



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ALCALOIDES INDÓLICOS MONOTERPENOÍDICOS COM ATIVIDADE
ANTIMALÁRICA DE CARAPANAÚBA (*Aspidosperma excelsum* Benth).

Edizon Veiga Lopes

Manaus
2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ALCALOIDES INDÓLICOS MONOTERPENOÍDICOS COM ATIVIDADE
ANTIMALÁRICA DE CARAPANAÚBA (*Aspidosperma excelsum* Benth).

ORIENTADOR: Dr. ADRIAN MARTIN POHLIT
COORIENTADORA: Dra. ZELINA ESTEVAM DOS SANTOS TORRES

Tese apresentada à Coordenação do
Programa de Pós-Graduação em Química
da Universidade Federal do Amazonas,
como requisito para obtenção do título de
Doutor em Química, área de concentração
Química Orgânica.

Manaus
2019

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

L864a Lopes, Edizon Veiga
 Alcaloides indólicos monoterpénoides com atividade
 antimalárica de carapanaúba (*Aspidosperma excelsum* Benth). /
 Edizon Veiga Lopes, Adrian Martin Pohlit. 2019
 191 f.: il. color; 31 cm.

 Orientador: Adrian Martin Pohlit
 Coorientadora: Zelina Estevam dos Santos Torres
 Tese (Doutorado em Química Orgânica) - Universidade Federal
 do Amazonas.

 1. Malária. 2. *Aspidosperma excelsum*. 3. Alcaloides indólicos. 4.
 Carapanaúba. I. Pohlit, Adrian Martin. II. Universidade Federal do
 Amazonas III. Título

**“ALCALOIDES INDÓLICOS MONOTERPENOÍDICOS
COM ATIVIDADE ANTIMALÁRICA DE
CARAPANAÚBA (*Aspidosperma excelsum* Benth)”**

Edizon Veiga Lopes

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor(a) em Química.

Aprovado, em 26 de julho de 2019.

BANCA EXAMINADORA



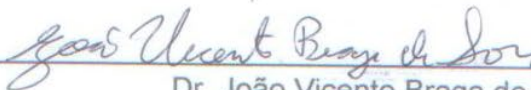
Dr. Adrian Martin Pohlit
Orientador



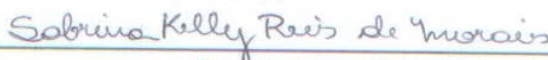
Dra. Maria Lúcia Belém Pinheiro
Membro/UFAM



Dr. Hector Henrique Ferreira Koolen
Membro/UEA



Dr. João Vicente Braga de Souza
Membro Externo/INPA



Dra. Sabrina Kelly Reis de Moraes
Membro/INPA

Universidade Federal do Amazonas
Manaus; 26 de julho de 2019.

Dedico aos meus pais, José Antônio da Silva Lopes (in memoriam) e Aldinete de Albuquerque Veiga, que mesmo com todas as limitações e dificuldades estiveram ao meu lado apoiando e torcendo por mim em cada momento nesta longa jornada. A minha família, em especial ao minha esposa Edileusa da Silva e a meus filhos Maria Luiza da Silva Lopes, Guilherme Aldo da Silva Lopes e Mariana Sousa da Silva, que sempre me acalentaram com palavras de carinho e confiança mesmo nas situações mais difíceis, e aos amigos e mestres que tive o prazer de conhecer e conviver ao longo destes anos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por me dar força e fé nos momentos mais difíceis.

Ao professor Dr. Adrian Martin Pohlit, pela amizade e orientação que tanto influenciaram em minha formação acadêmica e pessoal.

A todos os integrantes da Cental Analítica do laboratório Temático de Química de Produtos Naturais (CALTQPN), por todas as análises realizadas com máxima competência, Dra. Sabrina Kelly Morais, M. Ciên. Magno Perea e em especial a Dra. Zelina E. Torres, que além de ser minha coorientadora foi uma pessoa muito especial na minha formação acadêmica e na minha vida pessoal.

À M. Ciên. Lais Garcia Jordão e M. Ciên. Jakeline Siqueira, pelas análises *in vitro* realizados.

Ao Prof. Dr. Emerson Silva Lima, Profa. Dr. Marne C. Vasconcelos (BIOPHAR/UFAM) e colaboradores pelas análises e testes citotóxicos realizados.

Aos meus amigos de laboratórios que estiveram comigo em todas as fases deste trabalho: Abraão Alexandre, Tiago Barbosa, Lais Garcia, Andreia Montóia, Diana Sangama, Marlene Camargo, Bruna Oliveira, Rita Cynara, Renan Feitosa, Berna Almeida.

Aos órgãos de fomento CNPq e Fapeam, pelos recursos financeiros.

À Fapeam da qual fui bolsista durante o doutorado.

Ao CAM/UFAM pelos espectros de RMN 1D e 2D de 500 MHz.

Ao Dr. Antônio Carlos Siani (FIOCRUZ/RIO) pela colaboração e obtenção de análises de HPLC e RMN 1D e 2D de 400 MHz.

“A educação é a arma mais poderosa que você pode usar para mudar o mundo.”

Nelson Mandela

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação.”

Simone de Beauvoir

RESUMO

O surgimento e a disseminação de cepas de *Plasmodium* resistentes aos atuais antimaláricos têm ameaçado as medidas de controle da malária. Na busca por substâncias mais eficazes no combate à doença, as plantas medicinais de uso tradicional são fontes promissoras para a descoberta de novos antipalúdicos. Trabalhos anteriores do LAPAAM demonstraram atividade antimalárica de extratos e frações obtidos da casca de *Aspidosperma excelsum* (Benth), planta utilizada no tratamento da malária por comunidades tradicionais da Amazônia. O presente trabalho é um estudo da composição química da casca dessa espécie, a fim de descobrir substâncias naturais com potencial antimalárico e de baixa toxicidade. O procedimento fitoquímico iniciou-se com o fracionamento do extrato metanólico e aquoso do banco de extrato do LAPAAM, particionado por aumento de pH (8, 10 e 12) gerando frações posteriormente avaliadas em uma triagem inicial frente à cepa K1 de *Plasmodium falciparum*. Nova coleta foi realizada na Reserva Florestal Adolpho Ducke do INPA. O material seco foi moído e extraído em dois métodos diferentes: extração contínua sólido-líquido em soxhlet, utilizando MeOH como solvente, e por maceração em MeOH e EtOH a temperatura ambiente. Os extratos foram submetidos à partição ácido-base, para concentrar os alcaloides e avaliar as técnicas ideais para um melhor rendimento. As frações obtidas foram submetidas a diversos fracionamentos por cromatografia em coluna aberta (CC), cromatografia em placa preparativa (CCDP) e cromatografia em camada delgada (CCD). A elucidação estrutural das substâncias foi realizada utilizando-se ressonância magnética nuclear (RMN 1D e 2D) e espectrometria de massas de alta resolução (CL-EMAR). A atividade antimalárica foi avaliada por meio de microteste *in vitro* utilizando a cepa K1 de *P. falciparum*. A citotoxicidade *in vitro* foi avaliada frente à linhagem normal de fibroblastos humanos (MRC-5), através do teste Alamar Blue. Foi possível isolar 9 alcaloides indólicos monoterpênicos: isoreserpilina (**C**), reserpilina (**D**), 3 α , 20 β -corinan-17-ol (**B**), *E*-15S, 16S-isositsiriquina (**A**), *N*-óxido-15S, 16S-*E*-isositsiriquina (**E**), 10-metoxi- corinan-17-ol (**F**), 10-metoxi-15S, 16S-*E*-isositsiriquina (**H**), 3 α , 15 α -10-metoxigeissosquizol (**I**) e substância **G** (ainda não relatada na literatura, contendo um esqueleto carbônico inédito). Não foi observada atividade citotóxica dos alcaloides (CI₅₀ >156 μ M), frente à linhagem MRC-5, sendo mais seletivos aos parasitas que as células normais. Nos testes antimaláricos, os alcaloides apresentaram concentração inibitória mediana (CI₅₀) de 10,3 μ M (10-metoxi-15S, 16S-*E*-isositsiriquina (**H**)) a 78,9 μ M (*N*-óxido-15S, 16S-*E*-isositsiriquina (**E**)) frente ao *P. falciparum*.

Palavras-chaves: Malária, *Aspidosperma excelsum*, Alcaloides indólicos.

Abstract

The emergence and spread of *Plasmodium* strains resistant to current antimalarials have threatened malaria control measures. In the search for more effective substances in the fight against this disease, medicinal plants of traditional use are promising sources for the discovery of new antimalarial agents. Previous work by LAPAAM has demonstrated antimalarial activity of extracts and fractions obtained from the bark of *Aspidosperma excelsum* (Benth), a plant used in the treatment of malaria by traditional Amazonian communities. The present work is a study of the chemical composition of the bark of this species, in order to discover natural substances with antimalarial potential and low toxicity. The phytochemical procedure began with fractionation of the MeOH extract from the LAPAAM extract bank, partitioned by pH increase (8, 10 and 12), generating fractions later evaluated in an initial screening against *Plasmodium falciparum* K1 strain. A new collection of bark was made at INPA's Adolpho Ducke Forest Reserve. The dry material was ground and extracted in two different methods: continuous solid-liquid extraction in a soxhlet apparatus, using MeOH as solvent, and by room temperature maceration in MeOH and EtOH. The extracts were subjected to acid-base partitioned, to concentrate the alkaloids and to evaluate the ideal techniques for a better yield. The obtained fractions were submitted to several fractions: column chromatography (CC), preparative thin - layer chromatography (PTLC) and thin-layer chromatography (TLC). The structural elucidation of the substances was performed using nuclear magnetic resonance (1D and 2D NMR) and high resolution mass spectrometry (LC-HRMS). The antiplasmodial activity was evaluated by the microtest *in vitro* using the *P. falciparum* strain K1. *In vitro* cytotoxicity was assessed against the normal human fibroblast lineage MRC-5 by the Alamar Blue test. It was possible to isolate 9 monoterpene indole alkaloids: isoreserpilin (**C**), reserpilin (**D**), 3 α , 20 β -corinan-17-ol (**B**), *E*-15S, 16S-isositsirikine (**A**), *N*-oxide-15S, 16S-*E*-isositsirikine (**E**), 10-methoxycorinan-17-ol (**F**), 10-methoxy-15S, 16S-*E*-isositsyquinine (**H**), 15 α -10-methoxy-geissosquizol (**I**) and substance **G** (not yet reported in the literature, having a new carbonskeleton). No cytotoxic activity for the alkaloids (CI > 156 μ M) against the MRC-5 lineage was observed. They were more selectively toxic to the parasites than to the normal cells. In the antimalarial tests, alkaloids had a median inhibitory concentration (IC₅₀) of 10.3 μ M (10-methoxy-15S, 16S-*E*-isositsyquinine (**H**)) to 78.9 μ M (*N*-oxide-15S, 16S-*E*-isositsirikine (**E**)) against *P. falciparum*.

Key-words: Malaria, *Aspidosperma excelsum*, Indole alkaloids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Número de casos de malária e percentual do total brasileiro entre 2017 e 2018 – jan- nov, na região Amazônica.....	19
Figura 2: Ciclo do parasita (<i>Plasmodium</i> spp)	20
Figura 3: Antimaláricos naturais de plantas usadas tradicionalmente.....	21
Figura 4: Antimaláricos sintéticos inspirados na quinina.....	22
Figura 5: Antimaláricos sintéticos inspirados na artemisinina.	23
Figura 6: Países com relatos de resistência aos TCAs do sudeste asiático.....	24
Figura 7: Substâncias da família Apocynaceae com atividades biológicas comprovadas	26
Figura 8: Substâncias isoladas de <i>Aspidosperma</i> com atividades biológicas comprovadas	29
Figura 9: Subgrupos de alcaloides terpênicos	32
Figura 10: Rota biosintética da strictosidina	33
Figura 11: Rota biosintética da formação da ajmalicina	34
Figura 12: Rota biosintética da formação da ioimbina.....	35
Figura 13: Principais grupos de alcaloides indólicos monoterpênicos.....	36
Figura 14: Numeração de alcaloides terpênicos do tipo ioimbano.....	36
Figura 15: Alcaloides de <i>A. excelsum</i> do tipo aspidoscarpina	37
Figura 16: Alcaloides de <i>A. excelsum</i> do tipo ioimbano e heteroioimbano.....	37
Figura 17: Alcaloides de <i>A. excelsum</i> do tipo geissosquizol e oclorifuanina	38
Figura 18: Alcaloides de <i>A. excelsum</i> do tipo secamina e micelaneo	38
Figura 19: Alcaloides de <i>A. marcgravianum</i> do tipo aspidoscarpina (66).....	39
Figura 20: Alcaloides da espécie <i>A. marcgravianum</i> do tipo aspidolimidina (43).....	39
Figura 21: Alcaloides de <i>A. marcgravianum</i> do tipo heteroioimbano e picrofilina.	40
Figura 22: Alcaloides de <i>A. marcgravianum</i> do tipo ioimbano.....	41
Figura 23: Alcaloides de <i>A. marcgravianum</i> do tipo aspidodasicarpina (Ponte C-16 e C-7)....	41
Figura 24: Alcaloides de <i>A. marcgravianum</i> do tipo secodina e secamina	42
Figura 25: Alcaloides de <i>A. marcgravianum</i> do tipo antirina.....	42
Figura 26: Alcaloides de <i>A. marcgravianum</i> do tipo geissosquizol (70 e 71), isositsiriquina (105 a 109), sitsiriquina (110 a 112) e corinanteol (72, 113 a 117)	43
Figura 27: Alcaloides de <i>A. marcgravianum</i> do tipo oclorifuanina.....	44
Figura 28: Alcaloides micelaneas de <i>A. marcgravianum</i>	45
Figura 29: Ampliação da região de aromático dos espectros de RMN de ¹ H e correlações no COSY	67
Figura 30: Ampliação e correlações de COSY e HMBC da região de aromático das substâncias F, H e I.....	69
Figura 31: Ampliação da região de aromático das substâncias C e D e correlações no HMBC.	70
Figura 32: Correlações comuns do COSY e HMBC entre átomos dos anéis B, C das substâncias A, B, C, D, E, F, H e I.....	71
Figura 33: Correlação do COSY e HMBC do anel D da substância A (isositsiriquina 29)	72
Figura 34: Anel D na conformação de cadeira	73

Figura 35: Estrutura da E-15S-isositsiriquina (29).....	73
Figura 36: Correlações do COSY e HMBC do anel D da substância E (N-óxido-isositsiriquina, 115).....	76
Figura 37: Acoplamento no COSY entre os H-16 e H-17	77
Figura 38: Estrutura da substância E (N ₄ -óxido-15S, 16S-E-epi-isositsiriquina, 115)	78
Figura 39: Correlações no espectro de COSY, HMBC e NOESY do anel D da substância H (10-metoxi-15S, 16S-E-isositsiriquina, 113).	81
Figura 40: Estrutura da substância H (10-metoxi-15S, 16S-E-isositsiriquina, 113).....	82
Figura 41: Algumas correlações de COSY e HMBC do anel D da substância B (3 α , 20 β -corinan-17ol, 76).	85
Figura 42: Estrutura do 3 α , 20 β -corinan-17-ol (76).	85
Figura 43: Anel D na conformação de cadeira.	88
Figura 44: Correlações no HMBC do anel D da substância F (10-metoxi-corinan-17-ol, 119).	89
Figura 45: Estrutura da substância F (10-metoxi-corinan-17-ol, 119).	89
Figura 46: Algumas correlações no COSY e HMBC do anel D da substância I (3 α , 15 α -10-metoxi-geissosquizol, 28).	92
Figura 47: estrutura da substância: geissosquizol e isogessosquizol.....	93
Figura 48: Estrutura da substância I (3 α , 15 α -10-metoxi-geissosquizol, 28).....	93
Figura 49: Algumas correlações do COSY e HMBC do anel D e E da substância C, a isoreserpilina (47).	96
Figura 50: Tipos de diastereoisômeros de estruturas do tipo isoreserpilina/reserpilina.....	96
Figura 51: Estrutura da substância C (isoreserpilina, 47).	97
Figura 52: Estrutura da substância D (reserpilina, 48)	100
Figura 53: Correlações de COSY e HMBC da região de aromático da substância G	104
Figura 54: Correlação da junção dos anéis B e C da substância G (2FBC-4-A).....	105
Figura 55: Correlações do COSY e HMBC do anel D da substância G (2FBC-4-A).....	105
Figura 56: Algumas correlações no HMBC da junção do anel B com o D.....	106
Figura 57: Estruturas de Aspidosperma com características parecidas com a substância G.	108
Figura 58: Proposta de estrutura para substância G	108
Figura 59: Proposta de rota biosintética para substância G (133)	110
Figura 60: Alcaloides de tipo corinante isoladas de <i>A. excelsum</i>	112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Algumas substâncias com atividade biológica da família Apocynaceae	25
Tabela 2: Algumas substâncias com atividade biológica de espécies de <i>Aspidosperma</i>	27
Tabela 3: Rendimento e teor extrativo dos processos de extração da casca de <i>A. excelsum</i> (Henrique, 2007).	50
Tabela 4: Rendimento após extração da casca de <i>A. excelsum</i> por soxhlet, maceração e ultrassom.....	51
Tabela 5: Rendimentos da partição do extrato 1EMA-H	53
Tabela 6: Rendimentos do fracionamento dos extratos obtidos nas tabelas 4.....	53
Tabela 7: Dados de CL-EMAR das substâncias isoladas nesse trabalho.	65
Tabela 8: Dados de RMN 1D e 2D da substância A (<i>E</i> -15 <i>S</i> -isositsiriquina, 29) (300/75 MHz; ppm; CDCl ₃).	74
Tabela 9: Dados de RMN de ¹³ C e ¹ H da substância A e comparação com dados da literatura para <i>E</i> -15 <i>S</i> -isositsiriquina (29).	75
Tabela 10:Dados de RMN de ¹³ C e ¹ H da substância E (N ₄ -óxido-15 <i>S</i> , 16 <i>S</i> - <i>E</i> - epi - isositsiriquina (115).	79
Tabela 11:Dados de RMN de ¹ H da substância E, e comparação com os da literatura para a N ₄ -óxido-15 <i>S</i> , 16 <i>S</i> - <i>E</i> - epi-isositsiriquina (115).	80
Tabela 12: Dados espectrais de RMN 1D e 2D da substância H (10-metoxi-15 <i>S</i> - <i>E</i> -isositsiriquina, 113) (300/75 MHz; ppm; CDCl ₃).	83
Tabela 13:Dados de RMN de ¹³ C e ¹ H da substância H (10-metoxi-15 <i>S</i> - <i>E</i> -isositsiriquina, 113) e comparação com dados da literatura para a 15 <i>S</i> - <i>E</i> -isositsiriquina (29).	84
Tabela 14: Dados espectrais de RMN 1D e 2D da substância B (3 α , 20 β -corinan-17-ol (76) (300/75 MHz; ppm; CDCl ₃).	86
Tabela 15: Dados de RMN de ¹³ C e ¹ H da substância B e comparação com dados da literatura para o 3 α , 20 β -corinan-17-ol (76).	87
Tabela 16: Dados espectrais de RMN 1D e 2D da substância F (10-metoxi-corinan-17-ol, 119) (300/75 MHz; ppm; acetona-d ₆).	90
Tabela 17: Dados de RMN de ¹³ C e ¹ H da substância F (10-metoxi-corinan-17-ol, 119) e comparação com dados da literatura para 3 α , 20 β corinan-17-ol (76).	91
Tabela 18: Dados de RMN 1D e 2D da substância I (3 α , 15 α -10-metoxi-geissosquizol, 28) (300/75 MHz; ppm; CDCl ₃).	94
Tabela 19: Dados de RMN de ¹³ C e ¹ H da substância I (3 α , 15 α -10-metoxi-geissosquizol, 28) e comparação com dados da geissosquizol (74).	95
Tabela 20: Dados espectrais de RMN 1D e 2D da substância C (isoreserpilina, 47) (300/75 MHz; ppm; CDCl ₃).	98
Tabela 21: Dados de RMN de ¹ H da substância C e comparação com dados da literatura para a isoreserpilina (47).	99
Tabela 22: Dados espectrais de RMN 1D e 2D da substância D (reserpilina, 48) (300/75 MHz; ppm; CDCl ₃).	101

Tabela 23: Dados de RMN de ^{13}C e ^1H da substância D e comparação com da literatura para a reserpilina, 48	102
Tabela 24: Dados espectrais de RMN 1D e 2D da substância G (2FBC-4-A) (300 e 500 MHz; ppm; MeOD).	111
Tabela 25: Atividade antimalárica e citotóxica de extratos e frações de <i>A. excelsum</i>	113
Tabela 26: Atividade contra <i>Plasmodium falciparum</i> (Pf) e citotóxica de alcaloides isolados de <i>A. excelsum</i>	115

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1: Partição ácido-base dos extratos	52
Fluxograma 2: Isolamento da substância A.....	54
Fluxograma 3: Isolamento da substância B.....	55
Fluxograma 4: Isolamento das substâncias C e D por CCDP.....	56
Fluxograma 5: Isolamento da substância E	56
Fluxograma 6: Isolamento da substância F	57
Fluxograma 7: Fracionamento de 2FBC-3-A.....	58
Fluxograma 8: Isolamento da substância G	59
Fluxograma 9: Isolamento da substância H.....	60
Fluxograma 10: Isolamento da substância I.	61

LISTA DE ABREVIACÕES

1EMA - H-Extrato metanólico e aquoso (preparado por Edizon e Marycleuma Henrique)
2EECM - Extrato etanólico de casca macerado
2EECM (2%) - Extrato etanólico de casca macerado
2EECMS - Extrato etanólico de casca macerado e sonicado
2EECMS (2%) - Extrato etanólico de casca macerado e sonicado
2EMCM - Extrato metanólico de casca macerado
2EMCM (2%) - Extrato metanólico de casca macerado
2EMCMS - Extrato metanólico de casca macerado e sonicado
2EMCMS (2%) - Extrato metanólico de casca macerado e sonicado
2EMCS - Extrato metanólico de casca em soxhlet
2FAC-B - Fração Acetato de etila da casca-B
AcOEt - Acetato de etila
CC- Cromatografia em coluna
CCD - Cromatografia em camada delgada
CCDP - Cromatografia em camada delgada preparativa
COSY - Espectroscopia de correlação homonuclear
DCM - Diclorometano
EtOH - Etanol
FIOCRUZ-RJ - Fundação Oswaldo Cruz-Rio de Janeiro
HMBC - Correlação heteronuclear múltiplo-quântica
HSQC - Correlação heteronuclear singular-quântica
INPA - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
LAPAAM - Laboratório de Princípios Ativos da Amazônia
CL-EMAR - Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa de alta resolução
LTQPN - Laboratório Temático de Química de Produtos Naturais
MeOH - Metanol
n-BuOH - *n*-Butanol
ppm - partes por milhão
RMN - Ressonância magnética nuclear
RMN de ¹³C - Ressonância magnética nuclear de carbono
RMN de ¹H - Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
MRC-5 - Estirpe celular do Conselho de Investigação Médica 5
DMEM - Dulbecco Modification of Minimum Essential Media
R_f - Fator de retenção
IES – Ionização por EletroSpray
IQPA – Ionização Química por Pressão Atmosférica

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	17
1. REFERENCIAL TEÓRICO	18
1.1. Malária	18
1.2. Ciclo biológico do <i>Plasmodium</i>	19
1.3. Conhecimentos tradicionais de plantas e os atuais antimaláricos	21
1.3.1. Antimaláricos sintéticos e semissintéticos	21
1.3.2. Antimaláricos semi-sintéticos	22
1.3.2. Resistência aos antimaláricos atuais	23
1.4. A família Apocynaceae	24
1.4.1. Levantamento bibliográfico sobre <i>Aspidosperma</i>	26
1.4.2. Descrição botânica, distribuição geográfica e considerações biogenéticas sobre alcaloides indoloterpênicos e quimiossistemáticas sobre <i>A. marcgravianum</i> e <i>A. excelsum</i>	30
1.4.2.1. Descrição botânica e distribuição geográfica de <i>A. excelsum</i>	31
1.4.2.2. Descrição botânica e distribuição geográfica de <i>A. marcgravianum</i>	31
1.4.2.3. Considerações biogenéticas sobre alcaloides indoloterpênicos e quimiossistemáticas sobre <i>A. excelsum</i> e <i>A. marcgravianum</i>	32
1.4.2.4. Alcaloides isolados de <i>A. excelsum</i>	37
1.4.2.4. Alcaloides isolados de <i>A. marcgravianum</i>	39
2. OBJETIVO GERAL	46
2.1. Objetivos específicos	46
3. MATERIAIS E MÉTODOS	47
3.1. Equipamentos e aparelhos analíticos	47
3.2. Cromatografia	47
3.2.1. Cromatografia em coluna (CC)	47
3.2.2. Cromatografia em camada delgada (CCD)	47
3.2.3. Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP)	48
3.2.4. Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (CL-EMAR)	48
3.3. Ressonância magnética nuclear	49
3.4. Isolamento de substâncias de <i>A. excelsum</i>	49
3.4.1. Extratos CH ₃ OH e H ₂ O de <i>A. excelsum</i> do banco de extratos do LAPAAM	49
3.4.2. Coleta e preparação de extrato de <i>A. excelsum</i>	50
3.4.3. Secagem e moagem	50
3.4.4. Extração	50
3.4.5. Partição ácido-base dos extratos de <i>A. excelsum</i> obtidos nas tabelas 3 e 4.	52
3.5. Fracionamento cromatográfico.	54
3.5.1. Fracionamento cromatográfico da fração 1FAcOEt-B (alcaloídica).	54
3.5.2. Fracionamento cromatográfico da fração 2F.AcOEt-B.	57
3.6. TESTES BIOLÓGICOS	62
3.6.1. Teste <i>in vitro</i> da atividade antiplasmodica	62
3.6.2. Teste de citotoxicidade em macrófagos	63
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
4.1. Rendimento de extratos e frações	64

4.1.	Identificação das substâncias isoladas de <i>A. excelsum</i>	65
4.1.1.	Dados de CL-EMAR das substâncias	65
5.	ANÁLISE DA REGIÃO DE AROMÁTICO DO RMN DE ¹ H.	66
5.2.3.	Elucidação estrutural dos anéis B, C das substâncias A, B, C, D, E, F, H e I.	71
5.2.4.	Elucidação estrutural do anel D e identificação da substância A.	71
5.2.3.	Elucidação estrutural dos anéis D e E da substância E.	76
5.2.3.	Elucidação estrutural do anel D da substância H	81
5.2.3.	Elucidação estrutural do anel D da substância B.	85
5.2.3.	Elucidação estrutural do anel D da substância F.	88
5.2.3.	Elucidação estrutural do anel D da substância I	92
5.2.4.	Elucidação estrutural dos anéis D e E das substâncias C e D.	96
5.2.5.	Elucidação estrutural da substância G.	103
5.2.6.	Proposta de rota biossintética para substância G	109
6.	ALCALOIDES ISOLADOS DE <i>A. EXCELSUM</i> E SUA ATIVIDADE ANTI-PLASMODICA.	112
6.1.	Atividade antimalárica <i>in vitro</i>	113
7.	CONCLUSÃO	118
8.	REFERÊNCIAS	119
9.	ANEXOS	126

INTRODUÇÃO

O uso de plantas para fins medicinais acompanha a história da humanidade, logo, o conhecimento tradicional sobre essas propriedades tem sido a fonte para a descoberta e desenvolvimento de diversos fármacos que atualmente são utilizados no combate a diversas enfermidades. Os povos da Amazônia encontram na floresta a base para o tratamento de diversas doenças endêmicas e repassam esses conhecimentos ao longo das gerações durante sua evolução. Dentre as diversas doenças tratadas pelos povos amazônicos, a malária se encontra em destaque devido a sua ampla incidência e prevalência nas comunidades ribeirinhas, indígenas e quilombolas.

A malária é uma doença parasitária epidemiológico da região, que acomete milhões de pessoas nas zonas tropicais e subtropicais do planeta. Por ser uma doença muito antiga, a população vem se tratando com vários tipos de medicação contendo princípios ativos naturais, semissintéticos ou sintéticos. No entanto, muito dos fármacos antimaláricos de primeira linha de tratamento vem se mostrando ineficientes devido o surgimento da resistência do protozoário. Com a perda da eficácia dos antimaláricos atuais se espera o ressurgimento de malária em regiões onde a mesma já havia sido eliminada.

Diante disso, torna-se necessária a descoberta e desenvolvimento de novos antimaláricos que venham atuar de uma forma eficaz no combate à doença. E por sabermos que os antimaláricos vieram de espécies vegetais ou que substâncias naturais serviram de base estrutural para formulação dos princípios ativos semissintéticos ou sintéticos, a proposta de estudar a composição química e atividade antimalárica de espécies vegetais amazônicas, se faz necessária partindo-se do conhecimento etnofarmacológico.

Entre as plantas regionais utilizadas pelas comunidades tradicionais no tratamento de malária estão as carapanaúbas (*Aspidosperma* spp.). O conhecimento tradicional sobre estas e outras plantas é a esperança de descobrir novos antimaláricos, uma vez que novas substâncias podem ser extraídas, modificadas e avaliadas com o objetivo de encontrar alternativas terapêuticas para esta doença. Assim, o presente trabalho busca novas substâncias com potencial antimalárico a partir de cascas de *Aspidosperma excelsum*, uma espécie de uso tradicional conhecido, contribuindo para o conhecimento sobre a composição química desta espécie e seu potencial biológico.

1. REFERENCIAL TEÓRICO

1.1. Malária

A malária é uma doença parasitária que pode ter evolução rápida e ser fatal. Em humanos é causada pelas seguintes espécies de protozoários: *Plasmodium vivax* Grassi & Feletti, *P. falciparum* Welch, *P. malariae* Grassi & Feletti, *P. ovale curtisi* (Sutherland et al., 2010), *P. ovale wallikeri* (Sutherland et al., 2010), *P. knowlesi* (Lee et al., 2009) e *P. cynomolgi* (Ta et al., 2014). A transmissão da doença se dá pela picada do mosquito fêmea do gênero *Anopheles* infectados com o *Plasmodium*. No Brasil, as espécies de maior ocorrência são *P. malariae*, *P. vivax* e *P. falciparum*, sendo *P. vivax* a mais predominante. A maioria dos casos de malária ocorre em regiões tropicais e subtropicais do planeta, como África, Ásia e América Latina (Frasson et al., 2009; Sutherland et al., 2010; Ta et al., 2014).

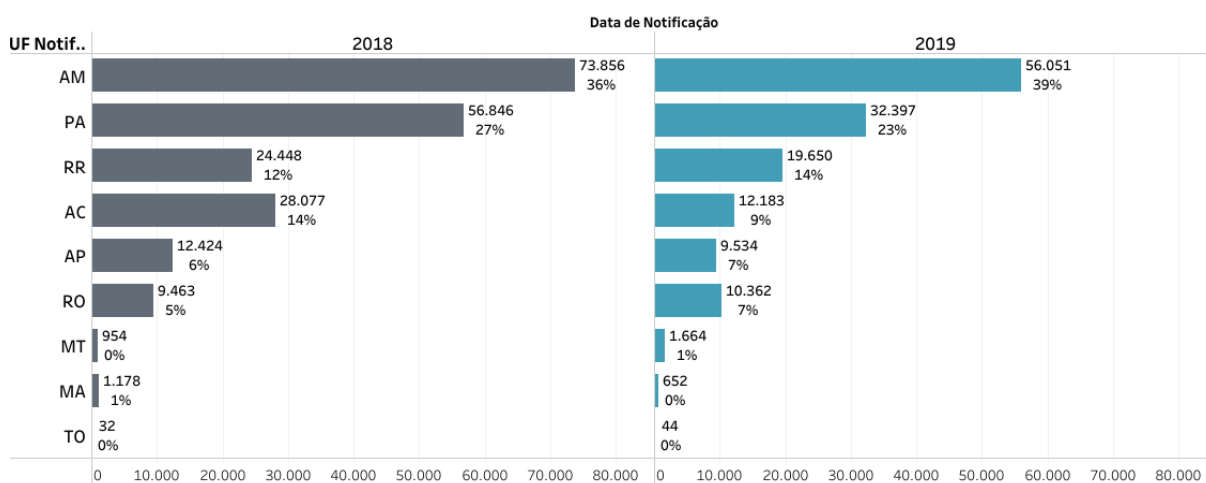
Em 2017, foram investidos cerca de US\$ 3,1 bilhões em medidas de controle e eliminação da malária nos países onde a doença é endêmica. A maior parte desse valor (2,2 bilhões) foi investida na Região Africana, região de maior ocorrência de casos de malária (WHO, 2018). Mesmo com todo o investimento e os avanços nas medidas de controle da doença nas últimas décadas, a malária ainda permanece como um dos mais graves problemas de saúde pública em todo o mundo. Ocorre em 91 países. Atualmente as situações mais graves se concentram na África Subsaariana.

Em 2017, estima-se que 219 milhões de casos de malária ocorreram em todo o mundo (95% de intervalo de confiança [IC]: 203-262 milhões). Comparado a 2016 em que houve 216 milhões (IC 95%: 196-263 milhões) de casos, houve um aumento nos casos de infecção (WHO, 2017; WHO, 2018). Em 2017 houve uma estimativa de 435.000 mortes por malária em todo o mundo, onde 93% destes foram registrados na Região Africana (WHO, 2018). Nas Américas foram registrados mais de 1 milhão de casos em 2017, destes, 630 vieram a óbito. O Brasil foi responsável por 189.503 casos da doença e 30 óbitos em 2017 (WHO, 2018).

Em 2019, no período de janeiro a setembro, foram confirmados 112.590 casos de malária no Brasil. No mesmo período do ano de 2018 foram confirmados 147.164 casos (Figura 1). Esses dados mostram um deflito na incidência de casos da doença (Brasil, 2019).

Assim como no restante do país o estado do Amazonas teve também uma redução de 24% dos casos de malária registrados quando comparado os anos de 2018 e 2019, onde fora registrados 73.856 e 56.051 mil casos respectivamente, como mostra a figura 1, sendo o estado com maior número de casos na região Amazônica. A maioria dos casos de malária na Região Amazônica é causada pelo *P. vivax*, com cerca de 88%, sendo a forma mais branda da doença (Brasil, 2019).

Figura 1: Número de casos de malária e percentual do total brasileiro entre 2018 e 2019 – jan-set, na região Amazônica.



Fonte: Sivep-Malária/SVS - Ministério da Saúde. Dados de 2018-2019 atualizados em 29/10/2019.

1.2. Ciclo biológico do *Plasmodium*

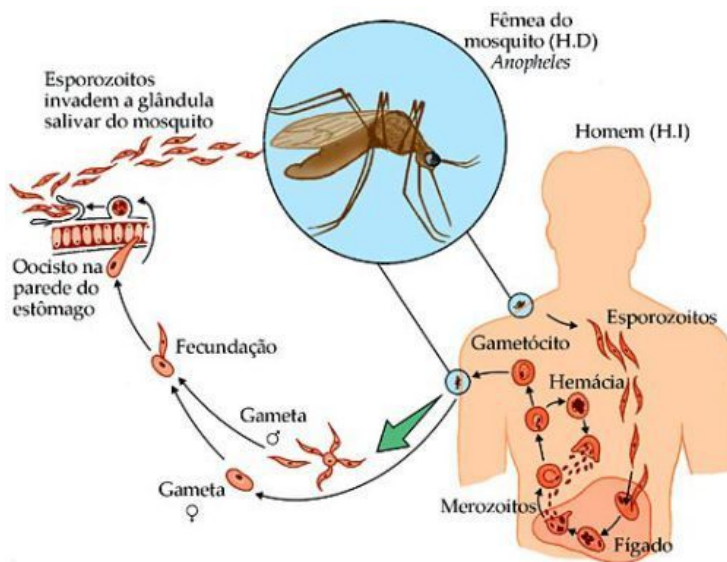
O ciclo biológico do parasita apresenta duas fases, a assexuada que ocorre no hospedeiro e a sexuada que acontece no vetor. O ciclo assexuado do plasmódio, denominado esquizogônico, inicia-se após a picada do vetor com a inoculação de esporozoítos infectantes no hospedeiro. A seguir, os esporozoítos circulam na corrente sanguínea até chegarem aos hepatócitos, células do fígado onde ocorre o ciclo pré-eritrocítico. No fígado os esporozoítos se diferenciam em trofozoítos e se multiplicam por esquizogonia, originando esquizontes. Durante esta fase, o *P. vivax* e o *P. ovale* apresentam desenvolvimento lento de alguns dos seus esporozoítos, formando os hipnozoítos, formas latentes (dormentes) do parasita responsáveis pelas recaídas da doença após meses ou anos da infecção (Brasil, 2005).

Ao final do ciclo tecidual, os esquizontes rompem os hepatócitos, liberando milhares de elementos-filhos na corrente sanguínea, chamados merozoítos. Os merozoítos irão invadir as hemácias, dando início ao ciclo eritrocítico do parasita. Durante um período que varia de

48 a 72 horas, o parasito se desenvolve no interior das hemácias até provocar a sua ruptura, liberando novos merozoítos que irão invadir novas hemácias. A ruptura e consequente liberação de parasitas na corrente sanguínea traduz-se clinicamente pelo início do paroxismo malárico, que se repetirá com o término do novo ciclo. Após um período de replicação assexuada, alguns merozoítos se diferenciam em gametócitos, que amadurecem e tornam-se infectantes aos mosquitos. A função desses gametócitos é reprodutiva, isto é, garantir a perpetuação da espécie. Eles podem ser de dois tipos, os microgametócitos (masculinos) e os macrogametócitos (femininos)(Brasil, 2005).

A reprodução sexuada (também conhecida como esporogônica) do parasita ocorre no estômago do mosquito após a diferenciação dos gametócitos em gametas e a sua fusão, com formação do ovo (zigoto). Este se transforma em uma forma móvel (ocineto) que migra até a parede do intestino médio do inseto, formando o oocisto, que cresce e passa por divisões esporogônicas originando os esporozoítos. Estes produzidos nos oocistos são liberados na hemolinfa do inseto e migram até as glândulas salivares, de onde são transferidos para o sangue do hospedeiro humano durante o repasto sanguíneo das fêmeas do vetor (Figura 2) (Brasil, 2005).

Figura 2: Ciclo do parasita (*Plasmodium* spp)



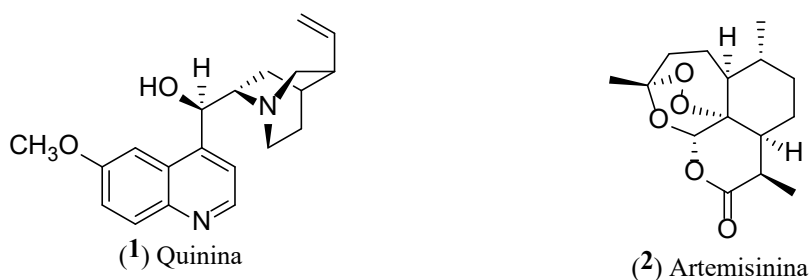
Fonte: <https://interna.coceducacao.com.br/ebook/pages/664.htm>

1.3. Conhecimentos tradicionais de plantas e os atuais antimaláricos

A malária é uma doença muito antiga. Têm-se relatos que desde a era cristã, a população chinesa já se tratava com plantas para o combate da malária como a *Dichroa febrifuga* (Vale et al., 2005). Outro exemplo é a quina verdadeira (*Cinchona officinalis*) conhecida pelos ameríndios como antitérmico. Em 1820, foi isolada da casca de *C. officinalis* a quinina (**1**) (Figura 3), que é um alcaloide indólico monoterpênico do grupo dos aminoquinolinas. Essa substância é responsável pela atividade dos extratos de *C. officinalis* frente ao *Plasmodium*. Até meados do século passado, a quinina era o principal quimioterápico utilizado no combate à malária. Seu uso só foi reduzido em função da sua alta toxicidade e com o surgimento de cepas de *P. falciparum* resistentes, mas sua importância voltou a aumentar na atualidade, em função do surgimento de resistência aos outros fármacos (Barreiro, 2001; França et al., 2008).

Em 1972 foi isolado o sesquiterpeno artemisinina (**2**) (Figura 3), que é obtido a partir da planta *Artemisia annua*. Essa planta já era usada na China há cerca de 2000 anos como febrífugo (Vale et al., 2005). Muito embora a artemisinina seja utilizada clinicamente para o tratamento da malária, o seu uso terapêutico é limitado devido a sua baixa solubilidade, tanto em óleo quanto em água.

Figura 3: Antimaláricos naturais de plantas usadas tradicionalmente



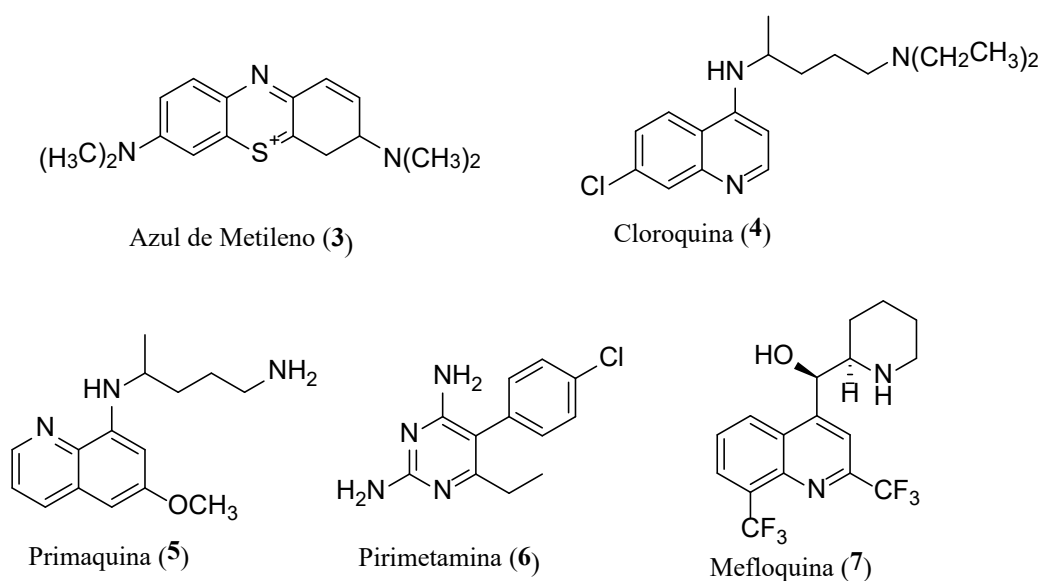
1.3.1. Antimaláricos sintéticos e semissintéticos

Partindo de noções sobre a estrutura molecular da quinina foram desenvolvidas novas drogas antimaláricas sintéticas, como o azul de metileno (**3**), (Figura 4) no final do século 19 que surgiu como o primeiro antimalárico sintético (Oliveira e França (2008)). Foi durante a segunda guerra mundial que o desenvolvimento de novas drogas antimaláricas teve seu maior

crescimento, com o surgimento da cloroquina (4) e primaquina (5) (Figura 4), que inicialmente vieram para reforçar o combate à malária nos cenários nacional e internacional. Em 1955, quando o Programa Global de Erradicação da Malária foi adotado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) havia um clima de grande otimismo em virtude das novas tecnologias no campo da química farmacêutica.

A partir da década de 1960, veio a frustração quando surgiram os primeiros relatos de recidivas causadas por algumas cepas resistentes de *P. falciparum* (Manzali, 2011). Com a confirmação dessa resistência houve um grande incentivo em utilizar outros fármacos que viriam a sanar esse problema. Foi então que surgiram muitas drogas sintetizadas como: pirimetamina (6) e mefloquina, (7) (Figura 4), dentre outras (Vale et al., 2005; Manzali, 2011).

