

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA**

**DANIEL ESDRAS DE ANDRADE UCHOA**

**APLICAÇÃO DE TÉCNICAS CONTEMPORÂNEAS DE  
RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR  
NO ESTUDO FITOQUÍMICO DE  
*ASPIDOSPERMA ULEI* MARKGF.**

**Fortaleza  
2006**

**DANIEL ESDRAS DE ANDRADE UCHOA**


**APLICAÇÃO DE TÉCNICAS CONTEMPORÂNEAS DE  
RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR  
NO ESTUDO FITOQUÍMICO DE  
*ASPIDOSPERMA ULEI* MARKGF.**

Tese submetida à Coordenação de Pós-Graduação em Química Orgânica, como requisito parcial, para a obtenção do Título de Doutor em Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Edilberto Rocha Silveira.

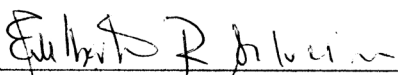
**Fortaleza  
2006**

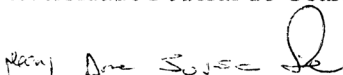
Esta Tese foi aprovada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Doutor em Química Orgânica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, em cuja Biblioteca de Ciências e Tecnologia/UFC encontra-se à disposição dos interessados.

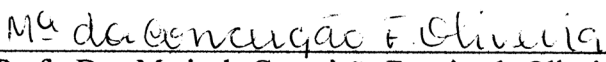
  
\_\_\_\_\_  
Daniel Esdras de Andrade Uchoa

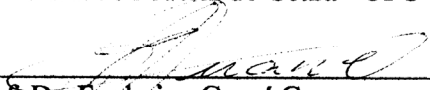
TESE APROVADA EM: 20/12/2006

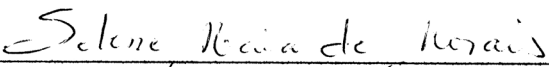
EXAMINADORES:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Edilberto Rocha Silveira  
Universidade Federal do Ceará - UFC

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª Dra. Mary Anne Sousa Lima  
Universidade Federal do Ceará - UFC

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª Dra. Maria da Conceição Ferreira de Oliveira  
Universidade Federal do Ceará - UFC

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Frederico Guaré Cruz  
Universidade Federal da Bahia - UFBA

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª Dra. Sélene Maia de Moraes  
Universidade Estadual do Ceará - UECE

A Deus por todas as conquistas.  
A meus pais, Antônio e Edneuda, pelo amor e oportunidades.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida.

Aos meus pais, Antonio e Edneuda, pelo amor e apoio durante todos os momentos de minha vida.

Ao professor Edilberto Rocha Silveira, que com compreensão e paciência me guiou até a conclusão desse trabalho. Por seus conselhos, algumas vezes contundentes, mas sempre corretos.

Às professoras Maria da Conceição Ferreira de Oliveira, Mary Anne Sousa Lima e Otília Deusdênia Loiola Pessoa, coordenadoras do Curso de Pós-Graduação em Química Orgânica, pelos esforços realizados para que esse trabalho pudesse ser concluído.

Ao professor Vietla S. N. Rao e a Adriana Rolim Campos, aluna de Doutorado, do Curso de Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, pela contribuição através dos estudos farmacológicos dos extratos e frações de *Aspidosperma ulei*.

Aos colegas operadores do CENAUREMN.

A todos os professores do Curso, que me ajudaram a crescer um pouco mais em saber.

A todos os alunos do Curso de Pós-Graduação.

Aos funcionários do Curso de Pós-Graduação em Química Orgânica.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente influenciaram a minha vida, me possibilitando chegar até aqui.

A minha amiga e amor, Jeanny da Silva Maciel, por estar sempre ao meu lado.

## RESUMO

O material vegetal (raiz e caule) de *Aspidosperma ulei* Markgf (Apocinaceae), popularmente conhecida como Pitiá, foi coletado na localidade de Garapa, no município de Acarape, Ceará. Neste trabalho, alíquotas dos extratos etanólicos da casca da raiz e da casca do caule de *A. ulei* foram submetidos a cromatografias sobre sephadex e/ou sílica gel, e CLAE, possibilitando o isolamento dos alcalóides (+)-20(S)-uleina (AU-1), (+)-20S-dasicarpidona (AU-2), (-)-16,19-dimetil-3,5,14,21-tetra-hidro-elipticina (AU-3), (-)- $\beta$ -ioimbina (AU-4), (-)-20(S)-N-desmetil-uleina (AU-5), (+)-15(S)-18-hidroxi-20(Z)-16,17-nor-subincanadina E (AU-7) e (+)-15(S)-20(Z)-16,17-nor-subincanadina E (AU-8), e o derivado do inositol (-)-D-1-O-metil-*myo*-inositol (AU-6). Desses alcalóides, (+)-15(S)-18-hidroxi-20(Z)-16,17-nor-subincanadina E (AU-7) e (+)-15(S)-20(Z)-16,17-nor-subincanadina E (AU-8) são inéditos na literatura como produtos naturais, embora o último já tenha sido caracterizado como intermediário de sínteses de alcalóides de *Strycnos*. A identificação e caracterização dos compostos isolados foi realizada por técnicas espectrométricas como I.V. e RMN uni- e bidimensionais, inclusive técnicas contemporâneas como HSQC editado, HSQC-TOCSY e  $^1\text{H},\text{X}$ -HMBC ( $\text{X} = ^{13}\text{C}$  ou  $^{15}\text{N}$ ). Estudos farmacológicos de uma fração do extrato etanólico da casca da raiz de *A. ulei*, rica em alcalóides, realizados no Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC, pelo Prof. V. S. N. Rao, demonstrou o efeito pró-erectil dessa fração em ratos, em três casos distintos: ereção peniana, tipo-ereção e similar a ereção. Injeção intraperitoneal da fração (25 a 50 mg/Kg), possibilitou observar efeitos semelhantes ao efeito observado para a ioimbina (2 mg/Kg). Esse estudo apoia o uso tradicional de extratos de espécies de *Aspidosperma* em deficiências orgânicas eréteis.

Palavras-chave: *Aspidosperma ulei* Markgf, alcalóides indólicos, dados de RMN  $^{13}\text{C}$ .

## ABSTRACT

The material (root and stem) of *Aspidosperma ulei* Markgf (Apocinaceae), popularly known as Pitiá, was collected in the locality of Garapa, Acarape County, Ceará. In this work, aliquots of the ethanol extracts of the root and of the stem barks of *A. ulei* were submitted to chromatographic analysis in sephadex and silica gel, and CLAE, making possible the isolation of the alkaloids (+)-20(*S*)-uleine (AU-1), (+)-20(*S*)-dasicarpidone (AU-2), (-)-16,19-dimethyl-3,5,14,21-tetra-hydro-ellipticine (AU-3), (-)- $\beta$ -yohimbine (AU-4), (-)-20(*S*)-*N*-demethyl-uleine (AU-5), (+)-15(*S*)-18-hydroxy-20(*Z*)-16,17-nor-subincanadine E (AU-7) and (+)-15(*S*)-20(*Z*)-16,17-nor-subincanadine E (AU-8), and a inositol derivative, the (-)-D-1-O-methyl-*myo*-inositol (AU-6). The alkaloid (+)-15(*S*)-18-hydroxy-20(*Z*)-16,17-nor-subincanadine E (AU-7) and (+)-15(*S*)-20(*Z*)-16,17-nor-subincanadine E (AU-8) are related for the first time as natural product, but the last one has been characterized as an intermediary of the *Strycnos*' alkaloids synthesis. The identification and characterization of the isolated compounds was accomplished by IR and 1D and 2D NMR techniques, mainly contemporary techniques as edited HSQC, HSQC-TOCSY and <sup>1</sup>H,X-HMBC (X = <sup>13</sup>C or <sup>15</sup>N). Pharmacological studies of an alkaloid rich fraction of the root bark of *A. ulei*, accomplished in the Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC by Prof. V. S. N. Rao, demonstrated the pro-erectile effect of that fraction in three cases: penile erection, erection-like and genital grooming in mice. Intraperitoneal injection of the fraction (25 to 50 mg/Kg), shown all three different responses similar to yohimbine (2 mg/Kg). This study further supports the traditional use of extracts from *Aspidosperma* species in erectile dysfunctions.

Keywords: *Aspidosperma ulei* Markgf, indole alkaloids, <sup>13</sup>C NMR data.

## LISTAS DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b>	Dependência do sinal de diferentes HnX com relação a $\phi$ . Para $\phi = 0$ ou $180^\circ$ observa-se amplitudes máximas para todos os sinais, enquanto para $\phi = 90^\circ$ observa-se apenas HX (Parella; Sánchez-Ferrando; Virgili, 1997). ...	23
<b>FIGURA 2.</b>	Seqüência de pulsos do ge-HSQC-TOCSY (NMRGuide 3.5, 2003). ....	24
<b>FIGURA 3.</b>	<i>Aspidosperma ulei</i> Markgf. (a) árvores, (b) flores e (c) frutos. Fotos: Prof. Edilberto R. Silveira. ....	25
<b>FIGURA 4.</b>	Compostos isolados a partir de <i>Aspidosperma ulei</i> , de acordo com a literatura: uleina (I), N-metil-tetrahydroelipticina (II), dihidroolivacina (III) e N-metiltetrahydroolivaona (IV). ....	26
<b>FIGURA 5.</b>	Cobaias sob efeito de uma injeção intraperitoneal de AUFRA apresentando os três tipos de reações observadas: (A) ereção peniana, (B) similar à ereção e (C) crescimento genital. Fotos: Adriana Campos Rolim. ...	26
<b>FIGURA 6.</b>	Espectro na região do infravermelho de AU1. ....	46
<b>FIGURA 7.</b>	Espectro de RMN $^1\text{H}$ de AU1 (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) e expansões. ....	54
<b>FIGURA 8.</b>	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de AU1 (125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ). ....	54
<b>FIGURA 9.</b>	Espectro de RMN 2D $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC editado de AU1 (500/125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ), com fase positiva (CH e $\text{CH}_3$ ) em vermelho e negativa ( $\text{CH}_2$ ) em azul. ....	55
<b>FIGURA 10.</b>	Espectro de RMN 2D $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY de AU1 (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ). As setas numeradas representam as correlações vicinais observadas e sua numeração corresponde a numeração dos picos observados no espectro. ....	56
<b>FIGURA 11.</b>	Espectro de RMN 2D $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC-TOCSY de AU1 (500/125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ). A numeração colorida na estrutura e espectro indica a seqüência observada para os hidrogênios. ....	57
<b>FIGURA 12.</b>	Espectro de RMN 2D $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC de AU1 (500/125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) com expansão. As setas numeradas representam as principais correlações à longa distância observadas e sua numeração corresponde a numeração dos picos observados no espectro. ....	58
<b>FIGURA 13.</b>	Espectro de RMN 2D $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -NOESY de AU1 (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ). As setas numeradas representam as principais correlações dipolares observadas e sua numeração corresponde a numeração dos picos observados no espectro. ....	59
<b>FIGURA 14.</b>	Espectro de RMN $^1\text{H}$ de AU1 (a) não irradiado e RMN 1D $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -NOE seletivo de AU1 irradiado em (b) $\delta_{\text{H}}$ 4,80 (H-21), (c) $\delta_{\text{H}}$ 2,91 (H-15), (d) $\delta_{\text{H}}$ 2,72 (H-3b/H-5) e (e) $\delta_{\text{H}}$ 1,92 (H-14b). As setas numeradas representam as principais correlações dipolares observadas e sua numeração corresponde a numeração dos picos observados no espectro. ....	60
<b>FIGURA 15.</b>	Espectro de RMN $^1\text{H}$ de AU1 (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) e expansões. ....	61
<b>FIGURA 16.</b>	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de AU1 (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). ....	61
<b>FIGURA 17.</b>	Espectro de RMN 2D $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC editado de AU1 (500/125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ), com fase positiva (CH e $\text{CH}_3$ ) em vermelho e negativa ( $\text{CH}_2$ ) em azul. ....	62
<b>FIGURA 18.</b>	Espectro de RMN 2D $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY de AU1 (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). As setas numeradas representam as correlações vicinais observadas e sua numeração corresponde a numeração dos picos observados no espectro. ....	63



<b>FIGURA 19.</b> Espectro de RMN 2D $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ -HMBC DE AU1 (500/125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) e expansão. As setas numeradas representam as principais correlações a longa distância observadas e sua numeração corresponde a numeração dos picos observados no espectro. ....	64
<b>FIGURA 20.</b> Espectro de RMN 2D $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ -NOESY de AU1 (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). As setas numeradas representam as principais correlações dipolares observadas e sua numeração corresponde a numeração dos picos observados no espectro. ....	65
<b>FIGURA 21.</b> Espectro na região do infravermelho de AU2. ....	66
<b>FIGURA 22.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ de AU2 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) e expansões. ....	71
<b>FIGURA 23.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de AU2 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz). ....	71
<b>FIGURA 24.</b> Espectro de RMN 2D $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ -HSQC editado de AU2 (500/125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ), com fase positiva (CH e $\text{CH}_3$ ) em vermelho e negativa ( $\text{CH}_2$ ) em azul. ....	72
<b>FIGURA 25.</b> Espectro de RMN 2D $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ -COSY de AU2 (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ). As setas numeradas representam as correlações vicinais observadas e sua numeração corresponde a numeração dos picos observados no espectro. ....	73
<b>FIGURA 26.</b> Espectro de RMN 2D $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ -HSQC-TOCSY de AU2 (500/125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ). A numeração colorida na estrutura e espectro indica a seqüência observada para os hidrogênios. ....	74
<b>FIGURA 27.</b> Espectro de RMN 2D $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ -HMBC (500/125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de AU2. As setas numeradas representam as principais correlações a longa distância observadas e sua numeração corresponde a numeração dos picos observados no espectro. ....	75
<b>FIGURA 28.</b> Espectros de RMN 1D $^1\text{H}$ (a) não irradiado e RMN 1D $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ -SELNO irradiado em (b) $\delta_{\text{H}}$ 4,42 (H21); (c) $\delta_{\text{H}}$ 2,64 (H3a/H15); e (d) $\delta_{\text{H}}$ 2,33 (H5/H20), de AU2 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz). As setas numeradas representam as principais correlações dipolares observadas e sua numeração corresponde a numeração dos picos observados no espectro. ....	76
<b>FIGURA 29.</b> Espectro na região do infravermelho de AU3. ....	77
<b>FIGURA 30.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ de AU3 (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ) e expansões. ....	81
<b>FIGURA 31.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (BB e DEPT135) de AU3 (125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ). ....	81
<b>FIGURA 32.</b> Espectro de RMN 2D $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ -HSQC de AU3 (500/125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ). ....	82
<b>FIGURA 33.</b> Espectro de RMN 2D $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ -COSY de AU3 (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ) (contornos de acoplamento em azul) e 2D $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ -NOESY de AU3 (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ) (contornos de acoplamento em preto), superpostos. As setas indicam as interações dipolares do NOESY (números em preto) e as correlações escalares entre hidrogênios do COSY (letras em azul). As setas numeradas representam as correlações escalares vicinais (em preto) e as interações dipolares (em azul) observadas e sua numeração corresponde a numeração dos picos observados no espectro. ....	83
<b>FIGURA 34.</b> Espectro de RMN 2D $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ -HMBC de AU3 (500/125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ). As setas numeradas representam as principais correlações a longa distância observadas e sua numeração corresponde a numeração dos picos observados no espectro. ....	84
<b>FIGURA 35.</b> Espectro na região do infravermelho de AU4. ....	85
<b>FIGURA 36.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ de AU4 (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) e expansões. ....	92
<b>FIGURA 37.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de AU4 (125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ). ....	92

<b>FIGURA 38.</b> Espectro de RMN 2D $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC editado de AU4 (500/125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ), com fase positiva (CH e $\text{CH}_3$ ) em vermelho e negativa ( $\text{CH}_2$ ) em azul. ....	93
<b>FIGURA 39.</b> Espectro de RMN 2D $^1\text{H},^1\text{H}$ -COSY de AU4 (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ). As setas numeradas representam as correlações vicinais observadas e sua numeração corresponde a numeração dos picos observados no espectro. ....	94
<b>FIGURA 40.</b> Espectro de RMN 2D $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HMBC de AU4 (500/125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ). As setas numeradas representam as principais correlações a longa distância observadas e sua numeração corresponde a numeração dos picos observados no espectro. ....	95
<b>FIGURA 41.</b> (a) Espectro de RMN $^1\text{H}$ de AU4 (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) e espectros de RMN 1D $^1\text{H},^1\text{H}$ -NOE seletivo de AU4 (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) irradiado em (b) $\delta_{\text{H}}$ 3,75 (H17), (c) 3,23 (H3), (d) 2,71 (H6b), (e) 2,60 (H5b) e (f) 1,13 (H19b). As setas numeradas representam as principais correlações dipolares observadas e sua numeração corresponde a numeração dos picos observados no espectro. ....	96
<b>FIGURA 42.</b> Espectro na região do infravermelho de AU5. ....	97
<b>FIGURA 43.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ de AU5 (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) e expansões. ....	101
<b>FIGURA 44.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de AU5 (125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ). ....	101
<b>FIGURA 45.</b> Espectro de RMN 2D $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC editado de AU5 (500/125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ), com fase positiva (CH e $\text{CH}_3$ ) em vermelho e negativa ( $\text{CH}_2$ ) em azul. ....	102
<b>FIGURA 46.</b> Espectro de RMN 2D $^1\text{H},^1\text{H}$ -COSY de AU5 (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ). As setas numeradas representam as correlações vicinais observadas e sua numeração corresponde a numeração dos picos observados no espectro. ....	103
<b>FIGURA 47.</b> Espectro de RMN 2D $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HMBC de AU5 (500/125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) com expansões. As setas. ....	104
<b>FIGURA 48.</b> Espectro de RMN 2D $^1\text{H},^1\text{H}$ -NOESY de AU5 (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ). As setas numeradas representam as principais correlações dipolares observadas e sua numeração corresponde a numeração dos picos observados no espectro. ....	105
<b>FIGURA 49.</b> Espectro na região do infravermelho de AU6. ....	106
<b>FIGURA 50.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ de AU6 (500 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ ) e expansões. ....	111
<b>FIGURA 51.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de AU6 (125 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ ). ....	111
<b>FIGURA 52.</b> Espectro de RMN 2D $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC de AU6 (500/125 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ ). ....	112
<b>FIGURA 53.</b> Espectro de RMN 2D $^1\text{H},^1\text{H}$ -COSY de AU6 (500 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ ). As setas numeradas representam as correlações vicinais observadas e sua numeração corresponde a numeração dos picos observados no espectro. ....	113
<b>FIGURA 54.</b> Espectro de RMN 2D $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HMBC de AU6 (500/125 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ ) com expansões. As setas numeradas representam as principais correlações a longa distância observadas e sua numeração corresponde a numeração dos picos observados no espectro. ....	114
<b>FIGURA 55.</b> Espectro de RMN 2D $^1\text{H},^1\text{H}$ -NOESY de AU6 (500 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ ). A seta numerada representa a correlação dipolar observada e sua numeração corresponde a numeração do pico observado no espectro. ....	115
<b>FIGURA 56.</b> Espectro na região do infravermelho de AU7. ....	116
<b>FIGURA 57.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ de AU7 (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) e expansões. ....	122
<b>FIGURA 58.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -BB de AU7 (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ). ....	122

- FIGURA 59.** Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC editado de AU7 (500/125 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ), com fase positiva (CH e  $\text{CH}_3$ ) em vermelho e negativa ( $\text{CH}_2$ ) em azul. .... 123
- FIGURA 60.** Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC-TOCSY de AU7 (500/125 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ). A numeração colorida na estrutura e espectro indica a seqüência observada para os hidrogênios. .... 124
- FIGURA 61.** Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HMBC de AU7 (500/125 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ). .... 125
- FIGURA 62.** Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HMBC de AU7 (500/125 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ): expansões das regiões entre (a)  $\delta_{\text{H}}$  12,0-11,5/ $\delta_{\text{C}}$  140,0-108,0 ppm e (b)  $\delta_{\text{H}}$  7,75-7,18/ $\delta_{\text{C}}$  140,0-108,0 ppm. As setas numeradas representam as principais correlações a longa distância observadas e sua numeração corresponde a numeração dos picos observados no espectro. .... 126
- FIGURA 63.** Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HMBC de AU7 (500/125 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ): expansões da região entre (a)  $\delta_{\text{H}}$  6,5-4,0/ $\delta_{\text{C}}$  62,0-20,0 ppm e (b)  $\delta_{\text{H}}$  6,5-4,0/ $\delta_{\text{C}}$  170,0-110,0 ppm. As setas numeradas representam as principais correlações a longa distância observadas e sua numeração corresponde a numeração dos picos observados no espectro. .... 127
- FIGURA 64.** Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HMBC de AU7 (500/125 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ): expansões das regiões entre (a)  $\delta_{\text{H}}$  3,4-2,4/ $\delta_{\text{C}}$  150,0-127,0 ppm, (b)  $\delta_{\text{H}}$  3,4-2,4/ $\delta_{\text{C}}$  114,0-110,0 ppm, (c)  $\delta_{\text{H}}$  3,4-2,4/ $\delta_{\text{C}}$  52,0-39,0 ppm e (d)  $\delta_{\text{H}}$  3,4-2,4/ $\delta_{\text{C}}$  32,0-19,0 ppm. As setas numeradas representam as principais correlações a longa distância observadas e sua numeração corresponde a numeração dos picos observados no espectro. .... 128
- FIGURA 65.** Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HMBC de AU7 (500/125 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ): expansões das regiões entre (a)  $\delta_{\text{H}}$  2,0-1,3/ $\delta_{\text{C}}$  145,0-135,0 ppm e (b)  $\delta_{\text{H}}$  2,0-1,3/ $\delta_{\text{C}}$  50,0-25,0 ppm. As setas numeradas representam as principais correlações a longa distância observadas e sua numeração corresponde a numeração dos picos observados no espectro. .... 129
- FIGURA 66.** Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HMBC de AU7 (500/50,7 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ). As setas numeradas representam as principais correlações a longa distância observadas e sua numeração corresponde a numeração dos picos observados no espectro. .... 130
- FIGURA 67.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de AU7 (500 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) (a) não irradiado e RMN 1D  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -NOE seletivo de AU7 (500 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) irradiado em (b)  $\delta_{\text{H}}$  11,73 (NH), (c)  $\delta_{\text{H}}$  6,06 (H16), (d)  $\delta_{\text{H}}$  3,12 (H14a) e (e)  $\delta_{\text{H}}$  2,61 (H5b) ( $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ , 500 MHz). As setas numeradas representam as principais correlações dipolares observadas e sua numeração corresponde a numeração dos picos observados no espectro. .... 131
- FIGURA 68.** Espectro na região do infravermelho de AU8. .... 132
- FIGURA 69.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de AU8 (500 MHz,  $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ ) e expansões. .... 138
- FIGURA 70.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB de AU8 (125 MHz,  $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ ). .... 138
- FIGURA 71.** Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC editado de AU8 (500/125 MHz,  $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ ), com fase positiva (CH e  $\text{CH}_3$ ) em vermelho e negativa ( $\text{CH}_2$ ) em azul. .... 139
- FIGURA 72.** Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC-TOCSY de AU8 (500/125 MHz,  $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ ). A numeração colorida na estrutura e espectro indica a seqüência observada para os hidrogênios. .... 140
- FIGURA 73.** Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HMBC de AU8 (500/125 MHz,  $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ ) com expansões. As setas numeradas representam as principais correlações

- a longa distância observadas e sua numeração corresponde a numeração dos picos observados no espectro. .... 141
- FIGURA 74.** Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HMBC de AU8 (500/50,7 MHz,  $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ ). As setas numeradas representam as principais correlações à longa distância observadas e sua numeração corresponde a numeração dos picos observados no espectro. .... 142
- FIGURA 75.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de AU8 (500 MHz,  $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ ) (a) não irradiado e RMN  $^1\text{H}$  NOE seletivo de AU8 (500 MHz,  $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ ) irradiado em (b)  $\delta_{\text{H}}$  5,63 (H19) e (c)  $\delta_{\text{H}}$  1,87 (H14a) ( $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ , 500 MHz). As setas numeradas representam as principais correlações dipolares observadas e sua numeração corresponde a numeração dos picos observados no espectro. .... 143
- FIGURA 76.** Cromatograma obtido a partir da fração ApCCE-A(4-5)(1). .... 156
- FIGURA 77.** Cromatograma obtido a partir da fração ApCCE-B(4-5)(1). .... 157

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1.</b>	Espécies do gênero <i>Aspidosperma</i> , em ordem alfabética, estudadas nos últimos 20 anos (1986-2006), parte estudada e substâncias isoladas. ....	32
<b>TABELA 2.</b>	Dados de RMN $^{13}\text{C}$ de alcalóides de espécies de <i>Aspidosperma</i> , agrupadas de acordo com seus esqueletos básicos, nos últimos 20 anos (1986-2006). Dados obtidos em $\text{CDCl}_3$ , exceto quando especificado o contrário. ....	38
<b>TABELA 3.</b>	Dados de RMN 1D e 2D de $^{13}\text{C}$ e $^1\text{H}$ para AU1. ....	48
<b>TABELA 4.</b>	Dados de RMN $^{13}\text{C}$ de AU1 em comparação com dados da literatura. ....	50
<b>TABELA 5.</b>	Dados de RMN $^1\text{H}$ de AU1, em comparação com dados da literatura. ....	51
<b>TABELA 6.</b>	Dados de RMN 1D e 2D de $^{13}\text{C}$ e $^1\text{H}$ para AU2, em $\text{CD}_3\text{OD}$ ( $\delta_{\text{C}}$ 49,15 e $\delta_{\text{H}}$ 3,31). ....	68
<b>TABELA 7.</b>	Dados de RMN $^{13}\text{C}$ e $^1\text{H}$ de AU2 e AU1 em comparação com dados da literatura. ....	70
<b>TABELA 8.</b>	Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ para AU3, obtidos a partir dos espectros RMN $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ (BB e DEPT135), HSQC, COSY e NOESY, em DMSO ( $\delta_{\text{C}}$ 39,51 e $\delta_{\text{H}}$ 2,51). ....	79
<b>TABELA 9.</b>	Comparação dos dados de RMN $^{13}\text{C}$ e $^1\text{H}$ de AU3 e dados da literatura (Ishikura, M. <i>et al.</i> 2000). ....	80
<b>TABELA 10.</b>	Dados de RMN $^{13}\text{C}$ e $^1\text{H}$ para AU4 obtidos a partir dos espectros 1D e 2D de AU4. ....	87
<b>TABELA 11.</b>	Dados de RMN $^{13}\text{C}$ de AU4 e dados da literatura (Wenkert, E. <i>et al.</i> 1976). Os valores em negrito indicam coincidências de $\delta_{\text{C}}$ entre os compostos. ....	90
<b>TABELA 12.</b>	Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ e $^1\text{H}$ obtidos a partir dos espectros 1D e 2D para AU5, em $\text{CD}_3\text{OD}$ . ....	99
<b>TABELA 13.</b>	Comparação dos dados de RMN $^{13}\text{C}$ e $^1\text{H}$ de AU1 e AU5, em $\text{CD}_3\text{OD}$ ( $\delta_{\text{C}}$ 49,15; $\delta_{\text{H}}$ 3,31). ....	100
<b>TABELA 14.</b>	Dados de RMN 1D e 2D de $^{13}\text{C}$ e $^1\text{H}$ , para AU6, em $\text{D}_2\text{O} + \text{DSS}$ ( $\delta_{\text{C}}$ 0; $\delta_{\text{H}}$ 0). ....	107
<b>TABELA 15.</b>	Dados de RMN $^{13}\text{C}$ de AU6 <sup>a</sup> e alguns inosítois e seus derivados metilados (Dorman, D. E.; Angyal, S. J.; Roberts, J. D. 1970) <sup>b</sup> . ....	108
<b>TABELA 16.</b>	Dados de RMN 1D e 2D de $^{13}\text{C}$ e $^1\text{H}$ para AU7, em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ( $\delta_{\text{C}}$ 123,87; $\delta_{\text{H}}$ 7,22). ....	118
<b>TABELA 17.</b>	Dados de RMN $^{13}\text{C}$ de AU7 e dados da literatura (Amat, M. 1999). ....	120
<b>TABELA 18.</b>	Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ e $^1\text{H}$ de AU8, em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ( $\delta_{\text{C}}$ 123,87; $\delta_{\text{H}}$ 7,22). ....	134
<b>TABELA 19.</b>	Comparação dos dados de RMN de $^{13}\text{C}$ de AU8 e dados da literatura (Amat, M. <i>et al.</i> 1997; Kobayashi, J. <i>et al.</i> , 2002). ....	136

## LISTA DE QUADROS

<b>QUADRO 1.</b>	Substâncias isoladas de espécies de Aspidosperma nos últimos 20 anos (1986-2006), agrupadas de acordo com seus esqueletos básicos.....	34
<b>QUADRO 2.</b>	Estruturas parciais obtidas pelos experimentos (a) COSY. (b) HSQC-TOCSY.....	49
<b>QUADRO 3.</b>	Proposta estrutural para AU1. ....	49
<b>QUADRO 4.</b>	Uleina e 20-epi-Uleina: duas configurações possíveis para o carbono 20. ....	49
<b>QUADRO 5.</b>	Correlações dipolares observadas através do NOESY.....	52
<b>QUADRO 6.</b>	Correlações dipolares observadas através do SELNOE.....	53
<b>QUADRO 7.</b>	Subestruturas obtidas através das correlações observadas nos experimentos COSY e HSQC-TOCSY. (a) Sistema indólico; (b) Cadeia saturada. ....	67
<b>QUADRO 8.</b>	Correlações observadas no espectro HMBC para AU2. ....	69
<b>QUADRO 9.</b>	Principais correlações dipolares observadas através do SELNOE para AU2. ....	70
<b>QUADRO 10.</b>	Subestruturas obtidas a partir dos dados de RMN 1D e 2D para AU3. ....	78
<b>QUADRO 11.</b>	Proposta estrutural e dados do HMBC para AU3. ....	79
<b>QUADRO 12.</b>	Estruturas parciais obtidas através do COSY.....	86
<b>QUADRO 13.</b>	Proposta estrutural para AU4 e correlações a longa distância obtidas no espectro HMBC.....	88
<b>QUADRO 14.</b>	Estrutural da ioimbina, em conformação cadeira (3 <i>S</i> ,15 <i>S</i> ,16 <i>R</i> ,17 <i>S</i> ,20 <i>R</i> ). ....	88
<b>QUADRO 15.</b>	Correlações observadas para H-19b, H-17 e H-3 no SELNOE. ....	89
<b>QUADRO 16.</b>	Proposta estrutural para AU5. ....	98
<b>QUADRO 17.</b>	Correlações espaciais observadas no SELNOE para AU5. ....	100
<b>QUADRO 18.</b>	Proposta estrutural para AU6. ....	107
<b>QUADRO 19.</b>	Comparação dos dados de RMN <sup>13</sup> C entre 2, 2a e 2b.....	109
<b>QUADRO 20.</b>	Comparação dos dados de RMN <sup>13</sup> C entre 4 e 5.....	109
<b>QUADRO 21.</b>	Subestruturas de AU7 obtidas a partir do HSQC-TOCSY. ....	117
<b>QUADRO 22.</b>	Estrutura proposta para AU7, e dados de correlações do HMBC.....	119
<b>QUADRO 23.</b>	Estrutura da delavirdina e estrutura proposta para AU7, comparando os deslocamentos químicos de seus nitrogênios. As setas indicam as correlações observadas no <sup>1</sup> H, <sup>15</sup> N-HMBC para AU7. ....	120
<b>QUADRO 24.</b>	Correlações observadas no SELNOE para AU7.....	121
<b>QUADRO 25.</b>	Subestruturas obtidas a partir dos dados de COSY e HSQC-TOCSY para AU8. ....	133
<b>QUADRO 26.</b>	Proposta estrutural para AU8, e correlações obtidas a partir do espectro HMBC. ....	135
<b>QUADRO 27.</b>	Comparação dos dados de <sup>15</sup> N de AU8 e dados da literatura, e correlações a longa distância obtidas do espectro <sup>1</sup> H, <sup>15</sup> N-HMBC.....	135
<b>QUADRO 28.</b>	Correlações do SELNOE para AU8.....	137

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

1D	unidimensional
2D	bidimensional
APT	attached proton test
CC	cromatografia em coluna
CCD	cromatografia em camada delgada
CCR	cromatografia em coluna de fase reversa
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
COLOC	heteronuclear correlation via long range coupling
COSY	correlation spectroscopy
CW	continuous wave
dB	decibéis
DEPT	distortionless enhancement by polarization transfer
FT	Fourier transform
GE	gradient enhanced
HBBD	hydrogen broad band decoupling
HETCOR	heteronuclear chemical shift correlation
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation
HMQC	heteronuclear multiple quantum coherence
HSQC	heteronuclear single quantum coherence
IV	infravermelho
INEPT	insensitive nucleus enhancement by polarization transfer
LR-HETCOR	long-range heteronuclear chemical shift correlation
NOE	nuclear Overhauser enhancement
NOEDIFF	nuclear Overhauser enhancement difference spectroscopy
NOESY	nuclear Overhauser enhancement spectroscopy
PDA	photo diodo array
PFG	pulsed field gradient
RMN	ressonância magnética nuclear
SELNOE	selective NOE
TOCSY	total correlation spectroscopy

## SUMÁRIO

<b>LISTAS DE FIGURAS</b> .....	8
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	13
<b>LISTA DE QUADROS</b> .....	14
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	15
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>1.1 A RMN moderna</b> .....	19
1.1.1 RMN 1D ge- <sup>1</sup> H-NOE seletivo (SELNOE).....	21
1.1.2 RMN 2D ge- <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C-HSQC editado (HSQC editado).....	22
1.1.3 RMN 2D ge- <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C-HSQC-TOCSY (HSQC-TOCSY).....	23
<b>1.2 Considerações Botânicas, Químicas e Farmacológicas sobre Aspidosperma ulei Markgf.</b> .....	25
<b>1.3 Referências Bibliográficas</b> .....	27
<b>2 ALCALÓIDES DE ASPIDOSPERMA: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA DO GÊNERO.</b> .....	30
<b>2.1 Dados de RMN <sup>13</sup>C descritos da literatura para alcalóides isolados de espécies do gênero Aspidosperma entre 1986-2006.</b> .....	30
<b>2.2 Referências Bibliográficas</b> .....	42
<b>3 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL</b> .....	46
<b>3.1 Determinação Estrutural de AU1</b> .....	46
<b>3.2 Determinação Estrutural de AU2</b> .....	66
<b>3.3 Determinação Estrutural de AU3</b> .....	77
<b>3.4 Determinação Estrutural de AU4</b> .....	85
<b>3.5 Determinação Estrutural de AU5</b> .....	97
<b>3.6 Determinação Estrutural de AU6</b> .....	106
<b>3.7 Determinação Estrutural de AU7</b> .....	116
<b>3.8 Determinação Estrutural de AU8</b> .....	132
<b>4 PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	147
<b>4.1 Coleta do material</b> .....	147
<b>4.2 Métodos</b> .....	147
4.2.1. Cromatográficos.....	147
4.2.1.1 Cromatografia em coluna de fase normal (CC).....	147
4.2.1.2 Cromatografia em coluna de fase reversa C18 (CCR).....	147
4.2.1.2 Cromatográfica em camada delgada (CCD).....	148
4.2.1.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	148
4.2.2 Espectrométricos.....	148
4.2.2.1 Infravermelho (IV).....	148
4.2.2.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	148
4.2.3 Outros.....	149
4.2.3.1 Ponto de fusão.....	149
4.2.3.2 Rotação óptica.....	149
<b>4.3 Ensaios farmacológicos</b> .....	150
<b>4.4 Estudo da casca da raiz (CR) e casca do caule (CC) de Aspidosperma ulei Markgf.</b> .....	150
4.4.1 Preparação do Extrato Etanólico das Cascas da Raiz de Aspidosperma ulei - Pitiá (ApCRE).....	150
4.4.2 Preparação da fração alcaloídica para os ensaios farmacológicos.....	150
4.4.3 Identificação dos constituintes de ApCRE-AE.....	151
4.4.4 Partição ácida de ApCRE.....	152



4.4.4.1	Cromatografia em gel de sílica de ApCRE-A: Isolamento de AU-1, AU-2 e AU-3.....	152
4.4.4.2	Cromatografia em gel de sílica de ApCRE-B: Isolamento de AU-4, AU-5 e AU-6.....	154
4.4.5	Preparação do Extrato Etanólico das Cascas do Caule de <i>Aspidosperma ulei</i> - Pitiá (ApCCE).....	155
4.4.5.1	Partição ácida de ApCCE.....	155
4.4.5.2	Cromatografia em gel de sílica de ApCCE-A: Isolamento de AU-7 e AU-8 .....	155
4.4.5.3	Cromatografia em gel de sílica de ApCCE-B: Isolamento de AU-4 .....	157
<b>4.5</b>	<b>Referências Bibliográficas</b> .....	158
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	160
<b>6</b>	<b>ANEXO</b> .....	162

# Capítulo 1

## INTRODUÇÃO

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 A RMN moderna

A ressonância magnética nuclear (RMN) com transformada de Fourier (FT) trouxe duas grandes vantagens: a primeira foi um grande aumento na sensibilidade dos experimentos; a segunda, a possibilidade de estudar fenômenos dependentes do tempo, como troca química e relaxação, antes impossibilitados pela própria natureza da excitação por onda contínua (CW).

Uma terceira vantagem passou despercebida por um tempo até que em **1971**, Jeener descreveu um novo experimento, em que um sistema de spins acoplados foi excitado por uma seqüência de dois pulsos separados por um intervalo de tempo variável  $t_1$ . Jeener imaginou que se  $t_1$  fosse variado em valores pequenos em uma série de experimentos, isso deveria constituir uma nova dimensão, em função de  $t_1$ . A esse intervalo chamou-se “tempo de evolução”. Através desse procedimento obteve-se duas dimensões temporais independentes, com matriz  $S(t_1, t_2)$  cuja FT gera duas dimensões de frequência independentes de matriz  $S(f_1, f_2)$ , com intensidade  $S$ .

As técnicas criadas a partir das modificações propostas por Jeener passaram a ser classificadas como técnicas bidimensionais ou 2D, e subdivididas em homonucleares (mesmo núcleo) e heteronucleares (diferentes núcleos). A partir da técnica homonuclear  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -COSY (correlation spectroscopy), proposta por Jeener, em **1971**, diversas outras foram surgindo. Em 1978, Freeman e colaboradores apresentaram um experimento heteronuclear extremamente importante, o  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ -HETCOR (heteronuclear chemical shift correlation) (Freeman, **1978**), possibilitando o assinalamento de dois núcleos diferentes diretamente ligados. Esse mesmo experimento podia fornecer acoplamentos a longa distância ( $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ -LR-HETCOR, long-range HETCOR) pela mudança do valor da constante de acoplamento,  $J$ , desejada. No ano seguinte, Jeener propôs o  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -NOESY (nuclear overhauser enhancement spectroscopy) (Jeener, **1979**) após estudos de relaxação cruzada dipolar. O NOESY passou a ser a principal fonte de informação dos efeitos da dinâmica molecular. Em **1984**, Kessler e colaboradores propuseram um experimento mais eficiente para a obtenção de acoplamentos heteronucleares a longa distância, denominado  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ -COLOC (heteronuclear correlation via long-range couplings).

As técnicas unidimensionais (1D) de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , principalmente HBBD (hydrogen broad band decoupling) e DEPT (distorsionless enhancement by polarization transfer), além dos

quatro experimentos 2D citados acima, tornaram-se fundamentais para a determinação estrutural de compostos, principalmente em Química de Produtos Naturais.

No entanto, todas as técnicas heteronucleares geravam seus resultados pela observação direta dos núcleos de interesse, normalmente  $^{13}\text{C}$  e, principalmente para as técnicas 2D, isso ocasionava baixa sensibilidade e grande perda do tempo de máquina.

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

Um grande número de seqüências de pulsos vêm sendo propostas utilizando esse tipo de detecção. Técnicas como HETCOR e COLOC puderam ser substituídas por técnicas mais sensíveis, como  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMQC (heteronuclear multiple quantum coherence) (Muller, **1979**),  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC (heteronuclear single quantum coherence) (Bodenhauser, **1980**) e  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC (heteronuclear multiple bond correlation) (Bax, **1986**).

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

Atualmente, a rotina de laboratórios de RMN voltados a Química de Produtos Naturais envolve o uso de algumas poucas técnicas, de onde se pode tirar praticamente toda a informação necessária para a elucidação estrutural desses tipos de compostos. Normalmente essa rotina inicia-se com técnicas clássicas 1D como RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Além disso, empregam-se técnicas modernas 2D como COSY, HMQC ou HSQC e HMBC. Em casos onde seja necessária a determinação da estereoquímica relativa da molécula, ou para estudos que envolvam dinâmica molecular, o experimento NOESY é o mais empregado.

Um novo ganho de sensibilidade pode ser obtido pela introdução de gradiente de campo pulsado, do inglês “pulsed field gradient” (PFG) nas técnicas já utilizadas, substituindo-se a modulação de fase (*phase cycling*). A modulação de fase faz-se necessária para a perfeita coerência de ordem quântica e cancelamento das ordens não desejadas. O PFG conduz a uma seleção quântica muito mais eficiente e em um tempo muito menor. Dessa forma, espectros 2D com PFG possuem ruídos muito menores que aqueles obtidos com modulação de fase (Kaiser, **1999**). Além disso, observa-se ainda uma diminuição no tempo de experimento, redução do ruído de  $t_1$  em 2D e eficiente supressão de magnetização indesejada ( $^1\text{H}$ - $^{12}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ - $^{14}\text{N}$ , ...) em experimentos por detecção de prótio (Parella, **1998**).

Nesse trabalho nós introduzimos três técnicas recentes, em adição, ou substituição, às técnicas de rotina utilizadas atualmente na análise estrutural de produtos naturais, por sua aplicação, qualidade dos espectros obtidos e redução do tempo de análise. Essas técnicas encontram-se descritas a seguir.

### 1.1.1 RMN 1D ge- $^1\text{H}$ -NOE seletivo (SELNOE)

A observação do efeito nuclear Overhauser é crucial do processo de determinação estrutural por RMN. Esses efeitos são geralmente observados usando técnicas 1D, através de NOEDIFF (nOe por diferença de espectros), ou 2D, através do NOESY e ROESY. Os resultados da espectroscopia por diferença são observados devido à subtração de um espectro de controle de um espectro seletivamente irradiado no spin de interesse. O espectro por diferença, em princípio, apresenta apenas as ressonâncias do spin irradiado e daqueles que sofreram relaxação cruzada com o primeiro. Na prática, imperfeição na subtração leva a “artefatos de subtração” cuja presença muitas vezes torna difícil visualizar o nOe desejado. Novos experimentos têm realizado medidas de nOe pela introdução de PFG, evitando a diferença de espectros e, portanto, evitando artefatos. Como resultado valores muito pequenos de nOe podem ser obtidos e com maior confiabilidade.

O experimento SELNOE utiliza a seguinte seqüência de pulsos  $90^\circ_{x,\text{sel}} - G_1 - 90^\circ_x - \tau_m - G_m - 90^\circ_x - \tau_2 - 180^\circ_x - G_2 - \text{acq}$ , onde o primeiro pulso de  $90^\circ$  excita seletivamente somente as ressonâncias do spin de interesse (Stonehouse, **1994**). Em sistemas de spins escalarmente acoplados existe um problema em potencial, como resultado do pulso seletivo e do gradiente  $G_1$ . Após esses pulsos, o segundo pulso de  $90^\circ$  pode gerar sinais dispersivos, correspondentes a sinais observados no COSY. Ainda assim, isso pode ser considerado uma vantagem por

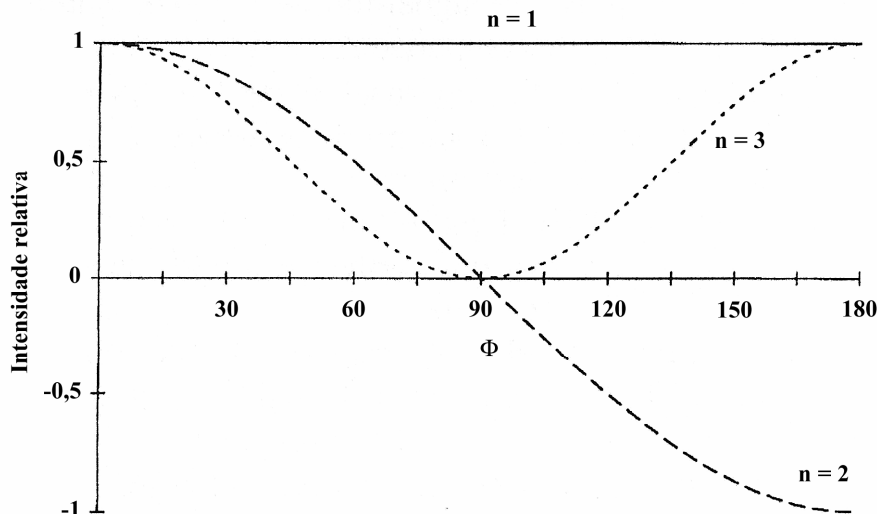
possibilitar distinguir esse tipo de acoplamento.  $\tau_m$  representa o tempo de mistura utilizado para experimentos de nOe, e deve ser cuidadosamente ajustado para cada amostra, no entanto, o uso de PFG possibilita utilizar longos valores de  $\tau_m$ , mesmo que as intensidades absolutas observadas para os nOe's diminuam, uma vez que os artefatos de subtração não irão interferir no resultado final.

Além da aplicação do gradiente e ausência de subtração, outra diferença importante entre o SELNOE e o NOEDIFF diz respeito a seletividade. Enquanto o NOEDIFF utiliza largura de pulso da ordem de microsegundos com alta potência (“hard pulses”), o SELNOE utiliza largura de pulso da ordem de milisegundos com potências mais atenuadas (“soft pulses”). Com isso, a largura espectral irradiada pelo SELNOE é muito menor (mais seletiva) que no NOEDIFF, possibilitando irradiar sinais sem interferir em sinais vizinhos. A seletividade desejada para um determinado sinal pode ser alcançada apenas recalculando os valores do “soft pulse” e a atenuação da potência utilizada.

### 1.1.2 RMN 2D ge- $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ -HSQC editado (HSQC editado)

A determinação do padrão de hidrogenação de carbonos e nitrogênios é essencial para o assinalamento estrutural de produtos naturais. O procedimento usual emprega técnicas como DEPT, INEPT e APT, no entanto, tais técnicas mostram-se ineficientes quando a concentração da amostra é muito baixa. Através do emprego de técnicas de detecção inversa, pode-se aumentar a sensibilidade dos experimentos, com ganhos ainda mais significativos quando empregando PFG em suas seqüências de pulso para a efetiva supressão de fortes magnetizações indesejadas, como  $^1\text{H}$ - $^{12}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ - $^{14}\text{N}$ , resultando em melhor qualidade espectral e menor tempo de aquisição. O HSQC editado é uma modificação simples do experimento HSQC em que o padrão de hidrogenação pode ser diretamente obtido do espectro resultante, através da observação da amplitude do pico, juntamente com as correlações heteronucleares. Por convenção, picos com amplitude negativa são representados por  $\text{H}_2\text{X}$ , enquanto picos positivos são representados por  $\text{HX}$  e  $\text{H}_3\text{X}$ , onde X é o nuclídeo de interesse, diferente de prótio. Esse resultado é obtido pela introdução, na seqüência de pulsos do HSQC, de um bloco de pulsos do tipo  $\Delta - \phi^\circ (^1\text{H}) - 180^\circ (\text{X}) - \Delta$ , onde  $\Delta = \frac{1}{2}J_{\text{HX}}$  (Parella; Sánchez-Ferrando; Virgili, 1997). O valor de  $\phi$  define o padrão de hidrogenação obtido através desse experimento, como pode ser visto pela FIGURA 1, pág. 23. Então, para  $\phi = 180^\circ$   $\text{HX}$  e  $\text{H}_3\text{X}$

são positivos e  $H_2X$  negativo, enquanto para  $\phi = 90^\circ$  obtemos um subspectro com apenas HX.



**FIGURA 1.** Dependência do sinal de diferentes  $H_nX$  com relação a  $\phi$ . Para  $\phi = 0$  ou  $180^\circ$  observa-se amplitudes máximas para todos os sinais, enquanto para  $\phi = 90^\circ$  observa-se apenas HX (Parella; Sánchez-Ferrando; Virgili, 1997).

### 1.1.3 RMN 2D $ge\text{-}^1H, ^{13}C\text{-HSQC-TOCSY}$ (HSQC-TOCSY)

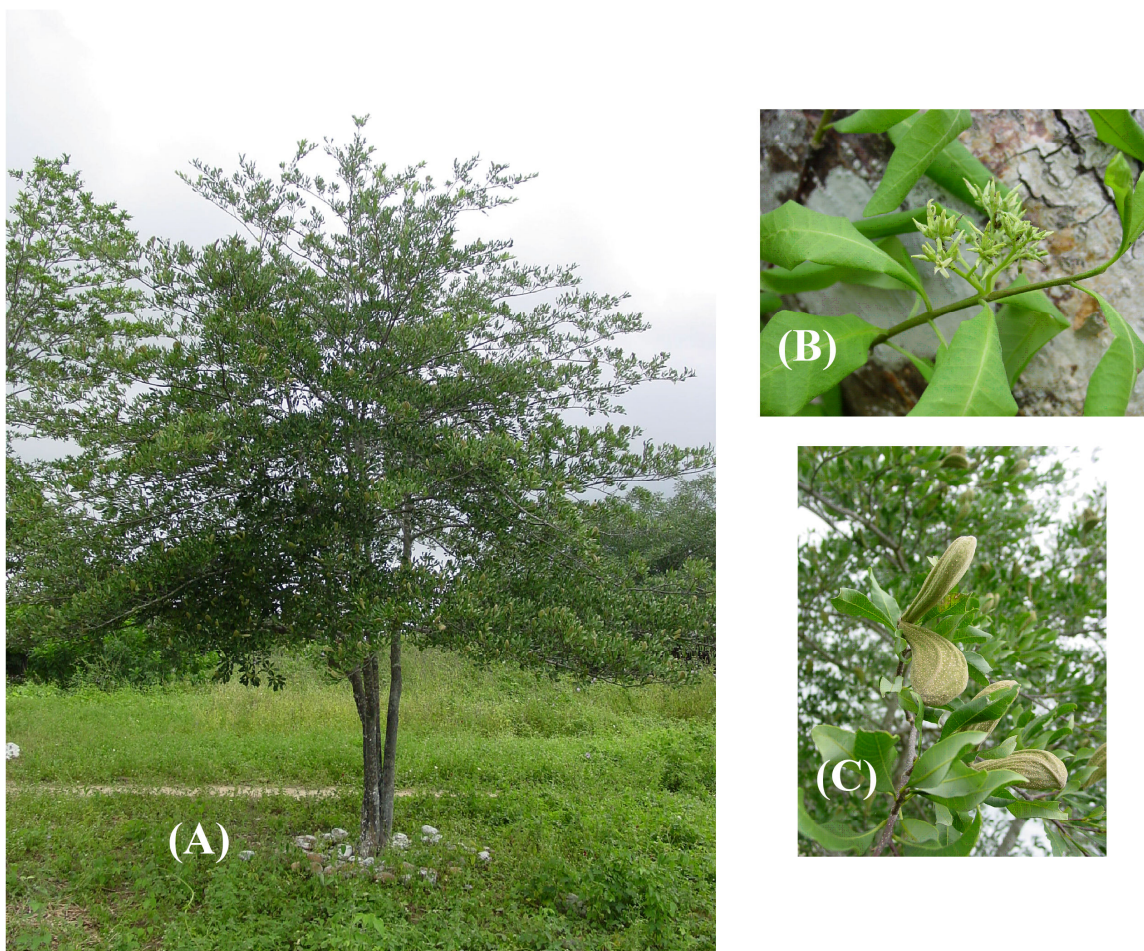
A combinação do HSQC com TOCSY, em princípio, levaria a uma técnica 3D, no entanto a remoção do período de evolução do TOCSY fornece uma técnica 2D híbrida extremamente poderosa para a elucidação estrutural de produtos naturais. Nesse experimento, enquanto as correlações do HSQC se apresentam como é normalmente esperado, a informação do TOCSY é distribuída horizontalmente, nas linhas do espectro correspondentes a cada pico do HSQC, de forma que para cada correlação do HSQC encontramos uma ou mais correlações de TOCSY daquele hidrogênio com outros na molécula. O HSQC-TOCSY pode ser obtido por diversas variantes, dependendo da informação que se deseja alcançar. Além da técnica convencional mencionada acima, é possível incorporar a edição da amplitude do sinal observado, tanto no TOCSY, quanto no HSQC. Ao incorporar edição do TOCSY, seus sinais aparecem em fase negativa, em relação aos sinais observados para o HSQC. Editando-se o HSQC obtêm-se carbonos com amplitudes diferentes dependendo do número de hidrogênios ligados, fornecendo  $CH_2$  em fase negativa e  $CH$  e  $CH_3$  em fase positiva. Também é possível, no mesmo experimento, editar tanto HSQC quanto TOCSY simultaneamente. Nesse trabalho optamos pela técnica convencional (**FIGURA 2**, pág. 24) devido a maior facilidade de aquisição, processamento e análise do resultado final.





## 1.2 Considerações Botânicas, Químicas e Farmacológicas sobre *Aspidosperma ulei* Markgf.

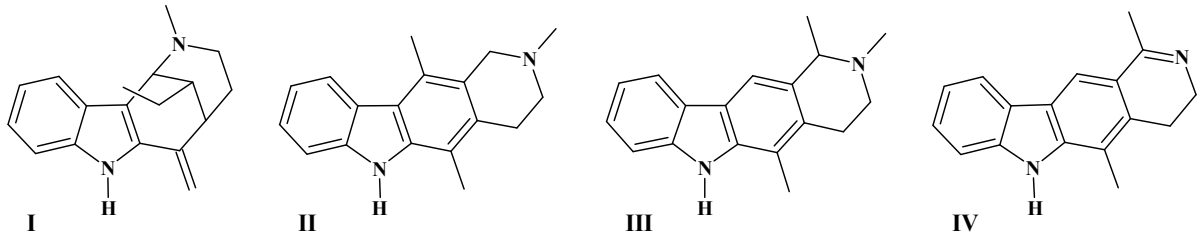
De acordo com Renato Braga (Braga, 1979), *Aspidosperma ulei* Markgf, popularmente conhecida como Pitiá, apresenta-se como uma “árvore com casca áspera e acizentada. Folhas alternas, pecioladas, lanceoladas, glabras. Flores alvecentas, pequenas, agrupadas em panículas multifloras terminais. Frutos capsulares, coriáceos, com sementes achatadas e aladas.” (FIGURA 3, pág. 25).



**FIGURA 3.** *Aspidosperma ulei* Markgf. (a) árvores, (b) flores e (c) frutos. Fotos: Prof. Edilberto R. Silveira.

O gênero *Aspidosperma* é distinguido quimicamente pela freqüente ocorrência de alcalóides indólicos, característica compartilhada por 46 das 57 espécies de *Aspidosperma* (Apocinaceae). Bolzani e colaboradores relatam em um *review* sobre espécies do gênero *Aspidosperma*, o isolamento de 4 alcalóides de *A. ulei*: uleina (I), N-metil-tetra-hidroelipticina

(II), di-hidroolivacina (III) e N-metil-tetra-hidroolivaona (IV) (Bolzani, 1987) (FIGURA 4, pág. 26).



**FIGURA 4.** Compostos isolados a partir de *Aspidoperma ulei*, de acordo com a literatura: uleina (I), N-metil-tetra-hidroelipticina (II), dihidroolivacina (III) e N-metiltetrahidroolivaona (IV).

Pesquisa no *SciFinder Scholar* v2006, do *Chemical Abstracts*, entre 2006 e 1986, usando como palavra-chave “*Aspidosperma ulei*”, mostrou que nenhum outro estudo químico fora realizado com essa espécie.

Um estudo cooperativo de uma fração rica em alcalóides das cascas da raiz de *A. ulei* (AUFRA), entre o Prof. E. R. Silveira, do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, e o Prof. V. S. Rao, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, rendeu uma Tese e uma publicação (ver **Anexo**, pág. 164) demonstrando o efeito pró-erectil de AUFRA em três tipos de casos: ereção peniana, crescimento genital e similar à ereção (**FIGURA 5**, pág. 26). A injeção intraperitoneal da fração (25 a 50 mg/Kg) mostrou resultados semelhantes a ioimbina (2 mg/Kg). 65 % dos ratos tratados com ioimbina ou AUFRA mostraram ereção peniana mesmo após seu bloqueio por clonidina, um agonista  $\alpha$ -2-adrenoceptor, e haloperidol, um antagonista dopaminérgico, bem como por I-NAME, um inibidor da oxido nítrico sintase. Esse estudo comprova o uso tradicional relatado para extratos de *Aspidosperma* em disfunções erecteis (Campos, 2006).



**FIGURA 5.** Cobaias sob efeito de uma injeção intraperitoneal de AUFRA apresentando os três tipos de reações observadas: (A) ereção peniana, (B) similar à ereção e (C) crescimento genital. Fotos: Adriana Campos Rolim.

### 1.3 Referências Bibliográficas

**BAX, A.;** SUMMERS, M. Proton and carbon-13 assignments from sensitivity-enhanced detection of heteronuclear multiple-bond connectivity by 2D multiple quantum NMR. *Journal of American Chemical Society*, **108**, 2093-2094, **1986**.

**BRAGA, R.** Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará, Imprensa Oficial, 2ª Edição, **1960**.

**BODENHAUSER, G.;** RUBEN, D. J. Natural abundance nitrogen-15 NMR by enhanced heteronuclear spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.* **69**, 185-189, **1980**.

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

**CAMPOS, A. R.;** LIMA-JR., R. C. P.; UCHOA, D. E. A.; SILVEIRA, E. R, SANTOS, F. A., RAO, V. S. N. Pro-erectile effects of an alkaloidal rich fraction from *Aspidosperma ulei* root bark in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, **104**, 240-244, **2006**.

**FREEMAN, R.;** GARETH A. MORRIS, G. A. Experimental chemical shift correlation maps in nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Chemical Society: Chemical Communication*, 684-686, **1978**.

**JEENER, J.** *Ampère International Summer School*, Basko Polje (proposal), **1971**.

**JEENER, J.;** MEIER, B. H. Bachmann, P.; Ernst, R. R.; *Journal of Chemical Physics*, **71**, 4546-4553, **1979**.

**KAISER, C. R.** RMN 2D: Detecção inversa e gradiente de campo na determinação estrutural de compostos orgânicos. *Quimica Nova*, **23**, 2, 231-236, **2000**.

**KESSLER, H.;** GRIESINGER, C.; ZARBOCK, J.; LOOSLI, H. R. Peptide conformations 32. Assignment of carbonyl carbons and sequence analysis in peptides by heteronuclear shift correlation via small coupling constants with broadband decoupling in t1 (COLOC). *Journal of Magnetic Resonance*, **57**, 331-336, **1984**.

---

**KÖEVÉR, K. E.; HRUBY, V. J.; UHRÍN, D.** Sensitivity- and gradient-enhanced heteronuclear coupled/decoupled HSQC-TOCSY experiments for measuring long-range heteronuclear coupling constants. *Journal of Magnetic Resonance*, **129**, 125-129, **1997**.

**MULLER, L.** Sensitivity enhanced detection of weak nuclei using heteronuclear multiple quantum coherence. *Journal of the American Chemical Society*, **101**, 16, 4481-4484, **1979**.

**PARELLA, T.** NMRGuide v3.5, 2D Experiments: ge-2D HSQC-TOCSY. Copyright@1998-2003 BRUKER Biospin., **2003**.

**PARELLA, T.** Pulsed field gradients: a new tool for routine NMR. *Journal of Magnetic Resonance*, **126**, 274-277, **1998**.

**PARELLA, T.; SÁNCHEZ-FERRANDO, F.; VIRGILI, A.** Improved sensitivity in gradient-based 1D and 2D multiplicity-edited HSQC experiments. *Journal of Magnetic Resonance*, **126**, 274-277, **1997**.

**STONEHOUSE, J.; ADELL, P.; KEELER, J.; SHAKA, A. J.;** Ultra-high quality NOE spectra. *Journal of the American Chemical Society*, **116**, 6037-6038, **1994**.

**WILLKER, W.; LEIBFRITZ, D.; KERSSEBAUM, R.; BERNEL, W.** Gradient selection in inverse heteronuclear correlation spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry*, **31**, 287-292, **1993**.

---

# Capítulo 2

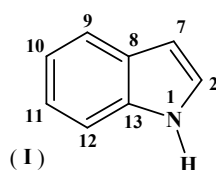
ALCALÓIDES DE *ASPIDOSPERMA*:  
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA  
DO GÊNERO

## 2 ALCALÓIDES DE ASPIDOSPERMA: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA DO GÊNERO.

### 2.1 Dados de RMN $^{13}\text{C}$ descritos da literatura para alcalóides isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* entre 1986-2006.

O gênero *Aspidosperma* é quimicamente distinto pela freqüente ocorrência de alcalóides indólicos (Bolzani *et al.* 1987, pág. 187).

Alcalóides indólicos são caracterizados pelo núcleo indol (I), onde as posições 2 e 7 são normalmente substituídas levando a formação de estruturas bastante diversificadas, enquanto as posições 9-12 podem, ocasionalmente, apresentar substituições como grupos hidroxila ou metoxila. Substituições no nitrogênio indólico são menos comuns, ocorrendo principalmente na forma de lactonas ou lactamas (Morales-Rios; Espiñeira; Joseph-Nathan 1987).



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

A TABELA 1, págs. 32, apresenta as espécies do gênero *Aspidosperma* estudadas nos últimos 20 anos, indicando a parte estudada e os compostos isolados enquanto o QUADRO 1, págs. 34, contém as estruturas desses compostos, dispostos pela semelhança entre suas estruturas. A numeração utilizada para os compostos levou em consideração a numeração mais comumente adotada na literatura para alcalóides indólicos, onde a contagem inicia no nitrogênio indólico, 1, e os carbonos 3, 5 e 21 encontram-se ligados a outro nitrogênio na posição 4.

Bolzani *et al.* (1986), em revisão bibliográfica sobre alcalóides do gênero *Aspidosperma* até 1986, constatou a ocorrência de 204 alcalóides distribuídos entre 46 das 57 espécies de *Aspidosperma* constantes na literatura.

De 1986 a 2006, nove espécies de *Aspidosperma* foram estudadas quimicamente, das quais três (*A. crueta*, *A. pruinatum* e *A. ramiflorum*) não apresentavam estudos anteriormente,

totalizando 49 alcalóides isolados, sendo oito novos compostos: 10-metoxi-4-metilgeissosquizol (**19**), 10-metoxi-ioimbina (**23**), 10-metoxi-aspidospermidina (**27**), desidrohaplocidina (**31**), aspidoquibina (**37**), 3-oxo-14,15-desidro-razinilam (**39**), 11-hidroxi-tubotaivina (**40**) e subincanadina G (**49**) (**TABELA 1**, págs. 32).

A **TABELA 2**, págs. 38, contem os dados de RMN  $^{13}\text{C}$  para os compostos do **QUADRO 1**, págs. 34, quando disponível na literatura, e identificando o solvente utilizado na obtenção dos dados.

**TABELA 1.** Espécies do gênero *Aspidosperma*, em ordem alfabética, estudadas nos últimos 20 anos (1986-2006), parte estudada e substâncias isoladas.

<b>Espécie</b>	<b>Parte Estudada</b>	<b>Alcalóide</b>	<b>Estrutura</b>	<b>Referência</b>
<i>A. crueta</i>	folhas	obscurinervidina	<b>1</b>	Harper, 1993
	folhas	obscurinervina	<b>2</b>	Harper, 1993
<i>A. macrocarpon</i>	casca do caule	copsanol	<b>3 1</b>	Mitaine, 1996
		copsanona	<b>4 1</b>	Mitaine, 1996
		copsinina	<b>5</b>	Mitaine, 1996
		epi-copsanol	<b>6 1</b>	Mitaine, 1996
	sementes	copsanol	<b>3 1</b>	Mitaine, 1996
		copsanona	<b>4 1</b>	Mitaine, 1996
		copsinina	<b>5</b>	Mitaine, 1996 Kan-Fan, 1988
		ervinceina	<b>7 1</b>	Mitaine, 1996
		(-)-vincadiformina	<b>8</b>	Mitaine, 1996 Kalaus, 1993
<i>A. megalocarpon</i>	casca do caule	(+)-aspidoalbina	<b>9 1</b>	Mitaine, 1998
		(+)-aspidolimidina	<b>10 1</b>	Mitaine, 1998
		(+)-fendlerina	<b>11</b>	Mitaine, 1998
<i>A. parvifolium</i>	cascas	aparcina	<b>12</b>	Jácome, 2004
		uleina	<b>13</b>	Jácome, 2004
		20-epi-uleina	<b>14</b>	Jácome, 2004
		desmetil-uleina	<b>15 1</b>	Jácome, 2004
<i>A. pruinatum</i>	casca da raiz	compactinervina	<b>16 1</b>	Nunes, 1992
		10-metoxi-di-hidro-corinanteol	<b>17</b>	Nunes, 1992
		10-metoxi-geissosquizol	<b>18</b>	Nunes, 1992
		10-metoxi-4-metil-geissosquizol	<b>19a</b>	Nunes, 1992
			<b>19b</b>	Nunes, 1992
		3,4,5,6-tetra-desidro-sitsiriquina	<b>20</b>	Nunes, 1992
		ioimbina	<b>21</b>	Nunes, 1992
		$\beta$ -ioimbina	<b>22</b>	Nunes, 1992
		10-metoxi-ioimbina	<b>23</b>	Nunes, 1992
		normacusina B	<b>24</b>	Yu, 2003 Nunes, 1992

<sup>1</sup> Sem dados de RMN <sup>13</sup>C na literatura. Estrutura determinada por RMN <sup>1</sup>H, E.M e/ou modificações químicas.

