

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**  
**(PRODUTOS NATURAIS)**

Estudo sobre a química e atividade biológica das cascas de *Aspidosperma desmanthum* e *A. vargasii* (Apocynaceae).

**MARYCLEUMA CAMPOS HENRIQUE**

MANAUS 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA  
(PRODUTOS NATURAIS)

Estudo sobre a química e atividade biológica das cascas de *Aspidosperma desmanthum* e *A. vargasii* (Apocynaceae).

MARYCLEUMA CAMPOS HENRIQUE

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Química (Produtos Naturais) da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do título de **Mestre em Química** na área de concentração em **Química de Produtos Naturais**.

MANAUS 2007

MARYCLEUMA CAMPOS HENRIQUE

Estudo sobre a química e atividade biológica das  
cascas de *Aspidosperma desmanthum* e *A.*  
*vargasii* (Apocynaceae).

Dissertação apresentada à Coordenação  
do Programa de Pós-graduação em  
Química (Produtos Naturais) da  
Universidade Federal do Amazonas,  
como parte dos requisitos para obtenção  
do título de Mestre em Química na área  
de concentração em Química de  
Produtos Naturais.

ORIENTADOR: ADRIAN MARTIN POHLIT

**MANAUS 2007**

HENRIQUE, Marycleuma Campos  
Estudo sobre a química e atividade biológica das cascas de  
*Aspidosperma desmanthum* e *A. vargasii* (Apocynaceae).  
Universidade Federal do Amazonas – UFAM. Manaus, 200x.

000 p. ilustr.

Dissertação de Mestrado

Palavras Chaves:

1. Amargoso;
2. Amarelão;
3. Elipticina;
4. N-metiltetraidroelipticina;
5. Aspidocarpina
4. *Artemia franciscana*;
5. *Aedes aegypti*;
6. Antitumoral;
7. Antimalárico;
8. Cristalografia

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
COORDENAÇÃO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
QUÍMICA (PRODUTOS NATURAIS)**

Esta dissertação foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química, outorgado pela Universidade Federal do Amazonas, e em cuja Biblioteca Central encontra-se à disposição dos interessados.

**MARYCLEUMA CAMPOS HENRIQUE**

**Banca Examinadora**

---

**Dr. Adrian Martin Pohlit - Orientador**

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA

---

**Dr<sup>a</sup>. Alaíde Braga de Oliveira- Membro**

Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

---

**Dr<sup>a</sup>. Maria Lúcia Belém Pinheiro – Membro**

Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Dedico este trabalho a Deus, a minha mãe Maria , ao meu pai Manoel (*in memoriam*), aos meus irmãos e ao meu noivo Suniá Gomes Silva.

## AGRADECIMENTOS

- **Acima de tudo a Deus por infinita sabedoria e misericórdia.**
- Ao Dr. Adrian Martin Pohlit, pela orientação, paciência, amizade e ensinamentos os quais influenciaram em minha formação acadêmica.
- Ao Dr. Sergio Massayoshi Nunomura, pela orientação, amizade que contribuíram para realização deste trabalho.
- Ao Dr. Jefferson Rocha de Andrade Silva, Dr. Kelson Mota, Dr. Maria Lúcia Pinheiro e a Dr. Maria Da paz pelos ensinamentos aprendidos durante este trabalho.
- Ao Dr. Massayoshi, a Msc. Laura Cristina P. de Oliveira e ao Sr. Luiz Carlos Roque, pela obtenção de espectros de RMN , os quais contribuíram para este trabalho.
- Ao Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes, Carlos Alexandre Carollo (doutorando) e José Carlos Tomaz (Especialista em Espectrometria de Massas) da USP-Ribeirão Preto, pelos espectros de massas e ajuda dispensada.
- Dr<sup>a</sup>. Regina H. de A. Santos do Instituto de Química de São Carlos - USP e Dr<sup>a</sup>. Claudia C. Silva do Departamento de Geociências da Universidade federal do Amazonas, pela cooperação na obtenção de análises de Cristalografia.

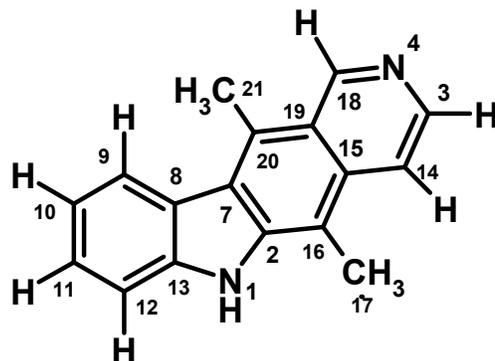
- Ao PNOPG / CNPQ nos. de processos 520.354 / 1999-0 e 550260 / 2001 – 3, Probem (contrato Bioamazonia – Basa – Fepad) e PPBio / MCT / CNPq proc. No. 480002 / 2004 – 5 pelos financiamentos recebidos em apoio a este estudo. Também ao PPG-7 / CNPq proc. N°. 557106 / 2005-2.
- Às bolsistas do Laboratório Malária e Dengue (CPCS /INPA): Érika Gomes, Dulcimar e Yara Graça.
- A Dr. Rita Saraiva, a doutoranda Ana Cristina e aos demais amigos do LAPAAM / (INPA).
- A Gláucia e Mirian pelo apoio dado para elaboração deste trabalho.
- À minha família, aos meus amigos Alexandre Alecrim, Janeide Lima, Ellen Cristina, Patrícia Pinto, Andreza, Karla, Zelina e ao meu noivo Suniá Gomes pela valiosa contribuição na realização deste trabalho.

*“Se sorte for sinônimo de trabalho, então sou uma pessoa abençoada”.*

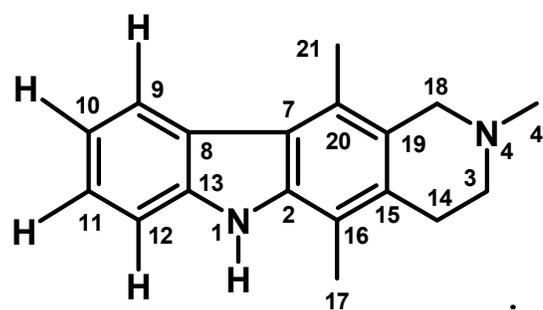
## RESUMO

As espécies *A. desmanthum* e *A. vargasii* (Apocynaceae), conhecidas popularmente na Amazônia por amargoso e amarelão, respectivamente, são muito utilizadas na medicina popular principalmente, suas cascas, na forma de chás. Este trabalho descreve o estudo químico das cascas dessas espécies que resultou no isolamento e na identificação dos alcalóides elipticina e N-metiltetrahydroelipticina provenientes da *A. vargasii*, e aspidocarpina, da *A. desmanthum*. A identificação foi feita baseada em espectros de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e os bidimensionais HSQC, COSY, HMBC, NOESY, massas de alta resolução por elétron spray (HR-ESI-MS), UV e IV, realização da identificação dos alcalóides elipticina e aspidocarpina foi apoiada ainda por análise de difração de raios-X e comparação com os dados da literatura. Os extratos etanólicos, frações clorofórmicas, bem como alcalóides isolados apresentaram letalidade para *Artemia franciscana* e foram inativos para *Aedes aegypti*, comportamentos este, verificado para as duas espécies em estudo. A atividade antitumoral do extrato etanólico, bem como algumas de suas frações e alcalóides isolados de *A. vargasii* foram ativos em teste *in vitro* para as linhagens de células tumorais (mama, cólon e sistema nervoso). Observou-se para o alcalóide elipticina atividade antimalárica *in vitro* expressiva frente ao *Plasmodium falciparum*. O extrato etanólico de *A. desmanthum* apresentou baixa atividade antitumoral, no entanto, grande parte de suas frações foram ativas. Observou-se ainda para essa espécie atividade antimalárica para o alcalóide isolado aspidocarpina.

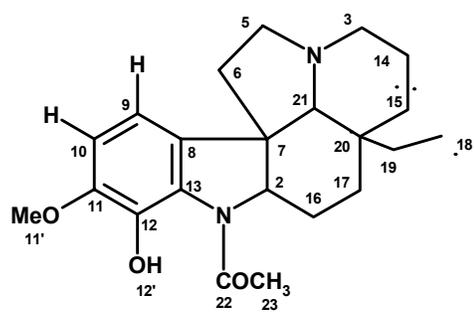
**Palavras-chave:** *A. vargasii*, *A. desmanthum*, elipticina, N-metiltetrahydroelipticina, aspidocarpina, antitumoral e antimalárico.



Elipticina



N-metiltetraidroelipticina

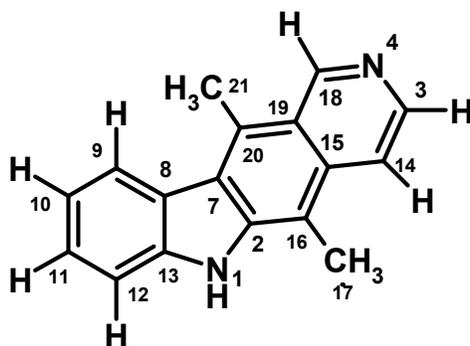


Aspidocarpina

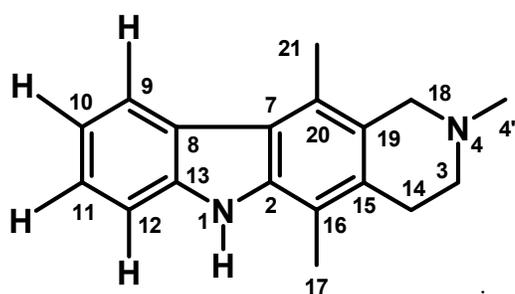
## ABSTRACT

The species *A. desmanthum* and *A. vargasii* (Apocynaceae), known popularly in the Amazon for “amargoso” and “amarelão”, respectively, are used in the folk medicine mainly, its barks, in the form of teas. This work describes the chemical study of the barks of these species that resulted in the isolation and the identification of the alkaloids ellipticine and N-methyltetrahydroellipticine from the *A. vargasii*, and aspidocarpine, of the *A. desmanthum*. The identification was made based in spectra of  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  RMN and bidimensional HSQC, COSY, HMBC, NOESY, high resolution for electron spray impact masses (HR-ESI-MS), UV and IR, accomplishment of the identification of alkaloids ellipticine and aspidocarpine was confirmed by analysis of X-rays and comparison with data of the literature. The ethanol extracts, chloroform fractions, as well as isolated alkaloids presented lethality for *Artemia franciscana* and has been inactive for *Aedes aegypti*, behaviors this, observed for the two species in study. The antitumor activity of the ethanol extract, as well as some of its fractions and isolated alkaloids of *A. vargasii* has been active in test *in vitro* for tumor cells (breast, colon and nervous system). High antimalarial activity was observed for ellipticine alkaloids *in vitro* for *Plasmodium falciparum*. The ethanol extract of *A. desmanthum* presented low antitumor activity, however, great part of its fractions has been active. Antimalarial activity for aspidocarpine alkaloid isolated was observed for this specie.

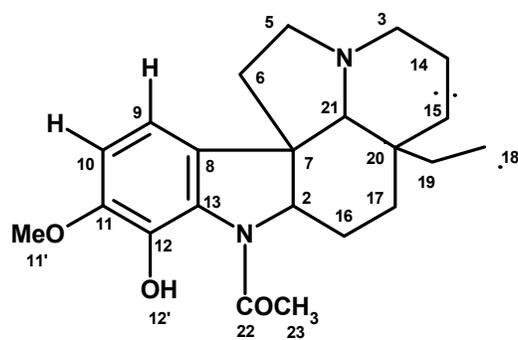
**Key words:** *A. vargasii*, *A. desmanthum*, ellipticine, N-methyltetrahydroellipticine, aspidocarpine, antitumor and antimalarial.



Ellipticine



N-methyltetrahydroellipticine



Aspidocarpine

## GLOSSÁRIO

ápice	porção terminal da folha, raiz, etc.
cordado	folha cuja base é escavada ou reentrante.
coriáceas	com consistência de couro.
corola	invólucro floral, por dentro do cálice, geralmente a parte mais vistosa das flores, de cores variadas, formada por um ou mais segmentos livres ou concrecidos, as pétalas.
decíduo	planta cujas folhas caem em certa época do ano ou após amadurecimento com novas brotações após um período de repouso.
folículo	fruto seco, deiscente, oriundo de um gineceu unicarpelar ou apocarpo, que se abre por uma única fenda central, e, contendo de uma a várias sementes.
glabras	órgão desprovido de pêlos.
lanceolado	folha em forma de lança.
lobos	cada uma das divisões, geralmente do labelo.
lóbulos	divisão profunda nas folhas ou nas flores
membranáceas	de consistência delicada, parecendo uma membrana
oblongo	que tem mais comprimento que largura
obovais	que tem ápice mais largo que a base
pecíolo	haste que suporta o limbo da folha

pedicelo	haste de uma flor individual, se fizer parte de uma inflorescência
sésseis	diretamente inserido, sem pedículo ou haste de sustentação
veloso	possui veludo, velo, lanoso, felpudo.

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	30
1. A família Apocynaceae.	32
1.1. Gênero <i>Aspidosperma</i> .	34
1.2. Características gerais da morfologia do Gênero <i>Aspidosperma</i> .	41
1.3. <i>Aspidosperma desmanthum</i> Benth. ex Mull. Arg	44
1.4. <i>Aspidosperma vargasii</i> A.DC.	46
1.5. Etnobotânica do gênero <i>Aspidosperma</i> .	48
1.6. Atividade biológica de extratos e frações de <i>Aspidosperma</i> spp.	52
1.6.1. Atividade Antimicrobiana	52
1.6.2. Atividade Antibacteriana	52
1.6.3. Atividade Antimalárica	53
1.6.4. Atividade Antifúngica	53
1.6.5. Atividade citotóxica em camundongos e letalidade contra <i>Artemia</i> <i>franciscana</i> e <i>Aedes aegypti</i> .	53
1.6.6. Atividade anti-tripanosossoma	54
1.6.7. Outras atividades biológicas	54
1.7. Química do gênero <i>Aspidosperma</i> .	55
1.7.1. Alcalóides indólicos	56
1.8. Alcalóides isolados de algumas de <i>Aspidosperma</i> spp.	62

1.9. Atividade biológica de alcalóides indólicos de <i>Aspidosperma</i> spp.	86
1.9.1. Atividade antitumoral	86
1.9.2. Atividade antimicrobiana	87
1.9.3. Atividade antibacteriana	87
1.9.4. Atividade antifúngica	87
1.9.5. Atividade antiplasmódica	88
1.9.6. Outras atividades biológicas	88
2. OBJETIVOS	89
2.1. Gerais	89
2.2. Específicos	89
3. PARTE EXPERIMENTAL	90
3.1. Materiais e Métodos	90
3.1.1. Materiais	90
3.1.1.1. Equipamentos e Acessórios de Laboratório.	90
3.1.2. Cromatografia	91
3.1.3 Métodos espectroscópicos.	92
3.1.3.1. RMN	92
3.1.3.2. IV e UV	92
3.1.3.3. Espectroscopia de massas por elétron-spray de alta resolução (HR- ESI-MS)	93

3.1.3.4. Análise estrutural por difração de raios-X	94
3.1.4. Solventes	94
3.2. Resumo dos métodos e resultados preliminares.	94
3.2.1. Coleta e Identificação do material vegetal.	95
3.2.2. Moagem do Material Vegetal.	96
3.2.3. Preparação dos extratos.	97
3.3. Nova coleta de <i>A. desmanthum</i> e <i>A. vargasii</i>	101
3.3.1. Identificação botânica	101
3.4. Preparação do extrato etanólico/NH <sub>3</sub> 1 %	103
3.4.1. Extração por maceração em etanol/NH <sub>3</sub> 1%	103
3.5. Fracionamento padrão das espécies de <i>Aspidosperma</i> neste estudo (Figura 15).	104
3.6. <i>Aspidosperma vargasii</i>	106
3.6.1. Fracionamento cromatográfico de 2pHV8.	107
3.6.1.1. Fracionamento da fração 8A3.	108
3.6.1.2. Purificação da fração 8A3.2	109
3.6.1.3. Purificação da fração 8A3.4	110
3.7. <i>Aspidosperma desmanthum</i>	111
3.7.1. Fracionamento cromatográfico de <i>A. desmanthum</i> 2DpH8D	112
3.7.1.1. Purificação da fração 8D4	114
3.8. Ensaio biológicos	115
3.8.1. Preparo das amostras para os testes biológicos.	115

3.8.1.1. Teste de letalidade frente <i>Artemia franciscana</i> .	116
3.8.1.2. Teste da atividade larvicida contra <i>Aedes aegypti</i>	118
3.8.1.3. Testes de atividade antitumoral	119
3.8.1.4. Teste de atividade antimalárica	121
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	124
4.1. Avaliação da citotoxicidade frente <i>Artemia franciscana</i> e atividade larvicida contra <i>Aedes aegypti</i> .	125
4.3. Atividade antimalárica	129
4.4. Identificação dos alcalóides isolados	130
4.4.1 Identificação estrutural do alcalóide 1 (8A3.2.1)	130
4.4.1.1. Análise dos espectros de IV e UV do alcalóide 1 (Elipticina)	132
4.4.1.2. Análise dos espectros de RMN do alcalóide 1 (elipticina).	135
4.4.1.3 Análise de cristalografia de monocristais de raios-X do alcalóide 1 (elipticina).	147
4.4.1.4. Análise do espectro de massas do alcalóide 1 (elipticina).	148
4.4.2. Identificação estrutural do alcalóide 2 (8A3.4.1).	149
4.4.2.1. Análise dos espectros de IV e UV do alcalóide 2 (N-metiltetraidroelipticina)	150
4.4.2.2. Análise dos espectros de RMN do alcalóide 2 (N-metiltetrahidroelipticina)	153
4.4.2.3. Análise do espectro de massas do alcalóide 2	168
4.4.3. Identificação estrutural do alcalóide 3 (aspidocarpina)	169
4.4.3.1. Análise dos espectros de IV e UV do alcalóide 3 (Aspidocarpina)	170

4.4.3.2. Análise dos espectros de RMN do alcalóide 3 (Aspidocarpina)	173
4.4.3.3. <i>Análise do espectro de massas do alcalóide 3</i>	185
4.4.3.4. <i>Análise de cristalografia de monocristais de raios-X da</i>	186
Aspidocarpina	
5. CONCLUSÃO	191
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	193
ANEXOS	215

## LISTA DE ABREVIÇÃO

%	porcentagem
$\delta$	deslocamento químico
$\phi$	diâmetro
A.	<i>aspidosperma</i>
Aa %	porcentagem de mortalidade das larvas de <i>aedes aegypti</i>
Af %	porcentagem de mortalidade das larvas de <i>artemia franciscana</i>
ca.	cerca de
CCD	cromatografia em camada delgada
CCDP	cromatografia em camada delgada preparativa
$\text{CDCl}_3$	clorofórmio deuterado
$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	diclorometano
$\text{CHCl}_3$	clorofórmio
$\text{CI}_{50}$	concentração inibitória de 50% do crescimento da população (células ou microrganismos)
CIM	concentração inibitória mínima
cm	centímetro
CPCS	coordenação de pesquisas das ciências da saúde
CPPN	coordenação de pesquisas em produtos naturais
d	dubleto
dd	duplo dubleto
ddd	duplo duplo dubleto
dq	duplo quarteto
DMSO	dimetilsulfóxido
EtOH	etanol

g	grama
IV	infravermelho
<i>J</i>	constante de acoplamento
kg	quilograma
LAPAAM	laboratório de princípios ativos da amazônia
m	múltiplo
m/z	razão massa carga
M <sup>+</sup>	íon molecular
Mart.	carl friedrich philipp von martius (botânico e explorador alemão; 1794-1868)
MeOH	metanol
mg	miligrama
mL	mililitro
Müell. Arg.	johannes müller argoviensis (botânico suíço; 1828-1896)
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	carbonato de sódio
pH	potencial de hidrogênio
R <sub>f</sub>	fator de retenção (do inglês <i>retardation factor</i> )
RMN <sup>1</sup> H	ressonância magnética nuclear do núcleo de hidrogênio 1
s	singleto
<i>sp</i>	espécie
<i>spp</i>	algumas espécies
UV	ultra-violeta
µg	micrograma
RMN <sup>13</sup> C	ressonância magnética nuclear do núcleo de carbono 13

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Distribuição mundial da família Apocynaceae.
- Figura 2.** Exemplos de árvores, troncos e cascas de *Aspidosperma* spp.
- Figura 3.** Folhas e flores de espécies de *Aspidosperma*
- Figura 4.** Sementes e frutos de espécies de *Aspidosperma*
- Figura 5.** Tronco (T), cascas (C), folha (F), ramos (R) e Látex (L) de *A. desmanthum*.
- Figura 6.** Distribuição geográfica de *A. desmanthum* Benth. ex Mull. Arg
- Figura 7.** Tronco (T), cascas (C), folha (FL) e Frutos e sementes (FS) de *A. vargasii* A.DC.
- Figura 8.** Distribuição geográfica de *A. vargasii*
- Figura 9.** O indol
- Figura 10.** Relação biossintética das classes de alcalóides indólicos monoterpênicos.
- Figura 11.** Sistema de numeração do esqueleto da ioimbina (14) e adotado nesta dissertação.
- Figura 12.** Estruturas de alguns alcalóides Indólicos de *aspidosperma* .
- Figura 13.** Localização da Reserva Adolpho Ducke.
- Figura 14a.** Exsicata do espécime de *Aspidosperma desmanthum* Benth. ex Mull. Arg sob estudo. (Fonte: herbário do INPA).
- Figura 14b.** Exsicata do espécime de *Aspidosperma vargasii* A. DC. sob estudo.

(Fonte: herbário do INPA).

- Figura 15.** Procedimento para extração de Alcalóides.
- Figura 16.** Fracionamento do extrato 2pHV8.
- Figura 17.** Fracionamento da fração 8A3.
- Figura 18.** Fracionamento cromatográfico da fração 8A3.2
- Figura 19.** Fracionamento cromatográfico da fração 8A3.4
- Figura 20.** Fracionamento cromatográfico da fração 2DpH8D
- Figura 21.** Fracionamento cromatográfico da subfração 8D4.
- Figura 22.** Teste de letalidade às larvas de *A. franciscana*.
- Figura 23.** Teste de letalidade frente a *Aedes aegypti*.
- Figura 24.** Estrutura e sistema de numeração do alcalóide 1 (**8A3.2.1**) segundo sua biogênese (Ahond *et al.*, 1978).
- Figura 25.** Detalhes da cromatografia e dos cristais do alcalóide 1(elipticina).
- Figura 26** Espectro de UV na faixa de 200 a 800 nm do alcalóide 1 (elipticina) em CHCl<sub>3</sub>: MeOH (1:1).
- Figura 27.** Espectro de IV do alcalóide 1 (elipticina) em pastilha de KBr.
- Figura 28.** Ampliação da faixa de  $\delta$  7,2 a 9,5 do espectro de RMN de <sup>1</sup>H do alcalóide 1 (elipticina).
- Figura 29.** Ampliação da região aromática do espectro de HSQC do alcalóide 1 (elipticina) e algumas correlações.
- Figura 30.** Ampliação da região aromática do espectro de COSY do alcalóide 1(elipticina) e algumas correlações.
- Figura 31.** Ampliação da região aromática do espectro de HMBC do

alcalóide 1 (elipticina) e algumas correlações.

- Figura 32.** Ampliação da região referente as metilas do espectro de HMBC do alcalóide 1 (elipticina) e algumas correlações.
- Figura 33..** Ampliação espectro de NOESY do alcalóide 1 (elipticina) e atribuições de algumas correlações .
- Figura 34.** Representações ORTEP e esquemática do alcalóide **1** e com os átomos identificados.
- Figura 35.** Espectro de massas por *electrospray* de alta resolução do alcalóide 1 (elipticina).
- Figura 36.** Estrutura e sistema de numeração do alcalóide 2 (N-metiltetraidroelipticina)
- Figura 37.** Espectro de UV na faixa de 200 a 800 nm do alcalóide 2 (N-metiltetraidroelipticina) em  $\text{CHCl}_3$ : MeOH (1:1).
- Figura 38.** Espectro de IV do alcalóide 2 (N- metiltetraidroelipticina) em pastilhas de KBr.
- Figura 39.** Estrutura do alcalóide N-metiltetraidroelipticina e as estruturas modelos de comparação para análises de dados de RMN.
- Figura 40.** Ampliação da faixa de  $\delta$  7,0 a 8,5 do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do alcalóide 2 ( N-metiltetraidroelipticina).
- Figura 41.** Região aromática do espectro de COSY e atribuição as correlações observadas para N-metiltetraidroelipticina.
- Figura 42.** Ampliação da região aromática do espectro de HMBC da correlações observadas para N-metiltetraidroelipticina.
- Figura 43** Ampliação da região de campo alto do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do

alcalóide 2 (500 MHz, CHCl<sub>3</sub>:MeOH). **B** Ampliação de campo alto do espectro de RMN de <sup>1</sup>H da N-metiltetraidroelipticina segundo Burnell e Casa (1967).

- Figura 44.** Ampliação do espectro de HMBC da região aromática correlações observadas.
- Figura 42** **A** Ampliação da região de campo alto do espectro de RMN de <sup>1</sup>H do alcalóide 2 (500 MHz, CHCl<sub>3</sub>:MeOH). **B** Ampliação de campo alto do espectro de RMN de <sup>1</sup>H da N-metiltetrahidroelipticina segundo Burnell e Casa (1967).
- Figura 43** Espectro de HMBC da região em  $\delta$  100 a 150 e em  $\delta$  2,0 e 4,5 e algumas correlações.
- Figura 44** Região de  $\delta$  100 a 150 espectro de HMBC da e  $\delta$  2,0 e 4,5 e algumas correlações da N-metiltetraidroelipticina.
- Figura 45** Espectro de NOESY do alcalóide 2 (N-metiltetraidroelipticina) e as correlações observadas.
- Figura 46 .** Espectro de massas por *electrospray* de alta resolução do alcalóide 2 (N-metiltetrahidroelipticina).
- Figura 47** Detalhes em CCDC do alcalóide 3 (Aspidocarpina)
- Figura 48** Estrutura e sistema de numeração do alcalóide 3 (Aspidocarpina).
- Figura 49** Espectro de UV na faixa de 200 a 800 nm do alcalóide 3 (aspidocarpina) em CHCl<sub>3</sub>.
- Figura 50** Espectro de IV do alcalóide 3 (aspidocarpina) em pastilhas de KBr.
- Figura 51** Ampliação da região de  $\delta$  6,6 a 6,8 do espectro de RMN de <sup>1</sup>H do alcalóide 3 (aspidocarpina).

- Figura 52** Ampliação do espectro de HMBC da região aromática do alcalóide 3 (aspidocarpina) e algumas correlações.
- Figura 53** Ampliação da região de  $\delta$  1,68 a 2,26 do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do alcalóide 3 (aspidocarpina) e atribuições dos sinais.
- Figura 54** Ampliação da região de  $\delta$  0,60 a 3,20 do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do alcalóide 3 (aspidocarpina) e atribuições dos sinais.
- Figura 55** Ampliação da região alifática do espectro de COSY do alcalóide 3 (aspidocarpina) e de algumas correlações.
- Figura 56a** Ampliações do espectro de HMBC da região alifática do alcalóide 3 (aspidocarpina) e algumas correlações.
- Figura 56b** Ampliações do espectro de HMBC da região alifática do alcalóide 3 (aspidocarpina) e algumas correlações.
- Figura 57** Ampliação do Espectro de NOESY da Região alifática do alcalóide 3 e algumas correlações.
- Figura 58** Espectro de massas por *electrospray* de alta resolução do alcalóide 3 (aspidocarpina).
- Figura 59** Representações ORTEP e esquemática da estrutura da aspidocarpina com os átomos identificados.

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Informações taxonômicas sobre o gênero *Aspidosperma*.
- Tabela 2.** Divisões do gênero *Aspidosperma* no século XIX.
- Tabela 3.** Espécies do gênero *Aspidosperma*.
- Tabela 4.** Indicações tradicionais de algumas espécies de *Aspidosperma*.
- Tabela 5.** Classes de alcalóides com núcleo indólico.
- Tabela 6.** Alguns Alcalóides Indólicos Isolados de Algumas *Aspidosperma* spp.
- Tabela 7.** Material vegetal disponível para estudo das *Aspidosperma* spp.
- Tabela 8.** Dados sobre a preparação dos extratos aquosos e alcoólicos a partir dos materiais vegetais secos e moídos (1ª coleta)
- Tabela 9.** Dados sobre fracionamento e atividade biológica.
- Tabela 10.** Extratos etanol/NH<sub>4</sub>OH 1% e frações obtidas de *A. vargasii*.
- Tabela 11.** Extratos etanol/NH<sub>4</sub>OH 1% e frações obtidas de *A. desmanthum*
- Tabela 12.** Bioatividade dos extratos, frações e alcalóides isolados de *A. desmanthum* e *A. vargasii* (concentração de 500 µg / mL)
- Tabela 13.** Atividade antitumoral de extrato, frações e alcalóides isolados.
- Tabela 14.** Resultado de CI<sub>50</sub> para os alcalóides 1 e 2 isolados de *A. vargasii*
- Tabela 15.** Comparação dos dados de UV do alcalóide 1 e da Elipticina descrito na literatura.
- Tabela 16.** Dados de RMN de <sup>1</sup>H do alcalóide 1 (Elipticina) e da Literatura.
- Tabela 17.** Dados de RMN de <sup>13</sup>C e DEPT do alcalóide 1 (elipticina) e da literatura.
- Tabela 18.** Correlações observadas no espectro de COSY e NOESY do alcalóide 1 (elipticina).
- Tabela 19.** Correlações observadas no espectro de HSQC e HMBC do alcalóide 1 (elipticina).
- Tabela 20.** Dados de análise de cristalografia para determinação da elipticina.

- Tabela 21.** Comparação dos Dados de UV do alcalóide 2 e da N-metiltetraidroelipticina da literatura.
- Tabela 22.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  do alcalóide 2 (N-metiltetraidroelipticina) e da literatura.
- Tabela 23.** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  do Alcalóide 2 (N-metiltetraidroelipticina) em comparação com os dados da literatura para a janetina.
- Tabela 24.** Correlações observadas no espectro de COSY e NOESY do alcalóide 2 (N- metiltetraidroelipticina).
- Tabela 25.** Correlações observadas no espectro de HSQC e HMBC do alcalóide 2 (N-metiltetraidroelipticina).
- Tabela 26.** Comparação com os dados de UV do alcalóide 3 com os encontrados na literatura para a Aspidocarpina.
- Tabela 27.** Dados de análise de cristalografia para determinação da aspidocarpina (37)
- Tabela 28.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  do alcalóide 3 (Aspidocarpina) e da Literatura.
- Tabela 29.** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT do alcalóide 3 e da literatura .
- Tabela 30.** Correlações observadas no espectro de HSQC e HMBC do alcalóide 3.
- Tabela 31.** Correlações e interações observadas no espectro de COSY e NOESY do Alcalóide 3 respectivamente.

## INTRODUÇÃO

O conhecimento sobre as plantas sempre tem acompanhado a evolução do homem através dos tempos. As primitivas civilizações cedo se aperceberam da existência, ao lado das plantas comestíveis, de outras dotadas de maior ou menor toxicidade que, ao serem experimentadas no combate à doença, revelaram, embora empiricamente, o seu potencial curativo. O mais antigo dos compêndios farmacêuticos foi escrito em placas de barro, em escrita cuneiforme, por volta do ano 2600 A.C., na região da Mesopotâmia. Dentre as plantas neles descritas destacam-se a mirra, o cedro, o cipestre, a papoula e o alcaçuz (Cowen *et al.*, 1988; Newman *et al.*, 2000).

Textos antigos da Mesopotâmia relatam o uso do óleo de gergelim como anti-séptico em curativos cirúrgicos, o uso medicinal de minerais como o antimônio, mercúrio e enxofre e descrevem um teste de gravidez desenvolvido por médicos babilônicos, com base no sumo de diversas plantas e alumina (Internet 6).

Outra importante compilação de receitas medicinais antigas é o papiro egípcio de Ebers escrito por volta de 1500 a.C., com mais de 20 metros de comprimento. Neste papiro encontram-se cerca de 700 drogas e minerais muitos deles preparados e servidos ao som de orações e veiculados por vinho, cerveja, mel ou leite (Cowen *et*

*al.*, 1988; Newman *et al.*, 2000). Toda essa informação foi sendo, de início, transmitido oralmente às gerações posteriores, para depois, com o aparecimento da escrita, passar a ser compilada e guardada como um tesouro precioso. Mesmo tendo em conta toda a investigação até agora realizada, esta acaba por ser uma pequena parte do que, até ao momento, ainda está por fazer, já que é grande o número de plantas ainda não estudadas, tanto no sentido de uma utilização direta, como da obtenção de novos constituintes ativos, ou, muito simplesmente, de novos compostos farmacologicamente ativos.

Dentro desse contexto busca-se novas substâncias ou intensificar as potencialidades das já existentes, objetivando dar uma maior contribuição ao conhecimento químico e de atividade biológica das espécies do gênero *Aspidosperma* Mart, em especial *A. desmanthum* e *A. vargasii*, fez-se o estudo químico e atividade biológica dos extratos e substâncias isoladas de suas cascas.

## 1. A família Apocynaceae.



**Legenda:** ● Família Apocynaceae

**Fonte:** Internet 1, 2006 ; Endress e Bruyns, (2000).

**Figura 1.** Distribuição mundial da família Apocynaceae.

A família Apocynaceae pertence à divisão das Magnoliophytas, classe Magnoliopsida, ordem das Gentianales (Endress e Bruyns, 2000) e engloba de 250 a 550 gêneros e entre 3700 e 5100 espécies ocorrendo controvérsias quanto a esse número, pois segundo Ribeiro *et al.* (1999) há 200 gêneros e 2000 espécies e de

acordo com Moreira *et al.* (2004), seriam 300 gêneros e 2.000 espécies que se distribuem principalmente em áreas pantropical e subtropical. No Brasil ocorrem ca. de 376 espécies subordinadas a 41 gêneros (Endress e Bruyns, 2000 ; Sennblad e Bremer, 1994).

Em geral, plantas dessa família apresentam látex branco e abundante, em alguns casos, com coloração diferenciada, vermelho, sangue ou acastanhada (Ribeiro *et al.*, 1999). Os seus látex freqüentemente contêm constituintes prejudiciais e danosos a saúde (Schultes, 1979).

Devido à profusão de metabólitos secundários, a família é uma importante fonte de compostos bioativos. Os mais utilizados são os alcalóides indólicos (Schultes, 1979; Ribeiro *et al.*, 1999).

### 1.1. Gênero *Aspidosperma*.

O gênero *Aspidosperma*, nome de origem latina que significa semente em forma de escudo. As espécies pertencentes a esse gênero têm sido objeto de estudo devido, sobretudo, à presença de alcalóides indólicos em diferentes membros. Na Tabela 1 tem-se a posição taxonômica na qual se encontra o gênero *Aspidosperma* (Endress e Bruyns, 2000; Internet 2, 2006).

**Tabela 1.** Informações taxonômicas sobre o gênero *Aspidosperma*.

<b>Categoria</b>	<b>Táxon</b>
Classe	Magnoliopsida
Ordem	Gentianales
Família	Apocynaceae
Gênero	<i>Aspidosperma</i> Mart.

Distribui-se em regiões neotropicais (Marcondes-Ferreira e Kinoshita, 1996). As espécies de *Aspidosperma* apresentam uma variedade de habitats, as mesmas podem ser encontradas em cerrados da região centro – sul do Brasil, áreas inundadas nas margens dos rios da região Amazônica, Paraguai, Argentina, México e em regiões de elevação como Peru, Bolívia (Woodson, 1951), e constituí-se de ca. 43 espécies e encontrado em sua maioria no Brasil. As espécies desse gênero são utilizadas na produção de móveis, carpintaria, artesanato e também na medicina popular (Internet 3, 2006). Dentre as diversas espécies que ocorrem no Brasil podemos citar: *A. olivaceum*, *A. gomesianum*, *A. cylindrocarpum*, *A. illustre*,

*A. desmanthum*, *A. populifolium*, *A. eburneum*, *A. polyneuron*, *A. macrocarpon*, *A. parvifolium*, *A. subincanum*, *A. discolor*, *A. pyrifolium*, *A. riedelii*, *A. cuspa*, *A. ramiflorum* e *A. tomentosum*. Essas espécies são conhecidas popularmente como peroba na maioria das regiões brasileiras e como carapanaúba para espécies amazônicas (Internet 3, 2006).

Segundo Martius o gênero *Aspidosperma* foi descrito (1824a,b *apud* Marcondes-Ferreira e Kinoshita, 1996), baseado em cinco espécies. Sendo *Aspidosperma tomentosum* Mart escolhida por Woodson (1951) como a espécie tipo. Segundo De Candolle (1844 *apud* Marcondes-Ferreira e Kinoshita, 1996) fez, pela primeira vez, uma revisão do gênero, avaliando as espécies até então descritas e descrevendo outras, num total de 19 espécies, dividindo o gênero em dois grupos com algumas diferenças em suas características morfológicas. Mueller (1860 *apud* Marcondes-Ferreira e Kinoshita, 1996) reconheceu 39 espécies para o Brasil. No entanto Miers (1878 *apud* Marcondes-Ferreira e Kinoshita, 1996) exclui 12 espécies, duas das quais foram transferidas para o gênero *Geissospermum* e *Strempeleopsis* e, as outras 10 passaram a constituir um novo gênero, *Thyroma*, com base na morfologia das flores e frutos. Schumann (1895 *apud* Marcondes-Ferreira e Kinoshita, 1996) desconsiderou a proposta de divisão por realizada Miers (1878 *apud* Marcondes-Ferreira e Kinoshita, 1996) e manteve a de Mueller (1860 *apud* Marcondes-Ferreira e Kinoshita, 1996). Pichon (1947 *apud* Marcondes-Ferreira e Kinoshita, 1996) propôs uma nova divisão em 12 séries comportando cerca de 90 espécies. Sendo algumas descrições apresentadas na Tabela 2.

**Tabela 2.** Divisões do gênero *Aspidosperma* no século XIX.

<b>De Candolle (1844)</b>	<b>Mueller (1860)</b>	<b>Miers 878)</b>	<b>Schumann (1895)</b>
1. corola com 5 partida, lobos linear-lanceolados, ramos grossos, às vezes suberosos; folhas congestas nos ápices dos ramos.	1. lobos da corola iguais ou maiores que o tubo da corola, lanceolados.		1. <i>Macrobii</i> ramos suberosos e não suberosos
2. corola 5 semi-partida, lobos oval-oblongos; ramos não suberosos; folhas ao longo dos ramos.	2. lobos da corola 2 ou 4 vezes menor que o tubo da corola ovais.		2. <i>Microlobii</i>

*Thyroma*

---

Segundo Woodson (1951) este gênero possui 52 espécies distribuídas em nove séries, conforme se observa na Tabela 3.

**Tabela 3.** Espécies do gênero *Aspidosperma*.

<b>Nº.</b>	<b>Série (Woodson, 1951)</b>	<b>Espécie</b>
1	I	<i>A. macrocarpan</i> Mart.
2	Macrocarpa	<i>A. verbascifolium</i> Muell. Arg.
	II	
3	Ramiflora	<i>A. ramiflorum</i> Muell. Arg.
	III	
4		<i>A. multiflorum</i> A.DC.
5	Pyricolla	<i>A. pyrifolium</i> Mart.
6		<i>A. oliganthum</i> Woodson
7		<i>A. tomentosum</i> Mart.
8		<i>A. subincanum</i> Mart ex A.DC.
9		<i>A. parvifolium</i> A.DC.
10		<i>A. australe</i> Muell.
11		<i>A. pyricollum</i> Muell. Arg.
12		<i>A. vargasii</i> A.DC.
13		<i>A. Ulei</i> Mgf.
14		<i>A. reductum</i> (Hassl.)
	IV	
15		<i>A. disperrum</i> Muell. Arg.
16	Polyneura	<i>A. polyneuron</i> Muell. Arg.
17		<i>A. cylindrocarpon</i> Muell. Arg.
18		<i>A. cuspa</i> (HBK.)

**Tabela 3.** Espécies do gênero *Aspidosperma*.(Continuação).

Nº.	Série (Woodson, 1951)	Espécie
	V	
19	Rígida	<i>A. rigidum</i> Rusby
	VI	
20		<i>A. inundatum</i> Ducke
21	Nitida	<i>A. schultesii</i> Woodson
22		<i>A. megaphyllum</i> Woodson
23		<i>A. myristicifolium</i> (Mgf) Woodson
24		<i>A. carapanauba</i> M. Pichon
25		<i>A. marcgravianum</i> Woodson
26		<i>A. excelsum</i> Benth
27		<i>A. eburneum</i> F. Allem. Ex Sald
28		<i>A. oblongum</i> A.DC.
29		<i>A. discolor</i> A.DC.
30		<i>A. salgadense</i> Mgf.
31		<i>A. nitidum</i> Benth. Ex M. Arg.
32		<i>A. auriculatum</i> Mgf
33		<i>A. pichonianum</i> Woodson

**Tabela 3.** Espécies do gênero *Aspidosperma*.(Continuação).

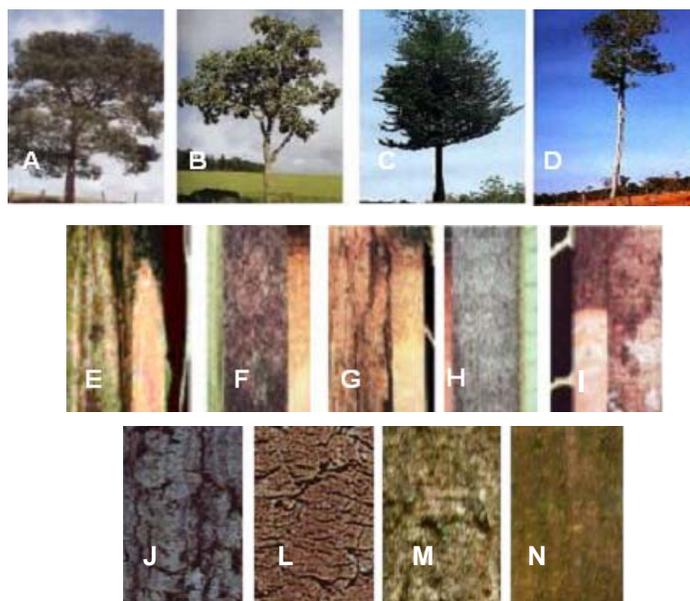
Nº.	Série (Woodson, 1951)	Espécie
34	VII	<i>A. illustre</i> (Vell) Kuhlms & Pirajá
35	Stegomeria	<i>A. stegomeris</i> (Woodson)
36		<i>A. curranii</i> Standl.
37	VIII	<i>A. quebracho-blanco</i> Schlecht.
38	Quebrachines	<i>A. horco-kebracho</i> Speg.
39	IX	<i>A. fendleri</i> Woodson
40	Nobiles	<i>A. spruceanum</i> Benth ex. Muell. Arg.
41		<i>A. steyermarkii</i> Woodson
42		<i>A. nobile</i> Muell. Arg.
43		<i>A. steinbachii</i> Mgf.
44		<i>A. obscurinervium</i> Azembuja.
45		<i>A. verruculosa</i> Muell. Arg.
46		<i>A. decussatum</i> Woodson
47		<i>A. melanocalyx</i> Muell. Arg.
48		<i>A. eteanum</i> Mgf.
49		<i>A. megalocarpon</i> Muell. Arg.
50		<i>A. leucostachys</i> Kuhlms.
51		<i>A. desmanthum</i> Benth. ex Mull. Arg
52		<i>A. sandwithianum</i> Mgf.

Marcondes-Ferreira e Kinoshita (1996) após um estudo detalhado de ampla coleção de exemplares de *Aspidosperma* propuseram uma nova divisão em dois subgêneros baseada em características dos ramos, folhas, inflorescências, flores e frutos: *Aspidosperma* subgen. *Coutinia* (Vell) Marc-Ferr. e *Aspidosperma* Mart. subgen. *Aspidosperma*, e esse último dividido em nove seções. De acordo com essa divisão, a espécie *A. desmanthum* Benth. ex Mull. Arg. pertence a seção IV *Nobilia* (Woodson) Marc.-Ferr. star. et. sect. Nov. essa seção torna-se de fácil reconhecimento devido aos lobos da corola e seus frutos sulcados longitudinalmente. A maioria das espécies ocorre em matas, principalmente da Amazônia.

A espécie *A. vargasii* encontra-se na seção *Aspidosperma*, essa seção é predominante extra-amazônica, a maioria das espécies ocorrendo nas matas e cerrados do Planalto Central do Brasil, podendo também ser encontradas na Caatinga, Mata da Restinga, Mata Atlântica, Chaco e até mesmo na Amazônia. Essa seção caracteriza-se por agrupar espécies que possuem as folhas com os ápices pungentes, únicas no gênero.

## 1.2 Características gerais da morfologia do gênero *Aspidosperma*.

O gênero *Aspidosperma* possui espécies com acentuada semelhança, ocasionando controvérsias em sua classificação. É representado por árvores, arvoretos ou arbustos podendo ser decíduo ou não e variando de 2 a 60 m, apresentando látex leitoso, avermelhado ou incolor. Possuem troncos com ritidoma geralmente sulcado longitudinalmente, acanalado, tortuoso, fenestrado ou circular, podendo variar seu tronco de 20 cm a 90 cm de diâmetro (Woodson, 1951; Pio Correa, 1984; Lorenzi, 1992; Marcondes-Ferreira e Kinoshita, 1996; Ribeiro *et al.*, 1999).



**Legenda:** (A e L) *A. subincanum*, (B e M) *A. parvifolium*, (C e N) *A. ramiflorum*, (D e J) *A. discolor*, (E) *A. nitidum*, (F) *A. marcgravianum*, (G) *A. sandwithianum*, (H) *A. desmanthum* (I) *A. schultesii*

**Fontes:** Ribeiro *et al.* (1999) e Internet 4 e 5 (2006).

**Figura 2.** Exemplos de árvores, troncos e cascas de *Aspidosperma* spp.

As cascas das espécies de *Aspidosperma* variam do castanho escuro, cinza esverdeado a amarelo claro (Figura 2). Suas cascas podem se apresentar de formas variadas indo de fina, espessa, rija, profundamente sulcada, rugosa, dura, lisa ou ligeiramente áspera (Woodson, 1951).

As espécies deste gênero apresentam variedades quanto aos tipos de folhas. Suas folhas são geralmente alternas podendo ser congesta nos ápices dos ramos, são raramente opostas ou verticuladas (Marcondes-Ferreira e Kinoshita, 1996). Podem ser densamente aglomeradas com nervuras proeminentes (Ribeiro *et al.*, 1999). Segundo Simões e Kinoshita (2002) as flores são actiformes, brancas, amarelas ou esverdeadas (Figura 3).



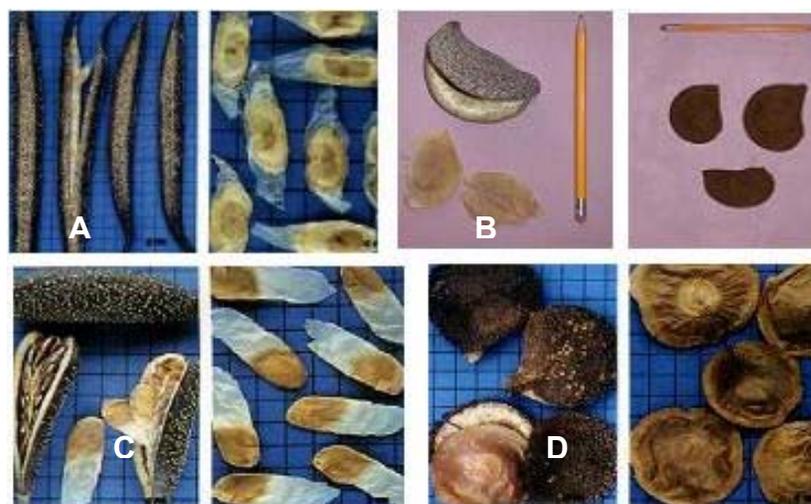
**Legenda:** (A) *A. parvifolium*, (B) *A. subincanum*, (C) *A. ramiflorum*, (D) *A. macrocarpon*, (E) *A. discolor*, (F) *A. polyneuron*.

**Fontes:** Internet 4 (2006).

**Figura 3.** Folhas e flores de espécies de *Aspidosperma*.

Quanto a inflorescências das *Aspidosperma* spp. podem ser glabras ou pilosas, laterais ou subapicais, às vezes extra-axilares ou ramifloras. As flores sésseis ou pediceladas e glandulosas (Marcondes-Ferreira e Kinoshita, 1996).

As espécies de *Aspidosperma* apresentam frutos do tipo bifolículo, lenhosos, semilenhosos a coriáceos, de forma variada. Possuem de 3-12 sementes membranáceas. Sementes geralmente aladas, núcleo normalmente cordado, ala concêntrica ate fortemente excêntrica, membranácea, raramente cartácea e, até, bem reduzida. (Marcondes-Ferreira e Kinoshita, 1996; Lorenzi, 1992; Pio Correa, 1984, Figura 4).



Legenda: (A) *A. Polyneuron* , (B) *A. vargasii*, (C) *A. cylindrocarpon*, (D) *A. Discolor*.

**Fontes:** Lorenzi (1992); Internet 4 (2006).

**Figura 4.** Sementes e frutos de espécies de *Aspidosperma*.

### 1.3 *Aspidosperma desmanthum* Benth. ex Mull. Arg

Essa espécie é caracterizada por árvore medindo de 10 - 30 m com circunferência de 30 - 70 cm. O tronco circular e os galhos pequenos, mas resistentes. As folhas alternas ou aproximado, oval-alongadas, arredondadas medindo 7 - 15 de comprimento e 3 - 7 cm de largura. Possui látex avermelhado (Figura 5). (Woodson, 1951).



Fontes: Ribeiro *et al.* (1999); Lorenzi (1992).

**Figura 5.** Tronco (T), cascas (C), folha (F), ramos (R) e Látex (L) de *A. desmanthum*.

A inflorescência terminal é um tanto congesta e apresenta folha predominante axilar com comprimento de 3 - 12 cm, mais ou menos branco a amarelada. Floresce durante os meses de junho a setembro. O fruto caracteriza-se por ser denso-veloso, deiscente e amadurece no final de agosto a setembro,

possuem de 8 - 10 sementes facilmente disseminadas pelo vento (Woodson, 1951).

A sua madeira é empregada na construção civil, como caibros, esteios para obras externas, dormentes para estradas. A árvore apresenta copa ampla e frondosa completamente desenvolvida fora da mata, característica essa desejável no paisagismo (Lorenzi, 1992; Pio Correa, 1984).

São encontradas em países como Brasil, Venezuela, Colômbia, Equador, Guiana (Figura 6). São conhecidas popularmente pelos nomes amargoso, araracanga, pequiá-marfim, pitiá, quina da mata e guatambu-rugoso (Brasil); *tun-yek*, *guabadaro* (Venezuela); *siba-dannie shibadan* (Guiana); *siferoe adda*, *mantjotjo* e *bitterbark* (Suriname). (Woodson, 1951; Lorenzi, 1992).



Fontes: Internet 7 (2006).

**Figura 6.** Distribuição geográfica de *A. desmanthum* Benth. ex Mull. Arg

#### 1.4 *Aspidosperma vargasii* A.DC.

É uma árvore com cerca de 3 - 20 m de altura, ramos relativamente fino, com terminação estreita nas cascas. As suas folhas são elípticas a oval medindo de 5-12 cm de comprimento e 3 - 6 cm de largura (Figura 7). Apresenta Inflorescência subterminal densamente florida (Woodson,1951). Floresce de junho a setembro.



**Fontes:** Ribeiro *et al.* (1999); internet 8 (2006).

**Figura 7.** Tronco (T), cascas (C), folha (FL) e Frutos e sementes (FS) de *A.vargasii* A.DC.

São encontradas na Bolívia, Brasil, Peru, Equador e Trindade e Tobago (Figura 8) . Tem como denominação vulgar: amarelão, *amarillo*, *yema de buevo*, *walabadan* e *quillo bordón* (Woodson, 1951; Internet 08, 2006).



Fonte: (Internet 9, 2006).

**Figura 8.** Distribuição geográfica de *A. vargasii*.

### 1.5 Etnobotânica do gênero *Aspidosperma*.

Na Amazônia, muitas espécies de *Aspidosperma* são utilizadas pelas populações locais, indígenas e caboclas, por suas propriedades medicinais. De acordo com a Tabela 4, têm-se algumas indicações medicinais de algumas espécies de *Aspidosperma*.

A infusão da casca de algumas espécies de *Aspidosperma* como *A. nitidum* e *A. marcgravianum*, conhecidas pelo nome comum carapanaúba, são utilizadas no tratamento de malária, em inflamações do útero e do ovário, em problemas de diabetes e do estômago, contra câncer, e também como anticonceptivo (Ribeiro *et al.*, 1999; Milliken, 1997).

O látex de *A. nitidum* é utilizado pelos índios Makuna e Taiwano na Colômbia para a cura da hanseníase. O uso medicinal é ainda pouco explorado, mas a família tem grande potencial e está sendo muito estudada pela comunidade farmacêutica (Ribeiro *et al.*, 1999). As espécies do gênero *Aspidosperma* são muito utilizadas por suas atividades antifúngicas, antibacteriana, antitumoral, antisséptica (Brandão *et al.*, 1993).