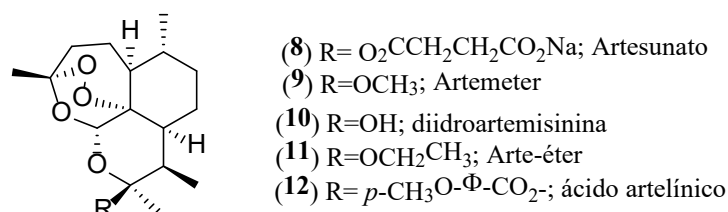
Figura 4: Antimaláricos sintéticos inspirados na quinina.



1.3.2 Antimaláricos semi-sintéticos

Outro exemplo no avanço na área da química medicinal foi o desenvolvimento de derivados semissintéticos da artemisinina (2), que surgiram com o propósito de melhorar a eficiência e solubilidade como artesunato (8), artemeter (9), diidroartemisinina (10), arte-éter (11) e o ácido artelínico (12) (Figura 5) (Franco et al., 2009).

Figura 5: Antimaláricos sintéticos inspirados na artemisinina.



1.3.2. Resistência aos antimaláricos atuais

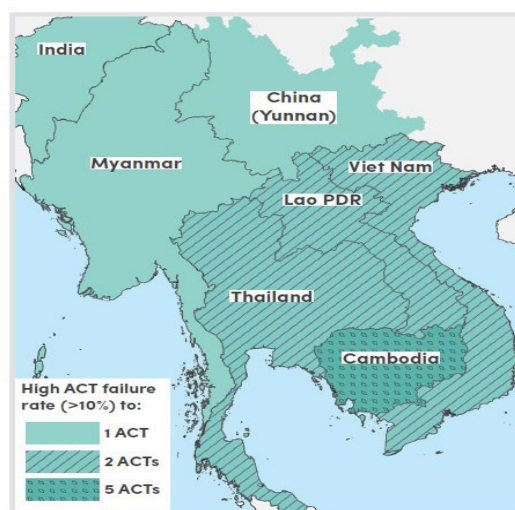
Alguns dos desafios que impedem que os países permaneçam no caminho certo e avancem para a eliminação da malária, incluem a falta de financiamento, os riscos em zonas endêmicas de malária, padrões climáticos anômalos, e o surgimento de resistência do parasita aos medicamentos antimaláricos (WHO, 2017).

As resistências aos antimaláricos iniciaram-se com a cloroquina (4) a partir da década de 1960, frente a algumas cepas de *P. falciparum*, em áreas nas quais a droga havia sido utilizada em massa (Manzali, 2011). Dentre as oito espécies de parasitas transmissores de malária ao ser humano, *P. falciparum* e o *P. vivax* são os responsáveis pelos maiores números de casos, bem como resistências ao tratamento.

Com os primeiros relatos de resistência à artemisinina (2), e seus derivados 8-12 em 2001, a OMS em 2005 sugeriu o uso dos TCAs (terapia combinada à base de artemisinina). Essa terapia tem sido eficaz e é a base atual da terapia de malária causada por *P. falciparum*. Recentemente, já houve relatos de resistência aos TCAs, como mostrado na figura 6.

A resistência aos medicamentos antimaláricos é uma ameaça aos esforços globais para controlar a doença. O acesso melhorado ao tratamento eficaz tem sido um fator chave na redução da malária nos últimos anos. Proteger a eficácia do tratamento da malária é uma das principais prioridades dos países com paludismo endêmico e da comunidade global da malária (WHO, 2017).

Figura 6: Países com relatos de resistência aos TCAs do sudeste asiático.



Fonte: WHO (2017)

A história mostra que as plantas utilizadas tradicionalmente para o tratamento da malária (*Cinchona* spp. e *Artemisia annua*), são fontes importantes dos principais antimaláricos em uso atualmente. Por isso a *A. excelsum* (Apocynaceae), tem um histórico de uso tradicional na região Amazônica contra a malária e grande concentração de alcaloides de acordo com Añez (2009), tornando-se uma espécie bastante atraente como plataforma para a descoberta de novas substâncias antimaláricas.

1.4. A família Apocynaceae

A família Apocynaceae está entre as dez maiores famílias de Angiospermas. Esta engloba 366 gêneros e 5000 espécies distribuídas em cinco subfamílias (Rauvolfioideae Miers, Apocynoideae Burnett, Asclepiadoideae Endl, Periplocoideae Endl e Secamonoideae Endl). A maior dificuldade para a delimitação dos táxons está relacionada à grande diversidade e ampla distribuição da família, associadas à escassez de estudos abrangentes. Espécies de Apocynaceae estão representadas em todos os continentes, exceto na Antártica. A maioria das espécies ocorrem na região tropical. No Brasil, a família Apocynaceae conta com 41 gêneros e 376 espécies, aproximadamente (Endress, 2004; Rapini, 2012; Endress et al., 2014).

As plantas dessa família são mais diversificadas em regiões tropicais e subtropicais, mas também se estendem em áreas temperadas (Nascimento et al., 2013). A família Apocynaceae pode ser considerada uma das mais importantes fontes vegetais de constituintes químicos. Várias substâncias têm sido isoladas a partir de espécies dessa família. Muitas

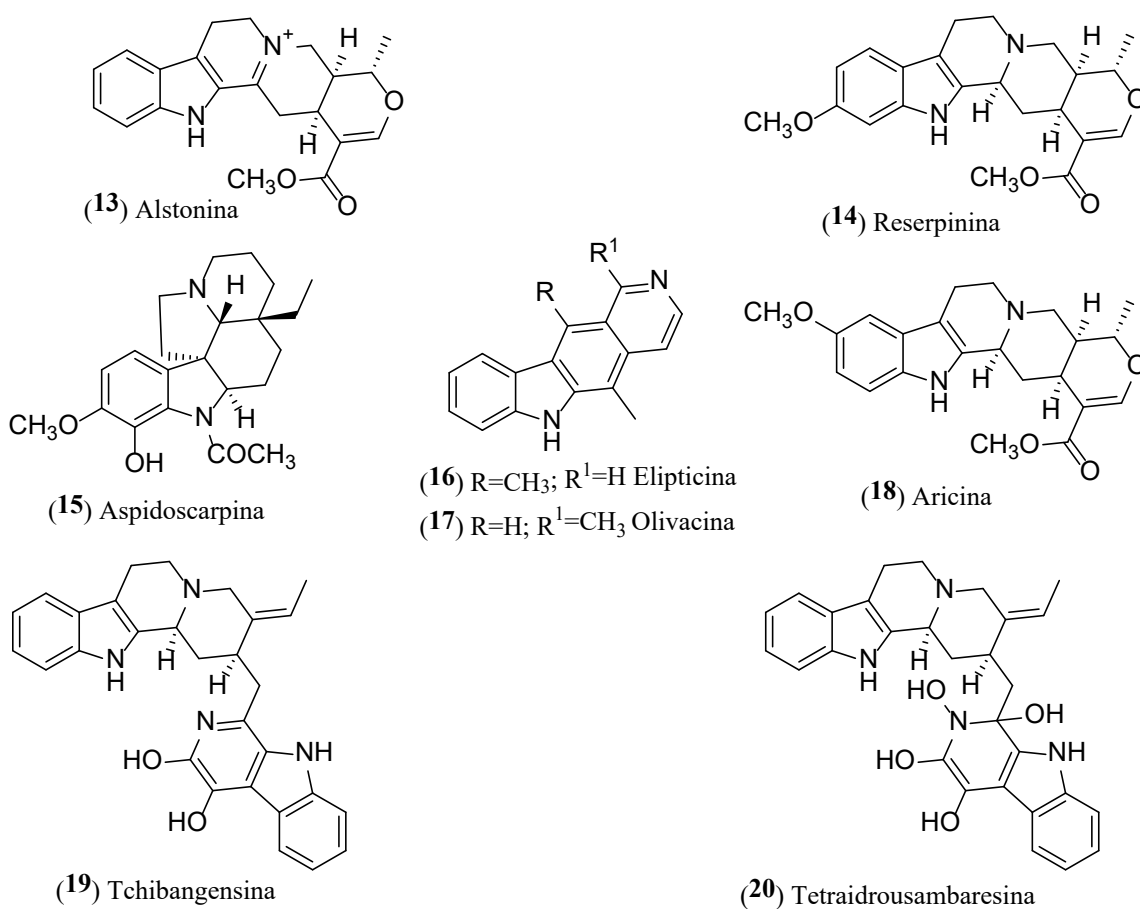
dessas espécies representam protótipos de classes farmacológicas distintas de drogas e fazem parte da história da farmacologia e da terapêutica (Tabela 1, Figura 7), das quais se destacam alguns gêneros como: *Alstonia* Scop., *Aspidosperma* Mart. & Zucc., *Rauwolfia* Gled., *Vinca* L., *Tabernaemontana* L., *Mandevilla* Lindl., *Hancornia* Gomes, *Nerium* L., *Catharanthus* G. Don, *Allamanda* L., *Thevetia* L., e *Himatanthus* Willd. ex Schult. Sendo em sua maioria, caracterizadas pela presença de alcaloides bioativos como: alstonina (13), reserpina (14), aspidoscarpina (15), elipticina (16), olivacina (17), aricina (18), tchibangensina (19) e tetraidrousambarensina (20) (Figura 7) (Baliga, 2010; Henrique et al., 2010; Rocha e Silva et al., 2012).

Tabela 1: Algumas substâncias com atividade biológica da família Apocynaceae

Substâncias	Aplicação	Referência
Alstonina (13)	Antipsicótica, tratamento de câncer de próstata	Hall e Sylvie (2005) (Patente); Linck et al. (2015)
Reserpina (14)	Antidepressivo, Antipsicótica	Andersson et al. (2018); Mohammed e tal. (2018)
Aspidoscarpina (15)	Antimalárico	Andrade Neto et al. (2007); Chierito et al. (2014)
Elipticina (16)	Anticancerígeno, antimalárico	Andrade-Neto et al. (2007); Rocha e Silva et al. (2012); Mustarichie et al. (2014)
Olivacina (17)	Atividade antiproliferativa contra células HCT-116 e HL-60 antimalárico	Rocha e Silva et al. (2012); Itoh et al. (2018)
Aricina (18)	Tratamento da dor na neuropatia periférica antimalárico	Passemar et al. (2011); Berry (2015). (Patente)
Tchibangensina (19)	Antiproliferativo,	Orlowski e Sellin. (2014)

	antiinflamatório e antifúngicos	(Patente)
Tetraidrousambarensina (20)	Antimalárico	Passemar et al. (2011)

Figura 7: Substâncias da família Apocynaceae com atividades biológicas comprovadas



1.4.1. Levantamento bibliográfico sobre *Aspidosperma*

Bolzani et al. (1987) propuseram que as espécies desse gênero fossem classificadas baseando-se na quimiosistemática, na qual esse método agrupou 48 espécies em 7 séries (Macrocarpa, Nítida, Nobile, Polyneura, Pyricolla, Quebrachines, e Rígida). O gênero *Aspidosperma* ficou classificado dentro da série Nítida. As espécies deste gênero podem ser encontradas em vários habitats. No Brasil são encontradas desde as áreas de cerrado da região Central e a parte sul bem como em áreas inundadas nas margens de rios e igarapés, da Região

Amazônica. Também são encontradas no Paraguai, Argentina, México e em regiões elevadas como Peru e Bolívia (Woodson, 1951).

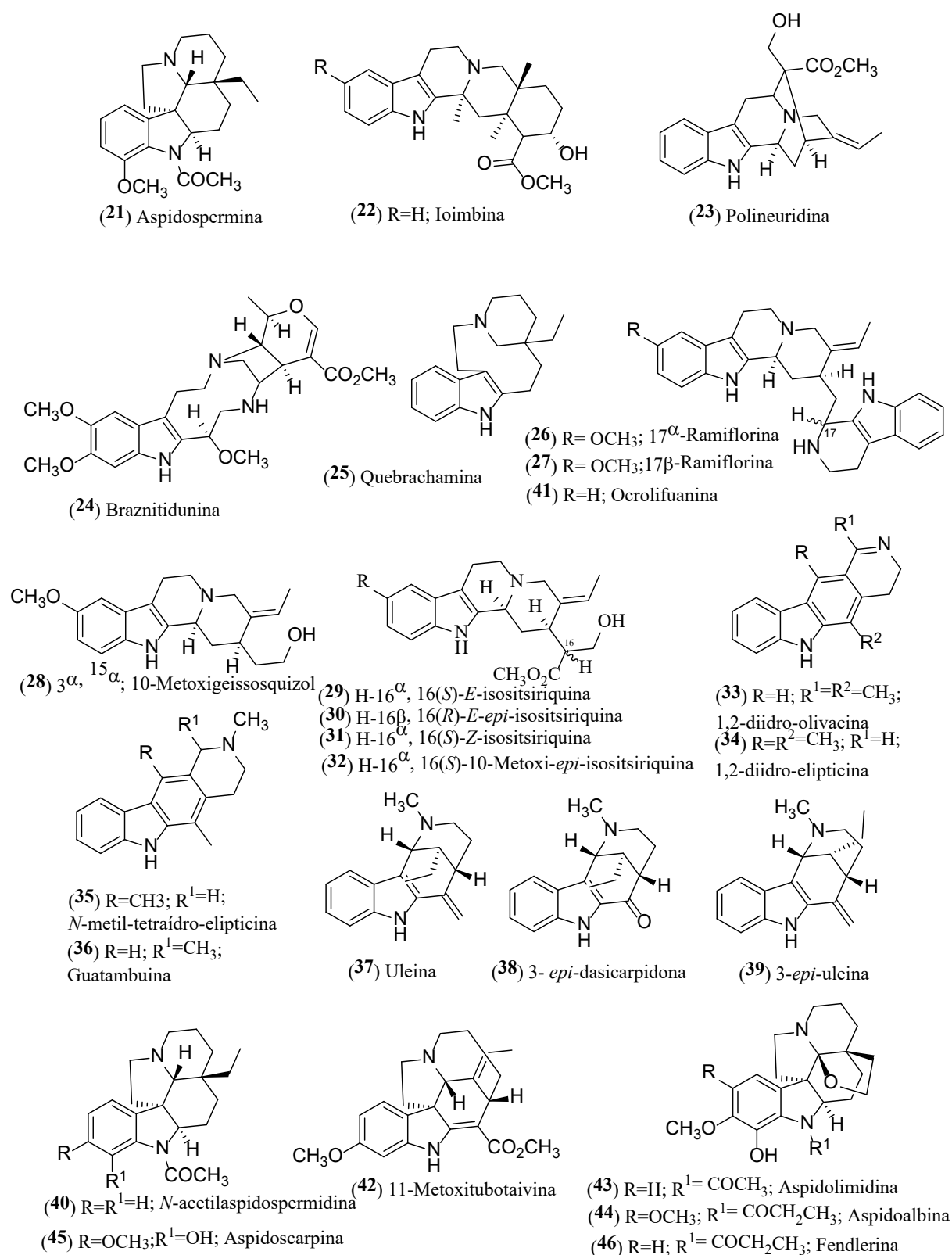
As espécies desse gênero são conhecidas popularmente como perobas, guatambus, carapanaúba, pau-pereira, amargoso e quina. Ocorrem predominantemente nas Américas, sendo em maior concentração na Argentina e no México (Pio Corrêa, 1926). Plantas desse gênero tem grande importância para a população em geral, sendo extraídas pelas suas madeira, além de serem muito utilizadas pelas populações indígenas e ribeirinhas para vários fins medicinais (Tabela 2 e Figura 8). Este fato tem despertado nos pesquisadores, o interesse por uma investigação mais apurada, de uma correlação entre as atividades terapêuticas, com a grande ocorrência de alcalóides indólicos presentes no gênero *Aspidosperma*. Em sua grande maioria os alcaloides isolados desse gênero possuem atividades biológicas tais como antitumoral, antituberculose, antimicrobiana, antiprotozoários como (antitrypanosoma, antileishmania e antiplasmódico (atividade antimalárica)) (Tabela 2). Sendo essa última atividade biológica o motivo da escolha desse gênero para um estudo mais aprofundado.

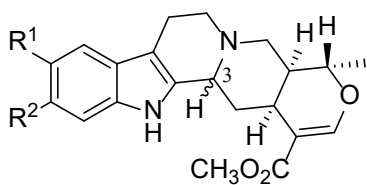
Tabela 2: Algumas substâncias com atividade biológica de espécies de *Aspidosperma*.

Espécie	Substância testada	Aplicação	Fonte
<i>A. quebracho blanco</i>	Aspidospermina (21) Ioimbina (22)	Antitumoral, inibição de adrenoceptores $\alpha 2C$	Cai et al. (2017) (Patente); Hidenobu et al. (2018)
<i>A. polineuron</i>	Polineuridina (23)	Antimicrobiano	Granato et al. (2005)
<i>A. nitidum</i>	Braznitidumina (24) Aspidospermina (21) Quebrachamina (25) Ioimbina (22)	Atividade contra protozoários flagelados do gênero <i>Trypanosoma</i> <i>Leishmania</i> , atividade antioxidante	Galarreta et al. (2008); Cai et al. (2017); Kreps et al. (2017)
<i>A. ramiflorum</i>	Ramiflorinas α (26) e β (27) 10-metoxi geissosquizol (28) 16 (<i>S</i>)- <i>E</i> -isositsiriquina (29) 16 (<i>R</i>)- <i>E</i> -isositsiriquina (30) 16 (<i>S</i>)- <i>Z</i> -isositsiriquina (31)	Atividade contra leishmaniose; baixa citotoxicidade (HepG2);	Frederich et al. (2002); Cunha et al. (2012); Aguiar et al. (2015)

		atividade antiplasmódica	
<i>A. ulei</i>	Ioimbina (22) 1,2-diidro-olivacina (33) 1,2-diidro-elipticina (34) <i>N</i> -metil-tetraidroelipticina (35) (<i>D</i>)-guatambuína (37) uleína (37) <i>N</i> -metil-tetraidroelipticina (34) uleína (37) 3- <i>epi</i> -dasicarpidona (38) 3- <i>epi</i> -uleína (39)	Atividade contra <i>M. tuberculosis</i> tuberculose, atividade citotóxica	Itoh et al. (2018) Schmidt et al. (2018)
<i>A. subicanum</i>	Ioimbina (22) <i>N</i> -acetilaspidospermidina (30) 3- <i>epi</i> -dasicarpidona (38), 9-metoxi-16 <i>R</i> - <i>E</i> - isositsiriquina (32) 11-metoxi-tubotaivina (42) Ochrolifuanina A (41)	Suplemento alimentar a pacientes com HIV	Maes e Maes (2015)
<i>A. excelsum</i>	Aspidolimidina (43) Aspidoalbina (44) Fendlerina (46)	Antimicrobiana e crescimento de <i>Bacillus subtilis</i>	Verpoorte et al. (1983); Frederich et al. (2002)
<i>A. megalocarpon</i>	Reserpinina (47) Reserpilina (48) Aspidoscarpina (45) Aspidolimidina (42)	Baixa atividade antimalárica ao testar os alcaloides purificados Toxicidade para larvas de <i>Artemia franciscana</i> e atividade antimicrobiana contra <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>C. albicans</i> , <i>A. niger</i>	Mitaine et al. (1998) Verpoorte et al. (1982); Quignard et al. (2003); Dwivedi et al. (2015)

Figura 8: Substâncias isoladas de *Aspidosperma* com atividades biológicas comprovadas





(47) $R^1 = R^2 = \text{OCH}_3$; 3 α -Reserpilina

(48) $R^1 = R^2 = \text{OCH}_3$; 3 β -Reserpilina

Espécies de *Aspidosperma* são utilizadas tradicionalmente no tratamento de várias doenças. As cascas e caules de *A. nitidum* são utilizadas no tratamento de infecções do fígado e do estômago (Añez, 2009), como anti-inflamatório e anticoncepcivo (Araújo et al., 2013) e no tratamento da malária (Ruiz et al., 2011; Coutinho et al., 2013; Oliveira et al., 2015). Também é utilizada a *A. auriculatum* (típica da Região Amazônica), espécie conhecida no Pará como carapanaúba e indicada popularmente para tratar febre e outras afecções, inclusive a malária (Barbosa et al., 2003). *A. desmanthum* apresentou atividade antiplasmodica (Andrade-Neto et al., 2007; Henrique et al., 2010). *A. excelsum* possui atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* (Theodor Escherich), *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter), *Candida albicans* (Berkhout), *Aspergillus niger* (Van Tieghem), entre outros (Verpoorte et al., 1982; Verpoorte et al., 1983).

1.4.2. Descrição botânica, distribuição geográfica e considerações biogenéticas sobre alcaloides indoloterpênicos e quimiosistemáticas sobre *A. marcgravianum* e *A. excelsum*

Em consulta realizada no W3Tropicos, foram encontrados 3 nomes aceitos como sinônimas de *A. excelsum* (*A. marcgravianum* (Woodsom), *A. nitidum* (Benth. ex Müll) e *Macaglia excelsa* (Benth.)). De acordo com a Reflora do Brasil, apenas o nome aceito para a espécie é *A. excelsum* (Benth) sendo *Macaglia excelsa* (Benth) sinônima (Reflora, 2019). O site também traz várias diferenças entre as demais espécies como: *Aspidosperma excelsum* pode ser diferenciada de *A. marcgravianum* pelas folhas coriáceas (vs. cartáceas), pelas flores com lobos do cálice iguais (vs. desiguais), e pelos folículos espinescentes (vs. muricados). Difere de *A. nitidum* também pelos folículos espinescentes (vs. muricados) (Castello et al., 2019).

Uma espécie de *Aspidosperma* está depositada no Herbário do INPA sob o número de acesso INPA 180516 (depositado em 2 de fevereiro de 1995 como *A. marcgravianum*

Woodson pelo Dr. Alberto Vicentini, atualizado em 29 de novembro de 2012 para *A. excelsum* Benth. Ex Mull. Por JF Morales).

Como nosso trabalho utilizou-se de material vegetal coletado do mesmo exemplar e períodos diferentes (coletas em 2001 e 2015, períodos em que houve a atualização dos nomes), optou-se por realizar levantamento químico dos compostos isolados dessas duas espécies (*A. excelsum* e *A. marcgravianum*).

1.4.2.1. Descrição botânica e distribuição geográfica de *A. excelsum*

É uma árvore de grande porte com características gerais: Caule de superfície (s) sulcado(s); ramo(s) cilíndrico(s); consistência dos ramo(s) súberes não espessado(s)/súber (es) levemente espessado(s). Folha: látex branco; filotaxia alterna(s); posição da(s) folha(s) no(s) ramo(s) laxa(s); venação eucamptódroma(s); bases achatada(s)/levemente revoluta(s). Inflorescência: tipo cimeira(s) corimbiforme(s); posição(ões) terminal(ais); consistência rígida/não rígida. Flor: cálice(s) com sépala(s) iguais; corola com comprimento dos lobo(s) menor(es) que o tubo; ovário(s) glabro(s). Fruto: costa(s) evidente(s)/não evidente(s); estipe(s) presente(s); lenticela(s) inconspícua(s); superfície(s) espinescente(s) (Castello et al. 2019). Essa espécie não é endêmica, é natural da Região Norte. Têm sua ocorrência confirmada nos estados do Amazonas, Rondônia e Roraima.

Segundo Vásquez et al. (2014); Paula et al. (2014) e Oliveira et al. (2015) dessa planta é utilizada a folha, casca do caule na forma de chá, maceração, no tratamento de inflamação, diabetes, fígado, pressão alta, malária, feridas e como anticoncepcional.

1.4.2.2. Descrição botânica e distribuição geográfica de *A. marcgravianum*

É uma árvore de grande porte com características gerais: caule: superfície(s) sulcado (s); ramos(s) cilíndrico(s); consistência dos ramos súberes não espessado(s). Folha: látex branco; filotaxia alterna(s)/suboposta(s); posição das folha(s) nos ramo(s) laxa(s); venação eucamptódroma(s); base achatada(s)/levemente evoluta(s). Inflorescência: tipo cimeira corimbiforme(s); posição terminal(ais); consistência não rígida(s). Flor: cálice(s) com sépala(s) desigual(ais); corola com comprimento do lobo(s) menor(es) que o tubo; ovário(s) glabro(s). Fruto: costa(s) evidente(s)/não evidente(s); estipe(s) presente(s); lenticela(s) inconspícua(s); superfície(s) muricada(s). Essa espécie

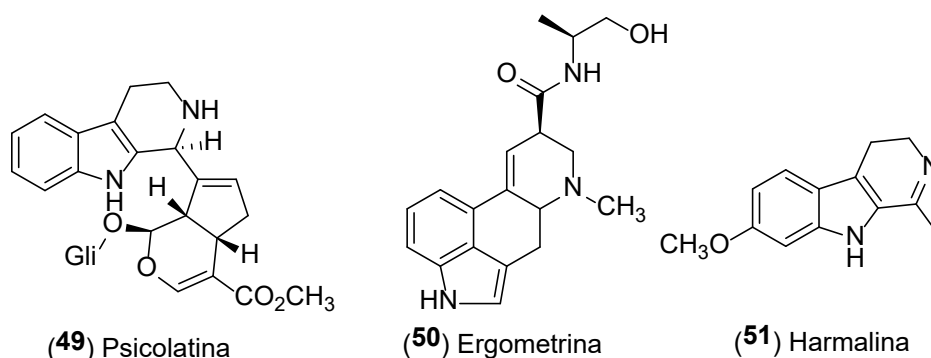
não é endêmica. Têm sua ocorrência confirmada nos estados do Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima, Maranhão e Mato Grosso.

Aspidosperma marcgravianum pode ser diferenciada de *A. nitidum* pelas inflorescências terminais (vs. axilares), e pelas flores com lobos do cálice desiguais (vs. iguais), e lobos da corola 1-1,5 mm compr. (vs. ca. 0,5).

1.4.2.3. Considerações biogenéticas sobre alcaloides indoloterpênicos e quimiossistemáticas sobre *A. excelsum* e *A. marcgravianum*

Os alcaloides indólicos constituem um extenso grupo de substâncias, com mais de 4.000 estruturas registradas na literatura, isolados de uma grande variedade de organismos. Estão distribuídos em três subgrupos denominados: alcaloides indólicos monoterpênicos (49), alcaloides indólicos hemiterpênicos (alcaloides do ergô) (50) e alcaloides indólicos β -carbolínicos (51) (tipo harmano) (Simões et al., 2002) (Figura 9).

Figura 9: Subgrupos de alcaloides terpênicos

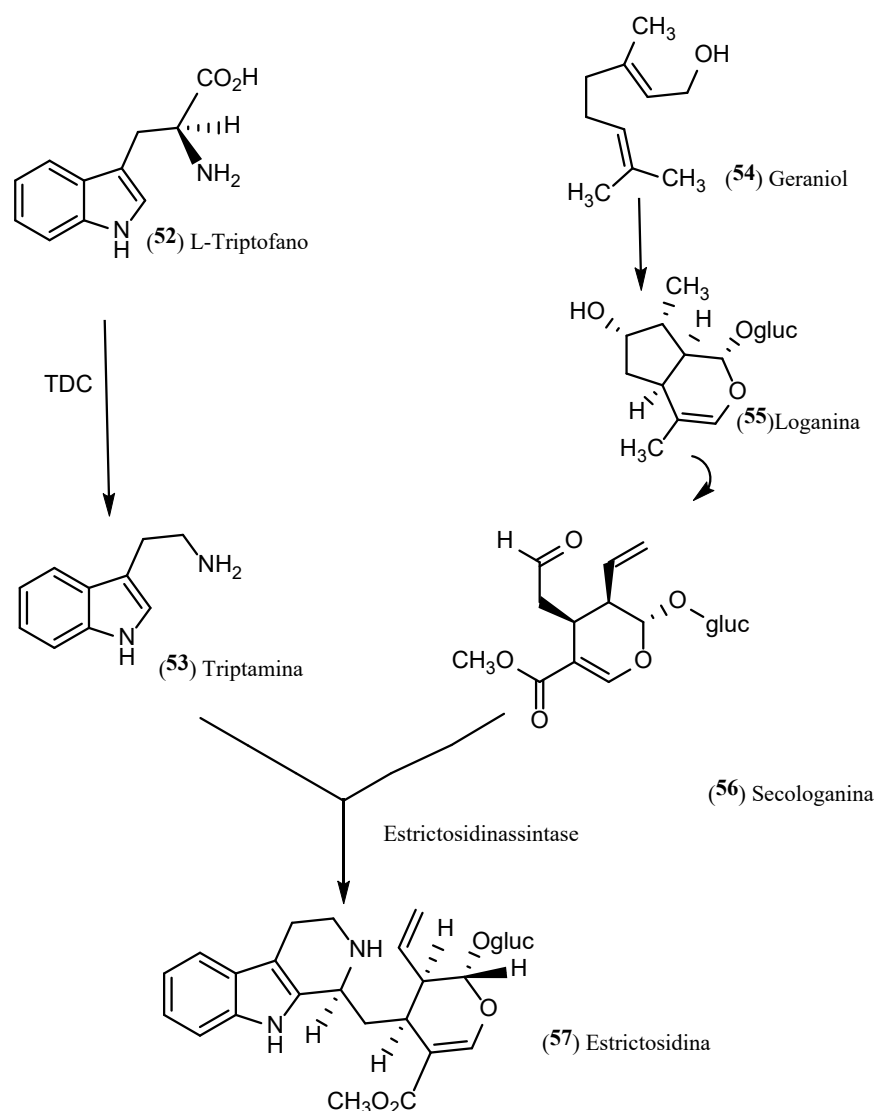


Os alcaloides indólicos monoterpênicos são o maior subgrupo, sendo encontrados em cerca de 8 famílias, principalmente em plantas pertencentes a três famílias da ordem Gentianales: Rubiaceae, Loganiaceae e Apocynaceae (Dewick, 2002).

Sua biossíntese vem sendo investigada há várias décadas, com experimentos realizados basicamente com *Catharantus roseus* (Croteau et al., 2000), que levaram ao isolamento e caracterização de várias enzimas envolvidas e clonagem de genes que as codificam. Ficou evidenciado que a porção aromática é oriunda do triptofano (52) que fornece

a triptamina (**53**) através do triptofano descarboxilase (TDC), enquanto a parte terpênica provém da secologanina (**54**), oriunda do geraniol (**55**), através de várias etapas que envolvem a sua hidroxilação pela enzima geraniol-10- hidroxilase (G10H). A reação entre essas duas substâncias é catalisada pela estrictosidina sintase (SSS), forma o glucoalcaloide 3 (α) (S) estrictosidina (**57**), o precursor universal dos alcaloides indoloterpênicos (Figura 10) (Croteau et al., 2000).

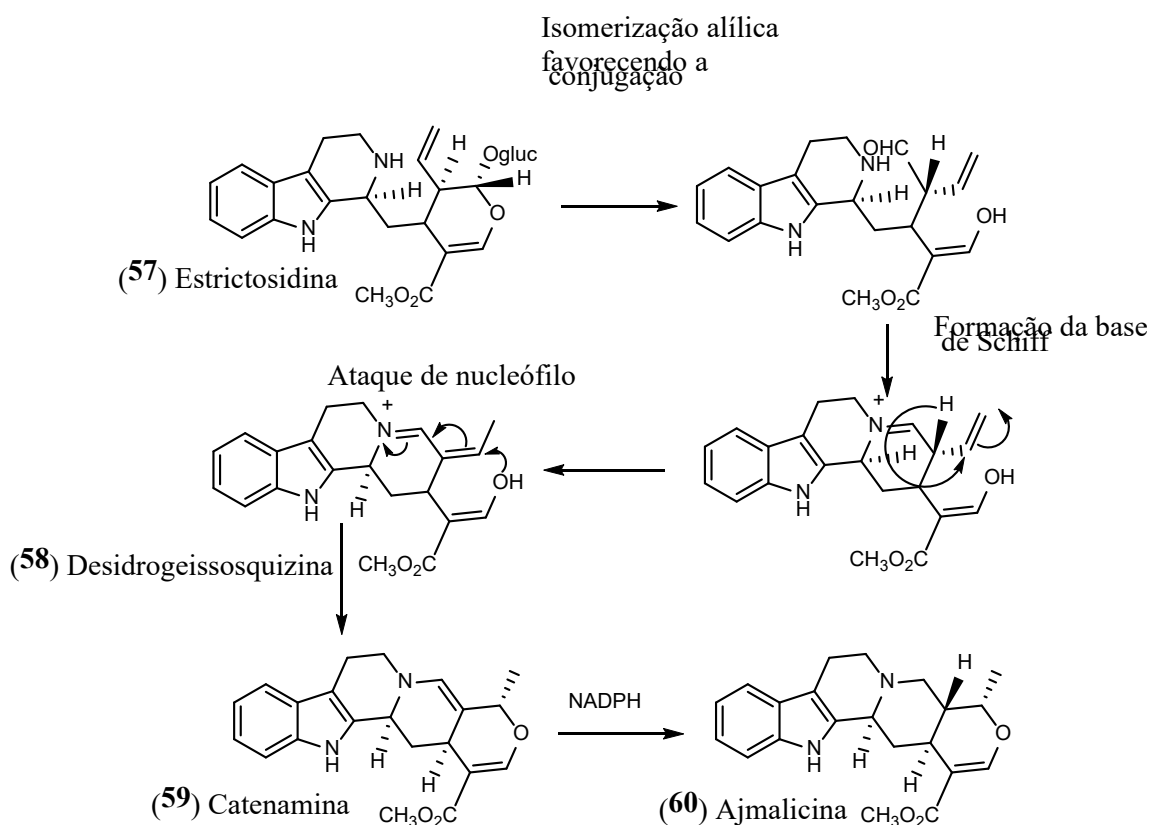
Figura 10: Rota biosintética da estrictosidina



Fonte: Croteau et al. (2000).

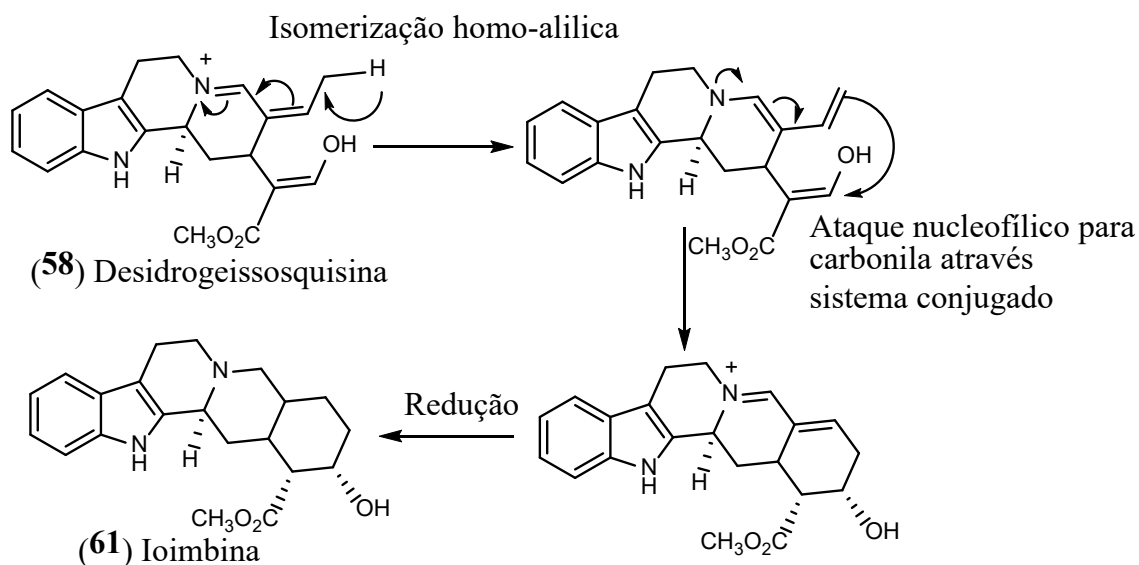
A partir da strictosidina (**57**), várias rotas levam a alcaloides de diversos grupos e subgrupos. Na próxima etapa ocorre a hidrólise enzimática da strictosidina (**57**), mediada pela enzima β -glicosidase (SG), levando a um hemiacetal que está em equilíbrio com um dialdeído altamente instável, que é convertido por meio de vários rearranjos intramoleculares em 4,21-desidrogeissosquizina (**58**) em uma carbinolamina da catenamina, e subsequentemente em catenamina (**59**) e ajmalicina (**60**) (Figura 11). Variantes carbocíclicas provenientes da desidrogeissosquizina (**58**) levam a alcaloides tipo ioimbina (Le Men et al., 1965). Na figura 12, são apresentados, esquema das reações e estruturas envolvidas.

Figura 11: Rota biosintética da formação da ajmalicina



Fonte: Le Men et al., 1965

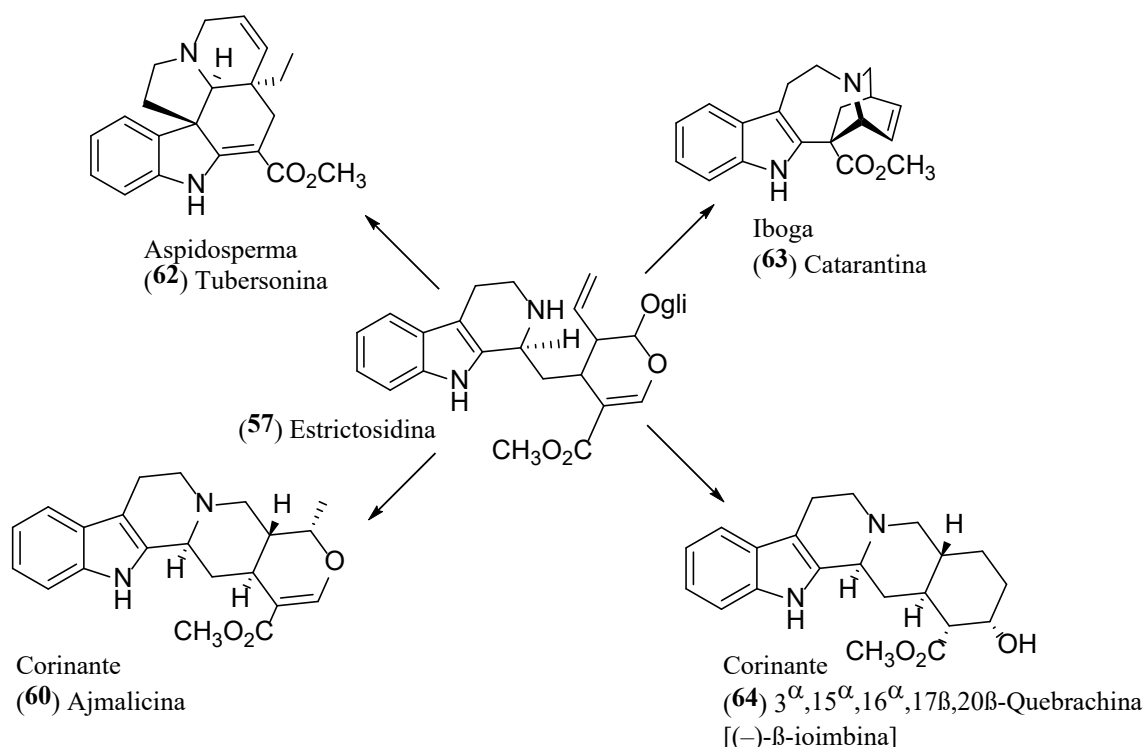
Figura 12: Rota biosintética da formação da ioimbina



Fonte: Le Men et al., 1965

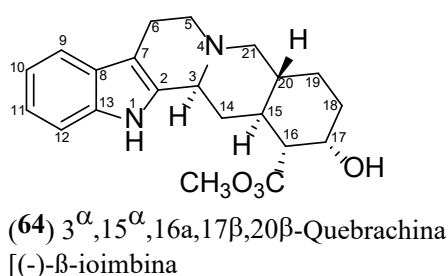
Até meados do século passado, eram conhecidos cerca de 350 alcaloides indólicos monoterpênicos. Le Men e Taylor (1965) classificaram, conforme variação ou rearranjos em seus esqueletos, em três classes denominadas: ioimbinoídes (correspondendo ao tipo corinante), iboga e aspidoesperma (Figura 13) e fizeram uma proposta de um sistema de numeração para os seus esqueletos com base no esqueleto da ioimbina, de modo que se atribui aos carbonos da mesma origem biogenética o mesmo número, em qualquer dos alcaloides (Figura 14). Basicamente, tais alcaloides possuem uma porção triptamínica e o restante é o resíduo monoterpenoide (secologanínico) C-9 ou C-10, onde os três grupos estruturais corinante, aspidoesperma e iboga, são discerníveis de acordo com o arranjo de seus átomos.

Figura 13: Principais grupos de alcaloides indólicos monoterpênicos



Atualmente são conhecidos mais de 2500 alcaloides indólicos terpênicos, distribuídos de acordo com seus esqueletos em 11 classes e subdivididos em 46 subclasses (Simões et al., 2002). Como destacado anteriormente, a família Apocynaceae possui uma rica variedade de esqueletos, o que também é verificado no gênero *Aspidosperma* e na espécie em estudo, que apresentam alcaloides derivados dos esqueletos básicos, corinante, iboga e aspidosperma (Pereira et al., 2007)

Figura 14: Numeração de alcaloides terpênicos do tipo ioimbano



Pereira et al. (2007) realizou um levantamento bibliográfico de todos os alcaloides isolados nesse gênero (*Aspidosperma*), e chegou ao número de 247 alcaloides de variados

tipos de esqueletos. Desse alcaloides alguns foram isolados nas espécies *A. marcgravianum* e *A. excelsum*, como descrito nos tópicos abaixo.

1.4.2.4. Alcaloides isolados de *A. excelsum*

Esses alcaloides estão agrupados de acordo com o sistema utilizado por Pereira et al. (2007) e Bolzani et al. (1987) nas figuras 15 a 18.