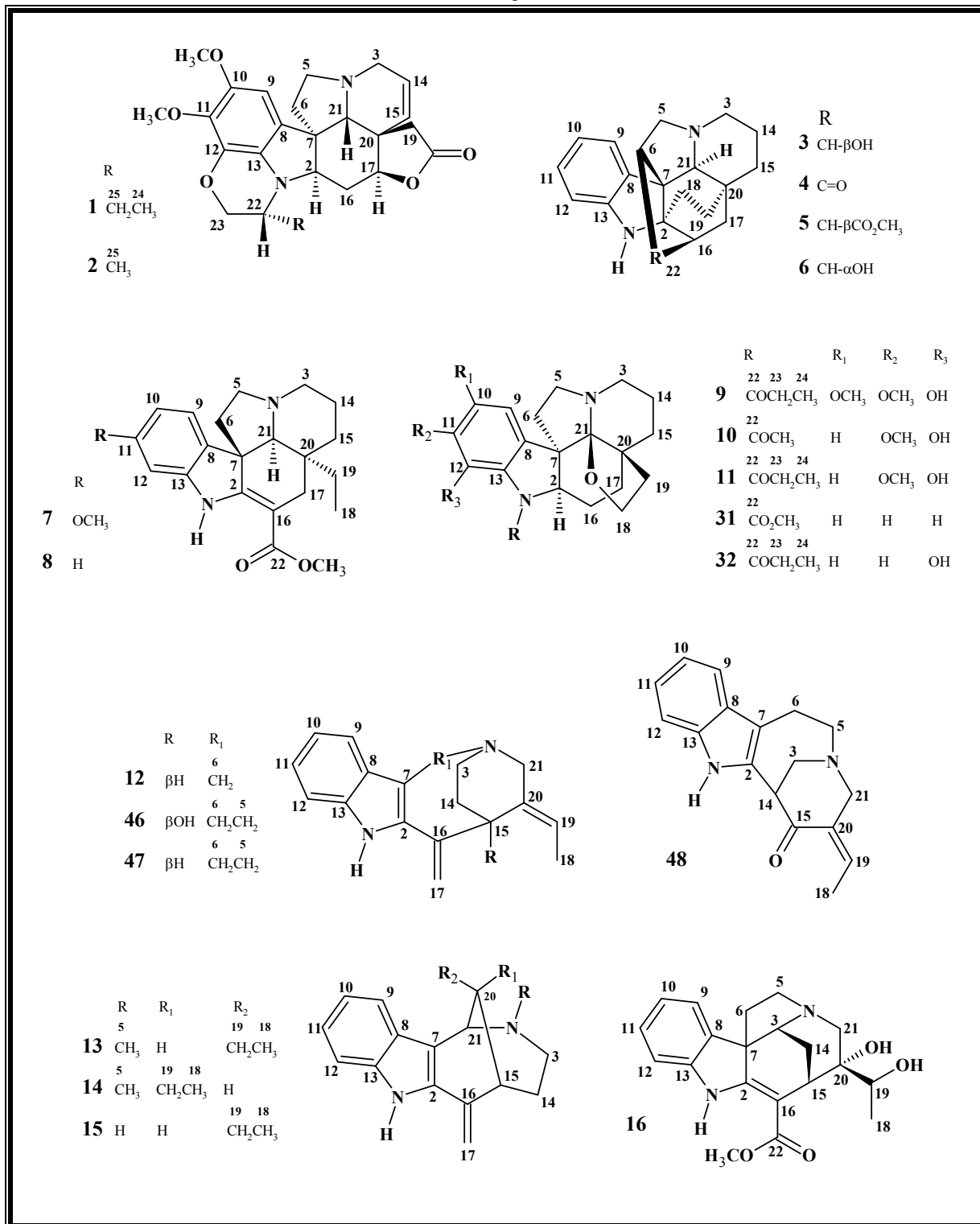


TABELA 1. Espécies do gênero *Aspidosperma*, em ordem alfabética, estudadas nos últimos 20 anos (1986-2006), parte estudada e substâncias isoladas (CONTINUAÇÃO).

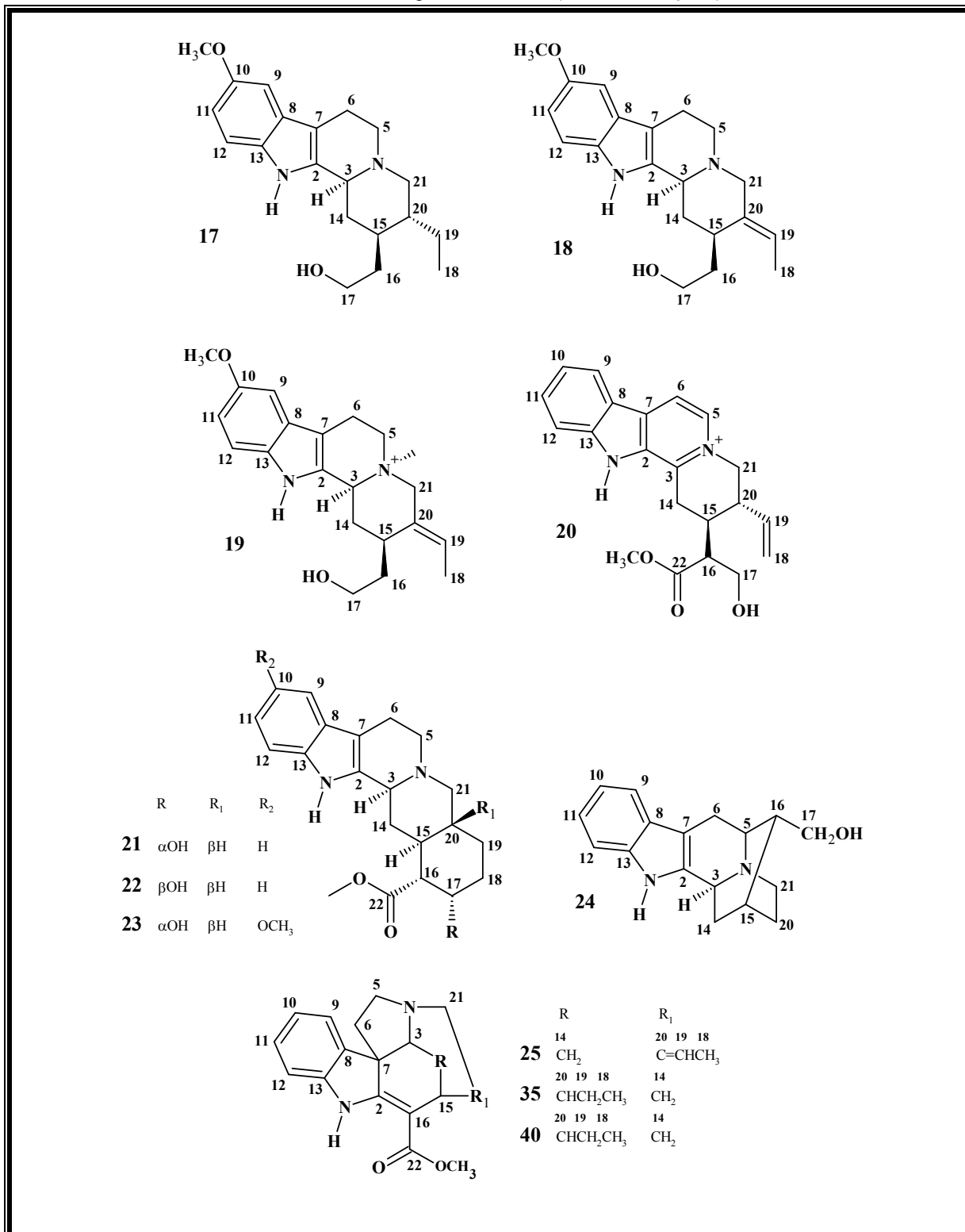
Espécie	Parte Estudada	Alcalóide	Estrutura	Referência	
<i>A. pyrifolium</i>	casca do caule	acumicina	25 1	Mitaine, 1996	
		aspidospermidina	26	Fukuda, 2003 Mitaine, 1996	
		10-metoxi- aspidospermidina	27	Mitaine, 1996	
		N-formil-aspidospermidina	28 1	Mitaine, 1996	
		(-)-aspidospermina	29 1	Mitaine, 1996	
		desmetoxiaspidospermina	30	Mitaine, 1996	
		desidroxi-haplocidina	31 1	Mitaine, 1996	
		haplocina	32 1	Mitaine, 1996	
		palosina	33	Mitaine, 1996	
		O-desmetil-palosina	34 1	Mitaine, 1996	
		tubotaivina	35	Mitaine, 1996	
		valesina	36 1	Mitaine, 1996	
				(-)-vincadiformina	8
<i>A. quebracho-blanco</i>	cultura de células	aspidoquibina	37	Aimi, 1991	
		3-oxo-14,15-desidro- razinilam	39	Aimi, 1991	
		11-hidroxi-tubotaivina	40	Aimi, 1994	
	indefinido	quebrachamina	38	Deutsch, 1994	
<i>A. ramiflorum</i>	cultura de células	10-metoxi-geissosquizol	17	Oliveira, 2001	
		sementes	10-metoxi-geissosquizol	17	Marques, 1996
			$\beta$ -ioimbina	21	Marques, 1996
	cultura de células	ramiflorina A	41	Oliveira, 2001	
		ramiflorina B	42	Oliveira, 2001	
	sementes	ramiflorina A	41	Marques, 1996	
		ramiflorina B	41	Marques, 1996	
<i>A. subincanum</i>	cascas	subincanadina A	43	Kobayashi, 2002	
		subincanadina B	44	Kobayashi, 2002	
		subincanadina C	45	Kobayashi, 2002	
		subincanadina D	46	Kobayashi, 2002	
		subincanadina E	47	Kobayashi, 2002	
		subincanadina F	48	Kobayashi, 2002	
		subincanadina G	49	Ishiyama, 2005	

<sup>1</sup> Sem dados de RMN <sup>13</sup>C na literatura. Estrutura determinada por RMN <sup>1</sup>H, E.M e/ou modificações químicas.

**QUADRO 1.** Substâncias isoladas de espécies de *Aspidosperma* nos últimos 20 anos (1986-2006), agrupadas de acordo com seus esqueletos básicos.



QUADRO 1. Substâncias isoladas de espécies de *Aspidosperma* nos últimos 20 anos (1986-2006), agrupadas de acordo com seus esqueletos básicos (CONTINUAÇÃO).



QUADRO 1. Substâncias isoladas de espécies de *Aspidosperma* nos últimos 20 anos (1986-2006), agrupadas de acordo com seus esqueletos básicos (CONTINUAÇÃO).

	R	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
<b>26</b>	H	H	H
<b>27</b>	H	OCH <sub>3</sub>	H
<b>28</b>	CHO	H	H
<b>29</b>	CO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>
<b>30</b>	CO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H	H
<b>33</b>	COCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>
<b>34</b>	COCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H	OH
<b>36</b>	CHO	H	OCH <sub>3</sub>

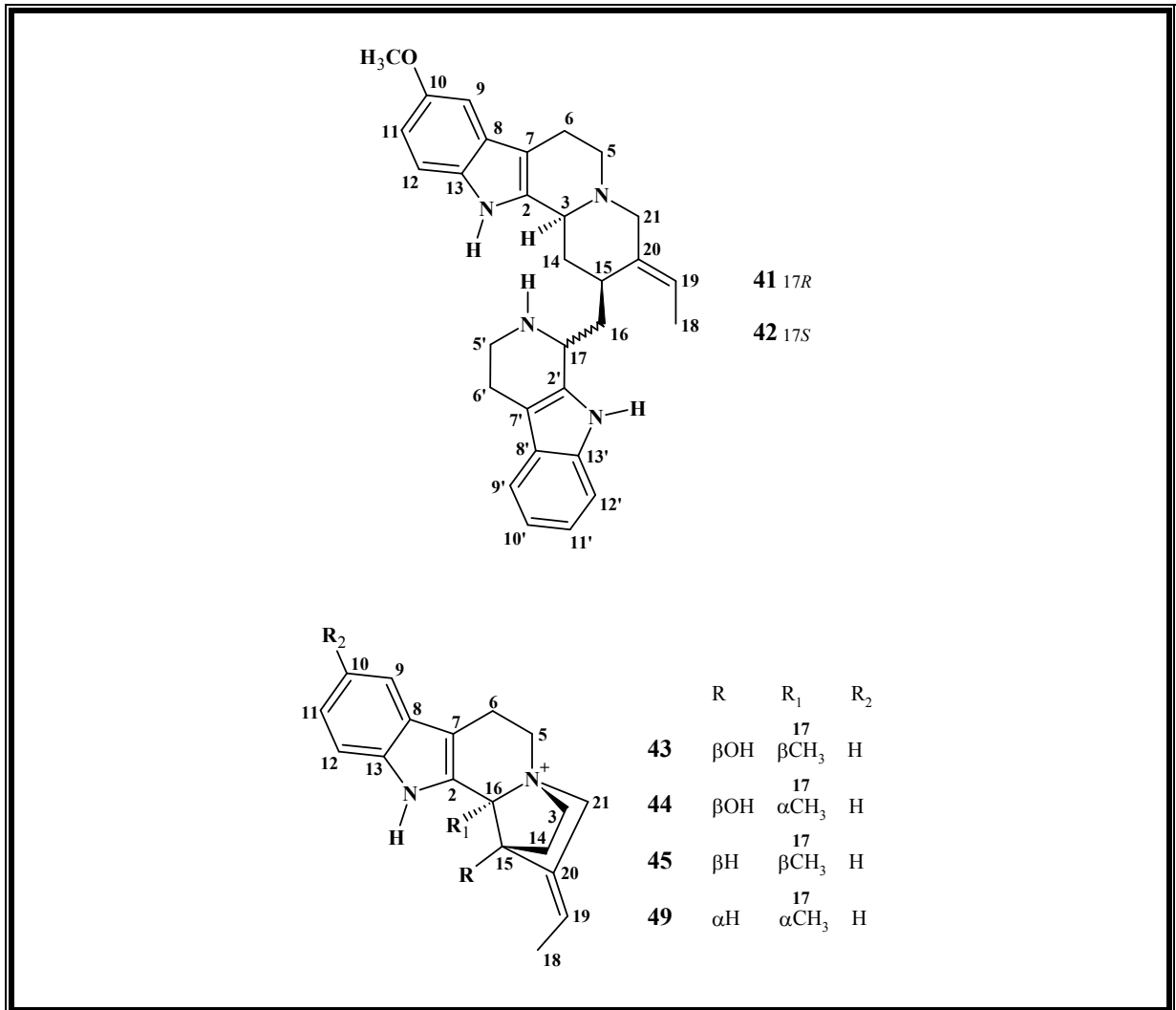
**37**

**38**

**39**

QUADRO 1. Substâncias isoladas de espécies de *Aspidosperma* nos últimos 20 anos (1986-2006), agrupadas de acordo com seus esqueletos básicos (CONTINUAÇÃO).



**TABELA 2.** Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  de alcalóides de espécies de *Aspidosperma*, agrupadas de acordo com seus esqueletos básicos, nos últimos 20 anos (1986-2006). Dados obtidos em  $\text{CDCl}_3$ , exceto quando especificado o contrário.

	1	2	5	8	11	12	46 <sup>3</sup>	47 <sup>2</sup>	48 <sup>1</sup>
2	65,0	64,6	66,7	167,7	69,5	144,9	135,5	140,0	136,3
3	52,1	52,1	47,6	51,7	43,7	45,2	45,2	48,7	51,7
5	54,2	54,2	50,7	50,6	48,7	---	56,6	60,1	57,4
6	38,8	38,9	36,5	45,3	36,4	54,1	20,4	22,7	20,6
7	51,2	51,2	57,9	55,5	57,5	110,6	108,1	110,1	112,5
8	129,9	129,3	140,6	137,9	132,4	128,9	127,8	131,0	128,7
9	100,2	100,3	121,6	121,0	114,5	118,5	111,3	120,1	118,7
10	147,5	147,3	119,7	120,5	110,3	122,9	119,1	121,7	120,4
11	130,3	130,8	126,6	127,4	149,0	119,3	122,8	125,2	123,3
12	135,4	135,7	110,8	109,3	137,1	110,3	118,3	116,2	112,2
13	136,7	136,8	149,0	143,3	128,0	137,2	136,0	139,9	137,5
14	123,3	123,3	17,1	22,1	21,0	29,4	36,4	28,3	45,4
15	133,6	133,6	34,8	32,9	32,9	41,1	71,6	44,3	189,2
16	23,6	23,5	43,8	92,6	25,1	135,6	145,5	144,7	---
17	81,6	81,6	31,8	25,6	26,4	112,4	117,8	123,1	---
18	176,3	176,3	33,9	7,1	65,2	12,6	14,3	16,0	13,9
19	39,1	39,1	33,9	29,3	34,5	120,5	131,2	131,1	144,1
20	40,6	40,6	31,2	38,2	39,7	131,4	135,7	133,5	128,3
21	69,5	69,5	68,4	72,6	101,7	54,2	53,1	55,7	51,7
22	44,3	50,5	174,3	169,1	172,3	---	---	---	---
23	71,8	67,8	---	---	28,3	---	---	---	---
24	---	16,8	---	---	9,8	---	---	---	---
25	10,4	10,3	---	---	---	---	---	---	---
10-OCH <sub>3</sub>	57,3	57,4	---	---	---	---	---	---	---
11-OCH <sub>3</sub>	60,9	60,9	---	---	---	---	---	---	---
OCH <sub>3</sub>	---	---	51,9	50,9	56,4	---	---	---	---

<sup>1</sup> Metanol- $d_4$ ; <sup>2</sup> DMSO- $d_6$ ; <sup>3</sup> Piridina- $d_5$ .

**TABELA 2.** Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  de alcalóides isolados de espécies de *Aspidosperma*, agrupadas de acordo com seus esqueletos básicos, nos últimos 20 anos (1986-2006). Dados obtidos em  $\text{CDCl}_3$ , exceto quando especificado o contrário (CONTINUAÇÃO).

	13	14	17	18	19 <sup>1</sup>	19 <sup>2</sup>	20 <sup>1</sup>	21	22	23
2	135,1	136,5	135,8	135,3	125,5	125,9	134,2	134,6	134,3	135,2
3	46,3	46,4	60,1	54,1	65,3	63,6	144,5	60,7	60,9	59,7
5	44,4	44,8	52,9	53,3	64,5	61,1	132,1	53,6	52,6	52,6
6	---	---	21,6	18,4	17,4	16,9	115,8	21,6	21,6	21,6
7	107,8	110,8	107,2	107,0	103,2	103,5	131,0	107,6	107,9	107,6
8	129,4	128,5	127,3	127,8	127,8	130,1	119,9	127,2	127,3	127,5
9	119,5	119,6	100,3	100,2	100,0	100,3	123,0	118,0	118,1	100,3
10	119,8	119,9	153,6	153,7	153,9	153,4	122,3	119,0	119,2	153,5
11	122,7	122,8	111,4	111,5	112,7	12,0	131,9	121,1	121,3	111,2
12	110,7	111,9	110,6	110,8	112,5	112,2	113,7	111,0	111,0	110,7
13	136,6	135,9	131,2	130,9	131,9	131,5	140,6	136,3	136,2	130,9
14	34,7	28,5	35,4	32,7	30,9	29,1	26,4	27,3	33,8	34,0
15	39,5	38,5	37,0	31,8	30,6	29,6	33,9	38,1	41,9	36,4
16	138,7	142,1	35,1	36,1	35,5	35,4	47,8	54,8	57,4	52,2
17	106,7	104,7	59,8	61,3	59,0	58,0	60,3	66,1	72,0	66,9
18	11,8	12,2	11,0	13,0	13,3	13,2	120,4	33,5	34,1	31,4
19	24,2	23,5	23,4	120,2	132,6	129,5	135,8	24,6	27,5	23,2
20	45,8	44,7	41,5	136,8	128,6	129,1	41,5	36,5	39,5	40,4
21	56,6	54,9	59,8	51,2	59,0	59,1	59,0	60,7	59,3	61,1
22	---	---	---	---	---	---	173,2	175,1	175,4	175,2
10-OCH <sub>3</sub>	---	---	---	---	---	---	---	---	---	55,7
4-N <sup>+</sup> CH <sub>3</sub>	---	---	---	---	48,0	48,1	---	---	---	---
OCH <sub>3</sub>	---	---	55,8	55,9	55,7	55,4	51,9	51,9	51,9	51,8

<sup>1</sup> Metanol-*d*<sub>4</sub>; <sup>2</sup> DMSO-*d*<sub>6</sub>; <sup>3</sup> Piridina-*d*<sub>5</sub>.

**TABELA 2.** Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  de alcalóides isolados de espécies de *Aspidosperma*, agrupadas de acordo com seus esqueletos básicos, nos últimos 20 anos (1986-2006). Dados obtidos em  $\text{CDCl}_3$ , exceto quando especificado o contrário (CONTINUAÇÃO).

	24	35	40	26	27	30	33	37	38	39
2	136,3	168,7	160,0	65,9	66,0	69,5	69,4	133,4	139,7	176,6
3	64,9	43,3	43,9	54,1	53,7	53,7	53,6	180,0	53,4	159,6
5	54,5	52,1	53,7	53,2	53,0	52,5	52,5	175,1	56,7	116,4
6	26,9	45,1	45,2	39,0	38,4	38,1	37,9	32,0	22,7	114,4
7	104,5	53,4	54,4	53,6	54,1	53,7	52,5	107,3	108,7	122,1
8	127,6	137,1	128,7	135,9	136,6	110,9	125,9	127,6	128,7	136,8
9	118,1	119,6	120,2	119,2	115,3	125,9	115,4	117,1	120,1	127,3 <sup>†</sup>
10	121,4	109,8	107,5	110,6	146,0	115,3	125,9	120,0	117,4	129,2 <sup>‡</sup>
11	116,8	127,5	156,2	127,3	108,8	129,2	111,2	122,4	118,6	124,8 <sup>‡</sup>
12	111,0	121,2	98,4	123,0	119,5	143,6	nd	111,3	110,0	130,5 <sup>†</sup>
13	137,8	143,6	144,9	149,6	138,3	149,2	nd	136,2	134,7	137,4
14	27,6	27,9	28,4	21,9	21,8	21,7	21,6	76,1	22,4	120,5
15	33,4	30,4	30,8	34,7	34,5	34,3	34,2	28,9	34,7	154,8
16	44,1	95,7	95,9	28,3	28,2	24,9	24,4	21,6	32,0	27,6
17	50,5	169,8	170,9	23,2	23,2	23,2	23,1	33,0	33,4	38,4
18	---	11,4	11,6	7,0	6,8	7,0	6,6	8,7	7,8	9,3
19	---	23,6	23,8	30,2	29,9	30,2	30,1	35,4	21,9	29,0
20	12,7	40,7	41,2	35,9	35,6	35,6	35,5	47,6	53,2	44,3
21	55,8	65,3	65,3	71,5	71,3	71,1	71,1	40,7	55,1	130,3
22	---	---	---	---	---	171,3	161,4	---	---	---
23	---	---	---	---	---	---	28,1	---	---	---
24	---	---	---	---	---	---	10,1	---	---	---
<b>OCH<sub>3</sub></b>	---	55,0	51,1	---	55,2	55,5	55,6	---	---	---

<sup>†</sup> e <sup>‡</sup> indicam sinais intercambiáveis na mesma coluna. nd significa valores não disponíveis. <sup>1</sup> Metanol- $d_4$ ; <sup>2</sup> DMSO- $d_6$ ; <sup>3</sup> Piridina- $d_5$ .



**TABELA 2.** Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  de alcalóides isolados de espécies de *Aspidosperma*, agrupadas de acordo com seus esqueletos básicos, nos últimos 20 anos (1986-2006). Dados obtidos em  $\text{CDCl}_3$ , exceto quando especificado o contrário (CONTINUAÇÃO).

	41	42	43 <sup>2</sup>	44 <sup>2</sup>	45 <sup>3</sup>	49 <sup>3</sup>
2	135,4 <sup>†</sup>	135,6 <sup>†</sup>	129,8	131,4	131,3	132,3
3	53,0	52,9	57,6	58,7	58,8	58,6
5	51,3	51,4	46,7	46,2	46,6	46,6
6	18,0	17,7	17,5	17,8	18,2	18,1
7	107,3 <sup>‡</sup>	108,3 <sup>‡</sup>	105,0	103,8	103,1	103,5
8	127,5 <sup>§</sup>	127,5 <sup>§</sup>	125,5	125,3	126,6	127,6
9	100,4	101,2	118,6	118,5	118,7	103,5
10	154,3	154,9	119,3	119,3	120,0	152,9
11	111,5	111,9	122,3	122,1	123,0	113,5
12	112,1	112,0	112,4	112,4	113,1	113,9
13	131,5	130,7	137,0	136,8	137,9	131,4
14	33,0	29,6	31,6	32,3	26,4	26,3
15	30,9	29,6	84,3	83,7	45,0	44,9
16	37,7	37,7	74,4	74,5	78,1	77,9
17	51,5	50,2	18,9	17,9	20,8	20,7
18	13,1	12,6	12,3	11,9	14,3	14,2
19	121,6	119,1	121,4	116,7	121,2	120,9
20	136,6 <sup>¥</sup>	136,5 <sup>¥</sup>	132,7	131,4	133,2	133,1
21	52,9	52,7	64,2	62,4	64,2	64,2
2'	135,8 <sup>†</sup>	138,2 <sup>†</sup>	---	---	---	---
5'	42,5	41,9	---	---	---	---
6'	22,4	22,8	---	---	---	---
7'	108,6 <sup>‡</sup>	108,8 <sup>‡</sup>	---	---	---	---
8'	128,0 <sup>§</sup>	128,9 <sup>§</sup>	---	---	---	---
9'	118,0	118,0	---	---	---	---
10'	119,4	119,4	---	---	---	---
11'	121,6	121,7	---	---	---	---
12'	111,1	111,1	---	---	---	---
13'	136,0 <sup>¥</sup>	135,8 <sup>¥</sup>	---	---	---	---
<b>OCH<sub>3</sub></b>	56,0	56,2	---	---	---	---

<sup>†</sup>, <sup>‡</sup>, <sup>§</sup> e <sup>¥</sup> indicam sinais intercambiáveis na mesma coluna. <sup>1</sup> Metanol- $d_4$ ; <sup>2</sup> DMSO- $d_6$ ; <sup>3</sup> Piridina- $d_5$ .

## 2.2 Referências Bibliográficas

AIMI, N.; UCHIDA, N.; OHYA, N.; HOSOKAWA, H.; TAKAYAMA, H.; SAKAI, S.-I. Novel indole alkaloids from cell suspension cultures of *Aspidosperma quebracho blanco* Schlect. *Tetrahedron Letters*, **32**, 37, 4949-4952, **1991**.

AIMI, N.; UCHIDA, N.; OYA, N.; SAKAI, S.I.; MENDONZA, L. A.; OBITZ, P.; STÖCKIGT, J. Isolation of two new nitrogenous metabolites from the cultured cells of *Aspidosperma quebracho- blanco*, *Heterocycles*, **38**, 11, 2411-2414, **1994**.

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

FUKUDA, Y.-I.; SHINDO, M.; SHISHIDO, K. Total synthesis of (-)-aspidospermine via diastereoselective ring-closing olefin metathesis. *Organic Letters*, **5**, 5, 749-751, **2003**.

HARPER, J. K.; DAILEY, N. K.; OWEN, N. L.; WOOD, S. G.; CATES, R. G. X-ray structure and <sup>13</sup>C NMR assignments of indole alkaloids from *Aspidosperma cruenta*. *Journal of Crystallographic and Spectroscopic Research*, **23**, 12, 1005-1011, **1993**.

ISHIYAMA, H.; MATSUMOTO, M.; SEKIGUCHI, M.; SHIGEMORI, H.; OHSAKI, A.; KOBAYASHI, J. Two new indole alkaloids from *Aspidosperma subincanum* and *Geissospermum vellosii*. *Heterocycles*, **66**, 651-658, **2005**.

JÁCOME, R. L. R. P.; OLIVEIRA, A. B.; RASLAN, D.; WAGNER, H. Estudo químico e perfil cromatográfico de *Aspidosperma parvifolium* A. DC. ("pau-pereira"). *Química Nova*, **27**, 6, 897-900, **2004**.

KALAUS, G.; GREINER, I.; KAJTÁR-PEREDY, M.; BRLIK, J.; SZABÓ, L.; SZÁNTAY, C. Synthesis of Vinca alkaloids and related compounds. 63. A new synthetic pathway for preparing alkaloids and related compounds with the aspidosperma skeleton. Total Syntheses of (±)-vincadifformine, (±)-tabersonine, and (±)-3-oxotabersonine. *Journal of Organic Chemistry*, **58**, 1434-1442, **1993**.

---

**KAN-FAN, C.;** KAN, S. K.; DEVERRE, J. R.; QUIRION, J. C.; HUSSON, H. P. Nouveaux alcaloïdes de type aspidofractinine fonctionnalisés en C-17, extraits des écorces de tronc d'un *Kopia* de Malaisie. *Journal of Natural Products*, **51**, 4, 703-707, 1988.

**KOBAYASHI, J.;** SEKIGUCHI, M.; SHIMAMOTO, S.; SHIGEMORI, H.; ISHIYAMA, H.; OHSAKI, A. Subincanadines A-C, novel quaternary indole alkaloids from *Aspidosperma subincanum*. *Journal of Organic Chemistry*, **67**, 18, 6449-6455, 2002.

**MARQUES, M. F. S.;** KATO, L.; LEITÃO-FILHO, H. F.; REIS, F. A. M. Indole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*. *Phytochemistry*, **41**, 3, 963-967, 1996.

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

**MITAINE, A. C.;** WENIGER, B.; SAUVAIN, M.; LUCUMI, E. ; ARAGÓN, R. ; ZÈCHES-HANROT, M. Indole alkaloids from the trunk bark of *Aspidosperma megalocarpon*. *Planta Medica*, **64**, 487, 1998.

**MORALES-RÍOS, M. S.;** ESPÍÑEIRA, J.; JOSEPH-NATHAN, P. <sup>13</sup>C NMR Spectroscopy of indole derivatives. *Magnetic Resonance in Chemistry*, **25**, 377-395, 1987.

**NUNES, D. S.;** KOIKE, L.; TAVEIRA, J. J.; REIS, F. A. M. Índole alkaloids from *Aspidosperma pruinatum*. *Phytochemistry*, **31**, 7, 2507-2511, 1992.

**OLIVEIRA, A. J. B.;** KOIKE, L.; REIS, F. A. M.; SHEPERD, L. K. Callus culture of *Aspidosperma ramiflorum* Muell. Arg.: growth and alkaloid production. *Acta Scientiarum*, **23**, 2, 609-612, 2001.

**ROBERTS, G. M. T.;** AHOND, A.; POUPAT, C.; POTIER, P.; JACQUEMIN, H.; KAN, S. K. *Aspidosperma* de Guyane: Alcaloïdes des graines de *Aspidosperma oblongum*. *Journal of Natural Products*, 46, 5, 708-722, 1993.

---

**SPERLING, H.;** LORENZ, A.; SUSANNE, K.; ARNDT, R.; MICHEL, M. C. An extract from bark of *Aspidosperma quebracho blanco* to human penile  $\alpha$ -adrenoceptors. *The Journal of Urology*, **168**, 160-163, **2002**.

**TANAKA, J. C. A.;** SILVA, C. C.; OLIVEIRA, A. J. B.; NAKAMURA, C. V.; DIAS-FILHO, B. P. Antibacterial activity of indole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **39**, 387-391, **2006**.

**YU, J.;** WANG, T.; LIU, X.; DESCHAMPS, J.; FLIPPEN-ANDERSON, J. ; LIAO, X. ; COOK, J. M. General Approach for the Synthesis of Sarpagine Indole Alkaloids. Enantiospecific Total Synthesis of (+)-Velloimine, (+)-Normacusine B, (-)-Alkaloid Q<sub>3</sub>, (-)-Panarine, (+)-N<sub>a</sub>-Methylvellosimine, and (+)-N<sub>a</sub>-Methyl-16-epipericyclivine. *Journal of Organic Chemistry*, **68**, 20, 7565-7581, **2003**.

# Capítulo 3

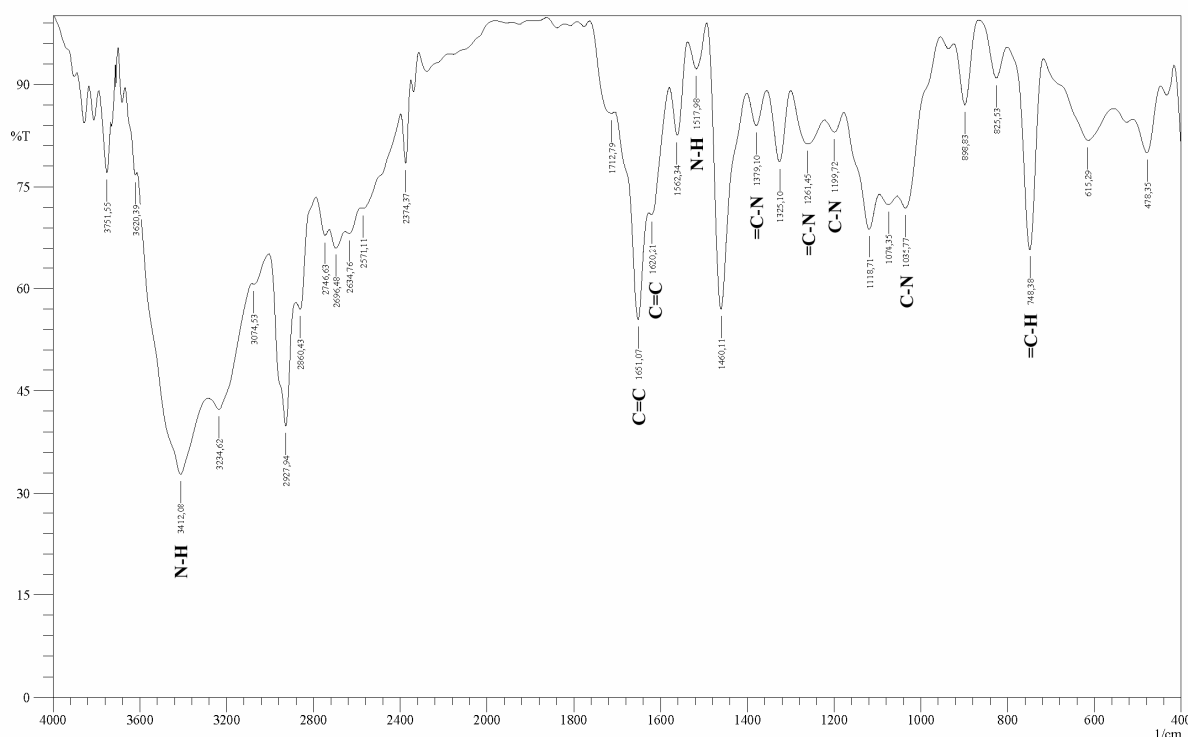
## DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL

### 3 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL

#### 3.1 Determinação Estrutural de AU1

O fracionamento cromatográfico do extrato etanólico da casca da raiz de *Aspidosperma ulei* permitiu o isolamento de um resina amarelo, de ponto de fusão 80,5-82,3 °C e  $[\alpha]_D^{25} = +13,3^\circ$  (c 0,33, CH<sub>3</sub>OH), denominado AU1 (ver **Parte Experimental**, pág. 151).

O espectro na região do infravermelho de AU1 (**FIGURA 6**, pág. 46) apresentou absorções correspondentes a vibrações de deformação axial de NH para aminas secundárias aromáticas (3412 cm<sup>-1</sup>), confirmadas por uma banda de deformação angular no plano (1517 cm<sup>-1</sup>). Também foram observadas bandas correspondentes a vibrações de deformação axial de C-N alifático (1199 e 1035 cm<sup>-1</sup>) e aromático (1379 e 1261 cm<sup>-1</sup>), além de bandas correspondentes a deformação angular fora do plano para CH em anéis aromáticos (748 cm<sup>-1</sup>).



**FIGURA 6.** Espectro na região do infravermelho de AU1.

O espectro de RMN <sup>1</sup>H de AU1 (**FIGURA 7**, pág. 54) apresentou 4 sinais correspondentes a hidrogênios aromáticos em  $\delta_H$  7,63 (1H, d, 8 Hz), 7,44 (1H, d, 8 Hz), 7,22 (1H, t, 8 Hz) e 7,13 (1H, t, 8 Hz), que evidenciaram a natureza indólica do composto. Além disso, observaram-se dois sinais correspondentes a hidrogênios olefinicos em  $\delta_H$  5,80 (1H, s)

e 5,29 (1H, s), dois sinais correspondentes a grupos metilas em  $\delta_H$  2,72 (3H, s) e 0,92 (3H, t, 7 Hz), sendo esse último pertencente a um grupo etila. Outros sinais observados foram:  $\delta_H$  3,12 (dd, 5 e 13 Hz), 2,72 (m), 2,27 (m), 1,92 (m), 2,91 (sl), 1,18 (m), 2,27 (m) e 4,90 (sl).

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB de AU1 (**FIGURA 8**, pág. 54) apresentou 18 sinais. Através do espectro de RMN 2D HSQC editado de AU1 (**FIGURA 9**, pág. 55) observou-se a existência de quatro carbonos aromáticos com absorções em 124,7 ( $\delta_H$  7,22), 122,0 (7,13), 119,4 (7,63), 112,9 (7,44); três carbonos metínicos em  $\delta_C$  60,4 (4,90), 45,0 (2,27) e 38,7 (2,91); quatro carbonos metilênicos, em  $\delta_C$  112,7 ( $\delta_H$  5,80 e 5,29), 47,5 (3,12 e 2,72), 33,1 (2,27 e 1,92) e 25,1 (1,18); e dois carbonos metílicos, em  $\delta_C$  42,3 ( $\delta_H$  2,72) e 11,7 (0,92). Os sinais de carbono restantes, não hidrogenados e, portanto, ausentes no HSQC editado, são  $\delta_C$  139,2, 139,0, 137,4, 129,1 e 101,5. Entre as absorções observadas, aquelas entre  $\delta_C$  124,7-112,9 correspondem ao sistema indólico identificado anteriormente através do espectro de RMN  $^1\text{H}$ , enquanto as absorções em  $\delta_C$  112,7 ( $\delta_H$  5,80 e 5,29) e 42,3 (2,72) correspondem, respectivamente, a uma dupla ligação exocíclica e a um grupamento metila possivelmente ligado a nitrogênio.

A análise do espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ -COSY de AU1 (**FIGURA 10**, pág. 56) forneceu a maioria dos acoplamentos geminais e vicinais do composto, inclusive para o sistema indólico, listados na **TABELA 3**, pág. 48. Dentre os acoplamentos observados destaca-se as absorções em  $\delta_H$  0,92 ( $\delta_C$  11,7) com 1,18 ( $\delta_C$  25,1), evidenciando o grupamento etila mencionado anteriormente. Outros acoplamentos observados foram:  $\delta_H$  1,18 ( $\delta_C$  25,1) com 2,27 (45,0);  $\delta_H$  2,27 ( $\delta_C$  45,0) com 4,80 (60,4);  $\delta_H$  3,12 e 2,72 ( $\delta_C$  47,5) com 2,27 e 1,92 (33,1) e  $\delta_H$  2,27 e 1,92 ( $\delta_C$  33,1) com 2,91 (38,7).

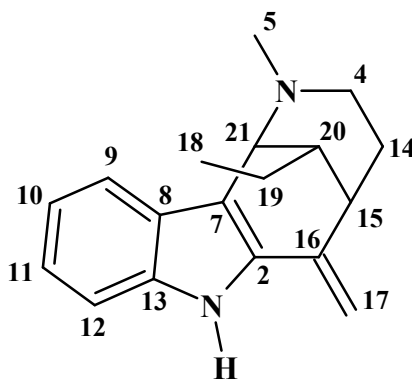
O espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ -HSQC-TOCSY (**FIGURA 11**, pág. 57) de AU1 possibilitou seqüenciar todos os carbonos através de seus respectivos hidrogênios. O hidrogênio em  $\delta_H$  2,27, correlacionado aos carbonos em  $\delta_C$  45,0 e 33,1 no HSQC editado, apresentou correlações com os carbonos  $\delta_C$  11,7, 25,1, 33,1 ( $^1J_{\text{CH}}$ ), 38,7, 45,0 ( $^1J_{\text{CH}}$ ), 47,5 e 60,4. Uma vez que o hidrogênio em  $\delta_H$  1,92 ( $\delta_C$  33,1), geminal com 2,27, apresentou acoplamento apenas com os carbonos em 33,1 ( $^1J_{\text{CH}}$ ), 38,7 e 47,5, supõe-se que os acoplamentos restantes estejam relacionados com  $\delta_H$  2,27 ligado a  $\delta_C$  45,0. Com esses dados é possível estabelecer inequivocamente, dois grupos de seqüências de carbonos na molécula como segue:  $\delta_C$  11,7  $\rightarrow$  25,1  $\rightarrow$  45,0  $\rightarrow$  60,4;  $\delta_C$  47,5  $\rightarrow$  33,1  $\rightarrow$  38,7, além do sistema indólico, estabelecido anteriormente pelo COSY. O **QUADRO 2**, pág. 49, apresenta as

estruturas parciais obtidas pelo COSY e HSQC-TOCSY.

TABELA 3. Dados de RMN 1D e 2D de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  para AU1.

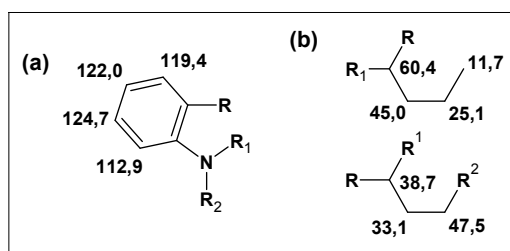
	$\delta_{\text{C}}$ *	$\delta_{\text{H}}$ (mult, $J$ ) *	COSY *	$\delta_{\text{C}}$ **	$\delta_{\text{H}}$ (mult, $J$ ) **	COSY **
2	139,1	---	---	137,2	---	---
3a	47,5	3,12 (dd, 5 e 13)	2,27	46,3	3,07 (dd, 3 e 11)	---
3b		2,72 (m)	2,27		2,63 (m)	---
5	42,3	2,72 (s)	---	42,0	2,64 (s)	---
6	---	---	---	---	---	---
7	101,5	---	---	101,4	---	---
8	129,1	---	---	127,8	---	---
9	119,4	7,63 (d, 8)	7,13	118,3	7,44 (d, 8)	7,17
10	122,0	7,13 (t, 8)	7,63; 7,22	121,5	7,17 (t, 8)	7,44; 7,26
11	124,7	7,22 (t, 8)	7,44; 7,13	124,1	7,26 (t, 8)	7,52; 7,17
12	112,9	7,44 (d, 8)	7,22	112,1	7,52 (d, 8)	7,26
13	139,2	---	---	137,5	---	---
14a		2,27 (m)	3,12; 2,91		2,57 (qt, 4 e 13)	2,91
14b	33,1	1,92 (m)	3,12	31,6	1,81 (m)	2,91
15	38,7	2,91 (sl)	2,27; 1,92	37,2	2,84 (m)	2,27; 1,92
16	137,4	---	---	135,7	---	---
17a		5,80 (s)	---		5,78 (s)	---
17b	112,7	5,29 (s)	---	112,1	5,24 (s)	---
18	11,7	0,92 (t, 7)	1,18	11,3	0,84 (t, 7)	1,12
19	25,1	1,18 (m)	2,27; 0,92	24,1	1,12 (m)	2,75; 0,84
20	45,0	2,27 (m)	4,80; 0,92	42,5	2,75 (m)	4,66; 1,12
21	60,4	4,80 (sl)	2,27	58,9	4,66 (d, 2)	2,75

\*  $\text{CD}_3\text{OD}$  ( $\delta_{\text{C}}$  49,15 e  $\delta_{\text{H}}$  3,31); \*\*  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta_{\text{C}}$  77,23 e  $\delta_{\text{H}}$  7,27).

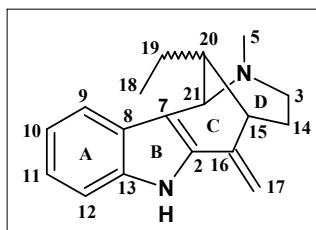


O espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HMBC (FIGURA 12, pág. 58) permitiu o assinalamento inequívoco e a conexão das duas estruturas parciais obtidas anteriormente (ver QUADRO 2, pág. 49). Através das correlações  $^3J_{\text{CH}}$  dos hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  7,63 e 2,27 com  $\delta_{\text{C}}$  101,5,  $\delta_{\text{H}}$  2,72 com  $\delta_{\text{C}}$  60,4 e 47,5,  $\delta_{\text{H}}$  1,92 com  $\delta_{\text{C}}$  137,4,  $\delta_{\text{H}}$  5,80/5,29 com  $\delta_{\text{C}}$  139,2,  $\delta_{\text{H}}$  7,22 com  $\delta_{\text{C}}$  139,1, e  $\delta_{\text{H}}$  4,80 com  $\delta_{\text{C}}$  139,2, além das correlações  $^2J_{\text{CH}}$  dos hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  7,44 com  $\delta_{\text{C}}$  139,1,  $\delta_{\text{H}}$  4,80 com  $\delta_{\text{C}}$  101,5, e  $\delta_{\text{H}}$  5,80/5,29 com  $\delta_{\text{C}}$  137,4, foi possível propor a estrutura apresentada no QUADRO 3, pág. 49, para AU1.



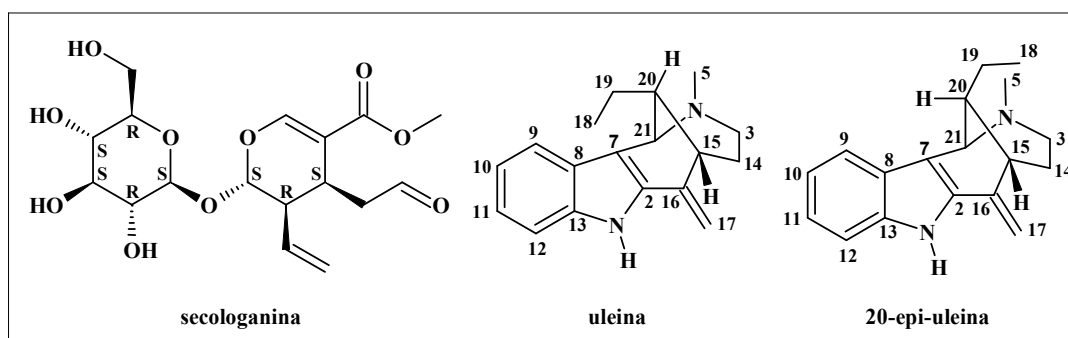


QUADRO 2. Estruturas parciais obtidas pelos experimentos (a) COSY. (b) HSQC-TOCSY.



QUADRO 3. Proposta estrutural para AU1.

Pesquisa online no SciFinder Scholar v2006 do Chemical Abstracts revelou a existência de um par de epímeros em C-20 para a estrutura proposta: uleina (p.f. 76-118 °C;  $[\alpha]_D^{25} = +16^\circ$ , c 1,34, CHCl<sub>3</sub> (Schmutz; Hunziker **1958**)) e epi-uleina (p.f. 122-124 °C (Jácome **2004**);  $[\alpha]_D^{25} = +34,8^\circ$ , CH<sub>3</sub>OH (Boris; Lankin; Cordell **1983**)), tendo sido a uleina já isolada anteriormente de *Aspidosperma ulei*. De acordo com a literatura, a configuração absoluta *R* em C-15 é estabelecida devido à origem biogenética desse tipo de alcalóide, a partir da secologanina (Amat, M. *et al.*, **2004**). Além disso, duas configurações são possíveis para o carbono C-20, com H-20 posicionando-se  $\pm$  synclinal a H-15 (QUADRO 4, pág. 49).



QUADRO 4. Uleina e 20-epi-Uleina: duas configurações possíveis para o carbono 20.

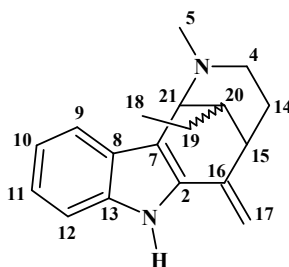
A comparação dos dados de carbono-13 de AU1 com uleina e epi-uleina da literatura mostrou diversas semelhanças, no entanto, para AU1, em CD<sub>3</sub>OD, C-17 e C-7 apresentam valores de  $\delta_C$  diferentes em relação àqueles observados na literatura para uleina e epi-uleina (TABELA 4, pág. 50) [Jácome, R. L. R. P.; Oliveira, A. B. 2004; França, O. O.; Brown R. T.;

Santos, C. A. M. 2000; Borris, R. P.; Lankin, D. C.; Cordel, G. 1983]. Uma vez que os dados da literatura foram obtidos em  $\text{CDCl}_3$  optou-se pela aquisição dos espectros de

TABELA 4. Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  de AU1 em comparação com dados da literatura.

	AU1		Uleina ( $\text{CDCl}_3$ )			Epiuleina ( $\text{CDCl}_3$ )	
	$\delta_{\text{C}}^1$	$\delta_{\text{C}}^2$	$\delta_{\text{C}}^3$	$\delta_{\text{C}}^4$	$\delta_{\text{C}}^5$	$\delta_{\text{C}}^3$	$\delta_{\text{C}}^5$
2	139,2	137,5	135,5	138,0	135,1	136,4	136,5
13	139,1	137,2	136,8	137,0	136,6	136,6	135,9
16	137,4	135,7	138,7	141,0	138,7	141,1	142,1
8	129,1	127,8	129,3	124,7	129,4	127,9	128,5
11	124,7	124,1	122,4	122,0	122,7	122,6	122,8
10	122,0	121,5	119,6	119,3	119,8	119,8	119,9
9	119,4	118,3	119,3	119,1	119,5	119,0	119,6
12	112,9	112,1	110,8	111,0/112,4	110,7	111,0	111,9
17	112,7	112,1	106,9	104,0	106,7	106,1	104,7
7	101,5	101,4	107,4	---	107,8	110,0	110,8
21	60,4	58,9	56,6	58,9	56,5	55,3	54,9
3	47,5	46,3	46,2	46,9	46,3	46,2	46,4
20	45,0	42,5	45,8	43,1	46,1	44,2	44,7
5	42,3	42,0	44,1	43,7	44,4	44,4	44,8
15	38,7	37,2	39,4	38,3	39,5	37,7	38,5
14	33,1	31,6	34,5	32,8	34,5	27,8	28,7
19	25,1	24,1	24,2	24,8	24,2	23,3	23,5
18	11,7	11,3	11,6	12,0	11,6	12,0	12,2

<sup>1</sup>  $\text{CD}_3\text{OD}$  (125 MHz); <sup>2</sup>  $\text{CDCl}_3$  (125 MHz); <sup>3</sup> França, O. O.; Brown R. T.; Santos, C. A. M. **2000** (100 MHz); <sup>4</sup> Borris, R. P.; Lankin, D. C.; Cordel, G. **1983** (22,68 MHz); <sup>5</sup> Jácome, R. L. R. P.; Oliveira, A. B. **2004** (90 MHz).



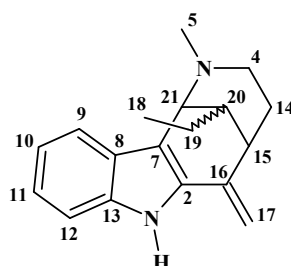
AU1 no mesmo solvente (FIGURAS 15 a 20, págs. 61-65), os quais estão listados na TABELA 4, pág. 50 e TABELA 5, pág. 51. A única diferença observada para AU1 em  $\text{CDCl}_3$  com relação a  $\text{CD}_3\text{OD}$  é a leve proteção observada, em  $\text{CDCl}_3$ , para todos os carbonos e praticamente todos os hidrogênios da amostra. A comparação dos dados de  $^{13}\text{C}$  de AU1 em  $\text{CDCl}_3$  com os dados da literatura (TABELA 4, pág. 50), apresentaram as mesmas discrepâncias observadas anteriormente no  $^{13}\text{C}$ , em  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

A comparação dos dados de RMN  $^1\text{H}$  de AU1 em  $\text{CDCl}_3$  (TABELA 5, pág. 51) não pôde ser conclusiva. Se observarmos os valores é possível notar que apenas os hidrogênios do

TABELA 5. Dados de RMN <sup>1</sup>H de AU1, em comparação com dados da literatura.

	AU1 (CDCl <sub>3</sub> )	Uleina (CDCl <sub>3</sub> )			Epiuleina (CDCl <sub>3</sub> )	
	δ <sub>H</sub> (mult, J) <sup>1</sup>	δ <sub>H</sub> (mult, J) <sup>2</sup>	δ <sub>H</sub> (mult, J) <sup>3</sup>	δ <sub>H</sub> (mult, J) <sup>4</sup>	δ <sub>H</sub> (mult, J) <sup>2</sup>	δ <sub>H</sub> (mult, J) <sup>4</sup>
<b>3a</b>	3,07 (dd, 3 e 11)	2,70 (d, 3,0)	2,67 (dl)	---	2,65 (m)	---
<b>3b</b>	2,63 (m)	2,45 (m)	1,80 (dl, 9,4)	---	2,40 (m)	---
<b>5</b>	2,64 (s)	2,30 (s)	2,59 (s)	2,29 (s)	2,25 (s)	2,28 (s)
<b>9</b>	7,44 (d, 8)	7,35 (d, 8,0)	7,49 (dd, 8)	7,00-7,65 (m)	7,30 (d, 7,8)	7,00-7,70 (m)
<b>10</b>	7,17 (t, 8)	7,10 (t, 7,8)	7,18 (t, 7,4)	7,00-7,65 (m)	7,10 (t)	7,00-7,70 (m)
<b>11</b>	7,26 (t, 8)	7,20 (t, 7,8)	7,26 (t, 7,4)	7,00-7,65 (m)	7,15 (t, 8,0)	7,00-7,70 (m)
<b>12</b>	7,52 (d, 8)	7,55 (d, 8,0)	7,46 (dd, 8)	7,00-7,65 (m)	7,55 (d, 8,0)	7,00-7,70 (m)
<b>14a</b>	2,57 (qt, 4 e 13)	2,05 (m)	2,52 (d, 8,5)	---	2,0 (m)	---
<b>14b</b>	1,81 (m)		1,27 (sl)	---		---
<b>15</b>	2,84 (m)	3,50 (s)	2,82 (d, 1,5)	---	---	---
<b>17a</b>	5,78 (s)	5,27 (s)	5,59 (s)	5,28 (s)	5,20 (s)	5,24 (s)
<b>17b</b>	5,24 (s)	5,00 (s)	5,21 (s)	4,98 (s)	4,95 (s)	4,96 (s)
<b>18</b>	0,84 (t, 7)	0,85 (t, 7,4)	0,88 (t, 7,4)	0,84 (m)	1,08 (t, 7,4)	1,00 (t, 6,0)
<b>19</b>	1,12 (m)	1,15 (m, 7,4)	1,15 (m, 7,4)	0,84 (m)	1,25 (t)	---
<b>20</b>	2,75 (m)	1,70 (m)	2,99 (dl, 6,9)	---	---	---
<b>21</b>	4,66 (d, 2)	4,10 (d, 3,0)	4,55 (d, 1,5)	4,11 (d, 2,3)	4,00 (s)	4,10 (sl)

<sup>1</sup> 500 MHz; <sup>2</sup> Jácome, R. L. R. P.; Oliveira, A. B. **2004** (360 MHz); <sup>3</sup> França, O. O.; Brown R. T.; Santos, C. A. M. **2000** (400 MHz); <sup>4</sup> Borris, R. P.; Lankin, D. C.; Cordel, G. **1983** (60 MHz).



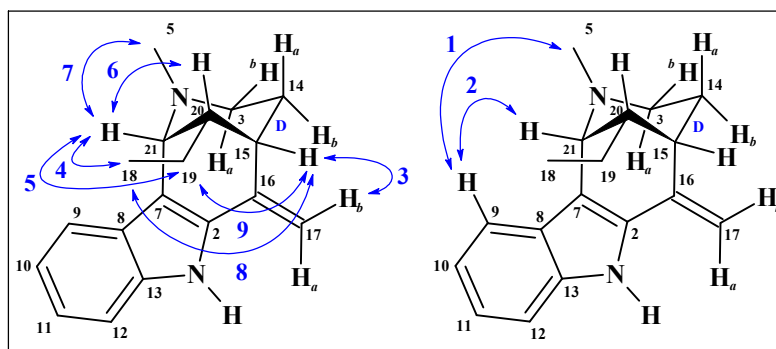
anel aromático indólico, da dupla oxocíclica, em C-17, e da metila, em C-18, apresentam concordância entre si. Além disso, Borris não apresenta o assinalamento para os hidrogênios em 3, 14, 15 e 20. Finalmente, nenhum dos autores menciona o uso de técnicas de RMN 2D na atribuição desses compostos, o que possivelmente levou a atribuições equivocadas.

França assinalou, para a uleina, todos os carbonos com seus respectivos hidrogênios, no entanto, para C-12, um carbono aromático monohidrogenado, foi atribuído dois valores de deslocamentos químicos diferentes (111,0/112,4), enquanto C-7, um carbono de dupla não hidrogenado, não apresentou qualquer assinalamento de deslocamento químico de carbono. Isto foi provavelmente devido a um erro tipográfico, onde um dos valores em C-12 pertenceria a C-7 (França, O. O.; Brown R. T.; Santos, C. A. M. **2000**).

Como mencionado anteriormente, uma vez que nenhum dos trabalhos citados menciona o uso de técnicas de RMN de correlação bidimensional para o assinalamento de

seus dados, enquanto AU1 foi completamente assinalado por RMN 1D e 2D, pode-se afirmar que os dados de C-17 e C-7 da literatura estejam errados, possibilitando sugerir AU1 como sendo uleína ou epiuleína. Jácome *et al.* (2004) e Buchi *et al.* (1971) relatam que os espectros de RMN  $^1\text{H}$  para uleína e epi-uleína são semelhantes, diferindo apenas com relação ao tripleto correspondente a metila (C-18) do grupamento etila, centrado em  $\delta_{\text{H}}$  0,85 para uleína e em  $\delta_{\text{H}}$  1,08 para epiuleína, em  $\text{CDCl}_3$ . Uma vez que a metila, na uleína, está sobre o sistema  $\pi$ -aromático observa-se um sinal mais protegido, em relação a epi-uleína. A comparação dos dados de RMN  $^1\text{H}$  de AU1 com uleína e epiuleína (TABELA 5, pág. 51) para o tripleto ( $\delta_{\text{H}}$  0,84) sugere que AU1 trata-se de uleína.

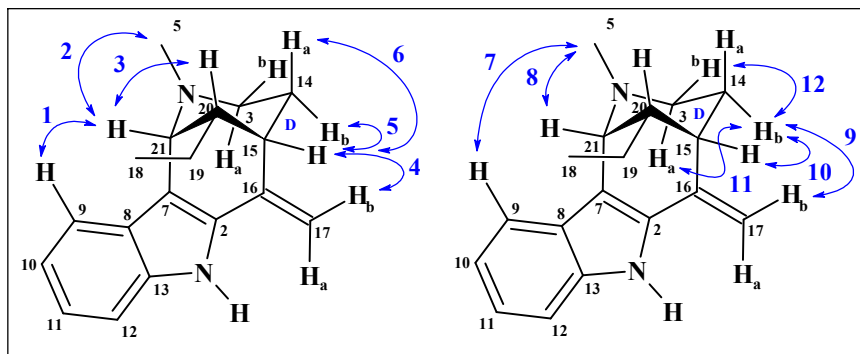
Para efetuar a atribuição dos hidrogênios equatoriais e axiais do anel D de AU1, optou-se pela obtenção do espectro de RMN 2D  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -NOESY (FIGURA 13, pág. 59), em  $\text{CD}_3\text{OD}$ . O espectro NOESY apresentou as seguintes correlações: H-9 com 3H-5 (1) e H-21 (2), H-17b com H-15 (3), H-21 com 3H-18 (4), 2H-19 (5), H-20 (6) e 3H-5 (7), H-15 com 3H-18 (8) e 2H-19 (9), e H-20 com 3H-18 e 2H-19 (QUADRO 5, pág. 52).



QUADRO 5. Correlações dipolares observadas através do NOESY.

Alguns sinais no NOESY geraram ambigüidade no assinalamento por não ser possível distingui-los dos acoplamentos escalares observados no COSY, impedindo a atribuição da estereoquímica de alguns hidrogênios. Devido a isso, optou-se pela aplicação de dupla irradiação seletiva através do experimento de RMN  $^1\text{H}$  NOE seletivo (SELNOE) (FIGURA 14, pág. 60), a fim de possibilitar a atribuição dos hidrogênios equatoriais e axiais do anel D. Ao irradiar-se seletivamente na frequência de H-21, observou-se resposta nos hidrogênios H-9 (2,49 %, 1), H-5 (3,57 %, 2), H-20 (3,56 %, 3), 2H-19 (2,42 %) e 3H-18 (1,81 %). A irradiação em H-15 apresentou resposta em H-17b (4,78 %, 4), H-14b (2,26 %, 5), H-14a e H-20 (7,65 %, 6), 2H-19 (2,36 %) e 3H-18 (1,82 %), enquanto H-14b mostrou interação com H-17b (0,96 %, 9), H-15 (3,35 %, 10), H-3a (1,90 %, 11) e H-3b (3,55 %, 12) e H-14a (26,47 %). Ainda que superpostos, a irradiação dos hidrogênios H-3b/H-5 apresentou interação

apenas com H-9 (1,63 %, 7) e H-21 (2,18 %, 8), e devido à posição de H-3b em relação a H-5 na estrutura, somente H-5 poderia interagir com H-21 e H-9. Esses dados indicam que o anel D do composto deve assumir uma conformação em cadeira, com os grupos etila e N-metila em equatorial (**QUADRO 6**, pág. 53).



**QUADRO 6.** Correlações dipolares observadas através do SELNOE.

Dessa forma, pode-se afirmar que os dados de uleina constantes na literatura revelam atribuições equivocadas e/ou ausência de dados bidimensionais de RMN para assegurar as correlações propostas. Assim, no melhor do nosso conhecimento, a análise dos espectros de RMN 1D e 2D de AU1, em CD<sub>3</sub>OD e CDCl<sub>3</sub>, possibilitou caracterizá-lo como uleina e confirmar a configuração relativa do carbono epimérico 20 (20*S*).

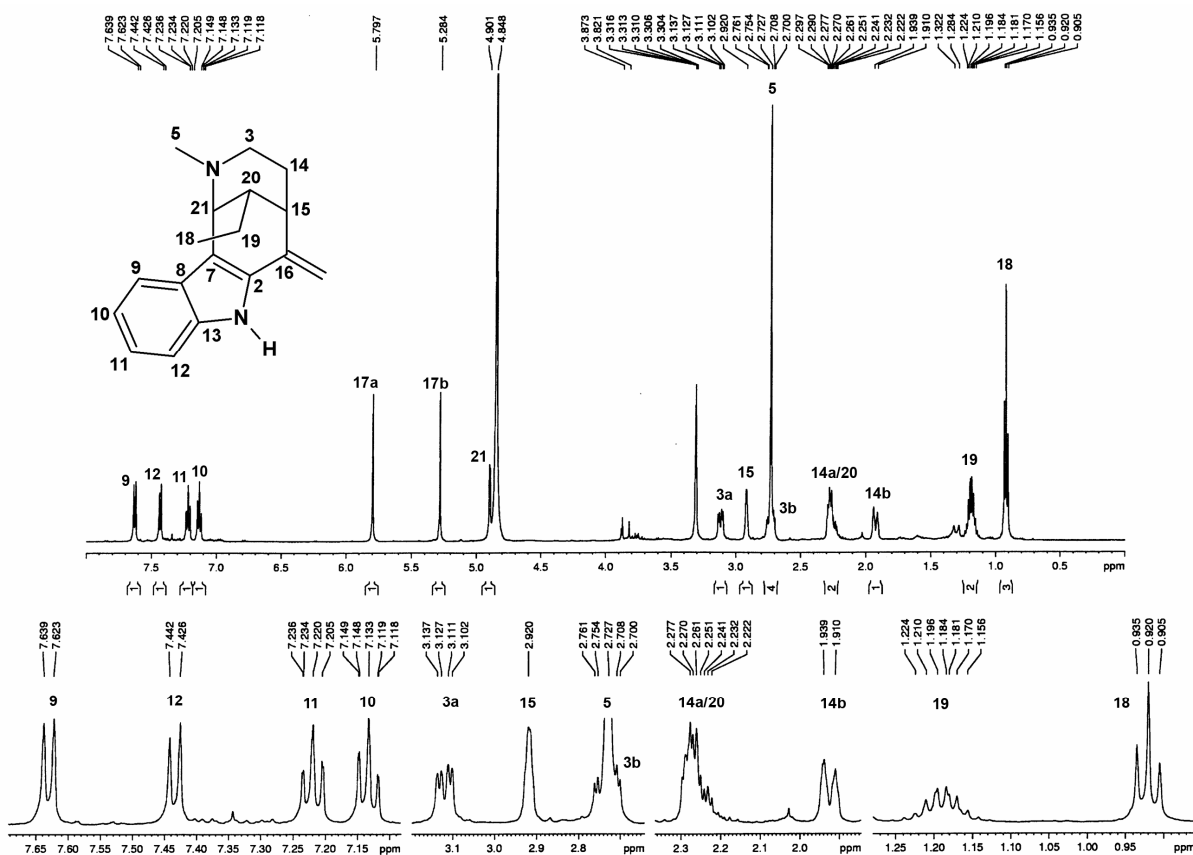


FIGURA 7. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de AU1 (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) e expansões.