**Tabela 4.** Indicações tradicionais de algumas espécies de *Aspidosperma*.

<b>Espécies</b>	<b>Nome comum</b>	<b>Parte</b>	<b>Indicação</b>	<b>Referência</b>
			antitumoral	Bongiovanni <i>et al.</i> (2006)
			regulador da fertilidade	Scarpa (2003) e Schultes (1979)
			expectorante	Scarpa (2003) e Schultes (1979)
A.quebracho	quebracho-blanco,		laxante, depurativo do sangue,	Scarpa (2003)
blanco	quina, cacha-cacha	casca	abortivo, antimalárico,	
Schlecht	quebracho,			
			apendicite	Bourdy <i>et al.</i> (2004)
			calçados	Pio Correia (1984)
			carpintaria	
			tornearia	

**Tabela 4.** Indicações tradicionais de algumas espécies de *Aspidosperma* (Continuação).

<b>Espécies</b>	<b>Nome comum</b>	<b>Parte</b>	<b>Indicação</b>	<b>Referência</b>
<i>A. desmanthum</i> Benth. ex Muell. Arg.	amargoso	cascas	febrífuga	Milliken (1997)
<i>A. polyneuron</i> M. Arg.	peroba-açu		redução de tumores	Graham <i>et al.</i> (2000)
	peroba-amargosa	folhas	reumatismo	Schultes (1979)
	peroba comum		anticonvulsivo	
<i>A. álbum</i> (Vahl) R. Benth. ex Pichon	pequiá - marfim	entre casca	antimicrobiana	Verpoorte <i>et al.</i> (1983)
<i>A. megalocarpon</i> Muell. Arg.	chichi	folhas	antiprotozoário	Weniger <i>et al.</i> (2001)

**Tabela 4.** Indicações tradicionais de algumas espécies de *Aspidosperma* (Continuação).

<b>Espécies</b>	<b>Nome comum</b>	<b>Parte</b>	<b>Indicação</b>	<b>Referência</b>
<i>A. cuspa</i> (HBK)	amargoso	casca	reumatismo	Schultes (1979)
<i>A. rigidum</i> Rusby	remo caspi	casca	tratamento de diarreia	Rojas <i>et al.</i> (2003)
<i>A. pyriforme</i> Mart.	pereiro	casca	malaria, sedativo, coração	Almeida <i>et al.</i> (2005)
<i>A. vargasii</i> A. DC.	amarelão	casca	febre, tratamento de feridas picadas de insetos	Fatope <i>et al.</i> (1993)

## 1.6 Atividade biológica de extratos e frações de *Aspidosperma* spp.

### 1.6.1 Atividade Antimicrobiana

Ferreira *et al.* (2004) em seu trabalho com extrato alcaloídico das cascas de *A. ramiflorum* demonstraram eficácia contra formas promastigotas de *Leishmania braziliensis* e *L. amazonensis*. Oliveira (1999) trabalhando com essa mesma espécie apresentou resultados quanto ao seu efeito antimicrobiano contra bactérias gram positivas e negativas. Extratos das cascas de *A. excelsum* demonstraram atividade antimicrobiana (Verpoorte *et al.*, 1983).

### 1.6.2 Atividade Antibacteriana

No trabalho de Tanaka *et al.* (2006) o extrato metanólico das cascas de *A. ramiflorum* apresentou moderada atividade contra as bactéria gram positiva *Bacillus subtilis* (CIM = 250 µg/mL) e *Staphylococcus aureus* (CIM = 250 µg/mL) e inativo para bactérias gram negativa *Escherichia coli I* e *Pseudomonas aeruginosa* (CIM > 1000 µg/mL). Das cinco frações alcaloídicas provenientes do fracionamento ácido-base do extrato metanólico, duas foram inativas (CIM > 1000µg/mL), uma apresentou atividade moderada e uma foi altamente ativa contra *B. subtilis* e *S.aureus*. A fração V apresentou alta atividade contra *B. subtilis* (MIC = 15,6 µg/mL) e *S. aureus* ( MIC = 31,3 µg/mL) e inativa contra bactérias gram negativas (MIC > 1000 µg/mL).

### 1.6.3 Atividade Antimalárica

Mitaine *et al.* (1998) relatam em seu trabalho com extratos polares das cascas de *A. megalocarpon* atividade contra *Plasmodium* spp. em testes *in vitro*. Mitaine *et al.* (1996) extratos brutos de espécies encontradas na Bolívia demonstraram-se como forte hipotensivo em testes com cachorros.

### 1.6.4 Atividade Antifúngica

Segundo Souza *et al.* (2006) o extrato bruto metanólico dos galhos de *A. ramiflorum* apresentou uma atividade moderada contra *Cryptococcus neoformans* com concentração inibitória mínima (CIM) variando entre 62,5-250 mg/mL. Contra os dermatófitos *Trycophyton rubrum*, *T. mentagrophytes* e *Microsporum canis*, a atividade foi fraca, com CIM entre 500 - 1000 mg/mL. O fracionamento ácido-base do extrato bruto resultou em 5 frações, as quais foram submetidas ao bioensaio frente aos mesmos fungos mencionados anteriormente, levando a uma fração ativa contra *C. neoformans* (CIM < 15,6 mg/mL) e contra os dermatófitos (CIM entre 62,5 - 125 mg/mL).

### 1.6.5 Atividade citotóxica em camundongos e letalidade contra *Artemia franciscana* e *Aedes aegypti*.

Goloni *et al.* (2005) realizaram estudos pré-clínicos com extratos metanólicos de *A. subincanum* Martius para avaliação da toxicidade aguda em

camundongos. A determinação de uma DLA superior a 5000 mg/kg conferiu um caráter muito pouco tóxico numa administração aguda de dose fixa caracterizando-o como praticamente como atóxico.

Quignard *et al.* (2003) relatam a letalidade do extrato MeOH das cascas de *Aspidosperma* frente às larvas de *Artemia franciscana* (em concentração de 500 µg / mL).

#### **1.6.6 Atividade anti-tripanosoma**

Extratos etanólicos do caule da *A. tomentosum* foram submetidos a bioensaio *in vitro* contra formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, tendo sido ativos nas concentrações de 11,4 e 5,8 mg/mL e parcialmente ativo a 2,8 mg/mL. A fração alcaloídica do extrato foi obtida e submetida a fracionamento cromatográfico monitorado pelo bioensaio *in vitro* contra *T. cruzi* (Abreu e Silva *et al.*, 2002).

#### **1.6.7 Outras atividades biológicas**

Silva *et al.* (2006) relatam efeito do extrato aquoso de *A. carapanaúba* utilizando-se ratos Wistar machos e fêmeas (modelo descrito em 1979 por Djahanguri) pode ter efeito protetor de mucosa digestiva, que é importante para a fitoterapia.

De acordo com Barros (2005), em seu estudo farmacológico da fração alcaloídica das cascas da raiz de *A. ulei*, foi estimada a toxicidade em teste camundongos pela via intraperitoneal, apresentando  $DL_{50}$  de  $400 \pm 40$  mg/Kg. Também neste mesmo trabalho apresentou ação estimulante central e atividade antidepressiva, bem como efeito pró-erétil *in vivo* e *in vitro* em camundongos. O estudo de Banerjee e Lewis (1954) com o caule de *A. ulei* mostrou efeito relaxante da musculatura uterina, ação estimulante central, antagonismo do efeito hipertensivo da adrenalina e atividade amebecida *in vitro*.

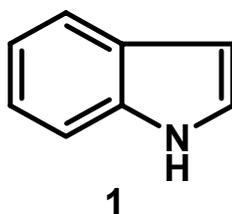
O extrato de *A. pyrifolium* foi descrito como moluscida (Santos, 2004) e o extrato hidroalcoólico de *A. subcanum* como antiinflamatório e anticonceptivo (Santos *et al.*, 2004a; 2004b). Trabalhos com extratos aquosos de *A. pyrifolium* demonstraram viabilidade contra a fase larval de *Plutella xylostella*, conhecida como traça-das-crucíferas, principal praga do repolho no Brasil (Torres *et al.*, 2006).

### **1.7 Química do gênero *Aspidosperma*.**

O gênero *Aspidosperma* é distinguido quimicamente pela ocorrência freqüente de alcalóides indólicos (Bolzani *et al.*, 1987). Segundo estudos realizados por Gilbert *et al.* (1965) com um grande número de espécies de *aspidosperma* resultaram no isolamento de vários alcalóides indólicos com as mais variadas estruturas.

### 1.7.1 Alcalóides indólicos

Segundo Dewick (1997), os alcalóides indólicos representam um dos maiores grupos de alcalóides em plantas e receberam esse nome por apresentarem em sua estrutura (Figura 9) um ou mais núcleos indólicos (**1**).



**Figura 9.** O indol.

Nas plantas, os alcalóides que pertencem a esse grupo são sintetizados a partir do aminoácido triptofano (**2**) que, em geral, perde sua carboxila pela ação da enzima triptofano descarboxilase, originando a triptamina (**3**), precursor comum na síntese de praticamente todos os alcalóides indólicos conhecidos.

Os alcalóides indólicos são achados em oito famílias, principalmente na Apocynaceae, Loganiaceae e Rubiaceae. Os alcalóides indólicos podem ser encontrados nos gêneros *Ervatania*, *Alstonia*, *Geissopermum*, *Hunteria*, *Kopsia*, *Picalina*, *Vinca*, *Rhazya*, *Rauvolfia* e *Aspidosperma* (Siddiqui *et al.*, 1987).

Dentro dessa classe de alcalóides, encontramos o subgrupo dos alcalóides indólicos monoterpênicos que apresentam como precursor comum a strictosidina (**5**), formada a partir da condensação de triptamina (**3**) e secologanina (**4**) (Mann *et al.*, 1993). O fato de todos os esqueletos carbônicos

serem formados a partir de um precursor comum é atribuído às diversas possibilidades de reações intramoleculares entre as duplas ligações e carbonilas formadas após a hidrólise do grupamento glicosila presente na strictosidina (5).

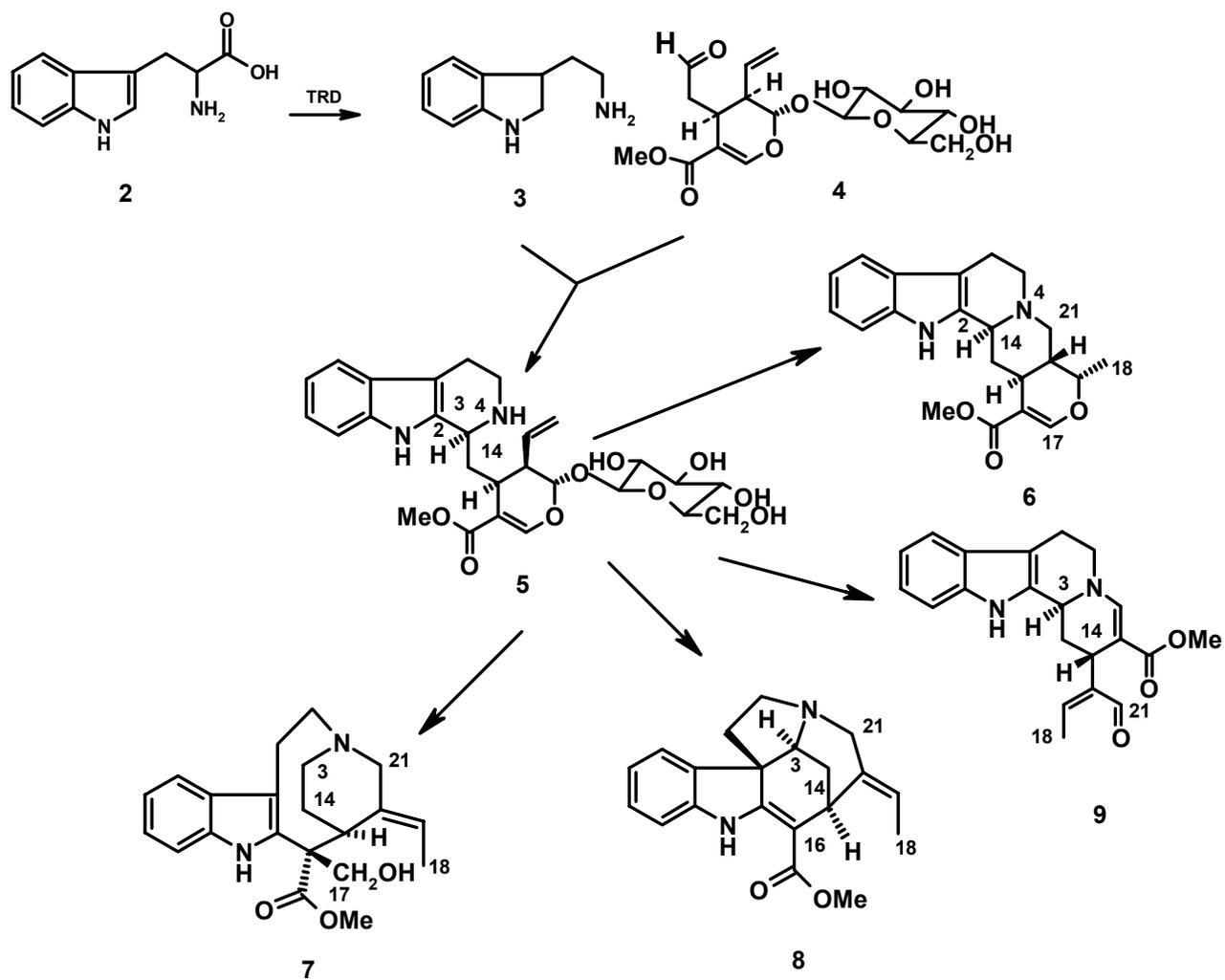
Por volta de 1980 eram reconhecidas oito classes de alcalóides indólicos monoterpênicos. De acordo com Van Beek (1984) *apud* Simões *et al.* (2001), ampliou essa classificação adicionando mais três classes às oitos já existentes. Foi criada uma classe para alcalóides monoterpênicos diméricos e uma classe para todos os demais alcalóides indólicos monoterpênicos.

As classes podem ser subdivididas de acordo com variações menores no esqueleto básico. Van Beek e Van Gessel (1988) *apud* Simões *et al.* (2001), distinguiram 46 subclasses nas onze classes existentes. Cada classe possui as seguintes características de acordo com a Tabela 5 e a Figura 10: cada classe é representada por uma única estrutura, e por conseguintes indicando, a relação biossintética entre as classes.

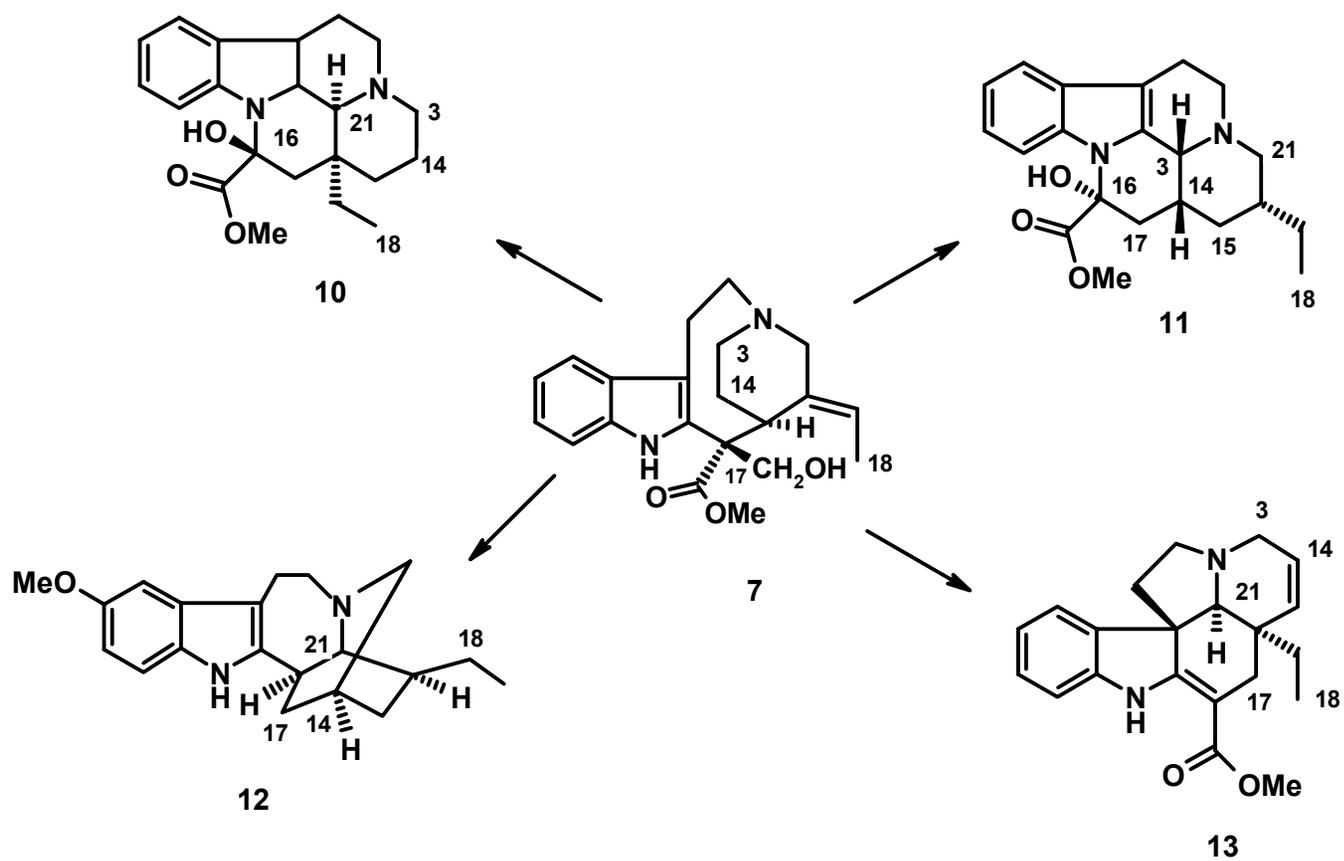
**Tabela 5.** Classes de alcalóides com núcleo indólico.

<b>Nº</b>	<b>Substância</b>	<b>Classe</b>	<b>Características</b>
6	ajamalicina	corinanteano	unidade C2, C3, C14 e ligação entre N4 e C21 ou unidade C7, C3, C14, ligação entre N4 e C21, e a função C2 oxo.
8	akuamicina	estricnano	unidade C2, C16, C15 e ligação entre C3 e C7.
5	estrictosidina	vincosano	unidade C2, C3, C14 e ligação entre N-4 livre ou ligação entre N4 e C19 ou entre N4 e C18.
12	Ibogaína	ibogano	unidade C2, C16, C17, C14 ou C7, C16, C17, C14 e a função C2 oxo.
7	stemadenina	aspidospermatano	unidade C2, C16, C15 sem ligação entre C3 e C7.
13	tabersonina	plumerano	unidade C2, C16, C17, C20.
11	Tacamina	tacamano	N1, C16, C17, C14.
9	valesiachotamano	valesiachotamano	unidade C2, C3, C14, ligação entre N4 e C17 ou N4 e C22
10	Vincamina	eburmano	unidade N1, C16, C17, C20.

Fonte: Simões *et al.*, 1999.

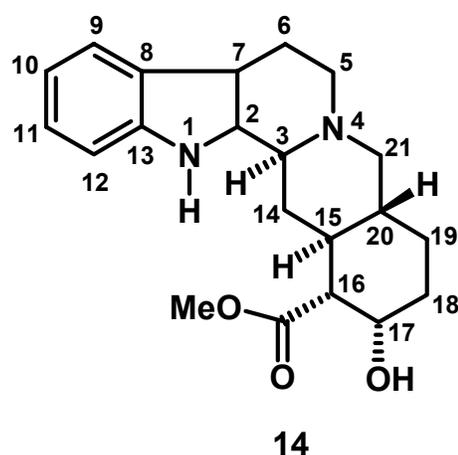


**Figura 10.** Relação biossintética das classes de alcalóides indólicos monoterpênicos.



**Figura 10.** Relação biossintética das classes de alcalóides indólicos monoterpênicos (continuação).

Segundo Le Men e Taylor, 1965 *apud* Simões *et al.*, 2001; Atassi *et al.*, 1995; Staerk *et al.*, 2001 propuseram um sistema de numeração para esses compostos baseados na biogênese (Figura 11), sendo que essa numeração ainda é aceita hoje em dia e baseia-se no esqueleto da ioimbina (**14**). Essa numeração é adotada nesta dissertação.



**Figura 11** . Sistema de numeração do esqueleto da ioimbina (**14**) e adotado nesta dissertação.

### 1.8 Alcalóides isolados de algumas de *Aspidosperma* spp.

De acordo com trabalhos de Cordell *et al.* (2001) aproximadamente 30 % dos alcalóides isolados de plantas são indólicos. Esses autores afirmam ainda que mais de 12 % desse total foram obtidos somente a partir de Apocynaceae, da qual destaca-se o gênero *Aspidosperma*. A Tabela 6 e Figura 12 apresentam algumas espécies de *Aspidosperma* e alguns de seus respectivos alcalóides isolados.

**Tabela 6.** Alguns alcalóides indólicos isolados de algumas *Aspidosperma* spp

<b>Espécie</b>	<b>Planta Parte</b>	<b>Substância</b>	<b>Nº.</b>	<b>Referência</b>
<i>A. album</i>	sementes	(-) alalaquina	<b>50</b>	Urrea <i>et al.</i> (1978).
	casca	aspidoalbina	<b>43</b>	Hesse, (1964).
= <i>A.</i>	casca	aspidocarpina	<b>37</b>	Ferrari e Marion (1963).
<i>desmanthum</i>	sementes	condilocapina	<b>67</b>	Urrea <i>et al.</i> (1978).
	Casca	cromatina	<b>42</b>	Hesse, (1964).
	sementes	demetoxi-12- aspidospermina	<b>32</b>	Urrea <i>et al.</i> (1978).
	casca	limapodina	<b>36</b>	Ferrari e Marion, (1964).
	casca	quebrachamina	<b>47</b>	Djerassi <i>et al.</i> (1962).
	sementes	cimicina	<b>46</b>	Urrea <i>et al.</i> (1978).
<i>A.</i> <i>auriculatum</i>	casca	diidrocorinanteol	<b>54</b>	Gilbert <i>et al.</i> (1962).

**Tabela 6.** Alguns alcalóides indólicos isolados de algumas *Aspidosperma* spp (continuação)

<b>Espécie</b>	<b>Parte Planta</b>	<b>Substância</b>	<b>Nº.</b>	<b>Referência</b>
	N.I.	10-metoxidiidrocorinanteol	<b>61</b>	Dastor <i>et al.</i> (1967).
<i>A. discolor</i>	N.I.	10-metoxigeissoschizol	<b>20</b>	Dastor <i>et al.</i> (1967).
A. DC.	N.I.	demetoxipalosina	<b>34</b>	Ferreira <i>et al.</i> , (1963).
	N.I.	diidrocorinanteol	<b>54</b>	Dastor e Schimid, (1963). Neuss <i>et al.</i> (1954, 1956, 1960, 1961 e 1962).
	N.I.	isoreserpilina	<b>59</b>	Dastor e Schimid, (1963). Dastor <i>et al.</i> (1967).
	N.I.	reserpilina	<b>57</b>	Dastor e Schimid, (1963). Schmutz e Hunziker, (1958).
A.				
<i>dispermum</i>	N.I.	aspidodispermina	<b>30</b>	Ikeda e Djerassi, (1968).
Muell. Arg.	N.I.	desoxiaspidodispermina	<b>29</b>	Ikeda e Djerassi, (1968).

N.I : Não informado

**Tabela 6.** Alguns alcalóides indólicos isolados de algumas *Aspidosperma* spp (continuação)

<b>Espécie</b>	<b>Parte Planta</b>	<b>Substância</b>	<b>Nº.</b>	<b>Referência</b>
<i>A. exalatum</i> Monachino	semente	aspidospermidina	<b>38</b>	Medina e Hurtado, (1977).
	casca	ácido 3-harmano carboxílico	<b>53</b>	Sanchez <i>et al.</i> (1971).
	semente	demetoxipalosina	<b>34</b>	Medina e Hurtado, (1977).
	semente	harman-3-etil- carboxílico éster	<b>52</b>	Sanchez <i>et al.</i> (1971).
	semente	limaspermina	<b>39</b>	Medina e Hurtado, 1977.
	semente	21-oxo -o-metil-aspidoalbina	<b>45</b>	Medina e Hurtado, 1977.
<i>A. fendleri</i>	sementes	aspidofendlerina	<b>41</b>	Burnell e Medina, (1966).
<i>Woodson</i>	sementes	fendleridina	<b>40</b>	Burnell <i>et al.</i> , (1964).
	sementes	fendlispermina	<b>26</b>	Burnell e Medina,(1966).
	sementes	quebrachamina	<b>47</b>	Medina <i>et al.</i> (1973).
	sementes	aspidolimidina	<b>44</b>	Medina <i>et al.</i> (1973).
<i>A. gilbertii.</i>	casca	5-etil-2-metil-11H-pirido [3.4- $\alpha$ ] carbazolium hidróxido	<b>49</b>	Miranda <i>et al.</i> (1980).
	casca	elipticina	<b>68</b>	Duarte e Miranda, (1983).
	casca	gilbertina	<b>48</b>	Miranda <i>et al.</i> , 1982.
	casca	olivacina	<b>69</b>	Duarte e Miranda, 1983.

**Tabela 6.** Alguns alcalóides indólicos isolados de algumas *Aspidosperma* spp (continuação).

<b>Espécie</b>	<b>Parte planta</b>	<b>Substância</b>	<b>Nº.</b>	<b>Referência</b>
	casca	18-epicopsanol	<b>18</b>	Ferreira <i>et al.</i> (1966) .
	casca	10-lactama -epicopsanol	<b>17</b>	Ferreira <i>et al.</i> (1966) .
<i>A. macrocarpon</i>	casca	copsanol	<b>16</b>	Ferreira <i>et al.</i> (1966) .
Mart	casca	copsanona	<b>15</b>	Ferreira <i>et al.</i> (1966) .
	casca	N $\alpha$ -formilcopsanol	<b>19</b>	Braekman <i>et al.</i> (1969).
<i>A. neblinae</i>	N.I.	aspidospermidina	<b>38</b>	Thomas <i>et al.</i> (1969).
Monochino	N.I.	desacetilpirifolidina	<b>27</b>	Thomas <i>et al.</i> (1969).
	N.I.	aspidocarpina	<b>37</b>	Thomas <i>et al.</i> (1969).
	N.I.	homoneblina	<b>64</b>	Brown e Djerassi,(1964).
	N.I.	neblina	<b>63</b>	Brown e Djerassi,(1964).
	N.I.	pirifolidina	<b>28</b>	Thomas <i>et al.</i> , 1969.
<i>A. nitidum</i>	N.I.	10-metoxidiidrocorinanteol	<b>61</b>	Arndt <i>et al.</i> (1967)
Benth ex Muell. Arg	cerne	ácido 3-harmano carboxílico	<b>53</b>	Pereira <i>et al.</i> (2006).

N.I : Não informado

**Tabela 6.** Alguns alcalóides indólicos isolados de algumas *Aspidosperma* spp (continuação).

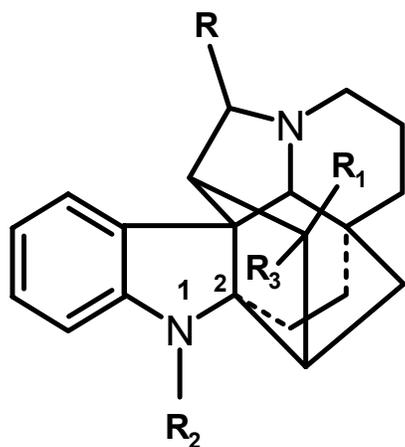
<b>Espécie</b>	<b>Parte Planta</b>	<b>Substância</b>	<b>Nº.</b>	<b>Referência</b>
	semente	10-metoxicorinantrina	<b>25</b>	Robert <i>et al.</i> (1983).
	semente	10-metoxi- $\alpha$ -ioimbina	<b>24</b>	Robert <i>et al.</i> (1983).
	casca	pseudoioimbina	<b>21</b>	Spiteller e Spiteller- Friedmann (1962).
A.	semente	corinatrina	<b>22</b>	Robert <i>et al.</i> (1983).
<i>oblongum</i>	semente	antirina	<b>56</b>	Robert <i>et al.</i> (1983).
A. DC.	semente	aricina	<b>58</b>	Robert <i>et al.</i> (1983).
	semente	aricina pseudoindoxila	<b>51</b>	Robert <i>et al.</i> (1983).
	semente	alo-ioimbina	<b>23</b>	Robert <i>et al.</i> (1983).
	semente	diiidrocorinanteol	<b>54</b>	Robert <i>et al.</i> (1983).
	semente	metoxi-antirina	<b>55</b>	Robert <i>et al.</i> (1983).
	semente	tetrahidroalstonina	<b>60</b>	Robert <i>et al.</i> (1983).

**Tabela 6.** Alguns alcalóides indólicos isolados de algumas *Aspidosperma* spp (continuação).

<b>Espécie</b>	<b>Parte Planta</b>	<b>Substância</b>	<b>Nº.</b>	<b>Ref.</b>
	casca	aparicina	<b>70</b>	Jácome <i>et al.</i> (2004).
<i>A. parvifolium</i>	casca	desmetiluleína	<b>71</b>	Jácome <i>et al.</i> (2004).
	casca	Epiuleína	<b>73</b>	Jácome <i>et al.</i> (2004).
= <i>A. vargasii</i>	casca	(+) guatambuina	<b>74</b>	Burnell e Casa, (1967).
A. DC.	casca	n-metiltetraidroelipticina	<b>75</b>	Burnell e Casa, (1967).
	casca	olivacina	<b>69</b>	Burnell e Casa, (1967).
	casca	Uleína	<b>72</b>	Jácome <i>et al.</i> (2004).
	casca	aspidospermina	<b>31</b>	Mitaine <i>et al.</i> (1996)
<i>A. pyriforme</i>	casca	haplocina	<b>76</b>	Mitaine <i>et al.</i> (1996)
	casca	palosina	<b>77</b>	Mitaine <i>et al.</i> (1996)
	casca	vincadiformina	<b>78</b>	Mitaine <i>et al.</i> (1996)

**Tabela 6.** Alguns alcalóides indólicos isolados de *Aspidosperma* spp (continuação).

<b>Espécie</b>	<b>Parte planta</b>	<b>Substancia</b>	<b>Nº.</b>	<b>Referência</b>
	casca	(-) quebrachamina	<b>47</b>	Gilbert <i>et al.</i> ,1962.
	casca	aspidospermatidina	<b>66</b>	Biemann <i>et al.</i> ,1961.
	casca	aspidospermatina	<b>65</b>	Biemann <i>et al.</i> ,1961.
<i>A.quebracho</i>	casca	aspidospermidina	<b>38</b>	Schnoes <i>et al.</i> ,1962
<i>-blanco</i>	casca	aspidospermina	<b>31</b>	Biemann <i>et al.</i> ,1961.
	casca	desacetilaspidospermina	<b>33</b>	Biemann <i>et al.</i> ,1961.
	casca	desacetilpirifolidina	<b>27</b>	Biemann <i>et al.</i> ,1963.
	casca	eburnamenina	<b>62</b>	Schnoes <i>et al.</i> ,1962
	casca	espegazinina	<b>35</b>	Orazi <i>et al.</i> ,1956
<i>A.ramiflorum</i>	casca	ramiflorina A	<b>79</b>	Ferreira <i>et al.</i> , 2004.
	casca	ramiflorina B	<b>80</b>	Ferreira <i>et al.</i> , 2004.



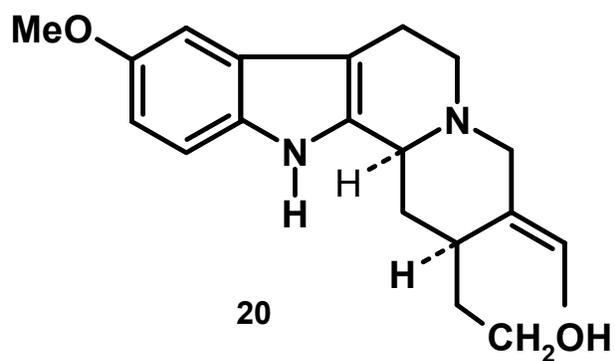
**15**  $R=R_2=R_3=H$ ;  $R_1=O$

**16**  $R=R_2=R_3=H$ ;  $R_1=OH$

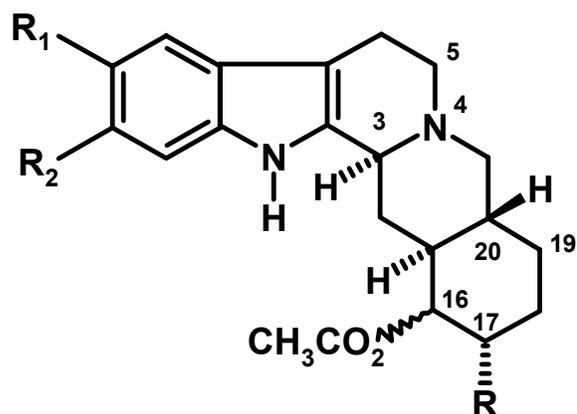
**17**  $R=O$ ;  $R_1=OH$ ;  $R_2=R_3=H$

**18**  $R=R_1=R_2=H$ ;  $R_3=OH$

**19**  $R=R_3=H$ ;  $R_1=OH$ ;  $R_2=CHO$



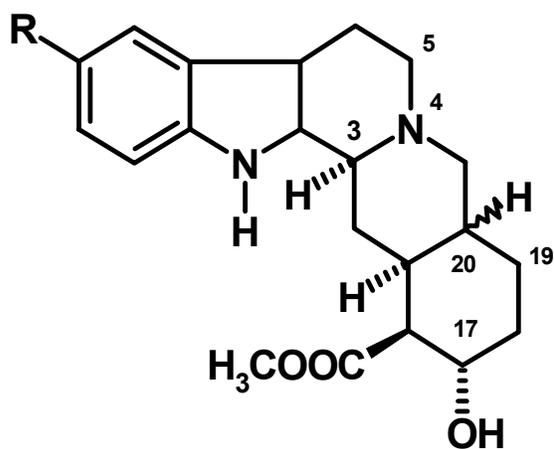
**Figura 12.** Estruturas de alguns alcalóides indólicos de *Aspidosperma*.



21 R = OH; R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = H; C<sub>16</sub> H- $\alpha$ ; <sub>3</sub>H<sub>3</sub> $\beta$

22 R=OH; R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=H, C<sub>16</sub> H- $\beta$ , C<sub>3</sub>H<sub>3</sub> $\alpha$

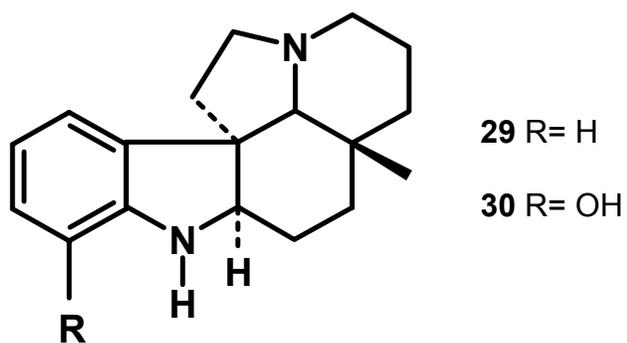
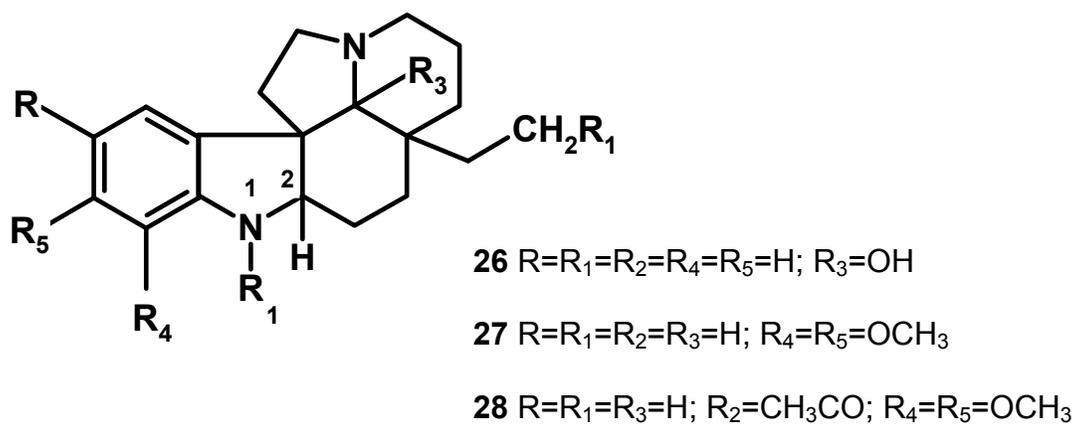
23 R=OH; R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=H, C<sub>16</sub> H- $\alpha$ , C<sub>3</sub>H<sub>3</sub> $\alpha$



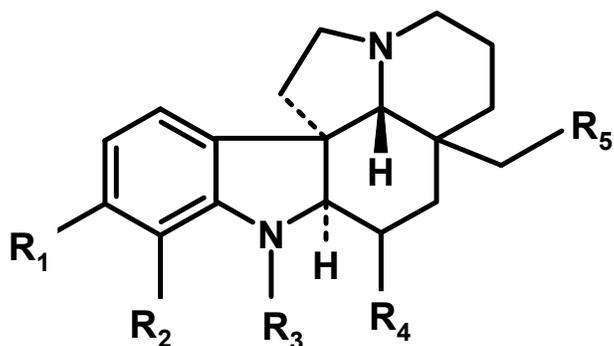
24 R=OCH<sub>3</sub>, C<sub>20</sub> H $\alpha$

25 R=OCH<sub>3</sub>, C<sub>20</sub> H $\beta$

**Figura 12.** Estruturas de alguns alcalóides indólicos de *Aspidosperma* (continuação).



**Figura 12.** Estruturas de alguns alcalóides indólicos de *Aspidosperma* (continuação).



**31** R<sub>1</sub>=R<sub>4</sub>=R<sub>5</sub>=CH<sub>3</sub> ; R<sub>2</sub>=OCH<sub>3</sub>; R<sub>3</sub>=CH<sub>3</sub>CO

**32** R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=R<sub>4</sub>= H ; R<sub>5</sub> =CH<sub>3</sub>; R<sub>3</sub>=CH<sub>3</sub>CO

**33** R<sub>1</sub>= R<sub>3</sub>= R<sub>4</sub>=H; R<sub>5</sub> =CH<sub>3</sub>; R<sub>2</sub>= OCH<sub>3</sub>

**34** R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>= R<sub>4</sub>= H; R<sub>5</sub> =CH<sub>3</sub>; R<sub>3</sub>= C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>CO

**35** R<sub>1</sub>= H; R<sub>5</sub>= CH<sub>3</sub> ; R<sub>2</sub>= R<sub>4</sub> = OH; R<sub>3</sub>= CH<sub>3</sub>CO

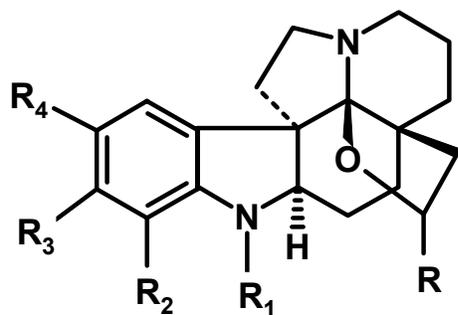
**36** R<sub>1</sub>= H; R<sub>4</sub> = H<sub>2</sub> ; R<sub>5</sub> = CH<sub>3</sub>; R<sub>2</sub> = OH; R<sub>3</sub> = CH<sub>3</sub>CO

**37** R<sub>1</sub>= OCH<sub>3</sub>; R<sub>2</sub>=OH; R<sub>3</sub>= CH<sub>3</sub>CO; R<sub>4</sub>= H; R<sub>5</sub> =CH<sub>3</sub>

**38** R<sub>1</sub>= R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = R<sub>4</sub> = H; R<sub>5</sub> =CH<sub>3</sub>

**39** R<sub>1</sub>=R<sub>4</sub>= H; R<sub>2</sub>=OH; R<sub>3</sub>= C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>CO ; R<sub>5</sub>=CH<sub>2</sub>OH

**Figura 12.** Estruturas de alguns alcalóides indólicos de *Aspidosperma* (continuação).



40 R=H<sub>2</sub>; R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>=H

41 R = H<sub>2</sub>; R<sub>1</sub>=CH<sub>3</sub>CO; R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>= OH R<sub>4</sub>=H

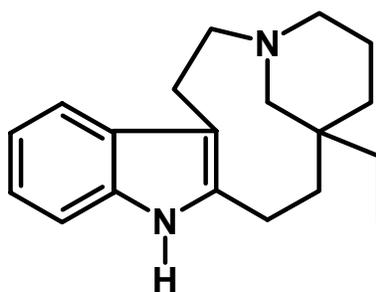
42 R= H<sub>2</sub>; R<sub>1</sub>= CH<sub>3</sub>CO; R<sub>2</sub>=OH; R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>=OCH<sub>3</sub>

43 R= H<sub>2</sub>; R<sub>1</sub>= C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>CO; R<sub>2</sub>=OH; R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>=OCH<sub>3</sub>

44 R=H<sub>2</sub>; R<sub>2</sub>= OH; R<sub>4</sub>= H; R<sub>1</sub>= CH<sub>3</sub>CO; R<sub>3</sub>= OCH<sub>3</sub>

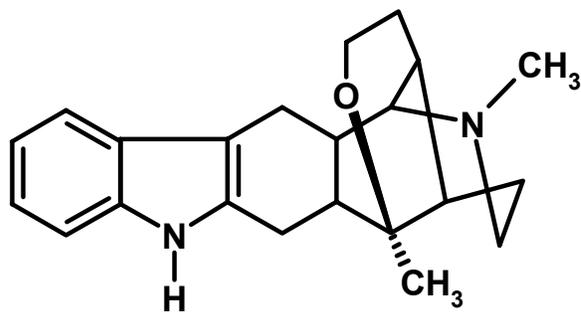
45 R = O; R<sub>1</sub>= C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>CO ; R<sub>2</sub>= R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>= OCH<sub>3</sub>

46 R = O; R<sub>1</sub>= C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>CO; R<sub>2</sub>=OH; R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>= H

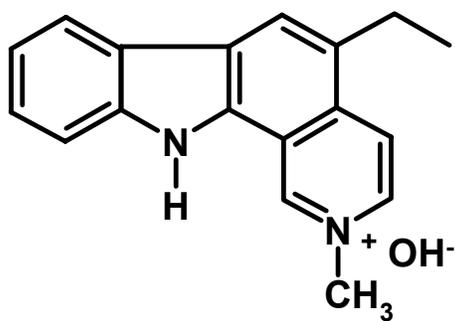


47

**Figura 12.** Estruturas de alguns alcalóides indólicos de *Aspidosperma* (continuação).

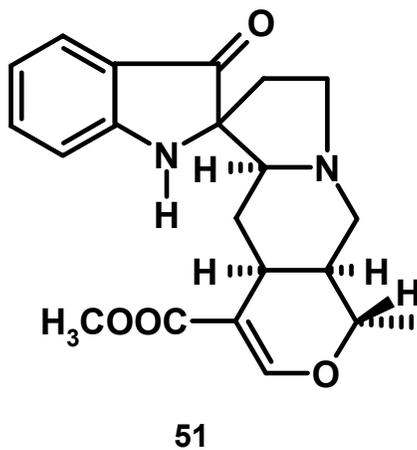
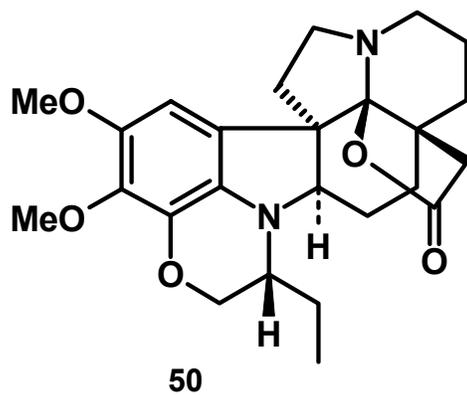


48

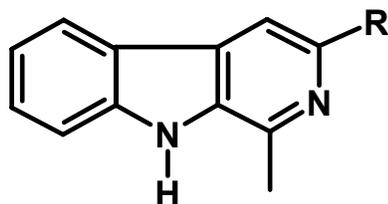


49

**Figura 12.** Estruturas de alguns alcalóides indólicos de *Aspidosperma* (continuação).

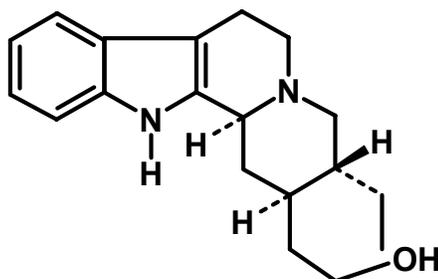


**Figura 12.** Estruturas de alguns alcalóides indólicos de *Aspidosperma* (continuação).

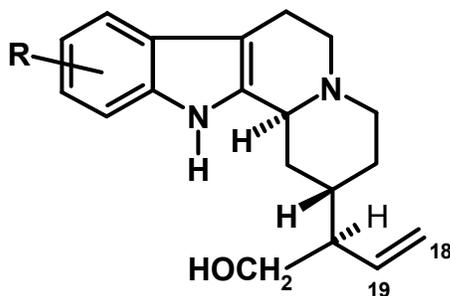


**52** R=CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>

**53** R=COOH



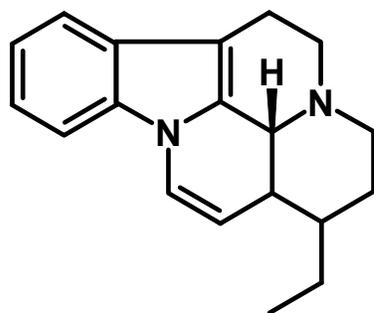
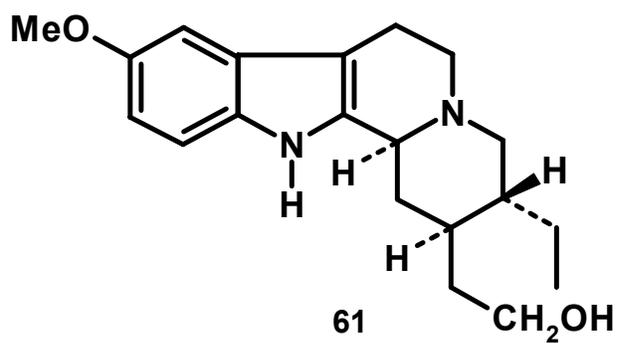
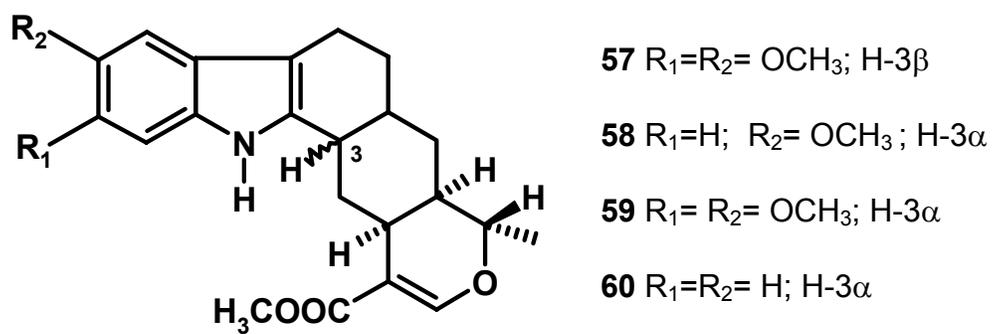
**54**



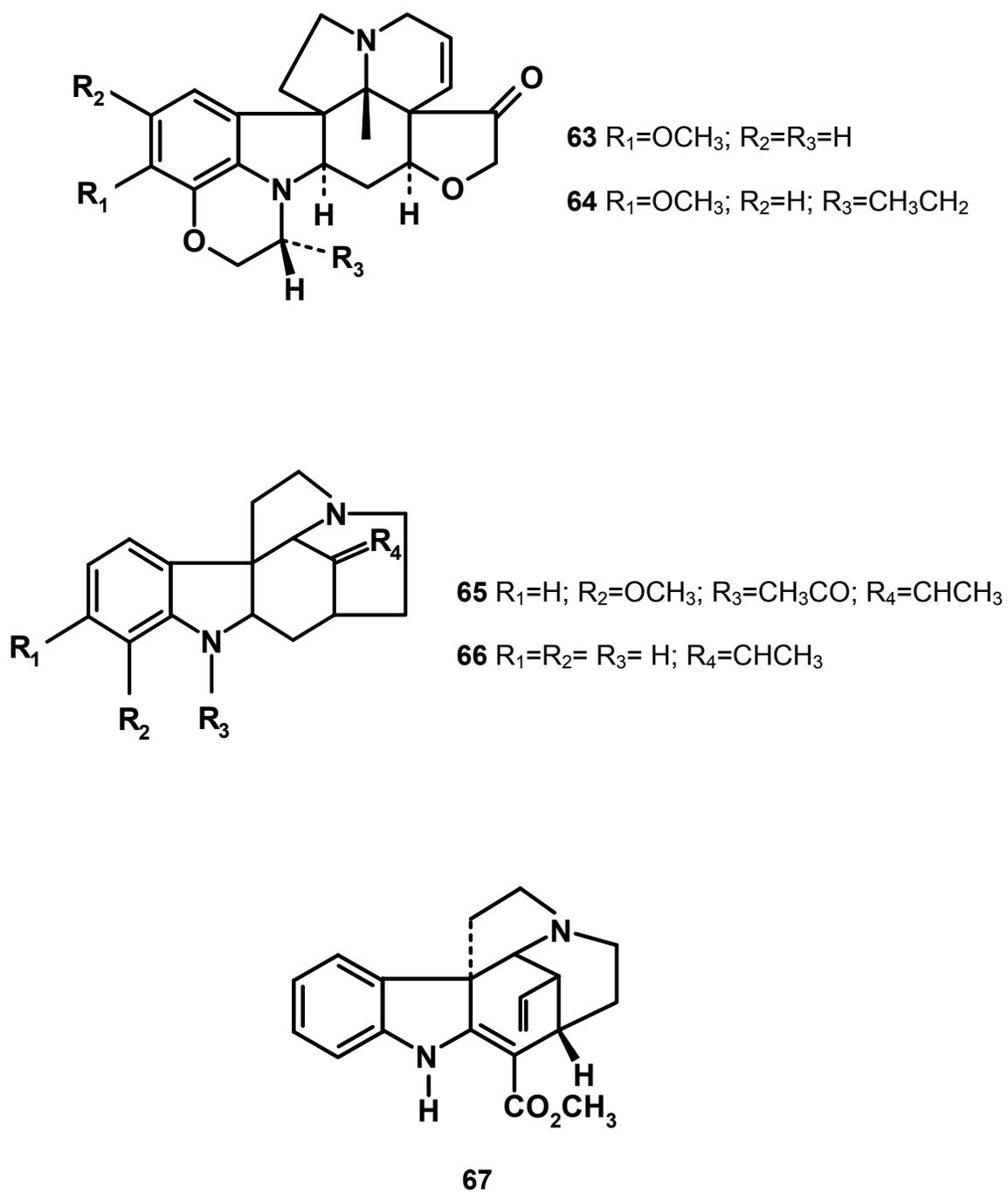
**55** R= OCH<sub>3</sub>

**56** R= H

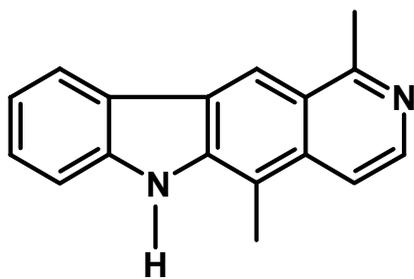
**Figura 12.** Estruturas de alguns alcalóides indólicos de *Aspidosperma* (continuação).



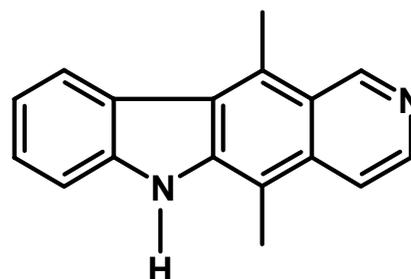
**Figura 12.** Estruturas de alguns alcalóides indólicos de *Aspidosperma* (continuação).



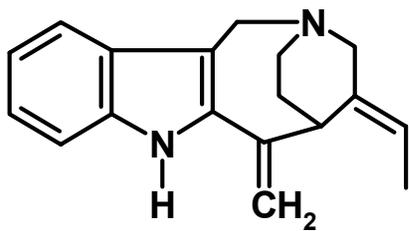
**Figura 12.** Estruturas de alguns alcalóides Indólicos de *Aspidosperma* (continuação).



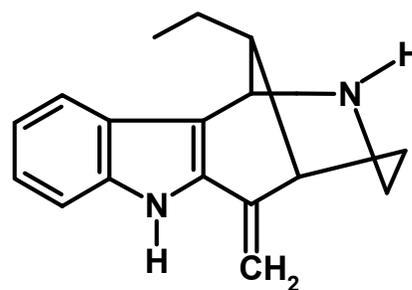
69



68

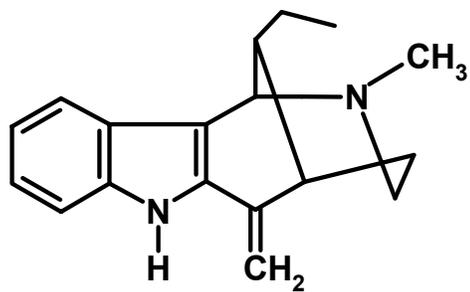


70

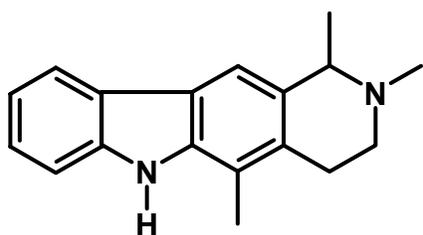


71 R= H  
72 R= CH<sub>3</sub>

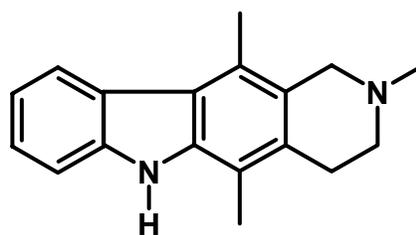
**Figura 12.** Estruturas de alguns alcalóides Indólicos de *Aspidosperma* (continuação).



73

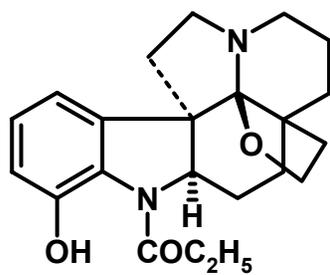


74

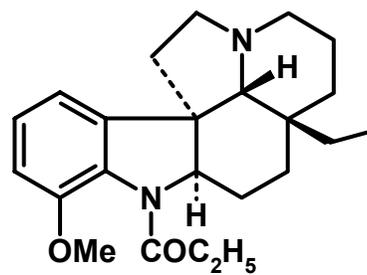


75

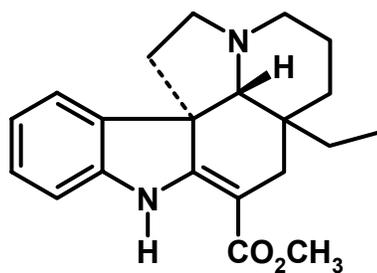
**Figura 12.** Estruturas de alguns alcalóides Indólicos de *Aspidosperma* (continuação).