Figura 15: Alcaloides de *A. excelsum* do tipo aspidoscarpina

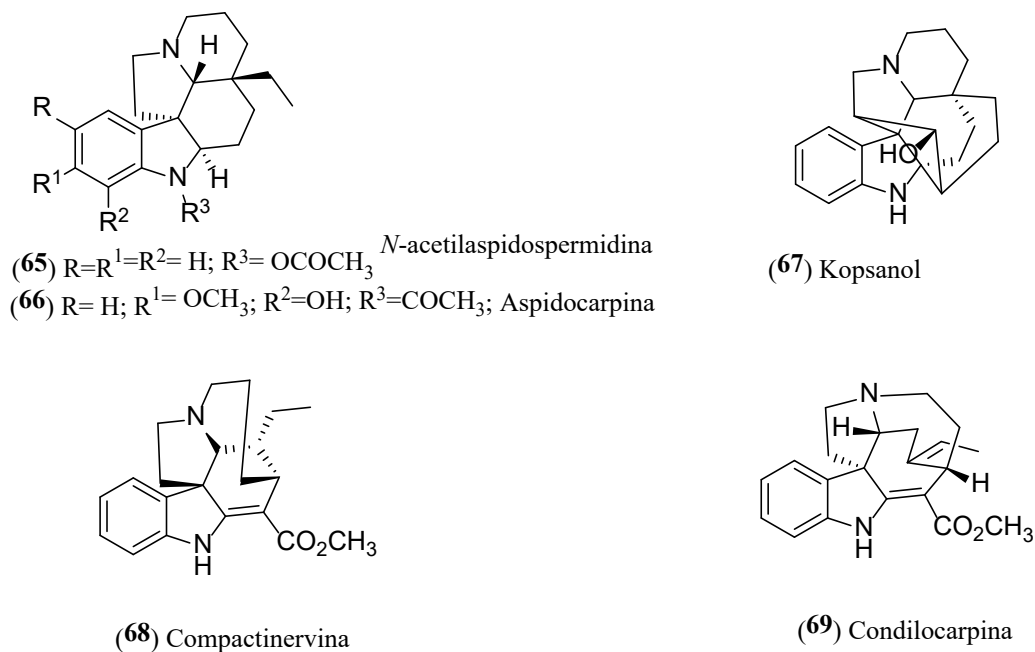
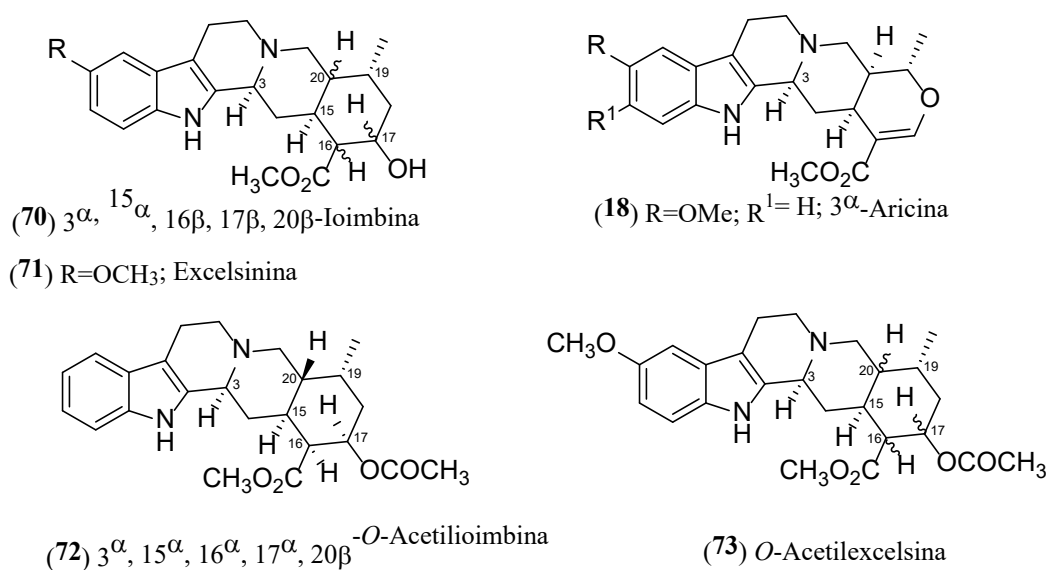
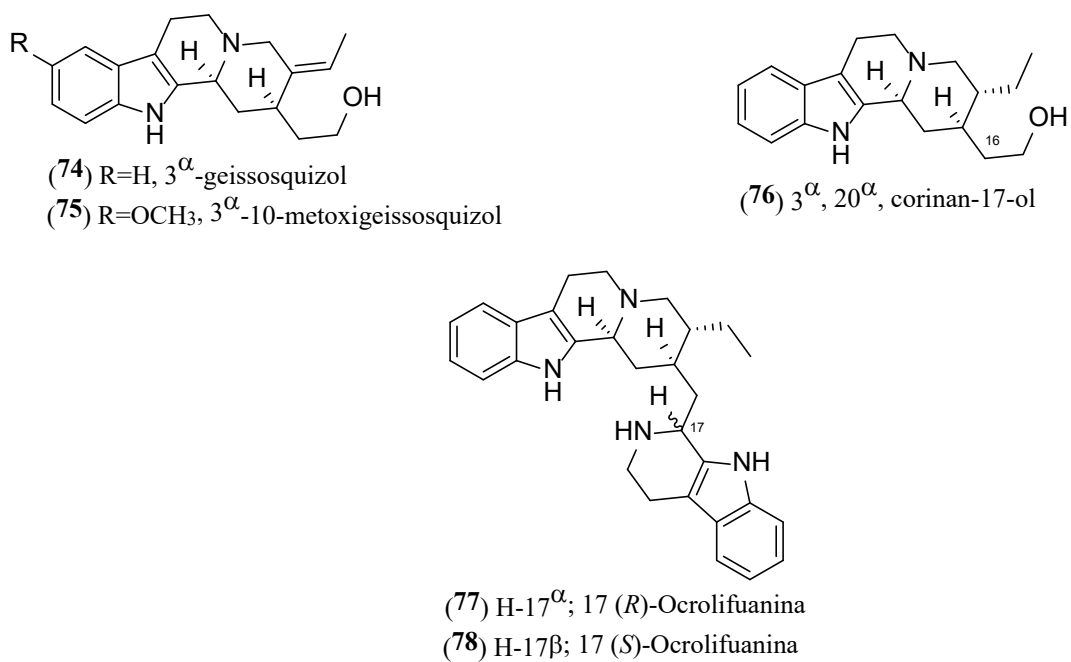


Figura 16: Alcaloides de *A. excelsum* do tipo ioimbano e heteroioimbano



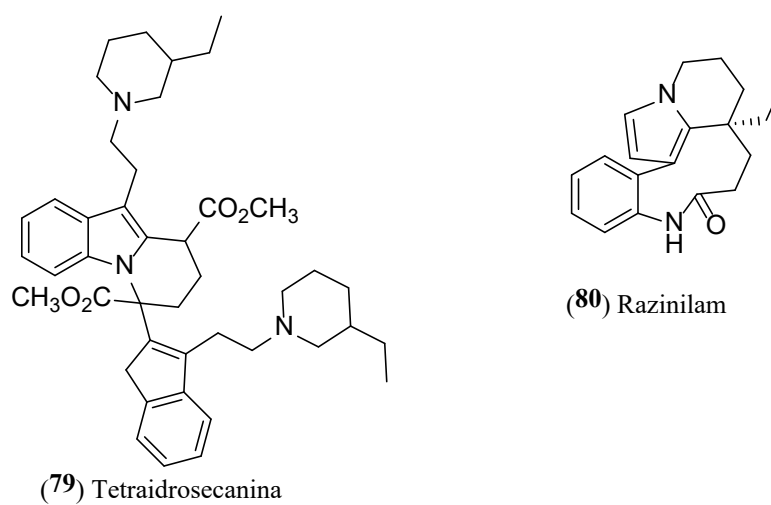
Fonte: Pereira et al. (2007)

Figura 17: Alcaloides de *A. excelsum* do tipo geissosquizol e ocrolifuanina



Fonte: Pereira et al. (2007)

Figura 18: Alcaloides de *A. excelsum* do tipo secamina e micelaneo

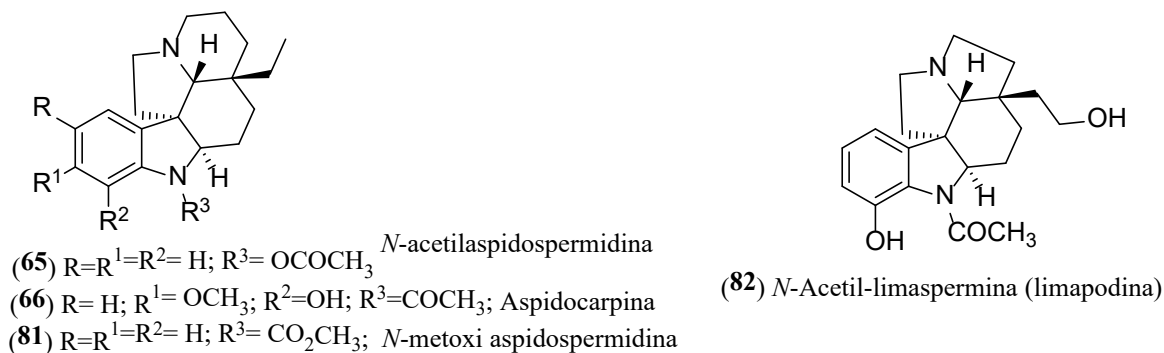


Fonte: Pereira et al. (2007)

1.4.2.4. Alcaloides isolados de *A. marcgravianum*

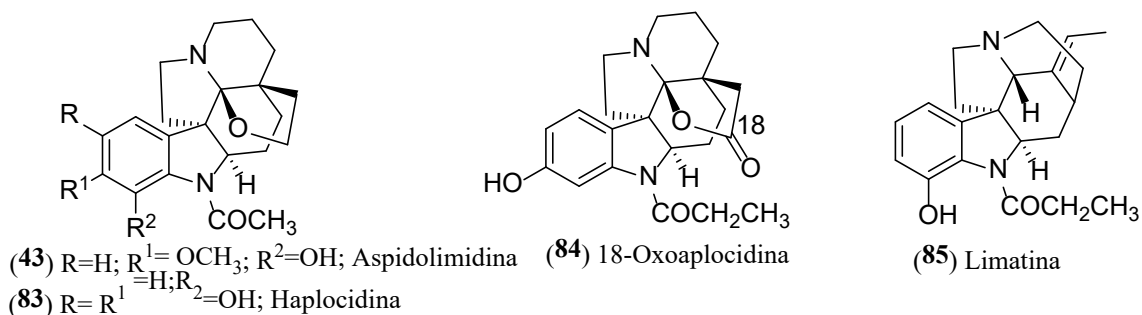
Dessa espécie já foram identificados 66 alcaloides que estão agrupados de acordo com o sistema utilizado por Pereira et al. (2007) e Bolzani et al. (1987) nas figuras 19 a 28.

Figura 19: Alcaloides de *A. marcgravianum* do tipo aspidoscarpina (**66**)



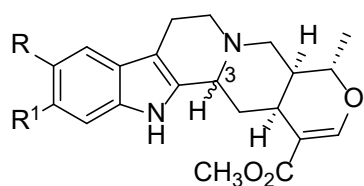
Fonte: Pereira et al. (2007)

Figura 20: Alcaloides da espécie *A. marcgravianum* do tipo aspidolimidina (**43**).



Fonte: Pereira et al. (2007)

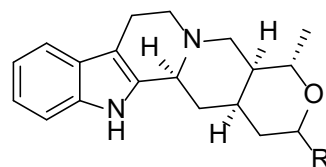
Figura 21: Alcaloides de *A. marcgravianum* do tipo heteroioimbano e picrofilina.



(18) R=OCH₃; R¹= H; 3^α Aricina

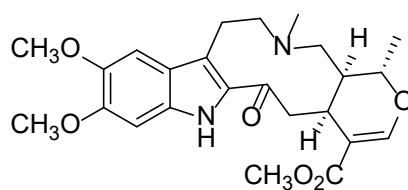
(47) R=R¹= OCH₃; 3^α Isoeserpilina

(48) R=R¹= OCH₃; 3^β Reserpilina



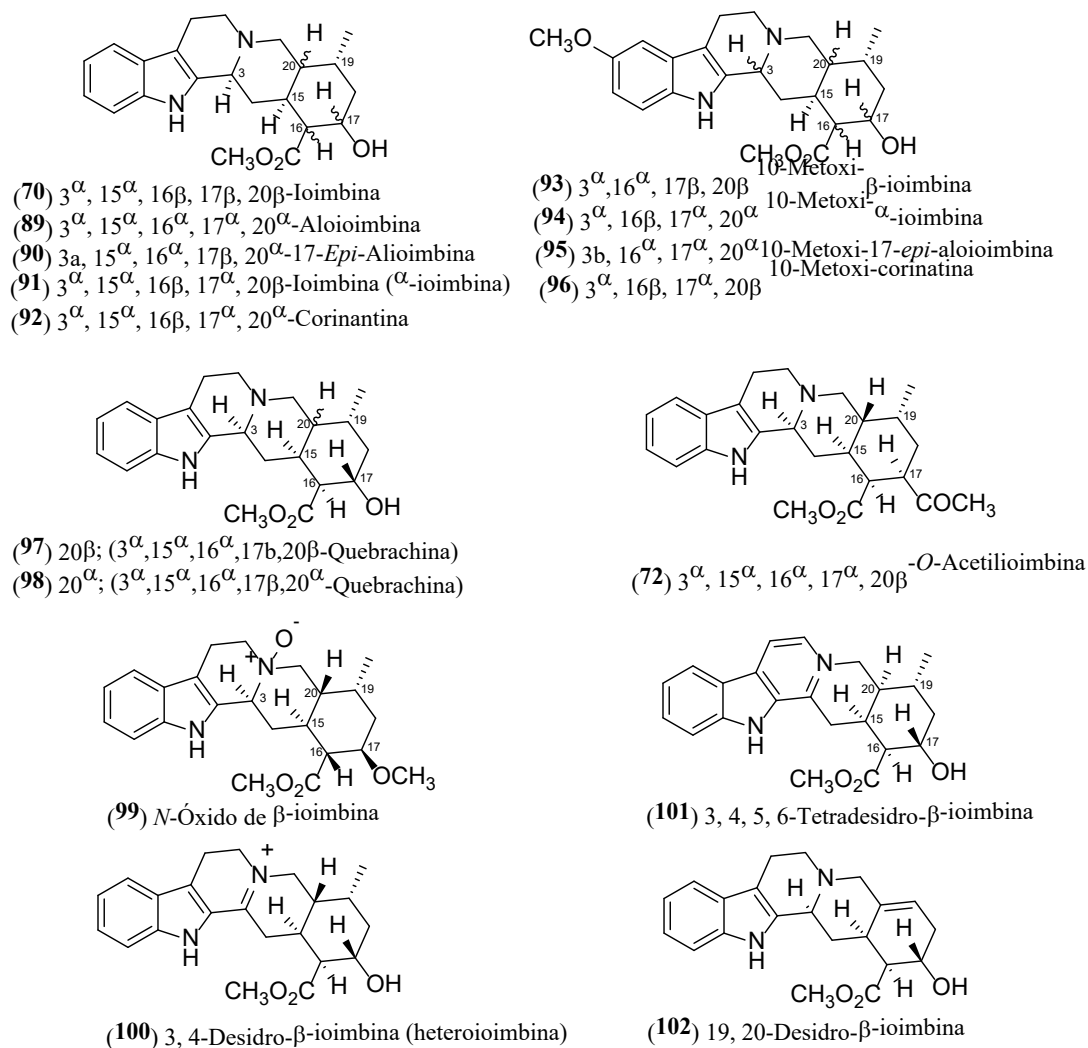
(86) R=H; 3^α, 15^α, 16^α, 17^α, 20^α-Tetraidro-alstonina

(87) R=OH; 16-Descarbometoxi-16, 17-diidro-17-hidroxi-*epi*-9-ajmalicina

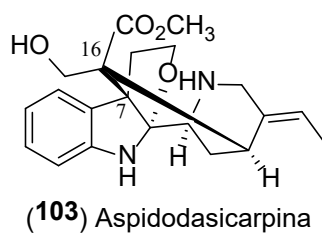


(88) 10,11-Dimetoxipicrafilina

Fonte: Pereira et al. (2007)

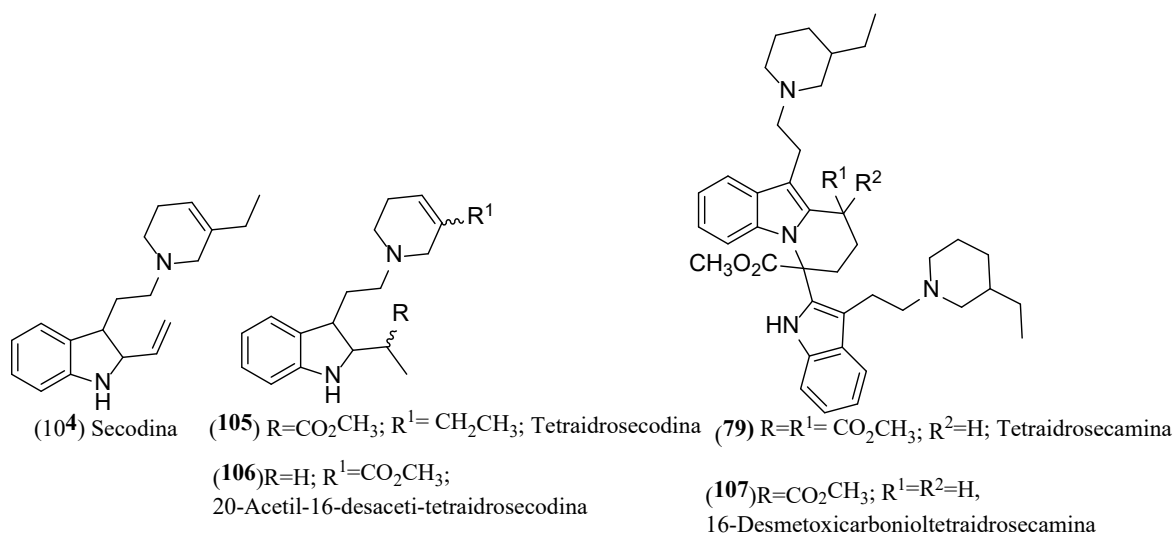
Figura 22: Alcaloides de *A. marcgravianum* do tipo ioimbano

Fonte: Pereira et al. (2007)

Figura 23: Alcaloides de *A. marcgravianum* do tipo aspidodasicarpina (Ponte C16-C7)

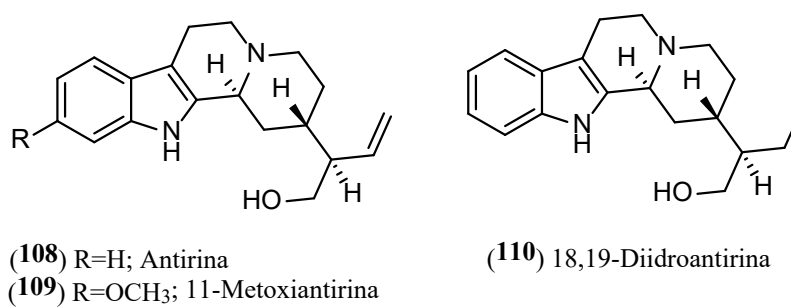
Fonte: Pereira et al. (2007)

Figura 24: Alcaloides de *A. marcgravianum* do tipo secodina e secamina



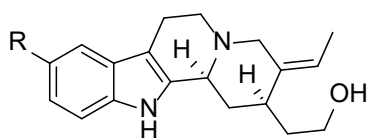
Fonte: Pereira et al. (2007)

Figura 25: Alcaloides de *A. marcgravianum* do tipo antirina



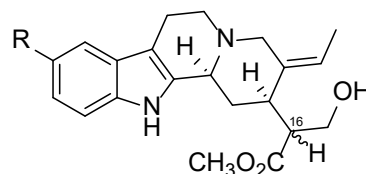
Fonte: Pereira et al. (2007)

Figura 26: Alcaloides de *A. marcgravianum* do tipo geissosquizol (**70 e 71**), isositsiriquina (105 a 109), sitsiriquina (**110 a 112**) e corinanteol (**72, 113 a 117**)



(**74**) R=H, 3^α-geissosquizol

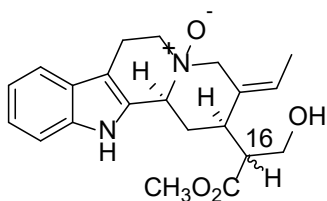
(**75**) R=OCH₃, 3^α-10-metoxigeissosquizol



(**111**) R=H, H-16^α, 16(*S*)-isositsiriquina

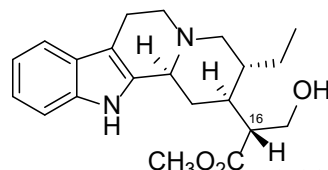
(**112**) R=H, H-16^β, 16(*R*)-*epi*-isositsiriquina

(**113**) R=OCH₃, H-16^β, 16(*S*)-10-metoxi-*epi*-isositsiriquina

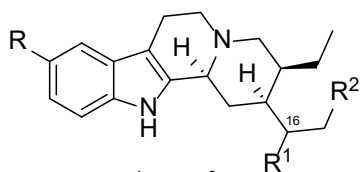


(**114**) H-16^α; 4(*S*)-*N*-óxido de 16(*R*)-*epi*-isositsiriquina

(**115**) H-16^β; 4(*S*)-*N*-óxido de 16(*S*)-*epi*-isositsiriquina

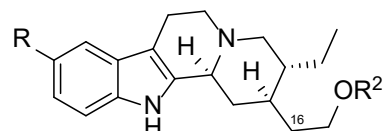


(**116**) 16(*R*)-18,19-dihidroisitsiriquina



(**117**) R=R¹=H; R²=CO₂CH₃; 16(*S*)-18,19-dihidroisitsiriquina

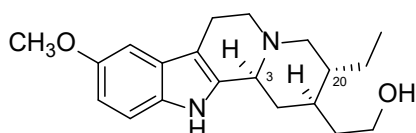
(**118**) R=OCH₃; H; R¹=CO₂CH₃; R²=H;
16(*R*)-18,19-dihidroisitsiriquina



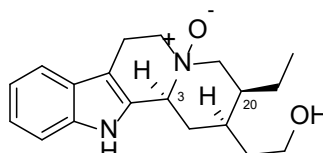
(**76**) R=R¹=H; 3^α, 20^β-corinan-17-ol

(**119**) R=OCH₃; R¹=H;
3^α, 20^β-10-metoxi-corinan-17-ol

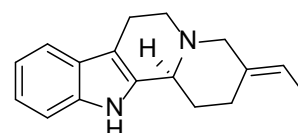
(**120**) R=H; R¹=CH₃;
3^α, 20^β-3,4,5,6-tetraidro-corinan-17-ol



(**121**) 3^α, 20^α;
10-metoxi-corinan-17-ol



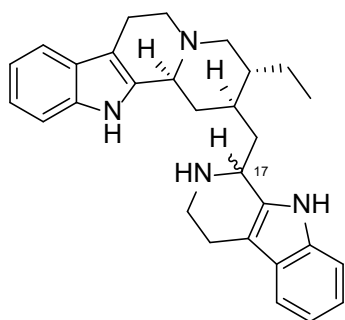
(**122**) 3^α, 20^β; *N*-óxido de corinan-17-ol



(**123**) Deplancheína

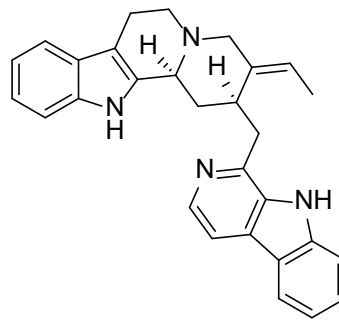
Fonte: Pereira et al. (2007)

Figura 27: Alcaloides de *A. marcgravianum* do tipo ocolifuanina

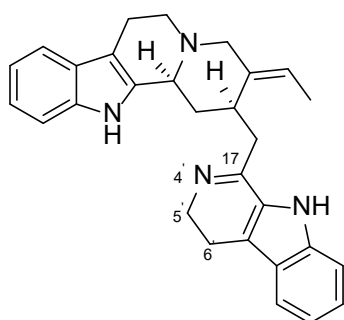


(77) H-17 α ; 17(R)-ocolifuanina

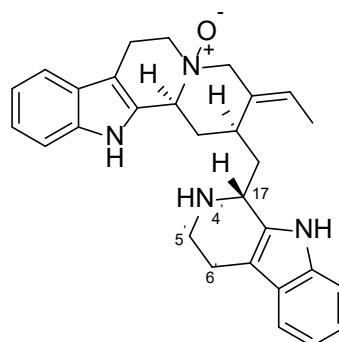
(78) H-17 β ; 17(S)-ocolifuanina



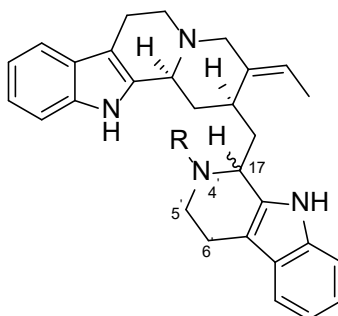
(124) Usambarensina



(125) 17,4'-Desidro-5',6'-diidrousambarensina



(126) N-óxido de-17,4',5',6'-tetraidro 17(R)-usambarensina



(127) R=H; 17 β ; 17(R)-17,4',5',6'-tetraidrousambarensina

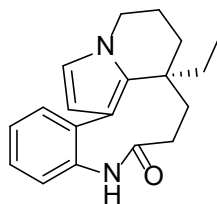
(128) R=H; 17 α ; 17(S)-17,4',5',6'-tetraidrousambarensina

(129) R=CO₂CH₃; H-17 β ; N-carbometoxi-17,4',5',6'-tetraidro-17(R)-usambarensina

(130) R=CO₂CH₂CH₃; H-17 β ; N-carboetoxi-17,4',5',6'-tetraidro-17(R)-usambarensina

Fonte: Pereira et al. (2007)

Figura 28: Alcaloides micelaneas de *A. marcgravianum*.



(131) Razinilam

Fonte: Pereira et al. (2007)

Como descrito acima, *A. excelsum* é utilizada tradicionalmente em várias formas no combate de doença e possui estudos a fim de evidenciar a eficácia dessa planta. *A. excelsum* tem atividade *in vitro* contra o *P. falciparum* de acordo com dados antimaláricos do grupo LAPAAM (Oliveira et al., 2009; Rocha e Silva, 2014; Nascimento et al., 2019). Assim essa espécie se torna um objeto interessante para um estudo bioguiado da atividade antiplasmódica com o intuito de isolar e purificar substâncias antimaláricas. Añez (2009) evidenciou a presença não somente de grande quantidade de alcaloides, mas também a presença de outras substâncias que poderiam ser ativas contra o parasita, como cumarinas e terpenoides pentacíclicos.

2. OBJETIVO GERAL

Isolar e identificar substâncias naturais com atividade antimalárica a partir das cascas de *Aspidosperma excelsum* Benth (Apocynaceae).

2.1. Objetivos específicos

- Contribuir para o conhecimento da composição química de *A. excelsum*.
- Isolar substâncias a partir da casca de *A. excelsum* para teste *in vitro* frente ao *P. falciparum*.
- Avaliar a citotoxicidade das substâncias que apresentarem um maior potencial antimalárico e disponibilidade.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Equipamentos e aparelhos analíticos

- LAPAAM e dependências:
Foram utilizados para a análise e condução laboratorial desse trabalho, os seguintes equipamentos:
Balança analítica: Marca Master, modelo AY220, com limite máximo de 220 g e mínimo de 0,001 g.
Balança semi-analítica: Marca Toledo, modelo ARC120, com limite de peso de 3100 g e mínimo de 0,01 g.
Lâmpada de UV: Marca UVP, modelo CC-10 (ondas longas, 365 nm e curtas, 254 nm).
Moinho de facas: Marca Marconi, modelo MA 340.
Rotaevaporador: Marca Fisatom, modelo 804.
Banho de ultrassom: Marca Unique, modelo USC-1800A.
- CA-LTQPN/INPA.
Espectrômetro de RMN: Marca Bruker Ultrashield de 300 MHz.
CLAE, marca Shimadzu acoplado-Espectrômetro de massas MicrOTOF-QII, Marca Bruker.
- UFAM/CAM
Espectrômetro de RMN: Marca Bruker Ultrashield de 500 MHz.
- FIOCRUZ-RJ
Espectrômetro de RMN: Marca Bruker Ultrashield de 400 MHz.

3.2. Cromatografia

3.2.1. Cromatografia em coluna (CC)

As colunas cromatográficas foram realizadas utilizando sílicas de fase normal e reversa (Merck), sílica gel (0,063 - 0,200 mm), sílica gel *flash* (0,040 - 0,063 mm) e RP-18 (0,040 - 0,063 mm).

3.2.2. Cromatografia em camada delgada (CCD)

Foram utilizadas cromatoplasas de fase normal e reversa RP-18 da Merck 20 × 20 cm, recortando-se placas até uma altura de 5 cm. Para as análises de extratos, frações e reunião de

subfrações cromatográficas, as placas de CCD foram visualizadas em câmara de luz UV nos comprimentos de onda 254 e 365 nm e reveladas com solução de *p*-anissaldeído em aquecimento a 100°C e reagente de Dragendorff.

3.2.3. Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP)

Na preparação das placas de CCDP, foi utilizada sílica gel com indicador de fluorescência (F₂₅₄) (Merck). Aproximadamente 15 g de sílica foi aplicada em cada placa. A sílica foi suspensa em água destilada até a formação de um gel viscoso uniforme (com auxílio de ultrassom) e aplicadas manualmente em placas de 20 X 20 cm. Em seguida, foi colocada na posição horizontal para secar à temperatura ambiente por 24 h. Antes da sua utilização as placas foram ativadas na estufa a 90°C por aproximadamente 12 h.

3.2.4. Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (CL-EMAR)

As análises por cromatografia líquida de alta eficiência foram realizadas num equipamento Modelo Prominence UFLC (Shimadzu), equipado com bomba binária LC-20AT, detector de arranjo de diodos (DAD) SPD-20A e injetor automático SIL-20A. As colunas utilizadas foram Phenomenex C-18 (70 X 2.1 mm, 2.6 µ). Solventes utilizados isopropanol, metanol e acetonitrila, grau CL-EM. As amostras foram dissolvidas nas fases móveis empregadas em cada análise e filtradas em membranas de teflon com poros de 0.45 µm (Agilent). O espectrômetro de massa utilizado Marca Bruker, com fonte ionização química a pressão ambiente (IQPA) e IES (ionização por eletrospray) em modo positivo e negativo, resolução de 17500 (FWHM). Foi utilizado o programa Compass, versão 4.1, para controle, aquisição e processamento de dados.

Essas análises forneceram as massas de alta resolução (CL-EMAR) das substâncias e através do banco de dados do equipamento foi sugerida uma fórmula bem como o fator de erro para aquela fórmula. Para confirmação da substância o erro permitido deve estar entre 0-10 ppm. O cálculo do erro foi efetuado através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ erro} = \frac{\text{Massa Teórica} - \text{Massa Experimental}}{\text{Massa Teórica}} \times 10^6$$

Esses equipamentos estão instalados na Central Analítica do Laboratório Temático de Química de Produtos Naturais (CA-LTQPN) do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA).

3.3. Ressonância magnética nuclear

Os espectros de ressonância magnética de hidrogênio e de carbono (1D) foram obtidos em um espectrômetro da marca Bruker modelo Fourier 300 (7,05 T), operando na frequência de 300 MHz (RMN ^1H) e 75 MHz (RMN ^{13}C), utilizando vários solventes deuterados como CDCl_3 , MeOD, D_2O e Acetona- d_6 (CIL - Cambridge Isotope Laboratories Inc.), além do padrão de referência TMS (tetrametilsilano/Sigma-Aldrich) nos solventes utilizados. Também foram registrados espectros de RMN bidimensionais (2D) de COSY, HSQC, HMBC, NOESY, e J_{RES} na CA-LTQPN do INPA. Os deslocamentos químicos foram registrados em ppm (δ).

No equipamento da UFAM (Central Analítica) foram realizadas análises de RMN (1D e 2D) de ^1H , COSY, HSQC, HMBC e NOESY.

Na FIOCRUZ-RJ (Laboratório de Produtos Naturais 4 (PN4)) foram obtidos todos os espectros referentes à substância A.

3.4. Isolamento de substâncias de *A. excelsum*

Esse projeto usou material vegetal coletado e extraído em épocas distintas como descrito a seguir.

3.4.1. Extratos CH_3OH e H_2O de *A. excelsum* do banco de extratos do LAPAAM

Parte desse estudo químico utilizou extratos preparados a partir de cascas de *A. excelsum* (2 Kg), coletados por Henrique (2007) na Reserva Adolpho Ducke, situado na estrada AM-010, Km 28. As coordenadas da localização desta espécie de *Aspidosperma* foram previamente cadastradas nos levantamentos pelo Sr. José Ramos (CPBO/INPA) com coordenadas (02°53' S 59°58' W). As amostras foram coletadas da planta identificada com o número 2280 no marco 472. A exsicata desse exemplar está depositada no herbário do INPA com o número 180516 (Henrique, 2007).

Após a limpeza, secagem à sombra e moagem do material vegetal, duas porções distintas da serragem foram extraídas separadamente com água deionizada (infusão, 100 °C, 5 minutos), metanol (em aparelhagem de Soxhlet, 3 X 6 h). Os rendimentos estão citados na tabela 3 (Henrique, 2007).

Tabela 3: Rendimento e teor extrativo dos processos de extração da casca de *A. excelsum* (Henrique, 2007).

Código	Solvente	Rendimentos	
		(g)	(%)
1EMH-A	MeOH (Soxhlet)	5,53	6,8
1EAH-B	Água (infusão)	6,63	8,4

*Extração com MeOH, realizada com 81,3 g de cascas secas e moídas

** Extração com água, realizada com 78,7 g de cascas secas e moídas

No banco de extrato do LAPAAM foram utilizados 2 g do extrato aquoso e 3,7 g do extrato metanólico. Os extratos foram analisados por CCD e CLAE e apresentaram perfil cromatográfico semelhante. Por essa característica os dois extratos foram reunidos (1EMA-H) e utilizados no presente estudo.

3.4.2. Coleta e preparação de extrato de *A. excelsum*

Após um levantamento dos dados no herbário do INPA, foi identificado o exemplar do espécime na qual foi realizada a primeira coleta, localizado na Reserva Adolpho Ducke. Em 22 de dezembro de 2015, foi realizada a coleta de 6,5 Kg de casca de *A. excelsum* a partir do mesmo espécime (exemplar) de onde foi obtido o material da coleta descrita acima por Henrique (2007). Esse material foi processado conforme descrito abaixo.

3.4.3. Secagem e moagem

As cascas frescas foram secadas em estufa climatizada a uma temperatura de 45°C por 48 h. Após a secagem o material vegetal foi triturado em moinho de facas para aumentar a superfície de contato entre o solvente da extração na etapa seguinte.

3.4.4. Extração

O primeiro método utilizado foi o de soxhlet (extração contínua sólido-líquido). Para a extração foi utilizado metanol grau comercial destilado. A extração foi realizada com 100 g de casca seca e moída (3 X 6 h) (Tabela 4, 2EMCS). Outros extratos foram preparados por maceração em condições variadas a fim de verificar os melhores rendimentos e presença de alcaloides nos extratos.

Foi realizada extração por maceração em três condições diferentes. Na primeira maceração foram utilizados dois solventes, metanol e etanol. Dois erlenmeyers de 1 L cada, foi adicionado o material vegetal (100 g), em seguida foi adicionado 500 mL de metanol no primeiro erlenmeyer e 500 mL de etanol no segundo erlenmeyer. A extração foi agitada três vezes durante o dia, sendo que a cada 7 dias da extração, era filtrado e adicionado solventes novamente até a exaustão do material vegetal (Tabela 4, 2EMCM e 2EECM, respectivamente).

Na segunda condição de maceração foi utilizada a mesma metodologia descrita acima, sendo que o início da extração era realizado a tarde e deixada macerando de um dia para o outro. Na manhã seguinte, o material era levado ao ultrassom por 45 min a uma temperatura de 45°C. Em seguida filtrado e rotaevaporado, obtendo-se em seguida os rendimentos apresentados na tabela 4 com códigos 2EMCMS e 2EECMS, respectivamente.

A terceira forma de maceração foi igual à primeira e à segunda descritas acima, porém, os solventes foram alcalinizados com NH_4OH , até a proporção de 2%. Os rendimentos estão na tabela 4 (quinta coluna) para 2EMCM (2%), 2EECM (2%), 2EMCMS (2%) e 2EECMS (2%).

Tabela 4: Rendimento após extração da casca de *A. excelsum* por soxhlet, maceração e ultrassom

Códigos	Solventes	Condições	% NH_4OH	Rend. (%)
2EMCS	MeOH	Soxhlet	0	9,9
2EMCM	MeOH	Maceração	0	6,3
2EMCMS	MeOH	Maceração/ ultrassom	0	6,5
2EECM	EtOH	Maceração	0	5,9
2EECMS	EtOH	Maceração/ ultrassom	0	6,0
2EMCM (2%)	MeOH	Maceração	2	6,4
2EMCMS (2%)	EtOH	Maceração/ ultrassom	2	6,5
2EECM(2%)	MeOH	Maceração	2	6,4
2EECMS (2%)	EtOH	Maceração/ Ultrassom	2	6,4

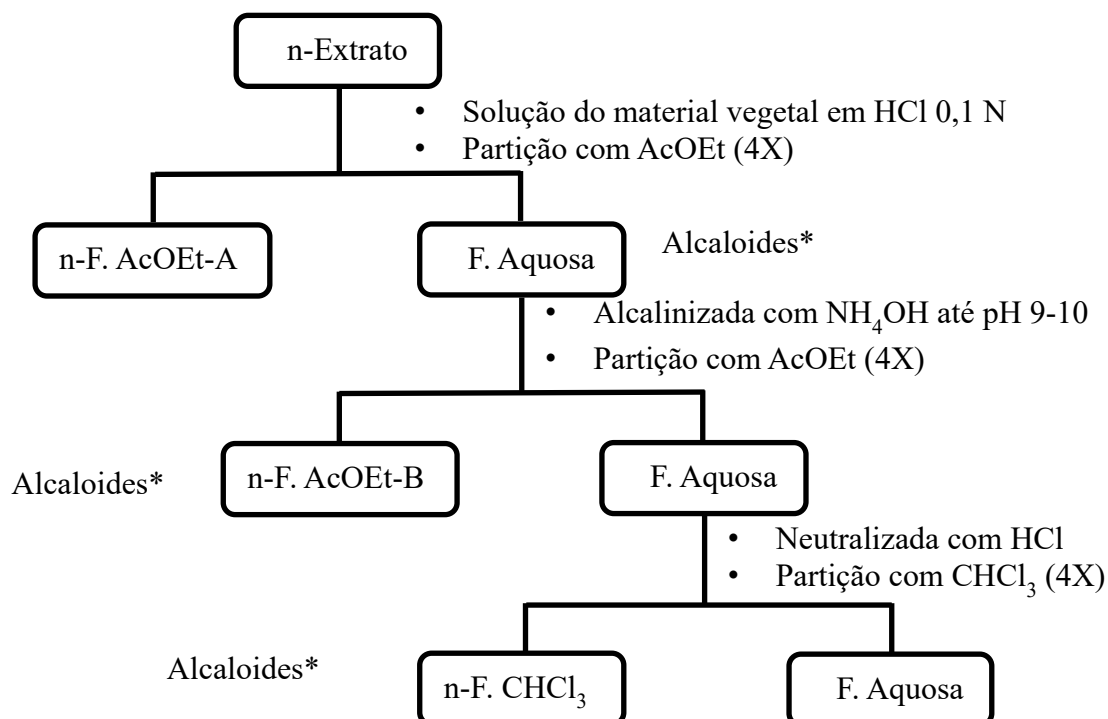
Todas as extrações foram realizadas com 100 g de material vegetal

3.4.5. Partição ácido-base dos extratos de *A. excelsum* obtidos nas tabelas 3 e 4.

Para um primeiro teste dessa partição foi utilizado o extrato codificado 1EMA-H (Tabela 3). A metodologia utilizada foi a descrita por Valente et al. (2006), que consiste em uma partição ácido-base onde o extrato seco é tratado com solução de HCl 0,1 N em uma proporção de 0,15 mL/mg. A mistura foi colocada no banho de ultrassom por 5 min e em seguida extraída com AcOEt (4 vezes), sendo o volume de AcOEt utilizado igual ao da solução ácida. A fração aquosa foi alcalinizada com NH₄OH até pH 9-10 (indicador de pH, fita) e extraída com o mesmo volume de AcOEt (4 vezes). Após realizar o procedimento descrito, foi realizada uma CCD da fração aquosa e revelado com reagente de Dragendorff onde observou-se que a fração aquosa ainda possuía alcaloides, então a mesma foi neutralizada (indicador de pH, fita) com a solução de HCl e extraída com CHCl₃ (4 vezes), gerando assim uma quarta fração. As 3 frações foram secas com Na₂SO₄ anidro, filtradas, evaporadas à pressão reduzida e pesadas conforme fluxograma 1.

Essa metodologia de fracionamento foi realizada com todos os extratos reunidos da tabela 3 (1EMA-H) e todos os 9 extratos descritos na tabela 4.

Fluxograma 1: Partição ácido-base dos extratos



n=1 (extrato preparado por Henrique (2007))

n=2 (extrato preparado no início do referido trabalho)

*detectados por CCD revelados com reagente de Dragendorff.

As tabelas 4 e 6 demonstram que apesar da extração em soxhlet (2EMCS, 9,86 %) ter um melhor teor extrativo, quando é realizada a partição ácido-base nos extratos, o rendimento da fração alcaloídica enriquecida não é tão significativo (2F.AcOEt-B, 15,1%) quando comparado com os demais rendimentos dos extratos metanólicos e etanólicos a partir de maceração com ou sem ultrassom.

Quando comparadas às frações dos extratos obtidos por maceração, sem alcalinização do solvente, a melhor fração alcaloídica mais rica foi obtido no extrato metanólico por sonicação (2F.AcOEt-B, com rendimento de 21,6%, Tabela 6). E quando é comparado os extratos metanólicos e etanólicos com ultrassom e 2% de NH_4OH , a fração alcaloídica mais enriquecida (2F. AcOEt-B, Tabela 6) é obtida com maceração com MeOH e sonicação por ultrassom a 2% de NH_4OH (2EMCMS, 2%), com rendimento de 31,8%), como mostra a tabela 6.

Tabela 5: Rendimentos da partição do extrato 1EMA-H

Código (Extrato)	Massa (g)	1F.AcOEt-A Rend. (g)	1F.AcOEt-B Rend. (g)	1F. CHCl_3 Rend. (g)	1F.H/M Rend. (g)
1EMA-H	7,6	1,97	1,08	1,13	3,08

Tabela 6: Rendimentos do fracionamento dos extratos obtidos nas tabelas 4

Código (Extrato)	Massa (g)	2F.AcOEt -A Rend. (%)	2F.AcOEt -B Rend. (%)	2F. CHCl_3 Rend. (%)	2F. H_2O Rend. (%)
2EMCS	5,1	26,1	15,1	10,0	31,0
2EMCM	5,2	15,6	15,5	10,2	30,2
2EMCMS	5,0	15,4	21,6	13,6	30,6
2EECM	5,0	15,8	20,0	13,0	35,6
2EECMS	5,0	17,2	13,2	10,4	33,4
2EMCM (2%)	3,1	16,4	28,0	0,8	43,5
2EMCMS (2%)	3,1	10,0	31,8	1,67	49,3
2EECM (2%)	1,8	15,0	29,4	25,0	23,3
2EECMS (2%)	1,3	16,9	16,9	28,4	33,8

As frações de todos os extratos da tabela 6 foram submetidas à CCD as quais foram e reveladas em Dragendorff. As frações 2F.AcOEt-B de todos os extratos da tabela 6 apresentaram maior concentração de alcaloides, e por apresentarem um perfil cromatográfico

parecidos por CCD, os mesmos foram reunidos para o fracionamento descrito no fluxograma 7.

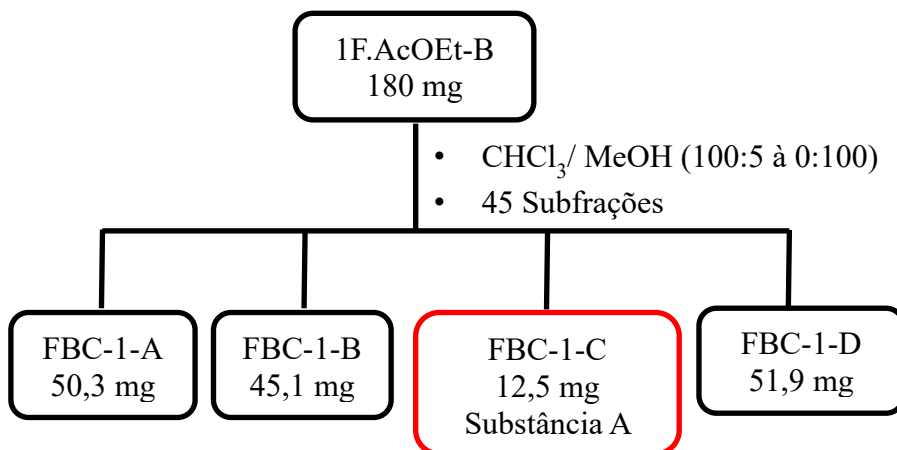
3.5. Fracionamento cromatográfico.

3.5.1. Fracionamento cromatográfico da fração 1F.AcOEt-B (alcaloídica).

O fracionamento iniciou com a fração 1F.AcOEt-B (1,08 g; Tabela 5) oriunda do extrato 1EMA-H.