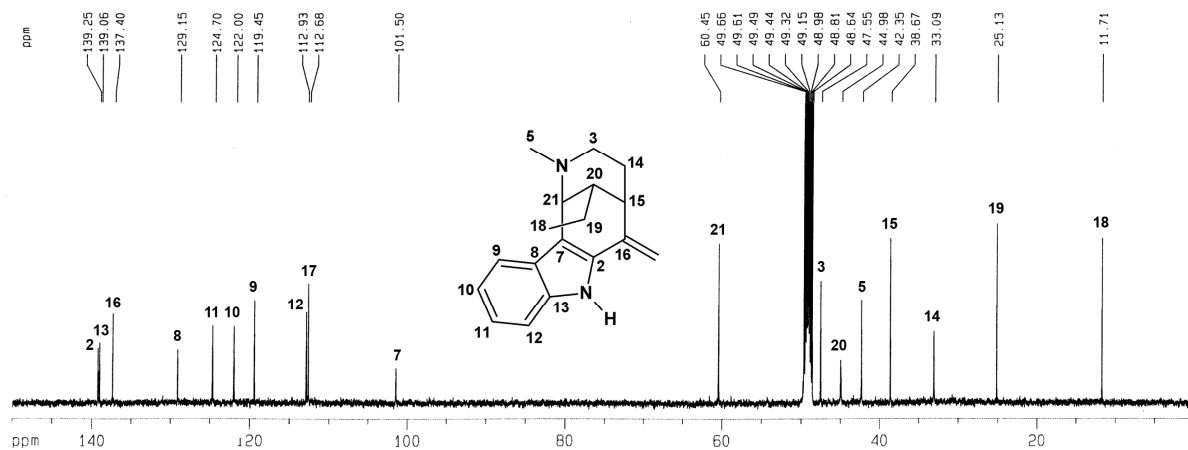


FIGURA 8. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de AU1 (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

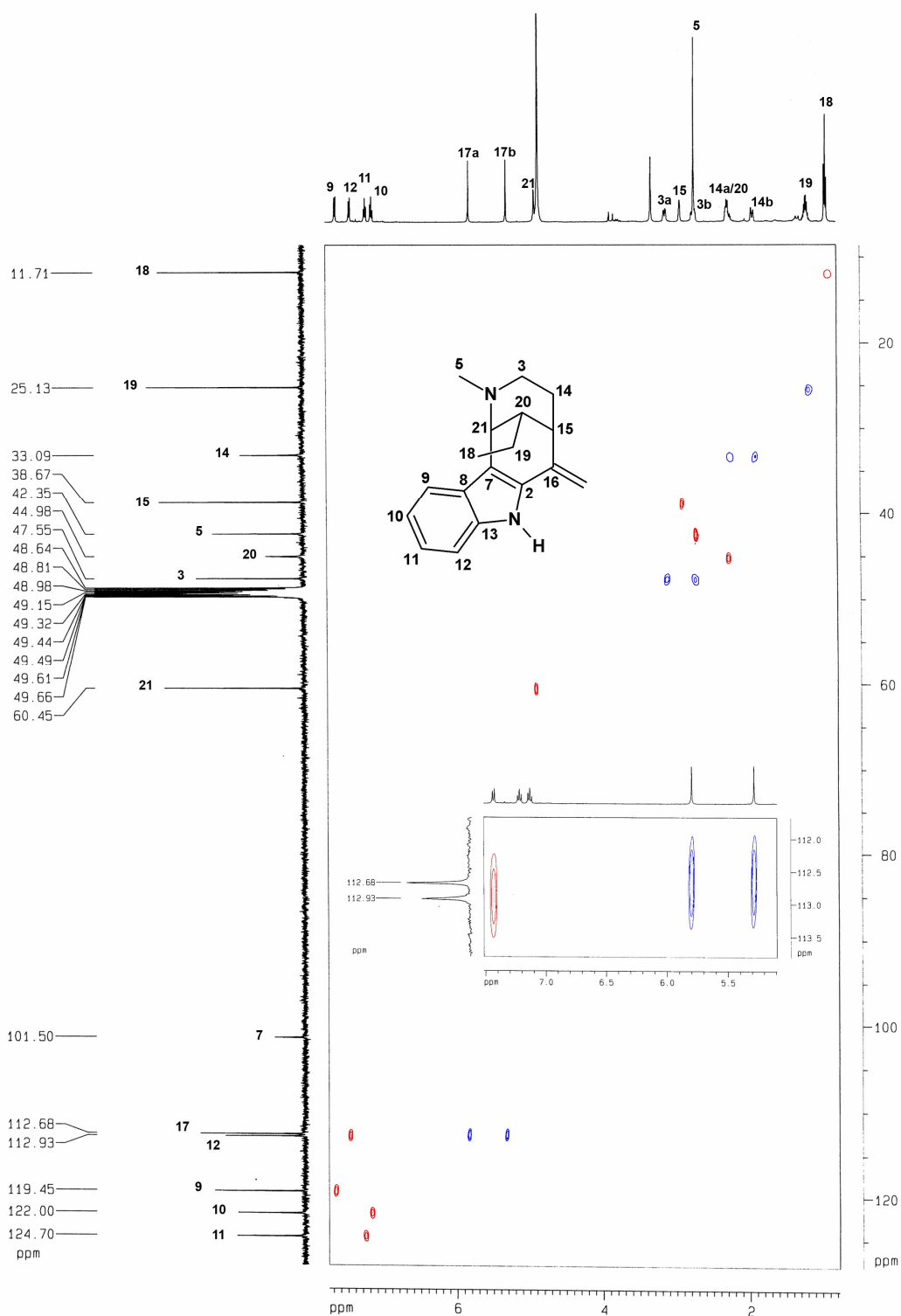
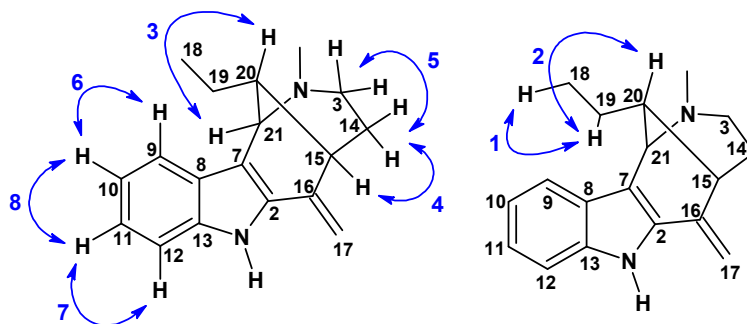
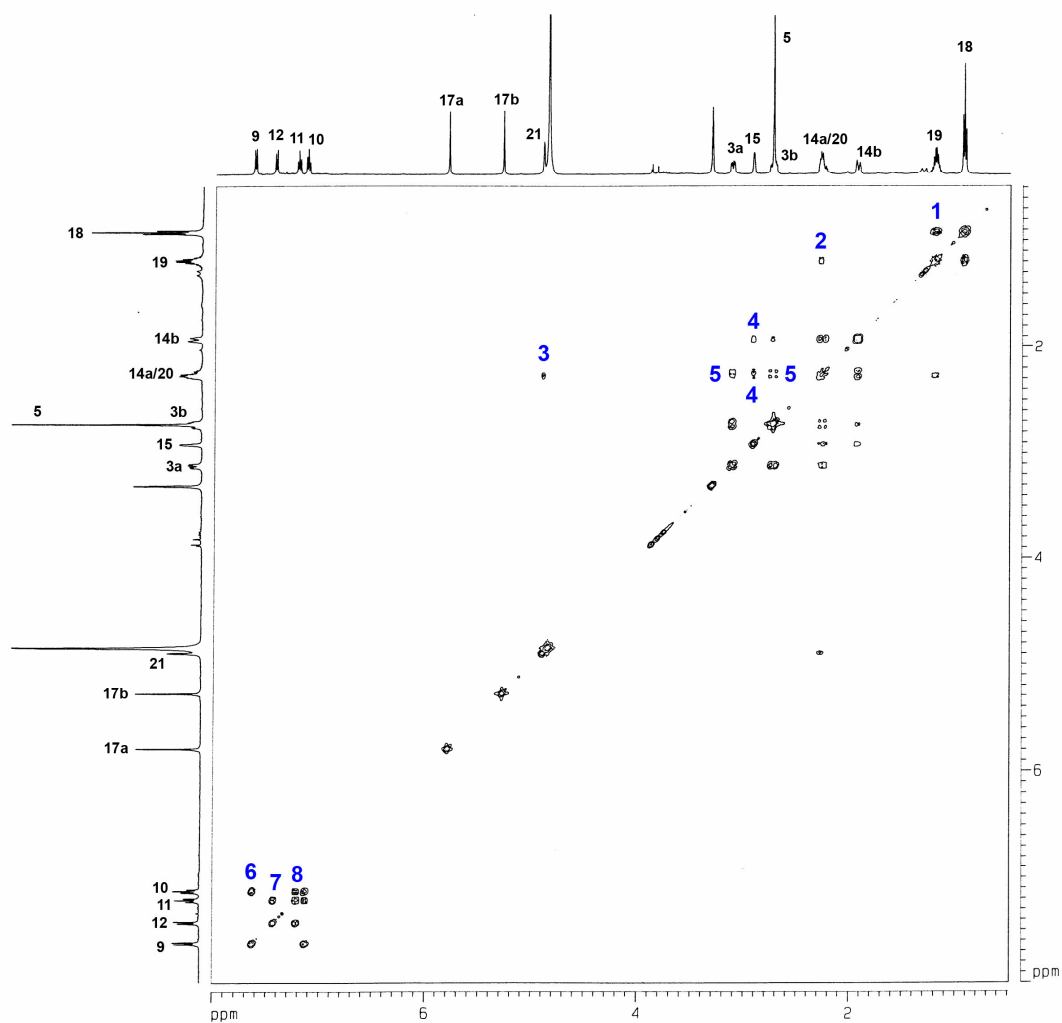
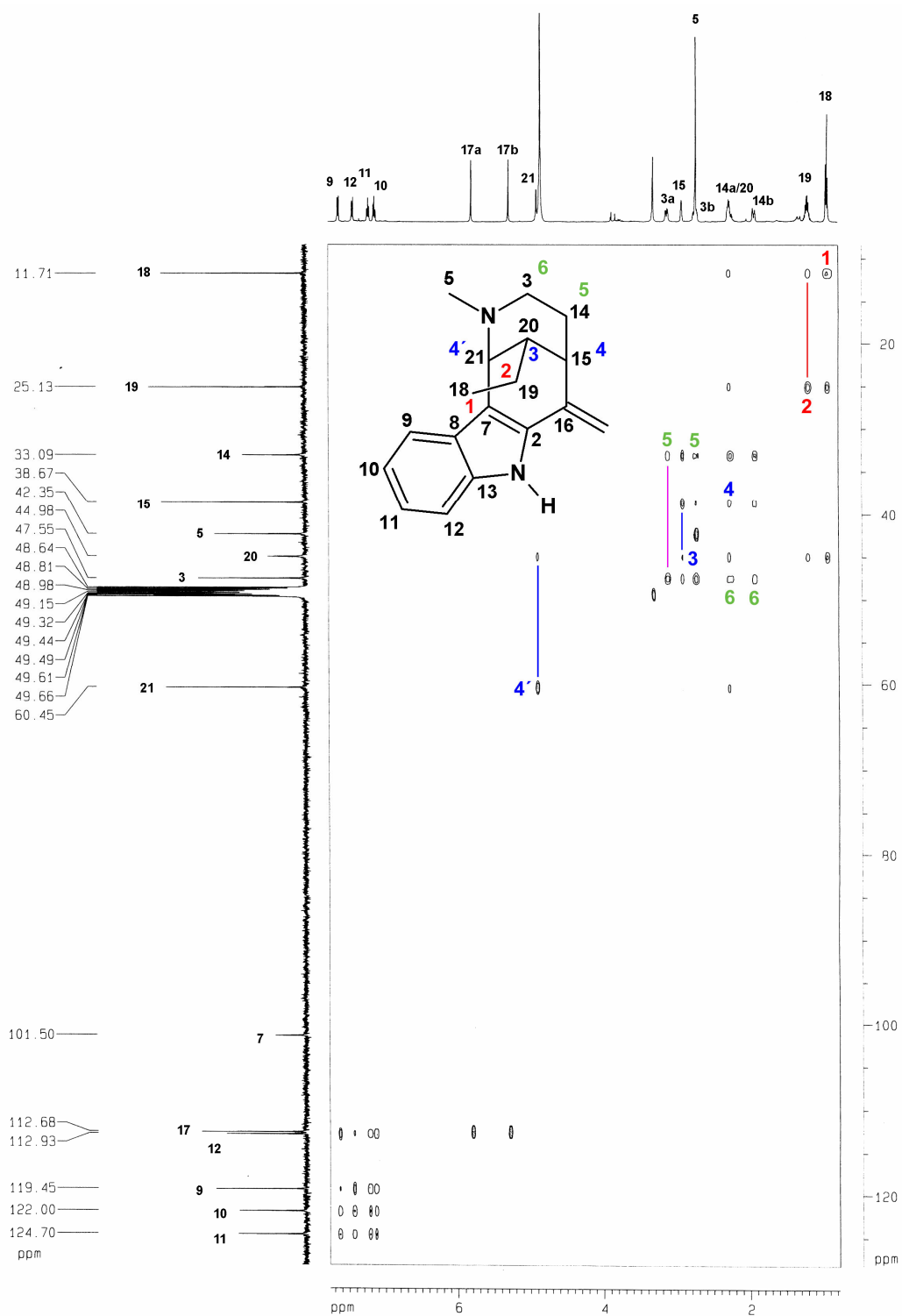


FIGURA 9. Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC editado de AU1 (500/125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ), com fase positiva (CH e  $\text{CH}_3$ ) em vermelho e negativa ( $\text{CH}_2$ ) em azul.

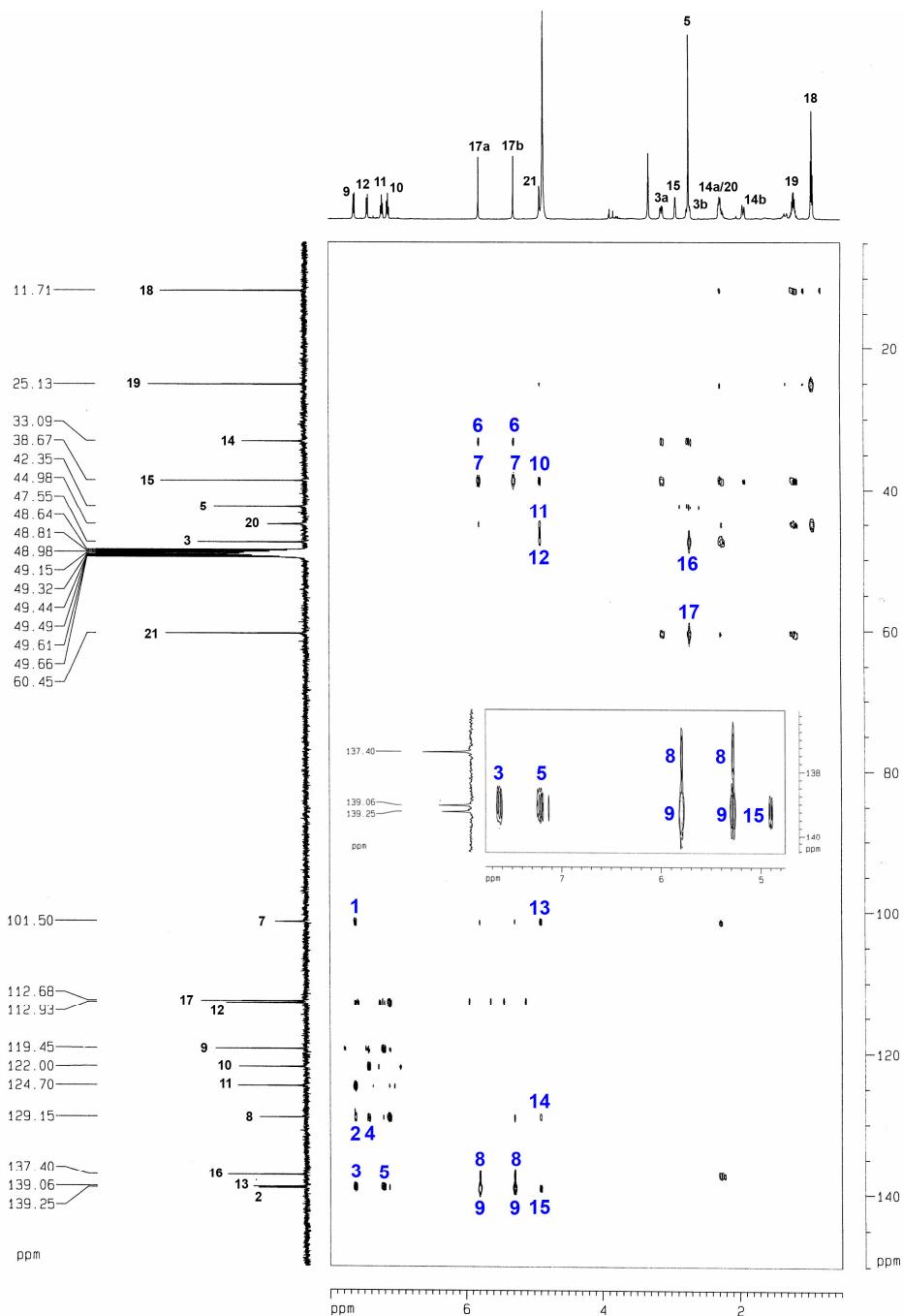


**FIGURA 10.** Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -COSY de AU1 (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ). As setas numeradas representam as correlações vicinais observadas e sua numeração corresponde a numeração dos picos observados no espectro.

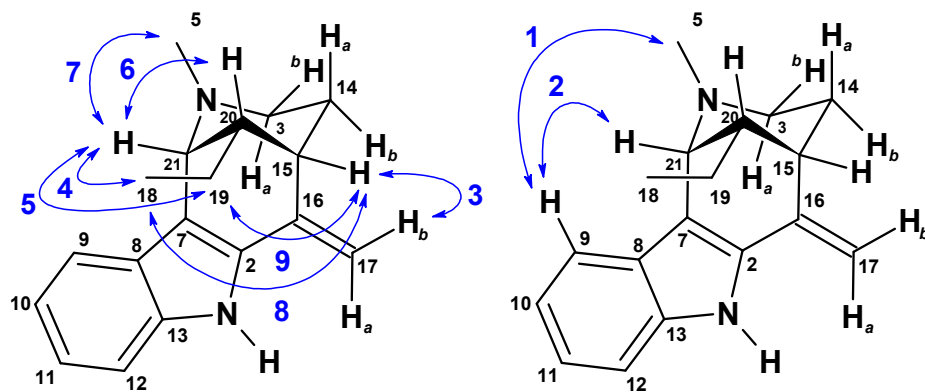
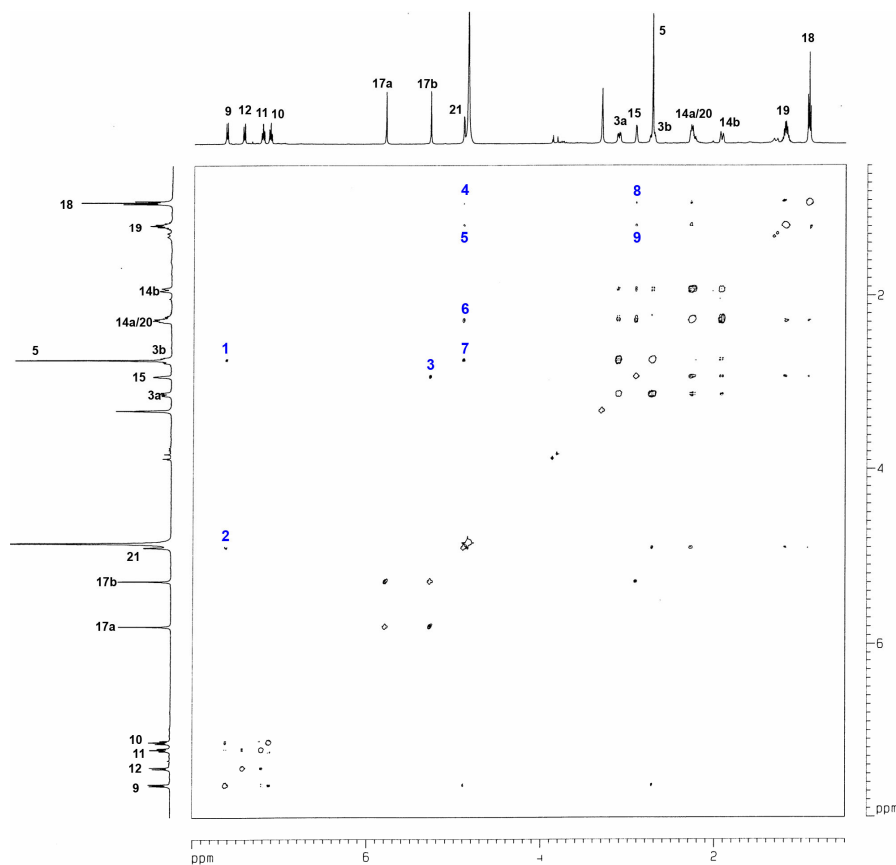




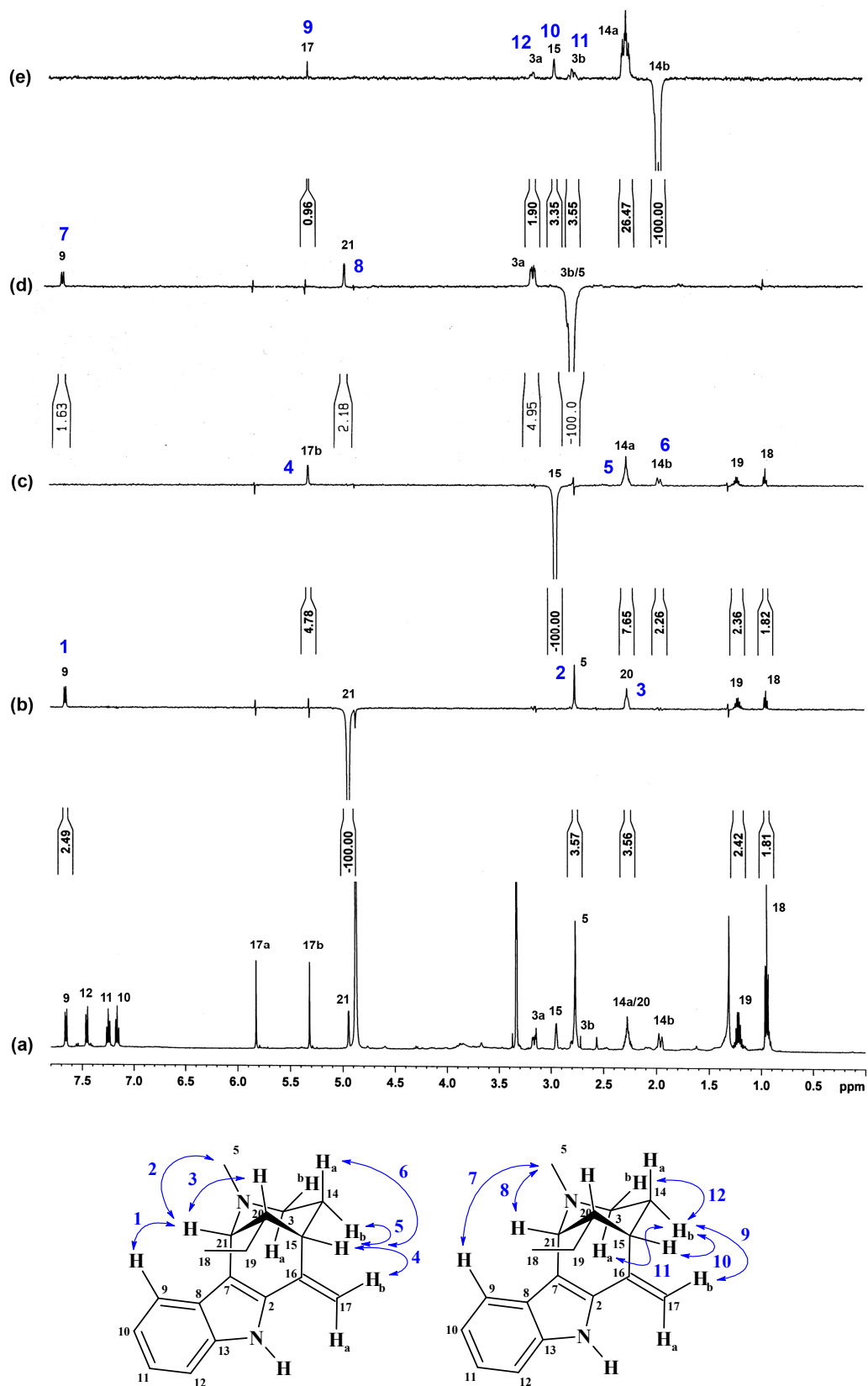
**FIGURA 11.** Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC-TOCSY de AU1 (500/125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ). A numeração colorida na estrutura e espectro indica a seqüência observada para os hidrogênios.



**FIGURA 12.** Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HMBC de AU1 (500/125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) com expansão. As setas numeradas representam as principais correlações à longa distância observadas e sua numeração corresponde a numeração dos picos observados no espectro.



**FIGURA 13.** Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -NOESY de AU1 (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ). As setas numeradas representam as principais correlações dipolares observadas e sua numeração corresponde a numeração dos picos observados no espectro.



**FIGURA 14.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de AU1 (a) não irradiado e RMN 1D  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -NOE seletivo de AU1 irradiado em (b)  $\delta_{\text{H}}$  4,80 (H-21), (c)  $\delta_{\text{H}}$  2,91 (H-15), (d)  $\delta_{\text{H}}$  2,72 (H-3b/H-5) e (e)  $\delta_{\text{H}}$  1,92 (H-14b). As setas numeradas representam as principais correlações dipolares observadas e sua numeração corresponde a numeração dos picos observados no espectro.

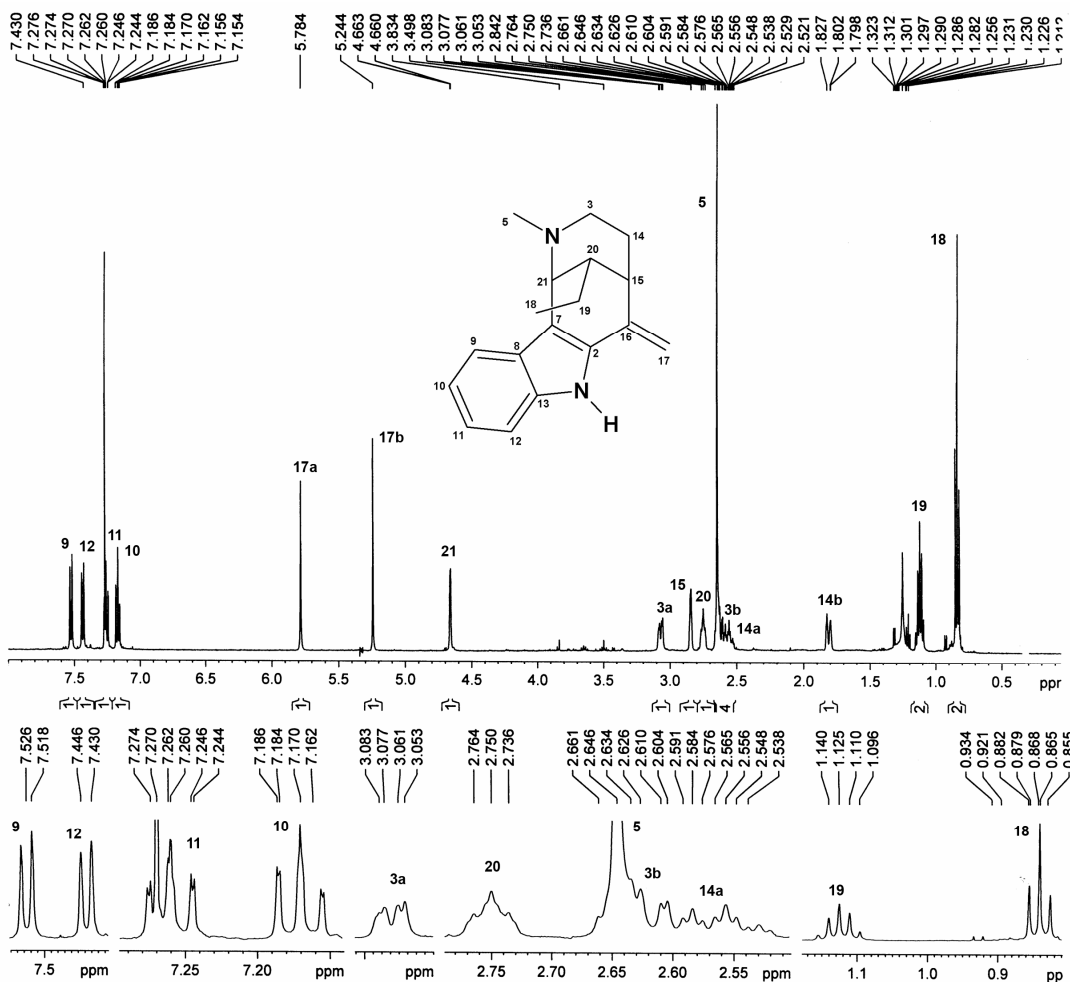


FIGURA 15. Espectro de RMN <sup>1</sup>H de AU1 (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) e expansões.

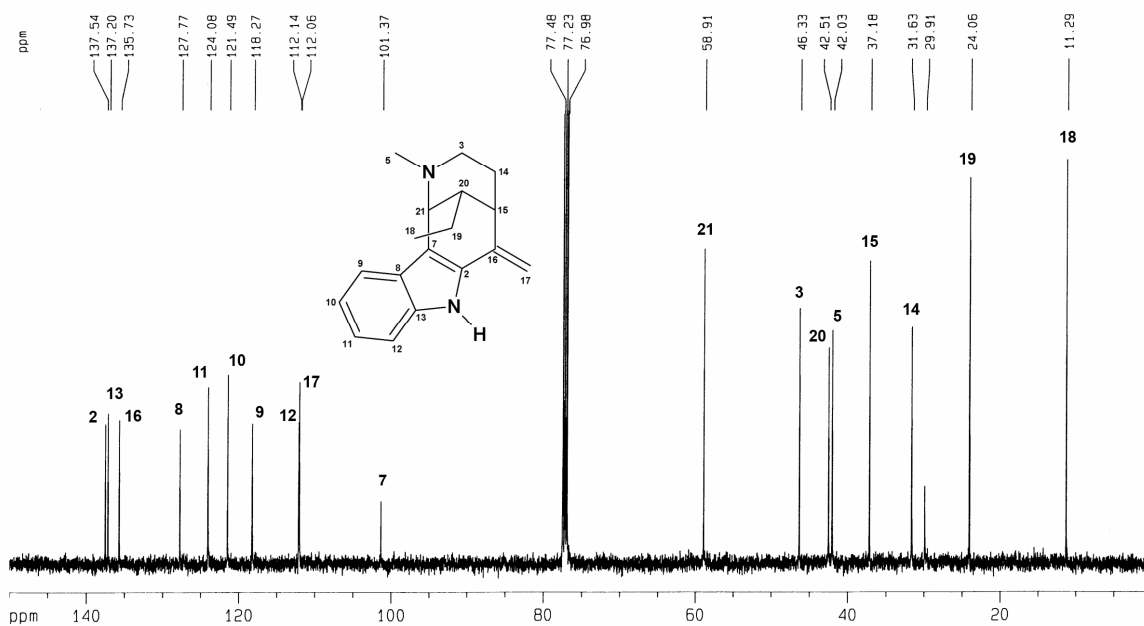
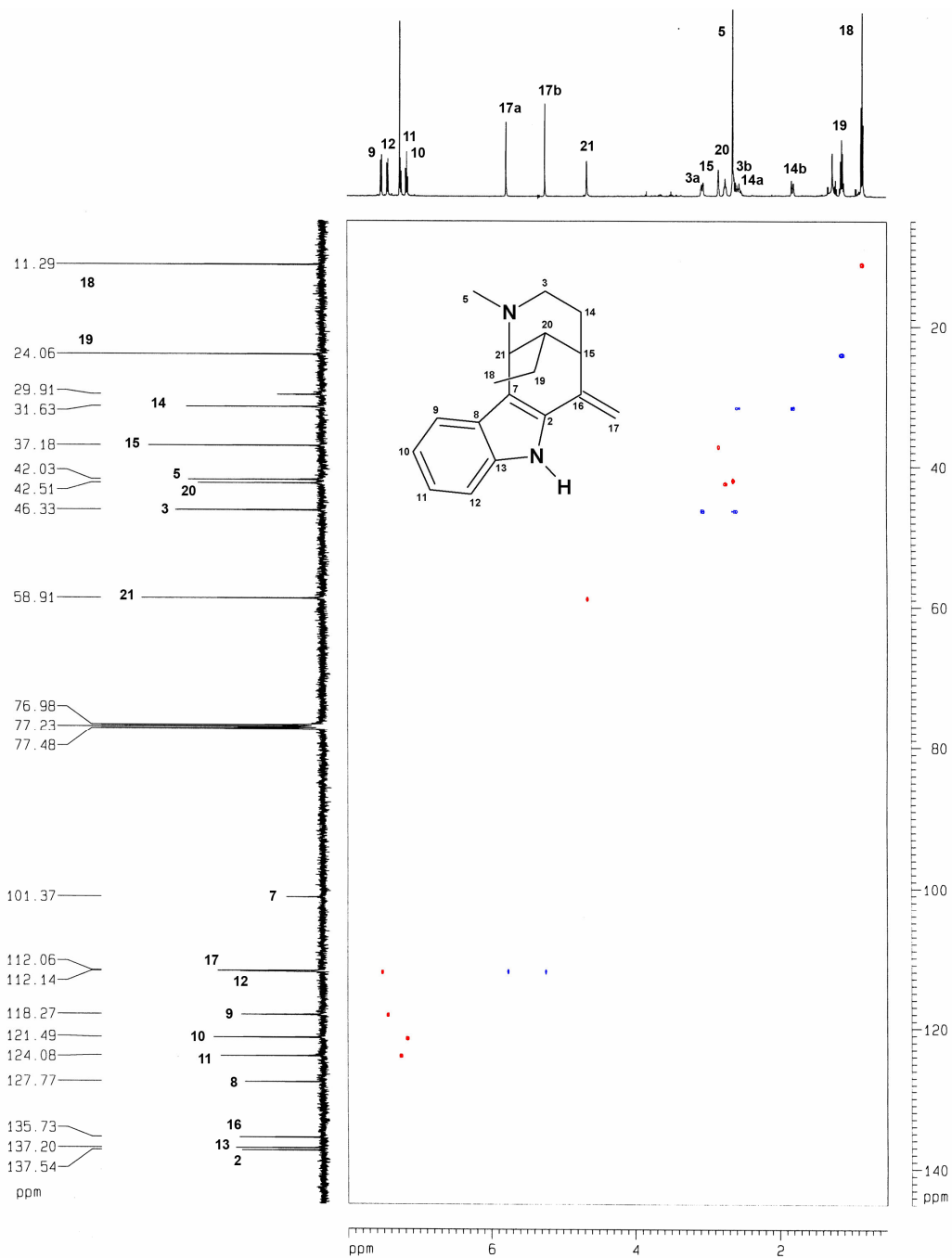
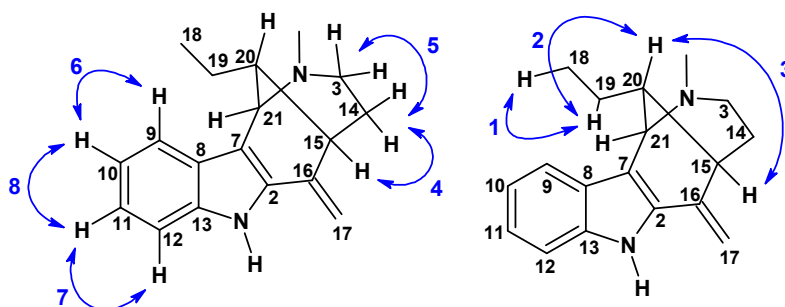
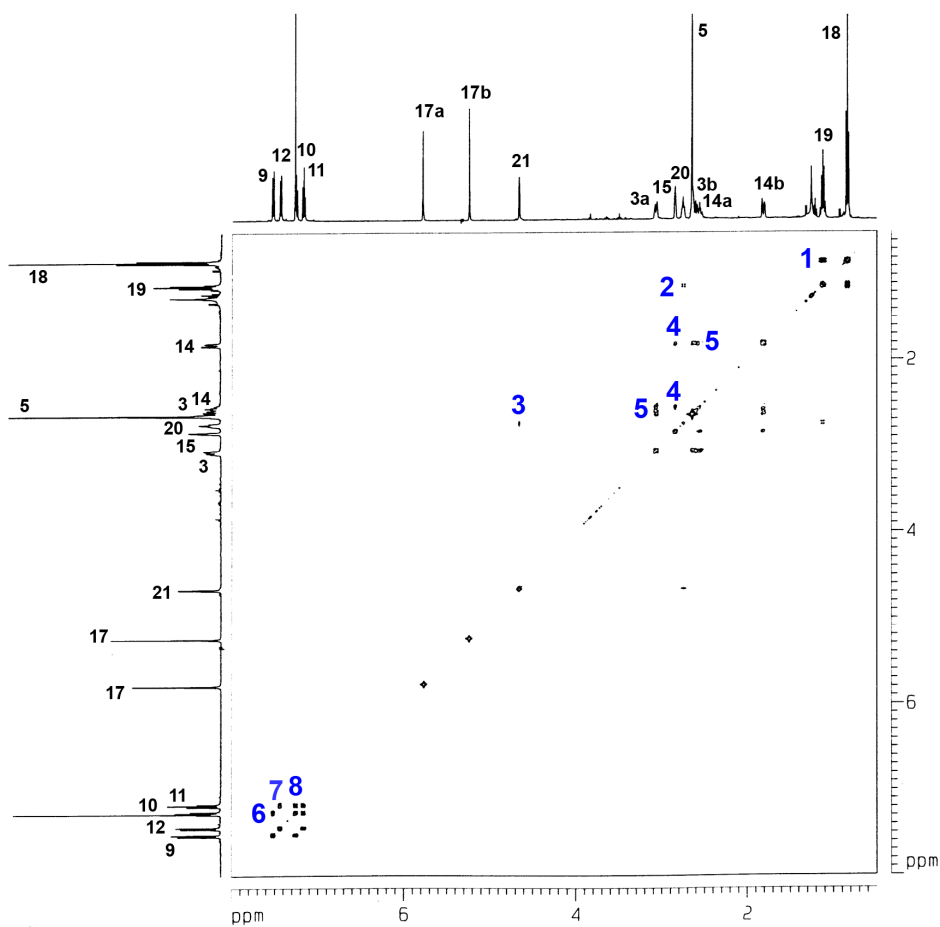


FIGURA 16. Espectro de RMN <sup>13</sup>C de AU1 (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



**FIGURA 17.** Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC editado de AU1 (500/125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), com fase positiva (CH e  $\text{CH}_3$ ) em vermelho e negativa ( $\text{CH}_2$ ) em azul.



**FIGURA 18.** Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -COSY de AU1 (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ). As setas numeradas representam as correlações vicinais observadas e sua numeração corresponde a numeração dos picos observados no espectro.

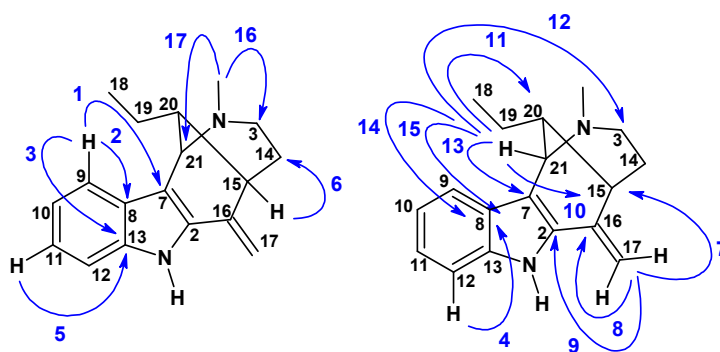
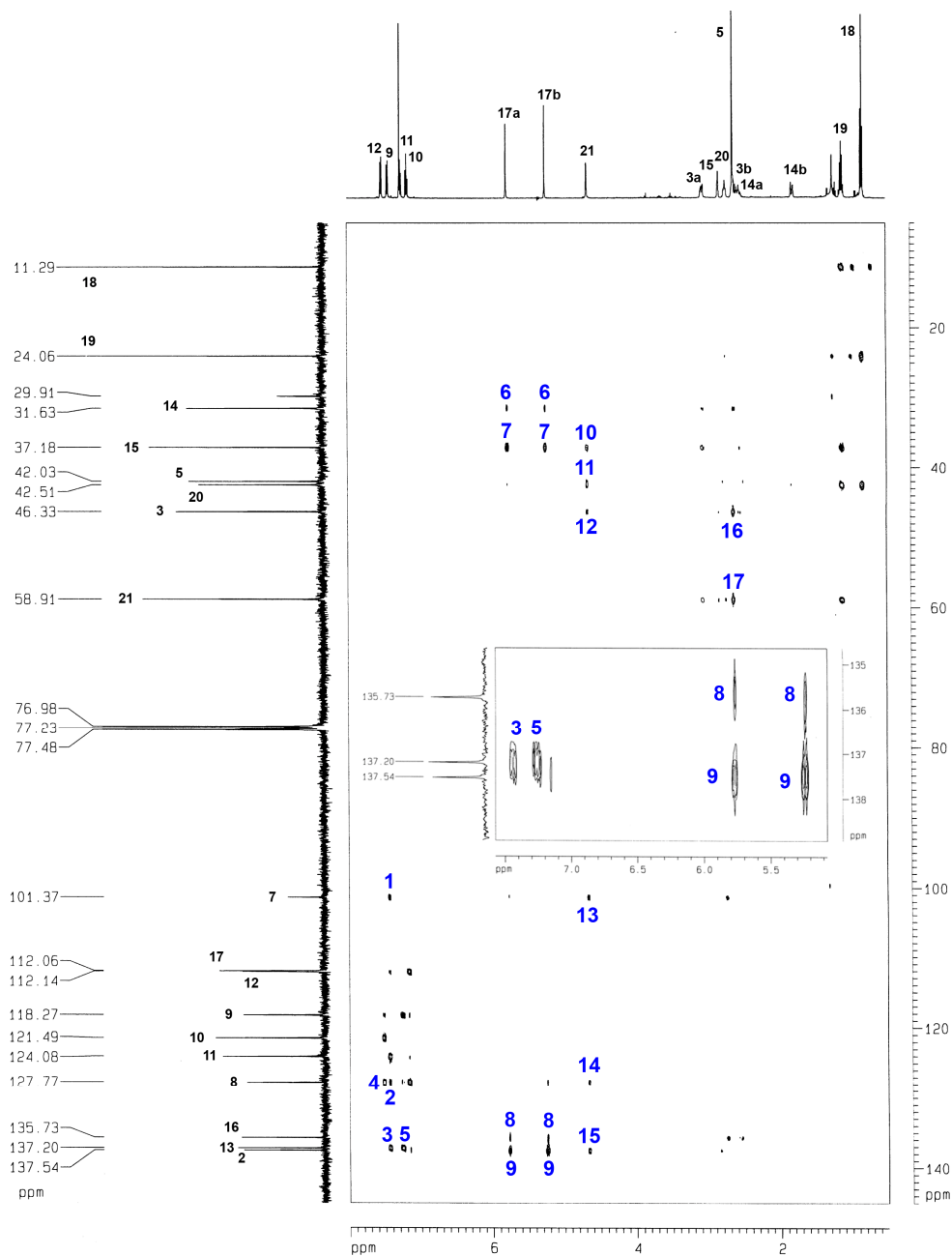
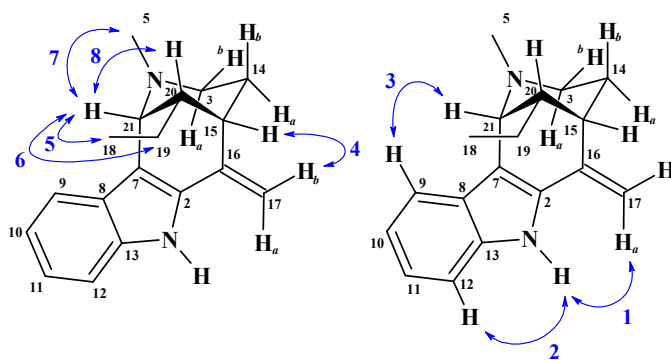
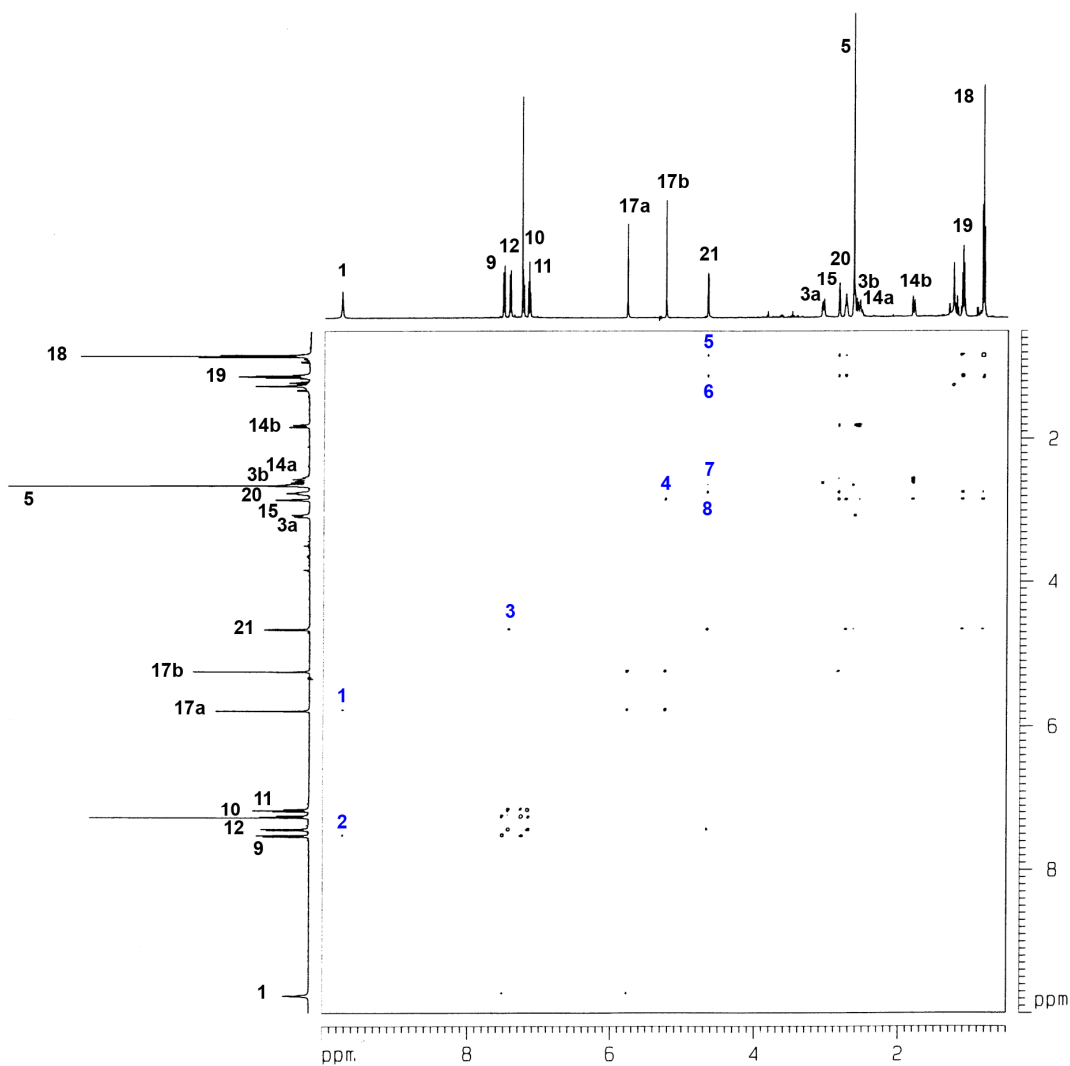


FIGURA 19. Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HMBC DE AU1 (500/125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) e expansão. As setas numeradas representam as principais correlações a longa distância observadas e sua numeração corresponde a numeração dos picos observados no espectro.



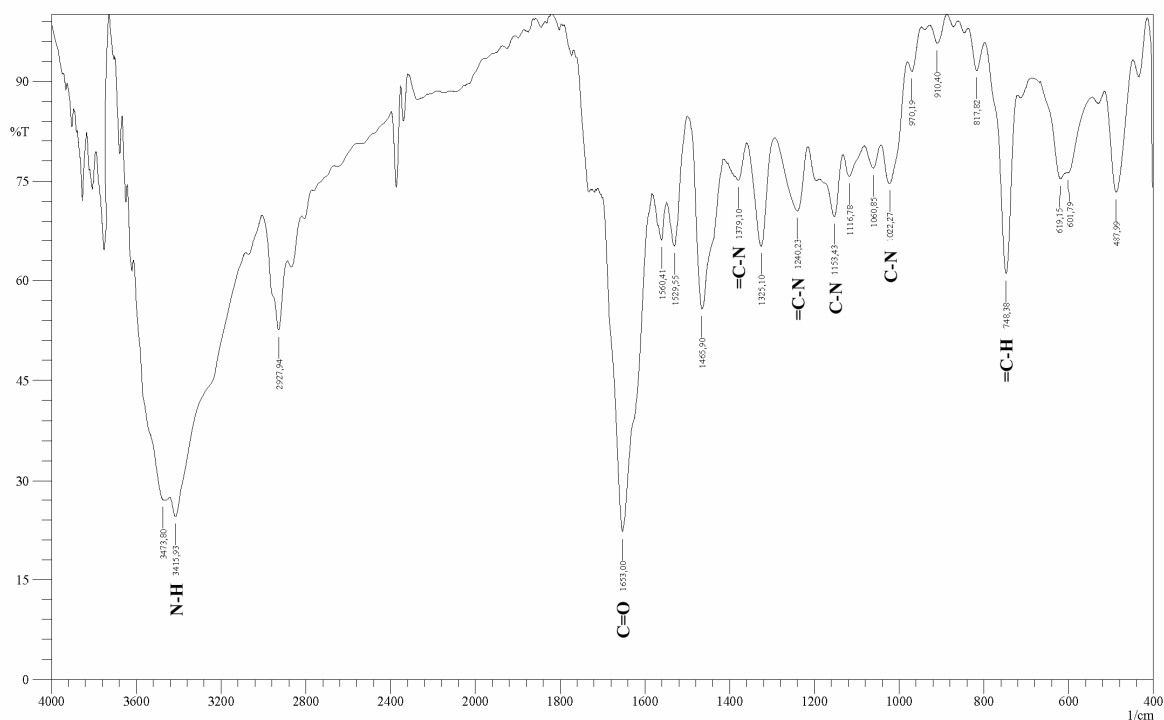


**FIGURA 20.** Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -NOESY de AU1 (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ). As setas numeradas representam as principais correlações dipolares observadas e sua numeração corresponde a numeração dos picos observados no espectro.

### 3.2 Determinação Estrutural de AU2

O fracionamento cromatográfico do extrato etanólico da casca da raiz de *Aspidosperma ulei* permitiu o isolamento de um sólido escuro, de ponto de fusão 150,2-151,6 °C e  $[\alpha]_D^{25} = + 33,3^\circ$  (c 0,33, CH<sub>3</sub>OH), denominado AU2 (ver **Parte Experimental**, pág. 151).

O espectro na região do infravermelho de AU2 (**FIGURA 21**, pág. 66) apresentou absorções correspondentes a vibrações de deformação axial de NH para aminas secundárias aromáticas (3415 cm<sup>-1</sup>) e bandas correspondentes a vibrações de deformação axial de C-N alifático (1153 e 1022 cm<sup>-1</sup>) e aromático (1379 e 1240 cm<sup>-1</sup>), além de bandas correspondentes a deformação angular fora do plano para CH em anéis aromáticos (748 cm<sup>-1</sup>). Observou-se ainda a presença de uma carbonila, possivelmente de cetona  $\alpha,\beta$  insaturada com uma conjugação estendida, devido ao baixo número de onda observado (1653 cm<sup>-1</sup>).



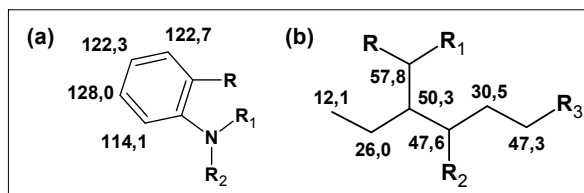
**FIGURA 21.** Espectro na região do infravermelho de AU2.

O espectro de RMN <sup>1</sup>H de AU2 (**FIGURA 22**, pág. 71) apresentou 4 sinais correspondentes a hidrogênios aromáticos em  $\delta_H$  7,75 (1H, d, 7 Hz), 7,48 (1H, d, 7 Hz), 7,35 (1H, dd, 1 e 7 Hz) e 7,17 (1H, dd, 1 e 7 Hz), que evidenciaram a natureza indólica do composto, e dois sinais correspondentes a grupos metilas em  $\delta_H$  2,33 (3H, s) e 0,90 (3H, t, 7 Hz), sendo esse último pertencente a um grupo etila. Outros sinais observados foram:  $\delta_H$  4,42

(1H, d, 2 Hz), 2,64 (1H, m), 2,63 (1H, m), 2,33 (1H, m), 2,15 (1H, m), 2,14 (1H, m), 1,87 (1H, m), 1,28 (2H, m).

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB de AU2 (**FIGURA 23**, pág. 71) apresentou 17 sinais. Através do espectro de RMN 2D HSQC editado de AU2 (**FIGURA 24**, pág. 72) observou-se a existência de quatro carbonos aromáticos monohidrogenados com absorções em  $\delta_{\text{C}}$  128,0 ( $\delta_{\text{H}}$  7,35), 122,7 (7,75), 122,3 (7,16), 114,1 (7,48); três carbonos metínicos em  $\delta_{\text{C}}$  57,8 ( $\delta_{\text{H}}$  4,42), 50,3 (2,33) e 47,6 (2,64); três carbonos metilênicos, em  $\delta_{\text{C}}$  47,3 ( $\delta_{\text{H}}$  2,63 e 2,14), 30,5 (2,15 e 1,87), 26,0 (1,28); e dois carbonos metílicos, em  $\delta_{\text{C}}$  44,1 ( $\delta_{\text{H}}$  2,33) e 12,1 (0,90). Os demais sinais, correspondentes a carbonos não hidrogenados, ausentes no HSQC editado, são  $\delta$  194,1, 140,2, 134,6, 128,8 e 119,5. Entre as absorções observadas, aquelas entre  $\delta_{\text{C}}$  128,0-122,3 e 114,1 correspondem ao sistema indólico identificado anteriormente através do espectro de RMN  $^1\text{H}$ , enquanto a absorção em  $\delta_{\text{C}}$  44,1 ( $\delta_{\text{H}}$  2,33) corresponde, provavelmente, a uma metila nitrogenada.

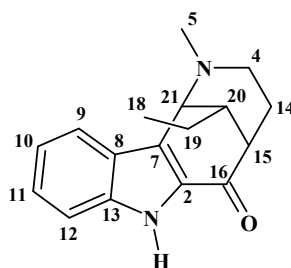
O espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ -COSY (**FIGURA 25**, pág. 73) apresentou poucas correlações, identificando principalmente os acoplamentos do sistema indólico entre  $\delta_{\text{H}}$  7,75-7,17, além de alguns acoplamentos geminais e vicinais, e em conjunto com o espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ -HSQC-TOCSY (**FIGURA 26**, pág. 74) foi possível propor dois grupos de seqüências de hidrogênios na molécula, como segue:  $\delta_{\text{H}}$  0,90 ( $\delta_{\text{C}}$  12,1)  $\delta$  1,28 (26,0)  $\delta$  2,35 (50,3)  $\delta$  4,42 (57,8) e 2,64 (47,6); 2,64/2,15 (47,3)  $\delta$  2,15/1,87 (30,5) e 2,64 (47,6). O **QUADRO 7**, pág. 67, apresenta as subestruturas obtidas a partir dos dados de COSY e HSQC-TOCSY, com a respectiva seqüência de carbonos, enquanto os dados de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  obtidos até o momento estão listados na **TABELA 6**, pág. 68.



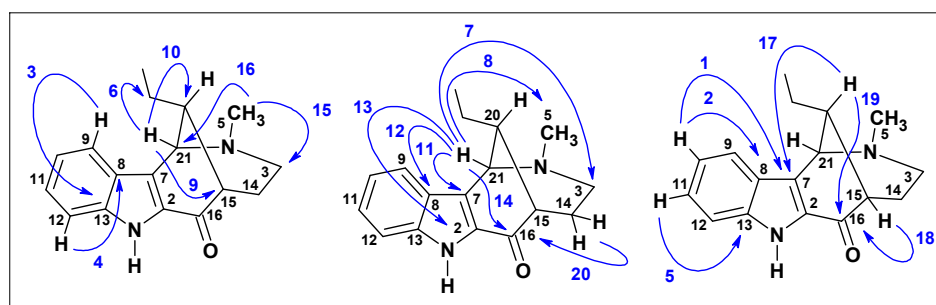
**QUADRO 7.** Subestruturas obtidas através das correlações observadas nos experimentos COSY e HSQC-TOCSY. (a) Sistema indólico; (b) Cadeia saturada.

TABELA 6. Dados de RMN 1D e 2D de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  para AU2, em  $\text{CD}_3\text{OD}$  ( $\delta_{\text{C}}$  49,15 e  $\delta_{\text{H}}$  3,31).

	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (mult, $J$ , 1H)	COSY
2	134,6	---	---
3a	47,3	2,63 (m, 1H)	2,15; 1,87
3b	47,3	2,14 (m, 1H)	2,15
5	44,1	2,33 (s, 3H)	---
7	119,5	---	---
8	128,8	---	---
9	122,7	7,75 (d, 7 Hz, 1H)	7,16
10	122,3	7,16 (ddd, 1 e 7 Hz)	7,75; 7,35
11	128,0	7,35 (ddd, 1 e 7 Hz, 1H)	7,48; 7,16
12	114,1	7,48 (d, 7 Hz, 1H)	7,35
13	140,2	---	---
14a	30,5	2,15 (m, 1H)	2,14
14b	30,5	1,87 (m, 1H)	---
15	47,6	2,64 (m, 1H)	---
16	194,1	---	---
18	12,1	0,90 (t, 7 Hz, 3H)	1,28
19	26,0	1,28 (m, 2H)	2,33; 0,90
20	50,3	2,33 (m, 1H)	1,28
21	57,8	4,42 (d, 2 Hz, 1H)	---



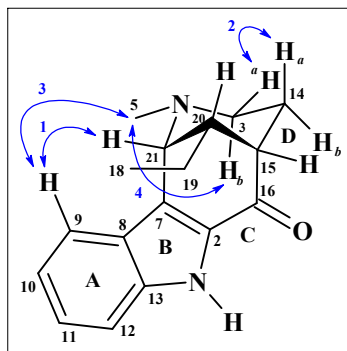
O espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HMBC (FIGURA 27, pág. 75) permitiu o assinalamento inequívoco e a conexão das duas subestruturas obtidas anteriormente (ver QUADRO 7, pág. 67). Através das correlações  $^3J_{\text{CH}}$  dos hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  4,42 com os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  26,0 (6), 44,1 (8), 47,3 (7), 47,6 (9), 50,3 (10), 128,8 (12) e 134,6 (13); e dos hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  2,33 com  $\delta_{\text{C}}$  47,3 e 57,8; e  $\delta_{\text{H}}$  7,75 ( $\delta_{\text{C}}$  122,7) com  $\delta_{\text{C}}$  119,5, além das correlações  $^2J_{\text{CH}}$  dos hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  4,48 com  $\delta_{\text{C}}$  50,3 e 119,5,  $\delta_{\text{H}}$  7,75 com  $\delta_{\text{C}}$  128,8; e de  $\delta_{\text{H}}$  2,33 ( $\delta_{\text{C}}$  50,3) com  $\delta_{\text{C}}$  194,1, foi possível propor a estrutura do QUADRO 8, pág. 69, para AU2.



QUADRO 8. Correlações observadas no espectro HMBC para AU2.

Comparação dos dados de RMN de AU2 com aqueles obtidos para AU1 e dados da literatura (TABELA 7, pág. 70), mostraram que AU2 deve tratar-se de um dos epímeros do alcalóide **dasicarpidona**, possivelmente o epímero 20*S* ( $[\alpha]_D^{25} = +64,7^\circ$ ,  $c$  1,02 (Joule, 1965)), devido ao deslocamento químico observado para a metila C-18 em  $\delta_H$  0,90, como justificado para AU1 (Buchi, G.; Gould, S. J.; Naf, F 1971).

Através dos espectros de RMN 1D  $^1H$  NOE seletivo (SELNOE) (FIGURA 28, pág. 76) foram obtidas algumas interações dipolares para AU2, pela irradiação seletiva dos hidrogênios em  $\delta_H$  4,48 (H-21), 2,64/2,63 (H-3a/H-15) e 2,33 (H-5/H-20). As principais interações observadas para cada hidrogênio irradiado foram: H-21: 3H-5/H-20 (2,94 %) e H-9 (0,88 %); H-3a/H-15: H-14b (1,03 %), 3H-5/H-20 (1,38 %) e H-3b/H-14a (5,63 %); 3H-5/H-20: H-9 (0,50 %), H-3b/H-14a (0,88 %), H-21 (1,02 %) e H-3a/H-15 (0,85 %). Os valores de  $nOe$  observados entre 3H-5 e H-9 (3) indicam que o grupo metila em N-4, está equatorial, enquanto a observação de interação dipolar entre H-15 e H-14b (2), e H-20 e H-14a (4), possibilita propor uma conformação em cadeira para o anel D de AU2 (QUADRO 9, pág. 70), semelhante aquela observada para AU1. O grupo etila em C-20 também se posiciona em equatorial, de acordo com o deslocamento químico dos hidrogênios da metila C-18, decorrente do efeito anisotrópico do sistema indólico sobre esses hidrogênios (Buchi, G.; Gould, S. J.; Naf, F 1971).

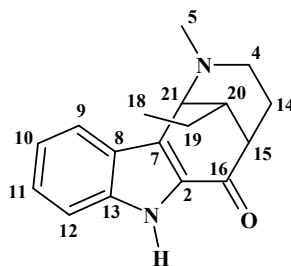


QUADRO 9. Principais correlações dipolares observadas através do SELNOE para AU2.

TABELA 7. Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  de AU2 e AU1 em comparação com dados da literatura.

	AU2		AU1		Literatura	
	$\delta_{\text{C}}^1$	$\delta_{\text{H}}^1$	$\delta_{\text{C}}^1$	$\delta_{\text{H}}^1$	$\delta_{\text{C}}^2$	$\delta_{\text{H}}^2$
2	134,6	---	139,2	---	132,9	---
3	47,3	2,63 2,14	47,5	3,12 2,72	46,0	2,63 2,09-2,20
5	44,1	2,33	42,3	2,72	44,0	2,35
7	119,5	---	101,5	---	122,0	---
8	128,8	---	129,1	---	127,8	---
9	122,7	7,75	119,4	7,63	119,9	7,70
10	122,3	7,16	122,0	7,13	121,1	7,21
11	128,0	7,35	124,7	7,22	126,9	7,40
12	114,1	7,48	112,9	7,44	112,7	7,48
13	140,2	---	139,1	---	138,1	---
14	30,5	2,15 1,87	33,1	2,27 1,92	30,1	2,09-2,20 1,92
15	47,6	2,64	38,7	2,91	46,3	2,62
16	194,1	---	137,4	---	193,5	---
17	---	---	112,7	5,80 5,29	---	---
18	12,1	0,90	11,7	0,92	11,8	0,82
19	26,0	1,28	25,1	1,18	24,8	1,30
20	50,3	2,33	45,0	2,27	49,6	2,35
21	57,8	4,42	60,4	4,80	56,2	4,33

<sup>1</sup> CD<sub>3</sub>OD ( $\delta_{\text{C}}$  49,15,  $^{13}\text{C}$ @125 MHz); <sup>2</sup> Gràcia, J. *et al.* 1994 (CD<sub>3</sub>OD;  $^{13}\text{C}$ @125 MHz).



Dessa forma, no melhor do nosso conhecimento é possível assegurar que AU2 trata-se de (+)-20S-dasicarpidona, um alcalóide pela primeira vez relatado na espécie.