76

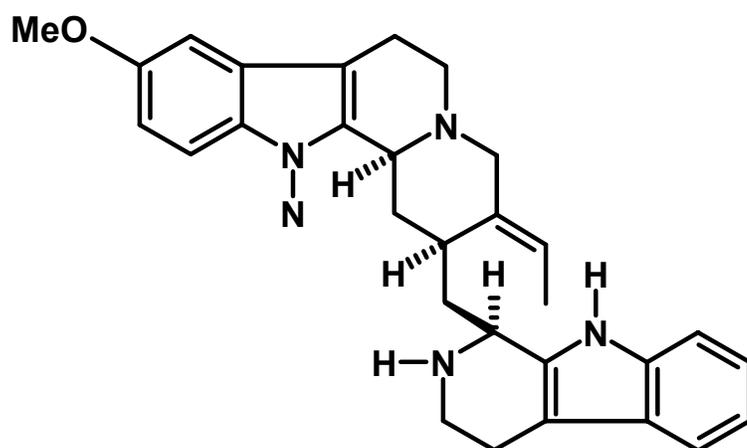


77

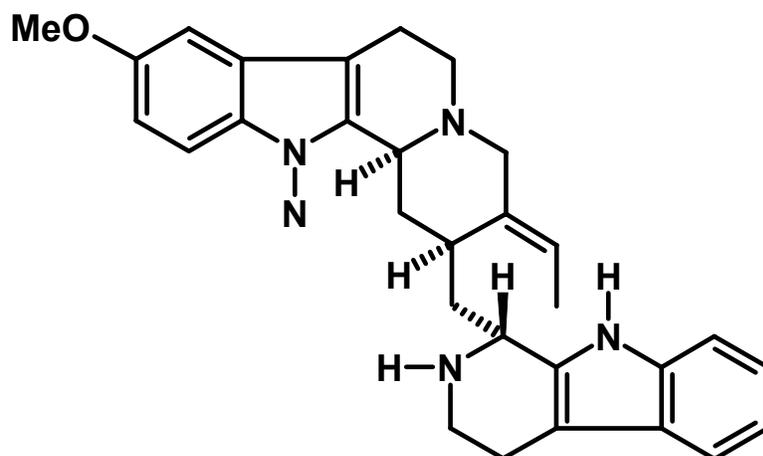


78

**Figura 12.** Estruturas de alguns alcalóides Indólicos de *Aspidosperma* (continuação).

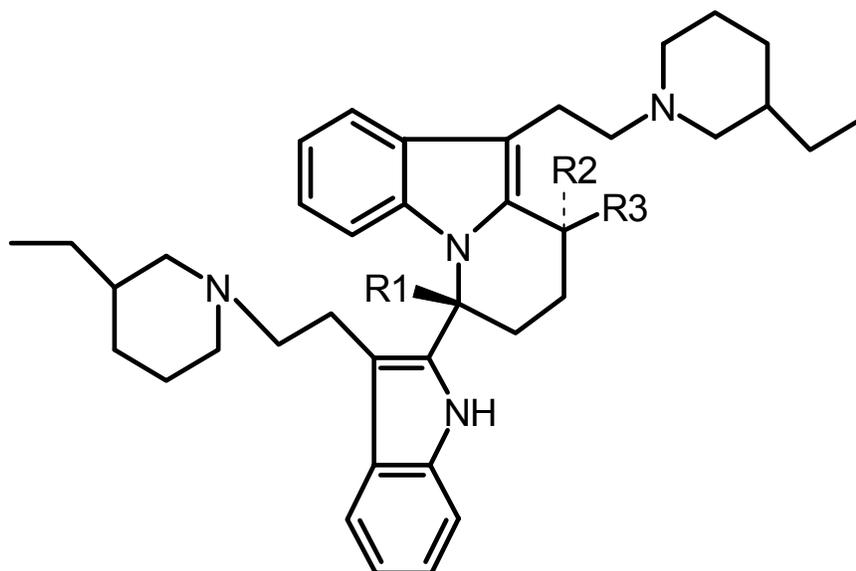


79



80

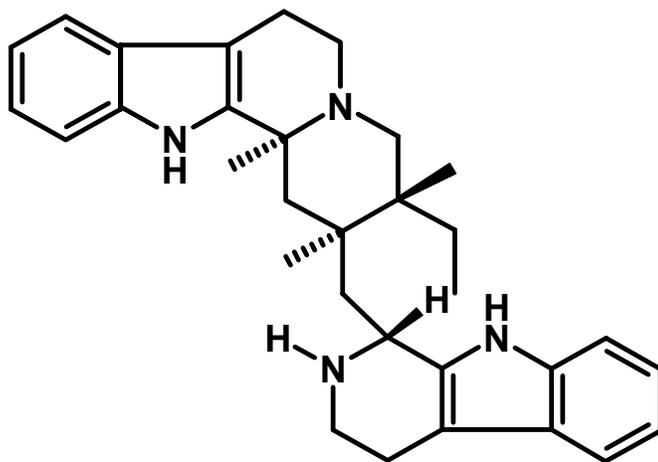
**Figura 12.** Estruturas de alguns alcalóides Indólicos de *Aspidosperma* (continuação).



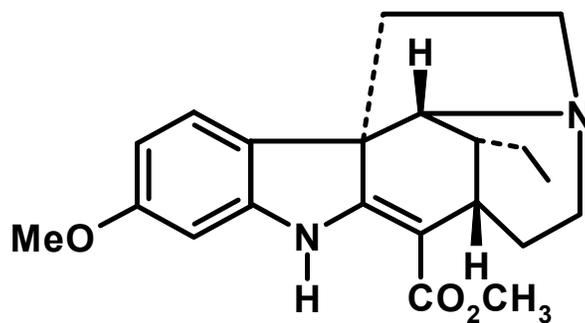
**81**  $R_1=R_2=COOCH_3$ ,  $R_3=H$ ;

**82**  $R_1=COOCH_3$ ,  $R_2=R_3=H$ ;

**Figura 12.** Estruturas de alguns alcalóides Indólicos de *Aspidosperma*  
(continuação).



83



84

**Figura 12.** Estruturas de alguns alcalóides Indólicos de *Aspidosperma* (continuação).

## 1.9. Atividade biológica de alcalóides indólicos de *Aspidosperma* spp.

A característica química marcante deste gênero é a presença de uma vasta variedade de alcalóides contendo núcleo indólico com atividade biológica já reconhecida.

### 1.9.1 Atividade antitumoral

Sakamoto-Hojo *et al.* (1988) demonstraram a atividade antitumoral e citotóxica para elipticina (**68**). Isolada, citam-se como exemplos algumas espécies, tais como *A. williamsii*, *A. olivaceum* (Zhang *et al.*, 2000), *A. gilbertii* (Duarte e Miranda, 1983) e *Ochrosia elliptica* Labill (Stowell, 1982; Kuroda *et al.*, 1999). Segundo Pedersen *et al.* (2005), a elipticina (**68**) tem recebido nas últimas décadas uma grande atenção, devido sua propriedade antitumoral. Há relatos na literatura de um grande número de trabalhos com síntese de elipticina e seus análogos (Paoletti *et al.*, 1979 ; May e Moody, 1984 Ohashi *et al.*, 1996; Fadeeva e Belyaeva, 1997; Zhang *et al.*, 2000;).

### 1.9.2 Atividade antimicrobiana

Verpoorte *et al.* (1983) revelaram em seu trabalho que alcalóides isolados das cascas de *A. excelsum* exibiram atividade antimicrobiana: tetrahydrosecamina

(81), 16-dimetoxicarboniltetraidrosecamina (82), ocolifuanina A (83), 11-metoxitubotaiwina (84).

### 1.9.3 Atividade antibacteriana

Em trabalho anterior, Verpoorte *et al.* (1982) isolaram alcalóides de *A. marcgravianum* e verificaram sua atividade contra *Bacillus subtilis* e *Arpergillus niger*, sendo verificada atividade elevada em apenas 2 alcalóides: tetraidrosecamina (81), diidrocorinanteol (54).

### 1.9.4 Atividade antifúngica

A ramiflorina  $\alpha$  (79) isolada de galhos de *A. ramiflorum* apresentou atividade contra *Cryptococcus neoformans* e contra dermatófitos *neoformans* (CIM entre 3,12 – 12,5 mg / mL) mas foi aproximadamente dez vezes menos ativa contra os dermatófitos testados, com as CIM variando entre 50 - 100 mg / mL. Neste mesmo trabalho a ramiflorina B (80) também inibiu *C. neoformans* com as CIM entre 12,5 - 25 mg / mL e foi menos ativa contra os dermatófitos testados (CIM entre 25 - 100 mg/mL). A separação de outra fração menos ativa levou ao isolamento de outro constituinte que foi identificado como o 10- metoxigeissoschizol (20). Esse composto foi apenas levemente ativo contra todos os fungos testados inibindo a maioria dos microrganismos com CIM >100 mg / mL (Souza *et al.*, 2006).

### 1.9.5 Atividade antiplasmódica

De acordo com o trabalho de Mitaine-Offer *et al.* (2002), uma série de alcalóides indólicos foi testada para atividade antiplasmódica *in vitro* (linhagens *Plasmodium falciparum*) apresentaram os seguintes resultados: aspidoespermina (**31**), aspidoespermidina (**77**) com CL<sub>50</sub> entre 3,2-15,4 µM e menos ativo as substâncias haplocina (**76**) e aspidoalbina (**43**) com CL<sub>50</sub> entre 22,6-52,6 µM.

### 1.9.6 Outras atividades biológicas

Trabalhos de Schmutz *et al.* (1957) e Lehner e Schmutz (1961) com cascas de raízes de *A. ulei* identificaram a presença do alcalóide uleína (**72**), e de acordo com Abreu e Silva *et al.* (2002) a uleína (**72**) apresenta atividade tripanomiscida.

Lyon *et al.* (1973) relatam ações farmacológicas de alcalóides indólicos: aspidoespermina e quebrachina como sendo hipotensivos. Quebrachamina (**47**) e ioimbina (**14**) também foram citados como agente simpato-lítico. Aspidoespermina (**31**) é relatada como diurético, estimulante respiratório, espasmódico intestinal, sedativo uterino, efeito inibitório no crescimento e mitoses de fibroblasto de coração de galinhas. Segundo o trabalho de Saxton *et al.* (1983) relatam as atividades de alguns alcalóides indólicos, como aparicina (**70**), com propriedades analépticas, ação antiviral sobre o vírus da poliomielite do tipo III

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Gerais

Estudar a química e a atividade biológica das cascas de *A. desmanthum* e *A. vargasii*.

### 2.2 Específicos

Isolar alcalóide(s), caracterizar quimicamente o(s) alcalóide(s) isolado(s), identificar / elucidá-los estruturalmente por métodos espectroscópicos e testá-la(s) para atividade biológica.

Avaliar a atividade citotóxica em *Artemia franciscana* e linhagens de células tumorais de extratos, frações e alcalóides isolados.

Avaliar a atividade larvicida de extratos, frações e alcalóides em *Aedes aegypti*.

Avaliar atividade antimalárica *in vitro* frente a *Plasmodium falciparum* dos alcalóides isolados;

### **3. PARTE EXPERIMENTAL**

#### **3.1. Materiais e Métodos**

Para realização deste trabalho foram utilizados os materiais e métodos descritos a seguir.

##### **3.1.1 Materiais**

###### **3.1.1.1 Equipamentos e Acessórios de Laboratório.**

- Balança Analítica: Marca Mettler-Toledo, modelo AB204 com limite de peso de 210 mg;
- Lâmpada UV: Marca Spectroline, modelo CX-20, ultraviolet fluorescence.
- analysis cabinet (onda longa 366 nm e onda curta 254 nm) LAPAAM – CPPN/INPA ;
- Liofilizador: Marca Christ, modelo Beta 1 – 8 K;

- Moinho de facas: sem identificação de marca (CPPN-INPA)
- Rotoevaporador: Marca Fisatom 802, modelo 550.
- Banho de *Ultrassom Cleaner Unique*, marca Merse, Modelo USC 1400, com frequência ultrasônica 40 kHz e potência 120 Watts.
- Fitas para determinação de pH (1-14) da Merck.
- Espectrômetro RMN de  $^1\text{H}$  modelo UNITY INOVA (500 MHz), marca VARIAN, probe de: P5mm diâmetro interno.
- Espectrômetro de IV BOMEM com transformada de Fourier, modelo FTLA-2000-104 – CBA;
- Espectrofotômetro de Ultravioleta-visível, modelo UV 1650PC de marca SHIMADZU - CBA;
- Espectrômetro de Massas ESI-TOF - ultrOTOF<sub>Q</sub>, marca Bruker Daltonics.
- Aparelho de Alta Resolução. Ponto de fusão e ebulição, marca Marconi Digimec BTC 9090, modelo MA 381 (CPPN-INPA).

### 3.1.2 Cromatografia

- Cromatografia em coluna (cc) : As colunas cromatográficas foram realizadas utilizando os seguintes tipos de sílicas da Merk: sílica flash gel 60 (0,040 – 0,063 mm); sílica gel 60 (0,063 – 0,200 mm);
- Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC): utilizadas cromatoplasmas em fase normal e CCDC fase reversa RP-18 recortadas (5 x 5 cm)

de folhas com dimensão 20 x 20 cm com indicador de fluorescência F<sub>254</sub> da Merck.

- Revelação e iluminação de placas com finalidade de visualização sendo utilizado: luz UV (254 nm e 366 nm); solução de Dragendorff; solução de Anisaldeído; vapor de iodo a temperatura ambiente.

- Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP): As placas de CCDP de fase normal foram preparadas usando aproximadamente 60 g de sílica gel 60 PF<sub>254</sub> e 150 mL de água destilada (para placas de vidro de 20 x 20 cm com 1,5 cm de espessura). As placas foram secas a temperatura ambiente e ativadas em uma estufa a 100 °C por no mínimo 3 h.

### **3.1.3 Métodos espectroscópicos.**

#### **3.1.3.1 RMN**

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H) e carbono (RMN <sup>13</sup>C, <sup>1</sup>H desacoplado) e DEPT foram registrados utilizando-se espectrômetro Varian modelo INOVA 500 de 11,7 T, operando a 500 e 125 MHz, respectivamente, pertencente ao Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA). Os solventes para as análises foram metanol e clorofórmio deuterados. Os deslocamentos químicos foram registrados em ppm ( $\delta$ ).

#### **3.1.3.2 IV e UV**

Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) em pastilhas de KBr, utilizando-se um espectrômetro Bomem com transformada de Fourier,

modelo M FTLA-2000-104 e os espectros de ultravioleta, modelo UV 1650PC de marca Shimadzu. Análises foram realizadas no CBA.

### **3.1.3.3 Espectroscopia de massas por elétron-spray de alta resolução (HR-ESI-MS)**

O Espectro de massas foram obtidos com a colaboração do Dr. Norberto Peporine Lopes, de seu aluno Carlos Alexandre Carollo e do especialista em massas José Carlos Tomaz da USP - Ribeirão Preto, utilizando-se espectrômetro de Massas ESI-TOF - ultrOTOF<sub>Q</sub>, marca Bruker Daltonics. O Aparelho foi de alta resolução e calibrado internamente com uma solução de NA-TFA a 10 mg / mL e calibrado externamente com uma solução de formiato de sódio, à 10 mM. Condições do experimento: bomba de Infusão, fluxo 300 µL / h, fase móvel para a solubilização: H<sub>2</sub>O : MeOH (20 : 80), *end plate*: 3500 volts; capillary: 4000 volts; capillary exit: 300 volts; skimmer 1: 50 volts; skimmer 2: 25 volts; transfer: 90 µs; collision exit gate: 80 µs; modo de detecção: modo positivo +M.

### 3.1.3.4 Análise estrutural por difração de raios-X

A análise foi obtida com a colaboração do Dr<sup>a</sup>. Regina H. de A. Santos do Instituto de Química da Universidade de São Paulo em São Carlos - USP e colaboração da Dr<sup>a</sup>. Claudia C. Silva do Departamento de Geociências da Universidade Federal do Amazonas.

Para a determinação das estruturas utilizou-se o método de difração de raios-X por monocristais e utilizou-se para representações o programa ORTEP.

### 3.1.3 Solventes

Para elaboração deste trabalho utilizaram-se solventes de grau técnico de diferente polaridades e previamente destilados e secos com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ou MgSO<sub>4</sub> anidro.

## 3.2 Resumo dos métodos e resultados preliminares.

O presente trabalho de mestrado, vem em continuação ao estudo iniciado em 2001, como bolsista no Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) da Universidade Federal do Amazonas (Henrique *et al.*, 2001) e em 2003 durante estágio curricular supervisionado do Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da UFAM (Henrique *et al.*, 2003). Sua parte prática realizada no Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia. No que segue, os métodos utilizados no trabalho preliminar, bem como os métodos utilizados

posteriormente, foram sistematizados e integrados tematicamente na presente obra.

### 3.2.1 Coleta e Identificação do material vegetal.

Obteve-se um mapa completo da Reserva Adolpho Ducke (Figura 13) do Projeto Flora disponível em [www.inpa.gov.br](http://www.inpa.gov.br), com as coordenadas da localização do gênero *Aspidosperma* cadastrados nos levantamentos com a ajuda do Sr. José Ramos (CPBO). As espécies tinham placas de alumínio com numeração que as identificavam. Verificou-se serem árvores de grande porte e de difícil acesso. Foram coletadas ca. 2 Kg de cada uma das oito *Aspidosperma* (Henrique *et al.*, 2001).



Figura 13. Localização da Reserva Adolpho Ducke.

A identificação botânica do material vegetal obtido das espécies se deu por meio de exsicatas depositadas no Herbário do INPA (Tabela 7).

As cascas coletadas foram colocadas para secar a sombra e temperatura ambiente nas bancadas do LAPAAM / CPPN em cima de jornais (Henrique *et al.*, 2001).

**Tabela 7.** Material vegetal disponível para estudo das *Aspidosperma spp.*

Nome Científico	Exsicata	Data da coleta	Coletor
<i>A. aracanga</i>	*	14-09-01	*
<i>A. desmanthum</i>	180459	25-02-02	Assunção, P.A.C.I.
<i>A. marcgravianum</i>	180516	14-09-01	Vicentini, A.
<i>A. nitidum</i>	181832	14-09-01	Ribeiro, J. E. L. S.
<i>A. sandwithianum</i>	*	25-02-02	*
<i>A. schultesii</i>	180476	14-09-01	Oliveira, A. A.
<i>A. spruceanum</i>	191270	14-09-01	Assunção, P.A.C.I.
<i>A. vargasii</i>	191853	25-02-02	Sothers, C.A.

\* As espécies estão registradas no departamento de botânica do INPA, mas não há registro de exsicata no Herbário.

### 3.2.2 Moagem do Material Vegetal.

O material limpo e seco foi picotado em pedaços menores e levado para ser moído no moinho de facas da CPPN. As serragens foram armazenadas separadamente em sacos devidamente identificados a uma temperatura de 35<sup>0</sup>C (Henrique *et al.*, 2001).

### 3.2.3 Preparação dos extratos.

Após a limpeza, secagem à sombra e moagem do material vegetal, três porções distintas da serragem foram extraídas separadamente com água desionizada (infusão, 100 °C, 15 minutos), metanol (em aparelhagem de Soxhlet, 3 x 6h) e o extrato etanol/NH<sub>4</sub>OH 1% por maceração a frio em solução etanol/NH<sub>3</sub> 1%. Foi realizado fracionamento ácido-base para extração de alcalóides das oito espécies (Tabela 8). Estes procedimentos foram realizados para as oito espécies coletadas (Henrique *et al.*, 2001 e 2003).

**Tabela 8.** Dados sobre a preparação dos extratos aquosos e alcoólicos a partir dos materiais vegetais secos e moídos (1ª coleta)

NOME CIENTÍFICO	EXTRATO ALCOÓLICO						EXTRATO AQUOSO		
	MEOH			EtOH/NH <sub>3</sub> 1%			Material vegetal seco (g)	Rend. (g)	Teor extrativo (%)
Material vegetal seco (g)	Rend*. (g)	Teor extrativo (%)	Material vegetal seco (g)	Rend*. (g)	Teor extrativo (%)				
<i>A. aracanga</i>	118,8	9,66	12,3	100	6,98	6,98	88,82	12,62	14,2
<i>A. desmanthum</i>	1263	7,30	6,9	800	12,73	1,59	88,78	6,59	7,4
<i>A. marcgravianum</i>	81,30	5,53	6,8	1200	15,2	1,26	78,70	6,63	8,4
<i>A. nitidum</i>	70,62	7,51	9,4	40	1,68	4,2	64,21	5,39	8,3
<i>A. sandwithianum</i>	303,1	41,5	7,3	1300	13,2	1,01	87,87	4,19	4,8
<i>A. schultesii</i>	105,0	9,20	8,8	800	15,93	1,9	85,40	5,43	6,4
<i>A. spruceanum</i>	62,13	8,73	14,1	1100	10,29	0,96	136,5	17,59	12,9
<i>A. vargasii</i>	58,73	8,98	15,2	800	17,05	2,38	57,47	7,41	12,9

**Legenda:** \* Rendimento das extrações realizadas com as cascas das espécies de *Aspidosperma*.

**Fonte:** (Henrique *et al.*, 2001 e 2003).

Para o trabalho atual de mestrado optou-se por: *A.desmanthum* e *A.vargasii*, devido aos seus perfis cromatográficos e atividade citotóxica *in vitro* (concentração de 500 µg / mL) contra *Artemia franciscana* (Tabela 9) para as frações previamente estudadas (Henrique *et al.*,2001 e2003).

**Tabela 9.** Dados sobre fracionamento ácido-base e <sup>a</sup>atividade biológica.

Extrato etanólicos	Frações e Massas (g)				
	1-Ac	1-pH 8,0	1-pH 10,0	1-pH 12,0	1-A1
<i>A. aracanga</i>	0,460	0,258	0,023	0,026	2,433
<i>Af</i> % 0	100	100	4	97	0
<i>Aa</i> % 0	0	18	43	0	0
<i>A. desmanthum</i>	<b>1,089</b>	<b>0,674</b>	<b>0,485</b>	<b>0,270</b>	<b>0,432</b>
<i>Af</i> % 64	8	87	94	90	0
<i>Aa</i> % 0	10	42	0	34	0
<i>A. marcgravianum</i>	1,613	0,310	0,014	0,028	1,985
<i>Af</i> % 10	57	67	50	84	7
<i>Aa</i> % 10	0	10	0	21	30
<i>A. nitidum</i>	0,070	0,084	0,015	0,027	0,265
<i>Af</i> % 97	100	9	7	97	0
<i>Aa</i> % 0	0	16	8	0	0
<i>A. sandwithianum</i>	1,083	0,251	0,043	0,007	4,35
<i>Af</i> % 10	24	84	27	0	7
<i>Aa</i> % 0	54	27	30	0	0
<i>A. schultesii</i>	0,459	0,085	1,001	0,066	1,813
<i>Af</i> % 0	100	7	50	4	84
<i>Aa</i> % 0	0	37	0	0	0
<i>A. spruceanum</i>	0,497	1,068	0,308	0,008	0,673
<i>Af</i> % 40	7	27	34	34	0
<i>Aa</i> % 0	0	41	10	0	0
<i>A. vargasii</i>	<b>2,431</b>	<b>0,204</b>	<b>0,066</b>	<b>0,153</b>	<b>2,562</b>
<i>Af</i> % 47	0	84	87	50	47
<i>Aa</i> % 0	0	47	0	0	0

<sup>a</sup> Concentração de 500µg/mLFonte: (Henrique *et al.*, 2001 e 2003).Legenda: *Af*: *Artemia franciscana*; *Aa*: *Aedes aegypti*

### 3.3 Nova coleta de *A. desmanthum* e *A. vargasii*

Após o fracionamento ácido-base para obtenção de alcalóides e verificação da citotoxicidade frente a *Artemia franciscana* dos extratos obtidos para as oito *Aspidosperma* spp (Henrique *et al.*, 2001 e 2003), optou-se na continuidade do estudo fitoquímico, como já relatado, por *A. desmanthum* e *A. vargasii* (Tabela 9). Fez-se uma nova coleta, uma vez que as massas eram mínimas para continuação do estudo, como descrito na Tabela 8.

Coletou-se na Reserva Adolpho Ducke no dia 11 de agosto de 2005 ca. de 3 Kg de cascas das duas espécies utilizando o mesmo método já descrito anteriormente na seção 3.2.1 e 3.2.2.

#### 3.3.1 Identificação botânica

A identificação botânica da árvore com o número 2857 como *Aspidosperma desmanthum* Benth. ex Mull. Arg, exsicata com o número 180459 depositado no Herbário do INPA, como é mostrado na Figura 14a e *Aspidosperma vargasii* A. DC. com identificação 4874 e número de exsicata número 191853, descrito na Figura 14b.



**Figura 14a.** Exsicata do espécime de *Aspidosperma desmanthum* Benth. ex Mull. Arg sob estudo. (Fonte: herbário do INPA).



**Figura 14b.** Exsicata do espécime de *Aspidosperma vargasii* A. DC. sob estudo (Fonte: herbário do INPA).

### **3.4 Preparação do extrato etanólico/NH<sub>3</sub> 1 %**

O material vegetal seco e moído das cascas das duas espécies foi em separado extraído a frio (maceração), como descrito abaixo.

#### **3.4.1 Extração por maceração em etanol/NH<sub>3</sub> 1%**

Colocaram-se cerca de 1,5 Kg de serragens das cascas em um mariote. Adicionaram-se aproximadamente 8 L de etanol/NH<sub>4</sub>OH 1% e deixou-se repousar por 7 dias, agitando diariamente. Filtrou-se a mistura e guardou-se o filtrado. Repetiu-se este procedimento por mais 4 vezes (Figura 15). Juntou-se todos os filtrados, concentrou-se em rotoevaporador, liofilizou-se e pesou-se. Após a obtenção do extrato fez o fracionamento ácido-base padrão. Procedimentos estes realizados para as duas espécies em estudo (Figura 15).

Conforme pode ser observado nas Tabelas 10 (seção 3.6) e 11 (seção 3.7), as massas obtidas foram mais expressivas em comparação com as do trabalho anterior (Henrique *et al.*, 2001 e 2003, Tabela 8) para *A. desmanthum* e *A. vargasii*. Isso pode ser devido ao número maior de extrações efetuado no segundo procedimento.

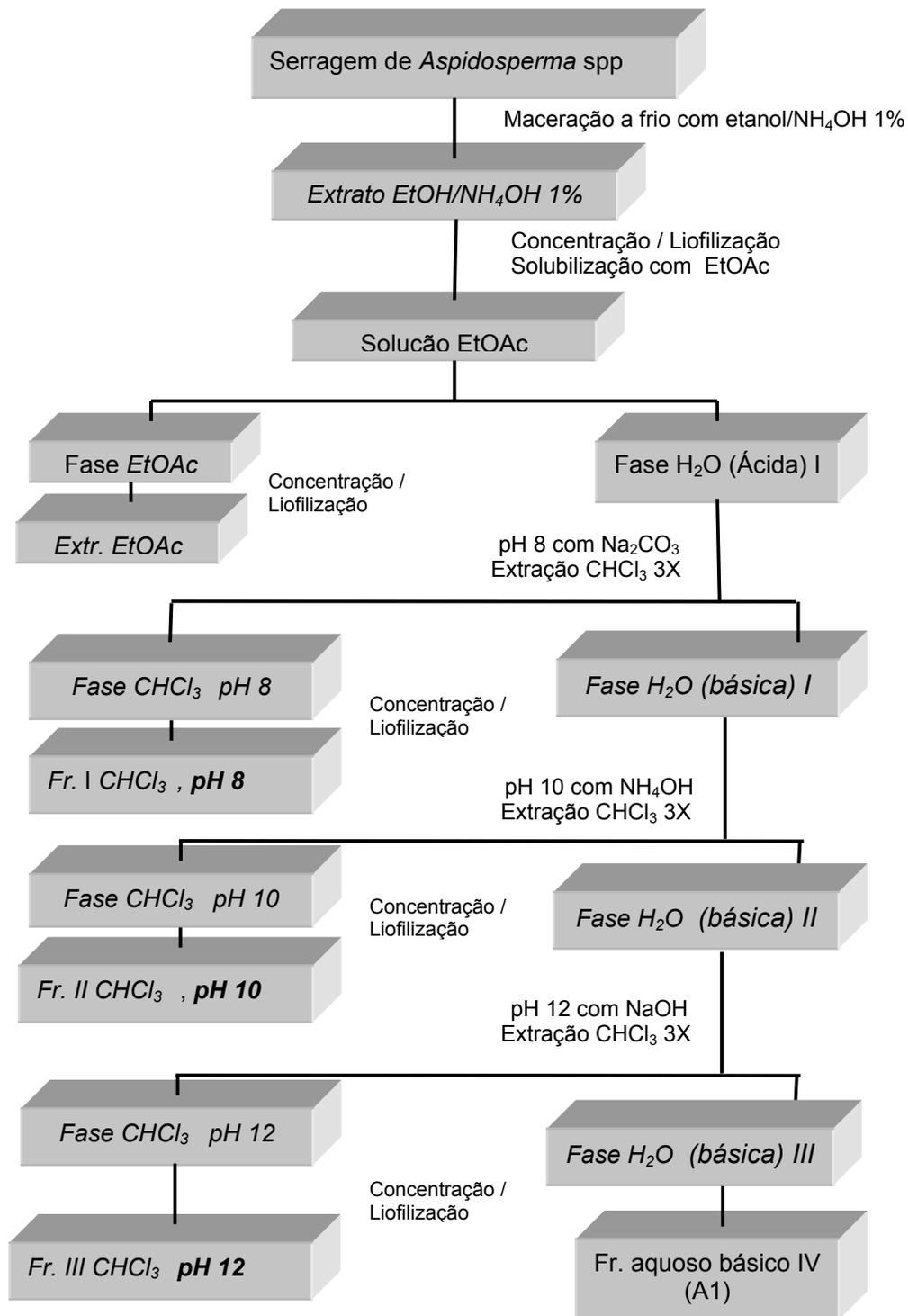
### 3.5 Fracionamento padrão das espécies de *Aspidosperma* neste estudo

(Figura 15).

O extrato etanólico /  $\text{NH}_4\text{OH}$  1% foi solubilizado com acetato de etila, em seguida acidulado com solução de ácido clorídrico 0,1 N (Figura 15). As fases foram separadas em acetato de etila e aquosa (ácida) I. A fase acetato de etila foi submetida à concentração em rotoevaporador para eliminação do solvente, obtendo-se assim a fração acetato de etila. A fase aquosa (ácida) I, foi basificada utilizando-se carbonato de sódio até pH 8, obtendo-se a fase aquosa (básica) I, a qual foi extraída com clorofórmio, gerando-se a fase clorofórmica pH 8, em seguida o solvente foi eliminado em evaporador rotativo a pressão reduzida, fornecendo a fração clorofórmica I.

A fase aquosa (básica) I foi basificada para pH 10 com hidróxido de amônia, gerando a fase aquosa (básica) II, que foi particionada com clorofórmio, o solvente da fase clorofórmica pH 10, foi eliminado em evaporador rotativo a pressão reduzida, fornecendo a fração clorofórmica II.

A fase aquosa (básica) II foi basificada para pH 12 com hidróxido de sódio 1 N, gerando a fase aquosa (básica) III, que em seguida foi particionada com clorofórmio. Os solventes foram eliminados em evaporador rotativo a pressão reduzida individualmente, fornecendo a fração aquosa (básico) IV e a fração clorofórmica III.



**Figura 15.** Procedimento para extração de Alcalóides

### 3.6 *Aspidosperma vargasii*

A serragem (1298 g) foi macerada em solução EtOH/NH<sub>4</sub>OH 1% (seção 3.4.1), o extrato foi submetido a tratamento ácido-base (Figura 15, seção 3.5) e forneceram as seguintes amostras (Tabela 10).

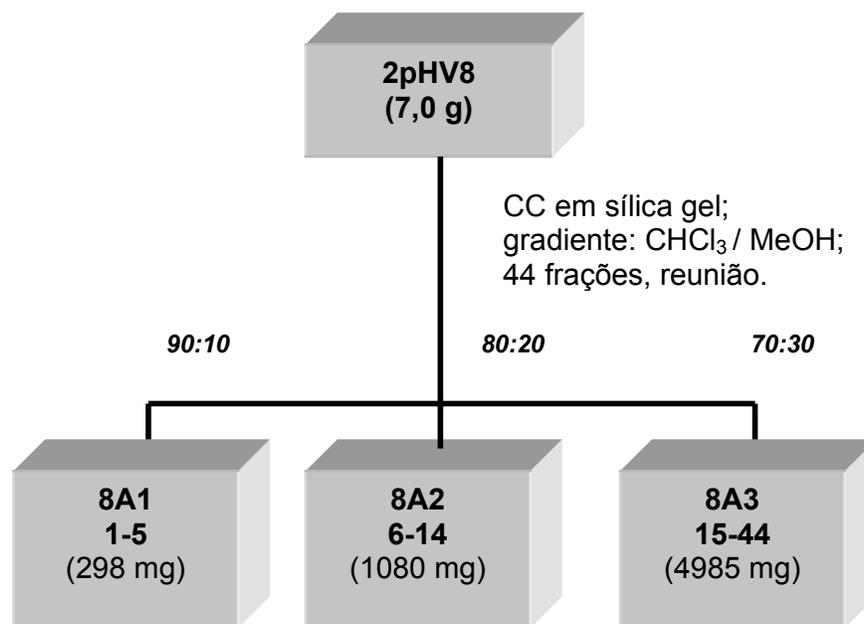
**Tabela 10.** Extratos etanol/NH<sub>4</sub>OH 1% e frações obtidas de *A. vargasii*.

<b>Extrato/ fração</b>	<b>Código</b>	<b>Massa (g)</b>
EtOH/NH <sub>4</sub> OH	EEAv	56,02 (4,3) <sup>a</sup>
EtOAc	2AcV	1,058 (0,08) <sup>a</sup>
CHCl <sub>3</sub> , pH 8	2pHV8	8,025 (0,61) <sup>a</sup>
CHCl <sub>3</sub> , pH 10	2pHV10	2,785 (0,21) <sup>a</sup>
CHCl <sub>3</sub> , pH 12	2pHV12	0,4518 (0,03) <sup>a</sup>
Aquoso	2VA1	3,451 (0,26) <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Rendimento (%) dos extratos obtidos para *A. vargasii* (baseado na massa da serragem das cascas)

### 3.6.1 Fracionamento cromatográfico de 2pHV8.

Uma porção (7,0 g) da fração clorofórmica **2pHV8** (seção 3.5) foi submetida à cromatográfica em coluna ( $\phi \times h$  de 5 × 25 cm) de sílica gel 60 (0,063 – 0,200 mesh), previamente ativado a uma temperatura de 100 °C por um período de 4 horas. Utilizou-se  $\text{CHCl}_3$  / MeOH como eluente. Foram coletadas 44 frações de 50 mL cada. As frações foram analisadas em CCDC, foi utilizado para visualização luz UV 254 e 366 nm, vapor de iodo, anisaldeído e revelador específico Dragendorff. As frações foram reunidas de acordo com seu perfil cromatográfico (Figura 16).



**Figura 16.** Fracionamento do extrato 2pHV8.

### 3.6.1.1 Fracionamento da fração 8A3.

A fração **8A3** (seção 3.6.1) foi submetida à cromatográfica em coluna ( $\phi \times h$  de 6  $\times$  40 cm) de sílica *flash* (0,040 – 0,063 mesh) utilizando como eluente acetona : Isopropanol : dietilamina, obtendo-se 206 frações, em seguida concentradas e analisadas em CCDC utilizando vários sistemas de eluentes e reveladas em luz UV (254 e 366 nm) e reveladas em reagente Dragendorff. Foram reunidas de acordo com os perfis cromatográficos em 4 novas frações (Figura 17).

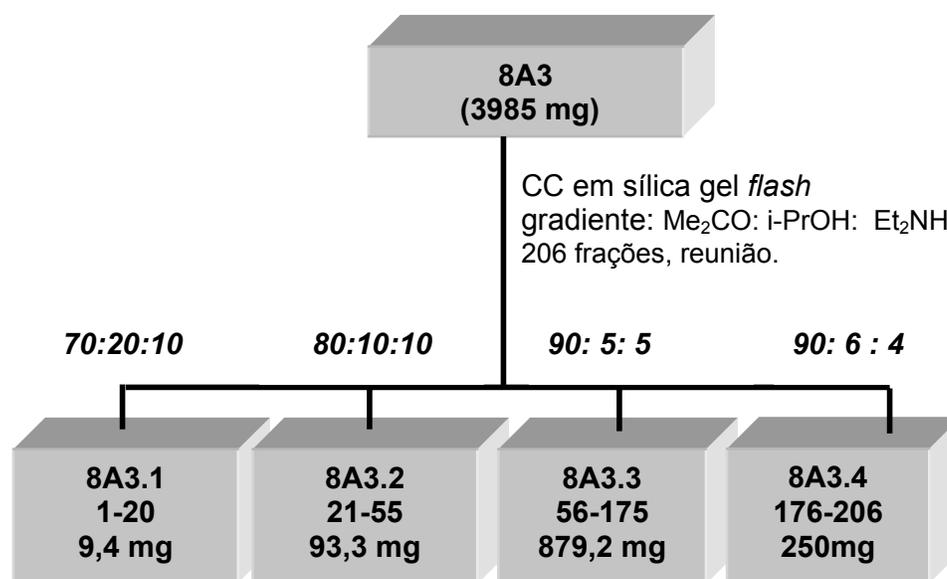
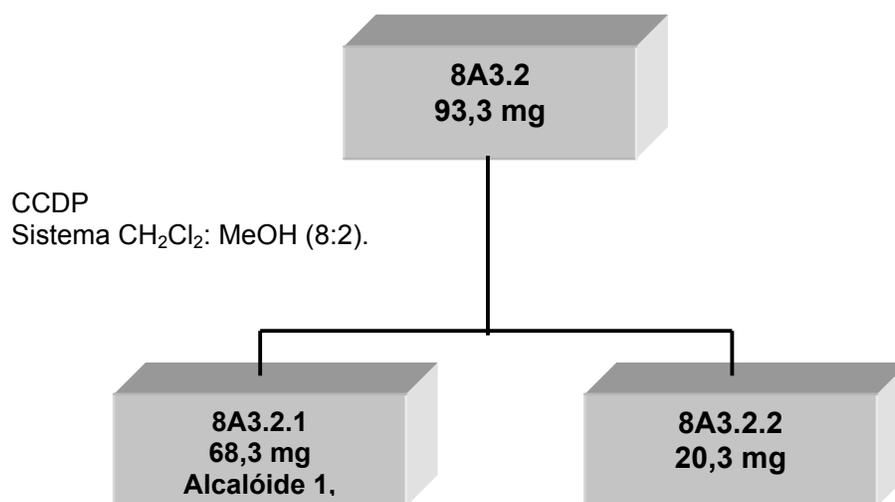


Figura 17. Fracionamento da fração 8A3.

### 3.6.1.2 Purificação da fração 8A3.2

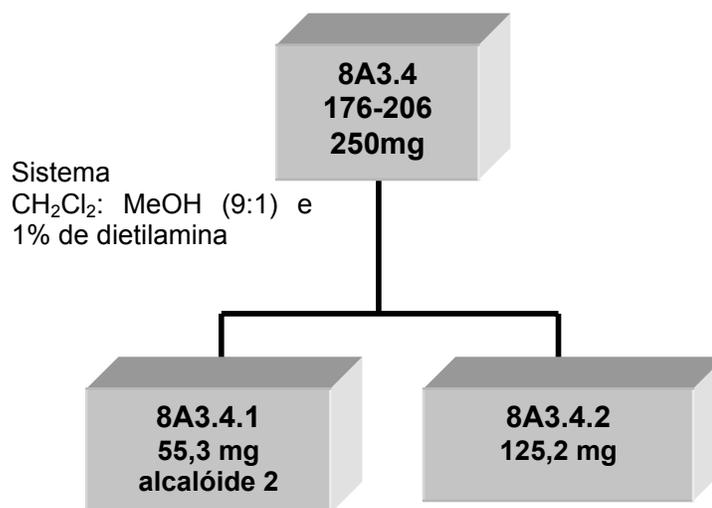
A fração **8A3.2** (seção 3.6.1.1) foi purificada (Figura 19), por CCPD (sílica gel 60 PF<sub>254</sub>), utilizando como eluente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH (8:2). O alcalóide 1 (8A3.2.1). Em fase normal de sílica gel 60 (CCDC), apresentou revelação em câmara de iodo e revelação intensa com reagente de Dragendorff, apresentando mancha alaranjada, indicativo de alcalóide. O alcalóide 1 apresentou solubilidade em mistura de clorofórmio: metanol na proporção 1:1. O alcalóide 1(8A3.2.1) caracteriza-se como cristais pontiagudos de cor amarela-alaranjado, sendo solúvel em mistura de Clorofórmio: metanol na proporção 1:1.



**Figura 18.** Fracionamento cromatográfico da fração 8A3.2

### 3.6.1.3 Purificação da fração 8A3.4

A fração **8A3.4** (seção 3.6.1.1) foi purificada por CCPD (Figura 19), tendo como sistema de eluente  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : MeOH (9:1) com 1% de dietilamina. O alcalóide 2 (8A3.4.1) apresentou revelação intensa da placa de CCDC em câmara de iodo; revelação intensa com Dragendorff, apresentando mancha alaranjada, consistente com a presença de alcalóides e caracteriza-se como sendo um sólido de cor amarelo-claro, sendo solúvel em mistura de Clorofórmio: metanol na proporção 7:3.



**Figura 19.** Fracionamento cromatográfico da fração 8A3.4

### 3.7 *Aspidosperma desmanthum*

A serragem (1200 g) foi macerada em solução EtOH/NH<sub>4</sub>OH 1% (seção 3.4.1), o extrato foi submetido a tratamento ácido-base (seção 3.5) e forneceram-se os seguintes extratos (Tabela 11).

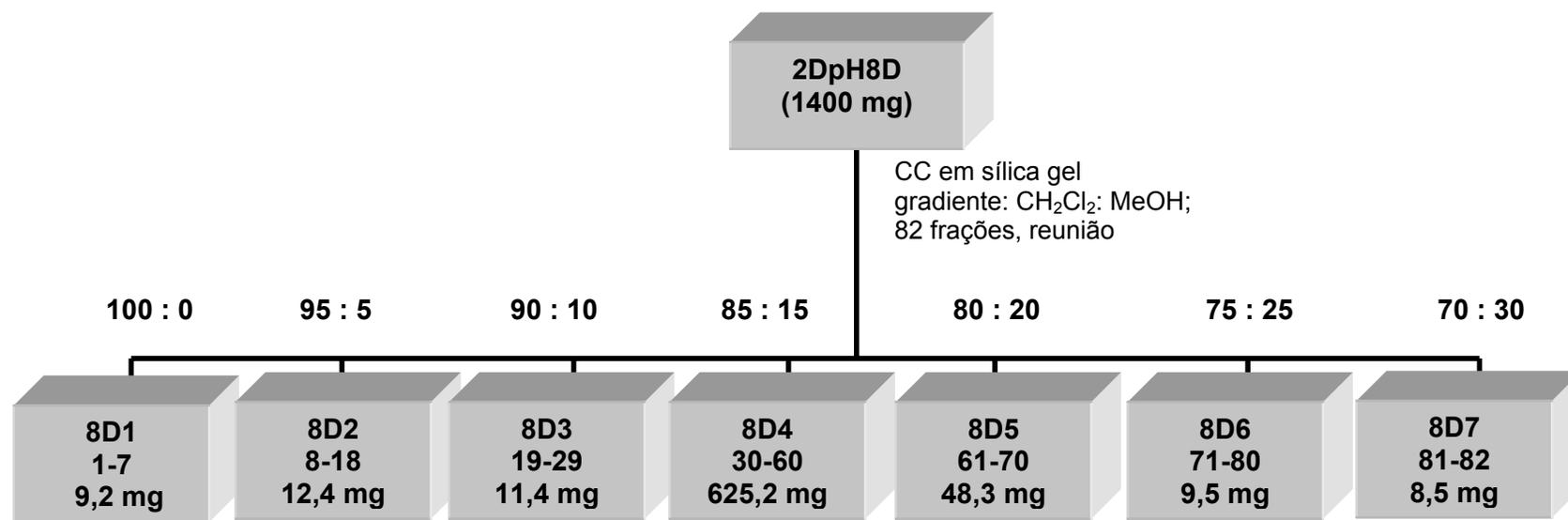
**Tabela 11.** Extratos etanol/NH<sub>4</sub>OH 1% e frações obtidas de *A. desmanthum*

<b>Extrato/fração</b>	<b>Código</b>	<b>Massa (g)</b>
EtOH/NH <sub>4</sub> OH	E E A d	35,98 (2,9) <sup>a</sup>
EtOAc	2AcD	2,025 (0,17) <sup>a</sup>
CHCl <sub>3</sub> , pH 8	2DpH8D	1,450 (0,13) <sup>a</sup>
CHCl <sub>3</sub> , pH 10	2DpH10D	0,2201 (0,018) <sup>a</sup>
CHCl <sub>3</sub> , pH 12	2DpH12D	0,402 (0,03) <sup>a</sup>
aquoso	2DA1	4,365 (0,36) <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Rendimento (%) dos extratos obtidos para *A. desmanthum*. (baseado na massa da serragem das cascas)

### 3.7.1 Fracionamento cromatográfico de *A. desmanthum* 2DpH8D

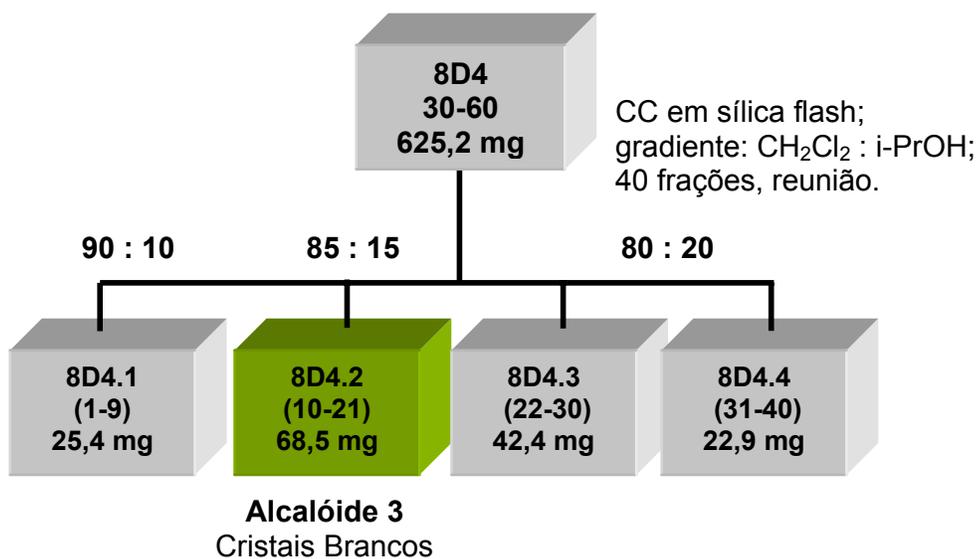
Uma porção (1,4 g) da fração clorofórmica **2DpH8D**, obtido na seção 3.5, foi fracionado em coluna ( $\phi \times h$  de 2,5 × 30 cm) de sílica gel 60 (0,063 – 0,200 mesh). O eluente usado foi diclorometano aumentando-se a polaridade com metanol (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: MeOH 95:5; 90:10; 85:15; 80:20 e 70:30). Foram recolhidas frações de 50 mL, que foram concentradas e analisadas em CCDC utilizando vários sistemas de eluentes e reveladas em luz UV (254 e 366 nm) e reagente de Dragendorff.



**Figura 20.** Fracionamento cromatográfico da fração 2DpH8D

### 3.7.1.1 Purificação da fração 8D4

A fração **8D4** (seção 3.7.1) foi fracionada em coluna de sílica *flash* ( $\phi \times h$  de  $1,5 \times 25$  cm), utilizando como eluente diclorometano : Isopropanol nas proporções 90:10, 85:15, 80:20. Obtiveram-se 40 frações de 4 mL (Figura 21). Obteve-se o alcalóide 3 (8D4.2), a qual foi analisada em CCDC e revelada em luz UV (254 nm), em vapor de iodo, apresentando cor marrom intenso, e reagente de Dragendorff. O alcalóide 3 apresentou-se como cristais brancos, com solubilidade em clorofórmio.



**Figura 21.** Fracionamento cromatográfico da subfração 8D4.

### **3.8 Ensaio biológicos**

*Screening* para bioatividade *in vitro* de extratos, frações e alcalóides, foram efetuados testes: *A. franciscana*, *A. aegypti*, bem como linhagens de células de tumor e no caso dos alcalóides isolados *Plasmodium falciparum* (parasita da malária humana).

#### **3.8.1 Preparo das amostras para os testes biológicos.**

Retirou-se uma pequena porção dos extratos etanólicos, frações e substâncias isoladas das espécies em estudo para a realização dos testes de atividade biológica descritos a seguir.

### 3.8.1.1 Teste de letalidade frente *Artemia franciscana*.



**Figura 22.** Teste de letalidade às larvas de *A. franciscana*.

As larvas de *Artemia* spp. têm sido utilizadas para detectar compostos bioativos em extratos de plantas (Alves *et al.*, 2000; Carvalho *et al.*, 1988) por ser um ensaio de baixo custo, rápido e simples, pois o mesmo utiliza o crustáceo *A. franciscana*. A letalidade às larvas de *Artemia* spp. têm sido amplamente utilizada por estar relacionada com a atividade antitumoral *in vitro* e, portanto sendo indicada para avaliação preliminar de extratos vegetais (Anderson, Goeth e Mclaughlin, 1991).

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Princípios Ativos da Amazônia - LAPAAM – CPPN / INPA. Os ovos das larvas de *A. franciscana* (Brine Shrimp Direct, EUA) foram incubados e eclodidos em placas de Petri em solução salina (sal marinho sintético Sera, Alemanha) a 35g/L por 48 h em temperatura ambiente e na presença de luz artificial (fluorescente). Após este período, 10 larvas de *Artemia franciscana* foram transferidas para cada poço de uma microplaca com volume final 2 mL por poço. As amostras pesadas foram solubilizadas em DMSO ou Tween, dependendo da solubilidade da amostra. O teste foi realizado em triplicata e em concentração padrão de teste de 500 µg/ mL de amostra em meio de cultura

(solução salina). A atividade foi determinada pela percentagem de mortalidade (Af%) determinada após 24 h de incubação na ausência de luz.

Os controles negativos foram também feitos em triplicata e consistiam nas larvas, no solvente usado para solubilizar as amostras (DMSO ou Tween-80) e meio de cultura, esses preparados na mesma concentração do poço experimental.

As amostras que são consideradas muito ativas, ou seja, Af% > 50 foram testadas em várias diluições em concordância com o método probit de análise (McLaughlin *et al.*, 1991). Os resultados foram analisados por regressão linear dos valores *probit* vs. logaritmo da concentração.

### 3.8.1.2 Teste da atividade larvicida contra *Aedes aegypti*



**Figura 23.** Teste de letalidade frente a *Aedes aegypti*.

O teste foi realizado por estagiários do Laboratório de Malária e Dengue da CPCS / INPA, sob a orientação do Dr. Wanderli Pedro Tadei.

Os ovos de *A. aegypti* foram incubados e eclodidos em água potável por um período de aproximadamente 3 a 4 dias. Após a eclosão, grupos de 10 larvas (3º estágio) foram transferidos para copos de plástico juntamente com alimento (composto de farinha de peixe com pó de fígado) e 10 mL de água destilada.

As amostras foram dissolvidas em DMSO ou água, de acordo com sua polaridade, e aplicadas em cada copo. Os testes preliminares foram realizados numa concentração de 500  $\mu\text{g/mL}$  de amostra em meio de cultura. A atividade larvicida das amostras testadas foi determinada pela percentagem de mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* (*Aa%*) observada após 24 h de incubação.

As que são consideradas muito ativas, ou seja, (*Aa%* > 50) foram testadas em várias diluições em concordância com o método *probit* de análise (McLaughlin *et al.*, 1991). Os resultados foram analisados por regressão linear dos valores *probit* vs. Logarítimo da concentração. Para os

controles positivos e negativos foram utilizados temefós e DMSO, respectivamente.

### 3.8.1.3 Testes de atividade antitumoral

Esses testes tiveram o objetivo de verificar a citotoxicidade *in vitro* das amostras contra três linhagens de células tumorais. Essa análise fez parte de um *screening* para determinação do potencial antitumoral das amostras. Esses testes foram realizados no Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará (UFC), através do convênio entre INPA / UFC, sob a responsabilidade dos Profs. Drs. Manoel Odorico de Moraes e Cláudia de Oliveira Pessoa, e colaborador Bruno Coelho Cavalcanti.

As linhagens de células utilizadas, MDA-MB435 (mama humano), HCT-8 (cólon humano), SF295 (sistema nervoso humano), foram cedidas pelo Mercy Children's Hospital, tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10 % de soro fetal bovino (Cultilab) e 1 % de antibióticos (penicilina 10.000 U.I. mL / estreptomicina 10 mg / mL), mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5 % de CO<sub>2</sub>, seguido da observação do crescimento celular com ajuda de microscópio de inversão a cada 24 h.

As amostras foram diluídas em DMSO na concentração estoque de 20 mg/mL.

A citotoxicidade das substâncias foram avaliadas pelo método do 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazólio (MTT; Mosman, 1983). As células foram plaqueadas em placas de 96 cavidades nas

seguintes densidades:  $0,7 \times 10^5$  (HCT8),  $0,6 \times 10^5$  (SF295),  $0,3 \times 10^6$  (HL60) e  $0,1 \times 10^6$  (MDA-MB435). As amostras foram incubadas durante 72 horas em concentrações que variaram de 0,19 a 100  $\mu\text{g/mL}$ . As absorbâncias foram obtidas com o auxílio de um espectofotômetro de placa a 550 nm.

Os experimentos foram analisados segundo suas médias e respectivos intervalos de confiança a partir da regressão linear no programa Prism versão 3.0 (*GraphPad Software*). As substâncias foram testadas em triplicata em dois experimentos independentes. A doxorubicina e DMSO foram utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente.

Para análise das amostras, uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico. Amostras sem atividade (SA), com pouca atividade (PA, inibição de crescimento celular variando de 1 a 50 %), com atividade moderada (MO, inibição de crescimento celular variando de 50 a 75 %) e com muita atividade (MA, inibição de crescimento variando de 75 a 100 %).

### 3.8.1.4 Teste de atividade antimalárica

O teste para atividade antimalárica foi realizado no Instituto de Medicina Tropical do Amazonas, sob Coordenação Dr. Pedro Paulo Ribeiro Vieira e seus colaboradores, com objetivo de avaliar os extratos, frações e alcalóides para inibição de cepas de *Plasmodium falciparum*.