Uma alíquota de 180 mg da fração 1F.AcOEt-B foi utilizada na primeira coluna cromatográfica ($\Phi \times h = 2,0 \times 15$ cm), utilizando sílica gel (0,063-0,200 mm, Merck) e empacotada com CHCl_3 . A coluna foi eluída com $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ com aumento de polaridade (100:5 a 0:100). Foram obtidas 45 subfrações com volume de 15 mL, as quais foram reunidas conforme seus perfis cromatográficos em 4 frações. A fração C (12,5 mg), apresentou um bom nível de pureza, observado por CCD (codificada como substância A) e foi levada a análise de RMN (1D e 2D) e CL-EMAR (Fluxograma 2).

Fluxograma 2: Isolamento da substância A

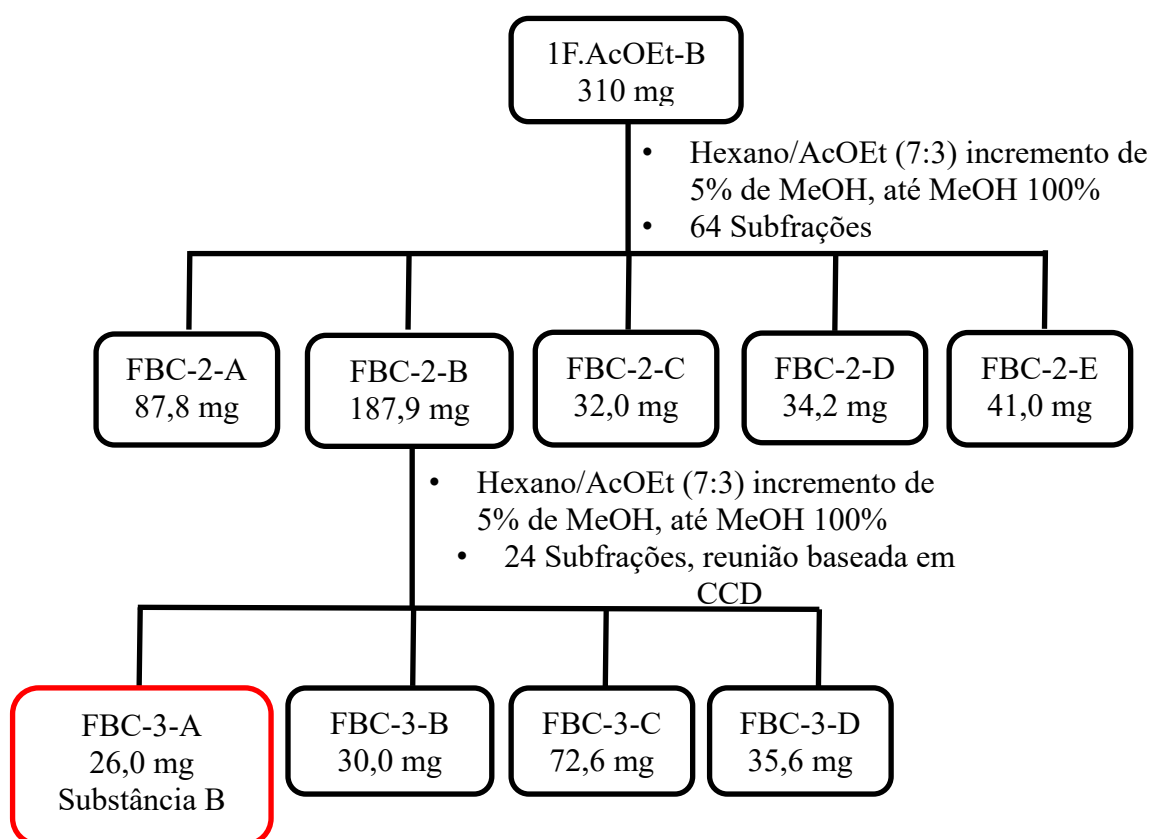


Uma alíquota de 310 mg da 1F.AcOEt-B foi utilizada na segunda CC. Uma coluna cromatográfica ($\Phi \times h = 1,9 \times 17$ cm), utilizando sílica gel (0,063-0,200 mm, Merck) sendo a mesma empacotada com hexano/AcOEt (7:3) e eluída no mesmo sistema do empacotamento com aumento de polaridade variando de 5% a 100% de MeOH. Foram obtidas 64 subfrações e conforme seus perfis cromatográficos, foram reunidas em 5 frações (Fluxograma 3).

A fração B (187,9 mg) Fluxograma 3, foi submetida a uma coluna cromatográfica ($\Phi \times h = 1,5 \times 15$ cm), empacotada com hexano/AcOEt (7:3) e eluída no mesmo sistema com aumento de polaridade com incremento de 5% de MeOH, até 100% de MeOH. Foram obtidas 24 subfrações e reunidas em 4 novas frações, conforme mostrado no.

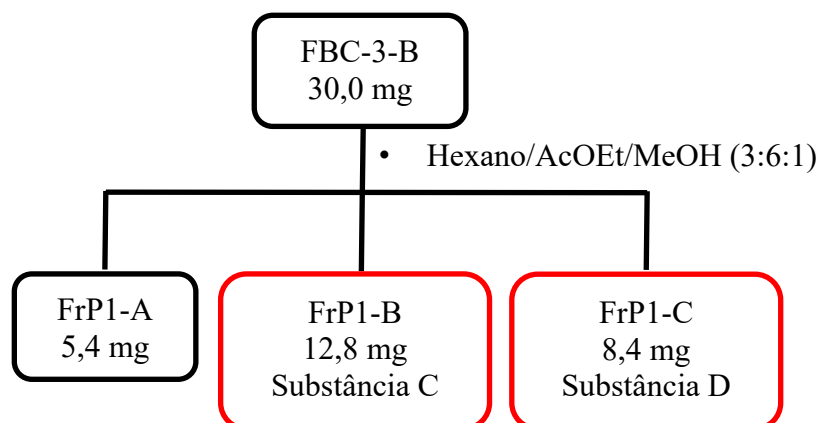
A fração FBC-3-A (26,0 mg), após análise por CCD, apresentou um bom grau de pureza e foi identificada como (substância B), e submetida a análise por CL-EMAR e posteriormente por RMN 1D e 2D.

Fluxograma 3: Isolamento da substância B



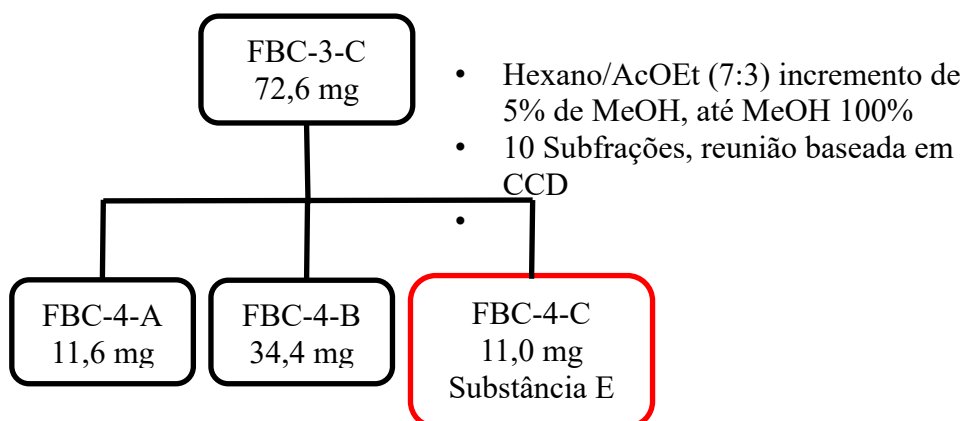
A fração FBC-3-B (30,0 mg) Fluxograma 4, foi submetida a CCDP, eluída com hexano/AcOEt/MeOH (3:6:1), de onde se obtiveram três frações (FrP1-A a FrP1-C). As frações FrP1-B (12,8 mg, substância C) e FrP1-C (8,4 mg, substância D), foram analisadas por CL-EMAR e RMN 1D e 2D.

Fluxograma 4: Isolamento das substâncias C e D por CCDP.



A fração FBC-3-C (72,6 mg) (Fluxograma 3) apresentou-se com relativa pureza por CCD e foi submetida a CC. Para essa coluna foi utilizada sílica *flash* (0,040- 0,063 mm; previamente ativada a 110°C por 12 h) empacotada com hexano/AcOEt (7:3) e eluída com o mesmo sistema, com aumento de polaridade e incrementos de 5% de MeOH, até MeOH 100%. Foram obtidas 10 subfrações que foram reunidas em 3 novas frações segundo seu perfil cromatográfico como mostrado no fluxograma 5. Foi observado por CCD que a fração FBC-4-C (11 mg) se apresentava com pureza por CCD e foi submetida a análises por CL-EMAR e RMN e identificada como substância E (Fluxograma 5).

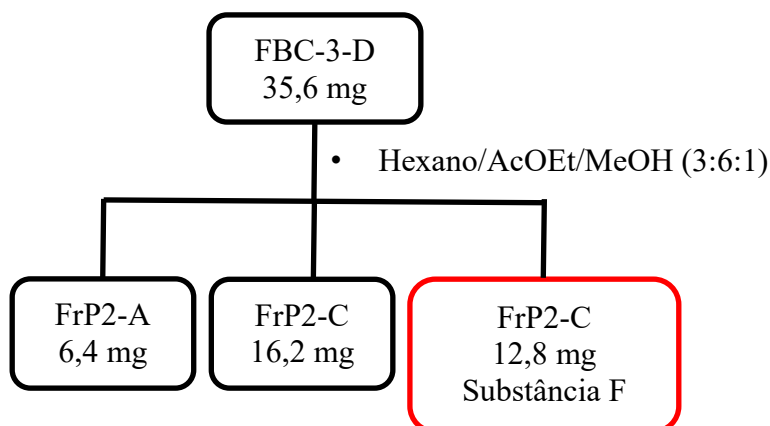
Fluxograma 5: Isolamento da substância E



A fração FBC-3-D (35,6 mg) (Fluxograma 3) foi fracionada por CCDP, com sistema de eluição hexano/AcOEt/MeOH (3:6:1). Foram obtidas 3 frações. A fração C (12,8 mg,

substância F) apresentou pureza por CCD e foi analisada por RMN e CL-EMAR (Fluxograma 6).

Fluxograma 6: Isolamento da substância F



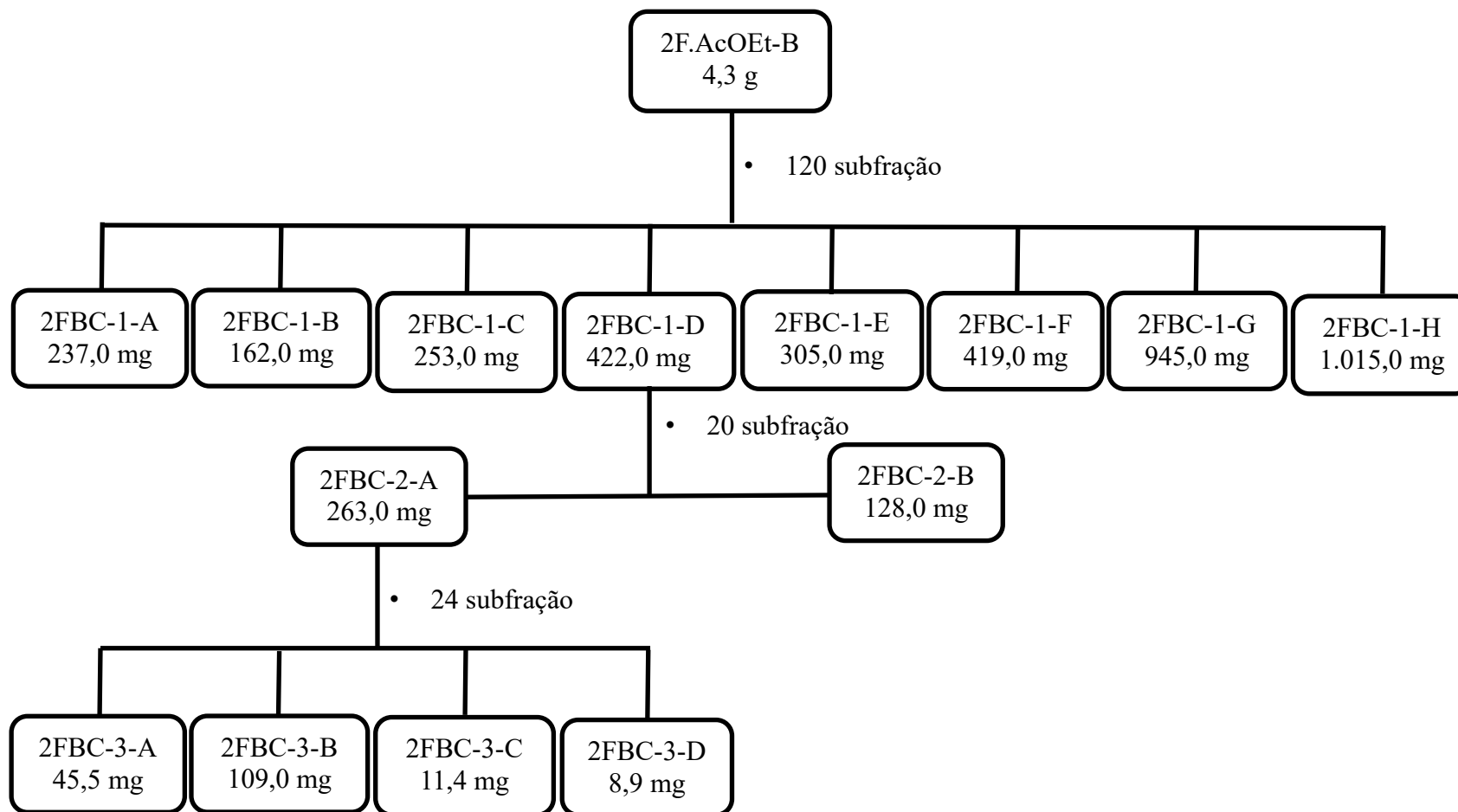
3.5.2. Fracionamento cromatográfico da fração 2F.AcOEt-B.

Uma alíquota de 4,3 g (2F.AcOEt-B) foi submetida a um fracionamento cromatográfico utilizando sílica gel (200 g; 0,063-0,200 mm, Merck), previamente ativada por 12 h em estufa climatizada a 100°C. A coluna foi empacotada ($\Phi \times h$; 4 × 17 cm), utilizando-se hexano/AcOEt (7:3) e a eluição foi realizada com 200 mL de hexano/AcOEt (7:3), com incrementos de 5% de MeOH até MeOH 100%. Nesse processo foram obtidas 120 frações que foram analisadas por CCD e reunidas em 8 novas frações (Fluxograma 7).

A fração 2FBC-1-D (422 mg) apresentou um bom perfil cromatográfico por CCD e foi submetida à CC ($\Phi \times h = 1,5 \times 17$ cm), utilizando sílica *flash* (0,040 - 0,063 mm, Merck), empacotada com hexano/AcOEt (7:3), no mesmo sistema de eluição e com incremento de 5% de MeOH até MeOH 100%. Foram obtidas 20 subfrações que após reunidas por perfil cromatográfico em CCD, rendeu em 2 novas frações (Fluxograma 7).

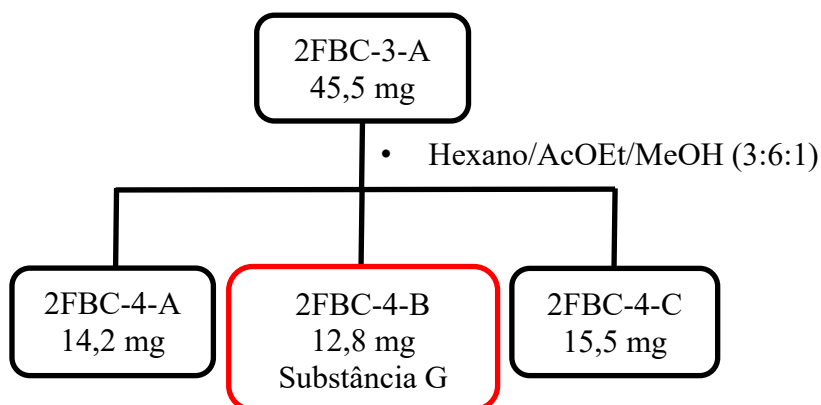
A fração 2FBC-2-A (263 mg) foi submetida a uma nova CC utilizando uma coluna com as mesmas medidas da anterior. Foi empacotada com sílica *flash* (0,040 - 0,063 mm, Merck) e eluída no mesmo sistema anterior. Foram recolhidas 24 subfrações e reunidas em 4 novas frações (Fluxograma 7).

Fluxograma 7: Fracionamento de 2F.AcOEt-B



A fração 2FBC-3-A (45,5 mg) apresentou baixa separabilidade (complexibilidade de separação) por CCD e foi submetida à CCDP. A amostra foi aplicada em 3 cromatoplasas, eluídas com hexano/AcOEt/MeOH (3:6:1), obtendo-se três frações (Fluxograma 8). A fração 2FBC-4-B (12,8 mg) foi analisada por CL-EMAR e RMN 1D e 2D.

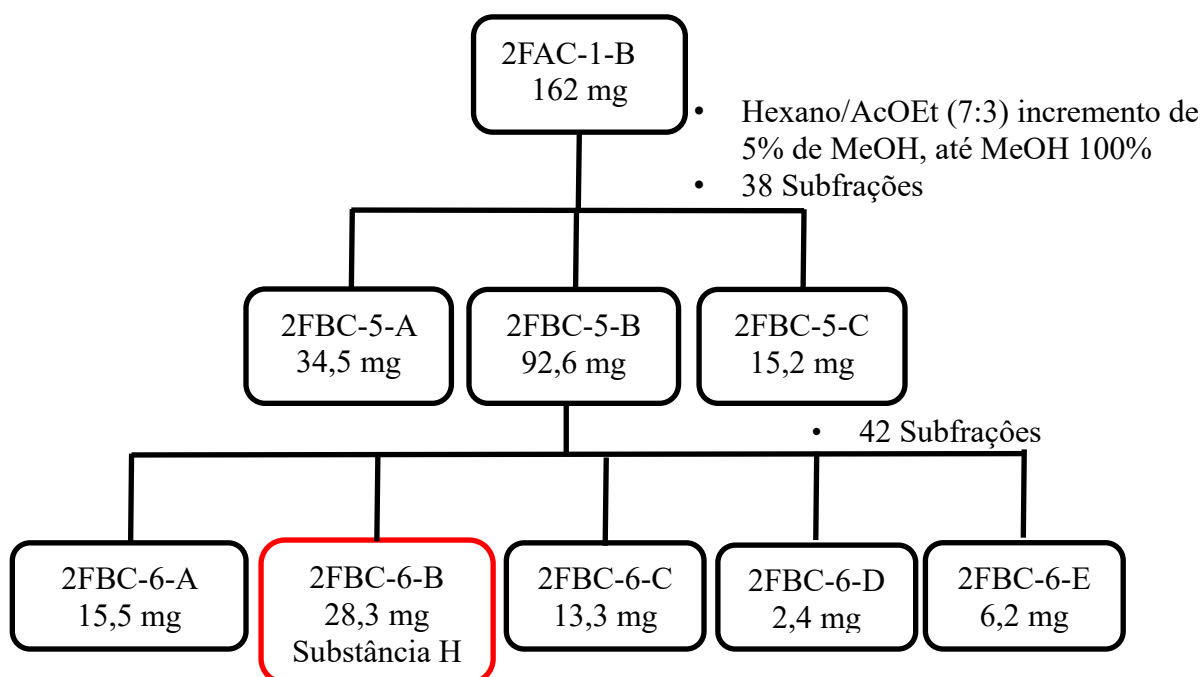
Fluxograma 8: Isolamento da substância G.



A fração 2FBC-1-B (162 mg) (Fluxograma 7) proveniente da fração 2F.AcOEt-B, tinha um bom perfil cromatográfico por CCD, e foi submetida a uma nova CC ($\Phi \times h$; 1,5 × 17 cm), utilizando sílica flash (0,040 - 0,063 mm, Merck), empacotada com hexano/AcOEt (7:3) e eluída com o mesmo sistema com incrementos de 5% de MeOH, até MeOH 100%. Foram obtidas 38 subfrações que foram reunidas em 3 novas frações de acordo com seu perfil em CCD (Fluxograma 9).

A fração 2FBC-5-B (92,6 mg) ainda estava com impureza (por CCD) e foi resubmetida a uma nova CC utilizando uma coluna com as mesmas medidas da anterior, mas agora empacotada com sílica *flash* (0,040 - 0,063 mm, Merck), onde foram recolhidas 42 subfrações que foram reunidas em 5 novas frações como demonstra o fluxograma 9, na qual a fração 2FBC-6-B (28,3 mg), se mostrou pura por CCD, e foi submetida à análise de RMN e CL-EMAR.

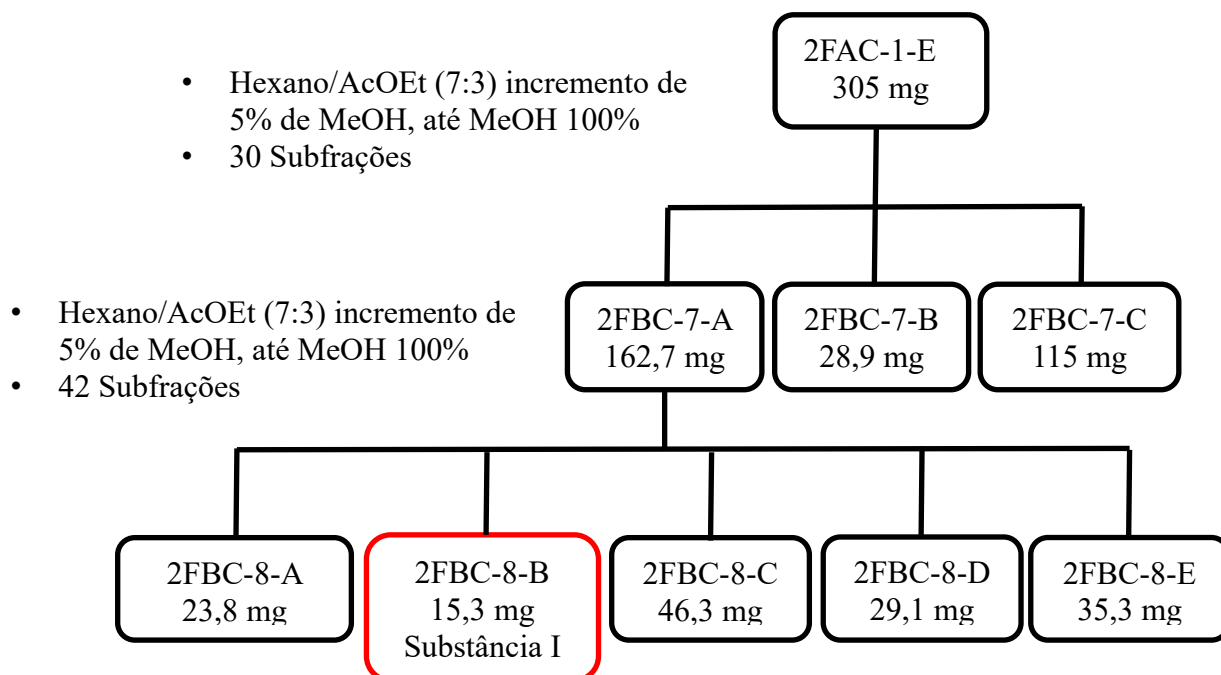
Fluxograma 9: Isolamento da substância H.



Outra fração que apresentou bom perfil cromatográfico por CCD foi a fração 2FBC-1-E (305 mg) (Fluxograma 7). A mesma foi submetida à CC ($\Phi \times h$; $1,5 \times 17$ cm), utilizando-se sílica *flash* (0,040 - 0,063 mm, Merck), empacotada com hexano/AcOEt (7:3) e eluída com o mesmo sistema com incrementos de 5% de MeOH, até MeOH 100%. Foram obtidas 30 subfrações que foram reunidas em 3 novas frações de acordo com seu perfil cromatográfico em CCD (Fluxograma 10).

A fração 2FBC-7-A (162,7 mg) foi submetida à uma nova CC utilizando uma coluna com as mesmas medidas da anterior. Foi empacotada com sílica *flash* (0,040 - 0,063 mm, Merck), onde foram recolhidas 42 subfrações que foram reunidas em 5 novas frações (fluxograma 10). A fração 2FBC-8-B (15,3 mg), se mostrou pura por CCD, e foi submetida a análise de RMN e CL-EMAR.

Fluxograma 10: Isolamento da substância I.



3.6. TESTES BIOLÓGICOS

3.6.1. Teste *in vitro* da atividade antiplasmodica

Os testes biológicos *in vitro* foram realizados no Laboratório de Cultura de *Plasmodium falciparum* do INPA, sob a responsabilidade da M. Ciên. Jaqueline Siqueira (PCI/INPA), e desenvolvidos pela M. Laís Jordão durante a sua dissertação de mestrado (PPGBIOEC/UFAM) (Jordão, 2018). As substâncias isoladas foram testadas frente à cepa K1 (MRA-159, MR4, ATCC, Manassas, Virgínia) de *P. falciparum* resistente à cloroquina, cultivada em eritrócitos humanos do tipo A+ a 37°C, em frascos de poliestireno de 50 mL hermeticamente fechados, a uma atmosfera de baixa tensão de oxigênio (5% de CO₂, 5% de O₂ e nitrogênio balanceado). A cultura contínua dos parasitas foi realizada utilizando-se o método de Trager e Jensen (1976), com adaptações (Andrade-Neto et al., 2007).

A avaliação da atividade antimalárica foi realizada de acordo com o método descrito por Rieckmann et al. (1978) e adaptado por Andrade-Neto et al. (2007). O microteste *in vitro* foi realizado utilizando culturas sincrônicas de parasitas, com predomínio de trofozoítos jovens (em forma de anel) de *P. falciparum*. As substâncias foram submetidas a uma triagem inicial em duas concentrações: 50 e 5 µg/mL em triplicata (3 poços cada concentração). Aquelas que apresentaram um percentual de inibição da parasitemia $\geq$ a 60% (na maior concentração), foram submetidas a uma diluição maior de 100 a 1,56 µg/mL (concentração final na placa teste) para determinação da concentração capaz de reduzir o crescimento do parasita em 50% (CI₅₀).

As amostras foram preparadas em dimetilsulfoxido (DMSO), e diluídas em meio de cultura (RPMI 1640) para obtenção das concentrações para teste. Os antimaláricos padrões cloroquina e quinina foram avaliados nas concentrações: 2,5 a $3,4 \times 10^{-3}$ µg/mL como controles. Cada amostra foi avaliada em duplicata para cálculo de CI₅₀, em microplaca de 96 poços, em dois experimentos independentes. As placas teste foram preparadas de modo que cada poço recebeu a suspensão de hemácias com parasitemia inicial de 1% no estágio anel, mais a amostra a ser testada em um volume final de 200 µL com no máximo 1% de DMSO, incubadas por 48 h a 37°C, nas mesmas condições de cultura do parasita. Os poços contendo apenas a suspensão de hemácias e DMSO na concentração máxima no poço (1%), representaram o controle livre de drogas. Após o período de incubação foram preparados

esfregaços sanguíneos para cada poço, avaliados por microscopia óptica para determinação da parasitemia, expressa em percentagem a partir da equação:

$$\text{Parasitemia \%} = (\text{N}^{\circ} \text{ total de parasitas} \times 100) \div \text{N}^{\circ} \text{ total de hemácias.}$$

A concentração inibitória (CI₅₀) foi calculada com o auxílio do software GraphPad Prism 5.0, onde a inibição do crescimento dos parasitas pelas amostras foi medido em relação ao controle livre de drogas, com um intervalo de confiança de 95% (IC 95).

3.6.2. Teste de citotoxicidade em macrófagos

A avaliação da citotoxicidade das amostras foi realizada no Laboratório de Atividade Biológica (BIOPHAR) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas / UFAM, em colaboração com a Dra. Marne Carvalho de Vasconcellos e desenvolvida pela aluna Elenn Suzany Pereira Aranha (aluna de doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia / UFAM).

O ensaio foi realizado conforme metodologia descrita por Ahmed et al. (1994), com o intuito de analisar a viabilidade das células na presença de diferentes concentrações das substâncias testadas. A linhagem celular utilizada foi a MRC-5, linhagem não neoplásica de fibroblastos humanos, cultivada em meio de cultivo DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico, em estufa a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

As substâncias foram preparadas em DMSO e diluídas em meio de cultura para o ensaio em sete concentrações, a partir de 200 µg/mL. A viabilidade celular foi avaliada através do teste Alamar Blue, um indicador fluorescente/colorimétrico com propriedades redox que é reduzido em células em estado de proliferação. Sua forma reduzida é rosa fluorescente e indica células viáveis, já a sua forma oxidada é azul não fluorescente e indica células não viáveis Ahmed et al. (1994).

As células foram plaqueadas em placas de 96 poços na concentração celular de $0,5 \times 10^4$ células/ poço, e incubadas por 24 h em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. Após este período, as amostras previamente preparadas foram adicionadas e a placa foi incubada por mais 48 h nas mesmas condições. O grupo controle recebeu no poço a mesma quantidade de DMSO da maior concentração das amostras 0,2%. Passado o período de incubação foram adicionados em cada poço 10 µL da solução de uso de Alamar Blue, preparada a 0,4% em meio de cultura sem soro fetal bovino, e aguardou-se mais 3 h para metabolização das células Ahmed et al. (1994).

A fluorescência foi medida usando um leitor de placas de elisa (Beckman e Coulter®) na faixa de 540 nm excitação e 585 nm de emissão. Os dados foram analisados em relação ao controle com o auxílio do software GraphPad Prism 5.0 Ahmed et al. (1994).

A citotoxicidade em relação à atividade antiplasmódica para cada substância foi avaliada como um índice de seletividade (IS), onde:

$$IS = CI_{50} \text{ (MRC-5)} \div CI_{50} \text{ (} P. \textit{falciparum} \text{)}.$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Rendimento de extratos e frações

A finalidade de adquirir conhecimento do teor extrativo em diferentes métodos conduziu a realização das extrações com metanol no Soxhlet; etanol e metanol por maceração com e sem ultrassom, na presença ou ausência de hidróxido de amônio, conforme descritos nas tabelas 4 e 5. O motivo principal desse trabalho preliminar foi o isolamento em quantidade > 50 mg de alcaloides para futuros trabalhos *in vivo* (não realizado até o presente momento).

Os resultados mostraram que a extração no soxhlet apresenta o melhor rendimento, 9,86% (2EMCS, tabela 4), isso acontece pelo fato da extração em soxhlet utilizar aumento de temperatura durante a extração e contato do material com solvente regenerado em grande volume quando comparado com a maceração, que consisti em um processo de saturação renovado por 3 vezes na temperatura ambiente assim extraindo uma maior quantidade de substâncias enquanto que o rendimento da extrações à temperatura ambiente variaram no intervalo de 5,87%-6,55% (2EECM e 2EMCMS (2%), respectivamente, tabela 4), evidenciando a semelhança dos resultados por extração com metanol ou etanol, com ou sem ultrassom e na presença ou ausência do hidróxido de amônio.

Todos os extratos obtidos nas tabelas 3 e 4, foram submetidos à partição ácido-base descrita no fluxograma 1. Esse procedimento foi realizado igualmente para todos, sendo que cada um dos extratos gerou 4 frações. Após comparação por CCD, observou-se de forma qualitativa que as frações acetato de etila 1F.AcOEt-B (Tabela 5) e 2F.AcOEt-B apresentaram a maior quantidade dos alcaloides (revelado com *p*-anissaldeído e Dragendorff). Apesar do

extrato metanólico obtido em soxhlet (2EMCS, 9,86 %), apresentar o maior teor extrativo, quando submetido à partição ácido-base, o rendimento da fração alcaloídica (2F.AcOEt-B, 15,1%) foi inferior às demais (quarta coluna da tabela 6). Isso leva a confirmar que esse método de extração não é satisfatório comparado às demais (tabelas 5 e 6). Dentre os rendimentos apresentados na tabela 6, a fração alcaloídica (2F.AcOEt-B, tabela 6) que apresenta o melhor rendimento (31,8%) foi a fração obtida do extrato metanólico obtido por maceração com ultrassom e 2% de NH_4OH (2EMCMS (2%).

4.1. Identificação das substâncias isoladas de *A. excelsum*

4.1.1. Dados de CL-EMAR das substâncias

Após avaliar o grau de pureza das substâncias por CCD, todas foram analisadas por CL-EMAR. Além de fornecer melhor ideia a pureza, os dados de massa/carga (m/z) de alta resolução forneceram sugestões de formulas compatíveis com alcaloides indólicos com erro bastante aceitável, proposta pelo equipamento da Bruker Compass DataAnalysis 4.2. Isso foi realizado para todas as substâncias isoladas. Os dados estão apresentados na tabela 7, anexos (LC-HRMS) 1, 7,15, 21, 28, 35, 40, 47 e 54.

A característica mais importante dos dados de EMAR é a presença de 2 átomos de nitrogênio, 19 ou mais átomos de carbono compatíveis com esqueletos de alcaloides indólicos terpenoídicos.

Tabela 7: Dados de CL-EMAR das substâncias isoladas nesse trabalho.

Substância	Fórmula	P.M. $[\text{M}+\text{H}]^+$	P.M. $[\text{M}+\text{H}]^+$	Δ (ppm)	Tempo de retenção
		Experimental	Teórico		
A	$\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_3$	355,2011	355,2016	1,6	5,8
B	$\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}$	299,2121	299,2118	1,1	2,9
C	$\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_5$	413,2084	413,2076	1,9	$\approx 5,0$
D	$\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_5$	413,2082	413,2076	1,4	5,0
E	$\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_4$	371,1974	371,1965	2,4	5,4
F	$\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_2$	329,2241	329,2224	5,3	3,0
G	$\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_5$	399,1917	399,1914	0,7	3,6
H	$\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_4$	385,2137	385,2122	4,0	7,4
I	$\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_2$	327,2062	327,2067	1,6	5,9

5. Análise da região de aromático do RMN de ^1H .

Após análise de CL-EMAR, as substâncias foram caracterizada por RMN 1D e 2D. Os dados de RMN estão apresentados nas tabelas 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 e 22.

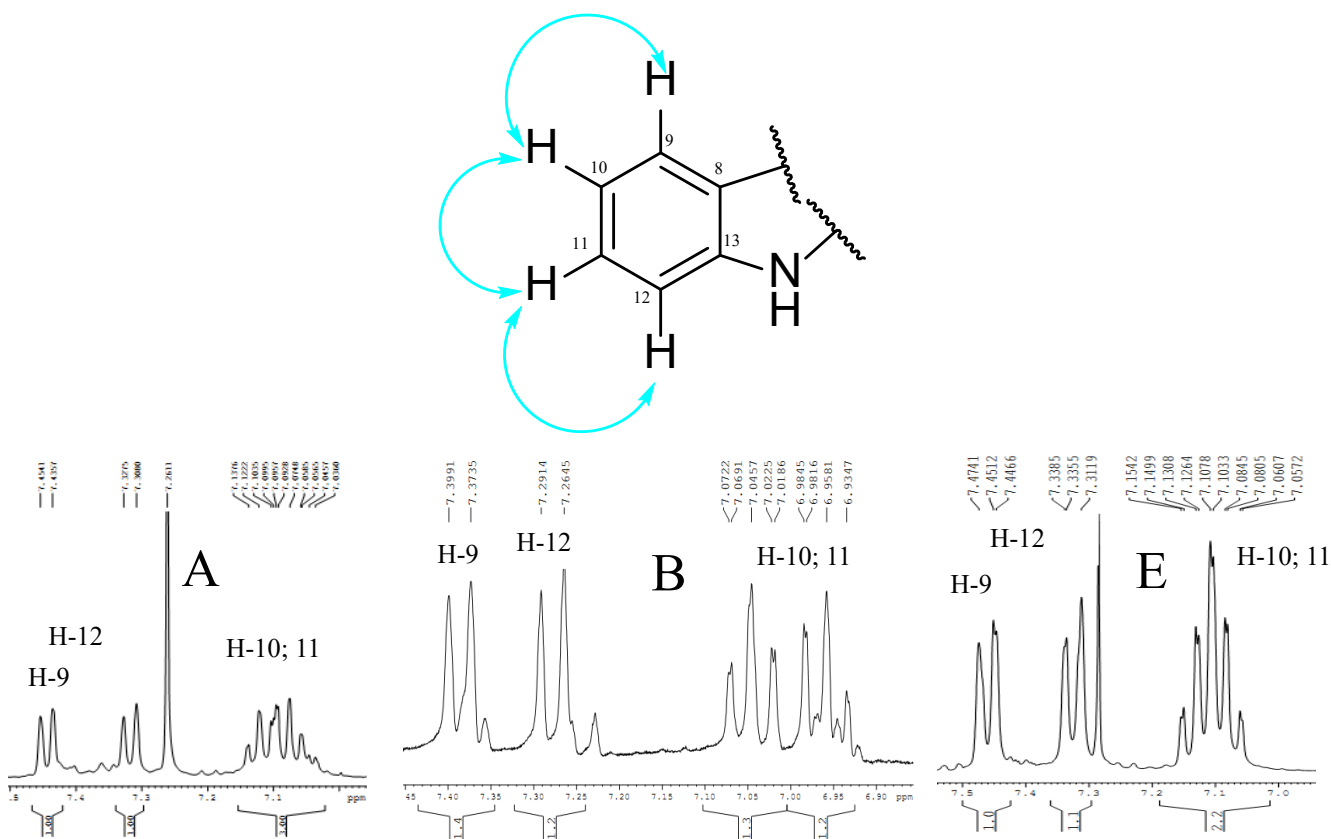
As análises dos dados de ressonância magnética nuclear (RMN) confirmaram a natureza indólo-terpênica das substâncias isoladas, evidenciados no CL-EMAR.

Ao analisar os espectros de RMN de ^1H foi observado que a região de hidrogênio aromático das substâncias A, B e E (Tabelas 8, 14 e 10 anexos 2, 22 e 8, respectivamente) apresentavam um perfil bem parecido de anel de benzeno 1,2-dissubstituído (característico de diversos alcaloides nomoindólicos). As substâncias apresentam dois dubletos (*d*), com *J* de acoplamento com cerca de 7,5 Hz. O espectro de COSY mostrou correlações entre os 4 hidrogênios na região de aromático (Figura 29; Tabelas 8, 14, e 10; Anexos 8, 27, e 13 respectivamente).

Os sinais de H-10 e H-11 (Figura 29) se apresentam como multipletos onde se pode identificar como duplo dubleto (*dd*) ou duplo duplo dubletos (*ddd*), com *J*s com cerca de 7,5 e 1 Hz.

A presença do núcleo indólico livre de substituintes no anel A foi também confirmada para as substâncias A, B e E pelas correlações heteronucleares de curta e longa distância apresentadas nos espectros de HSQC e HMBC, apresentados nas tabelas 8, 14 e 10, respectivamente; anexos 4 e 5; 25 e 26 11 e 12 respectivamente.

Figura 29: Ampliação da região de aromático dos espectros de RMN de ^1H e correlações no COSY das substâncias A, B e E, respectivamente.



Os espectros de RMN de ^1H das substâncias F, H e I (anexos 29, 16 e 36, respectivamente) apresentaram um perfil de deslocamento químico e multiplicidade bem semelhante na região aromática de anel benzenico 1,2,4 trissubstituído de sistema indólico. Os sinais δ_{H} 6,96 ($J = 2,5$ Hz); δ_{H} 6,78 ($J = 3$ Hz) e δ_{H} 6,89 ($J = 2,5$ Hz) nos espectros ^1H das substâncias F, H e I, respectivamente foram atribuídos aos respectivos H-9 dessas substâncias (Tabelas 16, 12 e 18, respectivamente).

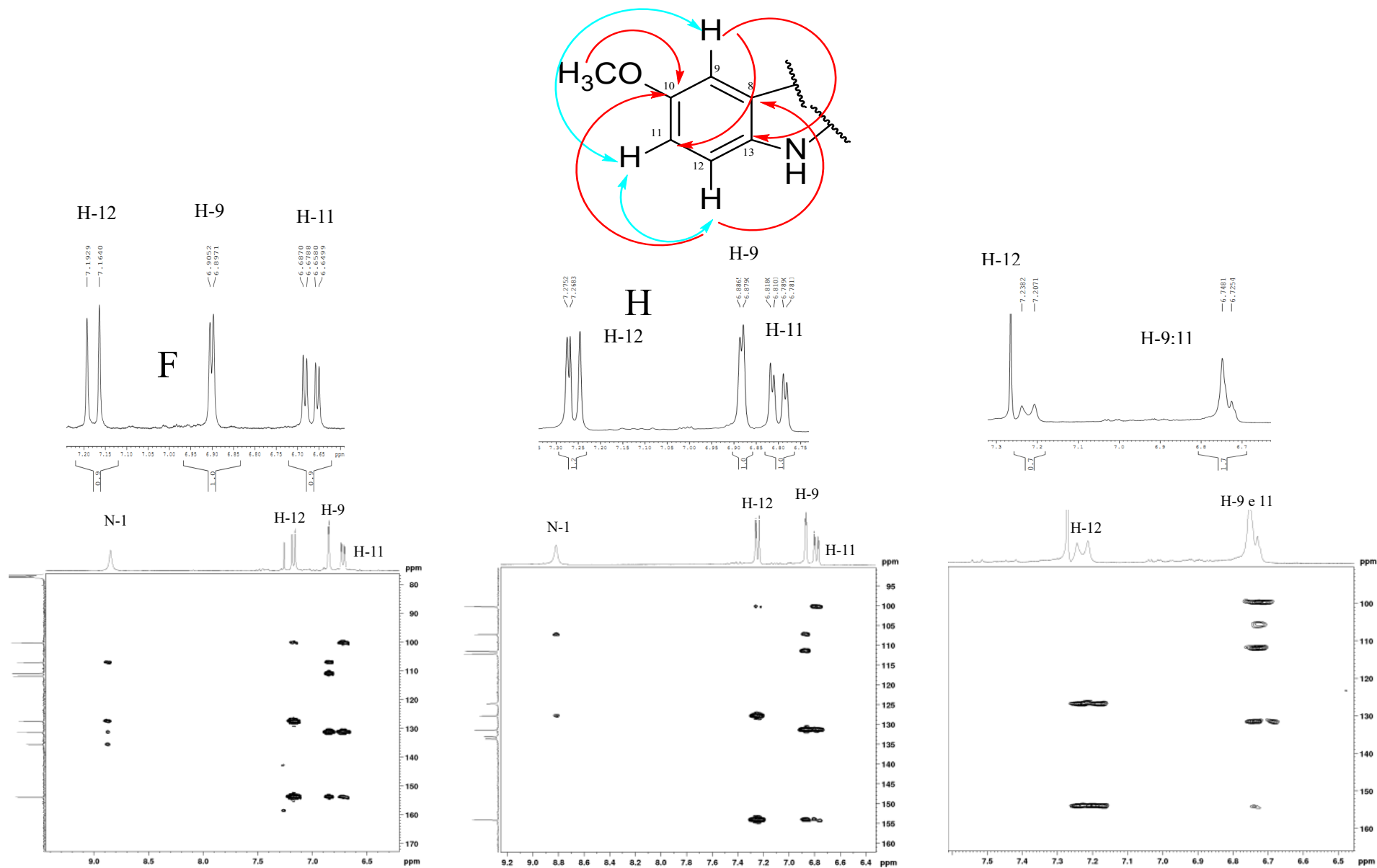
A substância I não apresentou boa resolução no espectro de RMN de ^1H de 300 MHz ou 500 MHz. Essa falta de resolução é própria dessa substância e será discutida na seção 5.2.3.

