cadeia lateral etílica, típica dos alcaloides plumeranos pentacíclicos, pois são altamente blindados e detectados em torno de 0,6 ppm, sendo o carbono C-18 detectado em torno de 7,0 ppm. A ausência dos sinais típicos de H-2 e 3H-18 é indicativa de fechamento do anel, gerando os alcaloides plumeranos hexacíclicos, como, por exemplo, o alcaloide aspidofractinina (**46**) (Figura 23). Os alcaloides plumeranos também são marcados por um simpleto referente ao hidrogênio H-21, o qual aparece normalmente entre 2,0 e 3,5 ppm.

Figura 23 - Estruturas dos alcaloides plumeranos aspidospermina (21) e aspidofractinina (46).



O espectro de RMN ^{13}C dos alcaloides plumeranos é marcado por sinais de carbonos nitrogenados metilênicos em aproximadamente 50 ppm (C-3 e C-5) e metínicos entre 65-72 ppm (C-2 e C-21), aproximadamente. Observou-se na literatura que os demais sinais de carbonos metilênicos (C-6, C-14 a C-17, e C-19) são muitas vezes trocados, devido à semelhança de seus deslocamentos químicos, porém as correlações à longa distância observadas no espectro HMBC possibilitam correlacionar cada um desses carbonos

inequivocadamente. Os carbonos sp^3 quaternários C-7 e C-20 apresentam deslocamentos variando entre 52-58 e 30-40 ppm, respectivamente.

3.3 Dados de RMN relatados na literatura

A literatura relata um artigo de revisão (PEREIRA *et al.*, 2007) mostrando diversas estruturas de alcaloides plumeranos isolados de espécies de *Aspidosperma*, até o ano de 2006, e suas respectivas fontes, além de um artigo de revisão mais recente (GUIMARÃES; BRAZ-FILHO; VIEIRA, 2012), baseado no primeiro, que apresenta dados de RMN 1H e/ou ^{13}C de apenas alguns alcaloides, com esqueleto plumerano mais simples. Este fato incentivou a realização de um levantamento bibliográfico com dados de RMN ^{13}C de alcaloides plumeranos obtidos a partir de plantas da família Apocinaceae, com estruturas das mais simples às mais complexas, a fim de fornecer um banco de dados ainda não disponível na literatura, e, assim, contribuir com a elucidação estrutural de compostos similares.

O “SciFinder” foi a ferramenta de busca utilizada para catalogar os 89 alcaloides plumeranos descritos neste levantamento, todos obtidos a partir de plantas da família Apocinaceae (*Alstonia*, *Aspidosperma*, *Catharanthus*, *Ervatamia*, *Haplophyton*, *Kopsia*, *Melodinus*, *Rhazia*, *Vallesia* e *Vinca*), confirmando a abundante ocorrência destes compostos na referida família.

A Figura 27 (p. 50) mostra os dados de RMN ^{13}C , as fontes, os solventes, as frequências dos espectrômetros e as referências da literatura.

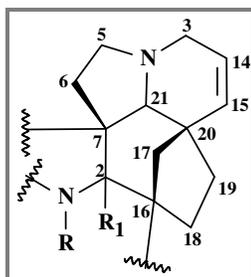
Dentre os compostos apresentados no levantamento, algumas considerações devem ser feitas. Observou-se que muitos compostos apresentaram uma ligação dupla entre os carbonos C-14 e C-15, como visto no grupo das melodininas (**69** a **74**, **79**, **80**) e das desidroaspidofractininas (**111** a **115**), dentre vários outros compostos. Outros, porém, apresentaram os referidos carbonos epoxidados, como visto nos dímeros pedunculina (**119**) e peduncularidina (**120**).

Um valor de deslocamento muito blindado (160,0 ppm) foi observado para a carbonila do grupo *N*-acetílico dos alcaloides pirifolidina (**103**) e aspidospermina (**122**), incoerente para este carbono, pois valores em torno de 170,0 ppm são observados para os compostos **67** (δ_C 168,5; p. 48), **87** (δ_C 171,0; p. 53), **102** (δ_C 170,3; p. 56), **104** (δ_C 169,2; p. 56), **105** (δ_C 171,2; p. 56), **106** (δ_C 171,2; p. 57), **107** (δ_C 172,0; p. 57), **127** (δ_C 168,3; p. 60), **130** (δ_C 169,3; p. 61) e **138** (δ_C 168,3; p. 62).

As kopsifolinas (compostos **96** a **101**, p. 55 e 56) foram classificadas como um novo grupo de alcaloides indólicos, com um esqueleto em que o carbono C-18 está ligado ao

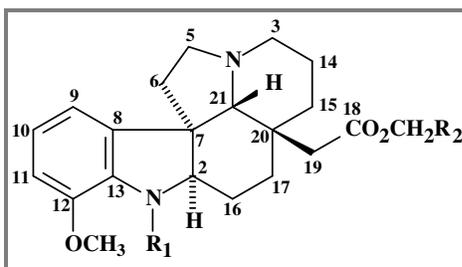
carbono C-16 e não a C-2 (Figura 24), como nos alcaloides do tipo aspidofractinina (KAM; CHOO, 2003, 2004a).

Figura 24 - Subestrutura característica dos alcaloides conhecidos como kopsifolinas.



A literatura relata para o alcaloide cilindrocarina (**131**) o valor de deslocamento químico 197,7 ppm para o carbono mono-hidrogenado C-10, porém não há nenhum argumento plausível para este valor, indicando que um grande equívoco foi cometido pelos autores Brennan e Saxton (1986). Já no alcaloide 19-carboetoxi-12-metoxi-19-desmetilvincadiformina (**134**), os mesmos autores inverteram os deslocamentos dos carbonos aromáticos C-10 (δ 113,6) e C-11 (δ 121,2), pois a presença da metoxila em C-12 causa proteção ao carbono C-11 e desproteção ao carbono C-10, devido ao efeito mesomérico doador de elétrons da metoxila, como se pode observar nos compostos **132** e **136** (Figura 25). Também se observou a inversão dos deslocamentos dos carbonos não-hidrogenados C-8 (δ 132,1) e C-13 (δ 138,1), pois comparando-se com os respectivos carbonos no composto desmetoxilado (**133**), verificar-se-ia que o carbono C-13 teria um incremento de -14,4 ppm ($143,3 - 14,4 = 128,9$), enquanto o carbono C-8 seria incrementado de 1,0 ppm ($137,2 + 1,0 = 138,2$) (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007).

Figura 25 - Esqueleto básico dos derivados do alcaloide cilindrocarina.

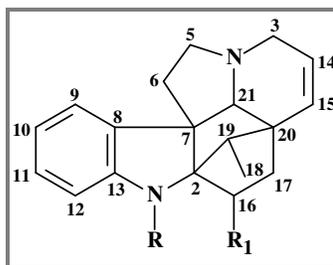


O alcaloide *N*-formilcilindrocarina (**132**) apresenta uma significativa blindagem no carbono C-13 (δ 127,8), em relação ao respectivo carbono nos alcaloides cilindrocarina (**131**),

19-carboetoxi-19-desmetilaspidospermidina (**135**) e cilindrocarinato de etila (**136**) (Figura 25, p. 47), fato justificado pelo efeito estérico causado pelo aldeído e pelo grupo metoxílico. Verificou-se que no alcaloide valesina (**121**), que corresponde ao composto **132** descarboximetilado, os autores (ZÈCHES *et al.*, 1995) inverteram os deslocamentos químicos dos carbonos C-8 (δ 127,0) e C-13 (δ 140,8). Como visto no alcaloide *N*-formilcilindrocarina (**132**), o carbono C-13 é mais blindado, devido ao efeito estérico, além de estar posicionado *orto* ao grupo metoxílico.

A vindolinina (**139**) e seus derivados (**140** a **143**) constituem um diferente grupo de alcaloides plumeranos hexacíclicos, onde o anel F é um anel de cinco membros, com um carbono metílico em torno de 7,5 ppm (C-18) (Figura 26), diferentemente dos alcaloides do tipo aspidofractinina, cujo anel F é de seis membros. Neste caso, foi o carbono C-19 que se ligou ao carbono nitrogenado C-2.

Figura 26 - Esqueleto básico dos derivados do alcaloide vindolinina.



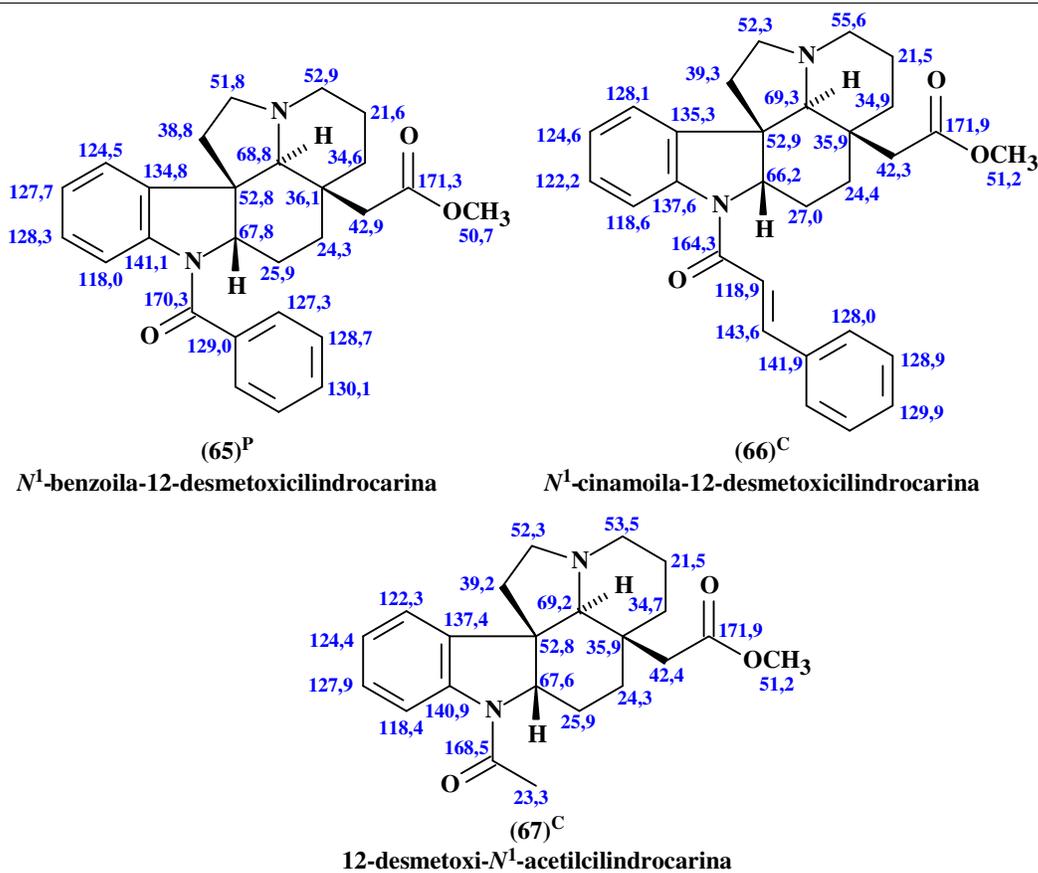
A comparação da vindolinina (**139**) com seu epímero em C-16 (**142**) mostra que existe uma blindagem nos carbonos C-8 (δ 135,7), C-10 (δ 118,9), C-12 (δ 109,0) e C-19 (δ 44,8) do epímero, provavelmente devido à mudança de configuração do carbono C-16. No derivado *N*-metílico da vindolinina (**140**) também é observado esse efeito de blindagem dos carbonos C-8 (δ 135,8), C-10 (δ 117,8) e C-12 (δ 105,6), porém neste caso essa blindagem é devida ao efeito mesomérico doador de elétrons do grupo *N*-metílico. O efeito de blindagem é ainda mais acentuado no carbono C-12, com uma diferença de 6,4 ppm do carbono da vindolinina, provavelmente devido à proteção extra causada pela compressão estérica *γ-gauche* da metila.

A Tabela 3 (p. 49) apresenta as espécies da família Apocinaceae contidas no levantamento bibliográfico, dispostas em ordem alfabética, e os respectivos alcaloides plumeranos isolados de cada espécie.

Tabela 3 - Espécies da família Apocinaceae contidas no levantamento bibliográfico e alcaloides isolados das mesmas.

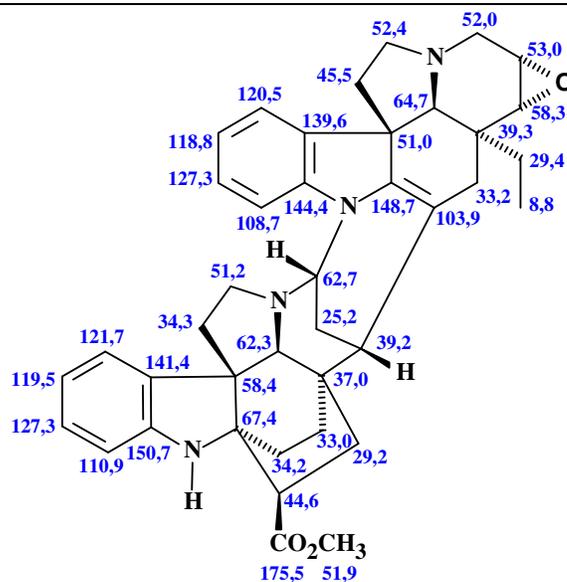
Espécie	Alcaloides
<i>Alstonia mairei</i>	76-78
<i>Aspidosperma cilindrocarpon</i>	65-67
<i>Aspidosperma megalocarpon</i>	130
<i>Aspidosperma pyriformium</i>	85-87, 116, 117
<i>Aspidosperma spp.</i>	102-110, 147-153
<i>Aspidosperma spruceanum</i>	82, 83
<i>Catharanthus spp.</i>	139-144
<i>Ervatamia peduncularis</i>	118-120
<i>Haplophyton cimidum</i>	145, 146
<i>Kopsia arborea</i>	84, 88-92
<i>Kopsia fruticosa</i>	93-101
<i>Kopsia profunda</i>	128, 129
<i>Kopsia teoi</i>	123-126
<i>Melodinus suaveolens</i>	69-75
<i>Melodinus tenuicaudatus</i>	79-81
<i>Melodinus yunnanensis</i>	68
<i>Rhazia stricta</i>	127
<i>Vallesia glabra</i>	121, 122
<i>Vinca sardoa</i>	111-115

Figura 27 - Levantamento bibliográfico dos dados de RMN ^{13}C de alcaloides plumeranos isolados de plantas da família Apocinaceae, ou sintetizados. Asteriscos nas estruturas indicam valores de carbonos não detectados.



Aspidosperma cilindrocarpon (Apocinaceae)

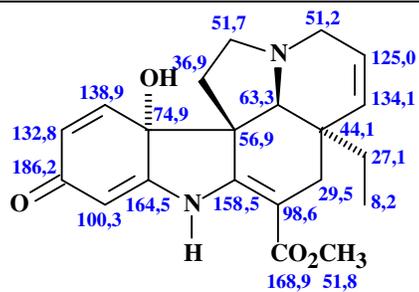
GUIMARÃES *et al.*, 2013 (* $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$; ** CDCl_3 , 125 MHz)



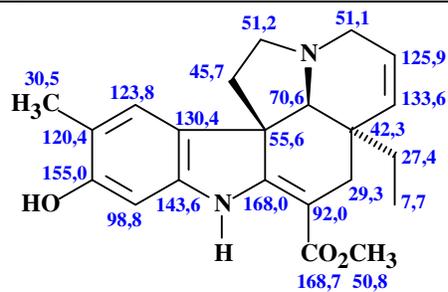
(68)
Meloyina

Melodinus yunnanensis (Apocinaceae)

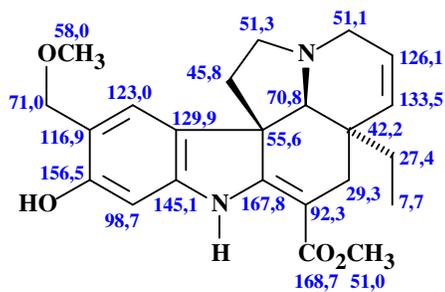
CAI *et al.*, 2012 [(CD₃)₂CO, 100 MHz]



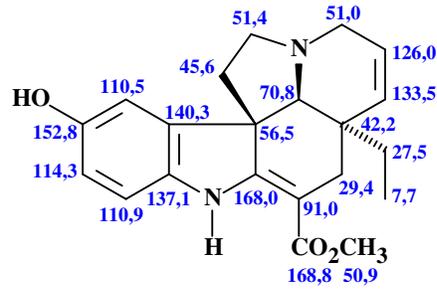
(69)^C
Melodinina M



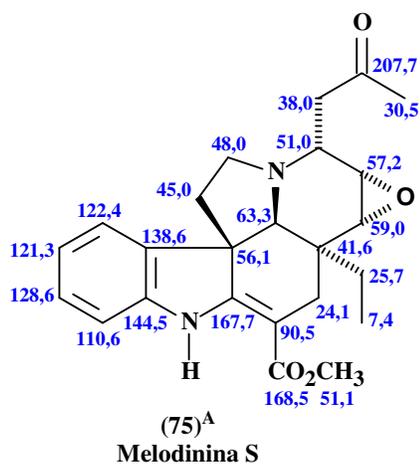
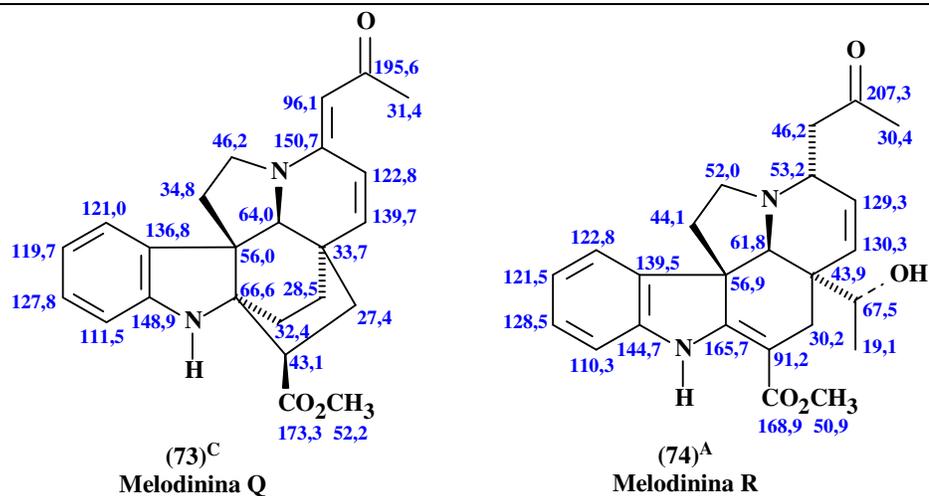
(70)^A
Melodinina N



(71)^A
Melodinina O

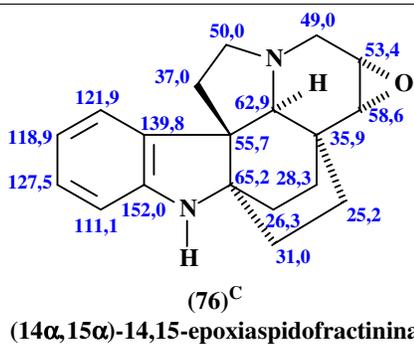


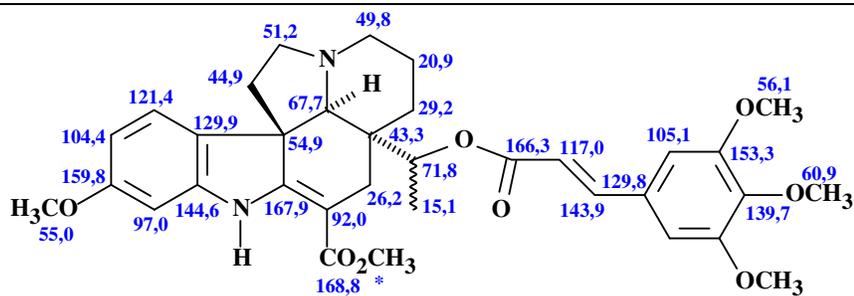
(72)^A
Melodinina P



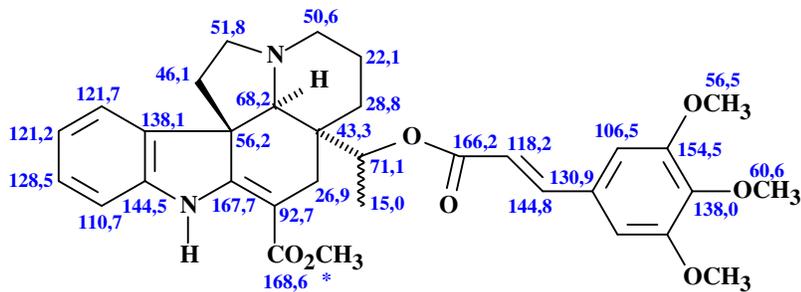
Melodinus suaveolens (Apocinaceae)

LIU *et al.*, 2012 [^CCDCl₃; ^A(CD₃)₂CO; 70 e 75 a 125 MHz; 69, 71-74 a 150 MHz]

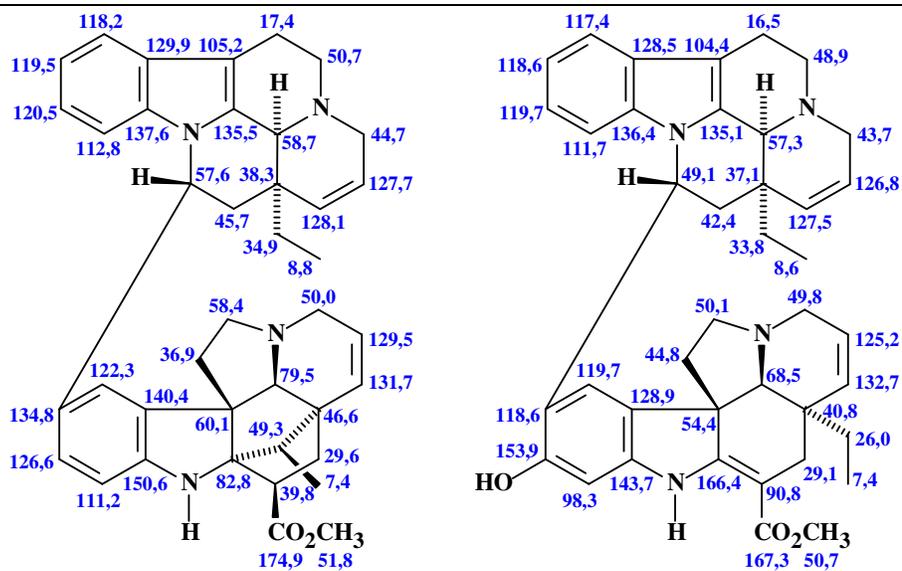


(77)^A

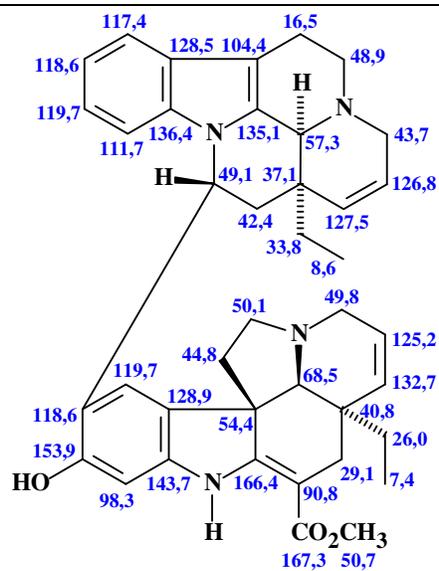
Maireina A

(78)^A

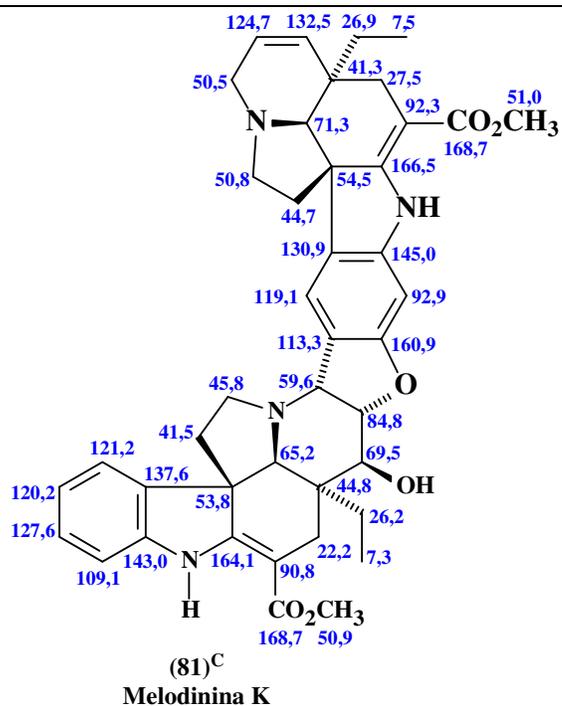
Maireina B

Alstonia mairei (Apocynaceae)CAI *et al.*, 2010 [¹³CDCDCl₃; ¹A(CD₃)₂CO, 100 MHz](79)^A

Melodinina H

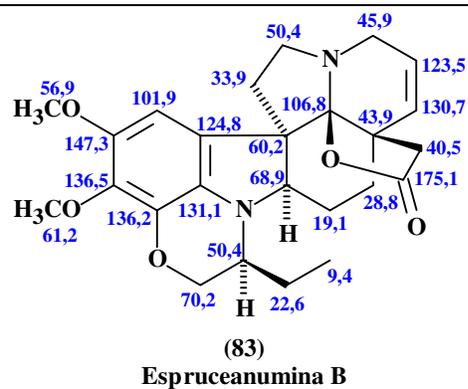
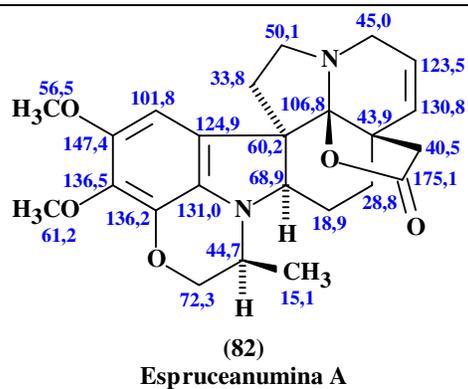
(80)^D

Melodinina J



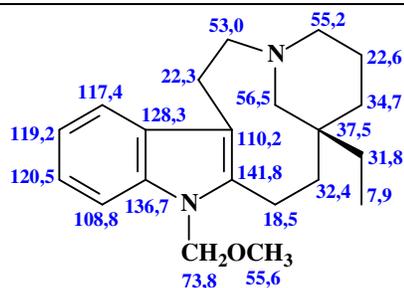
Melodinus tenuicaudatus (Apocinaceae)

FENG *et al.*, 2010 [^A(CD₃)₂CO; ^D(CD₃)₂SO; ^CCDCl₃, 100 MHz]



Aspidosperma spruceanum (Apocinaceae)

OLIVEIRA *et al.*, 2009b (CDCl₃, 125 MHz)

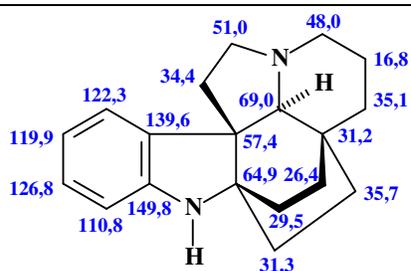


(84)

Kopsiunnanina D

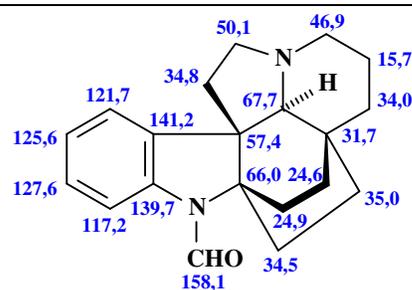
Kopsia arborea (Apocinaceae)

WU *et al.*, 2009 (CDCl₃, 125 MHz)



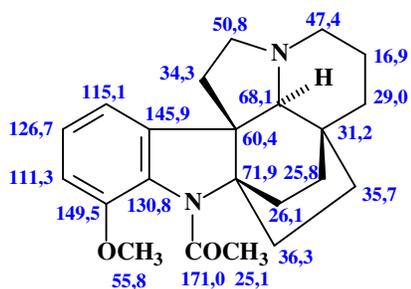
(85)

Aspidofractinina



(86)

N-formilaspidofractinina

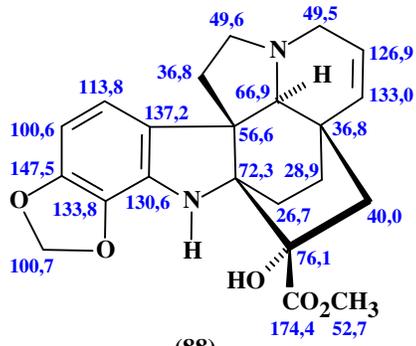


(87)

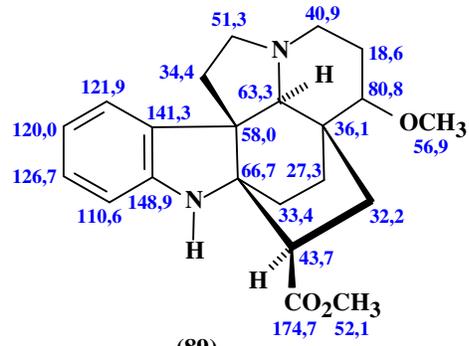
15-Desmetoxipirifolina

Aspidosperma pyrifolium (Apocinaceae)

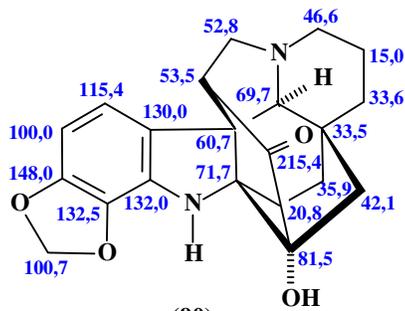
ARAÚJO JR. *et al.*, 2007 (CDCl₃, 125 MHz)



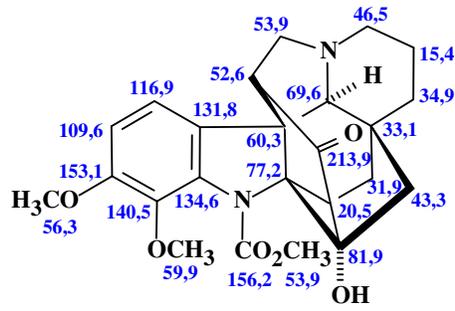
(98)
Kopsamidina A



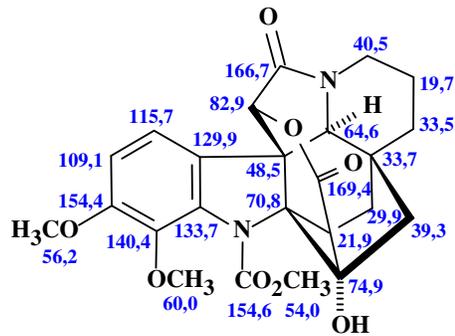
(89)
Kopsamidina B



(90)
Kopsinidina A



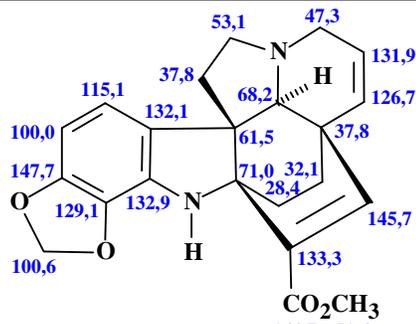
(91)
Kopsinidina B



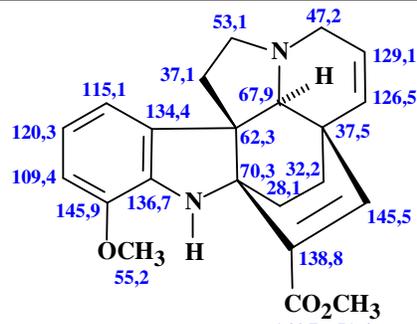
(92)
Paucidactina C

Kopsia arborea (Apocinaceae)

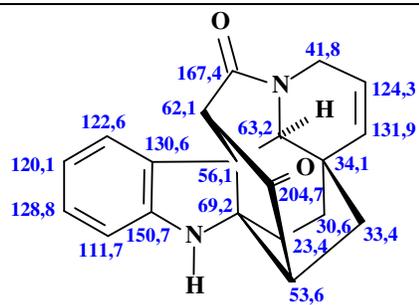
LIM *et al.*, 2007 (CDCl₃, 100 MHz)



(93)
Venacarpina A



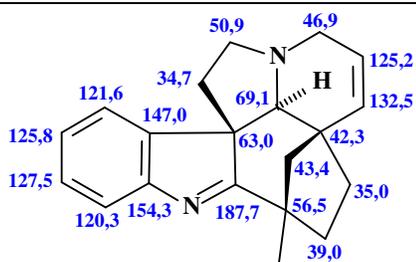
(94)
Venacarpina B



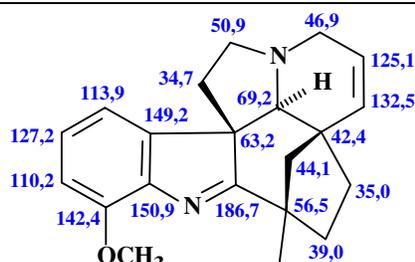
(95)
Kopsorinina

Kopsia fruticosa (Apocinaceae)

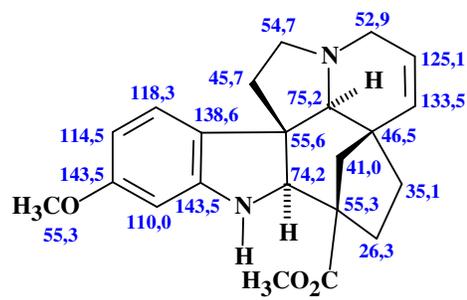
KAM; CHOO, 2004b (CDCl₃, 100 MHz)



H₃CO₂C
52,6 172,2
(96)
Kopsifolina D



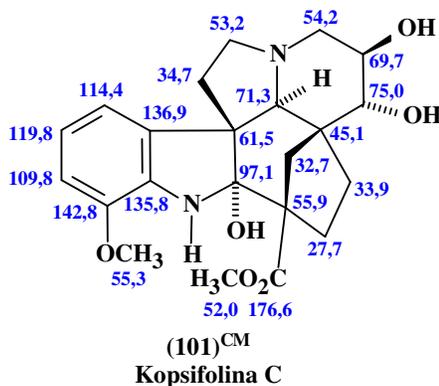
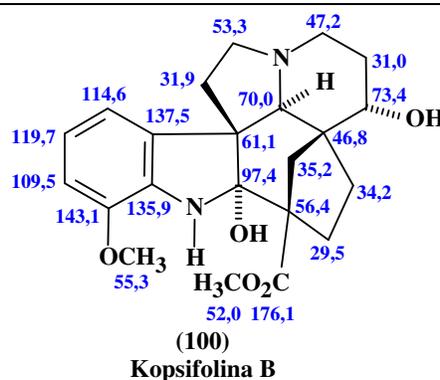
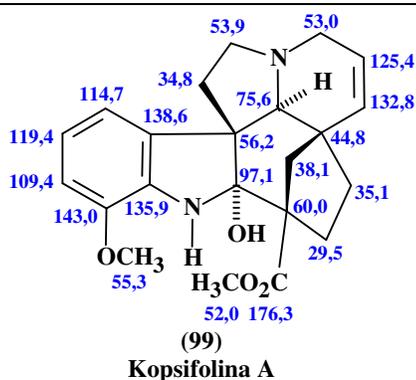
OCH₃
55,7 H₃CO₂C
52,4 172,5
(97)
Kopsifolina E



H₃CO
55,3 H₃CO₂C
52,1 176,6
(98)
Kopsifolina F

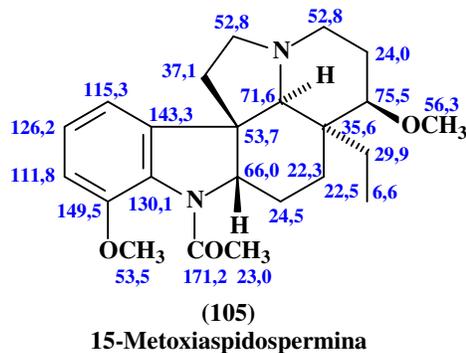
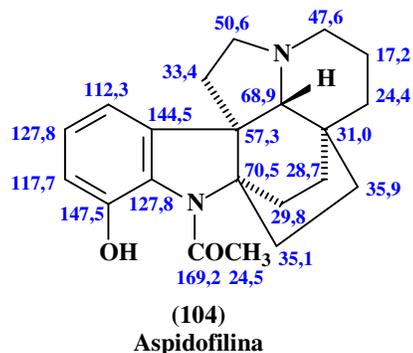
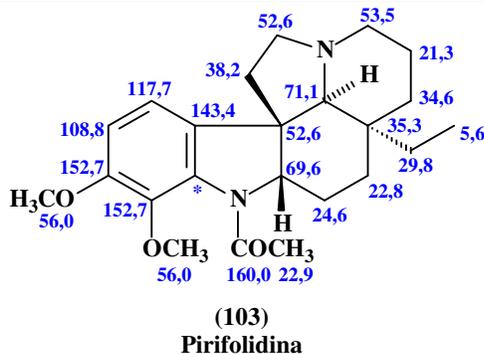
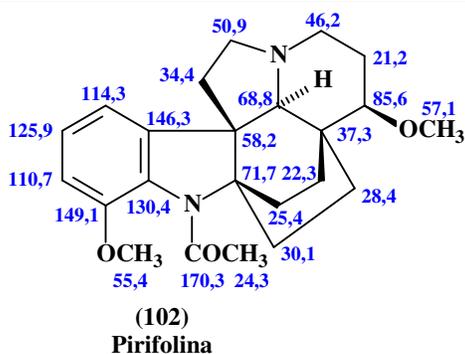
Kopsia fruticosa (Apocinaceae)

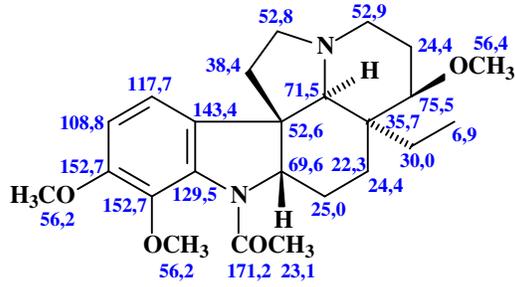
KAM; CHOO, 2004a (CDCl₃, 100 MHz)



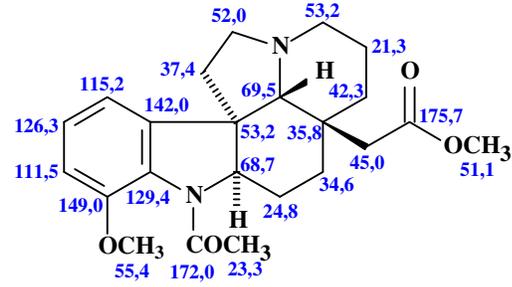
Kopsia fruticosa (Apocinaceae)

KAM; CHOO, 2003 (CDCl₃, 100 MHz; ^{CM}CDCl₃ com gotas de CD₃OD)

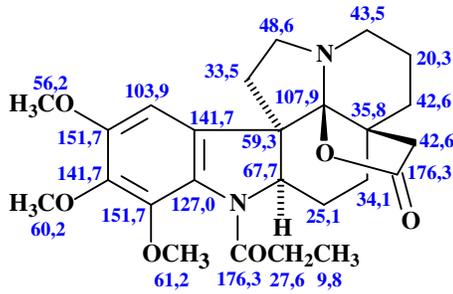




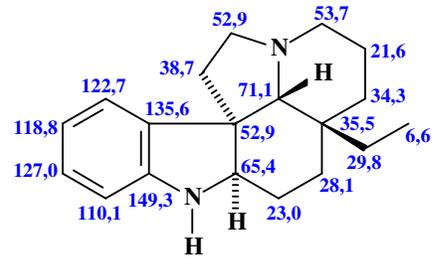
(106)
15-Metoxipirifolidina



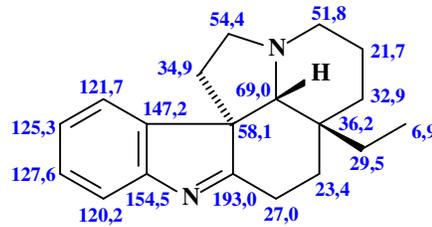
(107)
N-acetilciandrocarina



(108)
12-O-metoxi-21-oxo-aspidoalbina



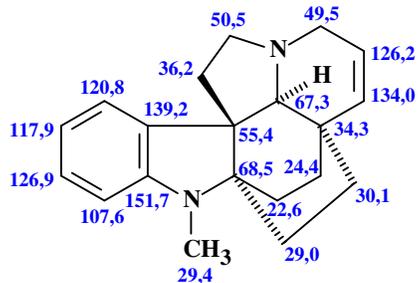
(109)
Aspidospermidina



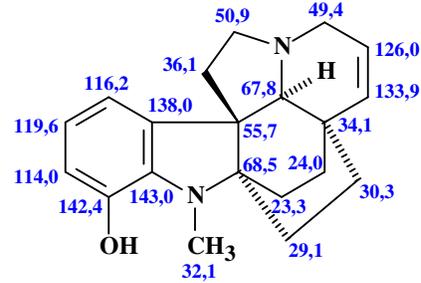
(110)
1,2-Desidroaspidoaspidospermidina

Aspidosperma (Apocinaceae)

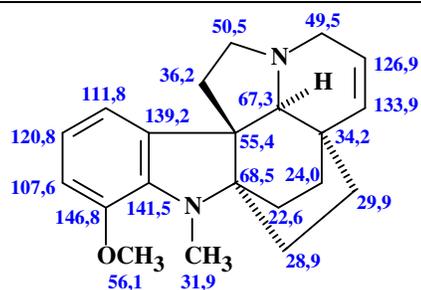
OLIVEIRA, 1999 (CDCl₃, 75 MHz)



(111)
N-metil-14,15-desidroaspidoaspidofractinina

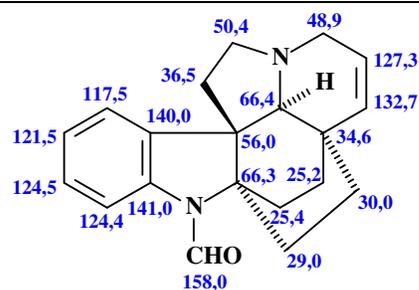


(112)
N-metil-14,15-desidro-12-hidroxi-aspidoaspidofractinina



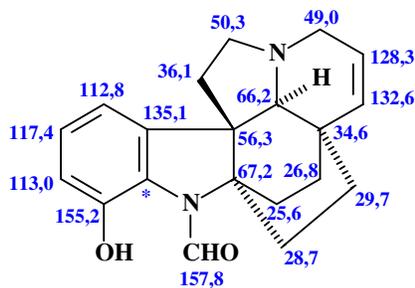
(113)

N-metil-14,15-desidro-12-metoxiaspidofractinina



(114)

N-formil-14,15-desidroaspidofractinina

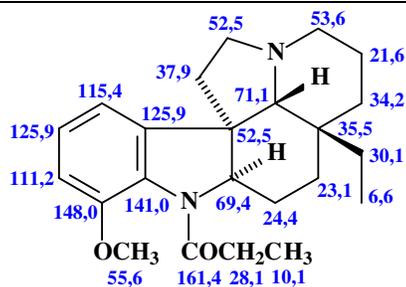


(115)

N-formil-14,15-desidro-12-hidroxi-aspidofractinina

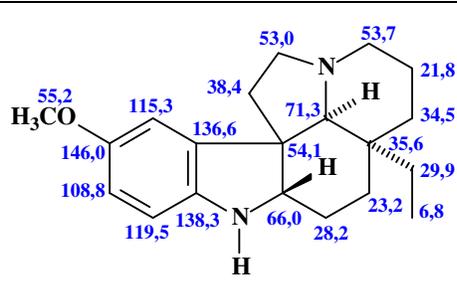
Vinca sardoa (Apocinaceae)

NICOLETTI *et al.*, 1998 (CDCl₃, 125 MHz)



(116)

Palosina

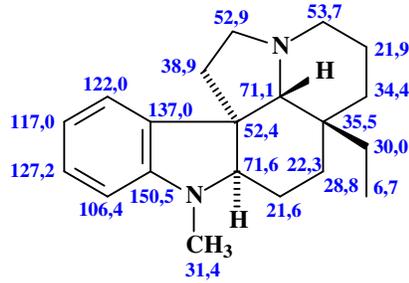


(117)

10-Metoxiaspidospermidina

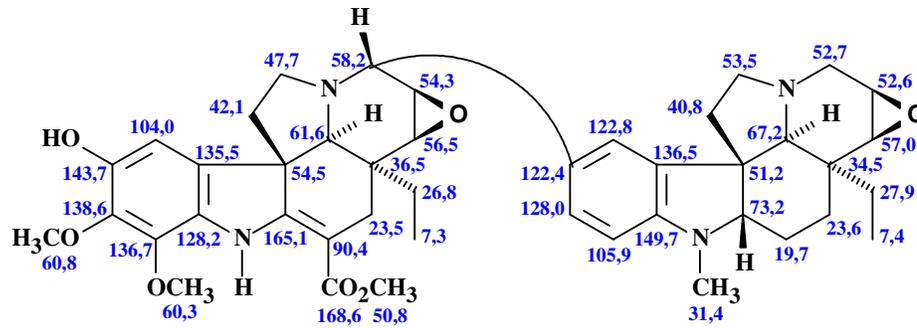
Aspidosperma pyrifolium (Apocinaceae)

MITAINE *et al.*, 1996 (CDCl₃, 75 MHz)



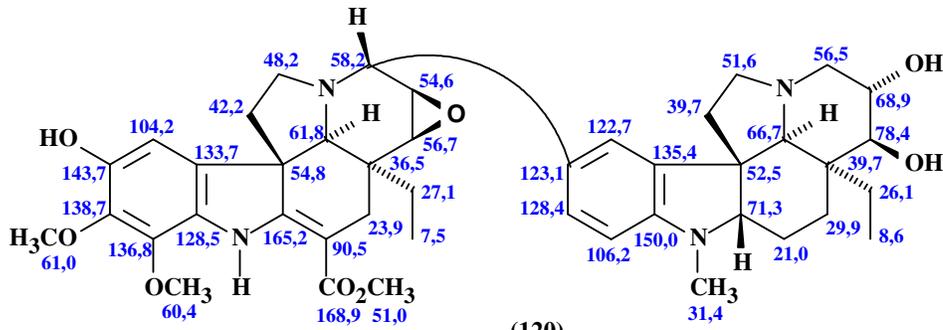
(118)

*N*¹-metilaspidospermidina



(119)

Pedunculina

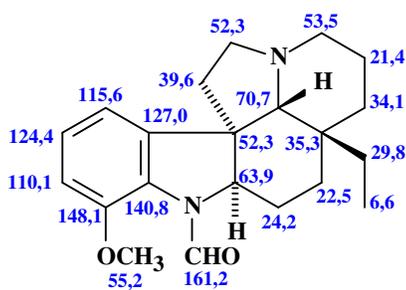


(120)

Peduncularidina

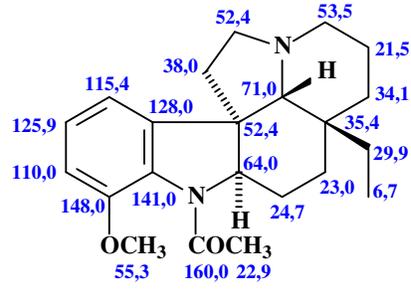
Ervatamia peduncularis (Apocinaceae)

ZÈCHES-HANROT *et al.*, 1995 (CDCl₃, 75 MHz)



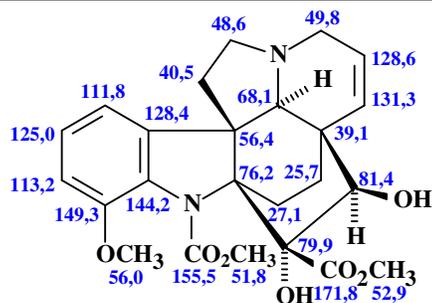
(121)

Vallesina



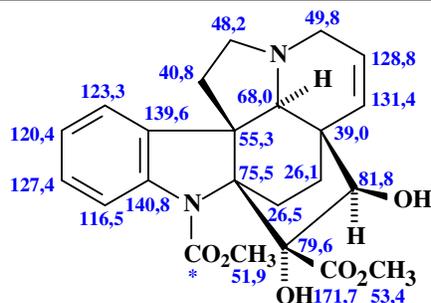
(122)

Aspidospermina

Vallesia glabra (Apocinaceae)ZÈCHES *et al.*, 1995 (CDCl₃, 75 MHz)

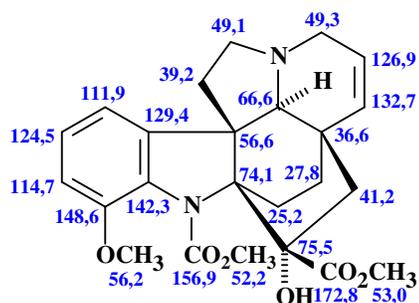
(123)

Kopsigina



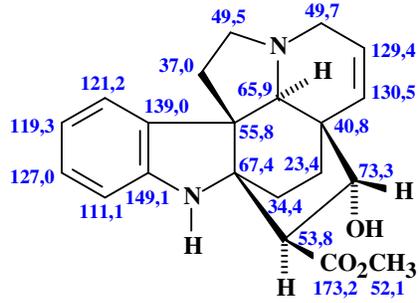
(124)

Kopsaporina

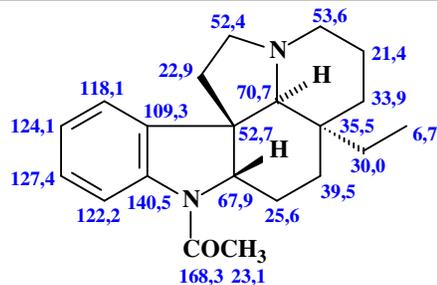


(125)

Kopsinginina



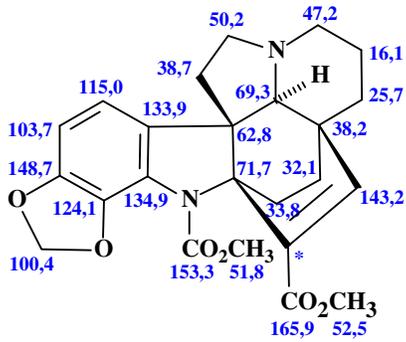
(126)

17- α -hidroxi- $\Delta^{14,15}$ -kopsinina*Kopsia teoi* (Apocinaceae)KAM *et al.*, 1993 (CDCl₃, 67,8 MHz)

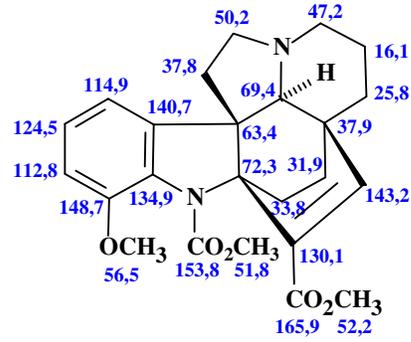
(127)

Desmetoxiaspidospermina

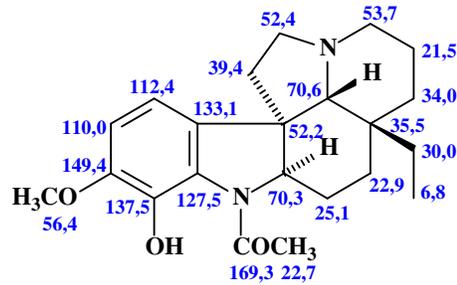
Rhazia stricta (Apocinaceae)ATTA-UR-RAHMAN *et al.*, 1991 (CDCl₃, 100 MHz)



(128)

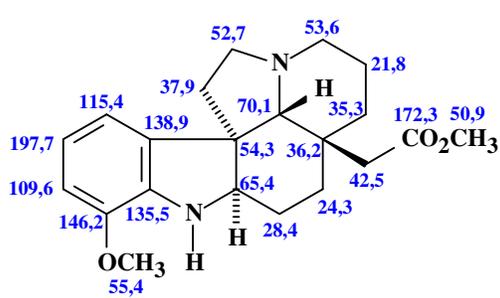
N-metoxycarbonil-11,12-metilenodioxi- $\Delta^{16,17}$ -kopsinina

(129)

N-metoxycarbonil-12-metoxi- $\Delta^{16,17}$ -kopsinina*Kopsia profunda* (Apocinaceae)KAM; TAN, 1990 (CDCl_3 , 25 MHz)

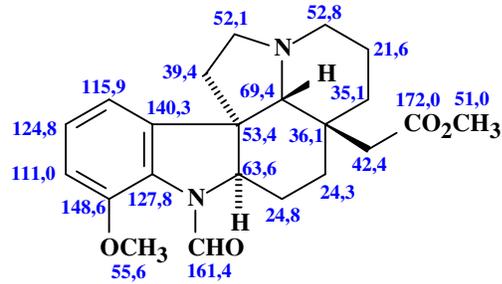
(130)

Aspidocarpina

Aspidosperma megalocarpon (Apocinaceae)McLEAN, REYNOLDS; ZHU, 1987 (CDCl_3 , 100 MHz)

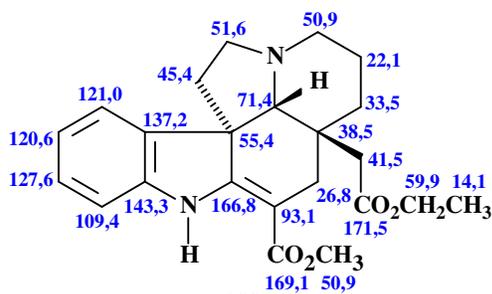
(131)

Cilindrocarina

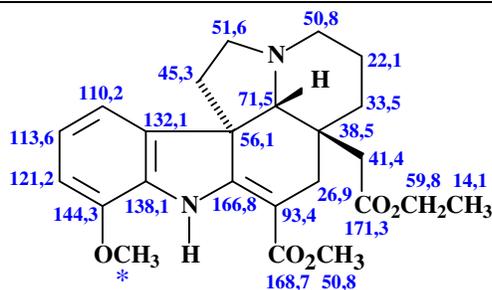


(132)

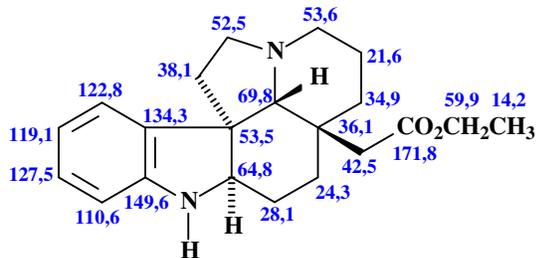
N-formilcilindrocarina



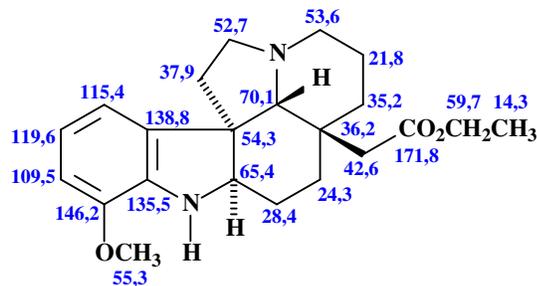
19-Carboetoxi-19-desmetilvincadiformina



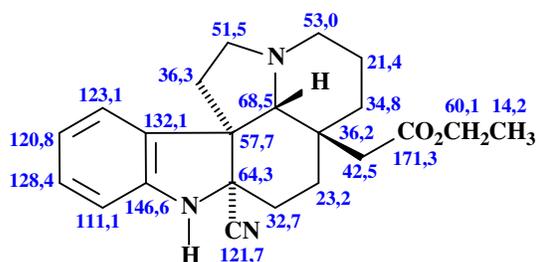
19-Carboetoxi-12-metoxi-19-desmetilvincadiformina



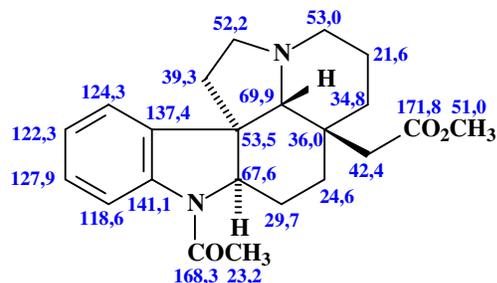
19-Carboetoxi-19-desmetilaspidospermidina



Cilindrocarinato de etila

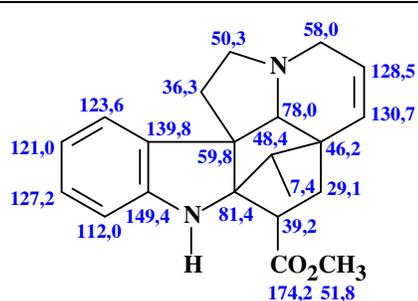


2-ciano-19-Carboetoxi-19-desmetilaspidospermidina

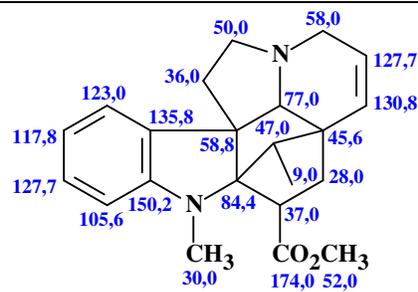


12-Desmetoxi-N-acetilcilindrocarina

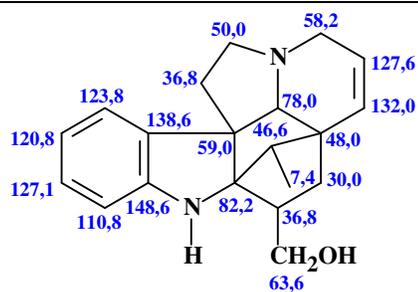
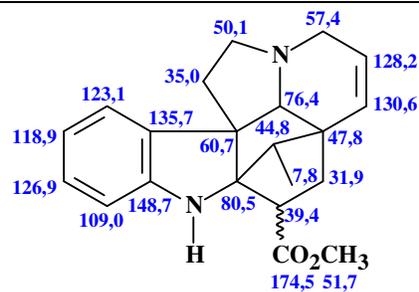
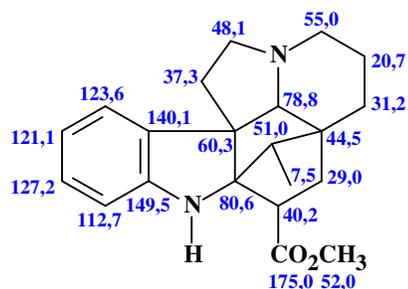
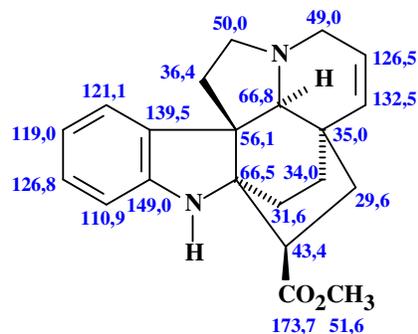
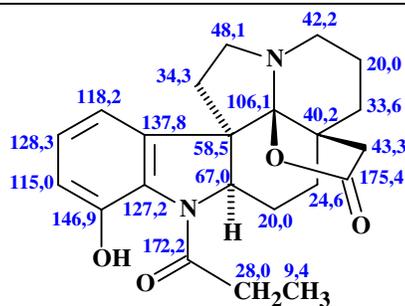
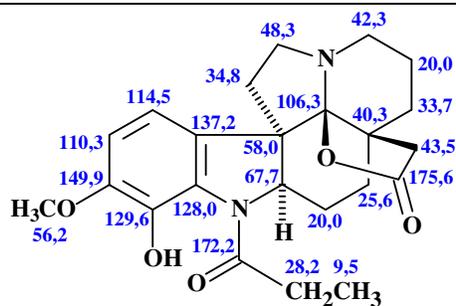
Compostos obtidos por síntese

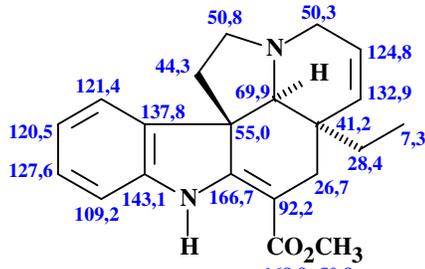
BRENNAN; SAXTON, 1986 (CDCl₃, 22,5 MHz)

Vindolinina

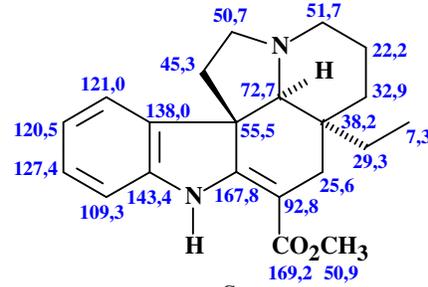


N-metilvindolinina

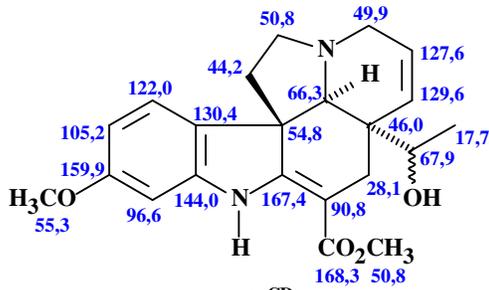
(141)
Vindolinol(142)
16-Epivindolinina(143)
14,15-Di-hidrovindolinina(144)
Venalstonina*Catharanthus* (Apocinaceae)AHOND *et al.*, 1974 (CDCl₃, 22,63 MHz)(145)
Cimicina(146)
Cimicina*Haplophyton cimidum* (Apocinaceae)CAVA *et al.*, 1973 (CDCl₃, 25,16 MHz)



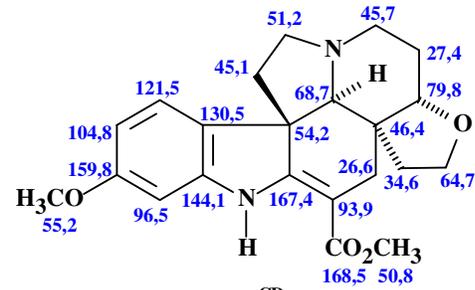
(147)^C
Tabersonina



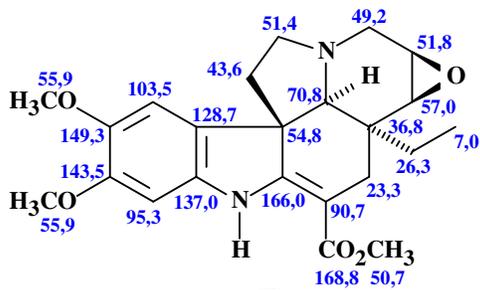
(148)^C
Vincadiformina



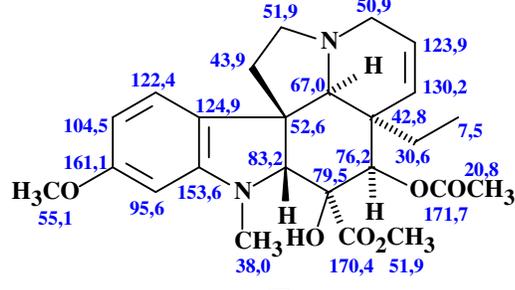
(149)^{CD}
Vandriquidina



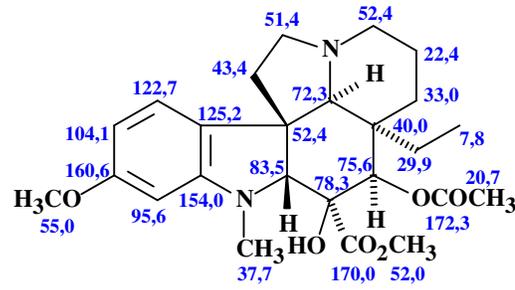
(150)^{CD}
Vandriquina



(151)^{CD}
Hazuntinina



(152)^{CD}
Vindolina



(153)^{CD}
Dihidrovindolina

Aspidosperma (Apocinaceae)

WENKERT *et al.*, 1973 (^CCHCl₃; ^{CD}CDCl₃, 15,08 MHz)

Capítulo 4

Resultados e Discussão



4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As estruturas dos compostos isolados foram determinadas através de análises dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C , uni e bidimensionais, em adição às análises dos espectros de massa de alta resolução e infravermelho. Comparações com dados espectroscópicos e físicos relatados na literatura também foram realizadas.

4.1 Determinação estrutural de AP-9

O composto AP-9 foi obtido a partir de fracionamentos cromatográficos da fração APSE-Aq, em Sephadex LH-20 e CLAE (ver Parte Experimental, p. 228), e apresentou-se como um pó avermelhado, com $[\alpha]_D^{20} = -8,35^\circ$ (c 0,23, MeOH) $\{[\alpha]_D = -14^\circ; c$ 0,28, CHCl_3 (GAGNON; SPINO, 2009)}.

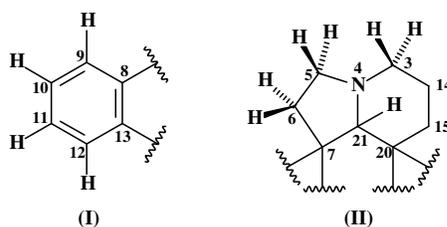
A análise do espectro de massa de alta resolução de AP-9 (Figura 36, p. 76), obtido por ionização por *electrospray* (ESI), operando no modo positivo, mostrou o pico da molécula protonada $[\text{M} + \text{H}]^+$ em m/z 281,2016, sugerindo a fórmula molecular $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_2$ (calculada 281,2017), equivalente a um Índice de Deficiência de Hidrogênio (IDH) igual a 9.

O espectro na região do infravermelho de AP-9 (Figura 37, p. 76) mostrou uma banda larga, com inflexão em 3341 cm^{-1} , atribuída à deformação axial de ligação N-H, além das bandas em 1340 e 1254 cm^{-1} , características de deformação axial de ligação C-N. As absorções em 2925 e 2856 cm^{-1} foram atribuídas à presença dos estiramentos assimétrico e simétrico, respectivamente, de ligações C-H de carbonos sp^3 , enquanto as absorções em 1607 e 1476 cm^{-1} foram atribuídas às bandas esqueléticas típicas de anel aromático. A natureza aromática do composto foi ainda reforçada pelo pico intenso em 746 cm^{-1} , característico de deformação angular fora do plano de ligação C-H de anel benzênico *orto*-substituído. A absorção em 1459 cm^{-1} foi atribuída à deformação angular de ligação N-H de amina secundária.

O espectro de RMN ^1H de AP-9 (Figura 38 e Figura 39, p. 77) apresentou sinais em três regiões bem distintas. A primeira, composta por quatro bandas com deslocamentos e multiplicidades característicos de hidrogênios ligados a carbonos aromáticos contíguos: dois dupletos em $\delta_{\text{H}} 7,47$ ($J = 7,5\text{ Hz}$, H-9) e $6,84$ ($J = 7,5\text{ Hz}$, H-12) e dois tripletos em $\delta_{\text{H}} 7,13$ ($J = 7,5\text{ Hz}$, H-11) e $6,93$ ($J = 7,5\text{ Hz}$, H-10), sugerindo a presença de um anel benzênico *orto*-substituído (Figura 28, p. 68, I), confirmando a sugestão do IV. A segunda região, composta por bandas com deslocamentos característicos de hidrogênios ligados a carbonos nitrogenados permitiu a observação de um simpleto em $\delta_{\text{H}} 3,91$ (H-21), um quarteto em $\delta_{\text{H}} 3,74$ ($J = 10,0$

Hz, H-5 α), um triplete em δ_{H} 3,60 ($J = 10,0$ Hz, H-5 β), um duplo duplete em δ_{H} 3,07 ($J = 14,0$ e 10,0 Hz, H-6 β), além de um multiplete em δ_{H} 3,47 (H-3 β) parcialmente superposto a um multiplete em δ_{H} 3,44 (H-3 α) (Figura 28, p. 68, II). A terceira região, composta por multipletos entre 1,4 e 2,4 ppm, é característica de hidrogênios ligados a carbonos sp³ não funcionalizados (Tabela 4, p. 75).

Figura 28 - Subestruturas sugeridas a partir da análise do espectro de RMN ¹H do composto AP-9.



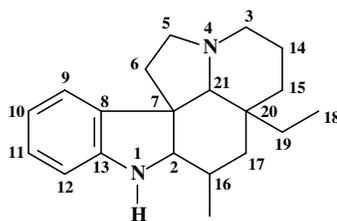
O espectro de RMN ¹³C-CPD de AP-9 (Figura 40, p. 78) exibiu 17 linhas espectrais, e por comparação com o espectro DEPT 135 (Figura 40, p. 78), permitiu a observação de cinco sinais de carbonos não-hidrogenados (δ 149,1; 138,5; 65,7; 58,5; 31,5), cinco de carbonos mono-hidrogenados (δ 129,5; 123,5; 123,1; 114,2; 69,7) e sete de carbonos metilênicos (δ 52,0; 35,7; 34,0; 33,7; 30,0; 25,9; 16,1). Os dois sinais de carbonos restantes para completar a fórmula molecular proposta foram observados pelo espectro de RMN 2D ¹H, ¹³C-HSQC (Figura 41, p. 78), um em δ_{C} 48,9 (sobrepuesto pelo sinal do solvente, MeOD) e outro em δ_{C} 30,0 (este sinal apresentou correlação com quatro hidrogênios, indicando tratar-se de dois carbonos metilênicos superpostos).

Os sinais de carbonos sp² mono-hidrogenados em δ_{C} 129,5 (C-11), 123,5 (C-9), 123,1 (C-10) e 114,2 (C-12) e não-hidrogenados em δ_{C} 149,1 (C-13) e 138,5 (C-8) foram atribuídos ao anel benzênico *orto*-dissubstituído anteriormente proposto. Como o IDH do anel benzênico é quatro, inferiu-se que o composto apresentava cinco outros anéis, visto que não havia mais sinais de carbonos insaturados.

A análise do espectro de RMN 2D ¹H, ¹H-COSY de AP-9 (Figura 42, p. 79) mostrou os acoplamentos geminais dos hidrogênios em δ_{H} 3,74 com 3,60 (H-5 α e H-5 β); 3,07 com 1,83 (H-6 β e H-6 α); 2,04 com 1,80 (H-14 α e H-14 β); 1,64 com 1,46 (H-15 α e H-15 β); 2,29 com 1,97 (H-16 β e H-16 α); e 1,72 com 1,42 (H-19 α e H-19 β). O espectro exibiu ainda acoplamentos escalares entre os hidrogênios em δ_{H} 3,74 (H-5 α) com 3,07 (H-6 β) e 1,83 (H-6 α); 3,60 (H-5 β) com 1,83 (H-6 α); 3,47 (H-3 β) com 2,04 (H-14 α) e 1,80 (H-14 β); 2,29 (H-16 β) com 1,49 (H-18b).

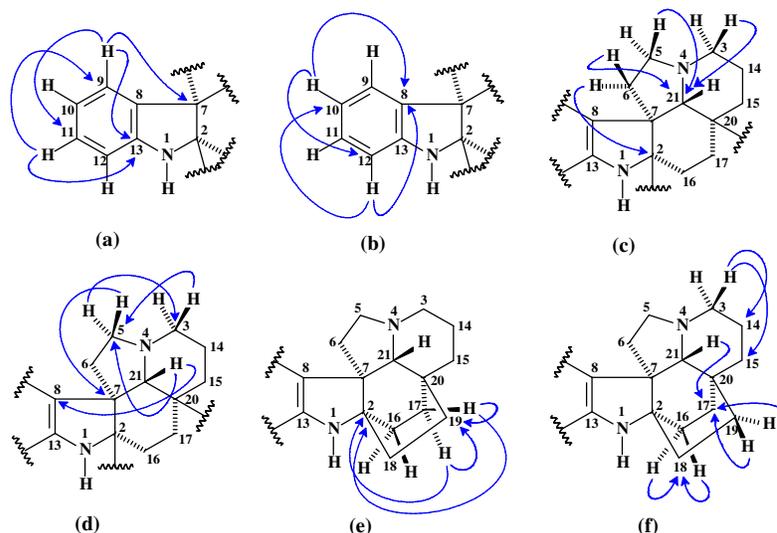
A partir dos dados expostos, sugeriu-se que o composto tivesse a estrutura do esqueleto plumerano mostrado na Figura 29. Porém, comparando-se os padrões de hidrogenação deste esqueleto com o do composto AP-9, observou-se neste apenas um carbono metínico, além da ausência de carbono metílico, propondo a perda do carbono ligado a C-16 e a ciclização da cadeia lateral etila no carbono 2 ou 21.

Figura 29 - Estrutura básica de um alcaloide plumerano pentacíclico.



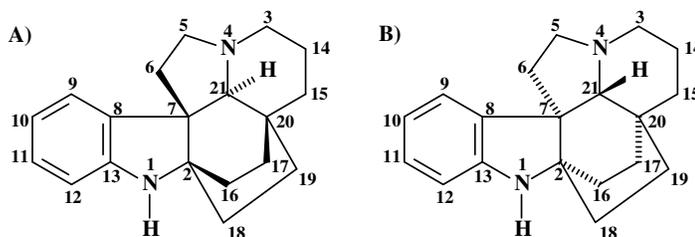
A análise do espectro de RMN 2D $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HMBC de AP-9 (Figura 43, p. 79) permitiu confirmar a estrutura proposta. Ratificando o sistema di-hidroindólico foram observados os acoplamentos a três ligações de H-9 (δ_{H} 7,47) com C-13 (δ_{C} 149,1), C-11 (δ_{C} 129,5) e C-7 (δ_{C} 58,5); H-10 (δ_{H} 6,93) com C-8 (δ_{C} 138,5) e C-12 (δ_{C} 114,2); H-11 (δ_{H} 7,13) com C-13 (δ_{C} 149,1) e C-9 (δ_{C} 123,5); e, finalmente, H-12 (δ_{H} 6,84) com C-8 (δ_{C} 138,5) e C-10 (δ_{C} 123,1) (Figura 30 a/b, p. 70). A parte da molécula relacionada com os carbonos próximos ou ligados a nitrogênio foi confirmada pelos acoplamentos a $^3J_{\text{CH}}$ de H-5 β (δ_{H} 3,60), H-3 β (δ_{H} 3,47) e H-6 β (δ_{H} 3,07) com C-21 (δ_{C} 69,7); H-6 α (δ_{H} 1,83) com C-2 (δ_{C} 65,7); H-5 β (δ_{H} 3,60) com C-7 (δ_{C} 58,5); H-21 (δ_{H} 3,91) com C-8 (138,5) e C-5 (δ_{C} 52,0); H-5 α (δ_{H} 3,74) com C-3 (δ_{C} 48,9); e H-3 β (δ_{H} 3,47) com C-5 (δ_{C} 52,0) (Figura 30, c/d, p. 70). Estas correlações mostraram que a ciclização da cadeia etila só poderia ocorrer no carbono C-2. As localizações dos carbonos metilênicos C-15 a C-19 foram asseguradas pelas correlações de H-17 β (δ_{H} 2,29) e H-17 α (δ_{H} 1,62) com C-2 (δ_{C} 65,7) e C-19 (δ_{C} 35,7); H-16 β (δ_{H} 2,29) e H-16 α (δ_{H} 1,97) com C-18 (δ_{C} 30,0); H-19 α (δ_{H} 1,72), H-19 β (δ_{H} 1,42) e H-21 (δ_{H} 3,91) com C-17 (δ_{C} 30,0); e H-3 β (δ_{H} 3,47) com C-14 (δ_{C} 16,1) e C-15 (δ_{C} 33,7) (Figura 30, e/f, p. 70).

Figura 30 - Subestruturas com setas mostrando as correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , observadas no espectro bidimensional HMBC do composto AP-9.

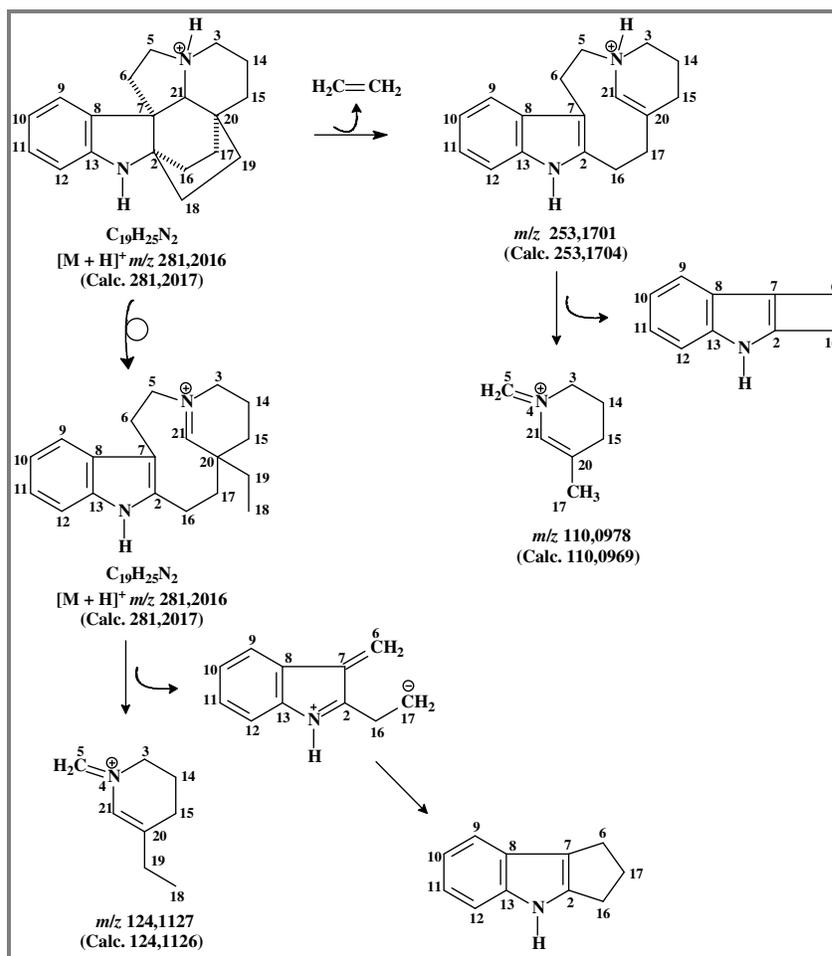


Diante de todos os dados, concluiu-se que a estrutura de AP-9 é a mostrada na Figura 31, um alcaloide conhecido como aspidofractinina. Neste caso, trata-se do enantiômero (-)-aspidofractinina, devido ao valor negativo da rotação específica.

Figura 31 - Estruturas dos enantiômeros do alcaloide aspidofractinina. A) (+)-aspidofractinina; B) (-)-aspidofractinina.

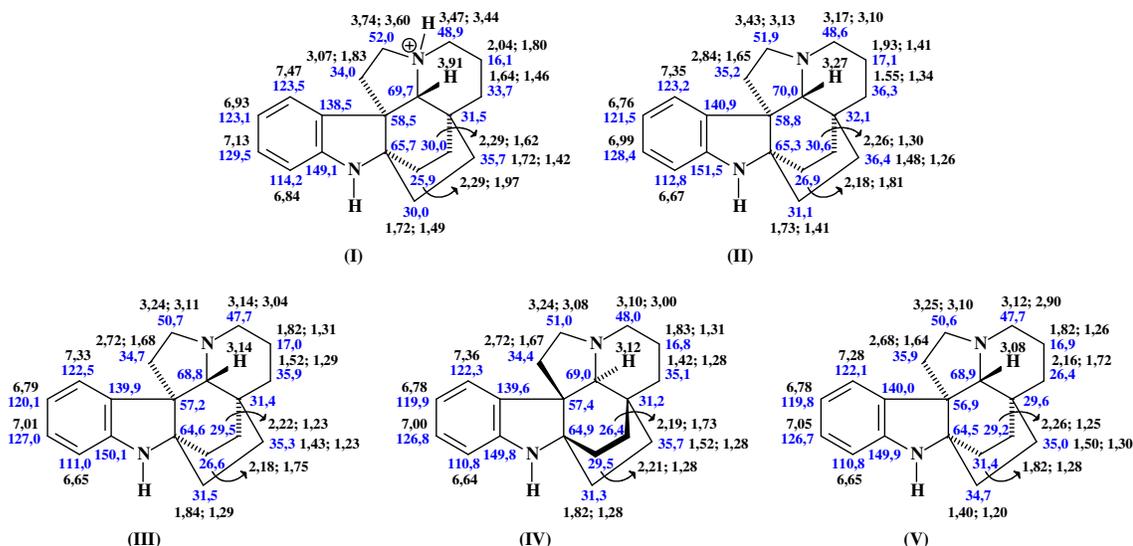


Após a elucidação da estrutura de AP-9, examinou-se o espectro de massa sequencial (EM/EM) (Figura 36, p. 76), obtido a partir do íon precursor em m/z 281,00 ($[\text{M} + \text{H}]^+$), e observou-se o pico base em m/z 253,1701, equivalente à saída de 28 unidades de massa, ou seja, uma molécula de etileno, além dos picos em m/z 124,1127 e 110,0978, como mostrado na Figura 32 (p. 71), que segundo Oliveira (1999) são característicos de alcaloides plumeranos hexacíclicos.

Figura 32 - Fragmentos de massa obtidos a partir do íon precursor em m/z 281,00.

A comparação com os dados de RMN da literatura (ARAÚJO JR. *et al.*, 2007; GAGNON; SPINO, 2009; OLIVEIRA, 1999) mostrou diferenças significativas nos valores dos deslocamentos químicos dos hidrogênios (Figura 33, p. 72), levando-se a propor que AP-9 encontrava-se em sua forma protonada, devido à interação com o TFA durante o isolamento por CLAE, ou que essas diferenças eram devidas aos espectros do composto terem sido obtidos em solvente diferente dos utilizados na literatura. Diante do problema, decidiu-se submeter AP-9 a tratamento com uma solução aquosa de NH_4OH 10%, para retorná-lo a sua forma de base livre, assim como obter os espectros em CDCl_3 , para facilitar a comparação com os dados da literatura.

Figura 33 - Comparação dos valores de deslocamentos químicos de RMN ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz) do composto AP-9 protonado (I) e desprotonado (II e III) com o alcaloide aspidofractinina, relatado por ARAÚJO JR. *et al.*, 2007 (IV) e OLIVEIRA, 1999 (V) (I e II em CD_3OD ; III a V em CDCl_3).

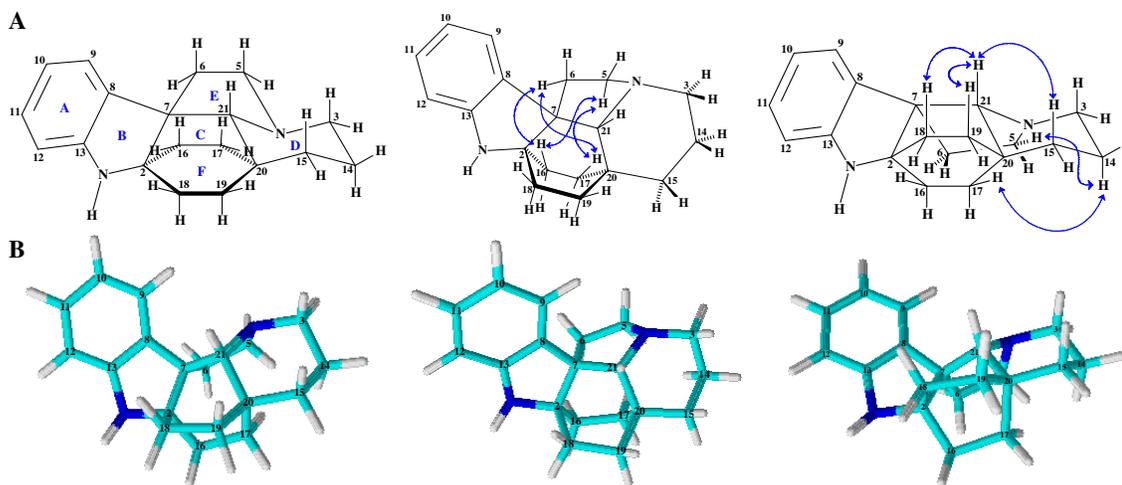


Após a análise dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C , uni e bidimensionais, de AP-9 desprotonado (Figura 45, p. 81, a Figura 50, p. 83), e a comparação com os dados do composto protonado, observou-se que o carbono C-8 encontrava-se mais blindado na molécula protonada (δ 138,5), fato justificado pela interação estérica entre o hidrogênio ligado ao nitrogênio N-4 e o hidrogênio H-9 do anel benzênico, causando uma tensão sobre o carbono C-8. Verificou-se também que a protonação do nitrogênio N-4 causou uma desblindagem nos hidrogênios dos carbonos vizinhos, devido à deficiência de elétrons do átomo de nitrogênio.

Quanto à comparação dos valores de RMN, obtidos em CDCl_3 , do composto desprotonado com os dados registrados por Araújo Jr. *et al.* (2007) foi possível observar que os valores de deslocamentos eram semelhantes, porém os autores inverteram os valores dos carbonos C-16 (δ 29,5) e C-17 (δ 26,4), que foram corretamente atribuídos em AP-9 (δ 26,6 para C-16 e δ 29,5 para C-17), pois verificou-se uma forte correlação no espectro HMBC entre o hidrogênio em δ 3,14 (H-21) com o carbono em δ 29,5, indicando que este só poderia encontrar-se na posição 17, correspondendo a uma correlação a três ligações. Também foi observada uma troca nos valores dos carbonos C-15 (δ 35,1) e C-19 (δ 35,7), os quais foram atribuídos em AP-9 como δ 35,9 para C-15 e δ 35,3 para C-19, através de correlações vistas no espectro HMBC. A comparação com os dados relatados por Oliveira (1999) também mostrou que o autor atribuiu incorretamente os carbonos metilênicos C-15 a C-19.

A estereoquímica relativa do composto foi determinada a partir da análise do espectro de RMN 2D $^1\text{H},^1\text{H}$ -NOESY de AP-9 desprotonado (Figura 51, p. 84). Os acoplamentos dipolares detectados entre os hidrogênios em δ_{H} 3,43 e 2,84 com 2,26 e 2,18, e em δ_{H} 3,43 e 2,26 com 1,93 indicaram que estes hidrogênios, pertencentes aos carbonos 5, 6, 14, 16 e 17, encontravam-se posicionados para um mesmo lado no espaço, enquanto os acoplamentos entre os hidrogênios em δ_{H} 3,27 com 1,73, 1,34 e 1,26 indicaram que estes hidrogênios, pertencentes aos carbonos 21, 18, 15 e 19, encontravam-se direcionados para um lado oposto. A partir do modelo molecular tridimensional obtido no programa “ChemSketch”, verificou-se as conformações em barco para os anéis C e F, cadeira para o anel D e envelope para o anel E, e as configurações β para H-21 e α para os carbonos 5, 6, 16 e 17 (Figura 34).

Figura 34 - Estruturas tridimensionais do composto AP-9 desprotonado, com setas duplas mostrando os acoplamentos dipolares detectados no experimento NOESY (A), e modelos moleculares 3D construídos pelo programa “ChemSketch” (B).