A metodologia utilizada para o cultivo *in vitro* de *P. falciparum* foi modificação da técnica desenvolvida por Trager & Jensen (1976), e baseia-se no desenvolvimento laboratorial dos estágios eritrocitários desta espécie parasitária. Após a realização do descongelamento das amostras, os parasitos foram mantidos a 37°C em garrafas de poliestireno de 25 mL hermeticamente fechadas, às quais foi adicionada uma mistura de gases para manter uma micro-atmosfera de baixa tensão de oxigênio (5 % de O<sub>2</sub>, 5 % de CO<sub>2</sub> e N<sub>2</sub> balanceado). Em cada garrafa de cultivo foi adicionada suspensão de eritrócitos suficiente para a obtenção de 500 µL de sangue parasitado (suspensão de eritrócitos tipo A<sup>+</sup> a 5 % (v/v) em um hematócrito de 50%) e 4,5 mL de solução composta por meio RPMI 1640 suplementado com 32mM NaHCO<sub>3</sub>, 25mM HEPES (C<sub>8</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S), 12 mM TES (ácido sulfônico-N-tris[hidroximetil]-metil-2-aminoetano), 37 mM hipoxantina, 2 mM glutamina, 10 mM glicose e 10 % de plasma humano tipo A<sup>+</sup>. Foram feitas trocas diárias de meio RPMI suplementado com plasma humano inativado, sendo a retirada desse meio efetuada por sucção a vácuo com o auxílio de uma pipeta Pasteur estéril. Todo o procedimento de descongelamento e manutenção das culturas realizou-se em ambiente de total assepsia (câmara de fluxo laminar). A adição de suspensão de hemácias não parasitadas em

períodos de 48 horas foi efetuado, sempre que a cultura apresentou predomínio de esquizontes e/ou parasitemia maior do que 2 %. O acompanhamento do crescimento parasitário também foi a cada 24 horas, durante o procedimento de troca do meio de cultura e adição da mistura de gases. A contagem de parasitos viáveis se deu pela observação de estendidos hematológicos corados pelo método panótico. A parasitemia foi calculada na forma de percentual de formas eritrocíticas viáveis observadas durante a contagem de 1000 hemácias.

O estudo de atividade antimalárica dos alcalóides contra o *Plasmodium falciparum*, foi realizado segundo metodologia descrita por Andrade-Neto *et al.* (2003) e Rathelot *et al.* (1995) com pequenas modificações. Primeiramente os parasitos serão sincronizados para o estágio trofozoíta na forma de anel pelo tratamento com sorbitol (Lambros e Vanderberg, 1979). Soluções estoques de cada alcalóide foram preparadas em DMSO ou etanol em uma concentração inicial de 10 mg/mL. Volume de 20 µL de cada solução estoque foi transferido para microtubos contendo meio de cultura RPMI completo. Destes microtubos foram aliqüotados 150 µL para cada poços de microplacas contendo 96 poços cada. A estes poços foram acrescentados 100 µL de sangue parasitado, encerrando um volume de 250 µL, parasitemia de 1 % e uma concentração inicial de 50 µg/mL. Controles foram preparados substituindo-se a solução estoque por DMSO ou etanol (controle negativo) ou pelos antimaláricos cloroquina, quinina ou artemisinina (controle positivo). As placas foram deixadas em repouso na ausência de luz direta (para evitar possíveis resultados falso-positivos devido à geração de compostos fototóxicos) a 37 °C, em atmosfera a 5 % de CO<sub>2</sub>, 5

% de O<sub>2</sub> e 90 % de N<sub>2</sub> e a atividade antiplasmodial avaliada após 24 h. A parasitemia em cada poço determinada pelo exame do esfregaço sangüíneo corado pelo método do panótico em microscópio óptico, com objetiva de 100 x. A parasitemia foi expressa em porcentagem de formas eritrocíticas viáveis observadas durante a contagem de 3000 hemácias e a inibição expressa em porcentagem (Andrade-Neto *et al.*, 2003; Rathelot *et al.*, 1995). Todos os ensaios foram realizados em triplicata. As concentrações das amostras requeridas para reduzir em 50% o crescimento do parasita (CI<sub>50</sub>) foram calculadas por análise de regressão linear usando curvas dose-resposta (Nfit, Texas Galvestone).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Avaliação da citotoxicidade frente *Artemia franciscana* e atividade larvicida contra *Aedes aegypti*.

Os resultados de citotoxicidade e atividade larvicida para os extratos, frações e alcalóides isolados estão apresentados na Tabela 12. Para as amostras mais ativas foram realizados os ensaios em diferentes diluições para determinação da concentração letal mediana ( $CL_{50}$ ). O extrato etanólico/ $NH_4OH$  1 % de *A. desmanthum* (EEAd), sua fração clorofórmica faixa pH 8 (2DpH8D) e o extrato etanólico/ $NH_4OH$  1% da *A. vargasii* (EEAv), bem como suas frações clorofórmicas de pH 8 (2pHV8) e pH 12 (2pHV12) mostraram-se letais para larvas de *A. franciscana* e inativos para larvas de *Aedes aegypti* (Tabela 12).

Os alcalóides 1 (8A3.2.1), 2 (8A3.4.1) e 3 (8D4.2) apresentaram citotoxicidade frente às larvas de *A. franciscana*. Para a atividade larvicida em *Aedes aegypti* os resultados foram inexpressivos (Tabela 12). Observa-se também a eficiência do fracionamento, pois a citotoxicidade concentrou-se nas frações clorofórmicas, comportamento verificado para as duas espécies em estudo.

**Tabela 12.** Bioatividade dos extratos, frações e alcalóides isolados de *A. desmanthum* e *A. vargasii* (concentração de 500 µg / mL).

Espécie	Amostra	<i>A. franciscana</i>		<i>* A. aegypti</i>
		% Mortalidade	CL <sub>50</sub> (µg / mL)	% Mortalidade
<i>A. desmanthum</i>	EEAd	84	243	0
	<sup>a</sup> 2AcD	0	-	0
	2DpH8D	95	120,2	30
	2DpH10D	58	x	0
	2DpH12D	45	-	12
	<sup>b</sup> 2DA1	0	-	0
Alcalóide isolado	8D4.2	100	163,5	23
<i>A. vargasii</i>	EEAv	76	344,4	15
	<sup>c</sup> 2AcV	10	-	10
	2pHV8	100	118,1	32
	2pHV10	70	x	5
	2pHV12	83	x	16
	<sup>d</sup> 2VA1	25	-	0
	Alcalóides isolados	8A3.2.1	98	136,6
	8A3.4.1	100	130,2	8

<sup>a</sup> 2AcD fração acetato de etila; <sup>b</sup> 2DA1 extrato aquoso básico.

<sup>c</sup> 2AcV fração acetato de etila; <sup>d</sup> 2VA1 extrato aquoso básico.

\* Não foi efetuado CL<sub>50</sub> devido à inexpressiva atividade frente *A. aegypti*.

x não realizado

A Tabela 13 apresenta os resultados dos ensaios antitumorais dos extratos, frações clorofórmicas e alcalóides isolados para as duas espécies em estudo.

**Tabela 13.** atividade antitumoral de extrato, frações e alcalóides isolados.

Espécie	Linhagens de Células Tumorais		
	HCT-8 (%)	MDA-MDB435 (%)	SF295 (%)
<i>A. desmanthum</i>			
EEAd	26	27	19
2AcD	35	18	28
2DpH8D	<b>87</b>	39	<b>90</b>
2DpH10D	27	5	26
2DpH12D	60	72	<b>75</b>
2DA1	30	22	24
Alcalóide isolado	50	68	29
8D4.2			
<i>A. vargasii</i>			
EEAv	<b>88</b>	<b>82</b>	<b>91</b>
2AcV	31	SA	43
2pHV8	<b>89</b>	<b>87</b>	<b>91</b>
2pHV10	61	63	65
2pHV12	<b>88</b>	<b>82</b>	<b>90</b>
2VA1	31	22	26
Alcalóides isolados			
8A3.2.1	<b>90</b>	<b>94</b>	<b>86</b>
8A3.4.1	<b>94</b>	<b>94</b>	<b>91</b>

**Legenda:** (SA) sem atividade. Concentração dos testes: 100 µg / mL.;

MDA-MB435 (mama humano), HCT-8 (cólon humano), SF295 (sistema nervoso humano),

Para o ensaio antitumoral, foi usado o seguinte critério: para atividade alta uma percentagem a partir de 75-100, moderada de 50 até 75 e pouca atividade abaixo de 25. O extrato etanólico (EEAv) da *A. vargasii* apresentou percentagem de letalidade superior a 80 % para as três linhagens de células tumorais. Foi observado o mesmo resultado expressivo para as frações clorofórmicas 2pHV8, 2pHV10 e 2pHV12. Destaca-se a fração 2pHV8 ativa para linhagens de células tumorais (tumor de cólon e de sistema nervoso), onde isolaram-se os alcalóides **1** (8A3.2.1) e o alcalóide **2** (8A3.4.1) com atividade alta frente a essas linhagens. A atividade desse extrato pode ser atribuída a presença desses alcalóides entre outras substâncias. Observou-se pouca atividade para a fração aquosa 2VA1 e a fração acetato de etila 2AcV, concluindo-se assim a não presença dos constituintes ativos ou sua baixa concentração nas mesmas.

O extrato etanólico (EEAd) de *A. desmanthum* apresentou letalidade baixa frente às linhagens tumorais testadas (Tabela 13). A sua fração clorofórmica (2DpH8D) apresentou inibição expressiva ao crescimento celular em duas linhagens de células tumorais. O alcalóide **3** (8D4.2) isolado desse extrato apresentou atividade citotóxica moderada para duas linhagens de células tumorais (tumor de mama e cólon), e assim, torna-se ser plausível a existência de outros constituintes, mais ativos, na fração 2DpH8D. Também, observou-se pouca atividade antitumoral para a fração aquosa e a fração acetato de etila (2DA1 e 2AcD, respectivamente).

A Tabela 13 apresenta um resumo dos extratos, frações e alcalóides testado para atividade antitumoral utilizando a doxorrubicina e DMSO como controles positivo e negativo, respectivamente.

Para obtenção da  $CI_{50}$ , as amostras foram incubadas durante 72 horas em concentrações que variaram de 0,19 a 100  $\mu\text{g/mL}$ , sendo testadas nas mesmas linhagens, MDA-MB435 (mama), HCT-8 (cólón), HL60 (leucemia) e SF295 (sistema nervoso). As duas amostras testadas apresentaram alta toxicidade celular em todas as linhagens utilizadas nos ensaios (Tabela 14).

**Tabela 14.** Resultado da avaliação de  $CI_{50}$  em linhagens de células tumorais para os alcalóides 1 e 2 isolados de *A. vargasii*

Linhagens celulares				
Amostras	$CI_{50}$			
	HL60	MDA-MB-435	HCT-8	SF295
Alcalóide 1 ( <b>8A3.2.1</b> )	1,52 (0,93 – 2,48)	1,49 (1,13 – 1,97)	0,11 (0,04 – 0,31)	0,31 (0,18 – 0,53)
Alcalóide 2 ( <b>8A3.4.1</b> )	3,37 (0,56 – 20,18)	4,33 (3,10 – 6,06)	4,19 (2,78 – 6,32)	6,56 (4,77 – 9,03)

Para o alcalóide 3 não foi realizada a avaliação de  $CI_{50}$  devido sua moderada ou pouca atividade nos ensaios preliminares.

### 4.3 Atividade antimalárica

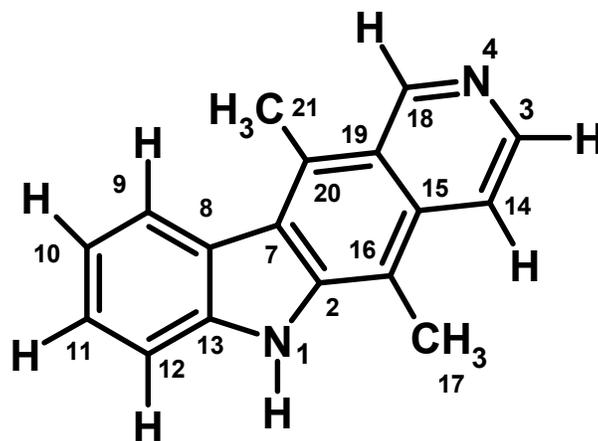
Nos ensaios contra *Plasmodium falciparum*, cepa K1, os alcalóides **1**, **2** e **3** foram dissolvidas em separado em DMSO, testadas numa concentração inicial de 10 µg / mL, com diluição seriada de 1:10 (7 diluições variando de 10 µg a 100 pg / mL). A microplaca foi incubada por 24 horas a 37 °C. O alcalóide **1** (8A3.2.1) apresentou a  $CI_{50}$  18 ng / mL e o alcalóide **3** (8D4.2) a  $IC_{50}$  de 7 ng / mL.

O alcalóide **2** (8A3.4.1), com  $CI_{50}$  0,18 µg / mL, não apresentou atividade tão expressiva, em comparada com os alcalóides 1 e 3.

#### 4.4. Identificação dos alcalóides isolados

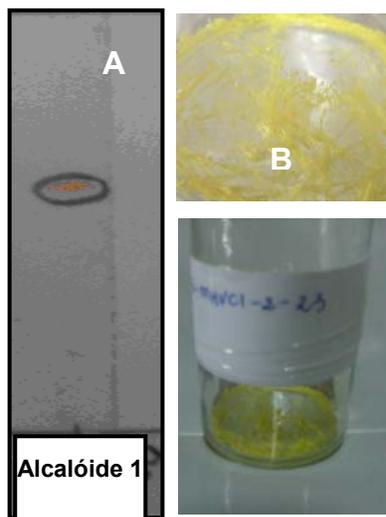
##### 4.4.1 Identificação estrutural do alcalóide 1 (8A3.2.1)

A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , RMN de  $^{13}\text{C}$ , os bidimensionais HSQC, COSY, HMBC e NOESY (Tabelas 16, 17, 18 e 19), o espectro de massa de alta resolução com ionização por *electrospray*, IV e UV, juntamente com a comparação com os dados da literatura e análise cristalográfica de monocristais, levaram a identificação do alcalóide 1 como elipticina (Figura 24).



**Figura 24.** Estrutura e sistema de numeração do alcalóide 1 (8A3.2.1) segundo sua biogênese (Ahond *et al.*, 1978).

O alcalóide 1 (**8A3.2.1**, m = 68,3 mg), isolado da fração clorofórmica **2pHV8** (seção 3.6.1.2), caracterizou-se como um cristal, em forma de agulhas, de coloração amarelo claro (Figura 25). Sua solubilidade foi observada em mistura de clorofórmio:metanol (1:1), em CCDC revelou-se positivo para dragendorff (indicando a presença de alcalóide), com Rf 0,58 em clorofórmio:metanol (8:2). ponto de fusão foi observado na faixa de 311-13 °C. Segundo Pedersen *et al.* (2005), o ponto de fusão para a elipticina na faixa 310-14 °C.

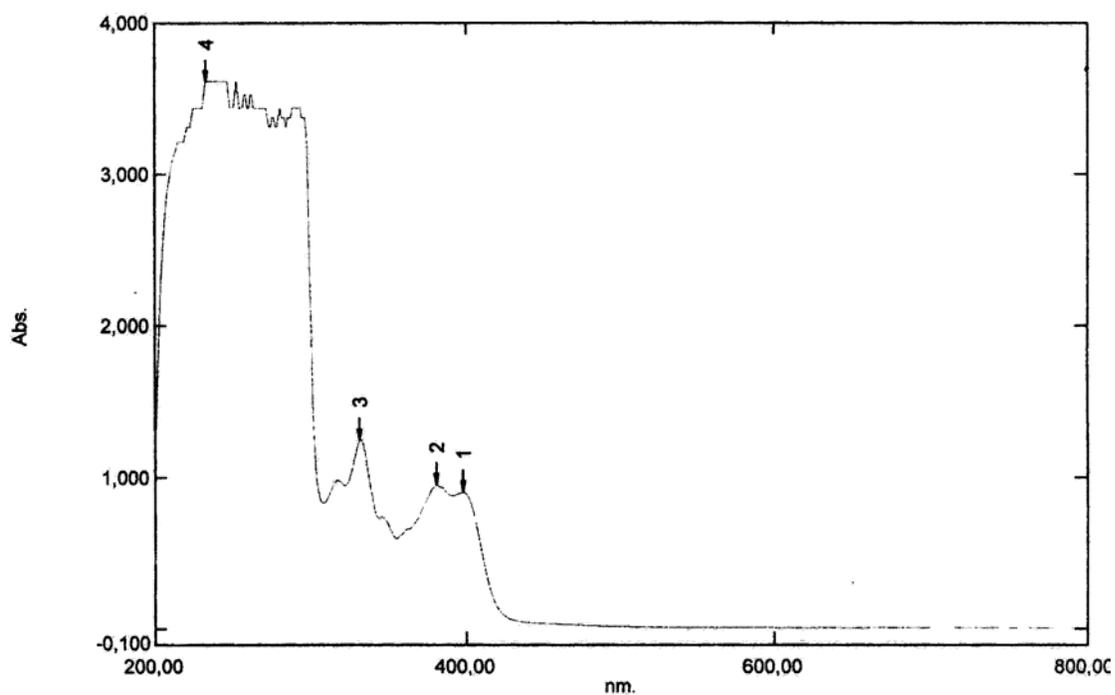


**Legenda:** perfil cromatográfico em CCDC (A) e aparência dos cristais (B)

**Figura 25.** Detalhes da cromatografia e dos cristais do alcalóide 1(elipticina).

#### 4.4.1.1 Análise dos espectros de IV e UV do alcalóide 1 (Elipticina)

No UV (Figura 26) observaram-se absorções em comprimentos de onda de 233, 332, 381 e 398 nm. Na Tabela 15 tem-se a comparação desses dados com os encontrados na literatura para a elipticina.



**Figura 26 .** Espectro de UV na faixa de 200 a 800 nm do alcalóide 1 (elipticina) em  $\text{CHCl}_3$ : MeOH (1:1).

**Tabela 15.** Comparação dos dados de UV do alcalóide 1 e da elipticina descrito na literatura.

<b>Alcalóide 1</b>	<b>Literatura*</b>
$\lambda_{\text{máx}}$ nm	$\lambda_{\text{máx}}$ nm
233	234
332	322
381	384
398	401

\*Fonte: Godwin *et al.*, 1958.

A análise do espectro de IV (Figura 27) mostrou a presença de uma banda de absorção larga na região de  $3429 \text{ cm}^{-1}$ , atribuída à vibração de deformação axial de heteroátomos que contêm grupo N–H. Observaram-se bandas de absorção em  $2922$  e  $2843 \text{ cm}^{-1}$  referente à deformação axial de C–H de metila. Na região de  $1636 \text{ cm}^{-1}$  observou-se uma banda de absorção atribuída a deformação axial da ligação C=C do anel aromático. Absorções fracas na região entre  $1015$  e  $1054 \text{ cm}^{-1}$  referem-se as bandas de deformação angular no plano de C–H de hidrocarbonetos aromáticos (Silverstein e Webster, 2000).

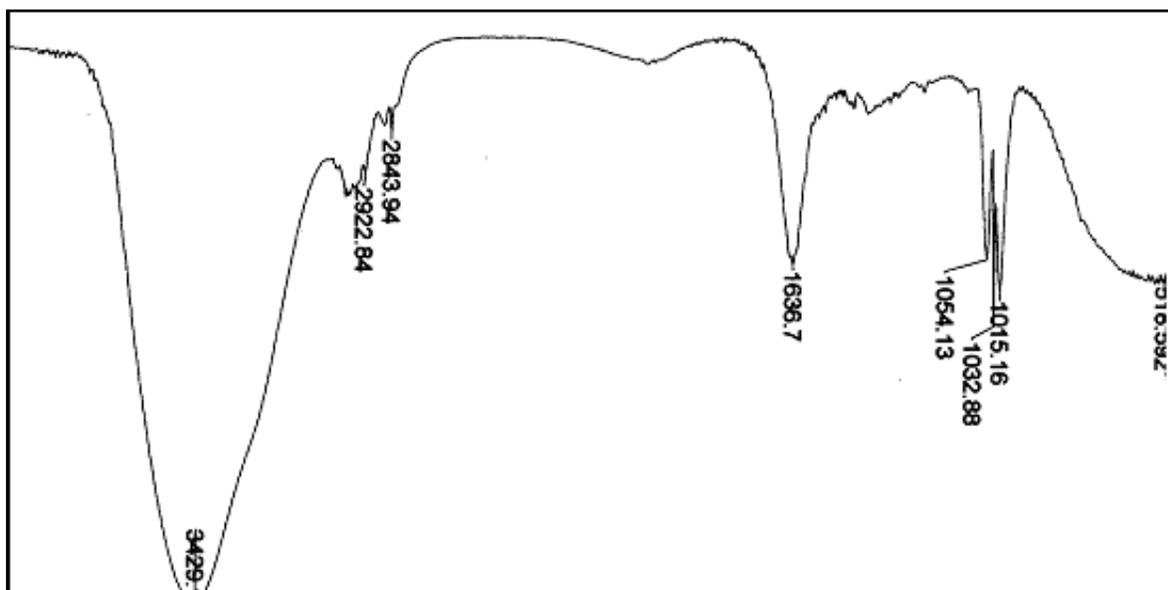
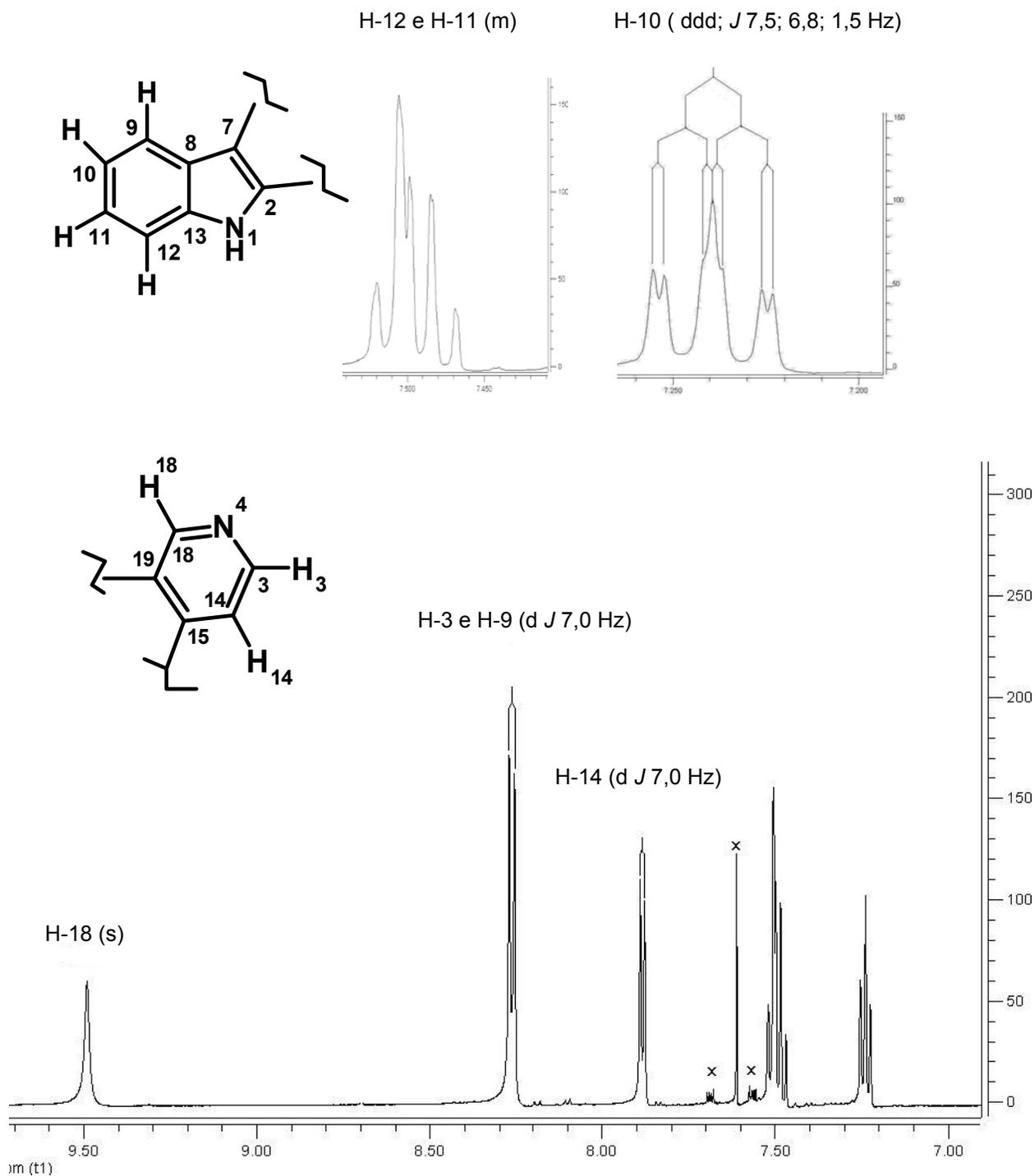


Figura 27. Espectro de IV do alcalóide 1 (elíptica) em pastilha de KBr.

#### 4.4.1.2 Análise dos espectros de RMN do alcalóide 1 (elipticina).

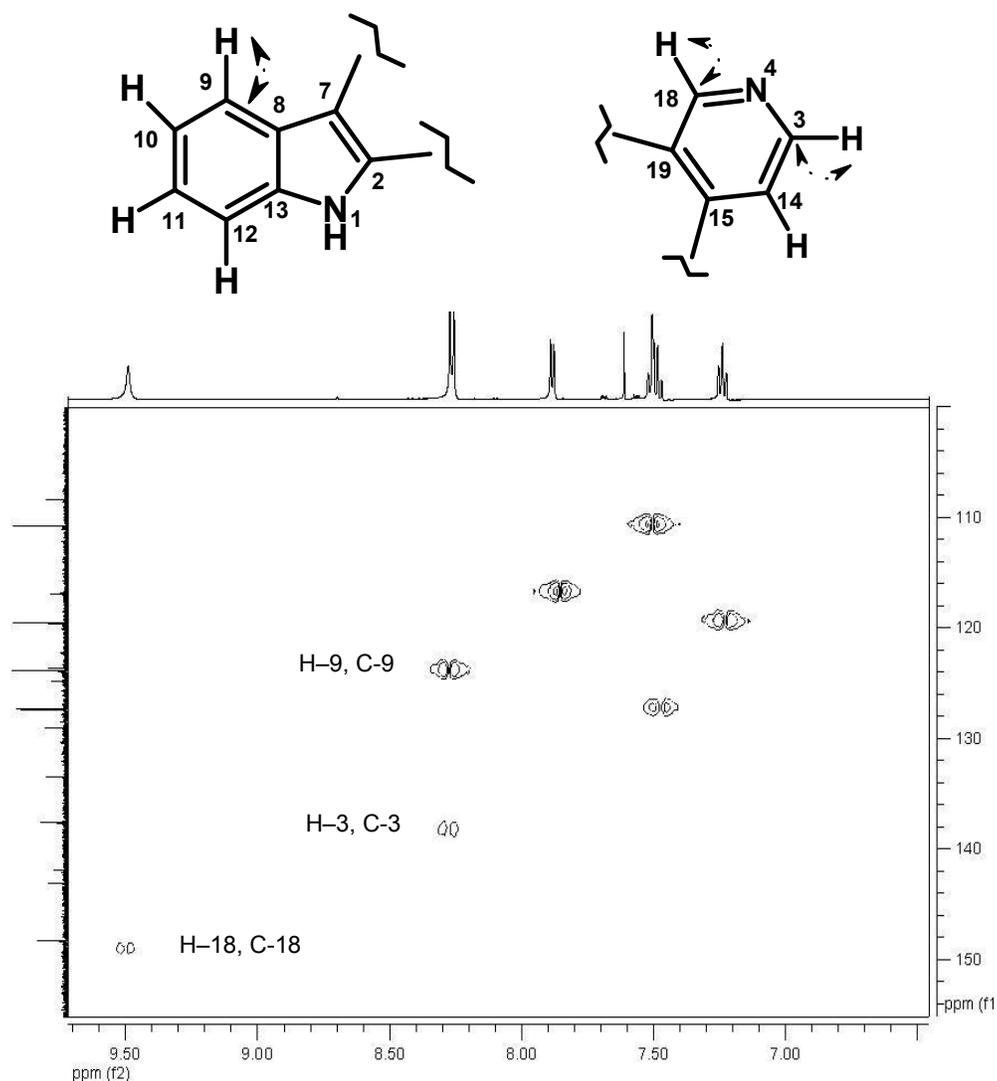
No espectro integral de RMN de  $^1\text{H}$ , em campo mais baixo, observou-se à presença de sete sinais de hidrogênios referentes ao núcleo indólico e piridínico do esqueleto da elipticina (Anexo 1, Tabela 16). O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT (Anexo 2 e 3, Tabela 17) revelaram a presença de 17 sinais de carbono, onde em campo mais baixo, observaram-se sete sinais referentes a carbonos metínicos (aromáticos) e em campo mais alto, dois sinais referentes a carbonos metílicos. Pela análise do espectro de HSQC, atribuiu-se os sinais dos hidrogênios aos sinais de carbonos correspondentes. (Anexo 4, Tabela 19).

Na ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 28) da região  $\delta$  7,2 a 9,4 observaram-se os sinais: um singlete em  $\delta$  9,49 com integração equivalente a um hidrogênio atribuído ao H-18 do núcleo piridínico, um dubleto ( $J$  7,0 Hz) com integração equivalente a dois hidrogênios centralizado em  $\delta$  8,26 atribuídos ao hidrogênio H-3 do núcleo piridínico e ao hidrogênio H-9 do núcleo indol, um dubleto em  $\delta$  7,88 referente ao hidrogênio H-14 ( $J$  7,0 Hz) do núcleo piridínico, um multiplete em  $\delta$  7,49-7,52 com integração equivalente a dois hidrogênios referentes aos hidrogênios H-11 e H-12 e um duplo duplo dubleto centralizado em  $\delta$  7,24 que foi atribuído ao hidrogênio H -10 ( $J$  7,5; 6,8; 1,5) do núcleo indólico.



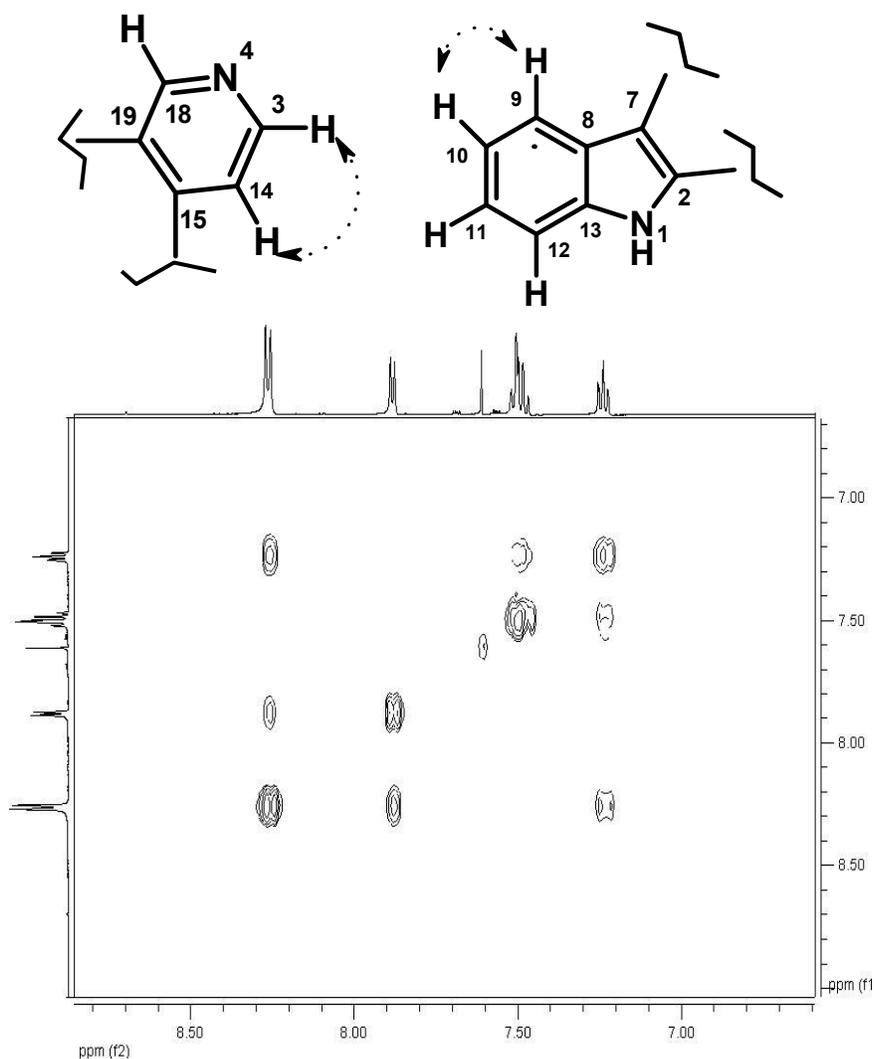
**Figura 28.** Ampliação da faixa de  $\delta$  7,2 a 9,5 do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do alcalóide 1 (elipticina).

Analisando a ampliação do espectro de HSQC (Figura 29) observaram-se as principais correlações entre  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$   $^1J$ : o sinal do hidrogênio em  $\delta$  8,26 (H-9) com o sinal do carbono em  $\delta$  123,8 (C-9), entre o sinal do hidrogênio em  $\delta$  8,26 (H-3) com o sinal do carbono em  $\delta$  137,6 (C-3) e entre o sinal do hidrogênio em  $\delta$  9,49 (H-18) e o sinal do carbono em  $\delta$  148,3 (C-18).



**Figura 29.** Ampliação da região aromática do espectro de HSQC do alcalóide 1 (elipticina) e algumas correlações.

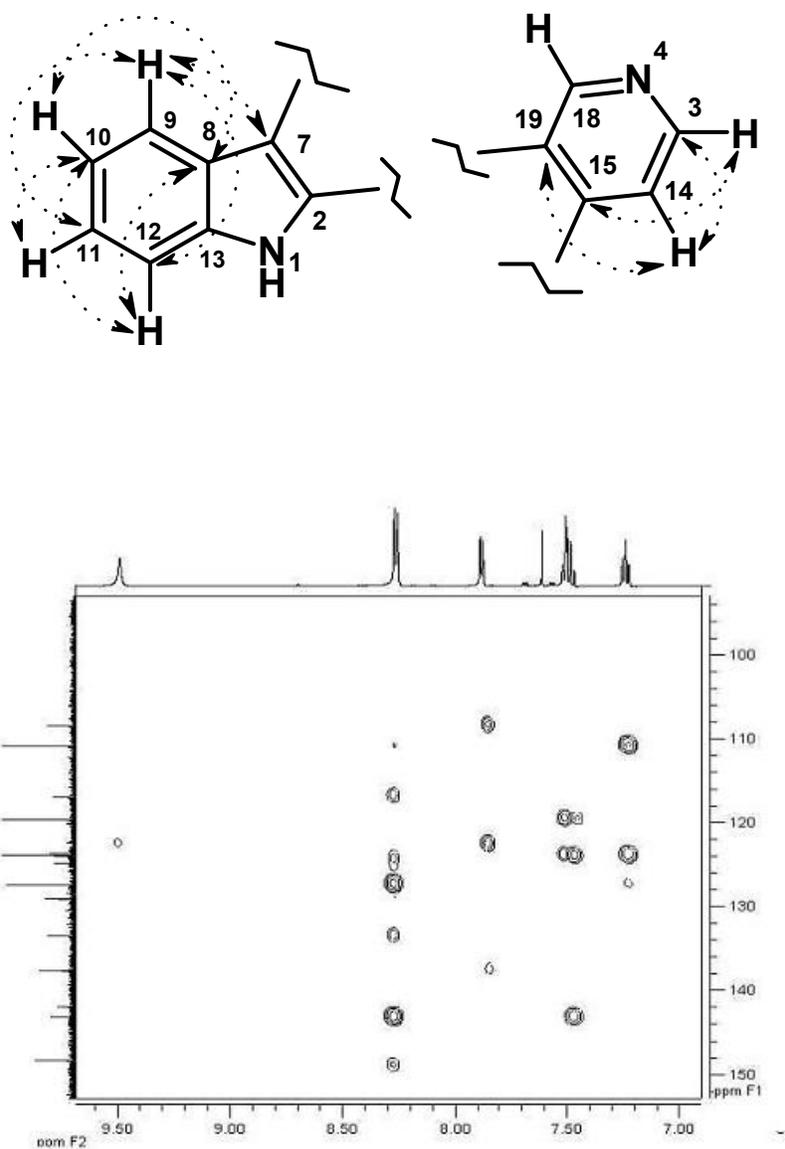
Observou-se na ampliação de  $\delta$  7,0 a 8,5 (Figura 30 e na Tabela 18) do espectro de  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (correlação dos hidrogênios acoplados) as principais correlações: em *orto* entre o H-10 ( $\delta$  7,24) com H-9 ( $\delta$  8,26) e entre o H-14 ( $\delta$  7,88) e H-3 ( $\delta$  8,26).



**Figura 30.** Ampliação da região aromática do espectro de COSY e algumas correlações do alcalóide 1 (elipticina).

No espectro integral (Anexo 6) e na ampliação do espectro de HMBC (Figura 31 e na Tabela 19) observaram-se as seguintes correlações  $^3J$  : o sinal do carbono em  $\delta$  124,8 (C-7) do anel pirrol com o sinal do hidrogênio em  $\delta$  8,26 (H-9) do anel aromático do núcleo indólico, entre o sinal do carbono em  $\delta$  123,6 (C-8) e os sinais dos hidrogênios em  $\delta$  7,24 (H-10) e o sinal em  $\delta$  7,49-7,52 (H-12). Observaram-se também as seguintes correlações: entre o sinal do carbono em  $\delta$  119,5 (C-10) em  $^2J$  com o sinal do hidrogênio em  $\delta$  7,49-7,52 (H-11) e em  $^3J$  com o sinal do hidrogênio em  $\delta$  7,49-7,52 (H-12), o sinal do carbono em  $\delta$  127,3 (C-11) com o sinal do hidrogênio em  $\delta$  8,26 (H-9), o sinal do carbono em  $\delta$  110,7 (C-12) com o sinal do hidrogênio em  $\delta$  8,26 (H-9).

Ainda na ampliação do espectro de HMBC (Figura 31), referente ao núcleo piridínico observaram-se as seguintes correlações: entre o sinal do carbono em  $\delta$  133,4 (C-15) com o sinal do hidrogênio em  $\delta$  8,26 (H-3), entre o sinal do carbono em  $\delta$  122,2 (C-19) com o sinal do hidrogênio em  $\delta$  7,88 (H-14) e entre o sinal do carbono em  $\delta$  137,6 (C-3) com o sinal do hidrogênio em  $\delta$  7,88 (H-14).

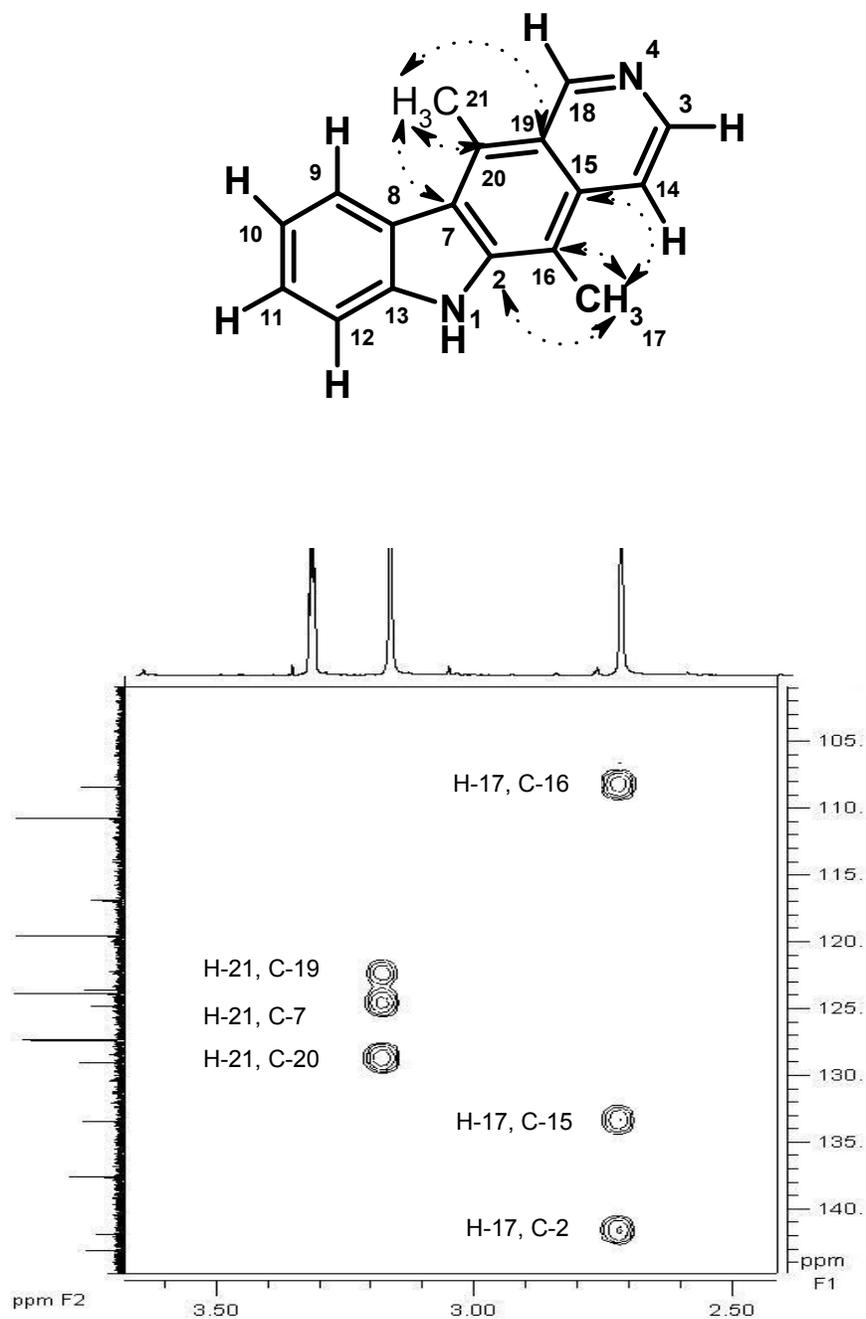


**Figura 31.** Ampliação da região aromática do espectro de HMBC do alcalóide 1 (elipticina) e algumas correlações.

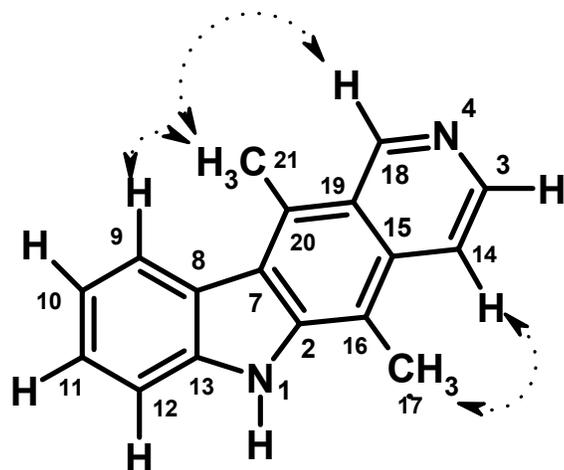
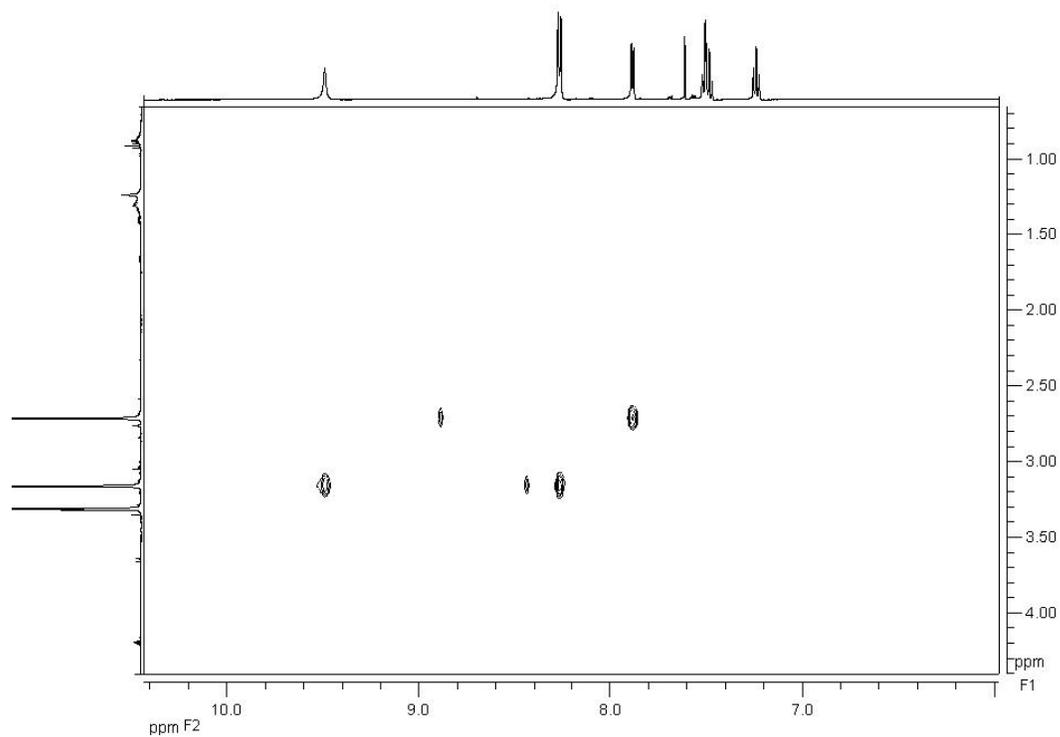
No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Anexo 1), verificou-se a presença de dois singletos, um em  $\delta$  3,16 e o outro em  $\delta$  2,71 (integrais equivalentes a 3 hidrogênios para cada sinal) atribuídos aos de hidrogênios H-21 e H-17, respectivamente, que correspondem as duas metilas da elipticina. Na análise dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Anexo 2) e DEPT (Anexo 3) observaram-se que os carbonos C-21 ( $\delta$  14,1) e C-17 ( $\delta$  11,2) correspondiam a carbonos metílicos. Observou-se pelo espectro de HSQC (Anexo 4) que o sinal do hidrogênio em  $\delta$  3,16 (H-21) correlacionava-se diretamente com o sinal do carbono em  $\delta$  14,1 (C-21) e o sinal do hidrogênio em  $\delta$  2,71 (H-17) com o sinal do carbono em  $\delta$  11,2 (C-17).

Analisando a ampliação do espectro de HMBC (Figura 32) podemos destacar as seguintes correlações  $^3J$  e  $^2J$  entre os hidrogênios da metila H-21 ( $\delta$  3,16) com o carbono C-19 ( $\delta$  122,2), com o carbono C-7 ( $\delta$  124,8) e com o carbono C-20 ( $\delta$  129,0). Também observaram-se correlações  $^3J$  e  $^2J$  para os hidrogênios H-17 ( $\delta$  2,71) da metila com o carbono C-2 ( $\delta$  141,9) do núcleo indol, também com o carbono C-15 ( $\delta$  133,4) do núcleo piridínico e com o carbono C-16 ( $\delta$  108,4).

Pela ampliação do espectro de NOESY (Figura 33) verificaram-se as seguintes interações: entre os hidrogênios H-21 ( $\delta$  3,16) e o hidrogênio H-9 ( $\delta$  8,26) e também com o hidrogênio H-18 ( $\delta$  9,49) e a interação entre os hidrogênios H-17 ( $\delta$  2,71) com o hidrogênio H-14 ( $\delta$  7,88).



**Figura 32.** Ampliação da região referente as metilas do espectro de HMBC do alcalóide 1 (elipticina) e algumas correlações.



**Figura 33.** Ampliação espectro de NOESY do alcalóide 1 (elipticina) e atribuições de algumas correlações.

**Tabela 16.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  do alcalóide 1 (elipticina) e para a elipticina da Literatura.

N° H	Alcalóide 1 (elipticina) ( $\text{CDCl}_3$ : $\text{CD}_3\text{OD}$ 500 MHz)			M. Ishikura <i>et al.</i> , 2000. ( $\text{CD}_3\text{OD}$ 400 MHz) elipticina ( <b>68</b> )		
	$\delta$ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	$\delta$ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)
3	8,26	1H, d	7,0	8,35	1H,d	7,8
9	8,26	1H,d	7,0	8,32	1H,d	6
10	7,24	1H, ddd	7,5; 6,8; 1,5	7,26	1H, ddd	8,3; 6,9; 1,5
11	7,49-7,52	1H,m	-	7,45-7,56	1H,m	-
12	7,49-7,52	1H,m	-	7,45-7,56	1H,m	-
14	7,88	1H,d	7,0	7,96	1H, dd	6,0; 1,0
17	2,71	3H,s	-	2,79	3H,s	-
18	9,49	1H,s	-	9,57	1H,s	-
21	3,16	3H,s	-	3,25	3H,s	-

**Tabela 17.** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT do alcalóide 1 (elipticina) e da literatura para elipticina.

Nº C	Alcalóide1 (elipticina) ( $\text{CDCl}_3$ : $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz)		(Ahond <i>et al.</i> , 1978) elipticina ( $d_6$ -DMSO, 15,08MHz)	
	$\delta$ (ppm)	Multiplicidade	$\delta$ (ppm)	Multiplicidade
2	141,9	C	140,4	C
3	137,6	CH	140,9	CH
7	124,8	C	121,9	C
8	123,6	C	123,3	C
9	123,8	CH	123,6	CH
10	119,5	CH	119,1	CH
11	127,3	CH	127,0	CH
12	110,7	CH	110,5	CH
13	143,1	C	142,6	C
14	116,9	CH	115,8	CH
15	133,4	C	132,3	C
16	108,4	C	107,9	C
17	11,2	$\text{CH}_3$	11,8	$\text{CH}_3$
18	148,3	CH	152,9	CH
19	122,2	C	123,3	C
20	129,0	C	123,0	C
21	14,1	$\text{CH}_3$	14,2	$\text{CH}_3$

**Tabela 18.** Correlações observadas no espectro de COSY e NOESY do alcalóide 1 (elipticina).

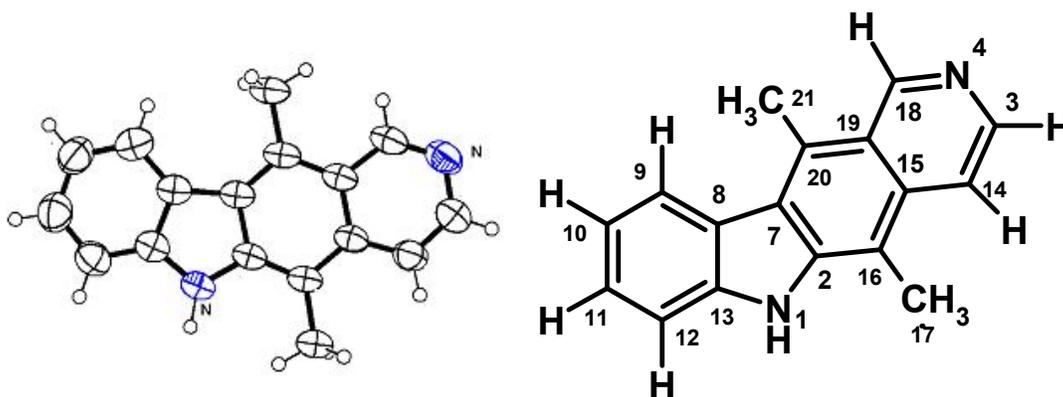
Nº H	$\delta$ (ppm)	<sup>3</sup> J	Interação no espaço <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H
		COSY	NOESY
3	8,26		
9	8,26		
10	7,24	8,26(H-9); 7,49-7,52(H11)	8,26(H-9); 7,49-7,52(H11)
11	7,49-7,52		
12	7,49-7,52		
14	7,88	8,26(H-3)	8,26(H-3)
17	2,71		7,88 (H-14)
18	9,49		
21	3,16	-	(H-18) 9,49; 8,26 (H-9);

**Tabela 19.** Correlações observadas no espectro de HSQC e HMBC do alcalóide 1 (elipticina).

Nº H	$\delta$ (ppm)	HSQC	HMBC
		<sup>1</sup> J, $\delta$ (H,C)	<sup>2</sup> J, <sup>3</sup> J ou <sup>4</sup> J, $\delta$ (H,C)
3	8,26	137,6 (C-3)	116,9 (C-14); 148,3 (C-18); 133,4 (C-15);
9	8,26	123,8 (C-9)	124,8 (C-7); 127,3 (C-11); 143,1 (C-13); 110,7 (C-12)
10	7,24	119,5 (C-10)	110,7 (C-12); 123,6 (C-8); 127,3 (C-11)
11	7,49-7,52	127,3 (C-11)	119,5 (C-10); 123,8 (C-9); 143,1(C-13)
12	7,49-7,52	110,7 (C-12)	-
14	7,88	116,9 (C-14)	122,2 (C-19); 108,4 (C-16); 137,6 (C-3)
17	2,71	11,2 (C-17)	141,9 (C-2); 133,4 (C-15); 108,4 (C-16)
18	9,49	148,3 (C-18)	122,2 (C-19)
21	3,16	14,1 (C-21)	124,8 (C-7); 129,0 (C-20); 122,2 (C-19)

#### 4.4.1.3 Análise de cristalografia de monocristais de raios-X do alcalóide 1 (elipticina).

A análise de cristalografia de monocristais, confirmou a identidade do alcalóide 1 como elipticina (Tabela 20 e Figura 34).



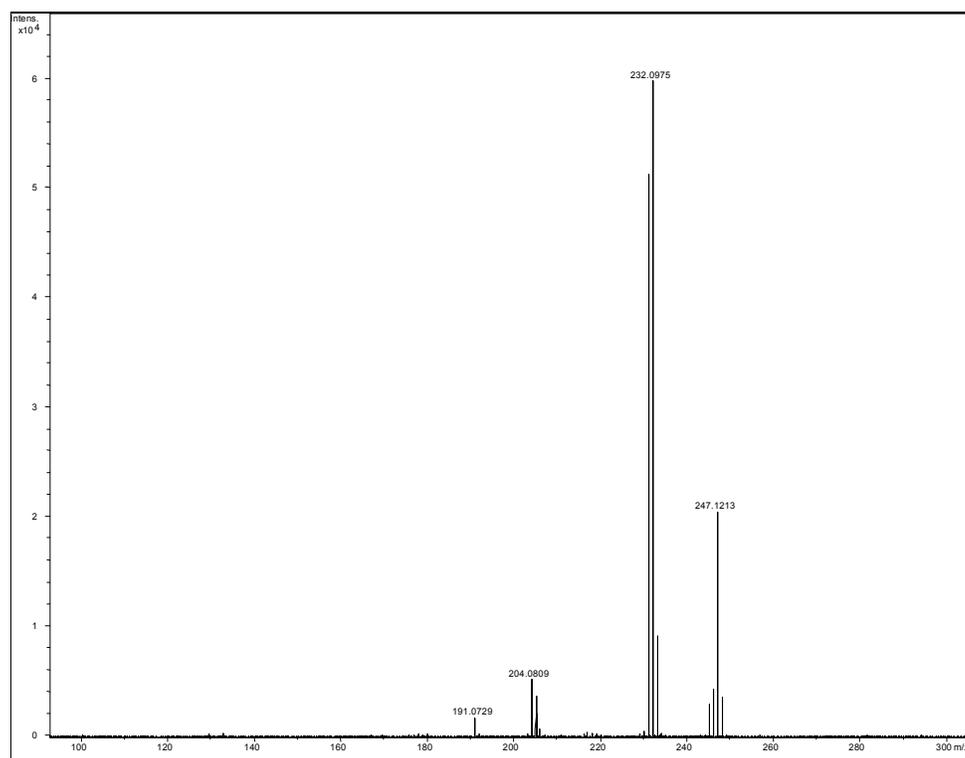
**Figura 34.** Representações ORTEP e esquemática do alcalóide 1 e com os átomos identificados.