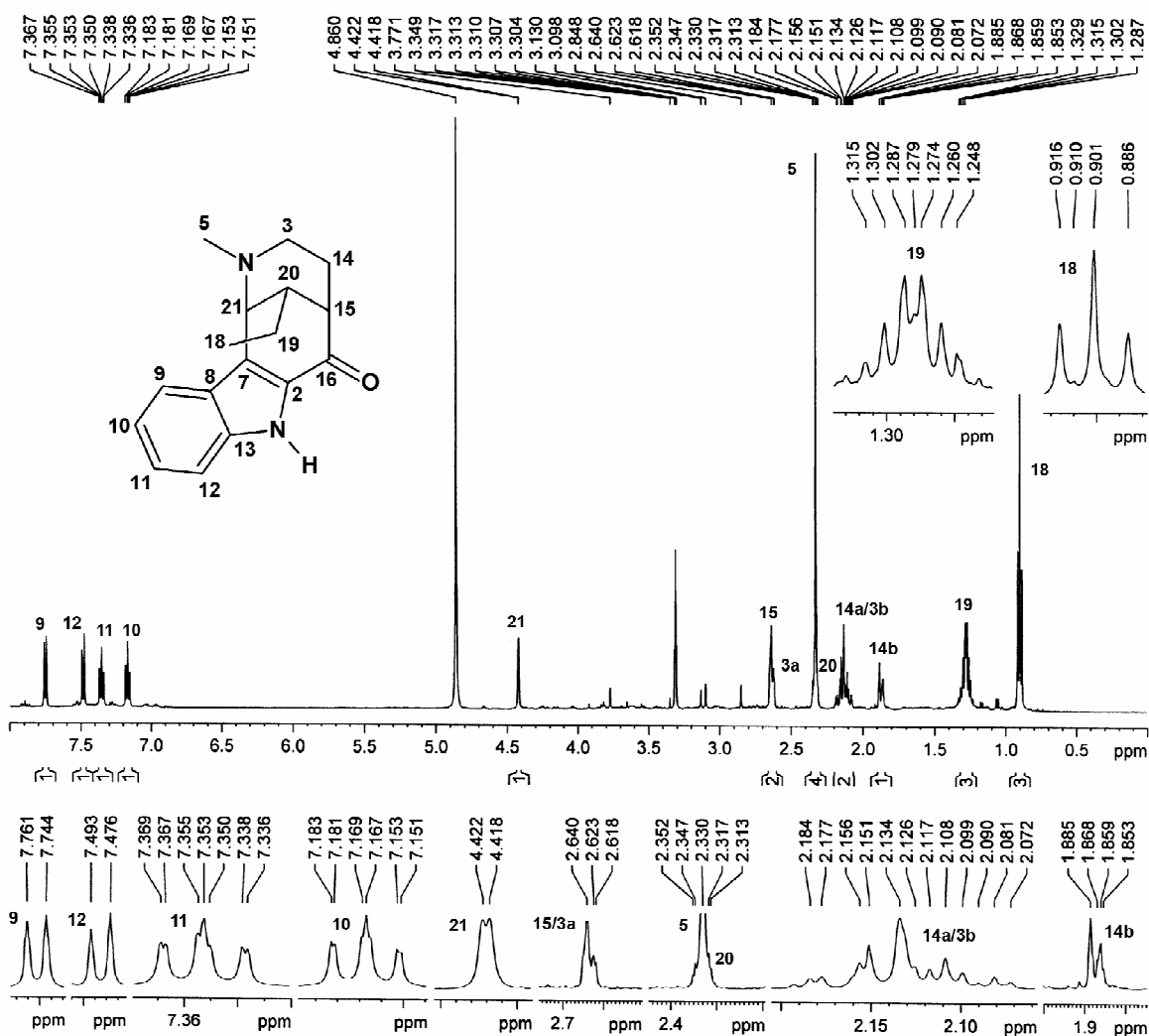


FIGURA 22. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de AU2 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) e expansões.

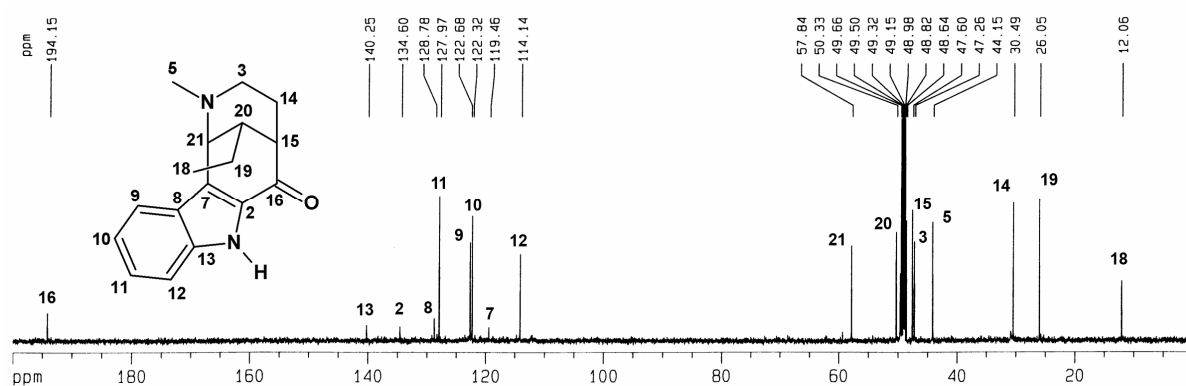


FIGURA 23. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de AU2 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz).

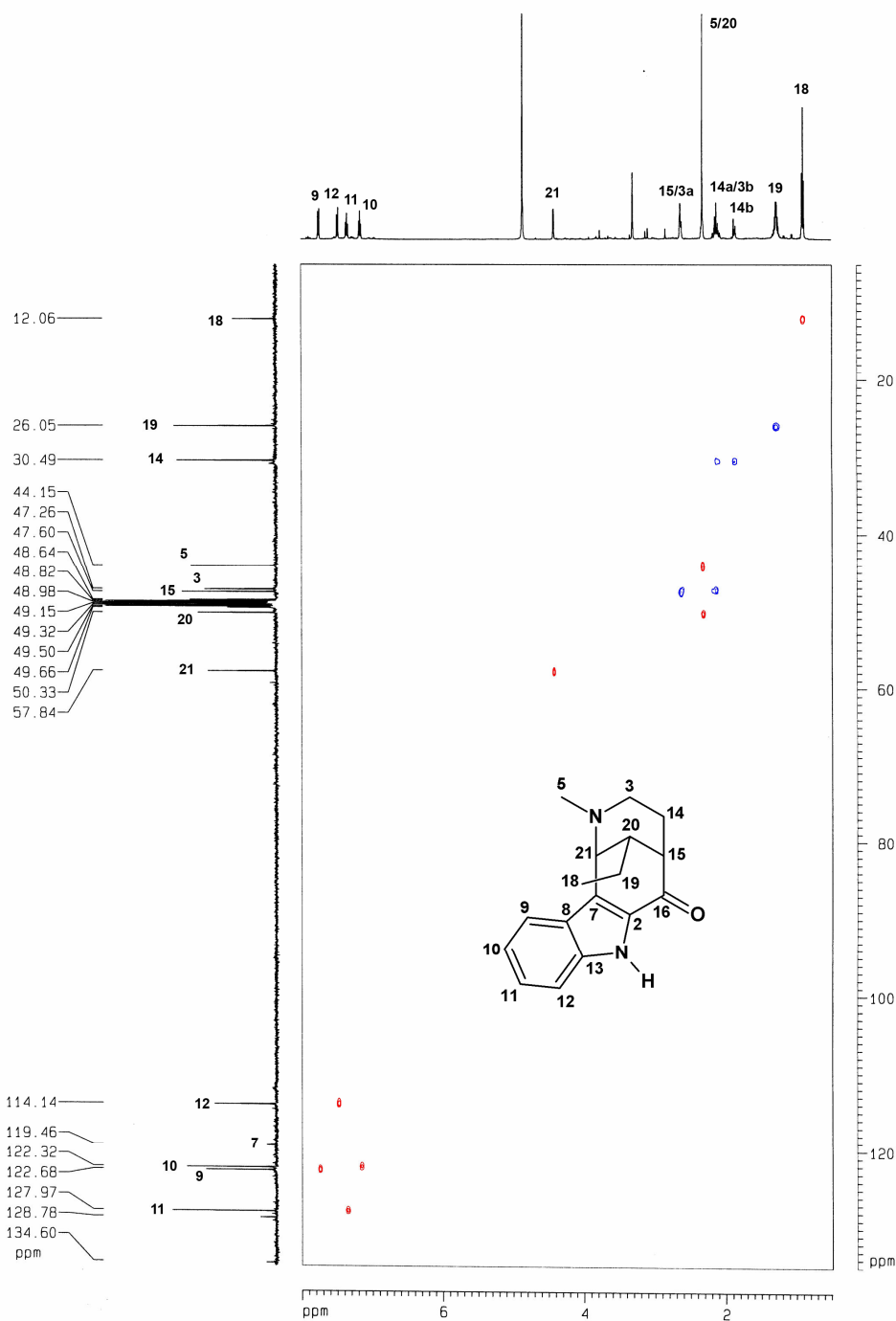
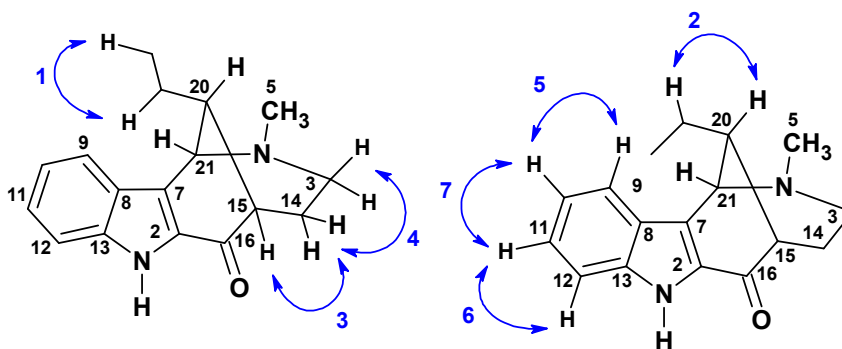
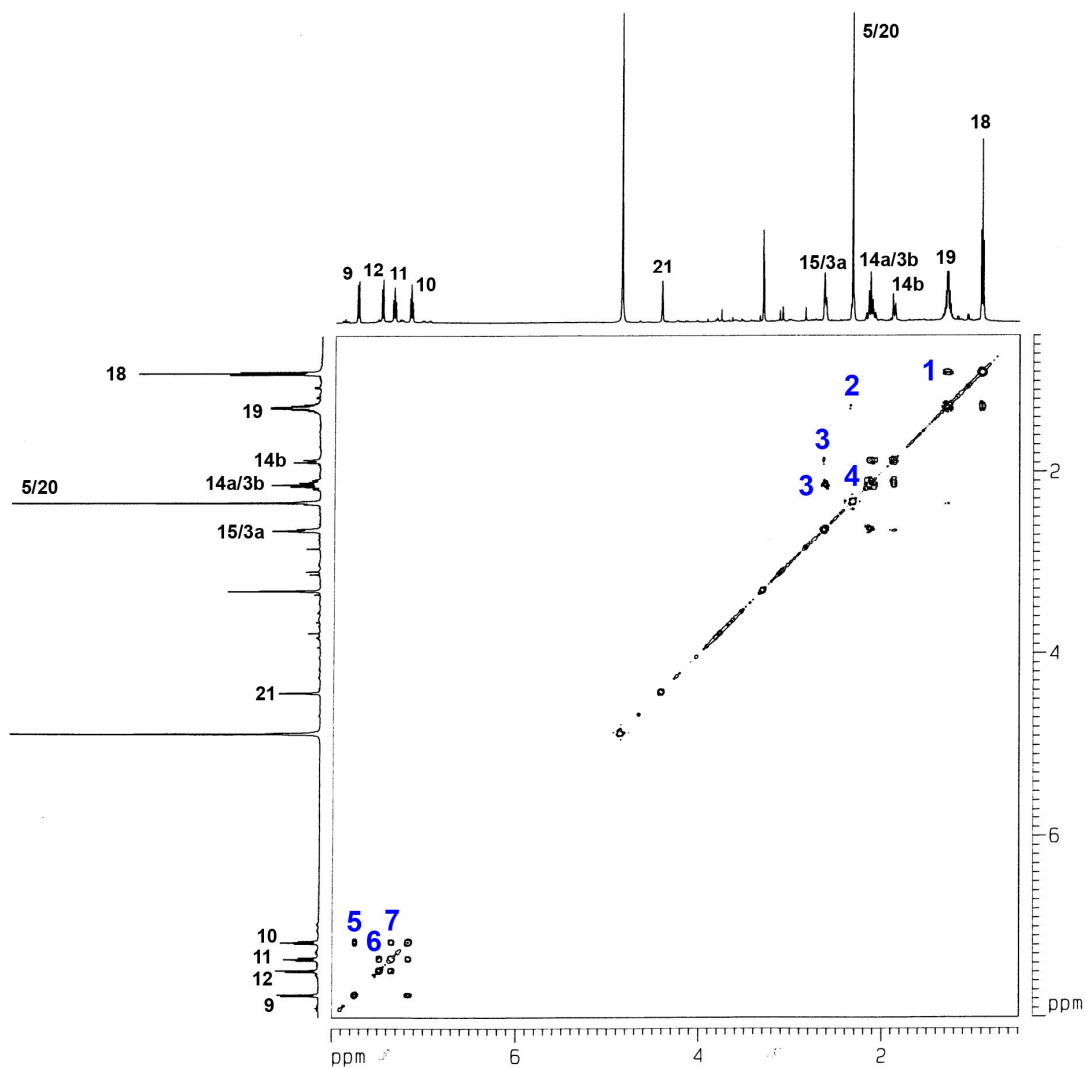


FIGURA 24. Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC editado de AU2 (500/125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ), com fase positiva (CH e  $\text{CH}_3$ ) em vermelho e negativa ( $\text{CH}_2$ ) em azul.





**FIGURA 25.** Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -COSY de AU2 (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ). As setas numeradas representam as correlações vicinais observadas e sua numeração corresponde a numeração dos picos observados no espectro.

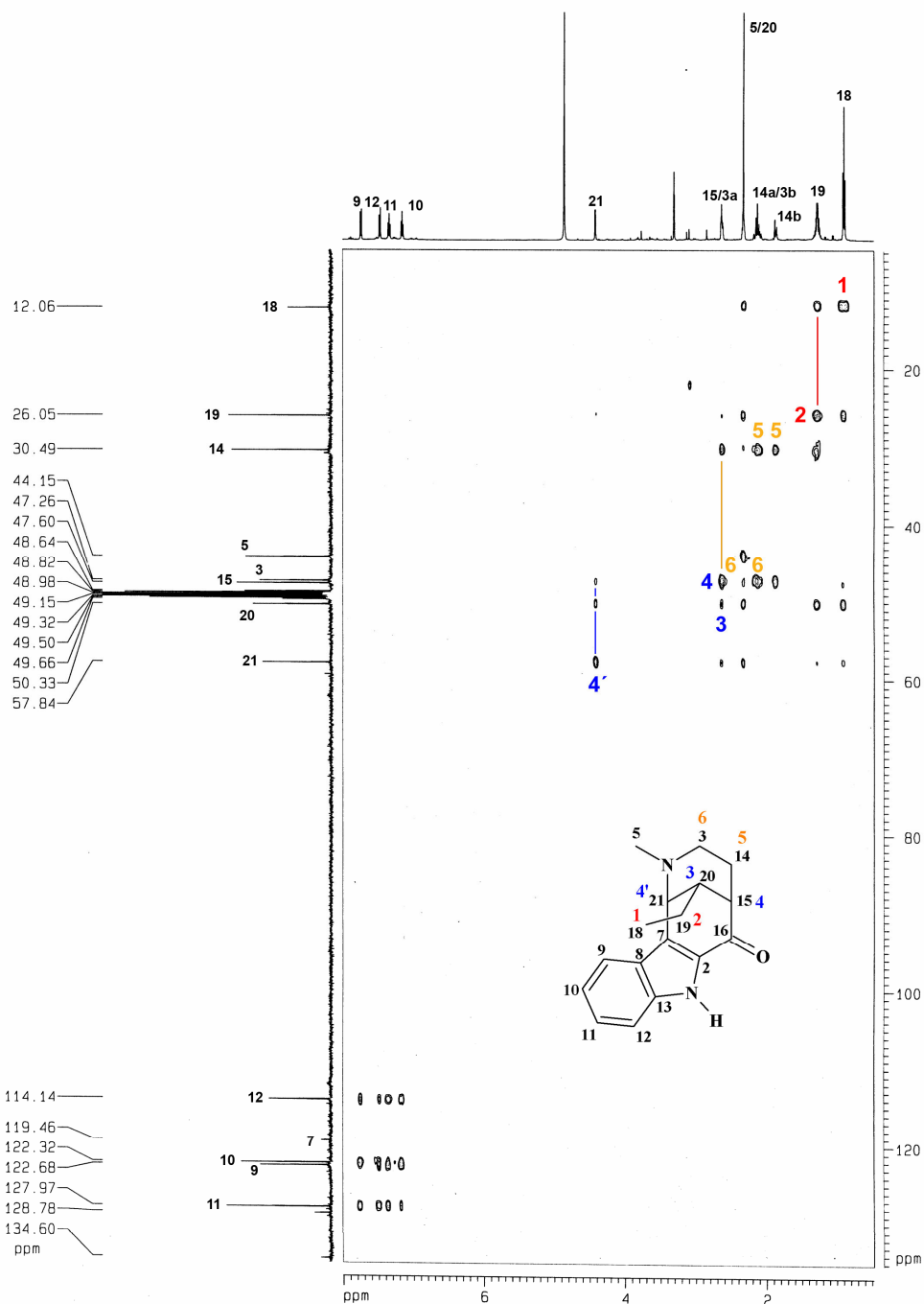
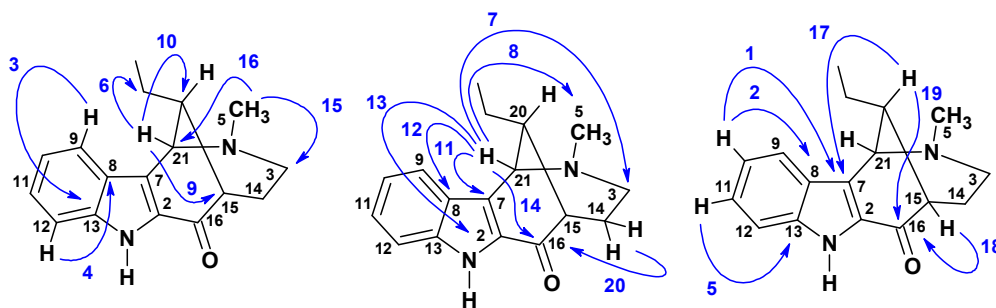
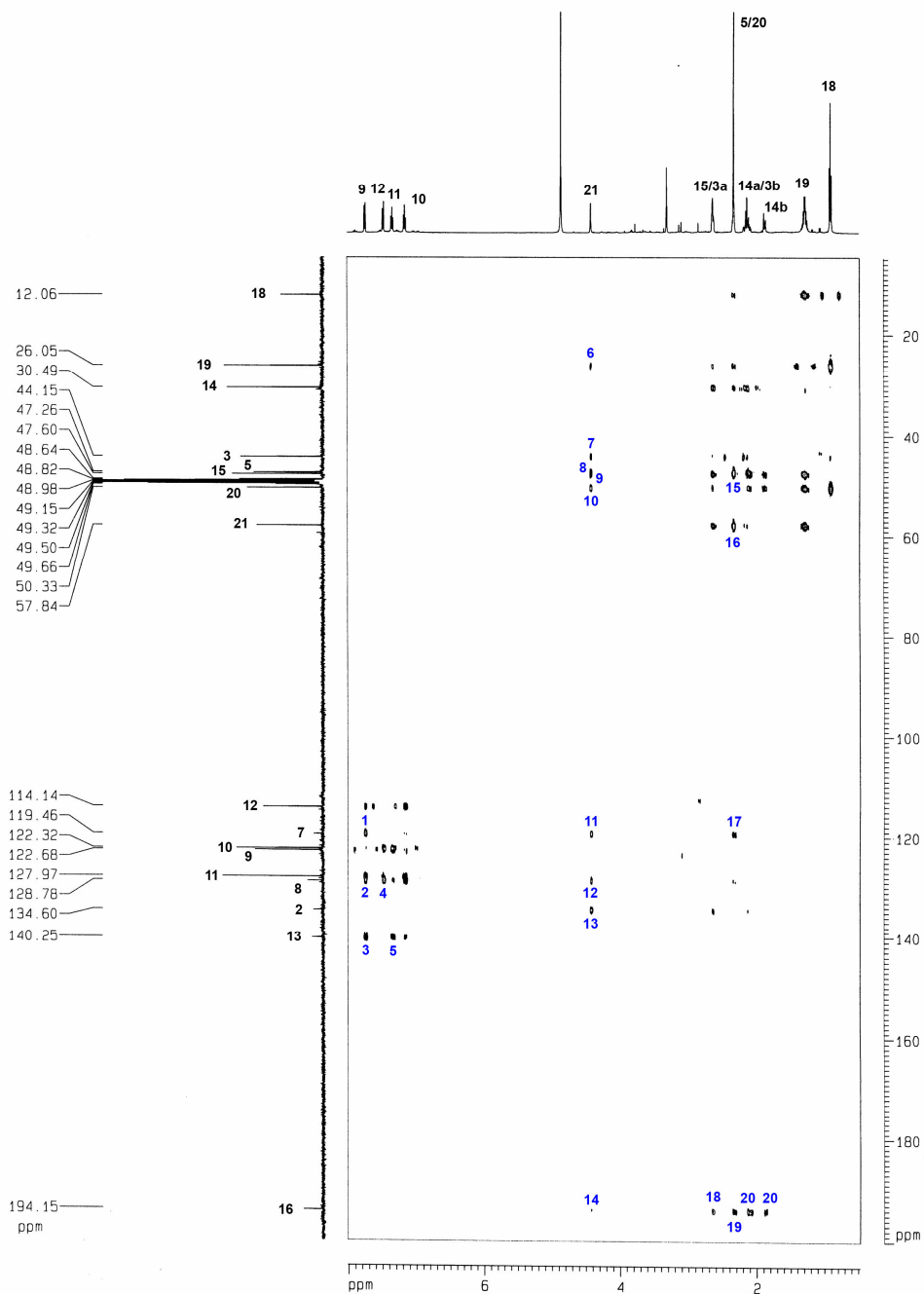
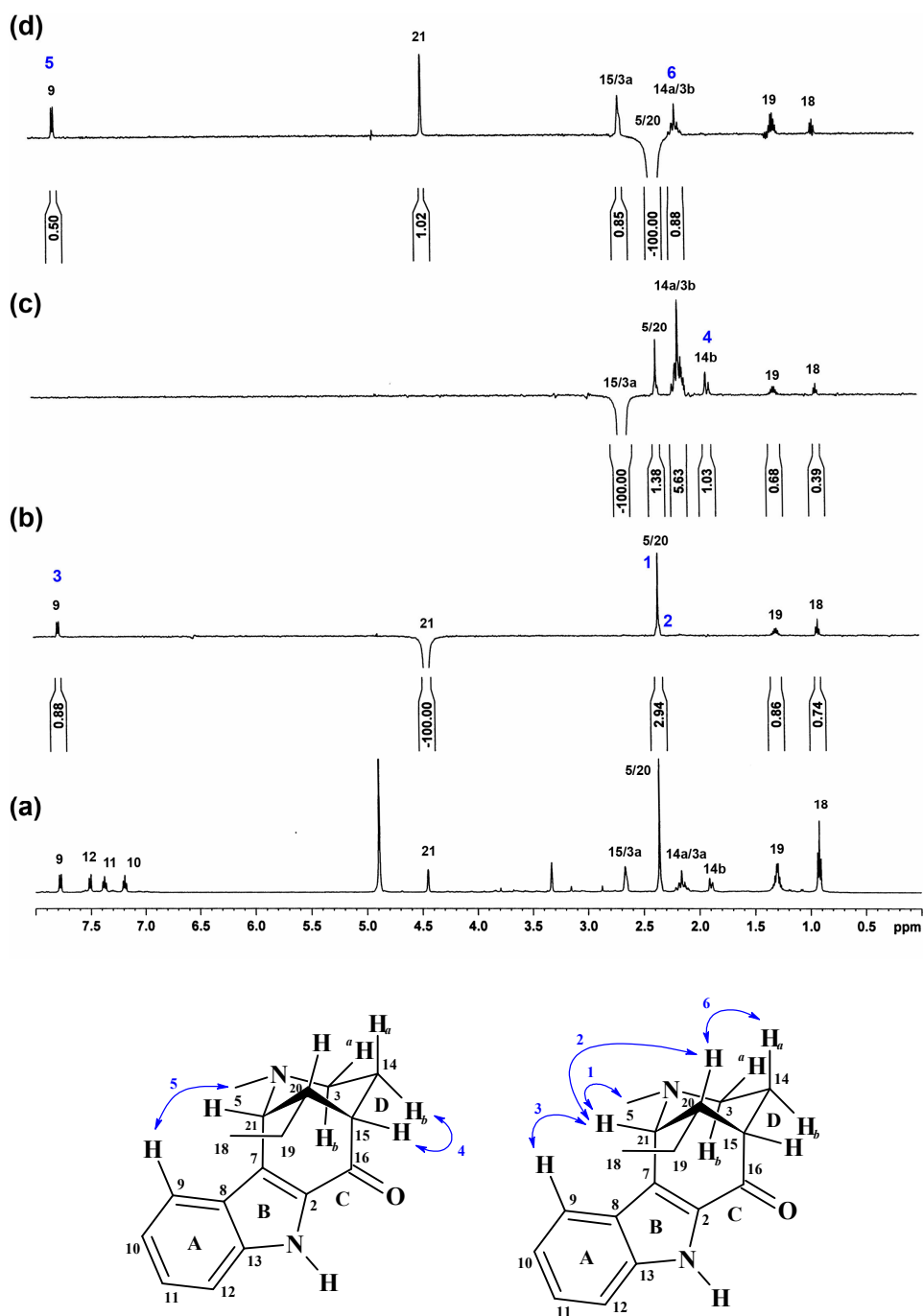


FIGURA 26. Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC-TOCSY de AU2 (500/125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ). A numeração colorida na estrutura e espectro indica a seqüência observada para os hidrogênios.



**FIGURA 27.** Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HMBC (500/125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de AU2. As setas numeradas representam as principais correlações a longa distância observadas e sua numeração corresponde a numeração dos picos observados no espectro.

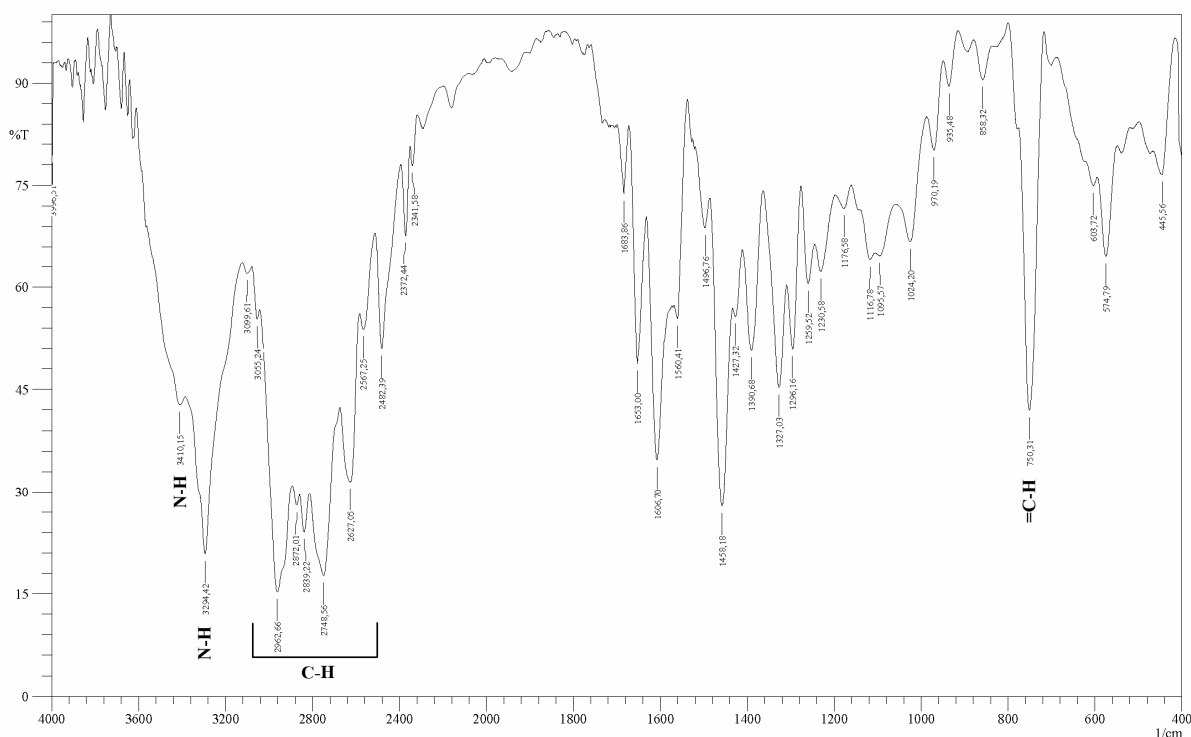


**FIGURA 28.** Espectros de RMN 1D  ${}^1\text{H}$  (a) não irradiado e RMN 1D  ${}^1\text{H}$ ,  ${}^1\text{H}$ -SELNO irradiado em (b)  $\delta_{\text{H}}$  4,42 (H21); (c)  $\delta_{\text{H}}$  2,64 (H3a/H15); e (d)  $\delta_{\text{H}}$  2,33 (H5/H20), de AU2 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz). As setas numeradas representam as principais correlações dipolares observadas e sua numeração corresponde a numeração dos picos observados no espectro.

### 3.3 Determinação Estrutural de AU3

O fracionamento cromatográfico do extrato etanólico da casca da raiz de *Aspidosperma ulei* permitiu o isolamento de um sólido claro, de ponto de fusão 280,6-282,3 °C e  $[\alpha]_D^{25} = -26,7^\circ$  (c 0,33, CH<sub>3</sub>OH), denominado AU3 (ver **Parte Experimental**, pág. 151).

O espectro na região do infravermelho de AU3 (**FIGURA 29**, pág. 77) apresentou absorções correspondentes a vibrações de deformação axial de NH para aminas secundárias aromáticas (3410 cm<sup>-1</sup>), deformação axial de NH alifático (3294 cm<sup>-1</sup>) e diversas bandas correspondentes a vibrações de deformação axial de C-H alifático (2962-2627 cm<sup>-1</sup>) de grupamentos metilas e metilênicos. Além disso, apresentou bandas correspondentes a deformação angular fora do plano para CH em anéis aromáticos (750 cm<sup>-1</sup>).



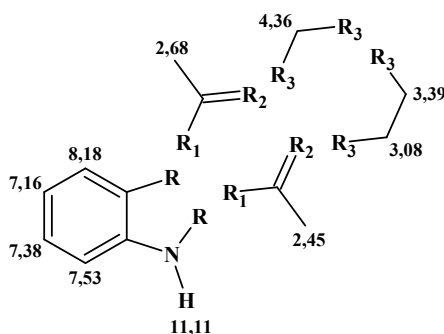
**FIGURA 29.** Espectro na região do infravermelho de AU3.

O espectro de RMN 1D de hidrogênio de AU3 (**FIGURA 30**, pág. 81) apresentou sinais em  $\delta_H$  8,18 (1H, d, 2 Hz), 7,53 (1H, d, 8 Hz), 7,38 (1H, t, 8 Hz) e 7,16 (1H, t, 8 Hz), possibilitando identificar a natureza indólica de AU3, além de um sinal em  $\delta_H$  11,11 (1H, sl), correspondente ao hidrogênio do nitrogênio do grupo indólico. Os sinais observados em  $\delta_H$  4,36 (2H, s), 3,39 (2H, t, 6 Hz), 3,08 (2H, t, 6Hz) foram correlacionados a hidrogênios metilênicos, enquanto os sinais em  $\delta_H$  2,45 (3H, s) e 2,68 (2H, s) correspondem a dois

grupamentos metila ligados a anéis aromáticos.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB de AU3 (**FIGURA 31**, pág. 81) apresentou 17 sinais e por comparação com o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT135 (**FIGURA 31**, pág. 81) permitiu identificar quatro sinais correspondentes a carbonos aromáticos monohidrogenados em  $\delta_{\text{C}}$  124,6, 122,0, 118,3 e 110,7; três sinais correspondentes a carbonos metilênicos em  $\delta_{\text{C}}$  42,4, 40,2 e 23,2; dois sinais para carbonos metílicos ( $\delta_{\text{C}}$  14,8 e 12,5), além de oito carbonos não hidrogenados em  $\delta_{\text{C}}$  140,2, 138,4, 127,4, 126,4, 122,9, 119,4, 117,3 e 114,9, ausentes no espectro RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT135. Com o auxílio do espectro de RMN 2D  $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC (**FIGURA 32**, pág. 82) foi possível identificar cada par de carbono-hidrogênio na molécula, como segue:  $\delta_{\text{C}}$  124,6 ( $\delta_{\text{H}}$  7,38), 122,0 (8,18), 118,3 (7,16), 42,4 (4,36), 40,2 (3,39), 23,2 (3,08), 14,8 (2,68) e 12,5 (2,45).

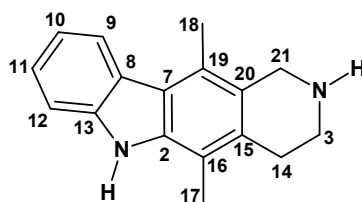
Através dos espectros de RMN 2D  $^1\text{H},^1\text{H}$ -COSY e RMN 2D  $^1\text{H},^1\text{H}$ -NOESY de AU3 (**FIGURA 33**, pág. 83) foi possível assinalar as correlações escalares dos hidrogênios aromáticos, além do acoplamento escalar entre os hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  3,39 e 3,08. As interações dipolares observadas para AU3, mostram acoplamento entre os hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  8,18 com  $\delta_{\text{H}}$  2,68, 2,68 com 4,36, 4,36 com 3,39; e  $\delta_{\text{H}}$  7,53 com  $\delta_{\text{H}}$  11,11, 11,11 com 2,45, e 2,45 com 3,08. Com esses dados atribuiu-se a seqüência de todos os hidrogênios em AU3, como  $\delta_{\text{H}}$  8,18  $\leftrightarrow$  2,68  $\leftrightarrow$  4,36  $\leftrightarrow$  (3,39  $\leftrightarrow$  3,08)  $\leftrightarrow$  2,45  $\leftrightarrow$  11,11  $\leftrightarrow$  (7,53  $\leftrightarrow$  7,38  $\leftrightarrow$  7,16  $\leftrightarrow$  8,18), onde os parênteses representam correlação escalar entre aqueles hidrogênios. O **QUADRO 10**, pág. 78, apresenta as subestruturas obtidas através desses dados. Os dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  obtidos encontram-se listados na **TABELA 8**, pág. 79.



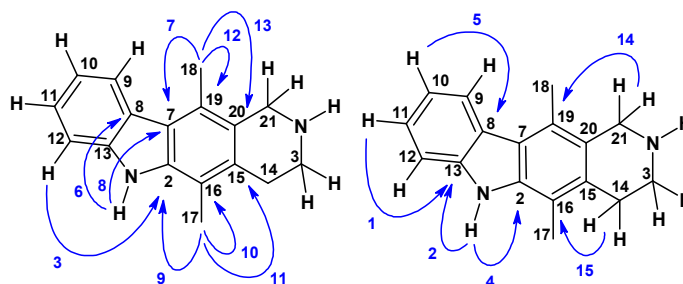
**QUADRO 10.** Subestruturas obtidas a partir dos dados de RMN 1D e 2D para AU3.

**TABELA 8.** Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para AU3, obtidos a partir dos espectros RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (BB e DEPT135), HSQC, COSY e NOESY, em DMSO ( $\delta_{\text{C}}$  39,51 e  $\delta_{\text{H}}$  2,51).

	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (mult, J, Int)	COSY ( $\delta_{\text{H}}$ )	NOESY ( $\delta_{\text{H}}$ )
<b>1</b>	---	11,11 (s)	---	7,53; 2,45
<b>2</b>	138,4	---	---	---
<b>3</b>	40,2	3.39 (t, 6 Hz, 2H)	3,08	4,36
<b>7</b>	119,4	---	---	---
<b>8</b>	122,9	---	---	---
<b>9</b>	122,0	8,18 (d, 8 Hz, 1H)	7,16	2,68
<b>10</b>	118,3	7,16 (t, 7 Hz, 1H)	8,18; 7,38	---
<b>11</b>	124,6	7,38 (t, 7 Hz, 1H)	7,53; 7,16	---
<b>12</b>	110,7	7,53 (d, 8 Hz, 1H)	7,38	11,11
<b>13</b>	140,2	---	---	---
<b>14</b>	23,2	3.08 (t, 6 Hz, 2H)	3,39	2,45
<b>15</b>	114,9	---	---	---
<b>16</b>	127,4	---	---	---
<b>17</b>	12,5	2,45 (s, 3H)	---	11,11; 3,08
<b>18</b>	14,8	2,68 (s, 3H)	---	8,18; 4,36
<b>19</b>	126,4	---	---	---
<b>20</b>	117,3	---	---	---
<b>21</b>	42,4	4,36 (s, 2H)	---	3,39; 2,68



O espectro de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HMBC de AU3 (**FIGURA 34**, pág. 84) forneceu a completa atribuição da posição dos carbonos não hidrogenados através dos acoplamentos entre os hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  2,45 (3H-17) com  $\delta_{\text{C}}$  114,9 (C-15, 11), 127,4 (C-16, 10) e 138,4 (C-2, 9);  $\delta_{\text{H}}$  2,68 (3H-18) com  $\delta_{\text{C}}$  117,3 (C-20, 13), 126,4 (C-19, 12) e 119,4 (C-7, 7);  $\delta_{\text{H}}$  3,08 (2H-14) com  $\delta_{\text{C}}$  127,4 (C-16, 15);  $\delta_{\text{H}}$  7,16 com  $\delta_{\text{C}}$  122,9;  $\delta_{\text{H}}$  7,38 (H-11) com  $\delta_{\text{C}}$  140,2 (C-13, 1);  $\delta_{\text{H}}$  11,11 (H-1) com  $\delta_{\text{C}}$  138,4 (C-2, 4), 119,4 (C-7, 8), 122,9 (C-8, 6) e 140,2 (C-13, 2), permitindo propor a estrutura do **QUADRO 11**, pág. 79, para AU3.

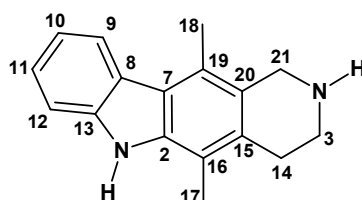

**QUADRO 11.** Proposta estrutural e dados do HMBC para AU3.

O nitrogênio na posição 4 de AU3 foi assegurado pelos deslocamentos químicos observados para os hidrogênios, e seus carbonos, em  $\delta_H$  4,36 ( $\delta_C$  42,4, C-21) e 3,39 ( $\delta_C$  40,2, C-3), um forte indicativo de um nitrogênio naquela posição, de acordo com o deslocamento químico esperado para esses tipos de núclídeos (Silverstein, R. M.; Webster, F. X., 2000).

**TABELA 9.** Comparação dos dados de RMN  $^{13}C$  e  $^1H$  de AU3 e dados da literatura (Ishikura, M. *et al.* 2000).

	AU3		Literatura	
	$\delta_C^a$	$\delta_H^a$	$\delta_C^b$	$\delta_C^b$
<b>13</b>	140,2	---	139,8	---
<b>2</b>	138,4	---	137,7	---
<b>16</b>	127,4	---	130,8	---
<b>19</b>	126,4	---	126,7	---
<b>11</b>	124,6	7,38	125,5	7,37
<b>8</b>	122,9	---	124,7	---
<b>9</b>	122,0	8,18	124,6	8,20
<b>7</b>	119,4	---	122,6	---
<b>10</b>	118,3	7,16	119,8	7,20
<b>20</b>	117,3	---	119,1	---
<b>15</b>	114,9	---	114,7	---
<b>12</b>	110,7	7,53	110,3	7,41
<b>21</b>	42,4	4,36	47,1	4,19
<b>3</b>	40,2	3,39	43,8	3,20
<b>14</b>	23,2	3,08	28,0	2,88
<b>18</b>	14,8	2,68	15,0	2,70
<b>17</b>	12,5	2,45	12,5	2,39

<sup>a</sup> DMSO ( $\delta_C$  39,51;  $\delta_H$  2,51); <sup>b</sup> CDCl<sub>3</sub> ( $\delta_C$  77,23;  $\delta_H$  7,22)



Pesquisa no SciFinder Scholar v2006 do Chemical Abstract mostrou que AU3 deve tratar-se de 3,4,14,21-tetra-hidro-elíptica, isolada anteriormente a partir de *Pterotaberna inconspícua* (Morfaux, A. M. *et al.* 1982) e *Ochrosia balansae* (Bruneton, J.; Cave, A. 1972), além de ter sido obtido como intermediário na síntese da elíptica (Ishikura, M. *et al.* 2000). Os dados de RMN  $^{13}C$  e  $^1H$  de AU3 em comparação com os dados da literatura encontram-se listados na TABELA 9, pág. 80. Os valores observados para  $\delta_C$  da literatura apresentam estreita semelhança, com leves variações devido ao efeito do solvente.

No melhor do nosso conhecimento, AU3 trata-se de 16,19-dimetil-3,5,14,21-tetra-hidro-elíptica, pela primeira vez relatada para a espécie.



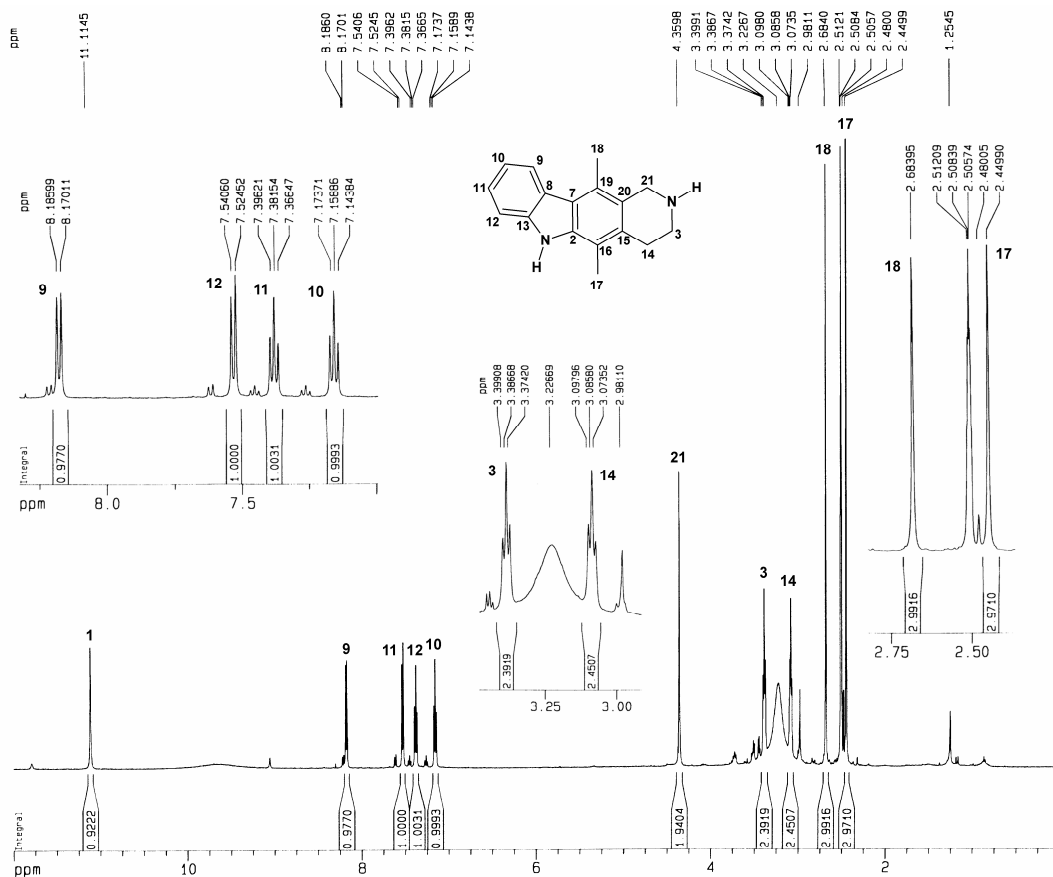


FIGURA 30. Espectro de RMN <sup>1</sup>H de AU3 (500 MHz, (CD<sup>3</sup>)<sub>2</sub>SO) e expansões.

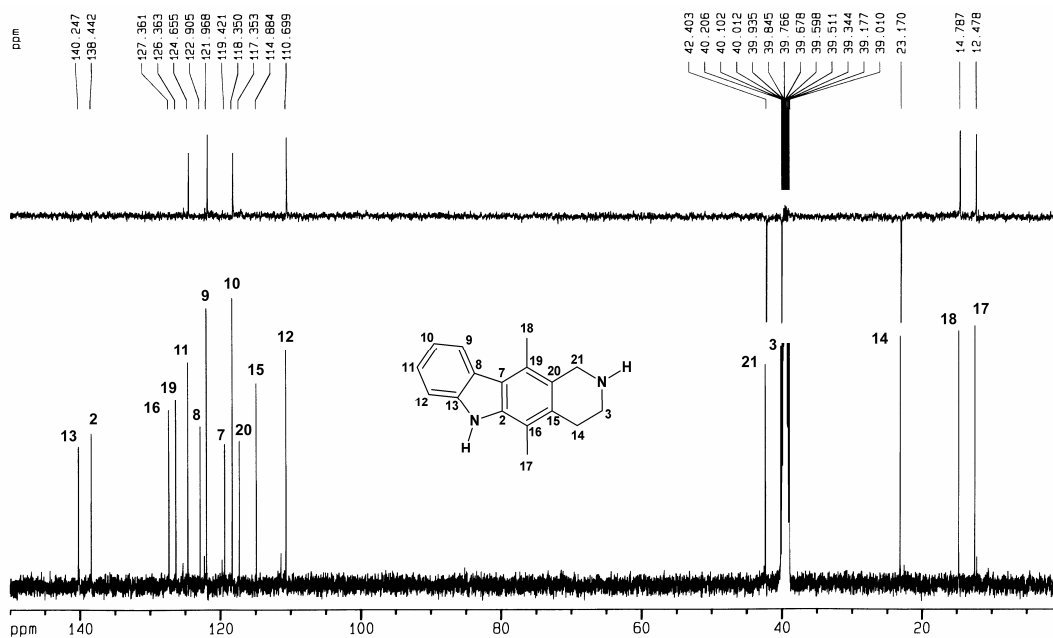


FIGURA 31. Espectro de RMN <sup>13</sup>C (BB e DEPT135) de AU3 (125 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO).

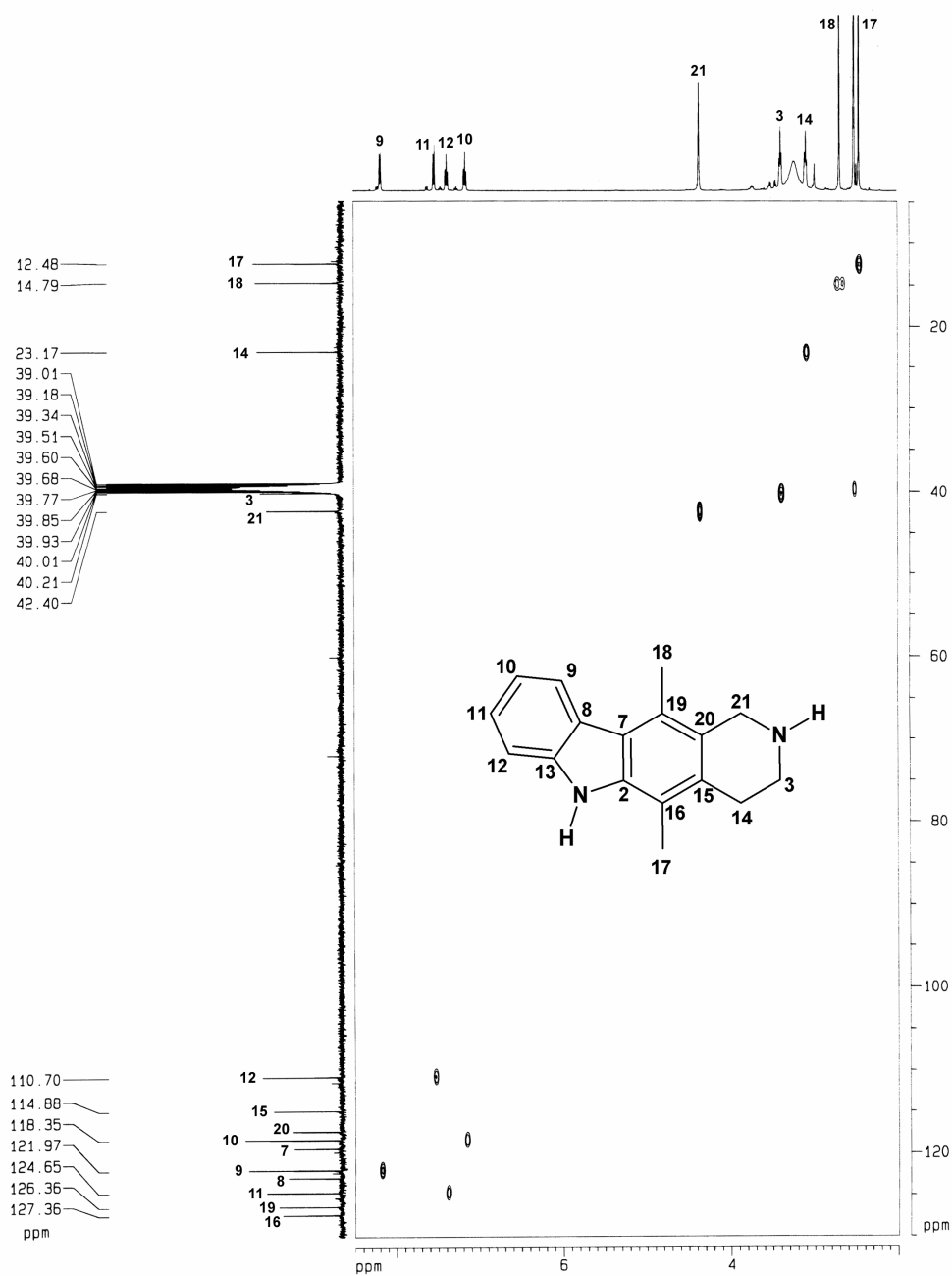
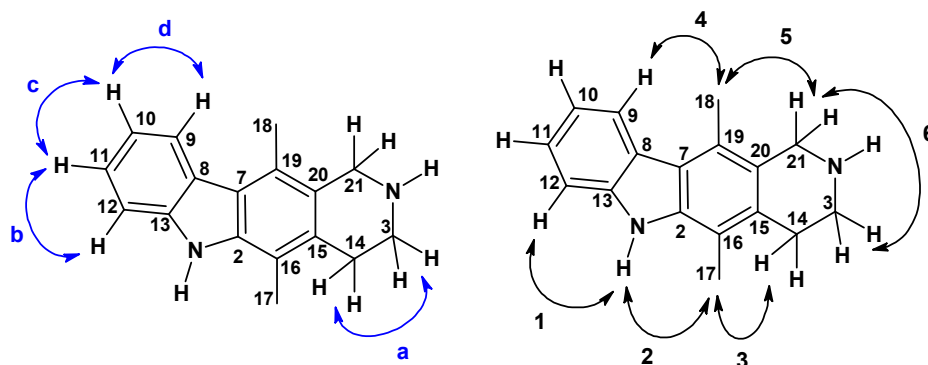
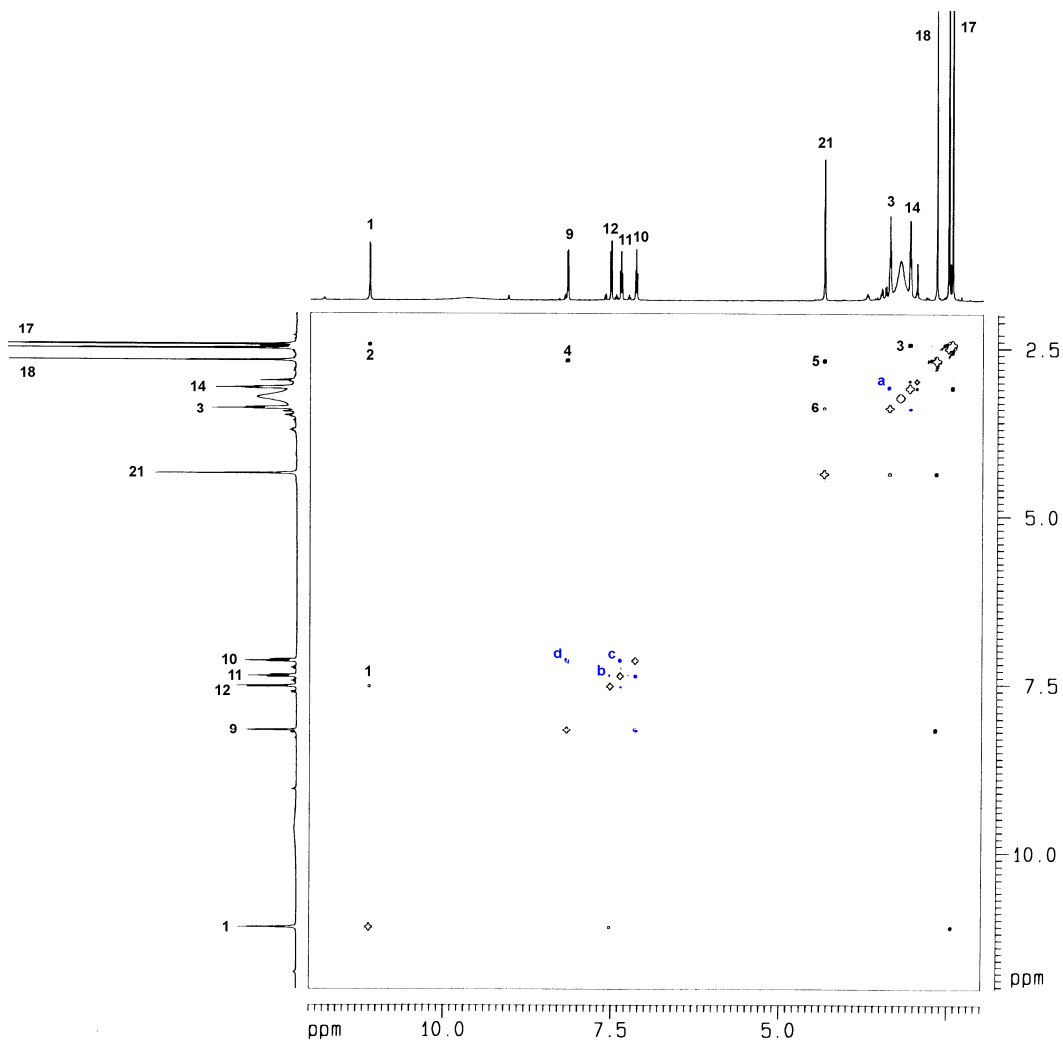
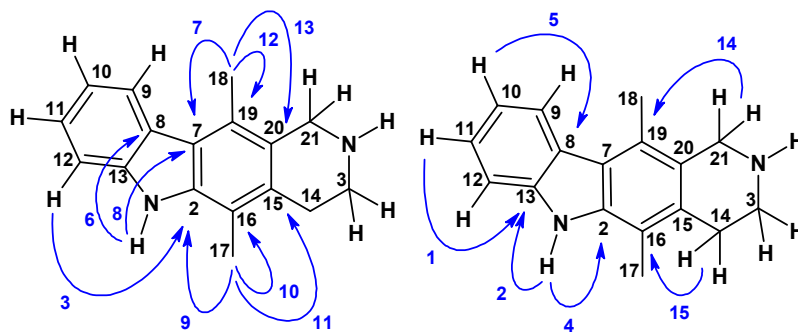
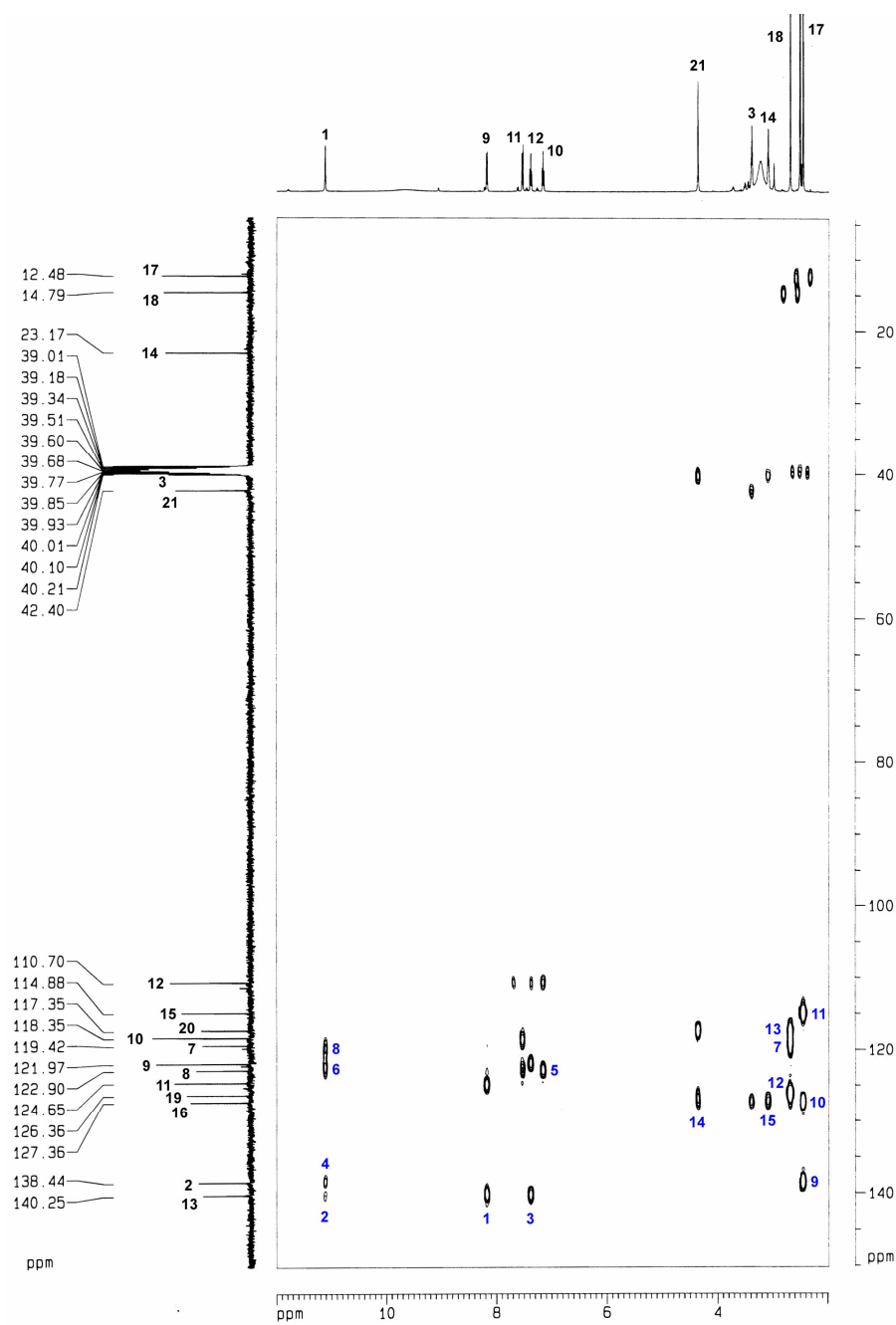


FIGURA 32. Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC de AU3 (500/125 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ).



**FIGURA 33.** Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY de AU3 (500 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ) (contornos de acoplamento em azul) e 2D  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -NOESY de AU3 (500 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ) (contornos de acoplamento em preto), superpostos. As setas indicam as interações dipolares do NOESY (números em preto) e as correlações escalares entre hidrogênios do COSY (letras em azul). As setas numeradas representam as correlações escalares vicinais (em preto) e as interações dipolares (em azul) observadas e sua numeração corresponde a numeração dos picos observados no espectro.

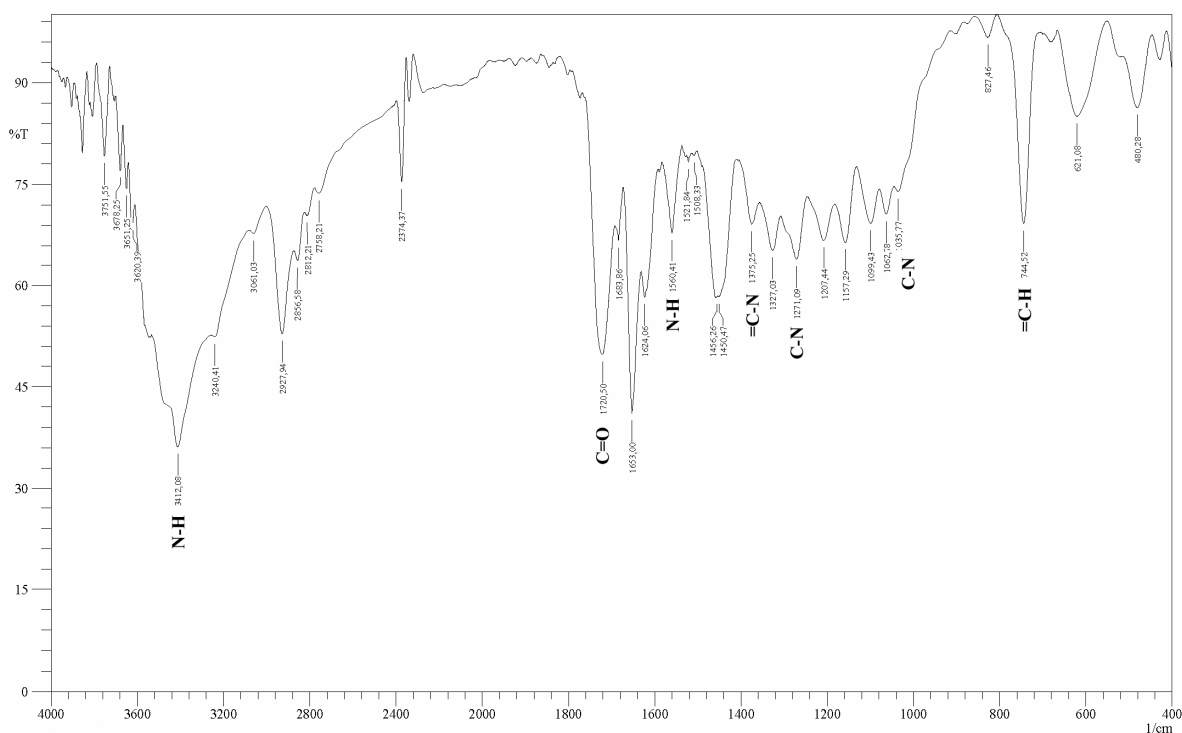


**FIGURA 34.** Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HMBC de AU3 (500/125 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ). As setas numeradas representam as principais correlações a longa distância observadas e sua numeração corresponde a numeração dos picos observados no espectro.

### 3.4 Determinação Estrutural de AU4

O fracionamento cromatográfico do extrato etanólico da casca da raiz de *Aspidosperma ulei* permitiu o isolamento de um sólido escuro, de ponto de fusão 137,3-138,7 °C e  $[\alpha]_D^{25} = -13,3^\circ$  (c 0,33, CH<sub>3</sub>OH), denominado AU4 (ver **Parte Experimental**, pág. 154).

O espectro na região do infravermelho de AU4 (**FIGURA 35**, pág. 85) apresentou absorções correspondentes a vibrações de deformação axial de NH para aminas secundárias aromáticas (3412 cm<sup>-1</sup>), vibrações de deformação axial de C-N aromático (1375 cm<sup>-1</sup>) e alifático (1271 e 1035 cm<sup>-1</sup>), e uma banda correspondente a vibrações de deformação axial de C=O de éster (1720 cm<sup>-1</sup>), além de bandas correspondentes a deformação angular fora do plano para CH em anéis aromáticos (744 cm<sup>-1</sup>).



**FIGURA 35.** Espectro na região do infravermelho de AU4.

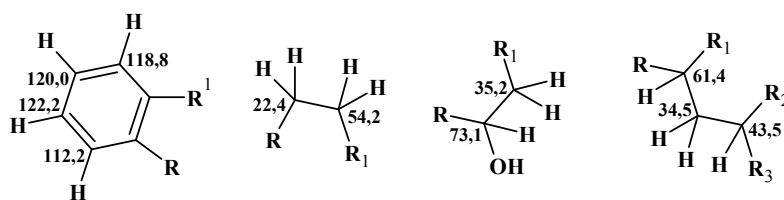
O espectro de RMN <sup>1</sup>H de AU4 (**FIGURA 36**, pág. 92) apresentou claramente 4 sinais correspondentes ao sistema indólico, em  $\delta_H$  7,38 (1H, d, 8 Hz), 7,29 (1H, d, 8 Hz), 7,04 (1H, t, 8 Hz) e 6,97 (1H, t, 8 Hz), um sinal em  $\delta_H$  3,81 (3H, s) atribuído a um grupamento metoxila, além de sinais em  $\delta_H$  3,75 (m, 1H), 3,23 (dl, 11 Hz, 1H), 3,08 (dd, 6 e 11 Hz, 1H), 2,97 (m, 1H), 2,92 (dd, 3 e 11 Hz, 1H), 2,71 (ddl, 4 e 15 Hz, 1H), 2,60 (tl, 6 e 11 Hz, 1H), 2,15 (m, 1H), 2,14 (m, 1H), 2,10 (q, 11 Hz, 1H), 2,02 (ddd, 3, 7 e 12 Hz, 1H), 1,65 (ddd, 3, 6

e 13 Hz, 1H), 1,46 (td, 3 e 11 Hz, 1H), 1,42 (m, 1H), 1,37 (m, 1H), 1,30 (q, 12 Hz, 1H), 1,13 (m, 1H).

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB de AU4 (**FIGURA 37**, pág. 92) apresentou 21 sinais e por comparação com o espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC editado (**FIGURA 38**, pág. 93) foi possível identificar quatro carbonos aromáticos monohidrogenados, em  $\delta_{\text{C}}$  122,2 ( $\delta_{\text{H}}$  7,04), 120,0 (6,97), 118,8 (7,38), 112,2 (7,29), cinco carbonos metínicos, em  $\delta_{\text{C}}$  73,1 ( $\delta_{\text{H}}$  3,75), 61,4 (3,23), 58,9 (2,14), 43,5 (1,46) e 40,7 (1,42), seis carbonos metilênicos, em  $\delta_{\text{C}}$  61,9 ( $\delta_{\text{H}}$  2,92 e 2,10), 54,2 (3,08 e 2,60), 35,2 (2,02 e 1,37), 34,5 (2,15 e 1,30), 29,2 (1,65 e 1,13) e 22,4 (2,97 e 2,71), um carbono metílico, em  $\delta_{\text{C}}$  52,3 ( $\delta_{\text{H}}$  3,81), atribuído a uma metoxila, além de 5 carbonos não hidrogenados, em  $\delta_{\text{C}}$  176,5, 138,2, 135,1, 128,4 e 107,4, identificados pela ausência de correlações no HSQC editado. Os sinais observados entre 122,2-112,2 ppm foram atribuídos aos carbonos aromáticos do sistema indólico, enquanto o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  73,1 ( $\delta_{\text{H}}$  3,75) foi atribuído a um carbono oximetínico e o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  176,5, a um carbono carbonílico de éster, como indicado no espectro de infravermelho (**FIGURA 35**, pág. 85).

O espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -COSY (**FIGURA 39**, pág. 94) apresentou os acoplamentos vicinais o anel aromático do sistema indólico, além de todos os acoplamentos geminais para os hidrogênios metilênicos, confirmando os dados observados anteriormente no HSQC editado. As correlações vicinais encontradas para os hidrogênios dos carbonos metilênicos permitiram atribuir alguns grupos de seqüências de hidrogênios, e conseqüentemente dos carbonos, como segue:  $\delta_{\text{H}}$  3,23 ( $\delta_{\text{C}}$  61,4)  $\leftrightarrow$  2,15/1,30 (34,5)  $\leftrightarrow$  1,46 (43,5);  $\delta_{\text{H}}$  3,75 ( $\delta_{\text{C}}$  73,1)  $\leftrightarrow$  2,02/1,37 (35,2); e  $\delta_{\text{H}}$  3,08/2,60 ( $\delta_{\text{C}}$  54,2)  $\leftrightarrow$  2,97/2,71 (22,4).

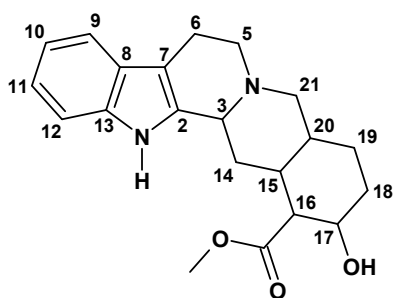
Os dados obtidos para AU4 encontram-se listados na **TABELA 10**, pág. 87, enquanto o **QUADRO 12**, pág. 86, mostra as estruturas parciais obtidas a partir desses dados.



**QUADRO 12.** Estruturas parciais obtidas através do COSY.

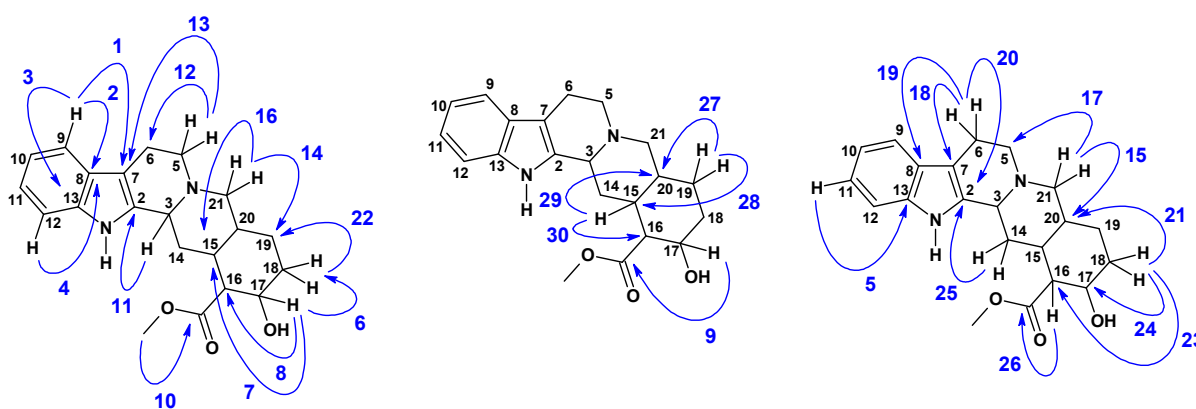
TABELA 10. Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  para AU4 obtidos a partir dos espectros 1D e 2D de AU4.

	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (mult, <i>J</i> , Int)	COSY ( $\delta_{\text{H}}$ )
2	135,1	---	---
3	61,4	3,23 (dl, 11 Hz, 1H)	2,15; 1,30
5a	54,2	3,08 (dd, 6 e 11 Hz, 1H)	2,97
5b		2,60 (tl, 6 e 11 Hz, 1H)	2,97; 2,71
6a		2,97 (m, 1H)	2,60; 3,08
6b	22,4	2,71 (ddl, 4 e 15 Hz, 1H)	2,60
7	107,4	---	---
8	128,4	---	---
9	118,8	7,38 (d, 8 Hz, 1H)	6,97
10	120,0	6,97 (t, 8 Hz, 1H)	7,38; 7,04
11	122,2	7,04 (t, 8 Hz, 1H)	7,29; 6,97
12	112,2	7,29 (d, 8 Hz, 1H)	7,04
13	138,2	---	---
14a		2,15 (m, 1H)	3,23; 1,46
14b	34,5	1,30 (q, 12 Hz, 1H)	3,23
15	43,5	1,46 (td, 3 e 11 Hz, 1H)	2,15
16	58,9	2,14 (m, 1H)	---
17	73,1	3,75 (m, 1H)	2,02; 1,37
18a		2,02 (ddd, 3, 7 e 12 Hz, 1H)	3,75
18b	35,2	1,37 (m, 1H)	3,75
19a		1,65 (ddd, 3, 6 e 13 Hz, 1H)	---
19b	29,2	1,13 (m, 1H)	---
20	40,7	1,42 (m, 1H)	---
21a		2,92 (dd, 3 e 11 Hz, 1H)	---
21b	61,9	2,10 (q, 11 Hz, 1H)	---
C=O	176,5	---	---
OCH <sub>3</sub>	52,3	3,81 (s, 3H)	---



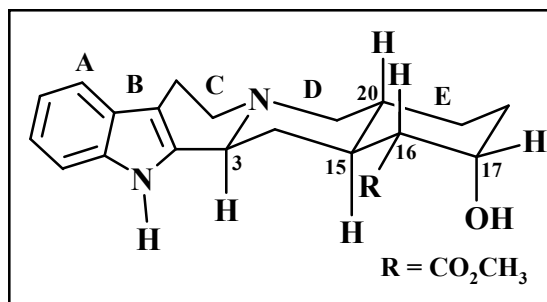
O espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HMBC possibilitou assinalar a posição de cada carbono não hidrogenado em AU4 (FIGURA 40, pág. 95). As correlações  $^3J_{\text{CH}}$  dos hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  7,38 (H-9) com  $\delta_{\text{C}}$  107,4 (C-7, 1) e 138,2 (C-13, 3); 7,04 com 138,2 (C-13, 5); 7,29 (H-12) com 128,4 (C-8, 4); 3,08/2,60 (2H-5) com 107,4 (C-7, 13); 2,92/2,10 (2H-21) com 54,2 (C-5, 17), 43,5 (C-15, 16) e 29,2 (C-19, 15); 1,65/1,13 (2H-19) com 43,5 (C-15, 28); e 3,75 (H-17) com 43,5 (C-15, 7), juntamente com as correlações  $^2J_{\text{CH}}$  dos hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  7,38 (H-9) com 128,4 (C-8, 2); 1,46 (H-15) com 58,9 (C-16, 30) e 40,7 (C-20, 29); e

1,65/1,13 (2H-19) com 40,7 (C-20, 27), além das estruturas parciais obtidas a partir dos dados de COSY, possibilitou propor a estrutura no **QUADRO 13**, pág 88, para AU4. A correlação entre os hidrogênios em  $\delta_H$  2,92/2,10 (2H-21) com  $\delta_C$  54,2 (C-5, 17), e os valores de deslocamentos químicos de C-3 ( $\delta_C$  61,4), C-5 ( $\delta_C$  54,2) e C-21 ( $\delta_C$  61,9), possibilitou inserir um segundo nitrogênio na junção desses carbonos. As correlações observadas para  $\delta_H$  3,75 (H-17) e 2,14 (H-16) com o carbono carbonílico em  $\delta_C$  176,5, assegurou a conexão entre  $\delta_C$  58,9 (C-16) e 176,5 (C=O), enquanto a correlação entre  $\delta_H$  3,81 (OCH<sub>3</sub>) e  $\delta_C$  176,5 (C=O) confirmou a carbonila do grupo éster metílico.



**QUADRO 13.** Proposta estrutural para AU4 e correlações a longa distância obtidas no espectro HMBC.

Pesquisa no SciFinder Scholar v2006, do Chemical Abstracts, mostrou a existência de sete diferentes isômeros para AU4 (ioimbina,  $\alpha$ -ioimbina, 3-epi- $\alpha$ -ioimbina,  $\beta$ -ioimbina,  $\psi$ -ioimbina, alloioimbina e corinantina) levando em consideração os centros estereogênicos em C-3, C-15, C-16, C-17 e C-20 (**TABELA 11**, pág 90). De acordo com a literatura, H-15 tem uma configuração fixa, sempre se apresentando em posição axial (*Wenkert, E. et al. 1976*), com configuração *S*, o que assegura uma conformação em cadeira para o anel E desses isômeros como pode ser visto no **QUADRO 14**, pág. 88, para a ioimbina.

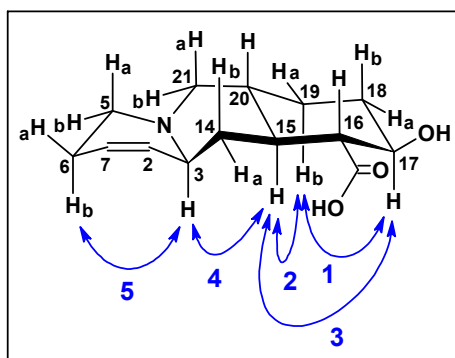


**QUADRO 14.** Estrutural da ioimbina, em conformação cadeira (3*S*,15*S*,16*R*,17*S*,20*R*).



A comparação entre os dados de carbono-13 de AU4 e de todos esses isômeros indicam estreita semelhança entre AU4 e  $\beta$ -ioimbina ( $[\alpha]_D^{25} = -19,8^\circ$ ) (TABELA 11, pág. 90), principalmente pelo deslocamento químico de C-17 da  $\beta$ -ioimbina em  $\delta_C$  71,6, comparável aquele observado para C-17 em AU4 ( $\delta_C$  73,1).

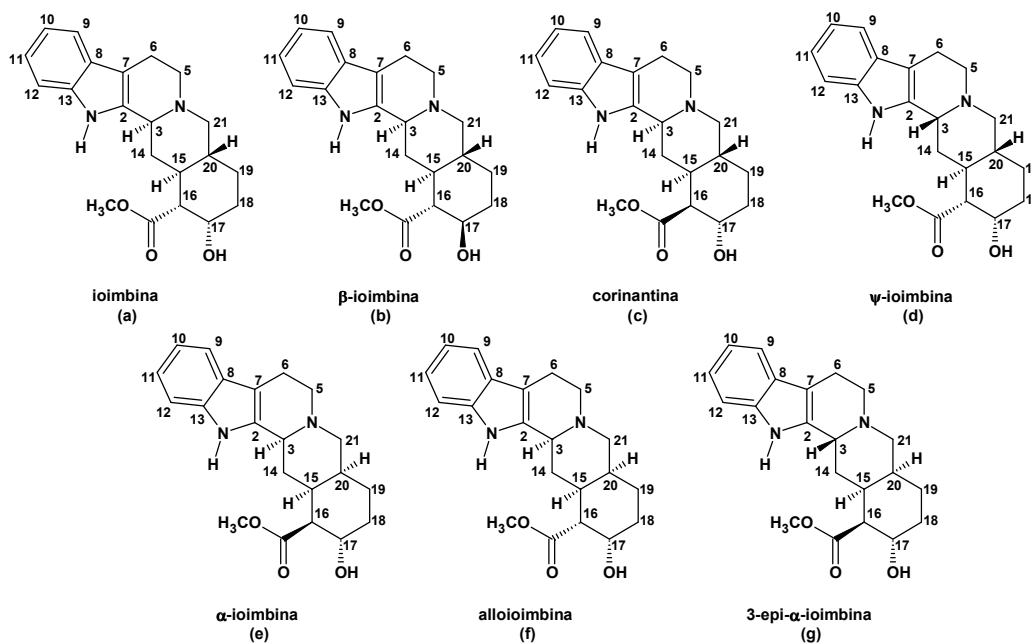
Uma vez que, presumidamente, a configuração em C-15 seja mantida, e o grupo hidroxila em C-17 esteja em posição equatorial devido ao deslocamento químico de carbono observado para o mesmo, a configuração relativa dos outros carbonos estereogênicos em AU4 pôde ser completamente estabelecida pelo espectro de RMN 1D  $^1\text{H}$ -NOE seletivo (SELNOE), através da irradiação seletiva dos hidrogênios H-17 ( $\delta_H$  3,75), H-3 (3,23), H-6b (2,71), H-5b (2,60) e H-19b (1,13) (FIGURA 41, pág. 96). Irradiação em H-19b (0,95 %, 1) e H-17 (1,12 %, 1) mostrou resposta entre si e em H-15 (1,79 %, 2; e 1,42 %, 3, respectivamente), enquanto H-3 apresentou interação com H-15 (2,00 %, 4) e H-6b (1,66 %, 5) (QUADRO 15, pág. 89). Esses resultados corroboram para a configuração 3*S*,15*S*,17*S* para AU4. Outras interações observadas no SELNOE podem ser vistas na FIGURA 41, pág 96.



QUADRO 15. Correlações observadas para H-19b, H-17 e H-3 no SELNOE.

TABELA 11. Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  de AU4 e dados da literatura (Wenkert, E. *et al.* 1976). Os valores em negrito indicam coincidências de  $\delta_{\text{C}}$  entre os compostos.

	AU4	a	b	c	d	e	f	g
2	135,1	134,2	134,0	135,8	134,0	134,3	134,4	131,7
3	61,4	59,8	59,0	60,5	53,7	60,1	60,1	53,7
5	54,2	52,1	52,3	52,6	50,7	53,2	52,8	50,8
6	22,4	21,5	21,3	21,6	16,4	21,7	21,3	16,5
7	107,9	107,5	107,4	106,3	105,9	108,1	107,1	107,3
8	128,4	127,0	126,9	127,0	127,2	127,1	126,8	127,2
9	118,8	117,7	117,7	117,5	117,2	117,9	117,5	117,6
10	120,0	118,8	118,8	118,4	118,1	119,1	118,6	118,9
11	122,2	120,8	120,9	120,4	120,1	121,1	120,5	121,0
12	112,2	110,6	110,7	111,1	111,1	110,6	110,6	110,8
13	138,2	135,8	135,8	136,1	135,5	135,7	135,8	135,6
14	34,5	33,8	33,8	33,6	32,2	27,6	31,0	23,6
15	43,5	36,4	41,6	34,7	32,4	37,9	37,4	32,5
16	58,9	52,6	57,1	51,1	52,4	54,6	50,6	54,1
17	73,1	66,9	71,6	65,9	66,6	66,0	66,7	65,7
18	35,2	31,4	33,5	28,2	30,9	33,2	30,2	33,5
19	29,2	23,1	27,5	23,5	23,0	24,5	24,8	23,9
20	40,7	40,2	39,1	36,5	39,5	36,4	32,0	35,6
21	61,9	61,0	60,5	62,0	51,5	60,4	59,6	49,4
C=O	176,5	175,1	175,0	172,7	172,9	174,4	174,0	174,7
OMe	52,3	51,7	51,6	51,1	51,2	51,8	51,5	51,7



Ainda que não tenham sido obtidas interações entre H-20 e quaisquer um dos outros hidrogênios, é possível sugerir a configuração de C-20 com base nos deslocamentos químicos de carbono-13 dos modelos da literatura. Como pode ser visto na **TABELA 11**, pág 90, na ioimbina (**a**),  $\beta$ -ioimbina (**b**) e  $\psi$ -ioimbina (**d**), os deslocamento químicos para C-20 apresentam-se em  $\delta_C$  40,2, 39,1 e 39,5, respectivamente, enquanto na corinantina (**c**) apresenta-se em  $\delta_C$  36,5. Nos primeiros casos, a carbonila ligada em C-16 está em equatorial, enquanto no último está axial. Por outro lado, para  $\alpha$ -ioimbina (**e**) e alloioimbina (**f**) C-20 apresenta-se em  $\delta_C$  36,4 e 35,6, respectivamente, enquanto para 3-epi- $\alpha$ -ioimbina (**g**), apresenta-se em  $\delta_C$  32,0. Nesses três casos H-20 está equatorial, enquanto a carbonila está em axial para  $\alpha$ -ioimbina e alloioimbina e equatorial para 3-epi- $\alpha$ -ioimbina. A partir desses dados é possível supor que quando a carbonila em C-16 está em equatorial ocorre uma desproteção em C-20. Comparando-se os valores de AU4, ioimbina,  $\beta$ -ioimbina e  $\psi$ -ioimbina, conclui-se que H-20 esteja axial e, portanto, AU4 trata-se realmente de  $\beta$ -ioimbina, como sugerido anteriormente.

No melhor do nosso conhecimento,  $\beta$ -ioimbina está sendo relatada pela primeira vez para a espécie.

---

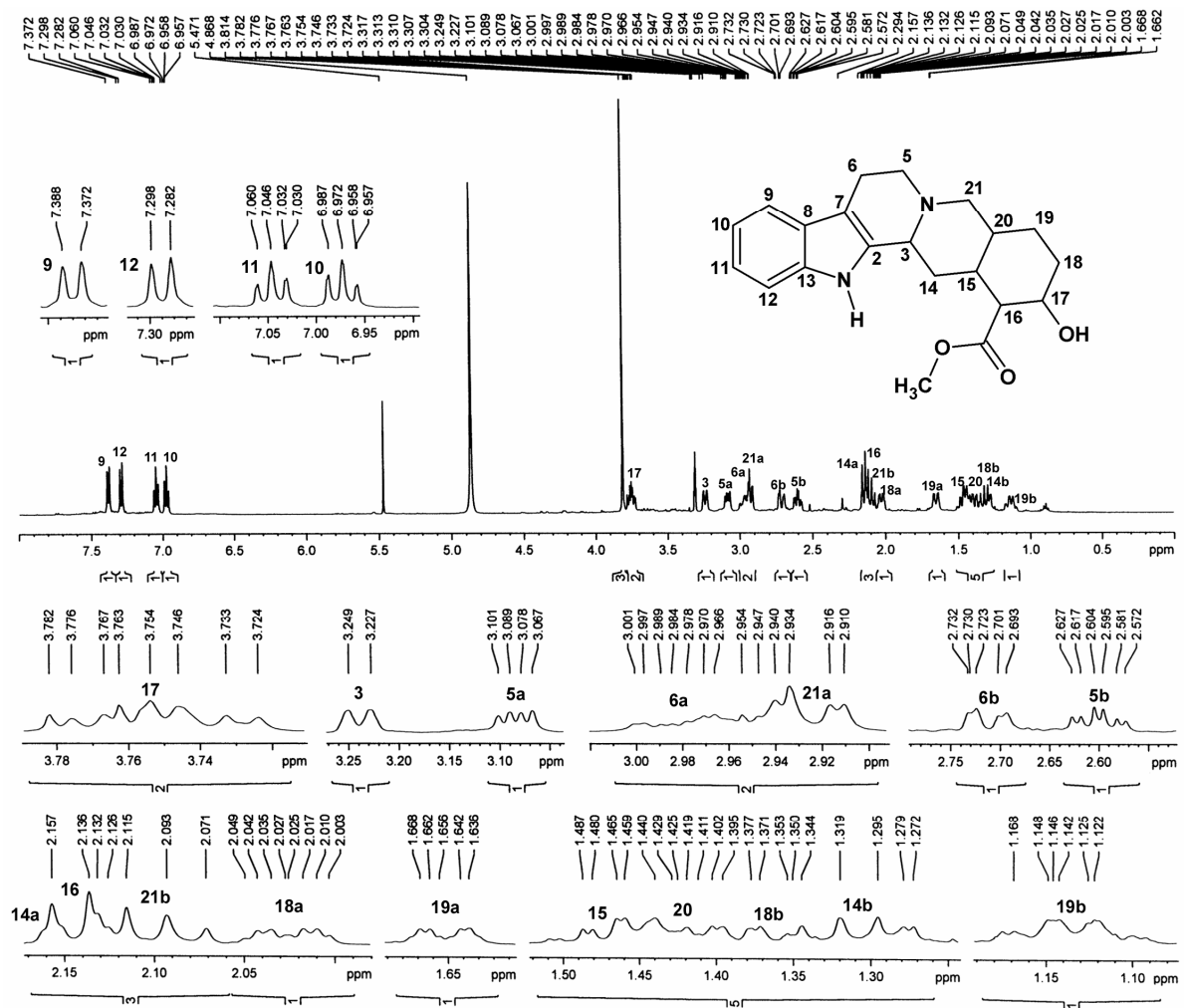


FIGURA 36. Espectro de RMN <sup>1</sup>H de AU4 (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) e expansões.

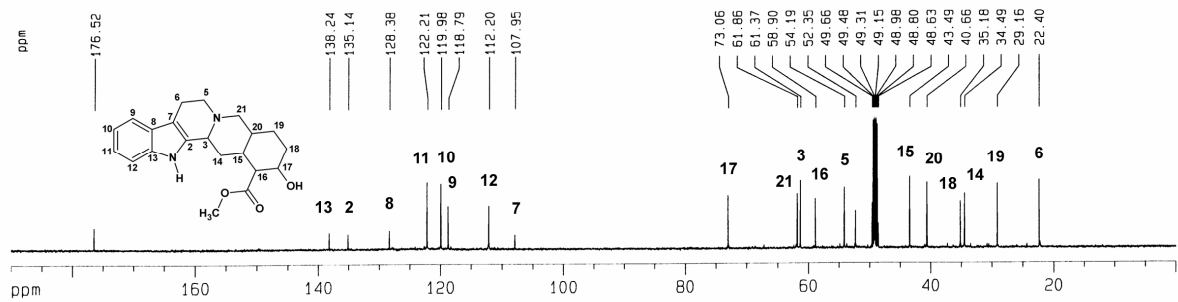
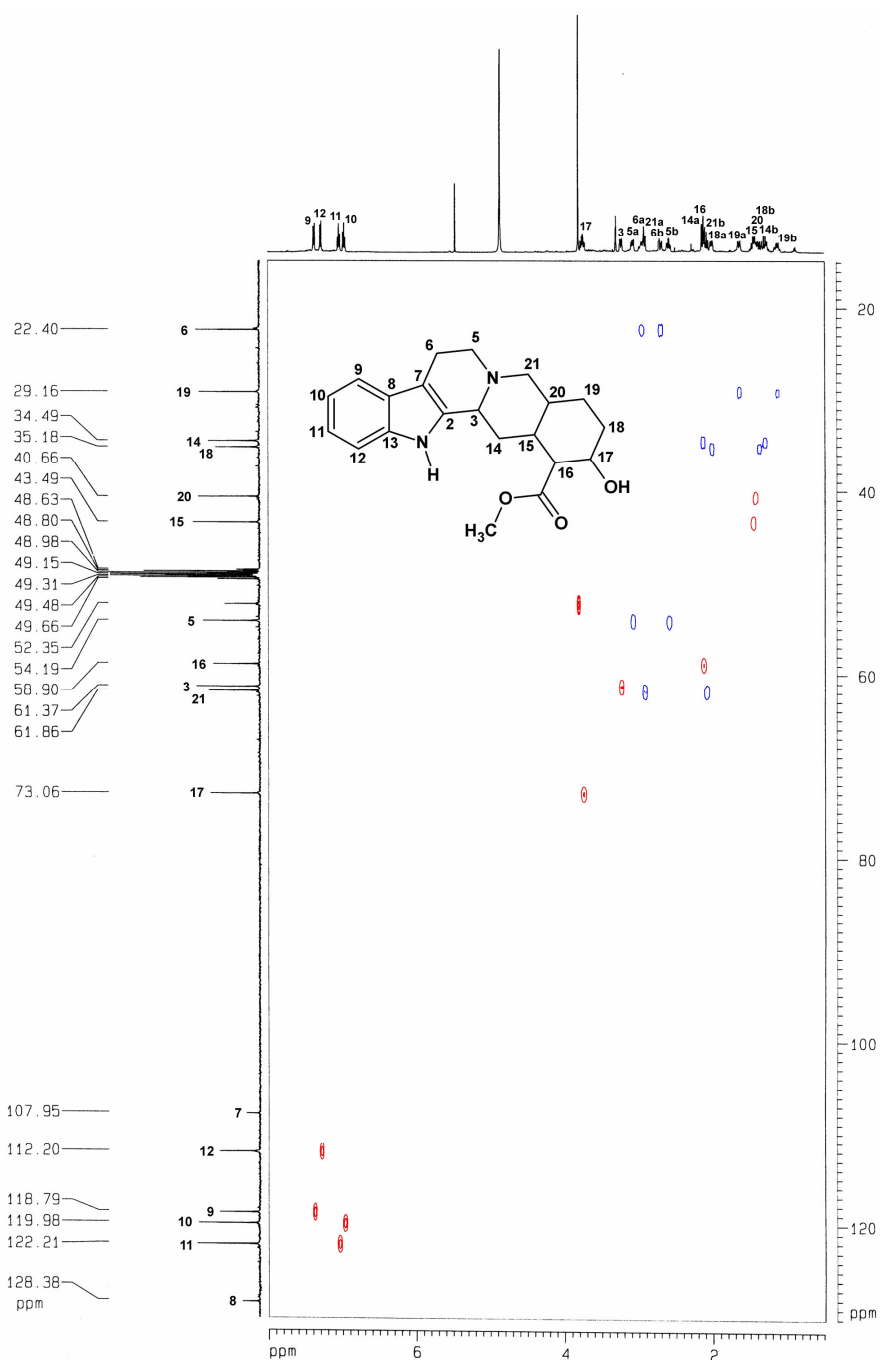
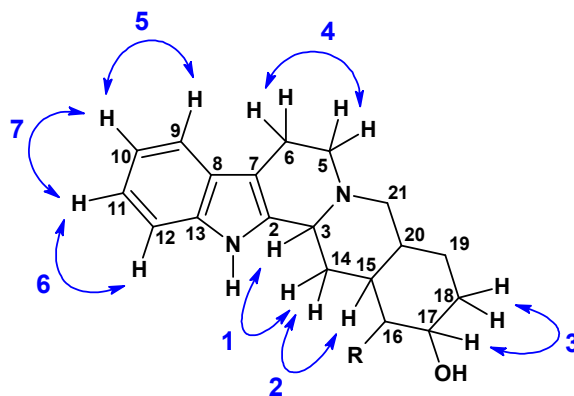
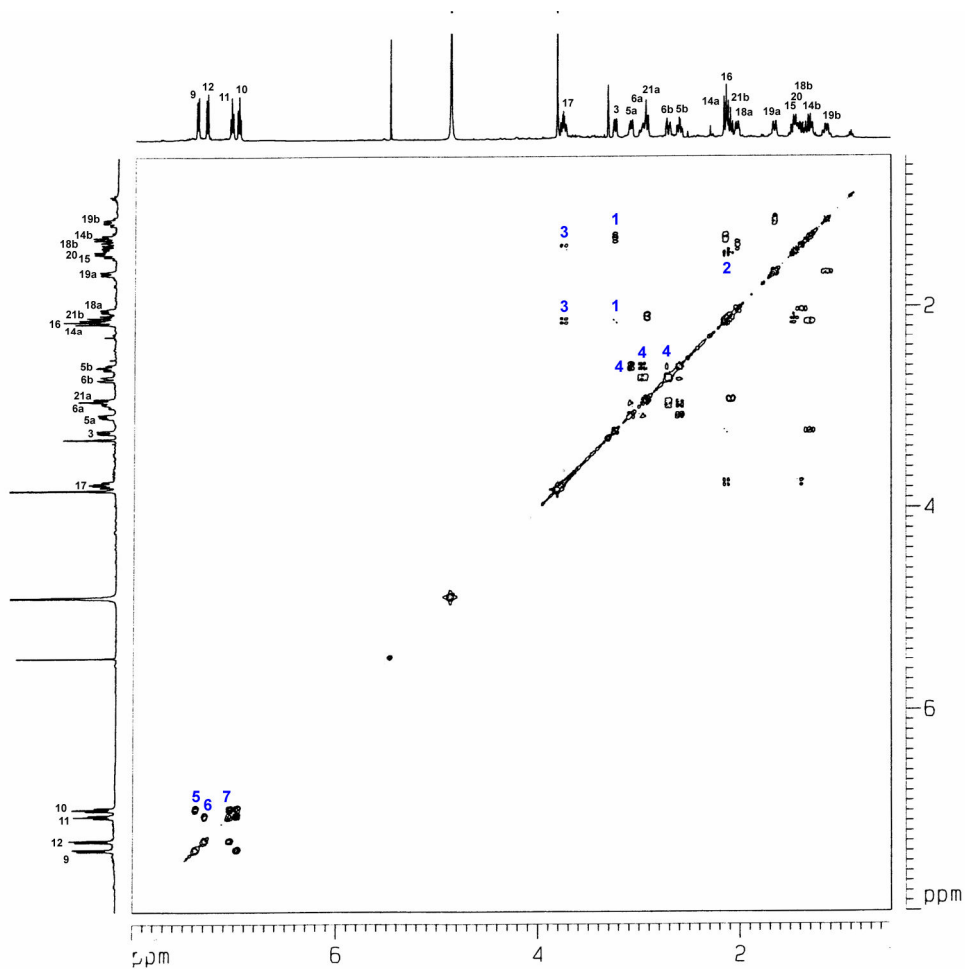


FIGURA 37. Espectro de RMN <sup>13</sup>C de AU4 (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD).



**FIGURA 38.** Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC editado de AU4 (500/125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ), com fase positiva (CH e  $\text{CH}_3$ ) em vermelho e negativa ( $\text{CH}_2$ ) em azul.



**FIGURA 39.** Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY de AU4 (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ). As setas numeradas representam as correlações vicinais observadas e sua numeração corresponde a numeração dos picos observados no espectro.

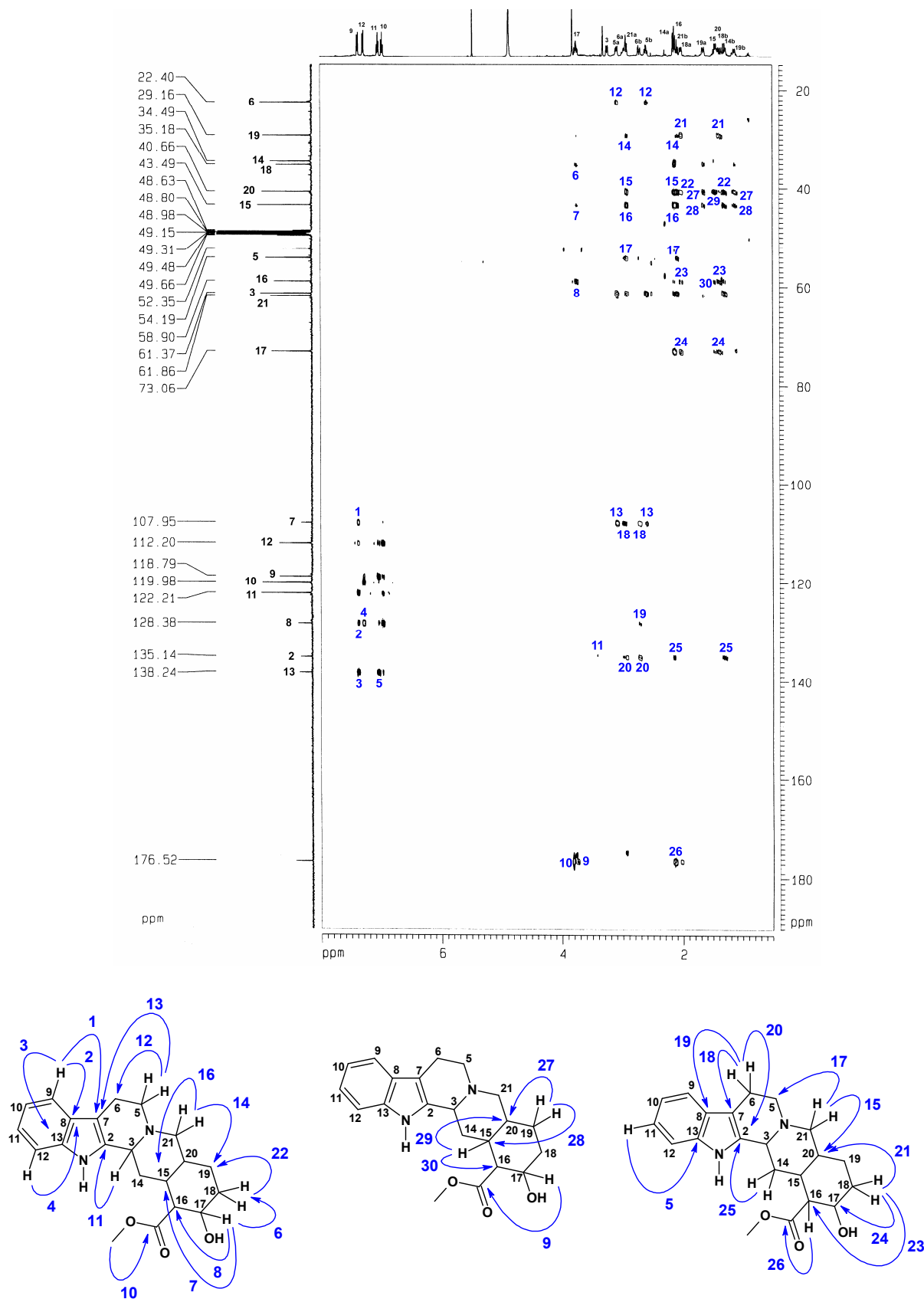
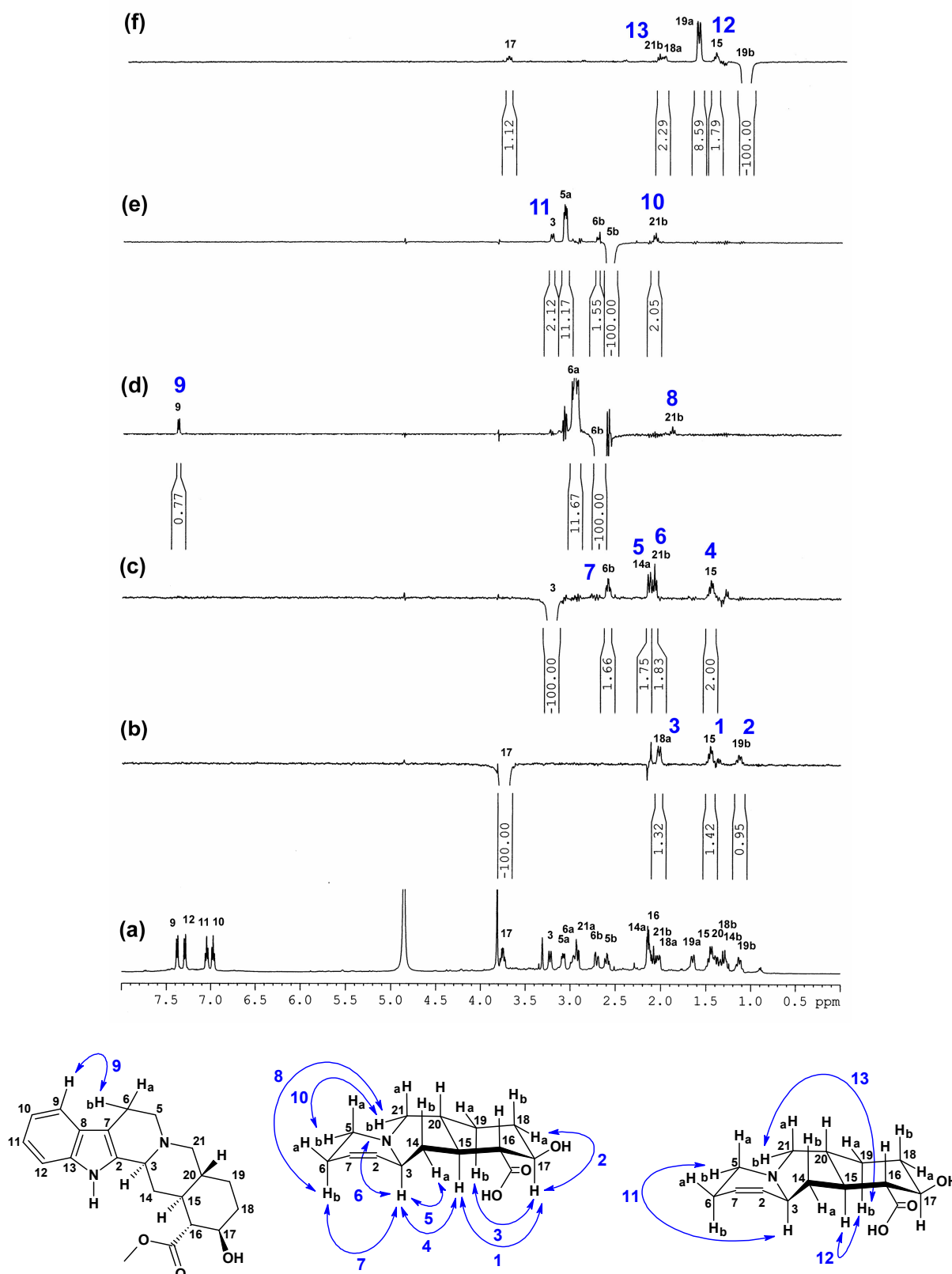


FIGURA 40. Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HMBC de AU4 (500/125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ). As setas numeradas representam as principais correlações a longa distância observadas e sua numeração corresponde a numeração dos picos observados no espectro.



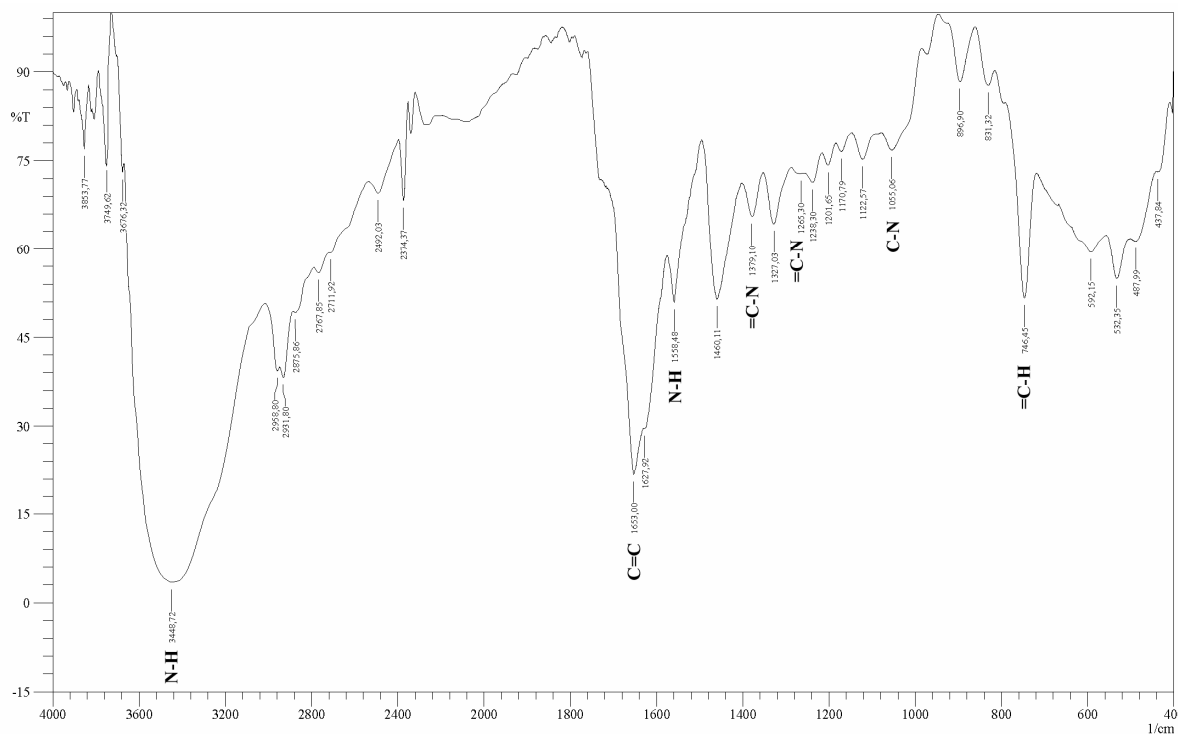
**FIGURA 41.** (a) Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de AU4 (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) e espectros de RMN 1D  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -NOE seletivo de AU4 (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) irradiado em (b)  $\delta_{\text{H}}$  3,75 (H17), (c) 3,23 (H3), (d) 2,71 (H6b), (e) 2,60 (H5b) e (f) 1,13 (H19b). As setas numeradas representam as principais correlações dipolares observadas e sua numeração corresponde a numeração dos picos observados no espectro.



### 3.5 Determinação Estrutural de AU5

O fracionamento cromatográfico do extrato etanólico da casca da raiz de *Aspidosperma ulei* permitiu o isolamento de um sólido vermelho escuro, de ponto de fusão 154,9-156,2 °C e  $[\alpha]_D^{25} = -23,3^\circ$  (c 0,33, CH<sub>3</sub>OH), denominado AU5 (ver **Parte Experimental**, pág. 154).

O espectro na região do infravermelho de AU5 (**FIGURA 42**, pág. 97) apresentou uma absorção larga e forte em 3448 cm<sup>-1</sup>, correspondente a um grupo NH de amins secundárias aromáticas e bandas correspondentes a vibrações de deformação axial de C-N alifático (1055 cm<sup>-1</sup>) e aromático (1379 cm<sup>-1</sup>), além de bandas correspondentes a deformação angular fora do plano para CH em anéis aromáticos (746 cm<sup>-1</sup>). Uma banda de deformação axial C=C (1653 cm<sup>-1</sup>) indicou a presença de uma dupla ligação conjugada.



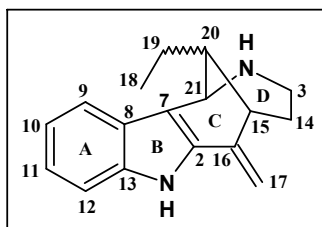
**FIGURA 42.** Espectro na região do infravermelho de AU5.

O espectro de RMN <sup>1</sup>H de AU5 (**FIGURA 43**, pág. 101) apresentou 4 sinais em δ<sub>H</sub> 7,63 (1H, d, 8 Hz), 7,41 (1H, d, 8 Hz), 7,21 (ddd, 1 e 8 Hz) e 7,11 (ddd, 1 e 8 Hz), evidenciando a natureza indólica de AU5. Outros dois sinais em δ<sub>H</sub> 5,76 (1H, s), 5,25 (1H, s) foram correlacionados a uma dupla ligação terminal, enquanto os sinais em δ<sub>H</sub> 1,21 (1H, qd, 3 e 8 Hz) e 0,92 (1H, t, 8 Hz), correspondem a um grupamento etila. Diversos outros sinais foram observados, como segue: δ<sub>H</sub> 4,96 (1H, d, 2 Hz), 3,06 (1H, dd, 4 e 14 Hz), 2,80 (1H, td,

4 e 14 Hz), 2,24 (1H, m), 2,20 (1H, m), 1,90 (1H, dt, 1 e 14 Hz).

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB de AU5 (**FIGURA 44**, pág. 101) apresentou 17 sinais. Através do espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC editado de AU5 (**FIGURA 45**, pág. 102) foi possível correlacionar cada carbono com seus respectivos hidrogênios, determinando assim, o padrão de hidrogenação de todos os carbonos, como segue: quatro carbonos aromáticos monohidrogenados em  $\delta_{\text{C}}$  124,7 ( $\delta_{\text{H}}$  7,21), 121,4 (7,11), 119,6 (7,63), 112,6 (7,41); três carbonos metínicos em  $\delta_{\text{C}}$  51,2 ( $\delta_{\text{H}}$  4,96), 44,0 (2,20) e 39,6 (2,93); um carbono metilidênico em  $\delta_{\text{C}}$  112,1 ( $\delta_{\text{H}}$  5,76/5,25); três carbonos metilênicos em  $\delta_{\text{C}}$  37,3 (3,06/2,80), 32,3 (2,24/1,90) e 25,1 (1,21); um carbono metílico em  $\delta_{\text{C}}$  11,7 ( $\delta_{\text{H}}$  0,92), além de cinco carbonos não hidrogenados, ausentes no HSQC editado, em  $\delta_{\text{C}}$  139,2, 138,7, 137,5, 127,5 e 104,0. Os carbonos entre 124,7-112,6 ppm foram atribuídos ao sistema aromático indólico, enquanto o carbono metilidênico em  $\delta_{\text{C}}$  112,1 foi correlacionado a uma dupla ligação terminal. Todos esses dados encontram-se listados na **TABELA 12**, pág. 99.

Comparação dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  de AU5 com aqueles obtidos para AU1 mostrou estreita semelhança, diferindo apenas na ausência de um carbono metílico ligado a nitrogênio que corresponderia a C-5 (**TABELA 13**, pág. 100), possibilitando propor a estrutura do **QUADRO 16**, pág. 98, para AU5.



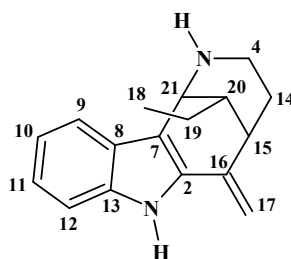
**QUADRO 16.** Proposta estrutural para AU5.

Os acoplamentos escalares observados no espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -COSY e os acoplamentos a longa distância obtidos através do espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HMBC para AU5 (**FIGURA 46**, pág. 103, e **FIGURA 47**, pág. 104, respectivamente) possibilitaram confirmar a estrutura do **QUADRO 17**, pág. 100, para AU5. O COSY apresentou acoplamentos entre os hidrogênios indólicos, além da seqüência de hidrogênios para a cadeia saturada de AU5, como segue:  $\delta_{\text{H}}$  3,06/2,80 ( $\delta_{\text{C}}$  37,3)  $\leftrightarrow$  2,24/1,90 (32,3)  $\leftrightarrow$  2,93 (39,6)  $\leftrightarrow$  2,20 (44,0)  $\leftrightarrow$  4,96 (51,2); e  $\delta_{\text{H}}$  2,20 ( $\delta_{\text{C}}$  44,0)  $\leftrightarrow$  1,21 (25,0)  $\leftrightarrow$  0,92 (11,7), enquanto o HMBC possibilitou atribuir todos os carbonos não hidrogenados através das correlações dos hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  7,63 com  $\delta_{\text{C}}$  104,0 (C-7), 127,5 (C-8) e 139,2 (C-13);  $\delta_{\text{H}}$  7,21 (H-11) e

7,41 (H-12) com  $\delta_C$  139,2 (C-13);  $\delta_H$  5,76/5,25 com  $\delta_C$  39,6 (C-15), 137,5 (C-16) e 138,7 (C-2);  $\delta_H$  4,96 com 104,0 (C-7) e 127,5 (C-8); e  $\delta_H$  2,93 com  $\delta_C$  137,5 (C-16) e 112,1 (C-17).

TABELA 12. Dados de RMN de  $^{13}C$  e  $^1H$  obtidos a partir dos espectros 1D e 2D para AU5, em  $CD_3OD$ .

	$\delta_C$	$\delta_H$ (mult, J, Int)	COSY ( $\delta_H$ )
<b>2</b>	138,7	---	---
<b>3a</b>	37,3	3,06 (dd, 4 e 14 Hz, 1H)	2,24; 1,90
<b>3b</b>		2,80 (td, 4 e 14 Hz, 1H)	2,24; 1,90
<b>7</b>	104,0	---	---
<b>8</b>	127,5	---	---
<b>9</b>	119,6	7,63 (ddd, 1 e 8 Hz, 1H)	7,11
<b>10</b>	121,4	7,11 (ddd, 1, 7 e 8 Hz, 1H)	7,63; 7,21
<b>11</b>	124,7	7,21 (ddd, 1, 7 e 8 Hz, 1H)	7,41; 7,11
<b>12</b>	112,6	7,41 (ddd, 1 e 8 Hz, 1H)	7,21
<b>13</b>	139,2	---	---
<b>14a</b>	32,3	2,24 (m, 1H)	3,06; 2,93
<b>14b</b>		1,90 (dt, 1 e 14 Hz, 1H)	3,06; 2,93
<b>15</b>	39,6	2,93 (sl, 1H)	2,24; 1,90
<b>16</b>	137,5	---	---
<b>17a</b>	112,1	5,76 (s, 1H)	---
<b>17b</b>		5,25 (s, 1H)	---
<b>18</b>	11,7	0,92 (t, 8 Hz, 3H)	1,21
<b>19</b>	25,1	1,21 (qd, 3 e 8 Hz, 2H)	2,20; 0,92
<b>20</b>	44,0	2,20 (m, 1H)	1,21
<b>21</b>	51,2	4,96 (d, 2 Hz, 1H)	2,93; 2,20

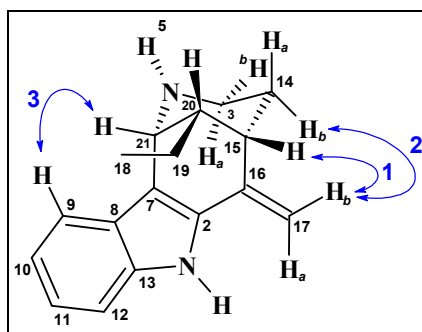
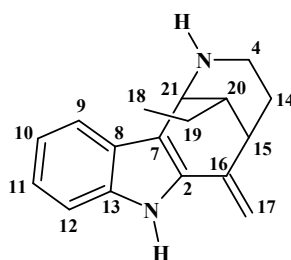


Pesquisa no SciFinder Scholar v2006, do Chemical Abstracts, mostrou que AU5 trata-se de um dos epímeros de N-desmetil-uleina.

Como relatado anteriormente (ver **Determinação Estrutural de AU1**, pág 46), o posicionamento do grupamento etila sobre o anel aromático do sistema indólico leva a proteção dos hidrogênios da metila em C-18. Dessa forma, a comparação dos valores de  $\delta_H$  desses hidrogênios entre AU5 ( $\delta_H$  0,92) e AU1 ( $\delta_H$  0,90), permite concluir que AU5 trata-se do epímero 20(*S*)-N-desmetiluleina (p.f. 143-145 °C;  $[\alpha]_D^{25} = -20^\circ$ , c 1,18 (Joule, **1965**)). Os dados de efeito nuclear Overhauser obtidos através do espectro de RMN 2D  $^1H$ ,  $^1H$ -NOESY para AU5 (**FIGURA 48**, pág. 105) permitiu ainda estabelecer a conformação em cadeira, semelhante a AU1, adotada pelo anel D de AU5, através das interações de H-17b com H-15 (1) e H-14b (2), e H-9 com H-21 (3) (**QUADRO 17**, pág. 100).

TABELA 13. Comparação dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  de AU1 e AU5, em  $\text{CD}_3\text{OD}$  ( $\delta_{\text{C}}$  49,15;  $\delta_{\text{H}}$  3,31).

	$\delta_{\text{C}}$ *	$\delta_{\text{H}}$ (mult, J) *	$\delta_{\text{C}}$ *	$\delta_{\text{H}}$ (mult, J) *
2	139,1	---	138,7	---
3a	47,5	3,12 (dd, 5 e 13)	37,3	3,06 (dd, 4 e 14 Hz, 1H)
3b		2,72 (m)		2,80 (td, 4 e 14 Hz, 1H)
5	42,3	2,72 (s)	---	---
7	101,5	---	104,0	---
8	129,1	---	127,5	---
9	119,4	7,63 (d, 8)	119,6	7,63 (d, 8 Hz, 1H)
10	122,0	7,13 (t, 8)	121,4	7,11 (ddd, 1, 8 Hz, 1H)
11	124,7	7,22 (t, 8)	124,7	7,21 (ddd, 1, 8 Hz, 1H)
12	112,9	7,44 (d, 8)	112,6	7,41 (d, 8 Hz, 1H)
13	139,2	---	139,2	---
14a		2,27 (m)		2,24 (m, 1H)
14b	33,1	1,92 (m)	32,3	1,90 (dt, 1 e 14 Hz, 1H)
15	38,7	2,91 (sl)	39,6	2,93 (sl, 1H)
16	137,4	---	137,5	---
17a		5,80 (s)		5,76 (s, 1H)
17b	112,7	5,29 (s)	112,1	5,25 (s, 1H)
18	11,7	0,92 (t, 7)	11,7	0,92 (t, 8 Hz, 3H)
19	25,1	1,18 (m)	25,1	1,21 (qd, 3 e 8 Hz, 2H)
20	45,0	2,27 (m)	44,0	2,20 (m, 1H)
21	60,4	4,80 (sl)	51,2	4,96 (d, 2 Hz, 1H)



QUADRO 17. Correlações espaciais observadas no SELNOE para AU5.

Dessa forma, no melhor do nosso conhecimento, 20(*S*)-*N*-desmetil-uleina é pela primeira vez relatada para a espécie.

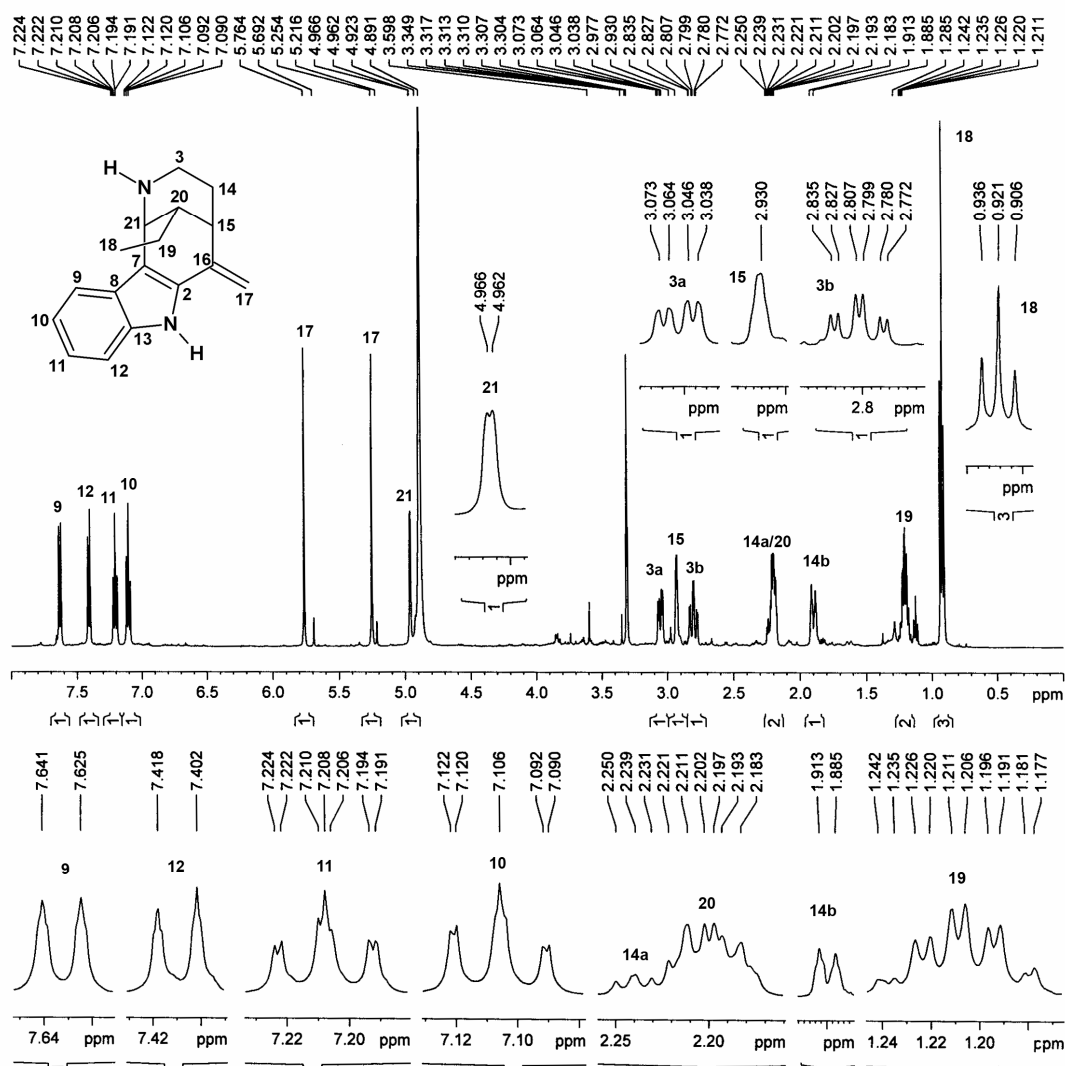


FIGURA 43. Espectro de RMN <sup>1</sup>H de AU5 (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) e expansões.

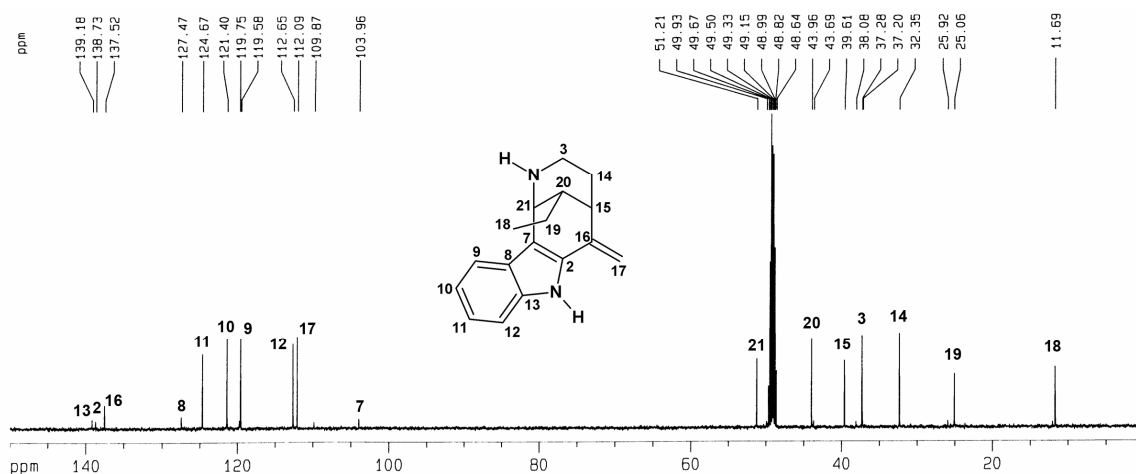


FIGURA 44. Espectro de RMN <sup>13</sup>C de AU5 (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD).

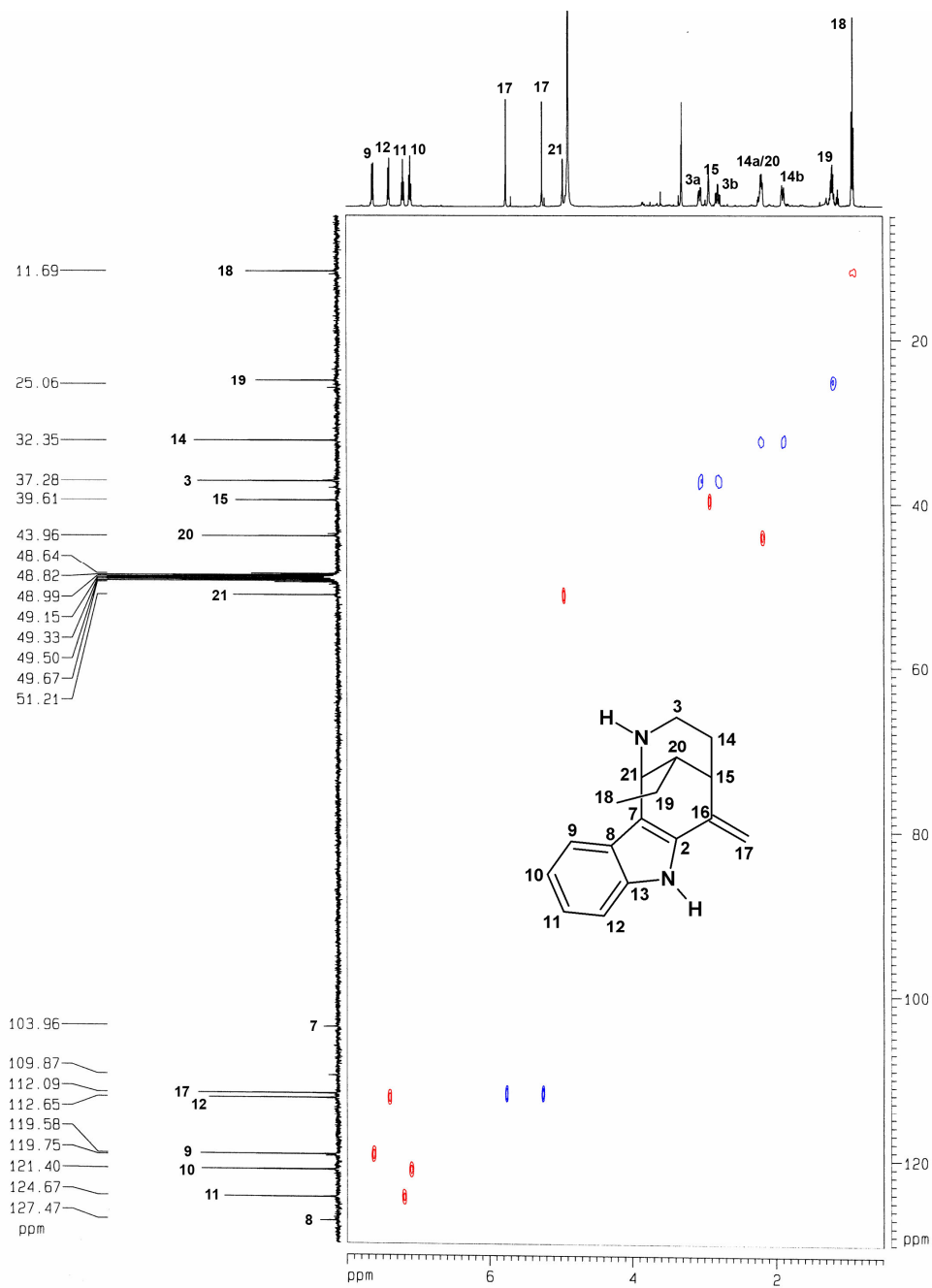
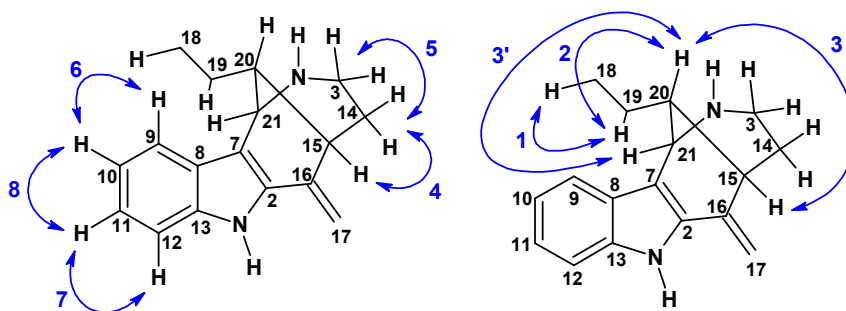
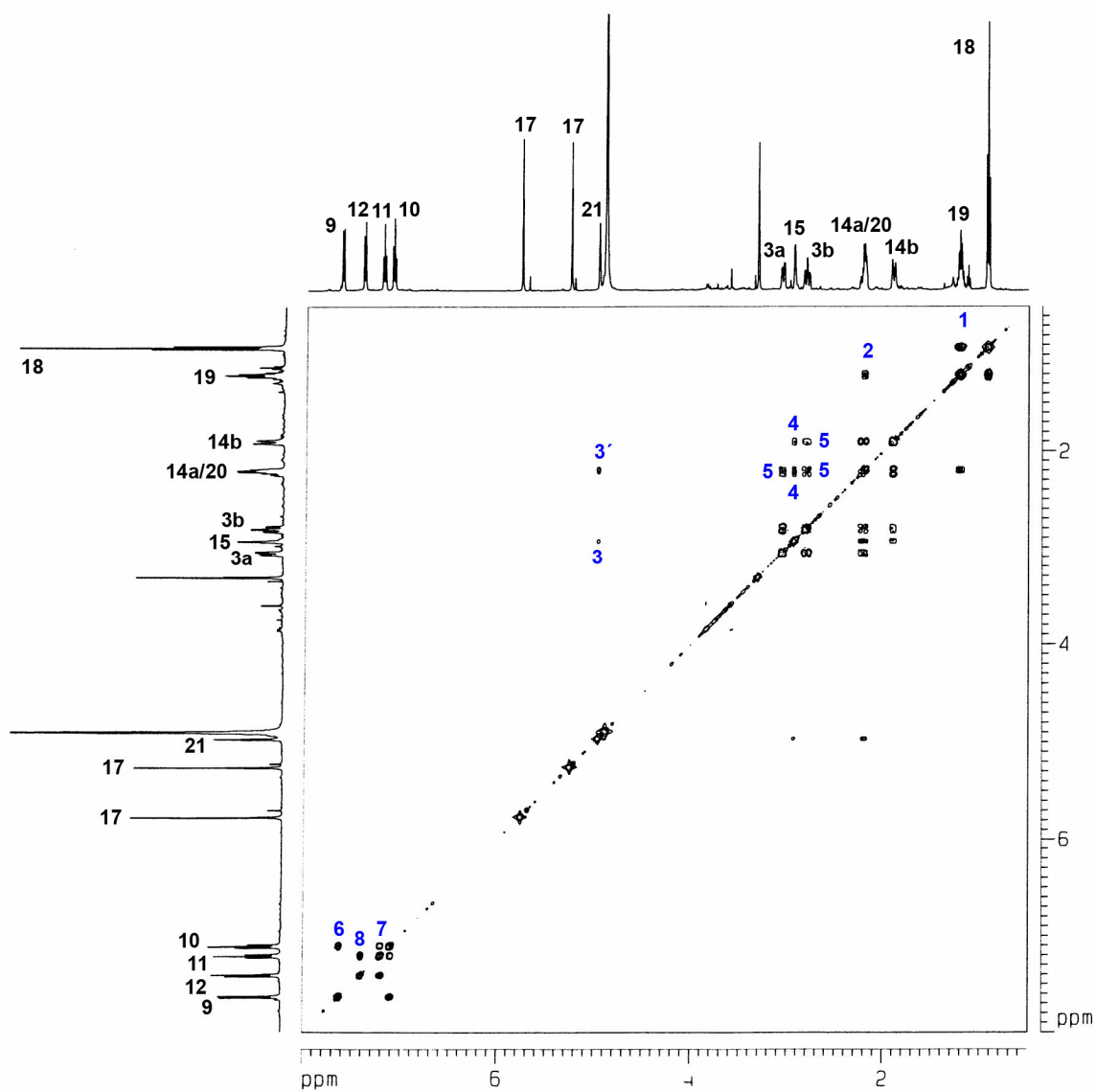


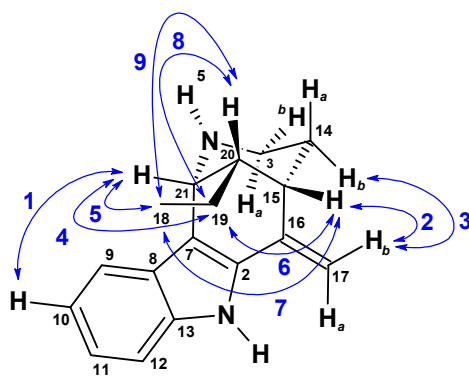
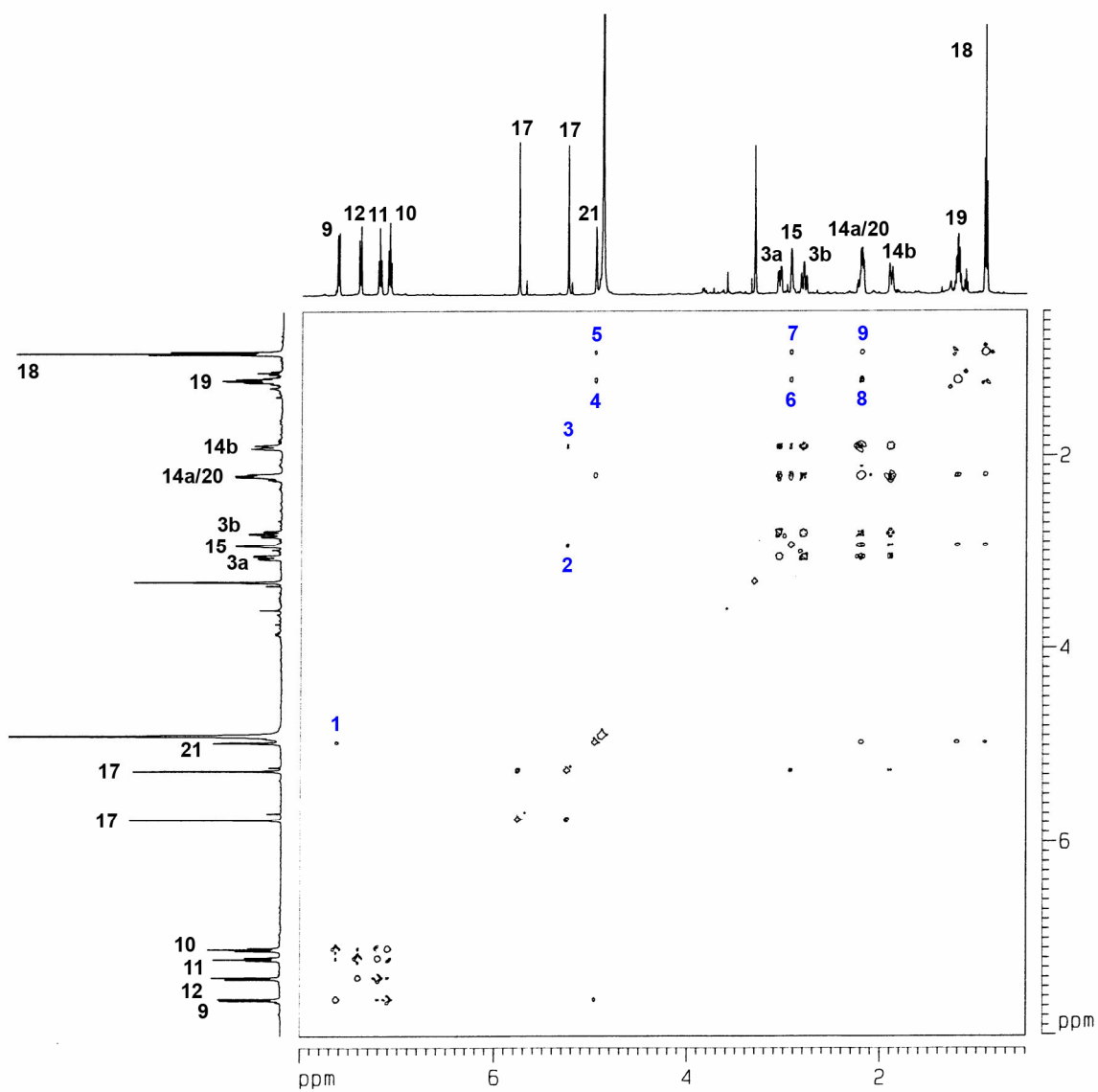
FIGURA 45. Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC editado de AU5 (500/125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ), com fase positiva (CH e  $\text{CH}_3$ ) em vermelho e negativa ( $\text{CH}_2$ ) em azul.