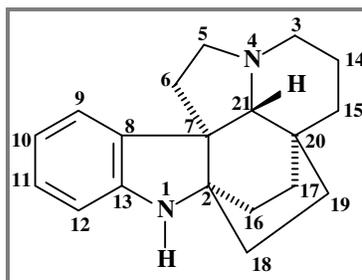


O espectro de RMN 2D $^1\text{H},^1\text{H}$ -NOESY de AP-9 protonado (Figura 44, p. 80) mostrou os acoplamentos dipolares entre os hidrogênios em δ_{H} 3,91 com 3,47 e 1,42, pertencentes aos carbonos 21, 3 e 19, respectivamente, indicando que tais hidrogênios encontravam-se direcionados para um mesmo lado. Os acoplamentos entre os hidrogênios em δ_{H} 3,74 com 2,04 e 2,29, e em δ_{H} 3,07 com 2,29, indicaram a proximidade espacial desses hidrogênios, pertencentes aos carbonos 5, 14, 17, 6 e 16, respectivamente. Embora o programa “ChemSketch” tenha mostrado a conformação barco para o anel D do composto protonado, os acoplamentos dipolares citados acima só podem ser observados na conformação cadeira, indicando que a conformação deve permanecer a mesma do composto desprotonado.

Então, o composto AP-9 (Figura 35, p. 75) foi identificado, segundo pesquisa no “SciFinder”, como o alcaloide plumerano hexacíclico (-)-2,3,4,5,11,12-hexahidro-

6*H*,13*aH*,3*a*,5*a*-etano-1*H*-indolizino[8,1-*cd*]carbazol, conhecido como aspidofractinina. Ele já foi anteriormente isolado da casca do caule de *Aspidosperma pyrifolium* (ARAÚJO JR. *et al.*, 2007).

Figura 35 - Estrutura do composto AP-9, identificado como o alcaloide (-)-aspidofractinina.


 Tabela 4 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C do composto AP-9 protonado (500 e 125 MHz, CD_3OD) e correlações a mais de uma ligação observadas no espectro HMBC.

AP-9				
	HSQC		HMBC	
	δ_{C}	δ_{H} (mult, J, H)	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
2	65,7	—	H-16 α ; H-16 β ; H-18b	H-6 α ; H-6 β ; H-17 α
3β	48,9	3,47 (m, 1H)		H-5 α
3α		3,44 (m, 1H)		
5α	52,0	3,74 (q, 10,0 Hz, 1H)	H-6 α	H-3 β ; H-21
5β		3,60 (t, 10,0 Hz, 1H)		
6β	34,0	3,07 (dd, 14,0; 10,0 Hz, 1H)	H-5 α	H-21
6α		1,83 (m, 1H)		
7	58,5	—	H-6 α ; H-6 β ; H-21	H-5 β ; H-9; H-16 α
8	138,5	—		H-6 β ; H-10; H-12; H-21
9	123,5	7,47 (d, 7,4 Hz, 1H)	H-10	H-11
10	123,1	6,93 (t, 7,4 Hz, 1H)		H-12
11	129,5	7,13 (t, 7,4 Hz, 1H)	H-10	H-9
12	114,2	6,84 (d, 7,4 Hz, 1H)	H-11	H-10
13	149,1	—		H-9; H-11
14α	16,1	2,04 (m, 1H)	H-3 β	
14β		1,80 (m, 1H)		
15α	33,7	1,64 (m, 1H)		H-3 β
15β		1,46 (m, 1H)		
16β	25,9	2,29 (m, 1H)	H-17 α	H-18b
16α		1,97 (m, 1H)		
17β	30,0	2,29 (m, 1H)		H-19 α ; H-19 β ; H-21
17α		1,62 (m, 1H)		
18α	30,0	1,72 (m, 1H)		H-16 α ; H-16 β
18β		1,49 (m, 1H)		
19α	35,7	1,72 (m, 1H)	H-18b	H-17 α ; H-17 β ; H-21
19β		1,42 (m, 1H)		
20	31,5	—	H-17 α ; H-19 α ; H-21	H-18b
21	69,7	3,91 (s, 1H)		H-3 β ; H-5 β ; H-6 β ; H-15 β ; H-19 α

Figura 36 - Espectro de massa de alta resolução de AP-9, obtido por ESI (A), e espectro de massa EM/EM obtido a partir do íon precursor em m/z 281,00 (B).

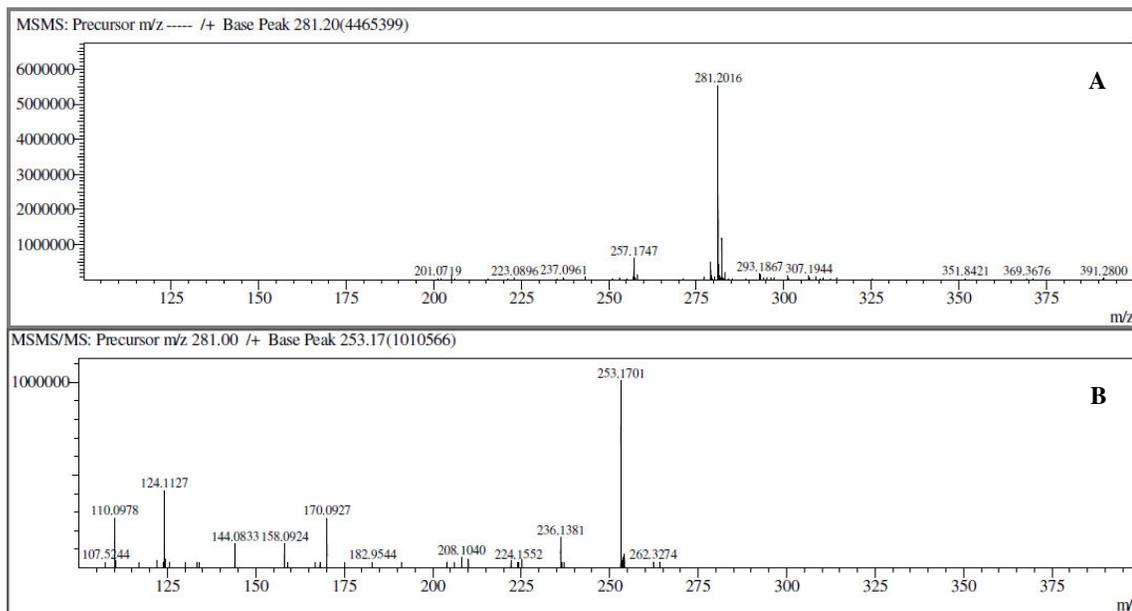


Figura 37 - Espectro de absorção na região do infravermelho de AP-9 (obtido no suporte UATR).

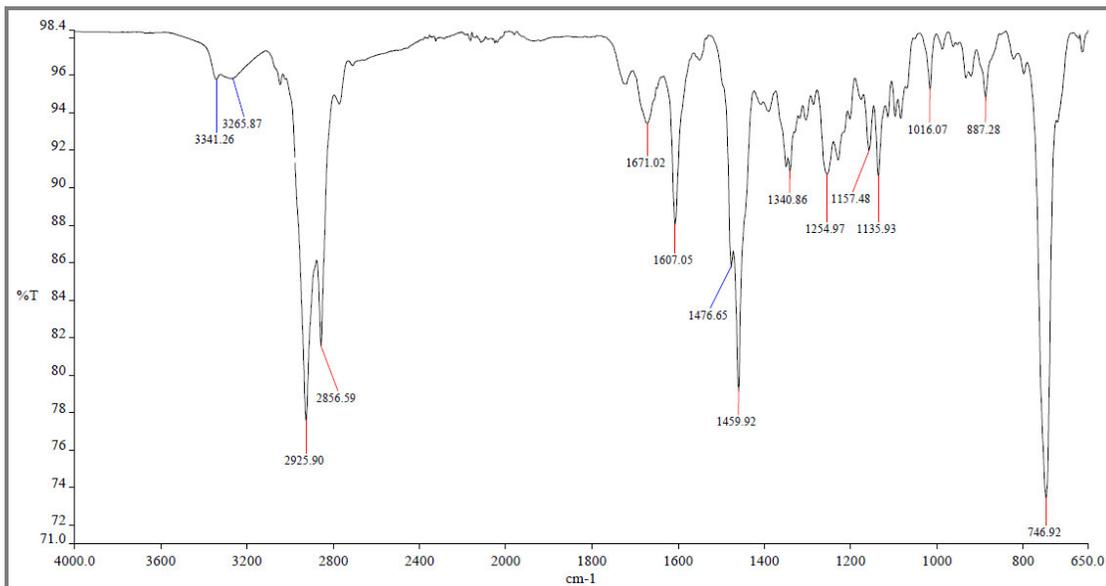


Figura 38 - Espectro de RMN ¹H de AP-9 protonado (CD₃OD, com supressão do sinal da água, 500 MHz) e detalhe para a expansão da região entre 7,5 e 6,8 ppm.

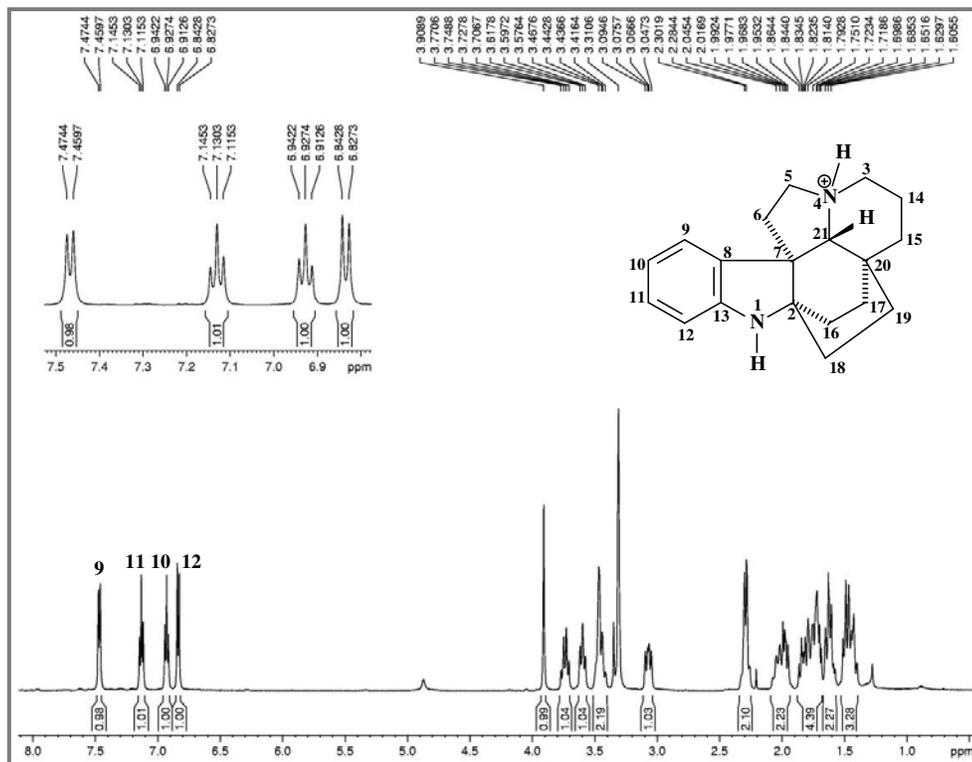


Figura 39 - Expansão do espectro de RMN ¹H de AP-9 protonado (CD₃OD, 500 MHz), correspondente à região entre 4,0 e 1,3 ppm.

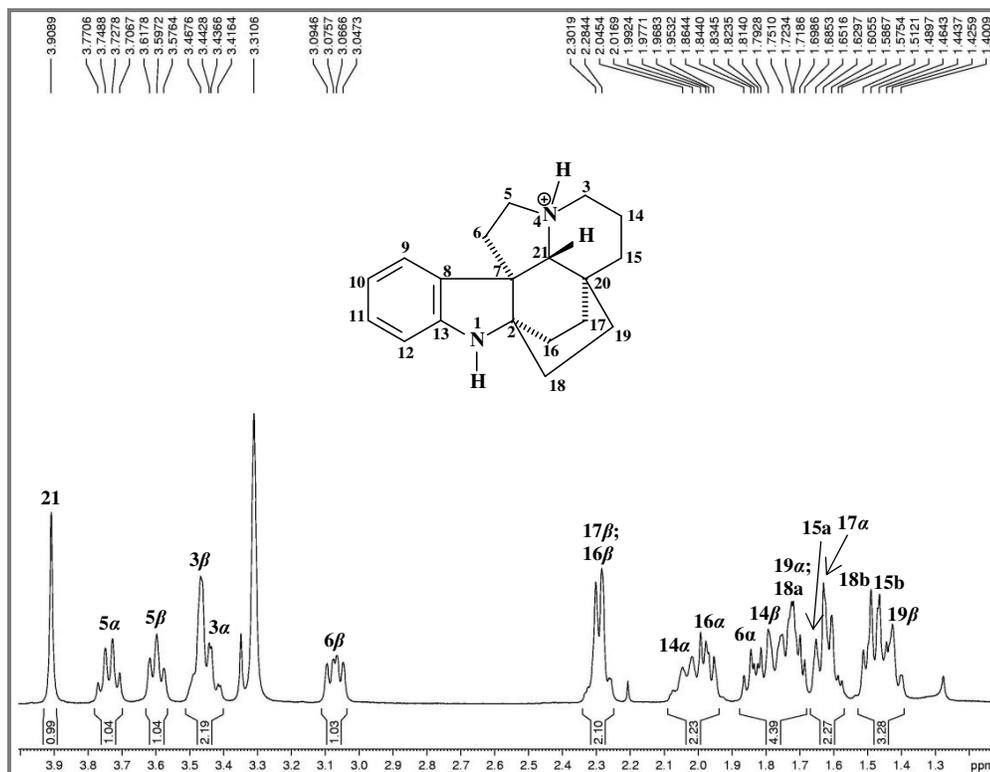


Figura 40 - Espectro de RMN ¹³C-CPD (A) e DEPT 135 (B) de AP-9 protonado (CD₃OD, 125 MHz).

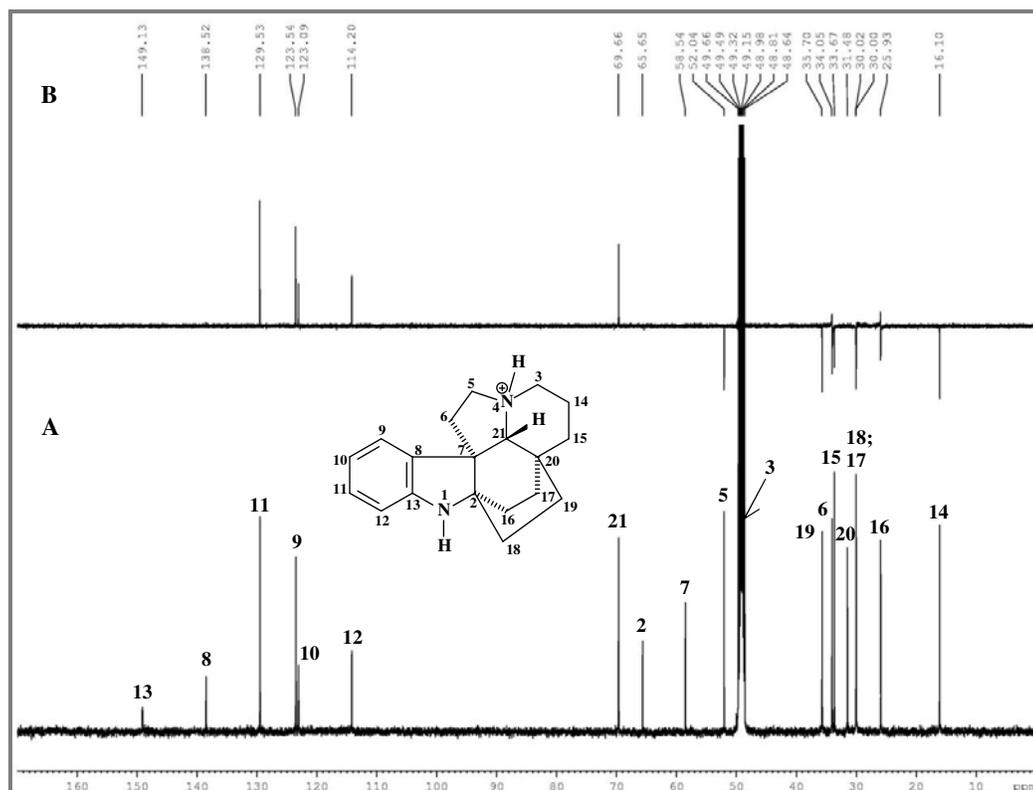


Figura 41 - Espectro de RMN 2D ¹H,¹³C-HSQC de AP-9 protonado (CD₃OD, 500 x 125 MHz) e expansão.

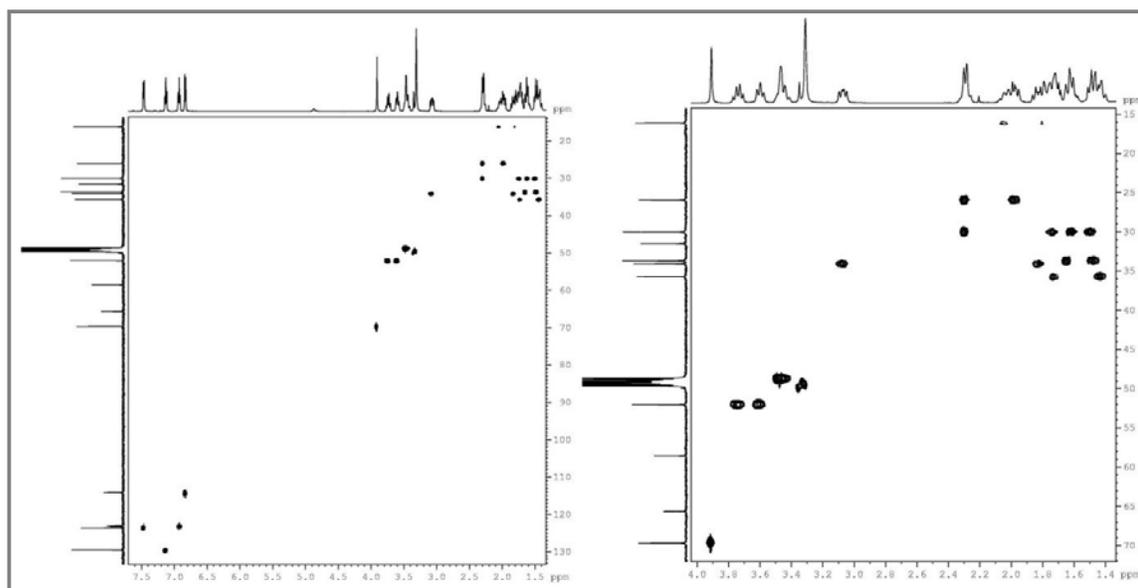


Figura 42 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY de AP-9 protonado (CD_3OD , 500 x 500 MHz) e expansão.

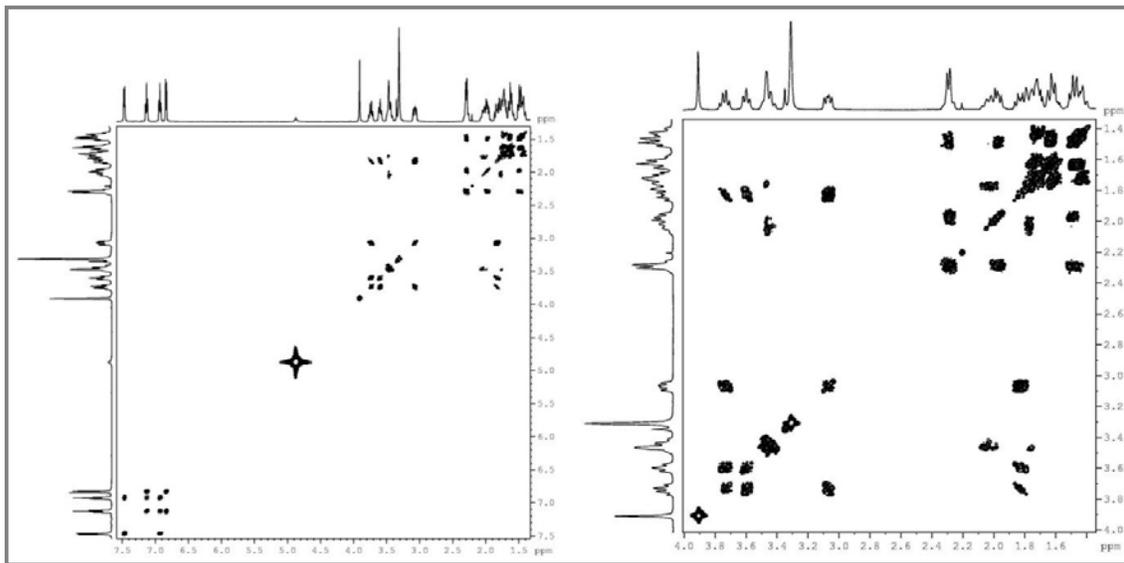


Figura 43 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de AP-9 protonado (CD_3OD , 500 x 125 MHz) e expansões.

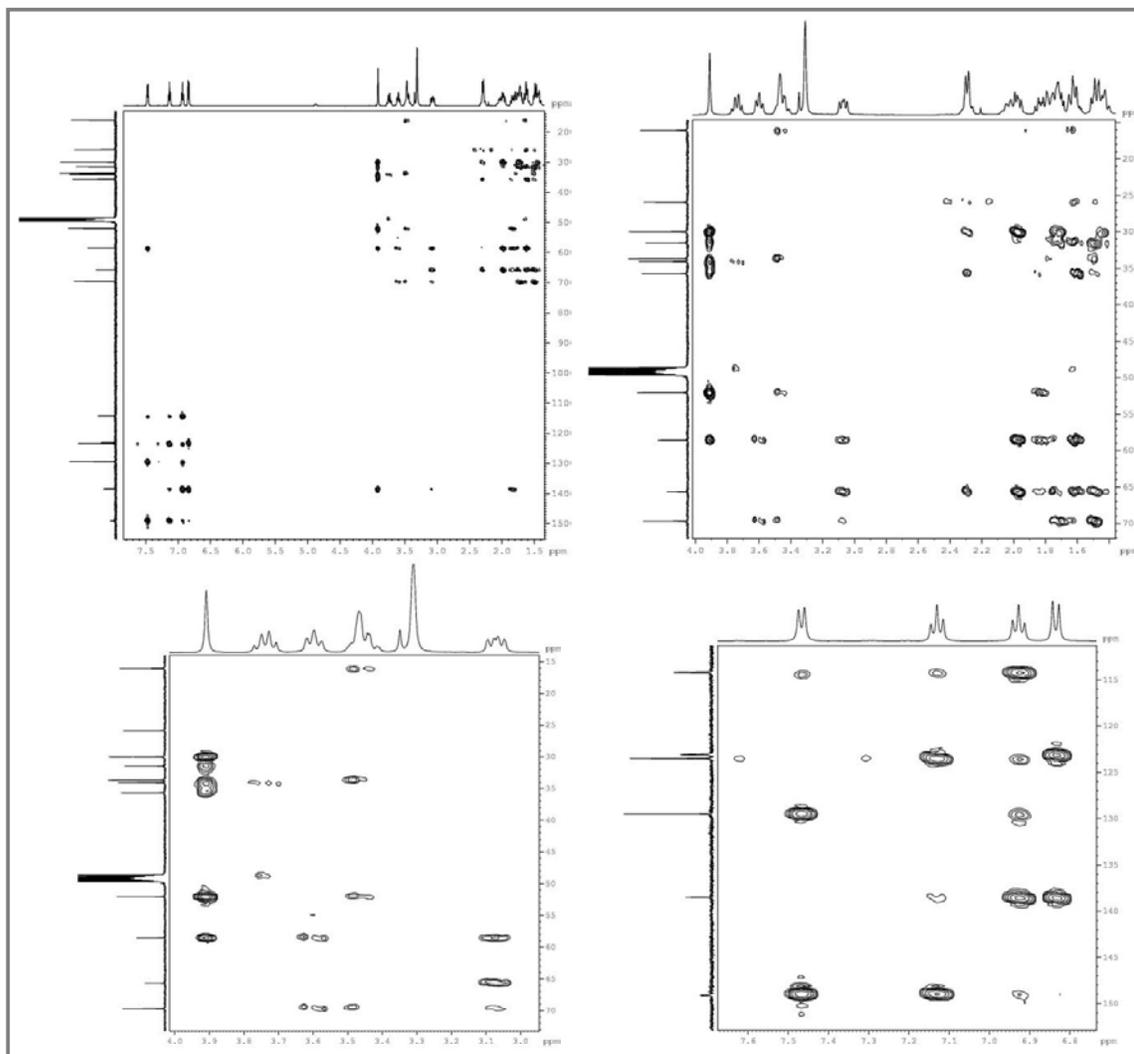


Figura 44 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -NOESY de AP-9 protonado (CD_3OD , 500 x 500 MHz) e expansão.

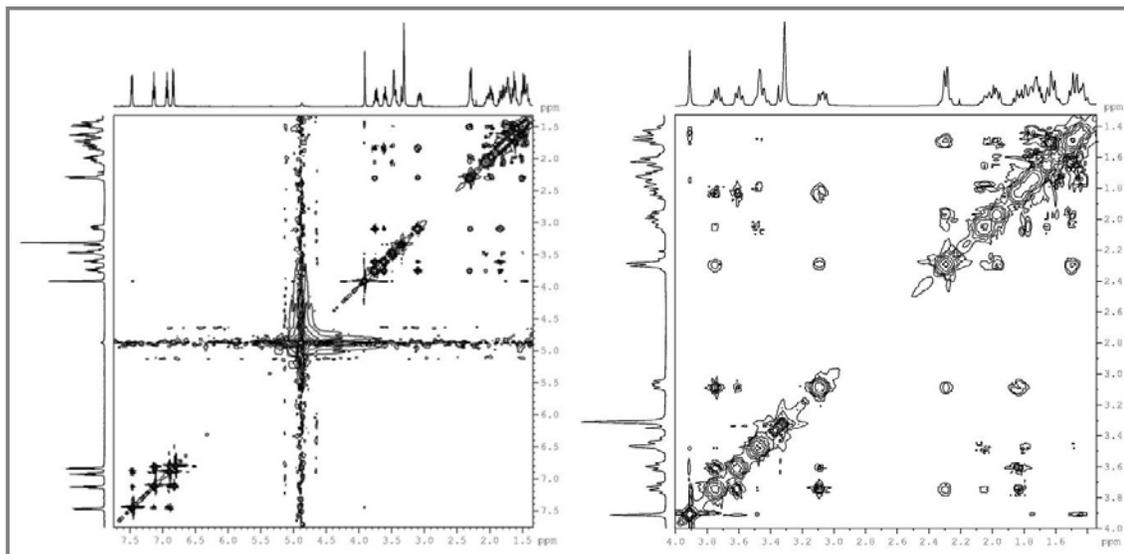


Figura 45 - Espectro de RMN ¹H de AP-9 desprotonado (CD₃OD, com supressão do sinal da água, 500 MHz) e detalhe para a expansão da região entre 7,4 e 6,6 ppm.

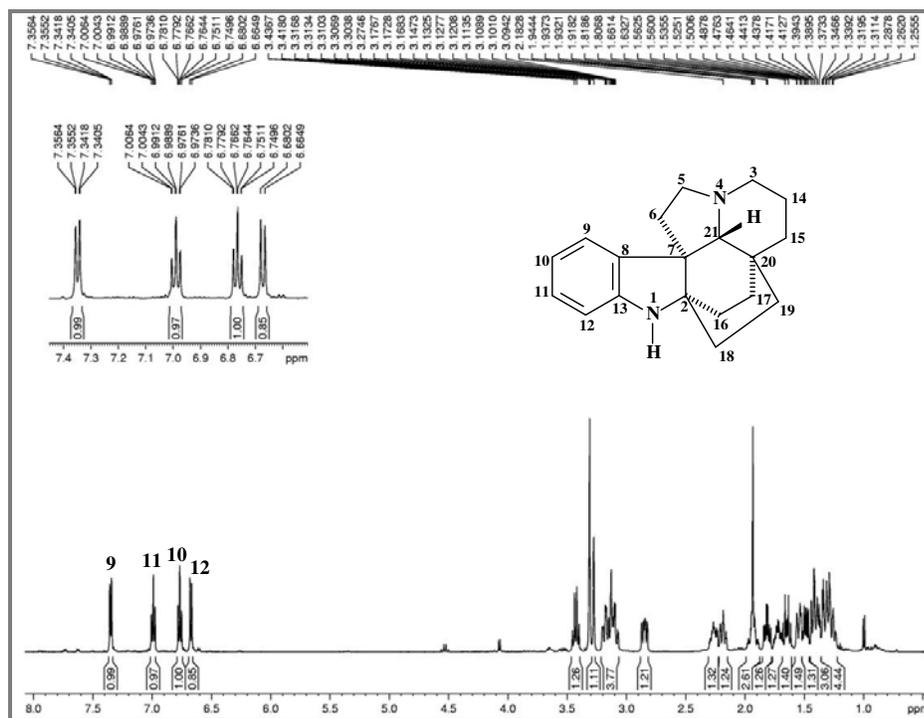


Figura 46 - Expansões do espectro de RMN ¹H de AP-9 desprotonado (CD₃OD, 500 MHz), correspondente às regiões entre 3,5 e 2,8 ppm (esquerda) e 2,3 e 1,2 ppm (direita).

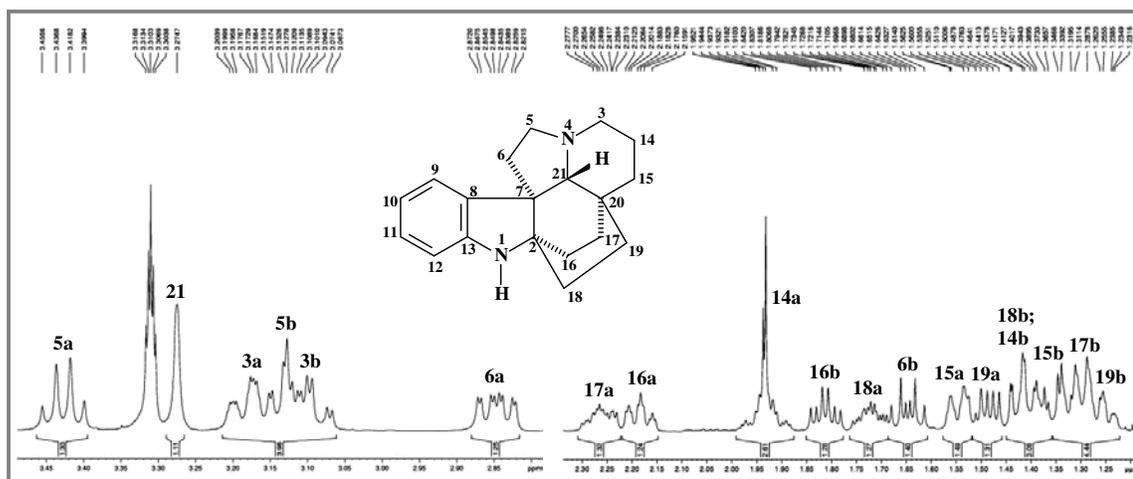


Figura 47 - Espectro de RMN ^{13}C -CPD (A) e APT (B) de AP-9 desprotonado (CD_3OD , 125 MHz).

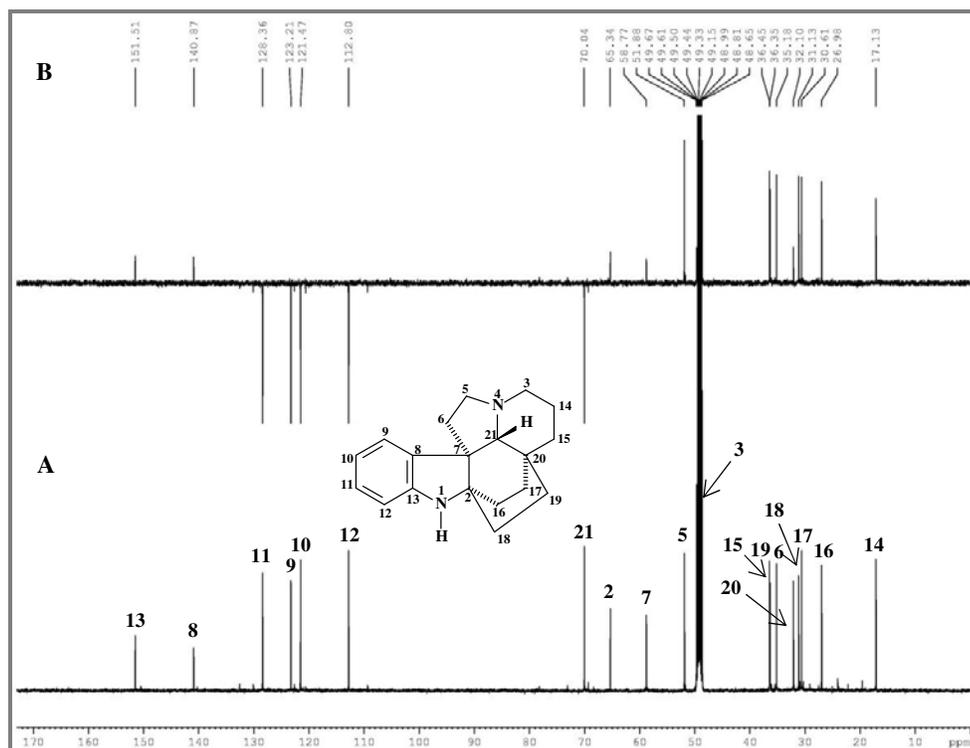


Figura 48 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC de AP-9 desprotonado (CD_3OD , 500 x 125 MHz) e expansão.

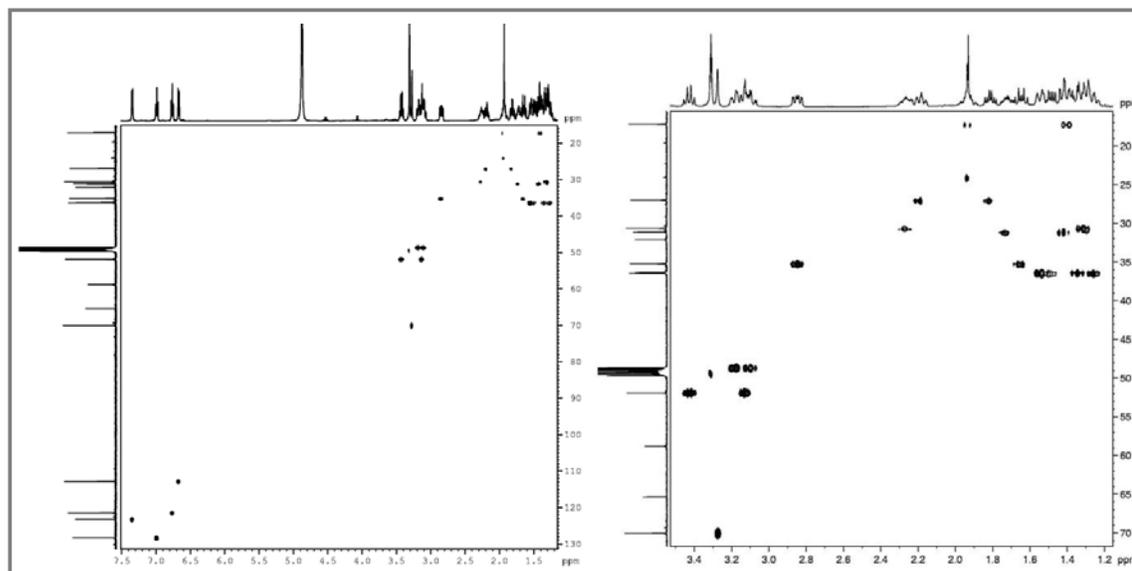


Figura 49 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY de AP-9 desprotonado (CD_3OD , 500 x 500 MHz) e expansão.

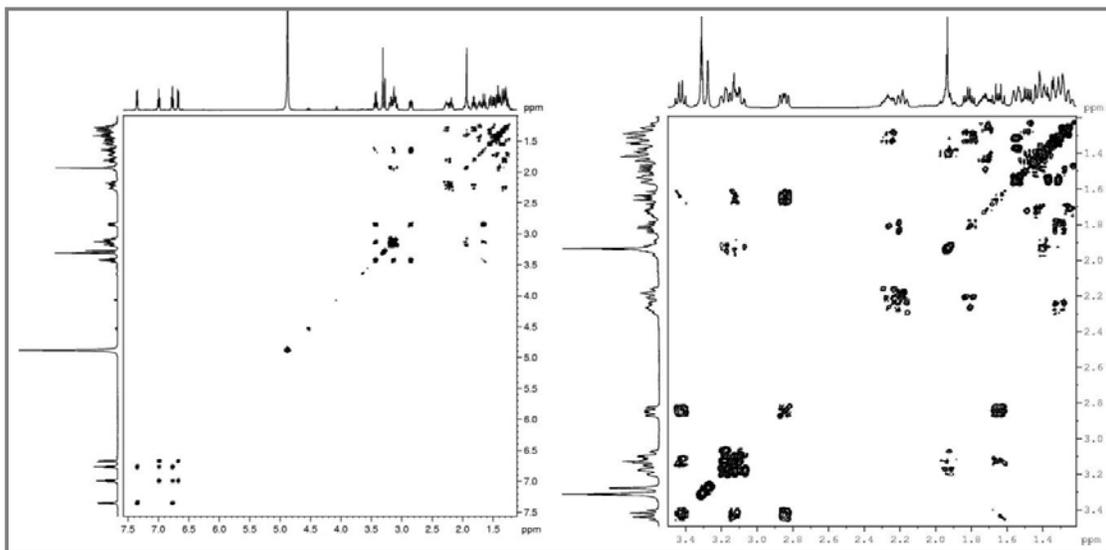


Figura 50 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de AP-9 desprotonado (CD_3OD , 500 x 125 MHz) e expansões.

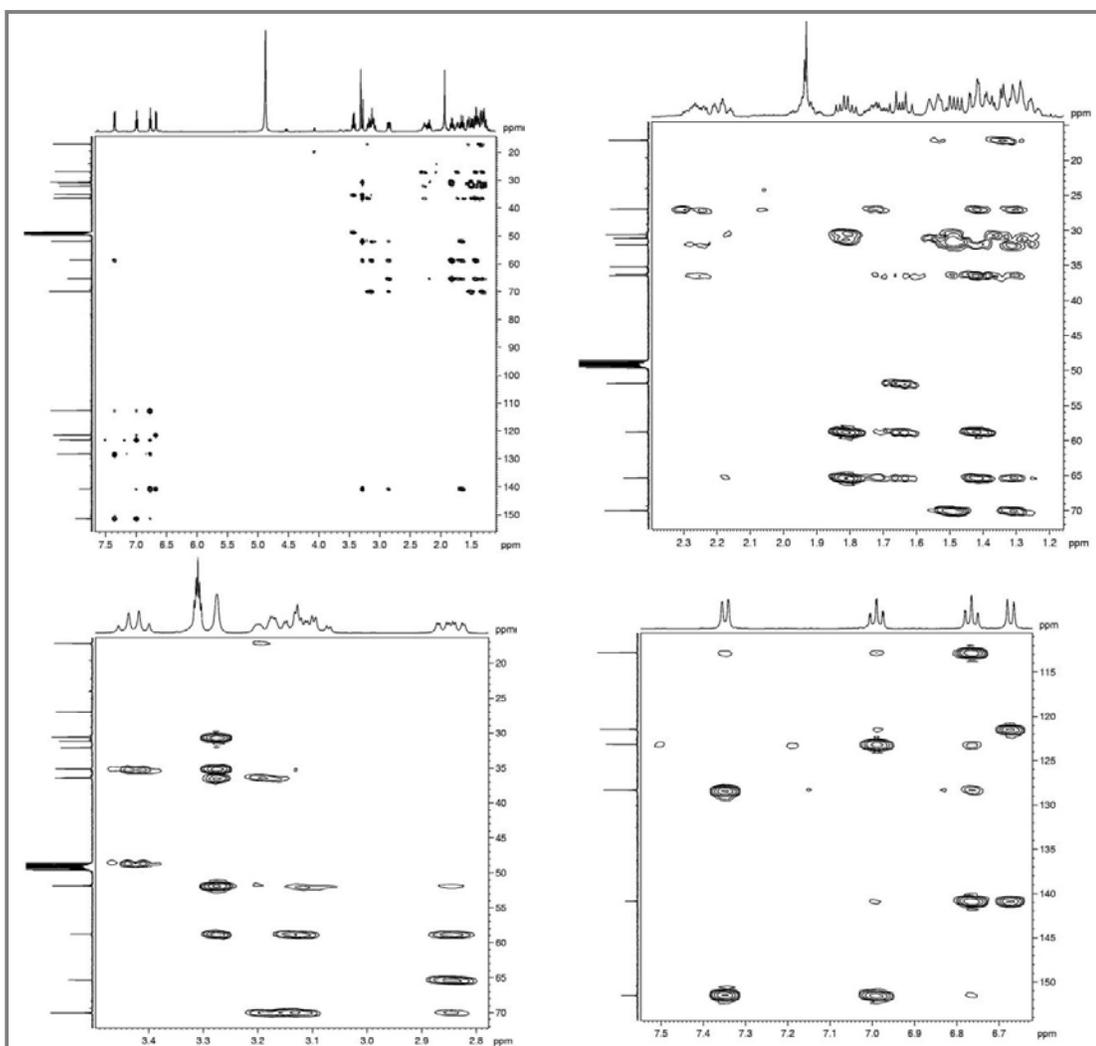
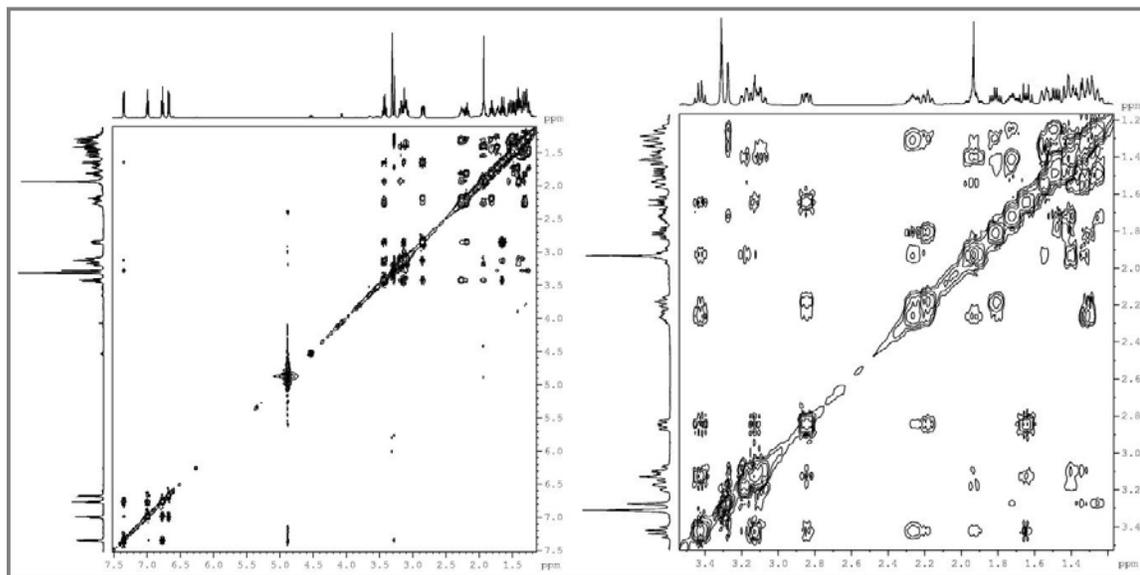


Figura 51 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -NOESY de AP-9 desprotonado (CD_3OD , 500 x 500 MHz) e expansão.



4.2 Determinação estrutural de AP-10

O composto AP-10 também foi isolado a partir de fracionamentos cromatográficos sucessivos da fração APSE-Aq, em Sephadex LH-20 e CLAE (ver Parte Experimental, p. 229), apresentando-se como um sólido amorfo alaranjado, com ponto de fusão 104,9-107,0 °C e $[\alpha]_D^{20} = + 31,5^\circ$ (c 0,15, MeOH) { $[\alpha]_D^{23,5} = + 27^\circ \pm 8$; c 0,251, CHCl₃ (BYCROFT *et al.*, 1964); $[\alpha]_D^{25} = + 34^\circ \pm 15$; c 0,042, MeOH (GUGGISBERG *et al.*, 1969)}.

O espectro de massa de alta resolução de AP-10 (Figura 58, p. 92), obtido por ionização por *electrospray* no modo positivo, exibiu o pico da molécula protonada $[M + H]^+$ em m/z 323,2124 (calculada 323,2123), sugerindo a fórmula molecular C₂₁H₂₆N₂O, equivalente a um IDH = 10.

O espectro na região do infravermelho de AP-10 (Figura 59, p. 92) mostrou um pico de absorção em 1646 cm⁻¹, característico de carbonila, neste caso provavelmente de amida. Bandas intensas em 1177 e 1124 cm⁻¹ foram atribuídas a deformações axiais de ligações C-N, e bandas em 2938 e 2869 cm⁻¹, aos estiramentos assimétrico e simétrico de ligações C-H de carbonos sp³, respectivamente. As absorções em 1481 e 1379 cm⁻¹ foram atribuídas às deformações angulares simétricas de grupos metileno e metila, respectivamente, enquanto as absorções em 1594 e 1460 cm⁻¹ foram atribuídas às bandas esqueletais de anel aromático, e o pico intenso em 719 cm⁻¹ foi atribuído à deformação angular fora do plano de ligação C-H de anel benzênico *orto*-substituído.

A análise do espectro de RMN ¹H de AP-10 (Figura 60 e Figura 61, p. 93) mostrou três bandas características de hidrogênios aromáticos, um duplete em δ_H 7,59 ($J = 7,5$ Hz, H-9) e dois tripletos em δ_H 7,28 ($J = 7,5$ Hz, H-11) e 7,15 ($J = 7,5$ Hz, H-10). A região entre 3 e 4 ppm mostrou-se similar à mesma região observada no espectro do composto AP-9, visualizando-se um simpleto em δ_H 3,99 (H-21), um quarteto largo em δ_H 3,80 ($J = 10,0$ Hz, H-5 α), um triplo duplete em δ_H 3,68 ($J = 12,0$; 10,0 e 2,5 Hz, H-5 β), um triplo duplete em δ_H 3,07 ($J = 15,0$; 10,0 e 2,5 Hz, H-6 α), além de um multiplete para dois hidrogênios em δ_H 3,47-3,49 (H-3 α e H-3 β). Além destes, foram vistos multipletos entre 1,4 e 2,4 ppm, característicos de hidrogênios ligados a carbonos sp³, e um simpleto em δ_H 2,37 (3H-23), cujo deslocamento e integração para três hidrogênios sugeriram a presença de uma metila de grupo acetílico.

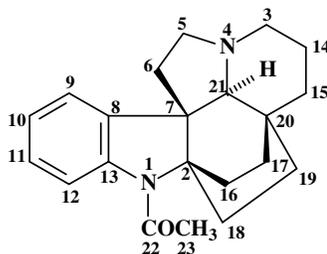
O espectro de RMN ¹³C-CPD de AP-10 (Figura 62, p. 94) exibiu 20 sinais, e por comparação com o espectro APT (Figura 62, p. 94), juntamente com a análise do espectro HSQC (Figura 63, p. 94), permitiu a observação de seis sinais de carbonos não-hidrogenados (δ 171,7; 142,6; 139,9; 70,3; 58,8; 31,3), cinco de carbonos mono-hidrogenados (δ 129,6;

126,1; 123,4; 118,1; 69,4), oito de carbonos metilênicos (δ 52,2; 34,9; 34,6; 33,6; 29,9; 28,1; 26,4; 16,0) e um de carbono metílico (δ 25,6). O sinal que faltava para completar a fórmula molecular sugerida foi observado pelo espectro HSQC, em δ_C 48,9, referente a um carbono metilênico sobreposto pelo sinal do solvente, MeOD. O sinal em δ 171,7, característico de carbonila, em adição ao carbono metílico em δ 25,6, este correlacionado no espectro HSQC aos hidrogênios em δ 2,37, sugeriram a presença de grupo *N*-acetílico, devido aos deslocamentos do carbono metílico e seus respectivos hidrogênios serem característicos de amida, fato condizente com a sugestão do IV referente à banda observada em 1646 cm^{-1} (Tabela 5, p. 91).

Um interessante e inexplicável fato observado foi que o hidrogênio diretamente ligado ao carbono em δ 118,1 não foi detectado, porém é certo que este carbono seja mono-hidrogenado, devido à fórmula proposta para este composto e às multiplicidades dos outros hidrogênios benzênicos, características de um anel benzênico *orto*-substituído.

Comparando-se os dados de RMN ^1H e ^{13}C do composto AP-10 com os de AP-9 protonado, e analisando-se os acoplamentos escalares observados no espectro COSY de AP-10 (Figura 64, p. 95), foi possível sugerir que o composto seria o derivado *N*-acetilado de AP-9, em sua forma protonada, visto que também foi isolado por CLAE utilizando-se TFA (Figura 52).

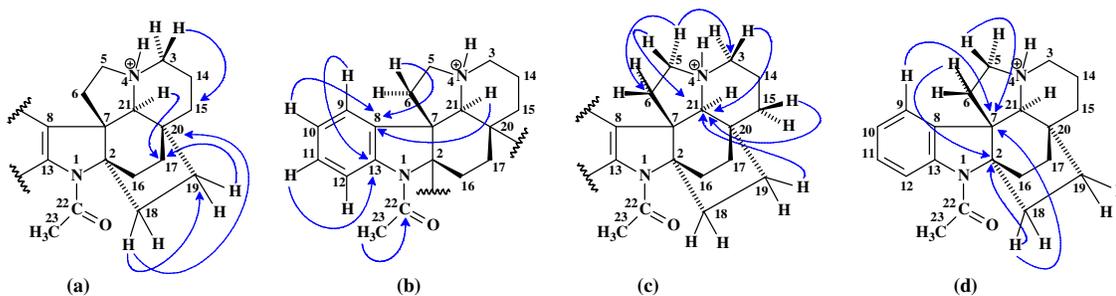
Figura 52 - Estrutura proposta para o composto AP-10.



A estrutura foi confirmada a partir das correlações vistas no espectro HMBC (Figura 65, p. 95). As atribuições dos carbonos metilênicos C-15 a C-19 foram confirmadas pelas correlações entre os hidrogênios em δ_H 3,99 (H-21) e 1,76 (H-19a) com o carbono em δ_C 29,9 (C-17); 3,49 (H-3 β) com 33,6 (C-15); e 2,02 (H-18a) com 34,9 (C-19) e 31,3 (C-20) (Figura 53, a). Ratificando o grupo *N*-acetílico observou-se a correlação, a duas ligações, dos hidrogênios em δ 2,37 (3H-23) com a carbonila em δ 171,7 (C-22). Outras importantes correlações foram observadas entre os hidrogênios em δ_H 7,15 (H-10), 3,99 (H-21) e 1,90 (H-

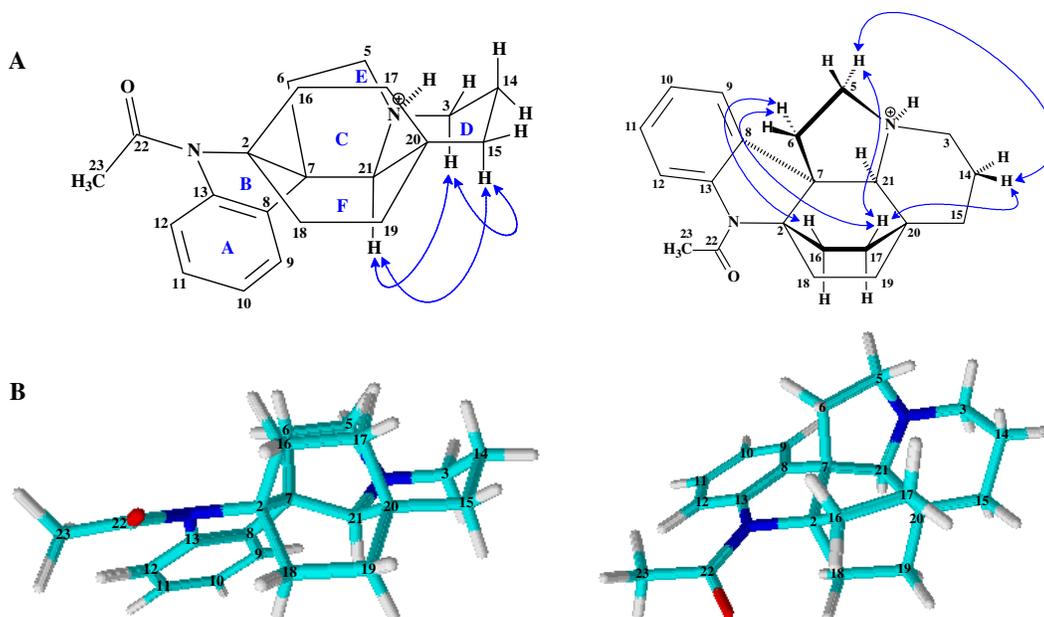
6β) com o carbono C-8 (δ_C 139,9); 7,59 (H-9) e 7,28 (H-11) com o carbono C-13 (δ_C 142,6) (Figura 53, b); 3,80 (H-5 α) com os carbonos C-3 (δ_C 48,9) e C-6 (δ_C 34,6); 3,68 (H-5 β), 3,49 (H-3 β), 1,76 (H-19a) e 1,66 (H-15 β) com o carbono C-21 (δ_C 69,4) (Figura 53, c); 3,07 (H-6 α) e 2,02 (H-18a) com o carbono C-2 (δ_C 70,3); 7,59 (H-9), 3,68 (H-5 β) e 2,02 (H-18a) com o carbono C-7 (δ_C 58,8) (Figura 53, d).

Figura 53 - Importantes correlações à longa distância ^1H - ^{13}C observadas no espectro HMBC do composto AP-10 protonado.



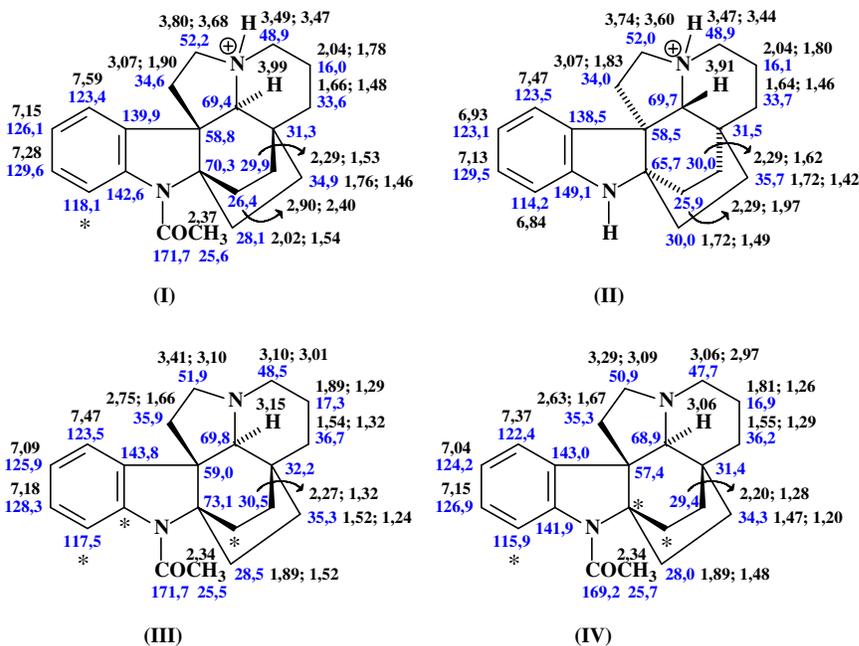
O espectro NOESY de AP-10 protonado (Figura 66, p. 96) mostrou acoplamentos dipolares entre os hidrogênios em δ 3,99 (H-21) com 3,47 (H-3 α); δ 3,47 (H-3 α) com 1,48 (H-15 α); δ 3,80 (H-5 α) com 2,29 (H-17 β) e 2,04 (H-14 β); δ 3,07 (H-6 α) com 2,29 (H-17 β) e 2,40 (H- β); δ 2,29 (H-17 β) com 2,04 (H-14 β), indicando a proximidade espacial desses hidrogênios. O espectro de NOE Seletivo (Figura 67, p. 96), obtido por irradiação no hidrogênio em δ 3,99 (H-21), exibiu acoplamentos deste com os hidrogênios em δ 3,47 (H-3 α) e 1,48 (H-15 α). A partir desses acoplamentos dipolares e da análise do modelo molecular, determinou-se que o composto apresentava o hidrogênio H-21 em configuração α e os carbonos 5, 6, 16 e 17, dos anéis C e E, em configurações β . O programa “ChemSketch” mostra que a conformação de mais baixa energia para o composto protonado apresenta os anéis C, D e F em conformações em barco, porém em solução verificou-se que o anel D encontrava-se em conformação em cadeira, pois somente assim os acoplamentos vistos no NOESY e no NOE Seletivo seriam possíveis, como também os acoplamentos entre os hidrogênios H-5 α , H-14 β e H-17 β (Figura 54, p. 88).

Figura 54 - Estruturas tridimensionais do composto AP-10 protonado, com setas duplas mostrando os acoplamentos dipolares detectados nos experimentos NOESY e NOE Seletivo (A), e modelos moleculares 3D obtidos pelo programa "ChemSketch" (B).



Assim como realizado para o composto AP-9, depois de elucidada a estrutura de AP-10 decidiu-se submetê-lo a tratamento com uma solução aquosa de NH_4OH 10%, para induzir a desprotonação do composto. A análise dos espectros de AP-10 desprotonado (Figura 68, p. 97, a Figura 72, p. 99) mostrou diferenças significativas nos valores de deslocamentos dos hidrogênios, verificando-se uma desblindagem quando ligados a carbonos próximos a nitrogênio carregado positivamente, ou seja, na molécula protonada. Também se observou, semelhantemente ao verificado para o composto AP-9, que o carbono C-8 encontrava-se mais blindado na molécula protonada (δ 139,9), provavelmente devido à interação estérica entre o hidrogênio ligado ao nitrogênio N-4 e o hidrogênio H-9 do anel benzênico (δ 7,59), causando uma tensão sobre o carbono C-8. Verificou-se ainda que a presença do grupo *N*-acetílico causa uma blindagem ao carbono sp^2 C-13, devido ao efeito gama (γ) do oxigênio e do carbono metílico da acetila, e uma desblindagem ao carbono saturado C-2, justificada pelo fato do grupo acetílico ser elétron-retirador, tornando o nitrogênio N-1 mais deficiente de elétrons (Figura 55, p. 89).

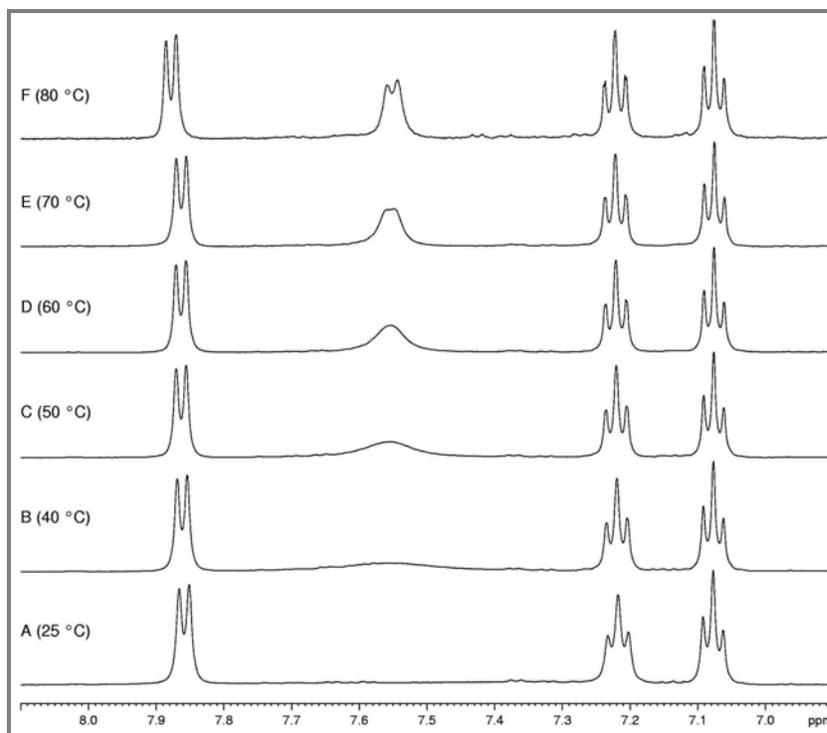
Figura 55 - Comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C dos compostos protonados AP-10 (I: 500 e 75 MHz, CD_3OD) e AP-9 (II: 500 e 125 MHz, CD_3OD), e valores de deslocamentos químicos de AP-10 desprotonado em CD_3OD (III: 500 e 125 MHz) e CDCl_3 (IV: 300 e 75 MHz). Asteriscos indicam hidrogênios e/ou carbonos não detectados.



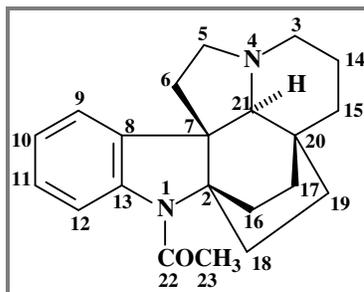
O espectro NOESY de AP-10 desprotonado (Figura 73, p. 100) mostrou os acoplamentos dipolares entre os hidrogênios em δ 3,41 com 2,27 e 1,89; δ 3,15 com 1,52 e 1,24; e δ 2,27 com 1,89, determinando a mesma estereoquímica relativa do composto protonado.

A fim de explicar o comportamento inesperado do hidrogênio H-12 no espectro de RMN ^1H do composto AP-10, foi realizada uma série de experimentos de RMN ^1H com variação de temperatura. Como se pode observar na Figura 56 (p. 90), o padrão de desdobramento esperado para os quatro hidrogênios contíguos do sistema aromático (dois dupletos e dois tripletos) começa a aparecer em torno de 50 °C (Figura 56, C), sendo completamente observado a 80 °C (Figura 56, F). A integração de cada absorção da região aromática, em δ 7,06-7,88, passa a ser para um hidrogênio (Figura 74, p. 100). O espectro COSY (Figura 75, p. 101), obtido a 70 °C, mostra o completo acoplamento do sistema aromático, e o espectro HMQC (Figura 76, p. 101) mostra a correlação do dupletos em δ 7,55 com o carbono em δ 116,0 (Figura 77, p. 102). Então, diante destes experimentos comprovou-se que, de alguma forma, o sinal de um hidrogênio ligado a carbono aromático pode não aparecer durante um experimento de RMN ^1H (Figura 56, A).

Figura 56 - Espectros parciais (δ 7,0-8,0) de RMN ^1H do composto AP-10 protonado [500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$], obtidos com variação de temperatura (25-80 $^\circ\text{C}$), mostrando o aparecimento do duplete correspondente a H-12, o qual está ausente no espectro obtido à temperatura ambiente.



Dessa forma, o composto AP-10 foi caracterizado como o alcaloide plumerano hexacíclico (+)-*N*-acetilaspidofractinina (Figura 57, p. 91), que embora já registrado na literatura por Bycroft *et al.* (1964) e Guggisberg *et al.* (1969) como produto reacional, obtido a partir da acetilação do alcaloide aspidofractinina, está sendo obtido pela primeira vez como produto natural, de origem vegetal.

Figura 57 - Estrutura do composto AP-10, identificado como o alcaloide plumerano (+)-*N*-acetilaspidofractinina.

 Tabela 5 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C do composto AP-10 protonado (500 e 75 MHz, CD_3OD), e correlações a mais de uma ligação observadas no espectro HMBC.

AP-10				
	HSQC		HMBC	
	δ_{C}	δ_{H} (mult, <i>J</i> , H)	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
2	70,3	—	H-18a	H-6 α
3β	48,9	3,49 (m, 1H)		H-5 α
3α		3,47 (m, 1H)		
5α	52,2	3,80 (ql, 10,0 Hz, 1H)	H-6 β	H-3 α ; H-3 β ; H-21
5β		3,68 (ddd, 12,0; 10,0; 2,5 Hz, 1H)		
6α	34,6	3,07 (ddd, 15,0; 10,0; 2,5 Hz, 1H)	H-5 α	H-21
6β		1,90 (dt, 15,0; 10,0 Hz, 1H)		
7	58,8	—	H-6 α ; H-6 β ; H-21	H-5 β ; H-9; H-18a
8	139,9	—		H-6 β ; H-10; H-21
9	123,4	7,59 (d, 7,5 Hz, 1H)		H-11
10	126,1	7,15 (t, 7,5 Hz, 1H)		
11	129,6	7,28 (t, 7,5 Hz, 1H)		H-9
12	118,1	n.d.		
13	142,6	—		H-9; H-11
14β	16,0	2,04 (m, 1H)	H-3 α ; H-3 β ; H-15 α ; H-15 β	
14α		1,78 (m, 1H)		
15β	33,6	1,66 (m, 1H)		H-3 β
15α		1,48 (m, 1H)		
16α	26,4	2,90 (m, 1H)		
16β		2,40 (m, 1H)		
17β	29,9	2,29 (m, 1H)		H-19a; H-21
17α		1,53 (m, 1H)		
18a	28,1	2,02 (m, 1H)		
18b		1,54 (m, 1H)		
19a	34,9	1,76 (m, 1H)	H-18a	
19b		1,46 (m, 1H)		
20	31,3	—	H-19a; H-19b; H-21	H-18a
21	69,4	3,99 (s, 1H)		H-3 β ; H-5 β ; H-15 β ; H-19a
22	171,7	—	H-23	
23	25,6	2,37 (s, 3H)		

n.d. = não detectado neste solvente.

Figura 58 - Espectro de massa de alta resolução de AP-10 (A) e espectro de massa EM/EM obtido a partir do íon precursor em m/z 323,00 (B).

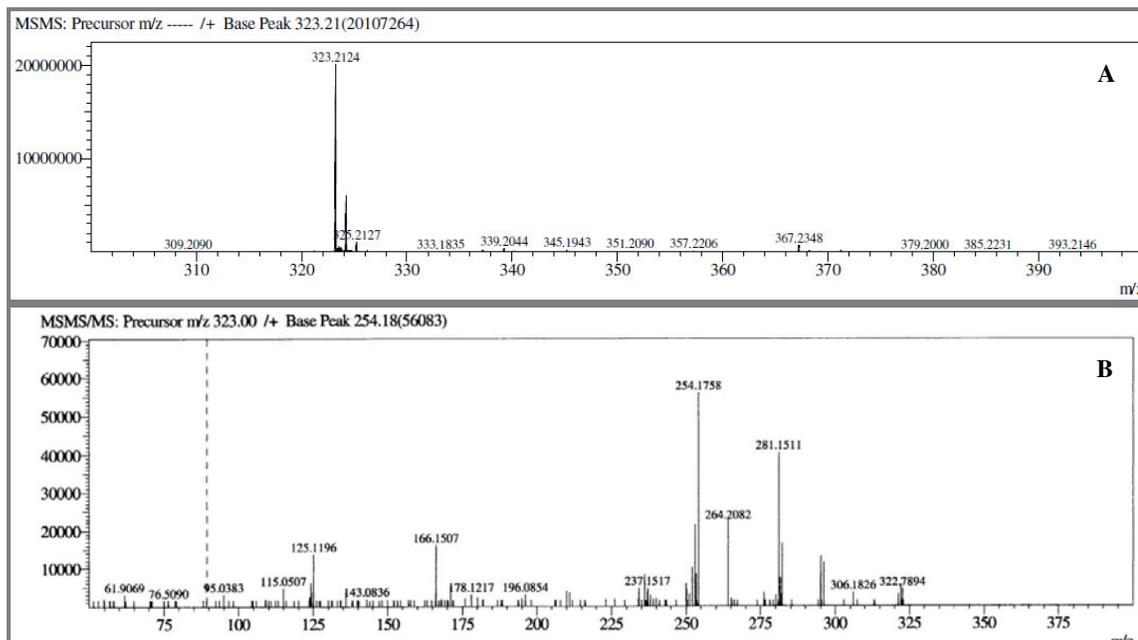


Figura 59 - Espectro de absorção na região do infravermelho de AP-10 (obtido no suporte UATR).

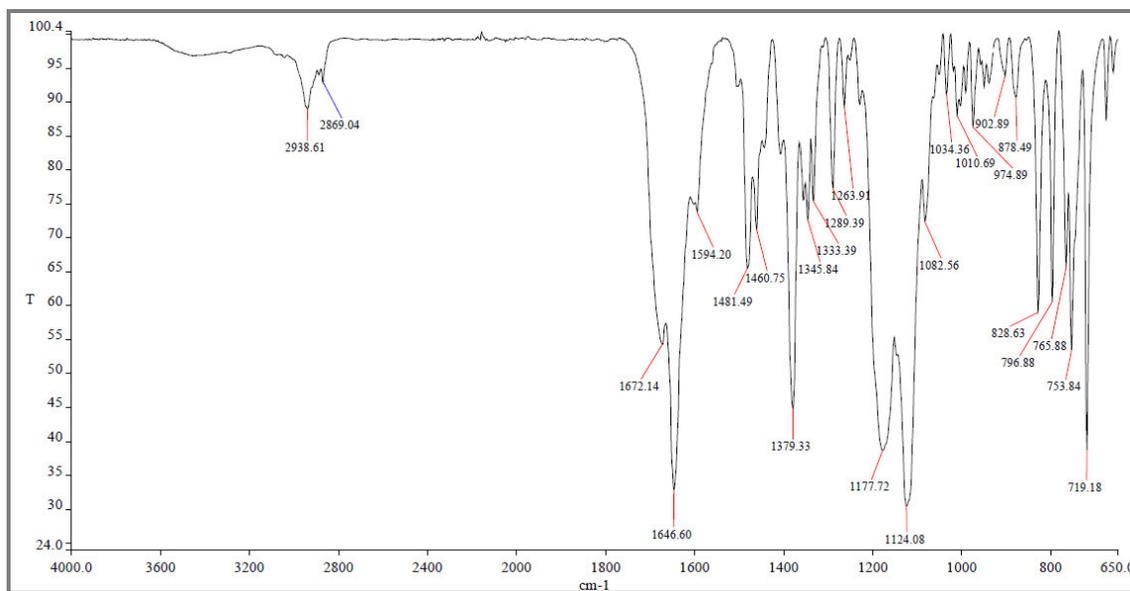


Figura 60 - Espectro de RMN ¹H de AP-10 protonado (CD₃OD, com supressão do sinal da água, 500 MHz).

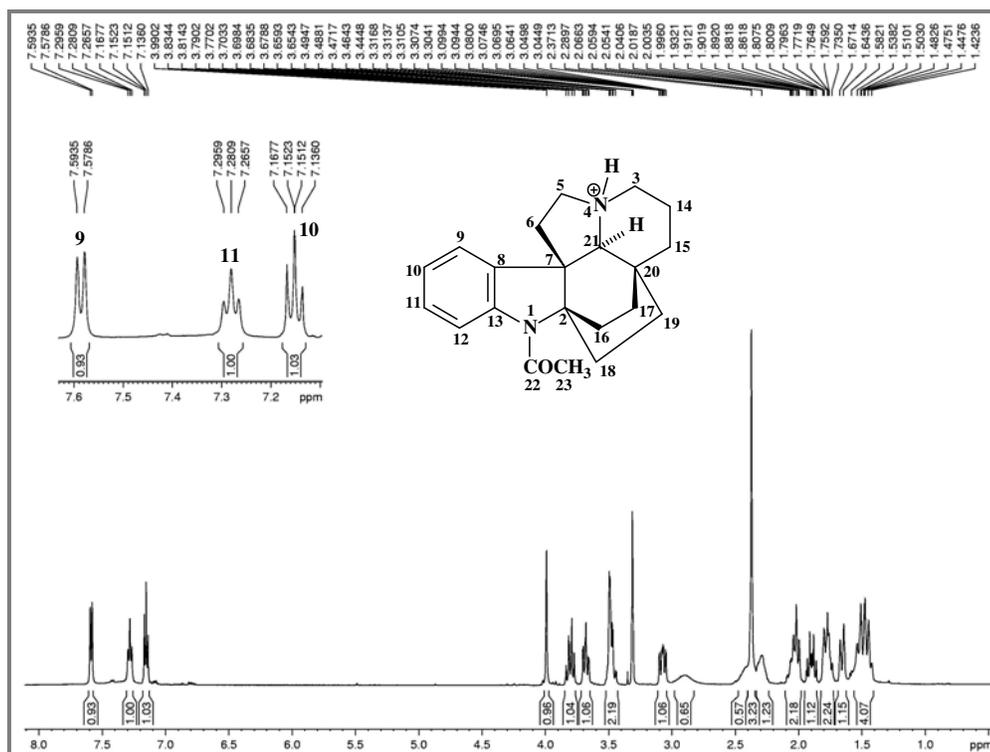


Figura 61 - Expansão do espectro de RMN ¹H de AP-10 protonado (CD₃OD, 500 MHz), correspondente à região entre 4,0 e 1,4 ppm.

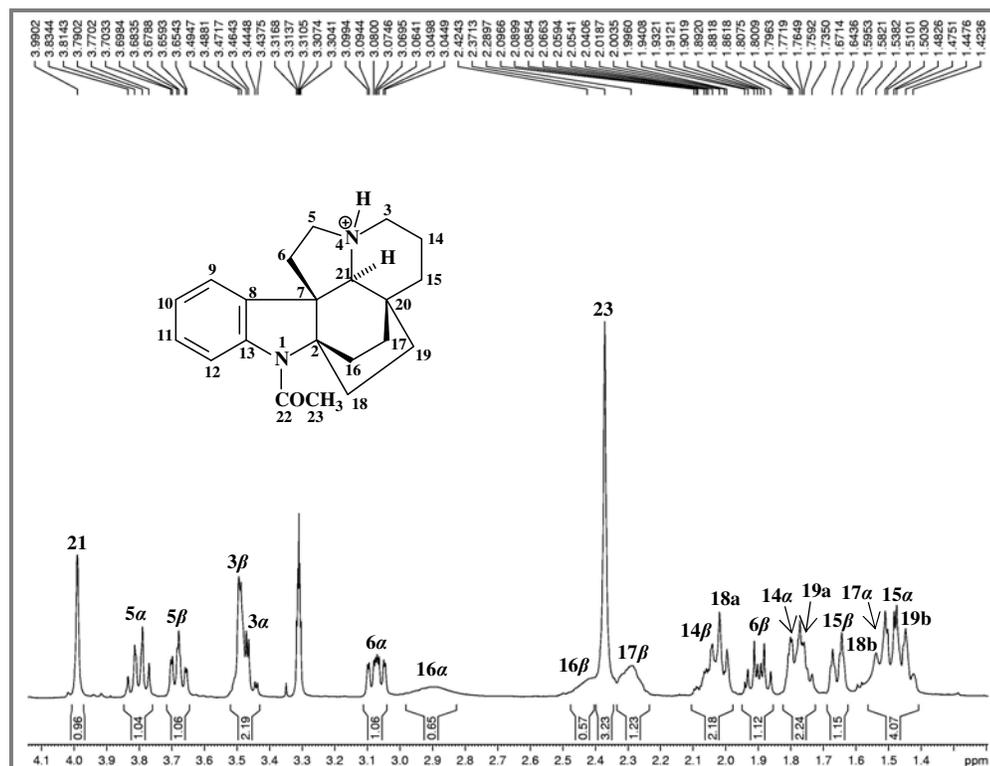


Figura 62 - Espectro de RMN ^{13}C -CPD (A) e APT (B) de AP-10 protonado (CD_3OD , 75 MHz).

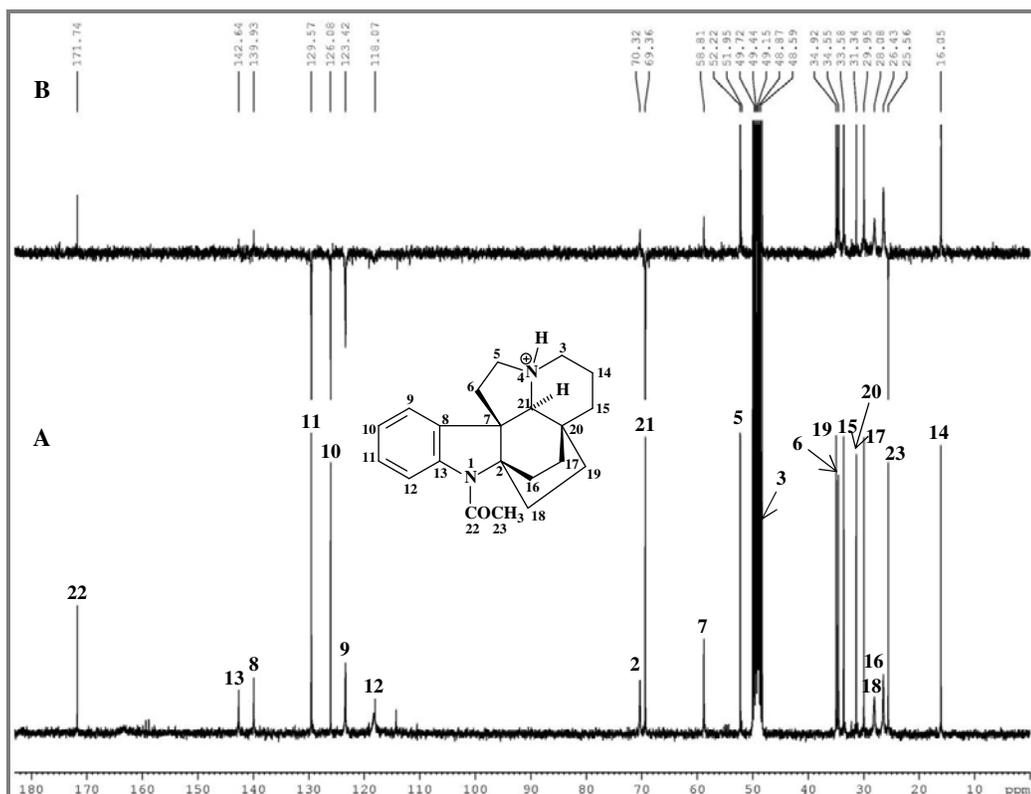


Figura 63 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC de AP-10 protonado (CD_3OD , 500 x 125 MHz) e expansão.

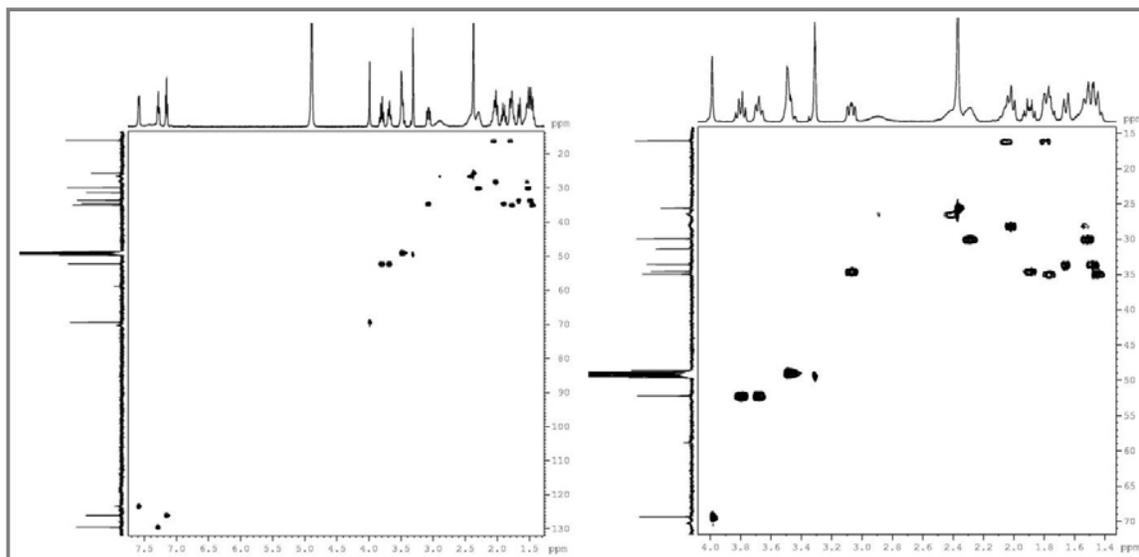


Figura 64 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY de AP-10 protonado (CD_3OD , 500 x 500 MHz) e expansão.

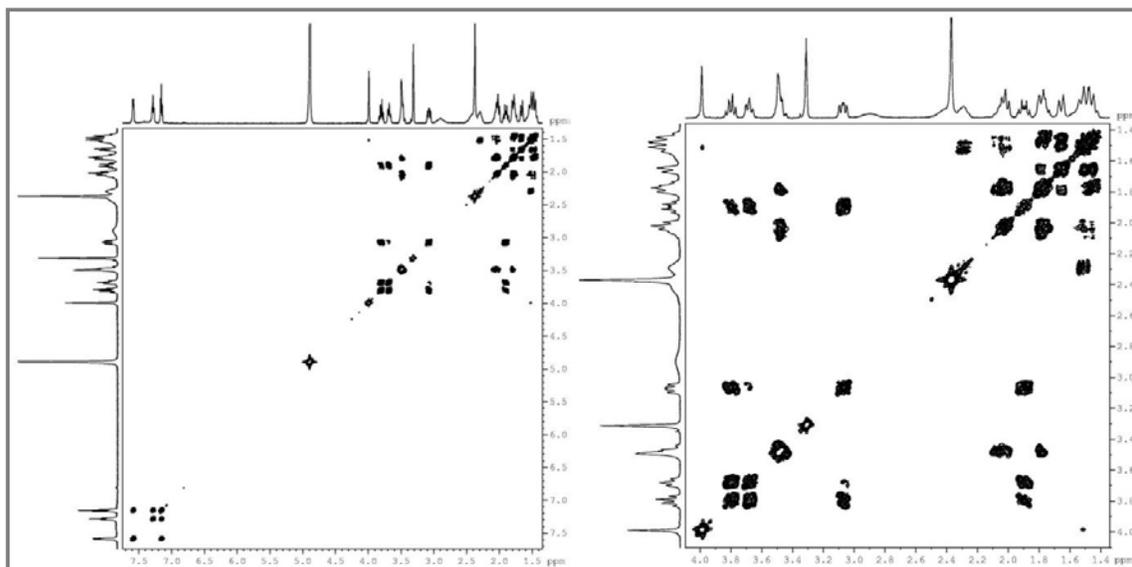


Figura 65 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de AP-10 protonado (CD_3OD , 500 x 125 MHz) e expansões.

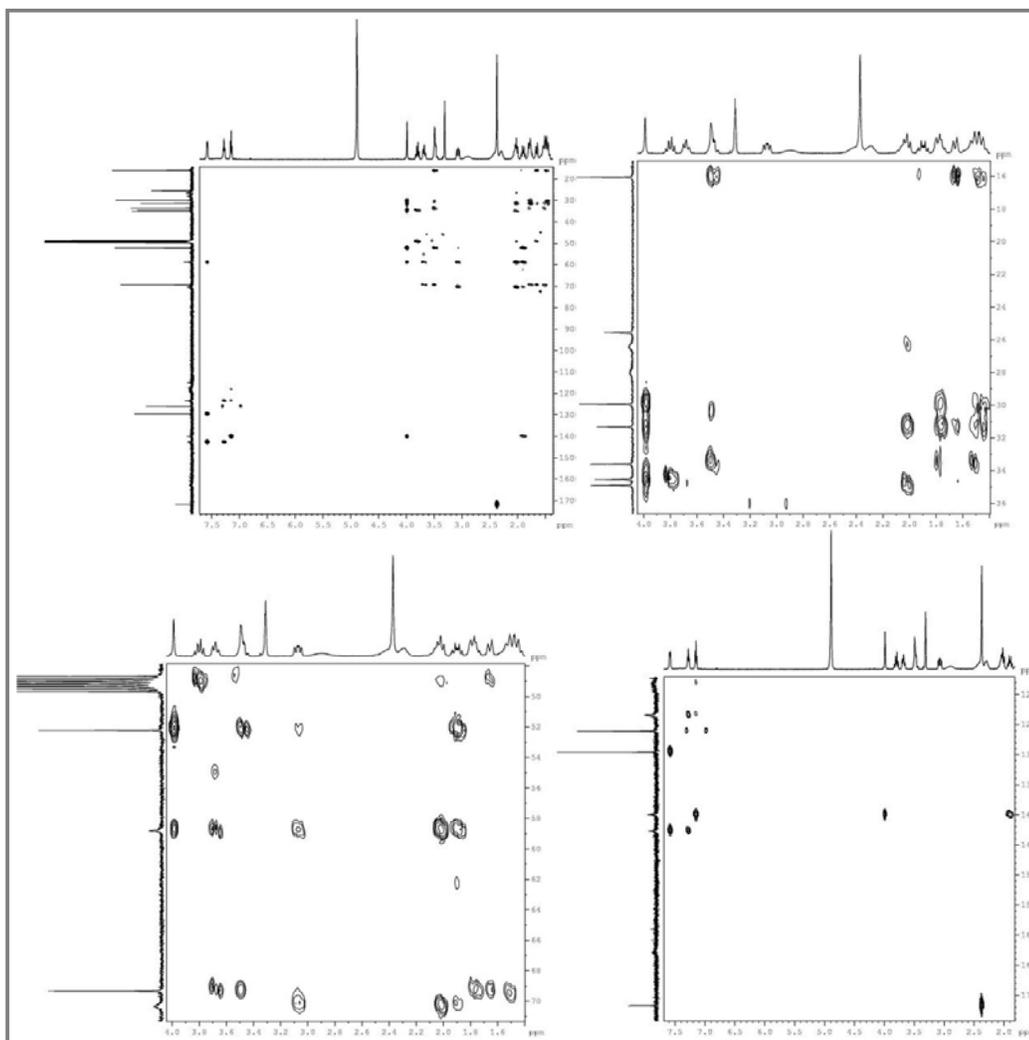


Figura 66 - Espectro de RMN 2D ¹H,¹H-NOESY de AP-10 protonado (CD₃OD, 500 x 500 MHz) e expansão.

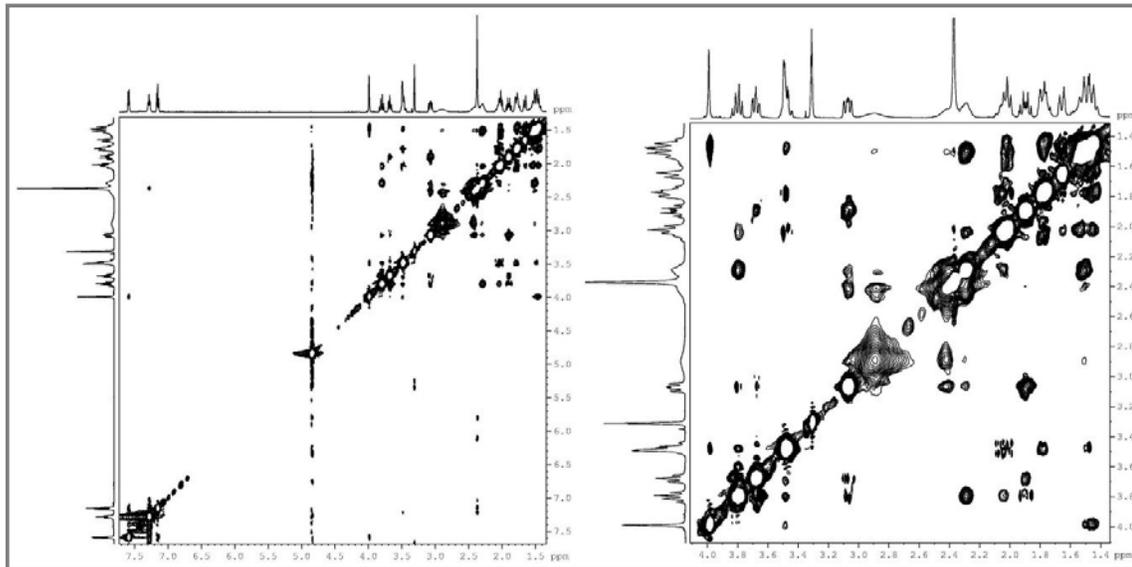


Figura 67 - Espectro de NOE Seletivo de AP-10 protonado, obtido por irradiação no hidrogênio em δ_H 3,99 (H-21) (CD₃OD, 500 MHz).