**Tabela 20.** Dados de análise de cristalografia para determinação da elipticina.

<b>Fórmula</b>	<b>C<sub>17</sub> H<sub>14</sub> N<sub>2</sub></b>
massa molecular	246,30
sistema cristalino	monoclínico

#### 4.4.1.4 Análise do espectro de massas do alcalóide 1 (elipticina).

O espectro de massa por *electrospray* de alta resolução (HR-ESI-MS) possibilitou a determinação da fórmula molecular do alcalóide 1 em  $C_{17}H_{14}N_2$  (achado  $m/z$  247,1213  $[M+H]^+$ , calculado  $m/z$  247,1260). O pico base consistente com a fórmula molécula  $C_{16}H_{11}N_2$  (achado  $m/z$  232,0975  $[M+H]^+$ , calculado  $m/z$  232,0960) resultante da perda do grupo metila (Figura 35).

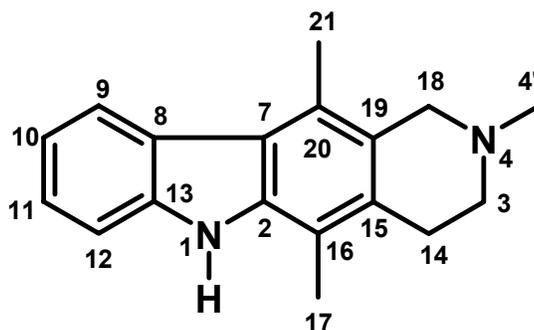


**Figura 35.** Espectro de massas por *electrospray* de alta resolução do alcalóide 1 (elipticina).

#### 4.4.2 Identificação estrutural do alcalóide 2 (8A3.4.1).

O alcalóide 2 caracterizou-se como um sólido amorfo de coloração amarelo claro com ponto de fusão 208-10 °C e está de acordo com os dados relatados por de Burnell e Casa (1967).

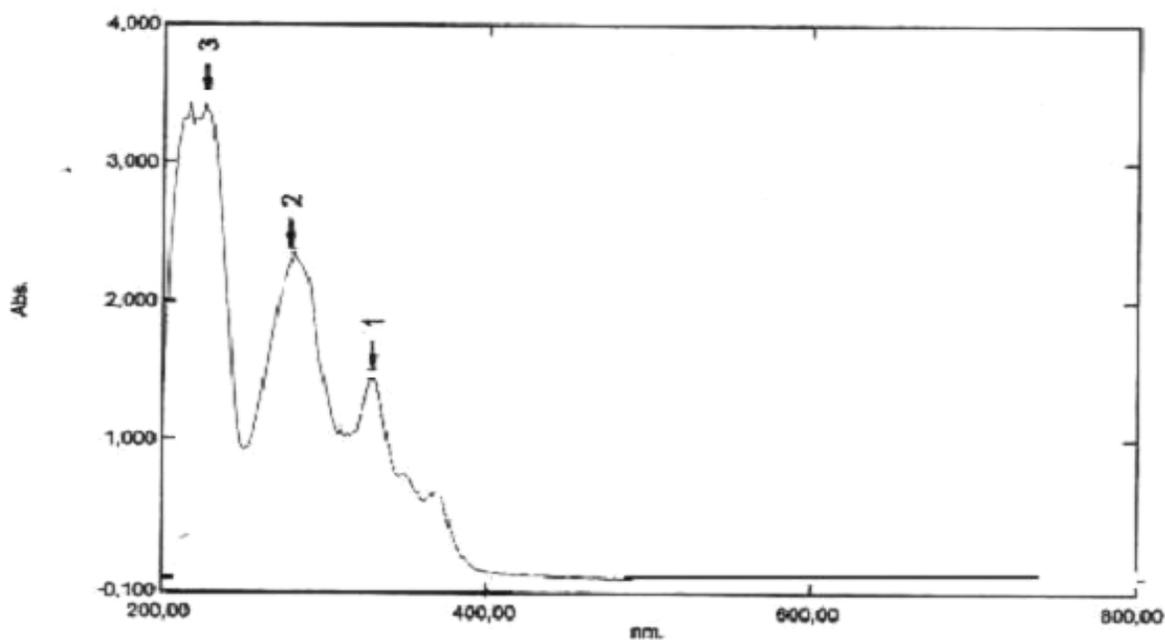
A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , RMN de  $^{13}\text{C}$ , os bidimensionais HSQC, COSY, HMBC e NOESY (Tabelas 22, 23, 24 e 25), o espectro de massa de alta resolução por *eletrospray*, IV e UV, juntamente em comparação com os dados da literatura (Azoug *et al.*, 1995; Ishikura *et al.*, 2000) levaram à identificação do alcalóide 2 como N-metiltetraidroelipticina (Figura 36).



**Figura 36.** Estrutura e sistema de numeração do alcalóide 2 (N-metiltetraidroelipticina)

#### 4.4.2.1 Análise dos espectros de IV e UV do alcalóide 2 (*N*-metiltetraidroelipticina)

Analisando-se o espectro de UV (Figura 37) observaram-se máximos de absorção com comprimentos de onda de 235, 255 e 348 nm. Esses dados estão descritos na Tabela 21 juntamente com os dados encontrados na literatura para a *N*-metiltetraidroelipticina.



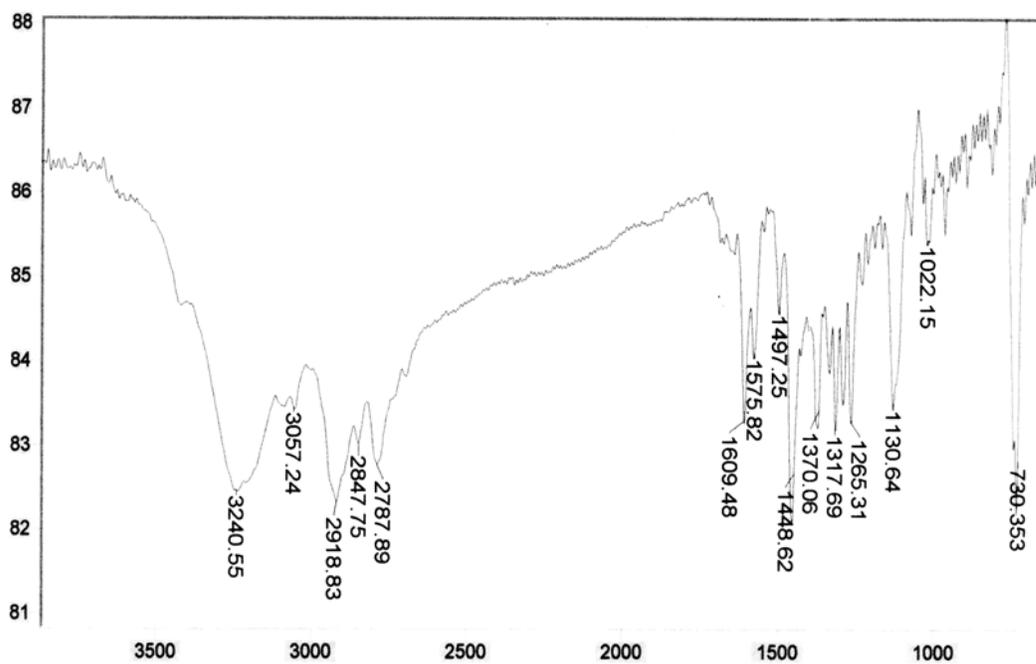
**Figura 37.** Espectro de UV na faixa de 200 a 800 nm do alcalóide 2 (*N*-metiltetraidroelipticina) em  $\text{CHCl}_3$ : MeOH (7:3).

**Tabela 21.** Comparação dos dados de UV do alcalóide 2 e da N-metiltetraidroelipticina da literatura.

Alcalóide 2 $\lambda_{\text{máx}}$ nm	Literatura* $\lambda_{\text{máx}}$ nm
235	239
255	260
348	330

\* Fonte: Burnell e Casa, 1967.

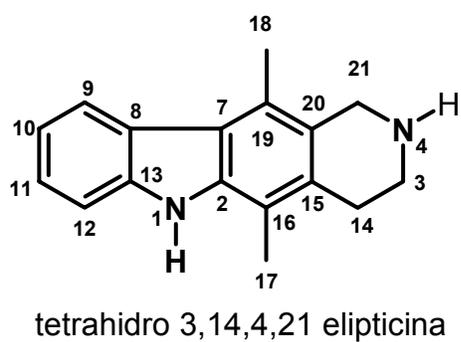
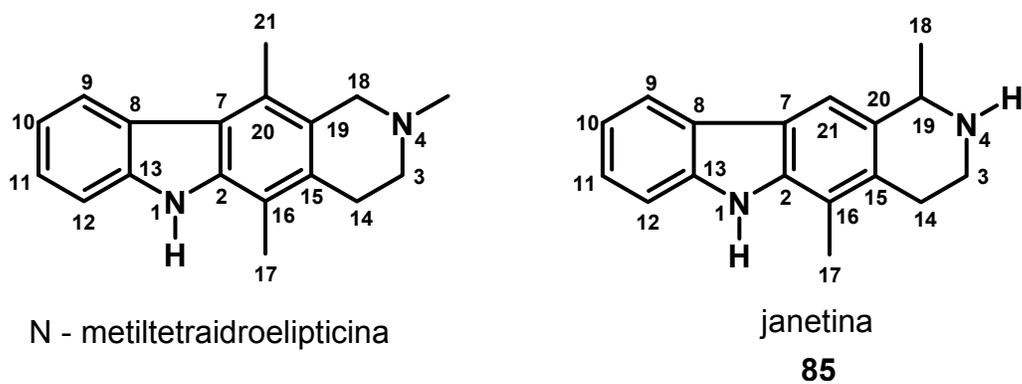
O espectro de IV (Figura 38) apresentou uma banda de absorção larga na região de  $3240 \text{ cm}^{-1}$ , atribuída à vibração de deformação axial de heteroátomos que contém grupo N–H. Observam-se também uma banda de absorção em 3057, atribuída a deformação axial de C–H de aromáticos e bandas de absorção 2918 e  $2847 \text{ cm}^{-1}$  referentes à deformação axial de C–H de metila. Na região de  $1609 \text{ cm}^{-1}$  observou-se uma banda de absorção atribuída à deformação axial da ligação C=C do anel aromático. Absorções fracas na região entre  $1370$  e  $1022 \text{ cm}^{-1}$  foram atribuídas a bandas de deformação angular no plano de C–H de hidrocarbonetos aromáticos (Silverstein e Webster, 2000).



**Figura 38.** Espectro de IV do alcalóide 2 (N- metiltetraidroelipticina) em pastilhas de KBr.

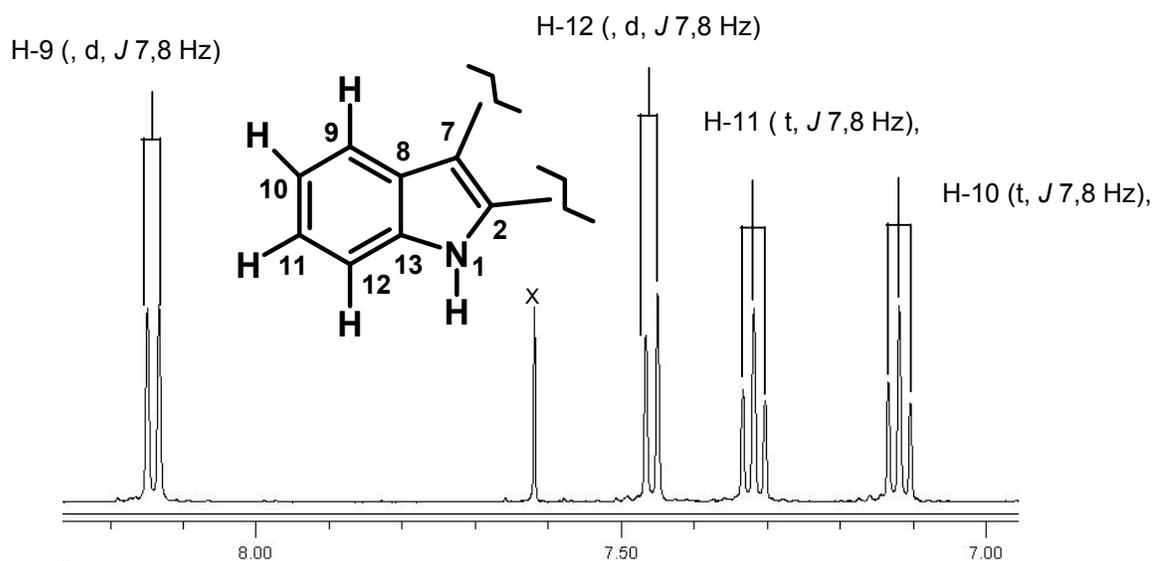
#### 4.4.2.2 *Análise dos espectros de RMN do alcalóide 2 (N-metiltetrahydroelipticina)*

Nas Tabelas 22 e 23 estão apresentados os dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de RMN de  $^{13}\text{C}$  obtidos para o alcalóide 2 e os dados utilizados como modelos para comparação, que foram os alcalóides janetina e tetrahydro-3, 14, 4, 21-elipticina (Figura 39). As comparações dos deslocamentos, integrações e multiplicidades permitiram sugerir que o alcalóide 2 (**8A3.4.1**) é o alcalóide N-metiltetrahydroelipticina (Figura 36). Vale a pena ressaltar que algumas diferenças nos deslocamentos químicos relatados por Burnell e Casa (1967), Azoug *et al.* (1995) e Ishikura *et al.* (2000) podem ser explicadas pelo uso de solventes diferentes nesses trabalhos.

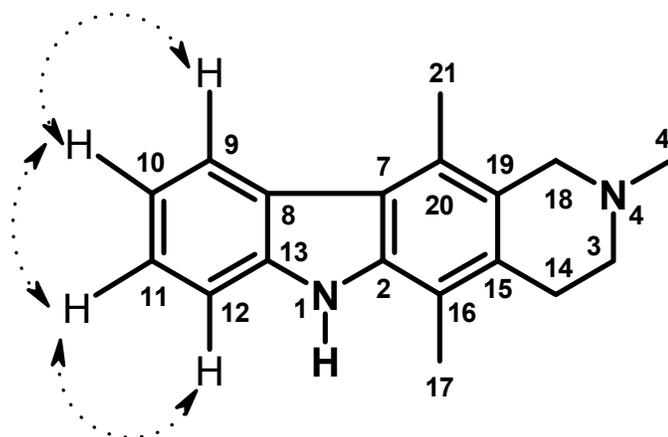
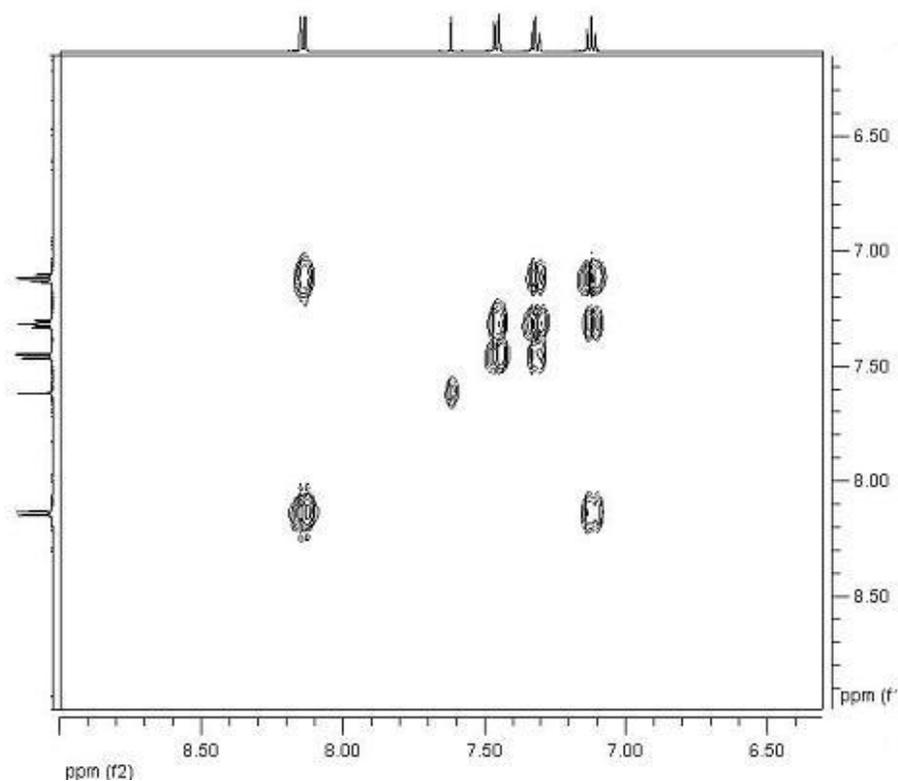


**Figura 39.** Estrutura do alcalóide N-metiltetrahydroelipticina e as estruturas modelos de comparação para análises de dados de RMN.

Na faixa entre  $\delta$  7,0 e 8,5 do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 40), observou-se quatro sinais referentes aos hidrogênios aromáticos H-9 ( $\delta$  8,17, dubleto,  $J$  7,8 Hz), H-10 ( $\delta$  7,08, tripleto,  $J$  7,8 Hz), H-11 ( $\delta$  7,30, tripleto,  $J$  7,8 Hz) e H-12 ( $\delta$  7,42, dubleto,  $J$  7,8 Hz), os quais pelo espectro de HSQC (Anexo 11) foram correlacionados aos carbonos C-9 ( $\delta$  122,3), C-10 ( $\delta$  118,4), C-11 ( $\delta$  124,6) e C-12 ( $\delta$  110,6), respectivamente. Pela análise da ampliação do espectro de COSY (Figura 41), observaram-se as principais correlações  $^3J$ : entre o hidrogênio H-9 ( $\delta$  8,17) e o hidrogênio H-10 ( $\delta$  7,08), entre o hidrogênio H-12 ( $\delta$  7,42) e o hidrogênio H-11 ( $\delta$  7,30) e entre o hidrogênio H-10 ( $\delta$  7,08) e o hidrogênio H-11 ( $\delta$  7,30).

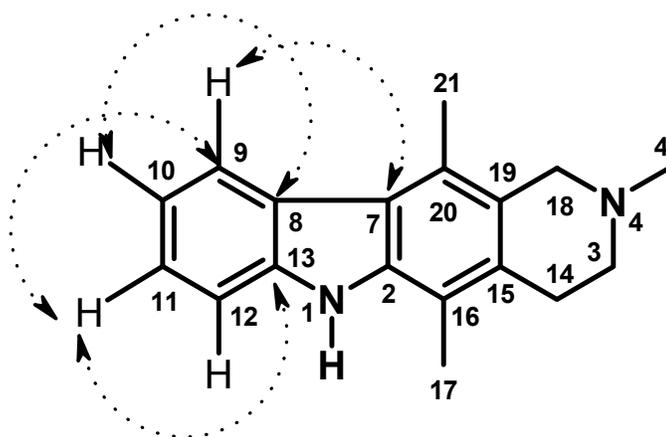
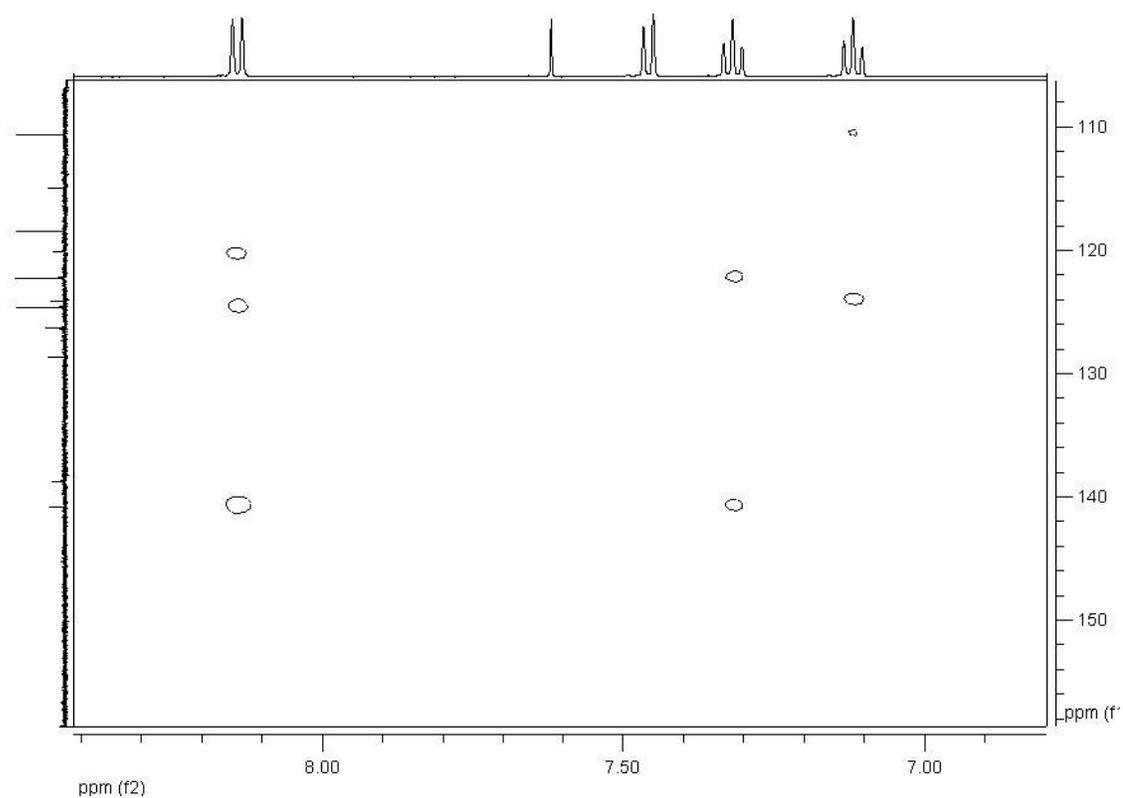


**Figura 40.** Ampliação da faixa de  $\delta$  7,0 a 8,5 do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do alcalóide 2 ( N-metiltetraidroelipticina).



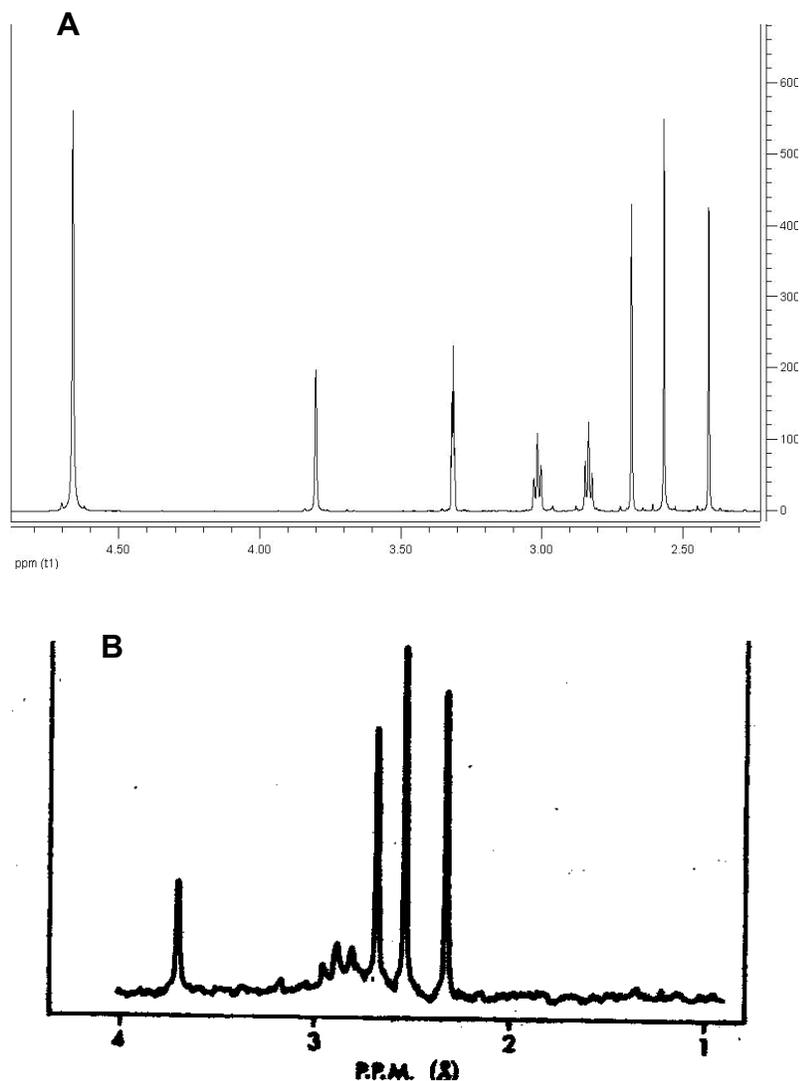
**Figura 41.** Região aromática do espectro de COSY e atribuição as correlações observadas para N-metiltetraidroelipticina.

Analisando a ampliação do espectro de HMBC (Figura 42), foi possível verificar as principais correlações  $^3J$ : entre o hidrogênio H-11 ( $\delta$  7,30) e os carbonos C-9 ( $\delta$  122,3) e C-13 ( $\delta$  140,8), entre o hidrogênio H-9 ( $\delta$  8,17) e o carbono C-7 ( $\delta$  120,1) e entre o hidrogênio H-10 ( $\delta$  7,08) e o carbono C-8 ( $\delta$  124,1).



**Figura 42.** Ampliação da região aromática do espectro de HMBC da correlações observadas para N-metiltetrahydroelipticina.

Ainda no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 43 A), observaram-se três singletos ( $\delta$  2,40, 2,59 e 2,70), com integração equivalente a três hidrogênios para cada sinal, referentes aos hidrogênios H-17, H-4' e H-21, respectivamente. Analisando o espectro de HSQC (Anexo 11) correlacionou-se diretamente o carbono C-17 ( $\delta$  12,1) com os hidrogênios H-17 ( $\delta$  2,40), o carbono C-4' ( $\delta$  45,4) com os hidrogênios H-4' ( $\delta$  2,59) e o carbono C-21 ( $\delta$  14,7) com os hidrogênios H-21 ( $\delta$  2,70). Observou-se no espectro de DEPT (Anexo 10) que os carbonos C-17, C-21 e C-4' correspondiam a carbonos metílicos. O alcalóide N-metiltetraidroelipticina (Alcalóide 2) já havia sido isolado anteriormente de *A. vargasii* em trabalho de Burnell e Casa (1967). Fez-se aqui uma comparação dos dados obtidos nesse trabalho com a literatura como é mostrado na Figura 43 A e B, observando-se assim uma similaridade entre os resultados. Vale ressaltar que nesse trabalho não foram descritos o solvente utilizado e as especificações do experimento de RMN de  $^1\text{H}$ .

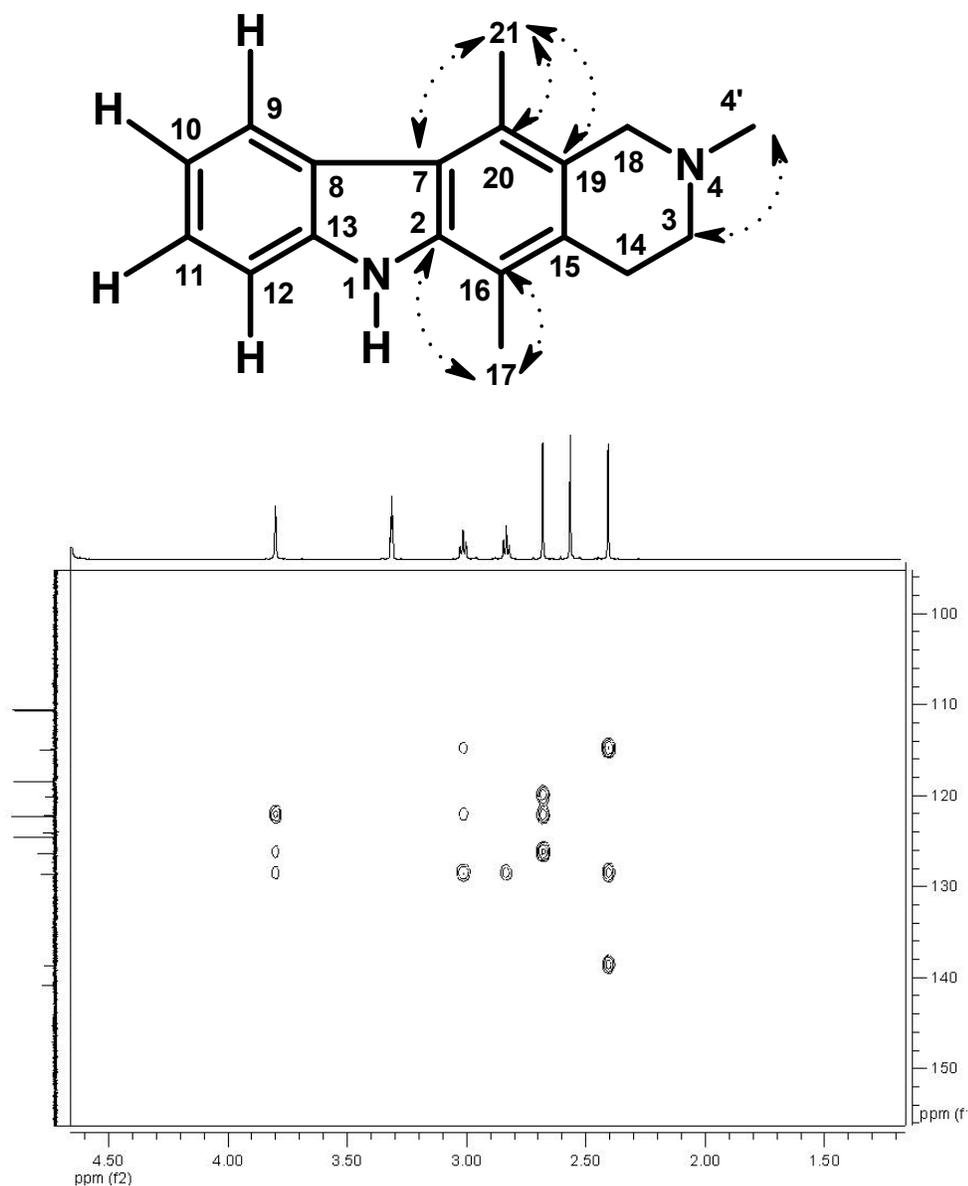


**Figura 43.** A Ampliação da região de campo alto do espectro de RMN de <sup>1</sup>H do alcalóide 2 (500 MHz, CHCl<sub>3</sub>:MeOH). B Ampliação de campo alto do espectro de RMN de <sup>1</sup>H da N-metiltetraidroelipticina segundo Burnell e Casa (1967).

Ainda no espectro de RMN de <sup>1</sup>H (Figura 43 A), em campo alto, observaram-se um tripleto ( $J$  6,5 Hz) em  $\delta$  2,82 (integral para dois hidrogênios),

referente ao hidrogênio H-3, tripleto ( $J$  6,5 Hz) em  $\delta$  3,04 (integral para dois hidrogênios), atribuído ao hidrogênio H-14 e um singlete em  $\delta$  3,79 (integral para dois hidrogênios) referente ao hidrogênio H-18. Pelo espectro de COSY (Anexo 12) observou-se a correlação entre o sinal do hidrogênio em  $\delta$  3,04 (H-14) com o sinal do hidrogênio em  $\delta$  2,82 (H-3). O espectro de HSQC (Anexo 11) mostrou a correlação direta entre o sinal do carbono em  $\delta$  52,5 (C-3) com o sinal dos hidrogênios em  $\delta$  2,82 (H-3), entre o sinal do carbono em  $\delta$  27,3 (C-14) e o sinal dos hidrogênios em  $\delta$  3,04 (H-14) e entre o sinal do carbono em  $\delta$  56,5 (C-18) e o sinal dos hidrogênios em  $\delta$  3,79 (H-18). Analisando o espectro de DEPT (Anexo 10), verificou-se que os carbonos C-3, C-14 e C-18 correspondiam a carbonos metilênicos.

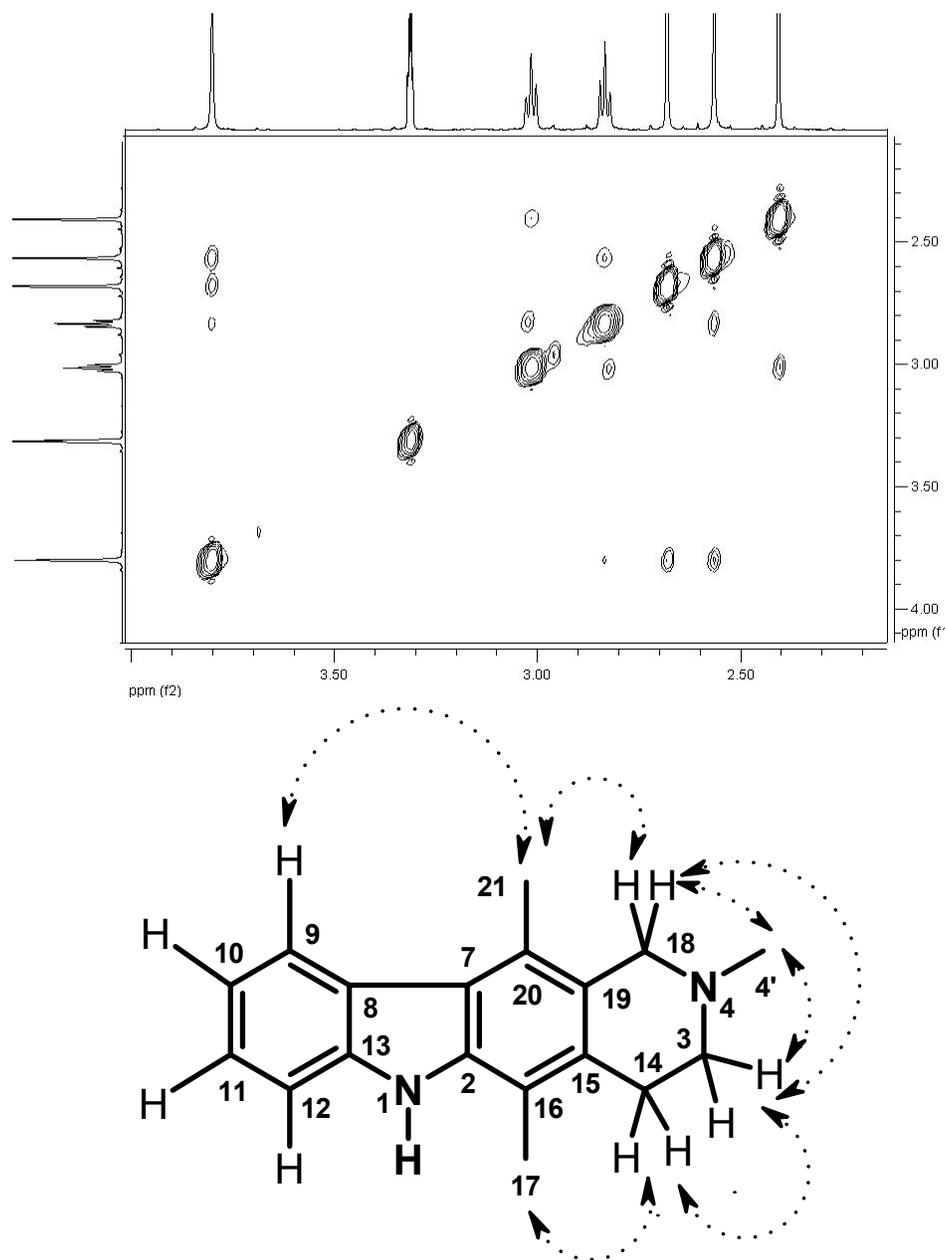
Pela análise do espectro HMBC (Anexo 13 e Figura 44) observaram-se as seguintes correlações: entre o sinal do carbono em  $\delta$  138,7 (C-2) do anel pirrol com o sinal dos hidrogênios em  $\delta$  2,40 (H-17), entre o sinal do carbono em  $\delta$  114,9 (C-16) com o sinal dos hidrogênios em  $\delta$  2,40 (H-17) e entre o sinal do carbono em  $\delta$  120,1 (C-7) com o sinal dos hidrogênios em  $\delta$  2,70 (H-21). Observaram-se também as correlações: entre o sinal do carbono em  $\delta$  122,2 (C-19) com o sinal dos hidrogênios em  $\delta$  2,70 (H-21), com o sinal dos hidrogênios em  $\delta$  3,04 (H-14) e com o sinal dos hidrogênios em  $\delta$  3,79 (H-18), entre o sinal do carbono em  $\delta$  126,3 (C-20) com o sinal dos hidrogênios em  $\delta$  2,70 (H-21) e entre o sinal do carbono em  $\delta$  52,5 (C-3) com o sinal dos hidrogênios em  $\delta$  2,59 (H-4'), metila substituinte do anel piperidínico.



**Figura 44.** Região de  $\delta$  100 a 150 espectro de HMBC da e  $\delta$  2,0 e 4,5 e algumas correlações da N-metiltetraidroelipticina.

Observando a ampliação espectro de NOESY (Figura 45 e Anexo 14) as seguintes interações no espaço foram observadas: o sinal dos hidrogênios em  $\delta$

2,59 (H-4') com os sinais dos hidrogênios em  $\delta$  2,82 e  $\delta$  3,79 (H-3 e H-18, respectivamente), entre o sinal dos hidrogênios em  $\delta$  3,04 (H-14) com o sinal dos hidrogênios em  $\delta$  2,82 e  $\delta$  2,40 (H-3 e H-17, respectivamente), entre o sinal dos hidrogênios em  $\delta$  3,79 (H-18) com o sinal dos hidrogênios em  $\delta$  2,70 (H-21), interações verificadas entre núcleos 1,4 dimetilbenzeno e piperidínico. Observou-se também a interação entre o sinal dos hidrogênios em  $\delta$  2,70 (H-21) e o sinal do hidrogênio em  $\delta$  8,17 (H-9) do anel aromático do núcleo indólico, interação essa que reforça a presença desta metila ligada ao carbono C-20 ( $\delta$  126,3).



**Figura 45.** Espectro de NOESY do alcalóide 2 (N-metiltetrahydroelipticina) e as correlações observadas.

**Tabela 22.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  do alcalóide 2 (N-metiltetraidroelipticina) e da literatura.

Nº H	Alcalóide 2 ( $\text{CDCl}_3$ : $\text{CD}_3\text{OD}$ 500 MHz)			M. Ishikura et al., 2000. ( $\text{CD}_3\text{OD}$ 400 MHz) tetrahydro 3,14,4,21 elipticina ( <b>86</b> )		
	$\delta$ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	$\delta$ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)
3	2,82	2H, t	6,5	2,88	2H, t	6,0
4'	2,59	3H, s	-	1,63	1H, s	-
9	8,17	1H, d	7,8	8,20	1H, d	7,8
10	7,08	1H, t	7,8	7,20	1H, t	7,8
11	7,30	1H, t	7,8	7,37	1H, t	7,8
12	7,42	1H, d	7,8	7,41	1H, d	7,8
14	3,04	2H, t	6,5	3,20	2H, t	6,0
17	2,40	3H, s	-	2,39	3H, s	-
18	3,79	2H, s	-	4,19	2H, s	-
21	2,70	3H, s	-	2,70	3H, s	-

**Tabela 23.** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  do Alcalóide 2 (N-metiltetraidroelipticina) em comparação com os dados da literatura para a janetina.

N° C	Alcalóide 2 (N-metiltetraidroelipticina) ( $\text{CDCl}_3$ : $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz)		M. Azoug <i>et al.</i> , 1995. ( $\text{CDCl}_3$ : $\text{CD}_3\text{OD}$ , 75 MHz) janetina ( <b>85</b> )	
	$\delta$ (ppm)	Multiplicidade	$\delta$ (ppm)	Multiplicidade
2	138,7	C	137,9	C
3	52,5	$\text{CH}_2$	41,9	$\text{CH}_2$
4'	45,4	$\text{CH}_3$	-	-
7	120,1	C	120,9	C
8	124,1	C	123,9	C
9	122,3	CH	120,0	CH
10	118,4	CH	119,1	CH
11	124,6	CH	125,3	CH
12	110,6	CH	110,5	CH
13	140,8	C	139,8	C
14	27,3	$\text{CH}_2$	28,0	$\text{CH}_2$
15	128,6	C	130,7	C
16	114,9	C	117,1	C
17	12,1	$\text{CH}_3$	12,9	$\text{CH}_3$
18	56,5	$\text{CH}_2$	23,5	$\text{CH}_3$
19	122,2	C	52,4	C
20	126,3	C	132,4	C
21	14,7	$\text{CH}_3$	114,7	CH

**Tabela 24.** Correlações observadas no espectro de COSY e NOESY do alcalóide 2 (N-metiltetraidroelipticina).

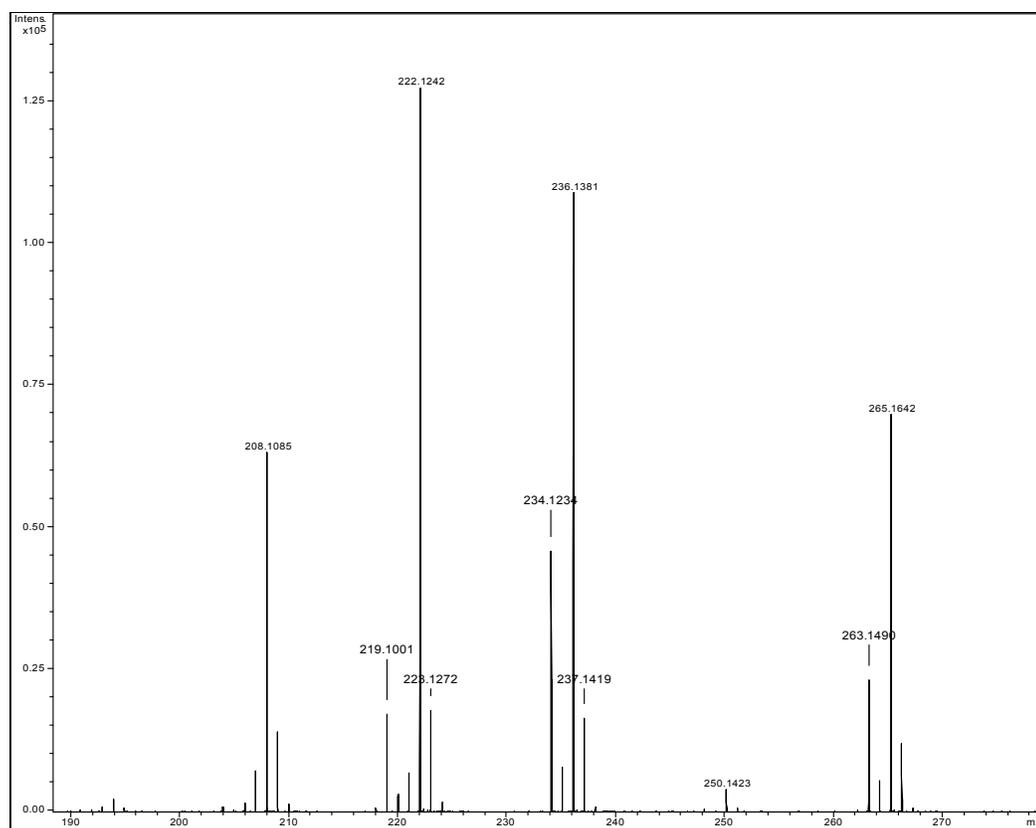
Nº H	$\delta$ (ppm)	Interação no espaço $^1\text{H}-^1\text{H}$	
		$^2J, ^3J$ ou $^4J$ <b>COSY</b>	<b>NOESY</b>
3	2,82		H-4' (2,59)
4'	2,59		
9	8,17		2,69 (H-21); 7,08 (H-10)
10	7,08	8,17 (H-9) ;7,30 (H-11)	
11	7,30	7,42 (H-12);	7,08 (H-10)
12	7,42		7,30 (H-11)
14	3,04	2,82 (H-3)	2,82 (H-3); 2,40 (H-17)
17	2,40		
18	3,79		2,59 (H-4'); 2,69 (H-21); 2,82 (H-3)
21	2,70		

**Tabela 25.** Correlações observadas no espectro de HSQC e HMBC do alcalóide 2 (N-metiltetraidroelipticina).

Nº H	$\delta$ (ppm)	HSQC	HMBC
		$^1J$	$^2J, ^3J$ ou $^4J$
3	2,82	52,5 (C-3)	114,9 (C-16); 56,5(C-18)
4'	2,59	45,4 (C-4')	56,5(C-18);52,5(C-3);
9	8,17	122,3 (C-9)	140,8(C-13); 124,6(C-11); 120,1(C-7)
10	7,08	118,8 (C-10)	110,6(C-12); 124,1(C-8)
11	7,30	124,6 (C-11)	140,8(C-13); 122,3 (C-9)
12	7,42	110,6 (C-12)	-
14	3,04	27,3 (C-14)	114,9 (C-16); 122,2(C-19); 128,6(C-15); 52,5 (C-3)
17	2,40	12,1 (C-17)	128,6 (C15); 114,9 (C-16); 138,7 (C-2)
18	3,79	56,5 (C-18)	122,2(C-19); 126,3(C-20); 114,9 (C-16); 52,5(C-3); 45,4(C-4')
21	2,70	14,7 (C-21)	122,2(C-19); 126,3(C-20);120,1(C-7)

#### 4.4.2.3 Análise do espectro de massas do alcalóide 2

A Figura 46 apresenta o espectro de massas por *electrospray* de alta resolução (HR-ESI-MS), no qual foi possível determinar a fórmula molecular do alcalóide 2 em  $C_{18}H_{20}N_2$  (achado  $m/z$  265,1642  $[M+H]^+$ , calculado para  $C_{18}H_{20}N_2$   $m/z$  265,1659). Alguns picos intensos que sustentam a estrutura do alcalóide 2 são  $m/z$  222,1242  $[H+C_{16}H_{15}N]^+$  (calculado  $m/z$  222,1280),  $m/z$  236,1381  $[H+C_{17}H_{17}N]^+$  (calculado  $m/z$  236,1360) e  $m/z$  234,1234  $[H+C_{16}H_{13}N_2]^+$  (calculado  $m/z$  234,1245).



**Figura 46** . Espectro de massas por *electrospray* de alta resolução do alcalóide 2 (N-metiltetrahydroelipticina).

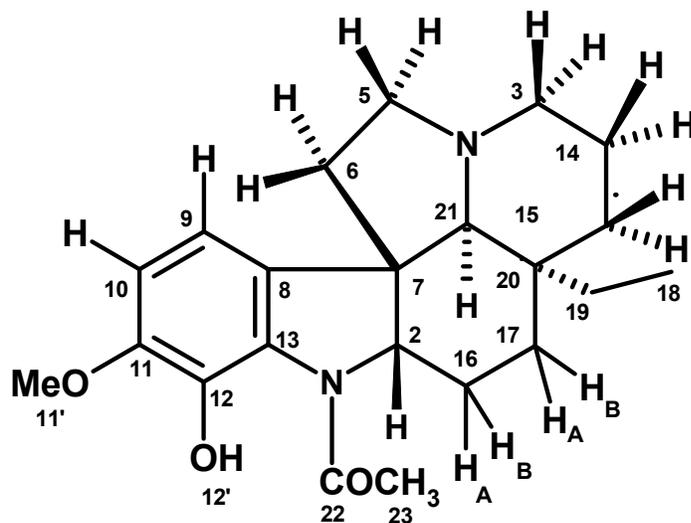
#### 4.4.2 Identificação estrutural do alcalóide 3 (aspidocarpina)



**Figura 47.** Detalhes em CCDC do alcalóide 3 (Aspidocarpina)

O alcalóide 3 (68,5 mg) codificado como **8D4.2**, e cujo isolamento foi descrito na seção 3.7.1.1, caracterizou-se como um sólido cristalino de coloração branca com ponto de fusão entre 169-171 °C. Em CCDC (Figura 47) apresentou R<sub>f</sub> de 0,71 no eluente clorofórmio:metanol (8:2) e revelou em reagente dragendorff e anisaldeído (coloração azul escura). Absorve também no UV, de baixo da lâmpada com comprimento de onda de 254 nm.

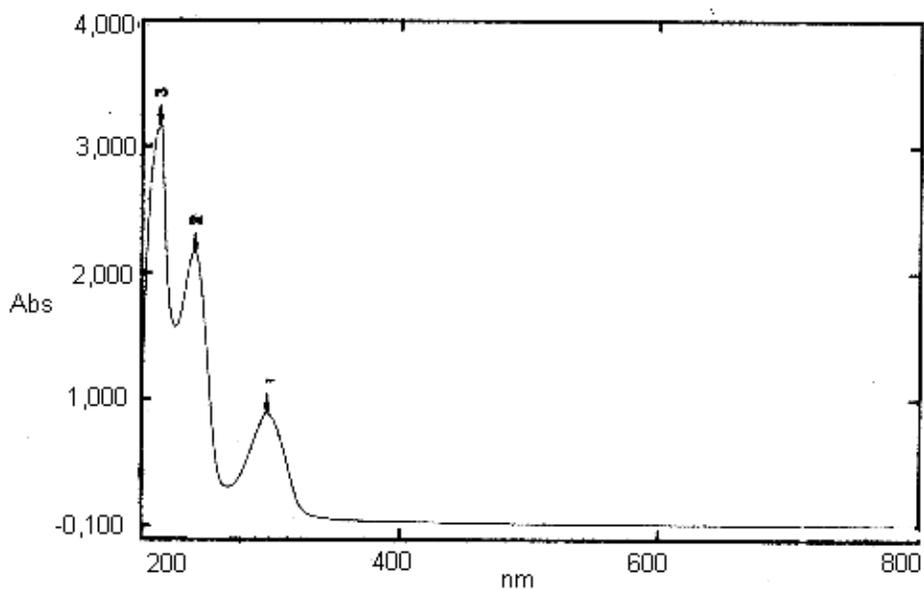
A análise de espectros de RMN de <sup>1</sup>H, RMN de <sup>13</sup>C, DEPT, HSQC, HMBC, NOESY, massas por electrospray de alta resolução (HR-ESI-MS), IV, UV, análise cristalográfica por difração de raios-x, bem como a comparação com dados da literatura, levou à identificação do alcalóide 3 (**8D4.2**, Figura 48) como a aspidocarpina (**37**).



**Figura 48.** Estrutura e sistema de numeração do alcalóide 3 (Aspidocarpina).

#### 4.4.3.1 Análise dos espectros de IV e UV do alcalóide 3 (Aspidocarpina)

O espectro no UV (Figura 49) mostrou máximas de absorção de  $\lambda_{\max}$  em 266, 241 e 224 nm. Esses dados encontram-se comparados com os da literatura para a aspidocarpina na Tabela 26.

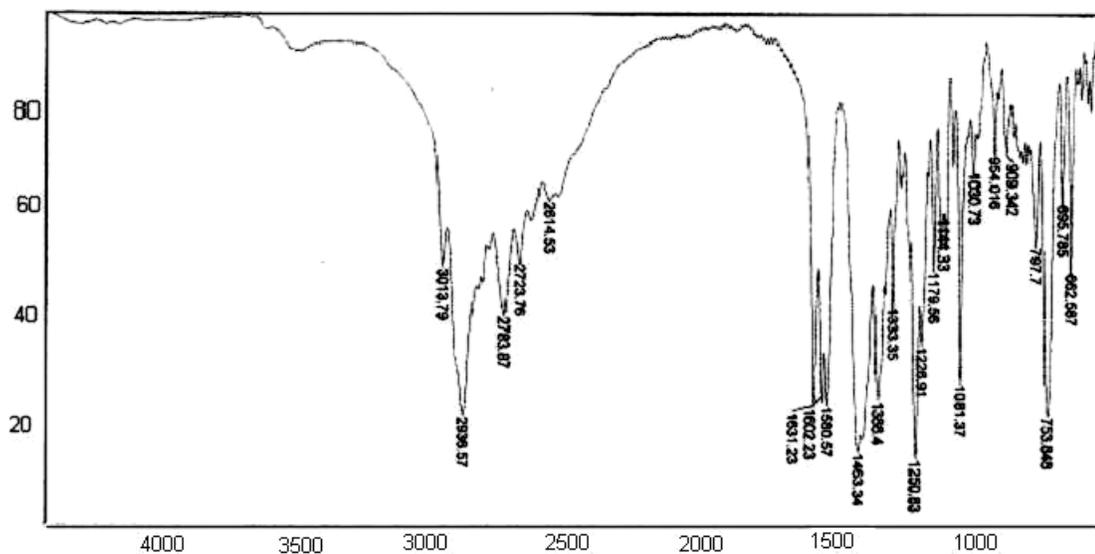


**Figura 49.** Espectro de UV na faixa de 200 a 800 nm do alcalóide 3 (aspidocarpina) em  $\text{CHCl}_3$ .

**Tabela 26.** Comparação com os dados de UV do alcalóide 3 com os encontrados na literatura para a aspidocarpina.

<b>Alcalóide 3</b>	<b>aspidocarpina*</b>
$\lambda_{\text{max}}$ , nm	$\lambda_{\text{Max}}$ , nm
224	227
241	249
266	263,5

\*Fonte: Mclean *et al.*, 1960.