Substâncias F, H e I apresentaram constantes de acoplamento ($J = 2,5 - 3,0$ Hz) sendo características de hidrogênios que fazem acoplamento em meta, consistente com a presença de um substituinte na posição 10. As posições dos hidrogênios H-11 e H-12, foram atribuídas utilizando os dados de COSY e HMBC. Os espectros de ^1H dessas substâncias também

apresentaram sinais com multiplicidade de duplo dubleto e dubleto com J de aproximadamente 3 e 9 Hz (Tabelas 16, 12 e 18, respectivamente).

Outro dado do espectro de hidrogênio das substâncias F, H e I é sinal na faixa de δ_H 3,5-3,8, sendo nessa região características de sinais de metilas ligadas a oxigênio (integral para 3 hidrogênios). Esse fato é confirmado quando analisamos as correlações heteronucleares de HSQC e HMBC dessas substâncias, bem como o COSY. Corroborando assim como sendo um anel aromático indólico mono substituído, que em concordância com as correlações do HMBC essa substituição está localizada na posição 10 do anel aromático (Figura 30).

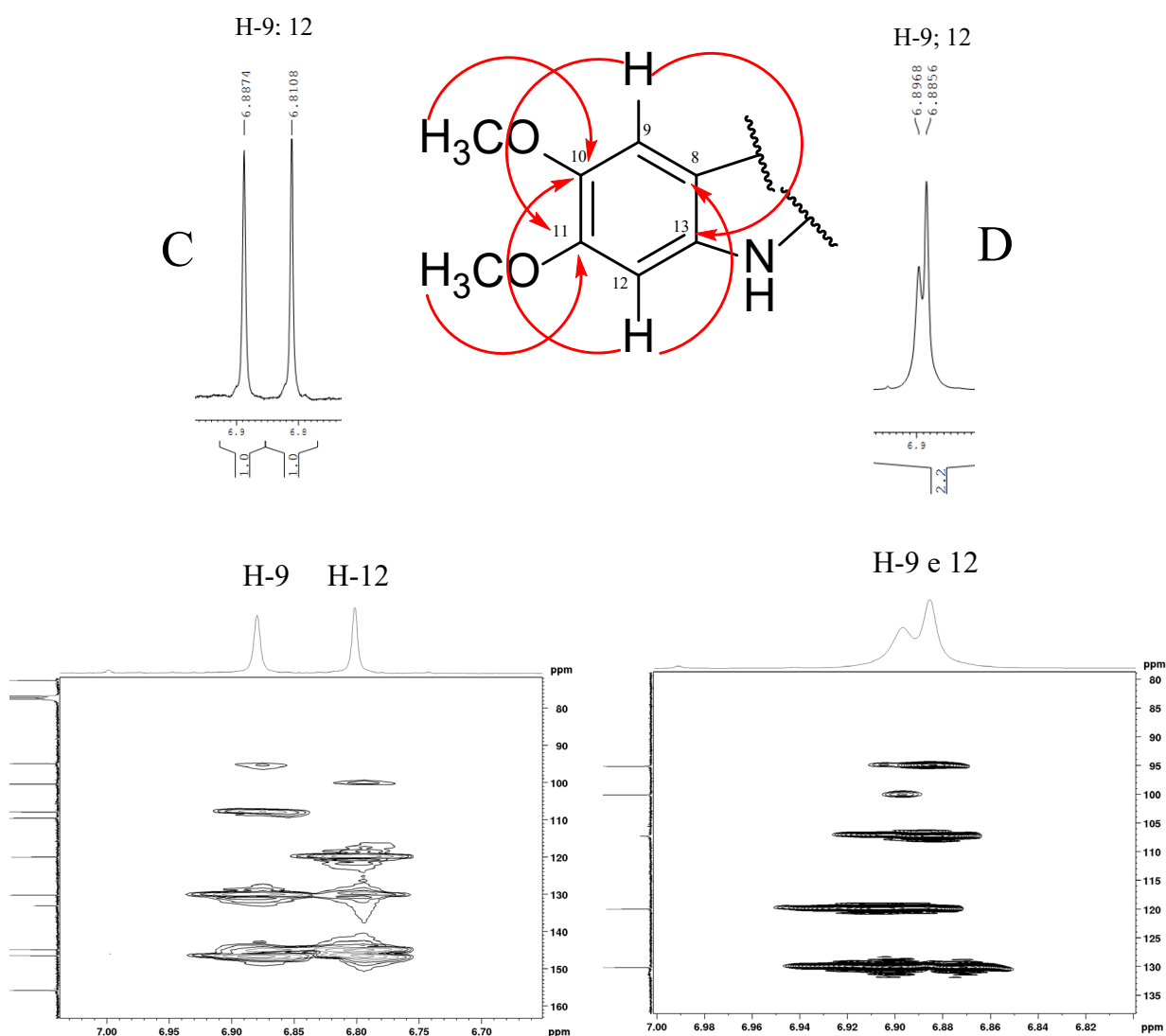
Figura 30: Ampliação e correlações de COSY e HMBC da região de aromático das substâncias F, H e I.



Assim como no caso da substância I, a substância D não apresentou boa resolução no espectro de RMN de ^1H de 300 MHz ou 500 MHz (anexo 48). Tal limitação da resolução foi relatado pela literatura por Bruyn et al. (1989) e Vieira (2011) e está discutido na seção 5.2.4. As substâncias C e D apresentaram dois singletos na região dos aromáticos (δ_{H} 7,56-6,81) consistente com um anel de benzeno 1,2,4 e 5 tetrassubstituído (Figura 31).

Ao analisar o espectro de RMN de ^1H (Anexos 41 e 48) na região de metoxilas observou-se que essas substâncias apresentavam dois singletos com integrais para três hidrogênios. Ao analisar os dados de HMBC foi confirmada a presença de metoxilas que apresentam deslocamento químico bem próximo entre δ_{H} 3,88 - 3,90.

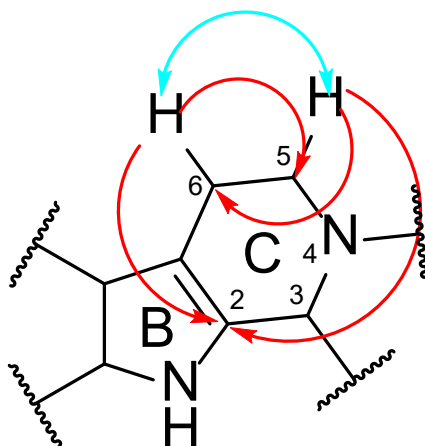
Figura 31: Ampliação da região de aromático das substâncias C e D e correlações no HMBC.



5.2.3. Elucidação estrutural dos anéis B, C das substâncias A, B, C, D, E, F, H e I.

As substâncias A-F e H-I apresentam correlação no espectro de COSY entre os H-5 e H-6, levando em consideração os seus deslocamentos químicos consistentes com H α de N sp³ e H alílico, respectivamente. No HMBC são observado correlação do H-5 com o C-6 (²*J*), assim como correlação do H-6 com o C-5 (²*J*), ilustrado na figura 32. Observou-se também no HMBC correlações dos H-5 com o C-2 (⁴*J*), e do H-6 com o C-2 (³*J*) (Figura 32).

Figura 32: Correlações comuns do COSY e HMBC entre átomos dos anéis B, C das substâncias A, B, C, D, E, F, H e I.



Os espectros de RMN da substância E apresentaram algumas diferenças em relação os espectros das demais substâncias apresentados acima. A substância E mostrou deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono mais deslocados nas posições 3, 5 e 21, como apresentados na tabela 10. Isso foi explicado pela presença do N₄-óxido e seu forte caráter eletronegativo.

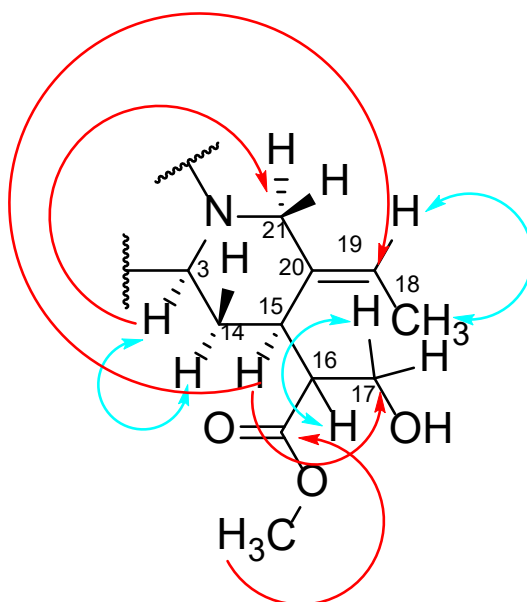
5.2.4. Elucidação estrutural do anel D e identificação da substância A.

A análise dos espectros de RMN de ¹H e mapa de correlação HSQC (Anexos 2 e 4, respectivamente) revelaram as correlações de todos em ¹*J* que estão mostradas na tabela 9. O sinal de hidrogênio em δ_H 4,07 (H-3) apresentou correlação no COSY com os sinais hidrogênios H-14 α,β em δ_H 2,29 (Figura 34). No mapa de contorno do HMBC foi possível observar a correlação do H-3 com C-14 (²*J*).

No espectro de COSY o sinal em δ_H 3,3 (H-15) correlaciona com o sinal em δ_H 2,57 (H-16). No HMBC o H-15 correlaciona-se com os sinais de carbono δ_C 29,6; 49,2; 52,9; 55,2; 61,5; 123 e 133,6, referentes aos carbonos nas posições 14, 16, 3, 21, 17, 19 e 20, respectivamente. O H-16 correlaciona-se no COSY com o hidrogênio δ_H 3,90 (H-17 β). No HMBC o H-16 correlaciona-se com os carbonos δ_C 29,6; 32,4; 61,5 e 174,4, referentes aos carbonos 14, 15, 17 e o carbono da carbonila de éster, respectivamente. O hidrogênio δ_H 3,90 (H-17 β) correlaciona-se com os carbonos δ_C 32,4; 49,2 e 174,4, referentes aos carbonos 15, 16 e o carbono da carbonila de éster, respectivamente (Tabela 8, Figura 34).

No espectro do COSY os hidrogênios da metila em δ_H 1,60 (H-18) correlacionam com H-19 (δ_H 5,56). Também essa metila apresenta um acoplamento homo-alílico com H-21. O mapa de contorno do HMBC apresentou correlação de δ_H 1,60 com os sinais de carbonos δ_C 32,4; 55,2; 123 e 133,6, referentes aos carbonos 15; 21; 19 e 20, respectivamente. A figura 33 mostra algumas das correlações de COSY e HMBC. Algumas correlações de HMBC e COSY do anel A, B e C estão demonstrados nas figuras 29 e 32 e descrito nos tópicos 5.2.2 e 5.2.3. Uma descrição completa das correlações está apresentada na tabela 8.

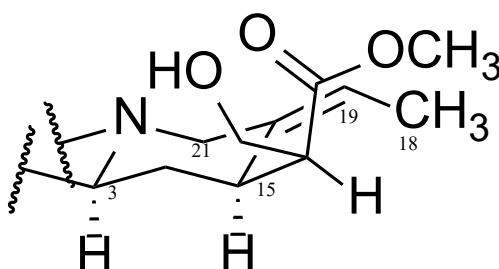
Figura 33: Correlação do COSY e HMBC do anel D da substância A (isositsiriquina **29**)



A substância A apresentou um grupo exo olefínico em C-20. Pela estabilidade da estrutura a melhor conformação do anel D foi verificada quando esse anel apresenta na forma de cadeira. No espectro de NOESY os hidrogênios da metila (H-18) e o H-19 estão

correlacionados com H-21 β (equatorial) e a metila também correlaciona com o H-15. Com essas correlações concluiu-se que a metila (H-18) se encontra na configuração *E*.

Figura 34: Anel D na conformação de cadeira



A substância D possui 3 centros estereogênicos nos carbonos C-16, C-15 e C-3. O H-16, apresentou-se com multiplicidade de duplo, duplo dubleto (*ddd*) com constantes de acoplamento de 9 e 5 Hz, referentes aos acoplamentos com H-15 e H-17. Com isso podemos deduzir que o H-16 encontra-se na conformação eclipsada em relação ao H-17. Na conformação *anti* imagina-se um *J* de acoplamento entre 11-15 Hz. Os H-14 apresentam como multipletos, com o auxílio do método do trabalho de Hoyer et al. (1994) foi possível calcular as constantes de acoplamentos (6,0 e 11,5 Hz), podendo essas constantes serem relacionadas aos acoplamentos com os hidrogênios 3 e 15.

Os dados obtidos foram comparados com a literatura de Lousnasmaa et al. (1994) (Tabela 9). A substância foi identificada como a isositsiriquina (**29**) (Figura 35).

Figura 35: Estrutura da *E*-15*S*-isositsiriquina (**29**)

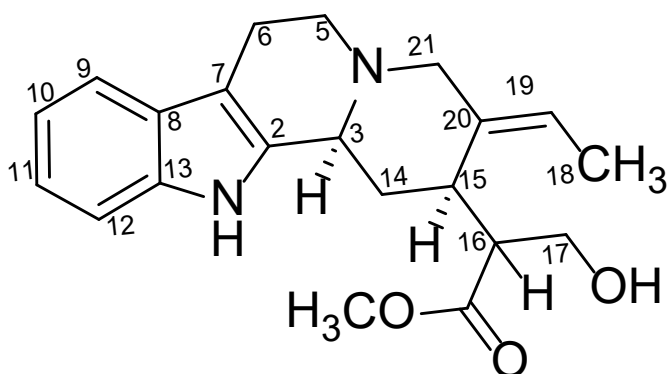


Tabela 8: Dados de RMN 1D e 2D da substância A (*E*-15*S*-isositsiriquina, **29**) (300/75 MHz; ppm; CDCl₃).

Unidimensionais			Bidimensionais (δ_H)	
C	¹³ C (δ_C)/DEPT Observado	¹ H (δ_H)/HSQC	HMBC	COSY
C-2	133,1 (C)	-	2,94; 2,65; 4,07; 2,29;	-
C-3	52,9 (CH)	4,07 (<i>tl</i> , $J = 6,0$ Hz)	2,86; 3,14; 2,29; 3,31; 3,14	
C-5	50,9 (CH ₂)	$\alpha - 2,86$ (<i>ddd</i> , $J = 11,0; 4,0$ Hz) $\beta - 3,14$ (<i>m</i>)	2,94; 2,65; 3,14; 3,79	
C-6	18,6 (CH ₂)	$\alpha - 2,65$ (<i>dl</i> , $J = 14,0$ Hz) $\beta - 2,94$ (<i>m</i>)	3,14	2,94-2,70
C-7	107,3 (C)	-	2,94; 2,65; 2,86; 3,14; 4,07	-
C-8	127,0 (C)	-	7,1; 7,32; 7,44	-
C-9	117,9 (CH)	7,44 (<i>d</i> , $J = 7,0$ Hz)	7,12	
C-10	119,2 (CH)	7,07 (<i>ddd</i> , $J = 7,0; 1,0$ Hz)	7,32	
C-11	121,7 (CH)	7,12 (<i>ddd</i> , $J = 7,0; 1,0$ Hz)	7,07; 7,32; 7,44	
C-12	111,0 (CH)	7,32 (<i>d</i> , $J = 7,0$ Hz)	7,1	
C-13	136,1 (C)	-	7,12; 7,44	-
C-14	29,6 (CH ₂)	α e $\beta - 2,29$ (<i>m</i> , $J = 6,0$ e $11,5$ Hz) ^b	4,07; 3,31; 2,57	
C-15	32,4 (CH)	3,31 (<i>m</i>)	4,07; 2,29; 2,57; 3,91; 1,60; 5,54; 3,14; 3,79	2,57
C-16	49,2 (CH)	2,57 (<i>ddd</i> , $J = 9,0; 5,0$ Hz)	2,29; 3,31; 3,91	3,90 3,31
C-17	61,5 (CH ₂)	$\alpha - 3,87$ (<i>dd</i> , $J = 12,0; 5,0$ Hz) $\beta - 3,90$ (<i>dd</i> , $J = 12,0; 5,0$ Hz)	3,31; 2,57	
C-18	12,9 (CH ₃)	1,60 (<i>dd</i> , $J = 7,0; 1,0$ Hz)	5,54	3,14
C-19	123,0 (CH)	5,54 (<i>q</i> , $J = 7,0$ Hz)	3,31; 1,60; 3,12; 3,79	
C-20	133,6 (C)	-	3,31; 1,60; 3,12; 3,79	-
C-21	55,2 (CH ₂)	$\alpha - 3,12$ (<i>dl</i> , $J = 13,0$ Hz) $\beta - 3,8^*$ (<i>m</i>)	4,07; 3,31; 1,60; 5,54	
C-22	174,4 (C)	-	2,57; 3,54; 3,91	-
OCH ₃	51,4 (CH ₃)	3,54 (<i>s</i> , OCH ₃)		
NH	-	8,75 (<i>sl</i>)		

*Atribuído com base nos espectros de HSQC/COSY.

^b multiplicidade definida utilizando o método de Hoye et al., 1994.

Tabela 9: Dados de RMN de ^{13}C e ^1H da substância A e comparação com dados da literatura para *E*-15*S*-isositiriquina (**29**).

RMN de ^{13}C (δ_{C})			RMN de ^1H (δ_{H})	
C	Observado	Lit **	Observado	Lit**
C-2	133,1 (C)	133,5	-	-
C-3	52,9 (CH)	53,1	4,07 (<i>tl</i> , $J = 6,0$ Hz)	3,9 (br)
C-5	50,9 (CH ₂)	51,2	$\alpha - 2,86$ (<i>ddd</i> , $J = 11,0$; $4,0$ Hz) $\beta - 3,14$ (<i>m</i>)	$\alpha - 2,84$ (<i>ddd</i> , $J = 4$ e 12 Hz) $\beta - 3,17$ (<i>dd</i> , $J = 4$ e 12 Hz)
C-6	18,6 (CH ₂)	18,5	$\alpha - 2,65$ (<i>dl</i> , $J = 14,0$ Hz) $\beta - 2,94$ (<i>m</i>)	$\alpha - 2,68$ (<i>d</i> , $J = 15$ Hz) $\beta - 3,0$ (<i>m</i> , $J = 15$ Hz)
C-7	107,3 (C)	107,3	-	-
C-8	127,0 (C)	127,2	-	-
C-9	117,9 (CH)	118,0	7,44 (<i>d</i> , $J = 7,0$ Hz)	7,48(<i>d</i>)
C-10	119,2 (CH)	119,2	7,07 (<i>ddd</i> , $J = 7,0$; $1,0$ Hz)	7,09 (<i>t</i>)
C-11	121,7 (CH)	121,4	7,12 (<i>ddd</i> , $J = 7,0$; $1,0$ Hz)	7,14(<i>t</i>)
C-12	111,0 (CH)	111,0	7,32 (<i>d</i> , $J = 7,0$ Hz)	7,31 (<i>d</i>)
C-13	136,1 (C)	136,2	-	-
C-14	29,6 (CH ₂)	29,6	α e $\beta - 2,29$ (<i>m</i> , $J = 6,0$ e $11,5$ Hz) ^b	$\alpha - 2,27$ (<i>m</i>) $\beta - 2,25$ (<i>m</i>)
C-15	32,4 (CH)	32,8	3,31 (<i>m</i>)	3,38 (<i>m</i>)
C-16	49,2 (CH)	49,1	2,57 (<i>ddd</i> , $J = 9,0$; $5,0$ Hz)	2,66 (<i>m</i>)
C-17	61,5 (CH ₂)	61,6	$\alpha - 3,87$ (<i>dd</i> , $J = 12,0$; $5,0$ Hz) $\beta - 3,90$ (<i>dd</i> , $J = 12,0$; $5,0$ Hz)	$\alpha - 3,87$ (<i>dd</i> , $J = 12$ e 4 Hz) $\beta - 3,92$ (<i>dd</i> , $J = 12$ e 4 Hz)
C-18	12,9 (CH ₃)	13,0	1,60 (<i>dd</i> , $J = 7,0$; $1,0$ Hz)	1,63 (<i>d</i> , $J = 6,5$ Hz)
C-19	123,0 (CH)	121,5	5,54 (<i>q</i> , $J = 7,0$ Hz)	5,52 (<i>q</i>)
C-20	133,6 (C)	134,5	-	-
C-21	55,2 (CH ₂)	54,6	$\alpha - 3,12$ (<i>dl</i> , $J = 13,0$ Hz) $\beta - 3,8^*$ (<i>m</i>)	$\alpha - 3,08$ (<i>d</i> , $J = 12$ Hz) $\beta - 3,80$ (<i>d</i> , $J = 12$ Hz)
C	174,4 (C)	174,9	-	-
OCH ₃	51,4 (CH ₃)	51,5	3,54 (<i>s</i> , OCH ₃)	3,57 (<i>s</i>)
NH			8,75 (<i>s</i>)	

Dados: RMN (observado) CDCl₃, 400 MHz

*Atribuído com base nos espectros de HSQC/COSY

**Lousnasmaa et al. (1994) CDCl₃, 400 MHz

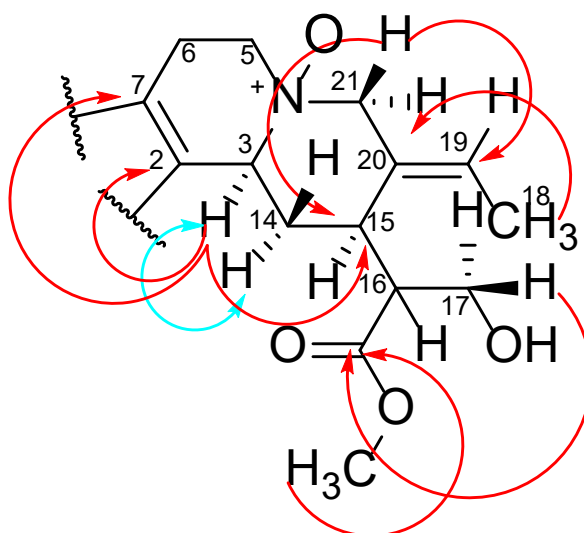
^b multiplicidade definida utilizando o método de Hoye et al., 1994

5.2.3. Elucidação estrutural dos anéis D e E da substância E.

O número de sinais no RMN de ^{13}C (Tabela 10) confirma a fórmula inferida na tabela 7 para a substância E. Ao compararmos as formulas da substância A (*E*-15*S*-isositsiriquina), com a formula da substância E, observamos que a diferença é a presença de um oxigênio a mais na substância E. No mapa de contorno do HMBC foi observada a correlação de H-3 com C-2 (^2J) e C-7. Os H-14 (^3J) correlaciona-se pelo espectro de COSY com o H-15 e no HMBC correlacionam com o C-3 e C-15. O H-15 correlaciona com C-3, C-16 e C-17 no HMBC. O carbono com deslocamento em δ_{C} 173,8 está correlacionando com os H-17 e também com os hidrogênios da metila do éster (Figura 29). Pelo HMBC os H-18 (δ_{H} 1,59) acoplam com C-19. Na figura 36 estão apresentadas algumas das correlações (Tabela 10).

Após análise dos espectros de RMN 1D e 2D, foi confirmado a conectividade dessa estrutura bem semelhante a da *E*-15*S*-isositsiriquina, mas com um oxigênio a mais como inferido pela formula. Após comparação com os deslocamentos de ^{13}C e ^1H foi observado que essa substância possui diferenças de deslocamento químico nas posições C-3, C-5 e C-21 (69,5; 65,8 e 66 para a substância *E* e 52,9; 50,9 e 55,2 para substância A), estando esses carbonos ligados ao nitrogênio (N-4). Concluiu-se que se tratava de uma *N*₄-óxidoisositsiriquina, consistente com a desblindagen dos C-3, C-5 e C-21 comparando com a substância A. Os dados foram comparados com os da literatura (Horst, 2012), para a *N*₄-óxidoisositsiriquina (**115**) (Figura 38, Tabela 11).

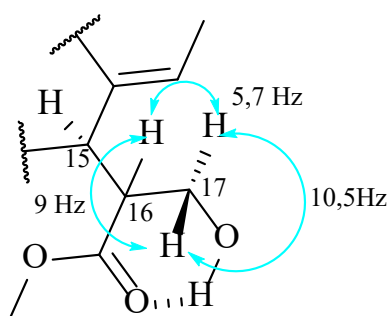
Figura 36: Correlações do COSY e HMBC do anel D da substância E (*N*-óxido-isositsiriquina, **115**).



Assim como a *E*-15*S*-isositsiriquina essa substância também possui 3 centros estereogênicos nos carbonos C-3, C-15 e C-16.

Os H-14_{ax} e H-14_{eq} apresentaram constantes de acoplamento de 15,6 Hz, referente ao acoplamento geminal. Utilizando os métodos descritos em Hoye et al.(1994) foi possível medir 2 constantes de acoplamento do H-15 (10,5 e 5,7 Hz) que apresentou-se como multipletto complexo (Tabela 10). Esses deslocamentos foram atribuídos ao acoplamento com os hidrogênios H-14_{ax} e H-16, respectivamente, sendo esse último acoplamento (5,7 Hz), característico de acoplamento entre hidrogênios na conformação *gauche* com o H-16. Se os mesmos estivessem em *anti*, esperar-se-ia um acoplamento com *J* entre 11-15 Hz. O H-17_a e H-17_b apresentaram-se como dois duplos dubletos com deslocamentos químicos de δ_H 3,76 e 3,84. Apresentaram constante de acoplamento de 10,5 Hz referente ao acoplamento geminal e constante de 4,47 Hz referente ao acoplamento vicinal entre o H-17_a com H-16 e também do H-17_b e com H-16 com constante de 9 Hz. Na conformação *sin* dos H-15 e H-16 e com essas constantes de acoplamento entre os hidrogênios H-16 com H-17 torna possível a formação de pontes de hidrogênio entre os pares de elétrons do oxigênio da carbonila e com o hidrogênio da hidroxila do C-17 (Figura 37), tornando assim a estrutura mais estável, conforme descrito por Li et al. (2017).

Figura 37: Acoplamento no COSY entre os H-16 e H-17



No epespectro de NOESY, os hidrogênios da metila (δ_H 1,59) acoplado com o H-15 (δ_H 3,01), o H-19 (δ_H 5,65) acoplado com o H-21 α (δ_H 3,34), isso são evidências que o grupo olefinico dessa estrutura se encontra na configuração *E*. O H-3 (δ_H 4,43) acoplado com o H-15 (δ_H 3,01) é uma confirmação que o H-15 encontra-se na configuração *S*. Outros dados de RMN e NOESY inseridos na tabela 10, corrobora para a conformação do H-16 em *S*, todos esses dados mostram que essa substância trata-se da *N*₄-óxido-15*S*, 16*S*-*E*-*epi*-isositsiriquina (Figura 38).

Figura 38: Estrutura da substância E (*N*₄-óxido-15*S*, 16*S*-*E*-*epi*-isositsiriquina, 115)

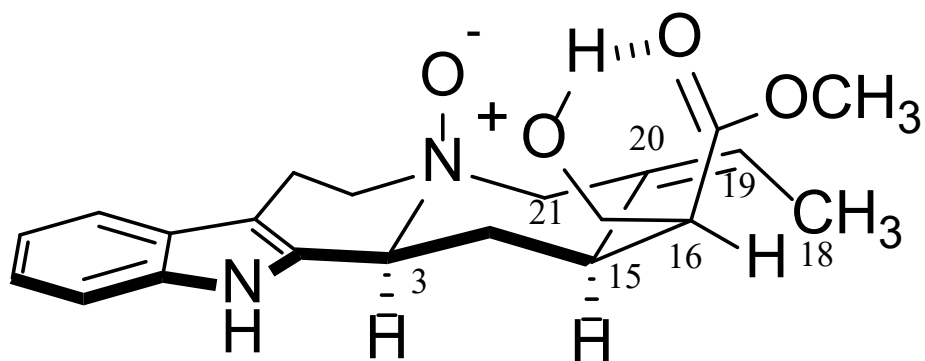


Tabela 10: Dados de RMN de ^{13}C e ^1H da substância E (*N*₄-óxido-15*S*, 16*S-E-epi*-isositsiriquina (**115**)).

Unidimensional		Bidimensionais			
C	^{13}C (δ_{C})/DEPT	^1H (δ_{H})/HSQC	HMBC	COSY	NOESY
C-2	129,6 (C)	-	4,43; 3,05;	-	-
C-3	69,6 (CH)	4.43 (<i>m</i>)	3,34; 3,01; 2,63	2,63; 2,34	3,65; 3,01
C-5	65,9 (CH ₂)	α e β 3.65 (<i>m</i>)	3,05	-	-
C-6	18,6 (CH ₂)	α e β 3.05 (<i>m</i>)	3,65	3,65	-
C-7	105,0 (C)	-	7,38; 4,43; 3,76; 3,05	-	-
C-8	126,2 (C)	-	7,25; 6,97	-	-
C-9	118,0 (CH)	7.38 (<i>d</i> , $J = 8$ Hz)	7,04	6,97	-
C-10	119,3 (CH)	6.97 (<i>dd</i> , $J = 8$; 1 Hz)	7,25	7,38; 7,04	-
C-11	122,0 (CH)	7.04 (<i>dd</i> , $J = 8$; 1 Hz)	7,38	7,25; 6,97	-
C-12	111,2 (CH)	7.25 (<i>d</i> , $J = 8$ Hz)	6,97	7,04	-
C-13	137, 3 (C)	-	7,38; 7,04	-	-
C-14	26,5 (CH ₂)	α - 2.63 (<i>ddd</i> , $J = 15,6$ Hz) β - 2.23* (<i>dd</i> , 5,7 e 10,5)	-	3,01	-
C-15	32,5 (CH)	3.01 (<i>m</i> , $J = 10,5$ e 5,7 Hz)	5,65; 4,43; 3,84; 3,34; 2,63; 2,23	2,25	-
C-16	49,7 (CH)	2.25* (<i>dd</i> , 5,7 e 10,5) α - 3.76(<i>dd</i> , $J = 4,4$ e 10,5 Hz)	3,84; 3,01; 2.63	-	-
C-17	61,2 (CH ₂)	β - 3.84 (<i>dd</i> , $J = 4,4$ e 10,5 Hz)	3,01	2,25	-
C-18	12,4 (CH ₃)	1.59 (<i>dd</i> , $J = 7$, 1 Hz)	5,65	5,65	3,01
C-19	130,4 (CH)	5.65 (<i>q</i> , $J = 7$ Hz)	3,34; 1,59	1,59	3,34
C-20	128,1 (C)	-	3,34; 1,59	-	-
C-21	66,1 (CH ₂)	α - 3.34 (<i>dl</i> , $J = 12$ Hz) β - 4.37 (<i>dl</i> , $J = 12$ Hz)	-	3,34	3,65; 3,01 2,25
OCH ₃	50,5 (CH ₃)	3.39 (<i>s</i> , OCH ₃)	-	-	-
OCOCH ₃	173,8 (C)	-	3,39; 3,84; 3,76	-	-
NH	-	8.41(<i>sl</i>)	-	-	-

*Atribuído com base nos espectros de HSQC/COSY.

Tabela 11: Dados de RMN de ^1H da substância E, e comparação com dados da literatura para a *N*-óxido-15*S*, 16*S-E-epi-isositsiriquina* (**115**).

RMN de ^{13}C (δ_{C})			RMN de ^1H (δ_{H})	
C	Observado	Lit **	Observado	Lit**
C-2	129,6 (C)	131,1	-	-
C-3	69,5 (CH)	71,1	4.43 (<i>m</i>)	4,52 (<i>tl</i>)
C-5	65,8 (CH ₂)	67,6	α e β 3.65 (<i>m</i>)	3,74 (<i>m</i>)
C-6	18,6 (CH ₂)	20,1	α e β 3.05 (<i>m</i>)	3,13 (<i>m</i>)
C-7	105,0 (C)	106,5	-	-
C-8	126,1 (C)	127,7	-	-
C-9	117,0 (CH)	119,3	7.38 (<i>d</i> , $J = 8$ Hz)	7,49 (<i>d</i>)
C-10	119,2 (CH)	119,3	6.97 (<i>dd</i> , $J = 8$; 1 Hz)	7,06 (<i>dd</i>)
C-11	121,8 (CH)	123,5	7.04 (<i>dd</i> , $J = 8$; 1 Hz)	7,13 (<i>dd</i>)
C-12	111,0 (CH)	112,7	7.25 (<i>d</i> , $J = 8$ Hz)	7,37 (<i>d</i>)
C-13	137,0 (C)	138,8	-	-
C-14	26,6 (CH ₂)	28,7	α - 2.63 (<i>ddd</i> , $J = 15,6$ Hz) β - 2.23* (<i>dd</i> , 5,7 e 10,5)	2,33 (<i>m</i>) 2,75 (<i>dd</i>)
C-15	32,3 (CH)	34,0	3.01 (<i>m</i> , $J = 10,5$ e 5,7 Hz)	3,11 (<i>m</i>)
C-16	49,7 (CH)	51,2	2.25* (<i>dd</i> , 5,7 e 10,5)	2,34 (<i>m</i>)
C-17	61,2 (CH ₂)	62,7	α - 3.76(<i>dd</i> , $J = 4,4$ e 10,5 Hz) β - 3.84 (<i>dd</i> , $J = 4,4$ e 10,5 Hz)	3,96 3,87
C-18	12,4 (CH ₃)	13,9	1.59 (<i>dd</i> , $J = 7$, 1 Hz)	1,69 (<i>dd</i>)
C-19	130,3 (CH)	131,9	5.65 (<i>q</i> , $J = 7$ Hz)	5,75 (<i>q</i>)
C-20	128,0 (C)	129,6	-	-
C-21	66,0 (CH ₂)	67,6	α - 3.34 (<i>dl</i> , $J = 12$ Hz) β - 4.37 (<i>dl</i> , $J = 12$ Hz)	3,43 (<i>dl</i>) 4,45
C	50,5 (CH ₃)	52,1	3.39 (<i>s</i> , OCH ₃)	3,49 (<i>s</i>)
OCH ₃	173,8 (C)	175,7	-	-
NH	-	-	8.41(<i>sl</i>)	-

Dados: RMN (observado) CDCl₃, 300 MHz

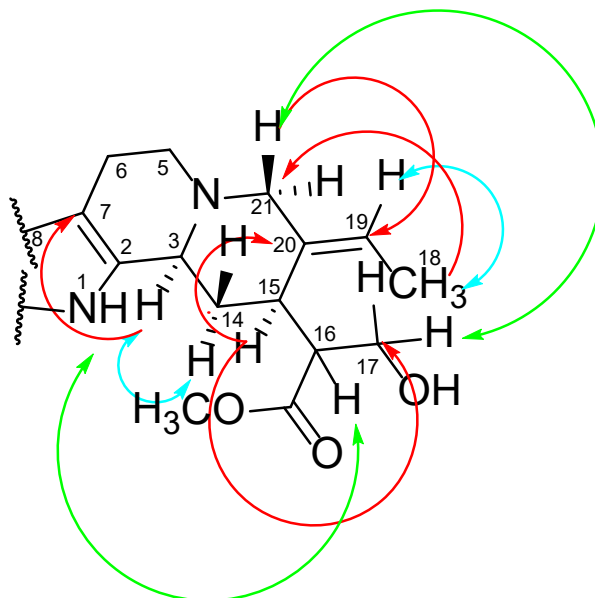
*Atribuído com base nos espectros de HSQC/COSY

**Horst et al. (2012) MeOH, 400 MHz

5.2.3. Elucidação estrutural do anel D da substância H

O espectro de RMN de ^{13}C da substância H apresentou 22 sinais (Tabela 12), corroborando a fórmula proposta na tabela 7. No espectro de COSY, o H-3 correlaciona-se com H-14 (δ_{H} 2,19) e o H-18 (δ_{H} 1,62) correlaciona-se com H-19 (δ_{H} 5,60). O H-3 correlaciona no espectro de HMBC com o δ_{C} 107,0; 29,5 e 32,5, atribuídos a C-7, C-14 e C-15, respectivamente. O H-15 (δ_{H} 3,08) correlaciona com δ_{C} 49,5, 61,7, 124,3 e 132,8, referente a C-16, C-17, C-19 e C-20. O H-21 α (δ_{H} 2,96) correlaciona com os carbonos C-15, C-19 e C-20. Algumas das principais correlações estão apresentadas na figura 39. As demais correlações de COSY e HMBC estão apresentadas na tabela 12.

Figura 39: Correlações no espectro de COSY (azul), HMBC (vermelho) e NOESY (verde) do anel D da substância H (10-metoxi-15*S*, 16*S-E*-isositsiriquina, **113**).



Ao analisar todos os dados de EMAR e RMN 1D e 2D, foi possível confirmar que a substância H apresenta dados bem próximos da 15*S*, 16*S-E*-isositsiriquina (**29**). A diferença de m/z entre as duas estruturas é de 31 Da (Tabela 7), que pode ser explicado pela presença de uma metoxila na substância H, corroborado pelo sinal de metoxila em δ_{H} 3,78 no espectro de RMN de ^1H . Os dados de RMN dos anéis A, B e C estão discutidos nas seções 5.2.2 e 5.2.3. Após analisar os dados uni e bidimensionais chegou-se a estrutura da 10-metoxi-15*S*, 16*S-E*-isositsiriquina (**39**) (Tabela 12, Figura 40). Para ilustrar a semelhança dos dados, comparamos os dados de RMN da substância H com os dados da 15*S*, 16*R* e 15*S*, 16*S* isositsiriquina (**29**) da literatura de Lousnasmaa et al. (1994) (Tabela 13).

A configuração do grupo olefinico dessa substância foi definido através das correlações do NOESY. Esse espectro mostrou acoplamento entre os hidrogênios da metila da olefina (δ_H 1,62) com o H-15 (δ_H 3,08) e H-17 α e H-17 β (δ_H 3,51). Os H-17 α,β acoplando com o H-21 α (δ_H 2,96), o acoplamento entre esses hidrogênios confirmam o grupo olefinico na conformação em *E*. O espectro de RMN de ^1H também mostrou evidências de acoplamento para a configuração 15*S* são: δ_H 3,51 (H-17 α e H-17 β) correlacionados com H-21 α (δ_H 2,96), H-1 (δ_H 8,82) correlaciona com H-16 (δ_H 2,45) e H-17 α e H-17 β no espectro NOESY (Figura 39). Todas as correlações espectrais dessa substância estão inseridas na tabela 12, e após comparação com a literatura de Lousnasmaa et al. (1994) (Figura 40), e com isso definimos essa substância como sendo a 10-metoxi-15*S*, 16*S-E*-isositsiriquina.

Figura 40: Estrutura da substância H (10-metoxi-15*S*, 16*S-E*-isositsiriquina, **113**).

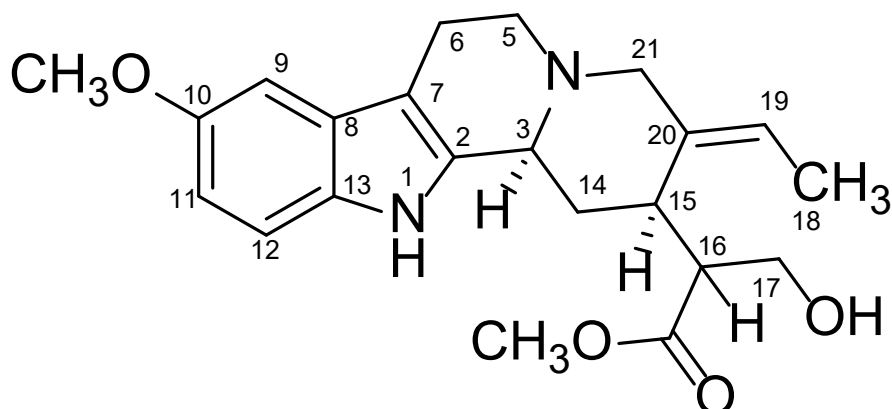


Tabela 12: Dados espectrais de RMN 1D e 2D da substância H (10-metoxi-15*S-E*-isositsiriquina, **113**) (300/75 MHz; ppm; CDCl₃).

Unidimensionais		Bidimensionais			
C	¹³ C (δ _C)/DEPT	¹ H (δ _H)/HSQC	HMBC	COSY	NOESY
C-2	133,3 (C)	-	2,19; 4,26	-	-
C-3	52,7 (CH)	4,26 (<i>sl</i>)	2,96; 3,50; 2,19; 3,11	2,19	3,11
C-5	51,0 (CH ₂)	α - 3,11(<i>m</i>) β - 3,21 (<i>m</i>)	2,60; 2,95		
C-6	17,6 (CH ₂)	α - 2,60 (<i>dl</i> , <i>J</i> =15 Hz) β - 2,95 (<i>m</i>)	3,21		
C-7	107,0 (C)	-	2,60; 2,95; 3,21; 4,26	-	-
C-8	127,6 (C)	-	7,25	-	-
C-9	100,0 (CH)	6,87 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2 Hz)	6,79; 7,25		3,83; 2,60; 2,95
C-10	153,9 (C)	-	6,79; 6,87; 7,25; 3,83	-	-
C-11	111,1 (CH)	6,79 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 9; 2 Hz)	-	7,25	3,83
C-12	111,8 (CH)	7,25 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9 Hz)	6,87		
C-13	131,1 (C)	-	6,70; 6,87	-	-
C-14	29,5 (CH ₂)	2,19 (<i>t app</i> , <i>J</i> = 5 Hz)	2,45; 3,08; 4,26		
C-15	32,5 (CH)	3,08 (<i>m</i>)	1,62; 2,19; 2,45; 3,51 2,96; 4,26; 5,60	2,45	1,62; 2,19
C-16	49,5 (CH)	2,45 (<i>m</i>)	1,62; 2,19; 3,08; 3,50		
C-17	61,7 (CH ₂)	3,51* (<i>m</i>)	3,08	2,45	
C-18	13,3 (CH ₃)	1,62 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7 Hz)	5,60	5,60	308; 3,50
C-19	124,3 (CH)	5,60 (<i>q</i> , <i>J</i> = 7 Hz)	3,08; 3,50; 2,96		
C-20	132,8 (C)	-	3,08; 3,50; 2,96	-	-
C-21	52,3 (CH ₂)	α - 2,96 (<i>dl</i> , <i>J</i> = 12 Hz) β - 3,50* (<i>m</i>)	5,60; 1,62		2,45; 2,19; 3,11
C	175,4 (C)	-	3,08; 3,78; 3,51*	-	-
COOCH ₃	56,0 (CH ₃)	3,83 (<i>s</i>)		-	
OCH ₃	52,1 (CH ₃)	3,78 (<i>s</i>)			
NH	-	8,82 (<i>sl</i>)	-		2,19; 2,45; 7,25; 3,78; 4,26

*Atribuído com base nos espectros de HSQC/COSY.

Tabela 13: Dados de RMN de ^{13}C e ^1H da substância H (10-metoxi-15*S-E*-isositsiriquina, **113**) e comparação com dados da literatura para a 15*S-E*-isositsiriquina (**29**).