**FIGURA 46.** Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY de AU5 (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ). As setas numeradas representam as correlações vicinais observadas e sua numeração corresponde a numeração dos picos observados no espectro.





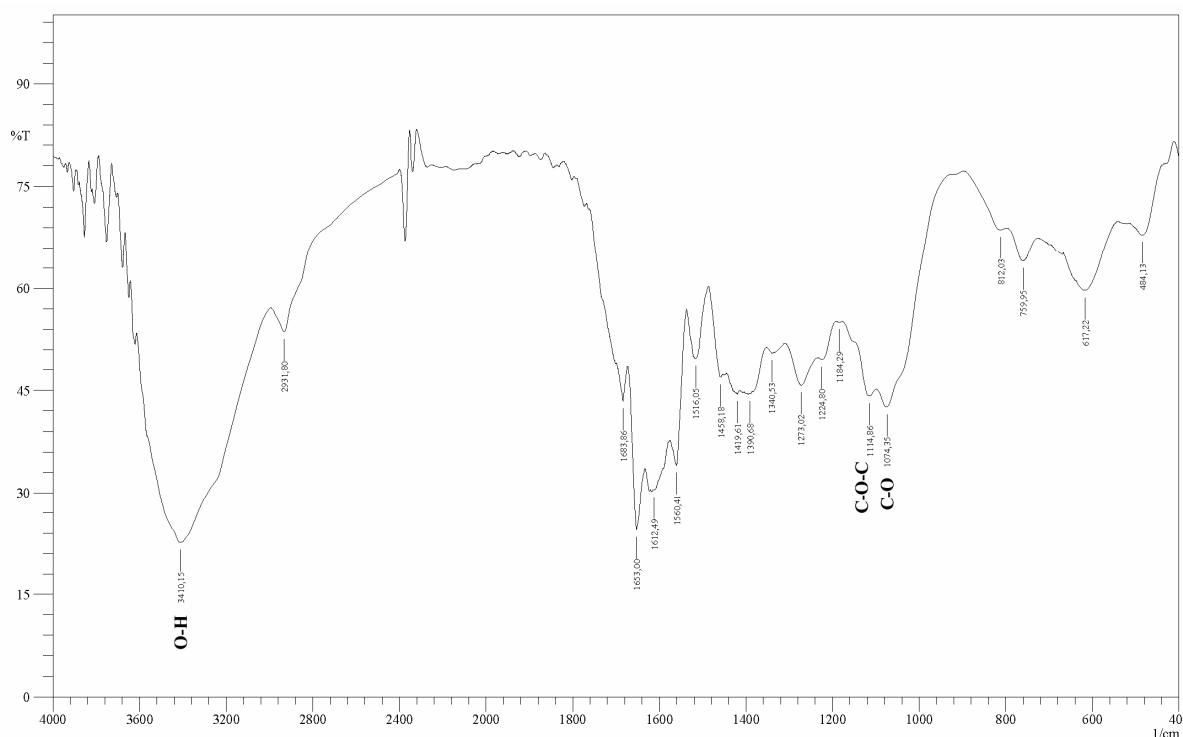


**FIGURA 48.** Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -NOESY de AU5 (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ). As setas numeradas representam as principais correlações dipolares observadas e sua numeração corresponde a numeração dos picos observados no espectro.

### 3.6 Determinação Estrutural de AU6

O fracionamento cromatográfico do extrato etanólico da casca da raiz de *Aspidosperma ulei* permitiu o isolamento de um sólido amarelo claro ( $[\alpha]_D^{25} = -66,7^\circ$  (c 0,33, CH<sub>3</sub>OH), denominado AU6 (ver **Parte Experimental**, pág. 154).

O espectro na região do infravermelho de AU6 (**FIGURA 49**, pág. 106) apresentou bandas de vibração correspondente a deformação axial de OH de álcool (3410 cm<sup>-1</sup>), deformação axial de C-O de álcool (1074 cm<sup>-1</sup>) e uma banda de deformação axial assimétrica de C-O-C de éter (1114 cm<sup>-1</sup>). Esses dados indicam um sistema oxigenado alifático.



**FIGURA 49.** Espectro na região do infravermelho de AU6.

O espectro de RMN <sup>1</sup>H de AU6 (**FIGURA 50**, pág. 111) apresenta seis sinais de hidrogênios ligados a carbonos oxigenados em  $\delta_H$  4,31 (1H, t, 3 Hz), 4,10 (1H, t, 3 Hz), 3,78 (1H, dd, 3 e 9 Hz), 3,65 (2H, m), 3,49 (3H, s) e 3,44 (1H, dd, 3 e 9 Hz). O hidrogênio em  $\delta_H$  3,49 foi correlacionada a um grupo metoxila.

O espectro de RMN <sup>13</sup>C-BB de AU6 (**FIGURA 51**, pág. 111) apresenta sete sinais de carbonos oxigenados em  $\delta_C$  80,5, 72,3, 71,7, 70,7, 70,2, 67,5 e 57,3, semelhante a monossacarídeos.

O espectro de RMN 2D <sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C-HSQC de AU6 (**FIGURA 52**, pág. 112) permitiu correlacionar os dois hidrogênios em  $\delta_H$  3,65 como um hidrogênio em  $\delta_H$  3,66 correspondente

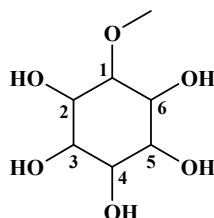
ao carbono em  $\delta_C$  72,3, e outro hidrogênio em  $\delta_H$  3,64 correspondente ao carbono em  $\delta_C$  70,2, enquanto os hidrogênios em  $\delta_H$  3,49, do grupo metoxila, foram correlacionados ao carbono em  $\delta_C$  57,3. As outras correlações foram:  $\delta_C$  80,5 ( $\delta_H$  3,44), 71,7 (4,10), 70,7 (3,78), 67,5 (4,31).

O espectro de RMN 2D de  $^1H, ^1H$ -COSY de AU6 (FIGURA 53, pág. 113) forneceu a sequência dos hidrogênios em AU6, como segue:  $\delta_H$  3,44  $\leftrightarrow$  4,31  $\leftrightarrow$  4,10  $\leftrightarrow$  3,78  $\leftrightarrow$  3,66/3,64.

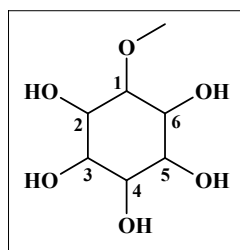
Com esses dados, listados na TABELA 14, pág. 107, foi possível propor a estrutura do QUADRO 18, pág. 107, para AU6, que mostrou ser um derivado do inositol.

TABELA 14. Dados de RMN 1D e 2D de  $^{13}C$  e  $^1H$ , para AU6, em D<sub>2</sub>O + DSS ( $\delta_C$  0;  $\delta_H$  0).

	$\delta_C$	$\delta_H$ (mult, J, Int)	COSY ( $\delta_H$ )
1	80,5	3,44 (dd, 3 e 9 Hz, 1H)	3,66
2	67,5	4,31 (dd, 3 Hz, 1H)	4,10; 3,66
3	71,7	4,10 (dd, 3 Hz, 1H)	4,31; 3,78
4	70,7	3,78 (dd, 3 e 9 Hz, 1H)	4,10; 3,64
5	70,2	3,64 (m, Hz, 1H)	3,78
6	72,3	3,66 (m, Hz, 1H)	3,44
OCH <sub>3</sub>	57,3	3,49 (s, 3H)	---



Os dados de correlações a longa distância, obtidos a partir do espectro de RMN 2D  $^1H, ^{13}C$ -HMBC de AU6 (FIGURA 54, pág. 114) corroboram com a estrutura proposta. O acoplamento do hidrogênio em  $\delta_H$  3,49 com o carbono em  $\delta_C$  80,5 assegurou a posição do grupo metoxila na estrutura.



QUADRO 18. Proposta estrutural para AU6.

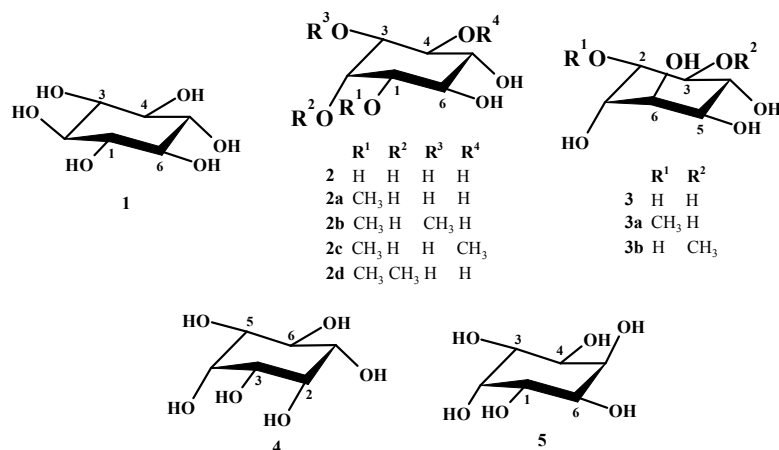
A literatura relata a existência de diversos isômeros do inositol, além de seus

derivados. A TABELA 15, pág. 108, lista os dados de RMN  $^{13}\text{C}$  de alguns deles.

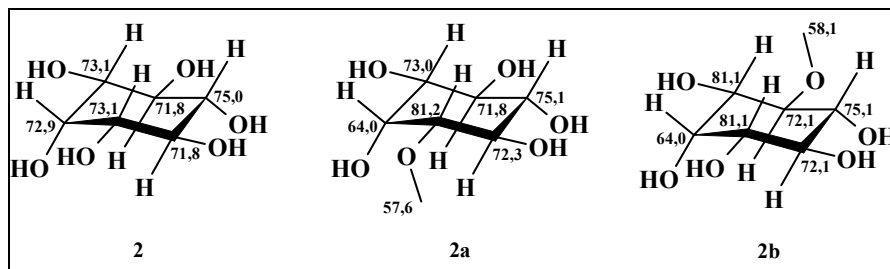
TABELA 15. Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  de AU6<sup>a</sup> e alguns inositóis e seus derivados metilados (Dorman, D. E.; Angyal, S. J.; Roberts, J. D. 1970)<sup>b</sup>.

	AU6	1	2	2a	2b	2c	2d	3	3a	3b	4	5
1	80,5	74,4	73,1	81,2	81,1	81,0	81,7	72,3	67,9	72,4	72,4	70,3
2	67,5	74,4	<u>72,9</u>	<u>68,7</u>	<u>64,0</u>	<u>68,5</u>	<u>78,8</u>	<u>71,2</u>	<u>80,8</u>	<u>70,5</u>	<u>75,2</u>	<u>72,6</u>
3	71,7	74,4	73,1	73,0	81,1	72,4	73,3	73,5	72,6	83,2	70,8	70,3
4	70,7	74,4	71,8	71,8	72,1	82,9	72,1	73,5	73,5	72,8	<u>75,2</u>	70,3
5	70,2	74,4	75,0	75,1	75,1	74,4	75,1	71,2	71,1	71,3	72,4	<u>72,6</u>
6	72,3	74,4	71,8	72,3	72,1	71,2	72,5	<u>72,3</u>	<u>72,0</u>	<u>72,1</u>	67,5	70,3
MeO-1	57,3	---	---	57,6	58,1	57,4	58,1	---	---	---	---	---
MeO-2	---	---	---	---	---	---	62,2	---	57,5	---	---	---
MeO-3	---	---	---	---	58,1	---	---	---	---	60,1	---	---
MeO-4	---	---	---	---	---	60,4	---	---	---	---	---	---

<sup>a</sup> D<sub>2</sub>O + DSS ( $\delta_{\text{C}}$  0). <sup>b</sup> valores corrigidos para a referência D<sub>2</sub>O + DSS ( $\delta_{\text{C}}$  0) a partir do original, obtido em dioxano e referenciado externamente pelo CS<sub>2</sub> ( $\delta_{\text{C}}$  192,3). Os carbonos sublinhados representam OH axial.

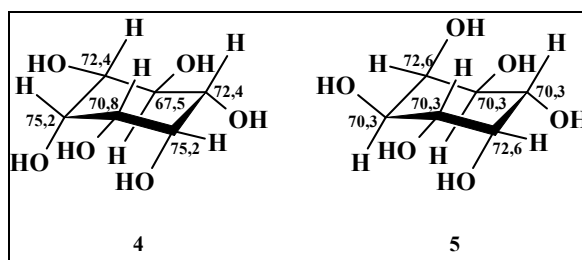


A comparação dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  dos inositóis e seus derivados (TABELA 15, pág. 108) revelou alguns dados importantes. Ao observar o comportamento dos compostos 2, 2a, 2b (QUADRO 19, pág. 109) com relação a posição metoxilada verifica-se que carbonos



QUADRO 19. Comparação dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  entre 2, 2a e 2b.

com grupos hidroxila em axial são desprotegidos quando encontram-se vizinhos a grupos metoxila em equatorial, enquanto grupos hidroxila em equatorial não sentem qualquer efeito da metoxilação do carbono vizinho. Esse comportamento também pode ser observado nos compostos **2d**, **3**, **3a** e **3b**. Além disso, verificou-se que carbonos metoxilados são desprotegidos cerca de 10 ppm de seus valores originais não metoxilados. A comparação dos valores de carbono-13 entre **4** e **5** indica que a presença de dois grupos eletronegativos em posição tipo 1,3-axial com a capacidade de formar ligações de hidrogênio, desprotege seus carbonos cerca de 5 ppm (QUADRO 20, pág. 109).



QUADRO 20. Comparação dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  entre 4 e 5.

Verificando-se então os dados de AU6, pode-se assegurar que não há ocorrência de grupos hidroxila em posição do tipo 1,3-axial; que C-1 encontra-se metoxilado; e que a hidroxila em C-2 encontra-se em axial devido ao deslocamento químico observado para esse carbono. Também é possível assegurar que as posições 4 e 6 não possuem OH axial, o que levaria a desproteção desses carbonos e de C-2. Além disso, as constantes de acoplamento observadas no espectro RMN  $^1\text{H}$  indicam a ocorrência de acoplamentos do tipo axial-equatorial entre H-1 e H-2 (3 Hz) e axial-axial entre H-1 e H-6 (9 Hz). Como H-2 apresentou um único valor de  $J_{\text{H,H}}$  de 3 Hz, é possível afirmar que, além do acoplamento equatorial-axial com H-1, deva ocorrer outro acoplamento do mesmo tipo, ou seja, com o mesmo  $J$ , com H-4. H-4, por sua vez apresenta um acoplamento axial-equatorial com H-3 (3 Hz) e outro axial-axial com H-5 (9 Hz). Esse padrão de acoplamentos assemelha-se aquele observado para o composto **2a**, conhecido como D-1-O-metil-*myo*-inositol. A comparação dos deslocamentos

químicos entre **2a** e AU6 apresenta valores mais desprotegidos para todos os carbonos em **2a**, de cerca de  $0,76 \pm 0,53$  ppm, exceto para C5, cuja diferença é de 4,9 ppm (Dorman, D. E.; Angyal, S. J.; Roberts, J. D. **1970**), possivelmente devido a interações com o dioxano, o solvente originalmente utilizado para a aquisição dos dados para **2a**.

O espectro de RMN 2D  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -NOESY de AU6 (**FIGURA 55**, pág. 115), por sua vez, apresentou apenas uma correlação correspondente a efeito nuclear Overhauser, entre a metoxila em  $\delta_{\text{H}} 3,49$  com o hidrogênio em  $\delta_{\text{H}} 3,66$  (H-1). Os sinais restantes confundem-se com correlações de COSY.

Os resultados obtidos anteriormente possibilitaram garantir inequivocamente que AU6 trata-se de D-1-O-metil-*myo*-inositol, pela primeira vez citado para a espécie.

---



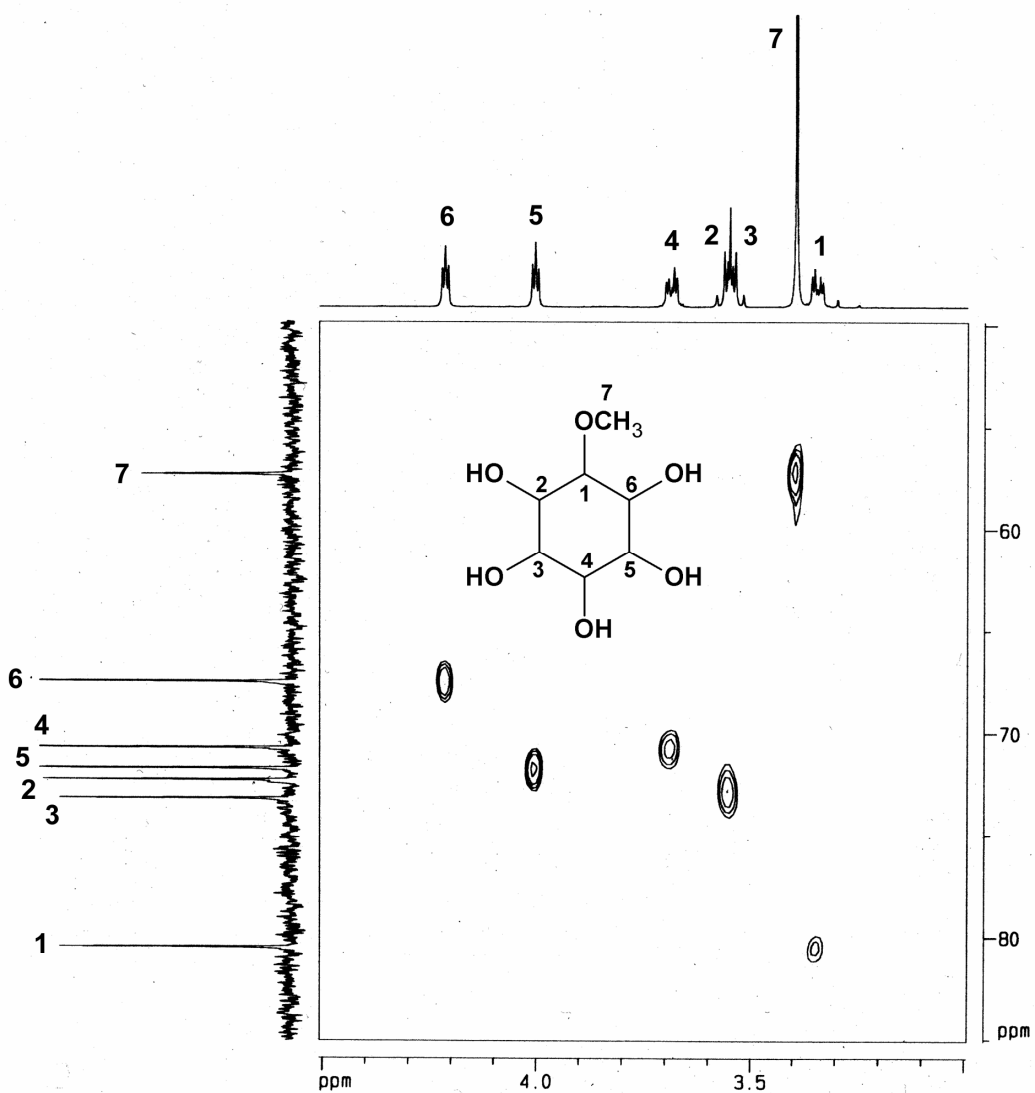


FIGURA 52. Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC de AU6 (500/125 MHz, D<sub>2</sub>O).



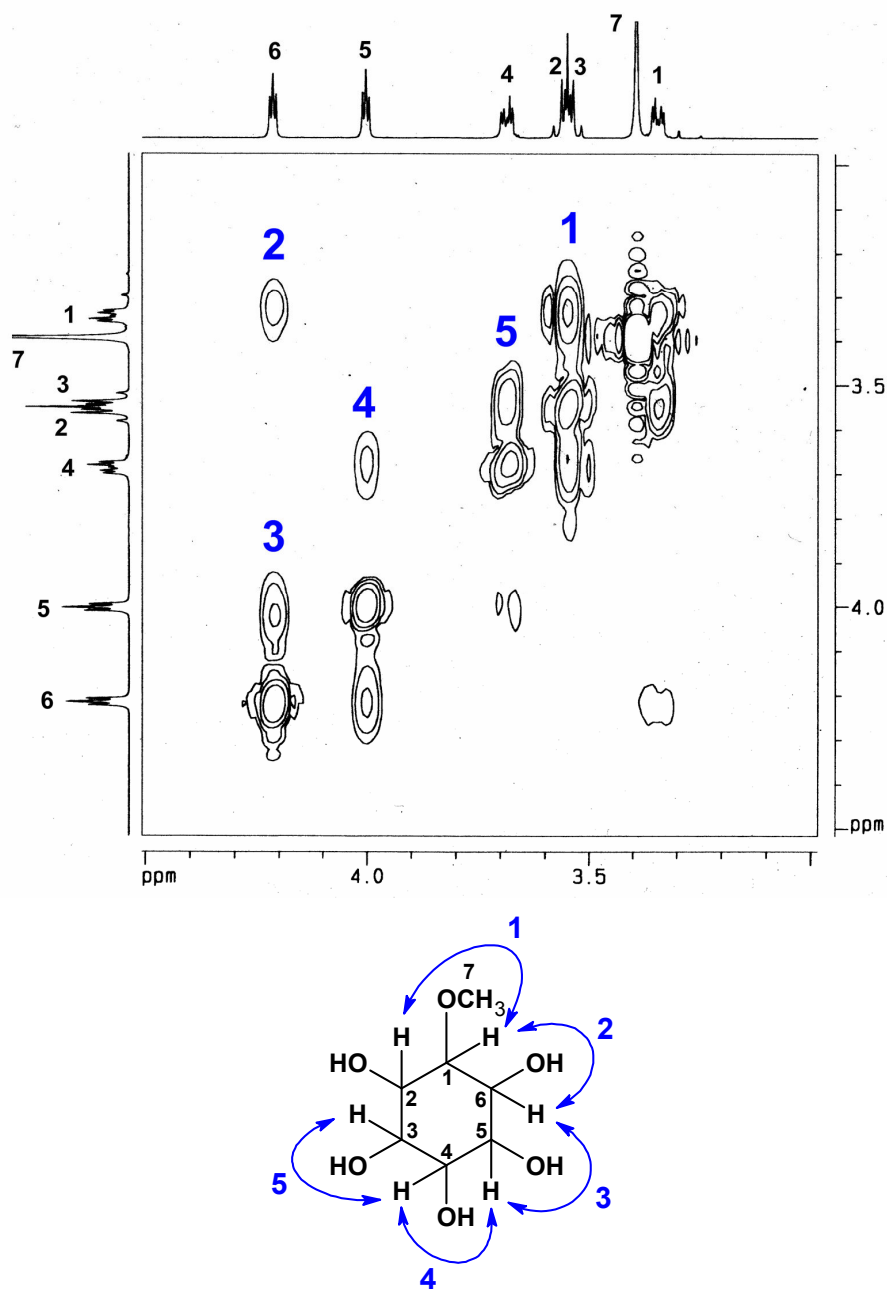


FIGURA 53. Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -COSY de AU6 (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ). As setas numeradas representam as correlações vicinais observadas e sua numeração corresponde a numeração dos picos observados no espectro.

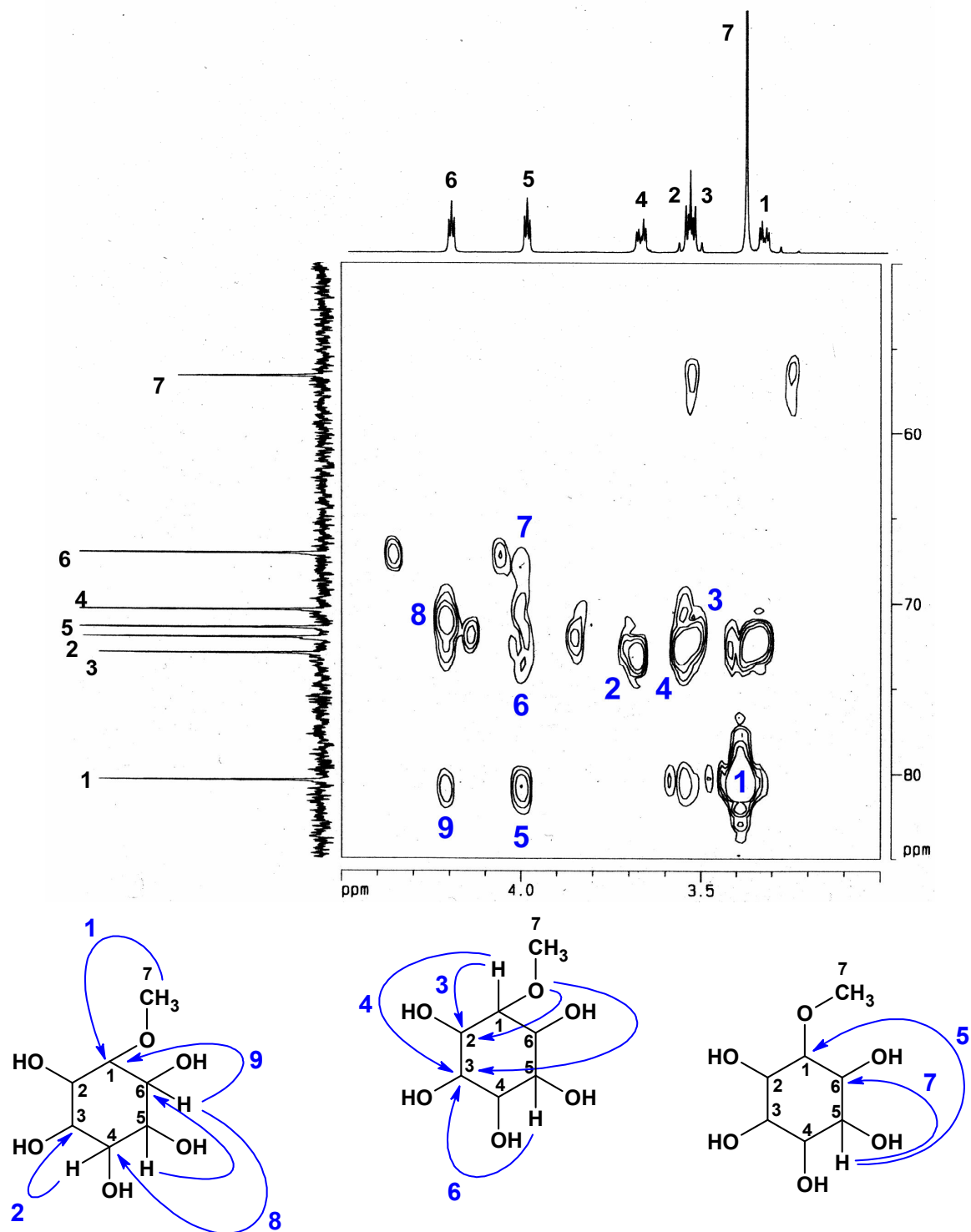
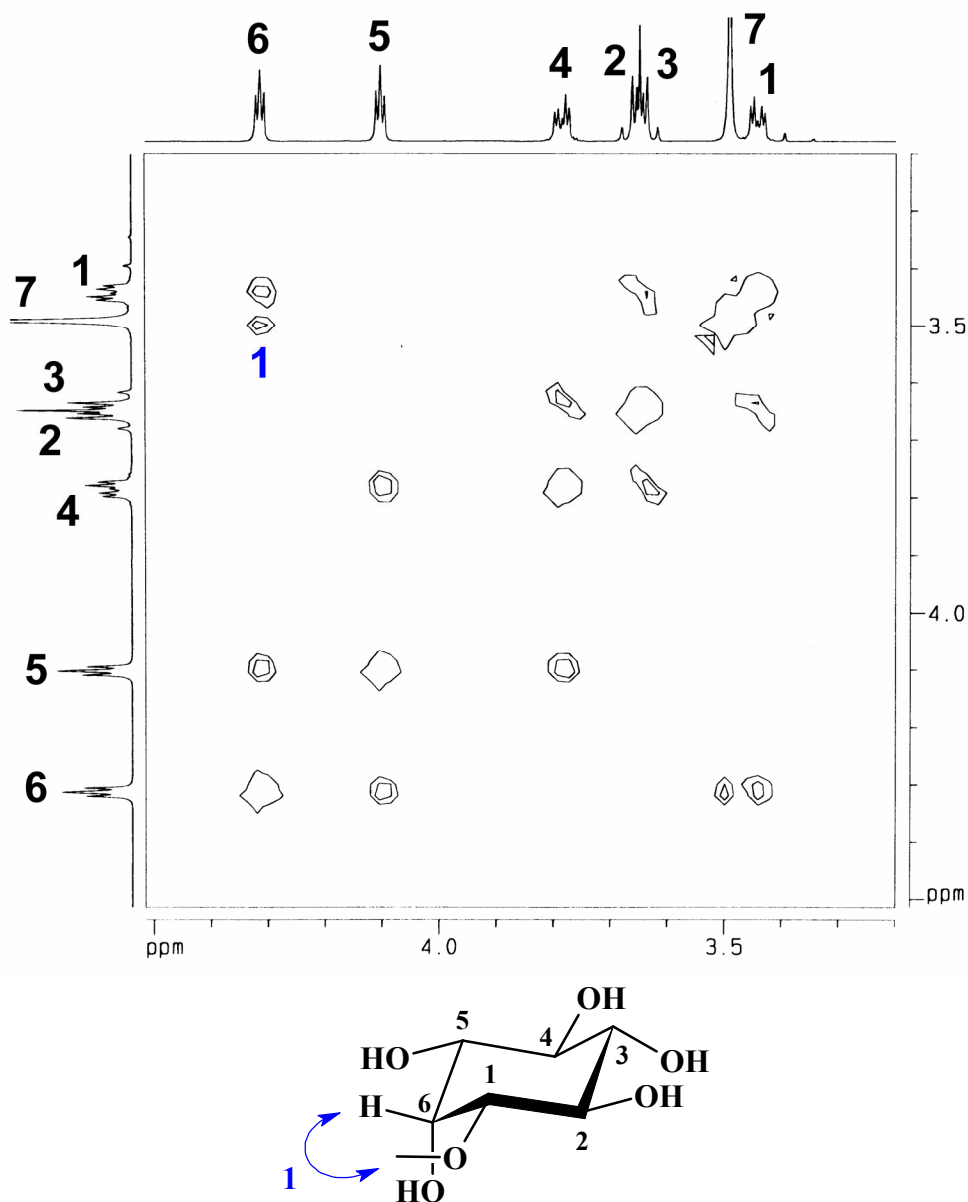


FIGURA 54. Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HMBC de AU6 (500/125 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) com expansões. As setas numeradas representam as principais correlações a longa distância observadas e sua numeração corresponde a numeração dos picos observados no espectro.

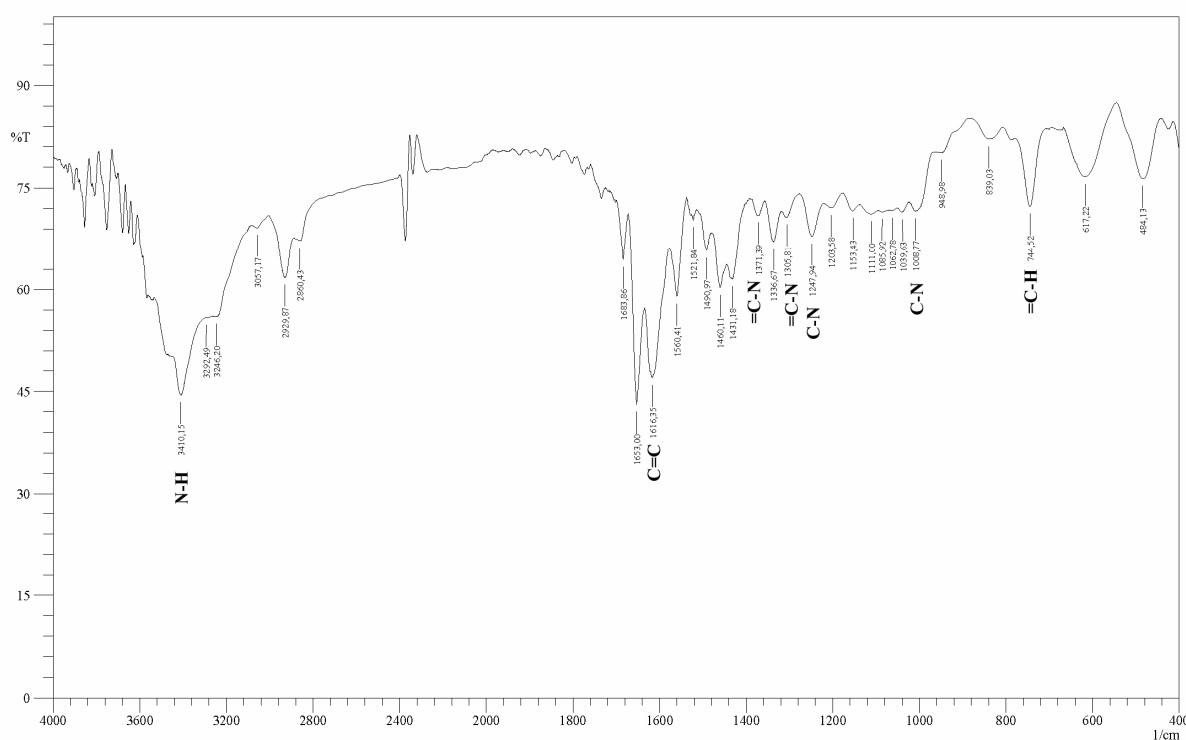


**FIGURA 55.** Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -NOESY de AU6 (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ). A seta numerada representa a correlação dipolar observada e sua numeração corresponde a numeração do pico observado no espectro.

### 3.7 Determinação Estrutural de AU7

O fracionamento cromatográfico do extrato etanólico da casca da raiz de *Aspidosperma ulei* permitiu o isolamento de um sólido branco, de ponto de fusão 209,6-210,9 °C e  $[\alpha]_D^{25} = + 103,3^\circ$  (c 0,33, CH<sub>3</sub>OH), denominado AU7 (ver **Parte Experimental**, pág. 155).

O espectro na região do infravermelho de AU7 (**FIGURA 56**, pág. 116) apresentou absorções correspondentes a vibração de deformação axial de NH para aminas secundárias aromáticas (3410 cm<sup>-1</sup>), vibrações de deformação axial de C-N alifático (1247 e 1008 cm<sup>-1</sup>) e aromático (1371 e 1305 cm<sup>-1</sup>), e deformação angular fora do plano para CH em anéis aromáticos (744 cm<sup>-1</sup>). Além disso, observou-se uma banda de vibração correspondente a deformação axial C=C em sistema vinílico (1616 cm<sup>-1</sup>).



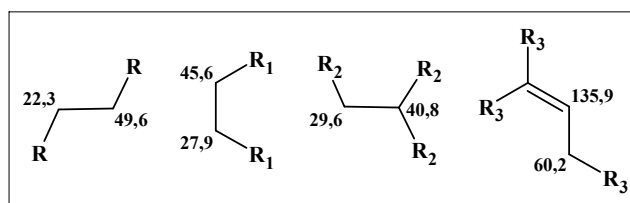
**FIGURA 56.** Espectro na região do infravermelho de AU7.

O espectro de RMN <sup>1</sup>H de AU7 (**FIGURA 57**, pág. 122) apresentou um sinal em  $\delta_H$  11,73, e 4 sinais em  $\delta_H$  7,74 (1H, m), 7,55 (1H, m), 7,29 (1H, m) e 7,27 (1H, m), correspondentes ao hidrogênio do nitrogênio indólico e aos hidrogênios aromáticos do sistema indólico, respectivamente. Observou-se ainda um sinal em  $\delta_H$  6,06 (1H, dd, 5 Hz), correspondente a uma dupla ligação trissubstituída, além de outros sinais em  $\delta_H$  4,82 (2H, m), 4,56 (1H, dt, 4 e 13 Hz), 3,39 (1H, ddd, 4, 9 e 13 Hz), 3,12 (1H, dd, 9 e 13 Hz), 3,03 (1H,

ddd, 4, 9 e 13 Hz), 2,95 (1H, ddd, 4, e 13 Hz), 2,61 (1H, ddd, 3, 9 e 13 Hz), 2,53 (1H, m), 1,84 (1H, m), 1,51 (1H, m) e grupo de sinais entre  $\delta_H$  3,02-2,94.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB de AU7 (**FIGURA 58**, pág. 122) apresentou 17 sinais. Comparação com o espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC editado (**FIGURA 59**, pág. 123) possibilitou determinar o padrão de hidrogenação de cada carbono, além de correlacionar os pares de carbono-hidrogênio, como segue: quatro carbonos aromáticos monohidrogenados em  $\delta_C$  121,8 (7,29), 119,5 (7,27), 118,5 (7,74), 111,6 (7,55); dois carbonos metínicos em  $\delta_C$  60,2 (4,83), 40,8 ( $\delta_H$  2,99); cinco carbonos metilênicos em  $\delta_C$  49,6 ( $\delta_H$  4,56/2,61), 45,6 (3,03/2,53), 29,6 (3,12/2,96), 27,9 (1,84/1,51) e 22,3 (3,29/2,95); e seis carbonos não hidrogenados, ausentes no HSQC editado, em  $\delta_C$  169,4, 139,4, 136,8, 136,2, 129,5 e 111,0. Um carbono em  $\delta_C$  135,9, superposto ao sinal do solvente (piridina- $d_5$ ), foi identificado por sua correlação no HSQC editado com o hidrogênio em  $\delta_H$  6,06, totalizando 18 carbonos para AU7. O sinal em  $\delta_C$  169,4 corresponde possivelmente a uma carbonila de amida, e uma vez que observou-se a ocorrência do NH do sistema indólico, supôs-se que houvesse um outro nitrogênio na molécula para esse grupamento amida.

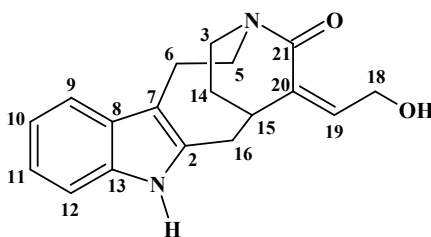
Através do espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC-TOCSY para AU7 (**FIGURA 60**, pág. 124) foi possível identificar quatro pares de carbonos diretamente ligados através das correlações observadas entre  $\delta_H$  6,06 ( $\delta_C$  135,9)  $\leftrightarrow$  4,83 (60,2);  $\delta_H$  4,56/2,61 ( $\delta_C$  49,6)  $\leftrightarrow$  3,29/2,95 (22,3);  $\delta_H$  1,84/1,51 ( $\delta_C$  27,9)  $\leftrightarrow$  3,03/2,53 (45,6); e  $\delta_H$  2,99 ( $\delta_C$  40,8)  $\leftrightarrow$  3,12/2,96 (29,6). Isso indica que cada par de carbonos identificado encontra-se isolado, ligado a um carbono ou heteroátomo não hidrogenado. O **QUADRO 21**, pág. 117, apresenta as subestruturas obtidas através do HSQC-TOCSY. Todos os dados obtidos encontram-se listados na **TABELA 16**, pág. 118.



**QUADRO 21.** Subestruturas de AU7 obtidas a partir do HSQC-TOCSY.

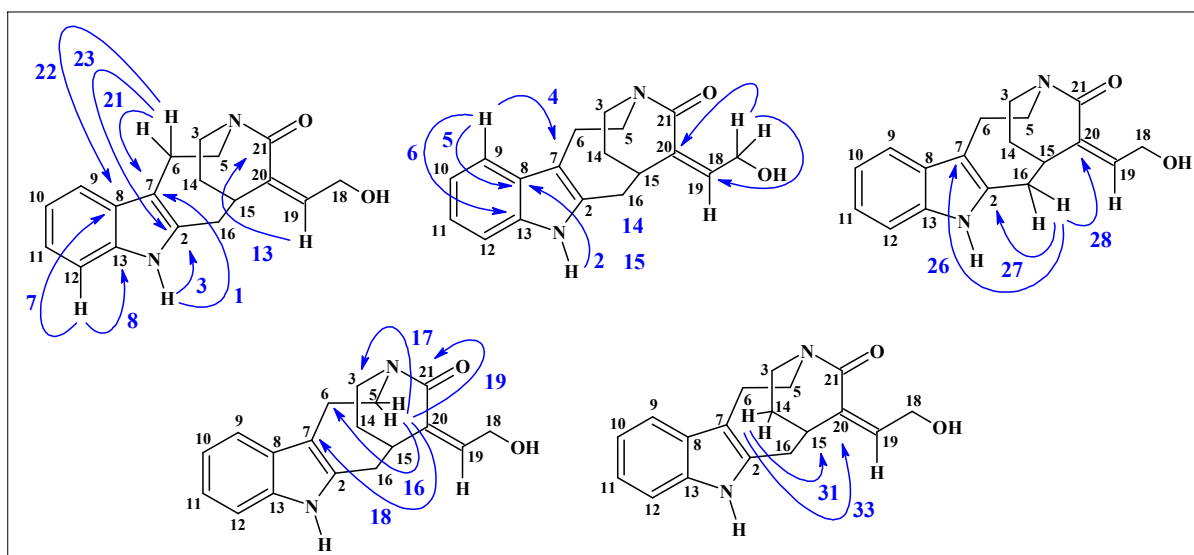
TABELA 16. Dados de RMN 1D e 2D de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  para AU7, em  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$  ( $\delta_{\text{C}}$  123,87;  $\delta_{\text{H}}$  7,22).

	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (mult, J, Int)	HSQC-TOCSY ( $\delta_{\text{C}}$ )
<b>1</b>	---	11,73	---
<b>2</b>	136,2	---	---
<b>3a</b>	45,6	3,03 (ddd, 4, 9 e 13 Hz, 1H)	27,9
<b>3b</b>		2,53 (sl, 1H)	
<b>5a</b>	49,6	4,56 (dt, 4 e 13 Hz, 1H)	22,3
<b>5b</b>		2,61 (ddd, 3, 9 e 13 Hz, 1H)	
<b>6a</b>	22,3	3,29 (ddd, 4, 9 e 14 Hz, 1H)	49,6
<b>6b</b>		2,95 (ddd, 4 e 14 Hz, 1H)	
<b>7</b>	111,0	---	---
<b>8</b>	129,5	---	---
<b>9</b>	118,5	7,74 (m, 1H)	---
<b>10</b>	119,5	7,27 (m, 1H)	---
<b>11</b>	121,8	7,29 (m, 1H)	---
<b>12</b>	111,6	7,55 (m, 1H)	---
<b>13</b>	136,8	---	---
<b>14a</b>	27,9	1,84 (m, 1H)	45,6
<b>14b</b>		1,51 (m, 1H)	
<b>15</b>	40,8	2,99 (m, 1H)	29,5
<b>16a</b>	29,6	3,12 (dd, 9 e 15 Hz, 1H)	40,8
<b>16b</b>		2,96 (m, 1H)	
<b>18</b>	60,2	4,83 (m, 2H)	135,9
<b>19</b>	135,9	6,06 (dd, 5, 1H)	60,2
<b>20</b>	139,4	---	---
<b>21</b>	169,4	---	---



A partir dos dados de acoplamentos a longa distância obtidos através do espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HMBC foi possível correlacionar todos os carbonos não hidrogenados de AU7 (FIGURA 61 a 64, págs. 125 a 129). As correlações entre  $\delta_{\text{H}}$  11,73 (H-1) e os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  136,2 (C-2, 3), 111,0 (C-7, 1) e 129,5 (C-8, 2);  $\delta_{\text{H}}$  7,74 (H-9) e  $\delta_{\text{C}}$  111,0 (C-7, 4), 129,5 (C-8, 5) e 136,8 (C-13, 6);  $\delta_{\text{H}}$  7,55 (H-12) e 129,5 (C-8, 7) e 136,8 (C-13, 8) permitiram

assinalar todos os carbonos não hidrogenados do sistema indólico (**QUADRO 22**, pág. 119). As subestruturas propostas através do HSQC-TOCSY puderam ser conectadas através da observação de correlações entre os hidrogênios em  $\delta_H$  4,56/2,61 (2H-5) com  $\delta_C$  45,6 (C-3, 17); e 1,84/1,51 (2H-14) com 40,8 (C-15, 31). A conexão com o núcleo indólico e o assinalamento das posições dos carbonos C-20 e C-21 foram estabelecidas pelas correlações dos hidrogênios em  $\delta_H$  3,29/2,95 (2H-6) com 136,2 (C-2, 23), 111,0 (C-7, 21) e 129,5 (C-8, 22); 3,12/2,96 (2H-16) com 136,2 (C-2, 27) e 111,0 (C-7, 26); 3,12/2,96 (2H-16), 1,84/1,51 (2H-14) e 4,83 (2H-18) com 139,4 (C-20, 28, 33 e 15, respectivamente); 4,56/2,61 (2H-5), 4,83 (2H-18) e 6,06 (H-19) com 169,4 (C-21, 19, 18 e 13) (**QUADRO 22**, pág. 119). Outras correlações observadas encontram-se nas **FIGURAS 61 a 64**, pág. 125 a 129.

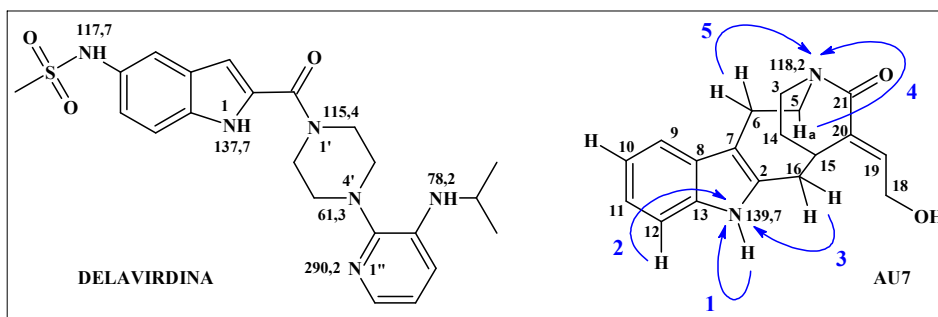


**QUADRO 22.** Estrutura proposta para AU7, e dados de correlações do HMBC.

O espectro de  $^1H,^{15}N$ -HMBC de AU7 (**FIGURA 65**, pág. 130) possibilitou assegurar inequivocamente a posição dos nitrogênios presentes em AU7, através das correlações entre os hidrogênios em  $\delta_H$  11,73 (H-1), 7,55 (H-12) e 3,12/2,96 (2H-16) com o nitrogênio em  $\delta_N$  139,7 (N-1); e 3,29/2,95 (2H-16) com o nitrogênio em  $\delta_N$  118,2 (N-4), além de possibilitar a obtenção de seus deslocamentos químicos. Comparação dos dados de RMN  $^{15}N$  de AU7 com dados da literatura (Martin, G. E.; Hadden, C. E. **2000**), mostraram que os valores observados para N-1, um nitrogênio indólico, e N-4, um nitrogênio terciário de amida, estão de acordo com aqueles observados para nitrogênios do mesmo tipo (**QUADRO 23**, pág. 120).

Pesquisa no SciFinder Scholar v2006, do Chemical Abstracts, mostrou que AU7 ainda não havia sido relatado na literatura. Busca por similaridade estrutural possibilitou obter modelos para comparação de seus dados de  $^{13}C$  (Amat, M. **1996**), os quais se encontram

listados na TABELA 17, pág. 120. Nos isômeros **I** e **II**, observa-se uma carbonila em C-5

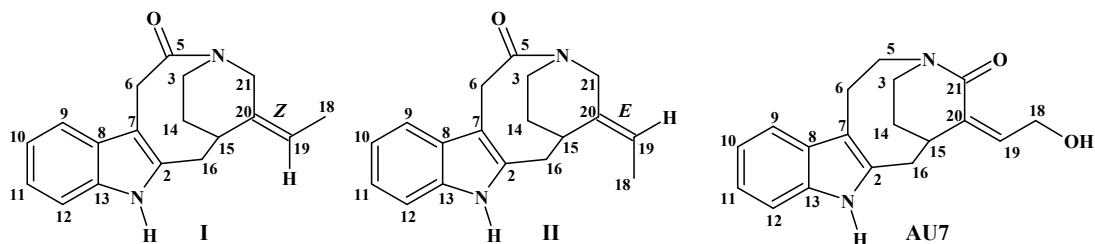


QUADRO 23. Estrutura da delavirdina e estrutura proposta para AU7, comparando os deslocamentos químicos de seus nitrogênios. As setas indicam as correlações observadas no  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HMBC para AU7.

TABELA 17. Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  de AU7 e dados da literatura (Amat, M. 1999).

	AU7	<b>I</b> <sup>1</sup>	<b>II</b> <sup>1</sup>
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$
2	136,2	134,8	134,7
3	45,6	43,3	38,2
5	49,6	172,7	173,3
6	22,3	33,1	33,3
7	111,0	105,3	104,8
8	129,5	128,1	127,8
9	118,5	117,6	117,4
10	119,5	119,3	119,0
11	121,8	121,6	121,3
12	111,6	110,6	110,3
13	136,8	133,6	133,9
14	27,9	25,5	29,7
15	40,8	37,3	38,4
16	29,6	30,3	31,3
18	60,2	12,5	12,4
19	135,9	117,8	118,5
20	139,4	139,1	136,4
21	169,4	43,9	49,1

<sup>1</sup> CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz.

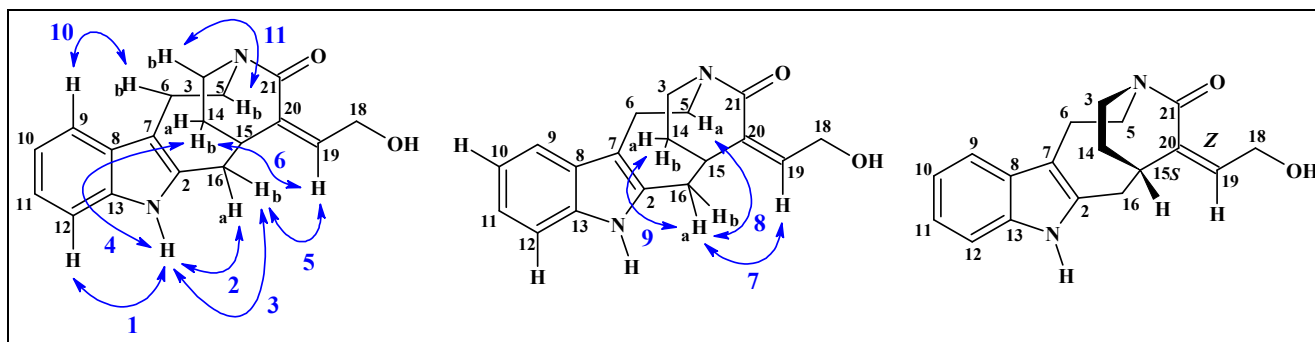


( $\delta_{\text{C}}$  172,7 e 173,3, respectivamente), que apresenta-se em C-21 ( $\delta_{\text{C}}$  169,4) em AU7. Além disso, o carbono metílico C-18 presente em **I** e **II** ( $\delta_{\text{C}}$  12,5 e 12,4, respectivamente) apresenta-



se como um carbono oximetilênico ( $\delta_C$  60,2) em AU7. Os demais sinais apresentam estreita semelhança.

Para estabelecer a configuração da dupla ligação entre C-20 e C-21, optou-se pela obtenção de dados de efeito nuclear Overhauser, através do espectro de RMN  $^1\text{H}$ -NOE seletivo (SELNOE) de AU7 (**FIGURA 67**, pág. 131). A irradiação de H-1 mostrou resposta em H-12 (1,19 %, 1), H-16a (1,45 %, 2), H-16b (0,83 %, 3) e H-14b (0,76 %, 4). A diferença de resposta entre os dois hidrogênios em C-16 indica que H-16a deve estar espacialmente mais próximo de H-1 que H-16b. A irradiação em H-19 mostrou forte resposta em H-16b (5,56 %, 5), e uma resposta muito pequena em H-16a (0,29 %, 7) demonstrando que o hidrogênio H-19 deva posicionar-se em direção a H-16b, conferindo a dupla ligação uma configuração *Z*, como pode ser visto na **FIGURA 67**, pág. 131, e no **QUADRO 24**, pág. 121.



**QUADRO 24.** Correlações observadas no SELNOE para AU7.

Dessa forma, no melhor de nosso conhecimento, AU7 trata-se de 15(*S*)-18-hidroxi-20(*Z*)-16,17-nor-subincanadina E, e é relatado pela primeira vez na literatura.

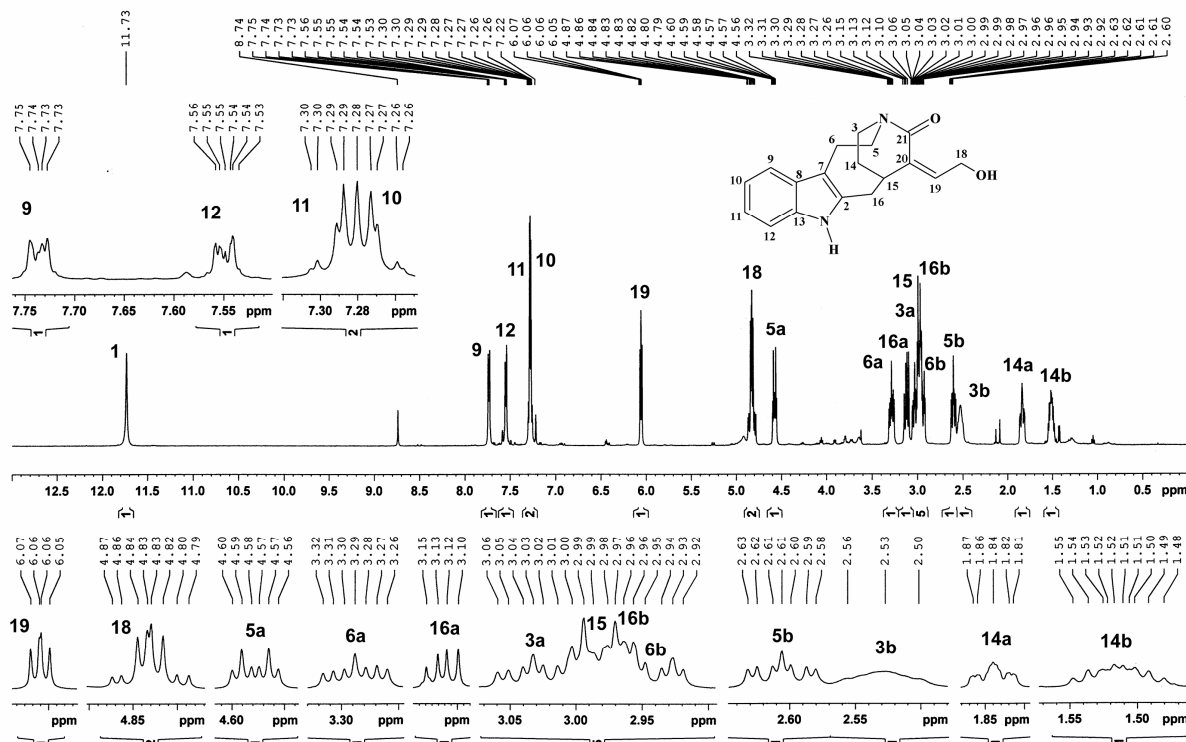


FIGURA 57. Espectro de RMN <sup>1</sup>H de AU7 (500 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) e expansões.

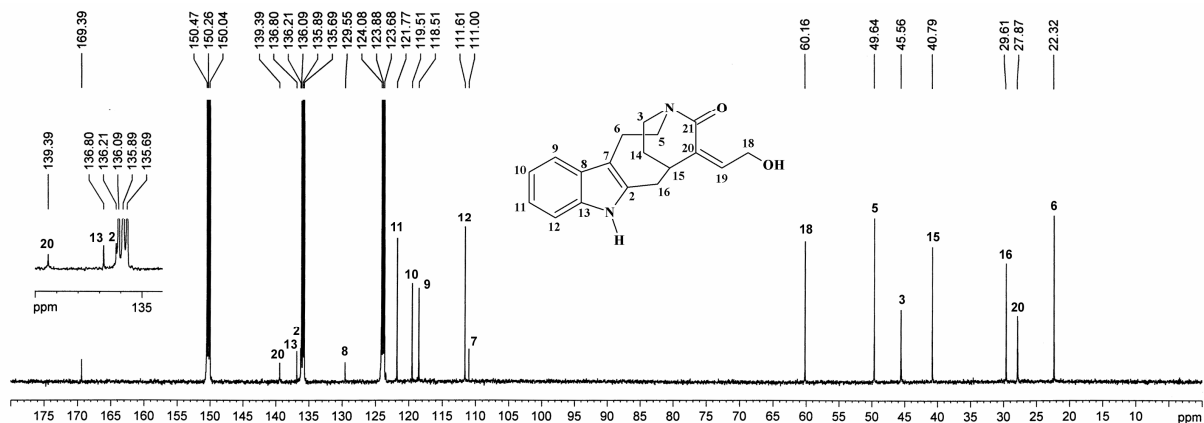


FIGURA 58. Espectro de RMN <sup>13</sup>C-BB de AU7 (125 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N).

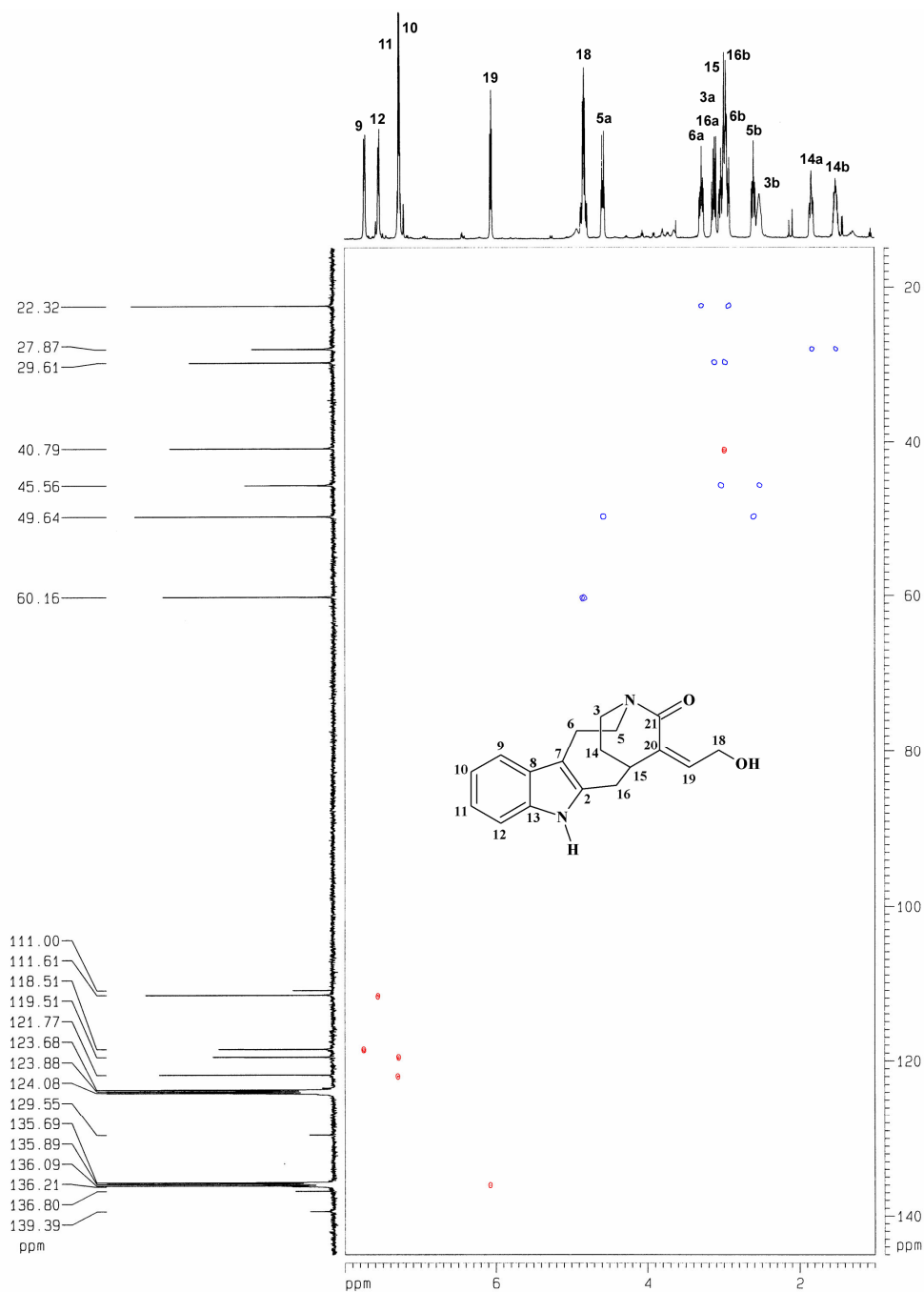


FIGURA 59. Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC editado de AU7 (500/125 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ), com fase positiva (CH e  $\text{CH}_3$ ) em vermelho e negativa ( $\text{CH}_2$ ) em azul.