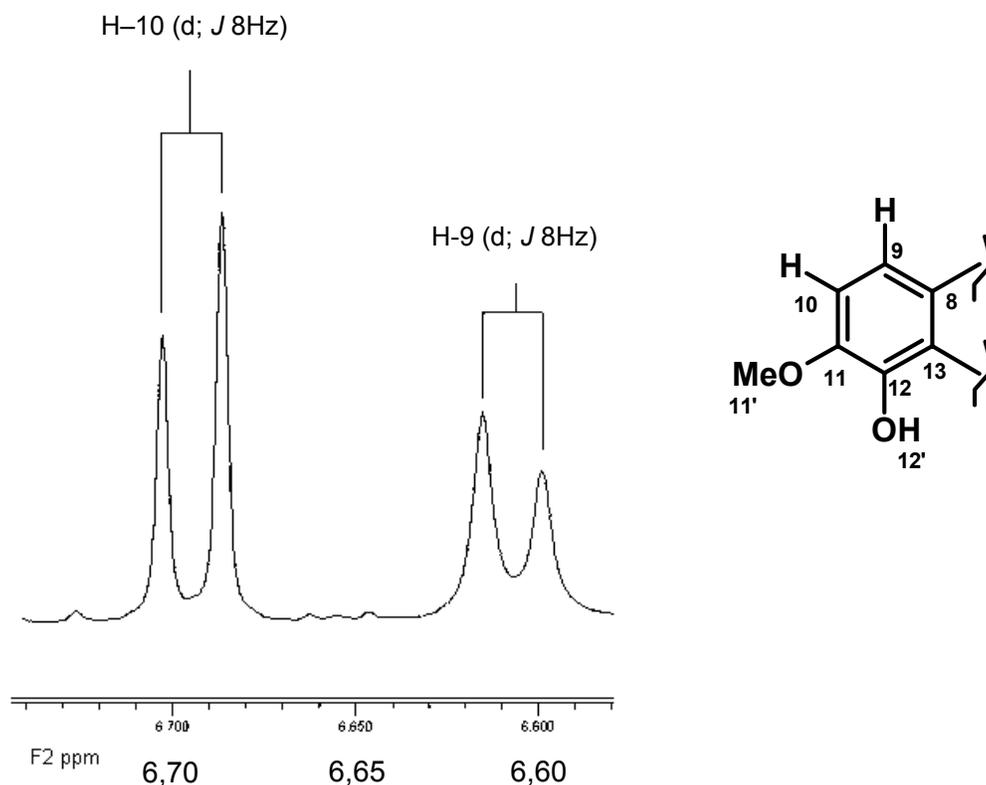


**Figura 50.** Espectro de IV do alcalóide 3 (aspidocarpina) em pastilhas de KBr.

Analisando o espectro de IV pôde-se observar bandas de absorção em  $1631\text{ cm}^{-1}$  (deformação axial C=O característica de ligação hidrogênio interna na carboníla amídica), em  $2936\text{ cm}^{-1}$  (característica de deformação axial de C-H de metila). As bandas de absorção em  $1580$  e  $1463\text{ cm}^{-1}$  são características de deformação axial das ligações C=C de anel aromático. A banda de absorção em  $753\text{ cm}^{-1}$  evidencia a natureza aromática da substância (Figura 50).

#### 4.4.3.2 Análise dos espectros de RMN do alcalóide 3 (Aspidocarpina)

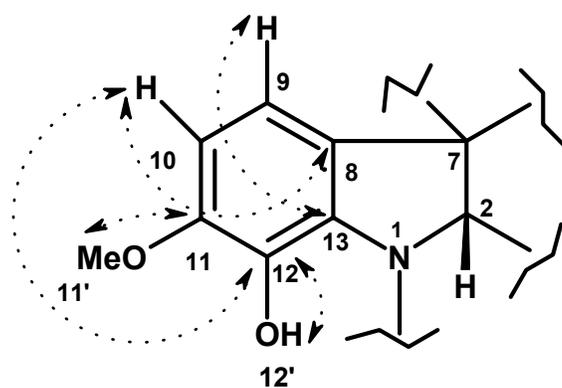
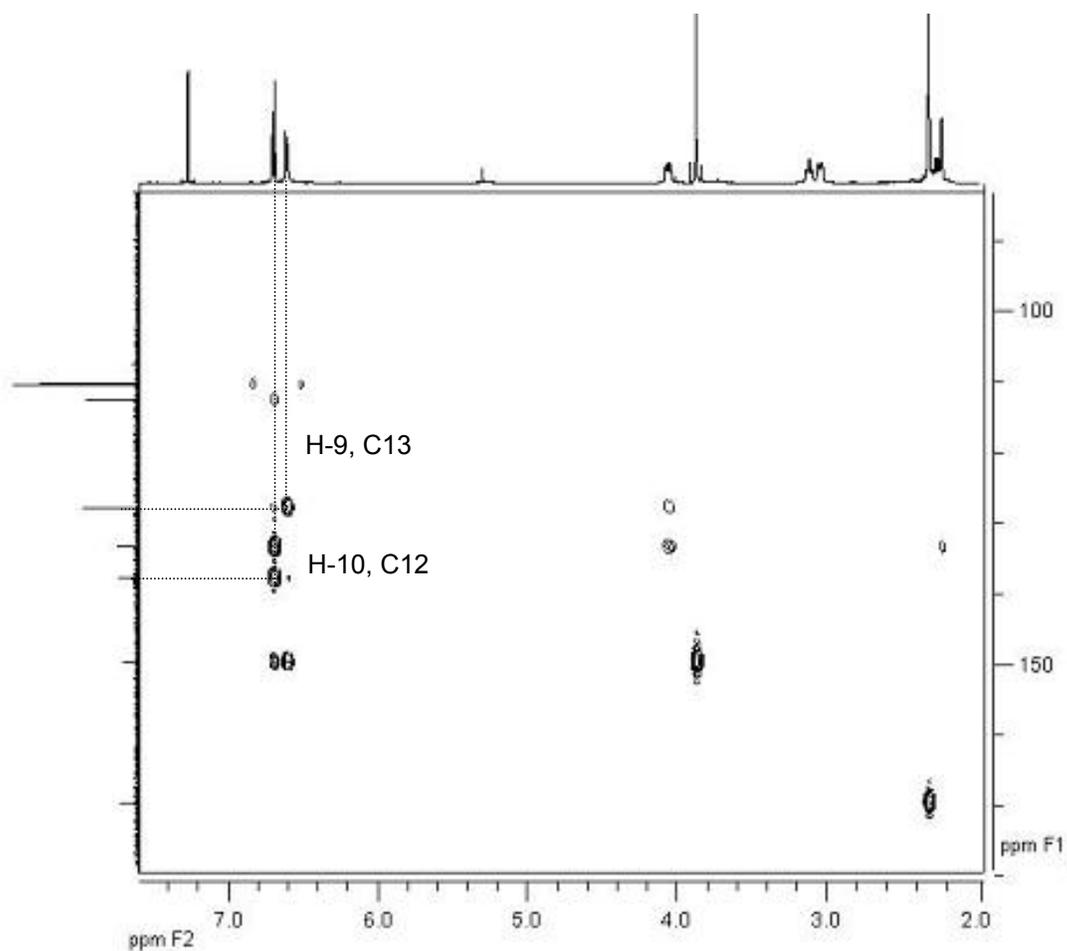
Pela ampliação da região de  $\delta$  6,6 a 6,8 (Figura 51) do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  pôde-se observar um dubleto ( $J$  8 Hz) centrado em  $\delta$  6,61, com integração equivalente a um hidrogênio, que se atribuiu ao hidrogênio H-9 e um dubleto ( $J$  8 Hz) centralizado em  $\delta$  6,69, com integração equivalente a um hidrogênio que se atribuiu ao hidrogênio H-10. Analisando o espectro de HSQC (Anexo 18) observou-se a correlação direta entre o carbono C-9 ( $\delta$  112,6) com o hidrogênio H-9 ( $\delta$  6,61) e o carbono C-10 ( $\delta$  110,3) com o hidrogênio H-10 ( $\delta$  6,69).



**Figura 51.** Ampliação da região de  $\delta$  6,6 a 6,8 do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do alcalóide 3 (aspidocarpina).

Em campo mais baixo, na ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  observou-se um singlete em  $\delta$  10,95, que foi atribuído O-H (H-12') , que está de acordo com Oliveira, (1999). No espectro integral de RMN de  $^1\text{H}$  (Anexo 15) observou-se também um singlete intenso em  $\delta$  3,87 (integral para 3 hidrogênios) que foi atribuído ao hidrogênio H-11'. Pelo espectro de HSQC (Anexo 18) verificou-se que o hidrogênio H-11' estava correlacionado diretamente com o carbono C-11' ( $\delta$  53,7), carbono que também foi confirmado ser metílico pela análise do espectro de DEPT (Anexo 17).

De acordo com os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT (Anexos 16 e 17, respectivamente) C-11 ( $\delta$  149,6), C-12 ( $\delta$  137,7), C-13 ( $\delta$  127,7), C-8 ( $\delta$  133,3) e C-7 ( $\delta$  52,4) são carbonos quaternários e o C-2 ( $\delta$  70,5) é metínico . Na ampliação do espectro de HMBC (Figura 52 e Anexo 20) podemos destacar as seguintes correlações  $^3J$ : entre o carbono C-11 ( $\delta$  149,6) e os hidrogênios H-11' ( $\delta$  3,87), entre o carbono C-13 ( $\delta$  127,7) com o hidrogênio H-9 ( $\delta$  6,61), entre o carbono C-8 ( $\delta$  133,3) e o hidrogênio H-10 ( $\delta$  6,69), entre o carbono C-12 ( $\delta$  137,7) com o hidrogênio H-10 ( $\delta$  6,69) e entre o carbono C-7 ( $\delta$  52,4) com o hidrogênio H-9 ( $\delta$  6,69). Observaram-se também as correlações  $^2J$  entre o carbono C-12 ( $\delta$  137,7) com o hidrogênio H-12' ( $\delta$  10,95), hidrogênio do grupo hidroxila e entre o carbono C-7 ( $\delta$  52,4) e o hidrogênio H-2 ( $\delta$  4,06).

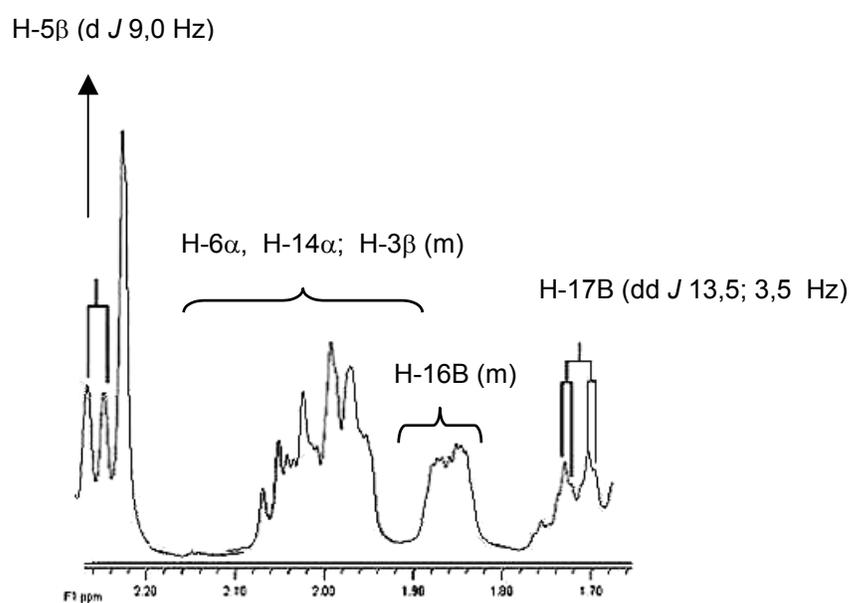


**Figura 52.** Ampliação do espectro de HMBC da região aromática do alcalóide 3 (aspidocarpina) e algumas correlações.

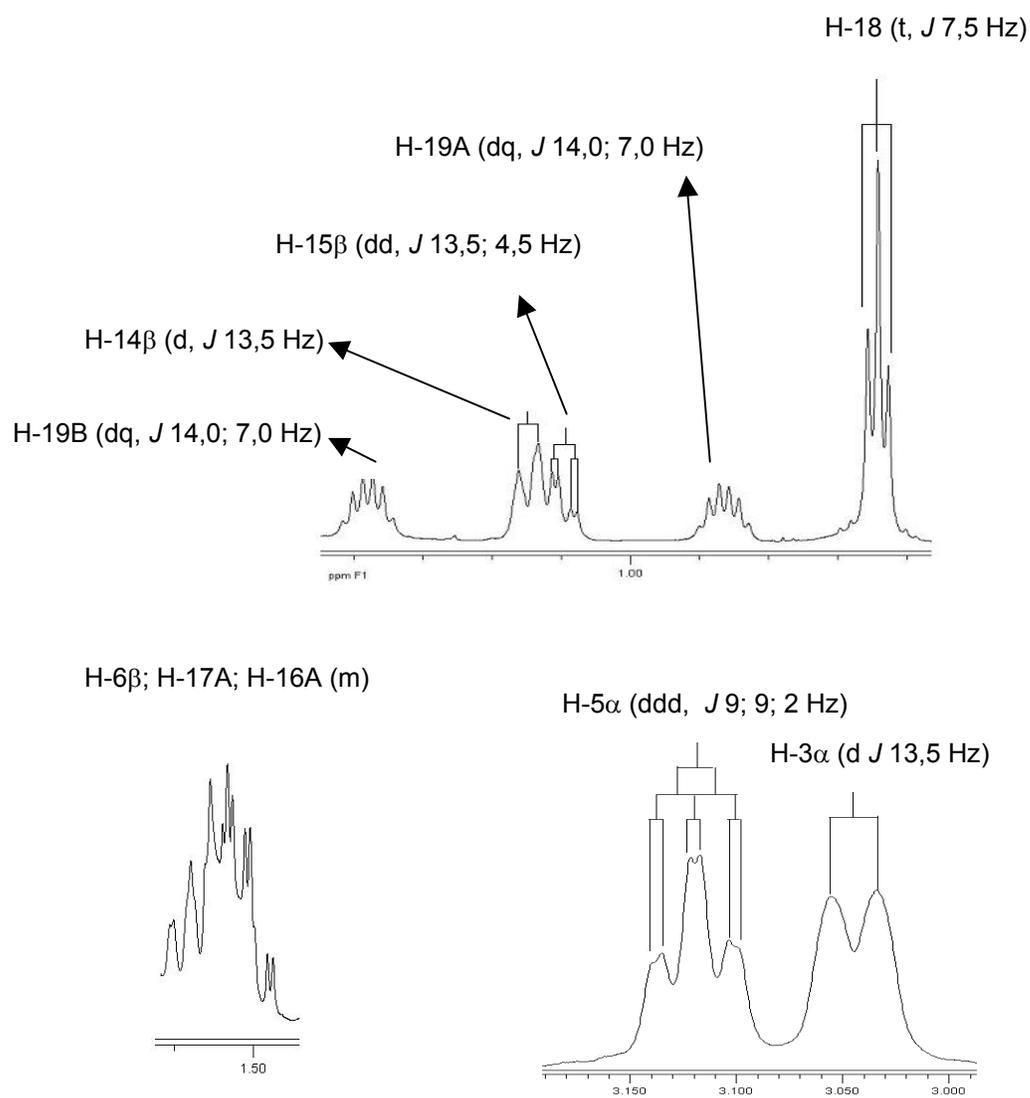
Os carbonos metilênicos C-3 ( $\delta$  53,9), C-5 ( $\delta$  52,7), C-6 ( $\delta$  39,6), C-14 ( $\delta$  23,2), C-15 ( $\delta$  34,3), C-16 ( $\delta$  25,4), C-17 ( $\delta$  21,8) e C-19 ( $\delta$  30,3) foram atribuídos pela análise do espectro de DEPT (Anexo 17) e seus respectivos hidrogênios pela análise do espectro de HSQC (Anexo 18 e Tabela 30).

Analisando a ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figuras 53 e 54) observaram-se os sinais: um duplo-duplo-dublete  $J$  9,0; 9,0; 2,0 Hz em  $\delta$  3,12 (integral equivalente a um hidrogênio,) atribuído ao hidrogênio H-5 $\alpha$ , um dublete  $J$  13,5 Hz centralizado em  $\delta$  3,04 (integral para um hidrogênio) atribuído ao hidrogênio H-3 $\alpha$  (para hidrogênios H-5 $\alpha$  e H-3 $\alpha$  foram sugeridas as atribuições devido a proximidade ao par de elétrons do nitrogênio N-4), um dublete  $J$  9,0 Hz em  $\delta$  2,26 (equivalente a um hidrogênio) atribuído ao hidrogênio H-5 $\beta$ , um duplo-dublete  $J$  13,5; 3,5 Hz em  $\delta$  1,71 (integral para um hidrogênio) atribuído ao hidrogênio H-17B, um dublete em  $\delta$  1,14  $J$  13,5 Hz (equivalente a um hidrogênio) atribuído ao hidrogênio H-14 $\beta$ , um duplo-dublete em  $\delta$  1,09  $J$  13,5; 4,5 Hz (integral para um hidrogênio) atribuído ao hidrogênio H-15 $\beta$ , um duplo quarteto  $J$  14,0; 7,0 Hz em  $\delta$  0,86 (com integral para um hidrogênio) atribuído ao hidrogênio H-19A e outro duplo quarteto  $J$  14,0; 7,0 Hz em  $\delta$  1,38 (com integral para um hidrogênio) que foi atribuído ao hidrogênio H-19B. Os hidrogênios H-3 $\beta$ , H-17A, H-14 $\alpha$ , H-15 $\alpha$ , H-6 $\alpha$ , H-6 $\beta$  e H-16A e H-16B foram observados como multipletos (Tabela 28). Ainda na ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  e no espectro integral (Figura 54 e Anexo 15) também observaram-se um tripeto  $J$  7,5 Hz em  $\delta$  0,64 (integral para três hidrogênios) atribuído aos hidrogênios H-18, um singleto em  $\delta$  2,32 (integral

para três hidrogênios) atribuído aos hidrogênios H-23, um duplo dubleto  $J$  11,0; 6,0 em  $\delta$  4,06 (integral equivalente a um hidrogênio) atribuído ao hidrogênio H-2 e um singleto em  $\delta$  2,23 (integral equivalente a um hidrogênio) atribuído ao hidrogênio H-21.

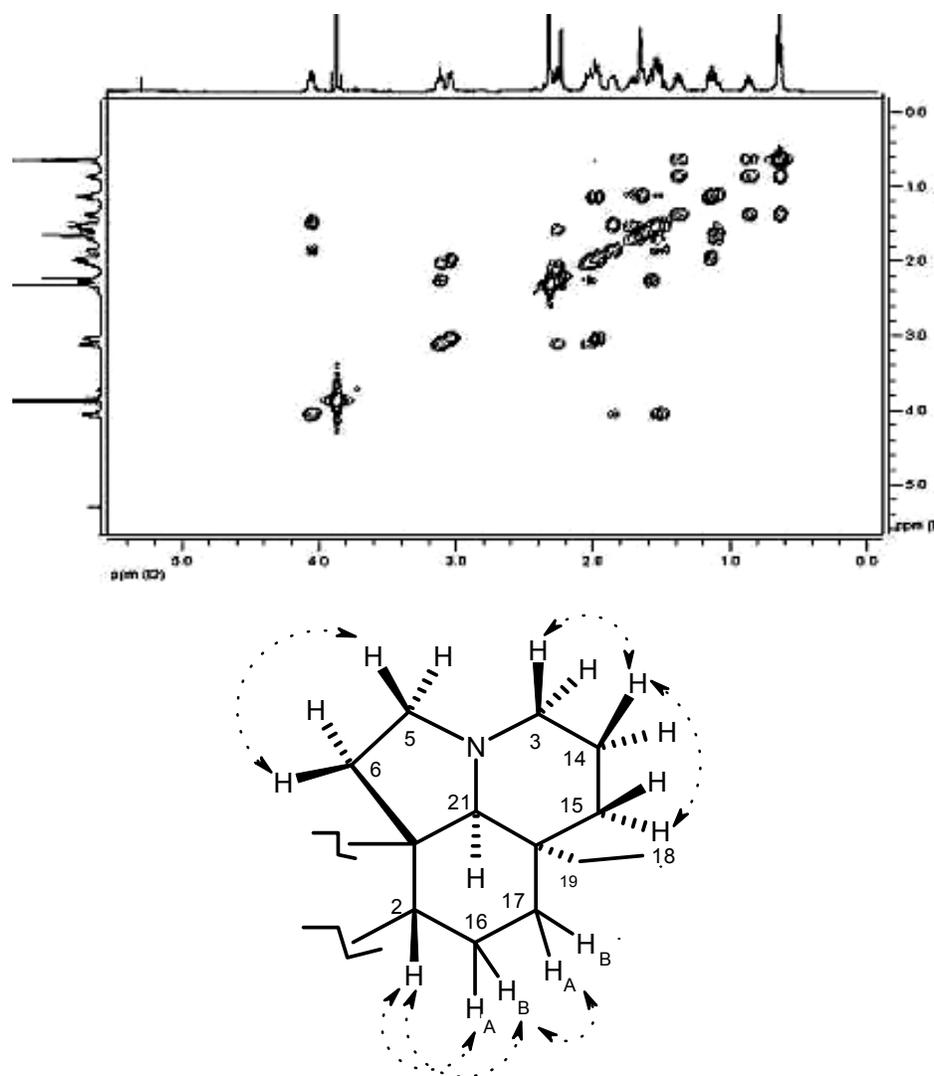


**Figura 53.** Ampliação da região de  $\delta$  1,68 a 2,26 do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do alcalóide 3 (aspidocarpina) e atribuições dos sinais.



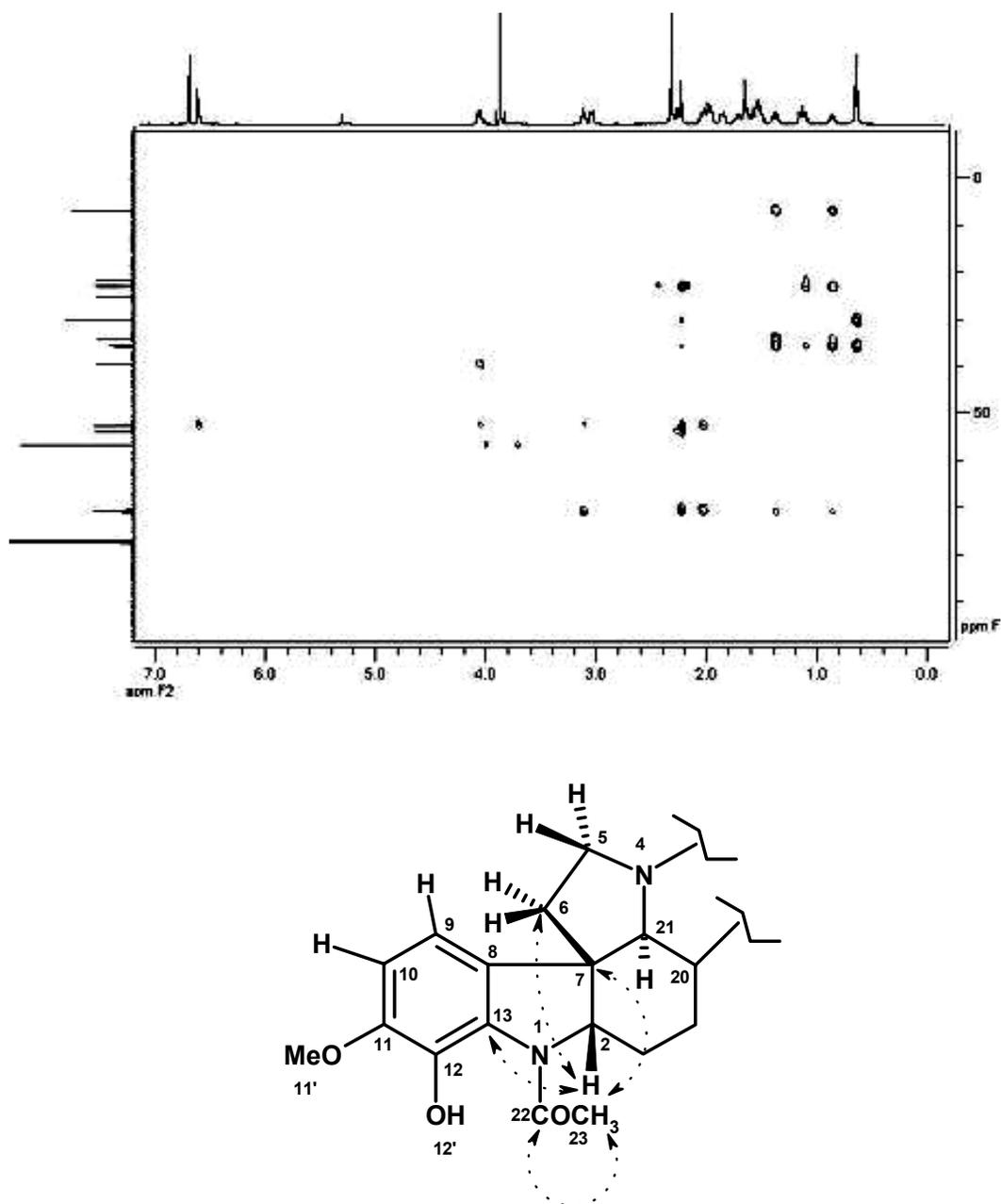
**Figura 54.** Ampliação da região de  $\delta$  0,60 a 3,20 do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do alcalóide 3 (aspidocarpina) e atribuições dos sinais.

No espectro de COSY (ampliação na Figura 55) destacam-se as seguintes correlações  $^3J$ : entre o hidrogênio H-14 $\beta$  ( $\delta$  1,14) com os hidrogênios H-3 $\beta$  e H-15 $\alpha$  ( $\delta$  1,93-2,08 e 1,46-1,68, respectivamente), entre o hidrogênio H-5 $\beta$  ( $\delta$  2,26) e o hidrogênio H-6 $\beta$  ( $\delta$  1,46-1,68), entre o hidrogênio H-2 ( $\delta$  4,06) com os hidrogênios H-16A e H-16B ( $\delta$  1,46-1,68 e 1,82-1,89, respectivamente) e entre o hidrogênio H-17A ( $\delta$  1,46-1,68) e o hidrogênio H-16B ( $\delta$  1,82-1,89).

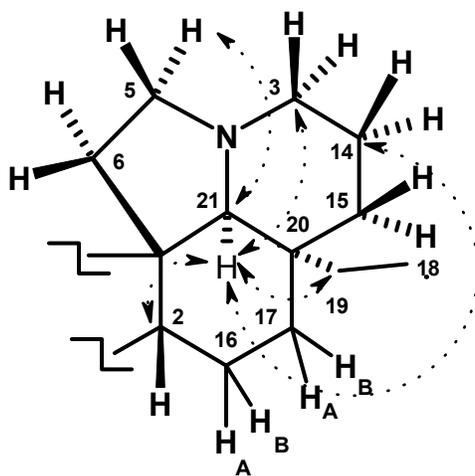
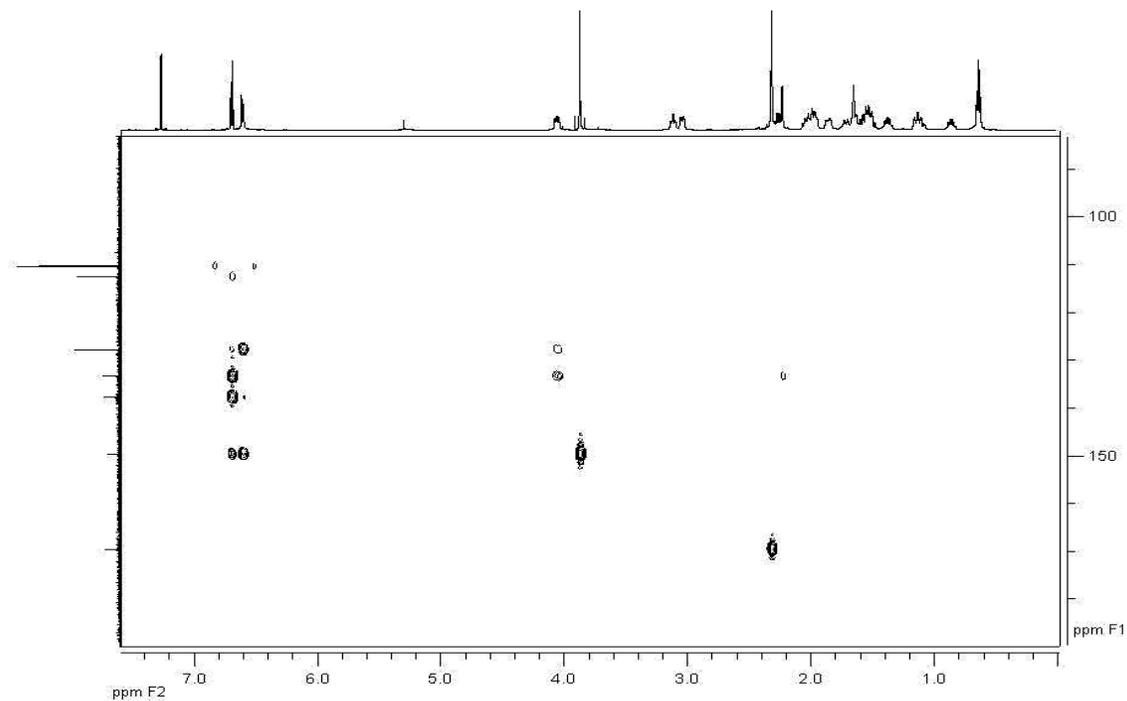


**Figura 55.** Ampliação da região alifática do espectro de COSY do alcalóide 3 (aspidocarpina) e de algumas correlações.

Pela ampliação do espectro de HMBC (Figuras 56a e 56b) pode-se perceber as principais correlações: entre o hidrogênio H-5 $\alpha$  ( $\delta$  3,12) com o carbono metínico C-21 ( $\delta$  70,9), entre o hidrogênio H-21 ( $\delta$  2,23) e os carbonos C-19 ( $\delta$  30,3), C-14 ( $\delta$  23,2), C-3 ( $\delta$  53,9) e C-2 ( $\delta$  70,5), entre o hidrogênio H-2 ( $\delta$  4,06) e os carbonos C-7 ( $\delta$  52,4), C-6 ( $\delta$  39,6), C-13 (127,7) e entre os hidrogênios H-23 ( $\delta$  2,32) e o carbono C-22 ( $\delta$  169,5).

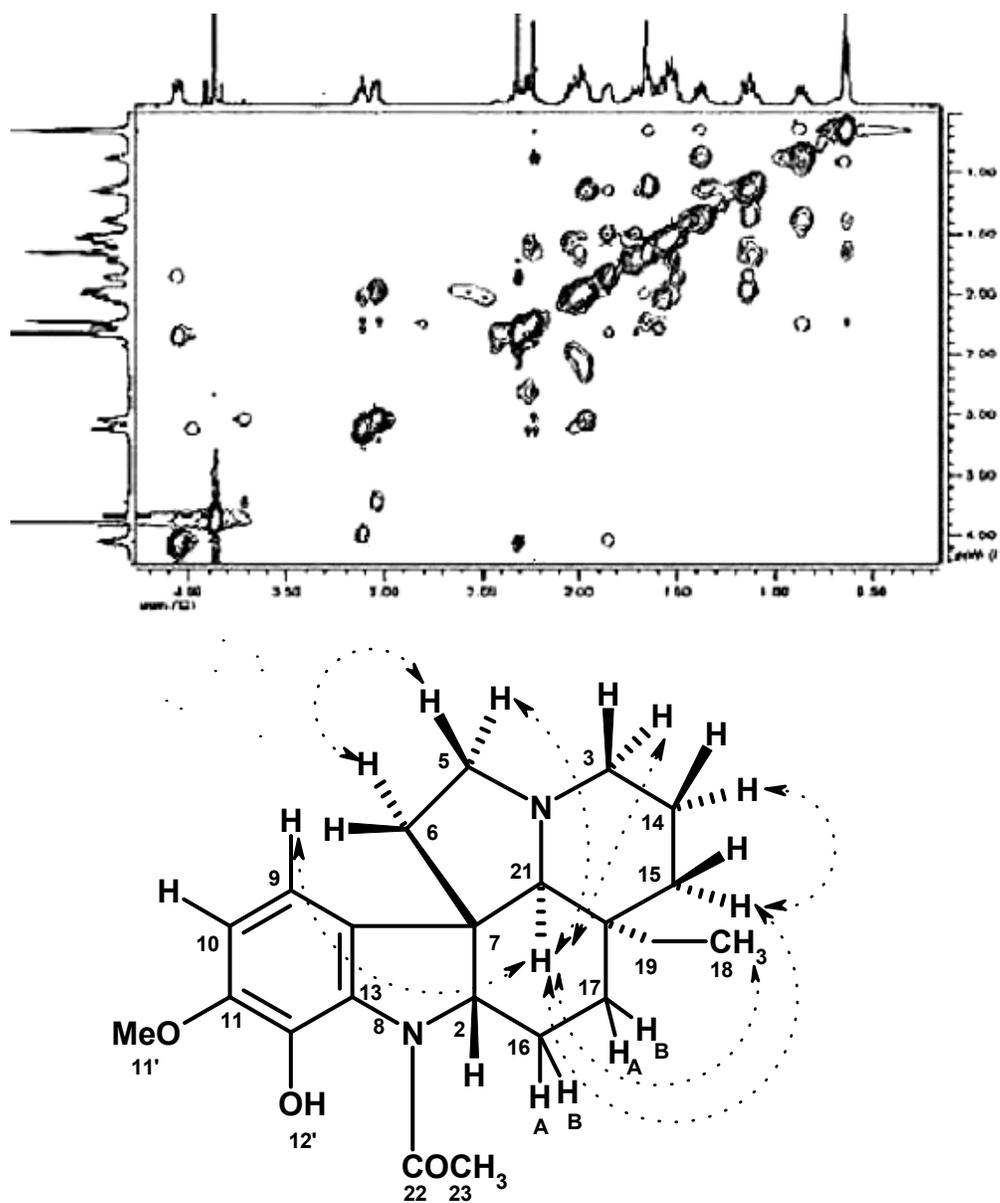


**Figura 56a.** Ampliações do espectro de HMBC da região alifática do alcalóide 3 (aspidocarpina) e algumas correlações.



**Figura 56b.** Ampliações do espectro de HMBC da região alifática do alcalóide 3 (aspidocarpina) e algumas correlações.

Analisando a ampliação do espectro de NOESY (Figura 57 e Anexo 21) destacam-se algumas interações : entre o hidrogênio H-21 ( $\delta$  2,23) e os hidrogênios H-15 $\alpha$  ( $\delta$  1,46-1,68), H-5 $\alpha$  ( $\delta$  3,12), H-3 $\alpha$  ( $\delta$  3,04) e H-9 ( $\delta$  6,61), entre o hidrogênio H-14 $\alpha$  ( $\delta$  1,93-2,08) e o hidrogênio H-15 $\alpha$  ( $\delta$  1,46-1,68), entre o hidrogênio H-9 ( $\delta$  6,61) e o hidrogênio H-5 $\alpha$  ( $\delta$  3,12) e entre o hidrogênio H-5 $\beta$  ( $\delta$  2,26) e o hidrogênio H-6 $\alpha$  ( $\delta$  1,93-2,08), reforçando assim as atribuições verificadas anteriormente.



**Figura 57.** Ampliação do Espectro de NOESY da Região alifática do alcalóide 3 e algumas correlações.

#### 4.4.3.3 Análise do espectro de massas do alcalóide 3

A Figura 58 apresenta o espectro de massas por *electrospray* de alta resolução (HR-ESI-MS), no qual foi possível determinar a fórmula molecular do alcalóide 1 em  $C_{22}H_{30}N_2O_3$  (achado  $m/z$  371,2351 $[M+H]^+$ , calculado para  $C_{22}H_{30}N_2O_3$   $m/z$  371,2320). Alguns picos intensos que sustentam a estrutura do alcalóide 3 são  $m/z$  124,1120  $[C_8H_{14}N]^+$  (calculado  $m/z$  124,1120),  $m/z$  189,0870  $[C_{13}H_{19}N]^+$  (calculado  $m/z$  189,0950) e  $m/z$  152,0714  $[C_{10}H_{18}N]^+$  (calculado  $m/z$  152,0780).

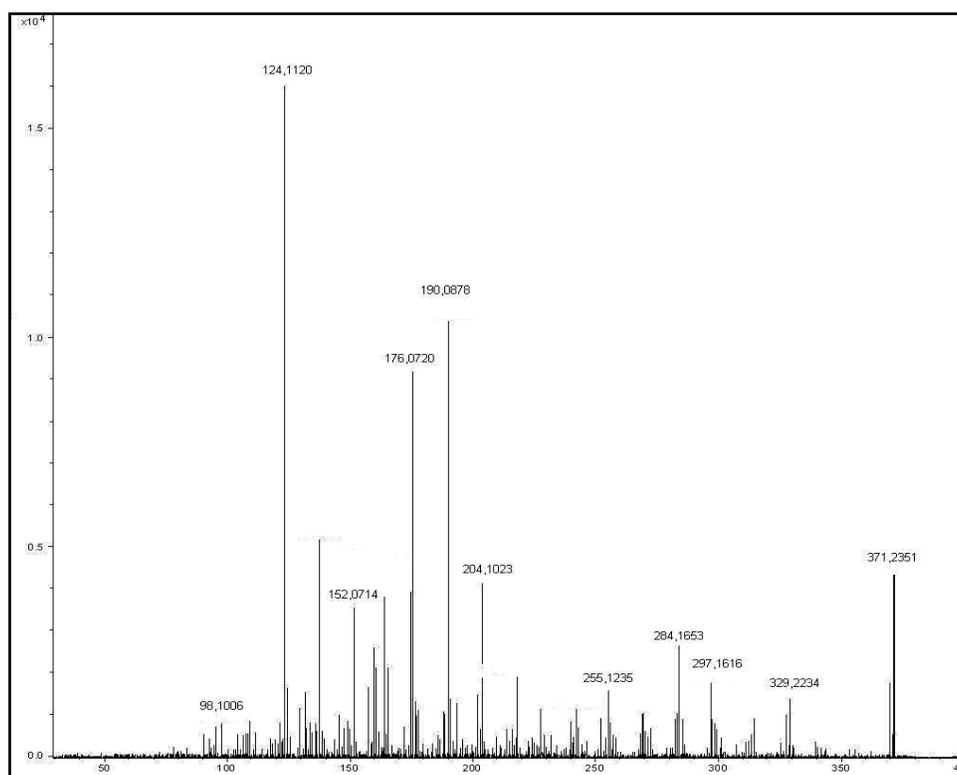
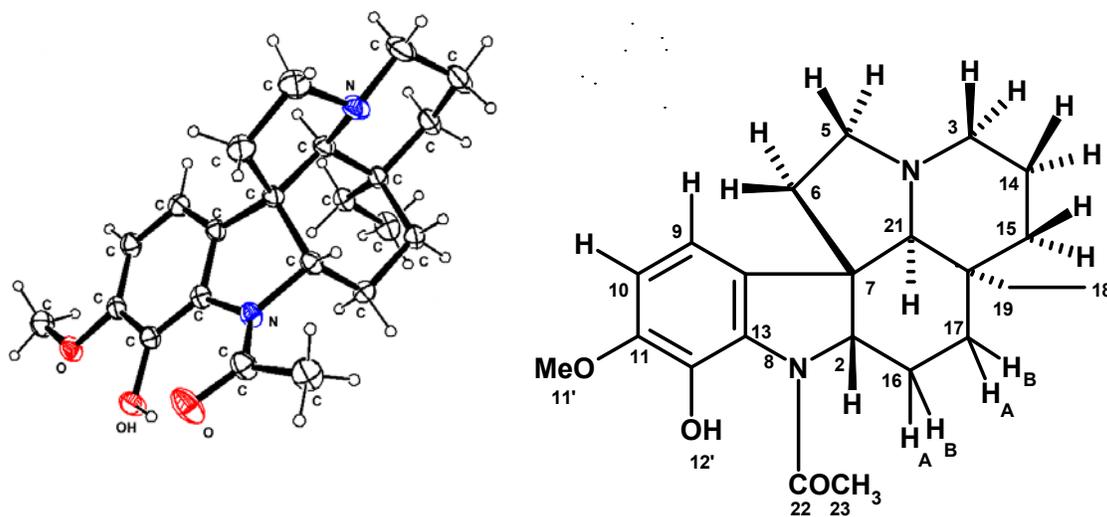


Figura 58. Espectro de massas por *electrospray* de alta resolução do alcalóide 3 (aspidocarpina).

#### 4.4.3.4 Análise de cristalografia de monocristais de raios-X da Aspidocarpina

A análise de cristalografia de monocristais (Figura 59 e Tabela 27) confirmou as atribuições feitas pelos espectros de RMN uni e bidimensionais feitas anteriormente para a identificação do alcalóide 3 como aspidocarpina.



**Figura 59.** Representações ORTEP e esquemática da estrutura da aspidocarpina com os átomos identificados.

**Tabela 27.** Dados de análise de cristalografia para determinação da aspidocarpina (37)

Fórmula	$C_{22} H_{30} N_2 O_3$
Massa molecular	370,48
Sistema cristalino	ortorrômbico

**Tabela 28.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  do alcalóide 3 (Aspidocarpina) e da Literatura.

Nº H	Alcalóide 3 (aspidocarpina) ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)			Mclean <i>et al.</i> , 1986 ( $\text{CDCl}_3$ 400 MHz) aspidocarpina		
	$\delta$ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	$\delta$ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)
2	4,06	dd	11; 6	4,07	dd	11 ; 6
3 $\alpha$	3,04	d	13,5	3,04	dm	12
3 $\beta$	1,93-2,08	m	-	1,98	td	12 ; 4
5 $\alpha$	3,12	ddd	9; 9; 2	3,12	m	-
5 $\beta$	2,26	d	9	2,27	m	-
6 $\alpha$	1,93-2,08	m	-	2,04	m	-
6 $\beta$	1,46-1,68	m	-	1,57	m	-
9	6,61	d	8	6,61	d	8
10	6,69	d	8	6,69	d	8
14 $\alpha$	1,93-2,08	m	-	1,72	tm	12
14 $\beta$	1,14	d	13,5	1,53	dm	12
15 $\alpha$	1,46-1,68	m	-	1,65	dt	12 ; 4
15 $\beta$	1,09	dd	13,5; 4,5	1,11	td	12 ; 4
16A	1,46-1,68	m	-	1,52	m	-
16B	1,82-1,89	m	-	1,86	m	-
17A	1,46-1,68	m	-	1,15	dm	12
17B	1,71	dd	13; 3,5	2,00	td	12 ; 4
18	0,64	t	7,5	0,63	t	7,5
19A	0,86	dq	14; 7	0,93	m	-
19B	1,38	dq	14; 7	1,44	m	-
H-21	2,23	s	-	2,25	s	-
H-23	2,32	s	-	2,33	s	-
H-11'	3,87	s	-	3,88	s	-
H-12'	10,95	s	-	10,98	s	-

**Tabela 29.** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT do alcalóide 3 e da literatura .

Nº C	Alcalóide 3 (aspidocarpina) ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)		Mclean <i>et al.</i> , 1986 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ 100 MHz) aspidocarpina	
	$\delta$ (ppm)	Multiplicidade	$\delta$ (ppm)	Multiplicidade
2	70,5	CH	70,2	CH
3	53,9	$\text{CH}_2$	53,7	$\text{CH}_2$
5	52,7	$\text{CH}_2$	52,4	$\text{CH}_2$
6	39,6	$\text{CH}_2$	39,3	$\text{CH}_2$
7	52,4	C	52,2	C
8	133,3	C	133,1	C
9	112,6	CH	112,3	CH
10	110,3	CH	110,0	CH
11	149,6	C	149,3	C
12	137,8	C	137,4	C
13	127,7	C	127,5	C
14	23,2	$\text{CH}_2$	21,5	$\text{CH}_2$
15	34,3	$\text{CH}_2$	34,0	$\text{CH}_2$
16	25,4	$\text{CH}_2$	25,1	$\text{CH}_2$
17	21,8	$\text{CH}_2$	21,5	$\text{CH}_2$
18	6,99	$\text{CH}_3$	6,76	$\text{CH}_3$
19	30,3	$\text{CH}_2$	30,0	$\text{CH}_2$
20	35,7	C	35,4	C
21	70,9	CH	70,6	CH
22	169,5	C	169,3	C
23	22,9	$\text{CH}_3$	22,6	$\text{CH}_3$
11'	53,7	$\text{CH}_3$	56,4	$\text{CH}_3$

**Tabela 30.** Correlações observadas no espectro de HSQC e HMBC do alcalóide 3.

Nº H	$\delta$ (ppm)	HSQC	HMBC
		$^1J$	$^2J, ^3J$ ou $^4J$
2	4,06	70,5 (C-2)	39,6 (C-6); 133,3 (C-8); 52,4 (C-7); 127,8 (C-13)
3 $\alpha$	3,04	53,9 (C-3)	-
3 $\beta$	1,93-2,08		-
5 $\alpha$	3,12	52,7 (C-5)	52,4 (C-7); 70,92 (C-21)
5 $\beta$	2,26		-
6 $\alpha$	1,93-2,08	39,6 (C-6)	70,5 (C-2); 52,4 (C-7)
6 $\beta$	1,46-1,68		-
9	6,61	112,6 (C-9)	52,4 (C-7); 127,8 (C-13); 149,6 (C-11)
10	6,69	110,3 (C-10)	133,3 (C-8); 149,6 (C-11); 137,8 (C-12); 112,6 (C-9)
14 $\alpha$	1,93-2,08	23,2 (C-14)	-
14 $\beta$	1,14		-
15 $\alpha$	1,46-1,68	34,3 (C-15)	-
15 $\beta$	1,09		23,2(C-14); 35,7(C-20)
16A	1,46-1,68	25,4 (C-16)	-
16B	1,82-1,89		-
17A	1,46-1,68	21,8 (C-17)	-
17B	1,71		-
18	0,64	6,99 (C-18)	30,3 (C-19); 35,7(C-20)
19A	0,86	30,3 (C-19)	6,9 (C-18); 23,2(C-14); 35,7(C-20); 70,9(C-21)
19B	1,38		6,9 (C-18); 35,7(C-20); 70,9(C-21)
21	2,23	70,9 (C-21)	53,9 (C-3); 133,3 (C-8); 70,5 (C-2); 23,2(C-14); 30,3 (C-19); 35,7(C-20)
23	2,32	22,9 (C-23)	169,5 (C-22)
11'	3,87	53,7	149,6 (C-11)
12'	10,95	-	149,6 (C-11); 137,8 (C-12)

**Tabela 31.** Correlações e interações observadas no espectro de COSY e NOESY do Alcalóide 3 respectivamente.

Nº H	$\delta$ (ppm)	COSY	NOESY
		$^2J, ^3J$ ou $^4J$	Interação no espaço $^1H-^1H$
2	4,06	-	-
3 $\alpha$	3,04	-	-
3 $\beta$	1,93-2,08	-	H-3 $\alpha$ (3,04)
5 $\alpha$	3,12	-	H-21 (2,23)
5 $\beta$	2,26	H-5 $\alpha$ (3,12)	H-5 $\alpha$ (3,12)
6 $\alpha$	1,93-2,08	H-5 $\alpha$ (3,12); H-5 $\beta$ (1,93-2,08)	H-5 $\alpha$ (3,12)
6 $\beta$	1,46-1,68	H-5 $\beta$ (1,93-2,08)	H-6 $\alpha$ (1,93-2,08); H-5 $\beta$ (2,26)
9	6,61	-	H-21 (2,23); H-5 $\alpha$ (3,12)
10	6,69	-	H-11' (3,87)
11		-	-
12		-	-
14 $\alpha$	1,93-2,08	3,04 (H-3 $\alpha$ )	-
14 $\beta$	1,14	H-14 $\alpha$ (1,93-2,08); 3 $\beta$ (1,93-2,08); H-15 $\alpha$ (1,46-1,68)	H-3 $\beta$ (1,93-2,08); H-16B (1,82-1,89); H-17B (1,71)
15 $\alpha$	1,46-1,68	-	H-21 (2,23);H-14 $\alpha$ (1,14)
15 $\beta$	1,09	H-17B(1,71)	H-15 $\alpha$ (1,46-1,68)
16A	1,46-1,68	4,06 (H-2)	H-16B (1,82-1,89); H-17B (1,71)
16B	1,82-1,89	4,06 (H-2)	H-2 (4,06); H-23 (2,32)
17A	1,46-1,68	1,82-1,89 (H-16B);H-17B(1,71)	-
17B	1,71	-	H-23 (2,32)
18	0,64	0,86 (H-19A); 1,38 (H -19B)	H-21 (2,23); H-15 $\alpha$ (1,46-1,68); H-19B (1,38); H- 19A (0,86)
19 A	0,86	1,38 (H -19B)	H-21 (2,23); H-19B (1,38)
19B	1,38	-	-
21	2,23	-	3 $\alpha$ (3,04)
23	2,32	-	H-2 (4,06)
11'	3,87	-	-
12'	10,95	-	-

## 5. CONCLUSÃO

Os extratos etanólicos das duas espécies e as frações provenientes do fracionamento ácido-base, apresentaram atividade frente às larvas *Artemia franciscana*, destacando-se as frações clorofórmicas 2pHV8 (*A. vargasii*) e 2DpH8D e (*A. desmanthum*). Pouca atividade frente às de *A. aegypti* para os extratos e frações.

Foram isolados da fração 2pHV8 elipticina (**68**) e N-metiltetraidroelipticina (**75**). Da fração 2DpH8D foi isolado aspidocarpina (**37**).

Nos testes biológicos, os alcalóides elipticina e N-metiltetraidroelipticina mostraram-se ativos frente às larvas de *A. franciscana*, e apresentaram alta atividade antitumoral em três linhagens de células (mama, cólon e sistema nervoso). O alcalóide aspidocarpina apresentou atividade antitumoral moderada e alta letalidade frente às larvas de *A. franciscana*, não havendo relato na literatura para essas atividades.

Quanto à atividade antimalárica frente a *Plasmodium falciparum*, os alcalóides elipticina e aspidocarpina apresentaram-se ativos, para o alcalóide N-metiltetraidroelipticina verificou-se baixa atividade. Para o alcalóide aspidocarpina,

poucas literaturas foram encontradas, o que demonstra nenhuma descrição quanto a sua atividade biológica.

Este trabalho relata atividade antimalárica inédita para os três alcalóides isolados (elipticina, N-metiltetraidroelipticina e aspidocarpina), bem como o primeiro relato de análise cristalográfica e atividade antitumoral para o alcalóide aspidocarpina.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU E SILVA M.; OLIVEIRA, A.B.; SOUZA FILHO, J.D.; CHIARI, E.; BRAGA, F.C. LOMBARDI, J.A. Isolamento de alcalóides de *Aspidosperma tomentosum* biomonitorado por teste *in vitro* contra *Trypanosoma cruzi*. Anais da II Semana da Pós-graduação da UFMG, 2002.

ALMEIDA, C.F.C.B.R.; LIMA E SILVA T.C.; AMORIM, M. B. M.; ALBUQUERQUE, U. P. Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from the caatinga. (Northeast Brazil). Journal of Arid Environments, v. 62, p. 127-142, 2005.

ALVES, T. M. De A., SILVA, A. F., BRANDÃO, M., GRANDI, T. S. M., SMÂNIA, E. F. A., JÚNIOR, A. S., ZANI, C. L. Biological Screening of Brazilian Medicinal Plants. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 95, n. 3, p. 367-373, 2000.

ANDRADE-NETO, V.F.; BRANDÃO, M.G.L.; STEHMANN, J.R.; OLIVEIRA, L.A.; KRETTLI, A.U. Antimalarial activity of Cinchona-like plants used to treat fever and malaria in Brasil. *J. Ethnopharmacology*, v. 87, p. 253-256, 2003.

ANDERSON, J. E., GOETH, C. M., McLAUGHLIN, J. L. A blind comparison of simple bench-top bioassay and human tumor cell cytotoxicities as antitumor prescreens. *Phytochemical Analysis*, v. 2, p. 107-111, 1991.

ARNDT, R.R.; BROWN, S. H.; LING, N.C.; ROLLER, P.; DJERASSI, C.; FERREIRA, F.J.M.; GILBERT, B.; MIRANDA, E. C.; FLORES, S. E.; DUARTE, A. P.; CARRAZZONI, E. P.; Alkaloids Studies LVIII. The Alkaloids of six *Aspidosperma* Species. *Phytochemistry*, v. 6, p. 1653, 1967.

ATASSI, G.; PIERRÉ, A.; ROLLAND, Y.; SCHAEFFER, C. Citotoxicite d'alcaloides indoliques aspidospermane a chaine tryptamine modifiee. *Journal of Natural Products*, v. 58, p. 1089-1091, 1995.

BANERJEE, J. N.; LEWIS, J.J. Pharmacological studies in the apocynaceous genus *Aspidosperma* Mart & Zucc., *Aspidosperma ulei* Mgf. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v.7, p. 42-45, 1954.

BARROS, A. R.C. Efeito pró-erétil de uma fração rica em alcalóides isolada de *Aspidosperma ulei* Markgr. Fortaleza: Tese de Doutorado, Universidade Federal do Ceará. 2005.

BIEMANN, K.; FRIEDMANN-SPITELLER, M.; SPITELLER, G. An Investigation by Mass Spectrometry of the Alkaloids of *Aspidosperma quebracho-blanco*. Tetrahedron Lett, v. 14, p. 485, 1961.

BIEMANN, K.; FRIEDMANN-SPITELLER, M.; SPITELLER, G. Application of Mass Spectrometry to Structure Problems. X. Alkaloids of the bark of *Aspidosperma quebracho-blanco*. Journal of The American Chemical Society; v.85, p.63, 1963.

BOLZANI, W.S.; SERUR, L.M.; MATOS, F.F.J.A., GOTTLIEB, O. R. Indole Alkaloid Evaluation in *Aspidosperma*. Biochemical Systematics, v. 15, p. 187-200, 1987.

BONGIOVANNI G.; LUCHINO N.; PALACIO L.; EYNARD, A. R.; JOSÉ, C. J.; GOLENIOWSKI, M. E. *In vitro* antitumoral activity determination of native plant extracts of the central region of Argentina. Molecular Medicinal Chemistry, v. 10, p. 22-23, 2006.

BOURDY G.; OPORTO, P.; GIMENEZ, A.; DEHARO, E. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part VI. Evaluation on the antimalarial activity of plants used by Isoceno-Gurani Indians. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 93, p. 269-277, 2004.

BRANDÃO, M. G. L., CARVALHO, L. H., KRETTLI, A. U. Antimaláricos de uso popular na Amazônia. *Ciência Hoje*, v. 13, n. 78, p. 9 – 11. 1993.

BROWN JR., K. S.; DJERASSI, C. Alkaloids Studies XLVI. The Alkaloids of *Aspidosperma obscurinervium* Azembuja. A New Class of Heptacyclic Indole Alkaloids. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 86, p. 2451, 1964.

BURNELL, R. H.; CASA, D. D. Alkaloids of *Aspidosperma vargasii* A.DC. *Can J. Chem.*, v. 45, p. 89, 1967.

BURNELL, R. H.; MEDINA, J. D. Alkaloid's seeds of *Aspidosperma flenderi* Woodson. *Can. J. Chem.*, v. 44, p.28, 1966.

BURNELL, R. H.; MEDINA, J.D.; AYER, W. A. *Aspidosperma* alkaloids- flenderine. *Chem. Ind. P.*, v. 33, 1964.