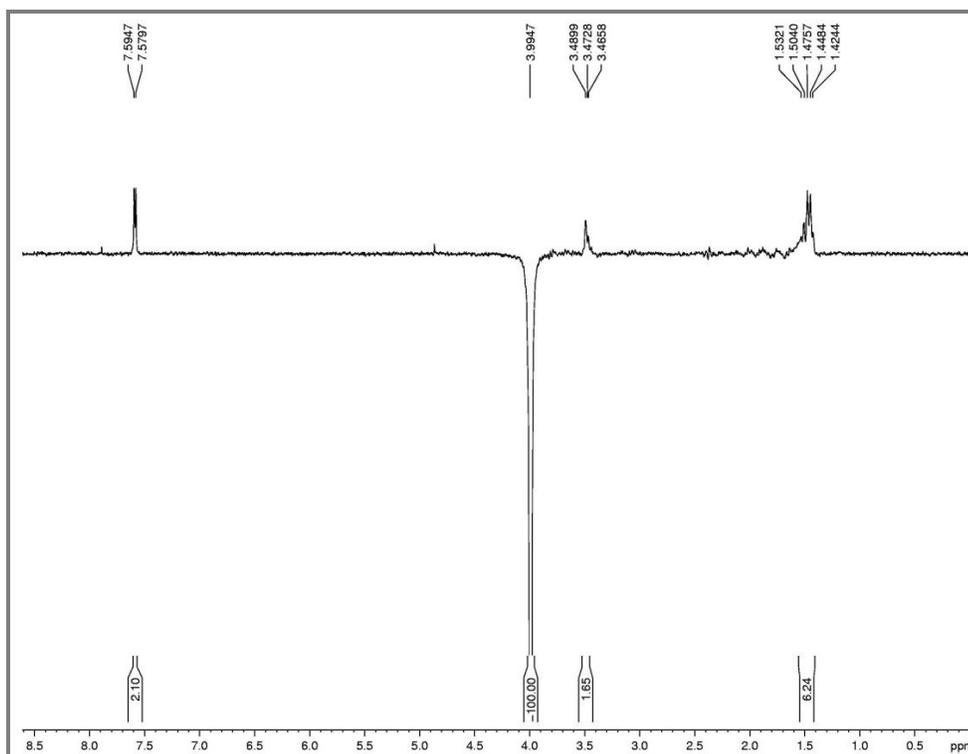


Figura 68 - Espectro de RMN ¹H de AP-10 desprotonado (CD₃OD, 500 MHz) e expansão da região entre 3,5 e 1,2 ppm.

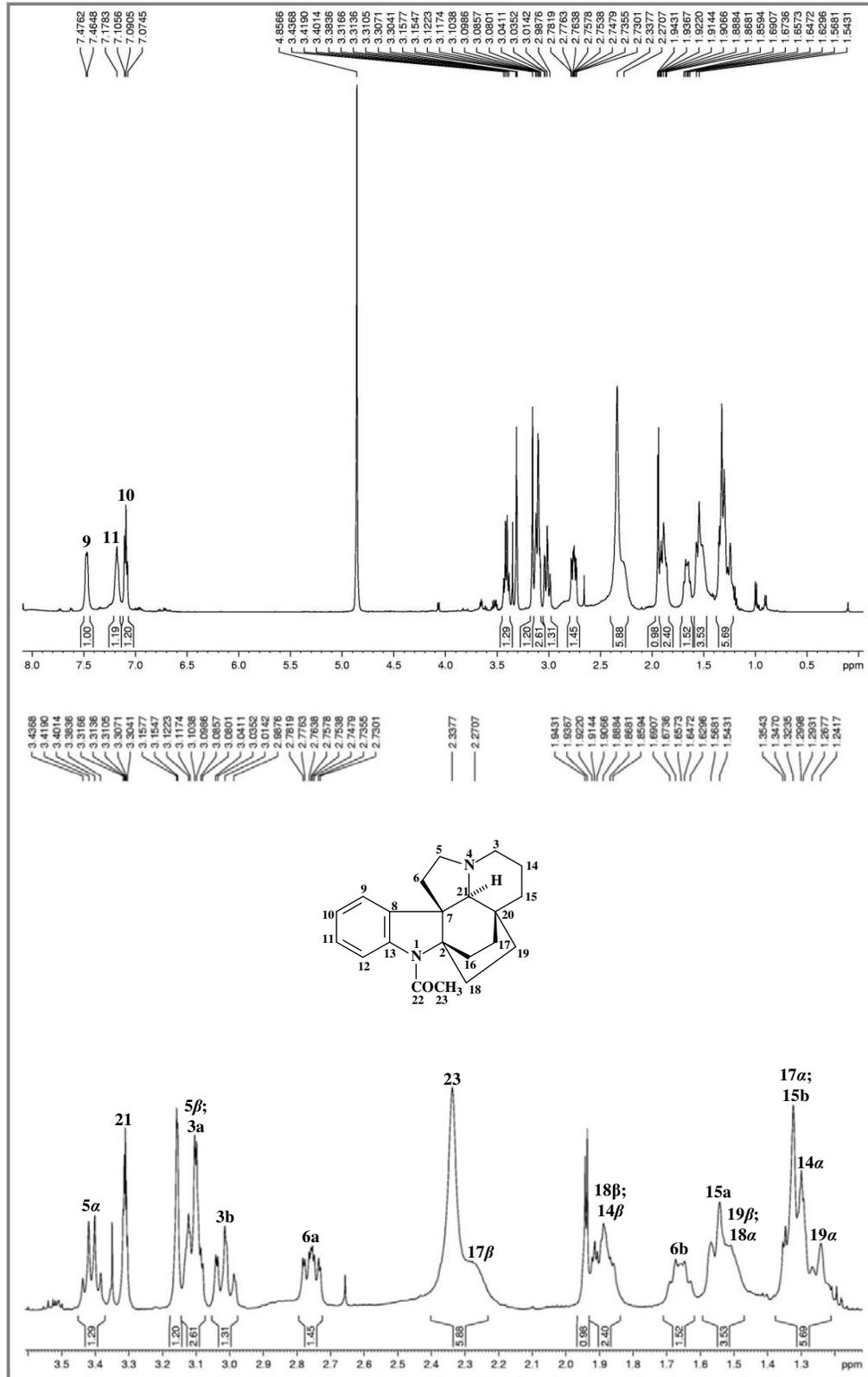


Figura 69 - Espectro de RMN ¹³C-CPD de AP-10 desprotonado (CD₃OD, 125 MHz).

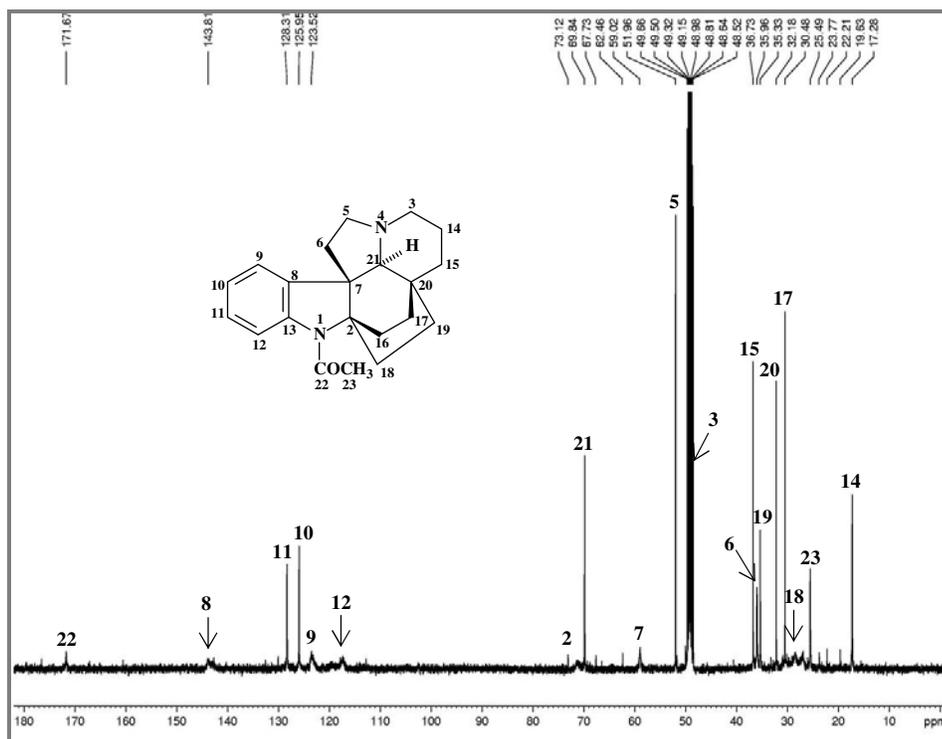


Figura 70 - Espectro de RMN 2D ¹H,¹³C-HSQC de AP-10 desprotonado (CD₃OD, 500 x 125 MHz) e expansão.

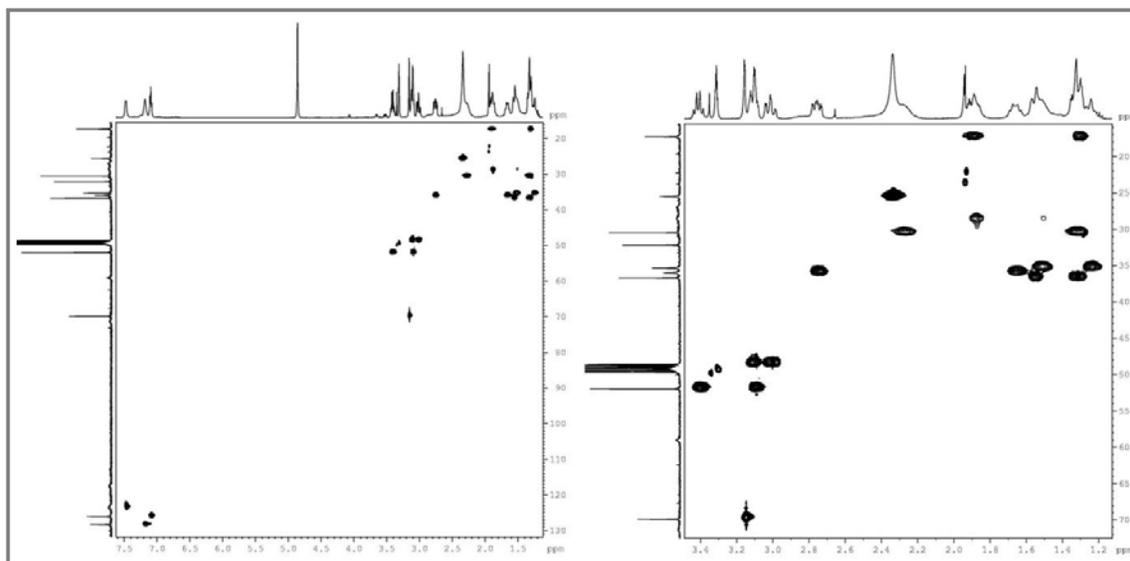


Figura 71 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY de AP-10 desprotonado (CD_3OD , 500 x 500 MHz) e expansão.

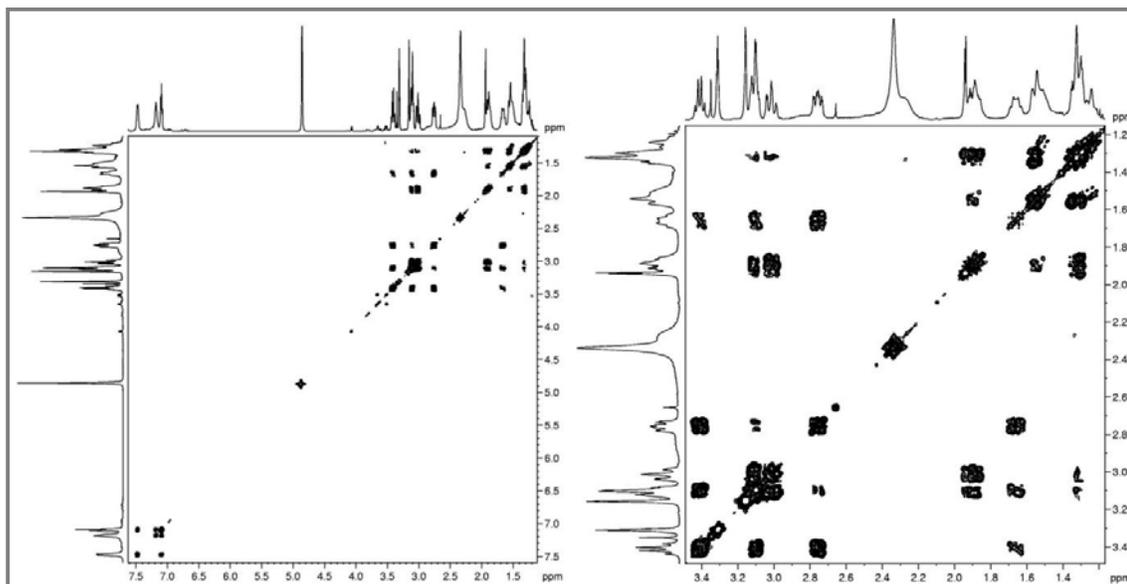


Figura 72 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de AP-10 desprotonado (CD_3OD , 500 x 125 MHz) e expansões.

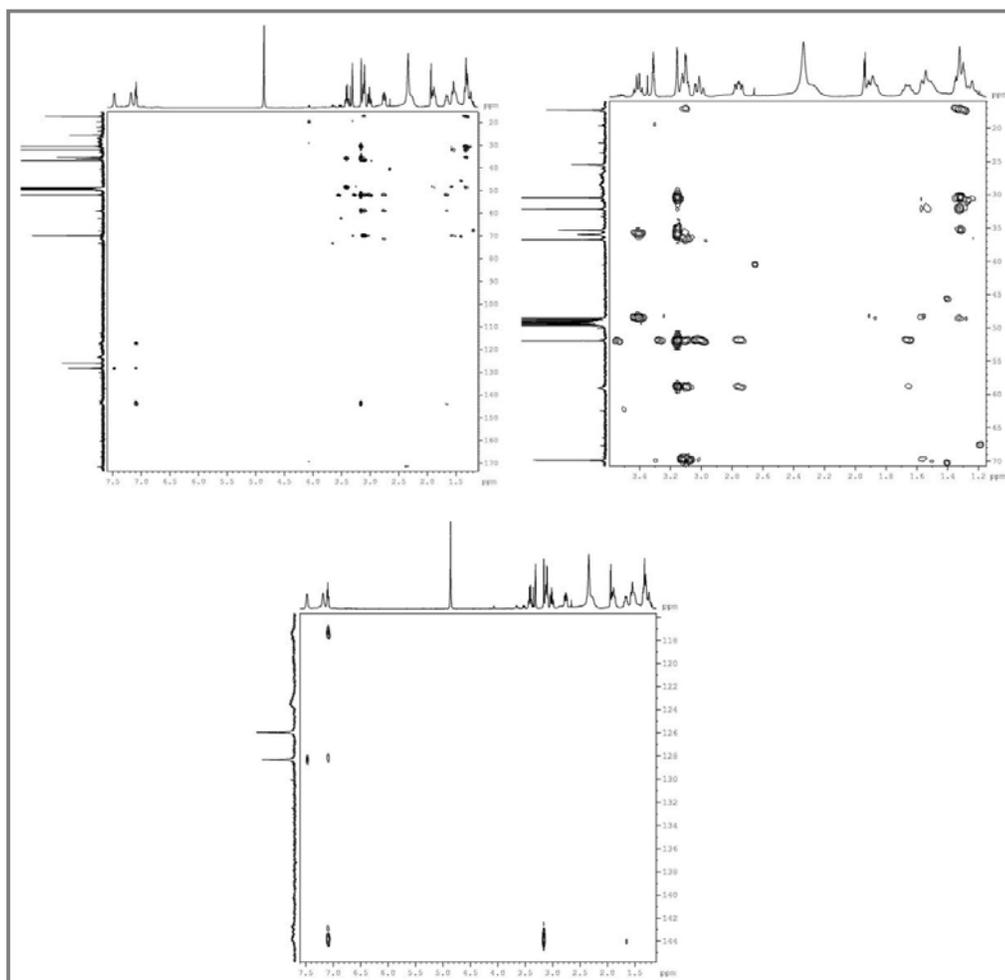


Figura 73 - Espectro de RMN 2D ¹H,¹H-NOESY de AP-10 desprotonado (CD₃OD, 500 x 500 MHz) e expansão.

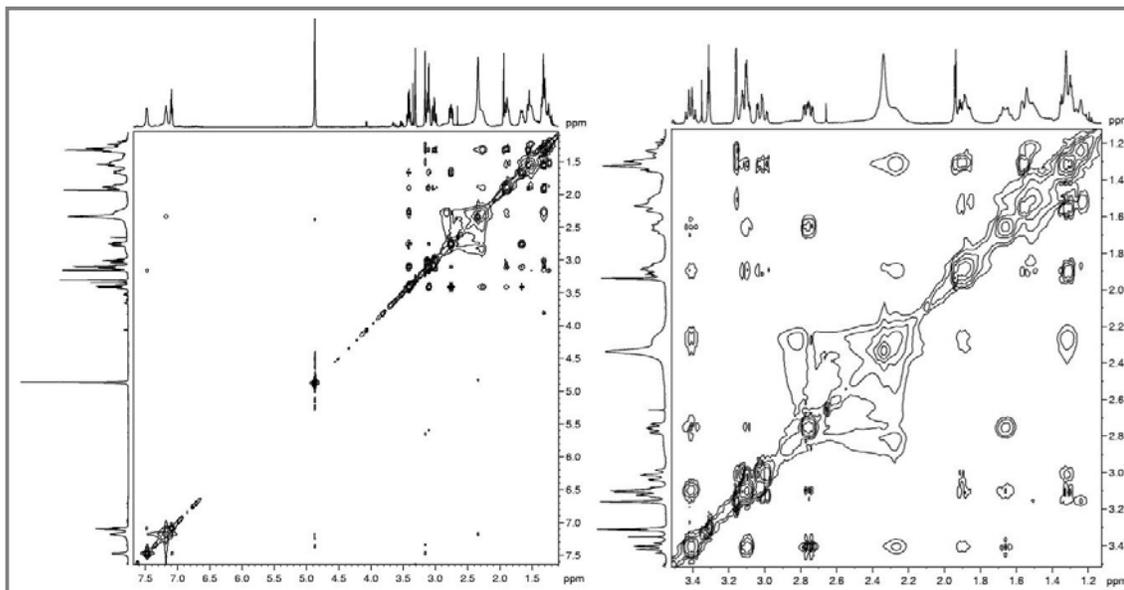


Figura 74 - Espectro de RMN ¹H de AP-10 protonado [(CD₃)₂SO, 500 MHz] a 80 °C e expansão da região correspondente aos hidrogênios aromáticos em δ_H 7,0-7,9.

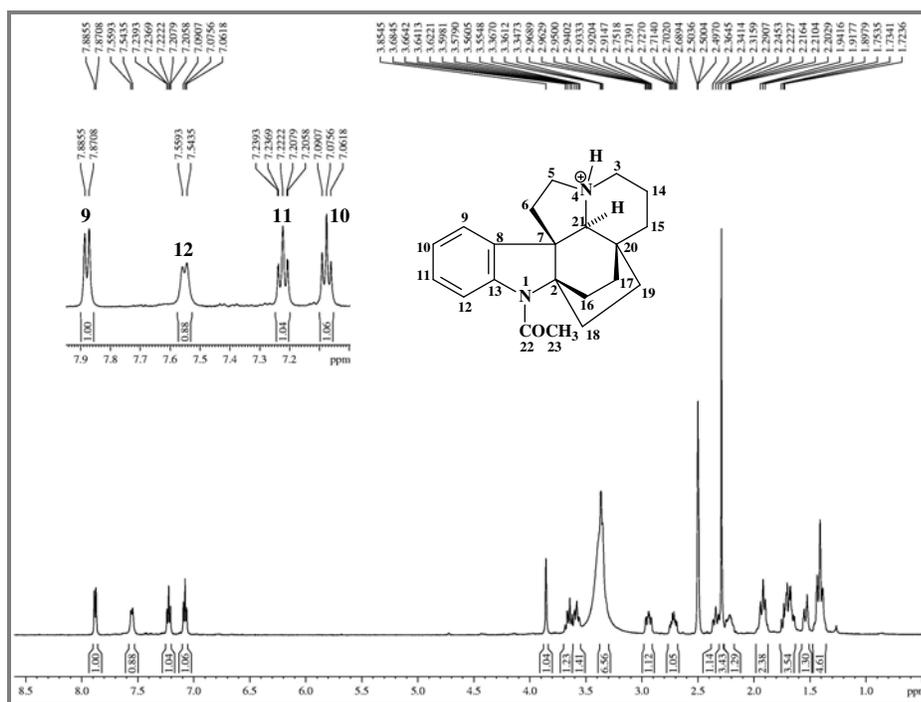


Figura 75 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY de AP-10 protonado $[(\text{CD}_3)_2\text{SO}]$, 500 x 500 MHz] a 70 °C e expansão da região aromática.

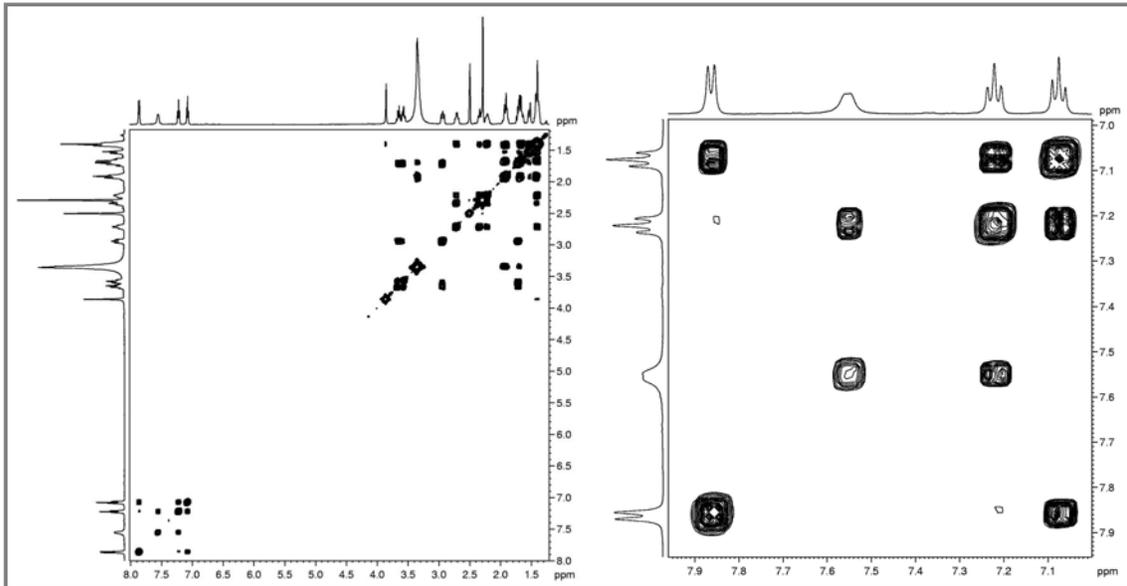


Figura 76 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMQC de AP-10 protonado $[(\text{CD}_3)_2\text{SO}]$, 500 x 125 MHz] a 70 °C e expansão da região aromática.

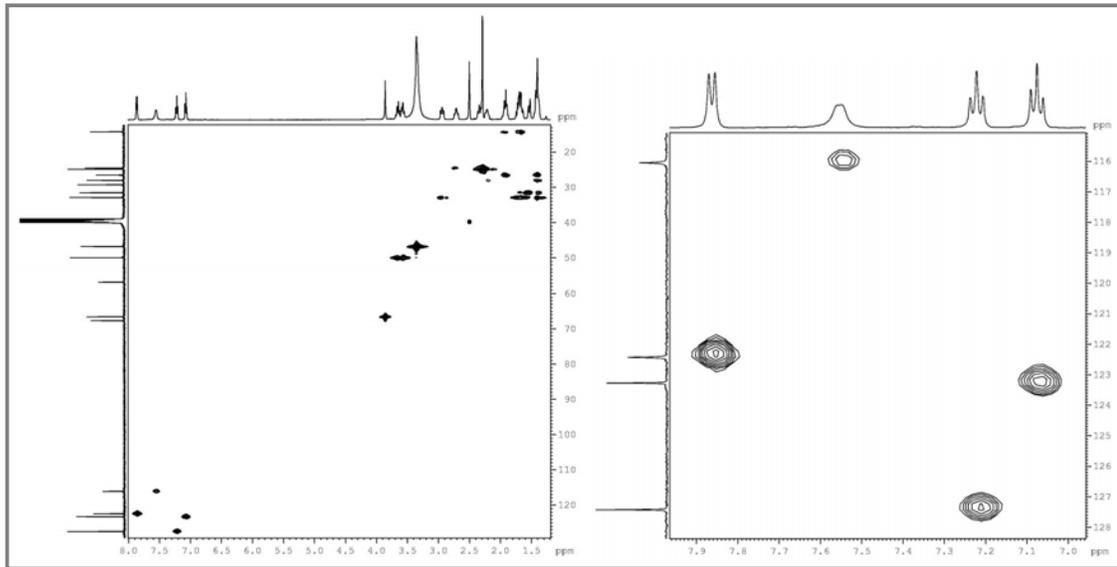
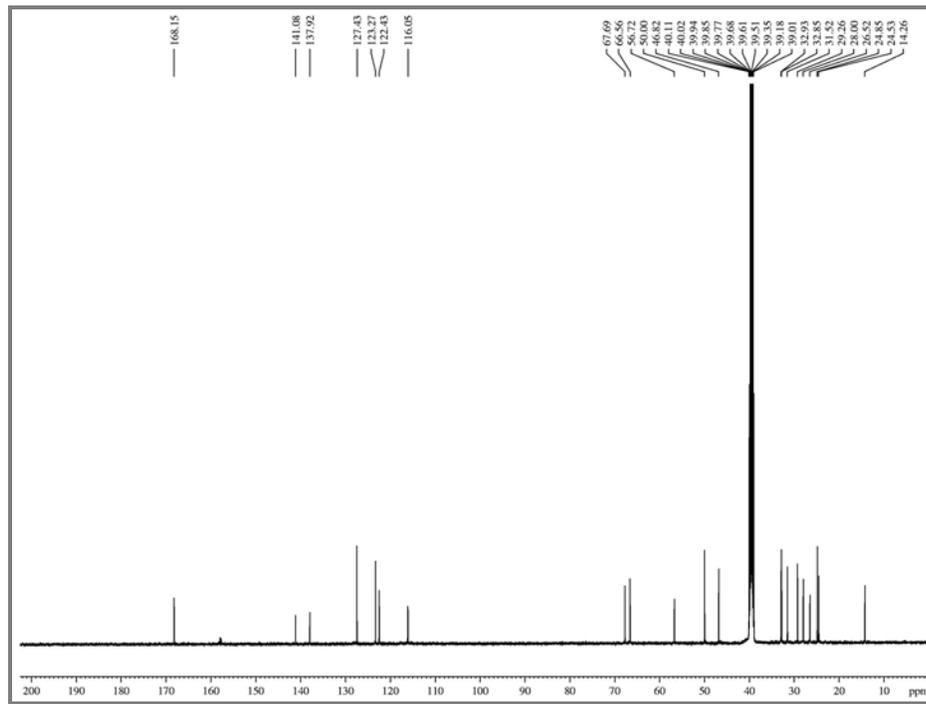


Figura 77 - Espectro de RMN ^{13}C -CPD de AP-10 protonado $[(\text{CD}_3)_2\text{SO}, 125 \text{ MHz}]$ a 70°C .

4.3 Determinação estrutural de AP-2

AP-2 foi isolado a partir do fracionamento cromatográfico em cartucho C18 e CLAE da fração APSE-D-7 (ver Parte Experimental, p. 224), sendo obtido como uma resina marrom, com $[\alpha]_D^{20} = +59,4^\circ$ (c 0,24, MeOH). O espectro de massa de alta resolução (Figura 84, p. 109), obtido por ionização por *electrospray* no modo positivo, exibiu o pico da molécula protonada $[M + H]^+$ em m/z 353,2287 (calculada 353,2229), sugerindo a fórmula molecular $C_{22}H_{28}N_2O_2$, cujo IDH é 10.

A análise do espectro na região do infravermelho de AP-2 (Figura 85, p. 109) mostrou bandas de absorções semelhantes às observadas para o composto AP-10. Verificou-se uma banda intensa em 1659 cm^{-1} , atribuída a uma carbonila de amida, bandas em 1194 e 1130 cm^{-1} , características de deformações axiais de ligações C-N ou C-O, e bandas em 1459 e 1375 cm^{-1} , atribuídas às deformações angulares simétricas de grupos metileno e metila, respectivamente.

O espectro de RMN ^1H de AP-2 (Figura 86, p. 110) exibiu um tripleto em δ_{H} 7,23 ($J = 8,0\text{ Hz}$, H-10) e dois dupletos em δ_{H} 7,18 ($J = 8,0\text{ Hz}$, H-9) e 7,02 ($J = 8,0\text{ Hz}$, H-11), sugerindo a presença do sistema indólico ou di-hidroindólico com uma substituição no anel benzênico. Várias bandas foram visualizadas na região entre 1,3 a 3,9 ppm, destacando-se dois simpletos, um em δ_{H} 3,88, característico de hidrogênios de metoxila ligada a anel benzênico, e outro em δ_{H} 2,12, associado aos hidrogênios de metila de grupo acetílico, como verificado no composto AP-10.

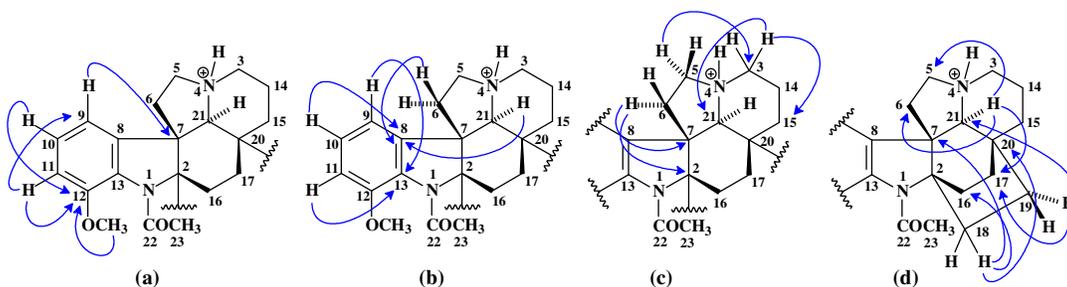
O espectro de RMN ^{13}C -CPD de AP-2 (Figura 87, p. 111) exibiu 21 sinais. Como já foi observado anteriormente, foi verificado outro sinal, através do espectro HSQC (Figura 88, p. 111), o qual se encontrava sobreposto ao sinal do metanol deuterado. A comparação com o espectro DEPT 135 (Figura 87, p. 111) determinou o padrão de hidrogenação dos carbonos, identificando-se sete sinais de carbonos não-hidrogenados, quatro de carbonos mono-hidrogenados, nove de carbonos metilênicos e dois de carbonos metílicos (Tabela 6, p. 108).

Os sinais de carbonos em δ_{C} 173,1 (C-22) e 25,0 (C-23) foram associados à presença de grupo *N*-acetílico, e o sinal em δ_{C} 151,2 (C-12), característico de carbono sp^2 oxigenado, sugeriu a substituição de um dos hidrogênios benzênicos por uma metoxila, esta absorvendo em δ_{C} 56,3. Comparando-se com os dados de RMN ^{13}C do composto AP-10 protonado, observaram-se muitos valores de deslocamentos químicos semelhantes e, por isso, foi possível propor para o composto a estrutura de AP-10 acrescida de uma metoxila ao anel

benzênico. Vale ressaltar que o composto também foi isolado por CLAE utilizando-se TFA, por isso considerou-se que estava em sua forma protonada.

Devido às multiplicidades dos hidrogênios ligados a carbonos aromáticos (dois dupletos e um triplete), existiam duas possíveis localizações para o substituinte metoxila, os carbonos C-9 ou C-12. Porém, a partir da análise do espectro bidimensional HMBC (Figura 89, p. 112), determinou-se a posição da metoxila no carbono C-12, através das correlações observadas entre os hidrogênios em δ_H 7,23 (H-10), 7,02 (H-11) e 3,88 com o carbono em δ_C 151,2 (C-12) e, principalmente, entre o hidrogênio em δ_H 7,18 (H-9) com o carbono em δ_C 59,6 (C-7), assegurando que a posição 9 pertence a um carbono hidrogenado (Figura 78, a). As posições dos carbonos C-8 e C-13 foram perfeitamente justificadas pelas correlações entre os hidrogênios em δ_H 7,23 (H-10), 3,89 (H-21) e 2,03 (H-6 β) com o carbono em δ_C 143,5 (C-8); e em δ_H 7,18 (H-9) e 7,02 (H-11) com o carbono em δ_C 131,2 (C-13) (Figura 78, b). Outras importantes correlações foram verificadas entre o hidrogênio em δ_H 3,03 (H-6 α) com os carbonos em δ_C 72,4 (C-2) e 59,6 (C-7); 3,79 (H-5 α) com o carbono em δ_C 48,8 (C-3); 3,48 (H-3 α) com os carbonos em δ_C 69,3 (C-21) e 33,5 (C-15) (Figura 78, c); 3,89 (H-21) com os carbonos em δ_C 52,4 (C-5), 33,8 (C-6) e 29,9 (C-17); 1,88 (H-18 α) com os carbonos em δ_C 59,6 (C-7), 31,3 (C-20) e 25,9 (C-16); 1,71 (H-19 α) com os carbonos em δ_C 69,3 (C-21) e 29,9 (C-17) (Figura 78, d).

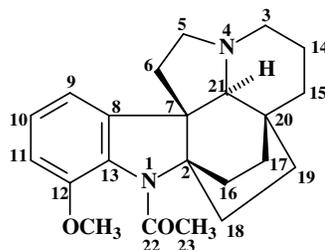
Figura 78 - Subestruturas com setas mostrando algumas importantes correlações à longa distância ^1H - ^{13}C observadas no espectro HMBC do composto AP-2.



O espectro COSY (Figura 90, p. 112) mostrou os acoplamentos vicinais dos hidrogênios em δ_H 3,79 (H-5 α) com 3,03 (H-6 α) e 2,03 (H-6 β); δ_H 3,66 (H-5 β) com 2,03 (H-6 β); δ_H 3,48 (H-3 α) com 1,78 (H-14 β); δ_H 3,45 (H-3 β) com 2,05 (H-14 α); δ_H 2,75 (H-16 α) com 2,26 (H-17 β) e 1,50 (H-17 α); δ_H 2,37 (H-16 β) com 2,26 (H-17 β); δ_H 2,05 (H-14 α) e 1,78 (H-14 β) com 1,62 (H-15 α) e 1,44 (H-15 β); δ_H 1,88 (H-18 α) com 1,71 (H-19 α) e 1,38 (H-19 β); δ_H 1,71 (H-19 α) com 1,47 (H-18 β), e deste com 1,38 (H-19 β).

A partir dos dados expostos, determinou-se que a estrutura do composto AP-2 é a mostrada na Figura 79, cuja pesquisa no “SciFinder” o identificou como o alcaloide plumerano 15-desmetoxipirifolina.

Figura 79 - Estrutura do composto AP-2.



Analisando a Figura 81 (p. 106), observa-se que a presença do substituinte metoxila no carbono C-12 causa uma blindagem aos carbonos 9 (δ 115,3), 11 (δ 113,5) e 13 (δ 131,2), e uma desblindagem aos carbonos 8 (δ 143,5) e 10 (δ 128,7), relativamente ao benzeno não-substituído do di-hidroindol. Isso é claramente explicado pelo efeito mesomérico doador da metoxila, que protege as posições *orto* e *para*, mas não protege as posições *meta*. Quanto à comparação dos dados de AP-2 com aqueles da literatura, ambos em CDCl_3 , verificaram-se diferenças mais significativas em alguns valores de hidrogênio, provavelmente devido à protonação do composto AP-2. Também se observou que a disposição dos valores de deslocamentos químicos dos carbonos metilênicos C-15 a C-19 não era semelhante, porém os assinalamentos feitos para AP-2 foram baseados em análises minuciosas dos espectros bidimensionais COSY, HSQC e HMBC, e estão em concordância com aqueles observados para os compostos AP-9 e AP-10 (Figura 80).

Figura 80 - Estruturas dos compostos AP-9 e AP-10.

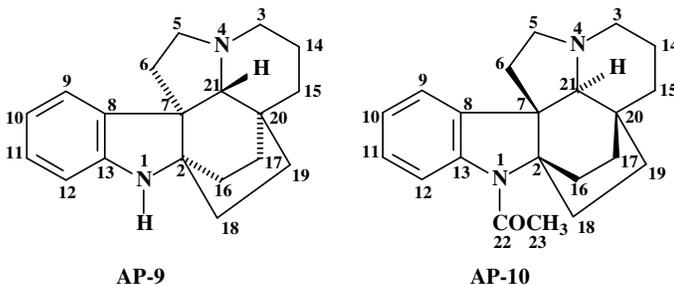
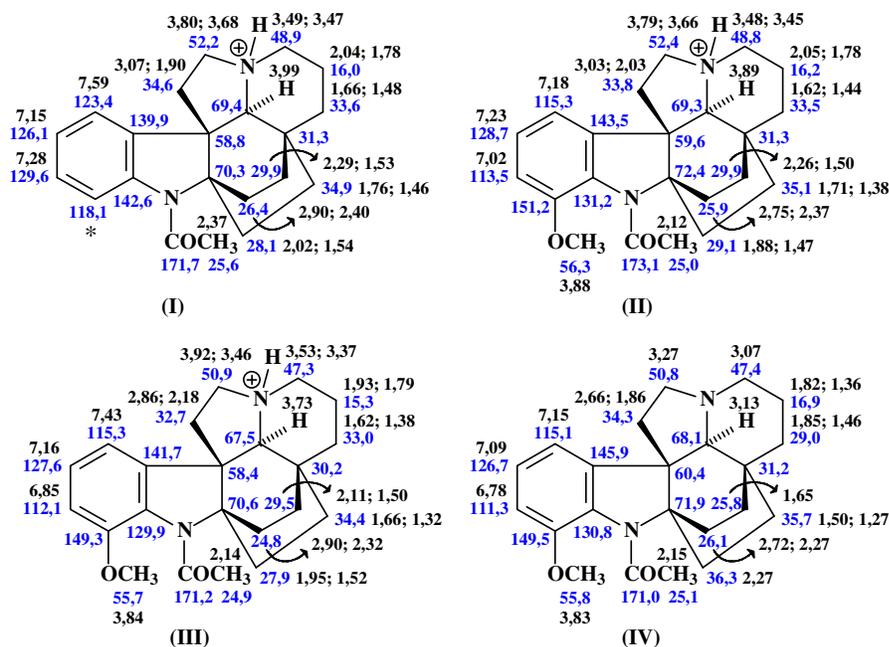
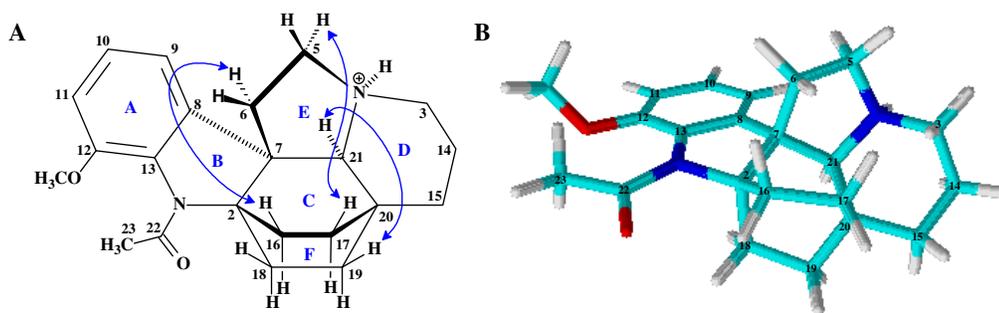


Figura 81 - Comparação dos dados de RMN ¹H e ¹³C dos compostos protonados AP-10 (I: 500 e 75 MHz, CD₃OD) e AP-2 (II: 500 e 75 MHz, CD₃OD), e comparação de AP-2 (III) com dados da literatura para o alcaloide 15-desmetoxipirifolina (IV; ARAÚJO JR. *et al.*, 2007), ambos em CDCl₃ a 500 e 125 MHz. Asterisco indica hidrogênio não detectado.



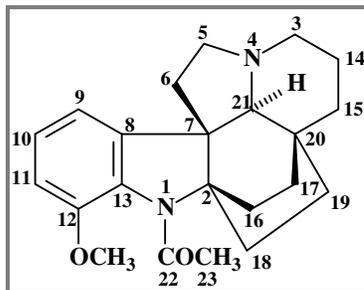
A estereoquímica relativa do composto foi identificada através dos acoplamentos dipolares observados no espectro NOESY (Figura 91, p. 113), entre os hidrogênios em δ_H 3,79 (H-5 α) com 2,26 (H-17 β), δ_H 3,03 (H-6 α) com 2,37 (H-16 β), e em δ_H 3,89 (H-21) com 1,38 (H-19 β), mostrando que tais hidrogênios encontram-se espacialmente próximos, e, comparado com a literatura (ARAÚJO JR. *et al.*, 2007), apresentam a mesma configuração: α para H-21 e β para os carbonos 5, 6, 16 e 17. O modelo molecular 3D, construído pelo programa “ChemSketch”, referente à molécula mais estável, mostra que os anéis C, D e F encontram-se em conformações em barco (Figura 82).

Figura 82 - Estrutura tridimensional do composto AP-2 protonado, com setas duplas mostrando acoplamentos dipolares observados no espectro NOESY (A), e modelo molecular 3D obtido pelo programa “ChemSketch” (B).



A análise de todos os dados permitiu identificar o composto AP-2 como o alcaloide plumerano hexacíclico (+)-15-desmetoxipirifolina (Figura 83, p. 108), isolado anteriormente da casca do caule (ARAÚJO JR. *et al.*, 2007) e das folhas (CRAVEIRO; MATOS; SERUR, 1983) de *Aspidosperma pyrifolium*.

Figura 83 - Estrutura do composto AP-2, em sua forma neutra, identificado como o alcaloide plumerano (+)-15-desmetoxipirifolina.


 Tabela 6 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C do composto AP-2 protonado (500 e 75 MHz, CD_3OD), e correlações a mais de uma ligação observadas no espectro HMBC.

AP-2				
	HSQC		HMBC	
	δ_{C}	δ_{H} (mult, J, H)	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
2	72,4	—	H-16 α ; H-18a; H-18b	H-6 α
3a	48,8	3,48 (m, 1H)		H-5 α
3b		3,45 (m, 1H)		
5a	52,4	3,79 (t, 10,0 Hz, 1H)	H-6 β	H-3b; H-21
5β		3,66 (t, 10,0 Hz, 1H)		
6α	33,8	3,03 (dd, 14,0; 10,0 Hz, 1H)		H-21
6β		2,03 (m, 1H)		
7	59,6	—	H-6 α ; H-6 β ; H-21	H-5 β ; H-9; H-16 α ; H-18a
8	143,5	—		H-6 β ; H-10; H-21
9	115,3	7,18 (d, 8,0 Hz, 1H)		H-11
10	128,7	7,23 (t, 8,0 Hz, 1H)		
11	113,5	7,02 (d, 8,0 Hz, 1H)	H-10	H-9
12	151,2	—	H-11	H-10; OCH ₃ -12
13	131,2	—		H-9; H-11
14a	16,2	2,05 (m, 1H)	H-3b; H-15b	
14b		1,78 (m, 1H)		
15a	33,5	1,62 (m, 1H)		H-3a
15b		1,44 (m, 1H)		
16α	25,9	2,75 (td, 13,0; 6,0 Hz, 1H)	H-17 α ; H-17 β	H-18a
16β		2,37 (m, 1H)		
17β	29,9	2,26 (m, 1H)		H-19 α ; H-21
17α		1,50 (m, 1H)		
18a	29,1	1,88 (td, 12,0; 2,0 Hz, 1H)		H-16 α
18b		1,47 (m, 1H)		
19α	35,1	1,71 (td, 12,0; 6,5 Hz, 1H)	H-18a	
19β		1,38 (m, 1H)		
20	31,3	—	H-17 α ; H-19 α ; H-21	H-18a
21	69,3	3,89 (s, 1H)		H-3a; H-17 α ; H-19 α
22	173,1	—	H-23	
23	25,0	2,12 (s, 3H)		
OCH₃	56,3	3,88 (s, 3H)		

Figura 84 - Espectro de massa de alta resolução de AP-2, obtido por ESI, mostrando o pico da molécula protonada $[M + H]^+$ em m/z 353,2287.

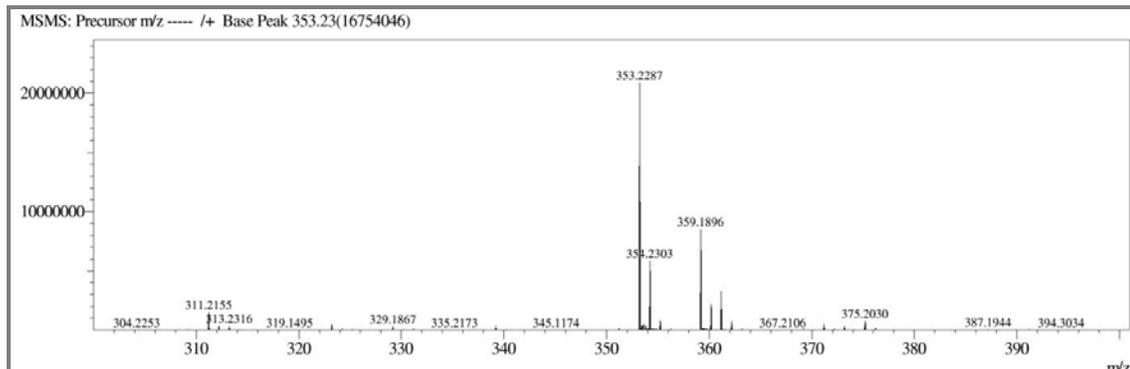


Figura 85 - Espectro de absorção na região do infravermelho de AP-2 (obtido no suporte UATR).

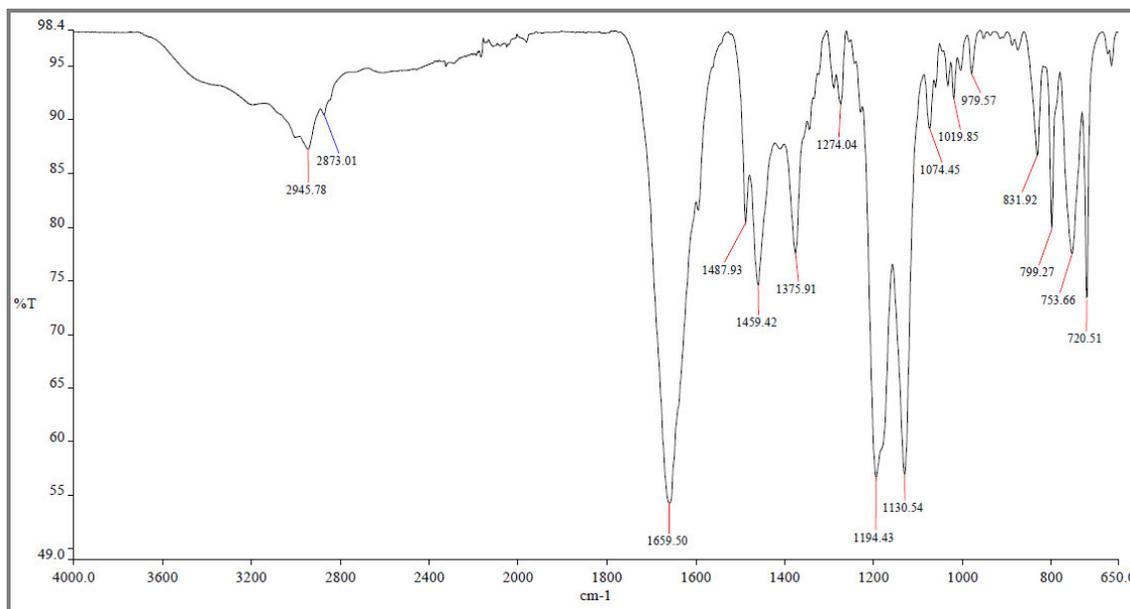


Figura 86 - Espectro de RMN ¹H de AP-2 protonado (CD₃OD, com supressão do sinal da água, 500 MHz) e expansões.

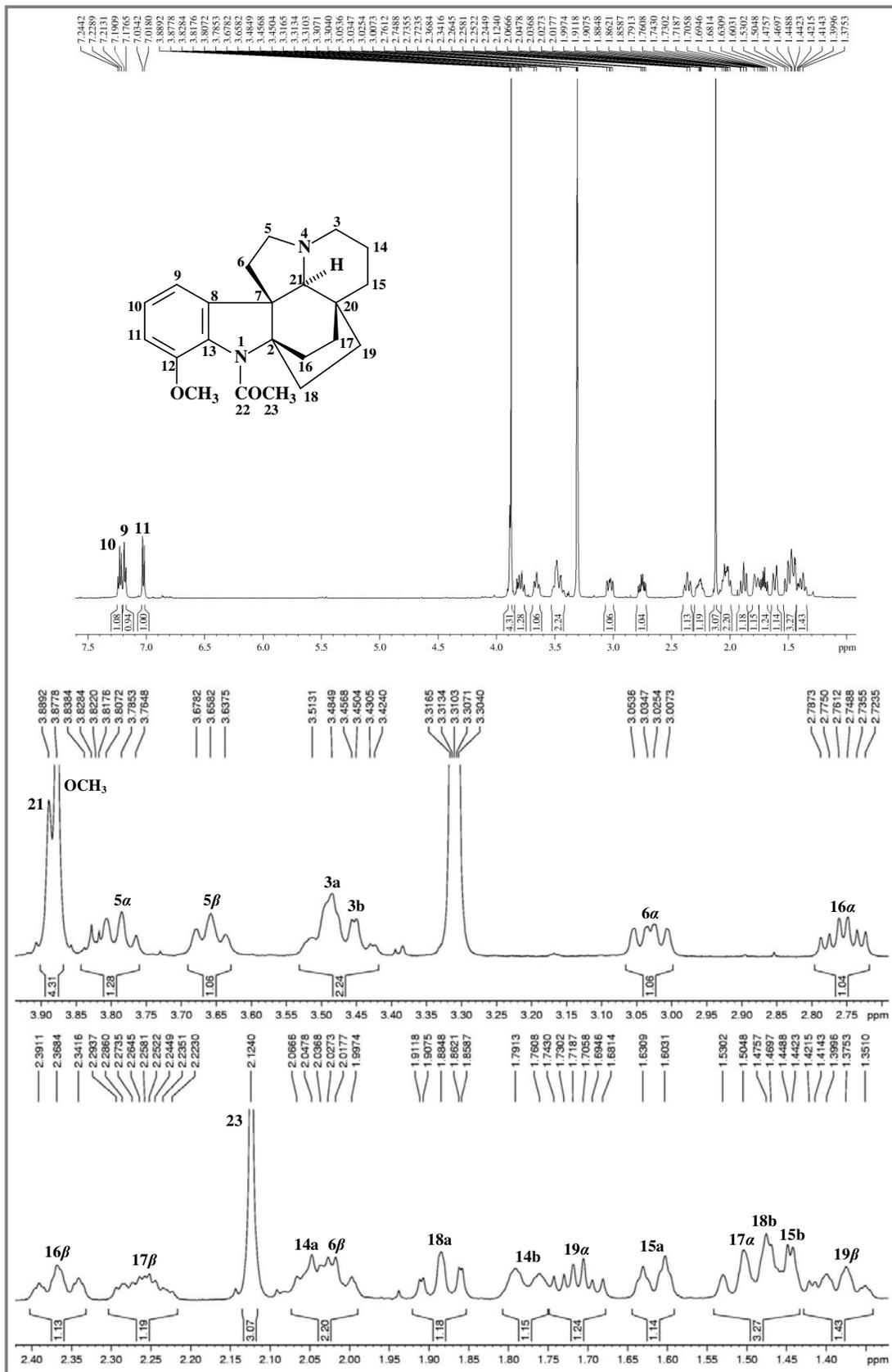


Figura 87 - Espectro de RMN ^{13}C -CPD (A) e DEPT 135 (B) de AP-2 protonado (CD_3OD , 75 MHz).

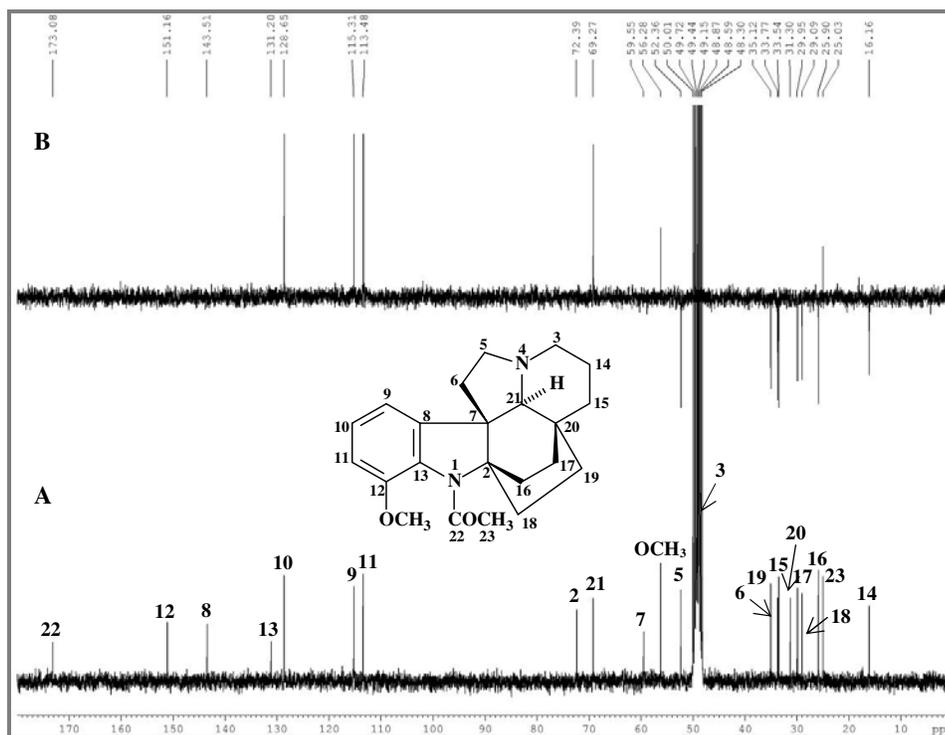


Figura 88 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC de AP-2 protonado (CD_3OD , 500 x 125 MHz) e expansão.

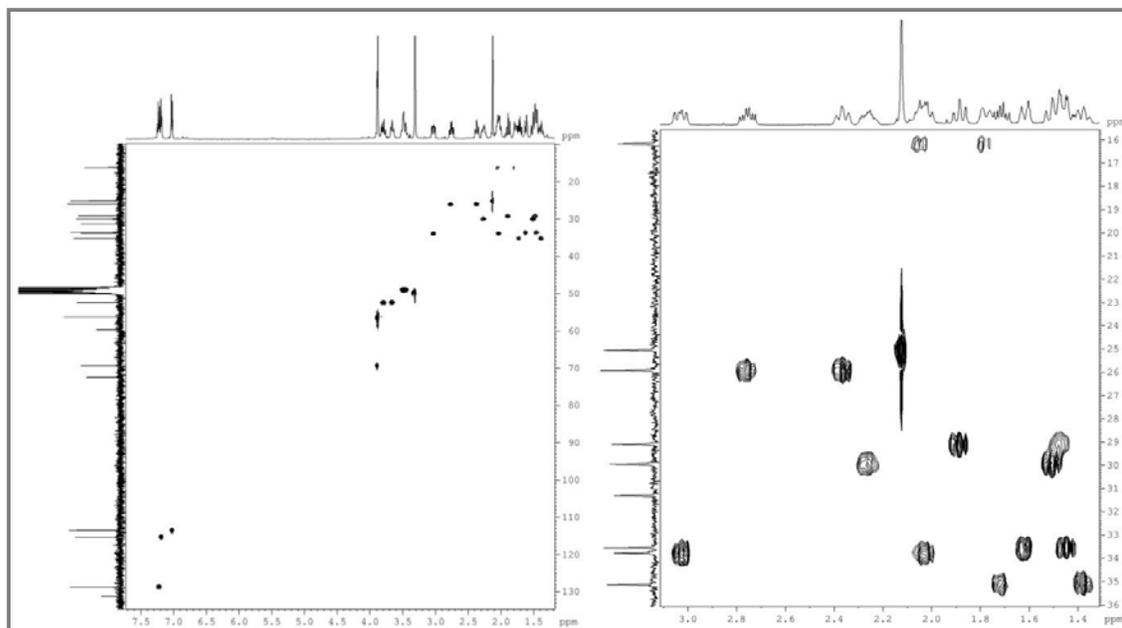


Figura 89 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de AP-2 protonado (CD_3OD , 500 x 125 MHz) e expansões.

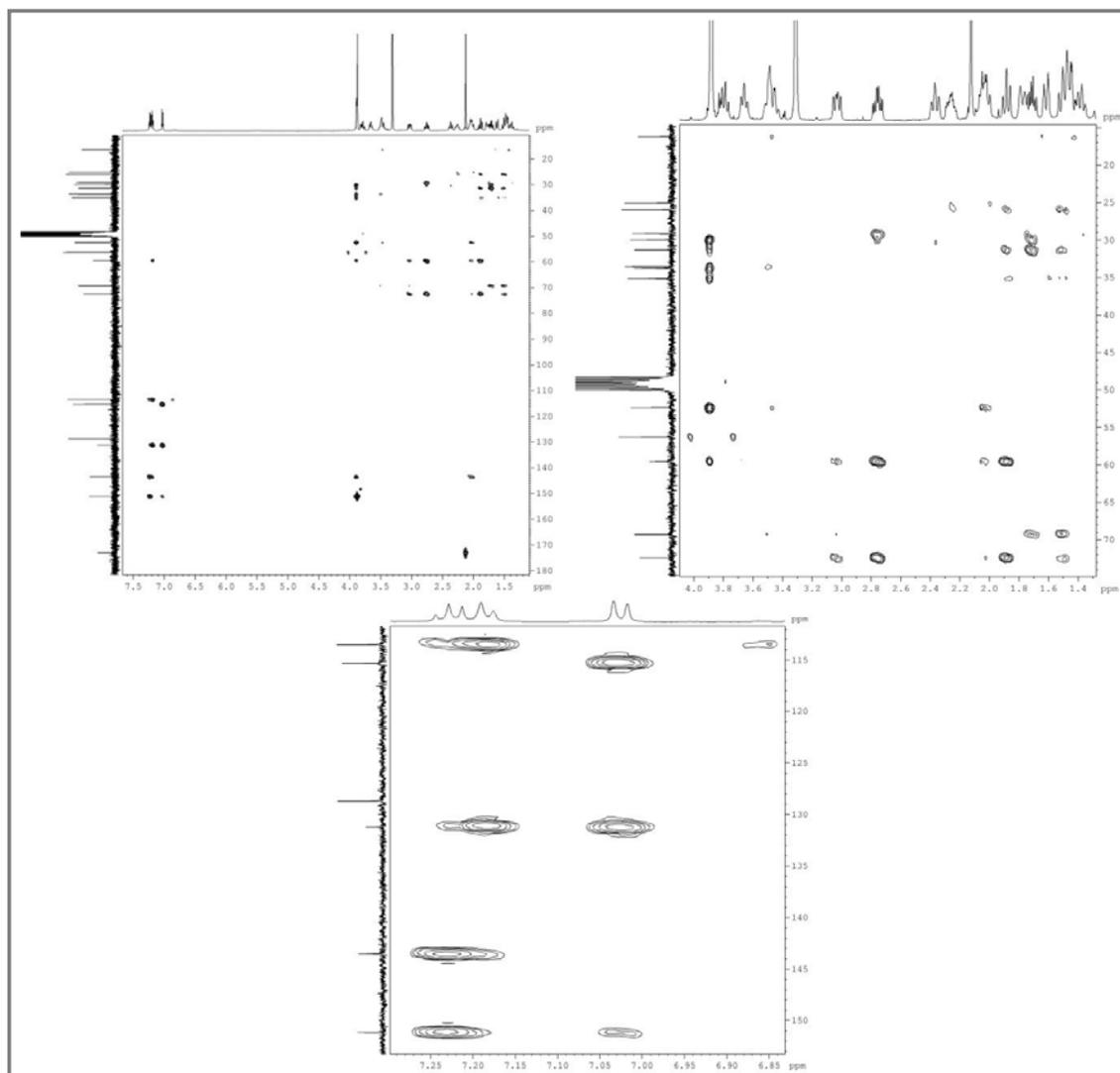


Figura 90 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY de AP-2 protonado (CD_3OD , 500 x 500 MHz) e expansão.

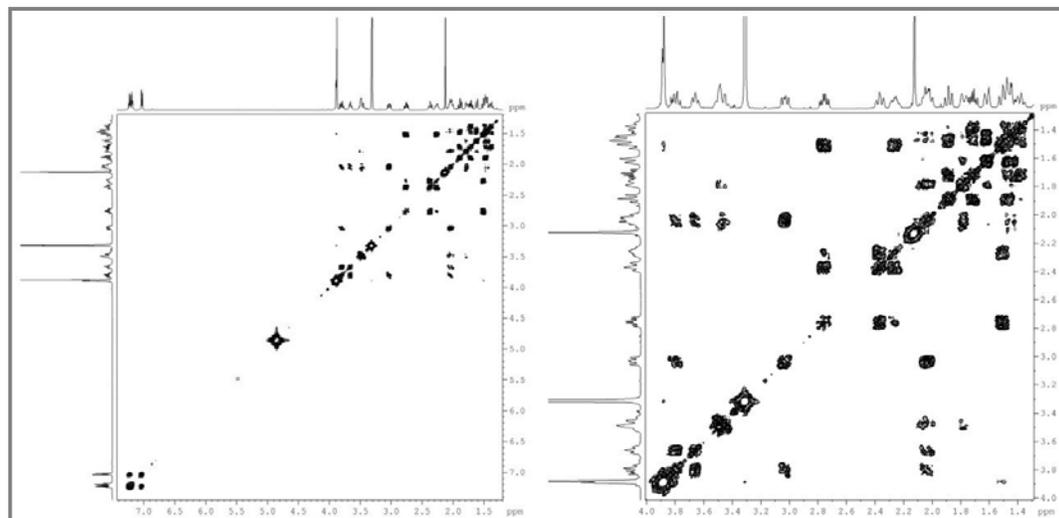
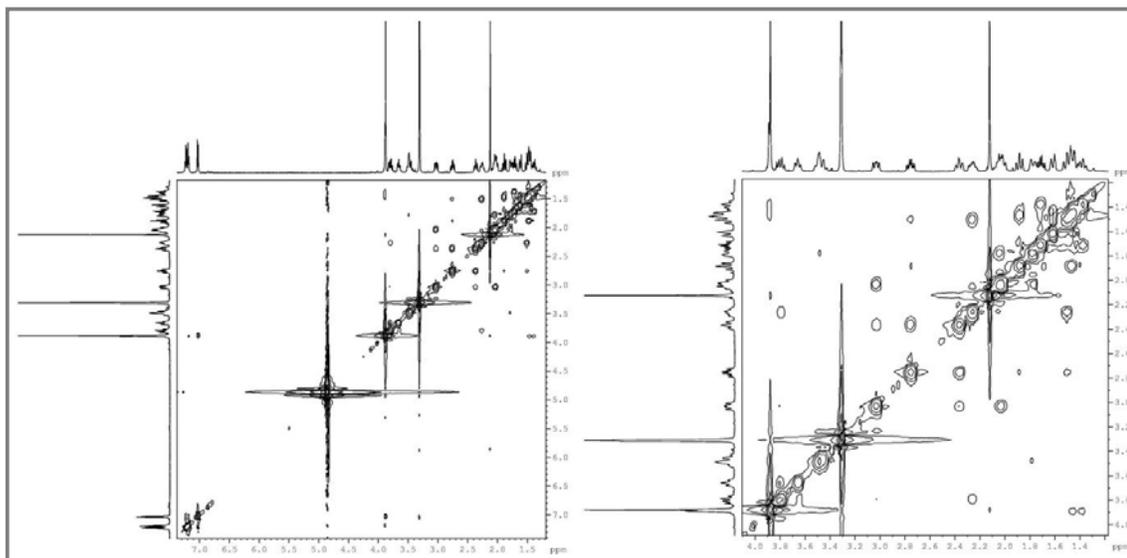


Figura 91 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -NOESY de AP-2 protonado (CD_3OD , 500 x 500 MHz) e expansão.



4.4 Determinação estrutural de AP-3

O composto AP-3 foi obtido de modo similar ao composto AP-2, sendo isolado por CLAE com solução aquosa ácida de TFA 0,1% em CH₃CN (73:27), utilizando fluxo de 4,0 mL/min e forno a 40 °C (ver Parte Experimental, p. 224). Ele apresentou-se como uma resina avermelhada, com $[\alpha]_D^{20} = + 56,7^\circ$ (*c* 0,05, MeOH) { $[\alpha]_D = + 105^\circ$ (CRAVEIRO; MATOS; SERUR, 1983)}.

Sua fórmula molecular C₂₃H₃₀N₂O₃ foi deduzida a partir do pico da molécula protonada [M + H]⁺ em *m/z* 383,2386 (calculada 383,2335), observado no espectro de massa de alta resolução (Figura 96, p. 119), referente a um IDH = 10. O espectro de massa de baixa resolução (Figura 97, p. 119), o qual mostrou o pico do íon molecular em *m/z* 382, revelou picos em *m/z* 354 [M⁺ - 28], 339 [M⁺ - 43], 154 [M⁺ - 228], 139 [M⁺ - 243] e 109 [M⁺ - 273].

O espectro na região do infravermelho de AP-3 (Figura 98, p. 119) apresentou bandas de absorções semelhantes às observadas para o composto AP-2. Observou-se uma banda intensa em 1656 cm⁻¹, atribuída a uma carbonila de amida, bandas em 1190 e 1131 cm⁻¹, características de deformações axiais de ligações C-N ou C-O, bandas em 1458 e 1374 cm⁻¹, atribuídas às deformações angulares simétricas de grupos metileno e metila, respectivamente, e bandas em 1593 e 1487 cm⁻¹, características de deformações axiais de ligações C=C de anel aromático.

O espectro de RMN ¹H de AP-3 (Figura 99, p. 120) exibiu dois dupletos, em δ_H 7,53 (*J* = 8,0 Hz, H-9) e 6,91 (*J* = 8,0 Hz, H-11), e três simpletos, dos quais dois são característicos de hidrogênios de metoxilas, em δ_H 3,71 e 3,26, e um é característico de hidrogênios da metila de grupo *N*-acetílico, em δ_H 2,24. Além destes, foram visualizados diversos multipletos entre 3,5 e 1,0 ppm (Tabela 7, p. 118).

O espectro COSY (Figura 100, p. 121) exibiu acoplamentos entre o hidrogênio em δ 7,53 com um sinal em δ 7,22, e deste com o hidrogênio em δ 6,91, mostrando a existência de um terceiro hidrogênio ligado a carbono aromático, fato confirmado após análise do espectro HSQC (Figura 101, p. 121), onde se verificou a correlação de um sinal sobreposto pelo sinal da piridina, em δ_H 7,22 (H-10), com o carbono em δ_C 127,2 (C-10).

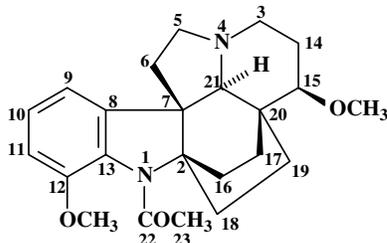
O espectro de RMN ¹³C-CPD (Figura 102, p. 122) mostrou 22 linhas espectrais, e a comparação com o espectro DEPT 135 (Figura 102, p. 122) revelou três sinais de carbonos sp² não-hidrogenados (δ 170,5, 145,3 e 131,4), três de carbonos sp² mono-hidrogenados (δ 127,2, 115,7 e 112,4), e entre os sinais de carbonos sp³ foram identificados três de carbonos

quaternários (δ 71,9, 59,2 e 37,3), dois de carbonos metínicos (δ 84,1 e 68,9), oito de carbonos metilênicos (δ 51,5, 46,9, 34,4, 30,8, 29,2, 25,9, 22,9 e 21,3) e três de carbonos metílicos (δ 57,5, 55,9 e 25,3).

O sinal de carbono restante para completar a fórmula molecular, em δ_C 149,9 (C-12), foi observado apenas no espectro HMBC, através dos acoplamentos entre os hidrogênios em δ_H 7,53 (H-9), 7,22 (H-10), 6,91 (H-11) e 3,71 (OCH₃-12) com o referido carbono.

Comparando-se os dados de carbono com aqueles do composto AP-2 notou-se o surgimento de outro grupo metoxílico e a substituição de um carbono metilênico por um oximetínico, em δ_C 84,1, sugerindo que a diferença entre os compostos seria uma metoxila adicional, concordante com a diferença de apenas 30 unidades de massa. Buscando algo similar na literatura encontrou-se o alcaloide pirifolina (Figura 92), cujo substituinte metoxílico encontra-se posicionado no carbono C-15. Então, o próximo passo foi confirmar a posição desse substituinte, assim como o restante da molécula, analisando-se os espectros bidimensionais HMBC e COSY.

Figura 92 - Estrutura do alcaloide pirifolina.



O espectro HMBC de AP-3 (Figura 103, p. 122) provou que a metoxila em δ_C 55,9/ δ_H 3,71 estava diretamente ligada ao carbono em δ_C 149,9 (C-12), enquanto a metoxila em δ_C 57,5/ δ_H 3,26 estava ligada ao carbono em δ_C 84,1 (C-15), devido às correlações, a três ligações, entre os referidos hidrogênios metoxilicos e esses carbonos, assim como entre o hidrogênio em δ_H 2,90 (diretamente ligado ao carbono em δ_C 84,1) com o carbono em δ_C 57,5.

A posição da segunda metoxila foi ratificada ainda pela correlação entre os hidrogênios em δ_H 1,72 (2H-14) com o carbono oximetínico em δ_C 84,1 (C-15), e também pelo acoplamento escalar entre os hidrogênios em δ_H 2,90 (H-15) e 1,72 (2H-14), observado no espectro COSY. Isso ocorre porque como os hidrogênios em δ_H 1,72 pertencem ao carbono metilênico mais blindado, em δ_C 21,3, e como é conhecido para os demais compostos que este

carbono sempre ocupa a posição 14, confirmou-se que a metoxila estaria realmente ligada ao carbono C-15, pois a posição 3 seria do carbono em δ_C 46,9, diretamente ligado ao nitrogênio.

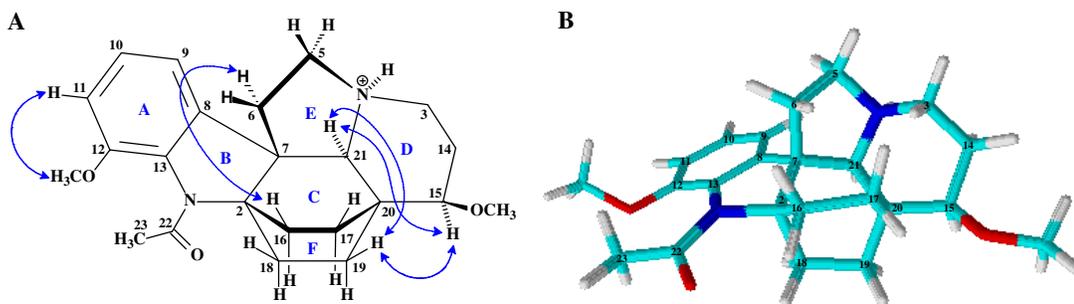
Quanto aos demais carbonos metilênicos, as correlações entre o hidrogênio em δ_H 3,43, diretamente ligado ao carbono metínico nitrogenado C-21 (δ_C 68,9), com os carbonos em δ_C 22,9 e 30,8 asseguraram que estes somente poderiam ocupar as posições 17 e 19.

O conjunto dos dados analisados, aliado ao valor positivo da rotação específica, confirmou a estrutura de AP-3 como sendo o alcaloide (+)-pirifolina, proposto anteriormente. Neste caso, ele encontra-se protonado devido ao modo como foi isolado por CLAE, utilizando TFA, e devido à quantidade obtida não foi efetuado o desprotonamento.

A estereoquímica relativa do composto foi determinada como a mesma da literatura. Os acoplamentos dipolares, observados no espectro NOESY (Figura 104, p. 123), entre os hidrogênios em δ_H 3,43 (H-21), 2,90 (H-15) e 1,07 (H-19 β), e entre os hidrogênios em δ_H 2,90 (H-15) com 1,07 (H-19 β), confirmaram as configurações α dos hidrogênios H-15 e H-21 e, conseqüentemente, a configuração β da metoxila ligada ao carbono C-15. O acoplamento entre os hidrogênios H-6 α (δ_H 2,74) e H-16 β (δ_H 2,46) indicou que os carbonos 6 e 16 estavam posicionados para a frente do plano, como ocorre nos alcaloides plumeranos da série (+). Também se observou o acoplamento dipolar entre os hidrogênios em δ_H 6,91 (H-11) e 3,71 (OCH₃-12) (Figura 93).

A representação 3D de AP-3, obtida através do programa “ChemSketch”, mostrou que a molécula mais estável apresentava os anéis C, D e F em conformações em barco, fato condizente com todos os acoplamentos observados para AP-3, como visto na Figura 93.

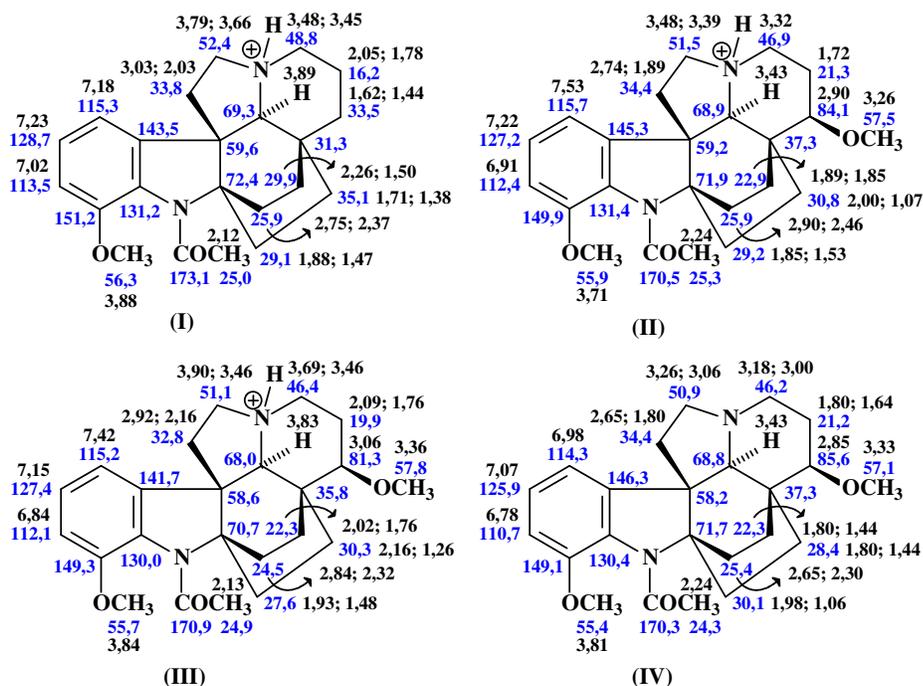
Figura 93 - Estrutura tridimensional do composto AP-3 protonado, mostrando setas duplas que indicam os acoplamentos dipolares vistos no espectro NOESY (A), e modelo molecular 3D obtido no programa “ChemSketch” (B).



A comparação com os deslocamentos químicos de RMN ¹³C de AP-2 (Figura 94, p. 117) mostra o efeito do substituinte metoxila no carbono 15 do composto AP-3, causando desproteção α ao carbono diretamente ligado, β aos carbonos 14 e 20, e proteção γ aos

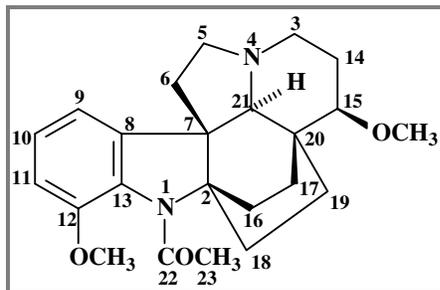
carbonos 3, 19, 21, e, principalmente, 17, cujo deslocamento passou a ser 22,9 ppm. Neste caso, verificou-se uma proteção adicional devido ao efeito estérico causado entre o grupamento metoxila e o carbono metilênico C-17, já que estão posicionados para um mesmo lado. A figura mostra também os dados de RMN ^1H e ^{13}C de AP-3 em CDCl_3 , para uma melhor comparação com os dados descritos na literatura por Oliveira (1999), visto que Craveiro e colaboradores (1983) relataram apenas alguns valores de hidrogênio, sem indicarem suas posições. Notou-se a mesma atribuição dos carbonos metilênicos, exceto para C-18 e C-19, que se apresentavam invertidos. Por fim, verificou-se que os hidrogênios de AP-3 estavam mais desblindados que os da literatura, fato este justificado pelo efeito da protonação.

Figura 94 - Comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C do composto AP-3 protonado (II e III) com aqueles descritos anteriormente para AP-2 protonado (I), e dados da literatura para o alcaloide pirifolina (IV; OLIVEIRA, 1999) (I: 500 e 75 MHz, CD_3OD ; II: 500 e 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$; III: 300 e 75 MHz, CDCl_3 ; IV: 300 e 75 MHz, CDCl_3).



Dessa forma, o composto AP-3 foi caracterizado como o alcaloide 1-acetil-6,17-dimetoxiaspidofractinina, conhecido como (+)-pirifolina (Figura 95, p. 118), isolado anteriormente das folhas e da casca do caule de *Aspidosperma pyrifolium* (CRAVEIRO; MATOS; SERUR, 1983; MITAINE *et al.*, 1996).

Figura 95 - Estrutura do composto AP-3, em sua forma neutra, identificado como o alcaloide plumerano (+)-pirifolina.


 Tabela 7 - Dados de RMN ¹H e ¹³C do composto AP-3 protonado (500 e 125 MHz, C₅D₅N), e correlações a mais de uma ligação observadas no espectro HMBC.

AP-3				
	HSQC		HMBC	
	δ_C	δ_H (mult, J, H)	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$
2	71,9	—	H-16 α ; H-18a; H-18b	
3	46,9	3,32 (m, 2H)	H-14	
5a	51,5	3,48 (m, 1H)	H-6 β	H-21
5b		3,39 (m, 1H)		
6α	34,4	2,74 (m, 1H)		H-21
6β		1,89 (m, 1H)		
7	59,2	—	H-6 β ; H-21	H-9; H-16 α
8	145,3	—		H-6 β ; H-10; H-21
9	115,7	7,53 (d, 8,0 Hz, 1H)		H-11
10	127,2	7,22 (*, 1H)		
11	112,4	6,91 (d, 8,0 Hz, 1H)		H-9
12	149,9	—	H-11	H-10; OCH ₃ -12
13	131,4	—		H-9; H-11
14	21,3	1,72 (m, 2H)		
15	84,1	2,90 (m, 1H)	H-14	OCH ₃ -15
16α	25,9	2,90 (m, 1H)		H-18a
16β		2,46 (m, 1H)		
17a	22,9	1,89 (m, 1H)	H-16 α	H-19 α ; H-21
17b		1,85 (m, 1H)		
18a	29,2	1,85 (m, 1H)	H-19 α	H-16 α
18b		1,53 (m, 1H)		
19α	30,8	2,00 (m, 1H)		H-17b; H-21
19β		1,07 (t, 12,0 Hz, 1H)		
20	37,3	—		H-17b; H-19 α ; H-15
21	68,9	3,43 (m, 1H)		H-17a
22	170,5	—	H-23	
23	25,3	2,24 (s, 3H)		
OCH₃-12	55,9	3,71 (s, 3H)		
OCH₃-15	57,5	3,26 (s, 3H)		H-15

* Multiplicidade não detectada, pois o sinal está sobreposto por um dos sinais da piridina deuturada, em δ_H 7,22.

Figura 96 - Espectro de massa de alta resolução de AP-3, obtido por ESI, mostrando o pico da molécula protonada $[M + H]^+$ em m/z 383,2386.

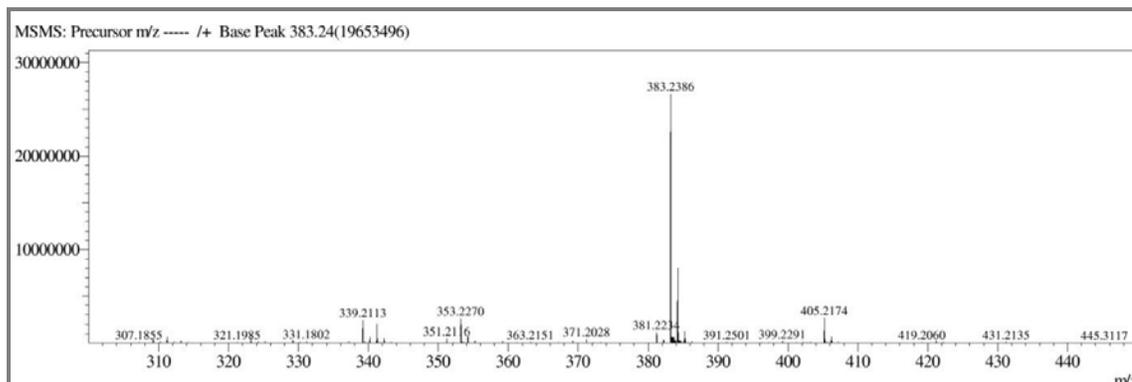


Figura 97 - Espectro de massa de baixa resolução de AP-3, obtido por impacto eletrônico a 70 eV.

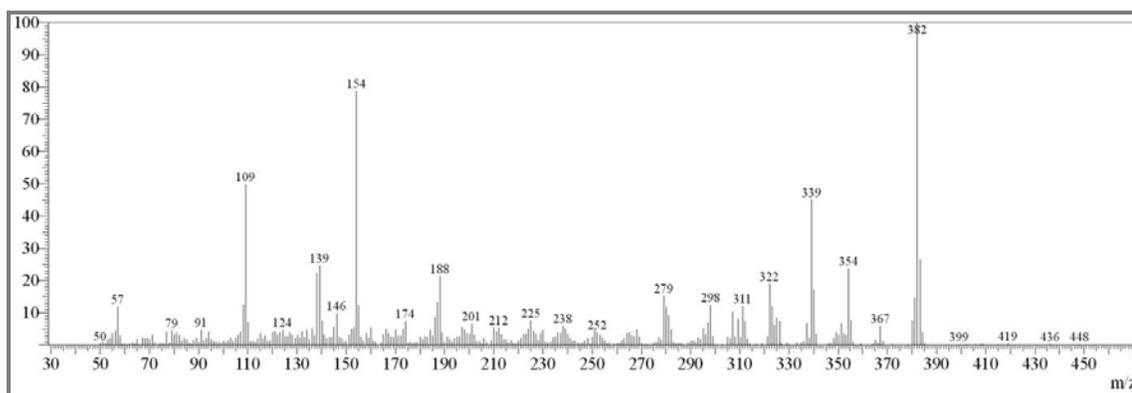


Figura 98 - Espectro de absorção na região do infravermelho de AP-3 (obtido no suporte UATR).

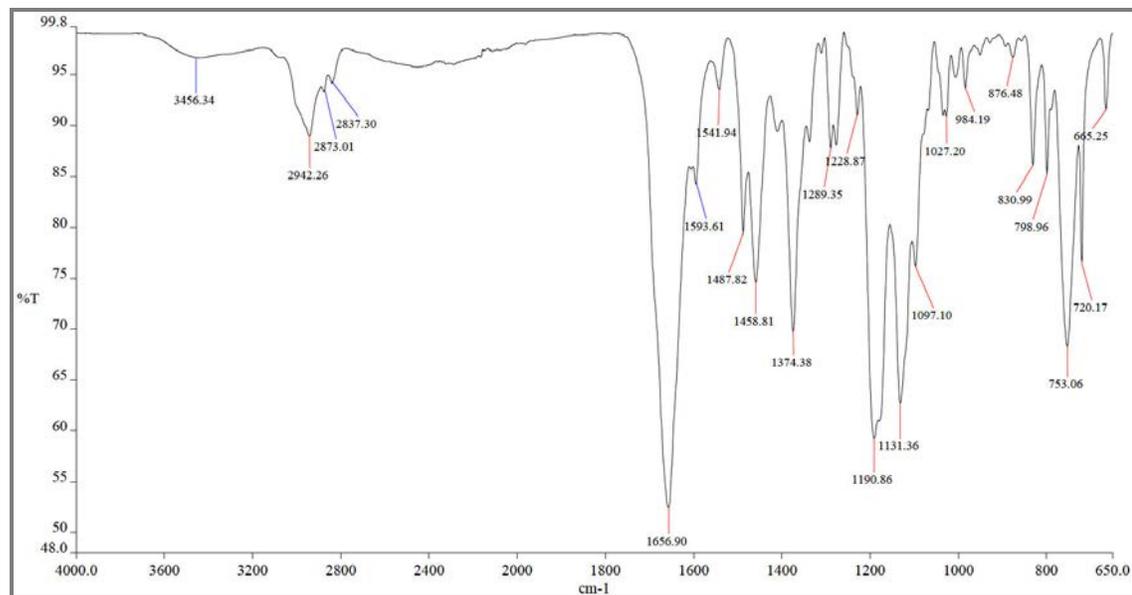


Figura 99 - Espectro de RMN ¹H de AP-3 protonado (C₅D₅N, com supressão do sinal da água, 500 MHz) e expansão da região entre 3,8 e 1,0 ppm.