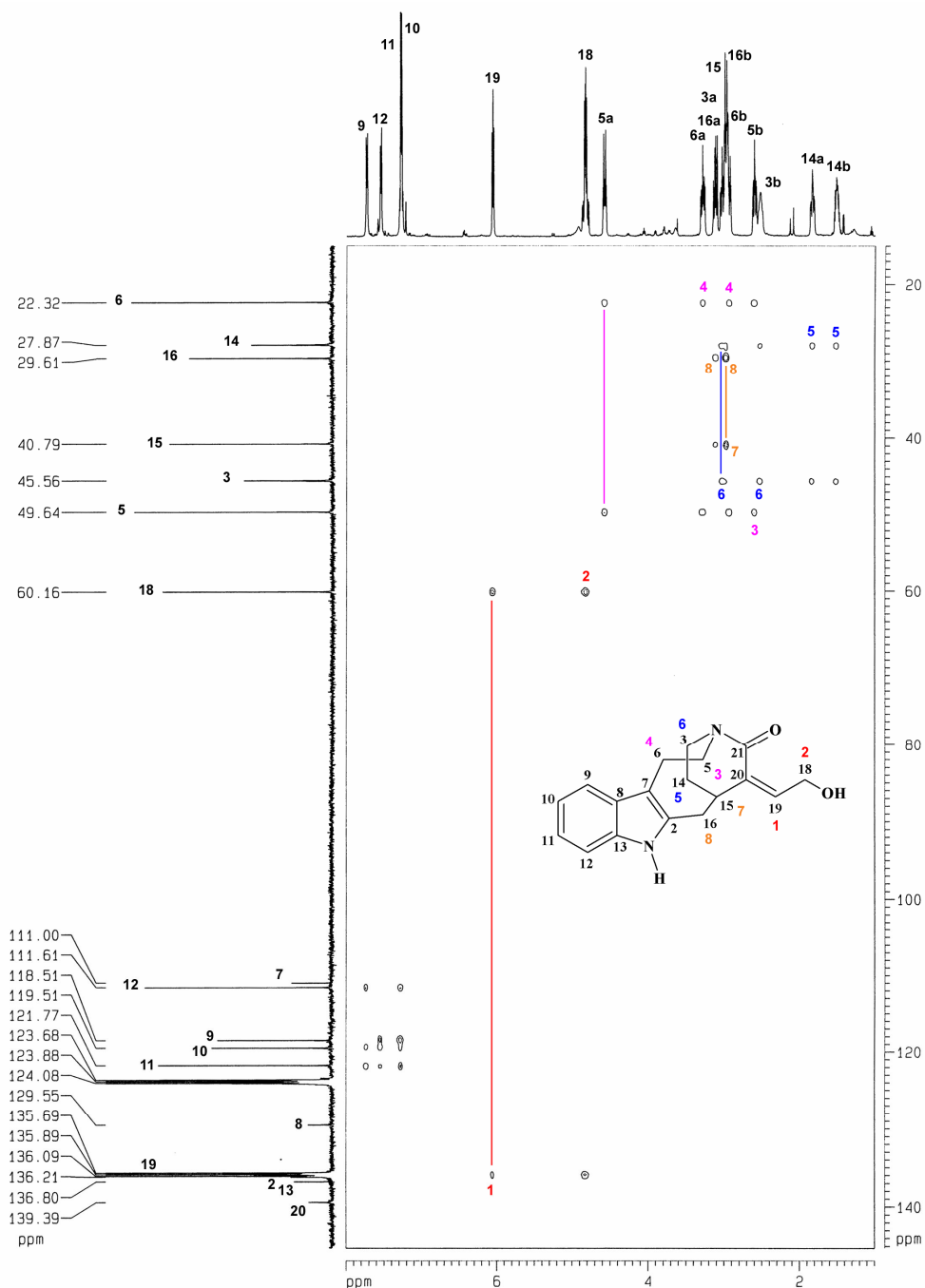


FIGURA 60. Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC-TOCSY de AU7 (500/125 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ). A numeração colorida na estrutura e espectro indica a seqüência observada para os hidrogênios.

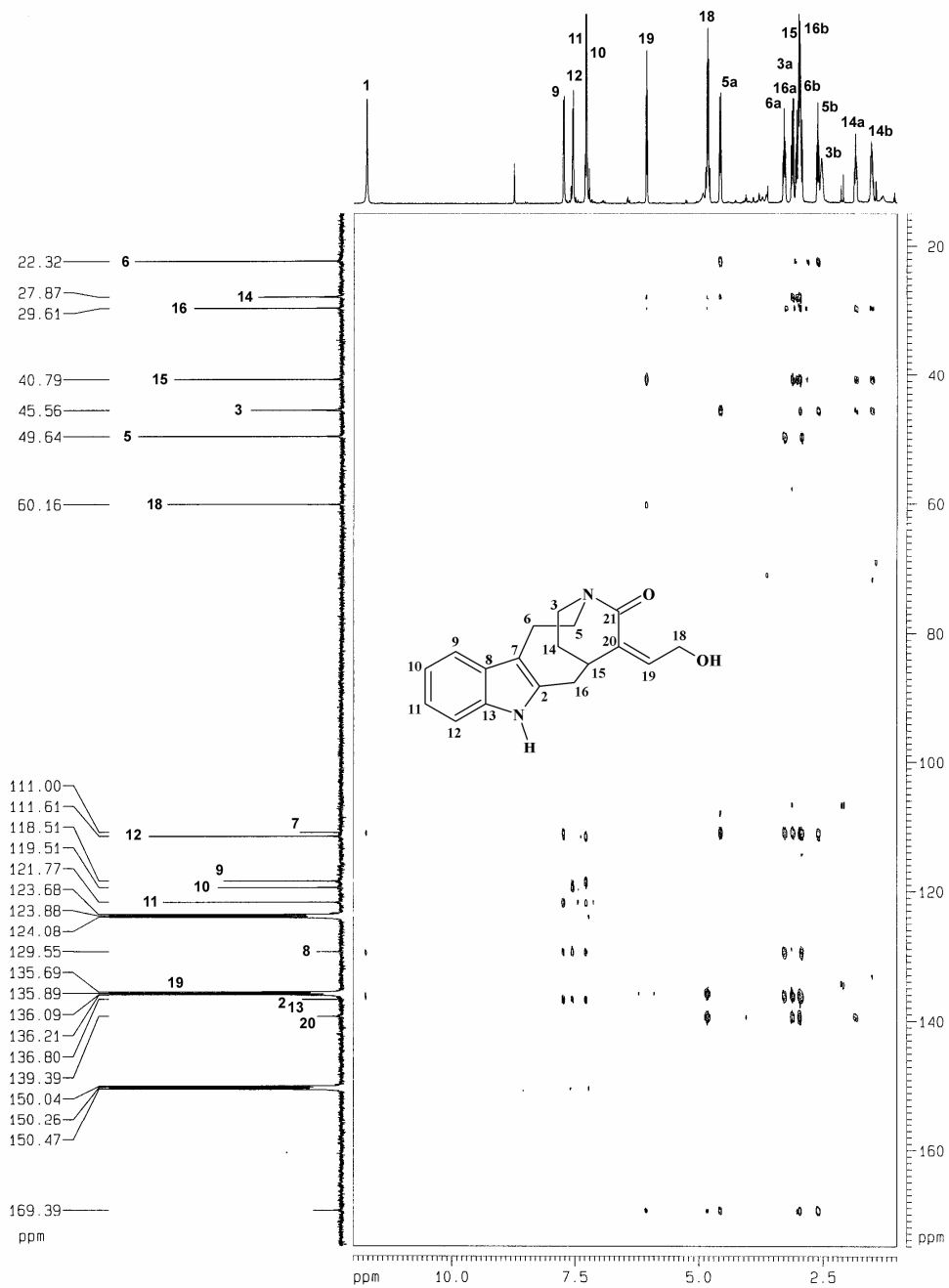
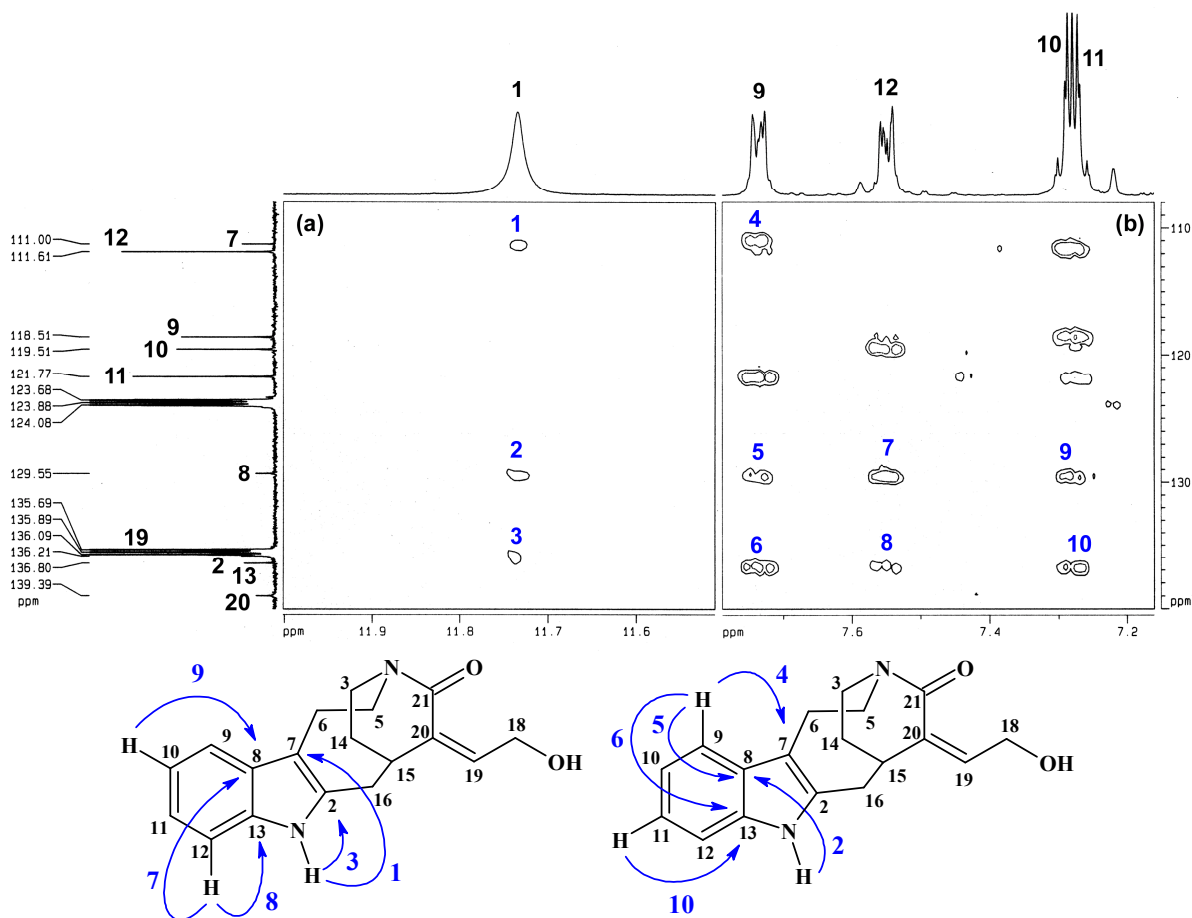
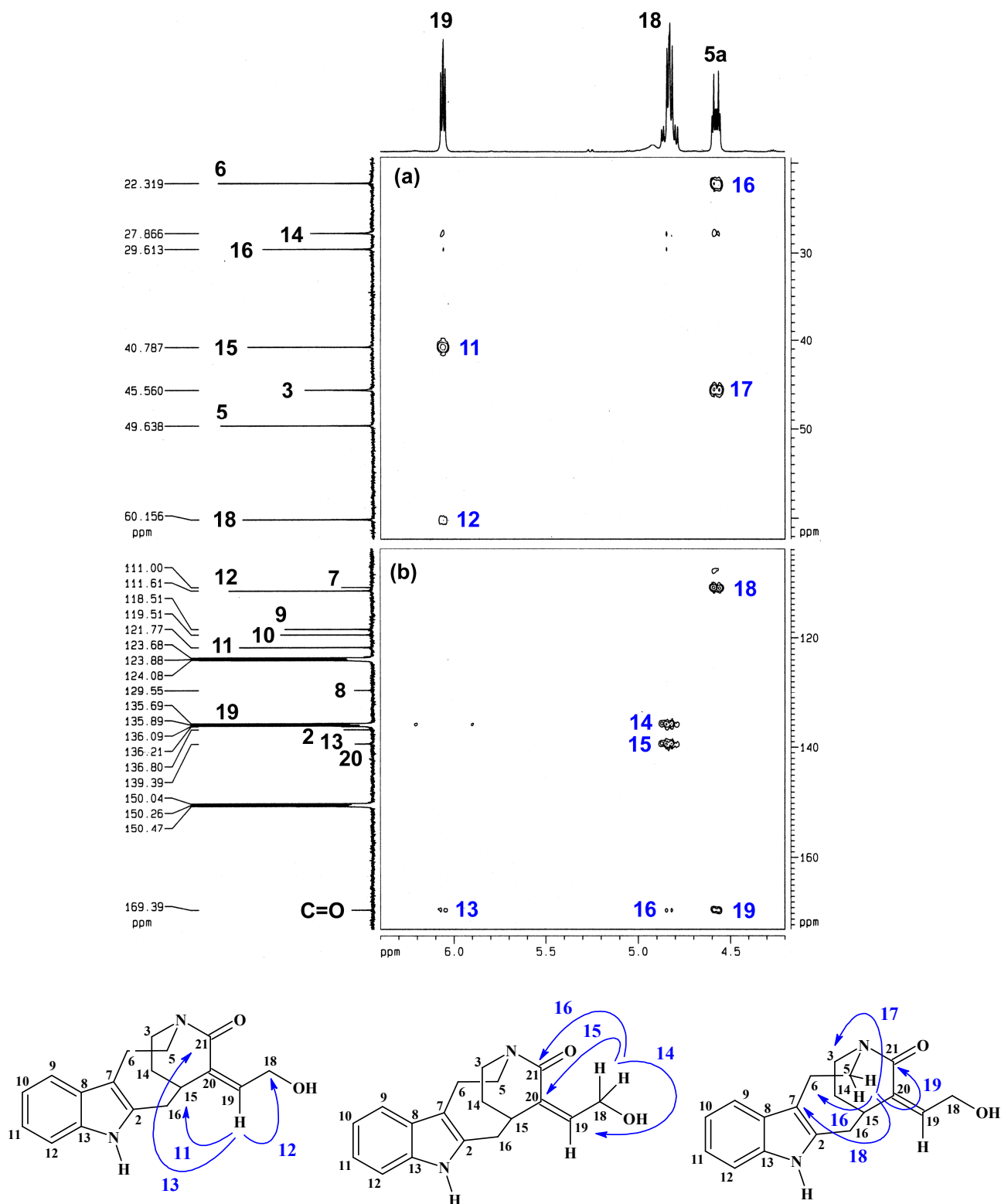


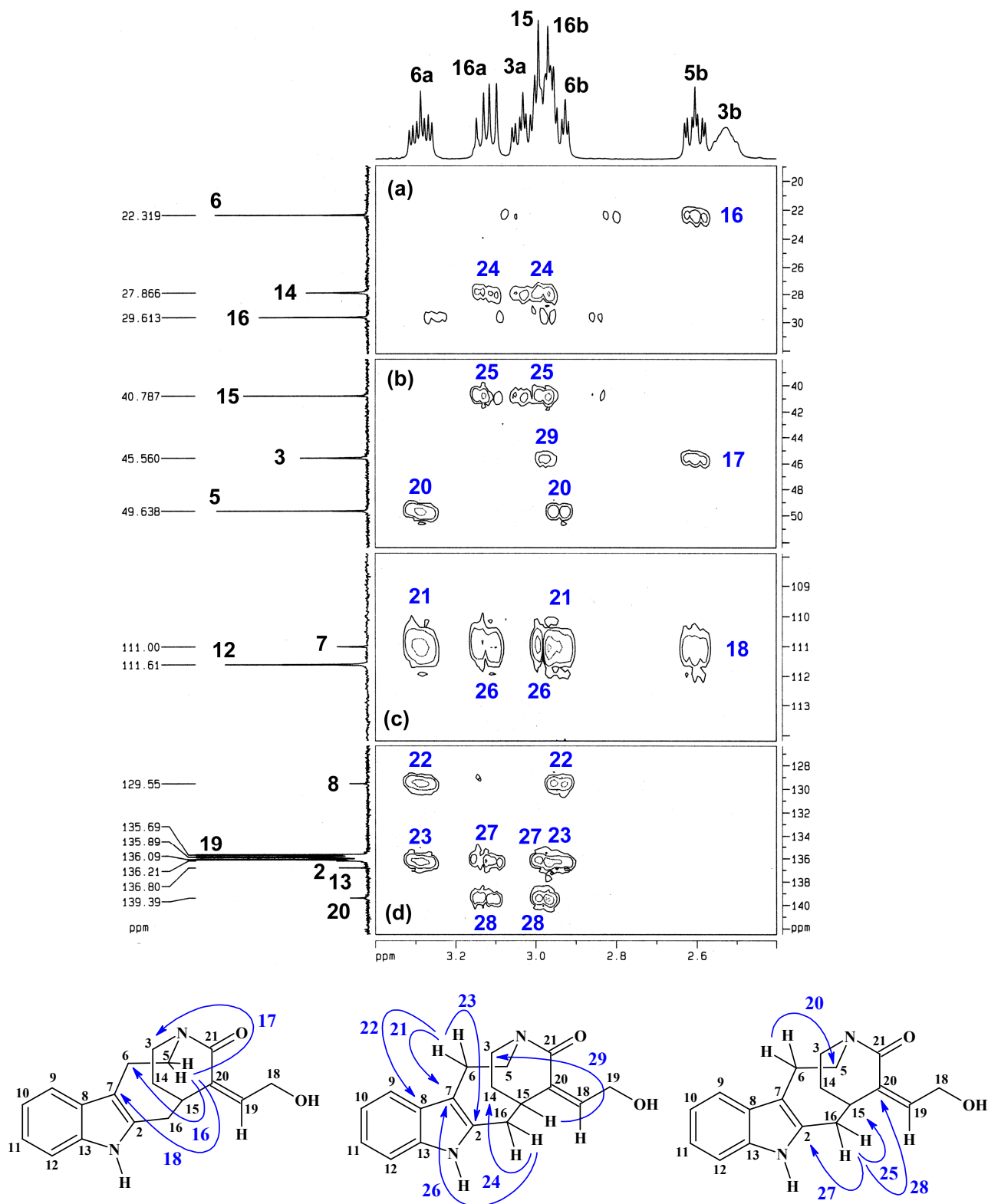
FIGURA 61. Espectro de RMN 2D <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C-HMBC de AU7 (500/125 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N).



**FIGURA 62.** Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HMBC de AU7 (500/125 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ): expansões das regiões entre (a)  $\delta_{\text{H}}$  12,0-11,5/ $\delta_{\text{C}}$  140,0-108,0 ppm e (b)  $\delta_{\text{H}}$  7,75-7,18/ $\delta_{\text{C}}$  140,0-108,0 ppm. As setas numeradas representam as principais correlações a longa distância observadas e sua numeração corresponde a numeração dos picos observados no espectro.

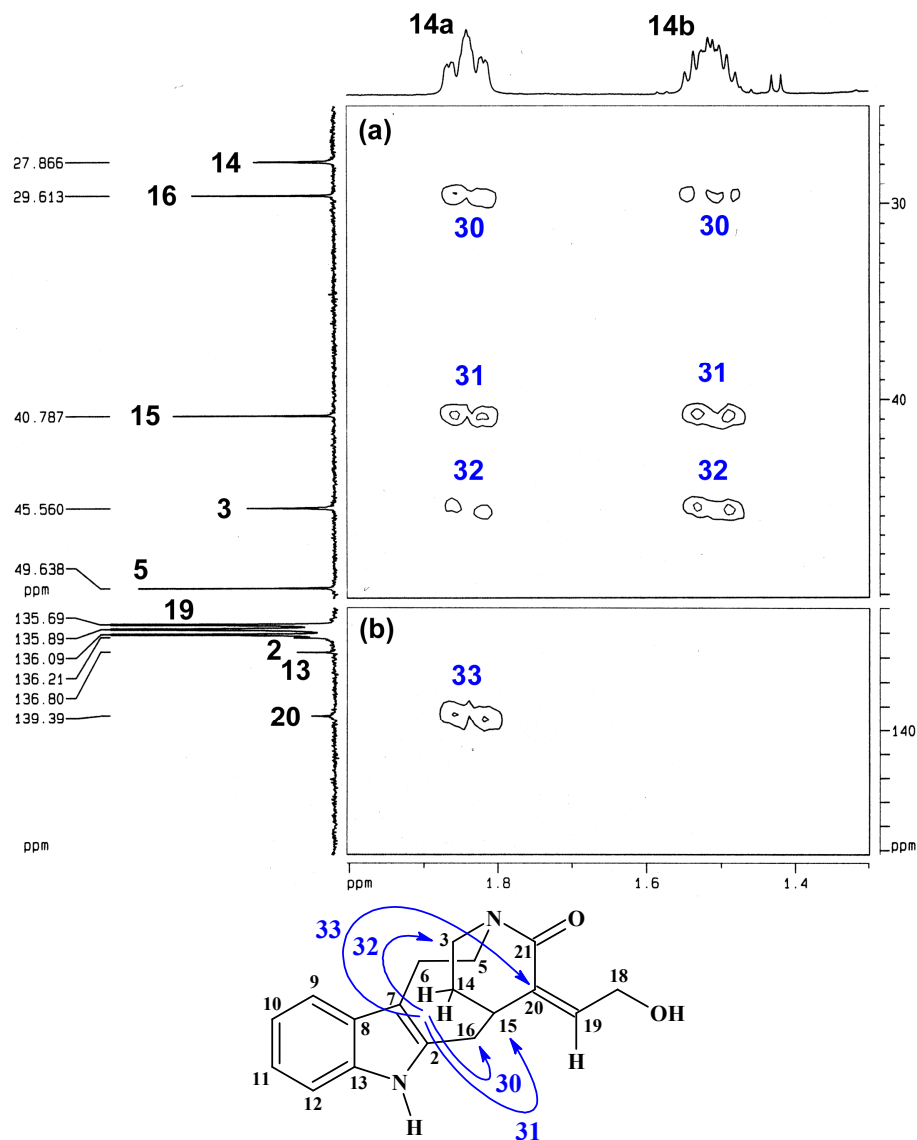


**FIGURA 63.** Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HMBC de AU7 (500/125 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ): expansões da região entre (a)  $\delta_{\text{H}} 6,5-4,0/\delta_{\text{C}} 62,0-20,0$  ppm e (b)  $\delta_{\text{H}} 6,5-4,0/\delta_{\text{C}} 170,0-110,0$  ppm. As setas numeradas representam as principais correlações a longa distância observadas e sua numeração corresponde a numeração dos picos observados no espectro.

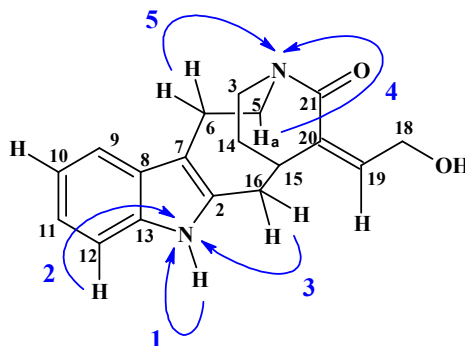
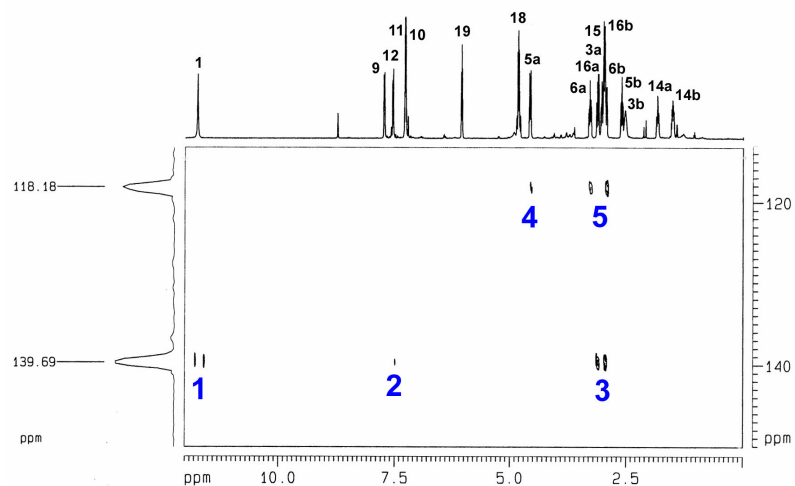


**FIGURA 64.** Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HMBC de AU7 (500/125 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ): expansões das regiões entre (a)  $\delta_{\text{H}}$  3,4-2,4/ $\delta_{\text{C}}$  150,0-127,0 ppm, (b)  $\delta_{\text{H}}$  3,4-2,4/ $\delta_{\text{C}}$  114,0-110,0 ppm, (c)  $\delta_{\text{H}}$  3,4-2,4/ $\delta_{\text{C}}$  52,0-39,0 ppm e (d)  $\delta_{\text{H}}$  3,4-2,4/ $\delta_{\text{C}}$  32,0-19,0 ppm. As setas numeradas representam as principais correlações a longa distância observadas e sua numeração corresponde a numeração dos picos observados no espectro.

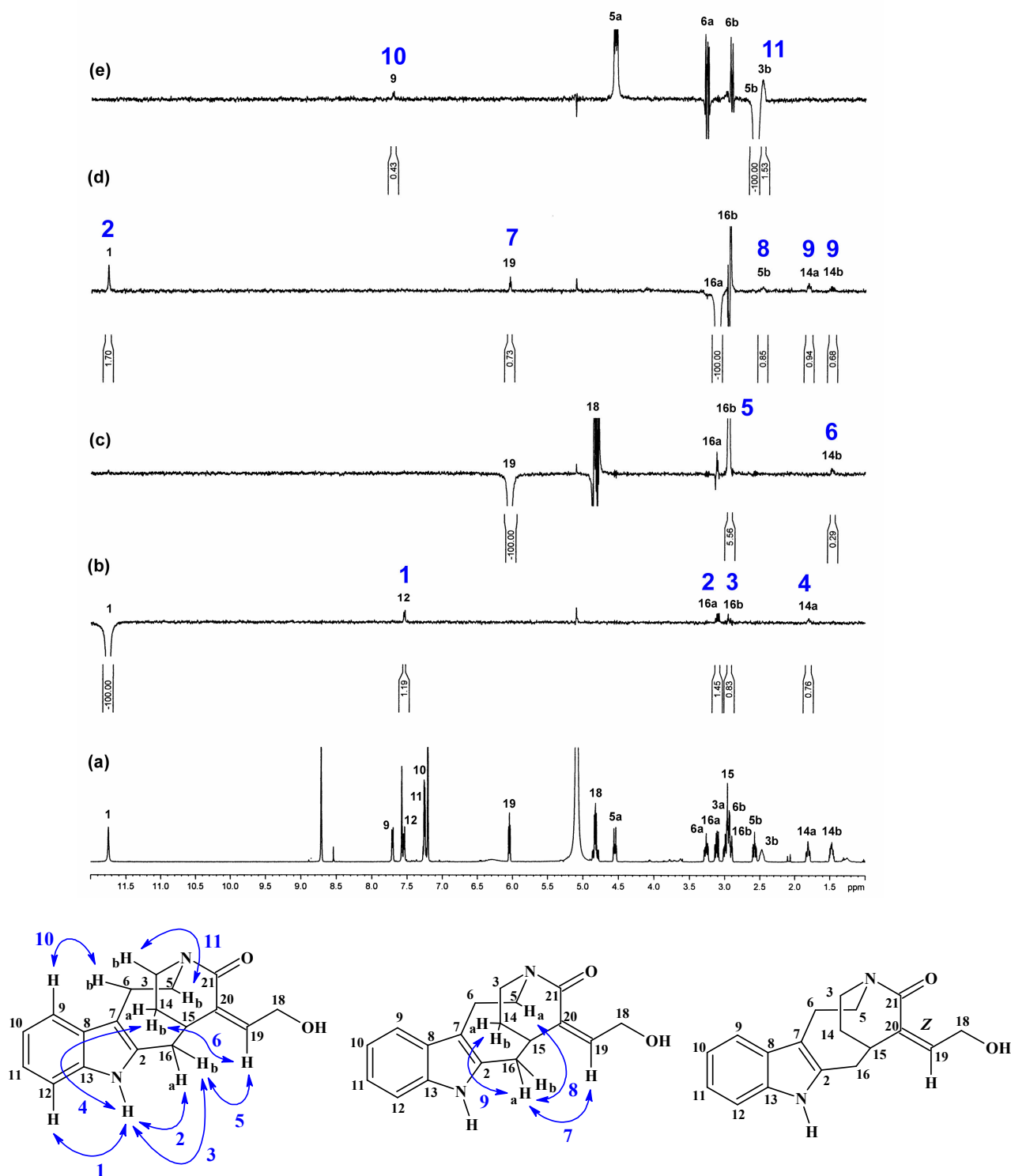




**FIGURA 65.** Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HMBC de AU7 (500/125 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ): expansões das regiões entre (a)  $\delta_{\text{H}}$  2,0-1,3/ $\delta_{\text{C}}$  145,0-135,0 ppm e (b)  $\delta_{\text{H}}$  2,0-1,3/ $\delta_{\text{C}}$  50,0-25,0 ppm. As setas numeradas representam as principais correlações a longa distância observadas e sua numeração corresponde a numeração dos picos observados no espectro.



**FIGURA 66.** Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HMBC de AU7 (500/50,7 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ). As setas numeradas representam as principais correlações a longa distância observadas e sua numeração corresponde a numeração dos picos observados no espectro.

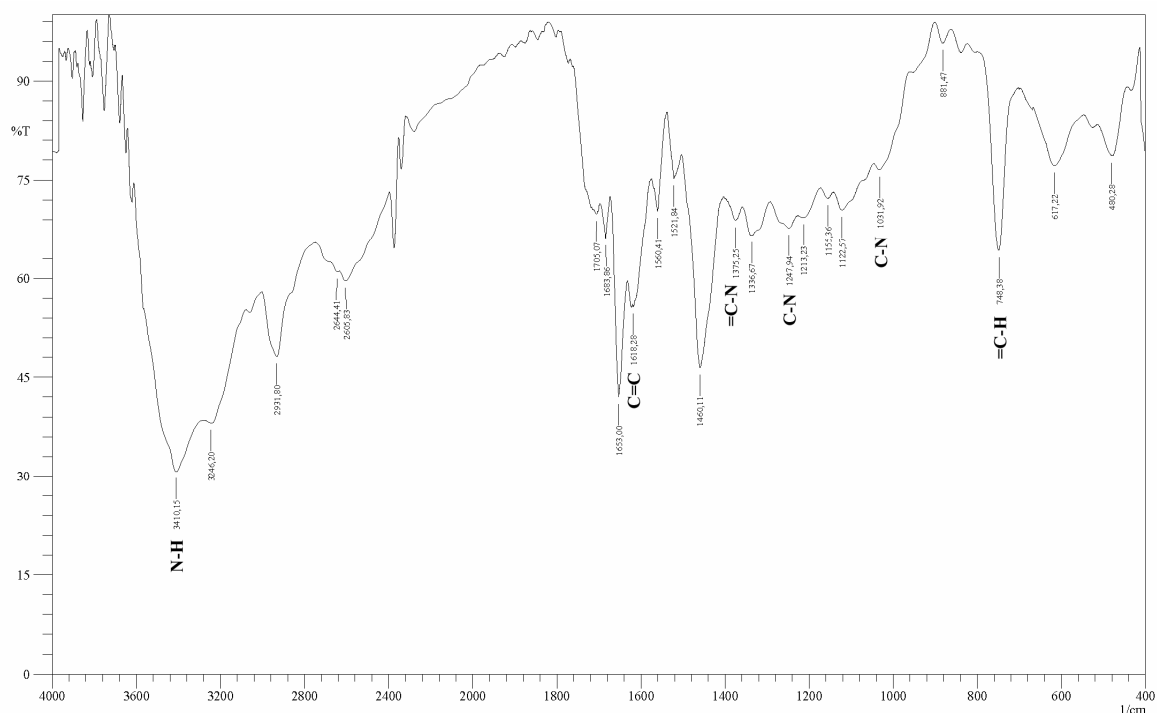


**FIGURA 67.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de AU7 (500 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) (a) não irradiado e RMN 1D  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -NOE seletivo de AU7 (500 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) irradiado em (b)  $\delta_{\text{H}} 11,73$  (NH), (c)  $\delta_{\text{H}} 6,06$  (H16), (d)  $\delta_{\text{H}} 3,12$  (H14a) e (e)  $\delta_{\text{H}} 2,61$  (H5b) ( $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ , 500 MHz). As setas numeradas representam as principais correlações dipolares observadas e sua numeração corresponde a numeração dos picos observados no espectro.

### 3.8 Determinação Estrutural de AU8

O fracionamento cromatográfico do extrato etanólico da casca da raiz de *Aspidosperma ulei* permitiu o isolamento de um sólido claro, de ponto de fusão 229,1-230,4 °C e  $[\alpha]_D^{25} = -36,7^\circ$  (c 0,33, CH<sub>3</sub>OH), denominado AU8 (ver **Parte Experimental**, pág. 155).

O espectro na região do infravermelho de AU8 (**FIGURA 68**, pág. 132) apresentou absorções correspondentes a vibrações de deformação axial de NH para aminas secundárias aromáticas (3410 cm<sup>-1</sup>), vibrações de deformação axial de C-N alifático (1247 cm<sup>-1</sup>) e aromático (1375 cm<sup>-1</sup>), uma banda correspondente a deformação angular fora do plano para CH em anéis aromáticos (748 cm<sup>-1</sup>) e outra banda, correspondente a deformação axial C=C (1618 cm<sup>-1</sup>), indicou a presença de sistema vinílico.



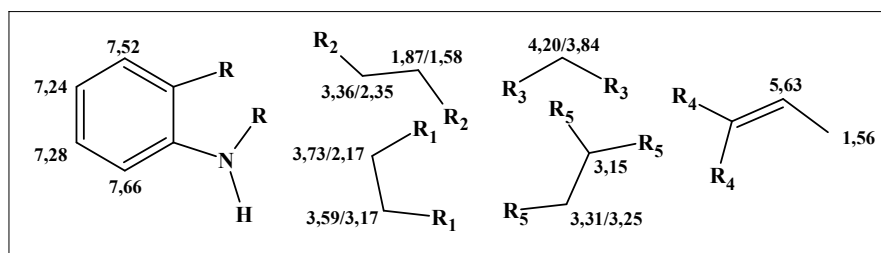
**FIGURA 68.** Espectro na região do infravermelho de AU8.

O espectro de RMN <sup>1</sup>H de AU8 (**FIGURA 69**, pág. 138) apresentou um sinal em  $\delta_H$  12,11, correspondente ao hidrogênio indólico nitrogenado, 4 sinais em  $\delta_H$  7,66 (1H, d, 8 Hz), 7,52 (1H, d, 8 Hz), 7,28 (1H, ddd, 1 e 8 Hz) e 7,24 (1H, ddd, 1 e 8 Hz), correspondente ao sistema aromático indólico, um sinal em  $\delta_H$  5,63 (1H, m), correspondente a uma dupla ligação trissubstituída, um sinal em  $\delta_H$  1,56 (3H, d, 6 Hz), correspondente a um grupamento metila, além de diversos sinais entre 4,5-1,5 ppm, como segue:  $\delta_H$  4,20 (d, 16 Hz, 1H), 3,84 (d, 16

Hz, 1H), 3,73 (dt, 3 e 14 Hz, 1H), 3,59 (ddd, 3, 13 e 16 Hz, 1H), 3,47 (t, 14 Hz, 1H), 3,36 (dd, 9 e 13 Hz, 1H), 3,31 (dd, 8 e 16 Hz), 3,25 (dl, 16 Hz, 1H), 3,17 (m, 1H), 3,15 (m, 1H), 2,35 (td, 7, 13 e 15 Hz, 1H), 1,87 (hept, 8 Hz, 1H), 1,58 (m, 1H) e 1,56 (d, 6 Hz, 3H).

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB de AU8 (**FIGURA 70**, pág 138) apresentou 18 sinais e comparação com o espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC editado de AU8 (**FIGURA 71**, pág. 139) possibilitou determinar o padrão de hidrogenação para cada carbono identificado no RMN  $^{13}\text{C}$ -BB, como segue: quatro carbonos aromáticos monohidrogenados em  $\delta_{\text{C}}$  122,0 (7,28), 120,1 (7,24), 118,3 (7,52), 112,1 (7,66); um carbono metínico em  $\delta_{\text{C}}$  31,2 (3,15); 6 carbonos metilênicos em  $\delta_{\text{C}}$  57,8 ( $\delta_{\text{H}}$  3,73/3,47), 52,3 (4,20/3,84), 44,8 (3,36/2,35), 32,9 (3,31/3,25), 23,2 (1,87/1,58) e 20,9 (3,59/3,17); um carbono metílico em  $\delta_{\text{C}}$  14,0 (1,56); um carbono correspondente a uma dupla ligação trissubstituída em  $\delta_{\text{C}}$  124,9 ( $\delta_{\text{H}}$  5,63); além de 5 carbonos não hidrogenados, ausentes no HSQC editado, em  $\delta_{\text{C}}$  136,8, 136,5, 135,3, 128,3 e 107,9. Os carbonos entre 122,0-118,3 ppm foram correlacionados aos carbonos aromáticos do sistema indólico.

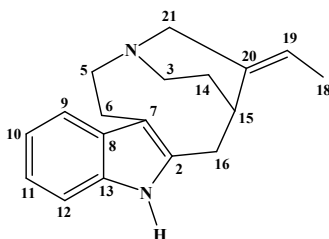
Através do espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC-TOCSY foi possível determinar 4 pares de carbonos em AU8 (**FIGURA 72**, pág. 140), através das correlações entre os hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  1,56 ( $\delta_{\text{C}}$  14,0) e 5,63 (124,9),  $\delta_{\text{H}}$  3,59/3,17 ( $\delta_{\text{C}}$  20,9) e 3,73/2,35 (57,8),  $\delta_{\text{H}}$  1,87/1,58 ( $\delta_{\text{C}}$  23,2) e 3,36/2,35 (44,8), e  $\delta_{\text{H}}$  3,15 ( $\delta_{\text{C}}$  31,2) e 3,31/3,25 (32,9) (**QUADRO 25**, pág. 133). Os hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  4,20/3,84 ( $\delta_{\text{C}}$  52,3) não apresentaram qualquer correlação, indicando que os mesmos encontram-se isolados por carbonos não hidrogenados ou heteroátomos na molécula, enquanto os hidrogênios  $\delta_{\text{H}}$  3,36/2,35 ( $\delta_{\text{C}}$  44,8) e 1,87/1,58 (23,2) apresentaram correlações com o hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  3,15 ( $\delta_{\text{C}}$  31,2) ou 3,31/3,25 (32,9), mas a superposição dos sinais não permitiu assegurar a conectividade entre esses carbonos. Os dados de RMN para AU8 encontram-se listados na **TABELA 18**, pág. 134.



**QUADRO 25.** Subestruturas obtidas a partir dos dados de COSY e HSQC-TOCSY para AU8.

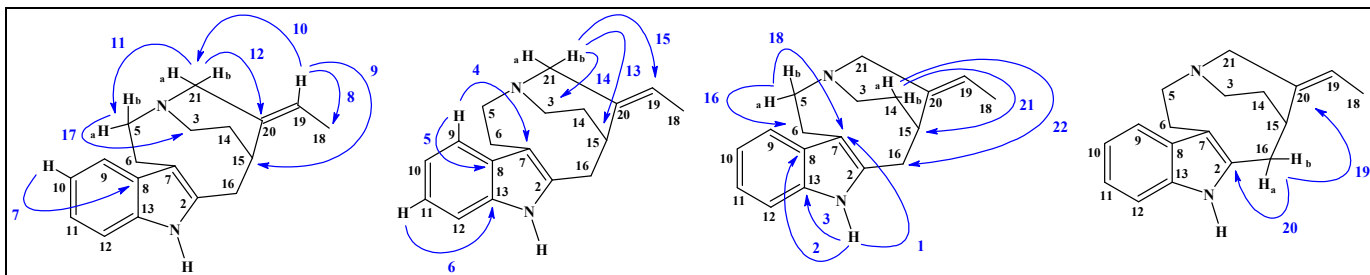
TABELA 18. Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  de AU8, em  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$  ( $\delta_{\text{C}}$  123,87;  $\delta_{\text{H}}$  7,22).

	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (mult, <i>J</i> , Int)	HSQC-TOCSY ( $\delta_{\text{C}}$ )
<b>1</b>	---	12,11	---
<b>2</b>	136,5	---	---
<b>3a</b>	44,8	3,36 (dd, 9 e 13 Hz, 1H)	23,2
<b>3b</b>		2,35 (td, 7, 13 e 15 Hz, 1H)	
<b>5a</b>	57,8	3,73 (dt, 3 e 14 Hz, 1H)	20,9
<b>5b</b>		3,47 (t, 14 Hz, 1H)	
<b>6a</b>	20,9	3,59 (ddd, 3, 13 e 16 Hz, 1H)	57,8
<b>6b</b>		3,17 (m, 1H)	
<b>7</b>	107,9	---	---
<b>8</b>	128,3	---	---
<b>9</b>	118,3	7,52 (d, 8 Hz, 1H)	---
<b>10</b>	120,1	7,24 (ddd, 1 e 8 Hz)	---
<b>11</b>	122,0	7,28 (ddd, 1 e 8 Hz, 1H)	---
<b>12</b>	112,1	7,66 (d, 8 Hz, 1H)	---
<b>13</b>	136,8	---	---
<b>14a</b>	23,2	1,87 (hept, 8 Hz, 1H)	44,8
<b>14b</b>		1,58 (m, 1H)	
<b>15</b>	31,2	3,15 (m, 1H)	32,9
<b>16a</b>	32,9	3,31 (dd, 8 e 16 Hz)	31,2
<b>16b</b>		3,25 (dl, 16 Hz, 1H)	
<b>18</b>	14,0	1,56 (d, 6 Hz, 3H)	124,9
<b>19</b>	124,9	5,63 (m, 1H)	14,0
<b>20</b>	135,3	---	---
<b>21a</b>	52,3	4,20 (d, 16 Hz, 1H)	---
<b>21b</b>		3,84 (d, 16 Hz, 1H)	



As correlações a longa distância observadas no espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HMBC para AU8 (FIGURA 73, pág 141) possibilitaram propor a estrutura do QUADRO 26, pág. 135, para AU8. As correlações observadas entre o hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  12,11 (H-1) com  $\delta_{\text{C}}$  107,9 (C-7, 1), 128,3 (C-8, 2) e 136,8 (C-13, 3);  $\delta_{\text{H}}$  3,31/3,25 (2H-16) com os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  136,5 (C-2, 20) e 135,3 (C-20, 19);  $\delta_{\text{H}}$  1,87/1,58 (2H-14) com  $\delta_{\text{C}}$  31,2 (C-15, 21) e 32,9 (C-

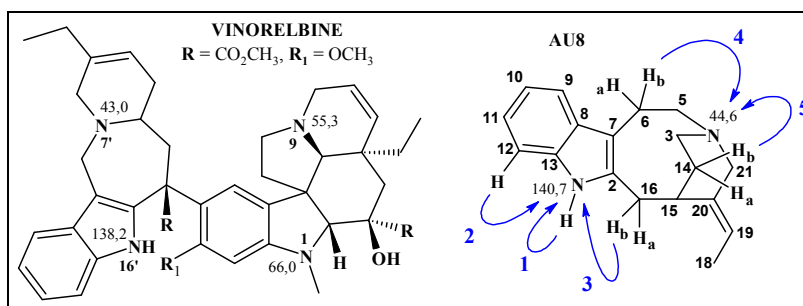
16, 22);  $\delta_H$  5,63 (H-19) com  $\delta_C$  31,2 (C-15, 9), 14,0 (C-18, 9) e 52,3 (C-21, 10);  $\delta_H$  4,20/3,84 (2H-21) com  $\delta_C$  57,8 (C-5, 11) e 135,3 (C-20, 12);  $\delta_H$  3,73/3,47 (2H-5) com  $\delta_C$  44,8 (C-3, 17), 20,9 (C-6, 16) e 107,9 (C-7, 18);  $\delta_H$  7,52 (H-9) com  $\delta_C$  107,9 (C-7, 4) e 128,3 (C-8, 5); e  $\delta_H$  7,28 (H-11) com  $\delta_C$  136,8 (C-13, 6), asseguram a estrutura proposta.



QUADRO 26. Proposta estrutural para AU8, e correlações obtidas a partir do espectro HMBC.

Pesquisa no SciFinder Scholar v2006, do Chemical Abstract, mostrou que AU8 já havia sido relatado na literatura como 16,17-nor-subincanadine E (pf 146-147 °C,  $[\alpha]_D^{25} = -6,64^\circ$  (CD<sub>3</sub>OD, c = 0,5 %), entretanto, nunca fora isolada antes de fonte natural, ocorrendo apenas como intermediário em sínteses de alcalóides de *Strichnos* (Amat, M. *et al.* **1996**; Amat, M. *et al.* **1997**). A comparação dos dados de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C de AU8 e dados da literatura encontram-se listados na TABELA 19, pág. 136. É possível observar boa concordância entre os dados de AU8 e **1**, com diferenças principalmente em torno da dupla ligação, possivelmente devido ao efeito do solvente, enquanto AU8 e **2** mostram diferença principalmente devido a presença de uma dupla ligação terminal entre C-16 e C-17, em **2**.

Correlações a longa distância entre H-1 (1), H-12 (2) e H-16b (3) com N-1 ( $\delta_N$  140,7), e H-6b (4) e H-14b (5) com N-4 ( $\delta_N$  44,6) foram obtidos através do espectro de RMN 2D <sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C-HMBC (FIGURA 74, pág. 142). Comparação desses dados com dados da literatura possibilitou confirmar os tipos de nitrogênios encontrados para AU8, um nitrogênio hidrogenado indólico, N-1, e um nitrogênio não hidrogenado terciário, N-4 (QUADRO 27, pág. 135).

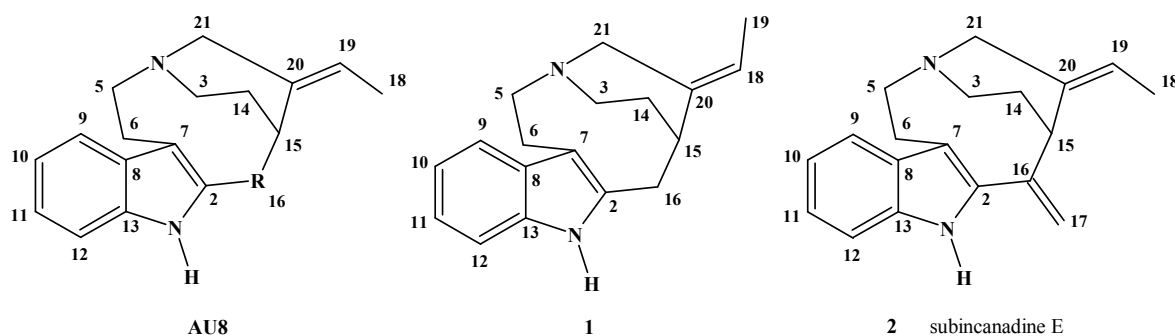


QUADRO 27. Comparação dos dados de <sup>15</sup>N de AU8 e dados da literatura, e correlações a longa distância obtidas do espectro <sup>1</sup>H,<sup>15</sup>N-HMBC.

TABELA 19. Comparação dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  de AU8 e dados da literatura (Amat, M. et al. 1997; Kobayashi, J. et al., 2002).

	AU8	1	2
	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{c}}$
18	14,0	12,5	16,0
6	20,9	24,6	22,7
14	23,2	26,7	28,3
15	31,2	36,8	44,3
16	32,9	36,7	144,7
3	44,8	44,8	48,7
21	52,3	47,7	55,7
5	57,8	57,6	60,1
7	107,9	110,8	110,1
12	112,1	110,4	116,2
9	118,3	117,6	120,1
10	120,1	118,7	121,7
17	---	---	123,1
11	122,0	120,6	125,2
19	124,9	118,6	131,1
8	128,3	128,2	130,9
20	135,3	142,7	133,5
2	136,5	135,2	139,9
13	136,8	135,0	139,9

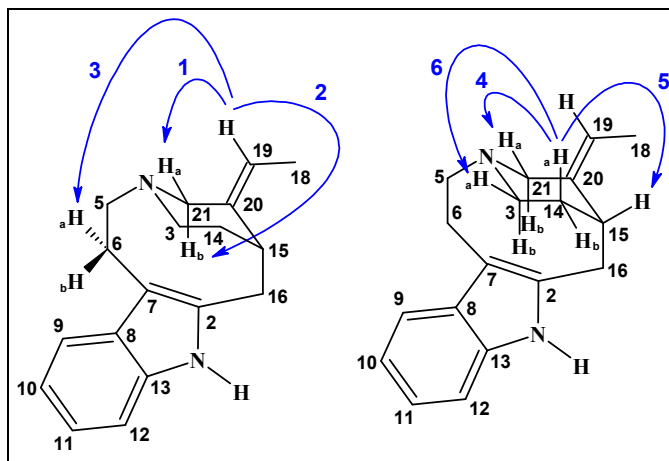
<sup>a</sup>  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$  ( $\delta_{\text{C}}$  123,87;  $\delta_{\text{H}}$  7,22); <sup>b</sup>  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta_{\text{C}}$  77,23;  $\delta_{\text{H}}$  7,27); <sup>c</sup>  $\text{CD}_3\text{OD}$  ( $\delta_{\text{C}}$  49,15;  $\delta_{\text{H}}$  3,31)



A fim de determinar a configuração relativa de C-15 e da dupla ligação em AU8, optou-se pela obtenção de dados de efeito nuclear Overhauser através de espectros de RMN 1D  $^1\text{H}$ -NOE seletivo (SELNOE) (FIGURA 75, pág. 143). A irradiação de H-19 mostrou uma forte resposta em H-21b (1,61 %, 1) além de respostas em H-6a (0,36 %, 3) e H-21a (0,30 %, 2). A irradiação em H-14a mostrou forte resposta em H-3a (1,42 %, 6), H-15 (1,73 %, 5) e H-



21a (1,22 %, 4). Essas interações mostram que a dupla ligação assume uma configuração *Z* (confirmada pelo nOe entre H-19 e H-21b/H-21a), enquanto C-15 adota uma configuração *S*, como pode ser visto no **QUADRO 28**, pág. 137.



**QUADRO 28.** Correlações do SELNOE para AU8.

Com os dados de RMN obtidos para AU8 é possível assegurar que AU8 trata-se de 15*S*-16,17-nor-subincanadina E, e está sendo relatado pela primeira vez para a espécie, e como produto natural.

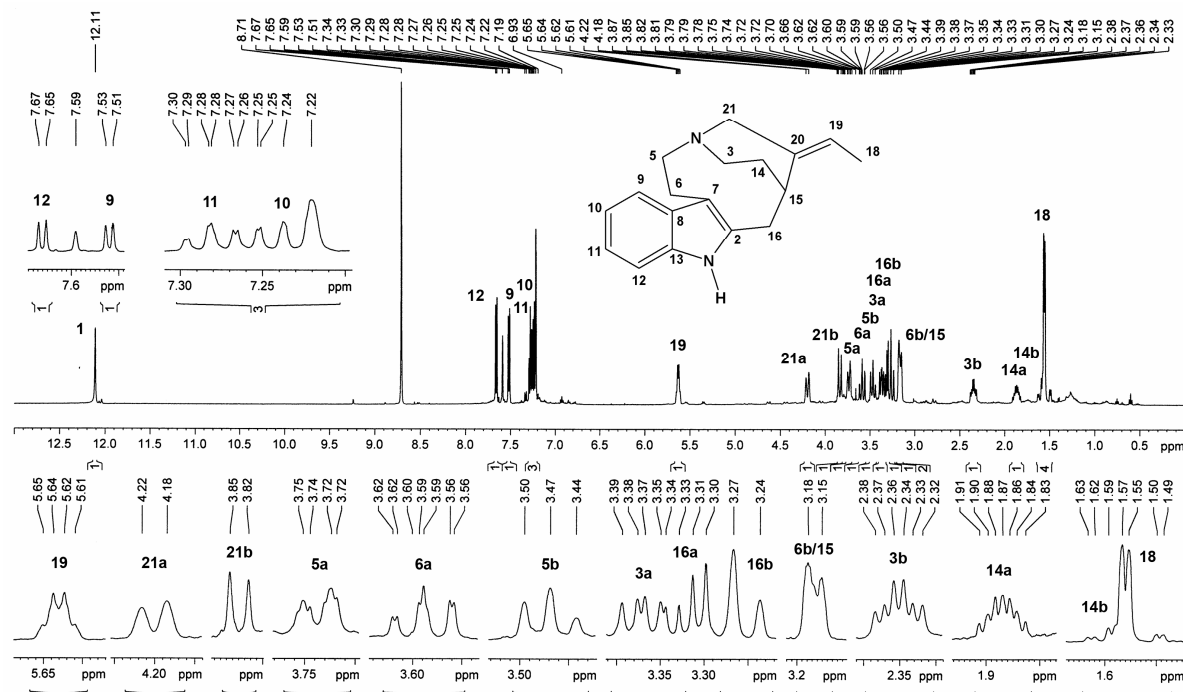


FIGURA 69. Espectro de RMN <sup>1</sup>H de AU8 (500 MHz, C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N) e expansões.

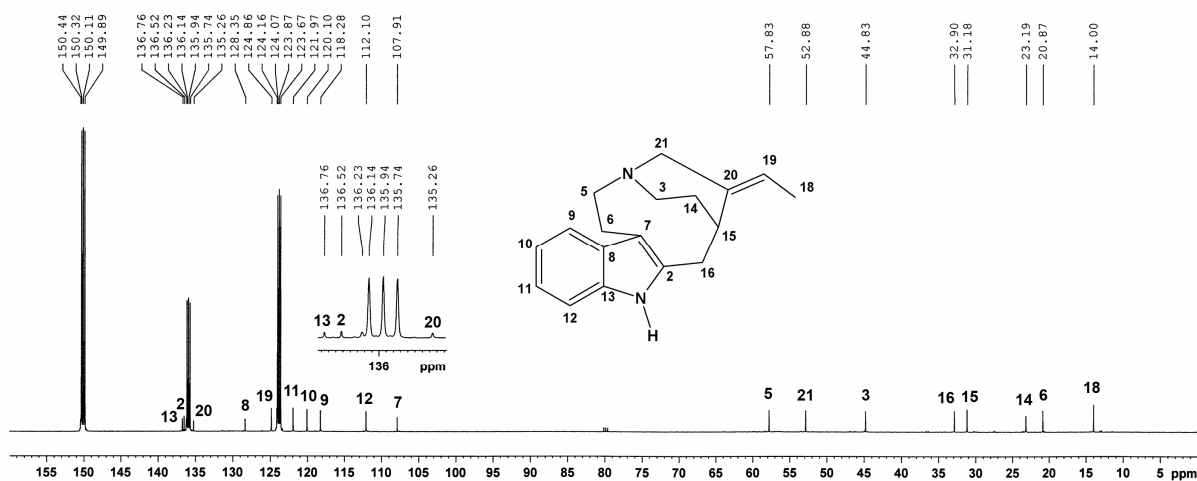
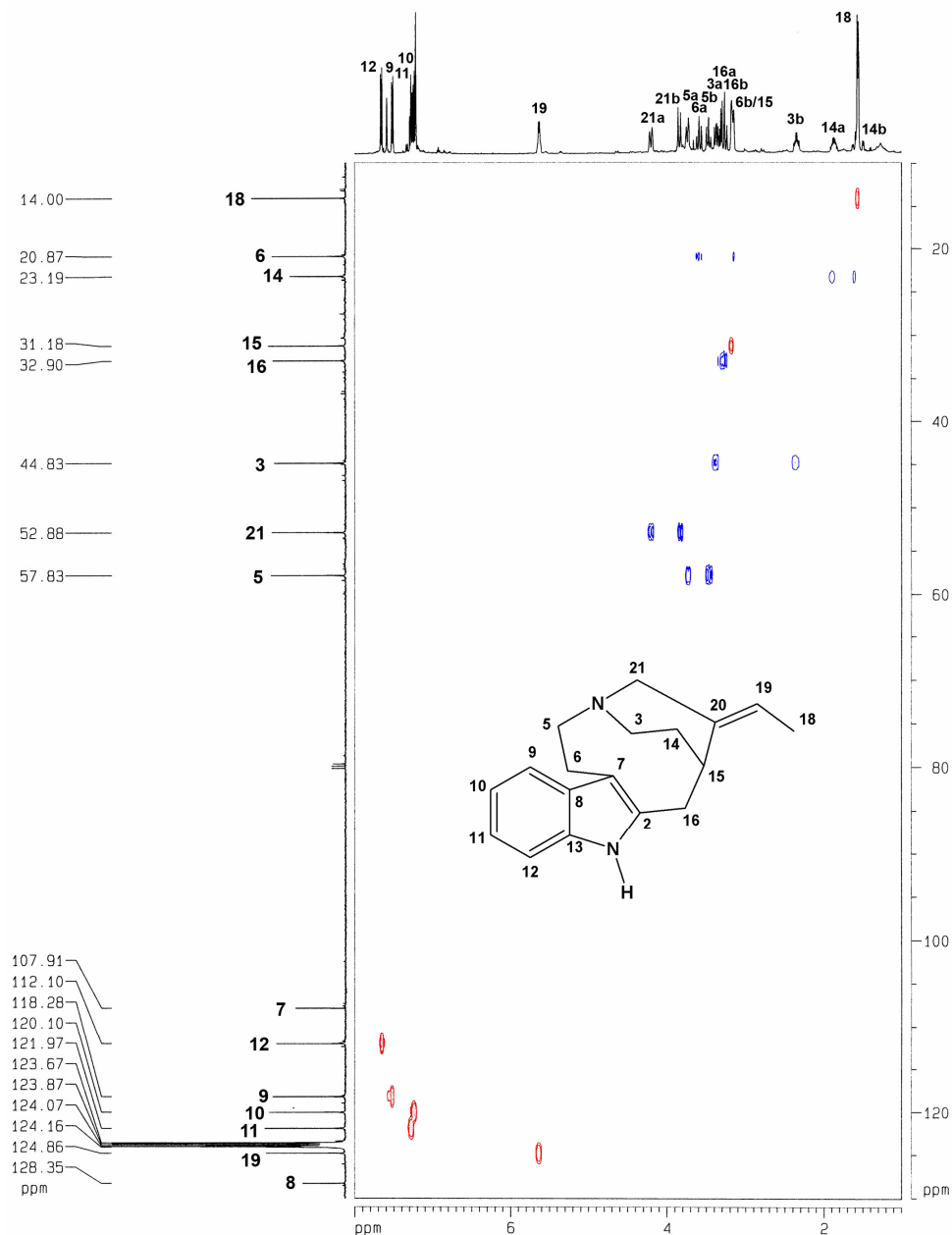
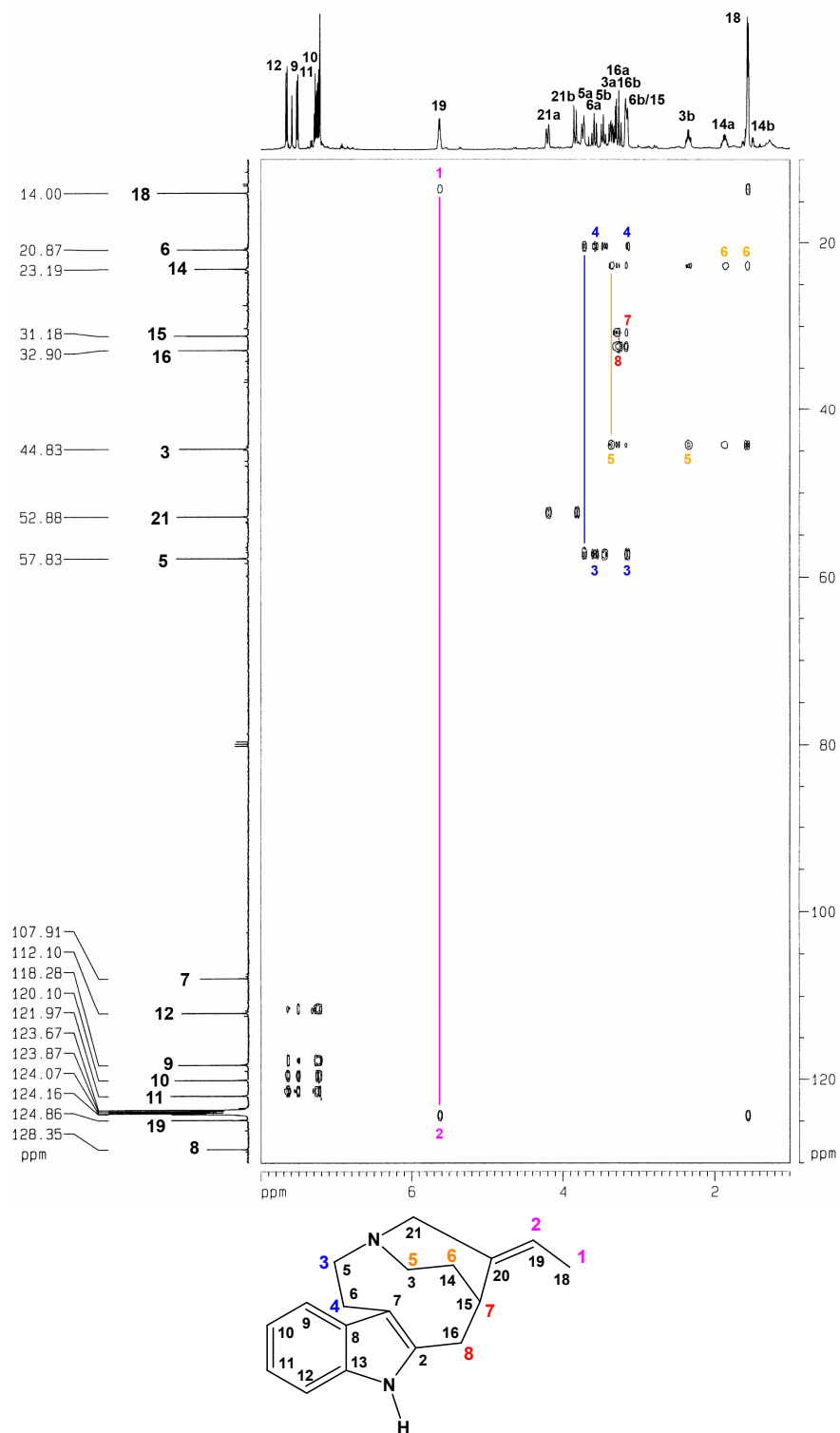


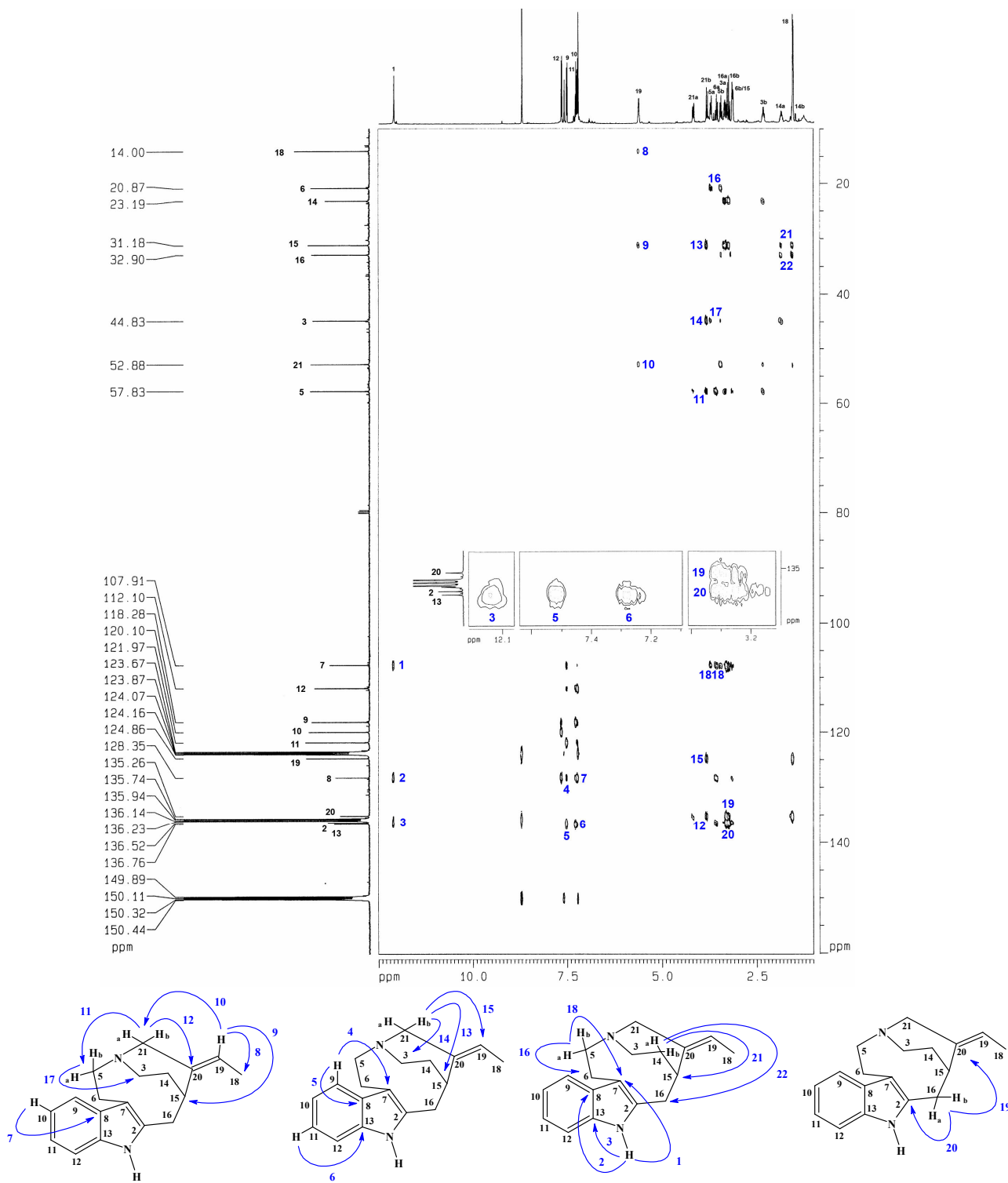
FIGURA 70. Espectro de RMN <sup>13</sup>C-BB de AU8 (125 MHz, C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N).