CARVALHO, L. H.; ROCHA, E. M. M.; RASLAN, D. S.; OLIVEIRA, A. B. de; KRETTLI, A. U. Journal Medicinal Biological Research, v. 21, p. 485, 1988;

CORDELL, G.A.; QUINN-BEATTIE, M.L.; FARNSWORTH, N.R. The Potential of Alkaloids in Drug Discovery. Phytotherapy Research; v.15, p.183-205, 2001.

COWEN, L.D.; HELFAND, H.W. Pharmacy: An Illustrated History; New York: Harryn Abrams Incorporated, p.17-30, 1988.

DASTOR, N. J. ; GORMAN, A. A.; SCHMID, H. Uber die alkaloid von *Aspidosperma discolor* A. DC. Helv. Chim. Acta, v. 50, p. 213, 1967.

DASTOR, N.; SCHMID, H. Alkaloids of *Aspidosperma discolor*. Experientia, v. 19. p. 297. 1963.

DE CANDOLLE, A. P. Apocynacea. In Prodrromus Systematics Naturalis Regni Vegetabilis (A. P. De Candolle, ed). Fortin, Masson et sociorum, Paris , v.8, 317-498, 1844.

DEWICK, P. M. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. Jonh Wiley & Sons, 1997.

DJERASSI, C.; ANTONACCIO, L. D.; BUDZIKIEWICZ, H.; E WILSON, J. M. Mass Spectrometry in Structural and Stereochemical Problems. The Structure of the Aspidosperma Alkaloid Aspidoalbine, *Tetrahedron Lett.* v.22. 1962.

DUARTE, A. P.; MIRANDA, E.C. New Quaternary Alkaloid from *Aspidosperma gilbertii*. *An. Acad. Bras. Cienc.*, v. 55, p. 189, 1983.

ENDRESS, M.E.; BRUYNS, P.V. A Revised Classification of the Apocynaceae S. I. *The Botanical Review*, v.66, p.1-56, 2000.

FADEEVA, M.D.; BELYAEVA, T. N. Sanguinarine and ellipticine: cytotoxic alkaloids isolated from well-known antitumor plants. Intracellular targets of their action. *Tsitologiya*, v. 39, p. 174-182, 1997.

FATOPE, M.O. *et al.*, Screening of higher plant reputed as pesticides using the brine shrimp lethality assay. *Internacional Journal of Pharmacognosy*, v. 31, p. 250-254, 1993.

FERRARI, C.; E MARION, L. Further Alkaloid related to Aspidoalbine and Limaspermine, *Can. J. Chem.* v.42, 1964.

FERRARI, C.; MCLEAN, S.; MARION, L.; PALMER, K. A New *Aspidosperma* Alkaloid: O-demethylaspidocarpine, *Can. J. Chem.* v.41. 1963.

FERREIRA, I.C.P.; LONARDONI, M.V.C.; MACHADO G.M.C.; LEON, L.L.; GOBBI, L. FILHO; PINTO, L.H.B.; OLIVEIRA, A.J.B. Anti-leishmanial Activity of Alkaloidal Extract from *Aspidosperma ramiflorum*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.99, p. 325-327, 2004.

FERREIRA, J. M., GILBERT, B., OWELLEN, R. J.; DJERASSI, C. Alkaloids of *Aspidosperma discolor*, *Experientia*, v. 19, p. 585, 1963.

GILBERT, B.; BRISSOLESE, J.A.; WILSON, J. M.; BUDZIKIEWICZ, H.; DURHAM, L. J.; DJERASSI, C. The Alkaloids of *Aspidosperma limae* Woodson. *Chem.*, Ind.1962.

GILBERT, B.; DUARTE, A. P.; NAKAGAWA, Y., JOULE, J. A., FLORES, S. E., BRIOLESSE, J. A., CAMPELLO, J., CARRAZZONI, E.P., OWELLEN, R.J., BLOSSEY, E.C., BROWN JR., K. S. E DJERASSI, C Alkaloids Studies-L- The Alkaloids of Twelve *Aspidosperma* species..., *Tetrahedron*, 21, 1965.

GOLONI, R. ; ALVES, N.M.; GARROTE, C.F.D.; PAULA, J.R.; VALADARES, M.C.; BARA, M.T.F.; CUNHA, L.C. Estudo da toxicidade aguda do *Aspidosperma subincanum* Martius. Revista Eletrônica de Farmácia, v. 2, p. 89-91, 2005.

GRAHAM J.G.; QUINN, M.L.; FABRICANT, D.S.; FARNSWORTH, N.R. Plants used against cancer – an extension of the work of Jonatham Hartwell. Journal of Ethnopharmacology, v. 73, p. 347-377, 2000.

HENRIQUE, M. C.; CHAAR, J. S.; POHLIT, A. M. Estudo das Atividades Biológicas de Extratos de *Aspidospermum* e *Geissospermum* Utilizadas nas Medicinas Popular e Indígenas. 2001.

HENRIQUE, M.C. Aplicação de Cromatografia no Isolamento de Substâncias Bioativas a partir de Frações de Extrato Etanólico/NH<sub>3</sub> de Casca de *Aspidosperma* Spp. *Relatório de Estágio Supervisionado, Período: Outubro/2002 a Fevereiro/2003, Orientador INPA: Adrian Martin Pohlit, Orientador UFAM: José Felício da Silva, Departamento de Química UFAM, Manaus, 2003.*

IKEDA, M.; DJERASII, C. Alkaloids studies. LX. The structures of two novel *Aspidosperma* alkaloids, deoxyaspidodispermine and aspidodispermine. Tetrahedron Lett, v. 56, p. 5837, 1968.

INTERNET 09: *Aspidosperma vargasii* Specimen Map – The New York Missouri Botanical Garden. W<sup>3</sup> Tropicos. Disponível em:  
[http://www.mobot1.mobot.org/website/map\\_post.asp](http://www.mobot1.mobot.org/website/map_post.asp). Acesso em: 19/11/2006.

INTERNET 1: Missouri Botanical Garden. W<sup>3</sup> Tropicos. Disponível em:  
<http://www.mobot.org/MOBOT/research/venguayana/apocynaceae/aspidosperma.htm>. Acesso em: 08/10/2006.

INTERNET 2: Instituto Nacional de Biodiversidad. Disponível em:  
<http://www.inbio.ac.cr/bims/k03/p13/co45/o0136/f01667/g006959.htm>. Acesso em: 15/12/2006.

INTERNET 3: Rede de Sementes do Cerrado: *Aspidosperma tomentosum*. Disponível em: <http://www.sementesdocerrado.bio.br/Especies/Apocynaceae>. Acesso em: 10/12/2006.

INTERNET 4: Detalhes sobre a árvore Peroba. Disponível em: <http://wwwdetalhes.sobrearvoreperoba.htm>. Acesso em: 11/11/2006.

INTERNET 5: Comunicado Técnico Disponível em:  
<http://www.cpfac.embrapa.br/pdf/comunicado104.pdf> . Acesso em: 11/11/2006.

INTERNET 6: History of ancient Medicine in Mesopotamia & Iran. Disponível em: [www.iranchamber.com/history/articles/ancient\\_medicine\\_mesopotamia\\_iran.php](http://www.iranchamber.com/history/articles/ancient_medicine_mesopotamia_iran.php). Acesso em: 20/11/2007.

INTERNET 7: *Aspidosperma desmanthum* Specimen Map – The New York Missouri Botanical Garden. W<sup>3</sup> Tropicos. Disponível em: [http://www.mobot1.mobot.org/website/map\\_post.asp](http://www.mobot1.mobot.org/website/map_post.asp). Acesso em: 18/11/2006.

INTERNET 8: Photos-amarelão Disponível em: [ecofog.cirad.fr/slides/Amarelao%20Leaf.html](http://ecofog.cirad.fr/slides/Amarelao%20Leaf.html). Acesso em: 11/11/2006

ISHIKURA, M.; HINO, A.; YAGINUMA T.; AGATA, I.; KATAGIRI, O. A Novel Entry to Pyrido[4,3-*b*]carbazoles: An Efficient Synthesis of Ellipticine. *Tetrahedron*. v 56, p. 193–207, 2000.

JACOME, R. L. R. P. ; OLIVEIRA, A. B. ; RASLAN, D. S. ; WAGNER, H. ESTUDO QUÍMICO E PERFIL CROMATOGRÁFICO DAS CASCAS DE *Aspidosperma parvifolium* A. DC. (“PAUPEREIRA”). *Química Nova*, v.27, n. 6, p.897- 900, 2004.

KURODA, M.; MIMAKI, Y.; KAWASE, N.; YOKOSURA, A. SASHIDA, Y.; KAGIYA, A. Citotoxic alkaloids from the barks of *Ochrosia elliptica*. *Natural Medicines*, v. 53, p. 272, 1999.

LAMBROS, C.; VANDERBERG, J.P. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocyte stages in culture. J. Parasitol., v. 65, p. 418-420, 1979.

LE MEN, J.; TAYLOR, W. I. A uniform numbering system for indole alkaloids. Experientia, v. 21, p. 508-10, 1965.

LORENZI, H. Árvores Brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil, 1992.

LYON, R. L.; FONG, H. H. S. Biological and Phytochemical evolutions of Plants. XI. Isolation of Aspidospermine, Quebracahamine, Rhazinilam, (-) Pyrifolidine and Akuammidine from *A. quebracho-blanco*, v. 62, p. 218, 1973.

MANN, J.; DAVIDSON, R.S.; HOBBS, J.B.; BANTHORPE, D.V.; HARBORNE, J.B. *Natural Products: Their Chemistry and Biological Significance*; Essex: Addison Wesley Longman Limited, p.389-395, 1993.

MARCONDES-FERREIRA, W. & KINOSHITA, L. S. Uma nova divisão infragenérica para *Aspidosperma* Mart. (Apocynaceae). Revista Brasileira de Botânica, v.19, 203-214, 1996.

MARTIUS, C.F.P. Ankündigung der Fortsetzung eines Werkes über brasilianische Pflanzen. *Flora*, Jena 7 Beil, v.4, p. 129-42, 1824 a.

MARTIUS, C.F.P. *Nova genera et species plantarum*. Typis Caroli Wolf, Monachii, v.1, p. 57-60, 1824 b.

MAY, C.; MOODY, C.J. A concise synthesis of the antitumor alkaloids ellipticine. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, v. 14, p 926-7, 1984.

McLAUGHLIN, J. L., CHANG, C., SMITH, D. L. "Bench-Top". Bioassays for the Discovery of Bioactive Natural Products: an update. In: *Studies in Natural Products Chemistry*, Elsevier Science, v. 9, p. 383-409, 1991

MCLEAN, S.; PALMER, K.; MARION, L. Isolation and Structure of a New Alkaloid: Aspidocarpine. *Can. J. Chem*, v. 38, p. 1547-1556, 1960.

MCLEAN, S.; REYNOLDS, W. F.; ZHU, X. Assignment of the  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  spectra of the structure and stereochemistry of the von Braun reaction product of aspidocarpine by 2D nmr spectroscopy. *Can J. Chem*, v. 65, p. 200, 1987.

MEDINA, J.D.; HURTADO, J.A. Alkaloids of *Aspidosperma exalatum* Monachino. Alkaloids of the Seeds. *Planta Medica*, v.32, p.130-132. 1977.

MEDINA, J.D.; HURTADO, J.A.; BURNELL, R.H. Structure of Fendispermine. Rev. Latinoam. Quim. , v.4, p.73, 1973.

MIERS, J. On the Apocynacea of South America. Williams and Norgate, London, 1878.

MILLIKEN, W. Plants for Malaria Plants for fever: Medicinal species in Latin America-a bibliographic survey. Kew: the Royal Botanic Gardens. Monografia. The Royal Botanic Gardens, 27, 1997.

MIRANDA, E.C.; BLECHENT, S. Gilbertin, a New Type of Indole Alkaloid. Tetrahedron Lett, v. 23, p. 5359, 1982.

MIRANDA, E.C.; BRIESKORN, C.H.; BLECHENT, S. Isolation and Synthesis of 5-ethyl-2-methyl-11- pyrido [3,4-a]-carboline hydroxide a New Alkaloid type from *Aspidosperma gilbertii*. Chem. Ber., v. 113, p. 3245, 1980.

MITAINE, A.C.; MESBAH, K.; RICHARD, B.; PETERMANN, C.; ARRAZOLA, S.; MORETTI, C.; ZÈCHES-HANROT, M.; MEN-OLIVER, L.L. Alkaloids From *Aspidosperma* Species From Bolivia. *Planta Medica*; v.62; 458-461.1996.

MITAINE, A.C.; WENIGER, B.; SAUVAIN, M.; LUCUMI, E.; ARAGÓN; ZÈCHES-HANROT, M. Indole Alkaloids from the Trunk of *Aspidosperma megalocarpon*. *Planta Medica*; v.65, p.487.1998.

MITAINE-OFFER, A.C.; SAUVAIN, M.; VALENTIN, A., CALLAPA, J.; MALLIÉ, M.; ZÈCHES HANROT, M. Antiplasmodial activity of *Aspidosperma* Indole Alkaloids. *Phytomedicine*, v. 9, p.142-145.2002.

MOREIRA, F.F.; MENDONÇA, C.B.F.; PEREIRA, J. F. Palynotaxonomy Of The Species Of The Apocynaceae Occur On The "Restinga" Of The Carapebus, Carapebus, Rio De Janeiro State, Brazil. *Acta Botanica. Brasiliensis*; v.18, p.711-721, 2004.

MUELLER, J. Apocynaceae. In Flora brasiliensis (C. F. P. de Martius, ed). Frid. Fleischer in comm., Lipsiaep, v.6, p. 1-196, 1860.

NEUSS, N.; ELY LILLY.; COMPANY, INDIANAPOLIS 6. INDIANA, U.S.A Physical Data of Indole and Dihydroindole Alkaloids. Edn. 1954,1956,1960,1961 e 1962.

NEWMAN, D.J.; GORDON, M.C.; SNADER, K.M.The Influence of Natural Products Upon Drug Dicoverly. *Natural Products Reports*, v.17, p.215-234, 2000.

OLIVEIRA A.J.B. Estudo de seis Espécies do Gênero *Aspidosperma* Utilizando GC, GC/MS e HPLC: Análise Qualitativa e Quantitativa. Teste Bioautográfico; cultura de Tecidos e Células Vegetais e rota de Preparação dos Compostos Diméricos Ramiflorina A e Ramiflorina B. Universidade de Campinas, Campinas. Tese (Doutorado em Química Orgânica); Curso de Pós-Graduação em Química Orgânica, 1999.

ORAZI, O.; CORRAL, R. A.; HOLKER, J.S.E.; DJERASSI, C. Isolation of Quebrachamine and a New Dihydroindole Alkaloids Spegazzinine, from *Aspidosperma chakensis* Spefazzini, v. 21, p. 979, 1956.

PAOLETTI, C.; LESCA, C.; CROS, S.; MALVY, C.; AUCLAIR, C. Ellipticine and derivatives induce breakage of L1210 cells DNA *in vitro*. *Biochemical Pharmacology*, v. 28, p. 245-50, 1979.

PEDERSEN, J.M.; BOWMAN, W.R.; ELSEGOOD, M.R.J.; FLETCHER, A.J.; LOVELL, P.J. Synthesis of Ellipticine : A Radical Cascade Protocol to Aryl- and Heteroaryl-Annulated[b]carbazoles. *J. Org. Chem*, v. 70, p. 10615-18, 2005.

PEREIRA, M.M; SOUZA JÚNIOR, S.N.;ALCÂNTARA, A.F.C.; PILO-VELOSO,D.;ALVES, R.B.; MACHADO P.O.; AZEVEDO, A.O.; MOREIRA, F. H.; CASTRO, M.S.A.; RASLAN, D.S. Constituintes químicos e estudo biológico de *Aspidosperma nitidum* (Apocynaceae). Rev.Bras.Pl.Méd.,Botucatu, v. 8, n. 3, p. 1-8, 2006.

PICHON, M. Classification des Apocynacées VII. Genre *Aspidosperma*. Bull Mus. Natn. Hist. Nat. 2. série, v. 19, p. 326-369, 1947.

PIO CORREA, M. Dicionário das plantas úteis do Brasil: e das exóticas cultivadas. v. 1-6, 1984.

RATHELOT, P.; VANELLE, P.; GASQUET, M.; DELMAS, F.; CROZET, M.P.; TIMON-DAVID, P.; MALDONADO, J. Synthesis of novel functionalized 5-nitroisoquinolines and evaluation of *in vitro* antimalarial activity. Eur. J. Med. Chem., v. 30, p. 503-508, 1995.

RELYVELD, P. Dissertation, Utrecht (1966) *apud* HESSE, M. Springer, Berlin, v. II, p. 183, 1964.

RIBEIRO, J. E.L.S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. S.; BRITO, J. M.; SOUZA, M. A. D.; MARTINS, L. H.; LOHMANN, L. G.; ASSUNÇÃO, P. A. C. L.; PEREIRA, E. C.; SILVA, C. F.; MESQUITA, M. R.; PROCÓPIO, L. Flora da Reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central. Manaus: INPA, DIFID, 798p., 1999;

ROBERT, G.M.T.; AHOND, A.; POUPAT, C.; POTIER, P. *Aspidosperma* de Guyane: Alkaloïds de *Aspidosperma marcgravianum*. *Journal of Natural Products*; v.46, p.694-707.1983.

ROJAS, R.; BUSTAMANTE, B.; BAUER, J.; FERNANDEZ, I.; ALBAN J.; LOCK, O.; Antimicrobial activity of select peruvian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 88, p. 199-204, 2003.

SAKAMOTO-HOJO, E.T.; TAKAHASHI, C.S.; FERRARI, I.; MOTIDOME, M. Clastrogenic effect of the plant alkaloid ellipticine on bone marrow cells of Wistar rats and on human peripheral blood lymphocytes. *Mutat Res.*, v. 199, v. 1, p. 11-19, 1988.

SANCHEZ, L.; WOLFANGO, E.; BROWN, KEITH, S. JR. Two New  $\beta$ -carboline Alkaloids from *Aspidosperma exalatum*. *An. Acad. Brasil. Cienc.*, v. 43, p. 3-4, 1971.

SANTOS, J.C.S.; SILVA, R.M.C.; ESTEVES, T.B.C.; ALMEIDA, C.F.B.R.;  
ALBUQUERQUE, U.P.; AMORIM, E.L.C.; MELO, A.M.M.; AMÂNCIO, F.F.;  
SCHWARTZ, M.O.E.; LIMA, C.S.A. Atividade moluscida e cercaricida de plantas do  
semi-arido pernambucano. XVII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, p. 124,  
2004.

SANTOS, S.R.; TANUS RANGEL, E.; LIMA, J.C.S.; MARTINS, D.T.O. Avaliação da  
atividade antiinflamatória do extrato hidroalcoólico de *Aspidosperma subcanum*  
Mart. XVII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, p. 141, 2004a.

SANTOS, S.R.; TANUS RANGEL, E.; LIMA, J.C.S.; MARTINS, D.T.O. Avaliação da  
atividade antinociceptivo do extrato hidroalcoólico de *Aspidosperma subcanum*  
Mart. XVII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, p. 141, 2004b.

SCARPA, G.F.; Medicinal plants used by the Criollos of Northwestern Argentine  
Chaco. Journal of Ethnopharmacology, v. 91, p. 115-135, 2003.

SCHMUTZ, J.; HUNZIKER, F.; HIRT, R. Alkaloids of *Aspidosperma olivaceum*. Helv.  
Chim. Acta, v. 33, p. 341, 1958.

SCHNOES, H. K.; BURLINGAME, A. L.; BIEMANN, K. Application of Mass  
Spectrometry to Structure Problems: The occurrence of Eburnamenine and Related  
Alkaloids in *Rhazya stricta* and *Aspidosperma quebracho-blanco*, v. 22, p. 485,  
1962.

SCHULTES E. R. De Plantis Toxicariis e Mundo Novo Tropicale Commentationes. XIX. Biodynamic apocynaceous of northwest Amazon. Journal of Ethnopharmacology, v. 1, p. 165-92, 1979.

SCHUMANN, K. Apocynaceae. In Die naturlichen Pflanzenfamilien, v.4 pt 2 (A. Engler & K. Prantl, ed). Leipzig, Wilhelm Engelmann, p. 109-189, 1895.

SENBLAD, B.; BREMER, B. The familial and subfamilial relationship of Apocynaceae and Asclepiadaceae evaluated with *rbcL* data. PL. Syst. Evol., 202. p. 153-175, 1994.

SIDDIQUI, S.; HAIDER, S.I.; AHMAD, S. SALMAN.; SULTANA, N. The alkaloids of Rauwolfia. Pakistan Journal Sci. Ind. Res, v. 30, n.1, p. 71-80, 1987.

SILVA, V. R. C.; LOBO, A. M.; CUNHA, P. G.; OLIVEIRA, C. I. F.B. Efeito do extrato aquoso de *aspidosperma carapanauba* nas lesões gástricas induzidas por indometacina em ratos da espécie wistar. 2006.

SILVERSTEIN, R. M., WEBSTER, F.X. Identificação espectroscópica de compostos orgânicos. 6 ed, Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 460 pg., 2000.

SIMÕES & S. KINOSHITA. The Apocynaceae s. str. of the Carrangas Region, Minas Gerais, Brazil. Darwiniana. v. 10. 2002.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P. de.; MENTZ, A. L.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia da planta ao medicamento. 3º ed. Rio Grande do Sul: Editora da Universidade, 2001.

SOUZA, A.C.M.; SOUZA, L.K.H.; SILVA, M.R.R.; OLIVEIRA, C.M.A.; KATO, L.; SILVA, C.C.; TANAKA, J.C.A.; OLIVEIRA, A.J.B. Propriedades antifúngicas dos alcalóides de *Aspidosperma ramiflorum*. 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2006.

SPITELLER G.; SPITELLER-FRIEDMANN, M. Anwendung der Massenspektrometrie zur Strukturaufklärung von Alkaloiden, 1. Mitt. Monatsh. Chem., v. 93, p. 795, 1962.

STAERK D.; NORRBY, P.; JAROSZEWSKI, J.W. 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 Groups. J. Org. Chem, v. 66, p. 2217-2221, 2001

STOWELL, J.G. Total synthesis of ellipticine, a pyridocarbazole alkaloids of *Ochrosia elliptica*, labill, 142 pp, 1982.

TANAKA, J.C.A.; SILVA, C. da C.; OLIVEIRA, A. J. B.; FILHO, B.P.D.; AKAMURA, C. V. Atividade antibacteriana dos alcalóides indólicos de *Aspidosperma ramiflorum*. 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2006.

THOMAS, D. W.; SCHNOES, H. K.; BIEMANN, K. Alkaloids of three *Aspidosperma neblinae*. An Application of a directly Coupled Gas Chromatograph-Mass Spectrometer, *Experientia*, v. 25, 1969.

TORRES, A. L.; JÚNIOR A. L.B.; MEDEIROS, C.A.M.; BARROS, R. Effect of aqueous extracts of *Azadirachta indica* (A. Juss), *Melia azedarach* (L.) and *Aspidosperma pyriformis* (Mart.) on the development and oviposition of *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). *Bragantia* vol.65 n..3, 2006.

TRAGER, W.; JENSEN, J.B. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, v. 193, p. 673-675, 1976.

URREA, M., AHOND, A., HENRI, J., KAN, S. K., POUPAT, C., POTIER, P., JANOT, M. M., A New alkaloids Extracted from the seeds of *Aspidosperma album* (Vahl) R. Benth. (Apocynaceae). *Compt Rendn. Sc. Ser. C*, 287, 1978.

VAN BECK, T. A. Pharmacognostical studies of some *Tabernaemontana* species. Leiden: Leiden University, Ph Thesis, 164p, 1984.

VAN BECK, T. A.; VAN GESSEL, M. A. J. T. Alkaloids of *Tabernaemontana* Species. In: PELLETTIER, S.W. (ed). *Alkaloids: chemical and biological perspectives*. New York: John Wiley, v.6, 1988.

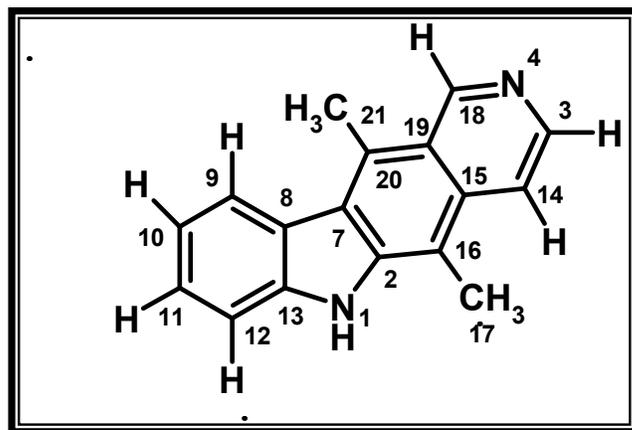
VERPOORTE, R.; KOS-KUYCK, E.; C. TJIN A TSOI. ; RUIGROK, C.L.M.; G. de JONG.; SVENDSEN, A. B. Antimicrobially Active Alkaloids from *Aspidosperma excelsum*. Journal of Medicinal Plant Research, v. 48, p. 283-289, 1983.

VERPOORTE, R.; RUIGROK, C.L.M.; G. de JONG.; SVENDSEN, A. B. Antimicrobially Active Alkaloids from *Aspidosperma marcgravianum*. Journal of Medicinal Plant Research. v, 46, p. 149-152, 1982.

WENIGER, B.; ROBLEDO, S.; ARANGO, G.J.; DEHARO, E.; ARAGON R.; MUNOZ, V.; CALLAPA, J.; LOBSTEIN, A.; ANTON, R. Antiprotozoal activities of colombian plants. Journal of Ethnopharmacology, v. 78, p. 193-200, 2001.

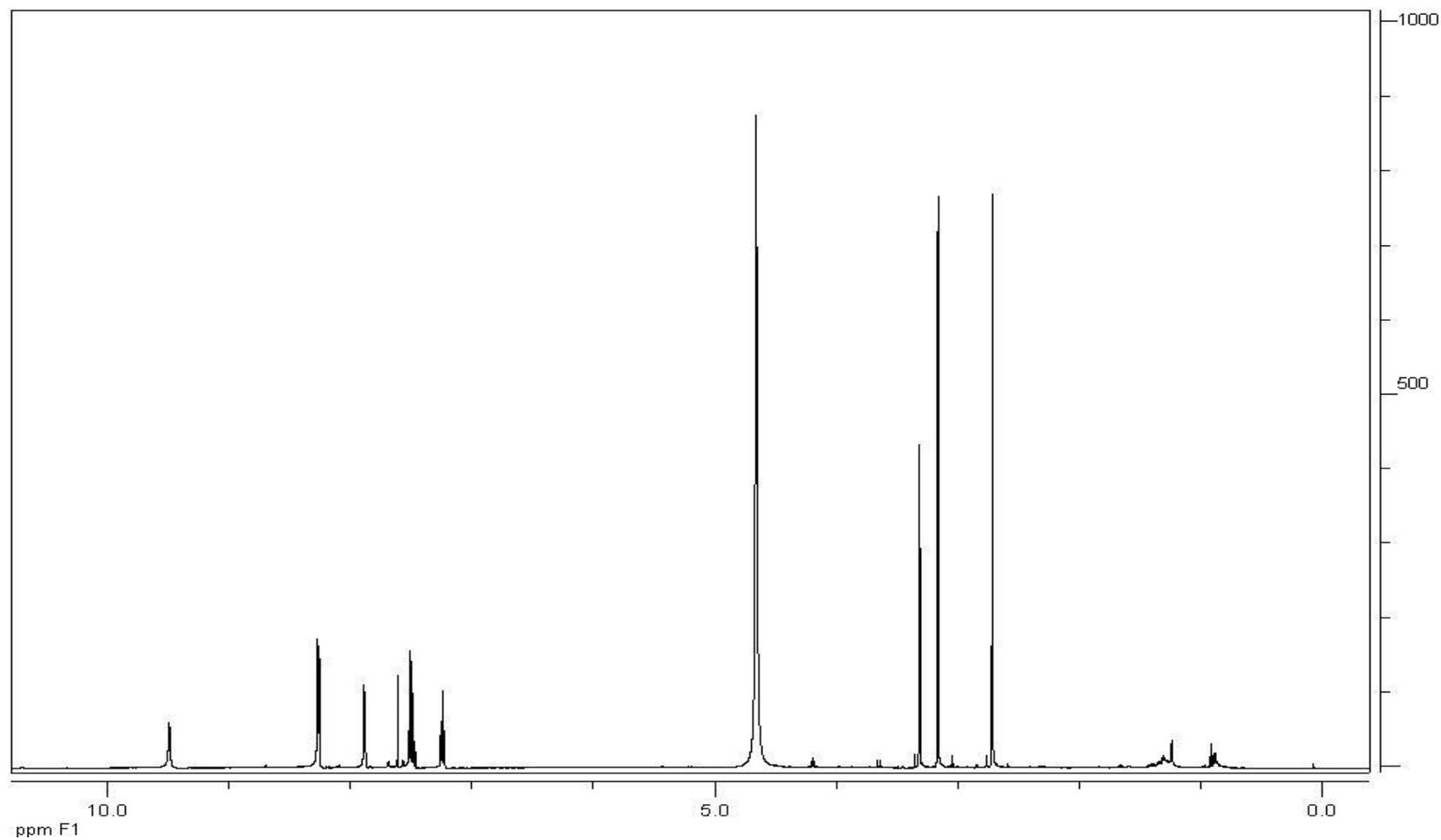
WOODSON, R.E., Jr. Studies in the Apocynaceae VIII. An interim Revision of the Genus *Aspidosperma* Mart. & Zucc. Ann. Mo. Bot. Gdn, v. 38, 119-204, 1951.

**ANEXOS**

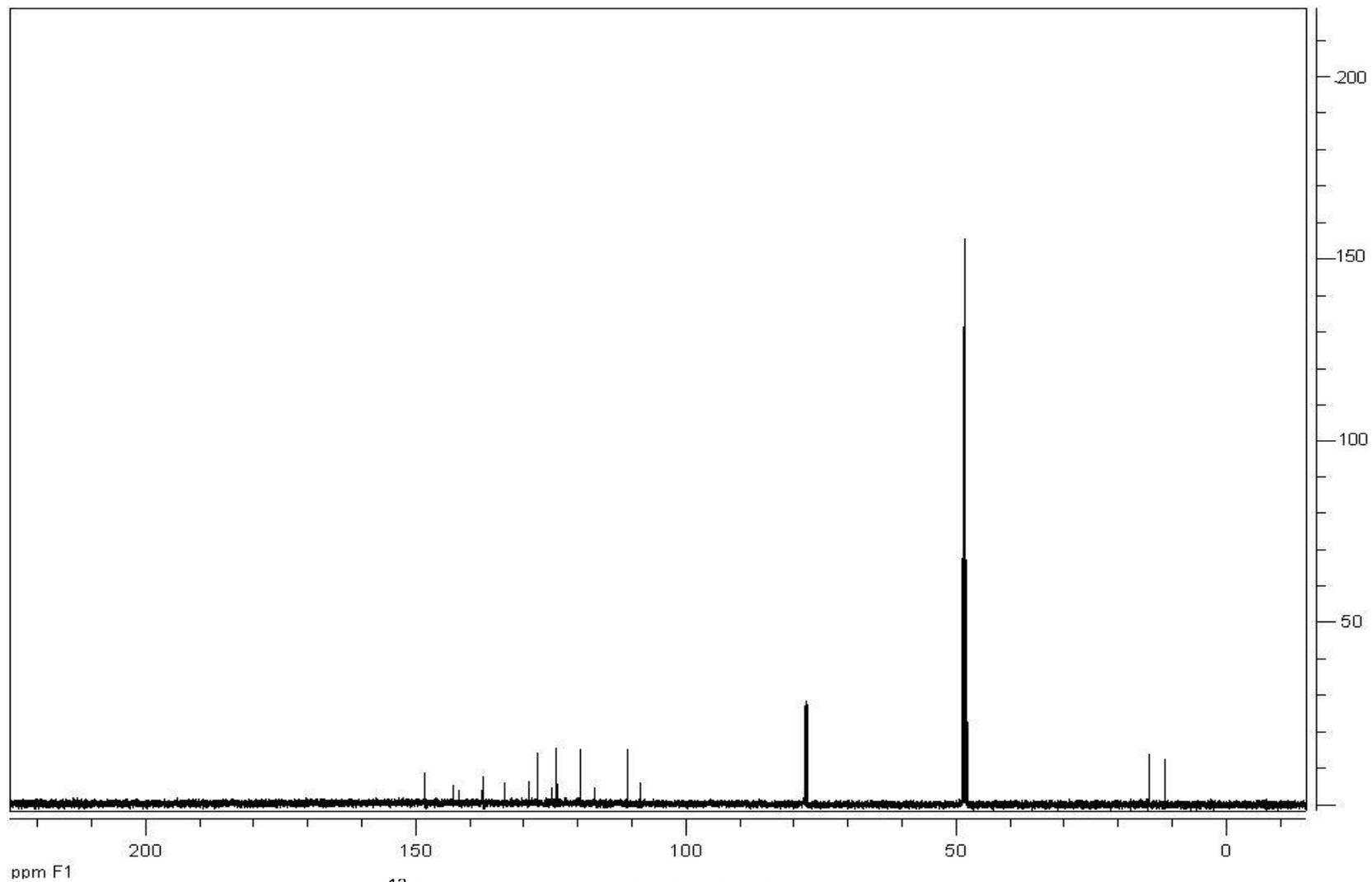


---

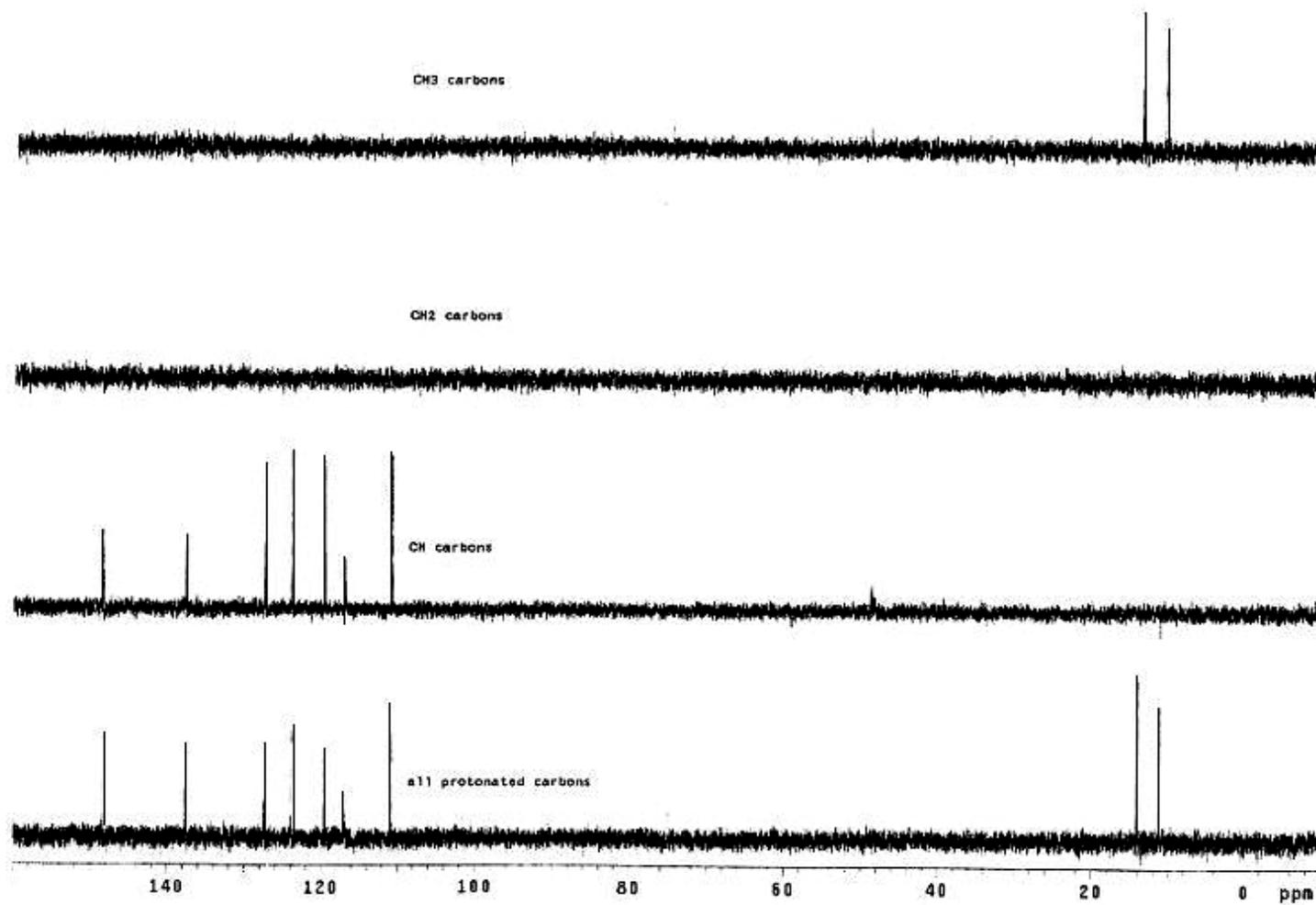
**ELOPTICINA**



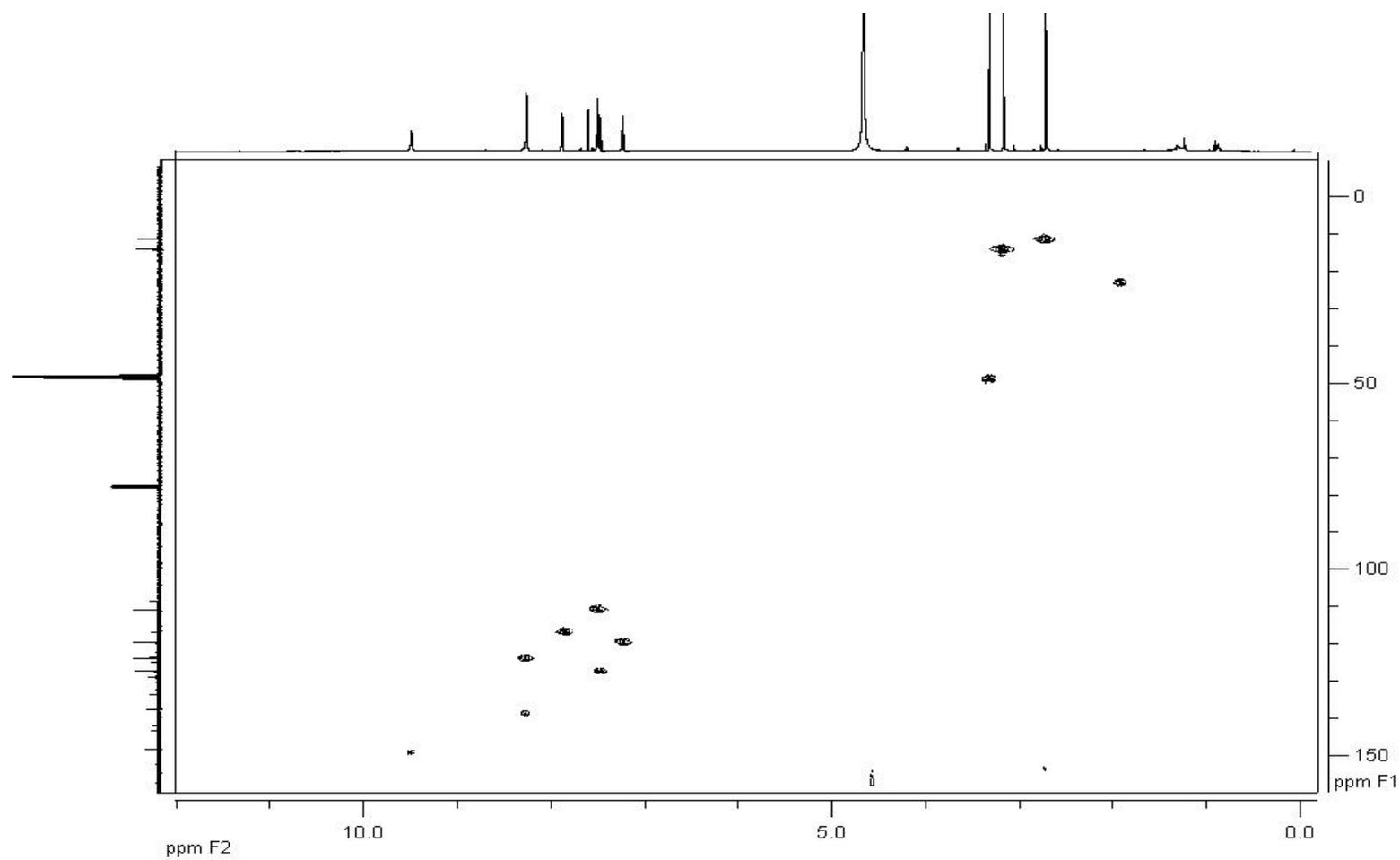
**Anexo 1.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de 500 MHz em  $\text{CDCl}_3$ :  $\text{CD}_3\text{OD}$  (1:1) do alcalóide 1 (elipticina).



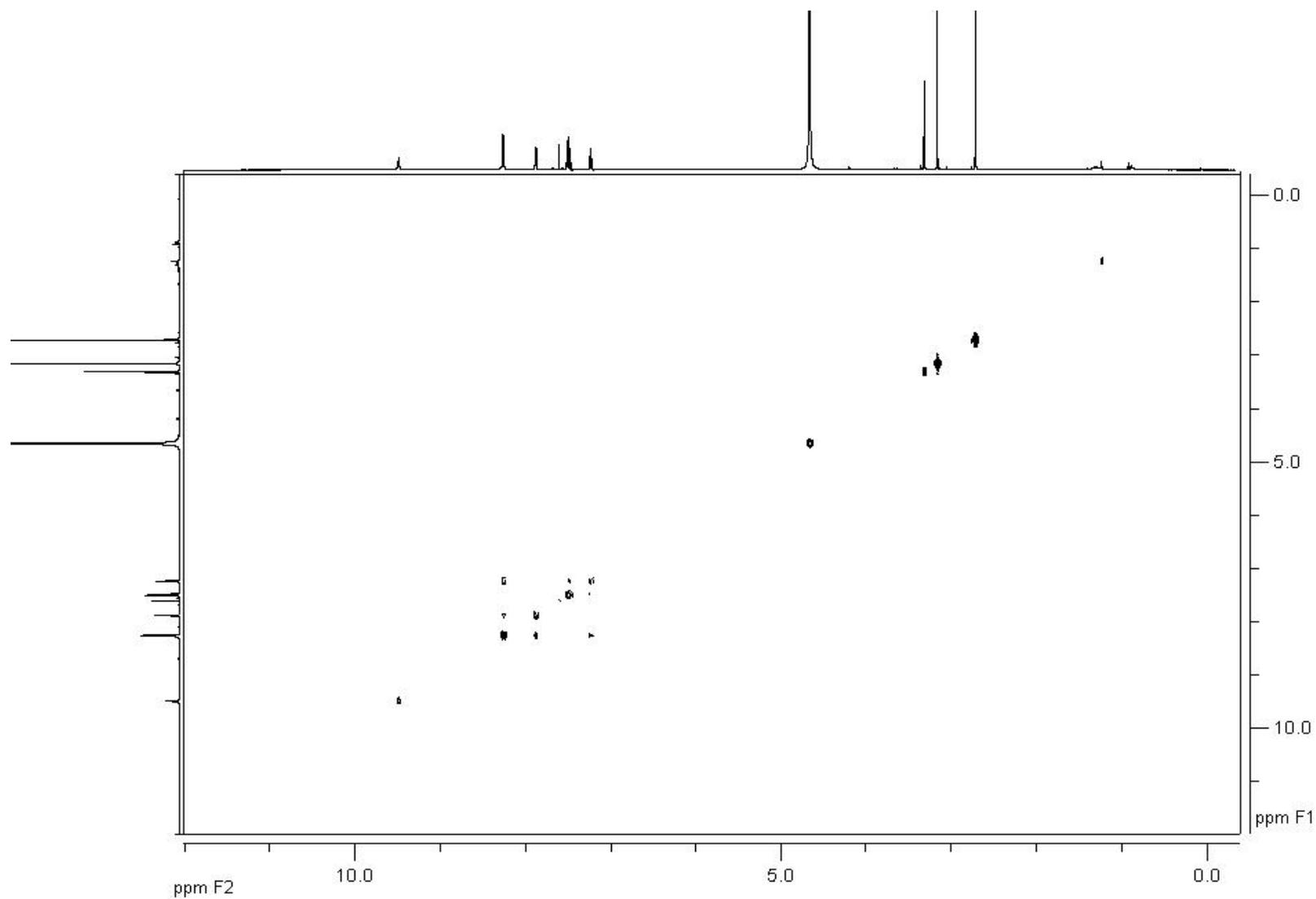
**Anexo 2.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de 125 MHz em  $\text{CDCl}_3$ :  $\text{CD}_3\text{OD}$  (1:1) do alcalóide 1 (elipticina).



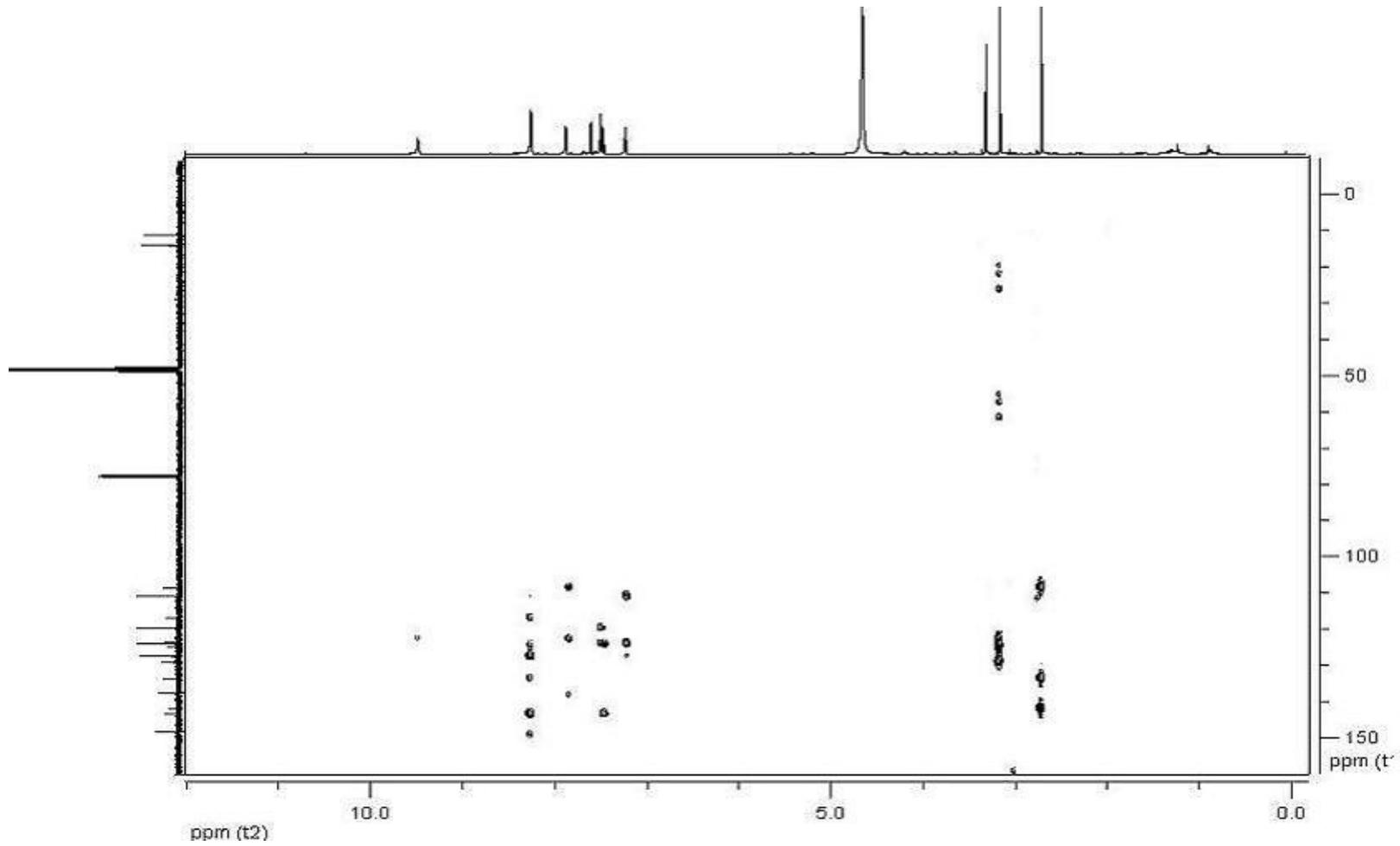
**Anexo 3.** Espectro de DEPT de 125 MHz em CDCl<sub>3</sub>: CD<sub>3</sub>OD (1:1) do alcalóide 1 (elipticina).



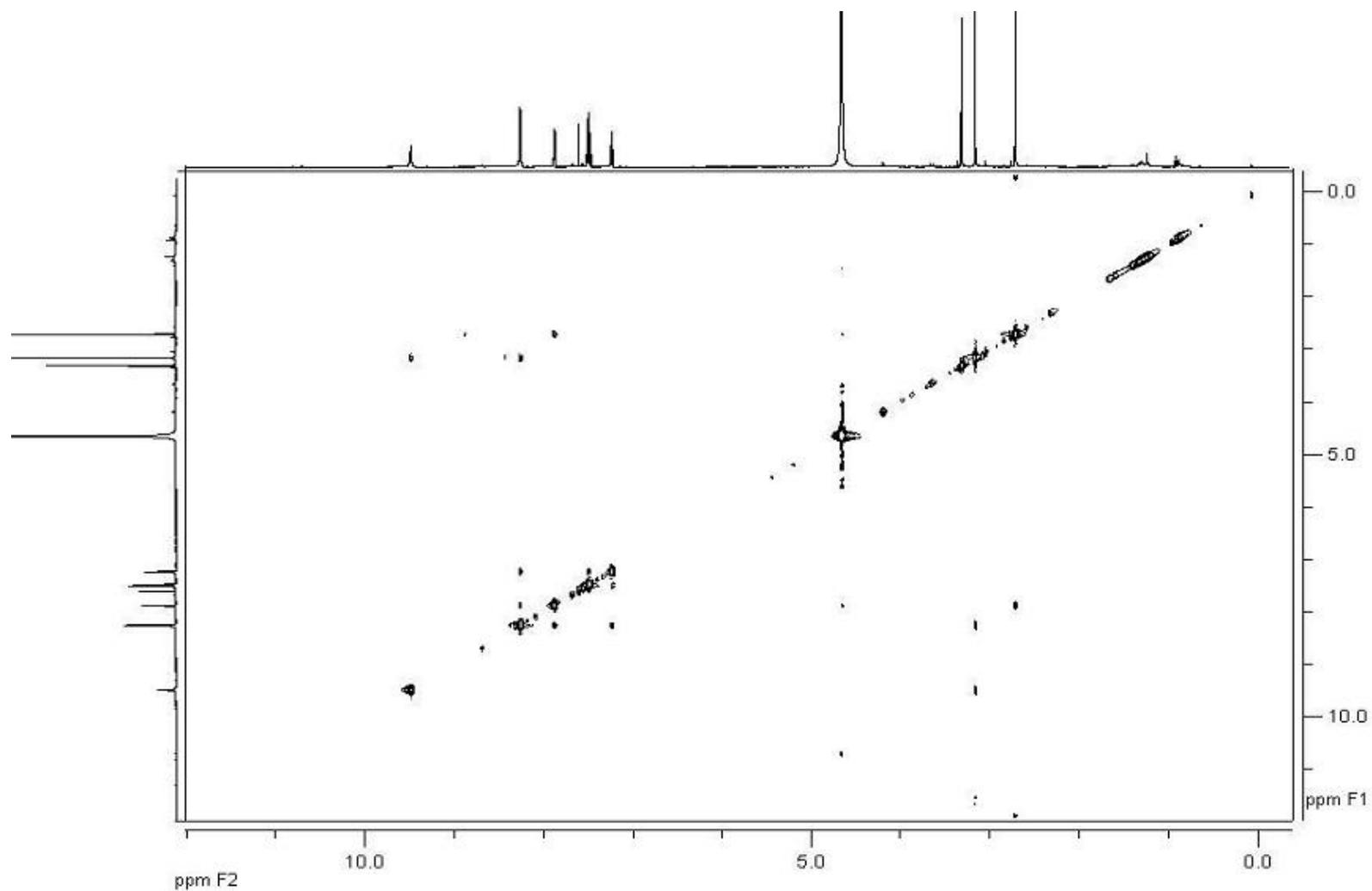
**Anexo 4.** Espectro de HSQC em  $\text{CDCl}_3$ :  $\text{CD}_3\text{OD}$  (1:1) do alcalóide 1 (elipticina).