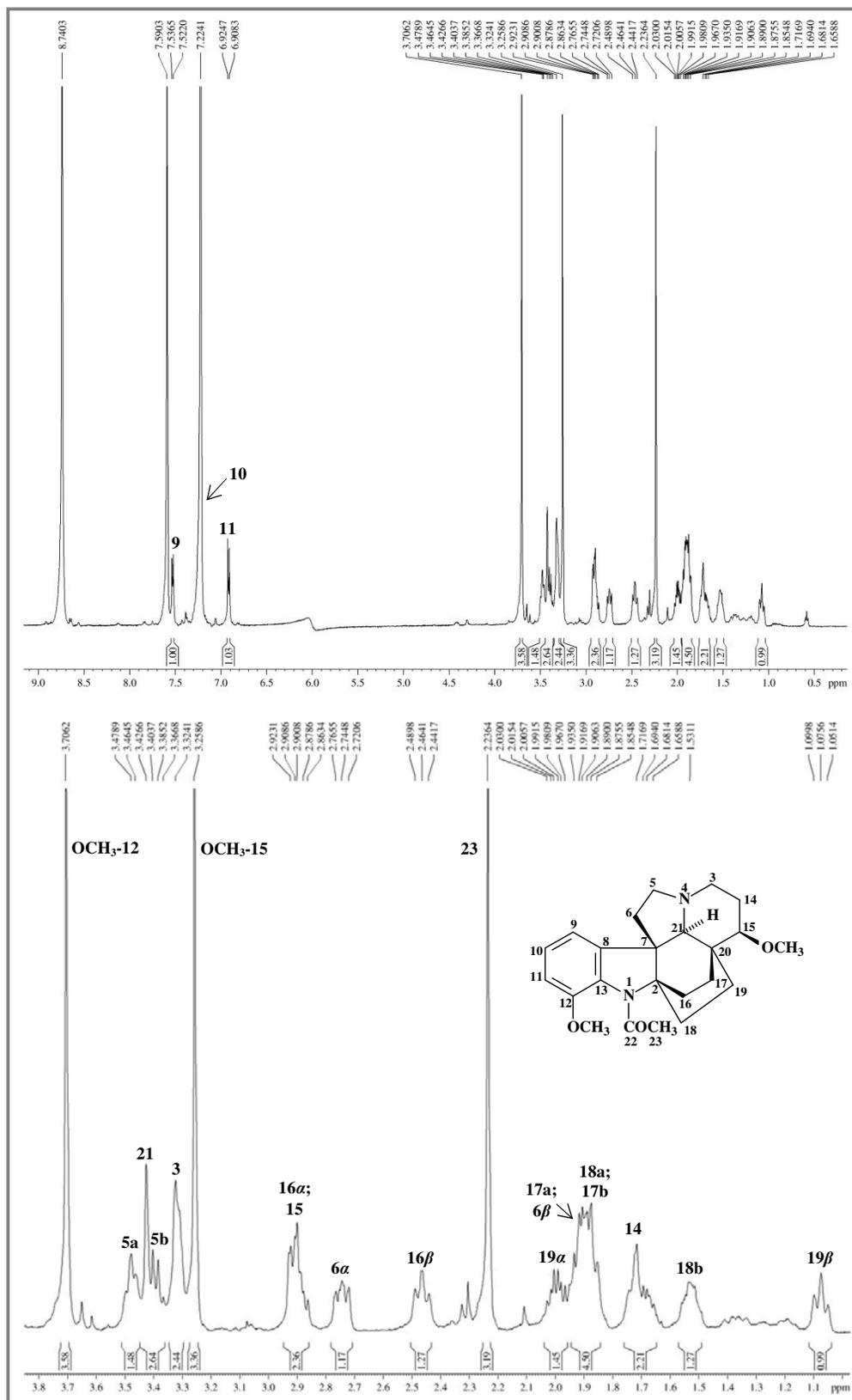


Figura 100 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY de AP-3 protonado ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 x 500 MHz) e expansão.

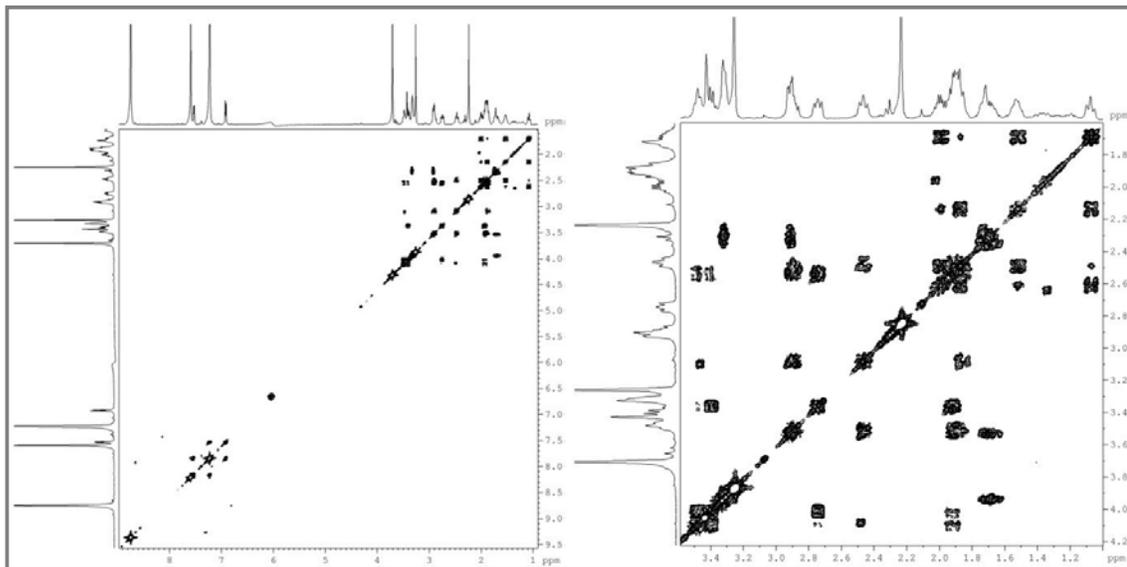


Figura 101 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC de AP-3 protonado ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 x 125 MHz) e expansão.

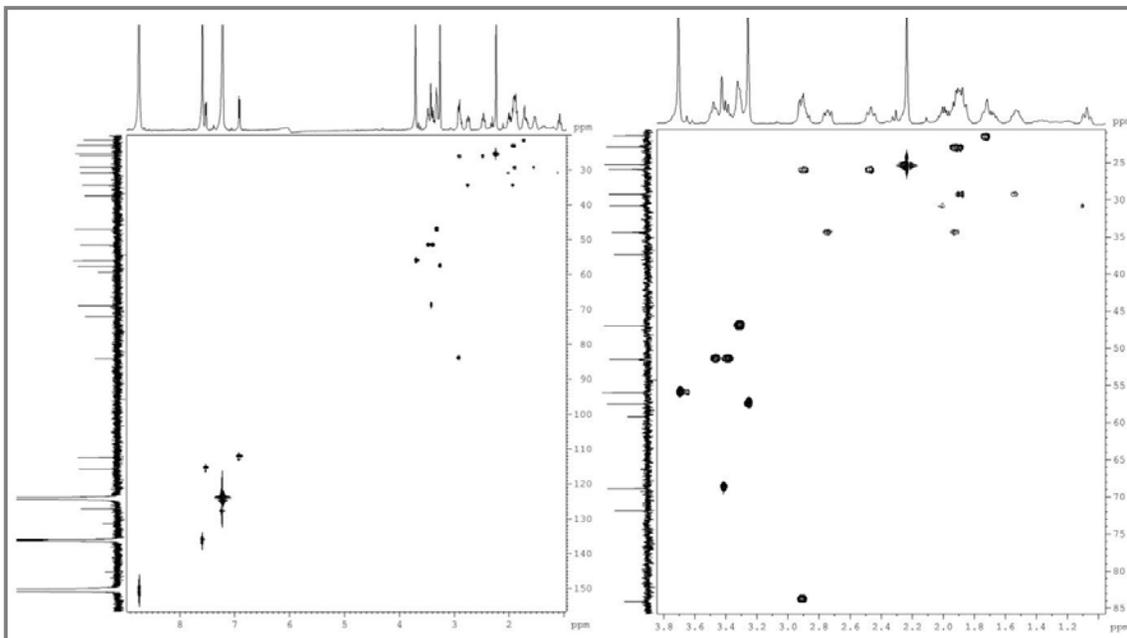


Figura 102 - Espectro de RMN ^{13}C -CPD (A) e DEPT 135 (B) de AP-3 protonado ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz).

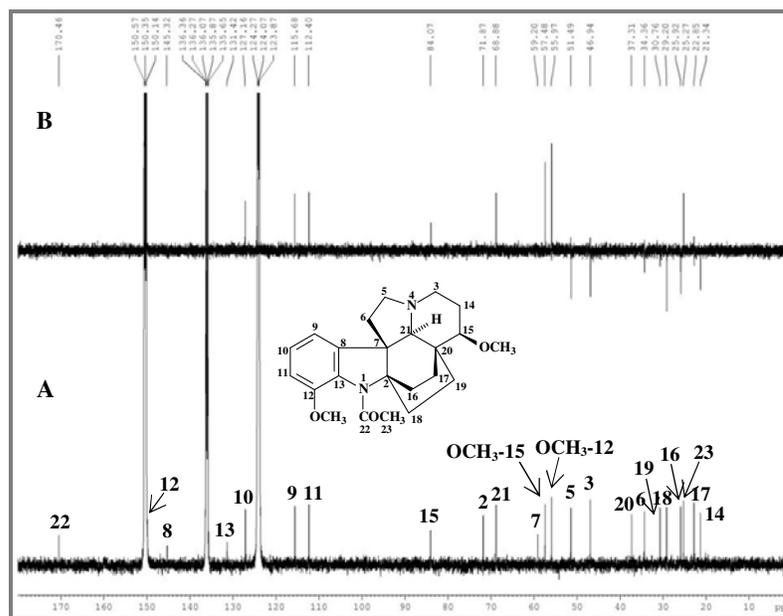


Figura 103 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de AP-3 protonado ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 x 125 MHz) e expansões.

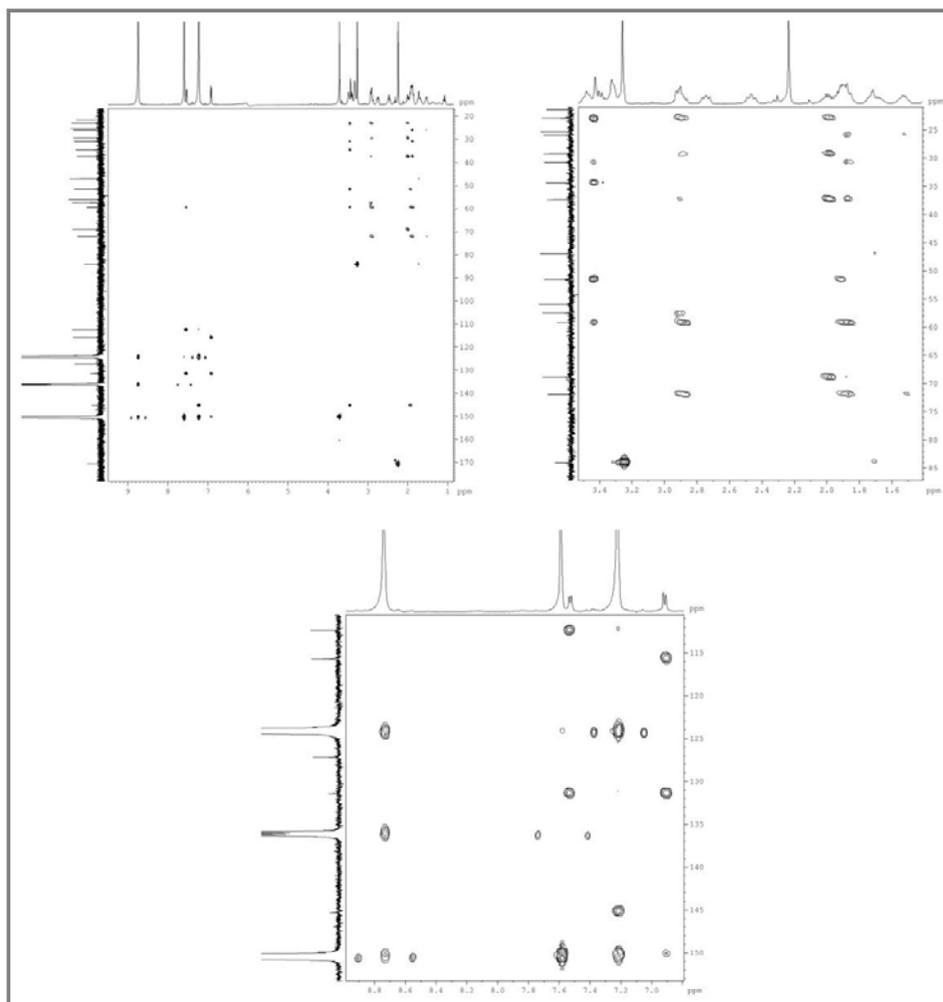
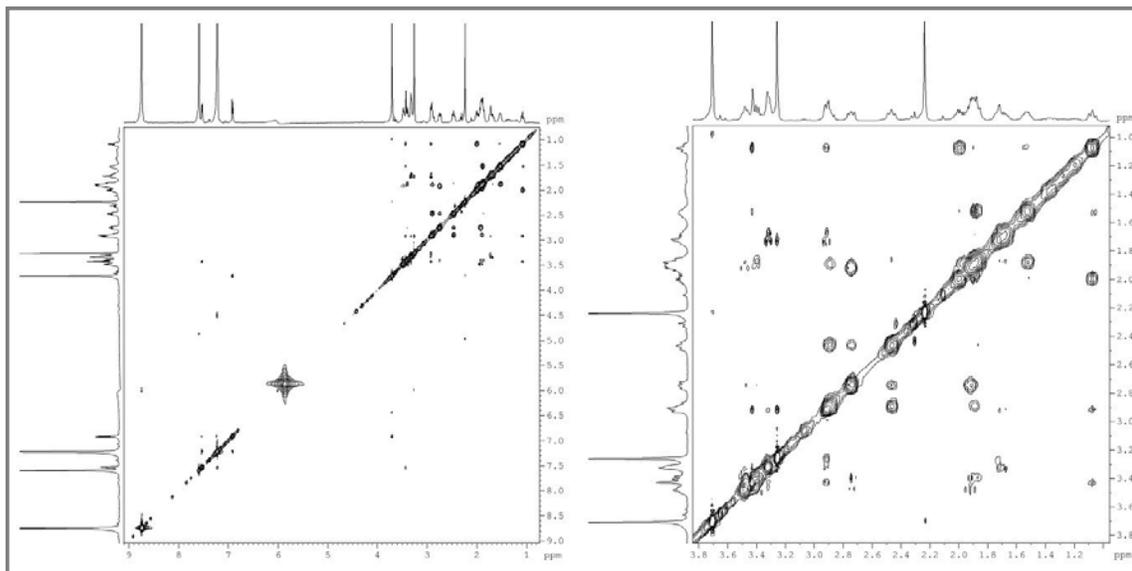


Figura 104 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -NOESY de AP-3 protonado ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 x 500 MHz) e expansão.



4.5 Determinação estrutural de AP-1

O composto AP-1 foi inicialmente isolado a partir de cromatografia em coluna da fração APSE-D, através de recristalização do precipitado formado na fração coletada com CH₂Cl₂-AcOEt 50% (ver Parte Experimental, p. 221). Ele foi obtido na forma de cristais em formato de agulha e apresentou ponto de fusão 202,5-204,5 °C e $[\alpha]_D^{20} = + 89,0^\circ$ (c 0,19, CHCl₃) { $[\alpha]_D = + 92^\circ$ (CRAVEIRO; MATOS; SERUR, 1983)}.

O espectro de massa de alta resolução de AP-1 (Figura 110, p. 129), obtido por ESI no modo positivo, exibiu o pico da molécula protonada $[M + H]^+$ em m/z 355,2369 (calculada 355,2385), compatível com a fórmula molecular C₂₂H₃₀N₂O₂, cujo IDH é 9.

Através da análise do espectro na região do infravermelho de AP-1 (Figura 111, p. 129) observaram-se as bandas em 1606, 1591, 1496 e 1452 cm⁻¹, bem características da presença de ligações C=C de anel benzênico, a banda em 1639 cm⁻¹, característica de ligação C=O de amida, e as bandas em 1439 e 1381 cm⁻¹, atribuídas às deformações angulares simétricas de grupos metileno e metila, respectivamente.

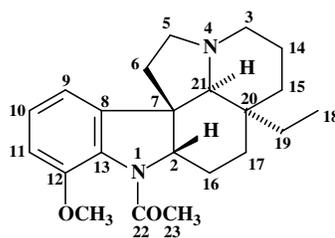
O espectro de RMN ¹H de AP-1 (Figura 112 e Figura 113, p. 130) mostrou três sinais de hidrogênios ligados a carbonos aromáticos em δ_H 7,23 (t, H-10), 7,01 (d, H-9) e 6,93 (d, H-11), todos acoplando entre si com constantes de acoplamento *orto* de 8,0 Hz. Suas multiplicidades, características de anel benzênico 1,2,3-tri-substituído, propuseram uma substituição no anel benzênico do sistema di-hidroindólico. Um simpleto em δ_H 3,77 foi atribuído aos hidrogênios de uma metoxila ligada a anel benzênico, devido a este valor de deslocamento químico ser bem característico de tal metoxila. Outro simpleto em δ_H 2,32 (3H-23) foi atribuído aos hidrogênios de um grupo *N*-acetílico.

O espectro de RMN ¹³C-CPD de AP-1 (Figura 114, p. 131) exibiu 21 sinais de carbonos, e o sinal muito pouco intenso em δ_C 171,8 (C-22), característico de carbonila, foi confirmado pelo espectro HMBC. O sinal que faltava para completar a fórmula molecular, em δ_C 150,6 (C-12), encontrava-se sobreposto por um dos tripletos da piridina deuturada, e também foi visto pelo espectro HMBC. A análise do espectro HSQC (Figura 115, p. 131), e comparação com o espectro HSQC Editado (Figura 116, p. 132), permitiram a observação de cinco sinais de carbonos mono-hidrogenados (δ_C 126,9, 116,4, 112,1, 71,0 e 70,0), oito de carbonos metilênicos (δ_C 53,8, 52,7, 38,6, 34,6, 30,6, 25,8, 23,7 e 22,2) e três de carbonos metílicos (δ_C 55,8, 23,5 e 7,2), e por subtração foram identificados seis sinais de carbonos não-hidrogenados (δ_C 171,8, 150,6, 144,2, 130,4, 54,2 e 36,2) (Tabela 8, p. 128).

A comparação com o padrão de hidrogenação dos carbonos do composto AP-2 (7 C, 4 CH, 9 CH₂ e 2 CH₃) e a diferença de somente duas unidades de massa a menos que AP-1, sugeriram a abertura de um dos anéis de AP-2, gerando uma estrutura pentacíclica para AP-1. Este fato é condizente com o surgimento da metila em δ_C 7,2 (C-18), que correlaciona no espectro HSQC com os hidrogênios tripleto em δ_H 0,53 (3H-18), e é típica de alcaloides plumeranos pentacíclicos (GUIMARÃES; BRAZ-FILHO; VIEIRA, 2012). Outra evidência deste fato é o surgimento do carbono metínico em δ_C 70,0, o qual indica a posição de abertura do anel no carbono C-2 do esqueleto plumerano, visto que esse valor de deslocamento químico é característico de carbono nitrogenado.

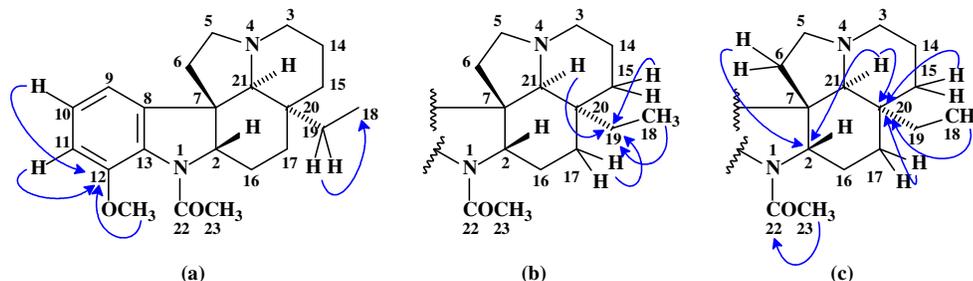
Então, diante dos dados apresentados, foi proposta a estrutura do alcaloide da Figura 105, a qual foi confirmada através das correlações à longa distância observadas no espectro HMBC (Figura 117, p. 133).

Figura 105 - Estrutura proposta para o composto AP-1.



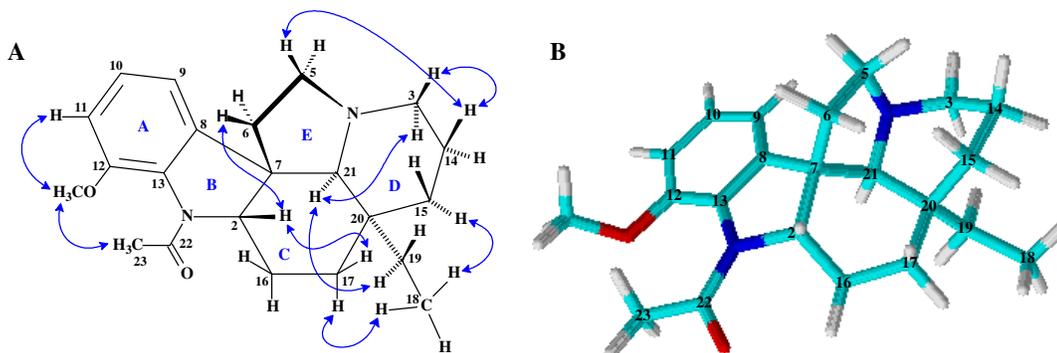
O substituinte metoxila no carbono C-12 foi ratificado pela correlação dos hidrogênios aromáticos H-10 (δ_H 7,23) e H-11 (δ_H 6,93) e dos hidrogênios metoxílicos em δ_H 3,77 com o carbono sp^2 oxigenado C-12 (δ_C 150,6). A cadeia lateral etila ligada ao carbono C-20 foi confirmada pelas correlações dos hidrogênios diastereotópicos H-19a (δ_H 1,33) e H-19b (δ_H 0,85) com o carbono metílico C-18 (δ_C 7,2) (Figura 106, a, p. 126), dos hidrogênios H-15b (δ_H 0,98), H-17a (δ_H 2,05), H-21 (δ_H 2,27) e 3H-18 (δ_H 0,53) com o carbono C-19 (δ_C 30,6) (Figura 106, b, p. 126), e dos hidrogênios 3H-18, H-17a, H-15b e H-21 com o carbono C-20 (δ_C 36,2). O grupo *N*-acetílico foi confirmado pela correlação a $^2J_{CH}$ dos hidrogênios metílicos 3H-23 (δ_H 2,32) com a carbonila C-22 (δ_C 171,8). Outras importantes correlações ocorreram entre os hidrogênios diastereotópicos H-6a (δ_H 2,09) e H-6b (δ_H 1,57) e o hidrogênio H-21 (δ_H 2,27) com o carbono metínico C-2 (δ_C 70,0), a $^3J_{CH}$ (Figura 106, c, p. 126), confirmando a abertura do anel F em C-2.

Figura 106 - Subestruturas com setas mostrando algumas importantes correlações à longa distância ^1H - ^{13}C vistas no espectro HMBC de AP-1.



O espectro NOESY de AP-1 (Figura 118, p. 134) mostrou acoplamentos dipolares entre os hidrogênios H-21 (δ_{H} 2,27) com H-3 α (δ_{H} 1,91) e H-19 α (δ_{H} 0,85); H-15 α (δ_{H} 1,45) e H-17 α (δ_{H} 0,96) com 3H-18 (δ_{H} 0,53); H-3 β (δ_{H} 2,95) e H-5 β (δ_{H} 3,02) com H-14 β (δ_{H} 1,38); H-2 (δ_{H} 4,93) com H-17 β (δ_{H} 2,05) e H-6 β (δ_{H} 2,09); e H-11 (δ_{H} 6,93) com os hidrogênios da metoxila em δ_{H} 3,77 e estes com os hidrogênios 3H-23 (δ_{H} 2,32). Essas interações permitiram determinar a configuração β para o hidrogênio H-2, as configurações α para H-21 e para a cadeia lateral etila, assim como determinar a conformação em barco para o anel C do esqueleto plumerano (Figura 107).

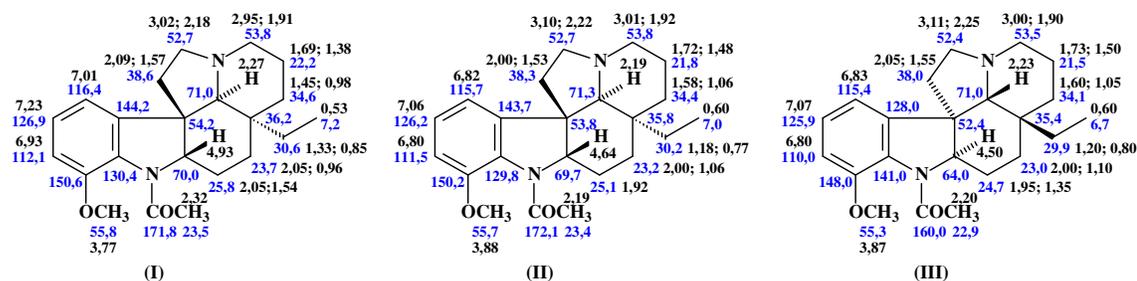
Figura 107 - Estrutura tridimensional do composto AP-1, com setas duplas mostrando os acoplamentos dipolares observados no experimento NOESY (A), e modelo molecular 3D obtido pelo programa “ChemSketch” (B).



A comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C de AP-1 com os dados registrados na literatura por Zêches e colaboradores (1995) para o alcaloide aspidospermina (Figura 108, p. 127) mostra que os autores invertem os valores dos carbonos não-hidrogenados C-8 (δ 128,0) e C-13 (δ 141,0), pois visto que o carbono C-13 encontra-se posicionado *orto* à metoxila, um grupo ativante e orientador *orto/para*, ele deve estar mais blindado que o carbono C-8, posicionado *meta* à metoxila. Observou-se também uma diferença de 12,1 ppm nos deslocamentos das carbonilas do grupo *N*-acetílico, porém o valor aqui encontrado de

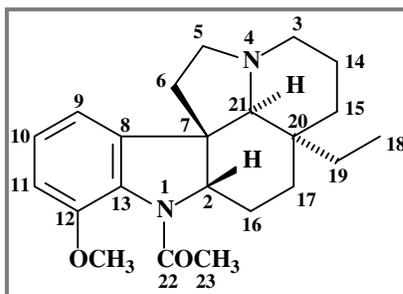
172,1 ppm é mais frequentemente observado para tal carbonila, visto na literatura que ele varia entre δ 168,3 a 172,0 (ARAÚJO JR. *et al.*, 2007; ATTA-UR-RAHMAN *et al.*, 1991; BRENNAN; SAXTON, 1986; GUIMARÃES *et al.*, 2013; McLEAN; REYNOLDS; ZHU, 1987; OLIVEIRA, 1999). Deve-se ainda enfatizar uma forte desblindagem observada para o carbono C-2 (δ 69,7) de AP-1 em relação ao da literatura (δ 64,0), porém nenhum argumento foi encontrado para justificar este comportamento.

Figura 108 - Comparação dos valores de deslocamentos químicos de RMN ^1H e ^{13}C do composto AP-1 (I: $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 e 125 MHz; II: CDCl_3 , 500 e 125 MHz) com os dados publicados por ZÈCHES *et al.* (1995) para o alcaloide aspidoespermina (III: CDCl_3 , 300 e 75 MHz).



O composto AP-1 foi identificado como o alcaloide plumerano pentacíclico (+)-aspidoespermina (Figura 109, p. 128), isolado da casca da raiz, das folhas (CRAVEIRO; MATOS; SERUR, 1983), das raízes e da casca do caule (MITAINE *et al.*, 1996) de *Aspidosperma pyrifolium*, além de outras espécies de *Aspidosperma* (GUIMARÃES; BRAZ-FILHO; VIEIRA, 2012; PEREIRA *et al.*, 2007).

Figura 109 - Estrutura do composto AP-1, identificado como o alcaloide plumerano (+)-aspidospermina.


 Tabela 8 - Dados de RMN ¹H e ¹³C do composto AP-1 (500 e 125 MHz, C₅D₅N), e correlações a mais de uma ligação observadas no espectro HMBC.

AP-1				
	HSQC		HMBC	
	δ_C	δ_H (mult, J, H)	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$
2	70,0	4,93 (*, 1H)		H-6 β ; H-6 α ; H-21
3β	53,8	2,95 (dl, 10,4 Hz, 1H)		H-5 α ; H-21
3α		1,91 (td, 10,4; 2,2 Hz, 1H)		
5β	52,7	3,02 (td, 8,5; 3,0 Hz, 1H)	H-6 β ; H-6 α	
5α		2,18 (q, 8,5 Hz, 1H)		
6β	38,6	2,09 (m, 1H)	H-5 β ; H-5 α	H-21
6α		1,57 (m, 1H)		
7	54,2	—	H-6 β	H-5 β ; H-9
8	144,2	—		H-10; H-21
9	116,4	7,01 (d, 8,0 Hz, 1H)	H-10	H-11
10	126,9	7,23 (t, 8,0 Hz, 1H)	H-9	
11	112,1	6,93 (d, 8,0 Hz, 1H)	H-10	H-9
12	150,6	—	H-11	H-10; OCH ₃
13	130,4	—		H-9; H-11
14α	22,2	1,69 (q, 13,0 Hz, 1H)	H-3 β	
14β		1,38 (m, 1H)		
15α	34,6	1,45 (dl, 13,0 Hz, 1H)		H-3 β ; H-19 β ; H-19 α
15β		0,98 (m, 1H)		
16α	25,8	2,05 (m, 1H)		
16β		1,54 (m, 1H)		
17β	23,7	2,05 (m, 1H)		H-15 β ; H-19 β ; H-19 α ; H-21
17α		0,96 (m, 1H)		
18	7,2	0,53 (t, 7,5 Hz, 3H)	H-19 β ; H-19 α	
19β	30,6	1,33 (sext, 7,5 Hz, 1H)		H-15 β ; H-17 β ; 3H-18; H-21
19α		0,85 (sext, 7,5 Hz, 1H)		
20	36,2	—	H-15 β ; H-21	H-16 α ; 3H-18
21	71,0	2,27 (s, 1H)		H-3 β ; H-5 β ; H-19 β ; H-19 α
22	171,8	—	3H-23	
23	23,5	2,32 (s, 3H)		
OCH₃	55,8	3,77 (s, 3H)		

* Sinal superposto pela água presente na piridina deuterada.

Figura 110 - Espectro de massa de alta resolução de AP-1, obtido por ESI no modo positivo.

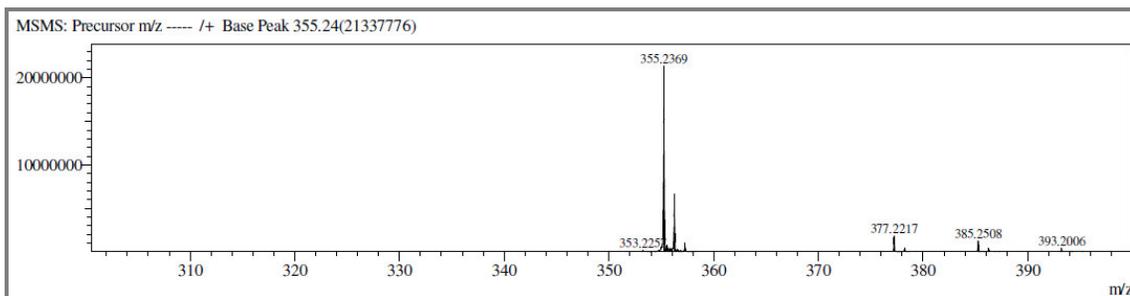


Figura 111 - Espectro de absorção na região do infravermelho de AP-1 (obtido no suporte UATR).

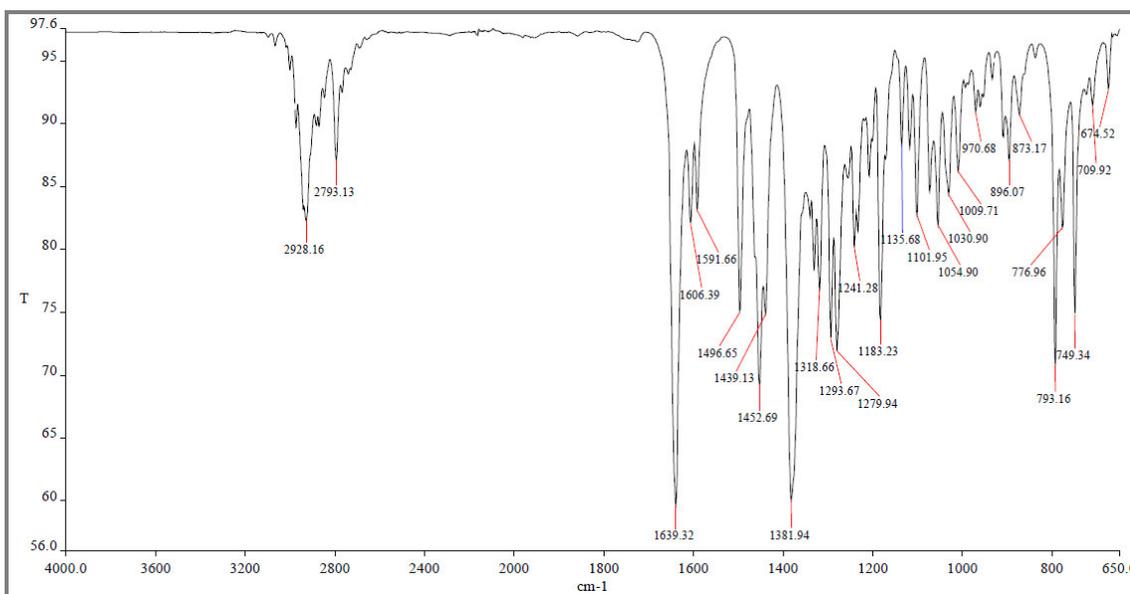


Figura 112 - Espectro de RMN ¹H de AP-1 (C₅D₅N, 500 MHz).

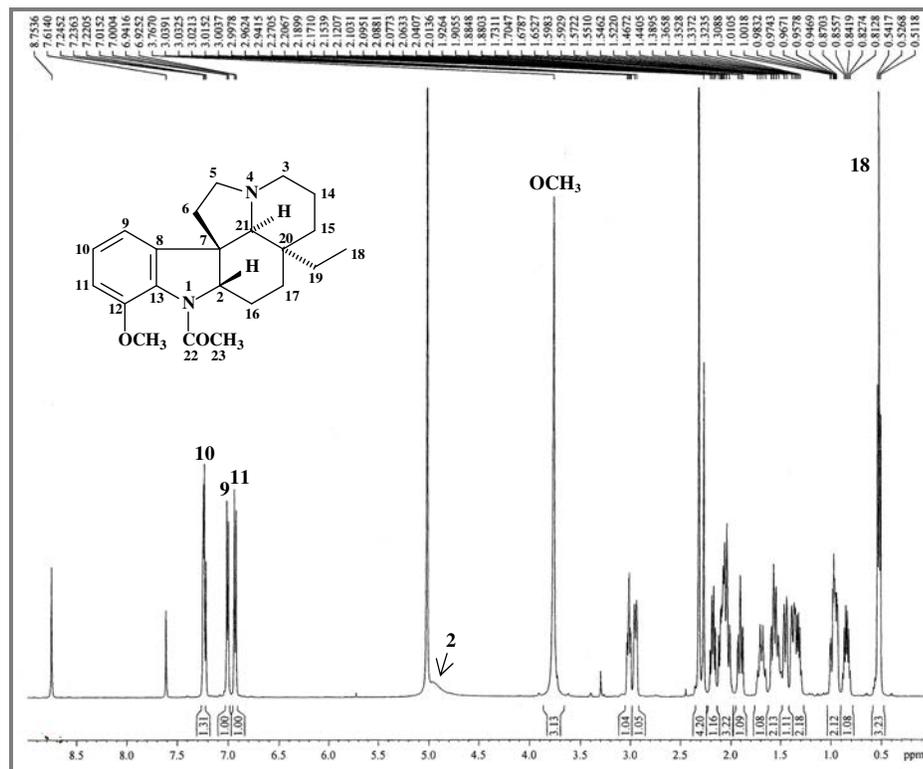


Figura 113 - Expansão da região entre 3,2 e 0,7 ppm do espectro de RMN ¹H de AP-1 (C₅D₅N, 500 MHz).

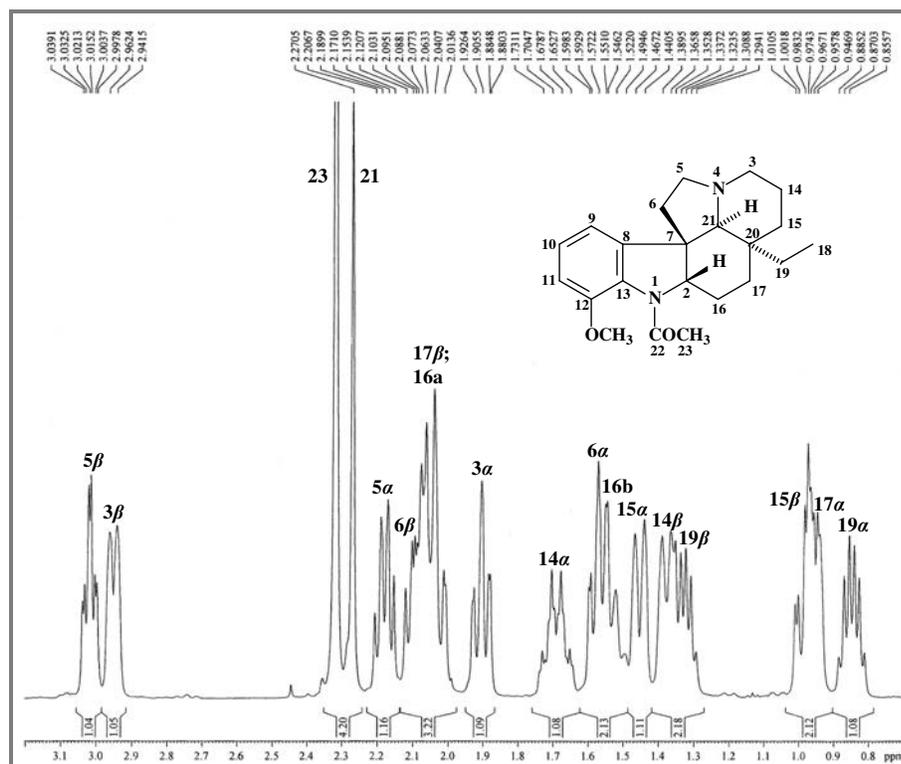


Figura 114 - Espectro de RMN ^{13}C -CPD de AP-1 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz).

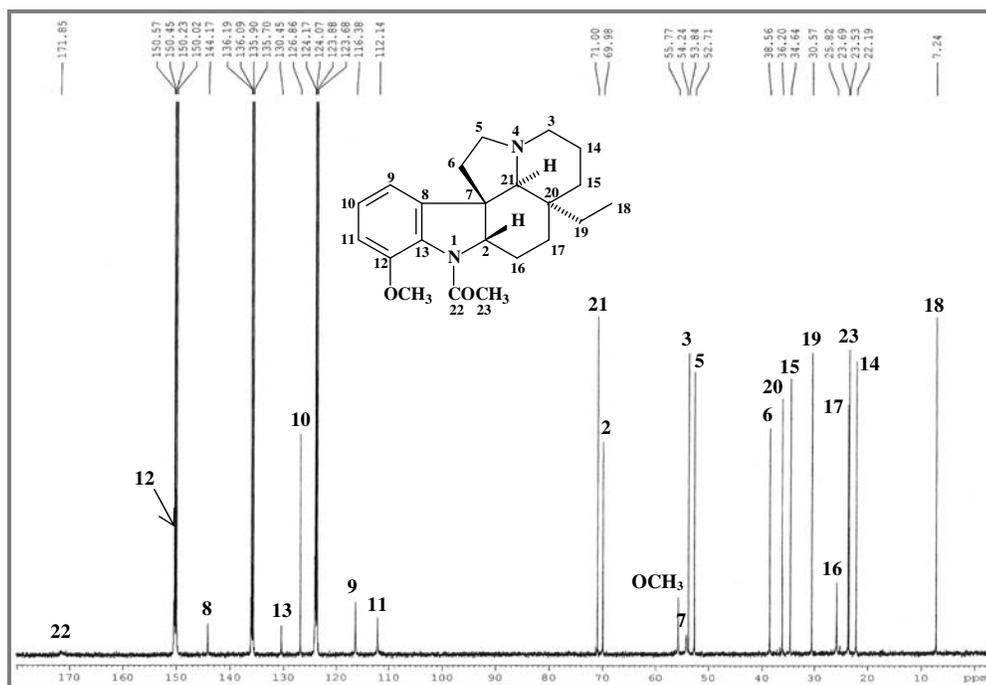


Figura 115 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC de AP-1 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 x 125 MHz).

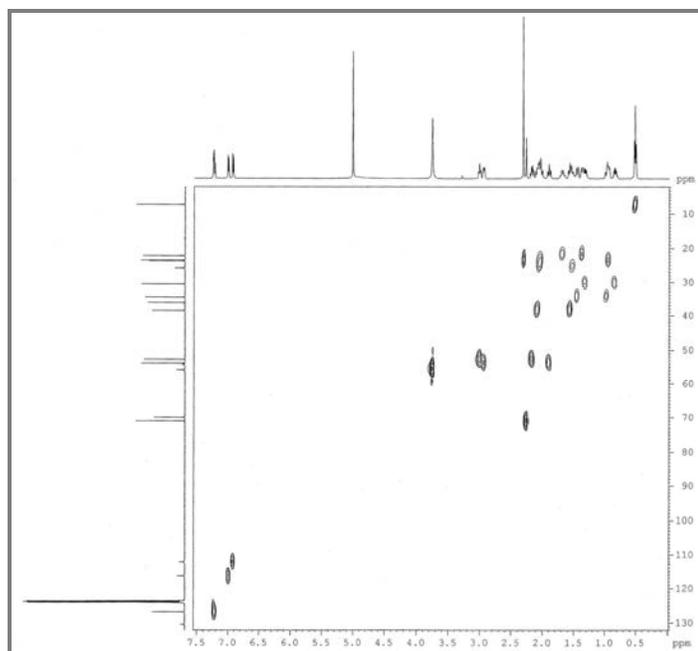


Figura 116 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC de AP-1 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 x 125 MHz) editado com CH_2 (A) e editado sem CH_2 (B).

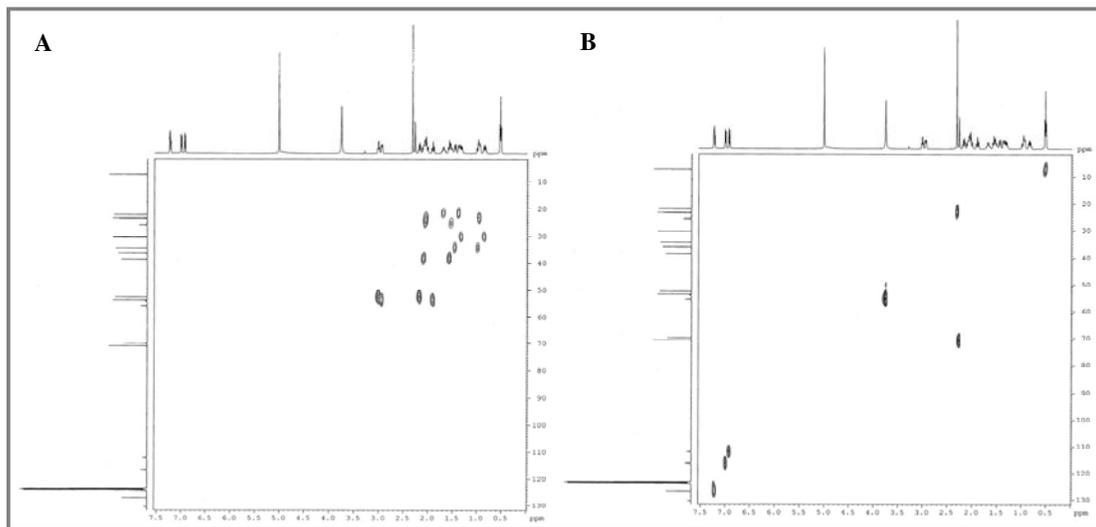


Figura 117 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de AP-1 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 x 125 MHz) e expansões.

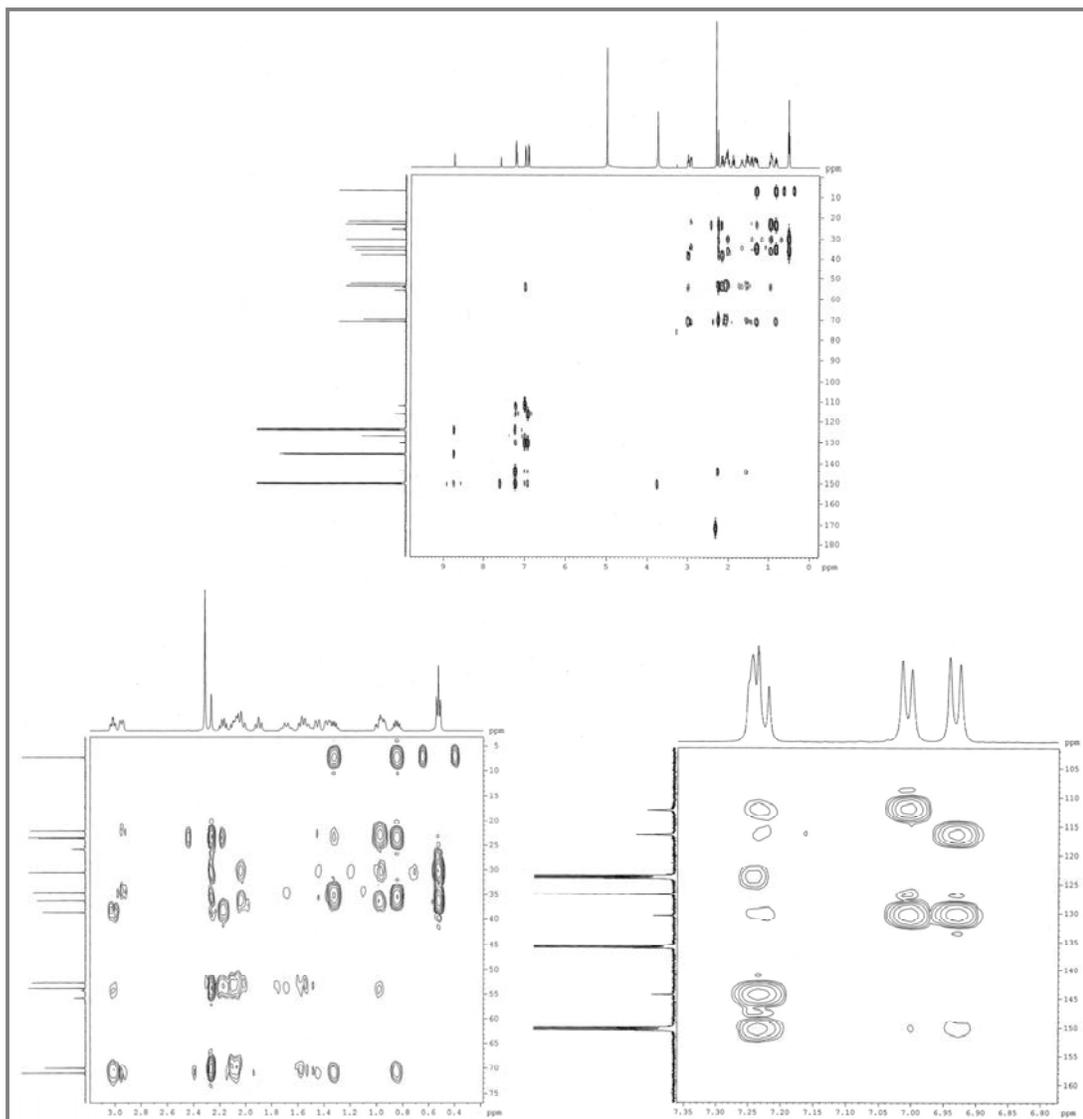
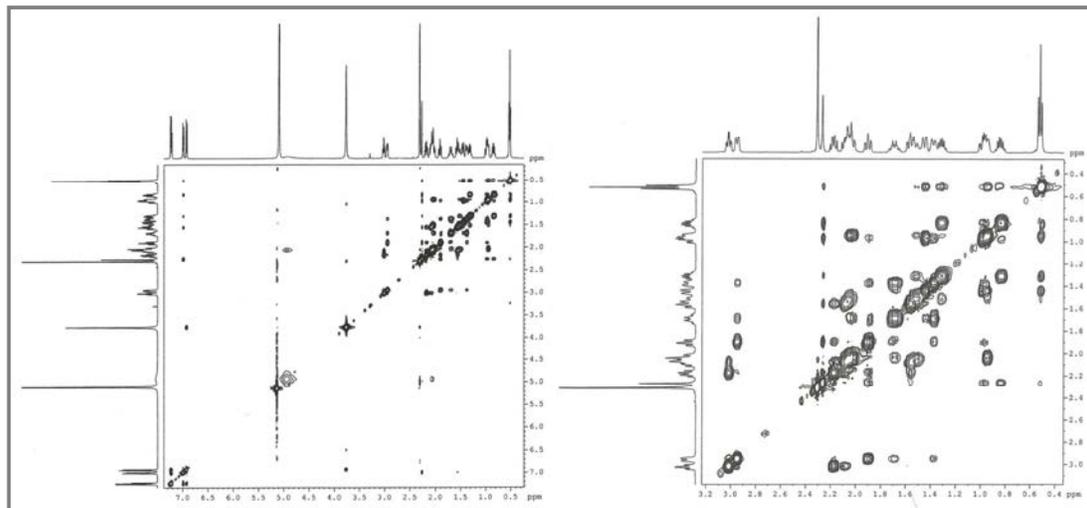


Figura 118 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -NOESY de AP-1 (CD_3OD , 500 x 500 MHz) e expansão.



4.6 Determinação estrutural de AP-4

O composto AP-4 foi obtido na mesma corrida cromatográfica que rendeu os compostos AP-2 e AP-3, além de mais quantidade do composto AP-1 (ver Parte Experimental, p. 224). Ele apresentou-se como uma resina marrom, cuja $[\alpha]_D^{20} = + 25,4^\circ$ (c 0,11, MeOH) $\{[\alpha]_D = + 10^\circ; c$ 0,009, CHCl_3 (FRANÇA; BROWN; SANTOS, 2000)}.

A fórmula molecular de AP-4, $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}$, foi sugerida a partir do pico da molécula protonada $[\text{M} + \text{H}]^+$ em m/z 325,2325 (calculada 325,2279), visto no espectro de massa de alta resolução (Figura 124, p. 140), referente a uma molécula com $\text{IDH} = 9$.

O espectro na região do infravermelho de AP-4 (Figura 125, p. 140) mostrou uma banda intensa em 1667 cm^{-1} , associada à deformação axial de ligação $\text{C}=\text{O}$ de amida. Absorções em 1198 e 1130 cm^{-1} foram atribuídas à presença de ligações $\text{C}-\text{N}$, e bandas em 1599 , 1480 e 1405 cm^{-1} foram atribuídas às deformações axiais de ligações $\text{C}=\text{C}$ de anel benzênico.

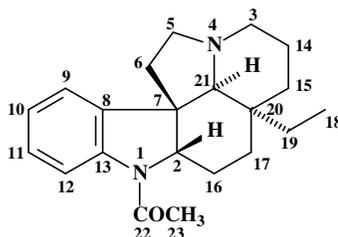
O espectro de RMN ^1H de AP-4 (Figura 126, p. 141, e Figura 127, p. 142) apresentou quatro bandas correspondentes a hidrogênios ligados a carbonos aromáticos, dois dupletos em δ_{H} 8,61 ($J = 7,5 \text{ Hz}$, H-12) e 7,34 ($J = 7,5 \text{ Hz}$, H-9), e dois tripletos em δ_{H} 7,29 ($J = 7,5 \text{ Hz}$, H-11) e 7,13 ($J = 7,5 \text{ Hz}$, H-10, sobreposto pela água presente no solvente deuterado), sugerindo a natureza indólica do composto. Os sinais em δ_{H} 4,62 (dd, $J = 10,5$ e $6,0 \text{ Hz}$, H-2), 3,49 (m, H-5 β), 3,34 (d, $J = 10,0 \text{ Hz}$, H-3a) e 3,01 (sl, H-21) foram atribuídos a hidrogênios ligados a carbonos nitrogenados, devido aos seus deslocamentos. Um simpleto em δ_{H} 2,40 (3H-23) e um triplete em δ_{H} 0,52 ($J = 7,0 \text{ Hz}$, 3H-18) foram associados aos hidrogênios de carbonos metílicos, sendo o primeiro característico de metila de grupo *N*-acetílico.

O espectro de RMN ^{13}C -CPD de AP-4 (Figura 128, p. 143) registrou 21 linhas espectrais, e a comparação com o espectro DEPT 135 (Figura 128, p. 143) permitiu a observação de cinco sinais de carbonos não-hidrogenados (δ 169,2, 142,0, 138,2, 53,1 e 36,6), seis de carbonos mono-hidrogenados (δ 128,8, 125,1, 123,4, 119,1, 71,0 e 67,0), oito de carbonos metilênicos (δ 53,5, 52,3, 39,1, 33,9, 30,5, 26,1, 23,0 e 21,2) e dois de carbonos metílicos (δ 23,7 e 7,21). Destes, convém destacar os carbonos metínicos em δ_{C} 71,0 e 67,0, que correlacionam a uma ligação, no espectro HSQC (Figura 129, p. 143), com os hidrogênios em δ_{H} 3,01 e 4,62, respectivamente; o carbono metílico em δ_{C} 7,21, que está diretamente ligado aos hidrogênios em δ_{H} 0,52; e a carbonila em δ_{C} 169,2, indicando que o composto também possui o grupo *N*-acetílico (Tabela 9, p. 139).

A diferença de trinta unidades de massa em relação ao composto AP-1 ($[M + H]^+$ em m/z 355,2366) levou a propor que a diferença entre os compostos seria a perda do substituinte metoxila, fato condizente com a observação dos quatro sinais de hidrogênios ligados a carbonos aromáticos contíguos no espectro de RMN 1H .

Levantamento bibliográfico na literatura, realizado com o auxílio da ferramenta de busca “SciFinder”, revelou uma similaridade entre os dados espectrais de AP-4 e o alcaloide desmetoxiaspidospermina (Figura 119), relatado por Atta-Ur-Rahman e colaboradores (1991). Então, para confirmar a estrutura foram analisados os espectros bidimensionais COSY e HMBC.

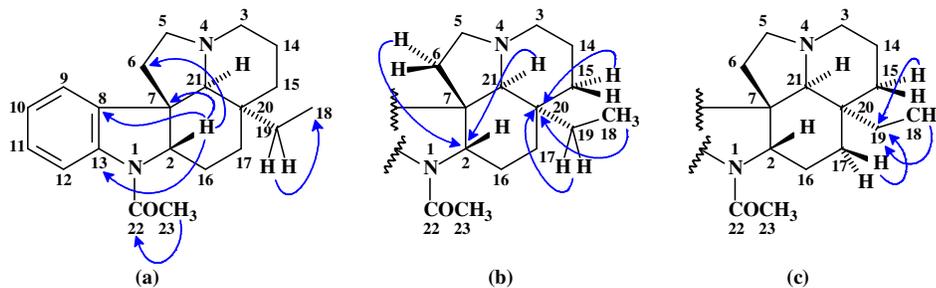
Figura 119 - Estrutura do alcaloide desmetoxiaspidospermina.



O espectro COSY (Figura 130, p. 144) mostrou os acoplamentos escalares do hidrogênio em δ_H 4,62 (H-2) com os hidrogênios diastereotópicos em δ_H 1,92 (H-16a) e 1,34 (H-16b), além dos acoplamentos entre os hidrogênios em δ_H 2,18 (H-17 β) com 1,34 (H-16b), 1,92 (H-16a) com 1,06 (H-17 α), e, finalmente, 1,46 (H-19a) e 0,95 (H-19b) com 0,52 (3H-18).

No espectro HMBC (Figura 131, p. 144) observou-se a correlação a duas ligações dos hidrogênios 3H-23 (δ_H 2,40) com o carbono C-22 (δ_C 169,2), referente ao grupo *N*-acetílico, e para ratificar a cadeia etila foram observadas as correlações entre os hidrogênios em δ_H 1,46 (H-19a) e 0,95 (H-19b) com o carbono metílico em δ_C 7,21 (C-18). Outras importantes correlações que confirmaram o esqueleto pentacíclico do composto foram observadas entre o hidrogênio em δ_H 4,62 (H-2) com os carbonos em δ_C 142,0 (C-13), 138,2 (C-8), 53,1 (C-7) e 39,1 (C-6) (Figura 120, a, p. 137); entre os hidrogênios em δ_H 3,01 (H-21) e 2,33 (H-6 α) com o carbono em δ_C 67,0 (C-2); entre os hidrogênios em δ_H 3,01 (H-21), 1,46 (H-19a), 1,13 (H-15 α), 0,95 (H-19b) e 0,52 (3H-18) com o carbono quaternário em δ_C 36,6 (C-20) (Figura 120, b, p. 137); e entre os hidrogênios em δ_H 2,18 (H-17 β), 1,13 (H-15 α) e 0,52 (3H-18) com o carbono em δ_C 30,5 (C-19) (Figura 120, c, p. 137).

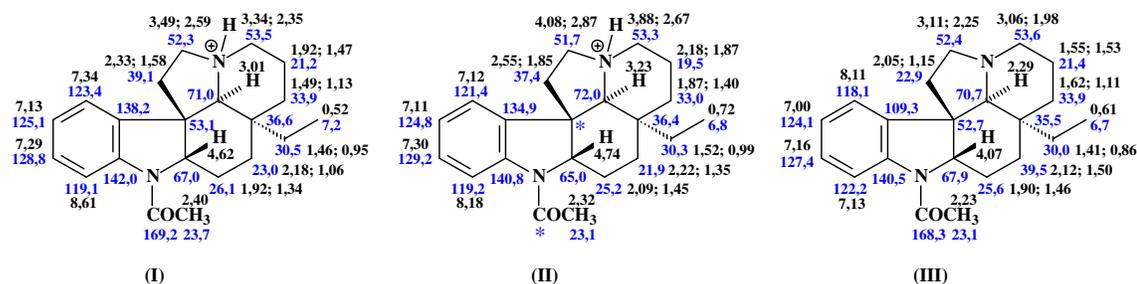
Figura 120 - Subestruturas com setas mostrando principais correlações a mais de uma ligação observadas no espectro HMBC do composto AP-4.



A estrutura de AP-4 foi, então, confirmada como a do alcaloide plumerano desmetoxiaspidospermina (Figura 119, p. 136), proposta anteriormente. Neste caso, o composto encontra-se em sua forma protonada, devido ao uso do TFA durante o isolamento.

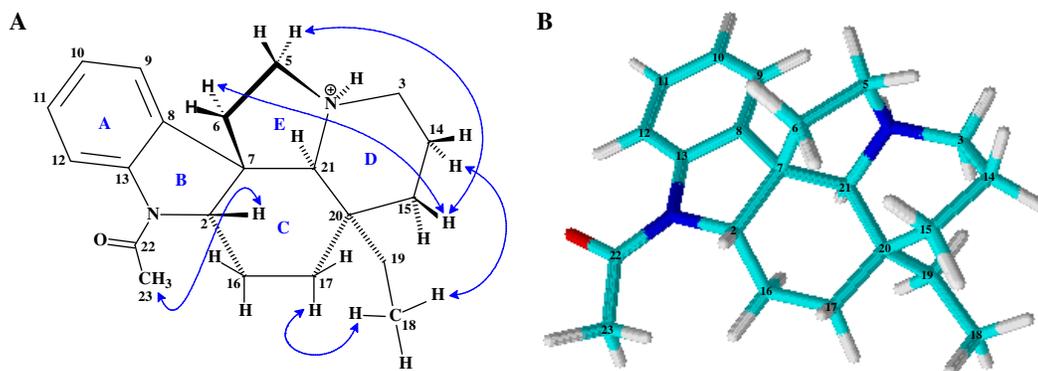
A Figura 121 (p. 138) mostra a comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C de AP-4 com aqueles relatados na literatura para o alcaloide desmetoxiaspidospermina (ATTA-UR-RAHMAN *et al.*, 1991), verificando-se que os autores inverteram os valores de ambos hidrogênios e carbonos-13 para os carbonos benzênicos C-9 (δ_{C} 121,4; δ_{H} 7,12) e C-12 (δ_{C} 119,2; δ_{H} 8,18), cuja correlação a $^3J_{\text{C,H}}$ do hidrogênio H-9 (δ_{H} 7,34) com o carbono C-7 (δ_{C} 53,1), observada no espectro HMBC obtido em piridina deuturada, permitiu assinalar inequivocadamente o carbono C-9. Também foram invertidos os carbonos metilênicos C-6 (δ_{C} 37,4; δ_{H} 2,55/1,85) e C-17 (δ_{C} 21,9; δ_{H} 2,22/1,35), cujas posições foram confirmadas pelas correlações à longa distância, vistas no espectro HMBC, do hidrogênio H-6 α (δ_{H} 2,33), ligado ao carbono em δ_{C} 39,1, com o carbono C-7 (δ_{C} 53,1), e do hidrogênio H-15 α (δ_{H} 1,13) com o carbono C-17 (δ_{C} 23,0; δ_{H} 2,18/1,06). Outro grande erro na literatura foi o assinalamento de C-8, um carbono benzênico substituído cujo valor de δ_{C} 109,3 é anotado versus o valor de δ_{C} 134,9 observado para AP-4, o qual é consistente com vários outros exemplos de alcaloides plumeranos da literatura (AHOND *et al.*, 1974; BRENNAN; SAXTON, 1986; GUIMARÃES *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2012; WENKERT *et al.*, 1973). Grandes divergências também foram vistas nos valores dos hidrogênios de carbonos nitrogenados, fato justificado pela protonação do composto AP-4, que causa a desblindagem de tais hidrogênios.

Figura 121 - Comparação dos valores de deslocamentos químicos de RMN ^1H e ^{13}C do composto AP-4 protonado (I: $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 e 125 MHz; II: CDCl_3 , 300 e 75 MHz) com os dados publicados por ATTA-UR-RAHMAN *et al.* (1991) para o alcaloide desmetoxiaspidospermina (III: CDCl_3 , 400 e 100 MHz). Asteriscos indicam carbonos não detectados.



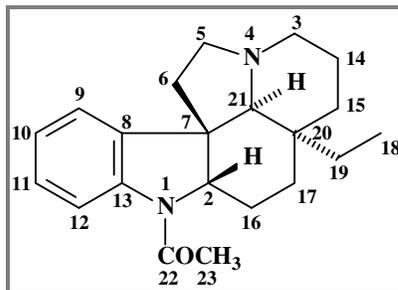
O espectro NOESY de AP-4 (Figura 132, p. 145) possibilitou determinar a estereoquímica relativa do composto através de acoplamentos dipolares vistos entre os hidrogênios H-2 (δ 4,62) com 3H-23 (δ 2,40); H-5 α (δ 2,59) e H-6 α (δ 2,33) com H-15 β (δ 1,49); H-14 α (δ 1,47) e H-17 α (δ 1,06) com 3H-18 (δ 0,52). Aliado à comparação com dados da literatura, foram determinadas as configurações α para o hidrogênio H-21 e para a cadeia lateral etila, e a configuração β para o hidrogênio H-2 e para os carbonos 5 e 6 (Figura 122).

Figura 122 - Estrutura tridimensional do composto AP-4 protonado, mostrando setas duplas que indicam as interações NOE vistas no espectro NOESY (A), e modelo molecular 3D obtido no programa “ChemSketch” (B).



Diante de todos os dados, o composto AP-4 foi identificado como o alcaloide plumerano pentacíclico (+)-desmetoxiaspidospermina (Figura 123, p. 139), também conhecido como *N*-acetilspidospermidina (ATTA-UR-RAHMAN *et al.*, 1991), isolado anteriormente da casca do caule de *Aspidosperma pyrifolium* (MITAINE *et al.*, 1996), além de outras espécies de *Aspidosperma*, como *A. discolor*, *A. marcgravianum* e *A. neblinae* (PEREIRA *et al.*, 2007). Também há relatos do isolamento deste alcaloide das folhas de *Rhazya stricta* (ATTA-UR-RAHMAN *et al.*, 1991) e da casca de *Plumeria lancifolia* (FRANÇA; BROWN; SANTOS, 2000).

Figura 123 - Estrutura do composto AP-4, em sua forma neutra, identificado como o alcaloide plumerano (+)-desmetoxiaspidospermina.


 Tabela 9 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C do composto AP-4 protonado (500 e 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$), e correlações a mais de uma ligação observadas no espectro HMBC.

AP-4				
	HSQC		HMBC	
	δ_{C}	δ_{H} (mult, J, H)	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
2	67,0	4,62 (dd, 10,5; 6,0 Hz, 1H)		H-6 α ; H-21
3a	53,5	3,34 (d, 10,0 Hz, 1H)		H-5 α
3b		2,35 (m, 1H)		
5β	52,3	3,49 (m, 1H)		
5α		2,59 (q, 8,5 Hz, 1H)		
6α	39,1	2,33 (m, 1H)		H-2
6β		1,58 (t, 10,8 Hz, 1H)		
7	53,1	—	H-2; H-6 α ; H-21	H-9
8	138,2	—		H-12; H-10; H-2
9	123,4	7,34 (d, 7,5 Hz, 1H)	H-10	H-11
10	125,1	7,13 (t, 7,5 Hz, 1H)	H-9	H-12
11	128,8	7,29 (t, 7,5 Hz, 1H)	H-10	H-9
12	119,1	8,61 (d, 7,5 Hz, 1H)	H-11	H-10
13	142,0	—	H-12	H-11; H-9; H-2
14β	21,2	1,92 (m, 1H)	H-15 α	
14α		1,47 (m, 1H)		
15β	33,9	1,49 (m, 1H)		H-19 α ; H-19 β
15α		1,13 (td, 13,0; 4,0 Hz, 1H)		
16α	26,1	1,92 (m, 1H)		
16β		1,34 (qd, 14,0; 3,5 Hz, 1H)		
17β	23,0	2,18 (t, 14,0 Hz, 1H)		H-15 α ; H-19 β ; H-21
17α		1,06 (d, 14,0 Hz, 1H)		
18	7,2	0,52 (t, 7,0 Hz, 3H)	H-19 α ; H-19 β	
19α	30,5	1,46 (m, 1H)	3H-18	H-15 α ; H-17 β
19β		0,95 (sext, 7,0 Hz, 1H)		
20	36,6	—	H-15 α ; H-19 α ; H-19 β ; H-21	H-18
21	71,0	3,01 (sl, 1H)		H-5 β ; H-6 α ; H-19 α ; H-19 β
22	169,2	—	3H-23	
23	23,7	2,40 (s, 3H)		

Figura 124 - Espectro de massa de alta resolução de AP-4, obtido por ESI, mostrando o pico da molécula protonada $[M + H]^+$ em m/z 325,2325.

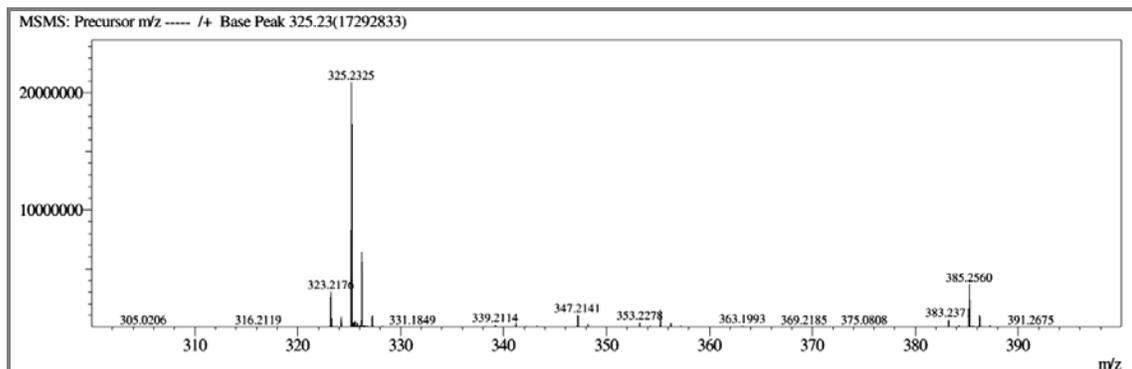


Figura 125 - Espectro de absorção na região do infravermelho de AP-4 (obtido no suporte UATR).

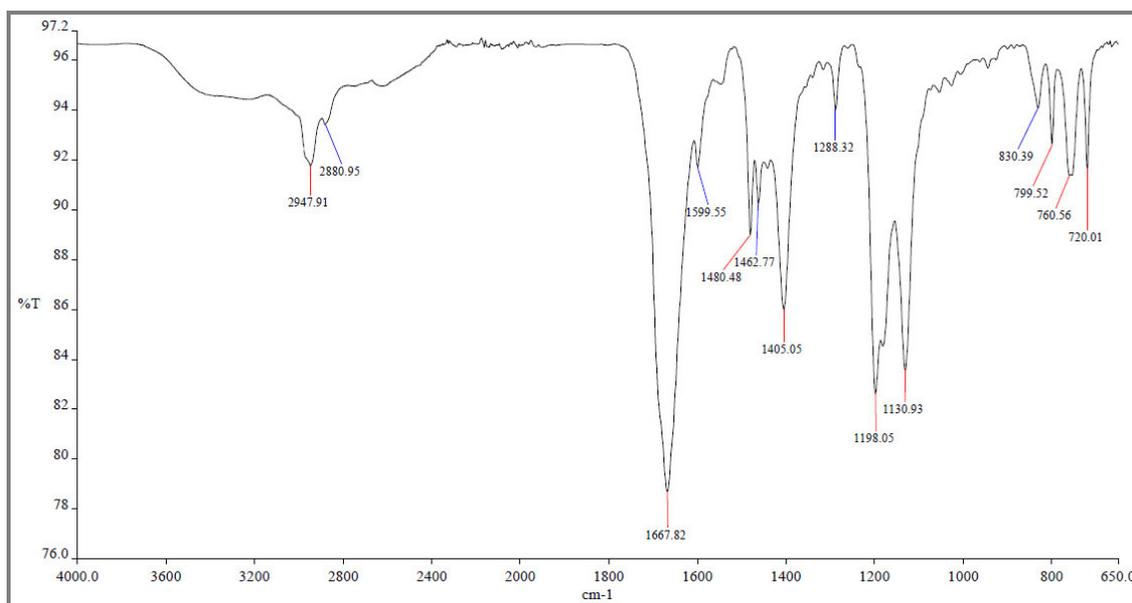


Figura 127 - Expansões do espectro de RMN ¹H de AP-4 protonado (C₅D₅N, 500 MHz).

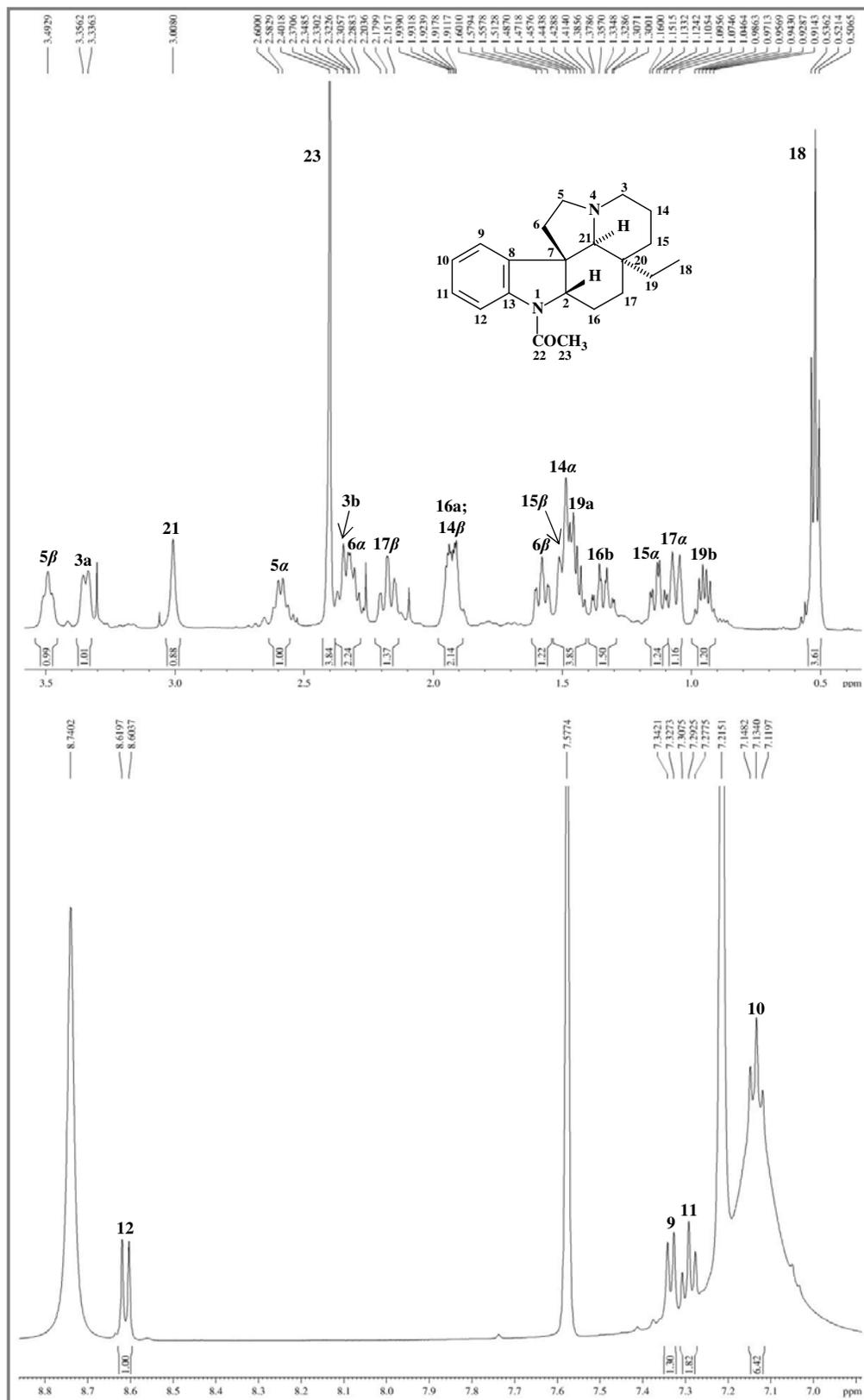


Figura 128 - Espectro de RMN ^{13}C -CPD (A) e DEPT 135 (B) de AP-4 protonado ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz).

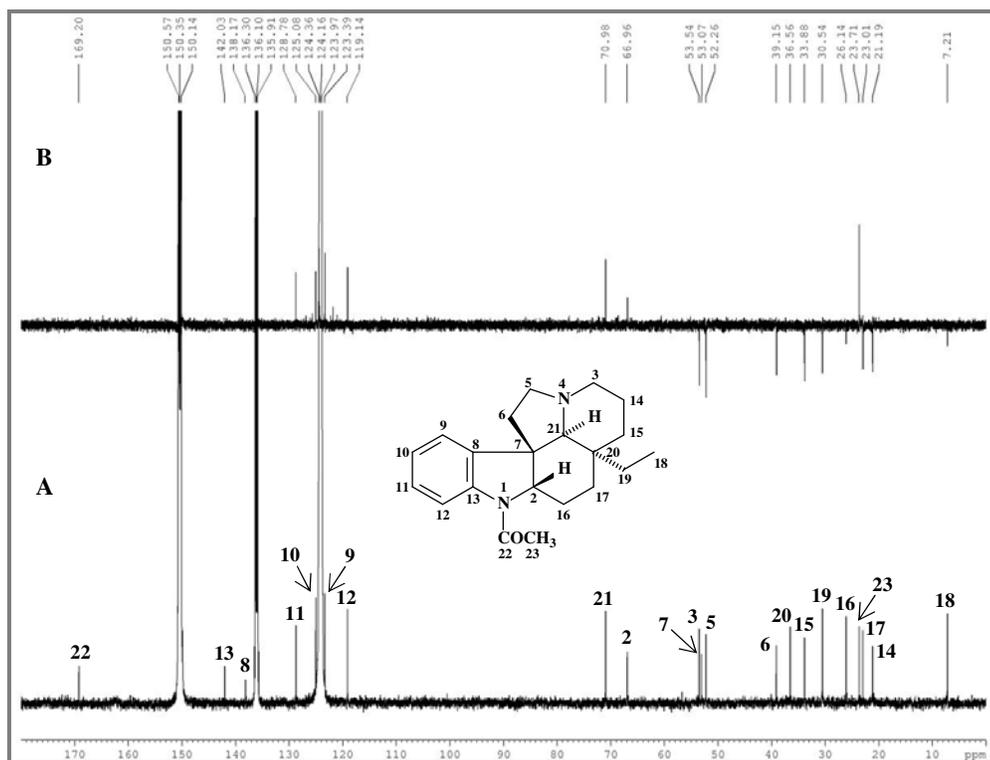


Figura 129 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC de AP-4 protonado ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 x 125 MHz) e expansão.

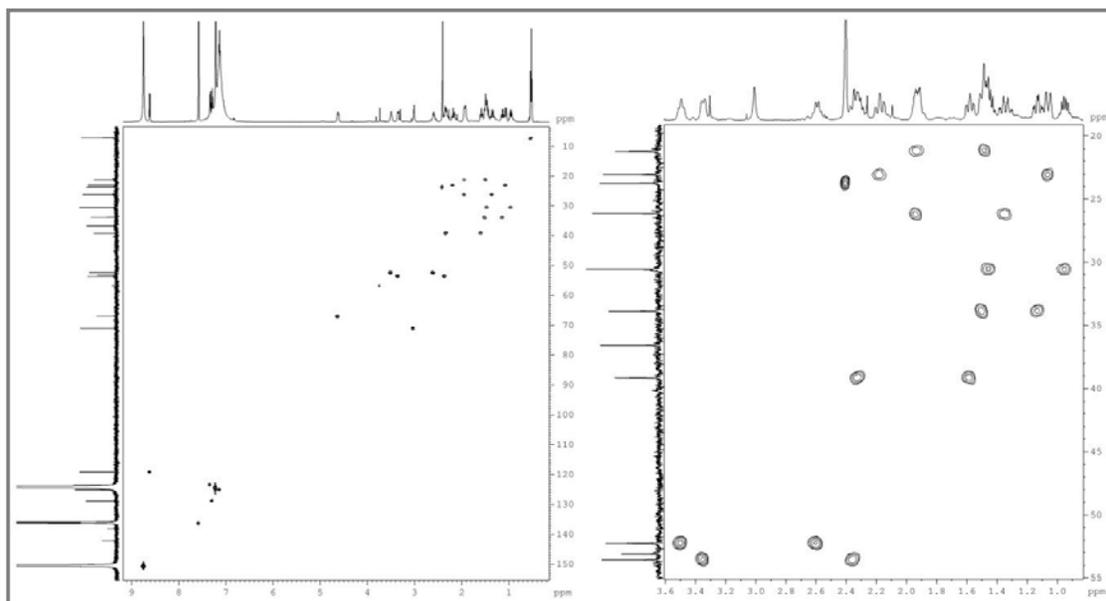


Figura 130 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY de AP-4 protonado ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz) e expansão.

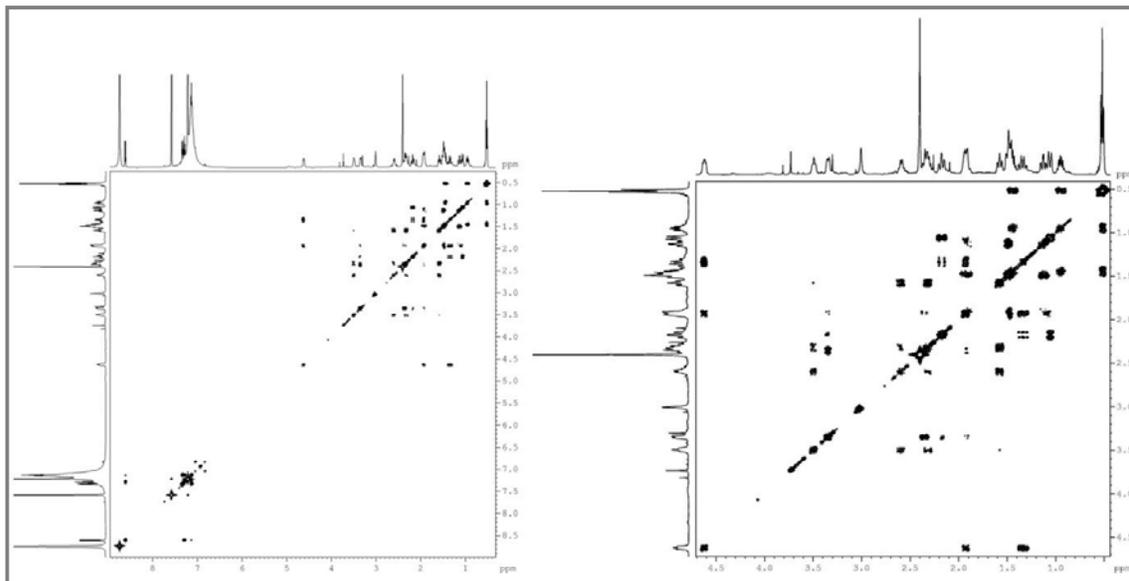


Figura 131 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de AP-4 protonado ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 x 125 MHz) e expansões.

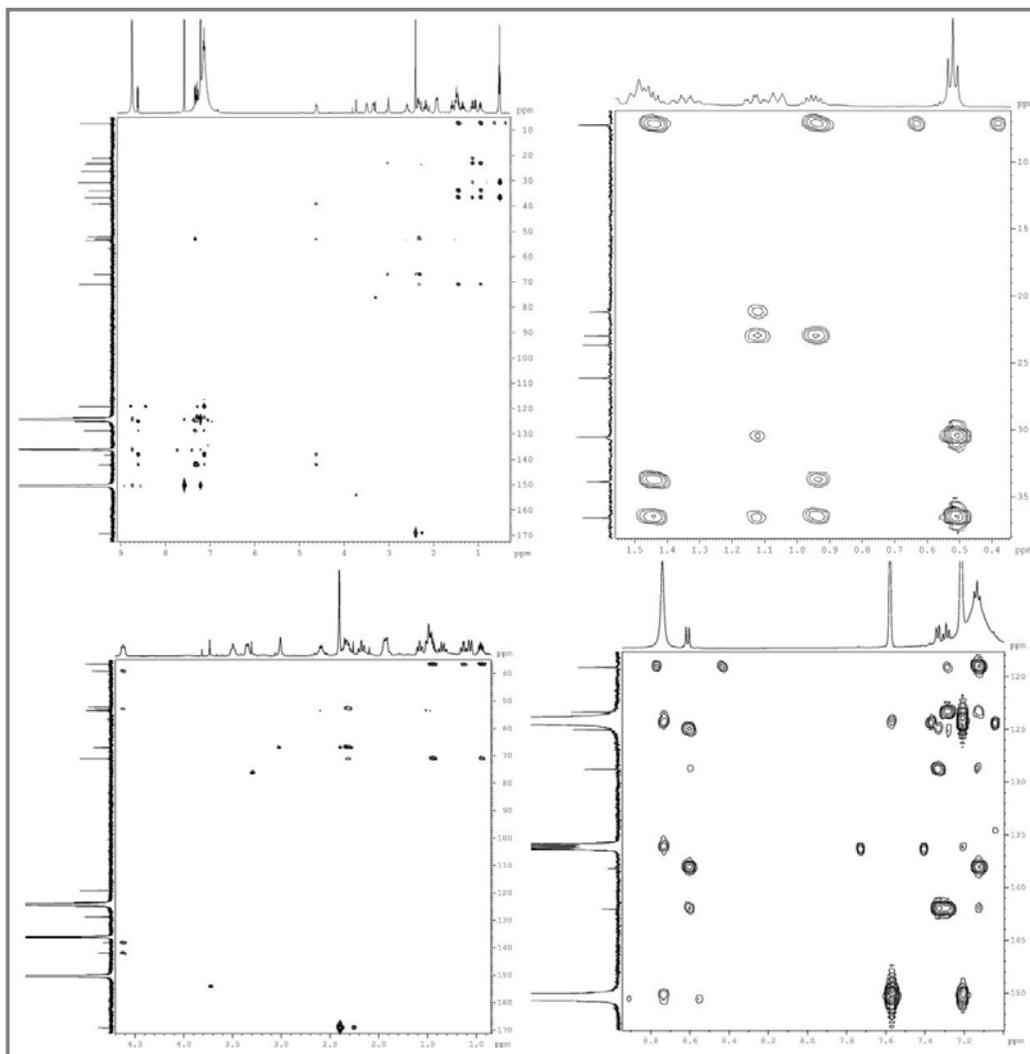
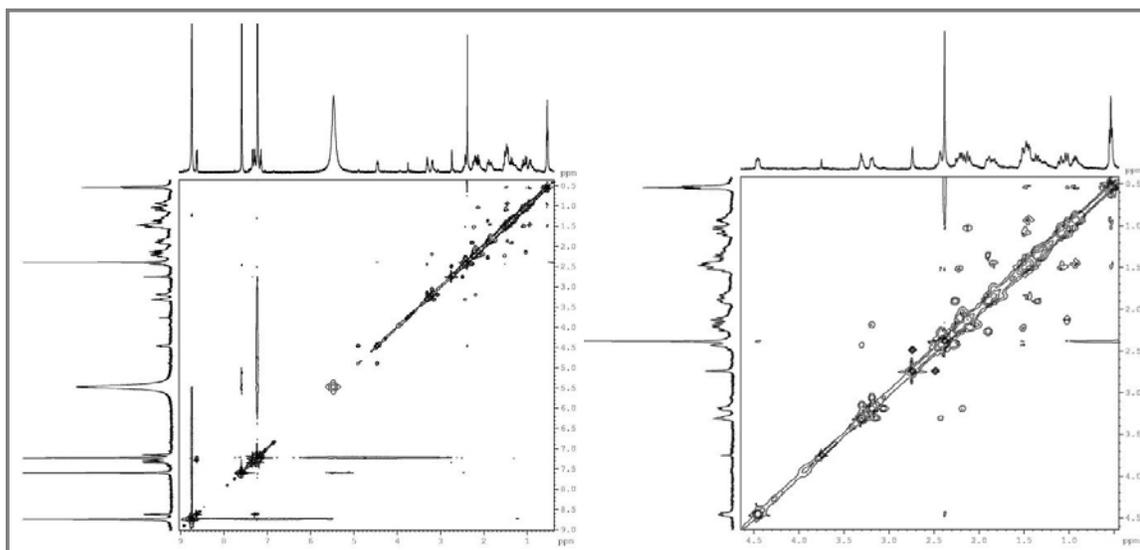


Figura 132 - Espectro de RMN 2D ¹H,¹H-NOESY de AP-4 protonado (C₅D₅N, 500 x 500 MHz) e expansão.



4.7 Determinação estrutural de AP-8

O composto AP-8 foi obtido do fracionamento cromatográfico de APSE-Aq, sendo isolado por CLAE utilizando mistura ternária composta por 15% de CH₃CN-CH₃OH (40:60) e 85% de solução aquosa ácida de TFA 0,2% (ver Parte Experimental, p. 228). Ele mostrou-se como uma resina marrom e exibiu $[\alpha]_D^{20} = -21,5^\circ$ (*c* 0,40, MeOH).

A fórmula molecular encontrada para o composto, C₁₉H₂₄N₂ (IDH = 9), idêntica a de AP-9, foi deduzida a partir do espectro de massa de alta resolução (Figura 140, p. 153), que exibiu o pico da molécula protonada [M + H]⁺ em *m/z* 281,2016 (calculada 281,2017). O espectro de massa sequencial mostrou os picos em *m/z* 253,1673 [M – 28]⁺ e 208,1055 [M – 73]⁺.

O espectro na região do infravermelho de AP-8 (Figura 141, p. 153) mostrou um perfil semelhante ao do composto AP-9, observando-se bandas em 3345 cm⁻¹, de deformação axial de ligação N-H, 2924 e 2858 cm⁻¹, de ligações C-H de carbonos sp³, 1101 cm⁻¹, de ligação C-N, além das absorções em 1606 e 1459 cm⁻¹, de ligações C=C de anel benzênico, aliada à banda em 744 cm⁻¹, característica de deformação angular fora do plano de ligação C-H de anel benzênico *orto*-substituído.