RMN de ^{13}C (δ_{C})			RMN de ^1H (δ_{H})	
C	Observado (39)	Lit (29) **	Observado (39)	Lit (29)**
C-2	133,3 (C)	133,5	-	-
C-3	52,7 (CH)	53,1	4,26 (<i>sl</i>)	3,9 (br)
C-5	51,0 (CH ₂)	51,2	$\alpha - 3,11(m)$ $\beta - 3,21 (m)$	α -2,84 (<i>ddd</i> , $J = 4$ e 12 Hz) β -3,17 (<i>dd</i> , $J = 4$ e 12 Hz)
C-6	17,6 (CH ₂)	18,5	$\alpha - 2,60 (dl, J = 15 \text{ Hz})$ $\beta - 2,95 (m)$	α -2,68 ($d J = 15 \text{ Hz}$) β -3,0 ($m, J = 15 \text{ Hz}$)
C-7	107,0 (C)	107,3	-	-
C-8	127,6 (C)	127,2	-	-
C-9	100,0 (CH)	118,0	6,87 ($d, J = 2 \text{ Hz}$)	7,48(d)
C-10	153,9 (C)	119,2	-	7,09 (t)
C-11	111,1 (CH)	121,4	6,79 (<i>dd</i> , $J = 9; 2 \text{ Hz}$)	7,14(t)
C-12	111,8 (CH)	111,0	7,25 ($d, J = 9 \text{ Hz}$)	7,31 (d)
C-13	131,1 (C)	136,2	-	-
C-14	29,5 (CH ₂)	29,6	2,19 ($t \text{ app}, J = 5 \text{ Hz}$)	α -2,27 (m) β -2,25(m)
C-15	32,5 (CH)	32,8	3,08 (m)	3,38 (m)
C-16	49,5 (CH)	49,1	2,45 (m)	2,66 (m)
C-17	61,7 (CH ₂)	61,6	3,51* (m)	α -3,92 (<i>dd</i> , $J = 12$ e 4 Hz) β -3,87 (<i>dd</i> , $J = 12$ e 4 Hz)
C-18	13,3 (CH ₃)	13,0	1,62 ($d, J = 7 \text{ Hz}$)	1,63 ($((d, J = 6,5 \text{ Hz}))$)
C-19	124,3 (CH)	121,5	5,60 ($q, J = 7 \text{ Hz}$)	5,52 (q)
C-20	132,8 (C)	134,5	-	-
C-21	52,3 (CH ₂)	54,6	$\alpha - 2,96 (dl, J = 12 \text{ Hz})$ $\beta - 3,50^* (m)$	α -3,08 ($d, J = 12 \text{ Hz}$) β -3,80 ($d, J = 12 \text{ Hz}$)
C=O	175,4 (C)	174,9	-	-
COOCH ₃	56 (CH ₃)	51,5	3,83 (s)	-
OCH ₃	52,1 (CH ₃)	-	3,78 (s)	-
NH	-	-	8,82 (<i>sl</i>)	-

Dados: (Observado) RMN CDCl₃, 300 MHz

*Atribuído com base nos espectros de HSQC/COSY

**Lousnasmaa et al. (1994) CDCl₃, 400 MHz

5.2.3. Elucidação estrutural do anel D da substância B.

A substância B apresentou a mesma quantidade de sinais de carbono no RMN de ^{13}C (Tabela 14) que a fórmula sugerida para esta substância pela análise de EMAR (Tabela 7). Pelo COSY H-3 (δ_{H} 2,86-3,11) correlaciona-se com o H-14 α (δ_{H} 1,24). No espectro de HMBC, o H-3 correlaciona-se com os carbonos nas posições 6, 15 e 21 (Figura 41). O H-15 (δ_{H} 1,35) H-16 (δ_{H} 2,23) e o H-16 acopla com o H-17 (δ_{H} 3,70) no espectro de COSY. No HMBC o H-16 correlaciona com o carbono 14 e os hidrogênios do C-17 correlacionam com C-15 (Tabela 14).

O espectro de HMBC apresentou também correlação entre os H-18 (δ_{H} 0,88) e C-19 e C-20. Os H-19 apresentaram correlação com C-20 (Figura 41). Algumas correlações de HMBC e COSY dos anéis A, B e C estão apresentadas nas figuras 29 e 32 e descritas nos tópicos 5.2.2 e 5.2.3. As demais correlações e os demais dados de RMN de 1D e 2D estão apresentadas na tabela 14 e foram comparados com dados da literatura na tabela 15, confirmando a estrutura da 3 α , 20 β -corinan-17-ol (**76**) (Figura 42) para essa substância.

Figura 41: Algumas correlações de COSY e HMBC do anel D da substância B (3 α , 20 β -corinan-17ol, **76**).

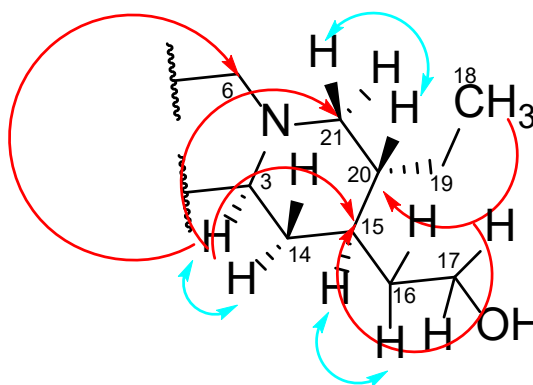


Figura 42: Estrutura do 3 α , 20 β -corinan-17-ol (**76**).

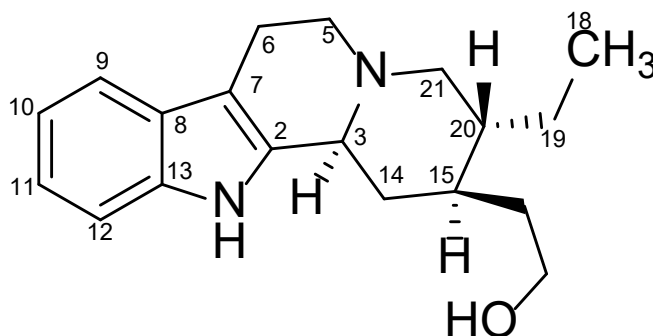


Tabela 14: Dados espectrais de RMN 1D e 2D da substância B (3 α , 20 β -corinan-17-ol (**76**)) (300/75 MHz; ppm; CDCl₃).

Unidimensionais			Bidimensionais	
C	¹³ C (δ_C)/DEPT	¹ H (δ_H)/HSQC	HMBC	COSY
C-2	134,8 (C)	-	2,70	-
C-3	59,7 (CH)	2,86-3,11 (<i>m</i>)	1,21; 2,47; 1,88	1,21
C-5	53,0 (CH ₂)	α - 2,47 (<i>m</i> , 7,0; 9,0; 13,0 Hz) β - 2,86-3,11 (<i>m</i>)	2,70	3,01
C-6	21,5 (CH ₂)	α - 2,70 (<i>dl</i> , <i>J</i> = 14,0 Hz) β - 2,86-3,11 (<i>m</i>)	3,04	2,45
C-7	107,4 (C)	-	2,47; 2,70; 7,46	-
C-8	127,3 (C)	-	7,46; 7,32; 3,04	-
C-9	118,0 (CH)	7,46 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 7,0; 1,0 Hz)	7,09	7,09
C-10	119,2 (CH)	7,09 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 7,0; 1,0 Hz)	7,12; 7,46	7,12; 7,46
C-11	121,2 (CH)	7,12 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 7,0; 1,0 Hz)		
C-12	111,1 (CH)	7,32 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 7,0; 1,0 Hz)	7,12	7,12
C-13	136,2 (C)	-	7,46; 7,32; 3,01; 3,04	-
C-14	35,0 (CH ₂)	α - 1,24* (<i>m</i>) β - 1,92* (<i>m</i>)	1,92	1,91 3,01
C-15	36,9 (CH)	1,35* (<i>m</i>)	1,21; 2,23; 3,70; 3,01	2,23; 3,01; 3,70
C-16	35,4 (CH ₂)	α - 1,35* (<i>m</i>) β - 2,23 (<i>dl</i> , <i>J</i> = 12,0 Hz)	3,70	3,70
C-17	60,1 (CH ₂)	3,70 (<i>m</i>)		
C-18	11,0 (CH ₃)	0,88 (<i>t</i> , <i>J</i> = 7 Hz)	1,07; 1,61	1,07; 1,61
C-19	23,4 (CH ₂)	α - 1,07 (<i>ddd</i> , <i>J</i> = 8,0; 15,0 Hz) β - 1,61 (<i>ddd</i> , <i>J</i> = 8,0; 15,0 Hz)	0,88	
C-20	41,5 (CH)	1,40* (<i>m</i>)	0,88; 1,07; 1,61; 2,89	1,88; 2,98
C-21	59,9 (CH ₂)	α - 1,87* (<i>dl</i> , <i>J</i> = 11,4 Hz) β - 2,86-3,11 (<i>m</i>)	3,04	
NH	-	8,72 (<i>sl</i>)	-	

*Atribuído com base nos espectros de HSQC/COSY.

Tabela 15: Dados de RMN de ^{13}C e ^1H da substância B e comparação com dados da literatura para o 3 α , 20 β -corinan-17-ol (**76**).

RMN de ^{13}C (δ_{C})			RMN de ^1H (δ_{H})	
C	Observado	Lit **	Observado	Lit**
C-2	134,8 (C)	134,9	-	-
C-3	59,8 (CH)	59,8	2,86-3,11 (<i>m</i>)	3,09
C-5	53,0 (CH ₂)	53,1	α - 2,47 (<i>m</i> , 7,0; 9,0; 13,0 Hz) β - 2,86-3,11 (<i>m</i>)	2,58 3,09
C-6	21,7 (CH ₂)	21,6	α - 2,70 (<i>dl</i> , J = 14,0 Hz) β - 2,86-3,11 (<i>m</i>)	2,75 3,00
C-7	107,4 (C)	107,7	-	-
C-8	127,3 (C)	127,3	-	-
C-9	118,0 (CH)	118,1	7,46 (<i>dd</i> , J = 7,0; 1,0 Hz)	7,50 (<i>d</i>)
C-10	119,2 (CH)	119,2	7,09 (<i>dd</i> , J = 7,0; 1,0 Hz)	7,10 (<i>dd</i>)
C-11	121,2 (CH)	121,2	7,12 (<i>dd</i> , J = 7,0; 1,0 Hz)	7,14 (<i>dd</i>)
C-12	111,0 (CH)	110,9	7,32 (<i>dd</i> , J = 7,0; 1,0 Hz)	7,31 (<i>d</i>)
C-13	136,2 (C)	136,1	-	-
C-14	35,0 (CH ₂)	35,2	α - 1,24* (<i>m</i>) β - 1,92* (<i>m</i>)	1,33 1,95
C-15	36,9 (CH)	37,2	1,35* (<i>m</i>)	1,44
C-16	35,6 (CH ₂)	35,4	α - 1,35* (<i>m</i>) β - 2,23 (<i>dl</i> , J = 12,0 Hz)	1,33 2,19
C-17	60,2 (CH ₂)	60,3	3,70 (<i>m</i>)	3,72
C-18	11,1 (CH ₃)	11,1	0,88 (<i>t</i> , J = 7 Hz)	0,93 (<i>t</i>)
C-19	23,4 (CH ₂)	23,4	α - 1,07 (<i>ddd</i> , J = 8,0; 15,0 Hz) β - 1,61 (<i>ddd</i> , J = 8,0; 15,0 Hz)	1,14 (<i>m</i>) 1,68 (<i>m</i>)
C-20	41,6 (C)	41,6	1,40* (<i>m</i>)	1,50
C-21	60,0 (CH ₂)	60,1	α - 1,87* (<i>dl</i> , J = 11,4 Hz) β - 2,86-3,11 (<i>m</i>)	2,19 3,10
NH	-	-	8,72 (<i>sl</i>)	7,96

Dados: RMN (Observado) CDCl₃, 300 MHz

*Atribuído com base nos espectros de HSQC/COSY

**Horst. (2012) RMN (Literatura) CDCl₃, 400 MHz

5.2.3. Elucidação estrutural do anel D da substância F.

O anel D apresentou correlação no HMBC do H-3 (δ_H 3,10) com o C-21 e o C-15 (Tabela 16). O H-16 β (δ_H 1,92) correlaciona com C-14 e C-17. O H-18 (δ_H 0,90) correlaciona com C-19 e C-20, e os H-21 correlacionam com C-15 e C-20 (Figura 43).

Ao analisar todos os dados de LC-EMAR e RMN 1D e 2D, foi possível confirmar que a substância F tem dados bem parecido com o 3 α , 20 β corinan-17-ol (**76**). A diferença de m/z entre o 3 α , 20 β corinan-17-ol (substância B) e substância F é de 30 Da como pode ser verificado na tabela 7. Essa diferença de m/z pode ser explicada pela presença de uma metoxila na substância F, evidenciada por um sinal em δ_H 3,77 no espectro de RMN de ^1H . Também, os desdobramentos na região de aromático, onde observamos a presença de um duplo dubleto em δ_H 6,66 com $J = 9$ e 3 Hz para H-11, o que é característico de acoplamento *orto* e *meta*. A discussão dos sinais de RMN de ^1H dos anéis A, B e C está nos tópicos 5.2.2 e 5.2.3. A figura 43 apresenta algumas correlações de HMBC do anel D. Os dados de RMN foram comparados com dados da literatura de corinan-17-ol (**72**) (Tabela 17) e pelos dados da tabela 16 pôde-se identificar a substância como sendo o 10-metoxi-corinan-17-ol, (**119**), figura 44.

Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C de Liu et al. (2013) para 3 α , 20 β corinan-17-ol (**76**) em $CDCl_3$ foram utilizados para comparação com os dados obtidos para substância F. O espectro de ^1H RMN foi realizado em $CDCl_3$ e acetona- d_6 (Tabela 17), sendo o espectro obtido em acetona- d_6 apresentou melhor resolução de sinal. No espectro de NOESY dessa substância (em $CDCl_3$) foi observada uma forte correlação de H-1 (δ_H 8,85) e OH (δ_H 3,23). Esta observação é consistente com fortes ligações de hidrogênio entre as funções NH e OH em uma conformação com orientação *cis* para H-3 e o par não ligante de elétrons do N-4 na junção C/D dos anéis, C-20 etil e C-15 etanol *trans*-diaxiais metade em uma conformação de cadeira (Figura 42). Esta conformação é também consistente com o dubleto largo ($J_{gem} = 11$ Hz) atribuído ao H-21 α axial com acoplamento mínimo a H-20.

Figura 43: Anel D na conformação em cadeira.

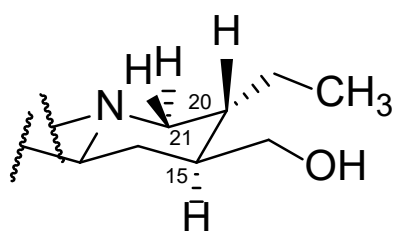


Figura 44: Correlações no HMBC do anel D da substância F (10-metoxi-corinan-17-ol, **119**).

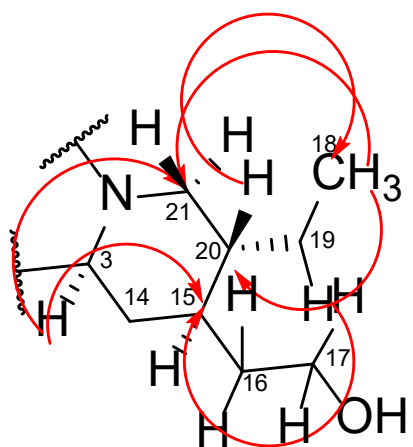


Figura 45: Estrutura da substância F (10-metoxi-corinan-17-ol, **119**).

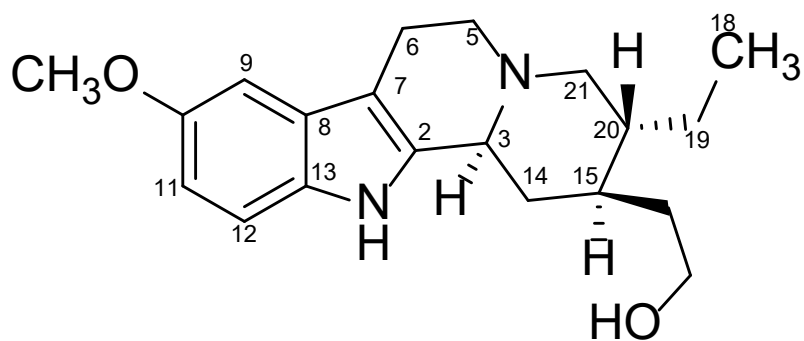


Tabela 16: Dados espectrais de RMN 1D e 2D da substância F (10-metoxi-corinan-17-ol, **119**) (300/75 MHz; ppm; acetona-d₆).

Unidimensional		Bidimensionais ($\delta_{H,C}$)			
C	¹³ C (δ_C)/DEPT	¹ H (δ_H)/HSQC	HMBC	COSY	NOESY
C-2	136,8 (C)	-	2,60; 2,85	-	-
C-3	60,2 (CH)	3,10 (<i>m</i>)	3,02; 2,50	2,44	
C-5	53,1 (CH ₂)	$\alpha - 2,50$ (<i>dd</i> , <i>J</i> = 11,0; 4,0 Hz) $\beta - 3,02^*$ (<i>m</i>)	2,60; 2,85		
C-6	21,8 (CH ₂)	$\alpha - 2,60$ (<i>m</i>) $\beta - 2,85$ (<i>dddd</i> , app <i>J</i> = 2,2; 5,8 Hz)	3,02; 2,5		
C-7	106,8 (C)	-	6,90; 2,60; 2,85; 3,02; 2,49	-	-
C-8	127,7 (C)	-	7,18	-	-
C-9	99,8 (CH)	6,90 (<i>d</i> , <i>J</i> = 3,0 Hz)	6,67	6,66	3,77
C-10	153,7 (C)	-	6,90; 7,18; 3,77	-	-
C-11	110,1 (CH)	6,66 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 9,0; 3,0 Hz)	6,90		
C-12	111,4 (CH)	7,17 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9,0 Hz)	-	6,66	
C-13	131,6 (C)		6,90; 6,67	-	-
C-14	35,3 (CH ₂)	$\alpha - 1,17$ (<i>m</i>) $\beta - 2,44$ (<i>dt</i> , <i>J</i> = 12,0; 3,0 Hz)	1,94	3,10	
C-15	37,1 (CH)	1,41* (<i>m</i>)	3,10; 2,02; 3,03		
C-16	35,8 (CH ₂)	$\alpha - 1,24$ (<i>m</i>) $\beta - 1,92$ (<i>dddd</i> , app <i>J</i> = 2,5; 7,5 Hz)			
C-17	59,2 (CH ₂)	3,65 (<i>m</i>)	1,94	1,92; 1,24	
C-18	10,5 (CH ₃)	0,90 (<i>t</i> , <i>J</i> = 8,0 Hz)			3,03
C-19	23,2 (CH ₂)	$\alpha - 1,11$ (<i>m</i>) $\beta - 1,65$ (<i>dddd</i> , app <i>J</i> = 2,2; 7,3 Hz)	0,90; 1,37		
C-20	42,2 (CH)	1,37* (<i>m</i>)	2,02; 3,03; 0,90		
C-21	60,6 (CH ₂)	$\alpha - 2,00$ (<i>dl</i> , <i>J</i> = 11,0 Hz) $\beta - 3,03^*$ (<i>m</i>)	3,10		
OCH ₃	54,9 (CH ₃)	3,77 (<i>s</i>)			
NH		8,85 (<i>sl</i>)			3,23

*Atribuído com base nos espectros de HSQC/COSY.

Tabela 17: Dados de RMN de ^{13}C e ^1H da substância F (10-metoxi-corinan-17-ol, **119**) e comparação com dados da literatura para 3 α , 20 β corinan-17-ol (**76**).

RMN de ^{13}C (δ_{C})			RMN de ^1H (δ_{H})	
C	Observado (119)	Lit **(76)	Observado (119)	Lit** (76)
C-2	136,8 (C)	134,9	-	-
C-3	60,2 (CH)	59,8	3,10 (<i>m</i>)	3,05–3,01 (<i>m</i>)
C-5	53,1 (CH ₂)	53,1	α – 2,50 (<i>dd</i> , $J = 11,0$; 4,0 Hz) β – 3,02* (<i>m</i>)	2,59–2,53 (<i>m</i>) 3,14 – 3,06 (<i>m</i>)
C-6	21,8 (CH ₂)	21,6	α – 2,60 (<i>m</i>) β – 2,85 (<i>dddd</i> , app $J = 2,2$; 5,8 Hz)	2,75–2,71 (<i>m</i>) 3,14 – 3,06 (<i>m</i>)
C-7	106,8 (C)	107,7	-	-
C-8	127,7 (C)	127,3	-	-
C-9	99,8 (CH)	118,1	6,90 (<i>d</i> , $J = 3,0$ Hz)	7,48 (<i>d</i> , $J = 7,8$ Hz)
C-10	153,7 (C)	119,2	-	7,08 (<i>m</i>)
C-11	110,1 (CH)	121,2	6,66 (<i>dd</i> , $J = 9,0$; 3,0 Hz)	7,16 (<i>m</i>)
C-12	111,4 (CH)	110,9	7,17 (<i>d</i> , $J = 9,0$ Hz)	7,33 (<i>d</i> , $J = 7,8$ Hz)
C-13	131,6 (C)	136,1	-	-
C-14	35,3 (CH ₂)	35,2	α – 1,17 (<i>m</i>) β – 2,44 (<i>dt</i> , $J = 12,0$; 3,0 Hz)	NA
C-15	37,1 (CH)	37,2	1,41* (<i>m</i>)	NA
C-16	35,8 (CH ₂)	35,4	α – 1,24 (<i>m</i>) β – 1,92 (<i>dddd</i> , app $J = 2,5$; 7,5 Hz)	2,34 (<i>m</i>)
C-17	59,2 (CH ₂)	60,3	3,65 (<i>m</i>)	3,79 – 3,72 (<i>m</i>)
C-18	10,5 (CH ₃)	11,1	0,90 (<i>t</i> , $J = 8,0$ Hz)	0,92 (<i>t</i> , $J = 7,4$ Hz)
C-19	23,2 (CH ₂)	23,4	α – 1,11 (<i>m</i>) β – 1,65 (<i>dddd</i> , app $J = 2,2$; 8,0 Hz)	1,16–1,11 (<i>m</i>) 1,71–1,62 (<i>m</i>)
C-20	42,2 (CH)	41,6	1,37* (<i>m</i>)	NA
C-21	60,6 (CH ₂)	60,1	α – 2,00 (<i>dl</i> , $J = 11,0$ Hz) β – 3,03* (<i>m</i>)	NA
OCH ₃	54,9 (CH ₃)		3,77 (<i>s</i>)	NA
NH			8,85 (<i>sl</i>)	8,21

Dados: RMN (Observado) acetona- d_6 , 300 MHz

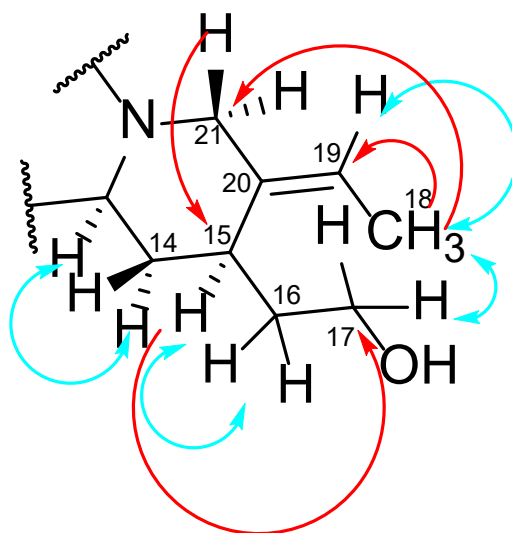
*Atribuído com base nos espectros de HSQC/COSY

**Liu et al. (2013). Dados da corinan-17-ol. RMN (Literatura) CDCl_3 , 500 MHz

5.2.3. Elucidação estrutural do anel D da substância I

No espectro de COSY o H-3 (δ_H 4,32) acopla com H-14 α (δ_H 2,12) (Tabela 18; Figura 44). Também, o H-15 (δ_H 2,96*) acopla com H-16 (δ_H 1,46). Os H-18 (δ_H 1,59) acoplam com o H-19 (δ_H 5,60). No espectro de HMBC o H-18 (δ_H 1,59) correlaciona com C-19, o C-21 (δ_C 53,4) correlaciona com os hidrogênios δ_H 3,20, 2,96* e 5,60, referentes à H-5, H-15 e H-19, respectivamente. Algumas correlações importantes de COSY e HMBC estão apresentadas na figura 45.

Figura 46: Algumas correlações no COSY e HMBC do anel D da substância I (3 α , 15 α -10-metoxi-geissosquizol, **28**).



Os demais dados de RMN estão apresentados na tabela 18 para substância I. Nos levantamentos já realizados não foram encontrados dados de RMN na literatura para essa substância. Os dados foram comparados com os dados obtidos no trabalho de Li et al. (2017) para a substância geissosquizol (Tabela 19), sendo que a diferença entre a estrutura da literatura e a substância I é a presença de uma metóxila no carbono 10. A configuração *E* pôde ser estabelecida com base nos dados espectrais de NOESY em que o sinal da metila do grupo olefínico H-18 (δ_H 1,59) exibiu correlação com H-15 (δ_H 2,96*) e com H-17 α e H-17 β (δ_H 3,57*). Em comparação de nossos dados de RMN de 1D e 2D para as substâncias geissosquizol e isogeissosquizol (Figura 47) com a literatura de Liu et al. (2013); Li et al. (2017) respectivamente, chegou-se à substância 3 α , 15 α -10-metoxi-geissosquizol (**28**) (Figura 48).

Figura 47: estrutura da substância: geissosquizol e isogeissosquizol

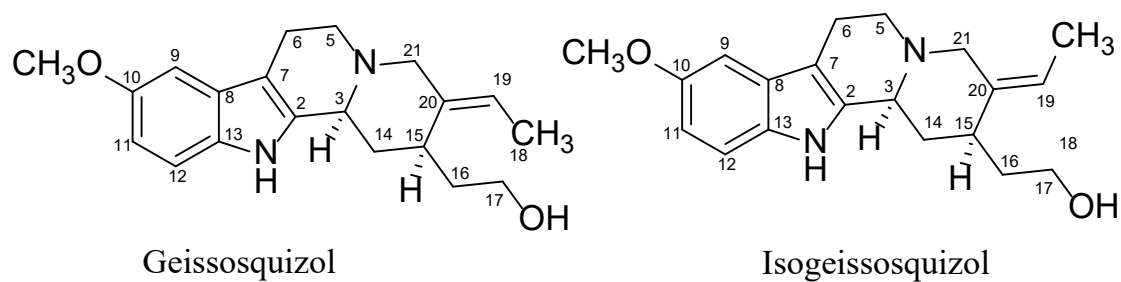


Figura 48: Estrutura da substância I (3 α , 15 α -10-metoxi-geissosquizol, **28**).

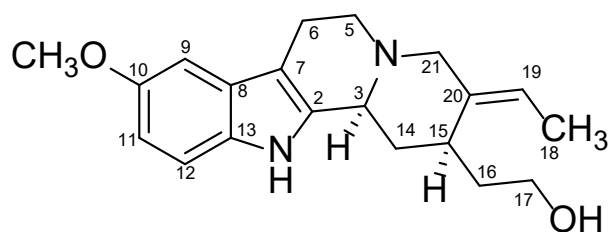


Tabela 18: Dados de RMN 1D e 2D da substância I (3 α , 15 α -10-metoxi-geissosquizol, **28**) (300/75 MHz; ppm; CDCl₃).

Unidimensionais			Bidimensionais		
C	¹³ C (δ_C)/DEPT	¹ H (δ_C)/HSQC	HMBC	COSY	NOESY
C-2	131,0 (C)	-		-	-
C-3	53,3 (CH)	4,32 (<i>sl</i>)		2,12; 2,51	
C-5	49,4 (CH ₂)	3,20 (<i>sl</i>)			
C-6	17,3 (CH ₂)	2,86* (<i>m</i>)		3,20	
C-7	105,8 (C)	-	3,20; 6,72	-	-
C-8	126,8 (C)	-	7,22	-	-
C-9	111,0 (CH)	6,73* (<i>m</i>)			2,86*
C-10	153,8 (C)	-	3,80; 7,22	-	
C-11	100,0 (CH)	6,74* (<i>m</i>)	6,72	7,22	
C-12	111,6 (CH)	7,22 (<i>d</i> , $J = 9,0$ Hz)	6,74		
C-13	131,7 (C)	-	6,74	-	-
C-14	30,4 (CH ₂)	$\alpha - 2,12$ (<i>m</i>) $\beta - 2,51$ (<i>m</i>)			
C-15	30,1 (CH)	2,96* (<i>m</i>)	1,46; 3,57	1,46; 2,12; 2,51	
C-16	34,8 (CH ₂)	1,46 (<i>dt</i> , $J = 12,0$; 6,0 Hz)	3,57	2,97	
C-17	60,0 (CH ₂)	3,57* (<i>m</i>)	1,46		
C-18	12,7 (CH ₃)	1,59 (<i>d</i> , $J = 7,0$ Hz)	5,60	3,57; 5,60	2,96; 3,57
C-19	125,3 (CH)	5,60 (<i>q</i> , $J = 7,0$ Hz)	1,58		3,60
C-20	132,5 (C)	-	1,58	-	-
C-21	53,4 (CH ₂)	3,32 (<i>dl</i> , $J = 12,0$ Hz) 3,60* (<i>m</i>)	5,60; 3,20; 2,97		
OCH ₃	55,2 (CH ₃)	3,79 (<i>s</i>)	-		
NH	-	9,66 (<i>sl</i>)	-	-	

*Atribuído com base nos espectros de HSQC/COSY.

Tabela 19: Dados de RMN de ^{13}C e ^1H da substância I (3α , 15α -10-metoxi-geissosquizol, **28**) e comparação com dados da geissosquizol (**74**).

RMN de ^{13}C (δ_{C})			RMN de ^1H (δ_{H})	
C	Observado (28)	Lit (74) **	Observado (28)	Lit (74)**
C-2	131,0 (C)	136	-	-
C-3	53,3 (CH)	54	4,32 (sl)	4,19 (s)
C-5	49,4 (CH ₂)	51,1	3,20 (sl)	3,20 (d, $J = 12,2$ Hz)
C-6	17,3 (CH ₂)	18,2	2,86* (m)	3,01-2,93 (m)
C-7	105,8 (C)	107,1	-	-
C-8	126,8 (C)	121,5	-	-
C-9	111,0 (CH)	111,1	6,73* (m)	7,33 (d, $J = 7,8$ Hz)
C-10	153,8 (C)	(CH) ^a	-	7,13 (t, $J = 7,6$ Hz) ^a
C-11	100,0 (CH)	119,4	6,74* (m)	7,08 (t, $J = 7,4$ Hz)
C-12	111,6 (CH)	118	7,22 (d, $J = 9,0$ Hz)	7,44 (d, $J = 7,5$ Hz)
C-13	131,7 (C)	135,9	-	-
C-14	30,4 (CH ₂)	32,6	$\alpha - 2,12$ (m) $\beta - 2,51$ (m)	2,14 (m), 2,67 (d, $J = 14,3$ Hz)
C-15	30,1 (CH)	31,6	2,96* (m)	3,01-2,93 (m)
C-16	34,8 (CH ₂)	35,8	1,46 (dt, $J = 12,0; 6,0$ Hz)	1,48 (m)
C-17	60,0 (CH ₂)	61,5	3,57* (m)	3,61-3,49 (m)
C-18	12,7 (CH ₃)	12,9	1,59 (d, $J = 7,0$ Hz)	1,62 (d, $J = 6,6$ Hz),
C-19	125,3 (CH)	127,3	5,60 (q, $J = 7,0$ Hz)	5,50 (q, $J = 6,4$ Hz)
C-20	132,5 (C)	133,5	-	-
C-21	53,4 (CH ₂)	53,6	3,32 (dl, $J = 12,0$ Hz) 3,60* (m)	2,02 (m) 3,03 (m)
OCH ₃	55,2 (CH ₃)	-	3,79 (s)	3,61-3,49 (m)
NH	-	-	9,66 (sl)	8,69 (sl)

Dados: RMN: Substância **I** - 3α , 15α -10-metoxi-geissosquizol, **28**) RMN, CDCl₃, 300 MHz.

*Atribuído com base nos espectros de HSQC/COSY

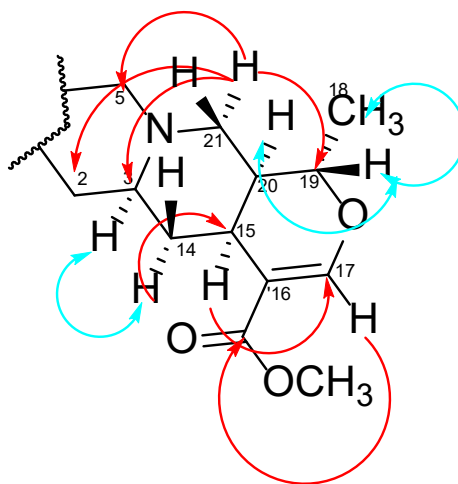
Li et al., (2017) geissosquizol (74**). RMN, CDCl₃, 400 MHz

^aDados não existente para essa estrutura

5.2.4. Elucidação estrutural dos anéis D e E das substâncias C e D.

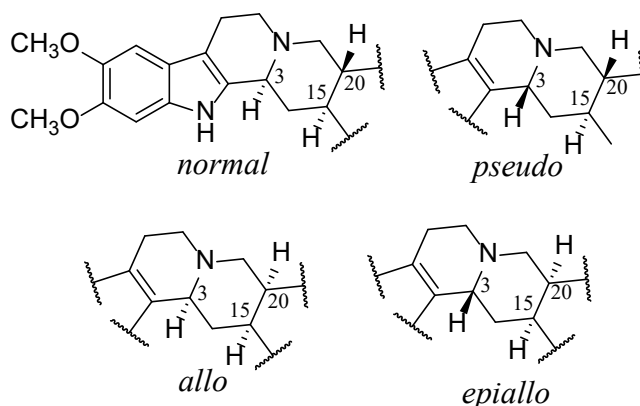
A substância C apresentou correlação no COSY entre os H-3 e H-14 β e α , e entre H-18 e H-19. No espectro de correlação à longa distância (HMBC) o H-21 β (δ_H 3,10) correlaciona com os carbonos C-2 (^4J), C-3 (^3J), C-5 (^3J) e C-19 (^3J). O H-14 α (δ_H 2,49*) correlaciona com o C-15 (^2J). Também, H-15 (δ_H 2,73*) correlaciona com C-17 (^3J), e também o H-17 correlaciona com o carbono da carbonila (^3J). A figura 49 apresenta algumas correlações importantes para a substância C. Algumas correlações de HMBC e COSY do anel A, B e C estão apresentadas nas figuras 31 e 32 e estão descritas nos tópicos 5.2.2 e 5.2.3. As demais correlações estão apresentadas na tabela 20.

Figura 49: Algumas correlações do COSY e HMBC do anel D e E da substância C, a isoreserpilina (47).



Baseado em nossos dados de conectividade, nossa substância é a reserpilina. Segundo Bruyn et al. (1989), essa classe de substância pode apresentar 4 diastereoisômeros (normal, pseudo, allo e epiallo), dependem da sua configuração relativa dos H-3, H-15, H-19 e H-20 (Figura 50).

Figura 50: Tipos de diastereoisômeros de estruturas do tipo isoreserpilina/reserpilina.



Podemos definir estereoquímica do H-15 através de seus J de acoplamento com o H-20, pois se os mesmos apresentarem J na faixa de δ_H 1-6 Hz isso indica que eles estão na relação *cis*, e J de 12 Hz estão na relação *trans*, (Bruyn et al., 1989). O H-15 apresentou-se na forma de um multipeto, com o auxílio do método do trabalho de Hoyer et al. (1994), foi possível 2 J s em 9,8 e 4,6 Hz, então podemos inferir que o J de 4,6 Hz é referente ao acoplamento com o H-20, logo o H-15 encontra-se em *cis* com o H-20, confirmando assim os possíveis diastereoisômeros *allo* e *epiallo*.

O H-15, também acopla com o H-14 β que se encontra em *trans*-diaxial com um J de 12 Hz, esse mesmo J foi observado com o acoplamento entre o H-14 β e H-3, logo podemos afirmar que o H-3 está em relação *cis*-diaxial em relação a H-15. O espectro de NOESY da substância C mostrou forma convexa entre os anéis D/E, estando assim em proximidade espacial H-14 β (δ_H 1,51) e H-19 (δ_H 4,48), as quais apresentaram correlação pelo espectro de NOESY. Além disso, os acoplamentos de RMN de ^1H e ^1H - ^1H $J_{\text{resolvido}}$ combinados com NOESY forneceram evidências para os átomos H-3 *cis*-diaxial (δ_H 3,31) e H-15 (δ_H 2,73). Esses dados corroboram o observado no trabalho de Bruyn et al. (1989) (Tabela 21). Com todas essas informações e por comparação com dados da literatura de Bruyn et al. (1989) na tabela 21, podemos afirmar que a substância C isolada é a isoreserpilina (**47**) (Figura 51).

Figura 51: Estrutura da substância C (isoreserpilina, **47**).

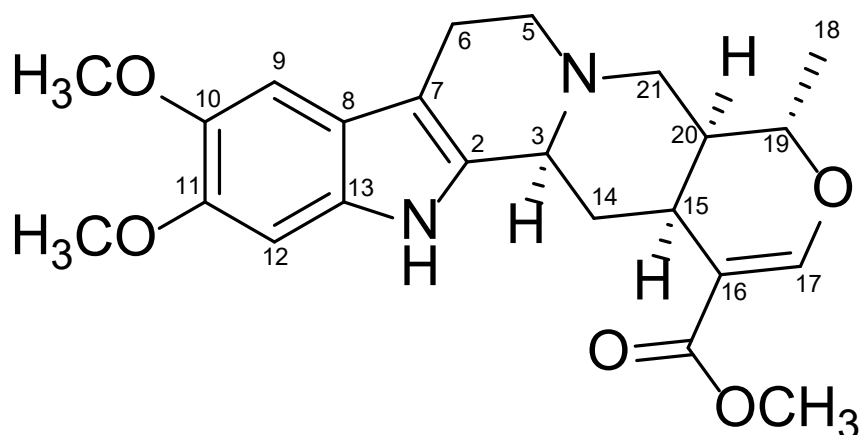


Tabela 20: Dados espectrais de RMN 1D e 2D da substância C (isoreserpilina, **47**) (300/75 MHz; ppm; CDCl₃).

Unidimensionais			Bidimensionais		
C	¹³ C (δ _c)/DEPT	¹ H (δ _c)/HSQC	HMBC	COSY	NOESY
C-2	133,0 (C)	-	3,10; 1,51	-	-
C-3	59,9 (CH)	3,31 (<i>dl</i> , <i>J</i> = 12,0Hz)	3,10; 2,94; 1,51	1,51	
C-5	53,5 (CH ₂)	α - 2,54* (<i>m</i>) β - 2,94* (<i>m</i>)	3,10	β - 2,94	3,10
C-6	21,7 (CH ₂)	α - 2,62* (<i>m</i>) β - 2,88* (<i>m</i>)	β - 2,94	β - 2,94	
C-7	107,7 (C)	-	6,88; 2,62;	-	-
C-8	119,9 (C)	-	6,81	-	-
C-9	100,2 (CH)	6,88 (<i>s</i>)	-	-	3,88
C-10	144,7 (C)	-	6,81; 6,88; 3,88	-	-
C-11	145,8 (C)	-	6,81; 6,88; 3,81	-	-
C-12	99,8 (CH)	6,81 (<i>s</i>)			
C-13	130,1 (C)	-	6,81; 6,88;	-	-
C-14	34,1 (CH ₂)	α - 2,49* (<i>m</i>) β - 1,51 (<i>ddd</i> , <i>J</i> = 12,0 Hz)	2,73		
C-15	31,2 (CH)	2,73* (<i>m</i> , <i>J</i> = 9,8 e 4,6 Hz) ^b	7,56; 4,48; 3,10; 2,49; 1,51	1,51; 1,69	
C-16	109,4 (C)	-	7,56; 3,10; 2,73; 1,51	-	
C-17	155,8 (CH)	7,56(<i>s</i>)	2,73; 1,40	1,40; 2,73; 4,48	
C-18	18,5 (CH ₃)	1,40 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6,0 Hz)	4,48	4,48	
C-19	72,4 (CH)	4,48 (<i>dddd</i> , <i>J</i> = 12,0; 6,0 Hz)	7,56; 3,10; 2,73; 1,40	1,40; 1,69	1,51
C-20	38,3 (CH)	1,69 (<i>m</i>)	4,48; 3,10; 2,73; 2,40; 1,40	-	
C-21	56,0 (CH ₂)	α - 2,72* (<i>m</i>) β - 3,10 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 12,0; 2,0 Hz)	2,94	1,69	
C-22	168,0 (C)	-	7,56; 2,73	-	-
OCH ₃ -10	56,2 (CH ₃)	3,81 (<i>s</i>)			
OCH ₃ -11	56,4 (CH ₃)	3,88 (<i>s</i>)			
OCH ₃ - 22	51,1 (CH ₃)	3,74 (<i>s</i>)		-	
NH	-	7,87 (<i>sl</i>)	-	-	2,54*

*Atribuído com base nos espectros de HSQC/COSY.

^b Multiplicidade definida utilizando o método de Hoyer et al., 1994

Tabela 21: Dados de RMN de ^1H da substância C e comparação com dados da literatura para a isoreserpilina (47).

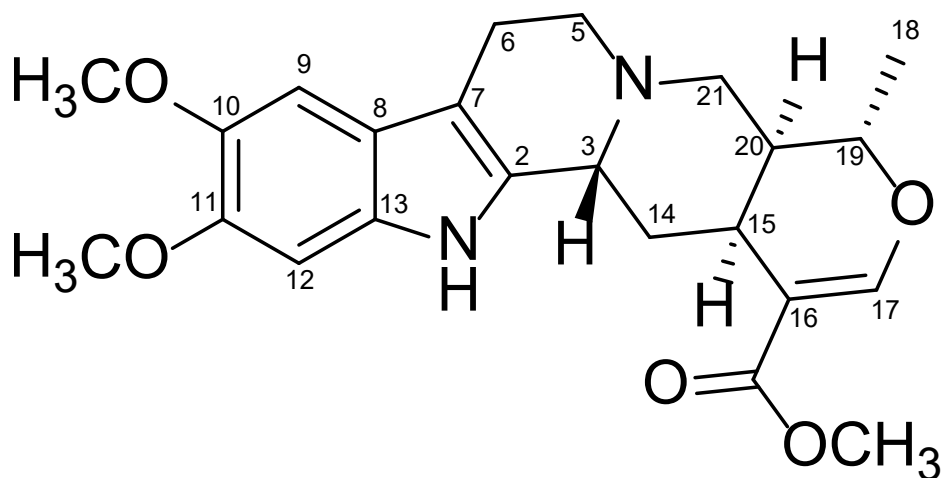
Nº H	Observado CDCl ₃ , 300 MHz	Literatura de Bruyn et al. (1989) CDCl ₃ , 300 MHz
H-3	3,31 (<i>dl</i> , $J = 12,0$ Hz)	3,32 ($J = 12,2$; 3,3 Hz)
H-5	α - 2,54* (<i>m</i>) β - 2,94* (<i>m</i>)	2,53 ($J = 8,2$; 3,9 Hz) 2,91 ($J = 11,1$; 5,7 Hz)
H-6	α - 2,62* (<i>m</i>) β - 2,88* (<i>m</i>)	2,60 ($J = 3,9$ Hz) 2,88 ($J = 14,9$; 8,2 Hz)
H-9	6,88 (<i>s</i>)	6,89 (<i>s</i>)
H-12	6,81 (<i>s</i>)	6,82 (<i>s</i>)
H-14	α - 2,49* (<i>m</i>) β - 1,51 (<i>ddd</i> , $J = 12,0$ Hz)	2,48 ($J = 12,4$; 4,5; 3,3 Hz) 1,52 (<i>q</i> , $J = 12,0$ Hz)
H-15	2,73* (<i>m</i> , $J = 9,8$ e 4,6 Hz) ^b	2,72 ($J = 4,5$ Hz)
H-17	7,56 (<i>s</i>)	7,55 (<i>s</i>)
H-19	4,48 (<i>dddd</i> , $J = 12,0$; 6,0 Hz)	4,50 ($J = 10,2$; 6,2 Hz)
H-20	1,69 (<i>m</i>)	1,68 (<i>m</i>)
H-21	α - 2,72* (<i>m</i>) β - 3,10 (<i>dd</i> , $J = 12,0$; 2,0 Hz)	2,71 ($J = 12,3$ Hz) 3,09 ($J = 12,3$ Hz)
H-CH ₃	1,40 (<i>d</i> , $J = 6,0$ Hz)	1,40
MeO-10	3,81 (<i>s</i>)	3,90 (<i>s</i>)
MeO-11	3,88 (<i>s</i>)	3,88 (<i>s</i>)
MeO-22	3,74 (<i>s</i>)	3,74 (<i>s</i>)
NH	7,87 (<i>sl</i>)	7,68

*Atribuído com base nos espectros de HSQC/COSY.