**Anexo 5.** Espectro de COSY em  $\text{CDCl}_3$ :  $\text{CD}_3\text{OD}$  (1:1) do alcalóide 1 (elipticina).

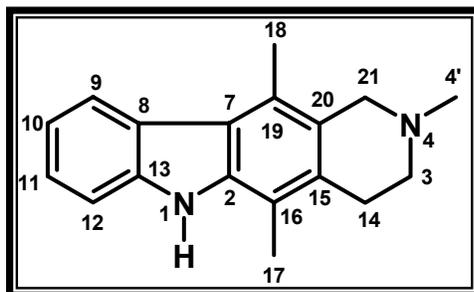


**Anexo 6.** Espectro de HMBC em  $\text{CDCl}_3$ :  $\text{CD}_3\text{OD}$  (1:1) do alcalóide 1 (elipticina).



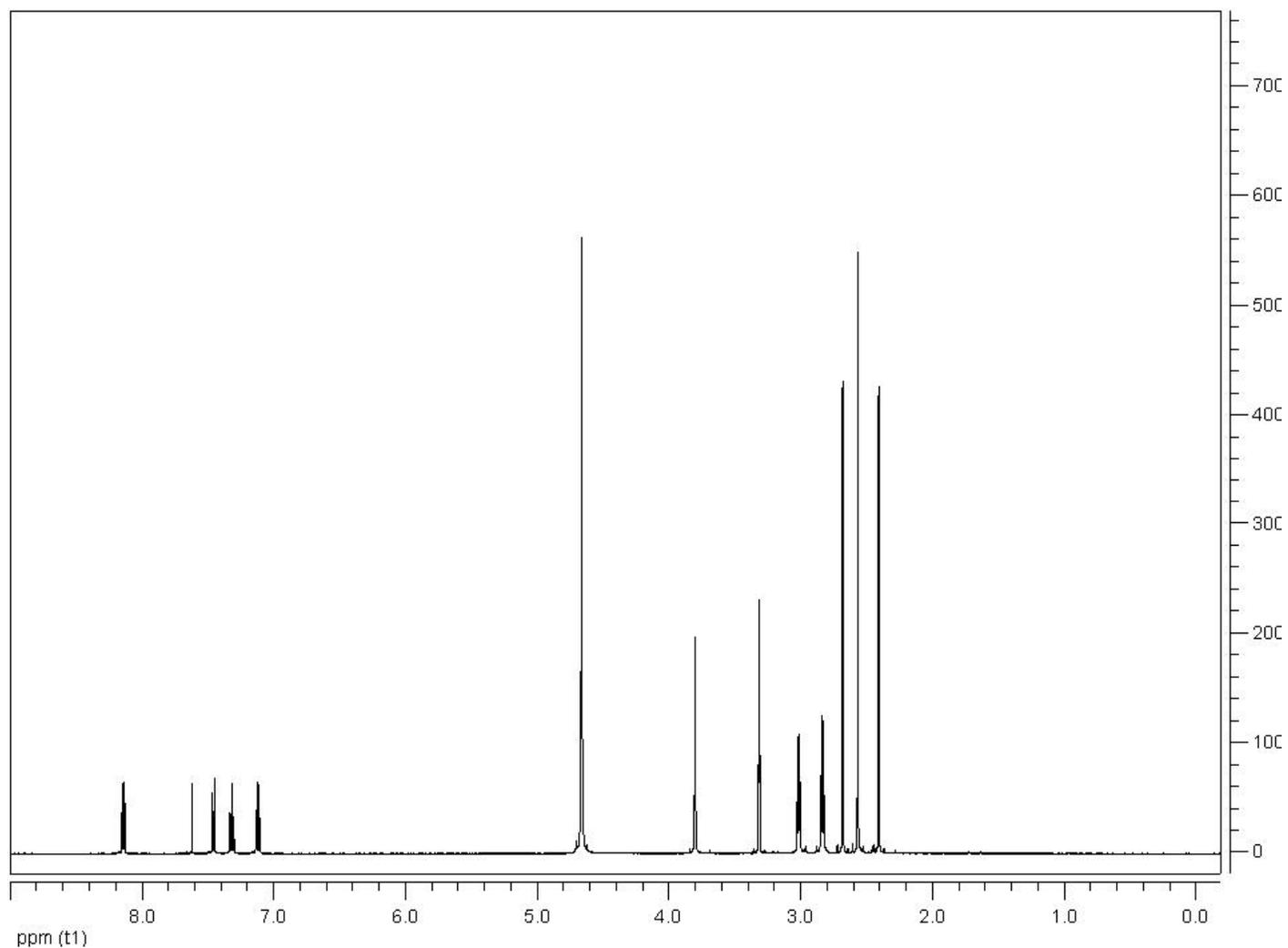
**Anexo 7.** Espectro de NOESY em CDCl<sub>3</sub>: CD<sub>3</sub>OD (1:1) do alcalóide 1 (elipticina).



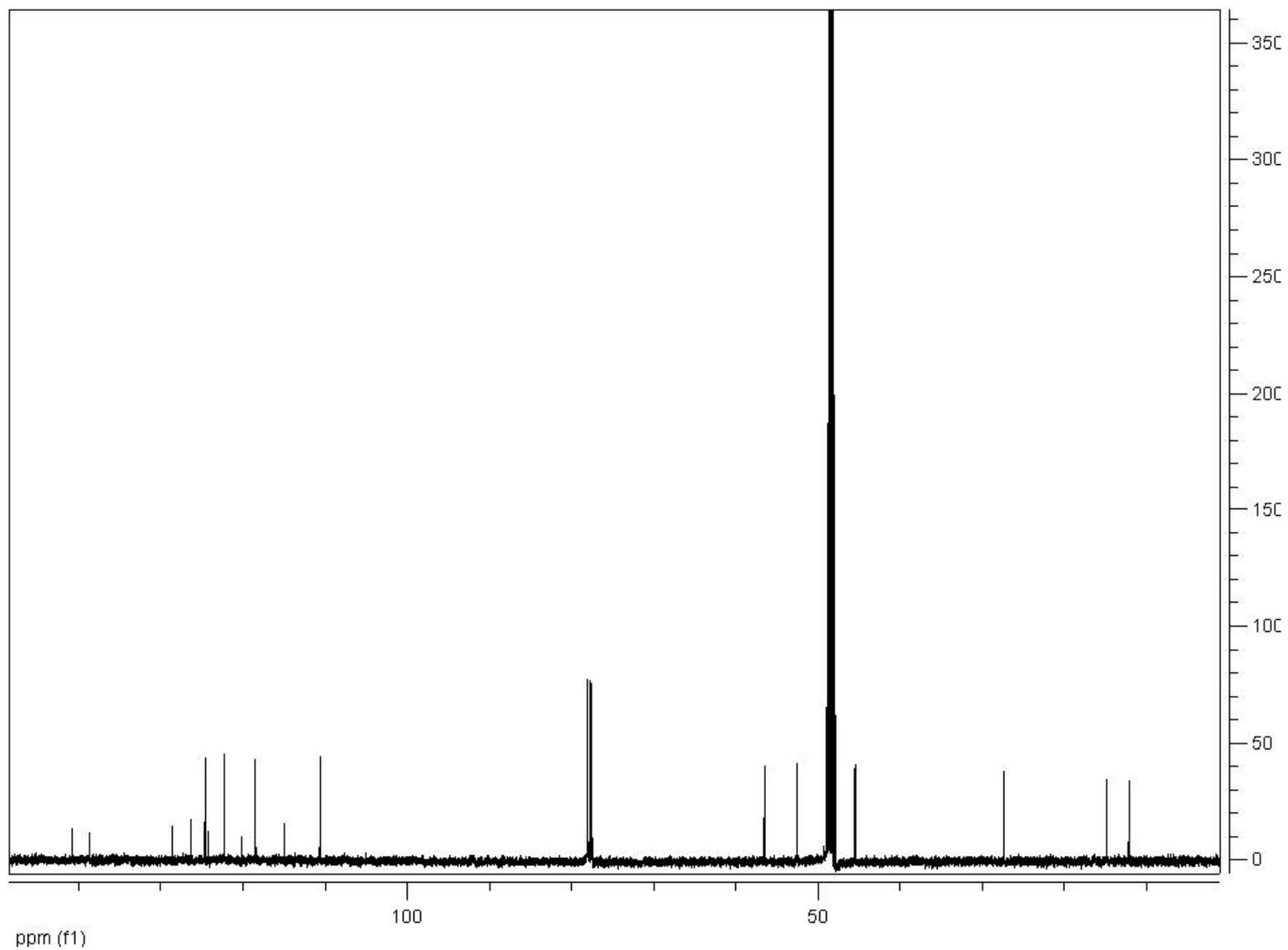


---

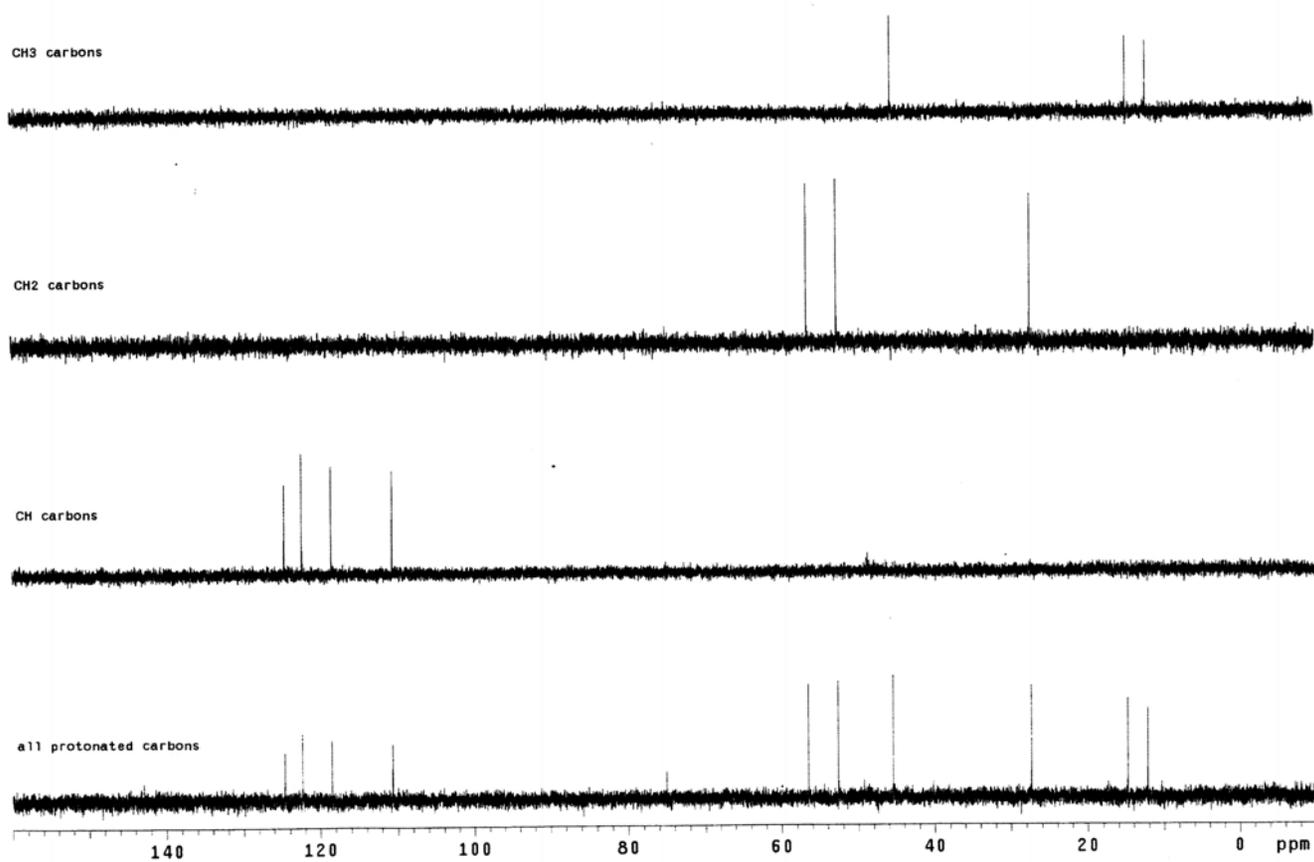
**N-METILTETRAIDROELIPTICINA**



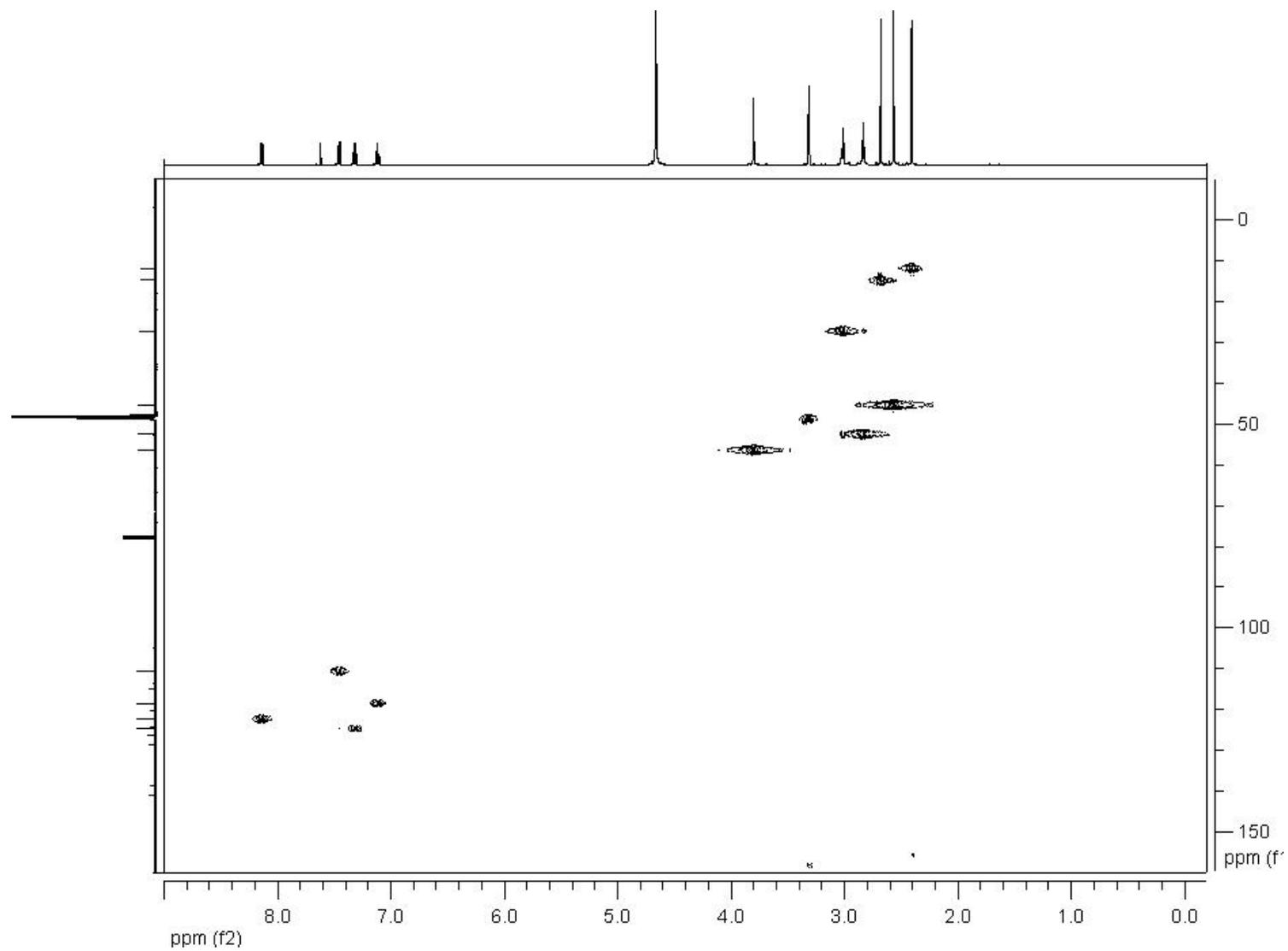
**Anexo 8.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de 500 MHz em CDCl<sub>3</sub>: CD<sub>3</sub>OD (7:3) do alcalóide 2 (N-metiltetraidroelipticina).



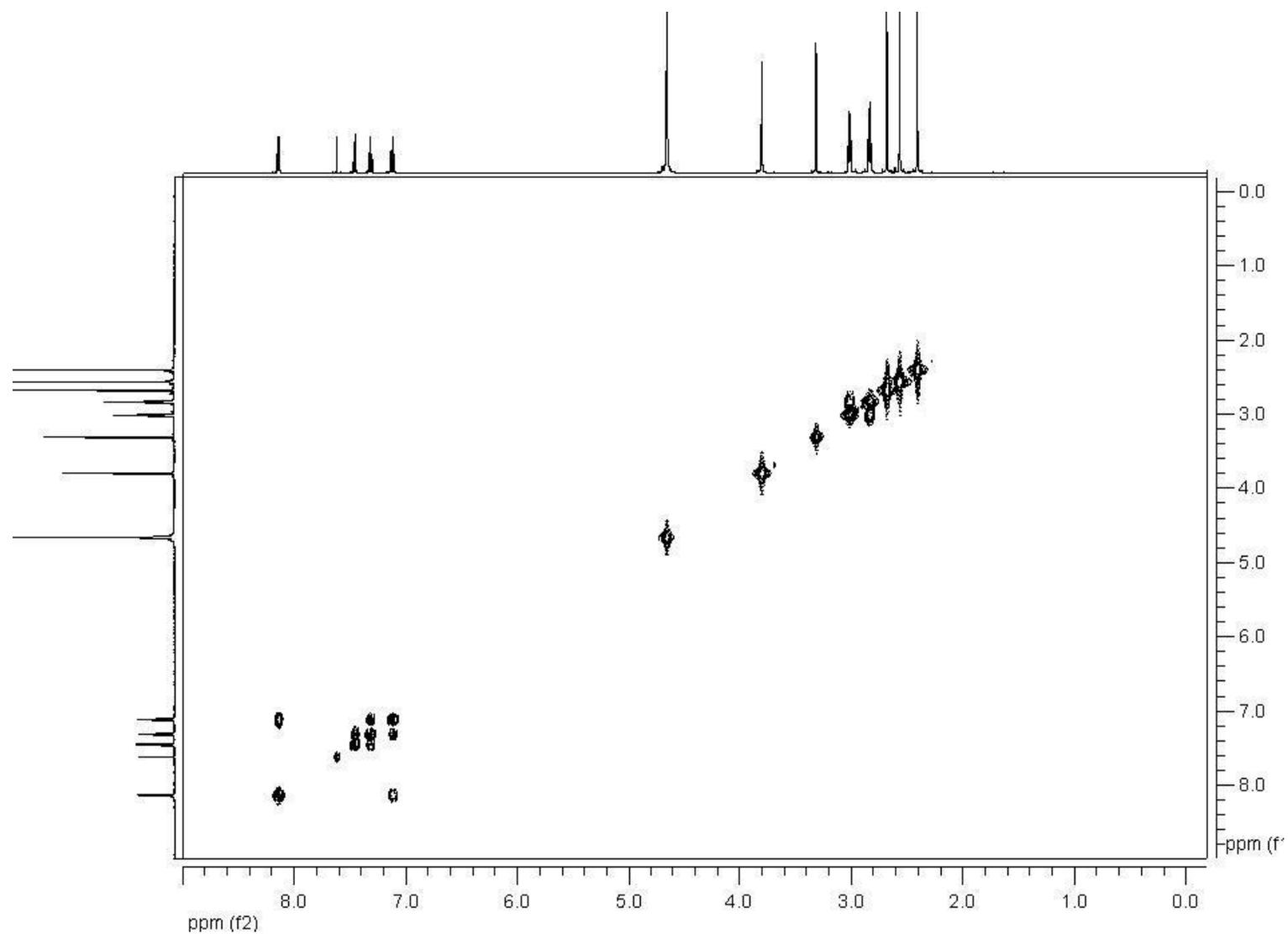
**Anexo 9.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de 125 MHz em  $\text{CDCl}_3$ :  $\text{CD}_3\text{OD}$  (7:3) do alcalóide 2 (N-metiltetraidroelipticina).



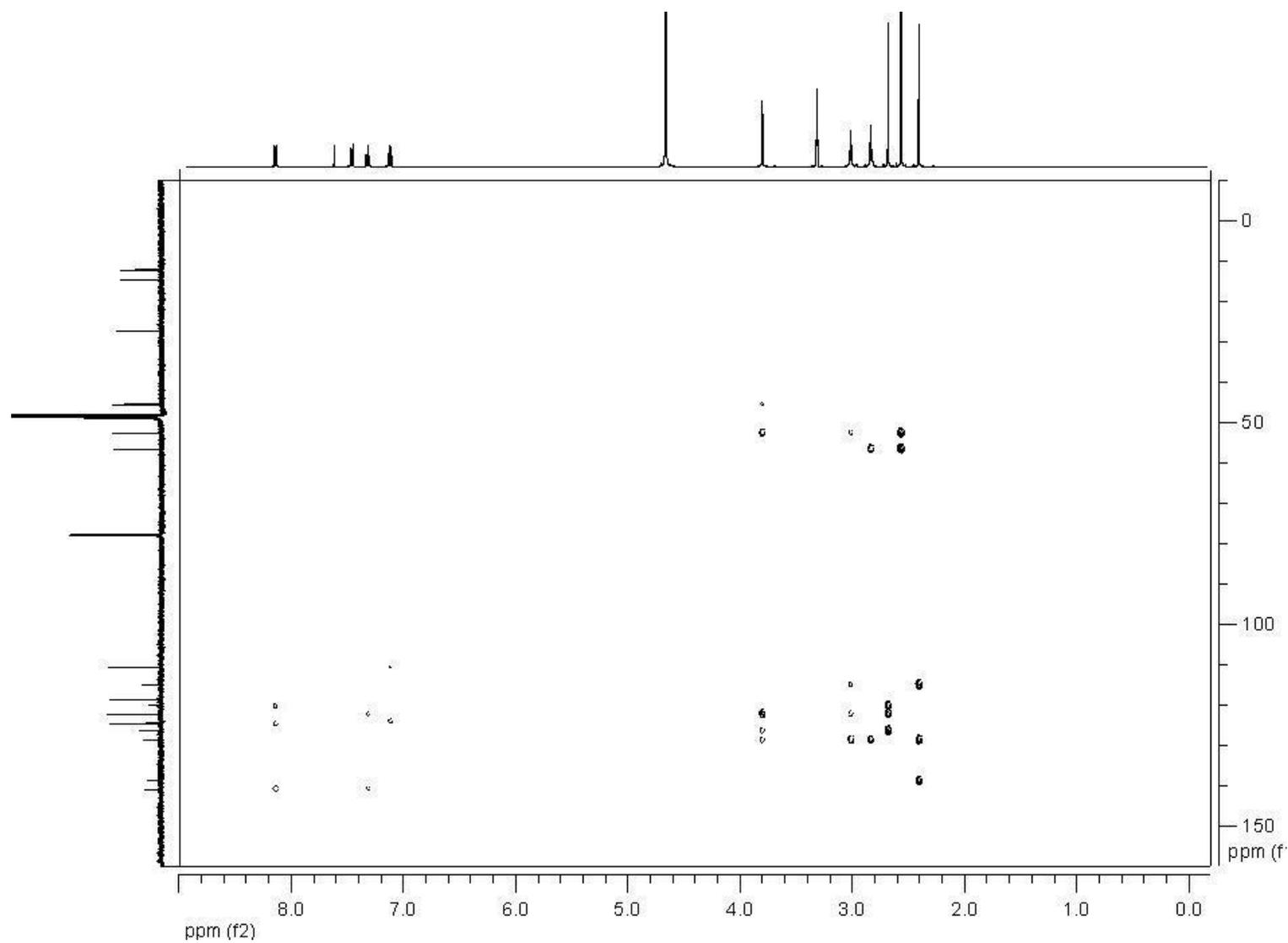
**Anexo 10.** Espectro de DEPT de 125 MHz em CDCl<sub>3</sub>: CD<sub>3</sub>OD (7:3) do alcalóide 2 (N-metiltetrahydroelipticina).



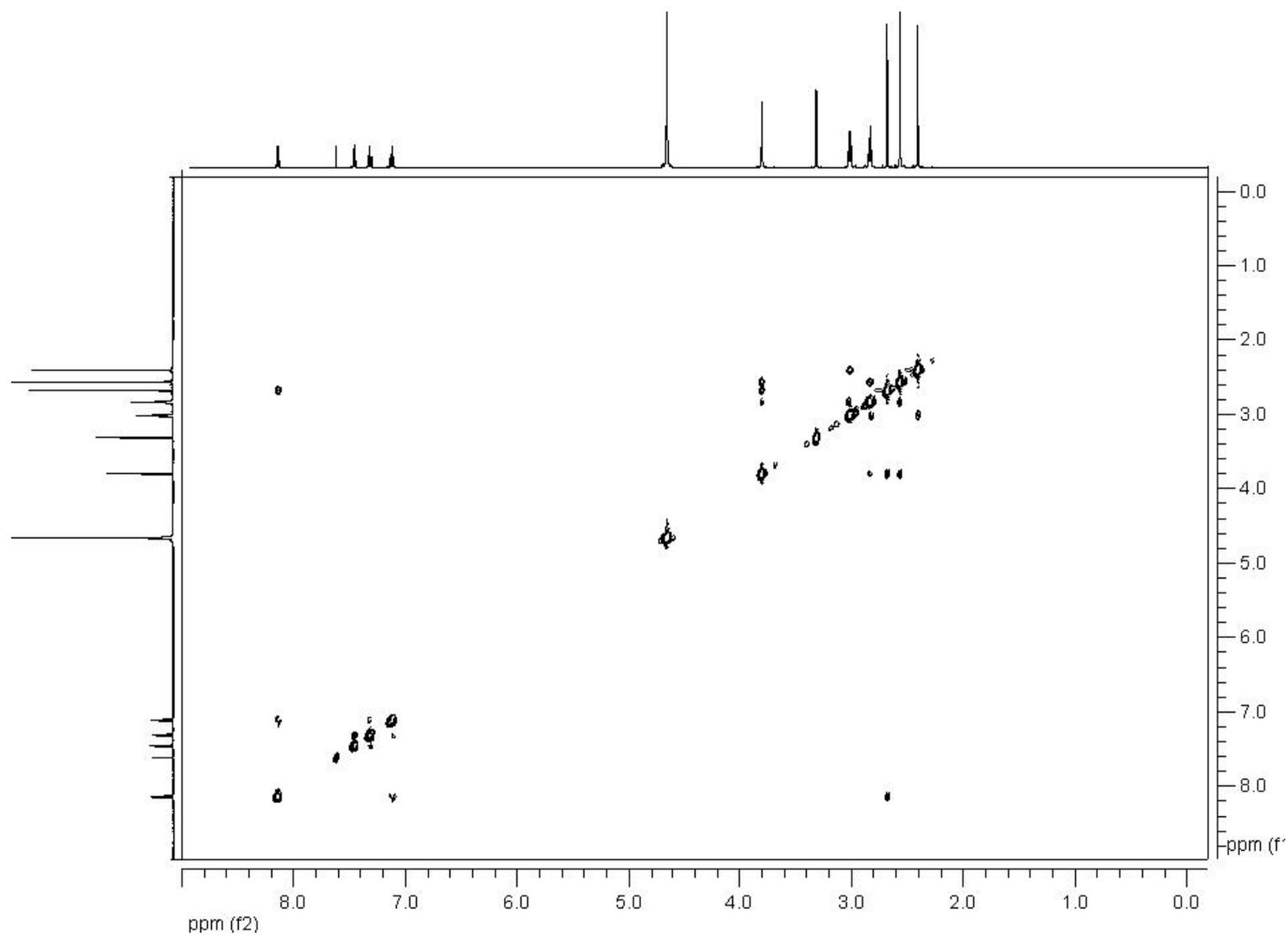
**Anexo 11.** Espectro de HSQC em  $\text{CDCl}_3$ :  $\text{CD}_3\text{OD}$  (7:3) do alcalóide 2 (N-metiltetrahydroelipticina).



**Anexo 12.** Espectro de COSY em  $\text{CDCl}_3$ :  $\text{CD}_3\text{OD}$  (7:3) do alcalóide 2 (N-metiltetraidroelipticina).

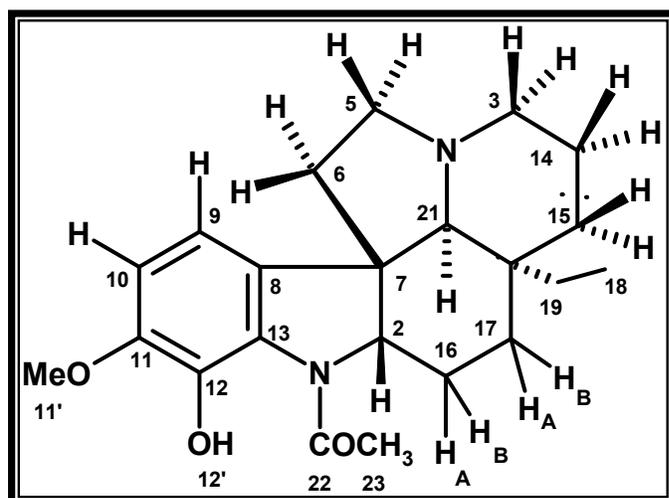


**Anexo 13.** Espectro de HMBC em  $\text{CDCl}_3$ :  $\text{CD}_3\text{OD}$  (7:3) do alcalóide 2 (N-metiltetrahydroelipticina).



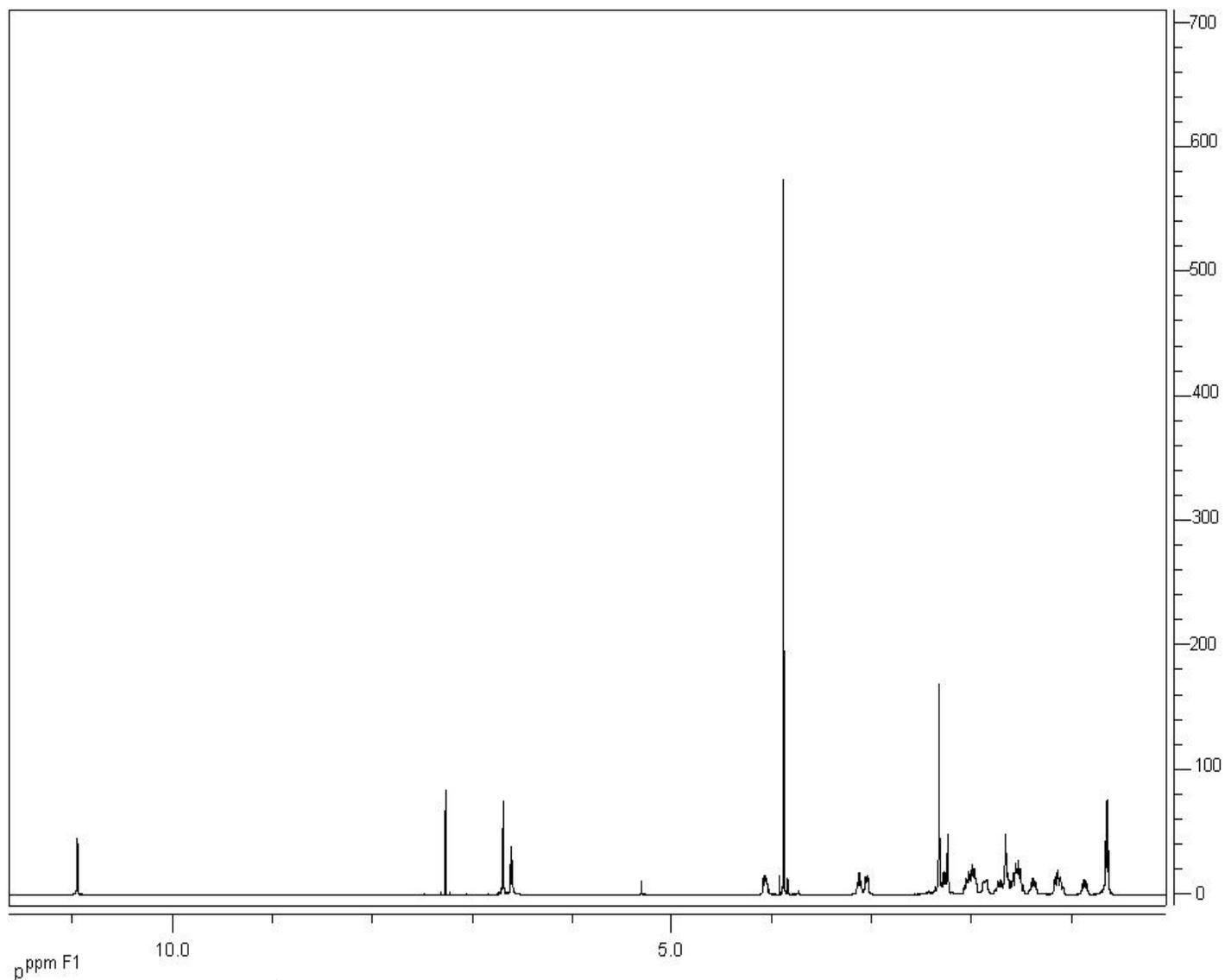
**Anexo 14.** Espectro de NOESY em  $\text{CDCl}_3$ :  $\text{CD}_3\text{OD}$  (7:3) do alcalóide 2 (N-metiltetraidroelipticina).



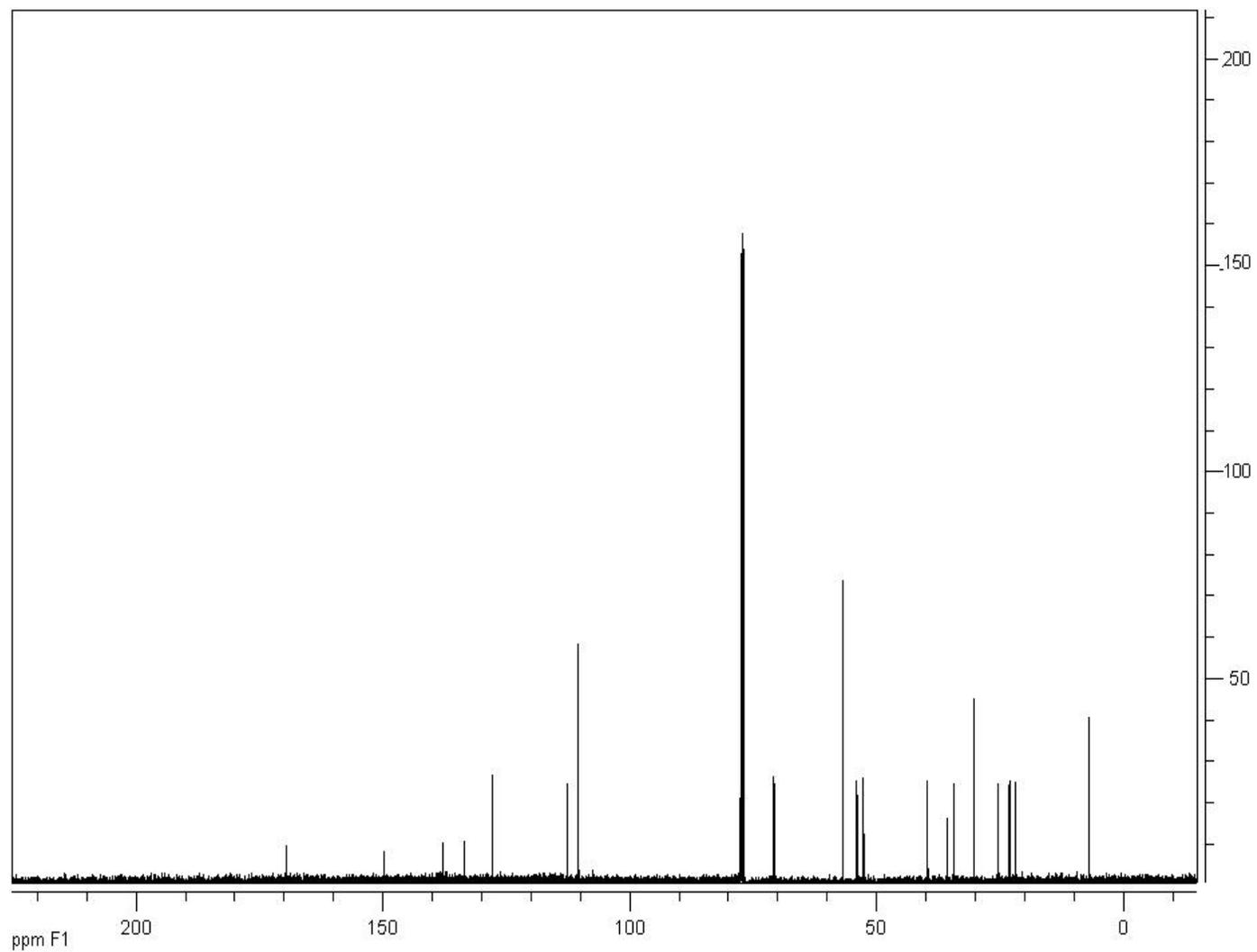


---

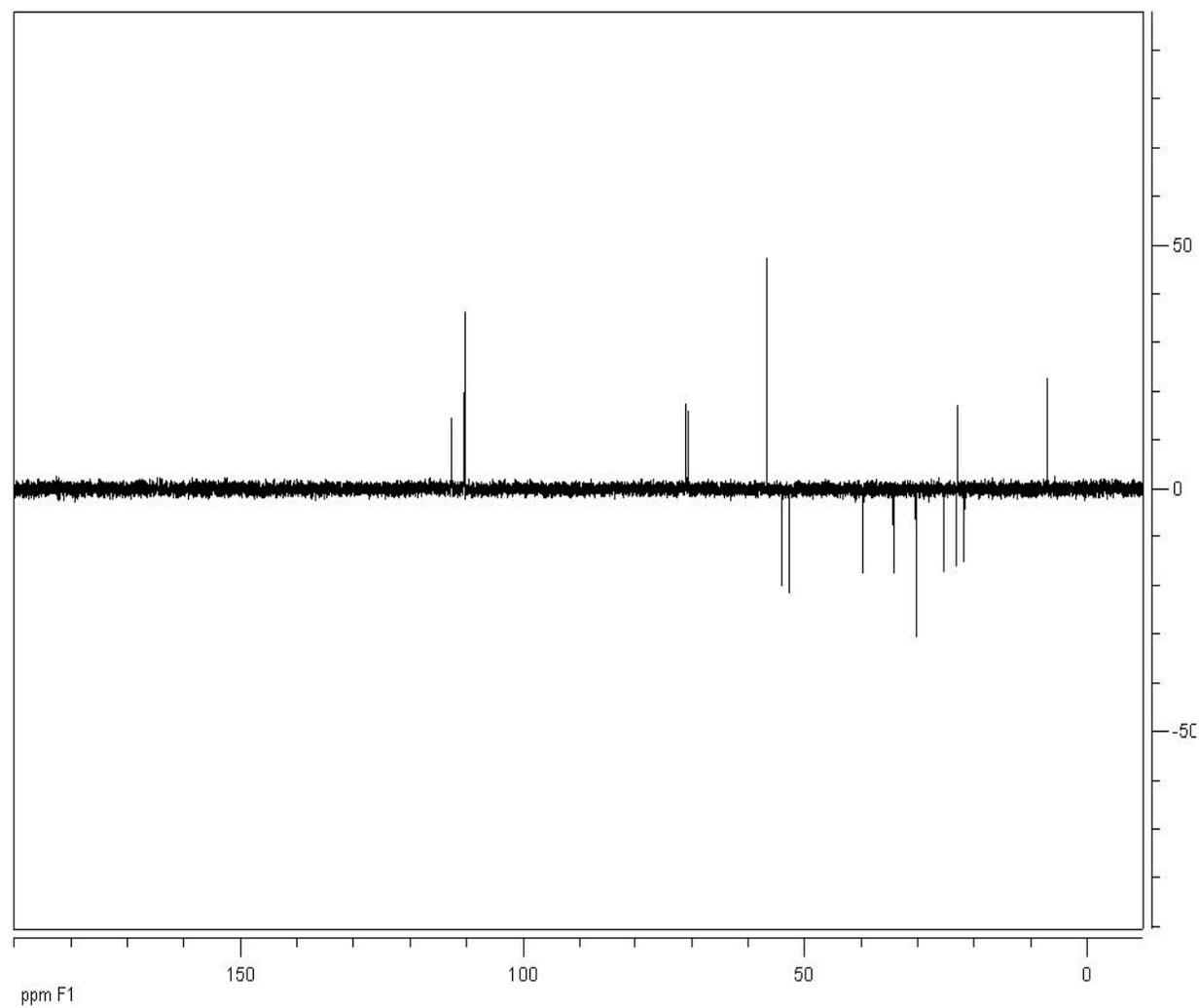
Aspidocarpina



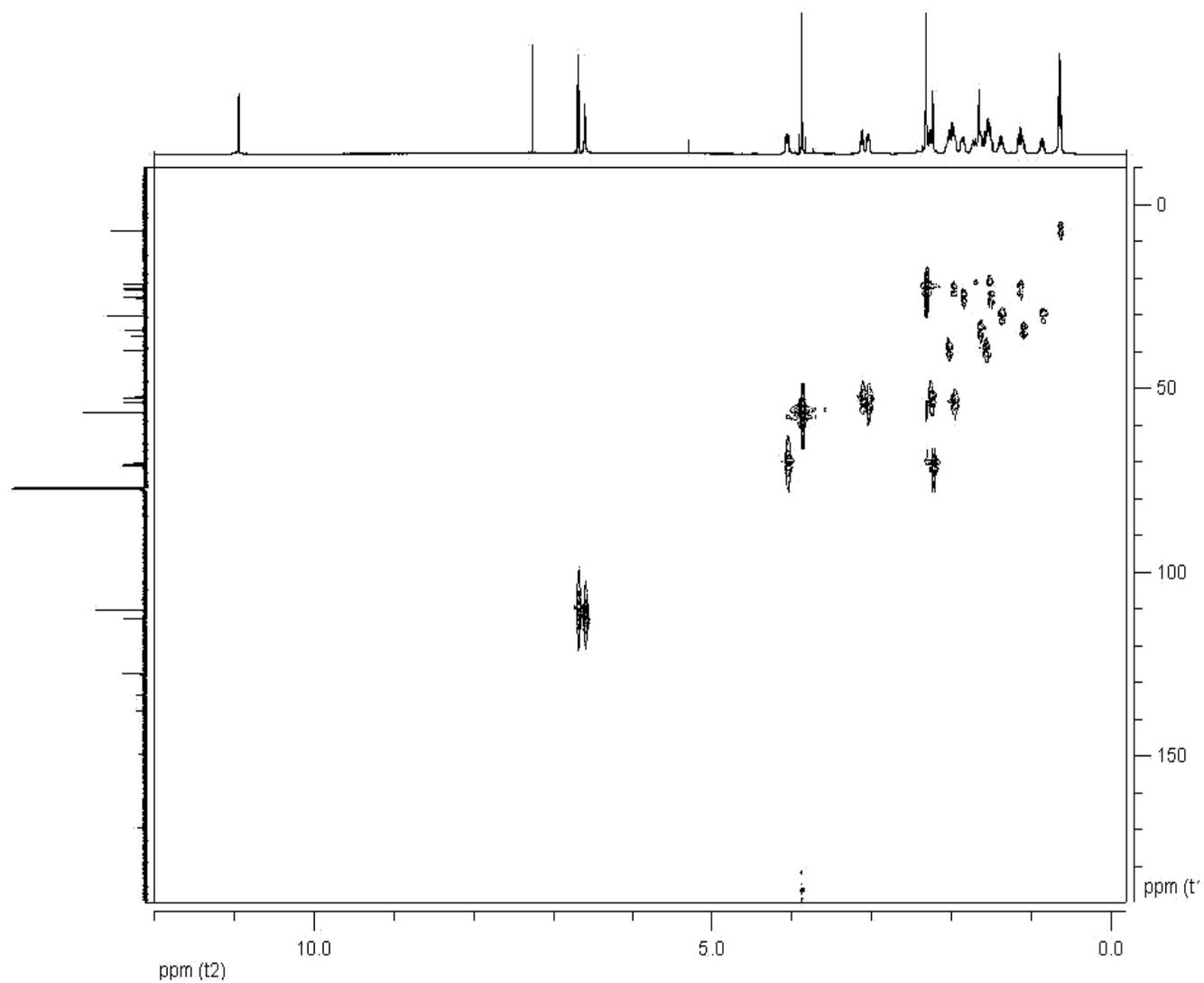
**Anexo 15.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de 500 MHz em  $\text{CDCl}_3$  do alcalóide 3 (aspidocarpina).



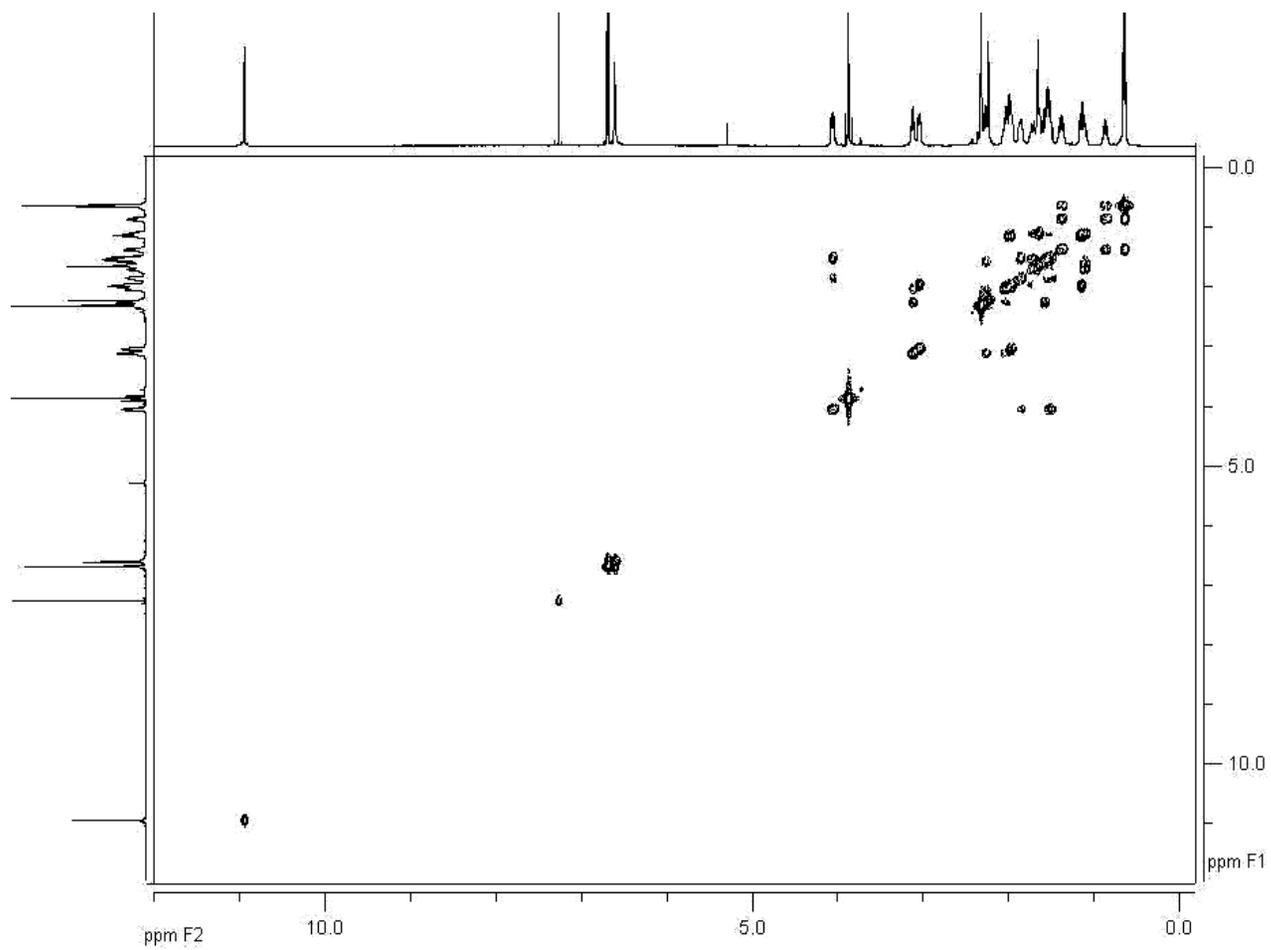
**Anexo 16.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de 125 MHz em  $\text{CDCl}_3$  do alcalóide 3 (aspidocarpina).



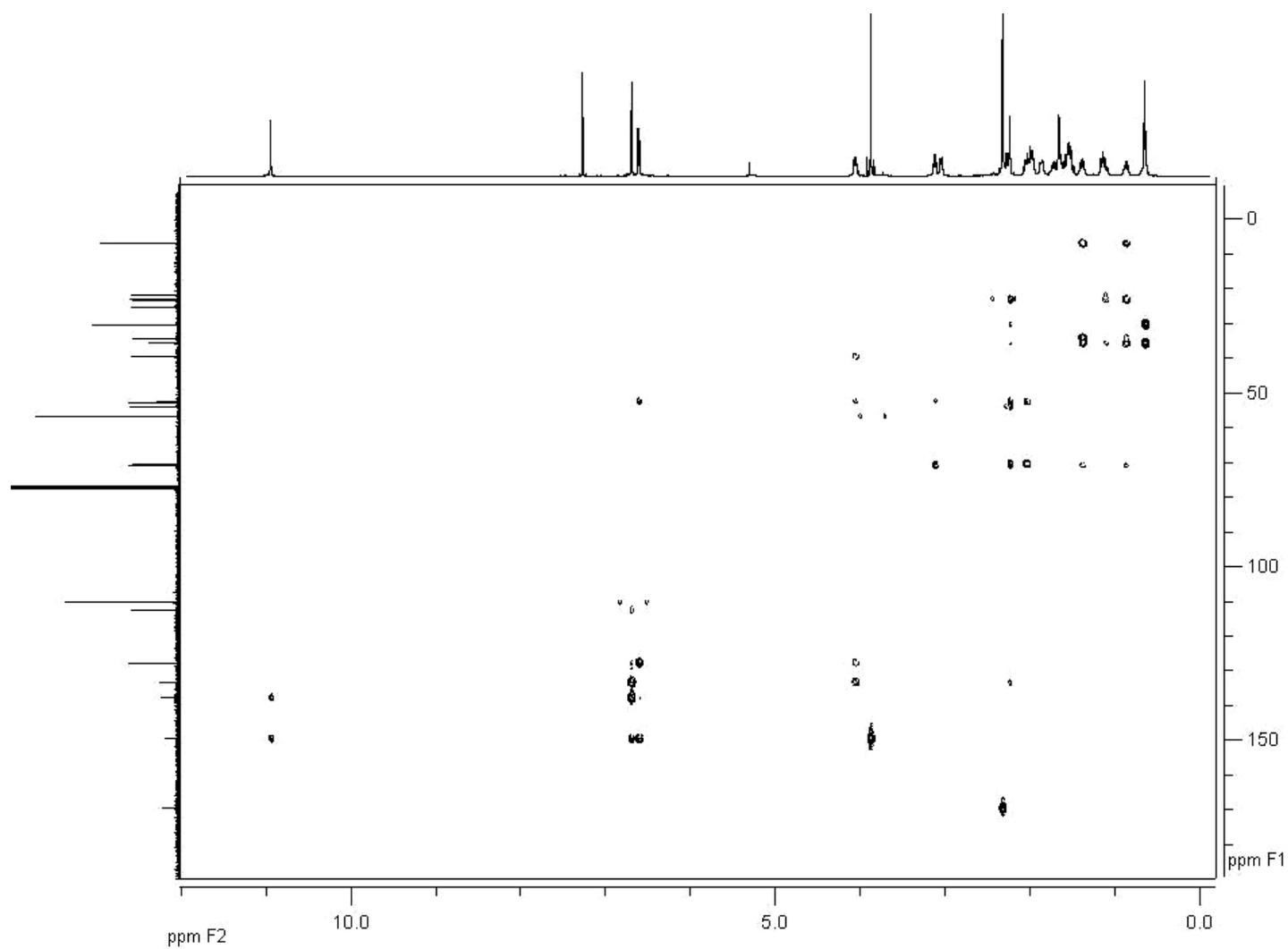
**Anexo 17.** Espectro de DEPT 135 de 125 MHz em  $\text{CDCl}_3$  do alcalóide 3 (aspidocarpina).



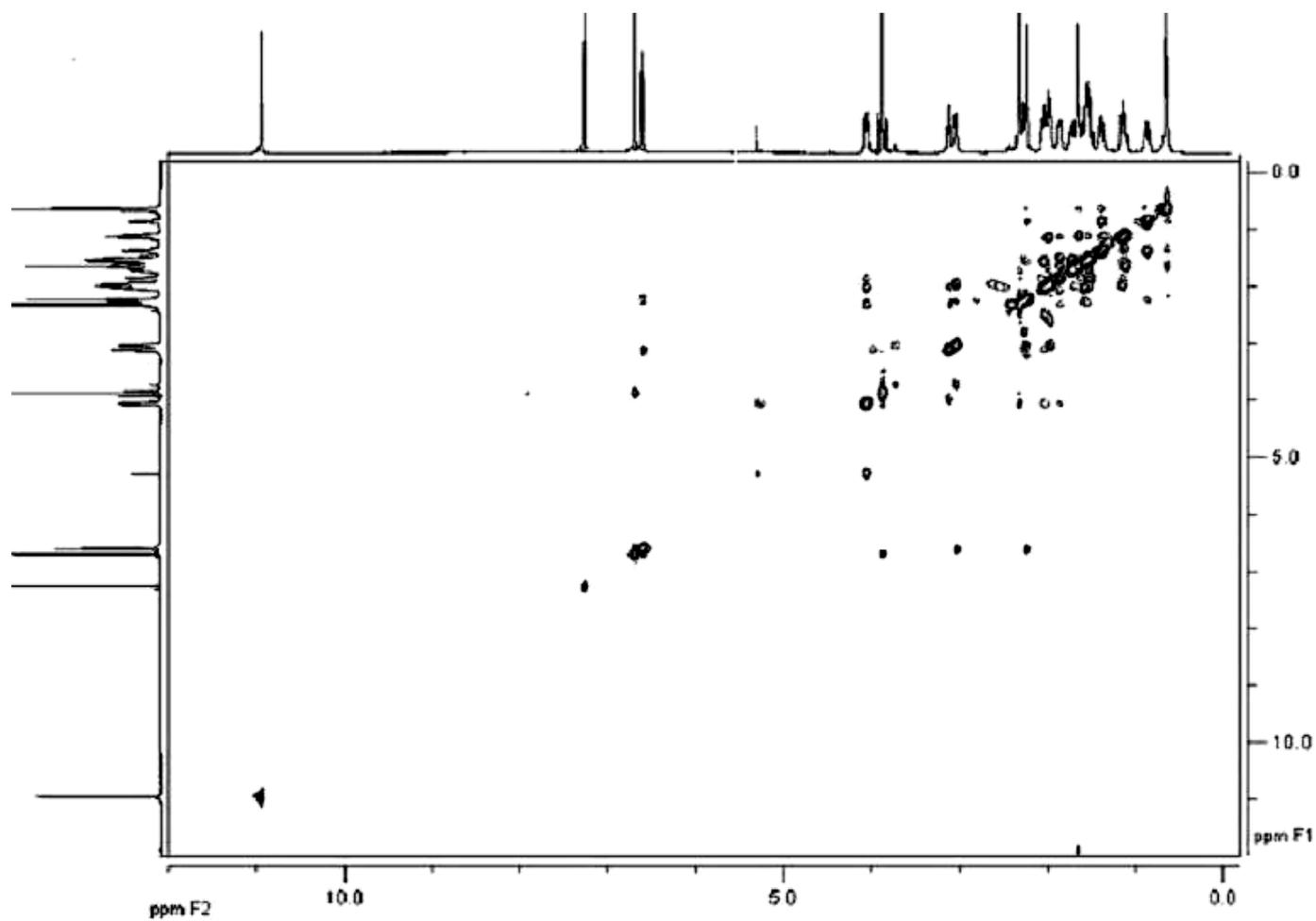
**Anexo 18.** Espectro de HSQC em  $\text{CDCl}_3$  (500 MHz) do alcalóide 3 (aspidocarpina).



**Anexo 19.** Espectro de COSY em  $\text{CDCl}_3$  (500 MHz) do alcalóide 3 (aspidocarpina).



**Anexo 20.** Espectro de HMBC em  $\text{CDCl}_3$  (500 MHz) do alcalóide 3 (aspidocarpina).



**Anexo 21.** Espectro de NOESY em  $\text{CDCl}_3$  (500 MHz) do alcalóide 3 (aspidocarpina).