Apesar das semelhanças nos espectros de infravermelho, da mesma massa molecular e de ambos os compostos, AP-8 e AP-9, apresentarem rotações específicas negativas, constatou-se facilmente que não podiam ter estruturas idênticas, pois diferenças foram vistas nos espectros de RMN ¹H e ¹³C, além de apresentarem tempos de retenção diferentes na eluição por CLAE.

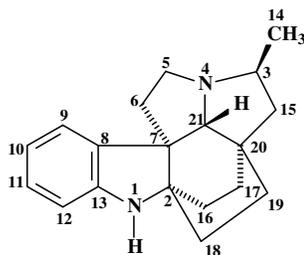
A análise do espectro de RMN ¹H de AP-8 (Figura 142, p. 154, e Figura 143, p. 155) mostrou as quatro bandas características do anel benzênico do sistema di-hidroindólico: dois dupletos em δ_H 7,24 (*J* = 7,5 Hz, H-9) e 6,73 (*J* = 7,5 Hz, H-12), um tripleto de duplete em δ_H 7,09 (*J* = 7,5 e 1,0 Hz, H-11) e um tripleto em δ_H 6,80 (*J* = 7,5 Hz, H-10). Na região típica dos hidrogênios ligados a carbonos sp³ nitrogenados foram observados cinco bandas, com deslocamentos e multiplicidades diferentes daquelas vistas para AP-9: um simpleto em δ_H 4,16 (H-21), um septeto em δ_H 4,12 (*J* = 6,0 Hz, H-3), um quarteto largo em δ_H 3,90 (*J* = 10,0 Hz, H-5 β), um triplo duplete em δ_H 3,64 (*J* = 12,5, 10,0 e 3,0 Hz, H-5 α) e um duplete de tripleto em δ_H 2,99 (*J* = 14,0 e 10,0 Hz, H-6 β). Por fim, foram vistos diversos multipletos entre 2,2 e 1,5 ppm, destacando-se um duplete em δ_H 1,58 (3H-14), associado aos hidrogênios de uma metila vizinha a um carbono metínico, pois eles acoplam com *J* = 6,0 Hz, característico de acoplamento vicinal.

No espectro de RMN ^{13}C -CPD de AP-8 (Figura 144, p. 155) foram visualizadas 19 linhas espectrais, e a comparação com o espectro DEPT 135 (Figura 144, p. 155) permitiu a observação de um padrão de hidrogenação dos carbonos diferente do observado para AP-9, identificando cinco sinais de carbonos não-hidrogenados (δ 151,6, 135,8, 65,6, 58,2 e 42,5), seis de carbonos mono-hidrogenados (δ 129,8, 123,4, 121,3, 112,8, 79,7 e 71,9), sete de carbonos metilênicos (δ 55,7, 44,7, 35,5, 32,1, 31,4, 29,6 e 26,9) e um de carbono metílico (δ 18,1) (Tabela 10, p. 152). Pelo espectro HSQC (Figura 145, p. 156), os carbonos metínicos em δ_{C} 79,7 e 71,9 foram correlacionados aos hidrogênios em δ_{H} 4,16 e 4,12, respectivamente, indicando estarem ligados a nitrogênio devido aos altos valores de deslocamentos, enquanto o carbono metílico em δ_{C} 18,1 foi correlacionado aos hidrogênios em δ_{H} 1,58. Visto que possuem a mesma fórmula molecular, constatou-se aqui que a diferença entre AP-8 e AP-9 está no arranjo de seus carbonos, pois AP-9 apresenta cinco carbonos mono-hidrogenados, nove carbonos metilênicos e não possui nenhum carbono metílico.

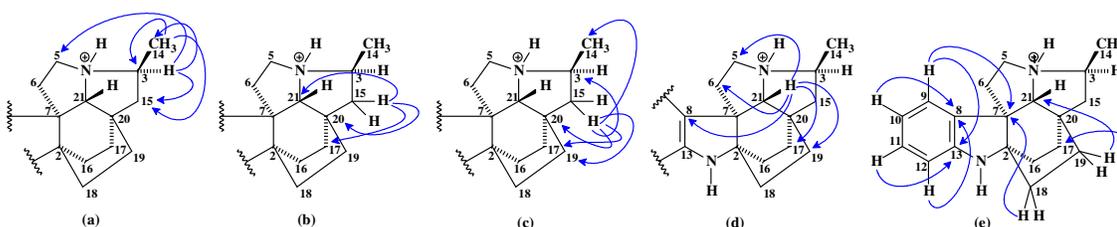
Através da análise do espectro COSY (Figura 146, p. 156), visualizou-se os acoplamentos escalares do hidrogênio em δ_{H} 4,12 (H-3) com os hidrogênios diastereotópicos em δ_{H} 2,09 (H-15 α) e 1,68 (H-15 β), e com os hidrogênios metílicos em δ_{H} 1,58 (3H-14), sugerindo que a metila estaria vizinha ao carbono metínico nitrogenado em δ_{C} 71,9 (C-3), e que este estaria vizinho também ao carbono metilênico em δ_{C} 44,7 (C-15), diretamente ligado aos hidrogênios em δ_{H} 2,09 e 1,68. Assim, justificaram-se as multiplicidades desses hidrogênios, exceto de H-3, pois para ser um septeto ele teria que acoplar com seis outros hidrogênios com constantes de acoplamento iguais, e isso somente seria justificado pelo átomo de nitrogênio está ligado a um hidrogênio, ou seja, encontrar-se protonado, fato este já esperado devido ao uso do TFA durante o isolamento. O espectro COSY também exibiu os acoplamentos vicinais dos hidrogênios em δ_{H} 3,90 (H-5 β) com 2,99 (H-6 β) e 1,79 (H-6 α); 3,64 (H-5 α) com 2,99 (H-6 β); 2,13 (H-17 β) com 1,98 (H-16b), e deste com 1,75 (H-17 α); 1,92 (H-19a) com 1,82 (H-18 β) e 1,53 (H-18 α).

Então, a partir das observações acima, aliada à comparação com os valores de RMN ^{13}C do composto AP-9, notou-se que os carbonos dos anéis C, E e F eram semelhantes, sugerindo que a mudança ocorreria no anel D e seria resultante da migração do carbono C-3 em direção ao carbono C-15, gerando a metila C-14 e um anel de cinco membros, como mostra a Figura 133 (p. 148).

Figura 133 - Estrutura proposta para o composto AP-8.



Para confirmar a estrutura utilizou-se o espectro HMBC (Figura 147, p. 157), que possibilitou visualizar as correlações ^1H - ^{13}C à longa distância. Justificando o rearranjo no anel D foram vistas as correlações entre o hidrogênio em δ_{H} 4,12 (H-3) com os carbonos em δ_{C} 55,7 (C-5) a $^3J_{\text{CH}}$, e 44,7 (C-15) e 18,1 (C-14) a $^2J_{\text{CH}}$; δ_{H} 1,58 (3H-14) com os carbonos em δ_{C} 71,9 (C-3) a $^2J_{\text{CH}}$, e 44,7 (C-15) a $^3J_{\text{CH}}$ (Figura 134, a); δ_{H} 2,09 (H-15 α) com os carbonos em δ_{C} 79,7 (C-21) e 29,6 (C-17) a $^3J_{\text{CH}}$, e 42,5 (C-20) a $^2J_{\text{CH}}$ (Figura 134, b); δ_{H} 1,68 (H-15 β) com os carbonos em δ_{C} 71,9 (C-3) e 42,5 (C-20) a $^2J_{\text{CH}}$, e 31,4 (C-19), 29,6 (C-17) e 18,1 (C-14) a $^3J_{\text{CH}}$ (Figura 134, c). Também foram importantes as correlações entre o hidrogênio em δ_{H} 4,16 (H-21) com os carbonos em δ_{C} 135,8 (C-8), 55,7 (C-5), 35,5 (C-6), 31,4 (C-19) e 29,6 (C-17) a $^3J_{\text{CH}}$, e 58,2 (C-7) e 42,5 (C-20) a $^2J_{\text{CH}}$ (Figura 134, d). Outras correlações para o restante da molécula foram mostradas no item “e” da Figura 134.

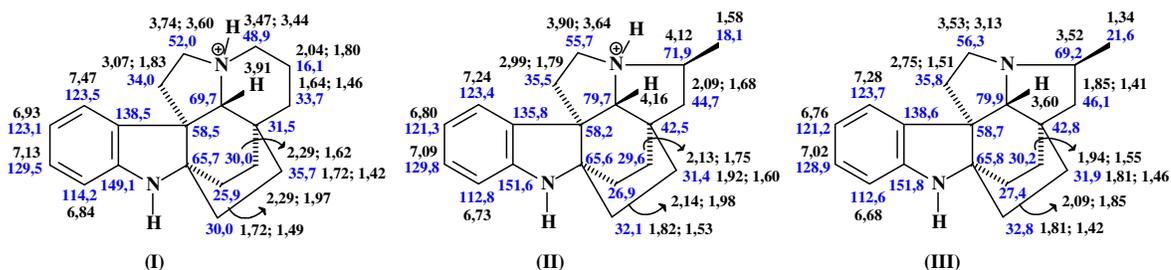
Figura 134 - Importantes correlações a duas e três ligações ^1H - ^{13}C observadas no espectro HMBC de AP-8.

O conjunto de todos os dados analisados permitiu confirmar a estrutura proposta para o composto AP-8 (Figura 133), identificado como um alcaloide de esqueleto plumerano rearranjado no anel D, cuja busca no “SciFinder” revelou o caráter inédito desse composto.

Visto que se trata de um novo alcaloide, e apesar da pequena quantidade obtida, o composto foi submetido a tratamento com uma solução aquosa básica de NH_4OH 10% para desprotoná-lo e obter-se os dados de RMN da molécula neutra (Figura 149, p. 159, a Figura 154, p. 162), indispensáveis para o registro na literatura. A estrutura III da Figura 135 (p. 149) mostra estes dados e a comparação com aqueles do composto protonado (II) permite concluir

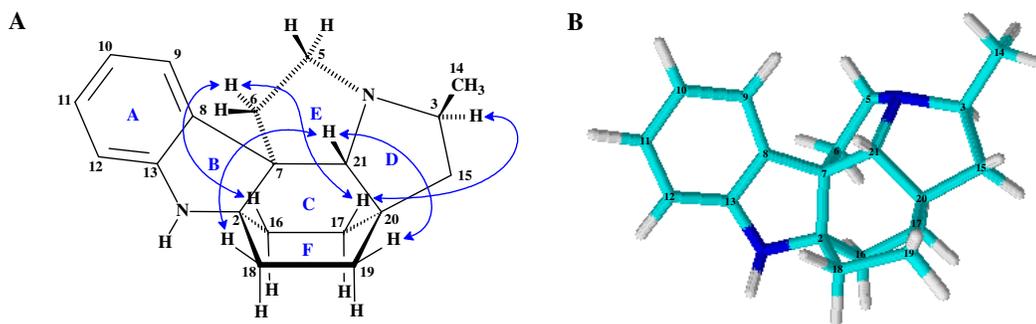
que é notável o efeito de desblindagem do nitrogênio protonado N-4 sobre os hidrogênios de carbonos vizinhos. Quanto aos deslocamentos químicos de carbono, as maiores diferenças foram visualizadas nos carbonos C-3 ($\Delta\delta = 2,7$), C-14 ($\Delta\delta = - 3,5$), C-15 ($\Delta\delta = - 1,4$) e C-8 ($\Delta\delta = - 2,8$), sendo a proteção deste último na molécula protonada explicada pela interação estérica entre os hidrogênios H-N-4 e H-9, causando uma tensão sobre o carbono C-8.

Figura 135 - Comparação dos deslocamentos químicos de RMN ¹H e ¹³C dos compostos AP-9 (I: CD₃OD, 500 e 125 MHz) e AP-8 protonado (II: CD₃OD, 500 e 75 MHz) e desprotonado (III: CD₃OD, 500 e 125 MHz).



O espectro NOESY de AP-8 desprotonado (Figura 155, p. 162) exibiu interações NOE entre os hidrogênios em δ_H 3,52 (H-3 α) com 1,94 (H-17 β); δ_H 2,75 (H-6 β) com 2,09 (H-16 β) e 1,94 (H-17 β); δ_H 3,60 (H-21) com 1,81 (H-19 β) e 1,42 (H-18 β). Como possui rotação específica negativa, ele pertence à série (-), ou seja, o hidrogênio 21 e a metila 14 têm configurações β , juntamente com os carbonos 18 e 19, enquanto os carbonos 5, 6, 16 e 17 possuem configurações α , fato condizente com os acoplamentos dipolares observados. O modelo molecular 3D, obtido pelo programa “ChemSketch”, mostra que a molécula mais estável possui os anéis C e F em conformações em barco e os anéis D e E em conformações em envelope (Figura 136).

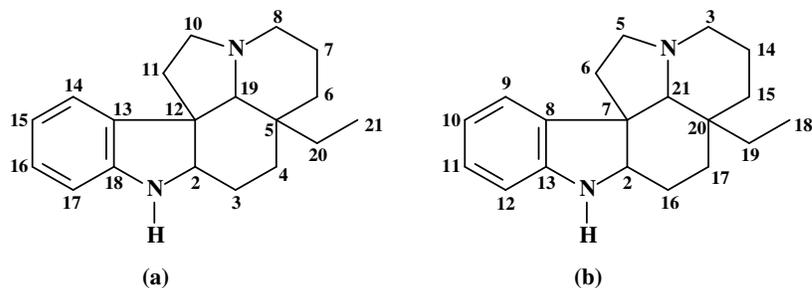
Figura 136 - Estrutura tridimensional do composto AP-8 desprotonado, mostrando setas que indicam os acoplamentos dipolares vistos no espectro NOESY (A), e modelo molecular 3D obtido no programa “ChemSketch” (B).



Já o espectro NOESY de AP-8 protonado (Figura 148, p. 158) mostrou acoplamentos dipolares entre os hidrogênios em δ_H 4,16 (H-21) com 1,82 (H-18 β) e 1,68 (H-15 β); δ_H 4,12 (H-3 α) com 3,64 (H-5 α); δ_H 2,99 (H-6 β) com 2,13 (H-17 β), possibilitando determinar as mesmas configurações acima citadas.

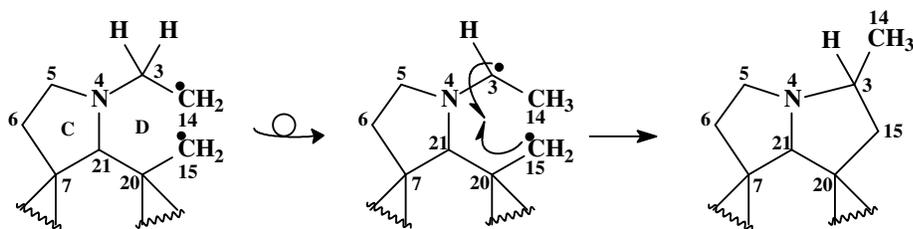
O “Dictionary of Natural Products” (BUCKINGHAM, 1994) mostra que existem dois sistemas de numeração de alcaloides de esqueleto plumerano, um baseado nas regras IUPAC e outro baseado na biogenética desses compostos (Figura 137). Portanto, de acordo com o sistema de numeração baseado na IUPAC, o composto AP-8 foi denominado (-)-(8*S*,12*S*,19*R*)-*rel*-(8 α H)-6(7 \rightarrow 8)-abeo-2,3,4,5,11,12-hexahidro-6*H*,13*aH*,3*a*,5*a*-etano-1*H*-indolizino[8,1-*cd*]carbazol. E, de acordo com o sistema de numeração baseado na biogenética, o qual é o adotado neste trabalho, o composto foi denominado (-)-(3*S*,7*S*,21*R*)-*rel*-(3 α H)-15(14 \rightarrow 3)-abeo-2,16,17,20,6,7-hexahidro-15*H*,8*aH*,16*a*,20*a*-etano-1*H*-indolizino[3,1-*cd*]carbazol, também denominado (3 α H)-15(14 \rightarrow 3)-abeo-aspidofractinina, ou ainda, de acordo com as regras IUPAC (2004), 3,15-ciclo-14,15-seco-3 α -aspidofractinina.

Figura 137 - Sistemas de numeração de alcaloides de esqueleto plumerano, baseados no sistema de nomenclatura IUPAC (a) e na biogenética desses alcaloides (b).

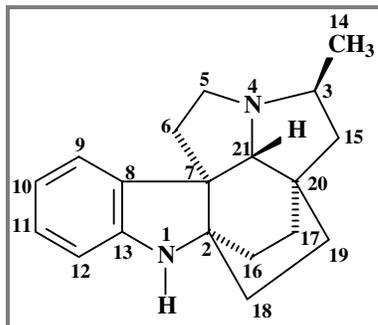


A Figura 138 mostra a proposta feita para justificar o rearranjo ocorrido no anel D do esqueleto plumerano que gerou o composto AP-8. O mecanismo proposto foi a formação radicalar de uma ligação entre os carbonos C-3 e C-15, que resultou na geração da metila C-14.

Figura 138 - Mecanismo hipotético para o rearranjo radicalar biogenético sugerido para a construção do anel D do alcaloide plumerano AP-8.



Dessa forma, o composto AP-8 foi caracterizado como um alcaloide inédito, com esqueleto plumerano rearranjado no anel D, denominado (-)-(3*S*,7*S*,21*R*)-*rel*-(3*αH*)-15(14→3)-abeo-2,16,17,20,6,7-hexahidro-15*H*,8*αH*,16*α*,20*α*-etano-1*H*-indolizino[3,1-*cd*]carbazol (Figura 139, p. 152).

Figura 139 - Estrutura do composto AP-8, um novo alcaloide denominado (-)-(3*S*,7*S*,21*R*)-*rel*-(3*α*H)-15(14→3)-abeo-2,16,17,20,6,7-hexahidro-15*H*,8*aH*,16*a*,20*a*-etano-1*H*-indolizino[3,1-*cd*]carbazol.

 Tabela 10 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C do composto AP-8 protonado (500 e 75 MHz, CD_3OD), e correlações a mais de uma ligação observadas no espectro HMBC.

AP-8				
	HSQC		HMBC	
	δ_{C}	δ_{H} (mult, <i>J</i> , H)	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
2	65,6	—	H-16b; H-16a; H-18 <i>α</i>	H-6 <i>α</i> ; H-17 <i>α</i>
3	71,9	4,12 (sept, 6,0 Hz, 1H)	3H-14; H-15 <i>β</i>	
5<i>β</i>	55,7	3,90 (ql, 10,0 Hz, 1H)	H-6 <i>α</i>	H-3; H-21
5<i>α</i>		3,64 (ddd, 12,5; 10,0; 3,0 Hz, 1H)		H-21
6<i>β</i>	35,5	2,99 (dt, 14,0; 10,0 Hz, 1H)		H-21
6<i>α</i>		1,79 (m, 1H)		
7	58,2	—	H-6 <i>α</i> ; H-21	H-9; H-16b; H-18 <i>α</i>
8	135,8	—		H-6 <i>α</i> ; H-10; H-12; H-21
9	123,4	7,24 (d, 7,5 Hz, 1H)	H-10	H-11
10	121,3	6,80 (t, 7,5 Hz, 1H)		H-12
11	129,8	7,09 (td, 7,5; 1,0 Hz, 1H)	H-10	H-9
12	112,8	6,73 (d, 7,5 Hz, 1H)		H-10
13	151,6	—		H-9; H-11
14	18,1	1,58 (d, 6,0 Hz, 3H)	H-3	H-15 <i>β</i>
15<i>α</i>	44,7	2,09 (dd, 12,5; 6,0 Hz, 1H)	H-3	3H-14
15<i>β</i>		1,68 (t, 12,5 Hz, 1H)		
16<i>a</i>	26,9	2,14 (m, 1H)		
16<i>b</i>		1,98 (m, 1H)		
17<i>β</i>	29,6	2,13 (m, 1H)	H-16b	H-15 <i>α</i> ; H-15 <i>β</i> ; H-19 <i>a</i> ; H-21
17<i>α</i>		1,75 (m, 1H)		
18<i>β</i>	32,1	1,82 (m, 1H)	H-19 <i>a</i>	H-16b
18<i>α</i>		1,53 (m, 1H)		
19<i>a</i>	31,4	1,92 (m, 1H)	H-18 <i>α</i>	H-15 <i>β</i> ; H-17 <i>α</i> ; H-21
19<i>b</i>		1,60 (m, 1H)		
20	42,5	—	H-15 <i>α</i> ; H-17 <i>α</i> ; H-19 <i>a</i> ; H-21	H-18 <i>α</i>
21	79,7	4,16 (s, 1H)		H-15 <i>α</i> ; H-17 <i>α</i> ; H-19 <i>a</i>

Figura 140 - Espectro de massa de alta resolução de AP-8, obtido por ESI (A), e espectro de massa EM/EM obtido a partir do íon precursor em m/z 281,00 (B).

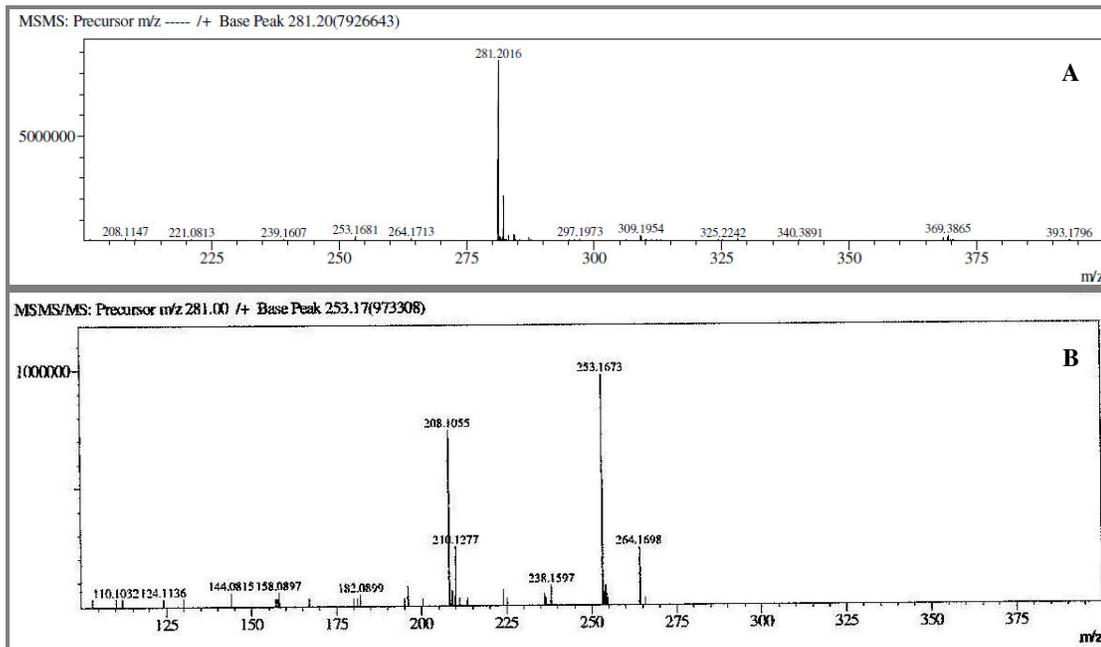


Figura 141 - Espectro de absorção na região do infravermelho de AP-8 (obtido no suporte UATR).

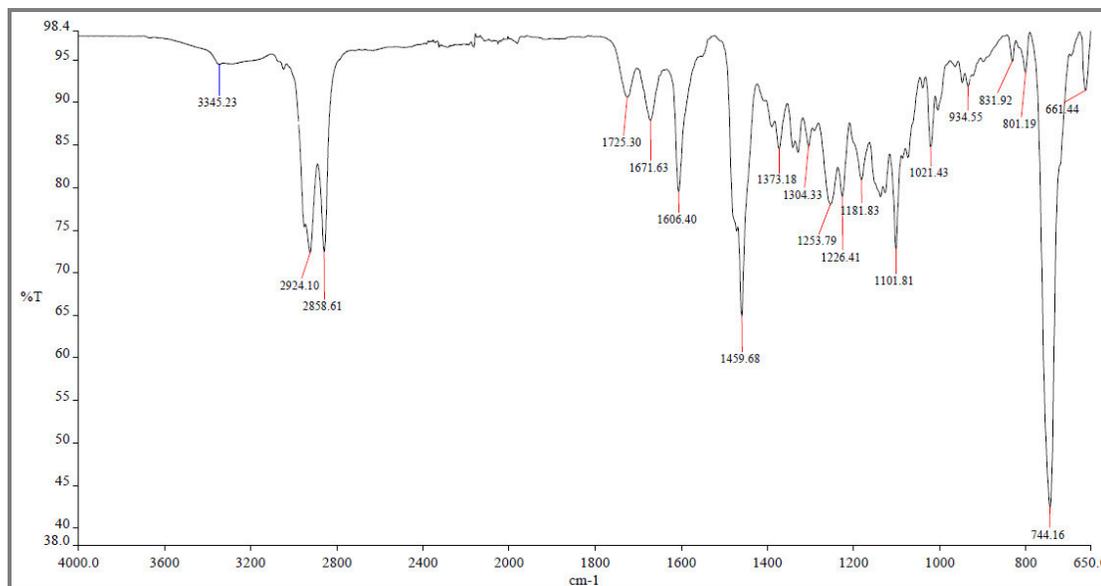


Figura 142 - Espectro de RMN ¹H de AP-8 protonado (CD₃OD, 500 MHz), com detalhe para a expansão entre 7,3 e 6,7 ppm (A), e expansão da região entre 4,2 e 2,9 ppm (B).

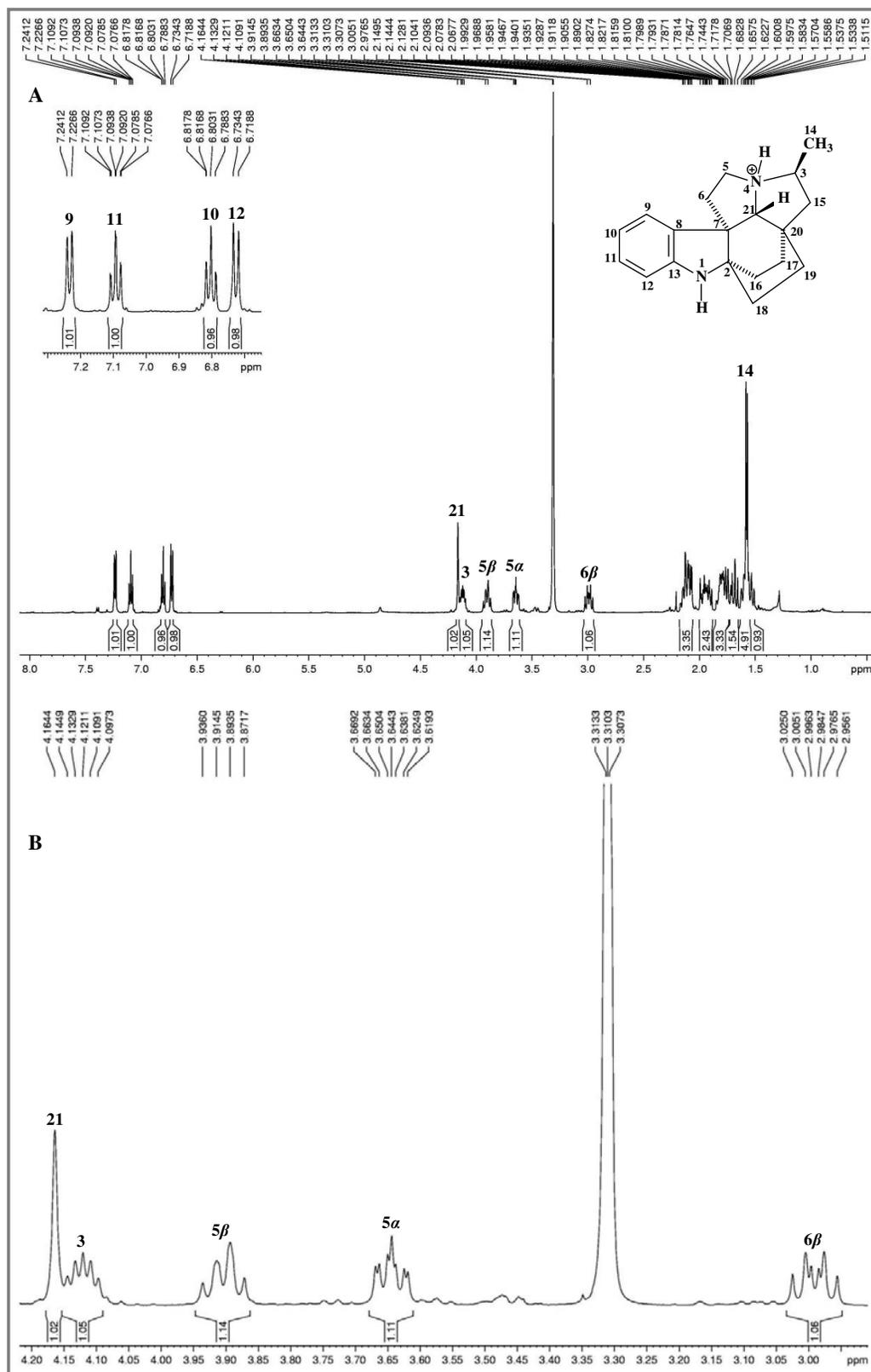


Figura 143 - Expansão da região entre 2,2 e 1,5 ppm do espectro de RMN ¹H de AP-8 protonado (CD₃OD, 500 MHz).

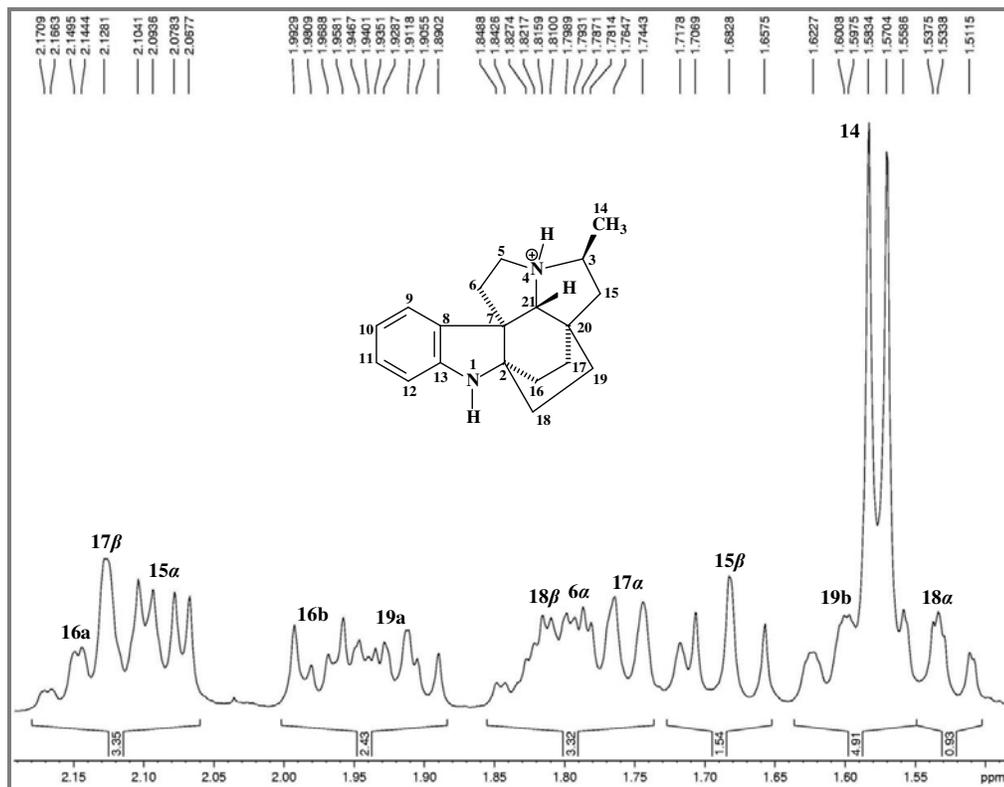


Figura 144 - Espectro de RMN ¹³C-CPD (A) e DEPT 135 (B) de AP-8 protonado (CD₃OD, 75 MHz).

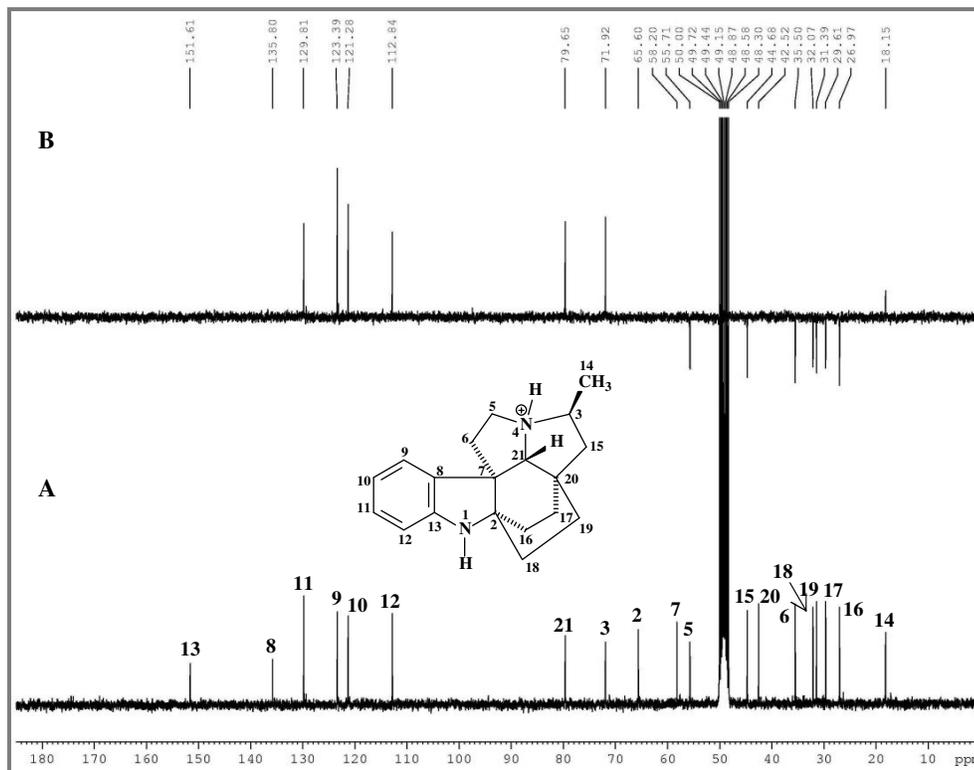


Figura 145 - Espectro de RMN 2D ¹H,¹³C-HSQC de AP-8 protonado (CD₃OD, 500 x 125 MHz) e expansão.

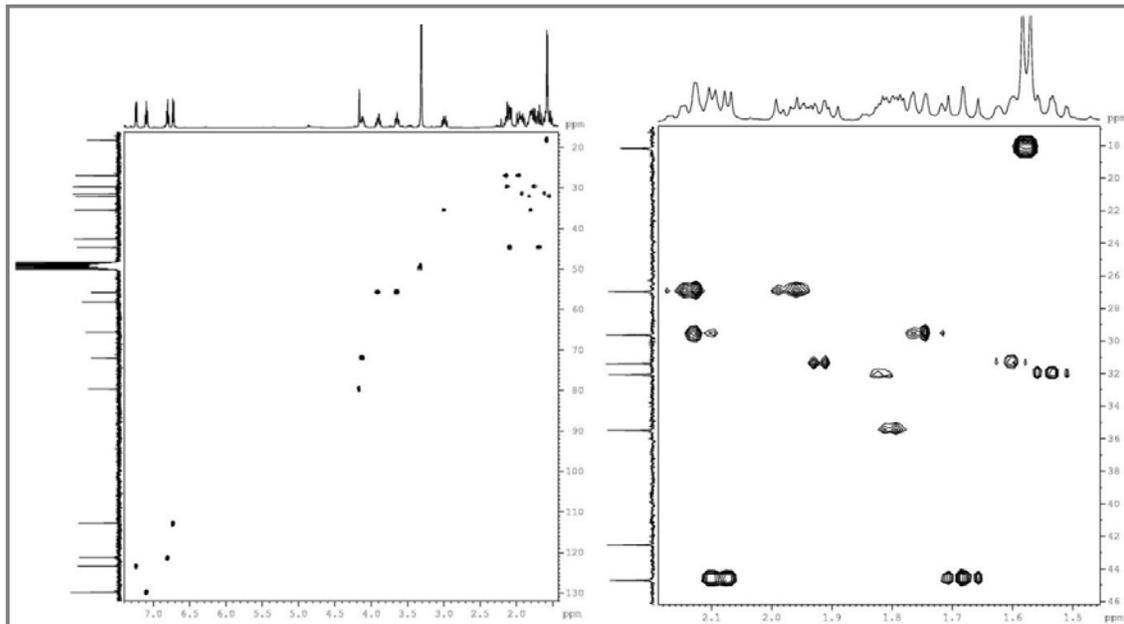


Figura 146 - Espectro de RMN 2D ¹H,¹H-COSY de AP-8 protonado (CD₃OD, 500 x 500 MHz) e expansão.

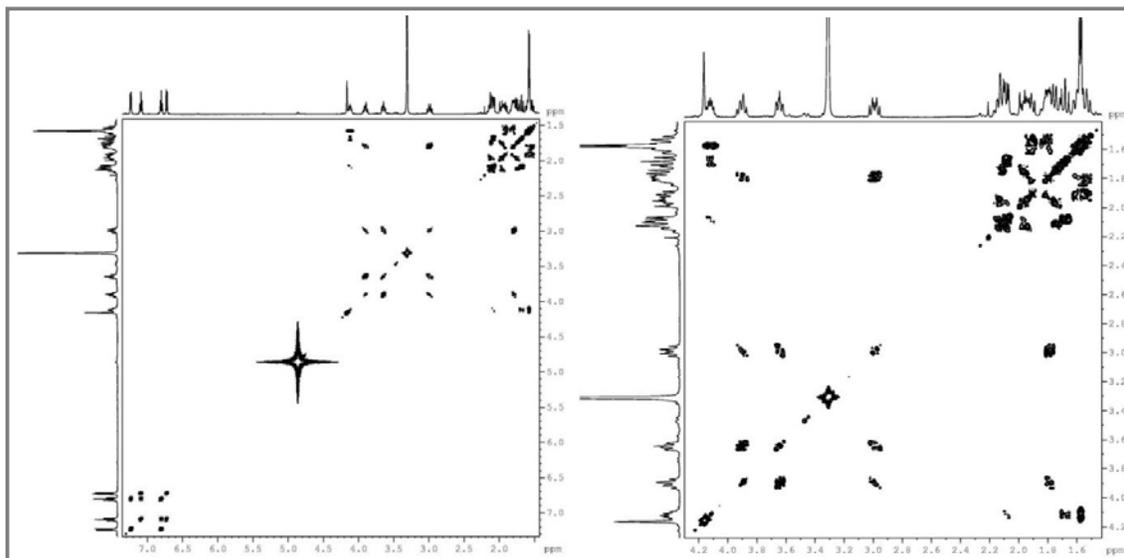


Figura 147 - Espectro de RMN 2D ¹H, ¹³C-HMBC de AP-8 protonado (CD₃OD, 500 x 125 MHz) e expansões.

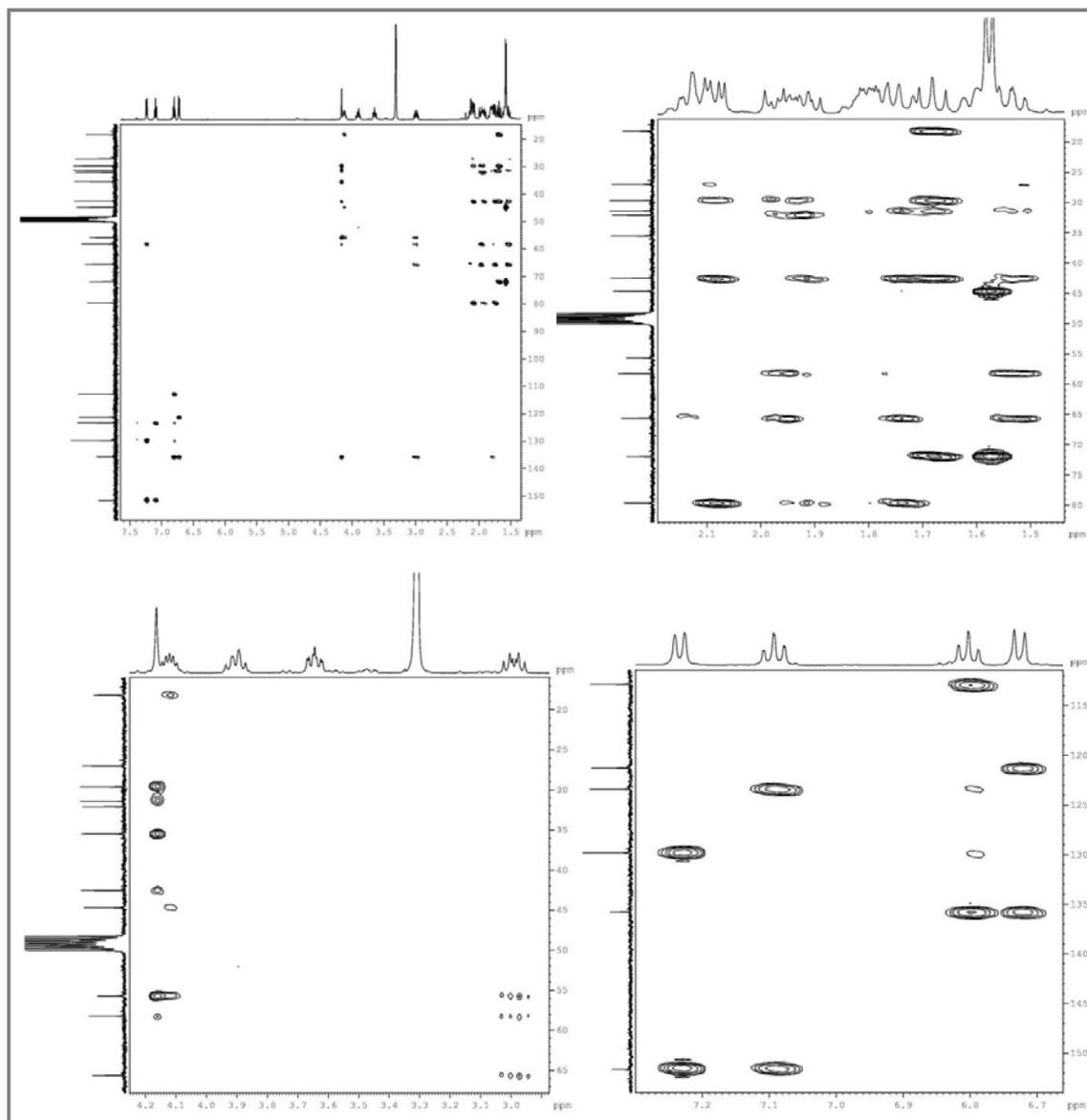


Figura 148 - Espectro de RMN 2D ¹H,¹H-NOESY de AP-8 protonado (CD₃OD, 500 x 500 MHz) e expansão.

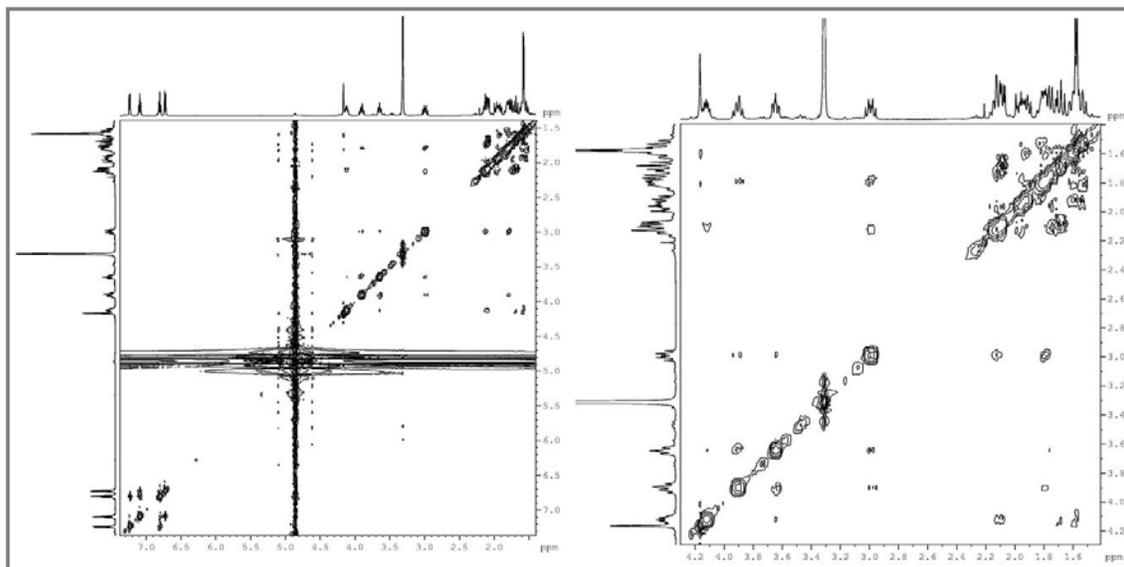


Figura 149 - Espectro de RMN ¹H de AP-8 desprotonado (CD₃OD, 500 MHz), com detalhe para a expansão entre 7,3 e 6,6 ppm (A), e expansão da região entre 3,7 e 2,7 ppm (B).

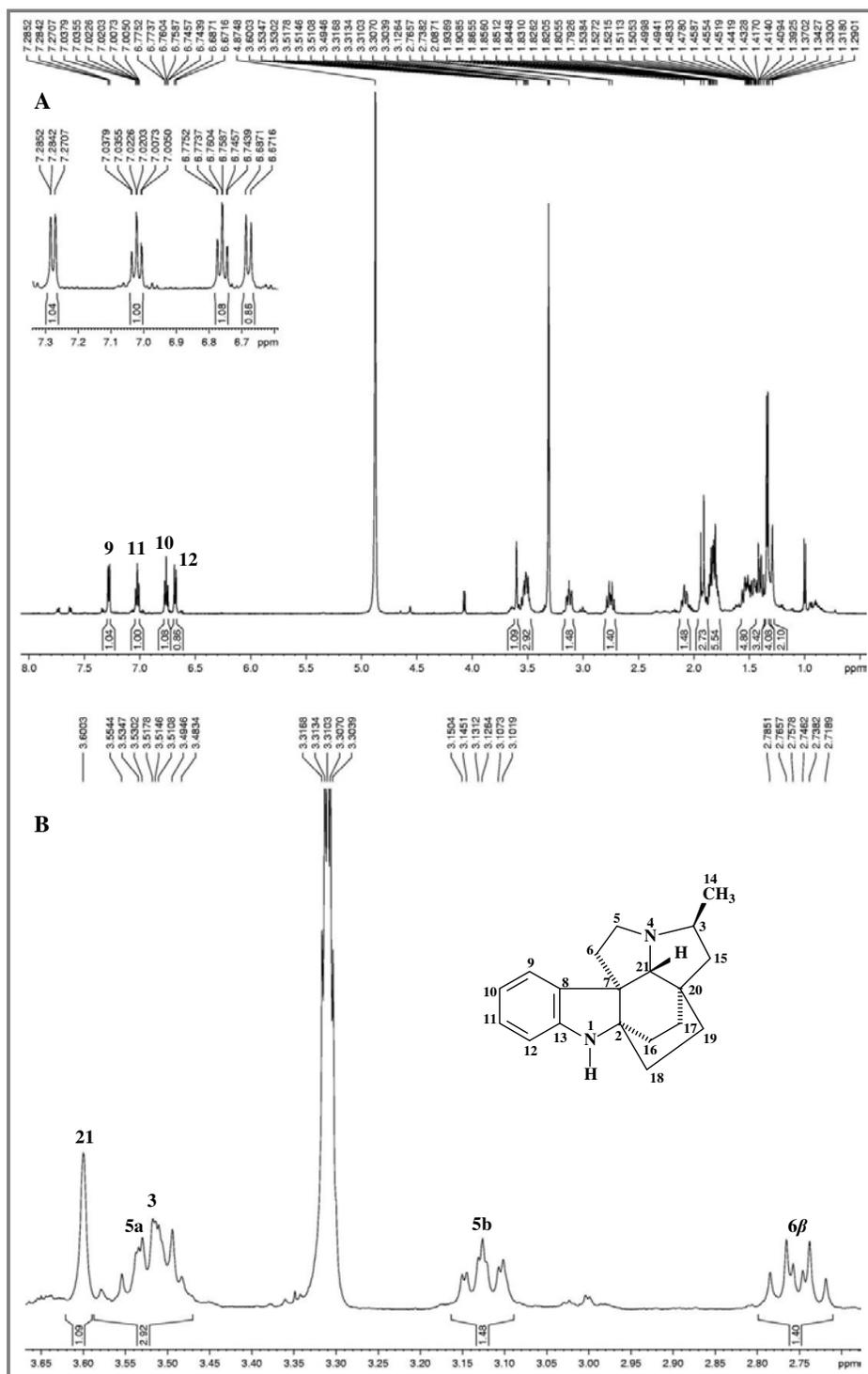


Figura 150 - Expansão da região entre 2,2 e 1,2 ppm do espectro de RMN ¹H de AP-8 desprotonado (CD₃OD, 500 MHz).

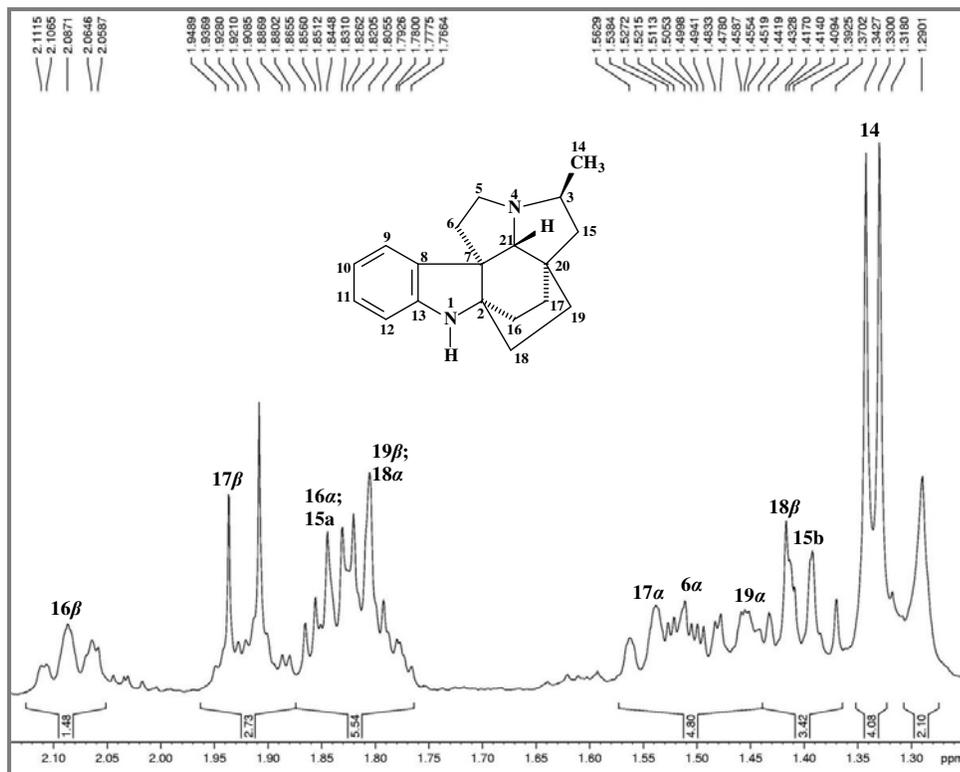


Figura 151 - Espectro de RMN ¹³C-CPD (A) e DEPT 135 (B) de AP-8 desprotonado (CD₃OD, 125 MHz).

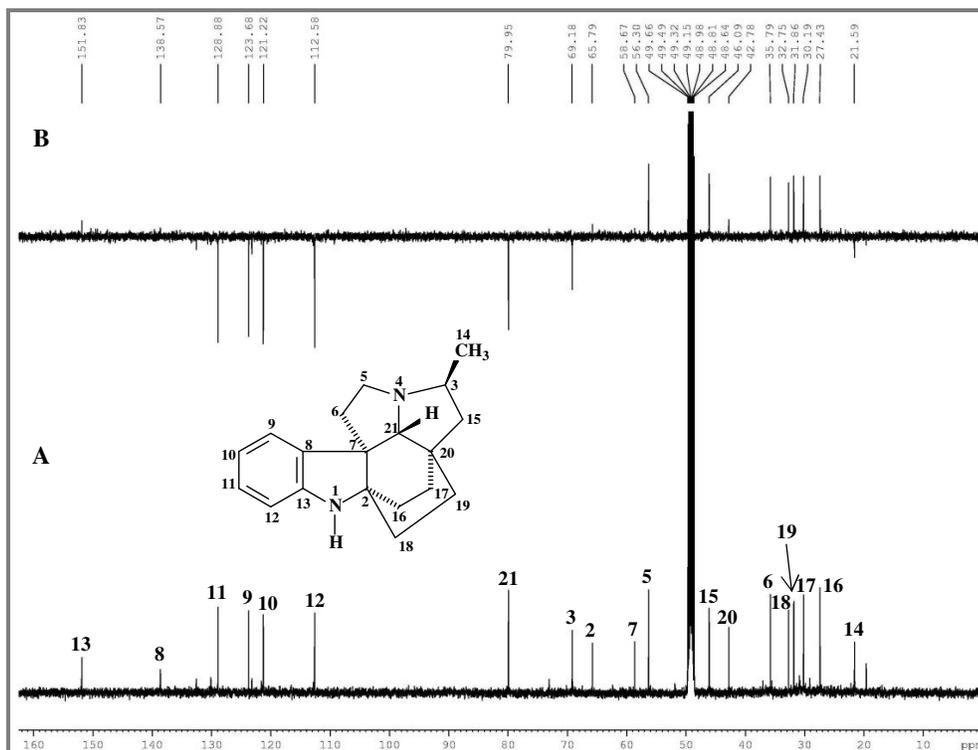


Figura 152 - Espectro de RMN 2D ¹H,¹³C-HSQC de AP-8 desprotonado (CD₃OD, 500 x 125 MHz) e expansão.

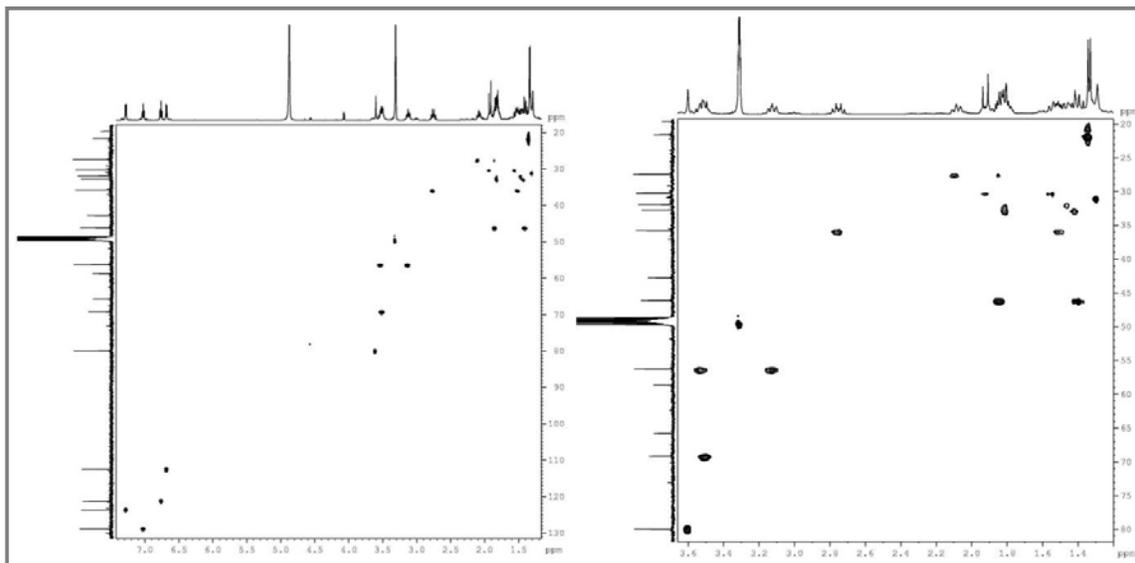


Figura 153 - Espectro de RMN 2D ¹H,¹H-COSY de AP-8 desprotonado (CD₃OD, 500 x 500 MHz) e expansão.

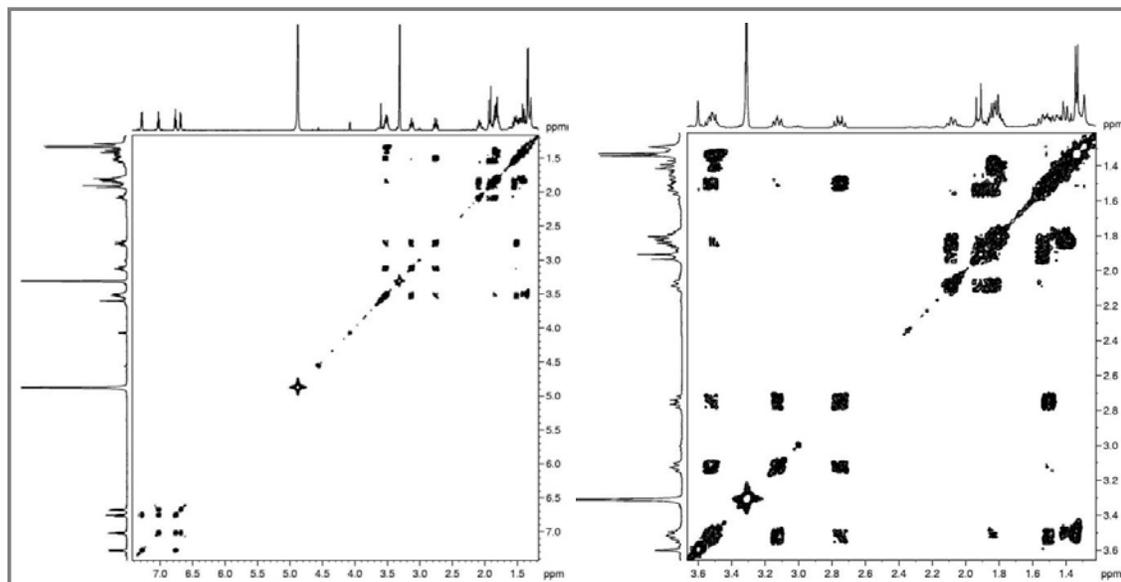


Figura 154 - Espectro de RMN 2D $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HMBC de AP-8 desprotonado (CD_3OD , 500 x 125 MHz) e expansões.

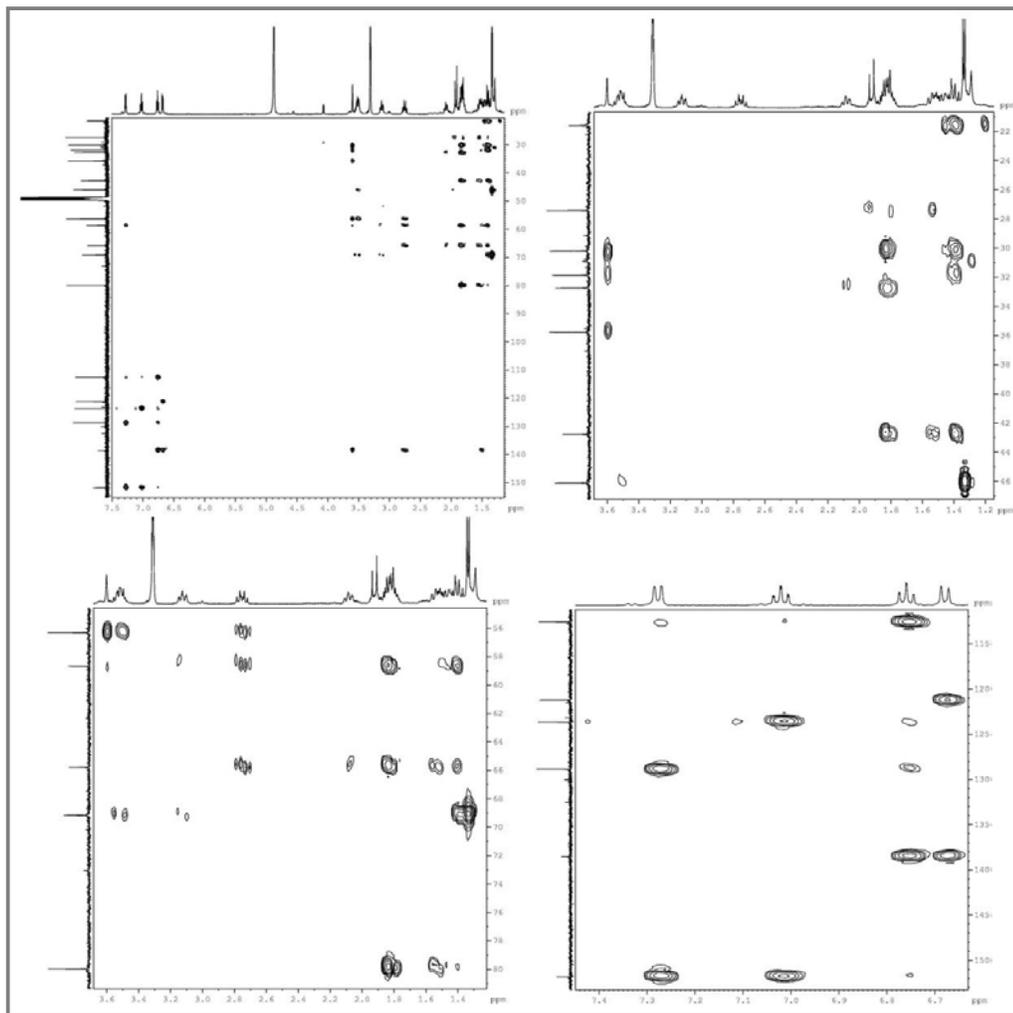
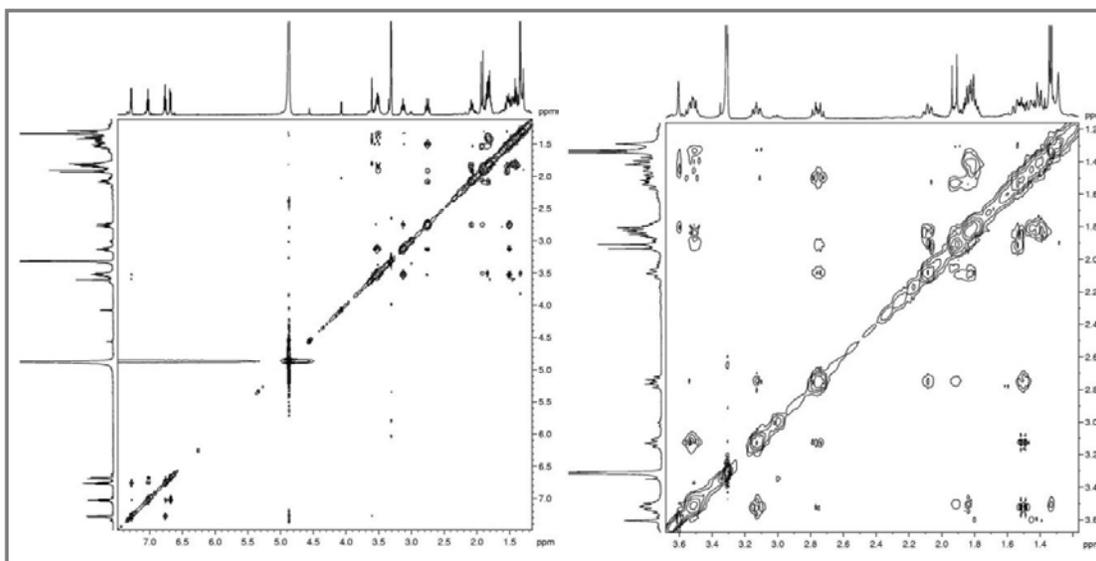


Figura 155 - Espectro de RMN 2D $^1\text{H},^1\text{H}$ -NOESY de AP-8 desprotonado (CD_3OD , 500 x 500 MHz) e expansão.



4.8 Determinação estrutural de AP-11

O composto AP-11 foi obtido a partir de partição líquido-líquido da fração APSE-Aq em solução aquosa saturada de NaCl, seguido por diversos fracionamentos cromatográficos em coluna de sílica da fração obtida por partição com CH₂Cl₂ (ver Parte Experimental, p. 230). Ele apresentou-se como um sólido amorfo marrom e exibiu ponto de fusão 221,0-223,5 °C e $[\alpha]_D^{20} = -15,7^\circ$ (*c* 0,43, MeOH) { $[\alpha]_D^{22} = +15^\circ$; *c* 0,43, H₂O (HU; ZHU; HESSE, 1989)}.

O espectro de massa de alta resolução de AP-11 (Figura 161, p. 168), obtido por ESI em modo positivo, exibiu o pico do íon molecular M⁺ em *m/z* 367,2072 (calculada 367,2021), compatível com a fórmula molecular C₂₂H₂₇N₂O₃, cujo IDH é 11. O espectro de massa sequencial mostrou o pico base em *m/z* 180,1055 [M – 187]⁺.

O espectro na região do infravermelho de AP-11 (Figura 162, p. 168) mostrou uma banda larga centrada em 3343 cm⁻¹, característica de ligação O-H e/ou N-H. Também foi observada uma banda de absorção em 2947 cm⁻¹, característica de deformação axial de ligação C-H de carbono sp³, uma banda em 1731 cm⁻¹, atribuída à deformação axial de ligação C=O de éster, e uma banda em 1637 cm⁻¹, atribuída à deformação axial de ligação C=C. A natureza aromática do composto foi sugerida pelas bandas esqueléticas observadas em 1623 e 1454 cm⁻¹, somadas à banda em 744 cm⁻¹, típica de deformação angular fora do plano de ligação C-H de anel aromático. As bandas em 1237 e 1211 cm⁻¹ foram atribuídas à presença de ligações C-N, e as bandas em 1102, 1074 e 1045 cm⁻¹ foram atribuídas à presença de ligações C-O.

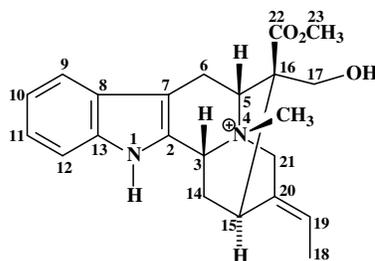
O espectro de RMN ¹H de AP-11 (Figura 163 e Figura 164, p. 169) apresentou um perfil diferente dos espectros dos alcaloides determinados anteriormente. Na região de hidrogênios ligados a carbonos aromáticos foram vistos quatro sinais de hidrogênios contíguos, compatíveis com o anel benzênico não substituído de um sistema indólico: dois dupletos em δ_H 7,55 (H-9) e 7,41 (H-12), e dois tripletos de dupletos em δ_H 7,21 (H-11) e 7,11 (H-10), todos acoplando entre si com constantes de acoplamento *orto* de 8,0 Hz e *meta* de 1,0 Hz. Observou-se um quarteto em δ_H 5,50 (*J* = 7,0 Hz, H-19), característico de hidrogênio olefínico, e um dupletos de tripleto em δ_H 1,70 (*J* = 7,0; 2,0 Hz, 3H-18), os quais apresentaram a mesma constante de acoplamento vicinal, sugerindo a proximidade de ambos. Na região de hidrogênios ligados a carbonos nitrogenados ou oxigenados observou-se um dupletos em δ_H 5,02 (*J* = 6,5 Hz, H-5), um dupletos largo em δ_H 4,92 (*J* = 11,0 Hz, H-3), além de pares de hidrogênios com mesma constante de acoplamento geminal em δ_H 4,47 (d, *J* = 16,2 Hz, H-

21 α) e 4,30 (d, $J = 16,2$ Hz, H-21 β), em δ_{H} 3,74 (d, $J = 10,8$ Hz, H-17 α) e 3,64 (d, $J = 10,8$ Hz, H-17 β), em δ_{H} 2,46 (ddd, 13,6; 11,0; 2,2 Hz, H-14 β) e 2,14 (dt, 13,6; 3,5 Hz, H-14 α), e em δ_{H} 3,86 (d, $J = 18,0$ Hz, H-6 β) e 3,37 (dd, $J = 18,0$; 6,5 Hz, H-6 α), cujos acoplamentos foram vistos no espectro COSY (Figura 165, p. 170). Dois simpletos, cada um com integração para três hidrogênios, foram vistos em δ_{H} 3,77 (3H-23) e 3,24.

O espectro de RMN ^{13}C -CPD (Figura 166, p. 170) mostrou 22 linhas espectrais, em concordância com a fórmula molecular estabelecida anteriormente. A análise do espectro APT (Figura 166, p. 170) permitiu determinar o padrão de hidrogenação dos carbonos, identificando-se sete sinais de carbonos não-hidrogenados, oito de carbonos mono-hidrogenados, quatro de carbonos metilênicos e três de carbonos metílicos (Tabela 11, p. 167). Um sinal de carbonila em δ_{C} 174,4 (C-22), associado com um sinal de metoxila em δ_{C} 53,5 (C-23), estabeleceram o grupo éster sugerido pelo infravermelho, indicando, assim, que a metila em δ_{C} 50,1 estaria ligada a um átomo de nitrogênio, justificando sua desproteção. O sinal em δ_{C} 120,9 (C-19), correlacionado no espectro HSQC (Figura 167, p.171) com o hidrogênio em δ_{H} 5,50 (H-19), sugeriu uma dupla ligação tri-substituída no composto. Os sinais de carbonos em δ_{C} 112,9 (C-12), 124,2 (C-11), 121,2 (C-10) e 119,9 (C-9), diretamente ligados aos hidrogênios em δ_{H} 7,41 (H-12), 7,21 (H-11), 7,11 (H-10) e 7,55 (H-9), respectivamente, foram atribuídos aos carbonos mono-hidrogenados do sistema indólico.

Os dados expostos, aliado à busca no “SciFinder”, possibilitaram propor a estrutura do alcaloide *N*-metilacuamidina (Figura 156) para AP-11, a qual foi confirmada após análise do espectro HMBC.

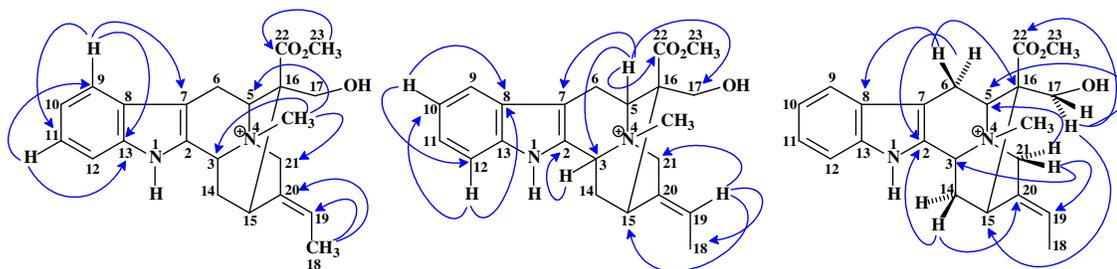
Figura 156 - Estrutura do alcaloide *N*-metilacuamidina.



O espectro HMBC (Figura 168, p. 172) mostrou correlações a $^3J_{\text{CH}}$ entre os hidrogênios H-9 (δ_{H} 7,55) com os carbonos C-13 (δ_{C} 138,8), C-11 (δ_{C} 124,2) e C-7 (δ_{C} 103,3); H-11 (δ_{H} 7,21) com os carbonos C-13 e C-9 (δ_{C} 119,9); H-10 (δ_{H} 7,11) com os carbonos C-12 (δ_{C} 112,9) e C-8 (δ_{C} 126,5); H-12 (δ_{H} 7,41) com os carbonos C-10 (δ_{C} 121,2) e C-8, que

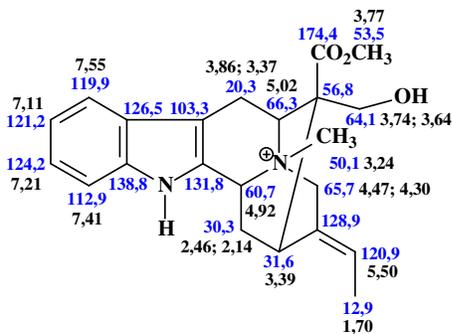
ratificaram o sistema indólico. Os hidrogênios da metila ligada a nitrogênio, em δ_H 3,24, correlacionaram a $^3J_{CH}$ com os carbonos C-21 (δ_C 65,7), C-5 (δ_C 66,3) e C-3 (δ_C 60,7). A dupla ligação tri-substituída foi ratificada pelas correlações dos hidrogênios 3H-18 (δ_H 1,70) com os carbonos da dupla C-20 (δ_C 128,9) e C-19 (δ_C 120,9), e do hidrogênio H-19 (δ_H 5,50) com os carbonos C-21 (δ_C 65,7), C-15 (δ_C 31,6) e C-18 (δ_C 12,9). A posição do grupo éster no carbono C-16 foi confirmada pelas correlações a $^3J_{CH}$ dos hidrogênios H-5 (δ_H 5,02), H-17 α (δ_H 3,74), H-17 β (δ_H 3,64) e 3H-23 (δ_H 3,77) com a carbonila C-22 (δ_C 174,4). A Figura 157 mostra essas e outras importantes correlações vistas no espectro HMBC.

Figura 157 - Estruturas com setas mostrando importantes correlações 1H - ^{13}C à longa distância, observadas no espectro HMBC de AP-11.



Os dois relatos da literatura sobre os dados de RMN 1H e ^{13}C do alcaloide *N*-metilacuamidina (HU; ZHU; HESSE, 1989; YIN *et al.*, 2010) não trazem nenhum assinalamento dos valores de deslocamentos. Interessantemente, os deslocamentos químicos diferem de aproximadamente 2 ppm, e a comparação dos dados espectrais de AP-11 (Figura 158) mostraram maior compatibilidade com aqueles relatados por Hu, Zhu e Hesse (1989).

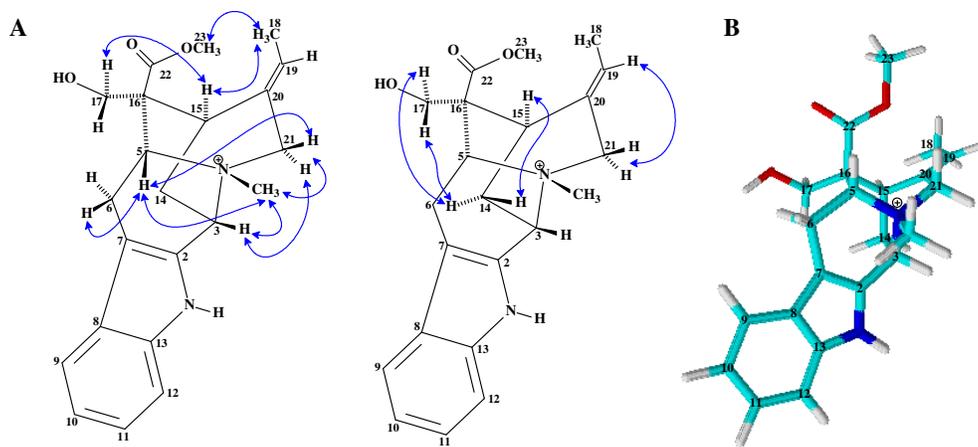
Figura 158 - Assinalamento dos deslocamentos químicos de RMN 1H e ^{13}C do composto AP-11 (CD_3OD , 500 e 125 MHz).



O espectro NOESY de AP-11 (Figura 169, p. 173) mostrou acoplamentos que foram concludentes na determinação da estereoquímica relativa do composto. Foram

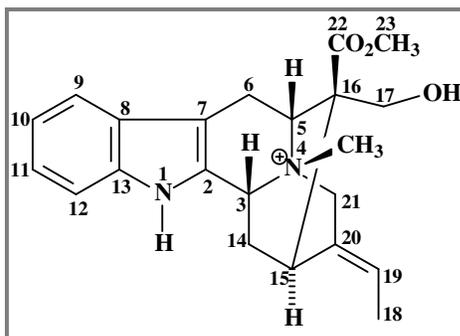
observadas interações espaciais entre os hidrogênios H-5 (δ_H 5,02), H-3 (δ_H 4,92), H-21 α (δ_H 4,47) e H-21 β (δ_H 4,30) com os hidrogênios da metila nitrogenada em δ_H 3,24; H-5 com os hidrogênios H-6 β (δ_H 2,46) e H-21 β ; H-3 com o hidrogênio H-21 α ; H-19 (δ_H 5,50) com os hidrogênios H-21 α e H-21 β ; H-17 α (δ_H 3,74) com os hidrogênios H-15 (δ_H 3,39) e H-14 α (δ_H 2,14); H-17 β (δ_H 3,64) com o hidrogênio H-14 α ; H-15 com o hidrogênio H-14 β (δ_H 2,46); 3H-23 (δ_H 3,77) com os hidrogênios 3H-18 (Figura 159). Todos esses acoplamentos permitiram determinar as configurações β para os hidrogênios H-3, H-5 e N-CH₃, assim como para o grupo éster, e a configuração α para o hidrogênio H-15. A geometria *E* da dupla ligação foi ratificada pela interação dipolar entre o hidrogênio H-15 (δ_H 3,40) e os hidrogênios 3H-18 (δ_H 1,70).

Figura 159 - Estruturas com setas duplas mostrando os acoplamentos dipolares observados no espectro NOESY do composto AP-11 (A), e modelo molecular 3D obtido no programa “ChemSketch” (B).



O conjunto de todos os dados, aliado à comparação com dados da literatura, possibilitou caracterizar AP-11 como o alcaloide quaternário de esqueleto tetra-hidro- β -carbolínico denominado 17-hidroxi-16-(metoxicarbonila)-4-metil-sarpaganio, conhecido como macusina A ou *N*-metilacuamidina (Figura 160, p. 167). Embora já isolado das cascas do caule de *Aspidosperma spegazzinii* (ORAZI; CORRAL; STOICHEVICH, 1966) e *Alstonia angustifolia* (HU; ZHU; HESSE, 1989), AP-11 revelou-se inédito em *Aspidosperma pyriformium*. Neste caso, trata-se do enantiômero (-), devido ao valor da rotação específica ser oposto àquele registrado por Hu e colaboradores (1989).

Figura 160 - Estrutura de AP-11, identificado como o alcaloide quaternário (-)-N-metilacumidina.


 Tabela 11 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C de AP-11 (500 e 125 MHz, CD_3OD), e correlações a mais de uma ligação observadas no espectro HMBC.

AP-11				
	HSQC		HMBC	
	δ_{C}	δ_{H} (mult, J, H)	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
2	131,8	—	H-3	H-6 β ; H-6 α ; H-14 β
3	60,7	4,92 (dl, 11,0 Hz, 1H)		H-5; H-21 β ; N-CH ₃
5	66,3	5,02 (d, 6,5 Hz, 1H)	H-6 β ; H-6 α	H-17 α ; H-17 β ; H-21 α ; N-CH ₃
6β	20,3	3,86 (d, 18,0 Hz, 1H)	H-5	
6α		3,37 (dd, 18,0; 6,5 Hz, 1H)		
7	103,3	—	H-6 β ; H-6 α	H-5; H-9
8	126,5	—		H-6 β ; H-10; H-12
9	119,9	7,55 (d, 8,0 Hz, 1H)		H-11
10	121,2	7,11 (td, 8,0; 1,0 Hz, 1H)		H-12
11	124,2	7,21 (td, 8,0; 1,0 Hz, 1H)		H-9
12	112,9	7,41 (d, 8,0 Hz, 1H)		H-10
13	138,8	—		H-9; H-11
14β	30,3	2,46 (ddd, 13,6; 11,0; 2,2 Hz, 1H)		
14α		2,14 (dt, 13,6; 3,5 Hz, 1H)		
15	31,6	3,40 (m, 1H)	H-14 β	H-17 α ; H-19
16	56,8	—	H-5; H-17 α ; H-17 β	H-6 β ; H-6 α ; H-14 β
17α	64,1	3,74 (d, 10,8 Hz, 1H)		H-5
17β		3,64 (d, 10,8 Hz, 1H)		
18	12,9	1,70 (dt, 7,0; 2,0 Hz, 3H)	H-19	
19	120,9	5,50 (q, 7,0 Hz, 1H)	3H-18	H-21 β
20	128,9	—	H-21 α ; H-21 β	H-14 β ; 3H-18
21α	65,7	4,47 (d, 16,2 Hz, 1H)		H-19; N-CH ₃
21β		4,30 (d, 16,2 Hz, 1H)		
22	174,4	—		H-5; H-17 α ; H-17 β ; 3H-23
23	53,5	3,77 (s, 3H)		
N-CH₃	50,1	3,24 (s, 3H)		

Figura 161 - Espectro de massa de alta resolução de AP-11, obtido por ESI no modo positivo (A), e espectro de massa EM/EM obtido a partir do íon precursor em m/z 367,00 (B).

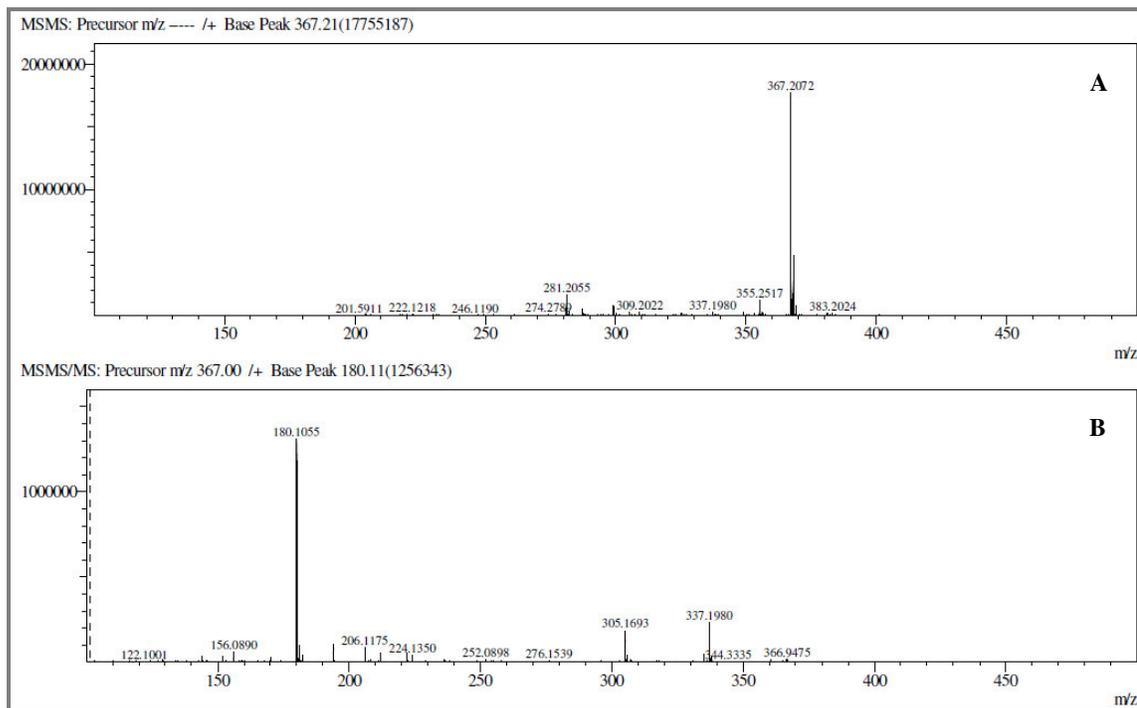


Figura 162 - Espectro de absorção na região do infravermelho de AP-11 (obtido no suporte UATR).

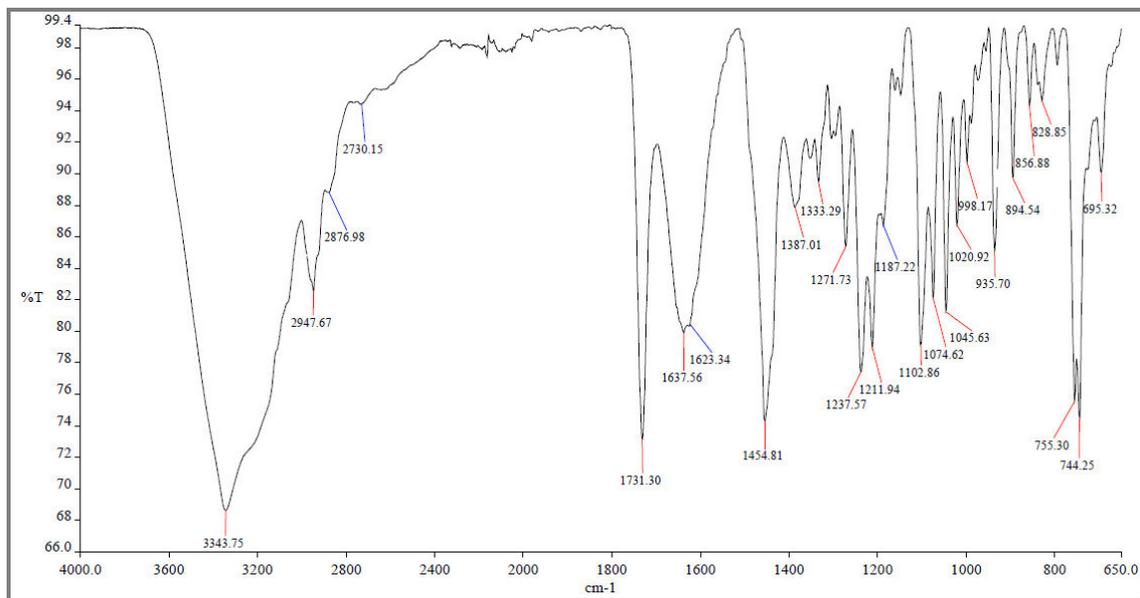


Figura 163- Espectro de RMN ¹H de AP-11 (CD₃OD, 500 MHz).

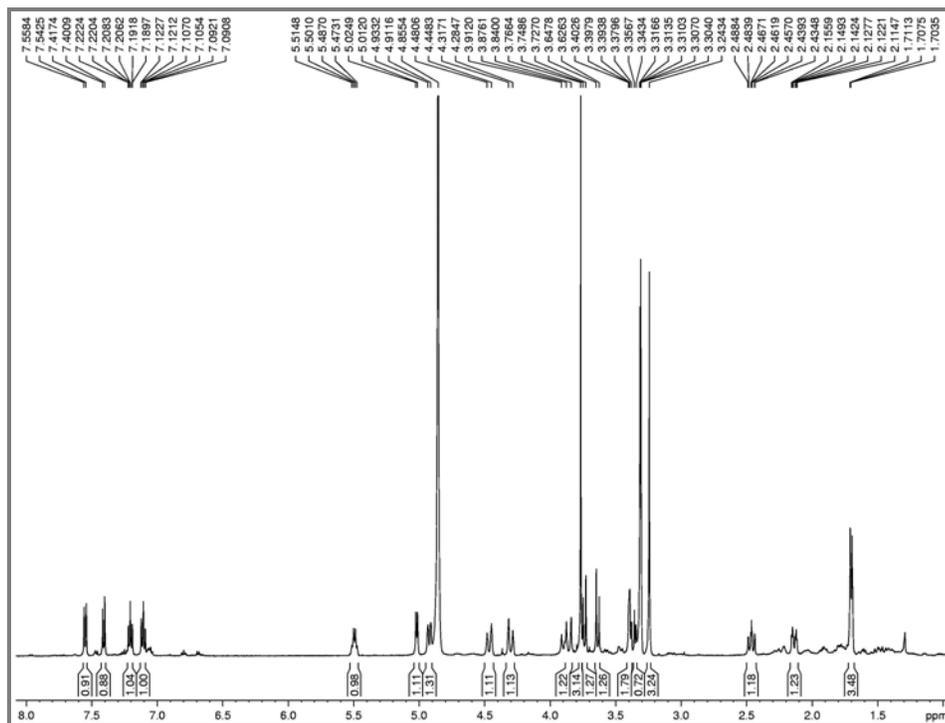


Figura 164 - Expansões do espectro de RMN ¹H de AP-11 (CD₃OD, 500 MHz).