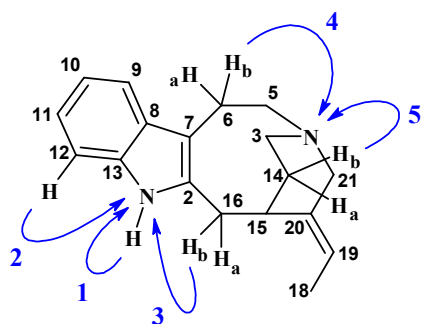
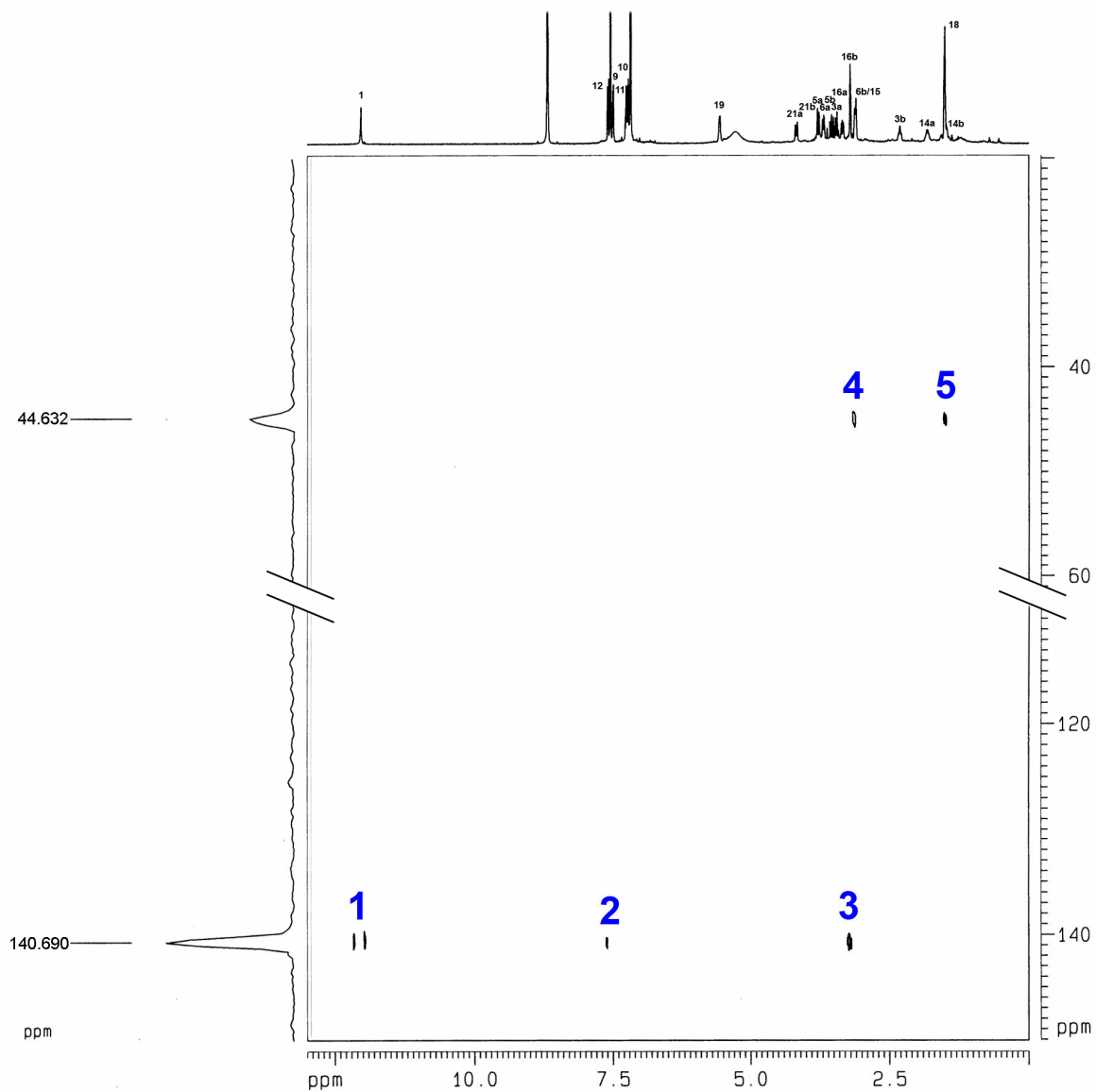
**FIGURA 71.** Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC editado de AU8 (500/125 MHz,  $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ ), com fase positiva (CH e  $\text{CH}_3$ ) em vermelho e negativa ( $\text{CH}_2$ ) em azul.



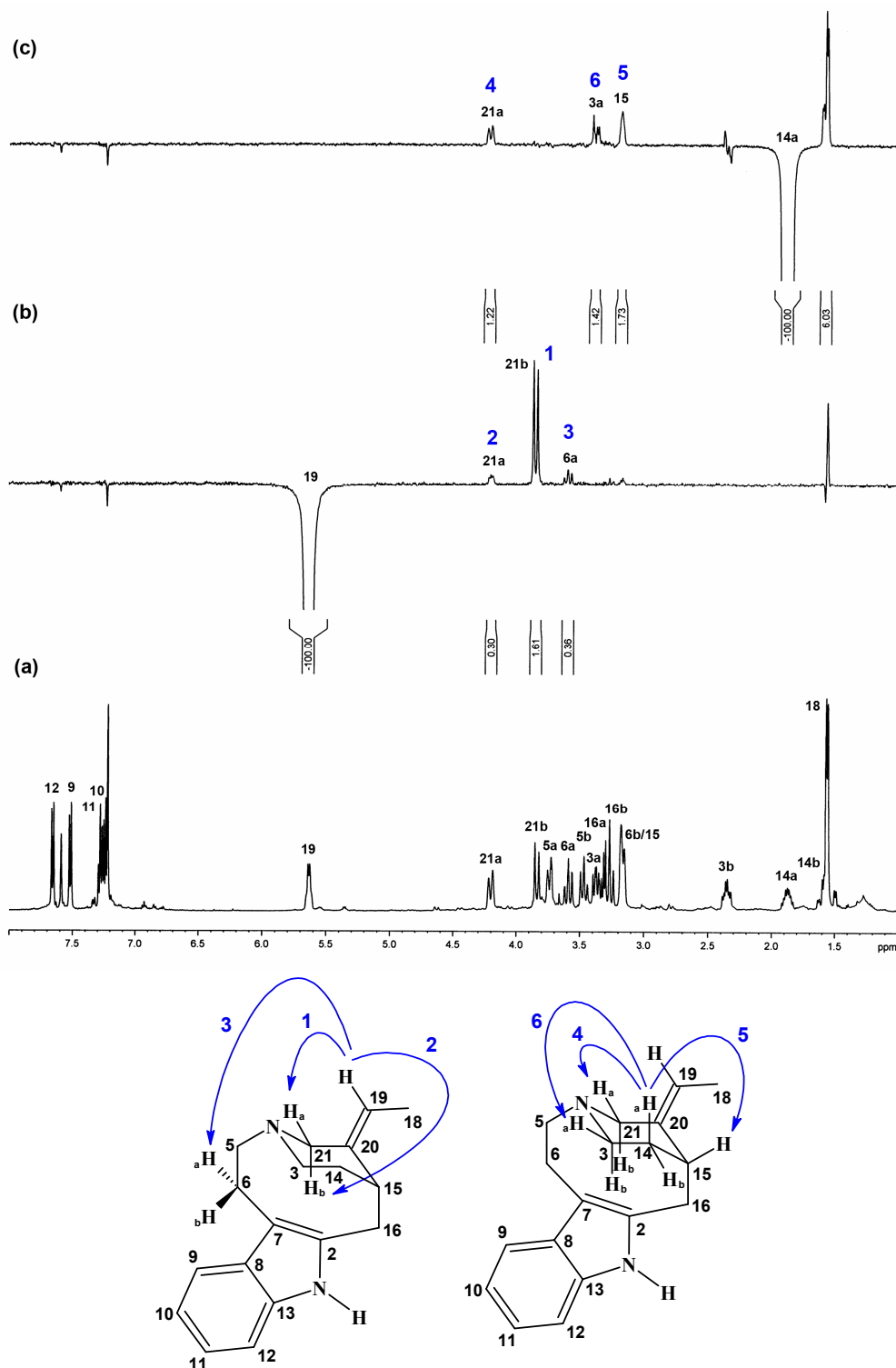
**FIGURA 72.** Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC-TOCSY de AU8 (500/125 MHz,  $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ ). A numeração colorida na estrutura e espectro indica a seqüência observada para os hidrogênios.



**FIGURA 73.** Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HMBC de AU8 (500/125 MHz,  $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ ) com expansões. As setas numeradas representam as principais correlações a longa distância observadas e sua numeração corresponde a numeração dos picos observados no espectro.



**FIGURA 74.** Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HMBC de AU8 (500/50,7 MHz,  $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ ). As setas numeradas representam as principais correlações à longa distância observadas e sua numeração corresponde a numeração dos picos observados no espectro.



**FIGURA 75.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de AU8 (500 MHz,  $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ ) (a) não irradiado e RMN  $^1\text{H}$  NOE seletivo de AU8 (500 MHz,  $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ ) irradiado em (b)  $\delta_{\text{H}}$  5,63 (H19) e (c)  $\delta_{\text{H}}$  1,87 (H14a) ( $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ , 500 MHz). As setas numeradas representam as principais correlações dipolares observadas e sua numeração corresponde a numeração dos picos observados no espectro.

### 3.9 Referências Bibliográficas

AMAT, M.; COLL, M.-D.; PASSARELLA, D.; BOSCH, J. An enantioselective synthesis of the Strychnos alkaloid (-)-tubifoline. *Tetrahedron: Asymmetry*, **7**, 10, 2775-2778, **1996**.

BORRIS, R. P.; LARRIS, D. C.; CORDELL, G. A. Studies on the uleine alkaloids I. Carbon-13 nmr studies on uleine, 20-epiuleine and (4S)-uleine-N<sub>b</sub>-oxide. *Journal of Natural Products*, **46**, 2, 200-205, **1983**.

BÜCHI, G.; GOULD, S. J.; NÄF, F. Stereospecific syntheses of uleine and epiuleine. *Journal of American Chemical Society*, **93**, 10, 2492-2501, **1971**.

GRÀCIA, J.; CASAMITJANA, N.; BONJOCH, J.; BOSCH, J. Total Synthesis of Uleine-Type and Strychnos Alkaloids through a Common Intermediate *Journal of Organic Chemistry*, **59**, 3939-3951, **1994**.

FRANÇA, O. O.; BROWN, R. T.; SANTOS, C. A. M. Uleine and demethoxyaspidospermine from the barks of *Plumeria lancifolia*. *Fitoterapia*, **71**, 208-209, **2000**.

ISHIKURA, M.; HINO, A.; YAGINUMA, T.; ÁGATA, I.; KATAGIRI, N. A novel entry to pyrido[4,3-b]carbazoles: an efficient synthesis of ellipticine. *Tetrahedron*, **56**, 193-207, **2000**.

JÁCOME, R. L. R. P.; OLIVEIRA, A. B.; RASLAN, D. S.; WAGNER, H. Estudo químico e perfil cromatográfico das cascas de *Aspidosperma parvifolium* A. DC. (“pau-pereira”). *Química Nova*, **27**, 2, 897-900, **2004**.

JOULE, J. A.; OHASHI, B.; GILBERT, B.; DJERASSI, C. Alkaloid studies-LIII. The structures of nine new alkaloids from *Aspidosperma dasycarpon* A. DC. *Tetrahedron*, **21**, 1717-1734, **1965**.

KOBAYASHI, J.; SEKIGUCHI, M. SHIMAMOTO, S.; SHIGEMORI, H.; ISHIYAMA, H.;

---



OHSAKI, A. Subicanadines A-C, novel quaternary indole alkaloids from *Aspidosperma subincanum*. *Journal of Organic Chemistry*, **67**, 6449-6455, **2002**.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. LTC Editora, 6ª Edição, ISBN 8521612303, **2000**.

SCHMUTZ, VON J.; HUNZIKER, F. Die Alkaloide von *Aspidosperma olivaceum* M. *Arg. Pharmaceutica Acta Helveticae*, **33**, 341-347, **1958**.

WENKERT, E.; CHANG C-J.; CHAWLA, H. P. S.; COCHRAN, D. W.; HAGAMAN, E. W.; KING, J. C.; ORITO, K. General methods of synthesis on indole alkaloids. 14. Short routes of construction of yohimboid and ajmalicinoid alkaloid systems and their <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectral analysis. *Journal of the American Chemical Society*, **98**, 12, **1976**.

---

# Capítulo 4

PARTE EXPERIMENTAL

## 4 PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1 Coleta do material

O material vegetal (raiz e caule) foi coletado no município de Acarapé, Garapa, Ceará pelo prof. Edilberto Rocha Silveira. A identificação botânica foi realizada pelo prof. Edson de Paula Nunes, do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará. A exsicata da planta encontra-se depositada no Herbário Prisco Bezerra do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, registrada sob os números 30823 (12/07/2001), 32630 (09/09/2003) e 34813 (04/03/2004).

### 4.2 Métodos

#### 4.2.1. Cromatográficos

##### 4.2.1.1 Cromatografia em coluna de fase normal (CC)

As cromatografias de adsorção em coluna foram realizadas utilizando-se sílica gel 60 (0,063-0,200 mm; 70-230 mesh) da VETEK.

O comprimento e o diâmetro das colunas variam de acordo com as alíquotas das amostras e quantidades de sílica a serem utilizadas, na proporção de 1 de amostra para 8 de sílica.

Para a eluição foi utilizado diclorometano e metanol, e suas misturas binárias, em ordem crescente de polaridade.

##### 4.2.1.2 Cromatografia em coluna de fase reversa C18 (CCR)

As cromatografias em coluna de fase reversa C18 foram realizadas em cartuchos de octadecil-sílica de acordo com o método descrito por Lanças (2004), utilizando-se colunas WATERS RP18 (500 mg).

---

#### 4.2.1.2 Cromatográfica em camada delgada (CCD)

Para CCD utilizaram-se placas de alumínio com sílica gel 60. Os resultados foram observados pela exposição das placas a luz ultravioleta, em dois comprimentos de onda diferentes: 254 e 366 nm.

#### 4.2.1.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A CLAE foi realizada através de um cromatógrafo WATERS modular, controlado pela programa de computador EMPOWER, contendo um detector PDA modelo 2996, bombas binárias modelo 1525 e forno para colunas, além de uma coluna de fase reversa XTERRA RP18 4,6 x 250 mm.

Os solvente utilizados foram metanol grau HPLC e água ultra pura obtida através de um ultrapurificador de água MilliQ, da MILLIPORE. Membranas de filtro apropriadas foram utilizadas para o metanol, e a degaseificação foi realizada sob vácuo pela aplicação de ultrassom por 15 minutos, para cada frasco de 1000 mL com 500 mL de solvente.

### 4.2.2 Espectrométricos

#### 4.2.2.1 Infravermelho (IV)

Os espectros infravermelho para todos os compostos foram obtidos em um espectrofotômetro SHIMADZU FT-IR 8500, com pastilhas de KBr confeccionadas na proporção de 1:100.

#### 4.2.2.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Cada amostra foi dissolvida em 0,6 mL do solvente deuterado adequado e acondicionado em tubos de RMN de 5 mm. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em ppm e referenciados através do pico residual de  $^1\text{H}$  do solvente deuterado utilizado na análise. O equipamento de RMN utilizado na análise foi um espectrômetro BRUKER AVANCE DRX500 situado no Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN), operando a 500,1 MHz, 125,7 MHz e 50,7 MHz para as

---

freqüências do  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e  $^{15}\text{N}$ , respectivamente, em um campo de 11,7 T, utilizando uma sonda multinuclear de detecção inversa de 5 mm, com gradiente de campo no eixo z de 10 A.

Nos experimentos unidimensionais de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  foram utilizadas larguras espectrais de 24 e 260 ppm, respectivamente, tempo de relaxação de 1 s e largura de pulso de  $90^\circ$  de 9,60  $\mu\text{s}$  (0 dB) e 10,90  $\mu\text{s}$  (-3 dB) para  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , respectivamente. Para os experimentos 2D com  $^{15}\text{N}$  foi usado uma largura espectral de 300 ppm em F1, largura de pulso de  $90^\circ$  de 26,0  $\mu\text{s}$  (-3 dB). Para todos os experimentos unidimensionais foram utilizados 65356 pontos para a aquisição e 32768 para o processamento, 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 necessário. O número de transientes variou de 8, para  $^1\text{H}$ , a 16384, para  $^{13}\text{C}$ , para os experimentos unidimensionais, e  $2^n$  ( $n \geq 2$ ) para bidimensionais, dependendo do experimento e quantidade de amostra disponível.

Os programas de pulsos utilizados para a aquisição dos dados foram:  $^1\text{H}$  (zg),  $^{13}\text{C}$ -BB (zgp),  $^{13}\text{C}$ -DEPT135 (dept135), COSY (cosygp), NOESY (noesygp), SELNOE (selno), HSQC (hsqcgpph), HSQC-TOCSY (hsqcgpmlph),  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HMBC e  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HMBC (hmbclpndqf).

Os valores de  $J$  utilizados para os experimentos pertinentes foram  $^1J_{\text{H,C}} = 145$ ,  $^nJ_{\text{H,C}} = 7$ ,  $^1J_{\text{H,N}} = 80$ ,  $^nJ_{\text{H,N}} = 7$ , onde  $n \geq 2$ .

### 4.2.3 Outros

#### 4.2.3.1 Ponto de fusão

O ponto de fusão das substâncias foram obtidas no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, da Universidade Federal do Ceará, em um aparelho METTLER, com processador central modelo FP90 e placa aquecedora modelo FP82H7. As determinações foram realizadas a uma velocidade de  $2^\circ\text{C}/\text{min}$ .

#### 4.2.3.2 Rotação óptica

As medidas de rotação óptica foram obtidas em um polarímetro Perkin-Elmer modelo 341, na faixa do sódio (549 nm), a  $20^\circ\text{C}$ . A concentração e o comprimento do caminho óptico

utilizados foram de 0,33 % (2 mg de amostra/6 mL de CH<sub>3</sub>OH) e 10 cm, respectivamente, para todas as amostras.

### 4.3 Ensaio farmacológicos

Os estudos da atividade pró-erectil da fração rica em alcalóides da casca da raiz de *Aspidosperma ulei* Markgf foram realizados no Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará e encontram-se citados no **Capítulo 1 – Introdução**, pág. 19.

### 4.4 Estudo da casca da raiz (CR) e casca do caule (CC) de *Aspidosperma ulei* Markgf.

#### 4.4.1 Preparação do Extrato Etanólico das Cascas da Raiz de *Aspidosperma ulei* - Pitiá (ApCRE)

4,0 kg das cascas da raiz de *Aspidosperma ulei* (Pitiá) foram extraídos, por maceração, com 10 L de etanol durante 24 horas. A extração foi repetida 3 vezes e as soluções etanólicas foram evaporadas à pressão reduzida e reunidas, fornecendo o extrato denominado ApCRE (144,55 g, 3,61 %).

#### 4.4.2 Preparação da fração alcaloídica para os ensaios farmacológicos

51,0 g do extrato etanólico da casca da raiz de *Aspidosperma ulei* Markgf – Pitiá (ApCRE) foram suspensos em 200 mL de água destilada e extraídos 4 x 200 mL de Acetato de Etila, fornecendo as frações APCRE-AQ (40,6 g, 79,6 %) e APCRE-AE (8,6 g, 16,9 %).

100 mg de ApCRE e suas frações, ApCRE-AE e ApCRE-AQ, foram enviado para testes farmacológicos e os resultados obtidos nos guiaram para o estudo da fração ApCRE-AE.

ApCRE-AE (1,20 g) foram dissolvidos em 5 mL de metanol e acondicionados a uma coluna (⊙ = 5 cm) contendo 45 g de SEPHADEX LH-20 e eluido com metanol. As frações coletadas e seus volumes individuais foram: 1-5 (50 mL), 6 (75 mL), 7-8 (200 mL).

Cromatografia em CCD possibilitou reunir as frações como segue: 1-2 (587,4 mg), 3-5 (162,4 mg) e 6-8 (371,9 mg).

---

100 mg de cada fração foram enviados para novos testes farmacológicos. A fração 3-5 demonstrou-se ativa frente aos testes realizados (Campos, A. R. **2006**). Uma nova fração (600 mg) foi preparada, de acordo com o procedimento acima, para a continuidade dos testes, enquanto outra alíquota (450 mg) foi separada para a identificação dos constituintes da fração.

#### 4.4.3 Identificação dos constituintes de ApCRE-AE

ApCRE-AE(3-5) (450 mg) foi adsorvido em 1 g de gel de sílica e acondicionado em uma coluna de vidro ( $\varnothing = 2,5$  cm) contendo 5 g de gel de sílica. Procedeu-se a eluição como segue abaixo:

Fração	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH	Vol. individual (mL)
<b>1</b>	100:0	60
<b>2</b>	99:1	40
<b>3-4</b>	98:2	20
<b>5-6</b>	97:3	20
<b>7-8</b>	96:4	20
<b>9-10</b>	94:6	20
<b>11</b>	0:100	20

As frações foram comparadas por CCD e reunidas (rendimentos entre parênteses) como segue: 1-2 (227,0 mg), 3 (13,9 mg), 4 (30,5 mg), 5-6 (80,5 mg), 7-8 (20,2 mg), 9-10 (53,0 mg) e 11 (20 mg). A partir da fração 11 formou-se 3,5 mg de um precipitado branco denominado 11ppt.

Através da obtenção de espectros 1D e 2D de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C das frações obtidas, pode-se determinar a constituição parcial da fração ApCRE-AE(3-5), como segue:

Fração	Alcalóide
<b>ApCRE-AE(3-5)(4)</b>	uleina
<b>ApCRE-AE(3-5)(7-8)</b>	N-desmetil-uleina
<b>ApCRE-AE(3-5)(11)ppt</b>	16,19-dimetil-3,5,14,21-tetra-hidroelipticina

A fração 1-2 apresentou-se como material graxo enquanto as demais frações apresentaram-se como misturas complexas.

Nenhuma das outras frações forneceu outros compostos em quantidade ou pureza suficiente para análise e identificação. Devido a isso, a metodologia foi modificada, como segue, a fim de tentar obter outros compostos.

#### 4.4.4 Partição ácida de ApCRE

21,5 g de ApCRE foram suspensas em 200 mL de HCl 2M e colocado sob agitação por 30 min. A suspensão foi filtrada em funil de Bücher sob vácuo e extraída com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 200 mL cada). A fase orgânica foi secada com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e rotaevaporada, fornecendo 790,7 mg de uma fração denominada ApCRE-A.

À fase aquosa ácida foi adicionado NH<sub>4</sub>OH até alcançar pH 9, observado em papel de pH. A solução foi filtrada em papel de filtro e extraída com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 200 mL cada), secada com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e rotaevaporada, fornecendo 401,8 mg de uma fração denominada APCRE-B.

##### 4.4.4.1 Cromatografia em gel de sílica de ApCRE-A: Isolamento de AU-1, AU-2 e AU-3

ApCRE-A (790,7 mg) foi adsorvido em 1,0 g de gel de sílica e acondicionada em uma coluna de vidro (Ø = 2,5 cm) contendo 5,0 g de gel de sílica. Procedeu-se a eluição como segue abaixo:

Fração	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH	Vol. individual (mL)
<b>1-4</b>	100:0	25
<b>5-8</b>	98:2	25
<b>9-10</b>	96:4	25
<b>11-13</b>	92:8	50
<b>14</b>	0:100	10

As frações foram comparadas por CCD e reunidas (rendimentos entre parênteses) como segue: 1-4 (24,9 mg), 5-8 (446,1 mg), 9-10 (153,7 mg), 11-13 (59,7 mg) e 14 (42,6 mg).

Através da obtenção de espectros de RMN <sup>1</sup>H das frações anteriores foi possível identificar a fração 5-8 como uma fração rica em alcalóides indólicos, pela observação de sinais correspondentes aos núcleos indólicos entre 7-8 ppm, enquanto as outras frações apresentavam-se como misturas complexas não alcaloídicas. A fração 5-8 foi adsorvida em



500 mg de gel de sílica e acondicionada em uma coluna de vidro ( $\varnothing = 2,5$  cm) contendo 2,5 g de gel de sílica. Procedeu-se a eluição como segue:

Fração	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH	Vol. individual (mL)
1	99:1	10
2-4	99:1	5
5	99:1	10
6-7	98:2	15
8	94:6	20
9	90:10	20
10	0:100	10

As frações foram comparadas por CCD e reunidas como segue, com seus respectivos rendimentos: 1 (4,5 mg), 2 (6,4 mg), 3-9 (365,1 mg) 10 (8,7 mg).

A fração 5-8/3-9 foi identificada, por RMN, como uma mistura de alcalóides e foi recromatografada sob as mesmas condições utilizadas para a fração 5-8, exceto que eluindo-se inicialmente com uma mistura de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 98:2, coletando-se duas frações, 1-2 (10 mL cada), e uma terceira, 3 (10 mL), com MeOH. As frações 1 e 2 foram comparadas por CCD e reunidas fornecendo 240,5 mg da mistura inicial. A fração 3 (108,1 mg) foi identificada como um alcalóide através de RMN, e denominada **AU-1**. Comparação com os alcalóides isolados anteriormente mostrou que **AU-1** corresponde a **ApCRE-AE(3-5)(4)**, e trata-se de **uleina** (ver **Capítulo 3 – Determinação Estrutural**, pág. 46).

A fração 5-8/3-9/10 apresentou-se homogênea em CCD e foi caracterizado como um alcalóide através de RMN, e denominada **AU-2** (8,7 mg). Dados de RMN mostraram que **AU2** trata-se de **20S-dasicarpidona** (ver **Capítulo 3 – Determinação Estrutural**, pág. 66).

A fração 5-8/14 apresentou um precipitado branco, caracterizado como um alcalóide por RMN, e foi denominada **AU-3** (20,1 mg). Comparação com os alcalóides isolados anteriormente mostrou que **AU-3** corresponde a **ApCRE-AE(3-5)(11)ppt**, e trata-se de **16,19-dimetil-3,5,14,21-tetra-hidroelipticina** (ver **Capítulo 3 – Determinação Estrutural**, pág. 77).

## 4.4.4.2 Cromatografia em gel de sílica de ApCRE-B: Isolamento de AU-4, AU-5 e AU-6

ApCRE-B (401,8 mg) foi adsorvido em 500 mg de gel de sílica e acondicionado em uma coluna de vidro ( $\odot = 2,5$  cm) contendo 2,5 g de gel de sílica. Procedeu-se a eluição como segue:

Fração	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH	Vol. individual (mL)
<b>1-2</b>	100:0	25
<b>3</b>	99:1	25
<b>4-7</b>	94:6	25
<b>8-10</b>	0:100	25

As frações foram comparadas por CCD e reunidas como segue, com seus respectivos rendimentos: 1 (33,3 mg), 2-3 (2,0 mg), 4 (35,6 mg), 5 (52,9 mg), 6-7 (128,5 mg) e 8-10 (17,3 mg).

Através do espectro de RMN <sup>1</sup>H das frações foi possível identificar as frações 4 e 6-7 como frações alcaloídicas, enquanto as outras frações apresentaram-se como misturas complexas não alcaloídicas.

A fração 4 apresentou-se como um alcalóide através de RMN, e foi denominada **AU-4** (35,6 mg). Dados de RMN mostraram que **AU-4** tratava-se de  **$\beta$ -ioimbina** (ver **Capítulo 3 – Determinação Estrutural**, pág. 85).

A fração 6-7 (128,5 mg) foi adsorvida em 500 mg de gel de sílica e acondicionada em uma coluna de vidro ( $\odot = 2,5$  cm) contendo 2,5 g de gel de sílica. Procedeu-se a eluição como segue:

Fração	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH	Vol. individual (mL)
<b>1-2</b>	99:1	20
<b>3</b>	98:2	10
<b>4-5</b>	96:4	10
<b>6-10</b>	96:4	5
<b>11</b>	94:6	20
<b>12-16</b>	0:100	10

As frações foram comparadas por CCD e reunidas (rendimentos entre parênteses) como segue: 1 ( 7,5 mg), 2-6 (8,1 mg), 7 (7,0 mg), 8-12 (88,8 mg), 13-14 (5,5 mg) e 15-16 (9,0 mg).

A fração 6-7/8-12 apresentou-se como um alcalóide através de RMN, e foi denominada **AU-5** (88,8 mg). Comparação com os alcalóides isolados anteriormente mostrou que **AU-5** corresponde a **ApCRE-AE(3-5)(7-8)**, e trata-se de **N-desmetil-uleina** (ver **Capítulo 3 – Determinação Estrutural**, pág. 97).

A fração 8-10 apresentou um precipitado branco, que foi caracterizado como **D-1-O-metil-myo-inositol** através de RMN, e denominada **AU-6** (115,2 mg) (ver **Capítulo 3 – Determinação Estrutural**, pág. 106).

#### 4.4.5 Preparação do Extrato Etanólico das Cascas do Caule de *Aspidosperma ulei* - Pitiá (ApCCE)

4,0 kg das cascas da raiz de *Aspidosperma ulei* (Pitiá) foram extraídos, por maceração, com 10 L de etanol por 24 horas. A extração foi repetida 3 vezes e as soluções etanólicas foram evaporadas à pressão reduzida e reunidas, fornecendo o extrato denominado ApCCE (435,32 g, 10,88 %).

##### 4.4.5.1 Partição ácida de ApCCE

20,7 g de ApCCE foram suspensas em 200 mL de HCl 2M e colocado sob agitação por 30 min. A suspensão foi filtrada em funil de Bücher sob vácuo e extraída com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 200 mL cada). A fase orgânica foi secada com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e rotaevaporado, fornecendo 776,9 mg de uma fração denominada ApCCE-A.

À fase aquosa ácida foi adicionado NH<sub>4</sub>OH até alcançar pH 9, observado em papel de pH. A solução foi filtrada em papel de filtro e extraída com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 200 mL cada) e secada com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e rotaevaporado, fornecendo 781,8 mg de uma fração denominada APCCE-B.

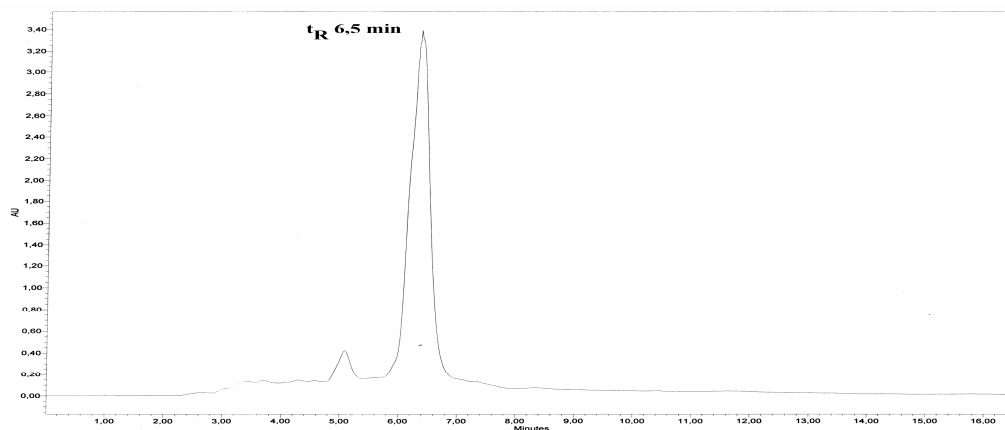
##### 4.4.5.2 Cromatografia em gel de sílica de ApCCE-A: Isolamento de AU-7 e AU-8

ApCCE-A (350 mg) foi adsorvido em 500 mg de gel de sílica e acondicionado em uma coluna de vidro (∅ = 2,5 cm) contendo 2,5 g de gel de sílica. Procedeu-se a eluição como segue:

Fração	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH	Vol. individual (mL)
1	100:0	60
2	100:0	30
3	100:0	10
4-6	98:2	8
7-9	0:100	8
10	0:100	50

As frações foram comparadas por CCD e reunidas (rendimentos entre parênteses) como segue: 1-3 (60,2 mg), 4-5 (13,9 mg), 6 (40,7 mg), 7-9 (50,4 mg) e 10 (153,0 mg).

A fração 4-5 (13,9 mg) foi cromatografada em cromatógrafo líquido de alta eficiência, em uma coluna X-Terra RP18 4,6 x 250 mm, e eluída através de um gradiente de água-metanol, variando de 45-55 % de metanol, em um tempo de corrida de 10 minutos, com fluxo de 1 mL/minuto. A amostra coletada (11,0 mg), denominada **1** e correspondente ao tempo de retenção de 6,5 minutos (**FIGURA 76**, pág. 156), foi identificada através de RMN como um alcalóide e foi denominada **AU-7**. Dados de RMN mostraram que **AU-7** não havia sido anteriormente relatado na literatura (ver **Capítulo 3 – Determinação Estrutural**, pág. 116).



**FIGURA 76.** Cromatograma obtido a partir da fração ApCCE-A(4-5)(1).

A fração 10 (153,0 mg) foi adsorvida em 500 mg de gel de sílica e acondicionada em uma coluna de vidro ( $\varnothing = 2,5$  cm) contendo 2,5 g de gel de sílica. Procedeu-se a eluição como segue:

Fração	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH	Vol. individual (mL)
1	98:2	60
2	94:6	30
3	100:0	10

As frações foram comparadas por CCD e reunidas (rendimentos entre parênteses) como segue: 1 (5,2 mg), 2 (83,1 mg), 3 (50,5 mg).

A fração 10/2 apresentou-se como um alcalóide através de RMN, e foi denominada **AU-8**. Dados de RMN mostraram que **AU-8** tratava-se de 15*R*-16,17-nor-subincanadina E (ver **Capítulo 3 – Determinação Estrutural**, pág. 132).

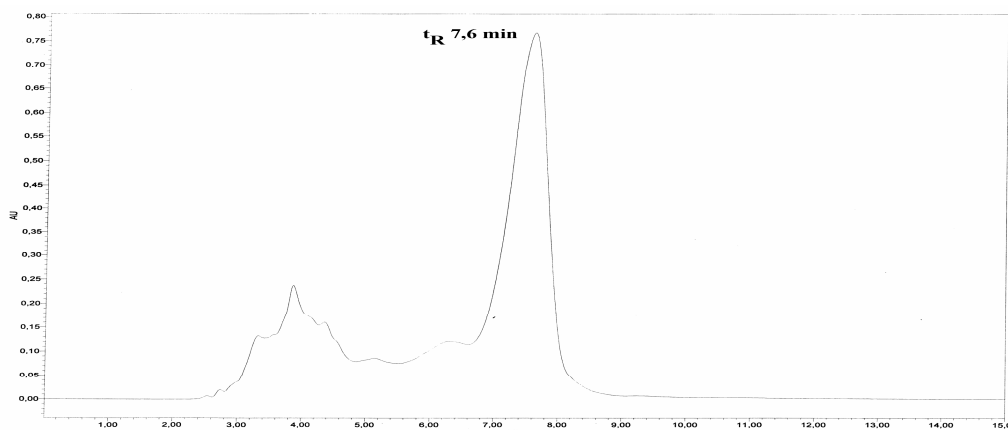
#### 4.4.5.3 Cromatografia em gel de sílica de ApCCE-B: Isolamento de AU-4

ApCCE-B (350 mg) foi adsorvido em 500 mg de gel de sílica e acondicionada em uma coluna de vidro ( $\varnothing = 2,5$  cm) contendo 2,5 g de gel de sílica. Procedeu-se a eluição como segue:

Fração	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH	Vol. individual (mL)
<b>1</b>	100:0	20
<b>2</b>	100:0	25
<b>3-5</b>	96:4	25
<b>6</b>	0:100	25
<b>7</b>	0:100	25

As frações foram comparadas por CCD e reunidas (rendimentos entre parênteses) como segue: 1-3 (20,2 mg), 4-5 (70,8 mg) e 6-7 (180,3 mg).

A fração 1-3 foi cromatografada em cromatógrafo líquido de alta eficiência, em uma coluna X-Terra RP18 4,6 x 250 mm, através de eluições isocrática de água-metanol 35:65, com fluxo de 1 mL/minuto. A amostra coletada (7,0 mg), denominada **1** e correspondente ao tempo de retenção de 7,6 minutos (**FIGURA 77**, pág. 157), foi identificada através de RMN como o alcalóide **AU-4**, denominado  **$\beta$ -ioimbina**.



**FIGURA 77.** Cromatograma obtido a partir da fração ApCCE-B(4-5)(1).

#### 4.5 Referências Bibliográficas

**Lanças, F. M.;** Métodos cromatográficos de análise 4: Extração em fase sólida. Rima Editora, 96 p., 2004.

# Capítulo 5

## CONCLUSÕES

## 5 CONCLUSÕES

Sete alcalóides foram isolados e identificados, cinco da casca da raiz ((+)-20(S)-uleina (AU-1), (+)-20S-dasicarpidona (AU-2), (-)-16,19-dimetil-3,5,14,21-tetra-hidro-elipticina (AU-3), (-)- $\beta$ -ioimbina (AU-4), (-)-20(S)-N-desmetil-uleina (AU-5)) e dois da casca do caule ((+)-15(S)-18-hidroxi-20(Z)-16,17-nor-subincanadina E (AU-7) e (+)-15(S)-20(Z)-16,17-nor-subincanadina E (AU-8)), além de um derivado do inositol, o (-)-D-1-O-metil-*myo*-inositol (AU-6). Entre esses alcalóides, AU7 é relatado pela primeira vez na literatura, enquanto AU8 já havia sido relatado anteriormente como produto intermediário em reações para a produção de alcalóides de *Strychnos*, no entanto, apenas agora é relatado como produto natural.

A determinação estrutural da (+)-20(S)-uleina mostrou ser a mais desafiante, uma vez que o relato do composto na literatura apresentava dados conflitantes com aqueles obtidos nesse trabalho. Após minucioso estudo, pôde-se concluir que os dados da literatura estão incorretos.

Estudos químicos da casca da raiz e casca do caule de *Aspidosperma ulei* Markgf continuarão em andamento, inclusive de outras partes da planta, o que possibilitará conhecer mais profundamente a composição química dessa espécie, e fornecerá novos dados espectroscópicos que auxiliarão na elucidação estrutural de outros alcalóides. O uso de técnicas contemporâneas de ressonância magnética nuclear uni- e bidimensionais de prótio, carbono-13 poderão ser aliadas a dados de RMN de nitrogênio-15, fornecendo uma valiosa informação sobre a estrutura desses compostos.

Colaboração com o Departamento de Farmacologia e Fisiologia da Universidade Federal do Ceará possibilitou a produção paralela de uma Tese de Doutorado versando sobre a atividade pró-erétil de uma fração rica em alcalóides, em camundogos. O potencial farmacológico desses tipos de compostos deverá ser comprovado em futuras colaborações, através do estudo das substâncias puras, possibilitando expandir o conhecimento da relação estrutura-atividade para além dos resultados obtidos até o momento.



# Anexo

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

Journal of Ethnopharmacology 104 (2006) 240–244

[www.elsevier.com/locate/jethpharm](http://www.elsevier.com/locate/jethpharm)

## Pro-erectile effects of an alkaloidal rich fraction from *Aspidosperma ulei* root bark in mice

Adriana R. Campos<sup>a</sup>, Roberto C.P. Lima Jr.<sup>a</sup>, Daniel E.A. Uchoa<sup>b</sup>,  
Edilberto R. Silveira<sup>b</sup>, Flavia A. Santos<sup>a</sup>, Vietla S.N. Rao<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, Rua Cel. Nunes de Melo, 1127, C.P. 3157, Porangabussu, 60430-270 Fortaleza, CE, Brazil

<sup>b</sup> Department of Organic and Inorganic Chemistry, Federal University of Ceará, Rua Cel. Nunes de Melo, 1127, C.P. 3157, Porangabussu, 60430-270 Fortaleza, CE, Brazil

Received 24 February 2005; received in revised form 9 August 2005; accepted 6 September 2005  
Available online 17 October 2005

### Abstract

In recent years, there has been a renewed interest in the search for novel natural substances active against erectile dysfunction. Plants that belong to the genus *Aspidosperma* (Apocyanaceae) are known to be very rich in indole alkaloids and have an ethnomedical history of use as traditional remedies for erectile dysfunction. This study examined whether the indole alkaloidal rich fraction ( $F_{3-5}$ ) from *Aspidosperma ulei* Markgr. root bark could manifest penile erection-related behavioral responses (penile erection, erection-like and genital grooming) in mice. Intraperitoneal injection of  $F_{3-5}$  (25 and 50 mg/kg) elicited all the three different behavioral responses in a manner similar to yohimbine (2 mg/kg, i.p.), a known indole alkaloid. Seventy-five percent of mice treated with yohimbine or  $F_{3-5}$  showed penile erections, which were completely blocked by clonidine, an alpha-2-adrenoceptor agonist and haloperidol, a dopaminergic antagonist and as well as by L-NAME, a nitric oxide synthase inhibitor. These results point out that  $F_{3-5}$  facilitates penile erection in mice possibly through the activation of central dopamine and blockade of presynaptic alpha-2 adrenoceptors with a subsequent enhancement in nitric oxide release from the penile nerves and arteries. This study further supports the traditional use of extracts from *Aspidosperma* species in erectile dysfunction.

© 2005 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Penile erection; *Aspidosperma ulei* Markgr.; Root bark; Alkaloidal fraction; Pro-erectile effect; Yohimbine; Male mice

### 1. Introduction

Erectile dysfunction (ED) has been described in medical literature since ancient times (Van Driel et al., 1994). Its prevalence rate may vary from 11 to 33.9% in male population (Shabsigh and Anastasiadis, 2003). Traditional herbs may be a potential source of natural drugs for therapy against ED (Adimoelja, 2000; Drewes et al., 2003; Ghadiri and Gorji, 2004). Pyranoisoflavones from the roots of *Eriosema kruassianum*; forskolin, a diterpene from *Coleus forskohlii*; several alkaloids like berberine, which occurs in Berberis plants, papaverine from *Papaver somniferum* and yohimbine from *Corynanthe yohimbe* bark are few examples that have enjoyed reputation as traditional remedies for the treatment of ED (Mullhall et al., 1997; Chiou et

al., 1998; Zaher, 1998). Yohimbine is an indole alkaloid with  $\alpha_2$ -adrenergic-blocking activity that has been used for over a century in the treatment of erectile dysfunction (Morales, 2000; Guay et al., 2002). Although it improves sexual performance (Ernst and Pittler, 1998), its use has been reported to be associated with undesirable side-effects, such as hypertension, anxiety and manic symptoms (Riley, 1994). The genus *Aspidosperma* (Apocyanaceae) is known to be very rich in indole alkaloids like aspidospermine and quebrachamine (Deutsch et al., 1994). In some countries, *Aspidosperma quebracho blanco* extract is in use as a prescription drug to treat ED and the beneficial effect could be largely due to its yohimbine content. Unlike yohimbine, the extract seems to bind non-selectively to penile  $\alpha_1$ - and  $\alpha_2$ -adrenoceptors (Sperling et al., 2002).

*Aspidosperma ulei* Markgr. (Apocyanaceae) is a large tree that grows widely in the regions of North and North-Eastern Brazil. Chemical extraction and fractionation study on its root bark revealed the presence of indole alkaloids in fraction  $F_{3-5}$ .

\* Corresponding author. Tel.: +55 85 4009 8341; fax: +55 85 4009 8333.  
E-mail address: [vietrao@ufe.br](mailto:vietrao@ufe.br) (V.S.N. Rao).

In the search for novel indole alkaloids effective against erectile dysfunction and free from yohimbine's side-effects, the present study assessed the  $F_{3-5}$  fraction from *Aspidosperma ulei* for penile erection-related behavioral activity in mice.

## 2. Material and methods

### 2.1. Plant material, extraction and fractionation

The root bark of *Aspidosperma ulei* Markgr. was collected from Garapa (Acarape Municipality), Ceará State (Brazil), after its identification by Botanist Prof. Edson de Paula Nunes. A voucher specimen (#30823) was deposited in the Herbário Prisco Corcêia of Federal University of Ceará, Fortaleza. Ground root bark (4.0 kg) of *Aspidosperma ulei* was macerated with EtOH (10 L, 3×) to yield, after solvent evaporation, a brown viscous extract designated as *Aspidosperma ulei* crude ethanolic extract (AuCE, 144.6 g). AuCE (51.0 g) was then suspended in H<sub>2</sub>O (200.0 mL) and partitioned with EtOAc (200 mL, 4×) to yield AuCE-Aq (40.6 g) from the water soluble and AuCE-EA (8.6 g) from the organic soluble phase, after lyophilization and rotavaporation, respectively.

When AuCE, AuCE-Aq and AuCE-EA extracts were subjected to behavioral tests in mice, only AUCE and AuCE-EA showed the penile erection-related behavioral activity. AuCE-EA (1.2 g) was subsequently dissolved in MeOH and submitted to exclusion chromatography over Sephadex LH-20 (45.0 g) using MeOH as eluent. Eight fractions (200.0 mL) were collected to yield three pooled fractions:  $F_{1-2}$  (587.4 mg),  $F_{3-5}$  (162.4 mg) and  $F_{6-8}$  (371.9 mg). In behavioral tests,  $F_{3-5}$  was found to be most active, and therefore, the procedure was repeated several times in order to obtain enough material for in vivo testing. <sup>1</sup>H NMR analysis of this fraction ( $F_{3-5}$ ) revealed the presence of two major indole-type alkaloids (Staerk et al., 2001).

### 2.2. Animals

Male Swiss mice (25–30 g) obtained from the central animal house of Federal University of Ceará were used. They were housed in polypropylene cages at 23 ± 2 °C before experimentation under standard environmental conditions (12-light/12-h dark cycle; 55–60% relative humidity) and had free access to pellet diet (Purina chow) and tap water. The Institutional Committee on the Care and Use of Animals for Experimentation approved the experimental protocols, which were in accordance with the guidelines of National Institute of Health, Bethesda, USA.

### 2.3. Drugs and reagents

Clonidine (Sigma, USA), haloperidol (Cristália, Brazil), N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine-methyl ester (L-NAME) (Sigma, USA), dimethyl sulfoxide (DMSO) (Vetec, Brazil), Diazepam (DZP) (Sigma Pharma, Brazil) were used. All the reagents used were of analytical grade. For experimentation, the drugs were dissolved in 0.9% saline.

### 2.4. Penile erection-related behaviors

The method described by Rampin et al. (2003) was followed. Mice were habituated to the testing room for at least a 2 h period and to the test chamber (a glass aquarium, 25 cm × 20 cm × 20 cm) for 5 min, before the start of experimentation. In the first series of experiments, four groups of mice ( $n = 8$  per group), respectively, received either a single intraperitoneal injection of the plant extract  $F_{3-5}$  (25 and 50 mg/kg), the vehicle (3% DMSO, 10 mL/kg) that was used to suspend the  $F_{3-5}$  or the reference drug yohimbine (2 mg/kg) (Clark et al., 1985). The dose selection of 25 and 50 mg/kg  $F_{3-5}$  was based on our acute toxicity study with mice (24 h intraperitoneal DL<sub>50</sub> in mice = 400 ± 40 mg/kg) and at the doses employed in this study, no clinical toxicity was apparent in treated animals.

Personnel unaware of the treatments of the mice participated in the behavioral evaluation. Observations were commenced 30 min after the plant extract injection by placing each male in the test chamber. Three behavioral responses were counted over a period of 30 min: erection (when the male stood on its hind limbs, bent its body forward, bent its head down to reach the genital area, licked its penis and displayed hip movements); erection-like response (the male stood on its hind limbs, bent its body forward, bent its head down, licked the abdomen but not the penis and displayed hip movements; the penis was not erect); and genital grooming (the male sat on its hindquarters, bent his head down and performed grooming of the genital area). The latency for the first erection was also measured.

In a second series of experiments, the influence of adrenergic, dopaminergic and nitergic systems on the penile erection-related behaviors was analyzed in groups of mice ( $n = 8$  per group) pre-treated with clonidine (100 µg/kg, i.p.) or haloperidol (2 mg/kg, i.p.) or L-NAME 10 mg/kg (s.c.), 15 min before  $F_{3-5}$  injection.

### 2.5. Pentobarbital-induced sleeping time

Sleeping times induced by pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) were established in groups of mice ( $n = 8$ ), 30 min following the treatments with  $F_{3-5}$  (25 and 50 mg/kg, i.p.), vehicle (DMSO 3%, 10 mL/kg, i.p.) or DZP (1 mg/kg, i.p.). The sleeping times were measured in minutes by observing the loss and the recovery of righting reflex (Carlini et al., 1986).

### 2.6. Open-field test

Mice ( $n = 8$ ) were observed for locomotion by placing them in the open-field arena and the locomotion frequency (the number of floor units the animal entered with all its limbs) was counted for a period of 4 min, following 30 min after the intraperitoneal administration of  $F_{3-5}$  25 and 50 mg/kg, DMSO 3%, 10 mL/kg or DZP 1 mg/kg (Archer, 1973).

### 2.7. Rota-rod test

The motor coordination and performance of each male mouse was evaluated in a rota-rod apparatus, 30 min after the intraperi-

toneal treatment with  $F_{3-5}$  (25–50 mg/kg), vehicle (DMSO 3%, 10 mL/kg) or DZP (1 mg/kg). This apparatus has a 2.5 cm diameter bar, divided into six parts, and it is placed at a height of 25 cm, rotating at 12 rpm. Latency to fall from the rotating bar during a 2 min period was registered (Dunham and Miya, 1957).

### 2.8. Hole-board test

A possible anxiogenic effect was evaluated in a hole-board apparatus (35 cm × 35 cm × 15 cm), 30 min after the intraperitoneal treatment of mice with  $F_{3-5}$  (25 and 50 mg/kg), vehicle (DMSO 3%, 10 mL/kg) or DZP (1 mg/kg). Each animal was placed on the central square of the arena and the number of holes poked (hole-dips) were recorded for 5 min. A decrease of the hole-poking response was considered a positive anxiogenic-like effect (File and Pellow, 1985).

### 2.9. Forced swimming test

This test was performed according to the method described by Porsolt et al. (1977). Mice were individually forced to swim in a transparent glass vessel filled with water at 24–26 °C, 30 min after the intraperitoneal administration of  $F_{3-5}$  (25 and 50 mg/kg), vehicle (DMSO 3%, 10 mL/kg) or clonidine (100 µg/kg). The total duration of immobility (s) was measured during a 6 min period. Mice were considered immobile, when they made no further attempts to escape except the movements necessary to keep their heads above the water. Each experimental group consisted of eight animals.

### 2.10. Statistical analysis

Comparisons between groups were performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnet test. Values are expressed as mean ± S.E.M. from eight animals. Differences were considered statistically significant, when  $p < 0.05$ .

## 3. Results

$F_{3-5}$  elicited all the three distinct behaviors in Swiss male mice: erection, erection-like responses and genital grooming (Fig. 1). During erection, the erect penis was visible, erection was always accompanied by grooming of the penis and

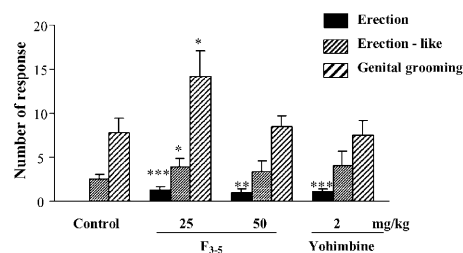


Fig. 1. Histogram displaying the number of erections, erection-like responses and genital groomings during the 30 min observation period in mice that received i.p. injections of vehicle (control),  $F_{3-5}$  (25 and 50 mg/kg) or yohimbine (2 mg/kg). Data are presented as mean ± S.E.M. from eight animals. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  significantly different from control (ANOVA, Dunnet test).

the mouse held the penis with forepaws. During erection-like responses, this penile grooming was not observed. In contrast, the mouse groomed the abdomen. During erection and erection-like responses, the animal bends on the extremity of its hind limbs. Genital grooming was the third behavioral response observed. It could not be confused with the other two behaviors, namely erection and erection-like responses, as it was recorded, when the mouse sat on its hindquarters. One-way ANOVA revealed the statistical significance ( $p < 0.001$ ) of treatment effect on the number of mice that displayed erections as well as on the mean number of erections.

$F_{3-5}$  (25 and 50 mg/kg) elicited erections in 11 of the 16 mice (68%) during the 30 min period of observation. In contrast, the reference drug yohimbine treated groups showed erections in six of eight animals (75%). There was no statistical significance between these two treatments. The animals of the control group that received the vehicle showed no erection. The mean number of erections in  $F_{3-5}$  (25 and 50 mg/kg) and yohimbine (2 mg/kg) were in the order of  $1.25 \pm 0.36$ ,  $1.00 \pm 0.37$  and  $1.12 \pm 0.29$ , respectively. The latency to first erection with  $F_{3-5}$  (25 and 50 mg/kg) was not significantly different from control group of animals that received yohimbine ( $556.62 \pm 168.11$ ,  $596.62 \pm 242.42$  and  $698.62 \pm 198.23$  s, respectively).

Clonidine (100 µg/kg), the  $\alpha_2$ -adrenoceptor agonist, haloperidol (2 mg/kg), the dopamine D2-receptor antagonist or the nitric oxide synthase inhibitor, L-NAME (10 mg/kg) failed to

Table 1  
Effects of *Aspidosperma ulei*  $F_{3-5}$  on pentobarbitone sleeping time and in open-field, rota-rod, hole-board and forced swimming tests in mice

Behavioral tests	Control	$F_{3-5}$ (25 mg/kg)	$F_{3-5}$ (50 mg/kg)	DZP (1 mg/kg)	Clonidine (100 µg/kg)
Sleeping time	64.14 ± 4.24	42.85 ± 6.42**	38.14 ± 2.96**	79.48 ± 5.66*	–
Open-field	34.28 ± 3.22	56.57 ± 4.80**	56.50 ± 4.58**	24.30 ± 7.65*	–
Rota-rod	120.00 ± 0.00	115.72 ± 4.28	102.50 ± 11.45	32.40 ± 7.00**	–
Hole-board	33.14 ± 3.15	25.71 ± 3.33	15.57 ± 2.41**	46.10 ± 1.50**	–
Forced swimming	158.71 ± 13.80	148.28 ± 12.57	84.00 ± 6.25**	–	23.70 ± 4.30**

Data are presented as mean ± S.E.M. from eight animals. Observations were made 30 min following the intraperitoneal injections of vehicle (control),  $F_{3-5}$ , diazepam (DZP) or clonidine. Sleeping time (min); open-field (counts/4 min); rota-rod (permanence in s); hole-board (head-dips/5 min); forced swimming (immobility time in s).

\*  $p < 0.05$  from control (ANOVA, Dunnet test).

\*\*  $p < 0.01$  from control (ANOVA, Dunnet test).

produce any per se pro-erectile effect. However, pre-treatment of mice with these agents abrogated the pro-erectile effects of 25 mg/kg  $F_{3-5}$  (data not shown).

In general behavioral tests, the alkaloidal fraction  $F_{3-5}$ , at either dose induced a significant increase in spontaneous locomotor activity in open-field test but caused no motor impairment in rota-rod test (Table 1). In contrast, DZP, the reference compound, significantly depressed the locomotor frequency and rota-rod performance. Mice pre-treated with  $F_{3-5}$  and DZP showed differing effects on pentobarbital-sleeping times. While  $F_{3-5}$  decreased the sleeping time, DZP enhanced it. DZP, as expected, markedly enhanced the number of head-dips in hole-board apparatus, and thus, showed an anxiolytic effect, whereas  $F_{3-5}$  was an anxiogenic effect as evidenced from a decreased number of head dips. In forced swimming test, both  $F_{3-5}$  and clonidine were able to decrease the immobility time.

#### 4. Discussion

In this work, we have demonstrated that the fraction  $F_{3-5}$  from *Aspidosperma ulei* root bark elicits penile erection-related behaviors in male mice. Presence of indole alkaloids closely related to yohimbine in this fraction and previous studies that show the clinical efficacy of a yohimbine rich extract from the bark of *Aspidosperma quebracho blanco* (Sperling et al., 2002) prompted us to undertake this study. Indole alkaloids can exert potent central and peripheral pharmacological effects by influencing various neurotransmitter systems. The results show that  $F_{3-5}$  facilitates penile erections in mice and at the dose of 25 mg/kg, it displayed a better efficacy as indicated by the number of responders and the number of erections.

$F_{3-5}$ -induced erections in mice were abolished by clonidine, an  $\alpha_2$ -adrenoceptor agonist, suggesting that it may function as an  $\alpha_2$ -adrenoceptor blocker. It implies that  $F_{3-5}$  has a yohimbine-like effect. In this context, Clark et al. (1985) provided evidence for the modulation of sexual behavior by  $\alpha_2$ -adrenoceptors and suggested that agonists like clonidine suppress, whereas antagonists, such as yohimbine, cause sexual arousal. Despite some controversy, controlled clinical studies have shown the efficacy of yohimbine alone or its combination with other agents that increase NO bioavailability, in erectile dysfunction regardless of its etiology (Riley, 1994; Lebreton et al., 2002; Meston and Worcel, 2002; Kernohan et al., 2005). To establish the therapeutic effect may require 3–8 weeks of therapy and most of the clinical trials of yohimbine have been criticized for having methodological problems and inconsistent data (Guirguis, 1998).

Haloperidol, a non-selective dopaminergic antagonist also abrogated the  $F_{3-5}$ -induced erections. Both animal and human studies demonstrate that male sexual behavior is partly regulated by dopamine mechanism and that penile erection can be induced by apomorphine, a dopamine receptor agonist (Andersson and Wagner, 1995; Paredes and Agmo, 2004). Both dopamine agonists and presynaptic  $\alpha_2$ -adrenergic blockers seem to increase NO synthase activity and cause enhanced NO release, important in erectile function (Simonsen et al., 1997; Heaton, 2000). In the present work, the nitric oxide synthase inhibitor, L-NAME also

blocked the erectile responses evoked by  $F_{3-5}$ . These results point out the involvement of noradrenergic, dopaminergic and nitrenergic mechanisms in  $F_{3-5}$ -induced penile erection.

Indole alkaloids can exert potent effects on the central nervous system (CNS). Therefore, the present study analyzed the effects of  $F_{3-5}$  on pentobarbital-sleeping time and general behaviors in open-field, rota-rod, hole-board and in forced swimming tests. The results obtained indicate a general stimulant action of  $F_{3-5}$  on CNS. The finding that  $F_{3-5}$  decreases pentobarbital-sleeping time is consistent with the finding of Kushikata et al. (2002) observed with yohimbine, a known indole alkaloid. The fraction  $F_{3-5}$ , at the doses tested (25 and 50 mg/kg), did not evoke any signs of toxicity in treated animals and the intraperitoneal  $LD_{50}$  in mice was 400 mg/kg (unpublished observations). In conclusion, the data obtained in this study clearly demonstrate the pro-erectile effect of the indole rich fraction from *Aspidosperma ulei* in mice mediated by dopaminergic, noradrenergic and nitrenergic mechanisms. The study further supports the traditional use of *Aspidosperma* plant extracts as a remedy for erectile dysfunction.

#### Acknowledgements

This study was supported by grants from CNPq, CAPES and FUNCAP, Brazil.

#### References

- Adimoelja, A., 2000. Phytochemicals and the breakthrough of traditional herbs in the management of sexual dysfunctions. *International Journal of Andrology* 23, 82–84.
- Andersson, K.E., Wagner, G., 1995. Physiology of penile erection. *Physiological Reviews* 75, 191–236.
- Archer, J., 1973. Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Animal Behavior* 21, 205–235.
- Carlini, E.A., Contar, J.D.P., Silva-Filho, A.R., Silveira-Filho, N.G., Frochtengarten, M.L., Bueno, O.F.A., 1986. Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf). Part I: effects of teas prepared from the leaves on the laboratory animals. *Journal of Ethnopharmacology* 17, 37–64.
- Chiou, W.F., Chen, J., Chen, C.F., 1998. Relaxation of *corpus cavernosum* and raised intracavernous pressure by beberine in rabbit. *British Journal of Pharmacology* 125, 1677–1684.
- Clark, J.T., Smith, E.R., Davidson, J.M., 1985. Evidence for the modulation of sexual behavior by alpha-adrenoceptors in male rats. *Neuroendocrinology* 41, 36–43.
- Deutsch, H.F., Evenson, M.A., Drescher, P., Christoph, S., Madsen, P.O., 1994. Isolation and biological activity of aspidospermine and quebrachamine from *Aspidosperma* tree source. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 12, 1283–1287.
- Drewes, S.E., George, J., Khan, F., 2003. Recent findings on natural products with erectile-dysfunction activity. *Phytochemistry* 62, 1019–1025.
- Dunham, N.W., Miya, T.S., 1957. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rat and mice. *Journal of American Pharmaceutical Association* 46, 208–209.
- Ernst, E., Pittler, M.H., 1998. A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Journal of Urology* 159, 433–436.
- File, S.E., Pellow, S., 1985. The effects of triazolobenzodiazepines in two animal tests of anxiety and in the holeboard. *British Journal of Pharmacology* 86, 729–735.
- Ghadiri, M.K., Gorji, A., 2004. Review of impotence: natural remedies for impotence in medieval Persia. *International Journal of Impotence Research* 16, 80–83.

- Guay, A.T., Spark, R.F., Jacobson, J., Murray, F.T., Geisser, M.E., 2002. Yohimbine treatment of organic erectile dysfunction. *International Journal of Impotence Research* 14, 25–31.
- Guirguis, W.R., 1998. Oral treatment of erectile dysfunction: from herbal remedies to designer drugs. *Journal of Sexual Marital Therapy* 24, 69–73.
- Heaton, J.P.W., 2000. Central neuropharmacological agents and mechanism in erectile dysfunction: the role of dopamine. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 24, 561–569.
- Kernohan, A.F., McIntyre, M., Hughes, D.M., Tam, S.W., Worcel, M., Reid, J.L., 2005. An oral yohimbine/L-arginine combination (NMI 861) for the treatment of male erectile dysfunction: a pharmacokinetic, pharmacodynamic and interaction study with intravenous nitroglycerine in healthy male subjects. *British Journal of Clinical Pharmacology* 59, 85–93.
- Kushikata, T., Hirota, K., Yoshida, H., Kubota, T., Ishihara, H., Matsuki, A., 2002. Alpha-2 adrenoceptor activity affects propofol-induced sleep time. *Anesthesia Analgesia* 94, 1201–1206.
- Lebret, T., Herve, J.M., Gorny, P., Worcel, M., Botto, H., 2002. Efficacy and safety of a novel combination of L-arginine glutamate and yohimbine hydrochloride: a new oral therapy for erectile dysfunction. *European Urology* 41, 608–613.
- Meston, C.M., Worcel, M., 2002. The effects of yohimbine plus L-arginine glutamate on sexual arousal in postmenopausal women with sexual arousal disorder. *Archives of Sex Behavior* 31, 323–332.
- Morales, A., 2000. Yohimbine in erectile dysfunction: the facts. *International Journal of Impotence Research* 12, S70–S74.
- Mullhall, J.P., Daller, M., Traish, A.M., Gupta, S., Park, K., Salimpout, P., Payton, T.R., Krane, R.J., Goldstein, I., 1997. Intracavernosal forskolin: role in management of vasculogenic impotence resistant to standard 3-agent pharmacotherapy. *Journal of Urology* 158, 1752–1759.
- Paredes, R.G., Agmo, A., 2004. Has dopamine a physiological role in the control of sexual behavior? A critical review of the evidence. *Progress in Neurobiology* 73, 179–226.
- Porsolt, D., Bertin, A., Jalfre, M., 1977. Behavioural despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et Therapie* 229, 327–336.
- Rampin, O., Jérôme, N., Suaudeau, C., 2003. Proerectile effects of apomorphine in mice. *Life Sciences* 72, 2329–2336.
- Riley, A.J., 1994. Yohimbine in the treatment of erectile disorder. *British Journal of Clinical Practice* 48, 133–136.
- Shabsigh, R., Anastasiadis, A.G., 2003. Erectile dysfunction. *Annual Review of Medicine* 54, 153–168.
- Simonsen, U., Prieto, D., Hernandez, M., 1997. Prejunctional alpha 2-adrenoceptors inhibit nitergic neurotransmission in horse penile resistance arteries. *Journal of Urology* 157, 2356–2360.
- Sperling, H., Lorenz, A., Krege, S., Arndt, R., Michel, M.C., 2002. An extract from the bark of *Aspidosperma quebracho blanco* binds to human penile alpha-adrenoceptors. *Journal of Urology* 168, 160–163.
- Staerk, D., Norrby, P.O., Jaroszewski, J.W., 2001. Conformational analysis of indole alkaloids corynantheine and dihydrocorynantheine by dynamic <sup>1</sup>H NMR spectroscopy and computational methods: steric effects of ethyl vs vinyl group. *Journal of Organic Chemistry* 66, 2217–2221.
- Van Driel, M.F., van de Wiel, H.B., Mensink, H.J., 1994. Some mythologic, religious, and cultural aspects of impotence before the modern era. *International Journal of Impotence Research* 6, 163–169.
- Zaher, T.F., 1998. Papaverine plus PGE<sub>1</sub> versus PGE<sub>1</sub> alone for intracorporeal injection therapy. *International Journal of Urology and Nephrology* 30, 193–196.