^b multiplicidade definida utilizando o método de Hoye, et al., 1994.

A substância D apresentou m/z $[M+H]^+$ igual a substância C (Tabela 7) e a mesma fórmula inferida pelo banco de dados do LC-EMAR. Partindo dessa primeira característica imaginou-se que essa estrutura poderia ser um estereoisômero da isoreserpilina (**47**). Ao analisar os espectros de RMN de hidrogênio essa hipótese não pôde ser confirmada (Tabela 22) devido à limitação na resolução do espectro. Após buscar possíveis isômeros para a isoreserpilina na literatura, foi encontrado um trabalho de Vieira (2011) onde o autor isolou a isoreserpilina e a reserpilina (Figuras 51 e 52) e caracterizou ambas as substâncias por de RMN de 500 MHz. Na sua discussão o autor enfatiza essa característica relacionada à qualidade dos espectros para diferenciar as duas estruturas. Bruyn et al., (1989) ressaltam que a qualidade do espectro melhora quando a reserpilina (**48**) encontra-se na forma de um sal. A tabela 23 compara os dados obtidos nesse trabalho com os apresentados no trabalho de Vieira (2011).

Figura 52: Estrutura da substância D (reserpilina, **48**)



Uma justificativa para baixa qualidade na resolução do espectro de hidrogênio e a configuração do H-3 da reserpilina, pois quando o mesmo se encontra em α a estrutura se torna mais estável assumindo assim poucas conformações (isoreserpilina), já com H-3 em β (reserpilina) a substância apresenta muita mobilidade conformacional, com essas varias conformações a qualidade na resolução do espectro é afetada.

Tabela 22: Dados espectrais de RMN 1D e 2D da substância D (reserpilina, **48**) (300/75 MHz; ppm; CDCl₃).

Unidimensionais			Bidimensionais	
C	¹³ C (δ _C)/DEPT	¹ H (δ _H)/HSQC	HMBC	COSY
C-2	NO	-	-	-
C-3	NO	3,13* (<i>m</i>)	-	
C-5	52,2 (CH ₂)	α – 3,13* (<i>m</i>) β – 2,97* (<i>m</i>)		
C-6	19,0 (CH ₂)	α – 2,59* (<i>m</i>) β – 2,97* (<i>m</i>)		2,97
C-7	107,2(C)	-	6,88; 2,59; 2,97	-
C-8	119,9 (C)	-	6,89; 3,88	-
C-9	95,0 (CH)	6,88 (<i>s</i>)	3,88	
C-10	144,7 (C)	-	6,88; 6,89; 3,90	-
C-11	146,4 (C)	-	6,88; 6,89; 3,88	-
C-12	100,0 (CH)	6,89 (<i>s</i>)		6,88
C-13	130,1 (C)	-	6,88; 6,89	-
C-14	30,5 (CH ₂)	2,15* (<i>m</i>)		
C-15	25,7 (CH)	2,59* (<i>m</i>)	7,53	
C-16	NO	-		-
C-17	155,3 (CH)	7,53 (<i>s</i>)		
C-18	18,5 (CH ₃)	1,33 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6,0 Hz)		
C-19	72,9 (CH)	4,43 (<i>sl</i>)	1,33	
C-20	37,2 (CH)	1,83* (<i>m</i>)		
C-21	54,7 (CH ₂)	-		
C-22	167,9 (C)	-	3,71; 7,53	-
OCH ₃ -10	56,2 (CH ₃)	3,87 (<i>s</i>)	-	
OCH ₃ -11	56,3 (CH ₃)	3,90 (<i>s</i>)	-	
OCH ₃ - 22	51,1 (CH ₃)	3,72 (<i>s</i>)	-	-
NH	-	8,47 (<i>sl</i>)	-	-

*Atribuído com base nos espectros de HSQC/COSY.

NO - Dados não observados

Tabela 23: Dados de RMN de ^{13}C e ^1H da substância D e comparação com da literatura para a reserpilina, **48**.

RMN de ^{13}C (δ_{C})			RMN de ^1H (δ_{H})	
C	Observado	Lit **	Observado	Lit**
C-2	NO	NA	NO	-
C-3	NO	NA	3,13* (<i>m</i>)	NA
C-5	52,2 (CH_2)	52,2	$\alpha - 3,13^* (m)$ $\beta - 2,97^* (m)$	3,14 (<i>sl</i>)
C-6	19,0 (CH_2)	-	$\alpha - 2,59^* (m)$ $\beta - 2,97^* (m)$	NA
C-7	106,8 (C)	107,4	-	-
C-8	119,7 (C)	120,1	-	-
C-9	94,9 (CH)	95,1	6,88 (<i>s</i>)	6,92 (<i>s</i>)
C-10	144,3 (C)	144,8	-	-
C-11	145,8 (C)	146,4	-	-
C-12	100,1 (CH)	100,2	6,89 (<i>s</i>)	6,92 (<i>s</i>)
C-13	129,6 (C)	130,1	-	-
C-14	30,6 (CH_2)	29,7	2,15* (<i>m</i>)	NA
C-15	25,7(CH)	25,8	2,59* (<i>m</i>)	NA
C-16	NO	NA	-	-
C-17	155,5 (CH)	155,3	7,53 (<i>s</i>)	7,57 (<i>s</i>)
C-18	18,5 (CH_3)	18,5	1,33 (<i>d</i> , $J = 6,0 \text{ Hz}$)	1,37 (<i>d</i> , $J = 5,8 \text{ Hz}$)
C-19	72,7 (CH)	73,2	4,43 (<i>sl</i>)	4,46 (<i>s</i> largo)
C-20	37,7 (CH)	30,7	1,83* (<i>m</i>)	-
C-21	54,7 (CH_2)	54,6	NO	2,67 – 2,57 (<i>m</i>)
C-22	167,7 (C)	167,9	-	-
OCH ₃ -10	56,2 (CH_3)	56,2	3,87 (<i>s</i>)	3,91 (<i>s</i>)
OCH ₃ -11	56,2 (CH_3)	56,4	3,90 (<i>s</i>)	3,94 (<i>s</i>)
OCH ₃ - 22	51,1 (CH_3)	51,1	3,72 (<i>s</i>)	3,75 (<i>s</i>)
NH	-	-	8,47 (<i>sl</i>)	8,22 (<i>s</i>)

Dados: RMN (Observado) CDCl_3 , 300 MHz

*Atribuído com base nos espectros de HSQC/COSY

**Vieira (2011). RMN (Literatura) CDCl_3 , 500 MHz

NO - Dados não observados

NA - Dados não apresentados/observado na literatura

5.2.5. Elucidação estrutural da substância G.

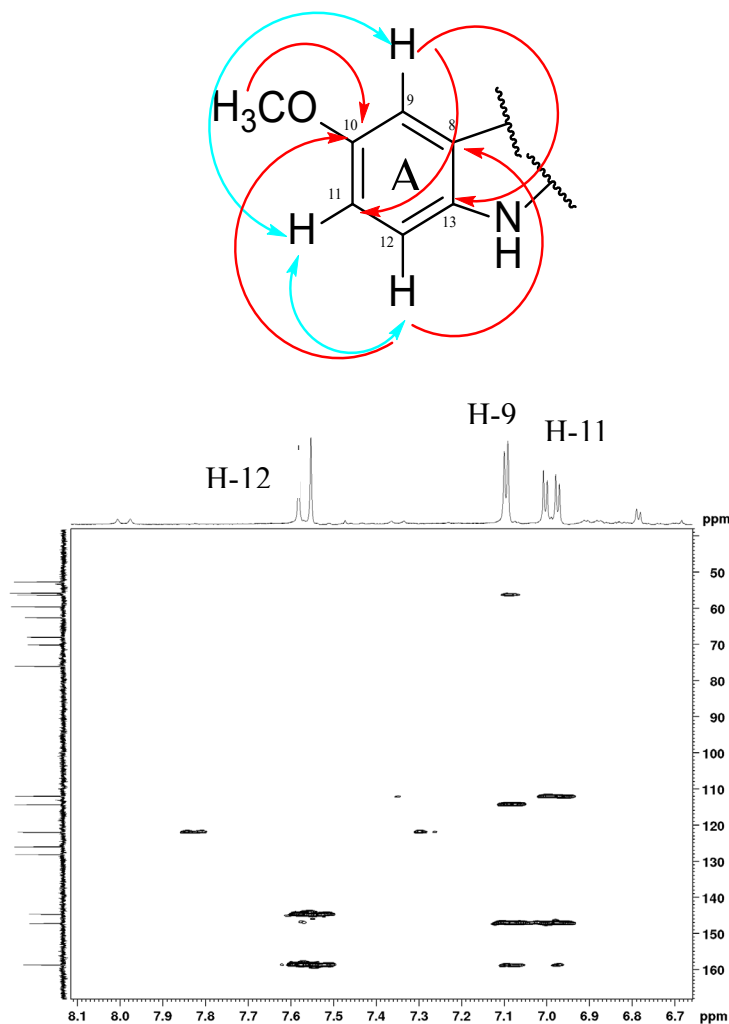
A substância G se apresentou como um sólido amorfo de coloração amarela, solúvel apenas em MeOH e H₂O, o cromatograma dessa substância apresentou m/z de (M+H) de 399,1917, o software (Bruker compass data analysis 4.2) propôs a fórmula C₂₂H₂₇N₂O₅ com uma variação de 0,7 ppm, estando assim dentro da margem de erro para substâncias conhecidas (até 20 ppm) e nova (até 10 ppm).

O espectro de RMN de ¹H apresentou 3 sinais característicos de hidrogênios aromáticos, os sinais em δ_H 7,54, 7,13 e 6,96 ppm, nas formas de dubleto, dubleto fino e duplo dubleto com constantes de acoplamento de $J = 8,6$; 2,6 e 8,6; 2,6 Hz respectivamente. Esse espectro apresentou também um quarteto com deslocamento de δ_H 5,76 ($J = 7,0$ Hz) característico de hidrogênio de metino. Foram observados dois singletos com deslocamento de δ_H 3,82 e 3,79, com integrais para 3 hidrogênios característicos de metoxilas, bem como um duplo dubleto com δ_H 1,72 ($J = 7,0$ e 2,0 Hz).

O espectro de ¹³C apresentou 22 linhas espectrais, corroborando com a fórmula inferida pelo equipamento. Utilizando-se dos dados espectrais de DEPT 135 e HSQC, foi possível afirmar que essa substância apresentava 3 sinais de metila (CH₃), 5 de metilenos (CH₂), 6 de metinos (CH) e 8 de carbonos quaternários (C).

No espectro do HMBC da substância G foram observadas as correlações na região de aromáticos entre o sinal do H-9 (δ_H 7,13 *d*) com C-7, C-11, C-13 e C-10. O H-11 (δ_H 6,96) correlacionando com C-9, C-13 e C-10. O H-12 (δ_H 7,54), com o carbono C-8 e C-10. Esses dados mostram que na posição 10 existe uma metoxila tendo em vista que os hidrogênios (δ_H 3,82) correlacionam-se com C-10 (δ_C 160,9), corroborando com a discussão na seção 5.2.2. Na figura 53 estão apresentadas algumas das correlações mais importantes para o anel A.

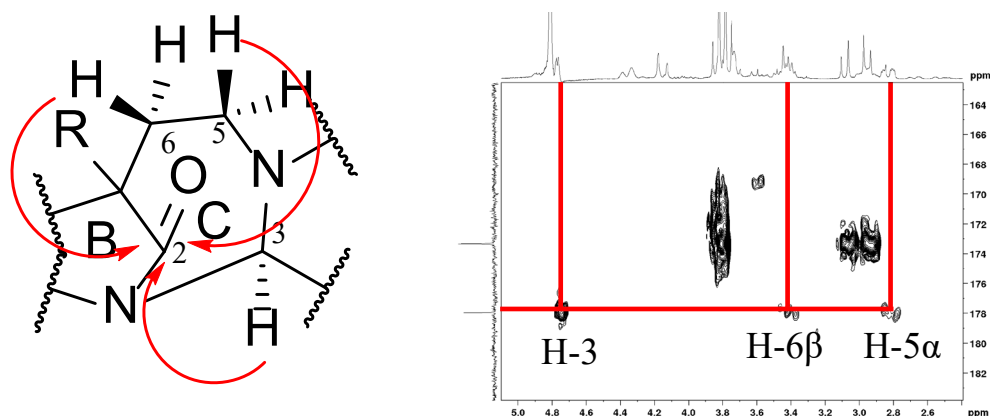
Figura 53: Correlações de COSY e HMBC da região de aromático da substância G.



Um dos hidrogênios diastereotópicos H-5 α (δ_{H} 3,0) apresentou uma correlação fraca no HMBC com C-2 (^4J) (δ_{C} 179,0). Também, o hidrogênio δ_{H} 3,43 ou 3,50 (H-5 β e H-6 β , respectivamente) apresenta correlação com o mesmo carbono (Figuras 34).

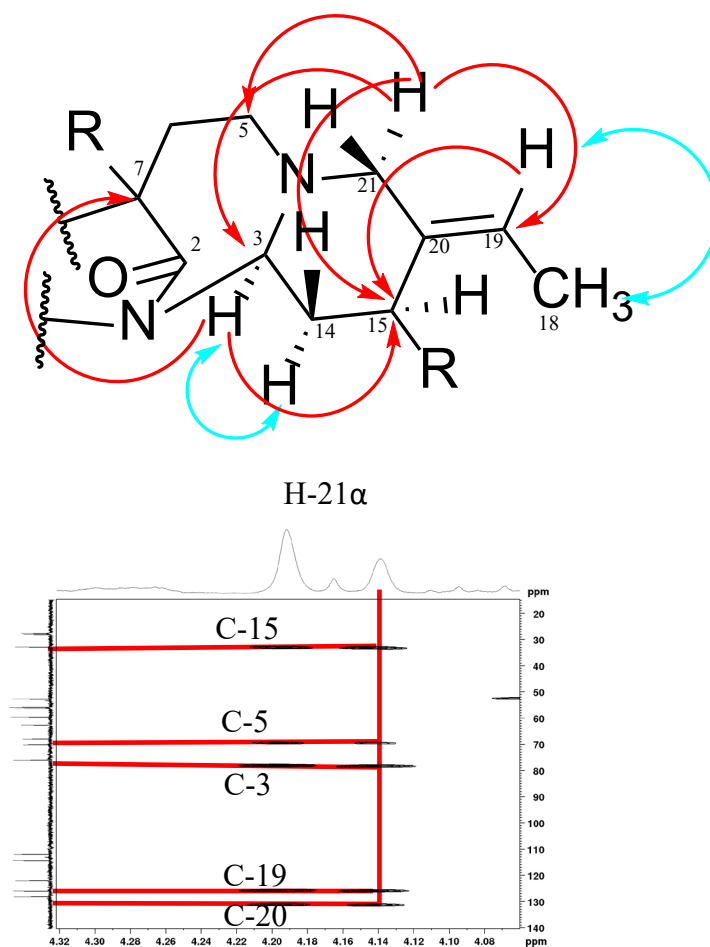
Na junção do anel C com D, o H-3 (δ_{H} 4,79) apresenta acoplamento no espectro de COSY com o H-14 α . O mesmo espectro mostrou acoplamento entres os H-18 (δ_{H} 1,72) e H-19 (δ_{H} 5,76) (Figura 54).

Figura 54: Correlação da junção dos anéis B e C da substância G (2FBC-4-A).



Também no espectro de HMBC observou-se correlação do C-7 (δ_c 57,8), com H-9, H-3, H-6 α e H-5 $\alpha\beta$. O H-3 (δ_H 4,79) correlaciona com C-15, C-14 e C-7 e C-2. O H-21 α (δ_H 4,17) apresentou correlação com C-15, C-5, C-3, C-19 e C-20 (Figura 55).

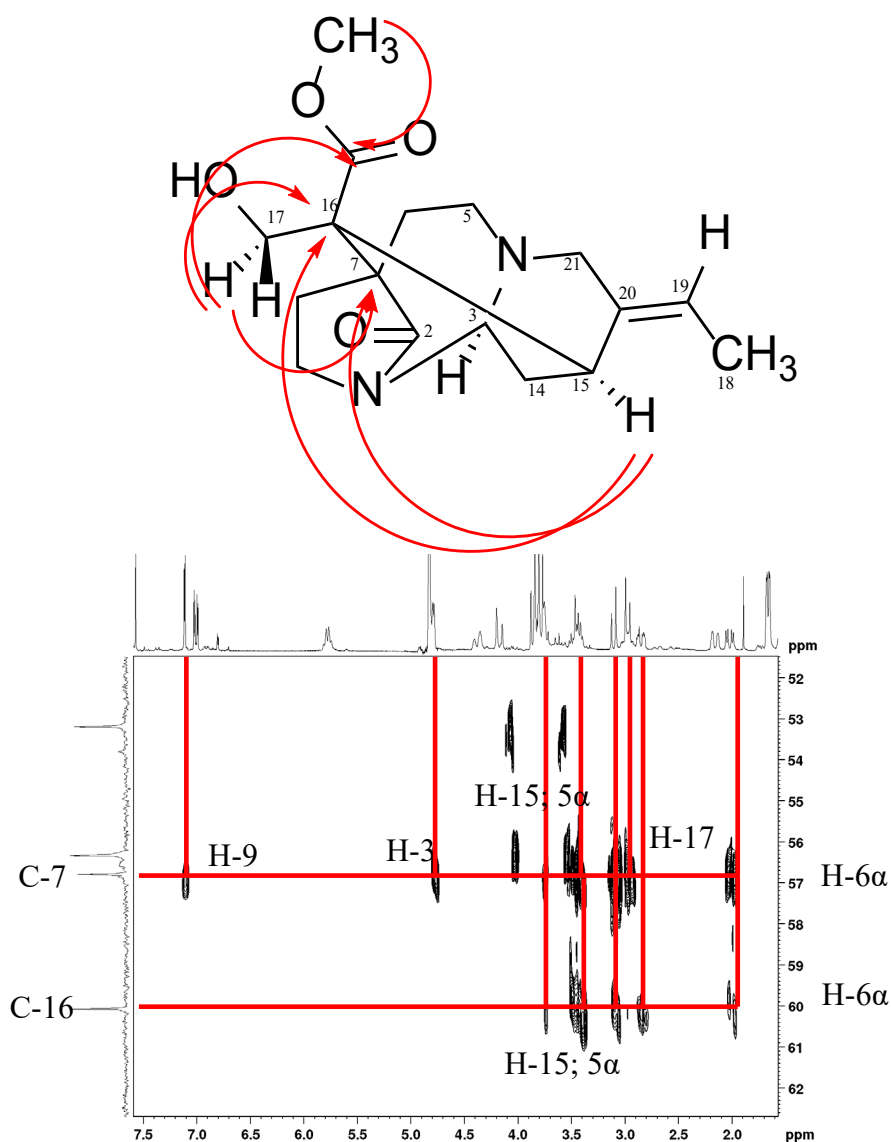
Figura 55: Correlações do COSY e HMBC do anel D da substância G (2FBC-4-A).



A estrutura da substância G evidenciou um alcaloide do tipo indolínico (carbonos quaternários em C-2 e C-7). Os deslocamentos químicos do C-2 e C-7 das demais substâncias isoladas, todas indólicas, são em média $\delta_C \approx 133$ e ≈ 107 , respectivamente. Já na estrutura G esses deslocamentos são de δ_C 179,0 e 57,8, respectivamente, com esse deslocamento o C-2 (δ_C 179,0) pode ser carbono de carbonila de cetona ou de lactama. Os carbonos nas posições 3, 5, 6 e 8 também sofreram alterações no deslocamento químico quando comparado com os mesmo deslocamentos dos respectivos carbonos das demais substâncias isoladas nesse trabalho.

Os hidrogênios H-15, H-17 α , H-14 β , H-5 α e H-6 α apresentaram correlação pelo HMBC com o C-16 (δ_C 60,4), o H-15 (δ_H 3,72) correlaciona-se com o C-7 (δ_H 57,8), com base nessas informações podemos concluir que essa estrutura apresenta uma ligação entre o C-16 e C-7 (Figura 56).

Figura 56: Algumas correlações no HMBC da junção do anél B com o D.



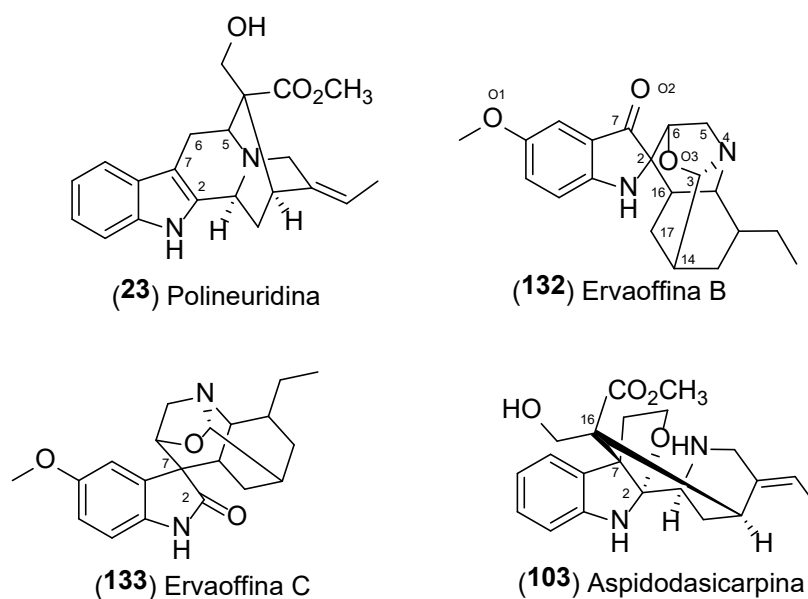
No levantamento bibliográfico realizado foram encontradas estruturas com essas características como demonstra a figura 57. Na substância polineuridina (**23**) a ligação acontece entre C-15 e C-5, com isso a junção entre os anéis B e C apresentam uma dupla ligação isso indica que os deslocamentos dos carbonos 2 e 7 seria na faixa de $\delta_c \approx 133$ e ≈ 107 respectivamente não corroborando com nossos dados de 1D e 2D.

As estrutura **132** e **133** apresentam um grupo espiro nas posições 2 e 7 respectivamente, esse grupo nessas posições apresentam esses carbonos com deslocamento na faixa de δ_c 70 e 55, a substância **132** o grupo indolico trata-se de um pseudoindoxila, logo o carbono 7 tem um deslocamento químico $>$ que δ_c 202 (Tang et al., 2014), esse fato leva a descartar a possibilidade da substância G (2FBC-4-A) apresentar esse mesmo grupo. A substância **133** trata-se de um grupo oxindole, nesse caso o deslocamento químico de C-2 fica na faixa de δ_c 178,9 (Tang et al., 2014), corroborando com nosso dados de RMN, mas essa estrutura tem um fechamento de anel na posição 6 diferenciando de nossos dados apresentados anteriormente. No composto **103** esse o fechamento de anel entre C-16 e C-7 é idêntica aos nossos dados, um dos diferenciais é a ligação entre o carbono 5 com o oxigênio, essa conexão não é vista em nossos dados pois na proposta de estrutura o C-5 está ligado ao N-4.

Uma outra características é o que se refere a tensão anelar entre essas substâncias, por exemplo na substância **23**, não acontece tensão anelar por que o biciclo é composto por ciclos de 6 átomos nesse formato acontece a aproximação do carbono 16 com os hidrogênios do carbono 6, formando uma substância 1- aza - Biciclo [2. 2. 2] octano. Na estrutura **132**, também existe um biciclo, mas um dos ciclos é formado por 8 átomos, o outro é formado por 7 átomos O3, C-3, C-14, C-17, C-16, C-2 e C-6, nesse ciclo acontece uma tensão anelar muito forte, sendo bem parecido com o que acontece com a substância G descrita nesse trabalho, onde o anel de 7 átomos é formado por N-1, C-2, C-7, C-16, C-15, C-14, e C-3, formando assim uma substância 1 - aza - Biciclo [1. 2. 4] nonano, (Figura 58), essa constatação foi possível com auxílio do modelo atômico (HGS – Polyedron Molecular Model).

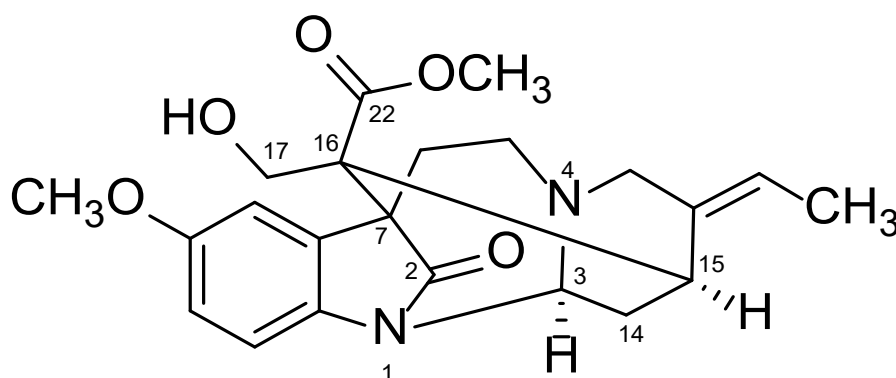
As estruturas **23** e **103** não apresenta substituinte na posição 10 no grupo aromático, outro ponto que corrobora para não ser essas estruturas é a ausência de um carbono que venha a apresentar um deslocamento químico de δ_c 179,0 (C-2).

Figura 57: Estruturas de *Aspidosperma* com características parecidas com a substância G.



Esse deslocamento de δ_C 179,0 (C-2) pode ser de uma carbonila de cetona ou de lactama próxima de um grupo eletronegativo. Como já citado anteriormente o H-3 correlaciona-se com C-2 (δ_H 179,0 ^3J), para isso ser possível nessa proposta de estrutura uma possibilidade seria que o do C-3 esteja ligado diretamente no N-1, com isso esse nitrogênio não seria hidrogenado, isso explica a ausência do sinal de hidrogênio do N-1, tendo em vista que nas demais substâncias isoladas nesse trabalho sempre apresentavam esse sinal. Logo com todos essas correlações uma proposta plausível seria uma estrutura com um grupo oxindol nas posições 1 e 2, como apresentado na figura 58. Todos os dados estão apresentados na tabela 24.

Figura 58: Proposta de estrutura para substância G



5.2.6. Proposta de rota biossintética para substância G

Assim como descrito no tópico 1.4.2.3 (Figura 10), essa substância possui os mesmos precursores (triptamina (**52**) e a secologanina (**55**), que através da reação do tipo Pictet-Spengler dessas duas substâncias forma a strictosidina (**57**). Posteriormente ocorrem várias reações como o ataque do par de elétrons livres do N-4 e a redução da dupla ligação da secologanina, chega à formação de isositsiriquina (**29**). Quando ocorre uma bis-hidroxilação na isositsiriquina nas posições 2 e 7 forma um intermediário **134** que pode levar à formação de duas substâncias totalmente diferentes conforme a figura 59. Se uma base (:B) retira o hidrogênio da hidroxila do carbono na posição 2 e assim formando na hora da formação da dupla ligação a ligação entre o carbono 2 e 3 é rompida logo, os elétrons livres atacam o carbono 7 com a saída da hidroxila nesse carbono na forma de água dando origem a uma estrutura chamada isositsiriquina indoxol **135** (Caminho A, Figura 59). A formação desse tipo de estrutura já foi relatada em outras espécies de *Aspidosperma* como na *A. oblongum* (Pereira et al. 2007).

Se uma base (:B) retirar o hidrogênio da hidroxila do carbono 2 do intermediário **134** e também ocorrer uma oxidação do hidrogênio na posição 16, os elétrons desse carbono podem atacar o nitrogênio na posição 4, o carbono na posição 7, mas como houve uma bis-hidroxilação no carbono 2 e 7, o lugar mais propício a formação de uma nova ligação seria no carbono 7. Isso pode levar a formação de uma dupla ligação entre o carbono 3 e o N-4 (imina **137**). Nesse intermediário uma base retira o hidrogênio do N-1, e os pares de elétrons dele atacam a dupla ligação do C-3, formando assim uma ligação entre N-1 e C-3, chegando assim a nossa proposta de estrutura G (Figura 59).

Figura 59: Proposta de rota biosintética para substância G (133)

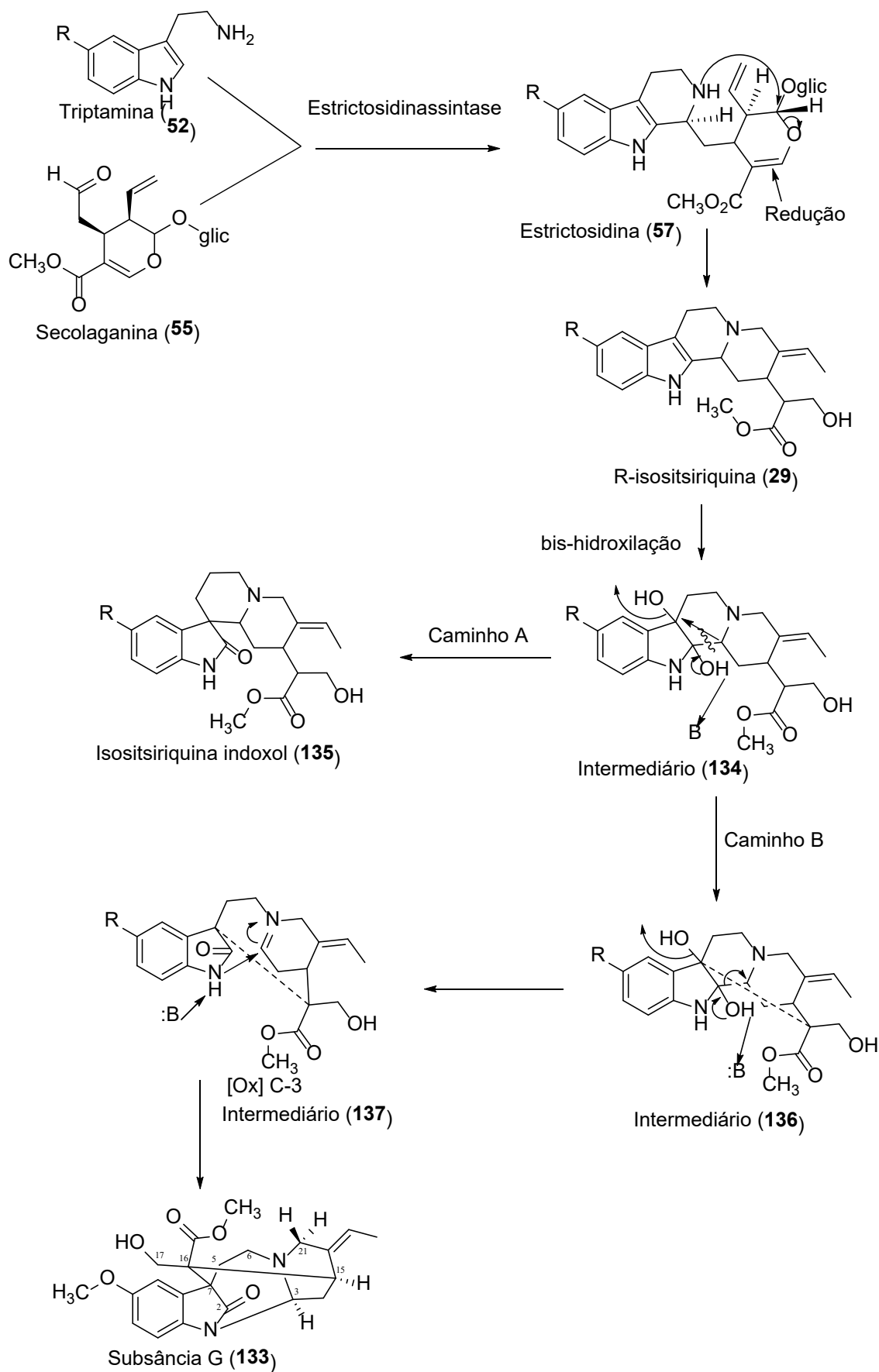


Tabela 24: Dados espectrais de RMN 1D e 2D da substância G (2FBC-4-A) (300 e 500 MHz; ppm; MeOD).

Unidimensionais			Bidimensionais		
C	^{13}C (δ_{C})/DEPT *	^1H (δ_{H})HSQC **	HMBC **	COSY **	NOESY **
C-2	179,0 (C)	-	4,79; 3,43 3,50	-	-
C-3	78,3 (CH)	4,79 (<i>m</i>)	2,85; 3,43; 4,17	2,85	
C-5	69,6 (CH ₂)	α - 3,00 (<i>dddd</i> , app <i>J</i> = 6,0; 3,0 Hz) β - 3,43 (<i>dddd</i> , app <i>J</i> = 12,0; 5,0 Hz)	3,43, 3,50; 4,17; 3,72	3,00	4,79; 5,76
C-6	29,4 (CH ₂)	α - 2,00 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 5; 15 Hz) β - 3,5 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 5; 15 Hz)	-	3,00 3,50	
C-7	57,8 (C)	-	4,79; 7,13; 2,80; 3,03; 3,43; 3,50; 2,00; 3,72		-
C-8	146,2 (C)	-	7,54; 2,00		-
C-9	113,1 (CH)	7,13 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,6 Hz)	6,96		3,79
C-10	160,9 (C)	-	6,96; 7,13; 7,54; 3,79		
C-11	114,8 (CH)	6,96 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8,6; 2,6 Hz)	7,13	7,13	3,79
C-12	123,2 (CH)	7,54 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,6 Hz),		6,69	
C-13	149,4 (C)	-	6,96; 7,13		
C-14	29,5 (CH ₂)	α - 2,22 (<i>dl</i> , <i>J</i> = 16,5 Hz) β - 2,85 (<i>dddd</i> , app <i>J</i> = 5,0; 2,6 Hz) -		3,00; 3,72	3,43
C-15	33,3 (CH)	3,72 (<i>ddd</i> , app <i>J</i> = 15,0; 9,0 Hz)	4,79; 5,76; 2,22; 2,80; 3,03; 4,17		1,72
C-16	60,4(C)	-	2,80; 2,85; 3,43; 3,50; 3,72		-
C-17	63,4 (CH ₂)	α - 2,80 (<i>d</i> , <i>J</i> = 12,5 Hz) β - 3,03 (<i>d</i> , <i>J</i> = 12,5 Hz)		2,80	
C-18	14, 2 (CH ₃)	1,72 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 7,0; 2,0 Hz)	5,76	5,76;	
C-19	126,0 (CH)	5,76 (<i>q</i> , <i>J</i> = 7,0 Hz)	1,72; 4,17		4,17
C-20	131,3 (C)	-	1,72; 2,22; 4,17	-	-
C-21	71,8 (CH ₂)	4,17 (<i>d</i> , <i>J</i> = 15 Hz) 4,41 (<i>d</i> , <i>J</i> = 15 Hz)	5,76		3,72 3,79
OCH ₃	52,7 (CH ₃)	3,82 (<i>s</i>)	-		
OCH ₃	56,2 (CH ₃)	3,79(<i>s</i>)	-		
C-22	173,9 (C)	-	2,80; 3,03	-	-
NH		-			

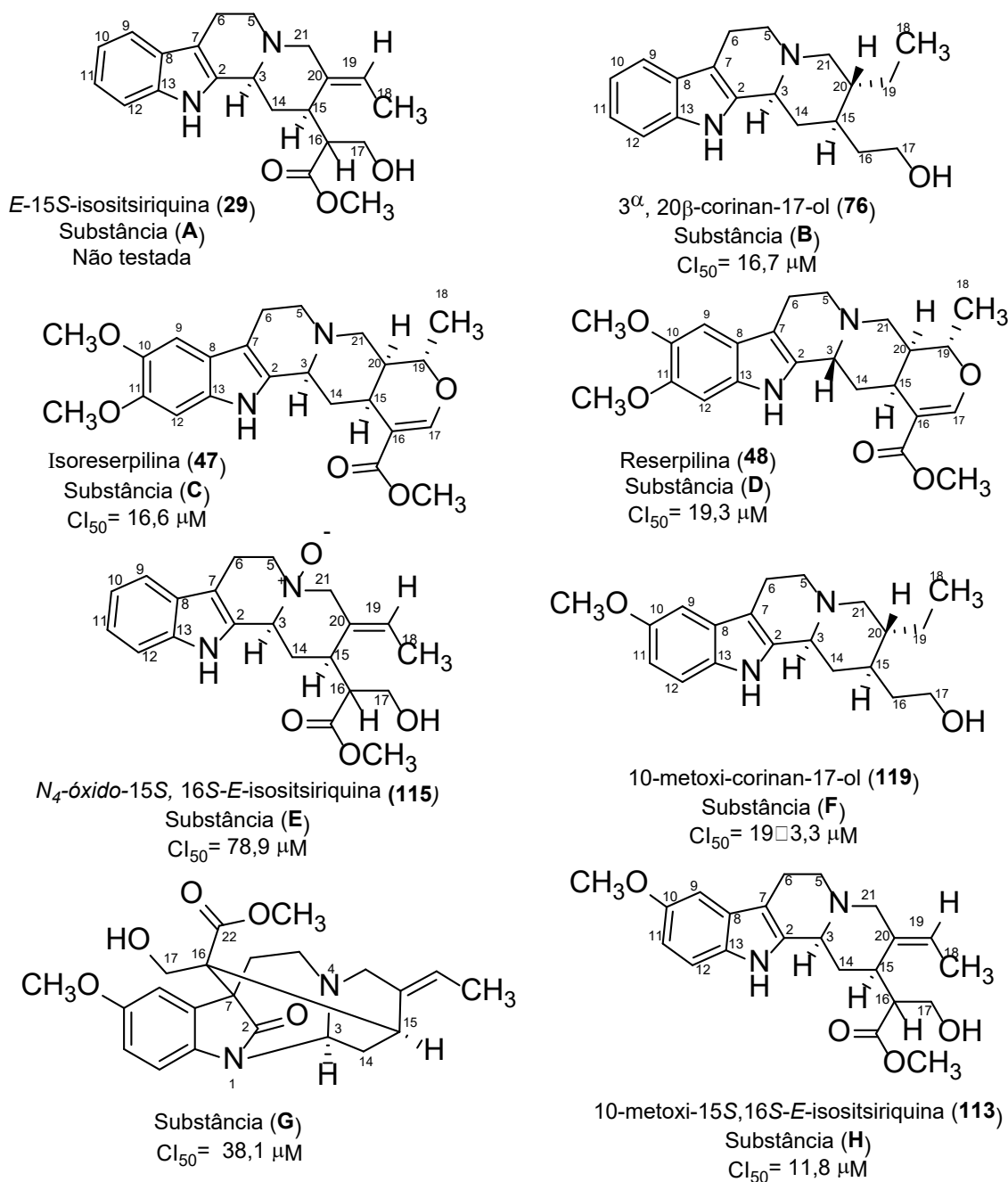
* = 300 MHz

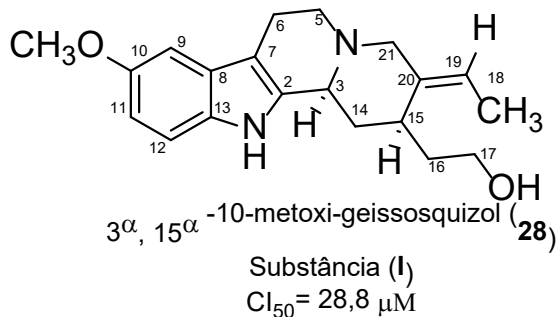
** = 500 MHz

6. Alcaloides isolados de *A. excelsum* e sua atividade anti-plasmodica.

Os estudo da composição química dessa espécie levou ao isolamento de 9 substâncias: isoreserpilina (47), reserpilina (48), 3 α , 20 β -Corinan-17-ol (76), *E*-15*S*, 16*S*-isositsiriquina (29), *N*₄-óxido-15*S*, 16*S*-*E*-isositsiriquina (115), 10-metoxi- corinan-17-ol (119), 10-metoxi- 15*S*, 16*S*-*E*-isositsiriquina (113), 3 α , 15 α -10-metoxi-geissosquizol (28) e a substância G 2FBC-4-A, (133).(Figura 59).

Figura 60: Alcaloides de tipo corinante isolados de *A. excelsum*





6.1. Atividade antimalárica *in vitro*

Os extratos, frações ricas em alcaloides e substâncias foram avaliadas frente à cepa K1 (cloroquina resistente) de *P. falciparum*. Os valores de CI₅₀ estão apresentados abaixo nas tabelas 25 e 26. Também estão apresentados os resultados da citotoxicidade *in vitro* frente à linhagem normal de fibroblastos humanos (MRC-5), bem como os dados de índice de seletividade (IS).

Tabela 25: Atividade antimalárica e citotóxica de extratos e frações de *A. excelsum*

Amostras	CI ₅₀ (μ g/mL)/IC 95%			IS
	<i>P. falciparum</i>	Atividade	MRC-5	
2EMCMS (2%)	5,24 (3,78 – 7,27)	A	159 (137 – 184)	30,3
2F.AcOEt-A	5,35 (3,77 – 7,58)	A	109 (94,9 – 124)	20,4
2F.AcOEt-B	2,53 (2,08 – 3,07)	A	53,3 (47,7 – 59,5)	21,1
2F.CHCl ₃	6,16 (4,00 - 9,49)	A	>200	>32,5
2F.H ₂ O	> 50	I	NT	-

Nota: A (ativo), I (inativo), IS (índice de seletividade) IC (intervalo de confiança), NT (não testado).

A fração 2F.AcOEt-B apresentou maior atividade antiplasmodica entre as amostras testadas (CI₅₀ = 2,53 μ g/mL) contra *P. falciparum*, e menor CI₅₀ frente à linhagem celular MRC-5 (53.3 μ g/mL), ainda sendo considerada de citotoxicidade moderada, já que Suffness e Pezzuto (1990) consideram citotóxicas apenas as amostras que apresentam CI₅₀ inferior a 30 μ g/mL. Essa é a fração 1F.AcOt-B, de onde foram isoladas as substâncias: *E*-15*S*, 16*S*-isositsiriquina (**29**), 3 α , 20 β -Corinan-17-ol (**76**), isoreserpilina (**47**), reserpilina (**48**), *N*-óxido-15*S*, 16*S*-*E*-isositsiriquina (**115**) e 10-metoxi- corinan-17-ol (**119**). Da fração enriquecida com

alcaloides (2F.AcOt-B) foram isoladas as substâncias: 10-metoxi-15*S*, 16*S-E*-isositsiriquina (**113**), 3 α , 15 α -10-metoxi-geissosquizol (**28**) e a substância G (2FBC-4-A, **133**) (Figura 59).

As demais amostras, 2EMCMS (2%) e as frações 2F.AcOEt-A e 2F.CHCl₃ (Tabelas 4 e 6), apresentaram CI₅₀ entre 6,16 e 5,24 μ g/mL sendo consideradas ativas neste estudo. Em estudo anterior, Rocha e Silva (2014) relatou atividade do extrato MeOH da casca de *A.excelsum* (CI₅₀ 0,30 μ g/mL) e da fração clorofômica (CI₅₀ 15,7 μ g/mL) frente à cepa W2 de *P.falciparum*. Quanto à citotoxicidade dessas amostras, a fração clorofômica (2F.CHCl₃) não se mostrou citotóxica nas concentrações testadas, com CI₅₀ superior a 200 μ g/mL. No índice de seletividade do extrato e frações testadas podemos observar que o IS ficou na faixa de 20,2 - 48,2 evidenciando assim que são seletivos frente as células parasitadas com *P.falciparum*.