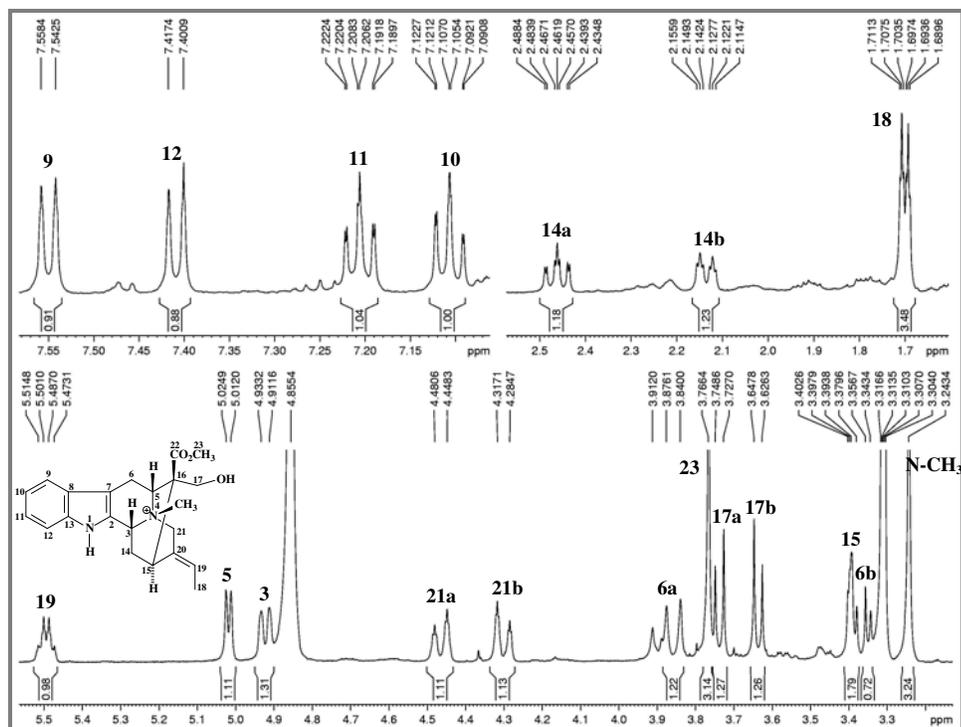


Figura 165 - Espectro de RMN 2D $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY de AP-11 (CD_3OD , 500 x 500 MHz) e expansão.

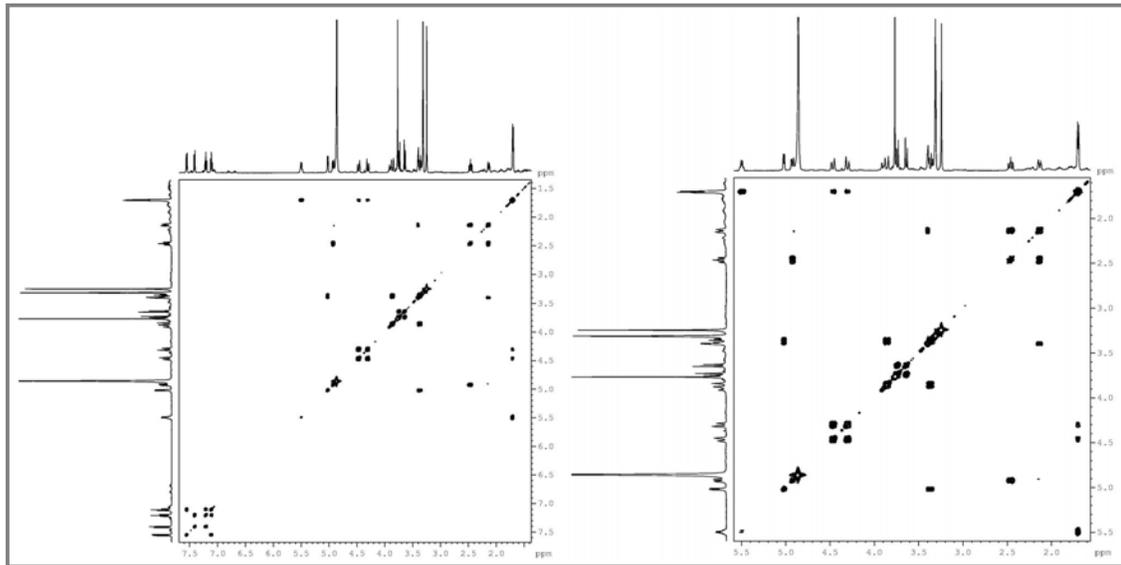


Figura 166 - Espectro de RMN ^{13}C -CPD (A) e APT (B) de AP-11 (CD_3OD , 125 MHz).

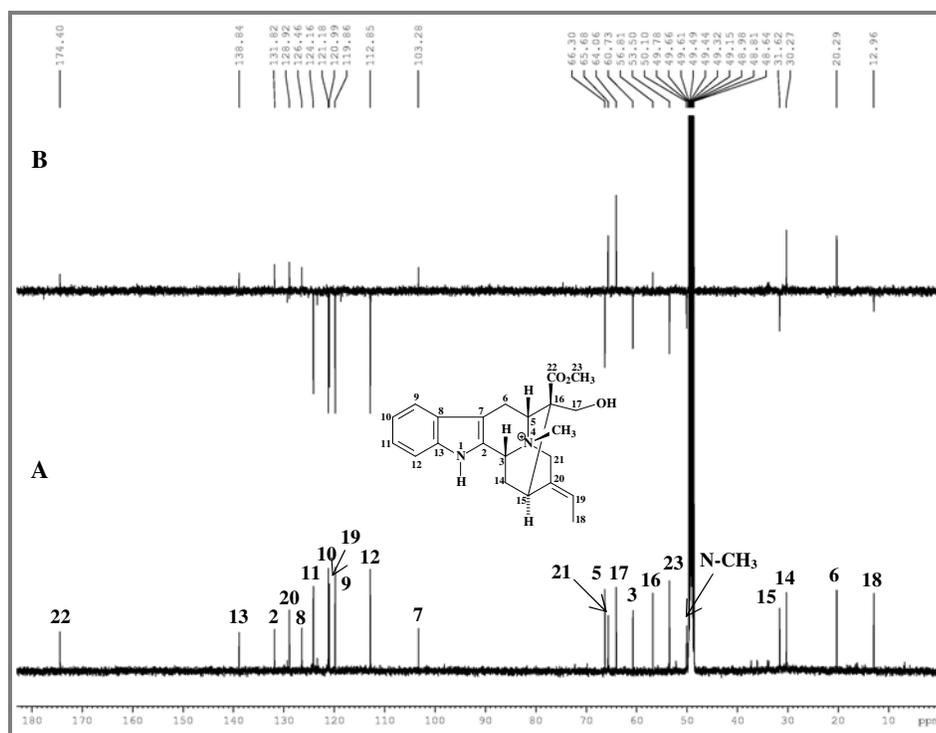


Figura 167 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC de AP-11 (CD_3OD , 500 x 125 MHz) e expansão.

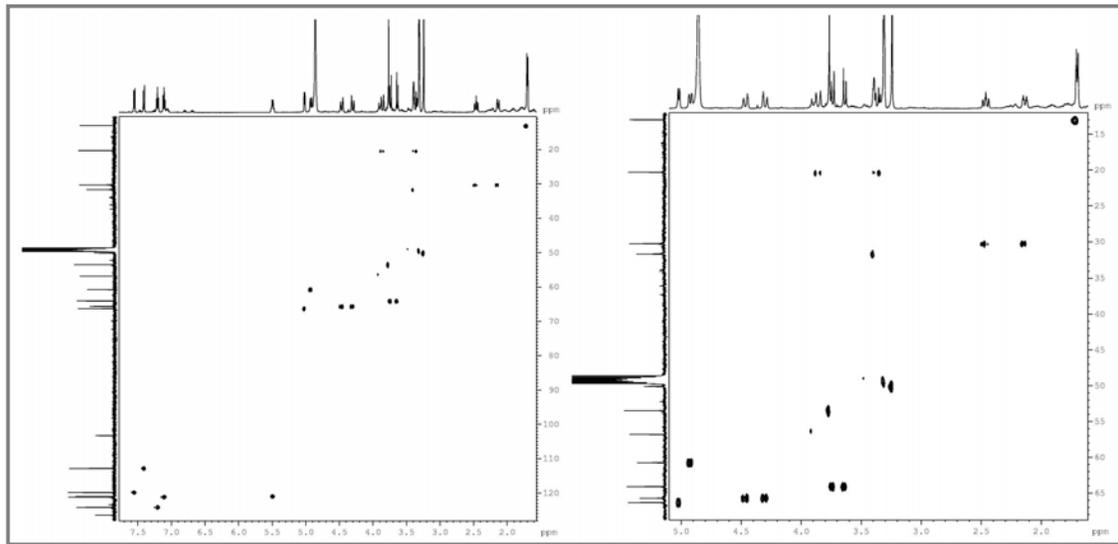


Figura 168 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de AP-11 (CD_3OD , 500 x 125 MHz) e expansões.

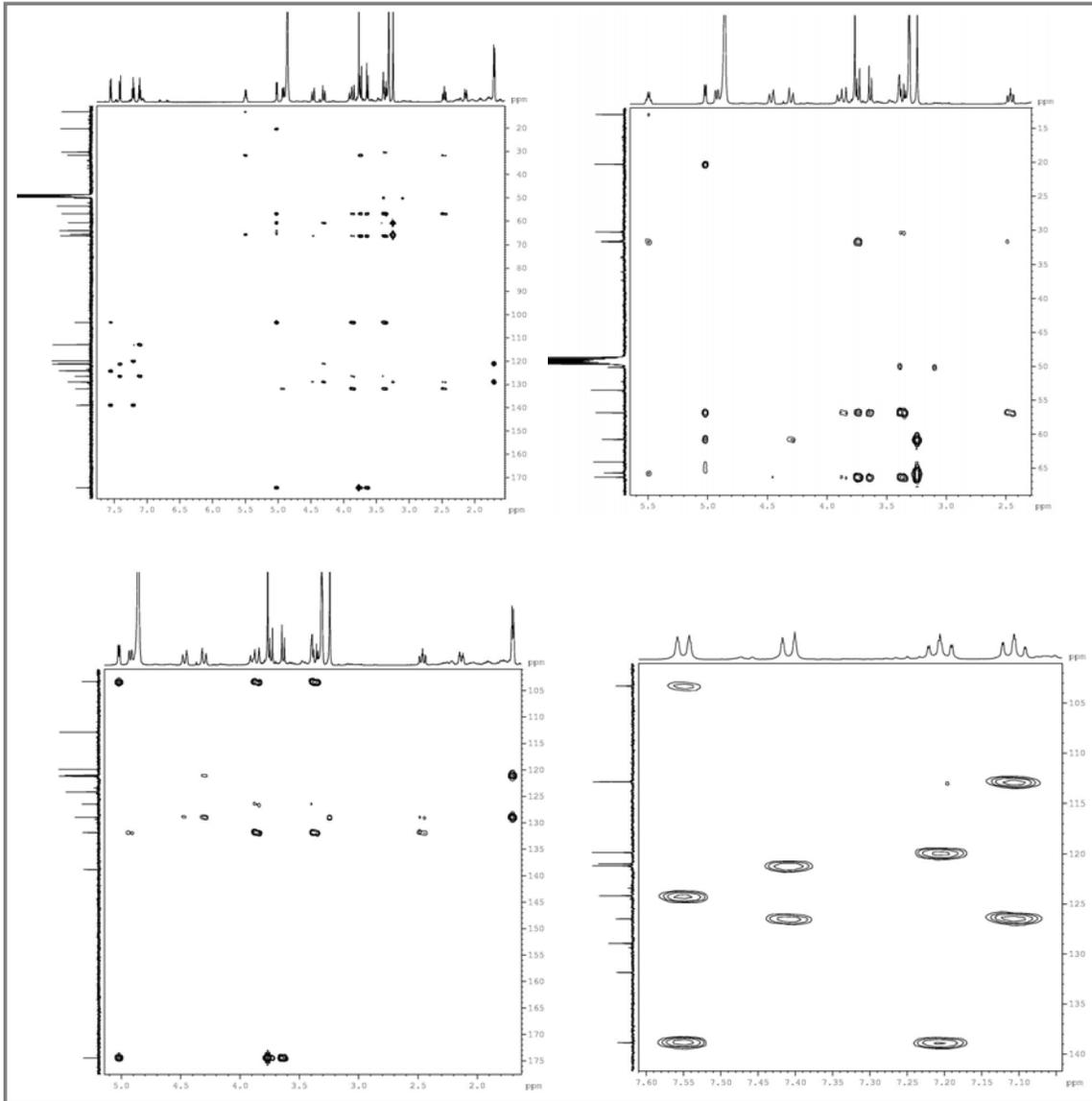
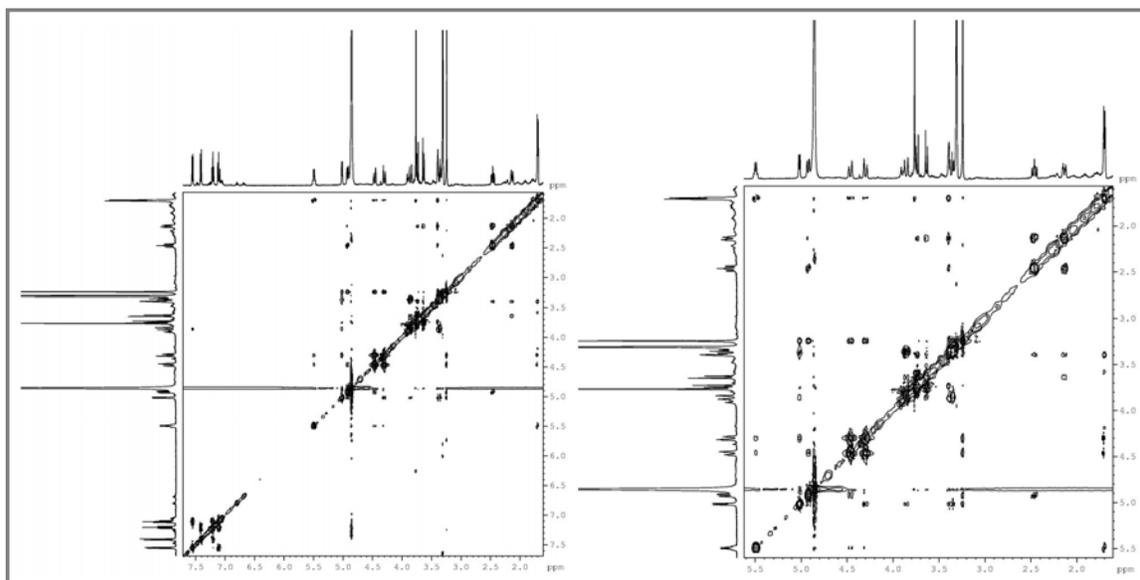


Figura 169 - Espectro de RMN 2D $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -NOESY de AP-11 (CD_3OD , 500 x 500 MHz) e expansão.



4.9 Determinação estrutural de AP-5

O composto AP-5 foi obtido a partir do fracionamento cromatográfico da fração APSE-Aq, por cromatografia de exclusão e CLAE, sendo isolado com solução aquosa ácida de TFA 0,2% em CH₃CN (90:10) (ver Parte Experimental, p. 227). Ele foi obtido como uma resina amarela, com $[\alpha]_D^{20} = -58,9^\circ$ (*c* 0,12, MeOH) { $[\alpha]_D^{20} = -75,8^\circ$; *c* 1,3, MeOH (ZHANG *et al.*, 2003)}.

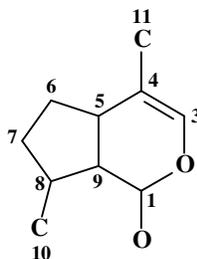
O espectro de massa de alta resolução (Figura 174, p. 179), obtido por ESI operando em modo negativo, mostrou o pico da molécula desprotonada $[M - H]^-$ em *m/z* 375,1360 (calculada 375,1291), induzindo a fórmula molecular C₁₆H₂₄O₁₀, cujo IDH é 5. O espectro revelou ainda o pico da molécula anionizada $[M + Cl]^-$ em *m/z* 411,1139 (calculada 411,1058). Por sua vez, o espectro obtido em modo positivo revelou o pico da molécula cationizada $[M + Na]^+$ em *m/z* 399,1353 (calculada 399,1267).

O espectro na região do infravermelho de AP-5 (Figura 175, p. 179) mostrou uma banda larga centrada em 3327 cm⁻¹, característica de deformação axial de ligação O-H de dímero. Outras bandas de deformações axiais foram vistas em 2930 e 2880 cm⁻¹, atribuídas a ligações C-H de carbonos sp³, as quais se encontraram superpostas pela banda de O-H; 1674 cm⁻¹, atribuída à presença de ligação C=O; 1633 cm⁻¹, atribuída à ligação C=C; e 1065 e 1027 cm⁻¹, características de ligações C-O de álcoois. A banda de absorção em 995 cm⁻¹ foi atribuída à deformação angular no plano de ligação C-H.

O espectro de RMN ¹³C-CPD de AP-5 (Figura 176, p. 180) registrou 16 sinais, em concordância com a fórmula molecular proposta anteriormente. Através de comparação com o espectro de RMN ¹³C-APT (Figura 176, p. 180) foram identificados dois sinais de carbonos não-hidrogenados, onze de carbonos mono-hidrogenados, dois de carbonos metilênicos e um de carbono metílico (Tabela 12, p. 178). O sinal em δ_C 171,0 foi atribuído a uma carbonila, já sugerida pelo espectro de infravermelho, e associada à presença de ácido carboxílico α,β -insaturado. Os sinais de carbonos mono-hidrogenados em δ_C 100,2 (C-1'), 78,4 (C-5'), 78,1 (C-3'), 74,9 (C-2') e 71,7 (C-4'), juntamente com o sinal de carbono oximetilênico em δ_C 62,9 (C-6'), sugeriram a presença de uma unidade de glicose no composto. Os sinais em δ_C 114,3 (C-4) e 152,3 (C-3) sugeriram uma ligação dupla tri-substituída, visto que o último é um carbono metínico sp² oxigenado, que correlaciona no espectro HSQC (Figura 177, p. 180) com o hidrogênio em δ_H 7,39. Observou-se também uma metila em δ_C 13,6 (C-10) e dois sinais em δ_C 75,2 (C-7) e 97,8 (C-1), típicos de carbonos oxigenados.

Diante dos sinais vistos no espectro de RMN ^{13}C e subtraindo-se seis carbonos da unidade de açúcar, os 10 carbonos restantes foram compatíveis com a proposta do esqueleto básico de um iridoide, constituído por um sistema de anéis fundidos ciclopentanodihidropirano (Figura 170).

Figura 170 - Esqueleto básico de um iridoide.



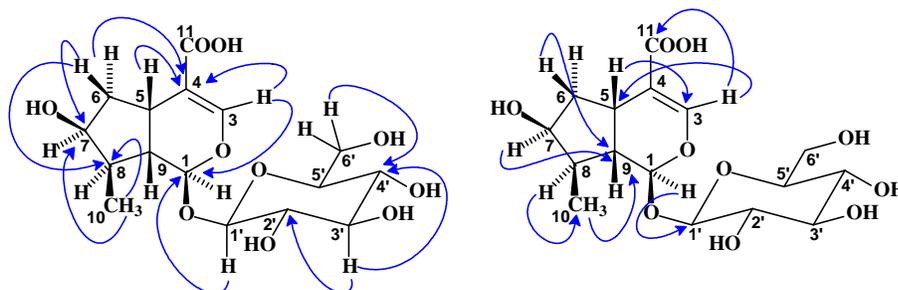
O espectro de RMN ^1H de AP-5 (Figura 178 e Figura 179, p. 181) apresentou sinais bem característicos do esqueleto de um iridoide glicosilado: um sinal de hidrogênio olefínico em δ_{H} 7,39 (d, $J = 1,0$ Hz, H-3), característico de hidrogênio de enol-éter conjugado, dois dupletos em δ_{H} 5,27 ($J = 4,4$ Hz, H-1) e 4,65 ($J = 8,0$ Hz, H-1'), característicos de hidrogênios hemiacetalico e anomérico, respectivamente, e um duplete em δ_{H} 1,09 ($J = 6,9$ Hz, 3H-10), atribuído aos hidrogênios do carbono metílico. A constante de acoplamento do hidrogênio anomérico, típica de um acoplamento trans-diaxial, indicou que a unidade de açúcar proposta anteriormente seria a β -D-glicose. Os sinais entre 3,0 e 4,0 ppm foram associados aos hidrogênios ligados a carbonos oxigenados da molécula de glicose.

O espectro COSY de AP-5 (Figura 180, p. 182) mostrou os acoplamentos geminais dos hidrogênios diastereotópicos em δ_{H} 3,89 (H-6'a) e 3,67 (H-6'b), e ainda em δ_{H} 2,24 (H-6 β) e 1,65 (H-6 α). Acoplamentos vicinais da unidade glicosídica foram detectados entre os hidrogênios em δ_{H} 4,65 (H-1') e 3,36 (H-3') com 3,19 (H-2'), δ_{H} 3,36 (H-3') com 3,30 (H-4'), e δ_{H} 3,89 (H-6'a) e 3,67 (H-6'b) com 3,30 (H-5').

A análise do espectro HMBC de AP-5 (Figura 181, p. 182) permitiu confirmar as posições dos substituintes hidroxílico, metílico, carboxílico e *O*-glicosílico no sistema ciclopentanodihidropirano, devido às correlações à longa distância vistas entre os hidrogênios em δ_{H} 2,24 (H-6 β) e 1,09 (H-10) com os carbonos em δ_{C} 75,2 (C-7) e 42,2 (C-8); 7,39 (H-3) e 4,65 (H-1') com o carbono em δ_{C} 97,8 (C-1); 7,39 (H-3), 3,09 (H-5), 2,24 (H-6 β) e 1,65 (H-6 α) com o carbono em δ_{C} 114,3 (C-4). Outras correlações observadas foram dos hidrogênios em δ_{H} 1,87 (H-8) com o carbono em δ_{C} 13,6 (C-10) ($^2J_{\text{CH}}$), δ_{H} 7,39 (H-3) com os carbonos em δ_{C} 171,0 (C-11) e 32,2 (C-5) ($^3J_{\text{CH}}$), e δ_{H} 4,04 (H-7) e 1,09 (H-10) com o carbono em δ_{C} 46,7

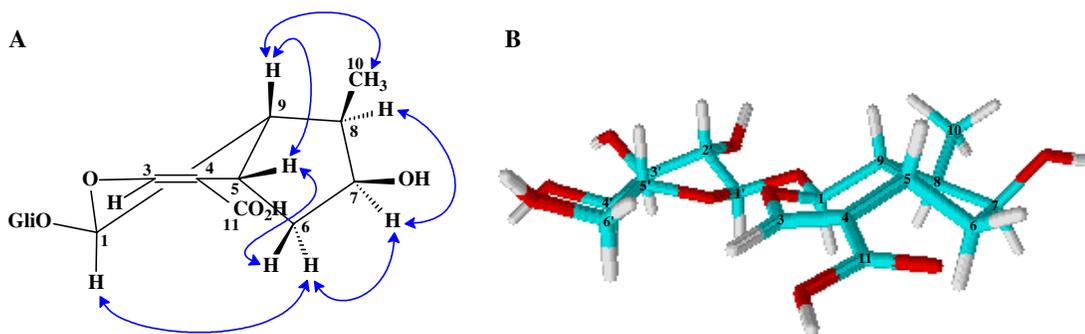
(C-9) ($^3J_{CH}$). A Figura 171 mostra essas e outras importantes correlações ^1H - ^{13}C à longa distância vistas no espectro HMBC.

Figura 171 - Estruturas mostrando importantes correlações ^1H - ^{13}C a duas e três ligações observadas no espectro HMBC de AP-5.



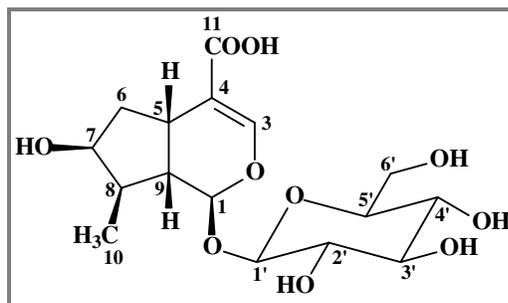
A estereoquímica relativa de AP-5 foi determinada através da análise dos espectros de NOE Seletivo (Figura 182, p. 183, a Figura 186, p. 185), os quais apresentaram acoplamentos dipolares entre os hidrogênios em δ_{H} 1,87 (H-8) e 1,65 (H-6 α) com 5,27 (H-1), e em δ_{H} 2,03 (H-9) com 1,09 (H-10). Estes acoplamentos, aliado à comparação com os dados de estereoquímica da literatura, permitiram determinar as configurações β para os substituintes *O*-glicosílico, hidroxílico e metílico, ligados aos carbonos 1, 7 e 8, respectivamente, e também para os hidrogênios H-5 e H-9 (Figura 172).

Figura 172 - Acoplamentos dipolares observados nos espectros de NOE Seletivo do composto AP-5 (A) e modelo molecular 3D obtido no programa “ChemSketch” (B).



Diante dos dados expostos, AP-5 foi identificado como o iridoide glicosilado (1*S*,5*S*,7*S*,8*R*,9*S*)-ácido 1-(β -D-glicopiranosiloxi)-7-hidroxi-8-metil-1,5,6,7,8,9-hexahidro-ciclopentano[*c*]pirano-4-carboxílico, conhecido por ácido logânico (Figura 173, p. 178). Embora isolado anteriormente das raízes de *Patrinia scabra* (DI *et al.*, 2011), das raízes de *Strychnos cocculoides* (SUNGHWA; KOKETSU, 2009) e das sementes de *Strychnos nuxvomica* (ZHANG *et al.*, 2003), o composto revelou-se inédito no gênero *Aspidosperma*.

Figura 173 - Estrutura do composto AP-5, identificado como o iridoide (-)-ácido logânico.


 Tabela 12 - Dados de RMN ¹H e ¹³C do composto AP-5 (500 e 125 MHz, CD₃OD), correlações à longa distância vistas no espectro HMBC e comparação com os dados de RMN ¹³C registrados na literatura.

AP-5						
	HSQC		HMBC		Lit.	
	δ_C	δ_H (mult, J, H)	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	δ_C^1	δ_C^2
1	97,8	5,27 (d, 4,4 Hz, 1H)		H-3; H-1'	97,5	97,6
3	152,3	7,39 (d, 1,0 Hz, 1H)		H-1; H-5	151,3	151,9
4	114,3	—	H-3; H-5	H-6 α ; H-6 β	115,0	114,4
5	32,2	3,09 (q, 8,0 Hz, 1H)	H-6 α ; H-6 β	H-3; H-1; H-7	32,2	32,1
6β	42,8	2,24 (ddd, 14,0; 8,0; 1,2 Hz, 1H)	H-5		42,7	42,9
6α		1,65 (ddd, 14,0; 8,0; 5,0 Hz, 1H)				
7	75,2	4,04 (t, 4,0 Hz, 1H)	H-6 β	H-10	74,7	74,7
8	42,2	1,87 (m, 1H)	H-10	H-6 β	42,1	42,1
9	46,7	2,03 (td, 9,0; 4,4 Hz, 1H)	H-5	H-7; H-6 β ; H-10	46,6	46,5
10	13,6	1,09 (d, 6,9 Hz, 3H)	H-8		13,4	13,4
11	171,0	—		H-3	171,8	171,0
1'	100,2	4,65 (d, 8,0 Hz, 1H)		H-1	100,0	100,0
2'	74,9	3,19 (t, 8,0 Hz, 1H)	H-3'		75,1	75,1
3'	78,1	3,36 (m, 1H)	H-2'		78,0	78,0
4'	71,7	3,30 (m, 1H)	H-3'	H-6'a	71,6	71,6
5'	78,4	3,30 (m, 1H)	H-6'b; H-4'		78,3	78,3
6'a	62,9	3,89 (dd, 12,0; 1,3 Hz, 1H)			62,7	62,7
6'b		3,67 (dd, 12,0; 5,2 Hz, 1H)				

¹100 MHz, CD₃OD (DI *et al.*, 2011).

²150 MHz, CD₃OD (SUNGHWA; KOKETSU, 2009).

Figura 174 - Espectro de massa de alta resolução de AP-5, obtido por ESI operando em modo positivo (A) e modo negativo (B).

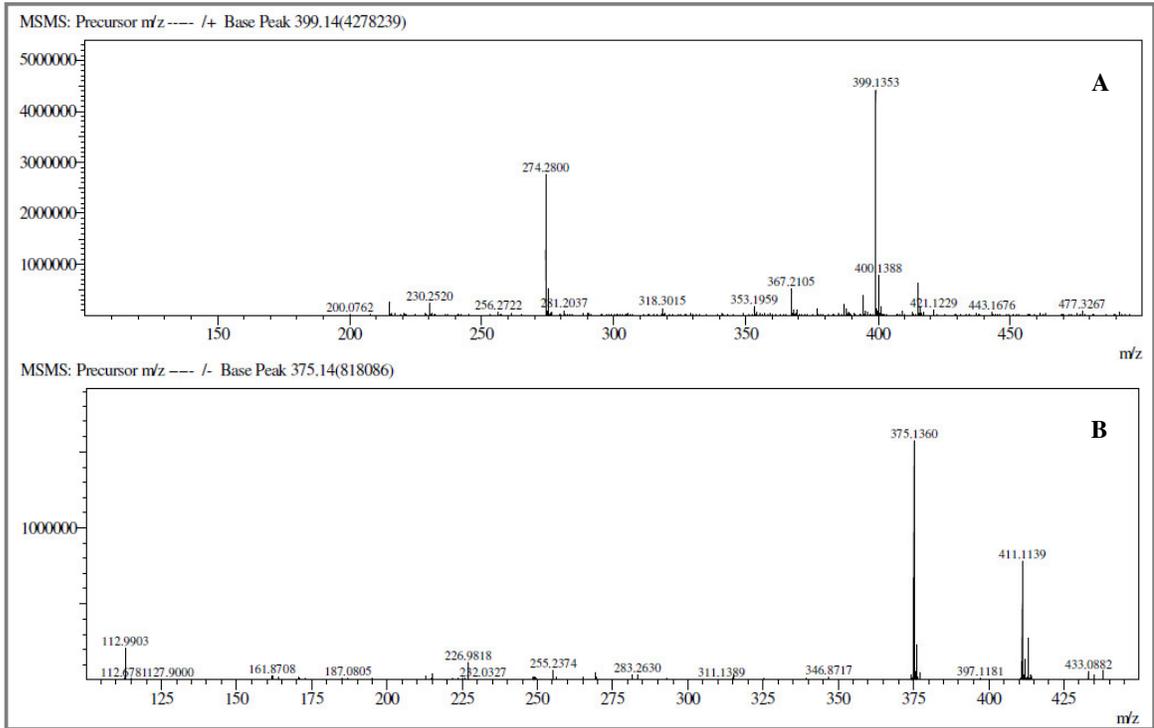


Figura 175- Espectro de absorção na região do infravermelho de AP-5 (obtido no suporte UATR).

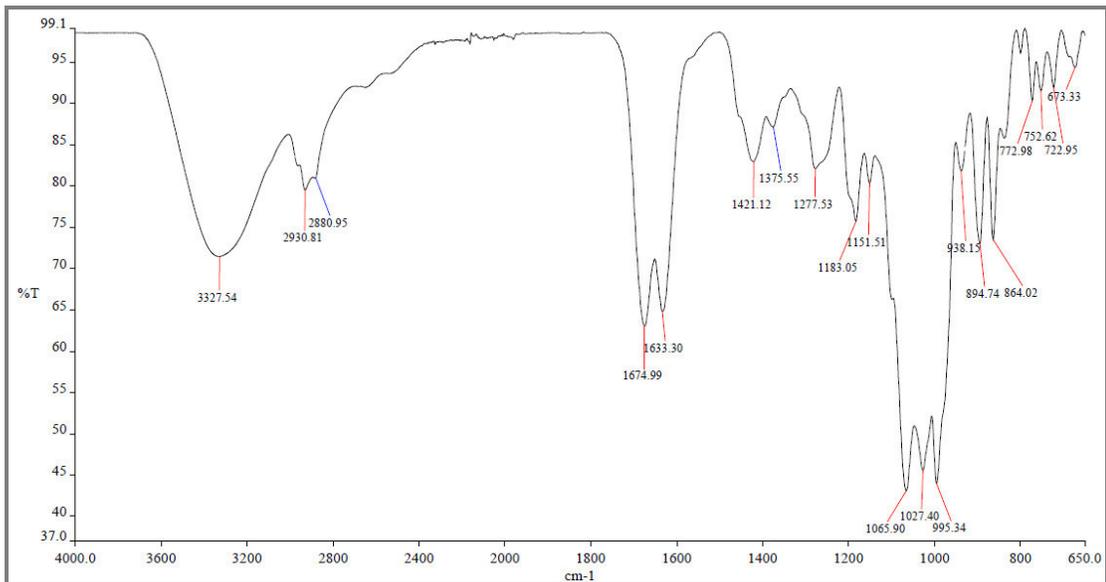


Figura 176 - Espectro de RMN ^{13}C -CPD (A) e APT (B) de AP-5 (CD_3OD , 125 MHz).

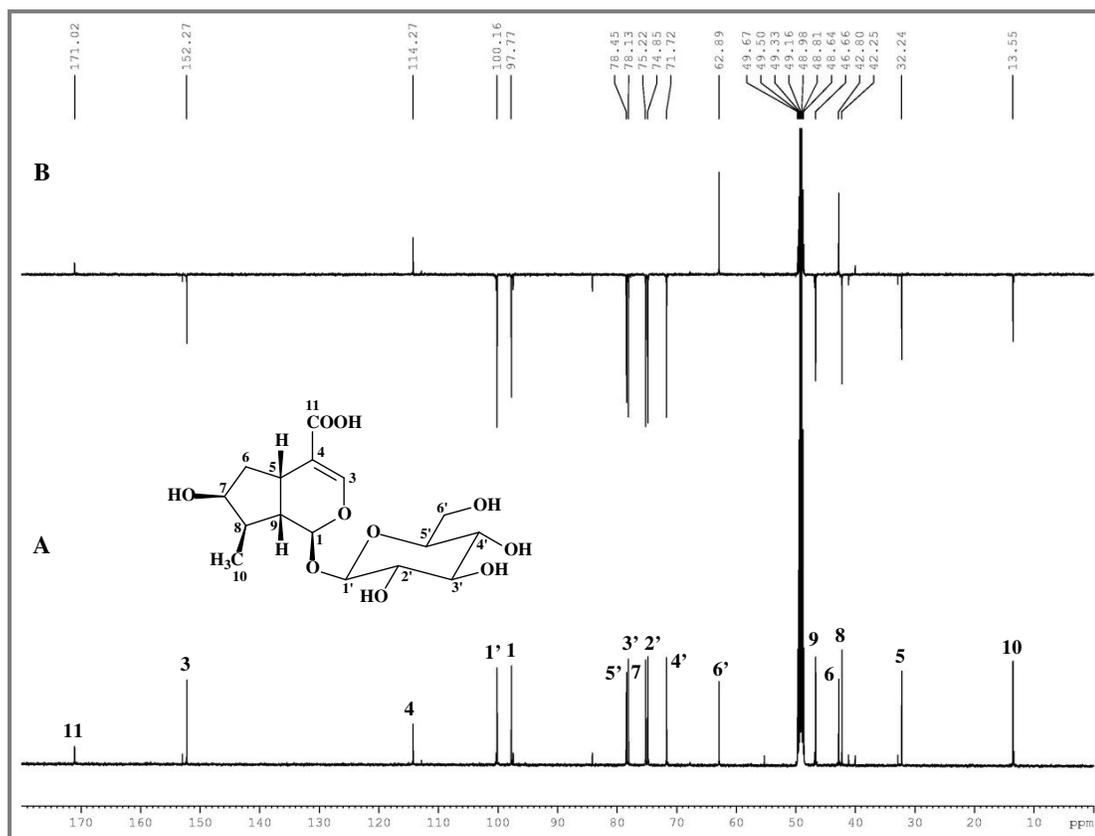


Figura 177 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC de AP-5 (CD_3OD , 500 x 125 MHz) e expansão.

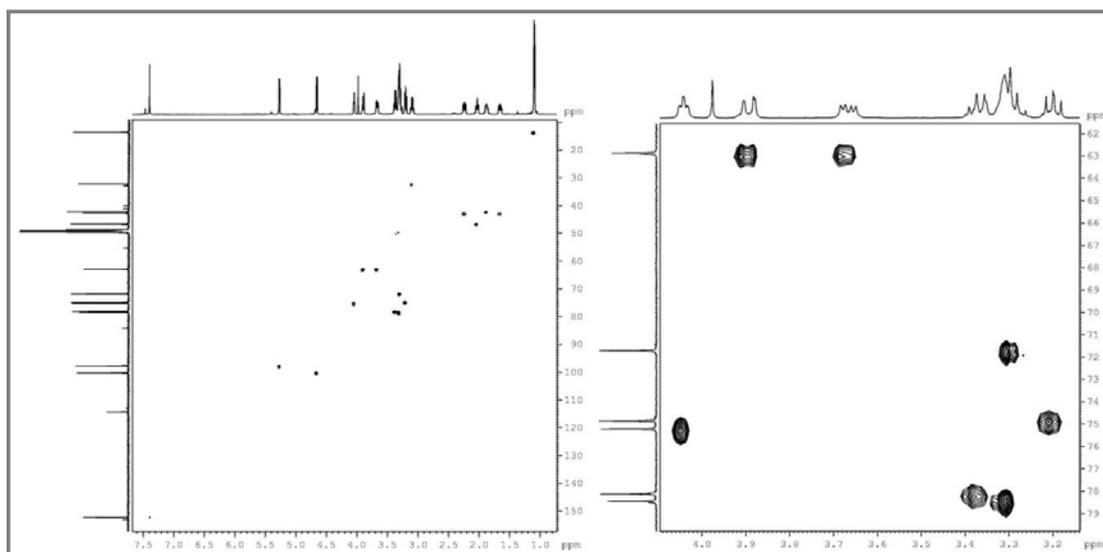


Figura 178 - Espectro de RMN ¹H de AP-5 (CD₃OD, com supressão do sinal da água, 500 MHz).

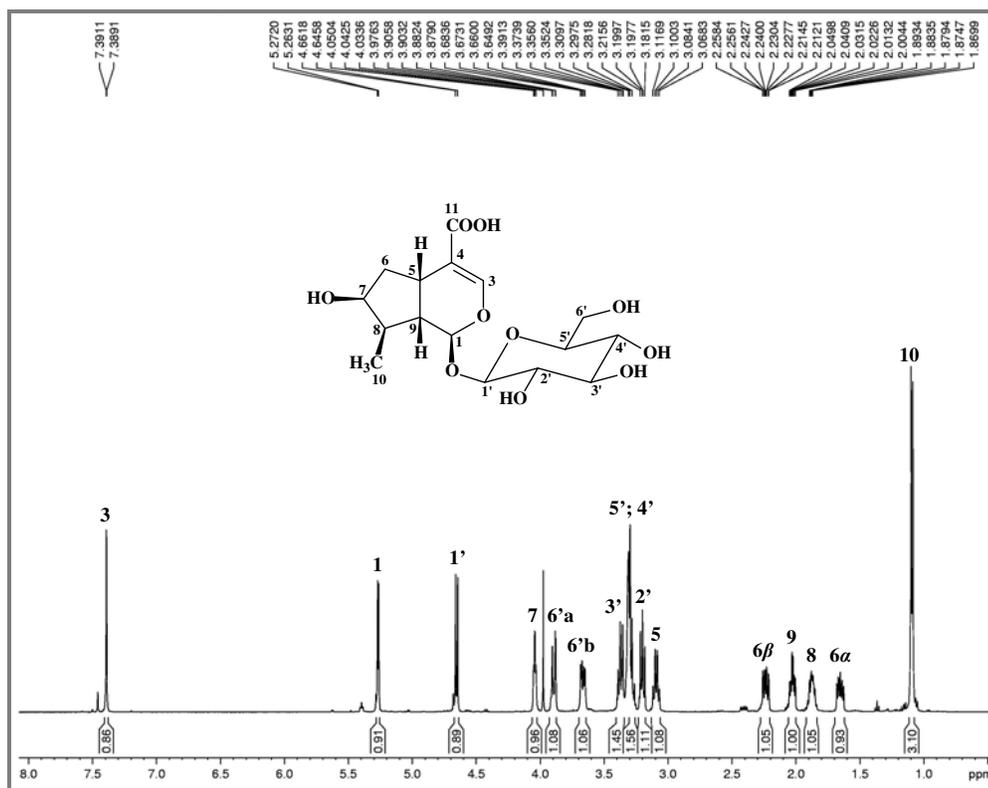


Figura 179 - Expansão do espectro de RMN ¹H de AP-5 mostrando a região entre 4,1 e 1,0 ppm.

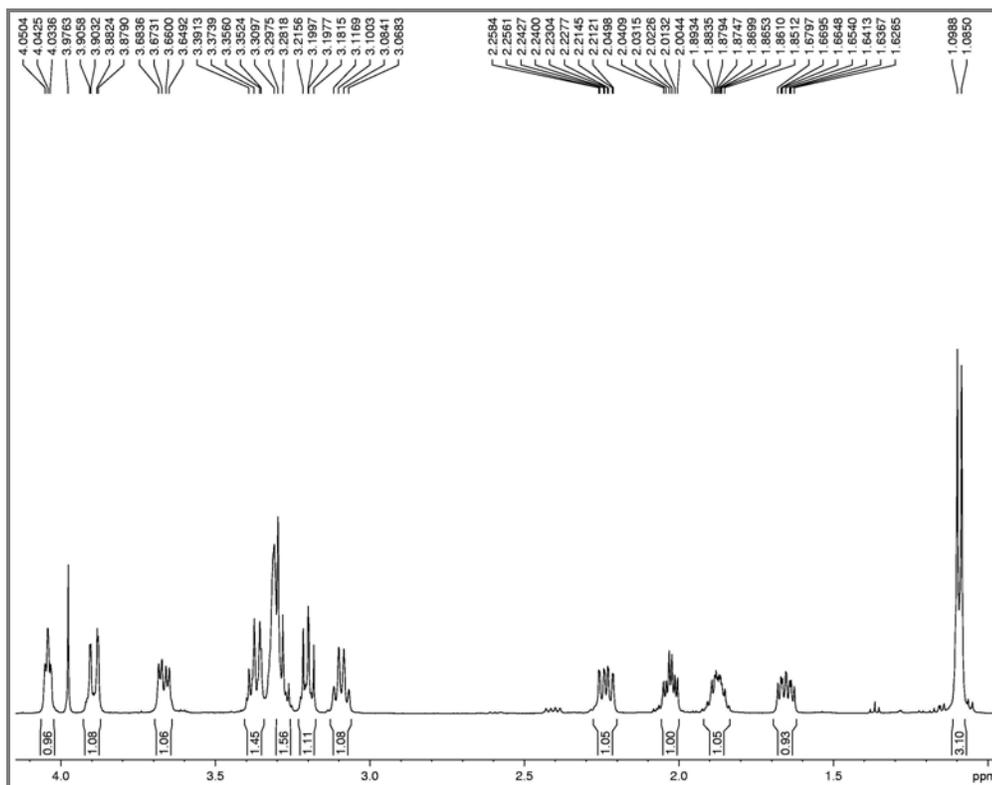


Figura 180 - Espectro de RMN 2D ¹H,¹H-COSY de AP-5 (CD₃OD, 500 x 500 MHz).

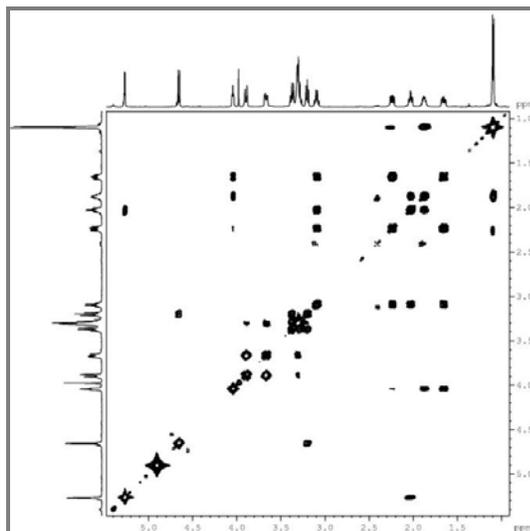


Figura 181 - Espectro de RMN 2D ¹H,¹³C-HMBC de AP-5 (CD₃OD, 500 x 125 MHz) e expansões.

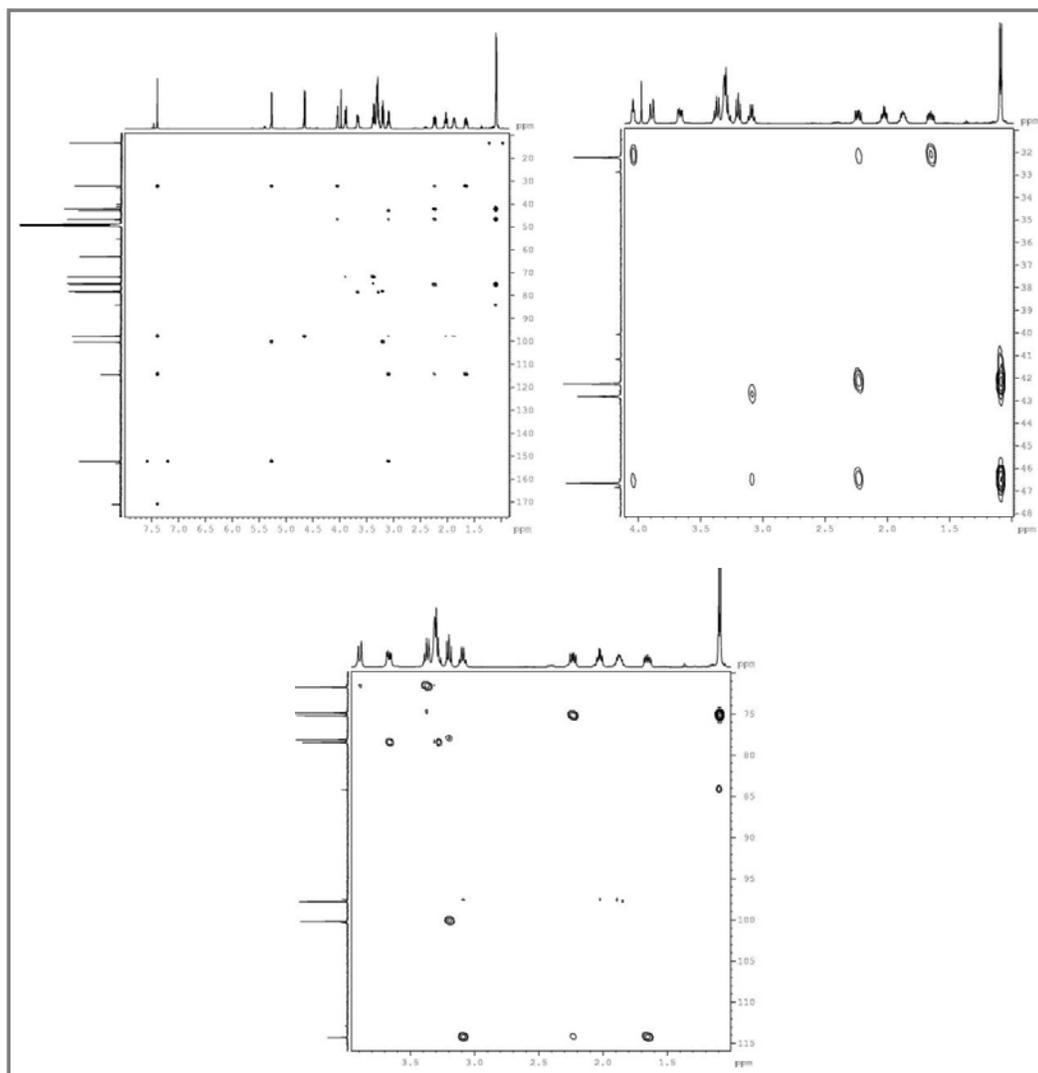


Figura 182 - Espectro de NOE Seletivo de AP-5, com irradiação no hidrogênio em δ_H 1,65 (H-6 α) (CD₃OD, 500 MHz).

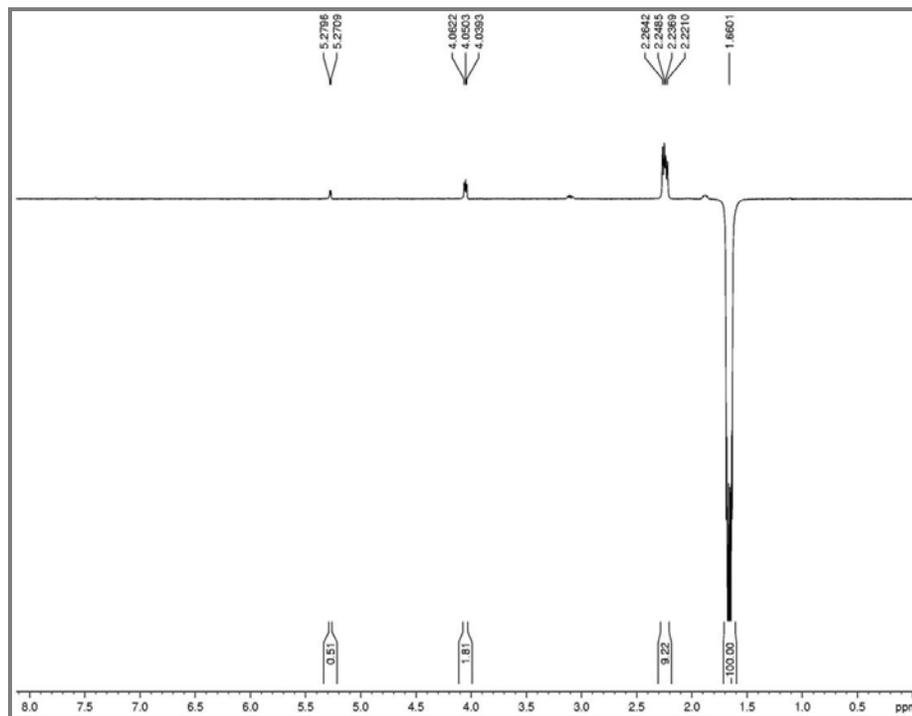


Figura 183 - Espectro de NOE Seletivo de AP-5, com irradiação no hidrogênio em δ_H 1,87 (H-8) (CD₃OD, 500 MHz).

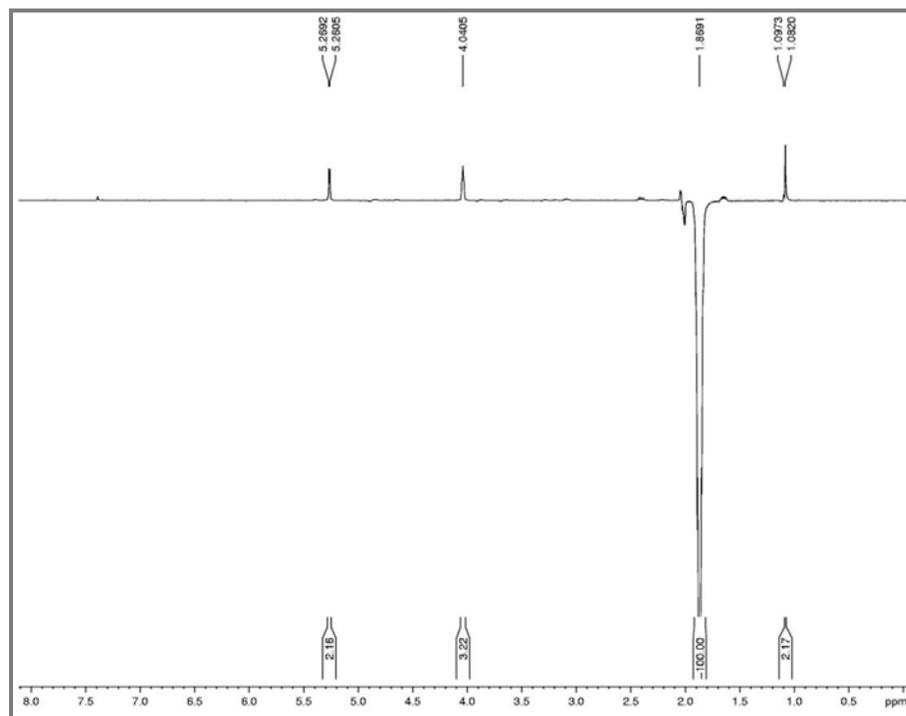


Figura 184 - Espectro de NOE Seletivo de AP-5, com irradiação no hidrogênio em δ_H 2,03 (H-9) (CD₃OD, 500 MHz).

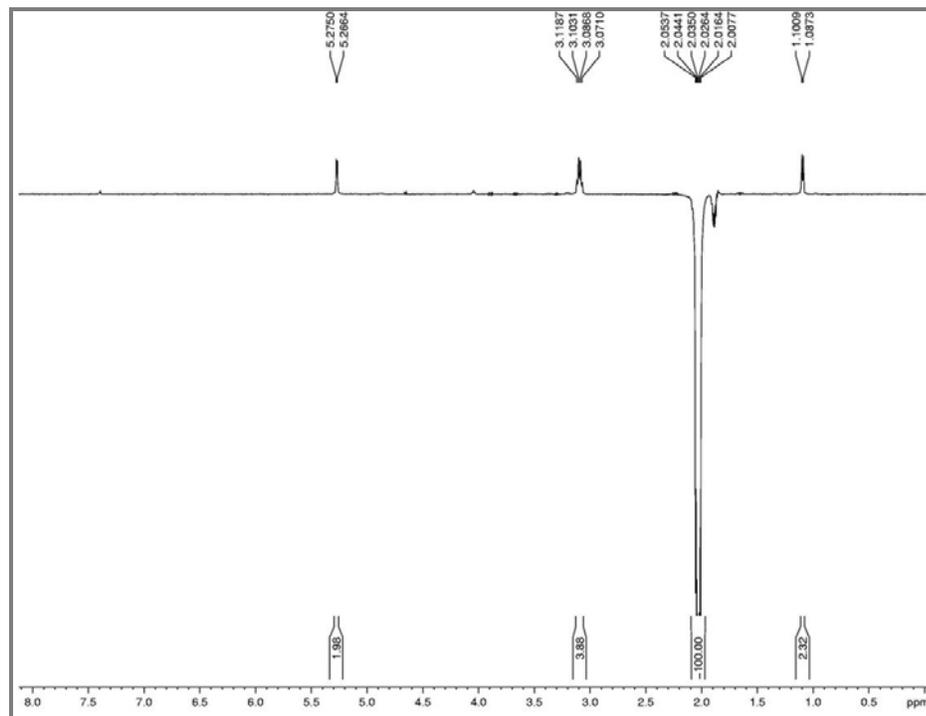


Figura 185 - Espectro de NOE Seletivo de AP-5, com irradiação no hidrogênio em δ_H 2,24 (H-6 β) (CD₃OD, 500 MHz).

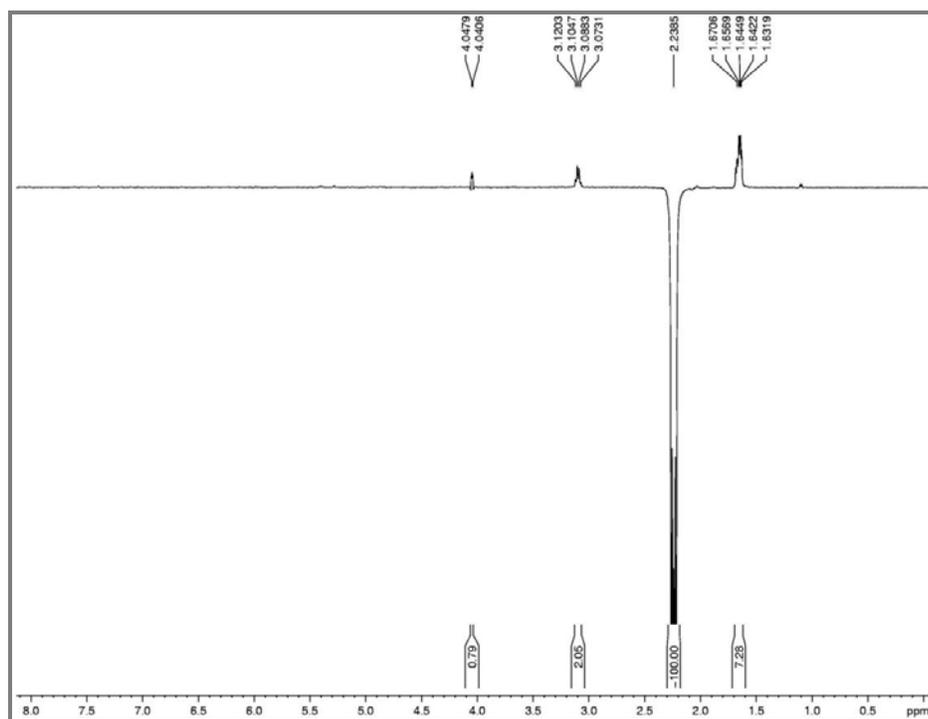
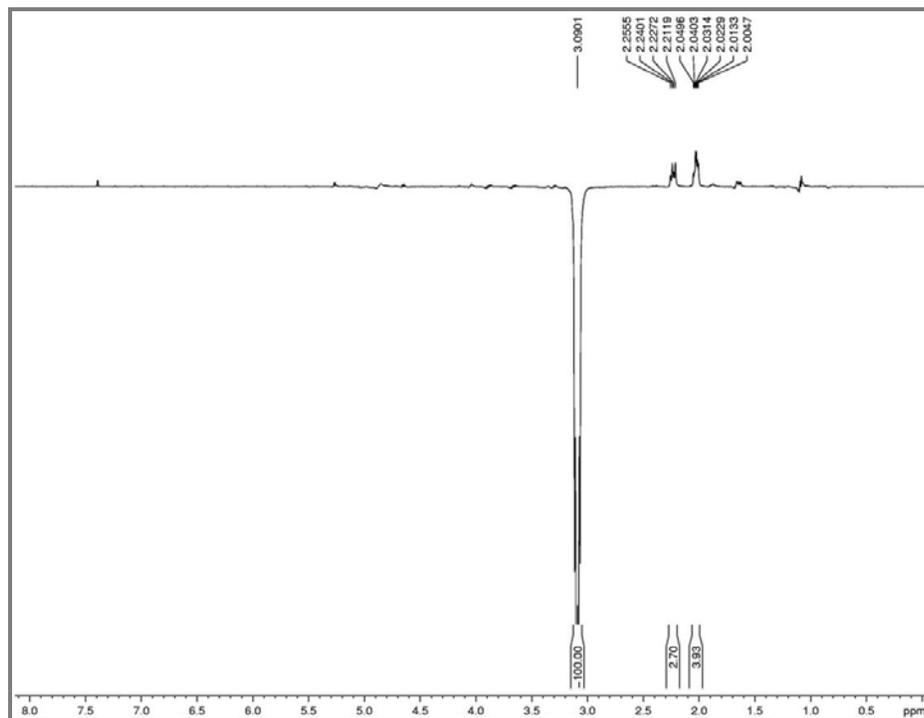


Figura 186 - Espectro de NOE Seletivo de AP-5, com irradiação no hidrogênio em δ_H 3,09 (H-5) (CD₃OD, 500 MHz).



4.10 Determinação estrutural de AP-7

O composto AP-7 foi obtido a partir de cromatografia de exclusão e CLAE da fração APSE-Aq, sendo isolado com mistura de 15% de CH₃CN e 85% de solução aquosa ácida de TFA 0,2% (ver Parte Experimental, p. 227). Ele apresentou aspecto cristalino, ponto de fusão 220-222 °C e $[\alpha]_D^{20} = -56,7^\circ$ (*c* 0,34, MeOH) { $[\alpha]_D^{22} = -37,5^\circ$; *c* 1,10, MeOH (ZHU *et al.*, 2004)}.

Sua fórmula molecular C₁₇H₂₆O₁₀ (IDH = 5) foi deduzida a partir do pico da molécula cationizada [M + Na]⁺ em *m/z* 413,1499 (calculada 413,1423), observado no espectro de massa de alta resolução (Figura 189, p. 189), obtido por ESI em modo positivo. O espectro obtido no modo negativo revelou o pico da molécula anionizada [M + Cl]⁻ em *m/z* 425,1312 (calculada 425,1214).

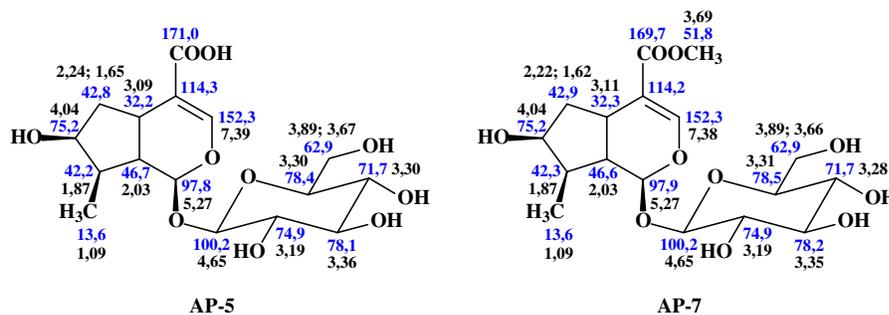
O espectro na região do infravermelho de AP-7 (Figura 190, p. 189) mostrou bandas de absorção semelhantes àquelas observadas para o composto AP-5. Dentre as mais importantes, observou-se uma banda larga centrada em 3348 cm⁻¹, característica de ligação O-H, além de bandas características de ligações C=O em 1680 cm⁻¹, C=C em 1632 cm⁻¹ e C-O em 1066 e 1028 cm⁻¹.

O espectro de RMN ¹H de AP-7 (Figura 191, p. 190, a Figura 193, p. 191) mostrou-se semelhante ao do composto AP-5, exceto pelo surgimento de um simpleto com integração para três hidrogênios, em δ_H 3,69, atribuído aos hidrogênios de uma metoxila (Tabela 13, p. 188).

O espectro de RMN ¹³C-CPD de AP-7 (Figura 194, p. 191) exibiu 17 linhas espectrais (Tabela 13, p. 188). A comparação com o espectro do composto AP-5 mostrou como única diferença um sinal de carbono metoxílico em δ_C 51,8, correlacionado no espectro HSQC (Figura 195, p. 192) com os hidrogênios em δ_H 3,69.

Logo, o próximo passo foi determinar a posição desse grupamento metoxílico a partir da análise do espectro HMBC (Figura 196, p. 192), o qual mostrou que os hidrogênios em δ_H 3,69 correlacionaram com o carbono em δ_C 169,7 (C-11), concluindo-se que AP-7 correspondia ao derivado metílico de AP-5 (Figura 187, p. 187).

Figura 187 - Comparação dos valores de deslocamentos químicos de RMN ^1H e ^{13}C dos compostos AP-5 e AP-7 (CD_3OD , 500 e 125 MHz).



O espectro COSY de AP-7 (Figura 197, p. 193) mostrou os acoplamentos vicinais dos hidrogênios em δ_{H} 5,27 (H-1) com 2,03 (H-9); 4,65 (H-1') com 3,19 (H-2'); 4,04 (H-7) com 1,87 (H-8) e 1,62 (H-6 α); 3,35 (H-3') com 3,19 (H-2'); 3,11 (H-5) com 2,22 (H-6 β), 2,03 (H-9) e 1,62 (H-6 α); 2,03 (H-9) com 1,87 (H-8); e 1,87 (H-8) com 1,09 (H-10). Os acoplamentos geminais dos hidrogênios diastereotópicos pertencentes aos carbonos C-6 e C-6' também foram vistos, além do acoplamento alílico dos hidrogênios em δ_{H} 7,38 (H-3) com 3,11 (H-5).

A estereoquímica relativa de AP-7 foi identificada através da análise dos espectros de NOE Seletivo (Figura 198, p. 193, a Figura 205, p. 197) e comparação com a literatura. Irradiando-se o hidrogênio em δ_{H} 5,27 (H-1) foram vistas as interações espaciais com H-1', H-6 α e H-8. Irradiação no hidrogênio em δ_{H} 2,03 (H-9) mostrou interações com H-5 e 3H-10. Irradiação no hidrogênio em δ_{H} 4,65 (H-1') exibiu interações com H-1, H-3' e H-5'. Irradiando-se o hidrogênio em δ_{H} 1,87 (H-8) foram observadas interações com H-1, H-7 e H-6 α . Irradiação no hidrogênio em δ_{H} 3,11 (H-5) mostrou interações com H-6 β e H-9. Diante dos dados, determinaram-se as configurações β para a hidroxila, a metila, o grupamento *O*-glicosílico e para os hidrogênios H-5 e H-9, igualmente às configurações de AP-5 e da literatura (LIN *et al.*, 2011).

O composto AP-7 foi identificado como o iridoide glicosilado (1*S*,5*S*,7*S*,8*R*,9*S*)-1-(β -D-glicopiranosiloxi)-7-hidroxi-8-metil-1,5,6,7,8,9-hexahidro-ciclopentano[*c*]pirano-4-carboxilato de metila, conhecido por loganina (Figura 188, p. 188). Ele foi isolado anteriormente de Corni Fructus, um fruto de *Cornus officinalis* (LIN *et al.*, 2011), e revelou caráter inédito em *Aspidosperma pyrifolium*.

Figura 188 - Estrutura do composto AP-7, identificado como o iridoide (-)-loganina.

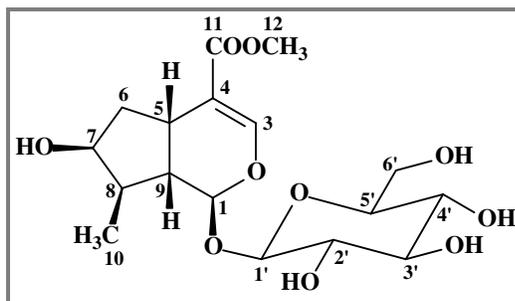


Tabela 13 - Dados de RMN ¹H e ¹³C do composto AP-7 (500 e 125 MHz, CD₃OD), correlações à longa distância vistas no espectro HMBC e comparação com os valores de RMN ¹³C da literatura registrados por LIN *et al.* (2011).

AP-7					
	HSQC		HMBC		Lit.
	δ_C	δ_H (mult, J, H)	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	δ_C^*
1	97,9	5,27 (d, 4,4 Hz, 1H)	H-9	H-3; H-1'; H-8	97,7
3	152,3	7,38 (d, 1,0 Hz, 1H)		H-1; H-5	152,1
4	114,2	—	H-3; H-5	H-6 α ; H-6 β ; H-9	114,0
5	32,3	3,11 (q, 8,0 Hz, 1H)	H-6 α ; H-6 β ; H-9	H-1; H-3; H-8	32,2
6β	42,9	2,22 (ddd, 14,0; 8,0; 1,2 Hz, 1H)	H-5		42,7
6α		1,62 (ddd, 14,0; 8,0; 5,0 Hz, 1H)			
7	75,2	4,04 (t, 4,2 Hz, 1H)	H-6 β	H-10	75,1
8	42,3	1,87 (m, 1H)	H-10	H-6 β	42,2
9	46,6	2,03 (td, 9,0; 4,4 Hz, 1H)	H-5; H-8	H-7; H-6 β ; H-10	46,5
10	13,6	1,09 (d, 6,9 Hz, 3H)	H-8	H-9	13,4
11	169,7	—		H-3; H-5; OCH ₃	169,5
12	51,8	3,69 (s, 3H)			51,6
1'	100,2	4,65 (d, 8,0 Hz, 1H)	H-2'	H-1	100,0
2'	74,9	3,19 (t, 8,0 Hz, 1H)	H-3'		74,7
3'	78,2	3,35 (m, 1H)	H-2'		78,0
4'	71,7	3,28 (m, 1H)	H-3'	H-6'a	71,6
5'	78,5	3,31 (m, 1H)	H-4'; H-6'b		78,4
6'a	62,9	3,89 (dd, 12,0; 1,5 Hz, 1H)		H-4'	62,8
6'b		3,66 (dd, 12,0; 5,6 Hz, 1H)			

*125 MHz, CD₃OD.

Figura 189 - Espectro de massa de alta resolução de AP-7, obtido por ESI operando em modo positivo (A) e modo negativo (B).

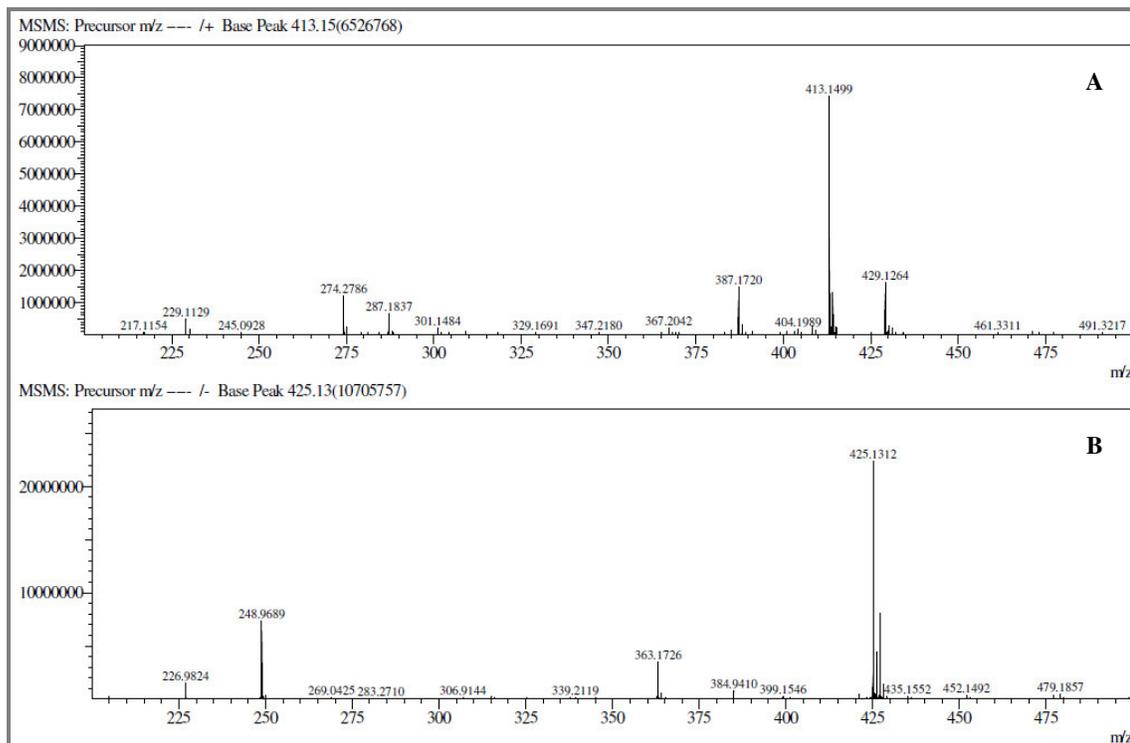


Figura 190 - Espectro de absorção na região do infravermelho de AP-7 (obtido no suporte UATR).

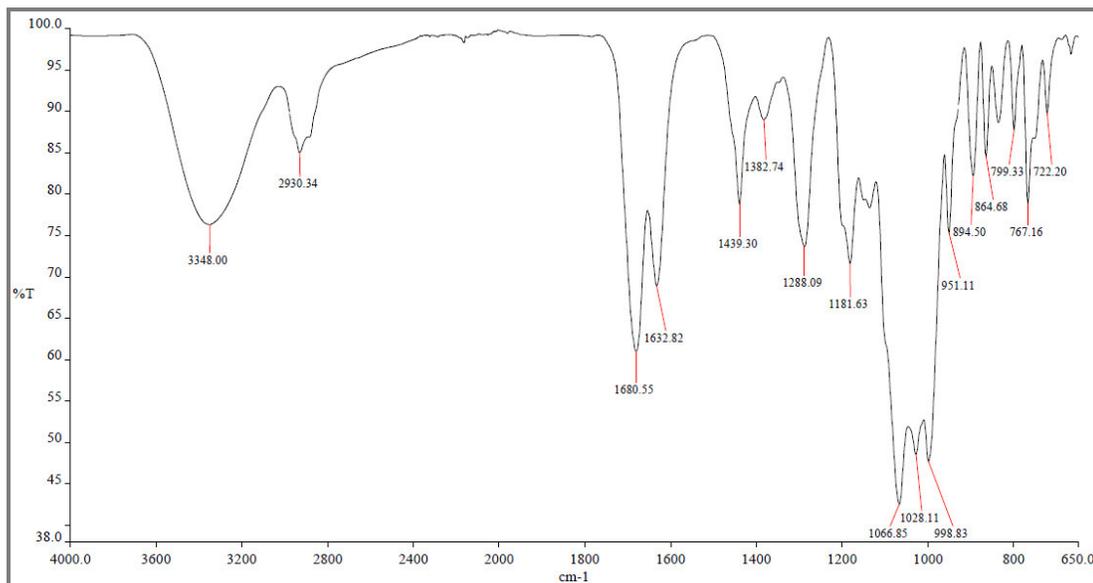


Figura 191 - Espectro de RMN ¹H de AP-7 (CD₃OD, 500 MHz).

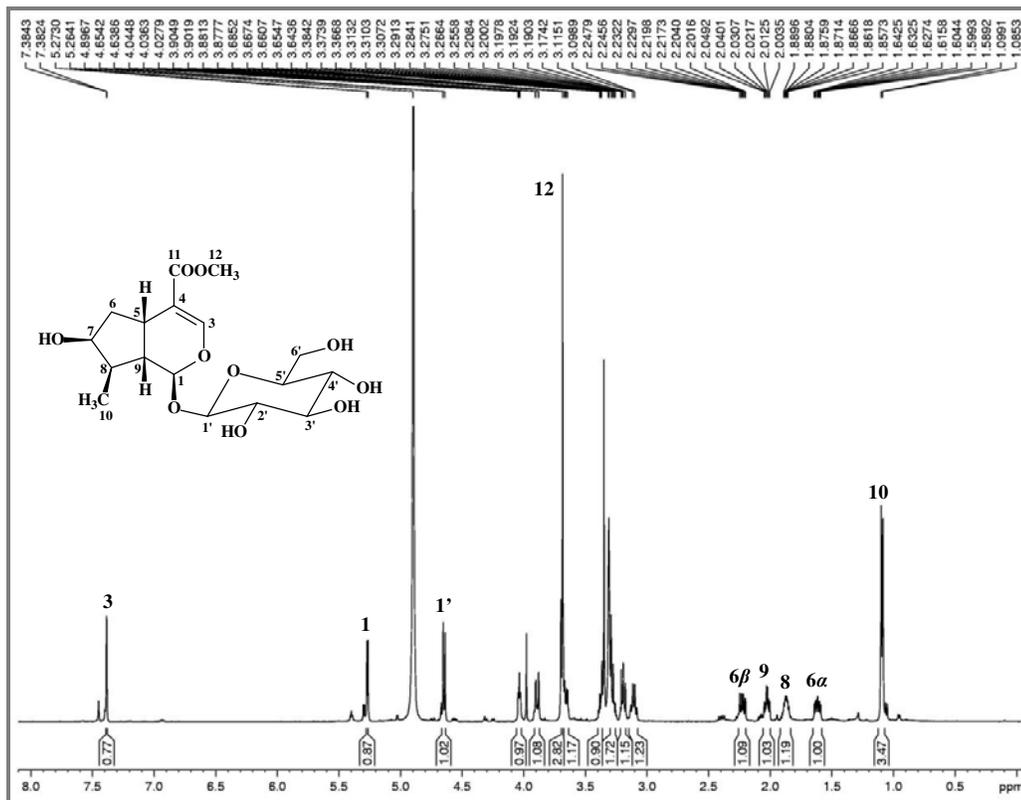


Figura 192 - Expansão da região entre 5,3 e 3,1 ppm do espectro de RMN ¹H de AP-7 (CD₃OD, 500 MHz).

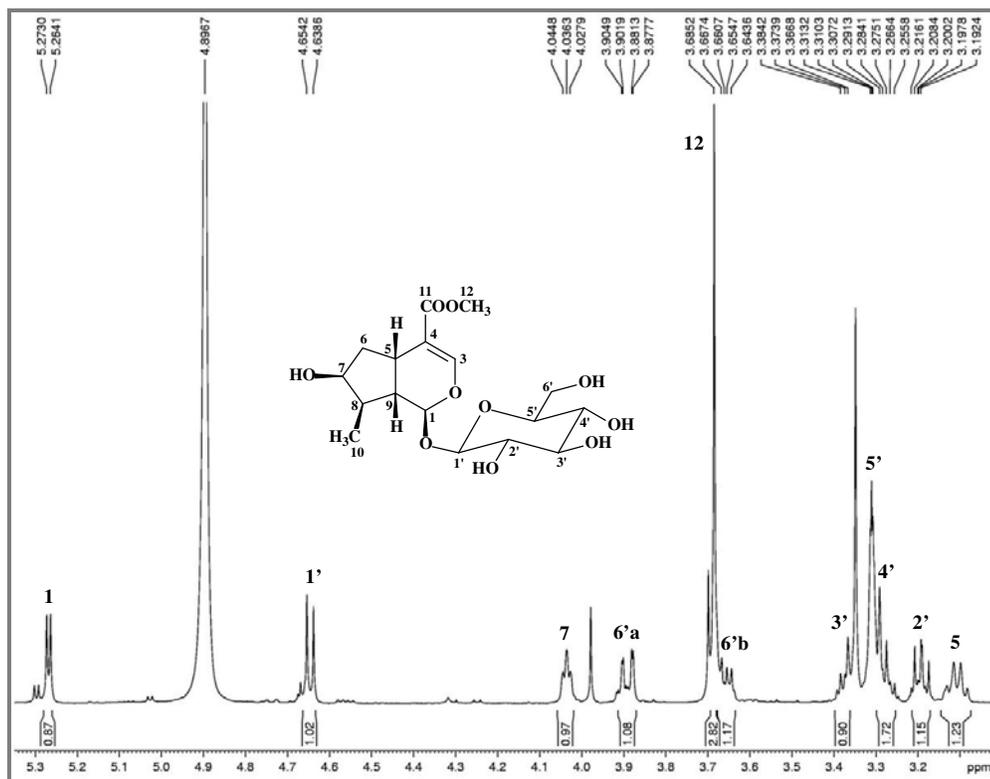


Figura 193 - Expansão da região entre 2,3 e 1,0 ppm do espectro de RMN ¹H de AP-7 (CD₃OD, 500 MHz).

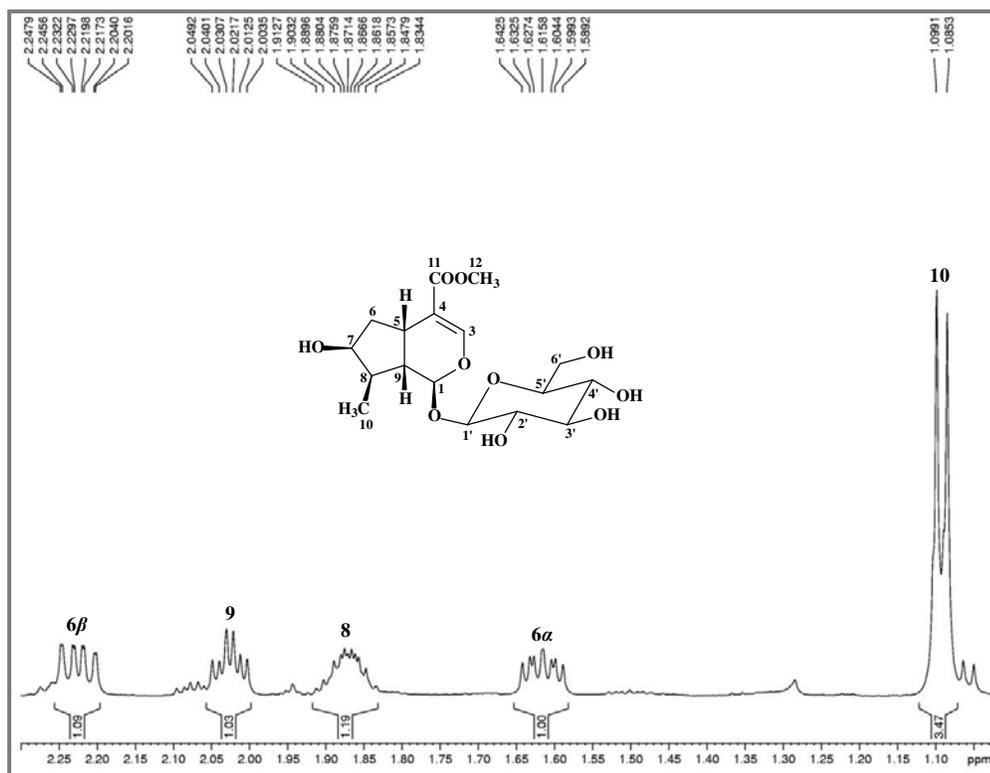


Figura 194 - Espectro de RMN ¹³C-CPD (A) e APT (B) de AP-7 (CD₃OD, 125 MHz).

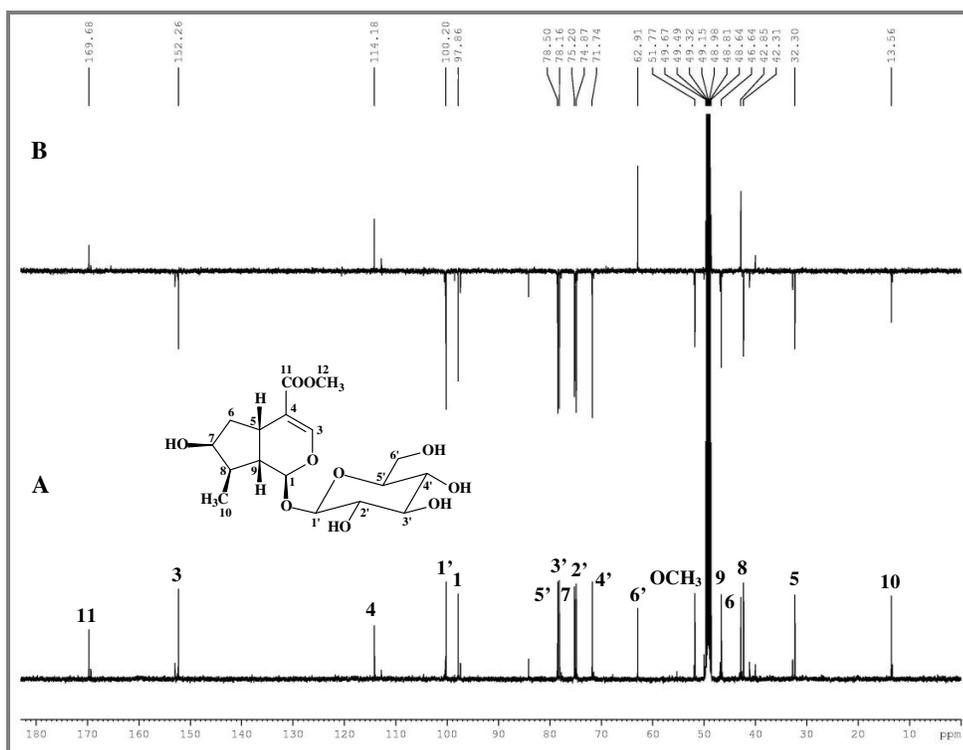


Figura 195 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC de AP-7 (CD_3OD , 500 x 125 MHz) e expansão.

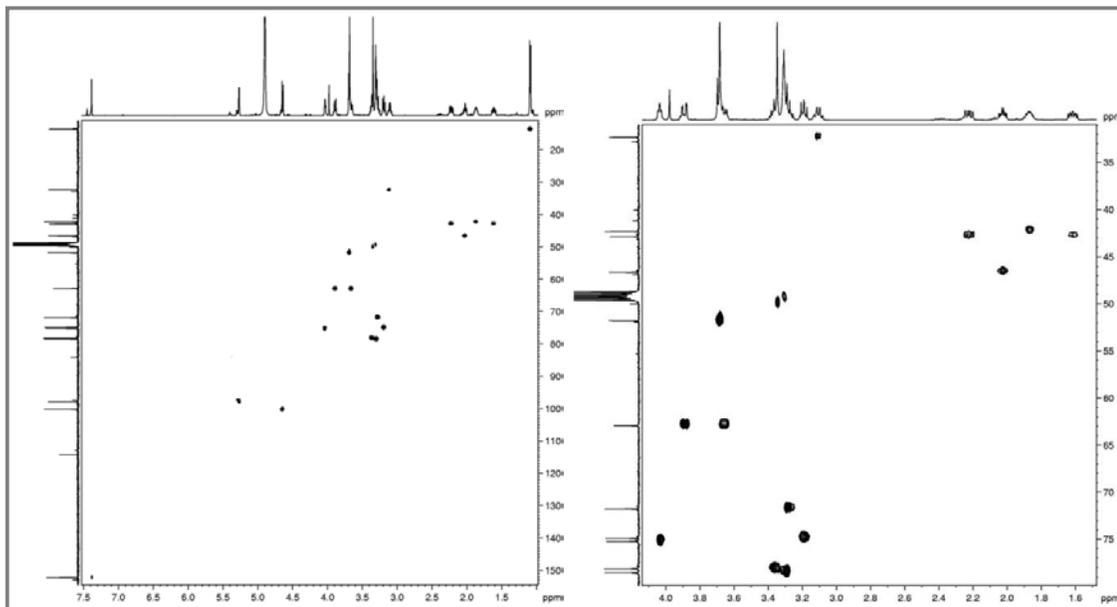


Figura 196 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de AP-7 (CD_3OD , 500 x 125 MHz) e expansões.

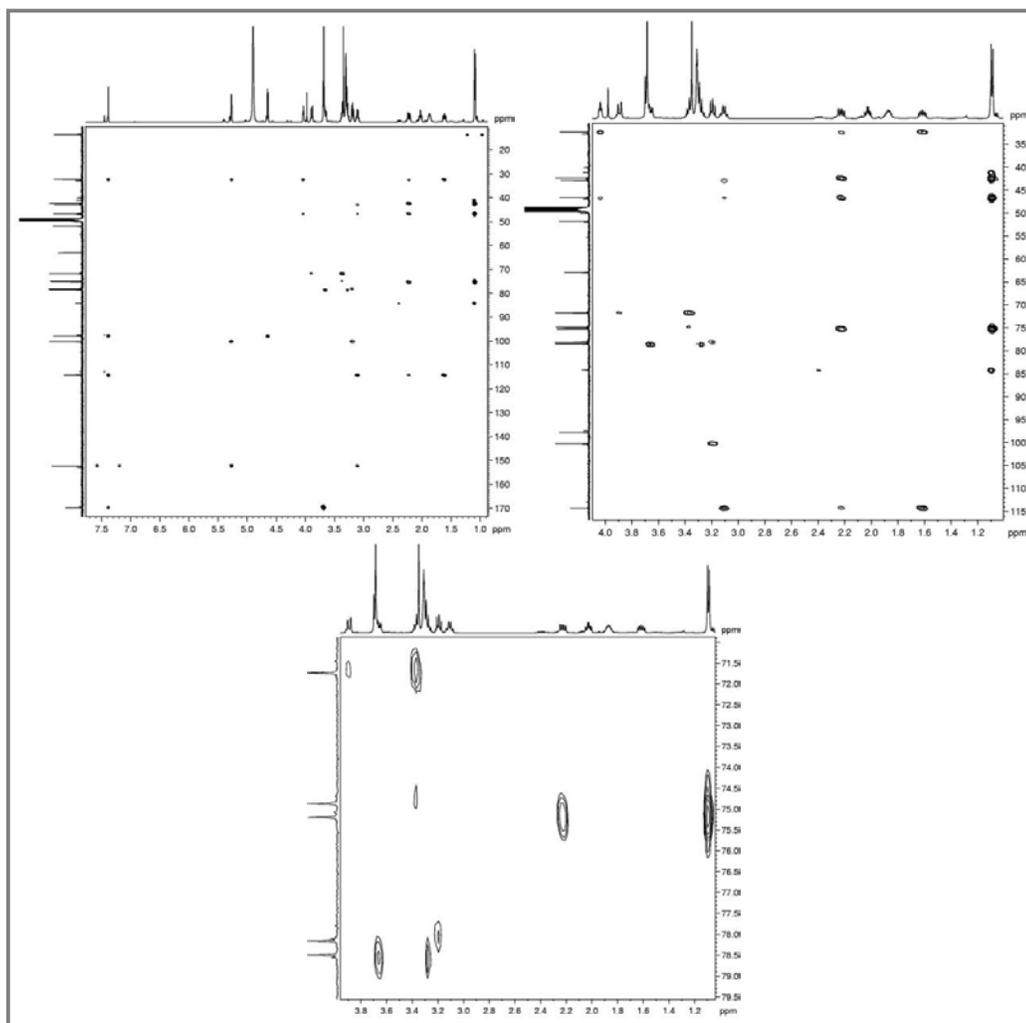


Figura 197 - Espectro de RMN 2D ¹H,¹H-COSY de AP-7 (CD₃OD, 500 x 500 MHz) e expansão.

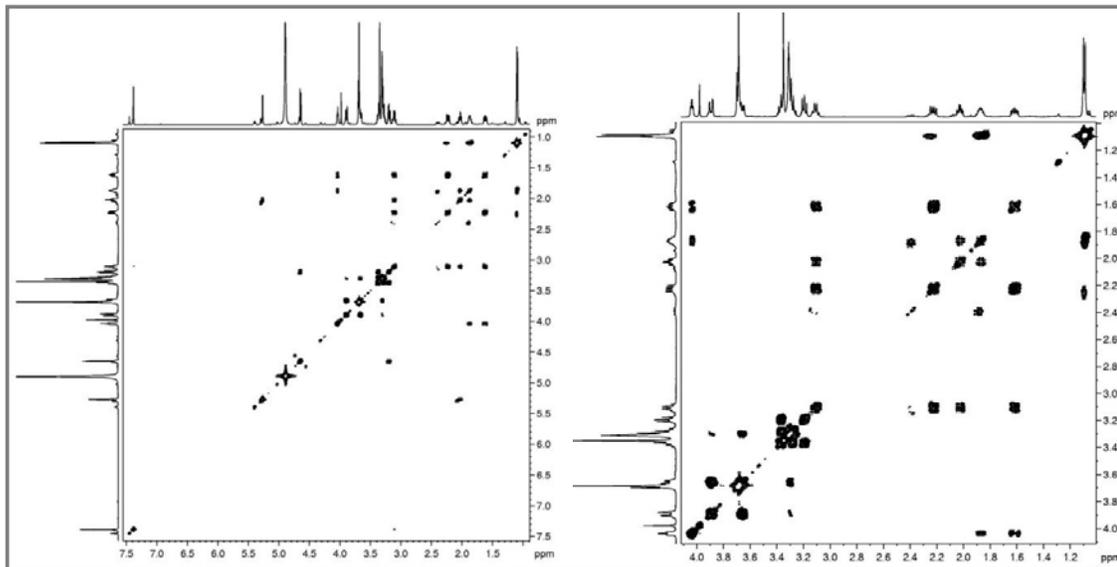


Figura 198 - Espectro de NOE Seletivo de AP-7, com irradiação no hidrogênio em δ_H 5,27 (H-1) (CD₃OD, 500 MHz).

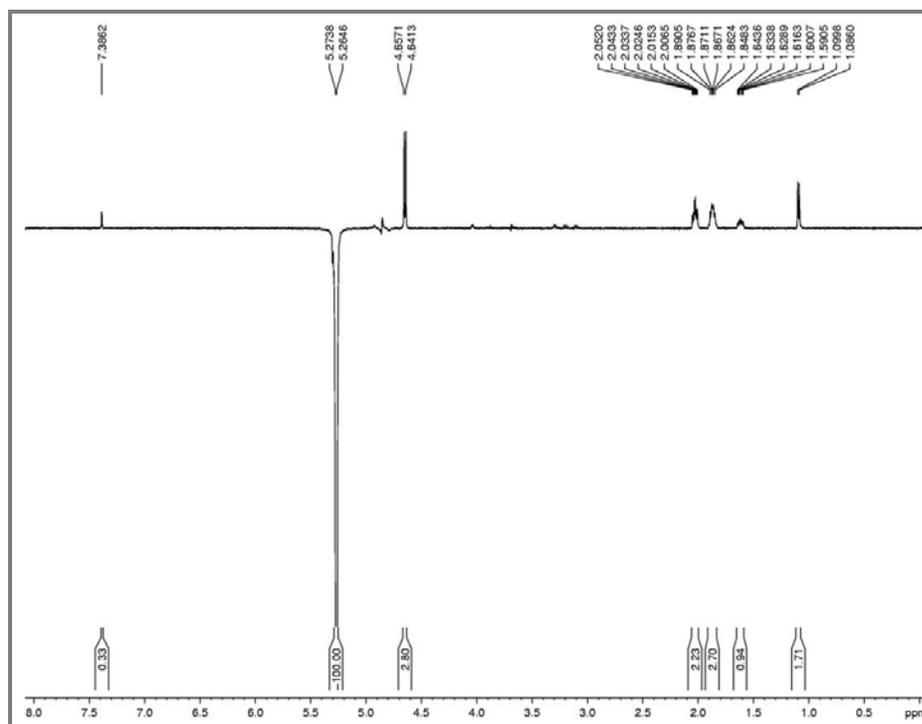


Figura 199 - Espectro de NOE Seletivo de AP-7, com irradiação no hidrogênio em δ_H 4,65 (H-1') (CD₃OD, 500 MHz).

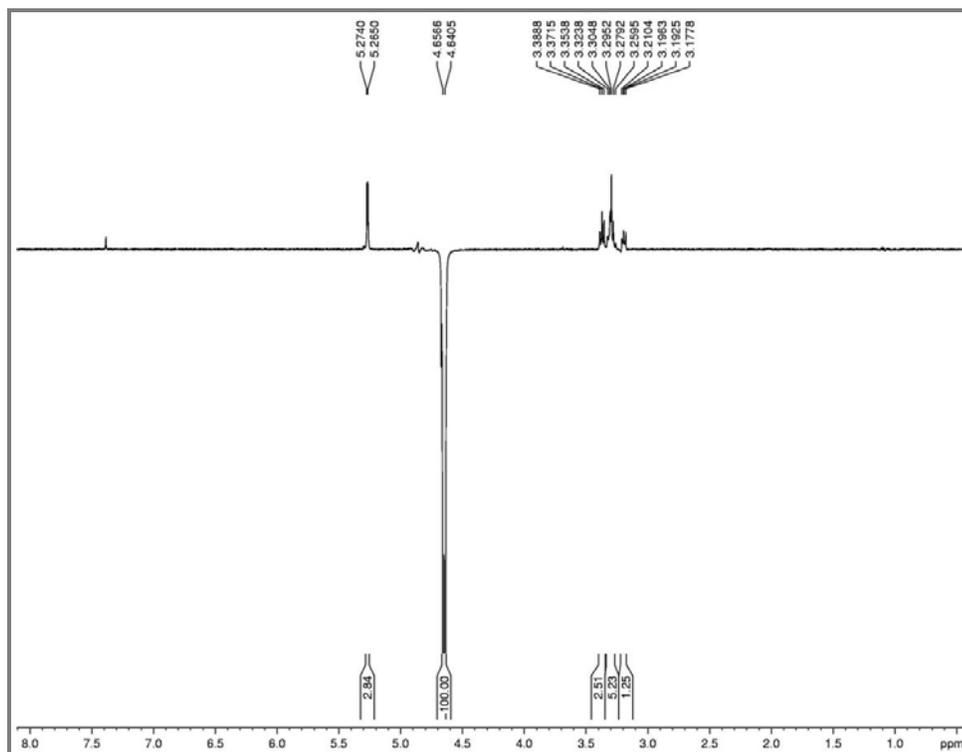


Figura 200 - Espectro de NOE Seletivo de AP-7, com irradiação no hidrogênio em δ_H 4,04 (H-7) (CD₃OD, 500 MHz).

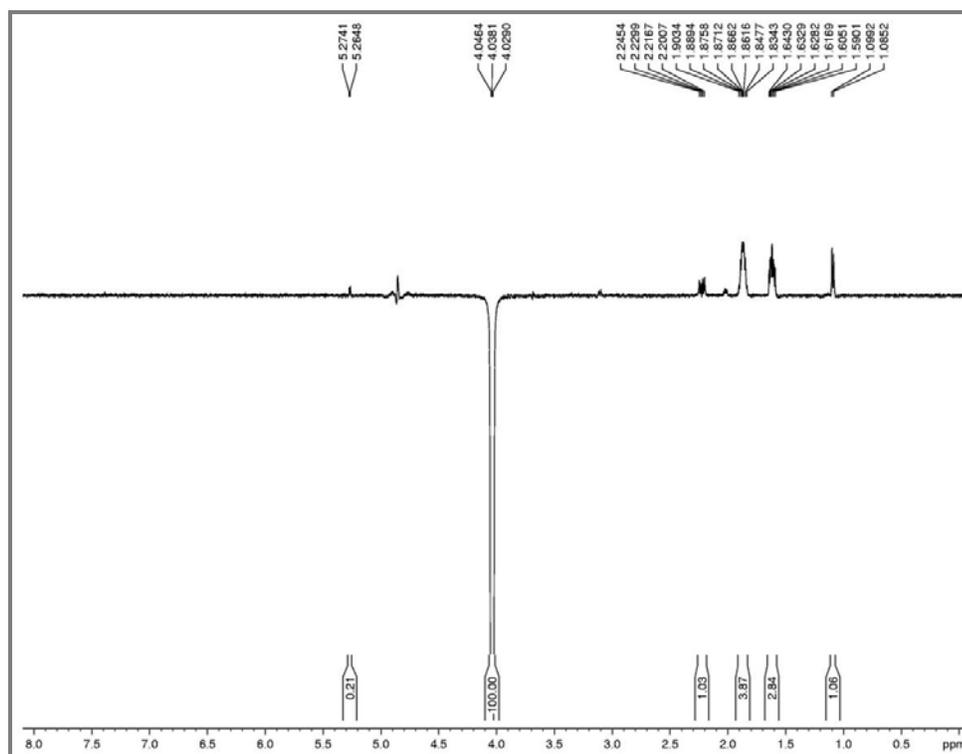


Figura 201 - Espectro de NOE Seletivo de AP-7, com irradiação no hidrogênio em δ_H 3,11 (H-5) (CD_3OD , 500 MHz).

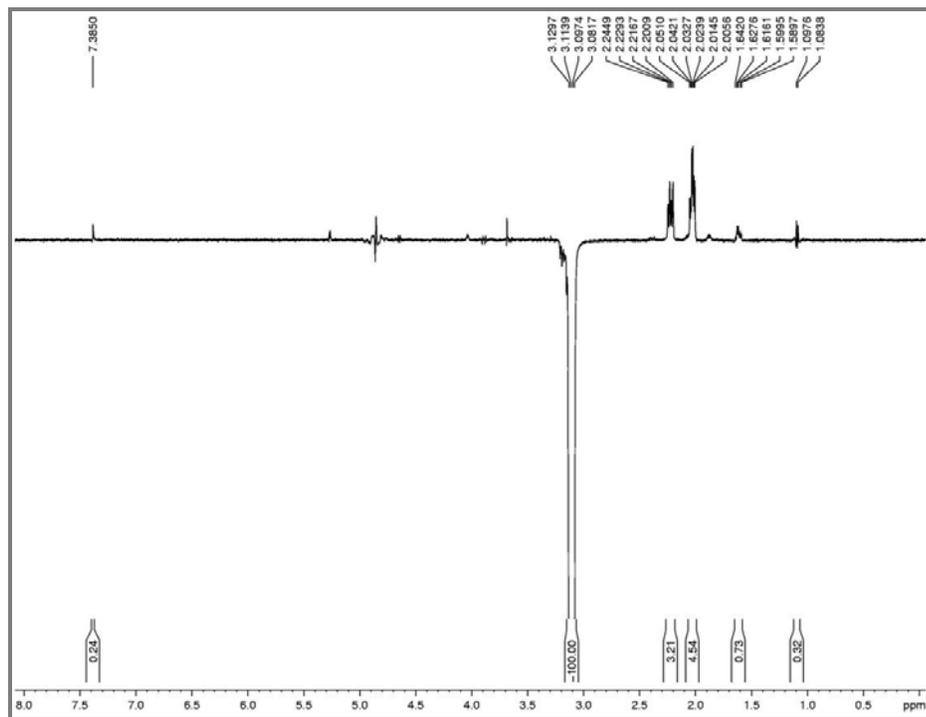


Figura 202 - Espectro de NOE Seletivo de AP-7, com irradiação no hidrogênio em δ_H 2,03 (H-9) (CD_3OD , 500 MHz).

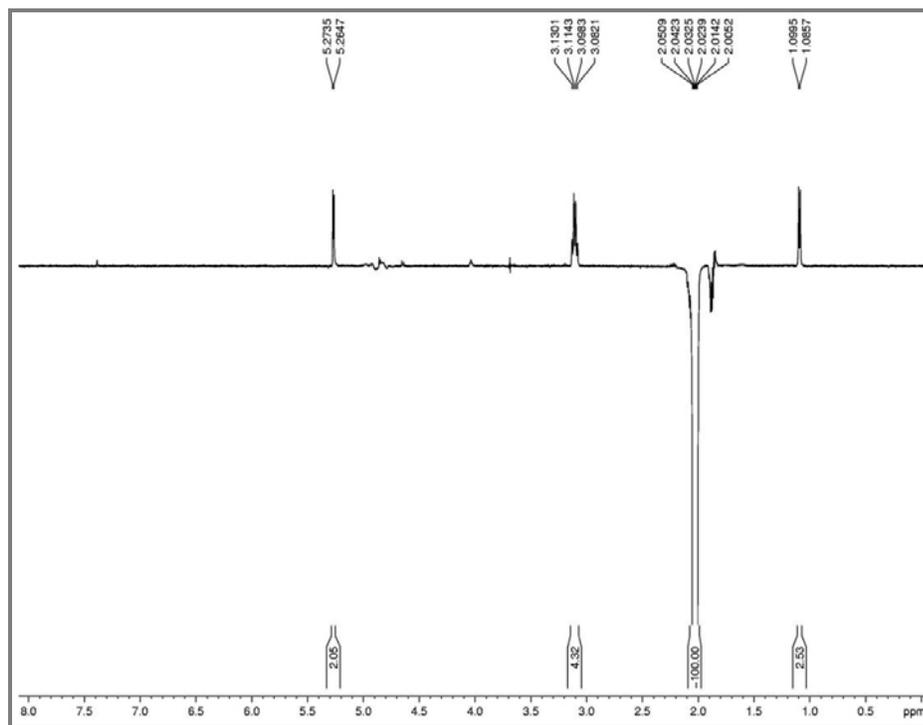


Figura 203 - Espectro de NOE Seletivo de AP-7, com irradiação no hidrogênio em δ_H 1,87 (H-8) (CD₃OD, 500 MHz).

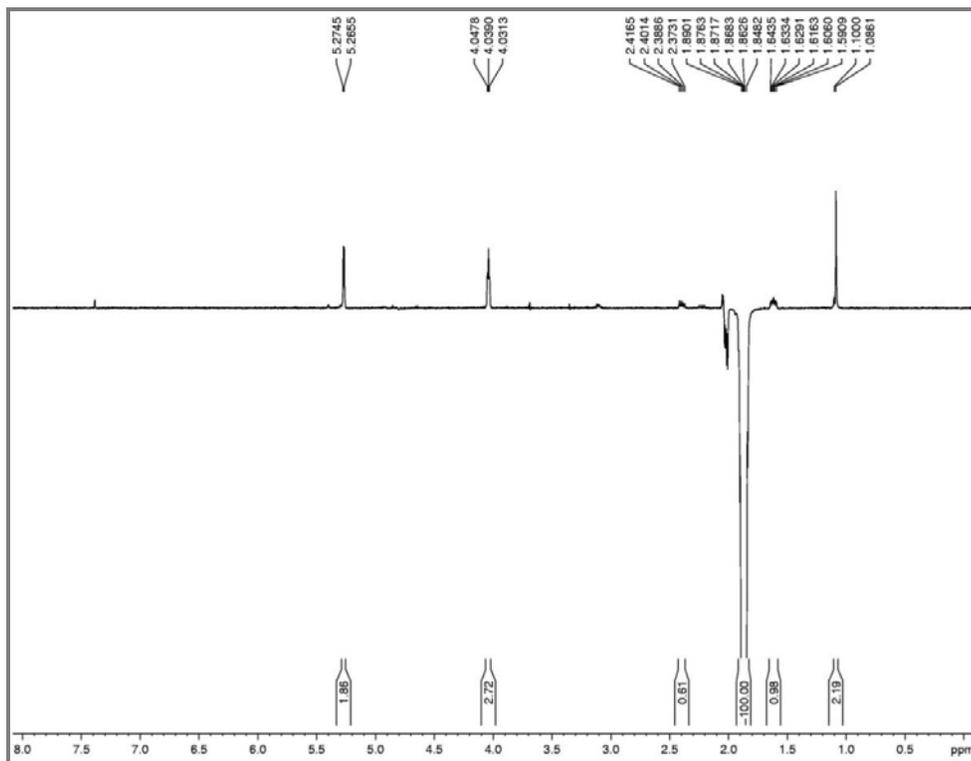


Figura 204 - Espectro de NOE Seletivo de AP-7, com irradiação no hidrogênio em δ_H 1,62 (H-6 α) (CD₃OD, 500 MHz).

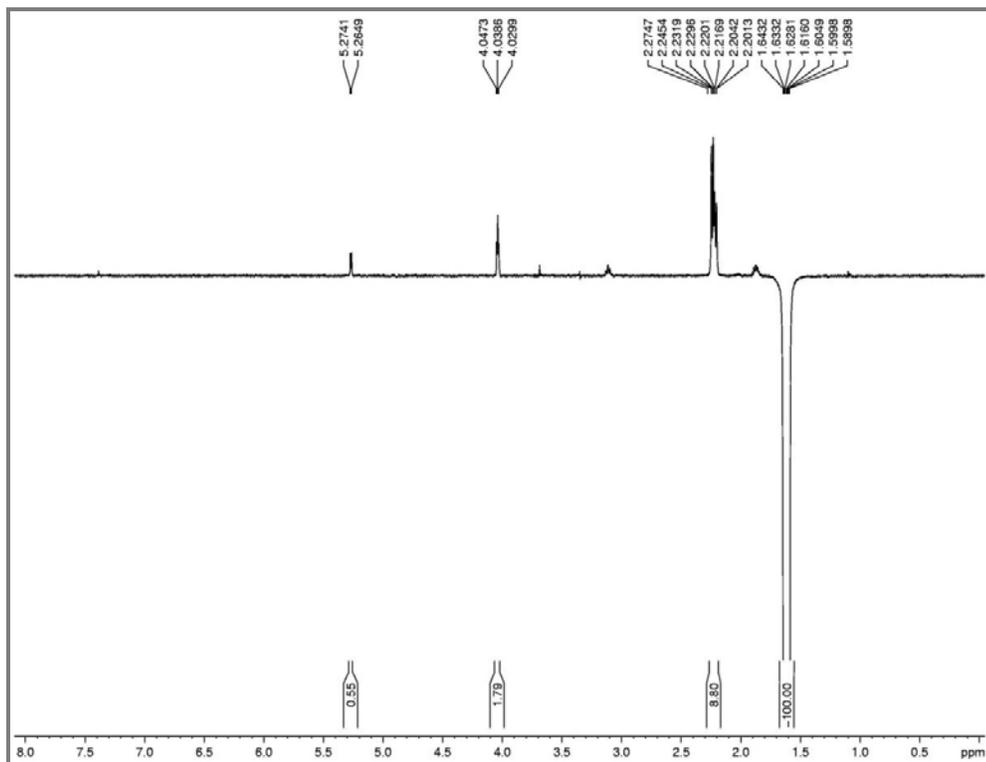
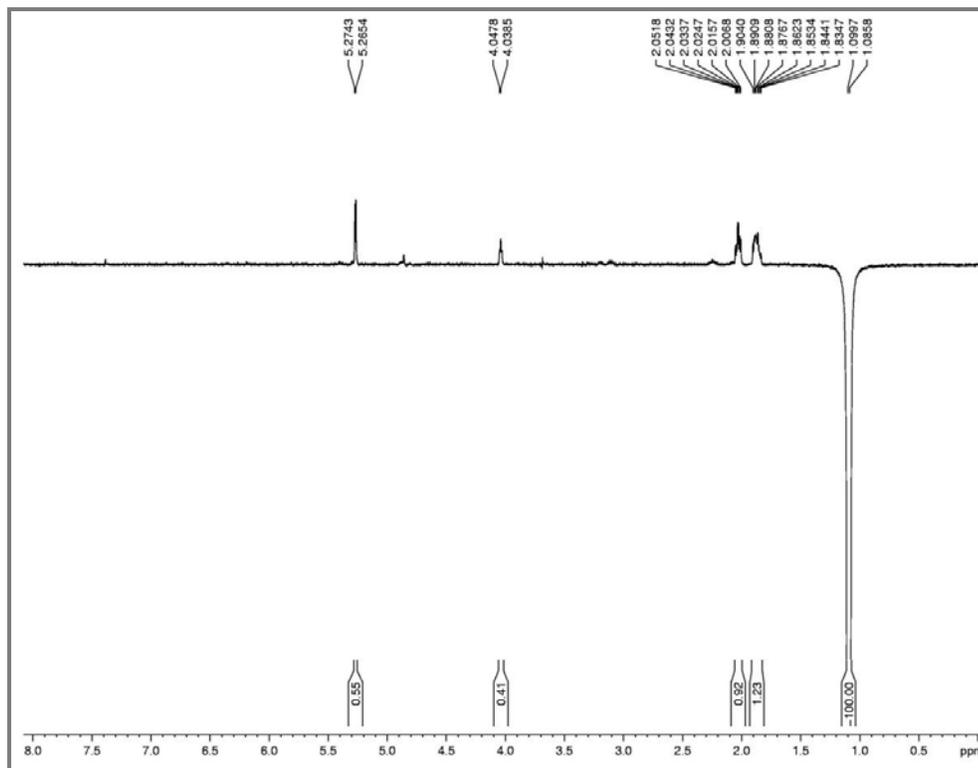


Figura 205 - Espectro de NOE Seletivo de AP-7, com irradiação no hidrogênio em δ_H 1,09 (H-10) (CD_3OD , 500 MHz).



4.11 Determinação estrutural de AP-6

O composto AP-6 foi isolado na mesma corrida cromatográfica que rendeu AP-7, utilizando-se como fase móvel uma mistura de 15% de CH₃CN e 85% de solução aquosa ácida de TFA 0,2% (ver Parte Experimental, p. 227). Ele mostrou-se como um sólido amorfo acinzentado, com ponto de fusão 127,5-129,5 °C e $[\alpha]_D^{20} = -71,9^\circ$ (*c* 0,215, MeOH) { $[\alpha]_D = -67,5^\circ$; *c* 0,2, MeOH (RASHID *et al.*, 1996)}.

Sua fórmula molecular, C₁₃H₁₆O₉ (IDH = 6), foi deduzida a partir do pico da molécula desprotonada [M – H]⁻ em *m/z* 315,0723 (calculada 315,0716), visualizado no espectro de massa de alta resolução (Figura 208, p. 201), obtido por ESI em modo negativo. O espectro obtido no modo positivo mostrou os picos dos adutos de sódio [M + Na]⁺ em *m/z* 339,0681 (calculada 339,0692) e de potássio [M + K]⁺ em *m/z* 355,2402 (calculada 355,0431).

O espectro na região do infravermelho de AP-6 (Figura 209, p. 201) exibiu uma banda fina em 3529 cm⁻¹, típica de deformação axial de ligação O-H livre, e uma banda larga centrada em 3239 cm⁻¹, típica de deformação axial de ligação O-H de dímero, que somada à banda em 1707 cm⁻¹, característica de ligação C=O, sugeriu a presença de um ácido carboxílico conjugado no composto. Bandas típicas de ligações C=C de anel aromático foram vistas em 1586, 1499 e 1468 cm⁻¹. As bandas em 1075, 1051 e 1032 cm⁻¹ foram associadas a deformações axiais de ligações C-O.

O espectro de RMN ¹H de AP-6 (Figura 210, p. 202) mostrou dois sinais duplos dupletos em δ_H 7,55 (*J* = 8,0; 1,0 Hz, H-6) e 7,39 (*J* = 8,0; 1,0 Hz, H-4) e um sinal tripleto em δ_H 6,84 (*J* = 8,0 Hz, H-5), os quais sugeriram a presença de um anel benzênico 1,2,3-trissubstituído. Além destes, foram vistos um sinal duplete em δ_H 4,91 (*J* = 7,3 Hz, H-1'), superposto pela água presente no metanol deuterado, dois duplos dupletos em δ_H 3,89 (*J* = 12,0; 1,0 Hz, H-6'a) e 3,70 (*J* = 12,0; 5,0 Hz, H-6'b), e alguns multipletos entre 3,6 e 3,3 ppm (Tabela 14, p. 200).

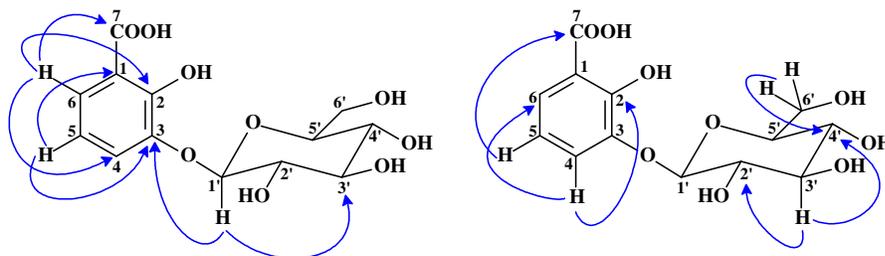
O espectro COSY de AP-6 (Figura 211, p. 202) exibiu os acoplamentos *orto* entre os hidrogênios de carbonos aromáticos em δ_H 7,55 (H-6) e 7,39 (H-4) com 6,84 (H-5), e o acoplamento *meta* entre o hidrogênio em δ_H 7,55 com 7,39. Outro importante acoplamento foi visualizado entre o hidrogênio anomérico em δ_H 4,91 (H-1') com o hidrogênio em δ_H 3,51 (H-2'), correspondente a um acoplamento *trans*-diaxial, justificado pelo valor da constante de acoplamento (*J* = 7,3 Hz), indicativo de uma glicose β-ligada.

A análise do espectro de RMN ^{13}C -CPD (Figura 212, p. 203) mostrou 13 linhas espectrais, e por comparação com o espectro DEPT 135 (Figura 212, p. 203) permitiu a identificação de quatro sinais de carbonos não-hidrogenados, oito de carbonos mono-hidrogenados e um de carbono metilênico (Tabela 14, p. 200). Dentre os carbonos não-hidrogenados, o sinal em δ_{C} 173,7 (C-7) ratificou a proposição de uma carboxila para o composto, e os sinais em δ_{C} 153,4 (C-2) e 147,2 (C-3) foram atribuídos a carbonos oxigenados, um ligado ao grupo *O*-glicosílico e o outro possivelmente ligado a uma hidroxila. O sinal em δ_{C} 115,1 (C-1) apresentou uma intensidade muito baixa, porém foi confirmado por correlação vista no espectro HMBC.

As correlações a uma ligação, vistas no espectro HSQC (Figura 213, p. 203), dos hidrogênios em δ_{H} 3,43 (H-5'), 3,50 (H-3'), 3,51 (H-2') e 3,43 (H-4') com os carbonos metínicos oxigenados em δ_{C} 78,3 (C-5'), 77,8 (C-3'), 74,9 (C-2') e 71,4 (C-4'), respectivamente, juntamente com as correlações dos hidrogênios em δ_{H} 3,89 (H-6'a) e 3,70 (H-6'b) com o carbono oximetilênico em δ_{C} 62,6 (C-6'), e em δ_{H} 4,91 (H-1') com o carbono oximetínico em δ_{C} 103,2 (C-1'), confirmaram a presença da unidade de β -D-glicose.

Então, a análise dos dados acima permitiu propor os três substituintes para o anel benzênico trissubstituído, cujos assinalamentos das posições foram feitos a partir da análise do espectro HMBC (Figura 214, p. 204). Neste, o hidrogênio em δ_{H} 7,55 (H-6) correlacionou a três ligações com a carboxila em δ_{C} 173,7 (C-7), com o carbono oxigenado em δ_{C} 153,4 (C-2) e com o carbono em δ_{C} 123,7 (C-4), ratificando que H-6 encontrava-se posicionado *orto* à carboxila e *meta* à hidroxila. A correlação do hidrogênio anomérico em δ_{H} 4,91 (H-1') com o carbono em δ_{C} 147,2 (C-3), a três ligações, estabeleceu a ligação da molécula de glicose neste carbono. O hidrogênio em δ_{H} 6,84 (H-5) correlacionou a $^3J_{\text{CH}}$ com os carbonos em δ_{C} 115,1 (C-1) e 147,2 (C-3), e a $^4J_{\text{CH}}$ com a carboxila C-7. O hidrogênio em δ_{H} 7,39 (H-4) correlacionou a $^3J_{\text{CH}}$ com os carbonos em δ_{C} 153,4 (C-2) e 125,2 (C-6). A Figura 206 ilustra essas correlações e algumas outras descritas na Tabela 14 (p. 200).

Figura 206 - Estruturas com setas mostrando correlações ^1H - ^{13}C à longa distância, observadas no espectro HMBC de AP-6.



O conjunto de todos os dados permitiu identificar o composto AP-6 como o ácido 2-hidroxi-3-*O*- β -D-glicopiranosiloxi-benzóico (Figura 207), também conhecido por ácido 3-*O*- β -D-glicosido pirocatecúico, isolado das folhas de *Vinca minor* (Apocinaceae) (KING; GILKS; PARTRIDGE, 1955), da casca do caule de *Strychnos cocculoides* (Loganiaceae) (SUNGHWA; KOKETSU, 2009), dos galhos de *Geniostoma antherotrichum* (Loganiaceae) (RASHID *et al.*, 1996) e dos frutos de *Boreava orientalis* (Cruciferae) (SAKUSHIMA; COSKUN; MAOKA, 1995), porém inédito em *Aspidosperma pyriformium*.

Figura 207 - Estrutura do composto AP-6, identificado como o ácido 2-hidroxi-3-*O*- β -D-glicopiranosiloxi-benzóico.

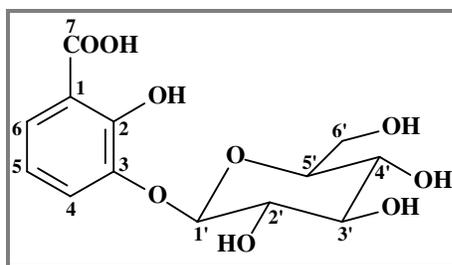


Tabela 14 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C do composto AP-6 (300 e 75 MHz, CD_3OD), correlações à longa distância vistas no espectro HMBC e comparação com os valores de RMN ^{13}C da literatura.

AP-6							
	HSQC		HMBC		Lit.		
	δ_{C}	δ_{H} (mult, J, H)	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}^1	δ_{C}^2	δ_{C}^3
1	115,1	—		H-5	120,4	115,6	117,1
2	153,4	—		H-4; H-6	152,9	152,2	151,9
3	147,2	—	H-4	H-5; H-1'	146,8	146,5	145,8
4	123,7	7,39 (dd, 8,0; 1,0 Hz, 1H)	H-5	H-6	121,3	122,7	124,3
5	119,9	6,84 (t, 8,0 Hz, 1H)			118,5	120,1	117,1
6	125,2	7,55 (dd, 8,0; 1,0 Hz, 1H)		H-4	125,1	125,2	119,9
7	173,7	—		H-6	175,5	173,7	174,6
1'	103,2	4,91 (d, 7,3 Hz, 1H)	H-2'		103,4	102,4	102,5
2'	74,9	3,51 (m, 1H)	H-3'		74,2	74,3	73,7
3'	77,8	3,50 (m, 1H)	H-2'	H-1'; H-5'	77,0	77,0	76,4
4'	71,4	3,43 (m, 1H)	H-3'	H-6'a; H-6'b	70,9	70,8	70,2
5'	78,3	3,43 (m, 1H)	H-6'b		78,0	77,6	77,1
6'a	62,6	3,89 (dd, 12,0; 1,0 Hz, 1H)			61,5	61,9	61,3
6'b		3,70 (dd, 12,0; 5,0 Hz, 1H)					

¹ RASHID *et al.*, 1996 (CD_3OD , 125 MHz).

² SAKUSHIMA; COSKUN; MAOKA, 1995 ($\text{CD}_3\text{OD} + \text{H}_2\text{O}$ 1:1, 100 MHz).

³ SUNGHWA; KOKETSU, 2009 (CD_3OD , 150 MHz).

Figura 208 - Espectro de massa de alta resolução de AP-6, obtido por ESI em modo positivo (A) e modo negativo (B).

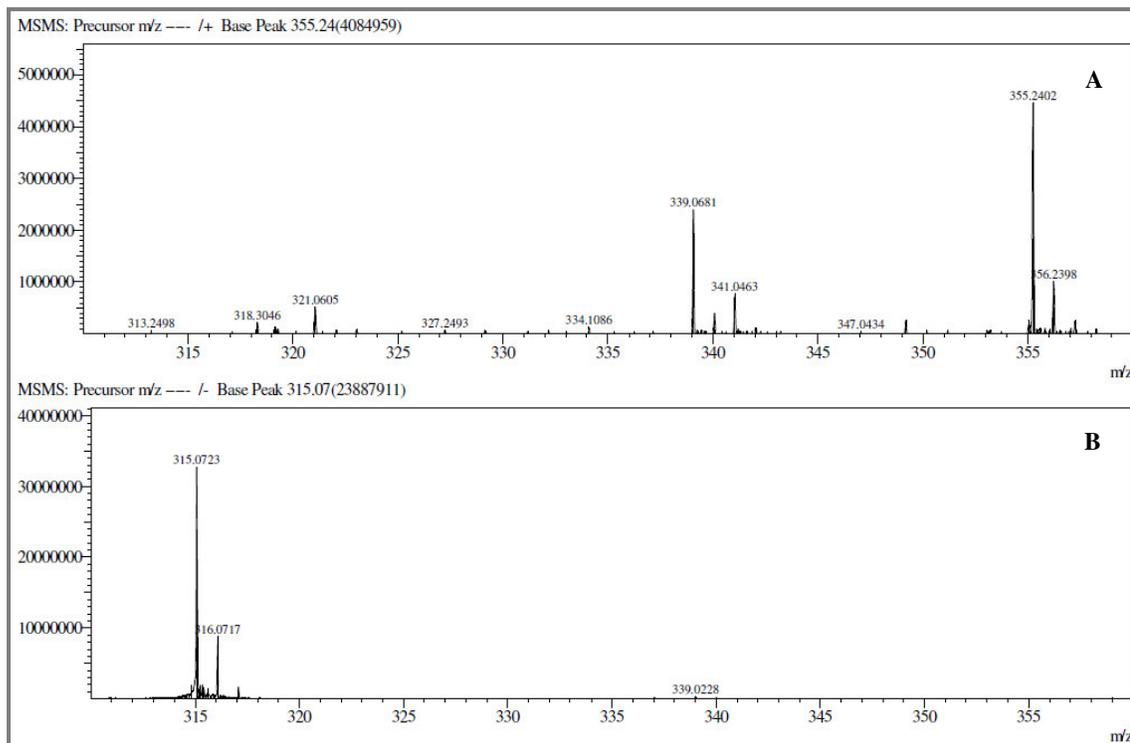


Figura 209 - Espectro na região do infravermelho de AP-6 (obtido no suporte UATR).

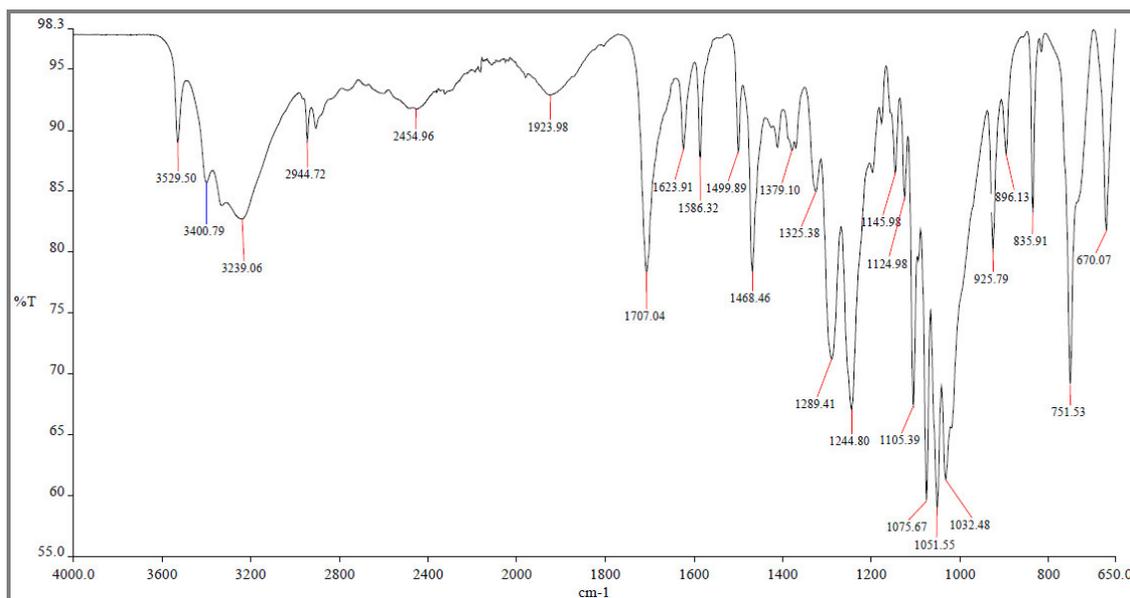


Figura 210 - Espectro de RMN ¹H de AP-6 (CD₃OD, 300 MHz).

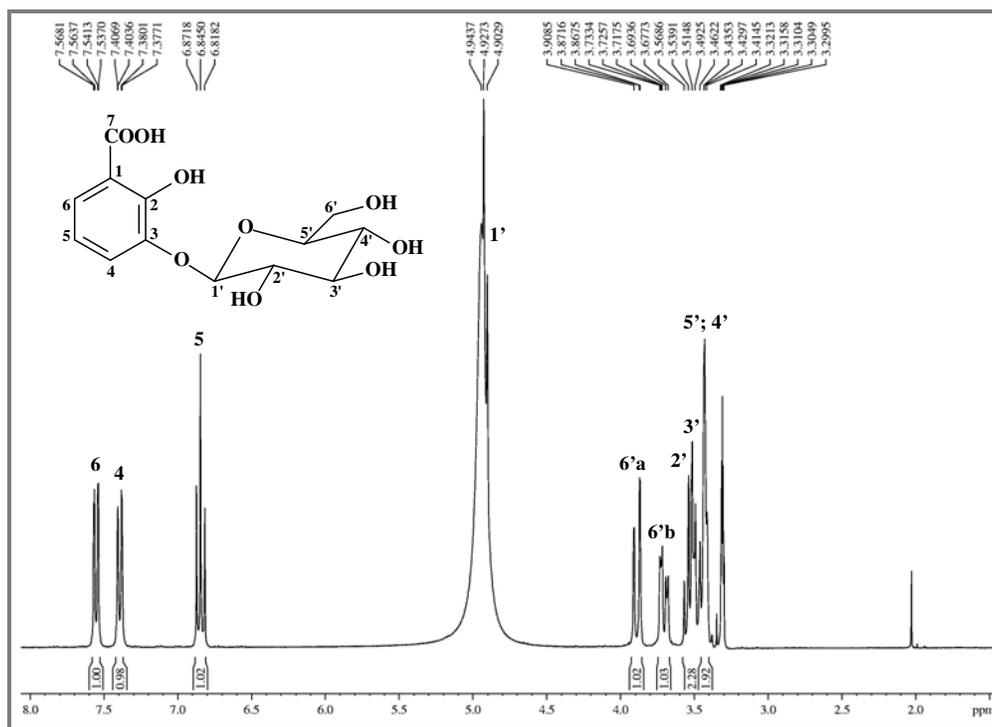


Figura 211 - Espectro de RMN 2D ¹H, ¹H-COSY de AP-6 (CD₃OD, 300 x 300 MHz).

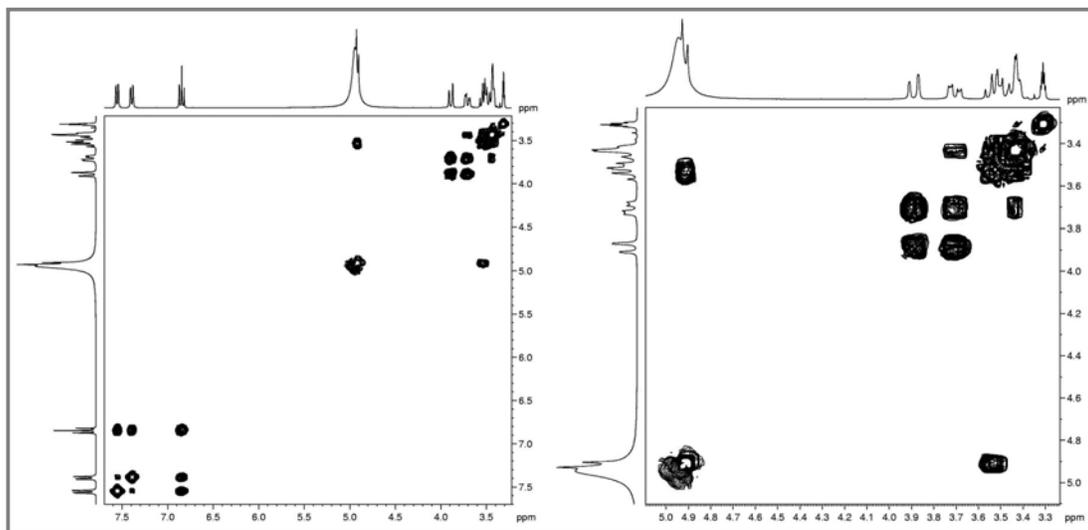


Figura 212 - Espectro de RMN ^{13}C -CPD (A) e DEPT 135 (B) de AP-6 (CD_3OD , 75 MHz).

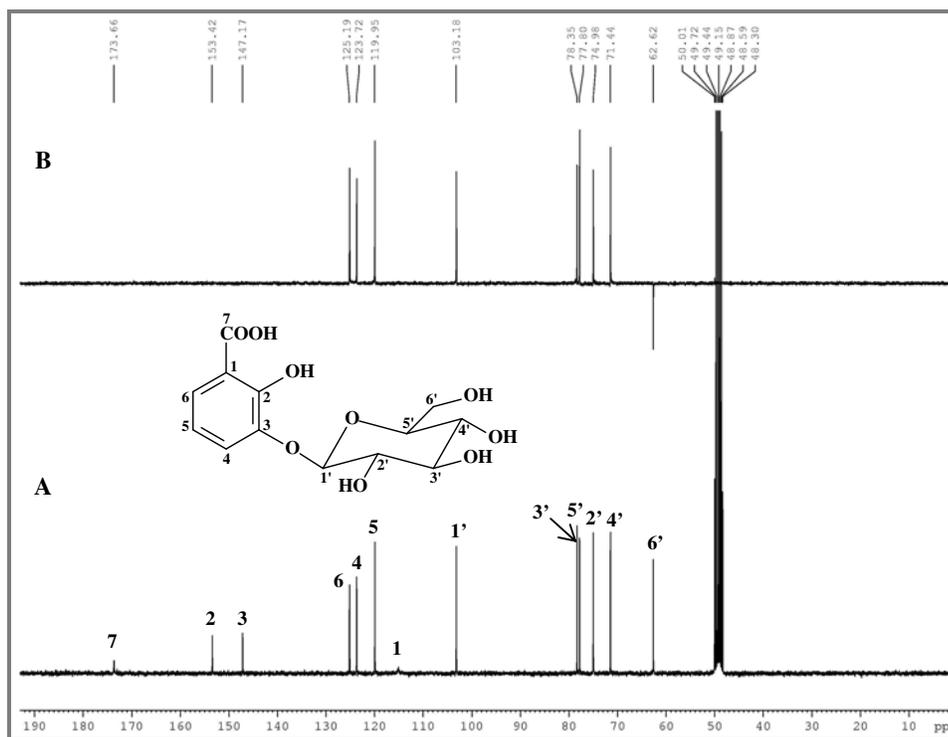


Figura 213 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC de AP-6 (CD_3OD , 300 x 75 MHz) e expansão.

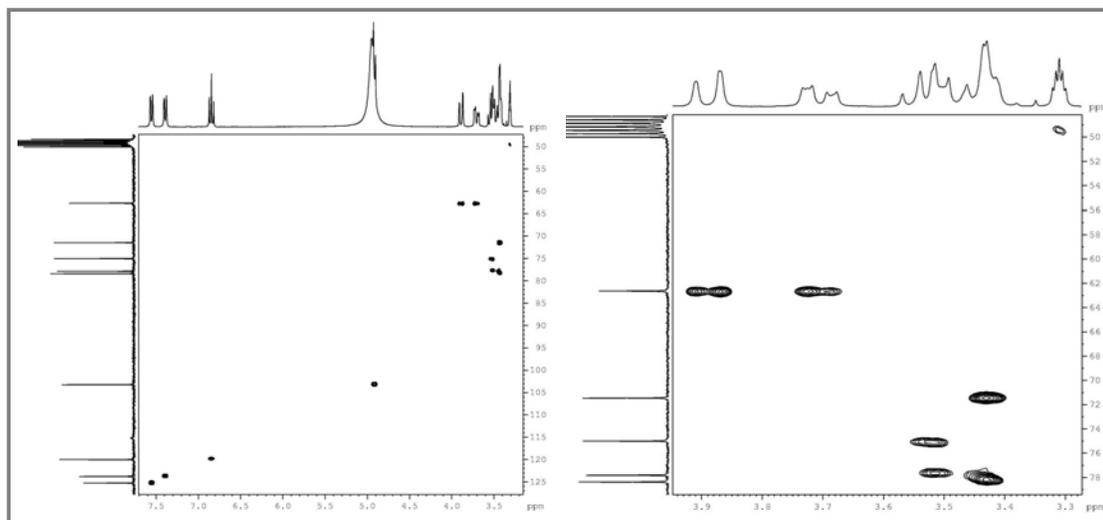
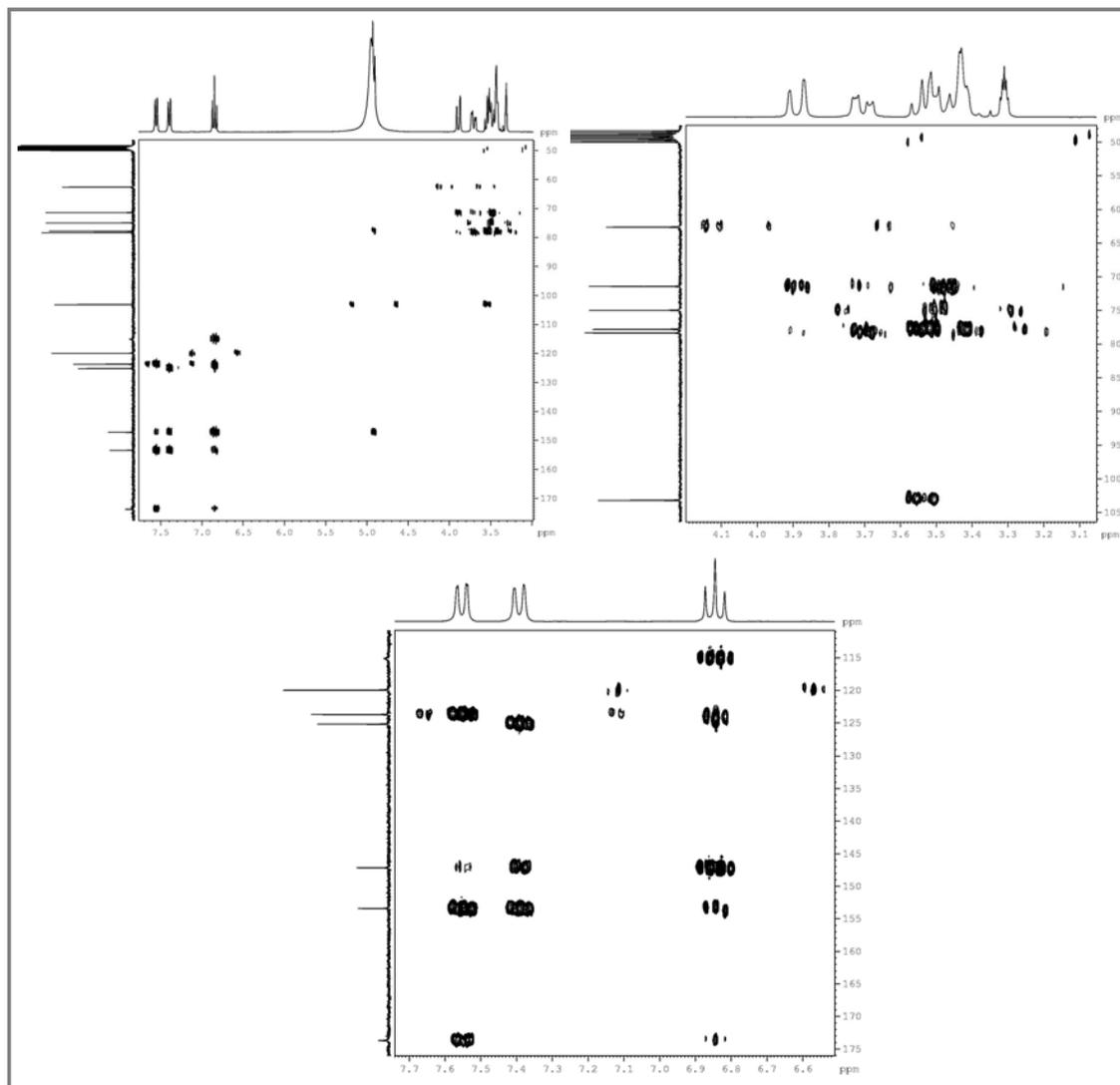


Figura 214 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de AP-6 (CD_3OD , 300 x 75 MHz) e expansões.



4.12 Determinação estrutural de AP-12

O composto AP-12 foi obtido por precipitação no extrato APSE (ver Parte Experimental, p. 220). Ele apresentou aspecto cristalino, ponto de fusão 192,0-193,5 °C e $[\alpha]_D^{20} = -81,1^\circ$ (c 0,16, H₂O) $\{[\alpha]_D^{25} = -84^\circ$; c 0,16, H₂O (DÍAZ *et al.*, 2008)}.

O espectro de massa de alta resolução de AP-12 (Figura 217, p. 208), obtido por ESI em modo positivo, mostrou o pico da molécula cationizada $[M + Na]^+$ em m/z 217,0600 (calculada 217,0683), permitindo deduzir a fórmula molecular C₇H₁₄O₆ para o composto, cujo IDH é 1.

O espectro de RMN ¹H de AP-12 (Figura 218, p. 208, e Figura 219, p. 209) exibiu apenas seis sinais, em região típica de hidrogênios ligados a carbonos oxigenados. Como sinais mais desblindados, foram observados dois tripletos em δ_H 4,29 (H-1) e 4,08 (H-6), acoplando com constantes de 3,3 Hz. Dois duplos dupletos foram observados em δ_H 3,76 (H-5) e 3,42 (H-2), referentes a hidrogênios acoplando com constantes de acoplamentos de 9,6 e 3,3 Hz. Além destes, foi visto um triplete em δ_H 3,63 ($J = 6,0$ Hz, H-3 e H-4), com integração para dois hidrogênios, e um simpleto em δ_H 3,47, que foi associado à presença de metoxila, devido à integração para três hidrogênios.

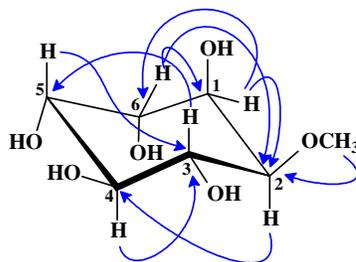
O espectro de RMN ¹³C-CPD de AP-12 (Figura 220, p. 209) mostrou sete sinais, em concordância com a fórmula deduzida a partir do espectro de massa, todos com deslocamentos químicos característicos de carbonos oxigenados (Tabela 15, p. 207). A análise dos espectros DEPT 135 (Figura 221, p. 210) e HSQC (Figura 222, p. 210) possibilitou identificar seis sinais de carbonos oximetínicos em δ_C 80,1 (C-2), 72,8 (C-3), 71,9 (C-4), 71,3 (C-6), 70,3 (C-5) e 67,1 (C-1), e um sinal de carbono metílico em δ_C 56,9, característico de metoxila, já mencionada anteriormente.

Diante desses dados, sugeriu-se para o composto AP-12 uma estrutura similar a uma molécula de açúcar, cuja busca na literatura mostrou valores de RMN ¹³C semelhantes aos de AP-12 (ALMEIDA *et al.*, 2012; DÍAZ *et al.*, 2008; KALLIO *et al.*, 2009), permitindo identificá-lo como o derivado metilado do inositol.

O espectro COSY (Figura 223, p.211) permitiu determinar a vizinhança de cada carbono através dos acoplamentos escalares dos hidrogênios em δ_H 4,29 (H-1) com os hidrogênios em δ_H 4,08 (H-6) e 3,42 (H-2); em δ_H 4,08 (H-6) com o hidrogênio em δ_H 3,76 (H-5), e deste com o hidrogênio em δ_H 3,63 (H-4); em δ_H 3,63 (H-3) com o hidrogênio em 3,42 (H-2).

A análise do espectro HMBC de AP-12 (Figura 224, p. 211) permitiu assinalar corretamente a posição do substituinte metoxila no carbono C-2 (δ_C 80,1), devido à correlação à longa distância entre os hidrogênios em δ_H 3,47 com o referido carbono. Outras correlações que permitiram confirmar a estrutura proposta foram vistas entre os hidrogênios em δ_H 4,29 (H-1) e 4,08 (H-6) com o carbono C-2; δ_H 3,76 (H-5) e 3,63 (H-4) com o carbono em δ_C 72,8 (C-3); δ_H 3,42 (H-2) com o carbono em δ_C 71,9 (C-4); δ_H 4,29 (H-1) com o carbono em δ_C 71,3 (C-6); δ_H 3,63 (H-3) com o carbono em δ_C 70,3 (C-5); δ_H 4,08 (H-6) com o carbono em δ_C 67,1 (C-1) (Figura 215).

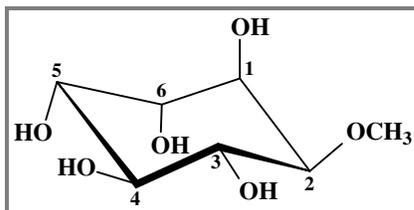
Figura 215 - Correlações à longa distância observadas no espectro HMBC do composto AP-12.



A identificação de qual seria o isômero do metil inositol foi possível pelas multiplicidades dos hidrogênios e suas respectivas constantes de acoplamento. As multiplicidades indicaram o isômero metil-*quiro*-inositol, pois os demais isômeros apresentam outros padrões de multiplicidades para seus hidrogênios (SINGLETON; HOBERG, 2009). Os hidrogênios duplos dupletos H-2 e H-5 mostraram valores de J iguais a 9,6 e 3,3 Hz, condizentes com acoplamentos axial-axial (J grande) e axial-equatorial (J pequeno). Os hidrogênios tripletos H-1 e H-6 mostraram valores de J iguais a 3,3 Hz, indicando acoplamentos equatorial-axial e equatorial-equatorial. Já os hidrogênios tripletos H-3 e H-4 apresentaram valores de J iguais a 6,0 Hz, condizentes com acoplamentos do tipo axial-axial com ambos os hidrogênios vizinhos.

O conjunto de todos os dados, aliado à comparação com os dados da literatura, permitiu identificar o composto AP-12 como o derivado metilado do inositol, o (-)-2-*O*-metil-L-*quiro*-inositol, também conhecido como L-quebrachitol (Figura 216, p. 207), um ciclitol de ocorrência comum em plantas da família Apocinaceae, que foi isolado pela primeira vez de *Aspidosperma quebracho-blanco* (DÍAZ *et al.*, 2008). Este é o primeiro relato de seu isolamento em *A. pyrifolium*.

Figura 216 - Estrutura do composto AP-12, identificado como o ciclitol (-)-2-O-metil-L-quiuro-inositol.


 Tabela 15 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C do composto AP-12 (300 e 75 MHz, D_2O), correlações à longa distância vistas no espectro HMBC e comparação com os dados de RMN ^{13}C da literatura.

AP-12							
	HSQC		HMBC		Lit.		
	δ_{C}	δ_{H} (mult, J, H)	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}^1	δ_{C}^2	δ_{C}^3
1	67,1	4,29 (t, 3,3 Hz, 1H)	H-6		67,2	67,6	69,7
2	80,1	3,42 (dd, 9,6; 3,3 Hz, 1H)	H-1	H-6; OCH ₃	80,2	80,6	82,7
3	72,8	3,63 (t, 6,0 Hz, 1H)	H-4	H-5	72,9	73,3	74,4
4	71,9	3,63 (t, 6,0 Hz, 1H)		H-2	72,0	72,4	75,4
5	70,3	3,76 (dd, 9,6; 3,3 Hz, 1H)		H-3	70,4	70,9	72,9
6	71,3	4,08 (t, 3,3 Hz, 1H)	H-1		71,4	71,8	73,9
OCH₃	56,9	3,47 (s, 3H)			56,9	57,3	59,4

¹ ALMEIDA *et al.*, 2012 (D_2O , 75 MHz).

² DÍAZ *et al.*, 2008 (D_2O , 100 MHz).

³ KALLIO *et al.*, 2009 (D_2O , 100,6 MHz).

Figura 217 - Espectro de massa de alta resolução de AP-12, obtido por ESI em modo positivo.

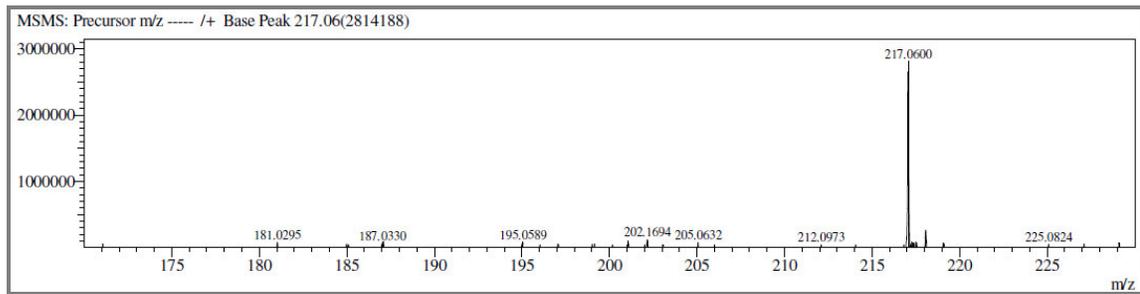


Figura 218 - Espectro de RMN ¹H de AP-12 (D₂O, 300 MHz).

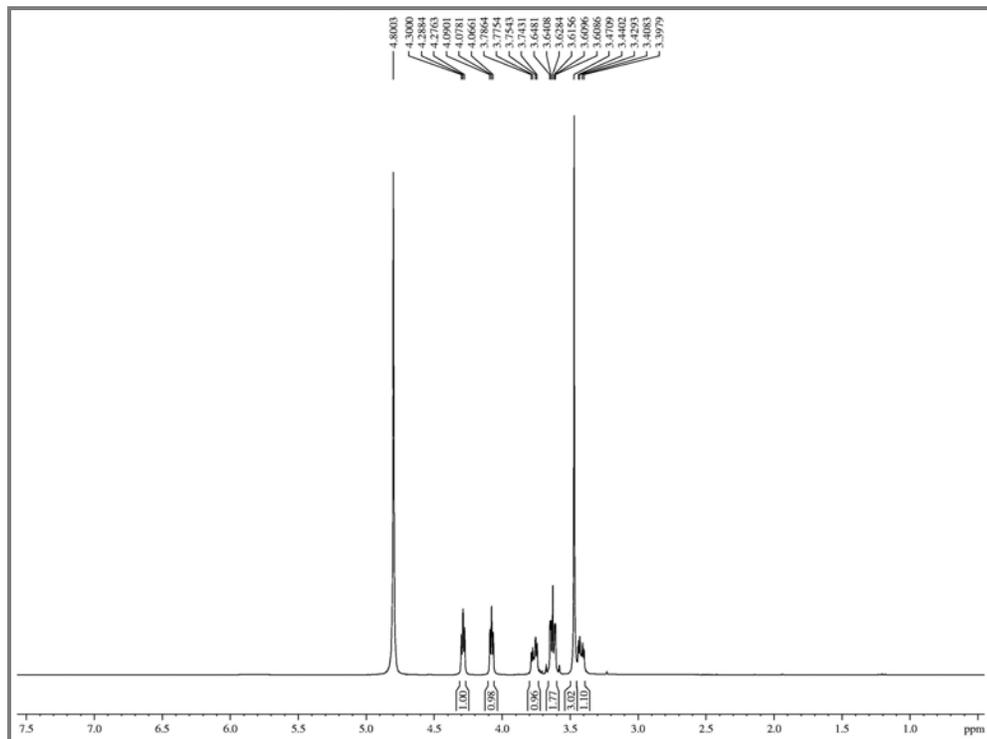


Figura 219 - Expansão do espectro de RMN ^1H de AP-12 (D_2O , 300 MHz).

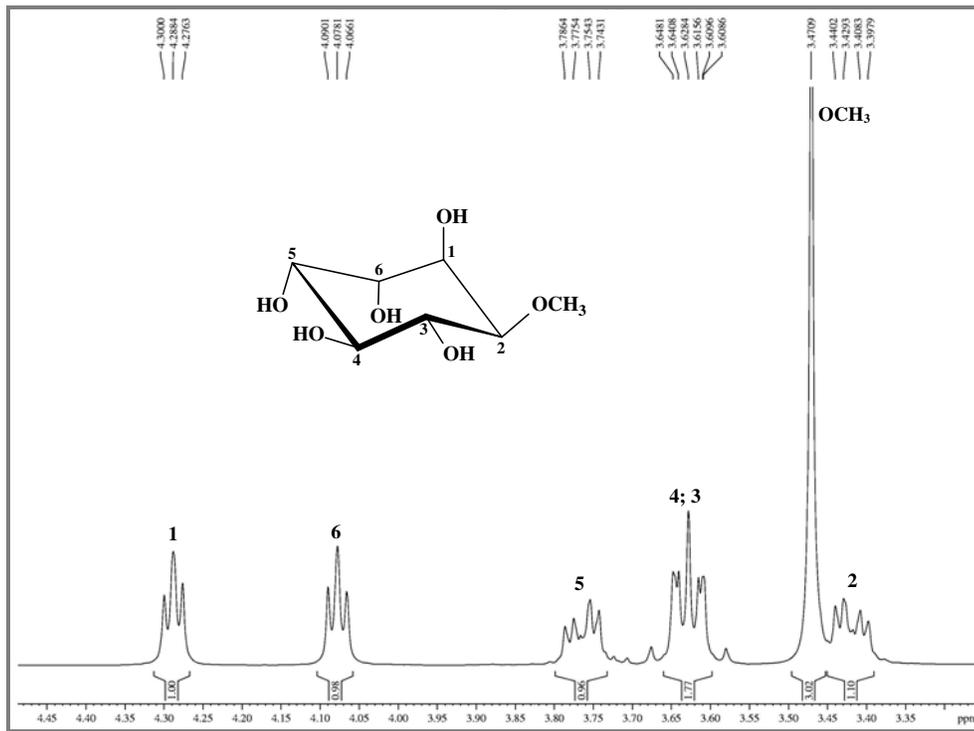


Figura 220 - Espectro de RMN ^{13}C -CPD de AP-12 (D_2O , 75 MHz).

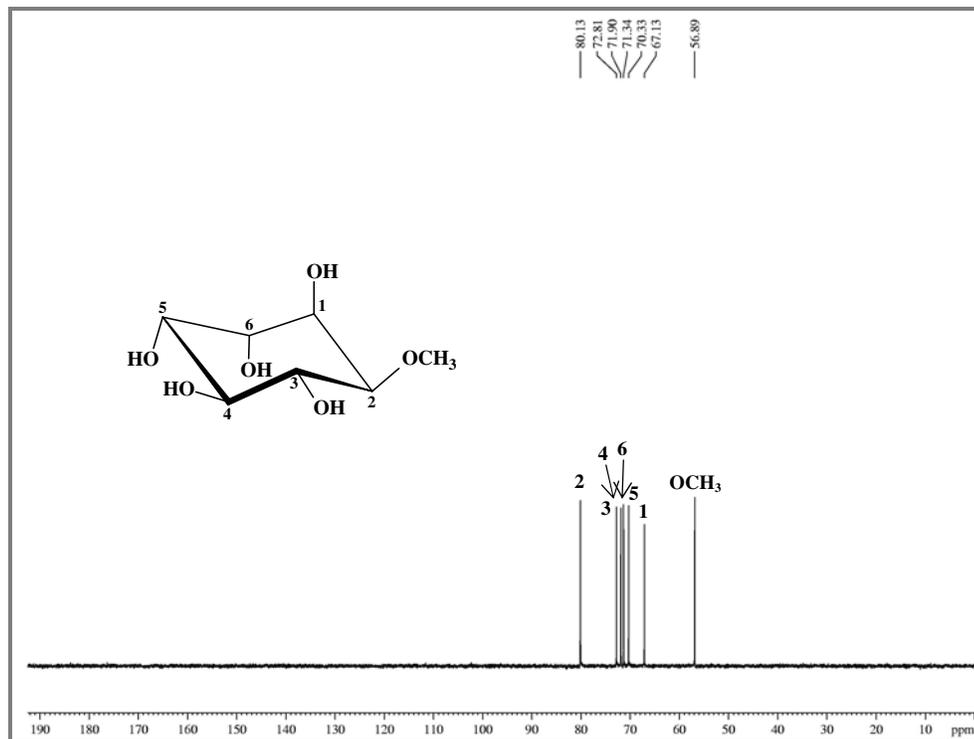


Figura 221 - Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135 de AP-12 (D_2O , 75 MHz).

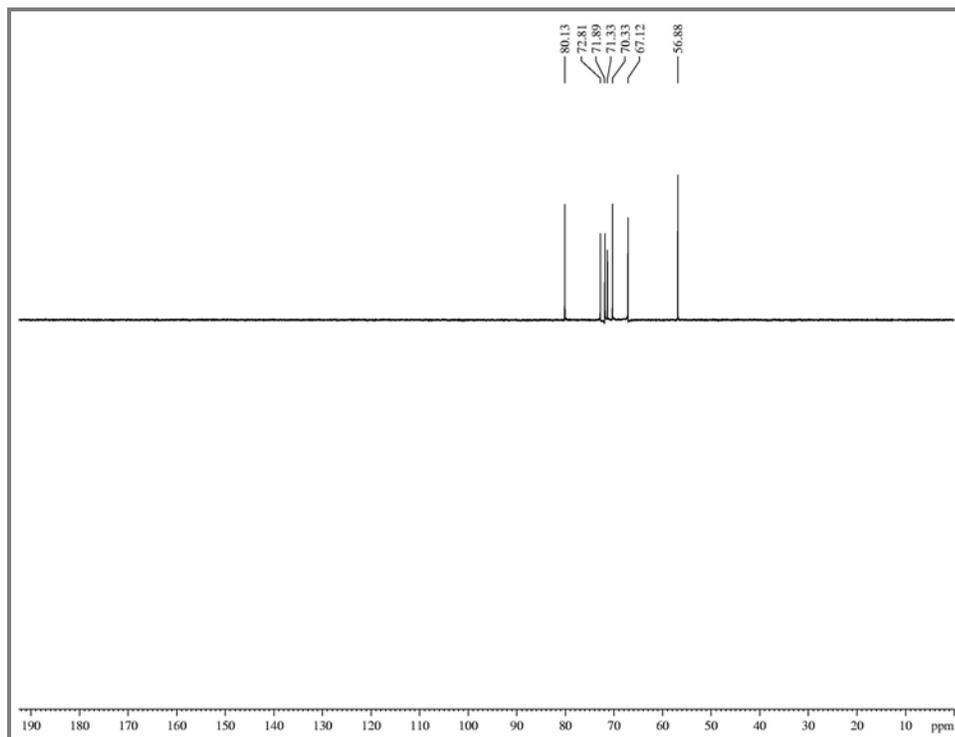


Figura 222 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC de AP-12 (D_2O , 300 x 75 MHz).

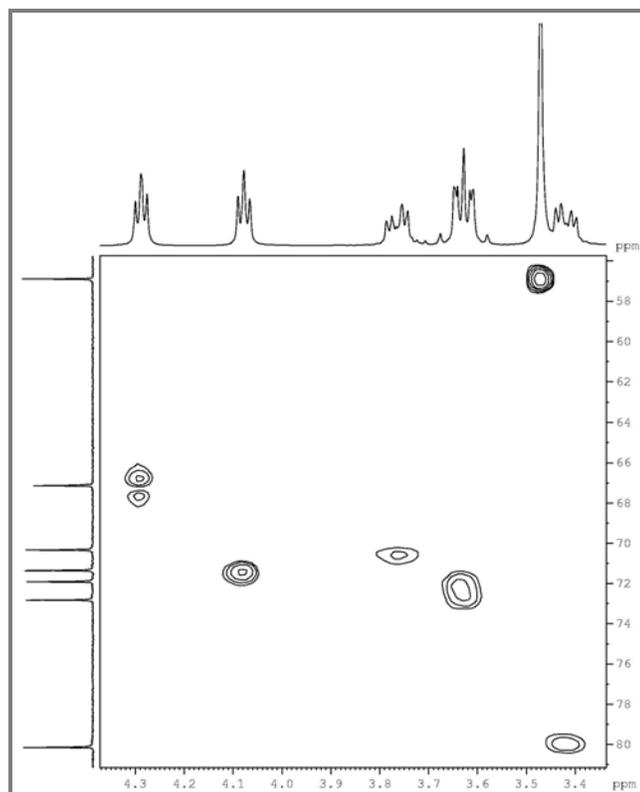


Figura 223 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY de AP-12 (D_2O , 300 x 300 MHz).

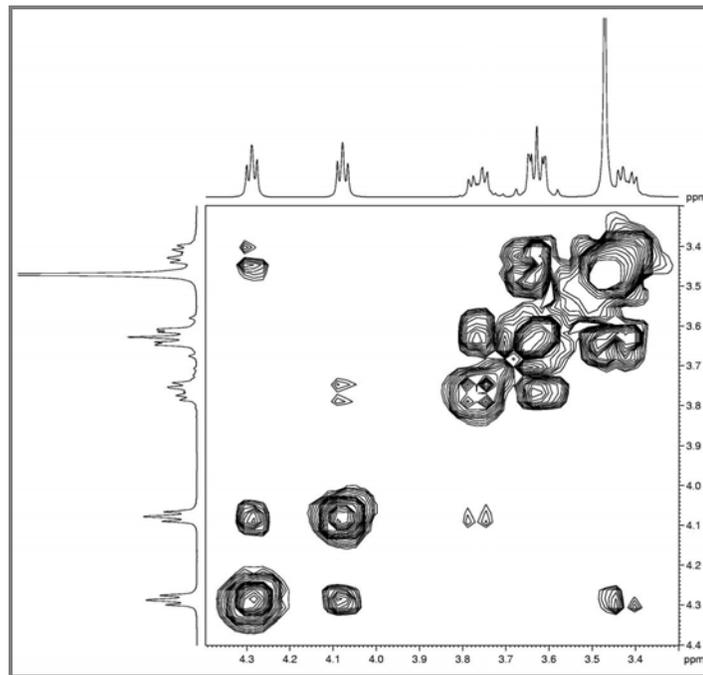
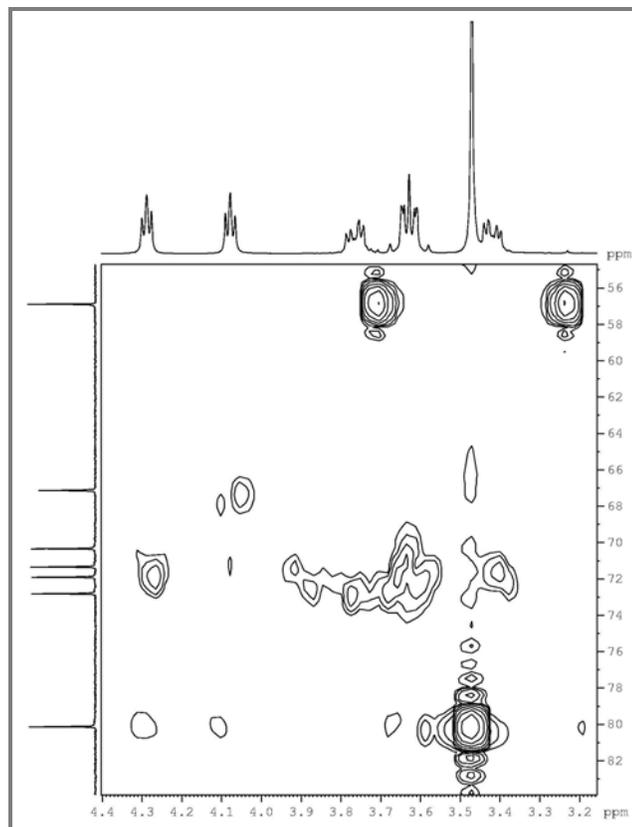
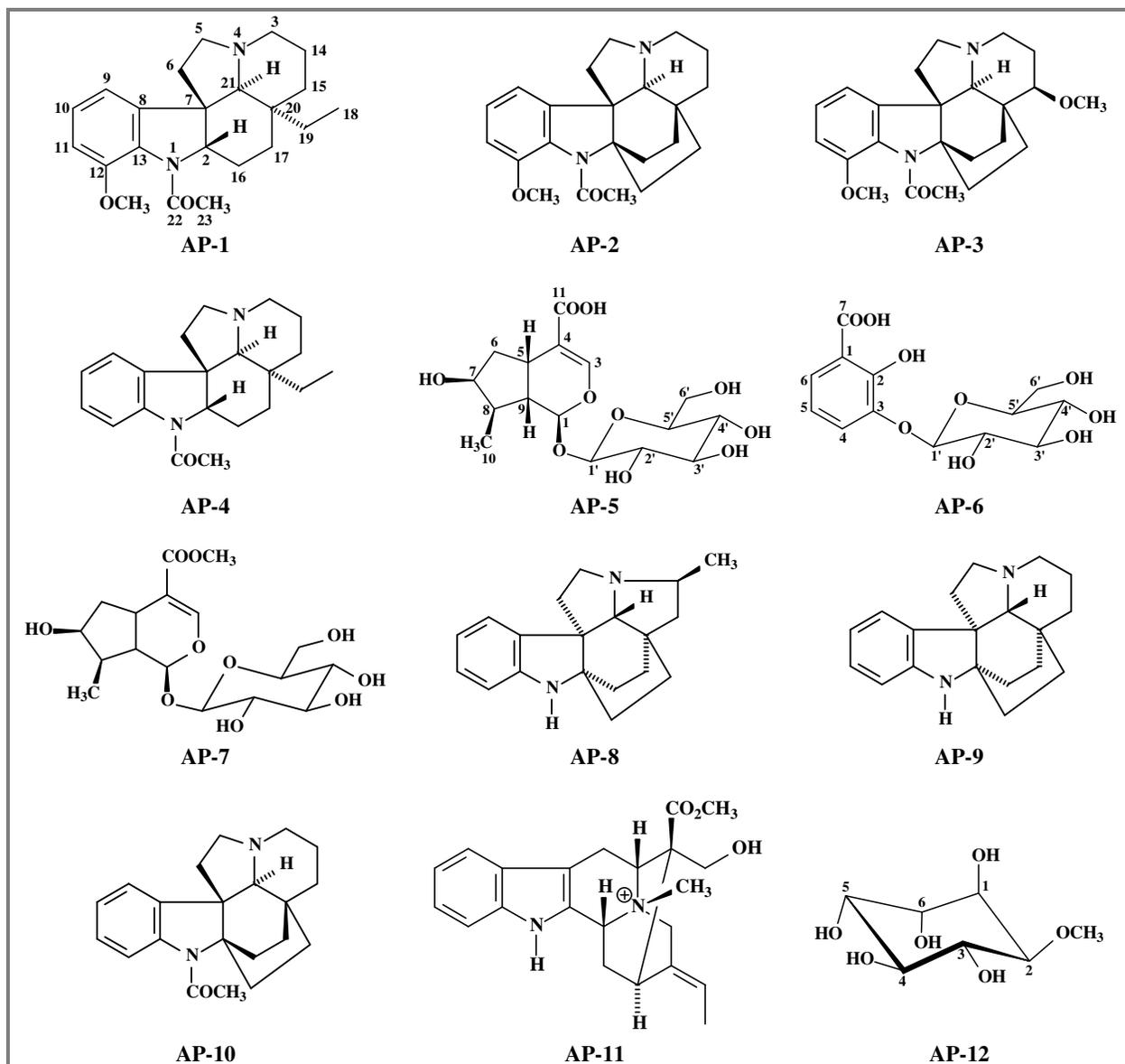


Figura 224 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de AP-12 (D_2O , 300 x 75 MHz).



A Figura 225 mostra todos os compostos isolados e caracterizados neste trabalho.

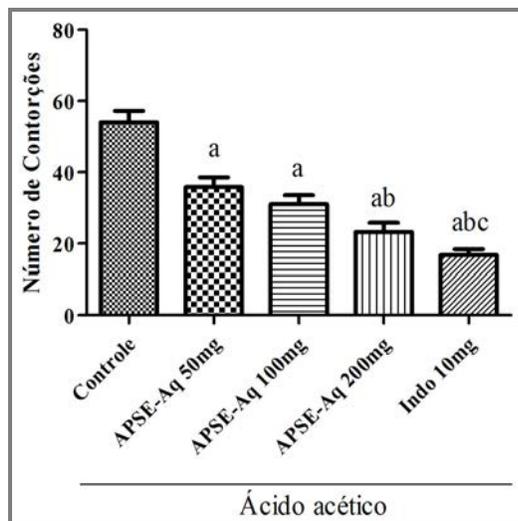
Figura 225 - Compostos isolados a partir do estudo fitoquímico do extrato etanólico das sementes de *Aspidosperma pyrifolium*.



4.13 Atividades antinociceptiva e anti-inflamatória

No teste da contorção abdominal induzida por ácido acético em camudongos “Swiss”, os grupos de animais pré-tratados com diferentes doses de APSE-Aq [50 mg/Kg ($35,83 \pm 2,73$), 100 mg/Kg ($31,00 \pm 2,58$) e 200 mg/Kg ($23,25 \pm 2,56$)] e com indometacina [10 mg/kg ($16,75 \pm 1,65$)] exibiram uma significativa diminuição no número de contorções abdominais induzidas por ácido acético, quando comparado ao grupo tratado somente com o veículo ($54,00 \pm 3,20$). A dosagem de 200 mg/Kg de APSE-Aq, comparada às demais doses, mostrou uma melhor resposta na redução das contorções. Os resultados permitiram concluir que a administração de APSE-Aq mostrou atividade antinociceptiva no modelo animal de dor visceral induzida pela administração de ácido acético (Figura 226).

Figura 226 - O efeito de APSE-Aq na contorção abdominal induzida por ácido acético. Os valores são expressos como média \pm EPM do número de observações. a) versus controle (n = 6); b) versus APSE-Aq 50 mg/Kg (n = 6); c) versus APSE-Aq 100 mg/Kg (n = 5); $P < 0,0001$ (one-way ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keul's *post hoc*).



No teste de nocicepção do modelo da formalina, os grupos tratados com diferentes doses de APSE-Aq, indometacina e morfina (Figura 227, p. 214) diminuíram significativamente o tempo de lambertura durante a fase inicial quando comparado com o controle [Controle: $44,88 \pm 2,46$ (n = 8); APSE-Aq 1 mg: $36,38 \pm 3,78$ (n = 8); APSE-Aq 10 mg: $25,33 \pm 2,34$ (n = 6); APSE-Aq 100 mg: $20,00 \pm 3,24$ (n = 5); Indometacina 10 mg: $20,00 \pm 2,33$ (n = 6); Morfina 5 mg: $19,25 \pm 2,28$ (n = 5)]. Em contraste, na fase final somente os grupos tratados com a dose de 100 mg/Kg de APSE-Aq, e com indometacina e morfina, diminuíram significativamente o tempo de lambertura quando comparado com o controle [Controle: $22,40 \pm 2,50$ (n = 6); APSE-Aq 100 mg: $6,00 \pm 2,00$ (n = 6); Indometacina 10 mg:

2,80 ± 1,20 (n = 6); Morfina 5 mg: 5,25 ± 2,13 (n = 6)] (Figura 228). Estes resultados sugerem que a fração APSE-Aq apresente possível efeito central e periférico.

Figura 227 - Estruturas do anti-inflamatório indometacina e do analgésico morfina.

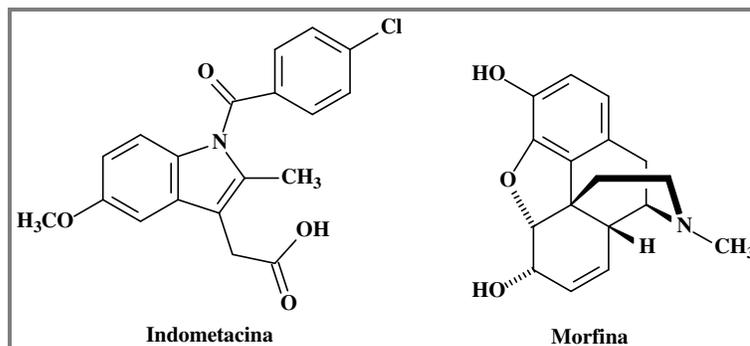
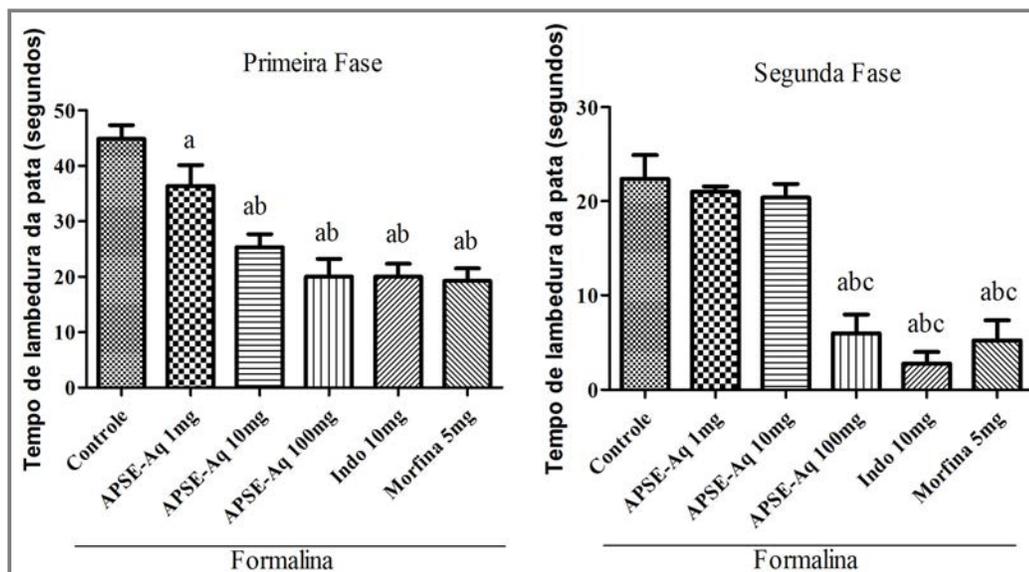


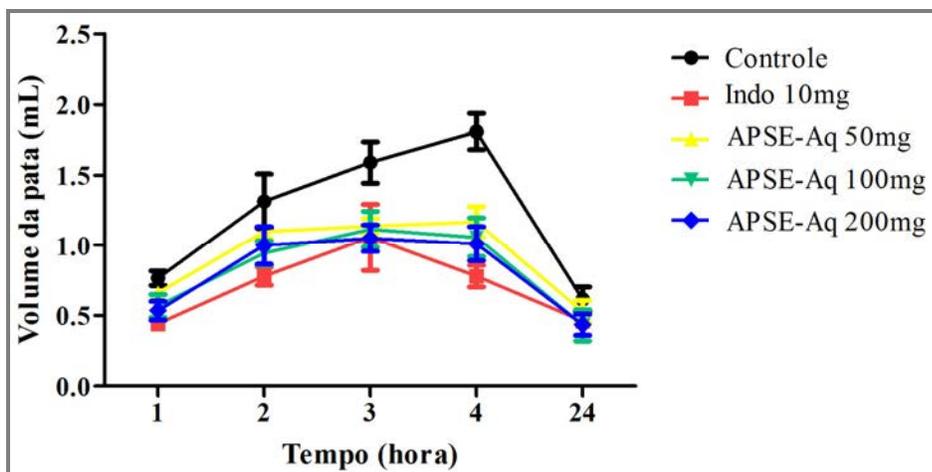
Figura 228 - O efeito de APSE-Aq no teste da formalina. A figura mostra o tempo de lambertura da pata (em segundos) nas fases inicial e final. Os valores são expressos como média ± EPM do número de observações. a) versus controle; b) versus APSE-Aq 1 mg/Kg; c) versus APSE-Aq 10 mg/Kg; $P < 0,0001$ (one-way ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keul's *pos hoc*).



No teste do edema da pata induzido por carragenina, a administração da dose de 100 mg/Kg de APSE-Aq reduziu significativamente o edema da pata após duas ($P < 0,05$), três ($P < 0,01$) e quatro ($P < 0,001$) horas da administração do estímulo, em comparação aos animais tratados com o veículo. As doses de 50 e 200 mg/Kg de APSE-Aq reduziram o edema da pata três horas (50 mg de APSE-Aq: $P < 0,01$; 200 mg de APSE-Aq: $P < 0,001$) e quatro horas (50 mg de APSE-Aq: $P < 0,001$; 200 mg de APSE-Aq: $P < 0,001$) após a administração do estímulo, em comparação aos animais tratados com o veículo, enquanto a

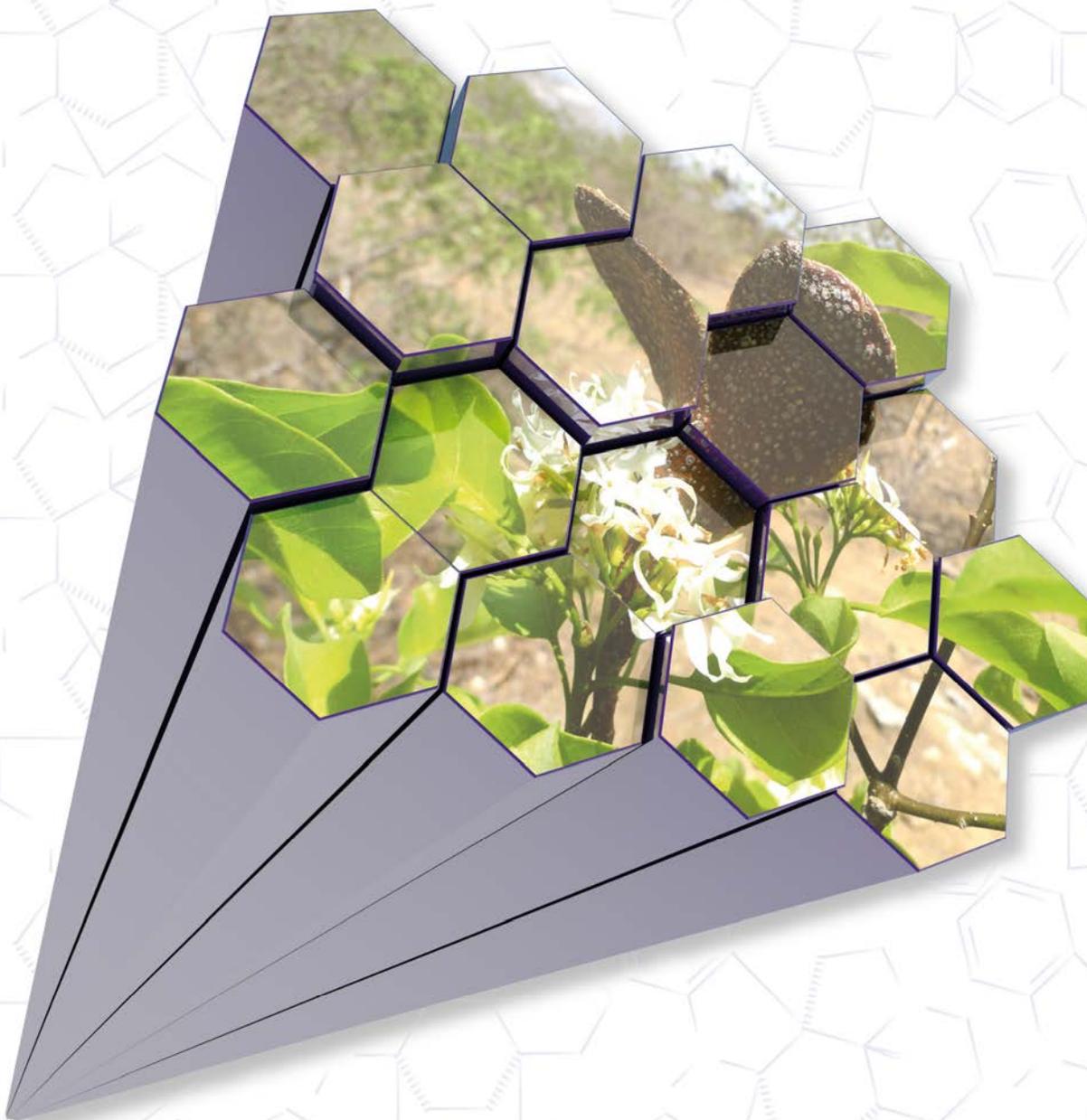
indometacina reduziu o edema da pata a partir da segunda hora de administração do estímulo ($P < 0,001$) (Figura 229). Estes resultados sugeriram que a fração APSE-Aq apresenta uma possível atividade anti-inflamatória.

Figura 229 - Curso de tempo do efeito do tratamento de APSE-Aq sobre o edema de pata induzido por carragenina (1%). Os valores são expressos como média \pm EPM do número de observações. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ versus controle (two-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni *post hoc*).



Capítulo 5

Parte Experimental



5 PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Material vegetal

As sementes de *Aspidosperma pyriforme* utilizadas no estudo foram coletadas na cidade de Cabrobó, Pernambuco, em junho de 2010. A planta foi identificada por comparação com um espécime de *A. pyriforme*, coletado em dezembro de 2004 na Fazenda Não Me Deixes, em Quixadá, Ceará, identificado pelo botânico Edson de Paula Nunes e depositado no Herbário Prisco Bezerra, da Universidade Federal do Ceará, com N° de exsiccata 35524.

5.2 Métodos cromatográficos

5.2.1 Cromatografia de exclusão molecular

O fracionamento por cromatografia de exclusão molecular foi efetuado em gel de dextrana Sephadex LH-20 da Pharmacia Fine Chemicals, por eluição com metanol (P.A.).

5.2.2 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

As análises por Cromatografia em Camada Delgada foram realizadas em placas de alumínio pré-revestidas com sílica gel (sílica gel 60 F254, 20 x 20 cm, 1 mm de espessura, da Merck). Os compostos foram visualizados por detecção no ultravioleta e/ou pulverização com solução de vanilina/ácido perclórico/etanol, seguido por aquecimento em chapa aquecedora, bem como com reagente de Dragendorff.

5.2.3 Cromatografia em coluna

As análises por cromatografia em coluna foram realizadas utilizando-se colunas de vidro, empacotadas com sílica gel 60 (70-230 Mesh para cromatografia gravitacional e 230-400 Mesh para cromatografia sob pressão). O comprimento e o diâmetro das colunas foram selecionados conforme a quantidade de amostra.

5.2.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Os isolamentos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foram realizados em cromatógrafos Waters, constituído de uma bomba binária (Waters-1525) e um detector UV PDA (Waters-2996), e Shimadzu UFLC, constituído de uma bomba ternária (LC20AT), um detector UV PDA (SPD-M20A) e um forno CTO-20A. As separações foram efetuadas em colunas RP-18 das marcas X-Terra® e Phenomenex®, adotando-se fluxos de 1

mL/min para coluna analítica (4,6 x 250 mm, 5 μ m) e 4,72 mL/min para coluna semi-preparativa (10 x 250 mm, 5 μ m).

Os solventes empregados apresentavam grau HPLC (CH₃CN-Tedia, CH₃OH-Tedia, H₂O Milli-Q e Ácido Trifluoroacético) e foram adequadamente filtrados através de membranas de nylon com poros de 0,45 μ m (Phenomenex[®]) e desgaseificados por sonicação a vácuo durante 5-40 min.

As amostras foram dissolvidas nas fases móveis empregadas em cada análise e filtradas através de membranas de nylon com poros de 0,45 μ m (Phenomenex[®]).

5.3 Métodos espectrométricos e espectroscópicos

5.3.1 Espectroscopia na região do infravermelho (IV)

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em espectrômetro Perkin Elmer, modelo Spectrum 100 FT-IR, utilizando UATR (Universal Attenuated Total Reflectance Accessory), na região de frequência de 650 a 4000 cm⁻¹, pertencente ao Laboratório de Espectrometria de Massa do Nordeste (LEMANOR), da Universidade Federal do Ceará.

As amostras sólidas foram colocadas diretamente sobre o cristal de seleneto de zinco do suporte UATR, enquanto as amostras resinosas foram dissolvidas em clorofórmio e, posteriormente, colocadas sobre o cristal através de um capilar.

5.3.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Prótio (RMN ¹H) e de Carbono-13 (RMN ¹³C)

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Prótio (RMN ¹H) e Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 (RMN ¹³C), uni e bidimensionais, foram obtidos em espectrômetros Bruker, modelos Avance DRX-500 e DPX-300, pertencentes ao Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear, da Universidade Federal do Ceará (CENAUREMN-UFC). Foram aplicadas frequências de 499,77 MHz (¹H) e 125,68 MHz (¹³C), sob um campo magnético de 11,7 T, e 300,13 MHz (¹H) e 75,47 MHz (¹³C), sob um campo magnético de 7,05 T.

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), piridina (δ 8,74; 7,58; 7,22) e dimetilsulfóxido (δ 2,50). Nos espectros de

carbono-13, os deslocamentos químicos foram referenciados pelos picos centrais dos sinais de carbonos-13 dos solventes: clorofórmio (δ 77,23), metanol (δ 49,15), piridina (δ 150,35; 135,91; 123,87) e dimetilsulfóxido (δ 39,51).

As multiplicidades dos sinais de hidrogênio nos espectros de RMN ^1H foram indicadas segundo a convenção: s (simpleto), d (duplete), t (triplete), q (quarteto), dd (duplo duplete), dt (duplete de triplete), td (triplete de duplete), ddd (triplo duplete), sept (septeto) e m (multiplete).

Os experimentos unidimensionais de ^1H e de ^{13}C foram efetuados em sonda multinuclear de 5 mm com detecção inversa (500 MHz) ou em sonda dual de 5 mm com detecção direta (300 MHz) e foram estabelecidos os seguintes valores para os parâmetros de aquisição: larguras espectrais de 24 ppm para ^1H e 260 ppm para ^{13}C , tempo de espera da relaxação (D1) de 1 s, e largura de pulso (P1) de 90° de 9,70 μs (0 dB) e 15,50 μs (0 dB) para ^1H e ^{13}C , respectivamente, no 500 MHz, e 10,75 μs (3 dB) e 10,00 μs (3,5 dB) para ^1H e ^{13}C , respectivamente, no 300 MHz. Para todos os experimentos unidimensionais foram utilizados 65356 pontos para a aquisição (TD) e 32768 para o processamento (SI), enquanto para os experimentos bidimensionais foram utilizados 2048 x 256 pontos para a matriz de dados de aquisição e 2048 x 1024 pontos para o processamento. Predição linear para o processamento 2D, utilizando 80 coeficientes, foi usada quando necessária. Os números de transientes (NS) variaram de acordo com as quantidades das amostras.

Os microprogramas utilizados para a aquisição dos dados foram: ^1H (zg ou zgcprr, quando aplicada a supressão da água), ^{13}C -CPD (zgpg30), ^{13}C -DEPT135 (dept135), ^{13}C -APT (jmod), NOE SELETIVO (selnogp), COSY (cosygpqf), NOESY (noesygpqh), HSQC (hsqcgpqh), HMQC (hmqcqh) e HMBC (hmbcgpqh), todos fornecidos pelo fabricante.

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 , foi utilizada na determinação do padrão de hidrogenação dos carbonos em RMN ^{13}C , descritos segundo a convenção: C (carbono não-hidrogenado), CH (carbono mono-hidrogenado ou carbono metínico), CH_2 (carbono metilênico ou metilidênico) e CH_3 (carbono metílico). Os carbonos não-hidrogenados foram caracterizados por comparação do espectro DEPT 135 com o espectro ^{13}C -CPD.

A técnica APT (Attached Proton Test) também foi utilizada na determinação do padrão de hidrogenação dos carbonos em RMN ^{13}C , mostrando C e CH_2 com amplitudes

positivas, e CH e CH₃ com amplitudes negativas. Os valores do intervalo de tempo (τ ou “delay” d20) foram calculados a partir do quociente $1/J$, resultando em um intervalo de 6,89 ms (para $^1J_{\text{CH}} = 145$ Hz). Utilizou-se tempo de aquisição de 1,82 s.

Nos experimentos de NOE Seletivo foram inicialmente realizadas as seleções das frequências a serem pré-saturadas. Os espectros foram adquiridos com gradiente, utilizando 128 ou 256 pulsos (NS).

Os experimentos bidimensionais de correlação homonuclear (COSY e NOESY) e heteronuclear (HSQC e HMBC), realizados no aparelho Bruker Avance DRX-500, foram efetuados em sonda multinuclear de 5 mm, com detecção inversa, empregando-se gradiente de campo no eixo Z, que apresenta magnitude total de 10 A. Os valores de J utilizados para os experimentos pertinentes foram $^1J_{\text{H,C}} = 145,0$ (CNST2) e $^nJ_{\text{H,C}} = 7,25$ (CNST13), onde $n \geq 2$. Quando realizados no aparelho Bruker Avance DPX-300, em sonda dual de 5 mm com detecção direta, os valores de J utilizados foram $^1J_{\text{H,C}} = 145,0$ (CNST2) e $^nJ_{\text{H,C}} = 10,0$ (CNST13), onde $n \geq 2$.

5.3.3 *Espectrometria de massa (EM)*

Os espectros de massa de baixa resolução foram registrados num espectrômetro Shimadzu, modelo CGMS-QP2010 Ultra, utilizando coluna DB-5 (25 m x 0,25 mm) e ionização por impacto eletrônico a 70 eV, pertencente ao Laboratório de Produtos e Tecnologia em Processos, da Universidade Federal do Ceará.

Os espectros de massa de alta resolução foram adquiridos usando um espectrômetro de massa modelo LCMS-IT-TOF (225-07100-34) - Shimadzu, equipado com fonte de ionização por electrospray, pertencente ao Laboratório de Espectrometria de Massa do Nordeste, da Universidade Federal do Ceará (LEMANOR-UFC).

5.4 Métodos físicos de análise

5.4.1 *Determinação do ponto de fusão (p.f.)*

Os pontos de fusão foram medidos em um equipamento da marca MicroQuímica Ind. E Com. LTDA, modelo MQAPF-301, pertencente ao Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, da Universidade Federal do Ceará. As medições foram realizadas a uma taxa de aquecimento de 2 °C/min e os valores não foram corrigidos.

5.4.2 *Determinação da rotação óptica*

As rotações ópticas foram obtidas num polarímetro Jasco, modelo P-2000, pertencente ao Laboratório de Espectrometria de Massa do Nordeste, da Universidade Federal do Ceará (LEMANOR-UFC), operando com lâmpada de Tungstênio, em comprimento de onda de 589 nm e temperatura de 20 °C. Utilizou-se uma cubeta de 2,5 mm de diâmetro por 100 mm de caminho óptico. As medições foram feitas em triplicatas e o tempo de duração de cada análise foi de 15 segundos. Antes de cada análise foi obtido o branco do solvente para a correção dos valores. Foram considerados aceitáveis valores de desvios padrões menores que 1 (um), calculados pelo próprio aparelho.

5.5 *Estudo dos constituintes químicos de *Aspidosperma pyrifolium* Mart.*

5.5.1 *Preparação dos extratos hexânico (APSH) e etanólico (APSE) das sementes de *A. pyrifolium* e isolamento de AP-12*

835,0 g das sementes de *Aspidosperma pyrifolium*, depois de secas e moídas, foram submetidos à maceração em 2 L de hexano por 72 horas. A extração foi repetida 2 vezes e as soluções hexânicas foram filtradas, evaporadas sob pressão reduzida e reunidas para a obtenção do extrato denominado APSH (líquido escuro; 65,17 g; 7,80 % de rendimento).

A torta resultante foi submetida à maceração em 2 L de etanol durante 72 horas. A extração foi repetida 2 vezes e as soluções etanólicas foram filtradas, concentradas em rotaevaporador e reunidas para a obtenção do extrato denominado APSE (sólido escuro; 162,54 g; 19,47 % de rendimento). A precipitação no extrato APSE rendeu 1,12 g de um sólido denominado **AP-12**.

5.5.2 *Preparação do decocto das sementes de *A. pyrifolium* (DEC-APS)*

A 10,0 g da torta seca, resultante da extração das sementes de *A. pyrifolium* com hexano e, posteriormente, com etanol, foram adicionados 100 mL de água destilada, submetendo-se ao procedimento de decocção. Após o início da fervura, o sistema foi mantido por 15 minutos sob aquecimento. A solução (decocto) foi filtrada e o material vegetal foi lavado com 80 mL de água fervente (1 x 50 mL + 1 x 30 mL), recuperando-se 100 mL da solução. Esta foi submetida à secagem por liofilização, rendendo 3,04 g da fração denominada DEC-APS.

5.5.3 Partição líquido-líquido de APSE

Uma alíquota de 30,0 g do extrato APSE foi solubilizada em 300 mL de água destilada, sob breve aquecimento. Após alguns minutos de repouso, houve a precipitação de um sólido escuro, que após a retirada do líquido sobrenadante com uma pipeta, foi dissolvido em 30 mL de metanol, originando a fração APSE-PID.

A solução aquosa remanescente foi extraída com 250 mL de hexano (2 x 100 mL e 1 x 50 mL), seguida por 300 mL de CH₂Cl₂ (2 x 100 mL e 2 x 50 mL) e, finalmente, por 250 mL de AcOEt (2 x 100 mL e 1 x 50 mL). As fases orgânicas hexano, diclorometano e acetato de etila foram secadas com sulfato de sódio anidro e rotaevaporadas, enquanto a fase aquosa residual foi liofilizada.

O procedimento acima foi repetido quatro vezes (totalizando 152,30 g de extrato) e as frações foram comparadas por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e reunidas, sendo descritas na Tabela 16.

Tabela 16 - Frações provenientes das partições líquido-líquido de alíquotas do extrato etanólico das sementes de *Aspidosperma pyrifolium*.

Fração	Sigla	Massa (g)
Precipitado	APSE-PID	17,18
Hexano	APSE-H	2,50
CH ₂ Cl ₂	APSE-D	20,77
AcOEt	APSE-Ac	1,04
Aquosa	APSE-Aq	91,17
Total		132,66 g
Rendimento		87,10%

5.5.4 Partição sólido-líquido de DEC-APS

A fração DEC-APS (3,04 g; item 5.5.2) foi submetida à partição sólido-líquido com 50 mL de metanol, sob agitação por 20 minutos. O líquido sobrenadante foi filtrado em papel de filtro e o material insolúvel foi novamente extraído com 2 x 50 mL de metanol. A solução metanólica final foi rotaevaporada, e ao se tentar retirar o material do balão, somente uma parte foi solúvel em metanol, resultando em 1,02 g da fração solúvel, denominada DEC-APS-M, e 534,8 mg da fração insolúvel, denominada DEC-APS-IM, a qual foi solúvel em água. O material residual da partição sólido-líquido foi secado e rendeu a fração DEC-APS-RES (1,43 g).

5.6 Isolamento dos constituintes químicos

5.6.1 Cromatografia de desadsorção seletiva da fração APSE-D e isolamento de AP-1

5,0 g da fração APSE-D (item 5.5.3) foram solubilizados em CH₂Cl₂ e adsorvidos em 25,0 g de sílica gel 60 (granulometria entre 70-230 Mesh). Este material foi adicionado a uma coluna de 4,5 cm de diâmetro, empacotada com 12,0 g de sílica gel. A eluição ocorreu em ordem crescente de polaridade e foram coletadas 9 frações (Tabela 17).

Tabela 17 - Frações coletadas por cromatografia de desadsorção seletiva de APSE-D.

Fração	Eluente	Volume (mL)	Cor	Massa (mg)
1	Hexano 100%	200	Incolor	11,1
2	Hex-CH ₂ Cl ₂ 50%	300	Incolor	273,9
3	CH ₂ Cl ₂ 100%	300	Incolor	1.297,2
4	CH ₂ Cl ₂ -AcOEt 50%	400	Amarela clara	1.649,8
5	AcOEt 100%	300	Amarela clara	255,4
6	AcOEt-MeOH 50%	100	Vinho	981,7
7	AcOEt-MeOH 50%	100	Vermelha	161,8
8	MeOH 100%	200	Alaranjada	88,0
9	MeOH 100%	200	Amarela	59,4
Total				4,78 g
Rendimento				95,60%

O mesmo procedimento acima foi realizado com mais três alíquotas de 5,0 g da fração APSE-D. As frações provenientes de cada cromatografia foram analisadas entre si por CCD, e reunidas diante de suas semelhanças. A fração APSE-D(4) mostrou formação de precipitado, o qual foi recristalizado com acetato de etila, resultando em 313,1 mg do composto **AP-1**, referente a cristais em formato de agulha. A fração APSE-D(7) foi submetida à análise em cartucho C18.

5.6.2 Cromatografia em cartucho C18 da fração APSE-D(7)

A fração APSE-D(7) (794,9 mg) foi submetida à cromatografia em um cartucho C18 da marca STRATA, empacotado com 10 g de fase estacionária. O cartucho foi inicialmente eluído com 50 mL de metanol, seguido por ativação com 50 mL de água milli-Q e, posteriormente, condicionamento com 25 mL de solução H₂O:MeOH (75:25). A fração foi dissolvida em 2 mL da fase móvel a ser utilizada e, então, adicionada ao cartucho. A eluição ocorreu com misturas binárias de H₂O e MeOH, sendo coletadas 38 frações (Tabela 18, p. 223).

Depois de comparadas por CCD, as frações foram reunidas em quatro grupos: 1-12 (510,1 mg), 13-31 (91,0 mg), 32-35 (127,8 mg) e 36-38 (10,2 mg). O grupo 32-35 foi submetido à análise por CLAE.

Tabela 18 - Frações coletadas a partir da cromatografia em cartucho C18 de APSE-D(7).

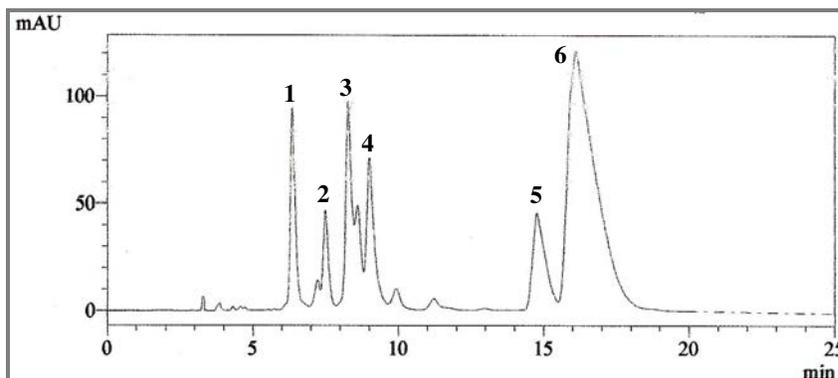
Fração	Eluente	Volume (mL)
1	H ₂ O-MeOH 25%	4
2-10	H ₂ O-MeOH 25%	1
11-18	H ₂ O-MeOH 25%	5
19-27	H ₂ O-MeOH 40%	5
28-31	H ₂ O-MeOH 40%	15
32-33	H ₂ O-MeOH 40%	50
34-35	H ₂ O-MeOH 80%	50
36-38	MeOH 100%	50

5.6.3 CLAE da fração APSE-D(7)-(32-35) e isolamento de AP-2, AP-3 e AP-4

1,0 mg da fração APSE-D(7)-(32-35) foi testado em coluna analítica Phenomenex com solução aquosa ácida de TFA 0,1% em CH₃CN nas proporções de 25 e 30%. Diante dos cromatogramas obtidos, foi decidido injetar a amostra com solução aquosa ácida de TFA 0,1% em CH₃CN (73:27), utilizando fluxo de 4,0 mL/min e forno a 40°C, em cromatógrafo Shimadzu.

123,0 mg da amostra foram dissolvidos na referida fase móvel, filtrados e injetados em loop de 100 µL. Foram coletadas seis frações, correspondentes aos picos numerados no cromatograma da Figura 230, e a Tabela 19 (p. 224) mostra seus respectivos tempos de retenção e massas.

Figura 230 - Cromatograma resultante da eluição isocrática da fração APSE-D(7)-(32-35), com solução aquosa ácida de TFA 0,1% em CH₃CN (73:27). Varredura de 215-400 nm.



Pico 1 - Mistura de compostos; Pico 2 - Não identificado; Pico 3 - Composto AP-2; Pico 4 - Composto AP-3; Pico 5 - Composto AP-4; Pico 6 - Composto AP-1.

Tabela 19 - Frações obtidas por CLAE de APSE-D(7)-(32-35) utilizando solução aquosa ácida de TFA 0,1% em CH₃CN (73:27).

Fração	TR (min)	Massa (mg)
1	6,35	7,3
2	7,48	3,0
3	8,27	4,8
4	9,00	6,1
5	14,75	9,0
6	16,09	31,3
Total		61,5 mg
Rendimento		50%

As frações 3, 4 e 5, após analisadas por RMN ¹H, geraram os compostos **AP-2**, **AP-3** e **AP-4**, respectivamente. A fração 6 rendeu mais quantidade do composto **AP-1**.

5.6.4 Cromatografia de exclusão molecular de APSE-Aq

Uma alíquota de 3,11 g da fração APSE-Aq (item 5.5.3) foi solubilizada em metanol e acondicionada em uma coluna de 4,0 cm de diâmetro empacotada com gel de dextrana Sephadex LH-20 (altura do gel = 27,0 cm). A primeira fração foi coletada após a eluição de 100 mL de metanol, utilizando-se fluxo médio de 12 gotas/minuto. Foram coletadas dez frações, descritas na Tabela 20.

Tabela 20 - Frações resultantes da cromatografia de exclusão molecular da fração APSE-Aq.

Fração	Volume (mL)	Cor	Massa (mg)
1	50	Marrom	5,8
2	20	Marrom	22,1
3	10	Marrom	176,5
4	10	Alaranjada	638,4
5	10	Amarela	765,7
6	10	Amarela	477,5
7	10	Amarela	356,6
8	25	Amarela clara	485,0
9	125	Amarela clara	165,4
10	25	Esverdeada	6,7
Total			3,10 g
Rendimento			99,68%

As frações 3-7 foram analisadas por RMN ¹H. Destas, 3 e 6 foram submetidas a análises por CLAE, enquanto 4 e 5 foram reunidas, recromatografadas por Sephadex e, posteriormente, injetadas em CLAE.

5.6.5 Cromatografia de exclusão molecular de APSE-Aq-S(4-5)

A fração APSE-Aq-S(4-5) (1,40 g) foi solubilizada em 8 mL de metanol e adicionada a uma coluna de 4,0 cm de diâmetro empacotada com gel de dextrana Sephadex LH-20 (altura do gel = 27,0 cm). A primeira fração foi coletada após eluídos 125 mL de metanol, utilizando-se fluxo médio de 15 gotas/minuto. Foram coletadas sete frações, descritas na Tabela 21.

Tabela 21 - Frações resultantes da cromatografia de exclusão molecular da fração APSE-Aq-S(4-5).

Fração	Volume (mL)	Cor	Massa (mg)
1	25	Amarela clara	2,3
2	15	Alaranjada	45,2
3	15	Alaranjada	361,3
4	15	Amarela	461,0
5	15	Amarela	302,3
6	25	Amarela clara	109,3
7	50	Amarela clara	21,1
Total			1,30 g
Rendimento			92,86%

Após analisadas por CCD, as sub-frações 3 e 4 foram submetidas a isolamento das substâncias por CLAE.

5.6.6 CLAE das frações APSE-Aq-S(3), APSE-Aq-S(4-5)-3, APSE-Aq-S(4-5)-4 e APSE-Aq-S(6)

176,5 mg da fração APSE-Aq-S(3) foram solubilizados em 13 mL de solução aquosa ácida de TFA 0,2% em CH₃CN (80:20). Esta solução foi filtrada em membrana de nylon e injetada em coluna semipreparativa X-Terra RP-18, utilizando loop de 200 µL e fluxo de 4,72 ml/min.

Foram coletadas as frações 1 (16,9 mg, TR = 3,5 min), 2 (5,2 mg, TR = 4,3 min), 3 (29,3 mg, TR = 7,0 min), 4 (16,6 mg, TR = 8,7 min) e 5 (20,1 mg, TR = 9,7 min). A fração 5 gerou uma nova quantidade de **AP-2**.

As frações APSE-Aq-S(4-5)-3 (361,3 mg), APSE-Aq-S(4-5)-4 (461,0 mg) e APSE-Aq-S(6) (477,5 mg) foram submetidas à CLAE sob as mesmas condições especificadas para a fração APSE-Aq-S(3).

A partir de APSE-Aq-S(4-5)-3 foram coletadas as frações 1 (101,3 mg, TR = 3,5 min), 2 (89,9 mg, TR = 7,0 min), 3 (43,3 mg, TR = 8,7 min) e 4 (19,5 mg, TR = 9,7 min). A fração 4 rendeu novamente o composto **AP-2**.

A partir de APSE-Aq-S(4-5)-4 foram coletadas as frações 1 (10,7 mg, TR = 2,9 min), 2 (118,8 mg, TR = 3,5 min), 3 (121,8 mg, TR = 7,0 min) e 4 (42,2 mg, TR = 8,7 min).

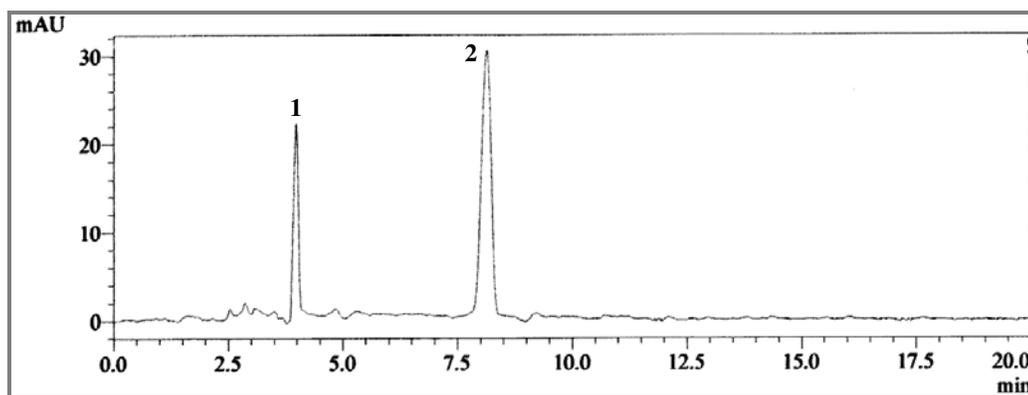
A partir de APSE-Aq-S(6) foram coletadas as frações 1 (59,0 mg, TR = 2,9 min), 2 (58,0 mg, TR = 3,5 min), 3 (6,7 mg, TR = 4,3 min) e 4 (34,7 mg, TR = 7,0 min). A fração 1 foi reinjetada em CLAE.

Todas as frações coletadas foram comparadas por CCD, e a partir de suas semelhanças e seus tempos de retenção foram geradas as frações APSE-Aq-TR 3,5 (249,5 mg), APSE-Aq-TR 7,0 (222,2 mg) e APSE-Aq-TR 8,7 (84,7 mg).

5.6.7 CLAE de APSE-Aq-S(6)-1 e isolamento de AP-5

A fração APSE-Aq-S(6)-1 (59,0 mg) foi solubilizada em 3 mL de solução aquosa ácida de TFA 0,2% em CH₃CN (90:10), filtrada em membrana de nylon e reinjetada em cromatógrafo Shimadzu, utilizando coluna semipreparativa Phenomenex RP-18, loop de 200 µL, fluxo de 4,72 mL/min e forno a 40°C. Coletou-se as frações 1 (0,6 mg, TR = 3,9 min) e 2 (23,3 mg, TR = 8,1 min) (Figura 231). A fração 2 levou ao isolamento do composto **AP-5**.

Figura 231 - Cromatograma resultante da eluição isocrática da fração APSE-Aq-S(6)-1, com solução aquosa ácida de TFA 0,2% em CH₃CN (90:10). Varredura de 200-400 nm.



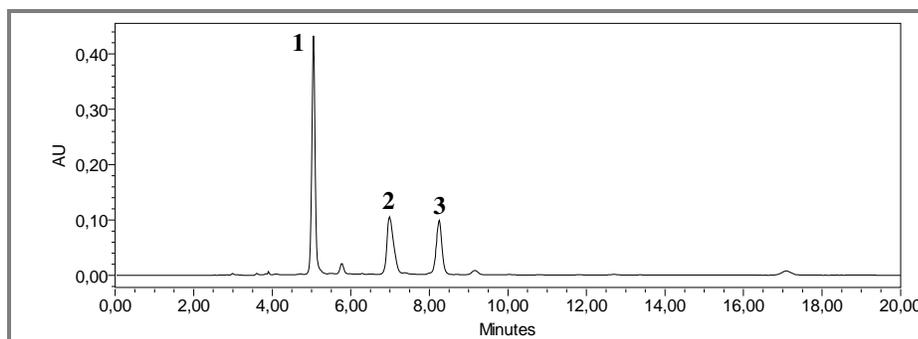
Pico 1 - Não identificado; Pico 2 - Composto AP-5.

5.6.8 CLAE de APSE-Aq-TR 3,5 e isolamento de AP-6 e AP-7

249,5 mg da fração APSE-Aq-TR 3,5 foram dissolvidos em uma mistura de 15% de CH₃CN e 85% de solução aquosa ácida de TFA 0,2%. A solução foi injetada em cromatógrafo Waters, equipado com coluna semipreparativa Phenomenex RP-18, utilizando loop de 200 µL e fluxo de 4,72 mL/min.

Foram coletadas as frações: 1 (116,2 mg, TR = 5,0 min), 2 (46,7 mg, TR = 6,9 min) e 3 (13,8 mg, TR = 8,2 min) (Figura 232). A fração 1 rendeu o composto **AP-6** e a fração 3 rendeu o composto **AP-7**.

Figura 232 - Cromatograma resultante da eluição isocrática da fração APSE-Aq-TR 3,5, com solução aquosa ácida de TFA 0,2% em CH₃CN (85:15). Comprimento de onda: 262 nm.



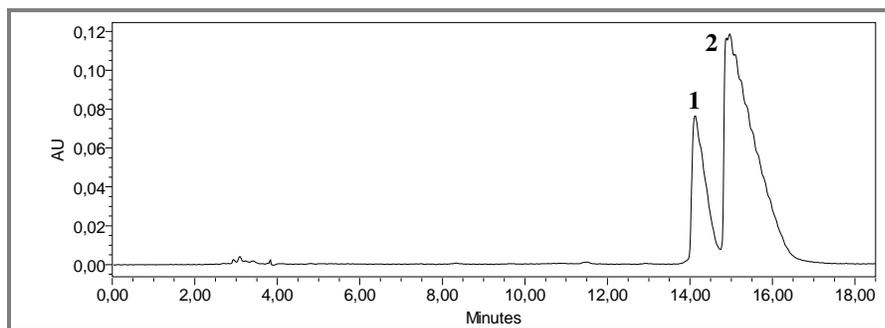
Pico 1 - Composto AP-6; Pico 2 - Não identificado; Pico 3 - Composto AP-7.

5.6.9 CLAE de APSE-Aq-TR 7,0 e isolamento de AP-8 e AP-9

70,0 mg da fração APSE-Aq-TR 7,0 foram solubilizados em uma mistura ternária composta por 15% de CH₃CN-CH₃OH (40:60) e 85% de solução aquosa ácida de TFA 0,2%. A solução foi injetada em cromatógrafo Waters, equipado com coluna semipreparativa Phenomenex RP-18, utilizando loop de 100 µL e fluxo de 4,72 mL/min.

Foram coletadas as frações 1 (9,7 mg, TR = 14,1 min) e 2 (30,5 mg, TR = 14,9 min) (Figura 233). A fração 1 resultou no composto **AP-8** e a fração 2 rendeu o composto **AP-9**.

Figura 233 - Cromatograma obtido por eluição isocrática da fração APSE-Aq-TR 7,0, utilizando mistura ternária composta por 15% de CH₃CN-CH₃OH (40:60) e 85% de solução aquosa ácida de TFA 0,2%. Comprimento de onda: 254 nm.

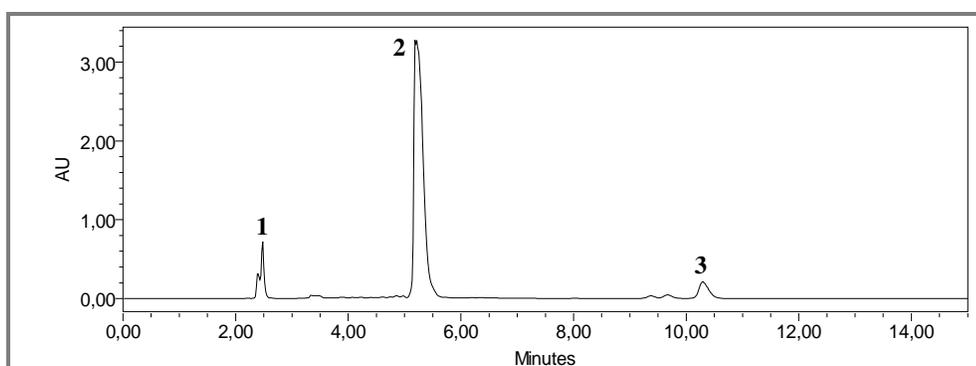


Pico 1 - Composto AP-8; Pico 2 - Composto AP-9.

5.6.10 CLAE de APSE-Aq-TR 8,7 e isolamento de AP-10

82,9 mg da fração APSE-Aq-TR 8,7 foram dissolvidos em uma mistura de 30% de CH₃CN e 70% de solução aquosa ácida de TFA 0,2%. Esta solução foi injetada em cromatógrafo Waters, equipado com coluna semipreparativa Phenomenex RP-18, utilizando loop de 200 µL e fluxo de 4,72 mL/min. Coletou-se as frações: 1 (2,5 mg, TR = 2,5 min), 2 (52,6 mg, TR = 5,2 min) e 3 (4,6 mg, TR = 10,3 min) (Figura 234). A fração 2 rendeu o composto **AP-10**.

Figura 234 - Cromatograma resultante da eluição isocrática da fração APSE-Aq-TR 8,7, utilizando solução aquosa ácida de TFA 0,2% em CH₃CN (70:30). Comprimento de onda: 254 nm.



Pico 1 - Não identificado; Pico 2 - Composto AP-10; Pico 3 - Não identificado.

5.6.11 Partição líquido-líquido de APSE-Aq em solução saturada de NaCl

300 mL de uma solução aquosa saturada de NaCl foi adicionada a uma alíquota de 30,0 g de APSE-Aq (item 5.5.3), gerando duas frações: a insolúvel, denominada APSE-Aq-Ins, e a solúvel, denominada APSE-Aq-Sol. Após separação das duas frações, APSE-Aq-Sol foi colocada em um funil de separação e extraída com 300 mL de CH₂Cl₂ (2 x 100 mL e 2 x 50 mL), rendendo a fração APSE-Aq-Sol-D. A fração aquosa residual foi secada em rotaevaporador e, posteriormente, submetida à extração sólido-líquido com 300 mL de metanol (2 x 100 mL e 2 x 50 mL), sob agitações de 15 minutos cada, gerando a fração APSE-Aq-Sol-M.

Este procedimento foi reproduzido mais duas vezes (totalizando 82,6 g de APSE-Aq) e resultou em 34,5 g da fração APSE-Aq-Ins, 8,6 g da fração APSE-Aq-Sol-D e 39,2 g da fração APSE-Aq-Sol-M.

5.6.12 Cromatografia de desadsorção seletiva de APSE-Aq-Sol-D

A fração APSE-Aq-Sol-D (8,6 g) foi solubilizada em CH₂Cl₂, adsorvida em 41,0 g de sílica gel 60 e acondicionada sobre uma camada de 12,0 g de sílica, contida em coluna de 4,5 cm de diâmetro. A eluição ocorreu com hexano, CH₂Cl₂, AcOEt e MeOH, puros e misturados, em ordem crescente de polaridade, gerando nove frações (Tabela 22).

Tabela 22 - Frações coletadas por cromatografia de desadsorção seletiva de APSE-Aq-Sol-D.

Fração	Eluente	Volume (mL)	Cor	Massa (mg)
1	Hexano 100%	200	Incolor	3,7
2	Hex-CH ₂ Cl ₂ 50%	200	Incolor	3,4
3	CH ₂ Cl ₂ 100%	300	Incolor	2,5
4	CH ₂ Cl ₂ -AcOEt 50%	500	Amarela clara	349,6
5	AcOEt 100%	250	Incolor	35,7
6	AcOEt-MeOH 50%	100	Alaranjada	5.830,8
7	AcOEt-MeOH 50%	100	Amarela	1.101,4
8	AcOEt-MeOH 50%	125	Amarela clara	102,0
9	MeOH 100%	250	Amarela clara	31,0
Total				7,46 g
Rendimento				86,26%

A sub-fração 6 foi recromatografada em coluna de sílica, eluindo-se com CH₂Cl₂, AcOEt e MeOH, puros e misturados em ordem crescente de polaridade, para gerar a sub-fração 12 (2,17 g). Esta foi submetida à cromatografia em coluna sob pressão (coluna “flash”).

5.6.13 Cromatografia em coluna de APSE-Aq-Sol-D(6)-12 e isolamento de AP-11

Uma alíquota de 1,67 g da fração APSE-Aq-Sol-D(6)-12 foi dissolvida em CH₂Cl₂ e gotas de MeOH, e adsorvida em 1,7 g de sílica “flash” (granulometria entre 230-400 Mesh). Este material foi colocado em uma coluna de 3,5 cm de diâmetro, empacotada com 100 g de sílica. A coleta ocorreu conforme mostrado na Tabela 23 (p. 230).

Tabela 23 - Frações coletadas a partir da cromatografia em coluna de APSE-Aq-Sol-D(6)-12.

Fração	Eluente	Volume (mL)
1		20
2-34	CH ₂ Cl ₂ -MeOH 5%	8
35-42		20
43		100
44-46		100
47		150
48-50	CH ₂ Cl ₂ -MeOH 10%	100
51-80		8
81-90		25
91-93		50
94-96	CH ₂ Cl ₂ -MeOH 50%	100
97	MeOH 100%	250

A sub-fração 85 (4,3 mg), coletada com mistura de CH₂Cl₂-MeOH 10%, rendeu o composto **AP-11**.

5.6.14 *Partição sólido-líquido de APSE-PID*

Uma alíquota de 13,85 g da fração APSE-PID (item 5.5.3) foi inicialmente submetida à agitação com 50 mL de hexano, durante 15 minutos, seguido por um curto período de repouso, e posterior filtração a vácuo do líquido sobrenadante. O sólido remanescente foi novamente extraído com 50 mL de hexano, seguindo o mesmo procedimento, e prosseguindo com duas extrações de 50 mL de diclorometano, obtendo-se, após rotaevaporação dos solventes, as frações APSE-PID-H (2,02 g) e APSE-PID-D (2,68 g), respectivamente. O sólido residual rendeu 8,49 g da fração APSE-PID-R.

5.6.15 *Cromatografia de exclusão molecular de APSE-PID-R*

Uma alíquota de 3,05 g da fração APSE-PID-R foi solubilizada em 10 mL de metanol e adicionada a uma coluna de 4,0 cm de diâmetro empacotada com gel de dextrana Sephadex LH-20 (altura do gel = 27,0 cm). Utilizou-se um fluxo inicial de 16 gotas/minuto e a primeira fração foi coletada após eluição de 100 mL de metanol. Foram coletadas 24 frações, descritas na Tabela 24 (p. 231).

Tabela 24 - Frações resultantes da cromatografia de exclusão molecular da fração APSE-PID-R.

Fração	Volume (mL)	Cor
1	20	Marrom
2	10	Marron
3-11	10	Preta
12-15	10	Marrom
16-19	20	Marrom
20-23	50	Marrom
24	425	Marrom

O procedimento de cromatografia de exclusão acima foi realizado com o restante da fração APSE-PID-R, e a comparação por CCD, seguida de reunião das frações similares, gerou 10 sub-frações (APSE-PID-R-A a APSE-PID-R-J).

5.6.16 Cromatografia de desadsorção seletiva de APSE-PID-R-E

A sub-fração APSE-PID-R-E (3,57 g) foi dissolvida em metanol e adsorvida em 18 g de sílica gel 60. O material foi acondicionado em uma coluna de 4,5 cm de diâmetro, empacotada com 20 g de sílica. Foram coletadas 21 frações, em volume de 100 mL cada, em ordem crescente de polaridade, conforme mostra a Tabela 25.

Tabela 25 - Frações coletadas por cromatografia de desadsorção seletiva de APSE-PID-R-E.

Fração	Eluente	Cor
1-3	Hex-CH ₂ Cl ₂ 50%	Incolor
4-7	CH ₂ Cl ₂ 100%	Amarela clara
8-10	CH ₂ Cl ₂ -AcOEt 50%	Amarela
11-13	AcOEt 100%	Amarela
14-18	AcOEt-MeOH 50%	Alaranjada
19-21	MeOH 100%	Alaranjada

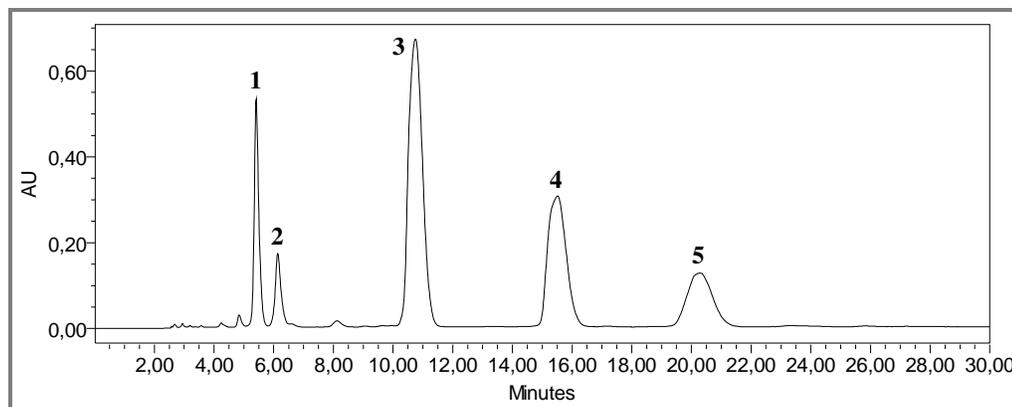
A fração 15-18 (806,8 mg) foi recromatografada em coluna de sílica gel e rendeu a sub-fração 11-12 (150,0 mg), coletada com a mistura de AcOEt-MeOH 20%, a qual foi submetida à análise por CLAE.

5.6.17 CLAE de APSE-PID-R-E-(15-18)-(11-12) e re-isolamento de AP-2, AP-6 e AP-10

A sub-fração APSE-PID-R-E-(15-18)-(11-12) foi solubilizada em uma mistura de 35% de CH₃OH e 65% de solução aquosa ácida de TFA 0,1%, filtrada e injetada em cromatógrafo Waters, equipado com coluna semipreparativa Phenomenex RP-18, utilizando loop de 200 µL e fluxo de 4,72 mL/min.

Foram coletadas as frações 1 (18,2 mg, TR = 5,4 min), 2 (5,1 mg, TR = 6,1 min), 3 (24,6 mg, TR = 10,7 min), 4 (14,4 mg, TR = 15,5 min) e 5 (14,5 mg, TR = 20,2 min) (Figura 235). As frações 1, 4 e 5 renderam, novamente, os compostos AP-6, AP-10 e AP-2, respectivamente.

Figura 235 - Cromatograma resultante da eluição isocrática da sub-fração APSE-PID-R-E-(15-18)-(11-12), utilizando solução aquosa ácida de TFA 0,1% em CH₃OH (65:35). Comprimento de onda: 254 nm.



Pico 1 - Composto AP-6; Pico 2 - Não identificado; Pico 3 - Não identificado; Pico 4 - Composto AP-10; Pico 5 - Composto AP-2.

5.6.18 *Cromatografia de exclusão molecular de DEC-APS-M*

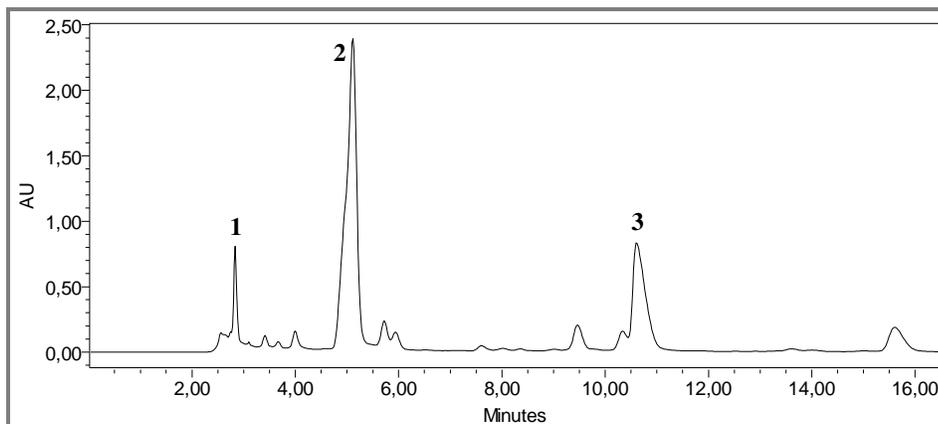
Uma alíquota de 473,4 mg da fração DEC-APS-M (item 5.5.4) foi solubilizada em 3 mL de metanol, e esta solução foi acondicionada em uma coluna de 2,0 cm de diâmetro, preenchida com gel de Sephadex LH-20. Utilizou-se fluxo médio de 18 gotas/minuto, iniciando-se a coleta após eluição de 30 mL de metanol. As frações 1-17 foram coletadas em volumes de 4 mL, as frações 18-20 em volumes de 5 mL, as frações 21 e 22 em volumes de 8 mL, e a fração 23 em volume de 135 mL. A fração 17 foi submetida à análise por CLAE.

5.6.19 *CLAE de DEC-APS-M(17) e re-isolamento de AP-6*

A fração DEC-APS-M(17) (28,4 mg) foi dissolvida em 2 mL da mistura de 35% de metanol e 65% de solução aquosa ácida de TFA 0,1%, filtrada e injetada em cromatógrafo Waters, equipado com coluna semipreparativa Phenomenex RP-18, utilizando loop de 100 µL e fluxo de 4,72 mL/min.

Foram coletadas as frações 1 (2,5 mg, TR = 2,8 min), 2 (11,0 mg, TR = 5,1 min) e 3 (3,9 mg, TR = 10,6 min) (Figura 236, p. 233). A fração 2 rendeu, novamente, o composto **AP-6**.

Figura 236 - Cromatograma resultante da eluição isocrática da fração DEC-APS-M(17), utilizando solução aquosa ácida de TFA 0,1% em CH₃OH (65:35). Comprimento de onda: 254 nm.



Pico 1 - Não identificado; Pico 2 - Composto AP-6; Pico 3 - Não identificado.

5.6.20 Tratamento dos compostos AP-8, AP-9 e AP-10

Depois de identificadas as estruturas dos compostos AP-8, AP-9 e AP-10, eles foram submetidos a tratamento com uma solução aquosa básica para efetuar o desprotonamento, visto que foram isolados utilizando ácido trifluoroacético (TFA) e, portanto, encontravam-se protonados, devido a reação do nitrogênio básico dos compostos com o ácido.

5,1 mg da fração APSE-Aq-TR 7,0(1), equivalente ao composto **AP-8**, foram solubilizados em 1 mL de metanol, e a esta solução foram adicionados, gota a gota, 3 mL de uma solução aquosa de NH₄OH 10% (v/v), até atingir pH 10. Para garantir o desprotonamento, acrescentou-se 1 mL de NH₄OH concentrado, e a solução foi submetida à extração com 25 mL de AcOEt (2 x 7 mL + 6 mL + 5 mL). A fração orgânica foi lavada com 3 mL de água destilada, sendo, em seguida, secada com Na₂SO₄ anidro e rotaevaporada, rendendo 4,0 mg do respectivo composto desprotonado.

O mesmo procedimento foi realizado com 13,5 mg do composto **AP-9** e 28,1 mg do composto **AP-10**, resultando em 9,2 e 20,7 mg, respectivamente, dos compostos desprotonados. Foram obtidos os espectros de RMN dos três compostos também em suas formas neutras, a fim de avaliar os efeitos causados pelo processo de protonação.

A Figura 237 (p. 234) e a Figura 238 (p. 235) mostram o fluxograma representativo para o procedimento experimental que conduziu ao isolamento dos compostos **AP-1** a **AP-12**, a partir do estudo fitoquímico das sementes de *Aspidosperma pyrifolium*.

Figura 237 - Fluxograma representando o procedimento experimental utilizado para o isolamento dos compostos AP-1 a AP-12, a partir do estudo fitoquímico das sementes de *Aspidosperma pyrifolium*.

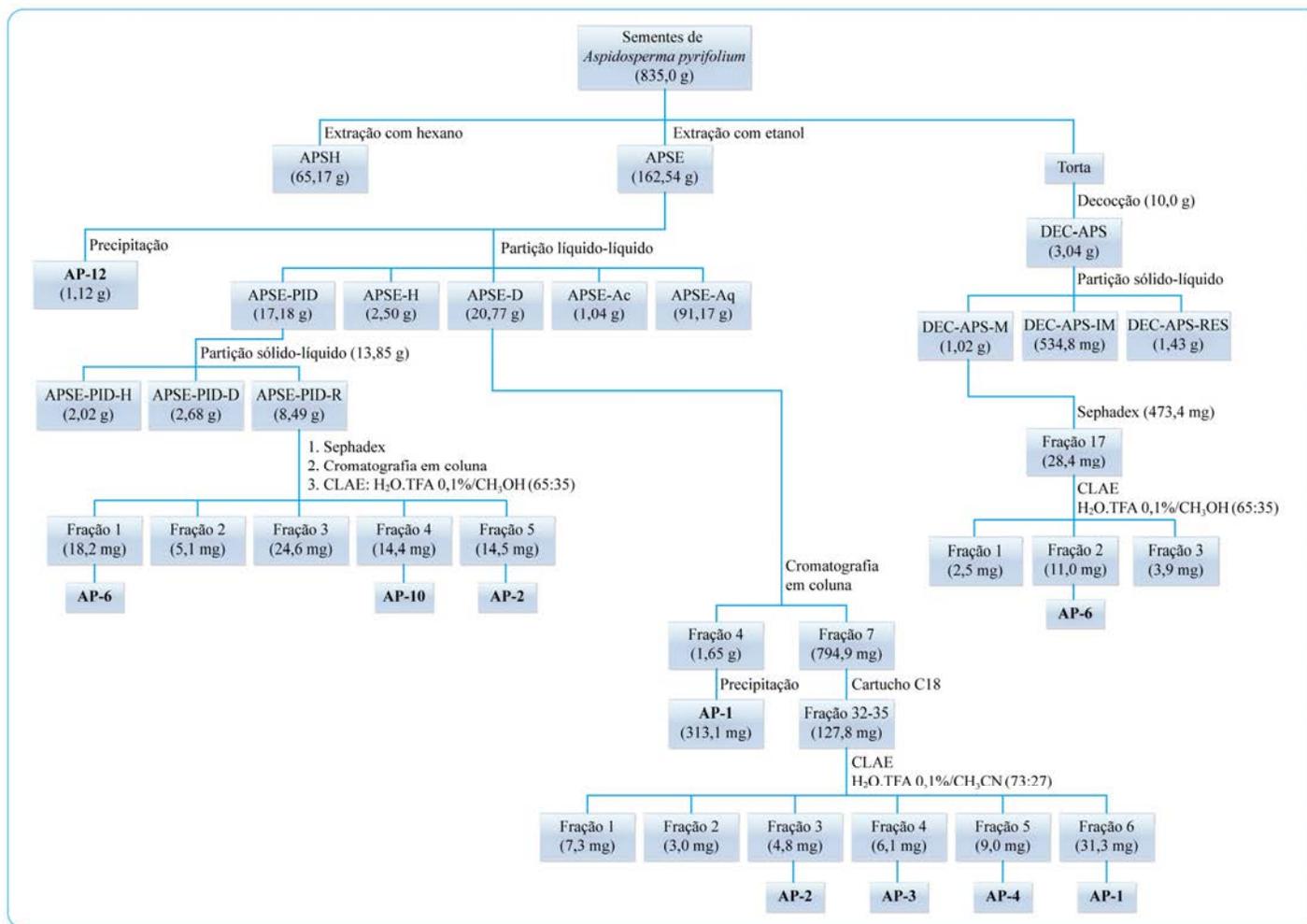
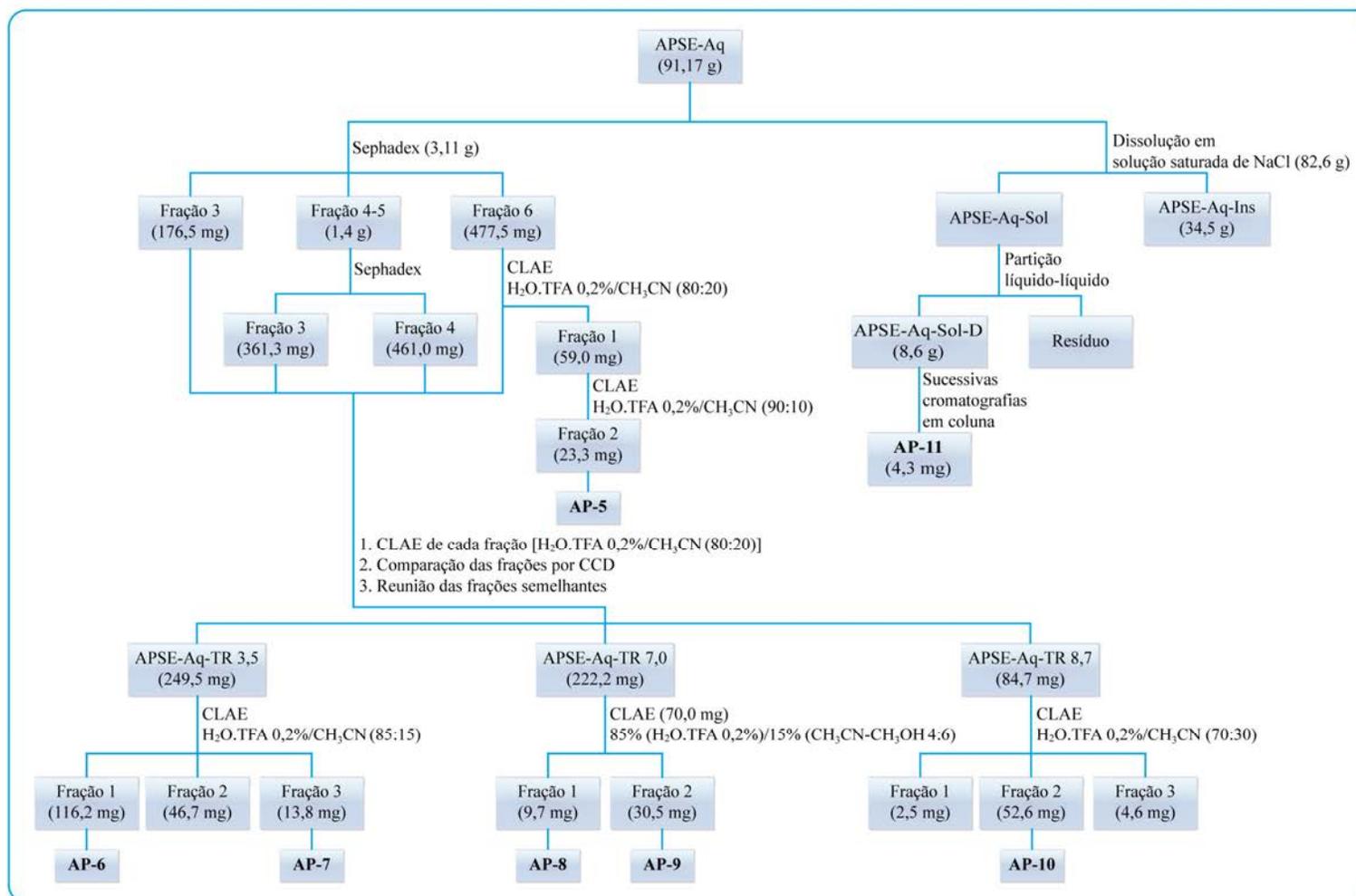


Figura 238 - Continuação do fluxograma representando o procedimento experimental realizado a partir da fração APSE-Aq.



5.7 Atividades antinociceptiva e anti-inflamatória

Os testes das atividades antinociceptiva e anti-inflamatória foram realizados no Laboratório de Neurofarmacologia, pertencente ao Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da UFC, pela doutoranda Dayane Pessoa de Araújo, sob orientação da professora Glauce S. B. Viana.

5.7.1 Animais

Para a avaliação das atividades antinociceptiva e anti-inflamatória foram utilizados camundongos “Swiss”, machos, pesando de 25-30 g, sendo formados grupos de 5-8 animais. Eles foram mantidos sob condições ambientais padrões: 22 ± 1 °C, humidade de $60 \pm 5\%$, 12 horas de luz e 12 horas de ciclo escuro, com livre acesso à água e comida. Todos os experimentos foram realizados de acordo com o Guia do NIH para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório.

5.7.2 Protocolo experimental

Os animais foram divididos em seis grupos e receberam, intra-peritonealmente (i. p.), água destilada (controle), APSE-Aq nas doses de 1, 10, 50, 100 e/ou 200 mg/Kg, e indometacina na dose de 10 mg/Kg ou morfina na dose de 5 mg/Kg. Após 30 minutos do último tratamento, os animais foram submetidos aos seguintes testes: contorção abdominal induzida por ácido acético, teste da formalina e edema da pata induzido por carragenina.

5.7.3 Contorção abdominal induzida por ácido acético

Os animais receberam 0,6% de ácido acético por via intraperitoneal (10 μ L/g de peso). Após 10 minutos de administração do ácido acético, o número de contorções abdominais durante um período de 20 minutos foi registrado para cada animal. Uma contorção foi identificada como uma extensão das pernas traseiras acompanhada por constrição do abdômen (KOSTER; ANDERSON; BEER, 1959).

5.7.4 Teste da formalina

Os camundongos foram injetados com formalina (20 μ L de formalina a 1%) por via intraperitoneal sob a superfície ventral da pata traseira direita. A quantidade de tempo gasto lambendo a pata injetada foi medida com um cronômetro e foi considerada como indicativa de nocicepção. A resposta nociceptiva inicial foi medida após 5 minutos da injeção de formalina (fase inicial) e 20-25 minutos após a injeção de formalina (fase final),

representando as respostas de dor tônica e inflamatória, respectivamente (HUNSKAAR; HOLE, 1987).

5.7.5 *Edema de pata induzido por carragenina*

Os animais receberam uma injeção intraplantar de 1% de carragenina (100 µL) para induzir o edema na pata traseira direita. O volume da pata foi medido antes, e 1, 2, 3, 4 e 24 horas após a administração de carragenina (WINTER; RISLEY; NUSS, 1962).

O volume do edema, em mililitros, foi medido usando um Pletismômetro (Ugo Basile, Itália), onde a pata traseira direita foi submersa até a articulação tálbio-társica, na câmara de medição do aparelho. O volume de fluido deslocado foi registrado e considerado o volume da pata. Os resultados foram expressos como a diferença entre o volume da pata nos intervalos de tempo especificados e o volume antes da injeção de carragenina (tempo zero).

5.7.6 *Análises estatísticas*

Os resultados foram apresentados como a média \pm o erro padrão da média (EPM). As diferenças estatísticas entre os grupos foram analisadas por análise de variância “one-way” ANOVA, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls. Para analisar os dados dos testes do edema de pata induzido por carragenina foi utilizada a análise de variância “two-way” ANOVA, seguida pelo teste de Bonferroni *post hoc* utilizando o software GraphPad (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Em todas as análises, consideraram-se estatisticamente significantes valores de $P < 0,05$.

Capítulo 6

Conclusão



6 CONCLUSÃO

A análise fitoquímica do extrato etanólico das sementes de *Aspidosperma pyrifolium* mostrou que a espécie é realmente uma fonte de alcaloides plumeranos. Dentre os 12 compostos obtidos, o alcaloide (3 α H)-15(14 \rightarrow 3)-abeo-aspidofractinina (AP-8) é inédito na literatura, enquanto os compostos *N*-metilacuamidina (AP-11), ácido logânico (AP-5), loganina (AP-7), ácido 2-hidróxi-3-*O*- β -D-glicopiranosilbenzóico (AP-6) e 2-*O*-metil-L-*qui*ro-inositol (AP-12) estão sendo relatados pela primeira vez para *A. pyrifolium*. Além disso, o alcaloide *N*-acetilaspidofractinina (AP-10) foi, pela primeira vez, obtido como produto natural, e a correlação dos seus dados de RMN ^1H e ^{13}C está sendo relatada pela primeira vez na literatura.

A análise comparativa dos dados de RMN dos compostos AP-8, AP-9 e AP-10 protonados e desprotonados, mostrou a importante influência do átomo de nitrogênio que, quando se encontra protonado, causa desblindagem aos hidrogênios dos carbonos vizinhos, justificando a importância da desprotonação de alcaloides. Este efeito é pouco pronunciado nos valores de ressonância dos carbonos.

Além de serem apresentados dados mais recentes de RMN, também foram sugeridas correções de alguns dados incoerentes da literatura, visto que os dados deste trabalho foram inequivocadamente assinalados baseando-se na análise de espectros de RMN 1D (^1H , ^{13}C -CPD, ^{13}C -DEPT 135 e ^{13}C -APT) e 2D (COSY, HSQC, HMQC e HMBC). As estereoquímicas relativas dos compostos foram determinadas com base em acoplamentos dipolares observados nos espectros NOESY e/ou NOE Seletivo, além da comparação dos dados físicos relativos à estereoquímica apresentada na literatura.

A fração aquosa obtida do extrato etanólico das sementes de *A. pyrifolium*, fonte da maior parte dos compostos isolados, mostrou um significativo efeito antinociceptivo na fase final do teste de formalina, reduzindo o tempo de lambadura, em comparação ao controle, para um valor similar ao da morfina ($5,25 \pm 2,13$), bem como efeito anti-inflamatório causando redução do edema induzido por carragenina, em comparação ao controle. Curvas de dose-respostas mostraram que as melhores doses de APSE-Aq foram 100 mg/Kg na nocicepção induzida por formalina [($20,0 \pm 3,24$) na fase inicial e ($6,00 \pm 2,00$) na fase final] e 200 mg/Kg na contorção abdominal induzida por ácido acético ($23,25 \pm 2,56$). Estes resultados permitem concluir que a fração aquosa de APSE apresenta atividades antinociceptiva e anti-inflamatória, contribuindo para o conhecimento farmacológico da planta.

Referências



REFERÊNCIAS

AHOND, A.; JANOT, M. M.; LANGLOIS, N.; LUKACS, G.; POTIER, P.; RASOANAIVO, P.; SANGARE, M.; NEUSS, N.; PLAT, M.; LE MEN, J.; HAGAMAN, E. W.; WENKERT, E. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of naturally occurring substances. XXIII. Structure of vindolinine. **Journal of the American Chemical Society**, 96(2), p. 633-634, 1974.

ALMEIDA, M. V.; COURI, M. R. C.; ASSIS, J. V.; ANCONI, C. P. A.; SANTOS, H. F.; ALMEIDA, W. B. ¹H NMR analysis of *O*-methyl-inositol isomers: a joint experimental and theoretical study. **Magnetic Resonance in Chemistry**, 50, p. 608-614, 2012.

ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. D. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L.; LOPES, M. T. P. Câncer e Agentes Antineoplásicos Ciclo-Celular Específicos e Ciclo-Celular Não Específicos que Interagem com o DNA: Uma Introdução. **Química Nova**, 28(1), p. 118-129, 2005.

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

ATTA-UR-RAHMAN; ZAMAN, K.; PERVEEN, S.; HABIB-UR-REHMAN; MUZAFFAR, A.; CHOUDHARY, M. I.; PERVIN, A. Alkaloids from *Rhazya stricta*. **Phytochemistry**, 30(4), p. 1285-1293, 1991.

BARROSO, G. B. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. 3. ed. Viçosa: Imprensa Universitária, 1991. 326 p.

BATTERSBY, A. R.; BURNETT, A. R.; PARSONS, P. G. Alkaloid Biosynthesis. Part XV. Partial Synthesis and Isolation of Vincoside and Isovincoside: Biosynthesis of the Three Major Classes of Indole Alkaloids from Vincoside. **Journal of the Chemical Society C**, p. 1193-1200, 1969.

BOLZANI, V. S.; SERUR, L. M.; MATOS, F. J. A.; GOTTLIEB, O. R. Indole Alkaloid Evolution in *Aspidosperma*. **Biochemical Systematics and Ecology**, 15(2), p. 187-200, 1987.

BRENNAN, J. P.; SAXTON, J. E. A New Synthesis of the Cylindrocarine Group of Alkaloids. **Tetrahedron**, 42(24), p. 6719-6734, 1986.

BROCKSOM, T. J.; DONATONI, M. C.; ULIANA, M. P.; VIEIRA, I. W. A Reação de Diels-Alder no Início do Século Vinte Um. **Química Nova**, 33(10), p. 2211-2218, 2010.

BUCKINGHAM, J. (Editor). **Dictionary of Natural Products**, Chapman & Hall Chemical Database, 7, London, 1994.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, Especialmente do Ceará**. 2. ed. Fortaleza, 1960. 540 p.

- BYCROFT, B. W.; SCHUMANN, D.; PATEL, M. B.; SCHMID, H. Weitere Alkaloide aus den Blättern von *Pleiocarpa tubicina*; Umwandlung von (-)-Quebrachamin in (+)-1,2-Dehydroaspidospermidin. **Helvetica Chimica Acta**, 47(124), p. 1147-1152, 1964.
- CAI, X.-H.; LI, Y.; LIU, Y.-P.; LI, X.-N.; BAO, M.-F.; LUO, X.-D. Alkaloids from *Melodinus yunnanensis*. **Phytochemistry**, 83, p. 116-124, 2012.
- CAI, X.-H.; ZENG, C.-X.; FENG, T.; LI, Y.; LUO, X.-D. Monoterpenoid Indole Alkaloids from *Alstonia mairei*. **Helvetica Chimica Acta**, 93, p. 2037-2044, 2010.
- CAVA, M. P.; LAKSHMIKANTHAM, M. V.; TALAPATRA, S. K.; YATES, P.; RAE, I. D.; ROSENBERGER, M.; SZABO, A. G. DOUGLAS, B.; WEISBACH, J. A. Cimicine and Cimidine, Lactonic Alkaloids from *Haplophyton cimidum*. **Canadian Journal of Chemistry**, 51, p. 3102-3109, 1973.
- CRAVEIRO, A. A.; MATOS, F. J. A.; SERUR, L. M. Alkaloids of *Aspidosperma pyrifolium*. **Phytochemistry**, 22(6), p. 1526-1528, 1983.
- DANTAS, V. S.; DANTAS, I. C.; CHAVES, T. P.; FELISMINO, D. C.; SILVA, H.; DANTAS, G. D. S. Análise das Garrafadas Indicadas Pelos Raizeiros na Cidade de Campina Grande - PB. **Revista de Biologia e Farmácia**, 3(1), p. 7-13, 2008.
- DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: a Biosynthetic Approach**. 2. ed. John Wiley & Sons Ltda., 2002. 507 p.
- DI, L.; LI, N.; ZU, L.-B.; WANG, K.-J.; ZHAO, Y.-X.; WANG, Z. Three New Iridoid Glucosides from the Roots of *Patrinia scabra*. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, 32(9), p. 3251-3254, 2011.
- DÍAZ, M.; GONZÁLEZ, A.; CASTRO-GAMBOA, I.; GONZALEZ, D.; ROSSINI, C. First record of L-quebrachitol in *Allophylus edulis* (Sapindaceae). **Carbohydrate Research**, 343, p. 2699-2700, 2008.
- EL-SAYED, M.; VERPOORTE, R. Catharanthus terpenoid indole alkaloids: biosynthesis and regulation. **Phytochemistry Reviews**, 6, p. 277-305, 2007.
- FENG, T.; LI, Y.; WANG, Y.-Y.; CAI, X.-H.; LIU, Y.-P.; LUO, X.-D. Cytotoxic Indole Alkaloids from *Melodinus tenuicaudatus*. **Journal of Natural Products**, 73(6), p. 1075-1079, 2010.
- FERREIRA, R. A.; CUNHA, M. C. L. Aspectos Morfológicos de Sementes, Plântulas e Desenvolvimento da Muda de Craibeira (*Tabebuia Caraiba* (Mart.) Bur.) - Bignoniaceae e Pereiro (*Aspidosperma pyrifolium* Mart.) - Apocynaceae. **Revista Brasileira de Sementes**, 22(1), p.134-143, 2000.
- FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F. Construindo a História dos Produtos Naturais. **MultiCiência**, 2006.
- FUMAGALI, E.; GONÇALVES, R. A. C.; MACHADO, M. F. P. S.; VIDOTI, G. J.; OLIVEIRA, A. J. B. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de

- plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 18(4), p. 627-641, 2008.
- FRANÇA, O. O.; BROWN, R. T.; SANTOS, C. A. M. Uleine and demethoxyaspidospermine from the bark of *Plumeria lancifolia*. **Fitoterapia**, 71, p. 208-210, 2000.
- GAGNON, D.; SPINO, C. Stereoselective Synthesis of (+)-Aspidofractinine. **Journal of Organic Chemistry**, 74, p. 6035-6041, 2009.
- GARCIA, M.; RUBEN, F.; BROWN, K. S. Alkaloids of Three *Aspidosperma* Species. **Phytochemistry**, 15(6), p. 1093-1095, 1976.
- GILANI, A. H.; ATTA-UR-RAHMAN. Trends in Ethnopharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, 100, p. 43-49, 2005.
- GOMES, S. M.; CAVALCANTI, T. B. Morfologia Floral de *Aspidosperma* Mart. & Zucc. (Apocynaceae). **Acta Botanica Brasilica**, 15(1), p. 73-88, 2001.
- GÓMEZ, M. V.; ARANDA, A. I.; MORENO, A.; COSSÍO, F. P.; CÓZAR, A.; DÍAZ-ORTIZ, A.; LA HOZ, A.; PRIETO, P. Microwave-assisted reactions of nitroheterocycles with dienes. Diels-Alder and tandem hetero Diels-Alder/[3,3] sigmatropic shift. **Tetrahedron**, 65, p. 5328-5336, 2009.
- GUIMARÃES, H. A.; BRAZ-FILHO, R.; VIEIRA, I. J. C. ¹H and ¹³C-NMR Data of the Simplest Plumeran Indole Alkaloids Isolated from *Aspidosperma* Species. **Molecules**, 17, p. 3025-3043, 2012.
- GUIMARÃES, H. A.; VIEIRA, I. J. C.; BRAZ-FILHO, R.; CROTTI, A. E. M.; ALMEIDA, V. S.; PAULA, R. C. Two Novel Plumeran Indole Alkaloids Isolated from *Aspidosperma cylindrocarpon* (Apocynaceae). **Helvetica Chimica Acta**, 96(9), p. 1793-1800, 2013.
- GUGGISBERG, A.; GORMAN, A. A.; BYCROFT, B. W.; SCHMID, H. Ein neuer Abbau des Indolalkaloids Kopsin; chemische Korrelierung der Alkaloide vom Kopsin- und Pleiocarpin-Typ mit Minovincin. **Helvetica Chimica Acta**, 52(7), p. 76-89, 1969.
- HARBORNE, J. B. **Phytochemical Methods**. A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis. 2. ed. New York: Chapman and Hall, 1984. 152 p.
- HEINRICH, M.; BARNES, J.; GIBBONS, S.; WILLIAMSON, E. M. **Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy**. 1. ed. London: Elsevier, 2004. 309 p.
- HENRIQUE, M. C.; NUNOMURA, S. M.; POHLIT, A. M. Alcalóides indólicos de cascas de *Aspidosperma vargasii* e *A. desmanthum*. **Química Nova**, 33(2), p. 284-287, 2010.
- HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **Princípios Ativos de Plantas Superiores**. São Carlos: EdUFSCar, 2003. 288 p.
- HU, W.-L.; ZHU, J.-P.; HESSE, M. Indole Alkaloids from *Alstonia angustifolia*. **Planta Medica**, 55, p. 463-466, 1989.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, 30, p. 103-114, 1987.

International Union of Pure and Applied Chemistry. **In Parent Structures for Natural Products and Related Compounds**. 2004, ch. 10.

KALLIO, H.; LASSILA, M.; JARVENPAA, E.; HARALDSSON, G. G.; JONSDOTTIR, S.; YANG, B. Inositols and methylinositols in sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) berries. **Journal of Chromatography B**, 877, p. 1426-1432, 2009.

KAM, T.-S.; CHOO, Y.-M. Kopsifolines A - F: a New Structural Class of Monoterpenoid Indole Alkaloids from *Kopsia*. **Helvetica Chimica Acta**, 87, p. 991-998, 2004a.

KAM, T.-S.; CHOO, Y.-M. Venalstonine and dioxokopsan derivatives from *Kopsia fruticosa*. **Phytochemistry**, 65, p. 2119-2122, 2004b.

KAM, T.-S.; CHOO, Y.-M. Kopsifolines A, B, and C, indole alkaloids with a novel hexacyclic carbon skeleton from *Kopsia*. **Tetrahedron Letters**, 44, p. 1317-1319, 2003.

KAM, T.-S.; TAN, P.-S. Plumeran Alkaloids from *Kopsia profunda*. **Phytochemistry**, 29(7), p. 2321-2322, 1990.

KAM, T.-S.; YOGANATHAN, K.; CHUAH, H.-H.; WEI, C. Aspidofractinine Alkaloids from a new *Kopsia* Species. **Phytochemistry**, 32(5), p. 1343-1346, 1993.

KING, F. E.; GILKS, J. H.; PARTRIDGE, M. W. A Glycosidic Constituent of *Vinca minor* and its Identification as 3- β -D-Glucosyloxy -2-hydroxybenzoic Acid. **Journal of the Chemical Society**, p. 4206-4215, 1955.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; BEER, J. Acetic Acid for Analgesic Screening. **Federation Proceedings**, 18, p. 412, 1959.

LIM, K.-H.; HIRAKU, O.; KOMIYAMA, K.; KOYANO, T.; HAYASHI, M.; KAM, T.-S. Biologically Active Indole Alkaloids from *Kopsia arborea*. **Journal of Natural Products**, 70(8), p. 1302-1307, 2007.

LIM, M.-H.; LIU, H.-K.; HUANG, W.-J.; HUANG, C.-C.; WU, T.-H.; HSU, F.-L. Evaluation of the Potential Hypoglycemic and Beta-Cell Protective Constituents Isolated from Corni Fructus to Tackle Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 59, p. 7743-7751, 2011.

LIU, Y.-P.; LI, Y.; CAI, X.-H.; LI, X.-Y.; KONG, L.-M.; CHENG, G.-G.; LUO, X.-D. Melodinines M-U, Cytotoxic Alkaloids from *Melodinus suaveolens*. **Journal of Natural Products**, 75, p. 220-224, 2012.

LOBO, A. M.; LOURENÇO, A. M. **Biossíntese de Produtos Naturais**. Lisboa: Instituto Superior Técnico - IST Press, 2007. 272p.

MACABEO, A. P. G.; ALEJANDRO, G. J. D.; HALLARE, A. V.; VIDAR, W. S.; VILLAFLORES, O. B.; Phytochemical Survey and Pharmacological Activities of the Indole

Alkaloids in the Genus *Voacanga* Thouars (Apocynaceae) - An Update. **Pharmacognosy Reviews: Plant Review**, 3(5), p. 132-142, 2009.

MAHMOUD, A. A.; AHMED, A. A. α -Pinene-type monoterpenes and other constituents from *Artemisia suksdorfii*. **Phytochemistry**, 67, p. 2103-2109, 2006.

MARTINS, E. S.; DINIZ, M. A.; GONÇALVES, A. E.; O Gênero *Landolphia* P. BEAUV. (Apocynaceae) na Guiné-Bissau. **Portugaliae Acta Biologica**, 19, p. 409-415, 2000.

MATOZINHOS, C. N.; KONNO, T. U. P.; Diversidade taxonômica de Apocynaceae na Serra Negra, MG, Brasil. **Hoehnea**, 38(4), p. 569-595, 2011.

MATOZINHOS, C. N.; KONNO, T. U. P.; Apocynaceae S. L. na Reserva Biológica da Represa do Grama, Descoberto, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia**, 59(1), p. 87-98, 2008.

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

MITAINE, A. C.; MESBAH, K.; RICHARD, B.; PETERMANN, C.; ARRAZOLA, S.; MORETTI, C.; ZÈCHES-HANROT, M.; LE MEN-OLIVIER, L. Alkaloids from *Aspidosperma* Species from Bolivia. **Planta Medica**, 62, p. 458-461, 1996.

MITAINE-OFFER, A.-C.; SAUVAIN, M.; VALENTIN, A.; CALLAPA, J.; MALLIÉ, M.; ZÈCHES-HANROT, M. Antiplasmodial activity of *Aspidosperma* indole alkaloids. **Phytomedicine**, 9, p. 142-145, 2002.

MORALES-RÍOS, M. S.; ESPÍÑEIRA, J.; JOSEPH-NATHAN, P. ^{13}C NMR Spectroscopy of Indole Derivatives. **Magnetic Resonance in Chemistry**, 25, p. 377-395, 1987.

NASCIMENTO, J. M.; CONCEIÇÃO, G. M. Plantas Medicinais e Indicações Terapêuticas da Comunidade Quilombola Olho D'água do Raposo, Caxias, Maranhão, Brasil. **Revista de Biologia e Farmácia**, 6(2), p. 138-151, 2011.

NICOLETTI, M.; SERAFINI, M.; FEDERICI, E.; GALEFFI, C.; POLI, F. Indole Alkaloids from Aerial Parts of *Vinca sardoa*. **Phytochemistry**, 47(1), p. 149-151, 1998.

OIKAWA, H.; TOKIWANO, T. Enzymatic catalysis of the Diels-Alder reaction in the biosynthesis of natural products. **Natural Product Reports**, 21, p. 321-352, 2004.

OLIVEIRA, A. J. B. **Estudo de Seis Espécies do Gênero *Aspidosperma* Utilizando GC, GC/MS e HPLC: Análise Qualitativa e Quantitativa. Teste Bioautográfico; Cultura de Tecidos e Células Vegetais e Rota de Preparação dos Compostos Diméricos Ramiflorina A e Ramiflorina B.** Tese de Doutorado, Campinas, 1999.

OLIVEIRA, V. B.; FREITAS, M. S. M.; MATHIAS, L.; BRAZ-FILHO, R.; VIEIRA, I. J. C. Atividade biológica e alcaloides indólicos do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae): uma revisão. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, 11(1), p. 92-99, 2009a.

- OLIVEIRA, V. B.; VIEIRA, I. J. C.; BRAZ-FILHO, R.; MATHIAS, L.; LOPES, N. P.; CROTTI, A. E. M.; UCHÔA, D. E. A. Spruceanumines A and B, Novel Plumeran Indole Alkaloids from *Aspidosperma spruceanum* (Apocynaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 20(4), p. 753-759, 2009b.
- ORAZI, O. O.; CORRAL, R. A.; STOICHEVICH, M. E. Studies on Plants. XI. Alkaloids of *Aspidosperma spegazzinii*. **Canadian Journal of Chemistry**, 44, p. 1523-1529, 1966.
- PEREIRA, M. M.; JÁCOME, R. L. R. P.; ALCÂNTARA, A. F. C.; ALVES, R. B.; RASLAN, D. S. Alcaloides Indólicos Isolados de Espécies do Gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae). **Química Nova**, 30(4), p. 970-983, 2007.
- RASHID, M. A.; GUSTAFSON, K. R.; CARDELLINA II, J. H.; BOYD, M. R. A Benzoic Acid Glycoside from *Geniostoma antherotrichum*. **Phytochemistry**, 41(4), p. 1205-1207, 1996.
- ROBERT, G. M. T.; AHOND, A.; POUPAT, C.; POTIER, P.; JOUSSELIN, A.; JACQUEMIN, H. *Aspidosperma* de Guyane: Alcaloides de *Aspidosperma marcgravianum*. **Journal of Natural Products**, 46(5), p. 694-707, 1983.
- SAKUSHIMA, A.; COSKUN, M.; MAOKA, T. Hydroxybenzoic Acids from *Boreava orientalis*. **Phytochemistry**, 40(1), p. 257-261, 1995.
- SANTOS, A. C. B.; SILVA, M. A. P.; SANTOS, M. A. F.; LEITE, T. R. Levantamento etnobotânico, químico e farmacológico de espécies de Apocynaceae Juss. ocorrentes no Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 15(3), p. 442-458, 2013.
- SERUR, L. M.; MATOS, F. J. A. Alkaloids of *Aspidosperma pyriforme* Mart. Isolation of Aspidospermine. **Revista Latinoamericana de Química**, 12, p. 38, 1981.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**, 5. ed. Editora da UFSC, 2004. 1102 p.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC - Livros Técnicos e Científicos, 2007. 490 p.
- SINGLETON, J.; HOBERG, J. O. *Chiro*-Inositols in Organic Synthesis. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, 6(1), p. 1-8, 2009.
- SOUSA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**. 2. ed. São Paulo. Nova Odesa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA, 2008.
- STOCKING, E. M.; WILLIAMS, R. M. Biosynthetic Diels-Alder Reactions. Chemistry and Biology of Biosynthetic Diels-Alder Reactions. **Angewandte Chemie International Edition**, 42, p. 3078- 3115, 2003.
- SUNGHWA, F.; KOKETSU, M. Phenolic and bis-iridoid glycosides from *Strychnos cocculoides*. **Natural Product Research**, 23(15), p. 1408-1415, 2009.

- TANAKA, J. C. A.; SILVA, C. C.; FERREIRA, I. C. P.; MACHADO, G. M. C.; LEON, L. L.; OLIVEIRA, A. J. B.; Antileishmanial activity of indole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*. **Phytomedicine**, 14, p. 377-380, 2007.
- ZÈCHES-HANROT, M.; NUZILLARD, J.-M.; RICHARD, B.; SCHALLER, H.; HADI, H. A.; SÉVENET, T.; MEN-OLIVIER, L. L. Alkaloids from Leaves and Stem Bark of *Ervatamia peduncularis*. **Phytochemistry**, 40(2), p. 587-591, 1995.
- ZÈCHES, M.; MESBAH, K.; RICHARD, B.; MORETTI, C.; NUZILLARD, J. M.; MEN-OLIVIER, L. L. Alkaloids from Leaves and Stems of *Vallesia glabra*. **Planta Medica**, 61, p. 89-91, 1995.
- ZHANG, X.; XU, Q.; XIAO, H.; LIANG, X. Iridoid glucosides from *Strychnos mux-vomica*. **Phytochemistry**, 64, p. 1341-1344, 2003.
- ZHU, W.-M.; LU, C.-H.; WANG, Y.; ZHOU, J.; HAO, X.-J. Monoterpenoids and Their Glycosides from *Winchia Calophylla*. **Journal of Asian Natural Products Research**, 6(3), p. 193-198, 2004.
- WENKERT, E. Biosynthesis of Indole Alkaloids. The *Aspidosperma* and *Iboga* Bases. **Journal of the American Chemical Society**, 84, p. 98-102, 1962.
- WENKERT, E.; COCHRAN, D. W.; HAGAMAN, E. W.; SCHELL, F. M.; NEUSS, N.; KATNER, A. S.; POTIER, P.; KAN, C.; PLAT, M.; KOCH, M.; MEHRI, H.; POISSON, J.; KUNESCH, N.; ROLLAND, Y. Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of Naturally Occurring Substances. XIX. *Aspidosperma* Alkaloids. **Journal of the American Chemical Society**, 95, p. 4990-4995, 1973.
- WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenin-induced edema in hind paw of rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, 111, p. 544-547, 1962.
- WU, Y.; SUEHIRO, M.; KITAJIMA, M.; MATSUZAKI, T.; HASHIMOTO, S.; NAGAOKA, M.; ZHANG, R.; TAKAYAMA, H. Rhazinilam and Quebrachamine Derivatives from Yunnan *Kopsia arborea*. **Journal of Natural Products**, 72(2), p. 204-209, 2009.
- YIN, W.; KABIR, M. S.; WANG, Z.; RALLAPALLI, S. K.; JUN MA; COOK, J. M. Enantiospecific Total Synthesis of the Important Biogenetic Intermediates along the Ajmaline Pathway, (+)-Polyneuridine and (+)-Polyneuridine Aldehyde, as well as 16-Epivelloimine and Macusine A. **Journal of Organic Chemistry**, 75, p. 3339-3349, 2010.