Das nove substâncias isoladas nesse trabalho apenas as substâncias 3 α , 20 β -corinan-17-ol (**76**) e 3 α , 15 α -10-metoxi-geissosquizol (**28**), já foram isoladas da espécie *A. excelsum*. No gênero (*Aspidosperma*) e família (Apocynaceae) oito dessas substâncias já foram isoladas e apenas a substância **G** é inédita tanto na espécie quanto no gênero e família.

O resultado da avaliação dos alcaloides indólicos para atividade antimalárica *in vitro* está apresentado na tabela 26, com classificação de atividade de acordo com Rocha e Silva (2014), onde:

CI₅₀ para substâncias puras:

- Maior que 20 μ M = inativo
- Entre 20,0 e 5,0 μ M = atividade moderada
- Entre 5,0 e 0,1 μ M = ativo
- Menor que 0,1 μ M = muito ativo

Tabela 26: Atividade contra *Plasmodium falciparum* (Pf) e citotóxica de alcaloides isolados de *A. excelsum*.

Substância	No	Nome	CI ₅₀ e IC 95% Pf e MRC-5			IS
			μM	Atividade	MRC-5 (μM)	
B	76	3α, 20 β-corinan-17-ol	12,5 (10,5 – 13,7)	AM	325 (260 – 407)	26,0
C	47	isoreserpilina	18,7 (12,8 – 27,4)	AM	156 (138 – 175)	8,3
D	48	reserpilina	18,0 (13,3 – 24,2)	AM	312 (279 – 349)	17,3
E	115	N-óxido-15S, 16S-E-isositsiriquina	78,9	I	NT	-
F	119	10-metoxi- corinan-17-ol	13,9 (13,0 – 15,1)	AM	463 (407 - 527)	33,3
H	113	10-metoxi-15S, 16S-E-isositsiriquina	10,3 (8,57 – 12,3)	AM	>523	>50,7
G	132	2FBC-4-A	38,1	I	NT	-
I	28	3α, 15 α -10-metoxi-geissosquizol	23,6 (20,9 – 26,7)	I	486 (190 – 556)	20,6
Controle	-	Cloroquina difosfato	0,353 (0,191 – 0,647)	A	NT	-
Controle	-	Hidrocloridrato de quinina	0,348 (0,183 – 0,647)	A	NT	-

Nota: **A** (ativo), **AM** (atividade moderada), **I** (inativo), **IS** (índice de seletividade) **IC** (intervalo de confiança), NT (não testado).

Fonte: Jordão (2018)

Alguns dos alcaloides avaliados apresentaram atividade moderada contra *P. falciparum*. Desses, o 10-metoxi-15S, 16S-E-isositsiriquina (**113**) apresentou a menor CI₅₀ (10,3 μM) e não se mostrou citotóxico nas concentrações testadas, com CI₅₀ superior a 523 μM para a linhagem MRC-5. Este é o primeiro relato de atividade antiplasmódica para esta substância.

As substâncias 10-metoxi-corinan-17-ol (**119**) e corinan-17-ol (**76**) apresentaram CI₅₀ iguais a 13,9 e 12,5 μM, respectivamente. Essas substâncias, que diferem apenas pela presença de uma metoxila na substância **119**, apresentaram CI₅₀ superiores a 3,35 μM,

conforme relatado por Passemar et al. (2011), frente à estirpe FcM29 (cloroquina resistente) de *P. falciparum*. Esses dados corroboram os dados citados e são as primeiras determinações de valores exatos de CI_{50} contra *P. falciparum*. Quando comparamos os valores de CI_{50} entre MRC-5 e *P. falciparum*, o índice de seletividade (IS) nos mostra maior toxicidade dessas substâncias frente ao parasita, comparado às células normais, indicando boa seletividade e baixa citotoxicidade.

A isoreserpilina e reserpilina (**47** e **48**, respectivamente) também apresentaram atividades semelhantes com CI_{50} entre 18,7 e 18,0 μM , respectivamente. Essa pequena diferença entre a CI_{50} está relacionada às suas estruturas, que diferem na sua configuração em C-3 e N-4. Nas reserpilinas são conhecidas atividades biológicas, como ação antibacteriana e sinérgica contra estirpes resistentes de *Escherichia coli* (Dwivedi et al., 2015), atividade antitumoral e antipsicótica (Yu et al., 2013; Srivastava et al., 2015). De acordo com Passemar et al. (2011), a atividade antiplasmodica $CI_{50} > 2,42 \mu\text{M}$. Quando observamos o índice de seletividade (IS) da isoreserpilina(**47**) observamos que essa substância não é tão seletiva frente as células parasitadas com *P. falciparum*, quando comparado com a reserpilina (**48**).

Os demais alcaloides testados foram considerados inativos contra o *P. falciparum*, com CI_{50} superior a 20 μM . O 3 α , 15 α -10-metoxi-geissosquizol (**28**) apresentou CI_{50} igual a 23,6 μM contra *P. falciparum*. Em estudo anterior foi avaliado por Aguiar et al. (2015) frente à estirpe W2 de *P. falciparum*, onde apresentou atividade com CI_{50} de 3,06 μM . Nesse mesmo estudo de Aguiar et al. (2015), também foi avaliada a citotoxicidade dessa substância em células tumorais HepG2 ($CI_{50} = 15 \mu\text{M}$) e em uma linhagem normal (BGM) ($CI_{50} = 25 \mu\text{M}$), sendo considerada tóxica para estas linhagens celulares. Para a linhagem MRC-5, avaliada no presente estudo, apresentou CI_{50} igual a 486 μM , com IS de 20,6. A substância N-óxido-15S, 16S-E-isositsiriquina (**115**) apresentou maior CI_{50} (78,9 μM), sem relatos na literatura para atividade biológica. A substância G (2FBC-4-A) também foi considerada inativa contra *P. falciparum* ($CI_{50} = 38,1 \mu\text{M}$).

A substância E-15S, 16S-isositsiriquina (**29**), isolada do extrato gerado por Henrique (2007) IEMA-H da fração 1F.AcOEt-B, não foi testada, pois mesmo realizando vários outros fracionamentos dos extratos obtidos em 2015 na fração 2F.AcOEt-B, não foi possível isolar essa substância. Esse fato pode estar relacionado com os períodos diferentes de coleta, bem como a sazonalidade, tendo em vista que a planta pode produzir uma quantidade maior de alcaloides de acordo com sua necessidade.

Apesar da atividade *in vitro* das frações 1F.AcOEt-B e 2F.AcOEt-B, de onde foram obtidos os alcaloides avaliados neste estudo, os mesmos apresentaram atividade moderada. Talvez a ação sinérgica destas substâncias explique a atividade antiplasmodica desta fração, o que não foi possível verificar nas substâncias isoladas. Ainda assim, estudos *in vivo* devem ser realizados para avaliar ao menos uma dessas substâncias em modelos experimentais futuramente, visto que o ensaio *in vitro* avalia apenas a ação direta das drogas sobre os parasitas sem considerar sua metabolização pelo organismo. Em modelos *in vivo* é possível avaliar a absorção dessas substâncias, que após serem metabolizadas podem apresentar atividade elevada. Os estudos em modelo animal são importantes na avaliação da ação farmacológica das plantas de uso tradicional.

Com isso, este trabalho demonstra o potencial biológico desta espécie vegetal que, além da atividade antimalárica aqui descrita, apresenta substâncias com baixa citotoxicidade frente à linhagem celular avaliada, podendo apresentar outros efeitos biológicos a serem descobertos.

7. Conclusão

O estudo fitoquímico do extrato metanólico da casca do caule de *A. exelsum* revelou a presença abundante de alcalóides indólicos monoterpênicos.

As frações geradas com a partição ácido-base, apresentaram-se ativas frente ao *P. falciparum* com CI_{50} na faixa de 2,53 – 6,16 $\mu\text{g/mL}$. As mesmas não apresentaram citotoxicidade nas concentrações testadas, com valores de CI_{50} entre 53,3 e superior 200 $\mu\text{g/mL}$.

Nesse trabalho foi possível isolar 9 alcaloides monoterpênicos, sendo testados frente ao *P. falciparum*, sendo que 6 apresentaram atividade moderada: isoreserpilina (**47**), reserpilina (**48**), 3 α , 20 β -corinan-17-ol (**76**), *E*-15 S , 16 S -isositsiriquina (**29**), 10-metoxi-corinan-17-ol (**119**), 10-metoxi-15 S , 16 S -*E*-isositsiriquina (**113**), os demais foram considerados inativos. Das 9 substâncias isoladas 8 são da classe dos alcaloides indólicos monoterpênicos e um alcaloide (substância G/2FBC-4-A) indolínico monoterpênico, relatado pela primeira vez na literatura.

Este trabalho apresentou pela primeira vez os valores de CI_{50} frente ao *P. falciparum* (*in vitro*) para essas substâncias, das quais 6 alcaloides apresentaram atividade moderada. Também foram isolados 3 alcaloides: isoreserpilina (**47**), reserpilina (**48**) e 10-metoxi-corinan-17-ol (**119**) em escala suficiente para um futuro estudo *in vivo*, inédito para essas substâncias.

8. REFERÊNCIAS

- Aguiar, A.C.C., Cunha, A.C., Ceravolo, I.P., Gonçalves, R.A.C., Oliveira, A.J.B., Krettli, A.U. *Aspidosperma* (Apocynaceae) plant cytotoxicity and activity towards malaria parasites. Part II: experimental studies with *Aspidosperma ramiflorum* *in vivo* and *in vitro*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 110, n. 7, p. 906-913. 2015.
- Ahmed, S.A.; Gogal, R.M.; Walsh, J.E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H] thymidine incorporation assay. **Journal Of Immunological Methods**. v. 170, n. 2, p.211-224, 1994.
- Albuquerque, B.W.P. Contribuição ao conhecimento das *Aspidosperma* da Amazônia Brasileira (Apocynaceae). *Aspidosperma carapanauba* Pichon. *A. excelsum* Woodson, *A. oblongum* A. DC. **Acta Amazônica**, v.1, n. 3, p. 9-17, 1971.
- Andersson, J.A., Sha, J., Kirtley, M.L., Reyes, E., Fitts, E.C., Dann, S.M., Chopra, A.K. Combating multidrug-resistant pathogens with host-directed nonantibiotic therapeutics. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 62, e1943-17, 18p. 2018.
- Andrade-Neto, V.F., Pohlit, A.M., Pinto, A.C.S., Silva, E.C.C., Nogueira, K.L., Melo, M.R.S., Henrique, M.C., Amorim, R.C.N., Silva, L.F.R., Costa, M.R.F., Nunomura, R.C.S., Nunomura, S.M., Alecrim, W.D., Alecrim, M.G.C., Chaves, F.C.M., Vieira, P.P.R. *In vitro* inhibition of *Plasmodium falciparum* by substances isolated from Amazonian antimalarial plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 3, p. 359-365, 2007.
- Añez, R.B.S. Análise morfoanatômica das folhas e casca de *Aspidosperma nitidum* Benth. e *Aspidosperma excelsum* Wdsom (Apocynaceae) com abordagem farmacognóstica e etnofarmacológica. **Tese (Doutorado) - INPA/UFAM**, Manaus, 128 f, 2009.
- Araújo, D.P., Bastos, M.V.R., Nascimento, P.C., Silveira, E.R., Viana, G.S.B. Avaliação dos efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivo de *Aspidosperma nitidum* e *Aspidosperma pyrifolium* em modelo experimental de nocicepção em camundongo. A 65ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira. Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), em Recife, PE, 2013.
- Baliga, M.S. *Alstonia scholaris* Linn R Br in the treatment and prevention of cancer: Past, present, and future. **Integrative Cancer Therapies**, v. 9, n. 3, p. 261-269, 2010.
- Barbosa, W.L.R.,Tavares, I.C.C.,Soares, D.C. Alcaloides de *Aspidosperma auriculatum* Standl. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, supl.1, 2003.
- Barreiro, E.J. Sobre a química dos remédios, dos fármacos e dos medicamentos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, n.3, 2001.
- Berry, D. W. **Treatment of pain in peripheral neuropathy using topical hamelia patens extract**. USA. US 2015-62230932. 2015 (Patente).
- Bolzani, V.S., Serur, L.M., Matos, F.J.A. Indole alkaloid evolution in *Aspidosperma*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 15, n. 2, p. 187-200, 1987.
- Brasil. Portal da Saúde. Disponível em: (https://public.tableau.com/profile/mal.ria.brasil#!/vizhome/MiniSivep1518_2018_08_15/casos_notificados_2018_regio_Amaznica). Acesso em 20 de agosto de 2018.

Brasil. Ministério da Saúde. Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária. 2005. Disponível em: (http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/malaria_diag_manual_final.pdf). Acesso em 12 de Janeiro de 2019.

Bruyn, A., Zhang, W., Budesinsky, M. NMR study of three heteroyohimbine derivatives from *Rauwolfia serpentina*: stereochemical aspects of the two isomers of reserpiline hydrochloride. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 27, p. 935-940, 1989.

Cai, X., Zhang, B., Bao, M. Preparation of the aspidospermine dimer with antitumor activity. Kunming Institute of Botany, **Chinese Academy of Sciences**. CN 2017-10290970. 2017 (Patente).

Castello, A.C.D.; Pereira, A.S.S.; Simões, A.O.; Koch, I. Aspidosperma in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB33616>>. Acesso em: 06 Jun. 2019

Chierrito, T.P. C., Aguiar, A.C.C., Andrade, I.M., Ceravolo, I.P., Goncalves, R.A. C., Oliveira, A.J., B., Krettli, A.U. Anti-malarial activity of indole alkaloids isolated from *Aspidosperma olivaceum*. **Malaria Journal**. 13:142. 10p. 2014.

Coutinho, J.P., Aguiar, A.C.C., Santos, P.A., Lima, J.C., Rocha, M.G.L., Zani, C.L., Alves, T.M.A., Santana, A.E.G., Pereira, M.M., Krettli, A.U. *Aspidosperma* (Apocynaceae) plant cytotoxicity and activity towards malária parasites. Part I: *Aspidosperma nitidum* (Benth) used as a remedy to treat fever and malaria in the Amazon. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 108, n. 8, p. 974-982, 2013.

Croteau, R., Kutchan, T. M., Lewis, N.G. Natural Products (Secondary Metabolites) in Biochemistry & amp. **Molecular Biology of Plants**. Chapter 24. Buchanan, B., Gruissem

W., Jones,R. Eds. American Society of Plant Physiologists, 2000

Cunha, A.C., Chierrito, T.P.C., Machado, G.M.C., Leon, L.L.P., Silva, C.C., Tanaka, J.C., Souza, L.M., Gonçalves, R.A.C., Oliveira, A.J.B. Anti-leishmanial activity of alkaloidal extracts obtained from different organs of *Aspidosperma ramiflorum*. **Phytomedicine**, v. 19, n. 5, p. 413– 417, 2012.

Dewick, P. Medicinal Natural Products- A biosynthetic Approach, 2nd John Wiley & amp; Sons. New York, 2002

Dwivedi, G.R ., Grupta, S., Maurya, A., Tripathi., S., Sharma, a., Darokar, M.P., Srivastava, S.K. Synergy Potential of Indole Alkaloids and its derivative against drug-resistant *Escherichia coli*. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 86, n. 6, p.1471-1481, 2015.

Endress, M.E. Apocynaceae: Brown and now. **Telopea**, v. 10, p. 525–541, 2004.

Endress, M.E., Liede-Schumann, S., Meve, U. An updated classification for Apocynaceae. **Phytotaxa**, v. 159, n.3, p. 175–194, 2014.

França, T.C.C., Santos, M.G., Figueroa-Villar, J.D. Malária: aspectos históricos e quimioterapia. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1271-1278, 2008.

- Franco, L.L., Gomes, P.R., Vale, M.S., Almeida, M.V. Síntese de tetraoxanos, candidatos a antimaláricos. **Sociedade Brasileira de Química (SBQ)**, 32^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2009.
- Frasson, A.P., Barlette, A.G., Dalpizolo, C., Sauter, I. P., Macedo, A. J., Tasca, T. Estratégias e desafios no combate à malária. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 10, p. 201-208, 2009.
- Frederich M., Jacquier, M.J., Thepenier, P., De Mol, P., Tits, M., Philippe, G., Delaude, C., Angenot, L., Zeches-Hanrot, M. Antiplasmodial activity of alkaloids from various *Strychnos* species. **Journal of Natural Products**. v. 65, p. 1381–1386. 2002.
- Galarreta, B.C., Sifuentes, R., Carrillo, A.K., Sanchez, L., Amado, M.R.I., Maruenda, H. The use of natural product scaffolds as leads in the search for trypanothione reductase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 14, p. 6689–6695. 2008.
- Granato, D., Nunes, D.S., Mattos, P.P., Rios, E.M., Glinski, A., Rodrigues, L.C., Júnior, G.Z. Chemical and biological evaluation of rejects from the wood industry. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 48, p. 237-241, 2005.
- Hall, J.C., Sylvie, B. Flavopereirine and alstonine combinations in the treatment and prevention of prostate cancer. **Natural Source International**, USA. WO 2005112964. 2005 (Patente).
- Henrique, M.C. Estudo sobre a composição química e atividade biológica das cascas de *Aspidosperma desmanthun* e *A. vargasii* (Apocinaceae). **Dissertação**. UFAM/ICE, Manaus, 241 f, 2007.
- Henrique, M.C., Nunomura, S.M., Pohlit, A.M. Alcaloides indólicos de cascas de *Aspidosperma vargasii* e *A. desmanthum*. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 284-287, 2010.
- Hidenobu, T., Takaomi, S., Takeshi, M., Masashi, T., Toru, N., Tomoyuki, T., Masayo, Y., Tokihito, Y. Inhibition of $\alpha 2C$ -adrenoceptors ameliorates cisplatin-induced acute renal failure in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 838, p. 113–119. 2018.
- Hoye, T.R., Hanson, P.R., Vyvyan, J.R. A Practical Guide to First-Order Multiplet Analysis in ¹H NMR. **The Journal of Organic Chemistry**. v. 59, p. 4096-4103, 1994.
- Horst, H. nvestigação fitoquímica e biológica da espécie: *Esenbeckia leiocarpa* Engl. **Tese** (doutorado) PPQG/UFSC. São Carlos. 2012.
- Itoh, T., Hatae, N., Nishiyama, T., Choshi, T., Hibino, S., Yoshimura, T., Ishikura, M. Synthesis and cytotoxicity of pyrido[4,3-b]carbazole alkaloids against HCT-116 and HL-60 cells. **Medicinal Chemistry Research**, v. 27, n. 2, p. 412-419. 2018.
- Jordão, L., G. Atividade antimalárica *in vitro* de extratos, frações e substâncias isoladas de duas espécies vegetais da Amazônia. **Dissertação** (Mestrado) – PPGBiotec/UFAM, Manaus, 62 f, 2018.
- Kreps, F., Burcova, Z., Jablonsky, M., Haz, A., Frecer, V., Kyselka, J., Schmidt, S., Surina, I., Filip, V. Bioresource of Antioxidant and Potential Medicinal Compounds from Waste Biomass of Spruce. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 5, n. 9, p. 8161-8170, 2017.
- Le Men, J.; Taylor, W.I. A uniforme numbering system for indole alkaloids. **Cellular and Molecular Life Sciences**. p. 508-10, 1965.

Lee, K.S., Cox-Singh J., Singh B. Morphological features and differential counts of *Plasmodium knowlesi* parasites in naturally acquired human infections. **Malaria Journal**, v. 21, 10p, 2009.

Li, L., Aibibula, P., Jia, Q., Jia, y. Total Syntheses of Naucleamides A–C and E, Geissoschizine, Geissoschizol, (*E*)-Isositsirikine, and 16-*epi*-(*E*)-Isositsirikine. **American Chemical Society**. v. 19, n. 10, p. 2642-2645, 2017.

Linck, V.M., Ganzella, M., Herrmann, A.P., Okunji, C.O., Souza, D.O., Antonelli, M.C., Elisabetsky, E. Original mechanisms of antipsychotic action by the indole alkaloid alstonine (*Picralima nitida*). **Phytomedicine**, v. 22, n. 1, p. 52-55. 2015.

Liu, Y., Wang, Q., Zhang, Y., Huang, J., Nie, L., Chen, J., Cao, W., Wu, X. Enantioselective synthesis of indoloquinolizidines via asymmetric catalytic hydrogenation/lactamization of imino diesters. **The Journal of Organic Chemistry**, 2013.

Lousnasmaa, M., Jokela, R., W, Hanhinen, P., Miettinen, J., Salo., J. Preparation and Conformational Study of Z- and E-Isositsirikine Epimers and Model Compounds. Determination of their C-16 Configurations. **Tetrahedron**, v. 50, n. 30, p. 9207- 9222. 1994.

Maes, D., Maes, R. *Aspidosperma subincanum* II. Usefulness of uleine and ribonucleic fragments in the treatment of AIDS patients. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 1, p. 42–46. 2015.

Manske, B. D. XIII: The Indole Alkaloids. Academic. **Angewandte Chemie**, v.79, p. 159, 1965.

Manzali, S.I., A resistência à cloroquina e a busca de antimalariais entre as décadas de 1960 e 1980. **História, Ciências, Saúde – Manguinhos**. RJ, v.18, n.2, p.407-430, 2011.

Mitaine, A.C., Weniger B., Sauvain M., Lucumi E., Aragón R., Zèches-Hanrot M. Indole alkaloid from the trunk bark of *Aspidosperma megalocarpon*. **Planta Medica**, v. 64, n. 5, p. 487, 1998.

Mohammed, H. S., Khadrawy, Y.A., El-Sherbini. T.M., Amer, H.M. Electrochemical and biochemical evaluation of antidepressant efficacy of formulated nanocurcumin. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p.1-17, 2018.

Mustarichie, R., Warya, S., Moektiwardoyo, M., Megantara, S., Saputri, F. A. Docking, absorption, distribution, metabolism and toxicity prediction of anticancer compounds found in plants. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.3, n. 10, p.72-90, 2014.

Nascimento, M.S., Pina, N.P.V., Silva, A.S.B., Gomes, L.F.S., Vasconcellos, F., Brandão, G.C., Nazar, N., Goyder, D.J., Clarkson, J.J., Mahmood, T., Chase, T.K.W. The taxonomy and systematics of Apocynaceae: where we stand in 2012. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.171, n. 3, p. 482–490, 2013.

Nascimento, M.F.A., Oliveira, A.B., Barbosa, W.L.R. In vitro antiplasmodial activity and identification, using tandem LC-MS, of alkaloids from *Aspidosperma excelsum*, a plant used to treat malaria in Amazonia. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 228, p. 99–109, 2019.

Oliveira, A. A., França, T.C.C. Lactato desidrogenase como alvo molecular para quimioterapia antimalarial. **Revista Militar de Ciência e Tecnologia**, n. 28, p. 24-39, 2011.

Oliveira, D.R., Krettli, A.U., Aguiar, A.C.C., Leitão, G.G., Vieira, M.N., Martins, K.S., Leitão, S.G. Ethnopharmacological evaluation of medicinal plants used against malaria by quilombola communities from Oriximiná, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 173, p. 424–434, 2015.

Oliveira, V.B., Freitas, M.S.M.; Mathias, L.; Braz-Filho, R.; Vieira, I.J.C. Atividade biológica e alcalóides indólicos do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. .v. 11, n.1, p.92-99, 2009.

Orlowski, M. Sellin, L. Coating for balloon catheter comprising active antiproliferative, antiinflammatory and/or antifungal agents. Cardionovum GmbH, Germany. WO 2014008875A1, 2014. (**Patente**).

Passemar, C., Saléry, M., Soh, P.N., Linas, M.D., Ahond, A., Poupat, C., Benoit-Vical, C. Indole and aminoimidazole moieties appear as key structural units in antiplasmodial molecules. **Phytomedicine**, v. 18, n. 13, p. 1118– 1125, 2011.

Paula, R. C., Dolabela, M. F., Oliveira, A. B. *Aspidosperma* Species as Sources of Antimalarials. Part III. A Review of Traditional Use and Antimalarial Activity. **Planta Medica**. v. 80: 378–386. . 2014.

Pereira, M.M., Jácome, R.L.R.P., Alcântara, A.D.C., Alves, R.B., Raslan, D.S. Alcaloides indólicos isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae). **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 970-983, 2007.

Pio Corrêa, C.M. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. **Imprensa Nacional**, Rio de Janeiro, 1926.

Pohlit, A.M., Lima, R.B.S., Frausin, G., Silva, L.F.R., Lopes, S.C.P., Moraes, C.B., & Costa, F.T.M. Amazonian Plant Natural Products: Perspectives for Discovery of New Antimalarial Drug Leads. **Molecules**, v.18, n. 8, p. 9219-9240, 2013.

Quignard, E. L. J., Pohlit, A. M., Nunomura, S. M., Pinto, A. C. D. S., Santos, E. V. M. D., Moraes, S. K. R. D., & Gomes, E. D. O. Screening of plants found in Amazonas state for lethality towards brine shrimp. **Acta Amazonica**, v. 33, n. 1, p. 93-104, 2003.

Rapini, A. Taxonomy “under construction”: advances in the systematics of Apocynaceae, with emphasis on the Brazilian Asclepiadoideae. **Rodriguésia**, v.63, n 1, p.075-088, 2012.

Reflora - Herbário Virtual. Disponível em: <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/herbarioVirtual/> Acesso em 6/01/2019.

Robert, G.M.T., Ahond, A., Poupat, C., Potier, P., Jolles, C., Jousselin, A., & Jacquemin, H. *Aspidosperma* de Guyane: alcaloides de *Aspidosperma excelsum*. **Journal of Natural Products**, v. 46, n. 5, p. 694-707, 1983.

Rocha e Silva, L. F. Identificação de potenciais novos antimaláricos a partir de produtos naturais de plantas amazônicas, e seus derivados: estudos in vitro, in vivo e de mecanismo de ação. **Tese** (Doutorado) - UFAM/PMPB, Manaus, 165 f, 2014.

Rocha e Silva, L.F., Montóia, A., R.C.N. Amorim, R.C.N., Melo, M.R., Henrique, M.C Nunomura, S.M., Costa, M.R.F., Andrade Neto, V.F., Costa, D.S., Dantas, G., Lavrado, J. Moreira, R., Paulo, A.P., Pinto, A.C., Tadei, W.P., Zacardi, R.S., Eberlin, M.M., Pohlitz, A.M. Comparative *in vitro* and *in vivo* antimalarial activity of the indole alkaloids ellipticine, olivacine, cryptolepine and a synthetic cryptolepine analog. **Phytomedicine**, v. 20, p. 71-76, 2012.

Ruiz, L., Ruiz, L., Maco, M., Cobos, M., Choquevilca, A.L.G., Roumy, V. Plants used by native Amazonian groups from the Nanay River (Peru) treatment of malaria. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 917–921, 2011.

Rieckmann k. h.; Sax L. J.; Campbell G. H.; Mrema J. E. Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*. An *in vitro* microtechnique. **The Lancet**, v. 1, p. 22-23. 1978.

Schmidt, U., Theumer, G., Jäger, A., Kataeva, O., Wan, B., Franzblau, S.G., Knölker, H.J. Synthesis and activity against *Mycobacterium tuberculosis* of olivacine and oxygenated derivatives. **Molecules**, v. 23, n. 6, 16p. 2018.

Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Mello, J., Mentz, I.A. Petrovick, P.R. Farmacognosia: Do Produto Natural ao Medicamento. **Artmed. Editora**, 2002.

Srivastava, S.K., Agrawal, A.K., Singh, S.C., Khanna, V.K., Janardan Singh, S., Nath, C., Gupta, M.M., Gupta, S., Verma, R.K., Pal, A., Bawankule, D.U., Saikia, D., Gupta, A. K., Maurya, A., Khanuja, S.P.S. Antipsychotic agents and standardized antipsychotic fractions from *Rauwolfia tetraphylla* and process of their isolation. U.S. n. 9,018,226, 28 Abr 2015 (**Patente**).

Suffness, M. Pezzuto, J.M. Assay related to cancer drug discovery. In: Hostettman K. (ed.) **Methods in plant biochemistry: assay for bioactivity**. London: Academic Press. v. 6, p. 71-133, 1990.

Sutherland, C., Tanomsing N., Nolder D., Oguike M., Jennison C., Pukrittayakamee S., Dolecek C., Hien T.T., do Rosário V.E., Arez A.P., Pinto J., Michon P., Escalante A., Nosten F., Burke M., Lee R., Blaze M., Otto T.D., Barnwell J., Pain A., Williams J., White N.J., Day N.P.J., Snounou G., Lockhart P.J., Chiodini P.L., Imwong M., Polley S.D. Two non-recombining sympatric forms of the human malaria parasite *Plasmodium ovale* occur globally. **Journal of Infectious Diseases**, v. 201, n.10, p. 1544-1550, 2010.

Ta T.H., Hisam, S., Lanza, M., Jiram, A., Ismail, N., Rubio, J.M. First case of a naturally acquired human infection with *Plasmodium cynomolgi*. **Malária Journal**, v. 13, n. 1, p. 68-74, 2014.

Tang, B.O., Wang, W.J., Huang, X.J., Li, G.Q., Wang, L., Jiang, R.W. Yang, T.T., Shi, L., Zhang, X.Q., Ye, W.C. Iboga-Type Alkaloids from *Ervatamia ficinalis*. **Journal of Natural Products**. v. 77, n. 8, p. 1839-46, 2014.

Trager, W., & Jensen, J. B. Human malaria parasites in continuous culture. **Science**, v. 193, n. 4254, p.673-675, 1976.

Vale, N., Moreira, R., Gomes, P. Quimioterapia da malária um século no desenvolvimento de antimaláricos. **Química Nova**, v. 99, p. 57-69, 2005.

Valente, L.M.N., Alves, F.F., Bezerra, G.M., Almeida, M.B.S., Rosário, S.L., José L. Mazzei, J.L., D'Avila, L.A., Siani, A.C. Desenvolvimento e aplicação de metodologia por cromatografia em camada delgada para determinação do perfil de alcaloides oxindólicos pentacíclicos nas espécies sul-americanas do gênero *Uncaria*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.16, n. 2, p.216-223, 2006.

Vásquez, S.P.F., Mendonça, M.S., Noda, S.N. Etnobotânica de plantas medicinais em comunidades ribeirinhas do Município de Manacapuru, Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**. v. 44, n. 4, p. 457 – 472, 2014:

Verpoorte, R., Kos-Kuijck, E., Tjin A Tsoi, A., Ruigrok, C.L.M., Jong, G., Svendsen, B. Medicinal plants of Surinam III. Antimicrobial active alkaloids from *Aspidosperma excelsum*. **Planta Medica**, v. 48, n. 4, p.283-289, 1983.

Verpoorte, R., Ruigrok, C.L.M., Svendsen, B. Medicinal plants of Surinam. II. Antimicrobial active alkaloids from *Aspidosperma excelsum*. **Planta Medica**, v. 46, n. 3, p. 149-152, 1982.

Vieira, M.V. Prospecção química e biológica de espécies de Carapanaúba (*Aspidosperma* spp.) empregadas por comunidades quilombolas de Oriximiná - PA. **Dissertação**. PPGF/UFRJ. 2011.

WHO. World Malária Report 2017. **Geneva**: 2017. 196 p. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259492/9789241565523-eng.pdf>>. Acessado em 25 de Abril de 2018.

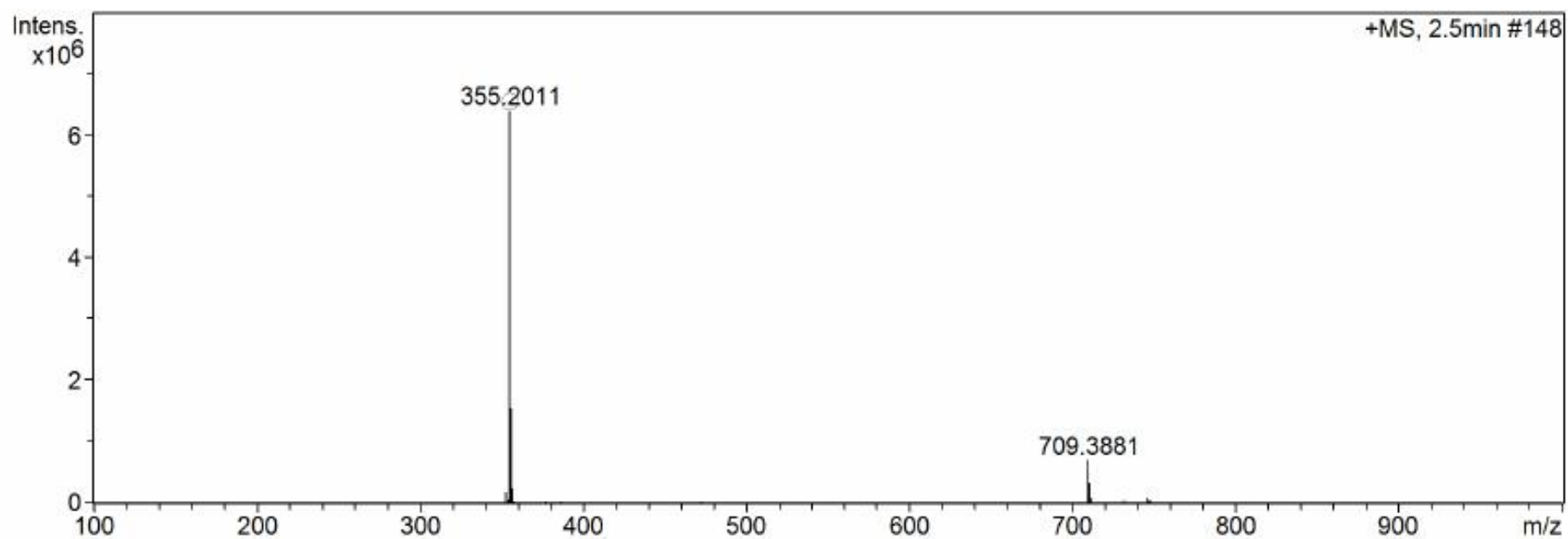
WHO. World Malária Report 2018. **Geneva** 2018.210 p. licence (CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/275867/9789241565653-eng.pdf>>. Acessado em 06 de Maio de 2019.

Woodson, R. E. Studies in the Apocynaceae. VIII. An Interim Revision of the Genus *Aspidosperma* Mart. & Zucc. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 38, n. 2, p. 119-206, 1951.

Yu, J., Ma, Y., Drisko, J., Chen, Q. Antitumor activities of *Rauwolfia vomitoria* extract and potentiation of carboplatin effects against ovarian cancer. **Current Therapeutic Research**, v.75, p.8-14, 2013

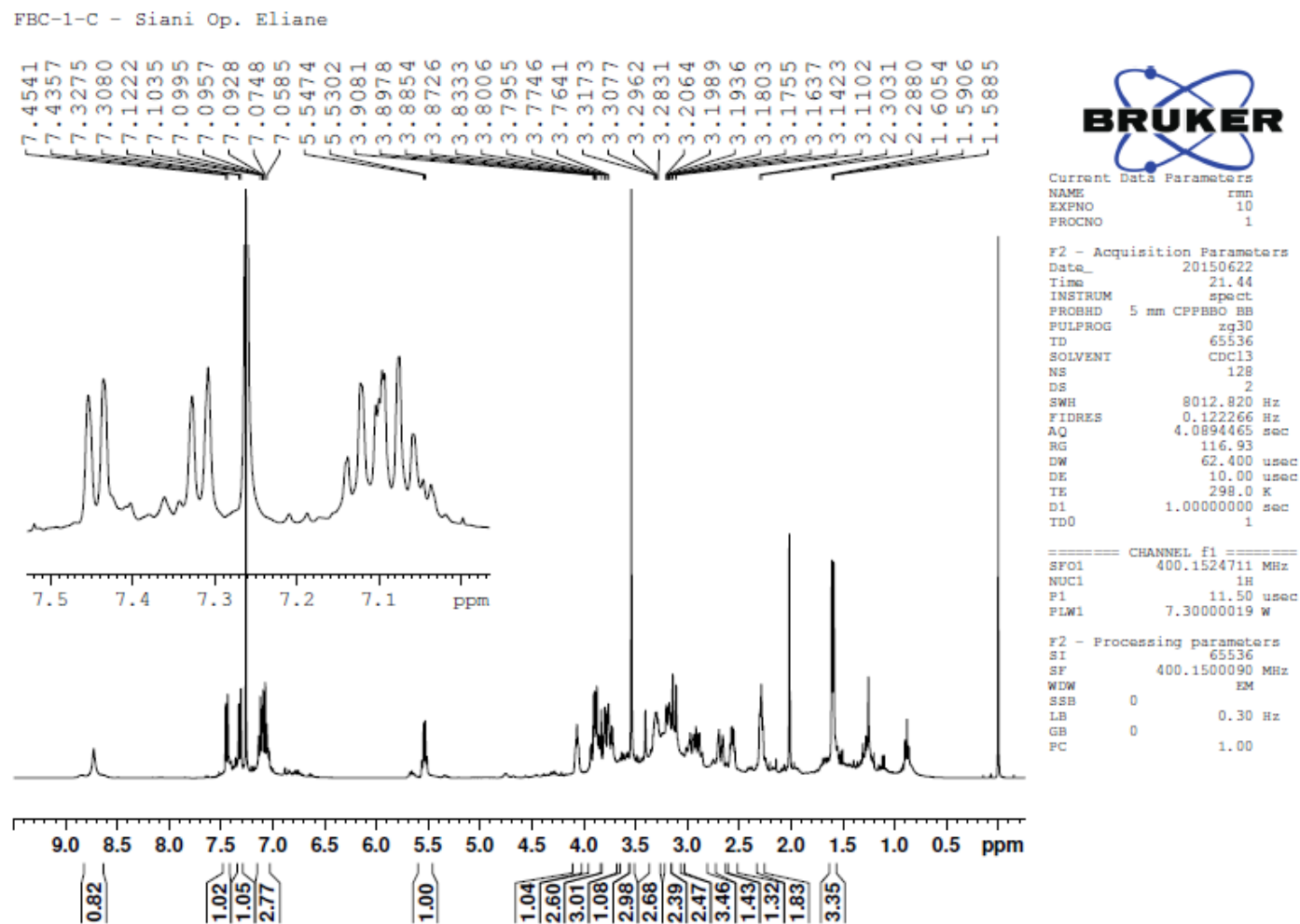
Anexos

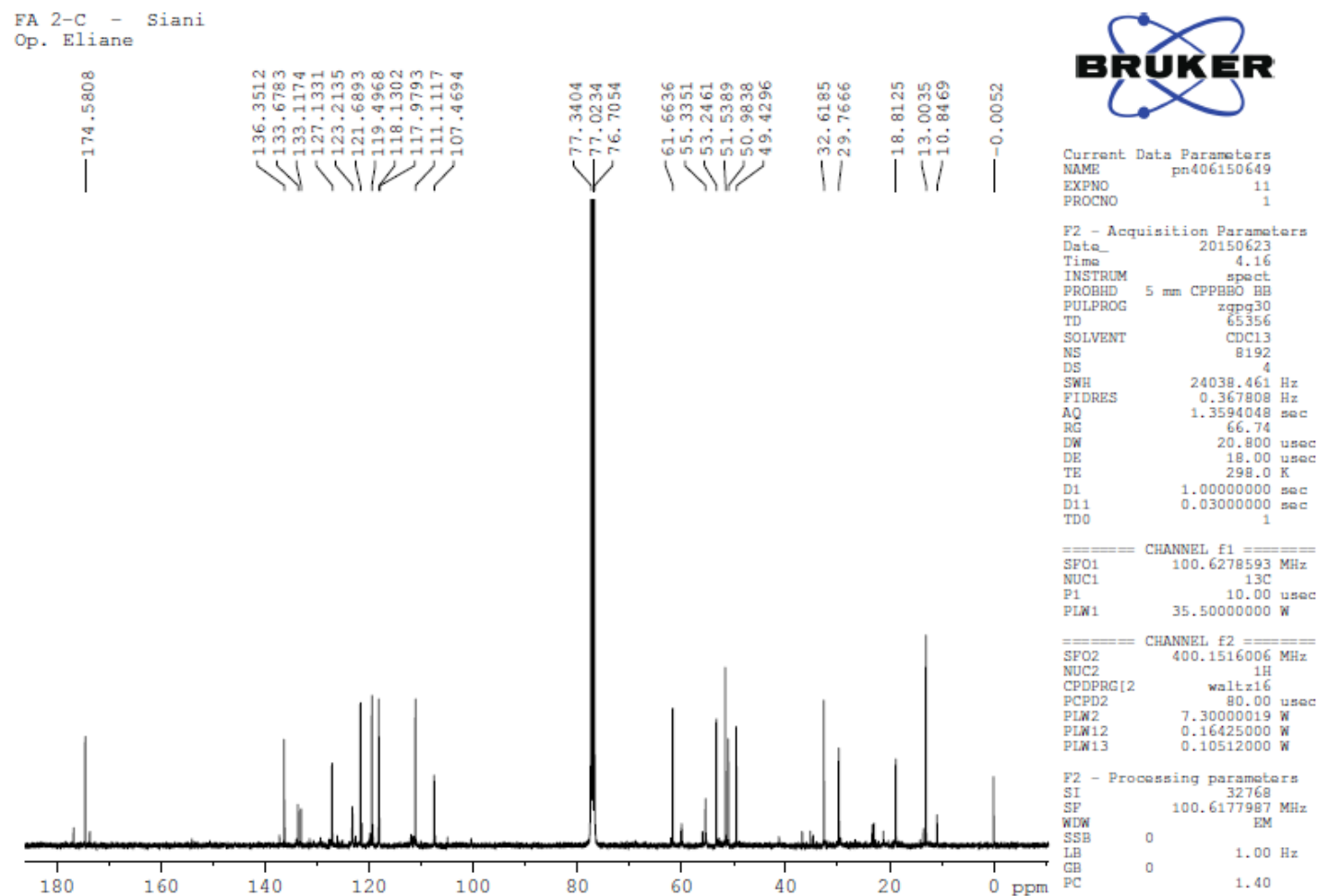
Anexo 1: Cromatograma de LC-HRMS da fração FBC-1-C

+MS, 2.5min #148

Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e ⁻	Conf	N-Rule
355.2011	1	C ₂₁ H ₂₇ N ₂ O ₃	355.2016	1.6	3.0	1	100.00	9.5	even		ok

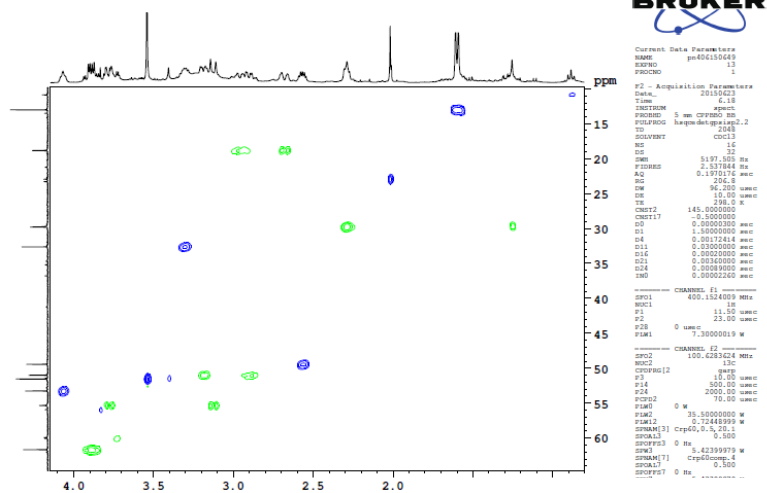
Anexo 2: Espectro de RMN de ^1H da Isositisriquina (FBC-1-C) em CDCl_3 (400 MHz).



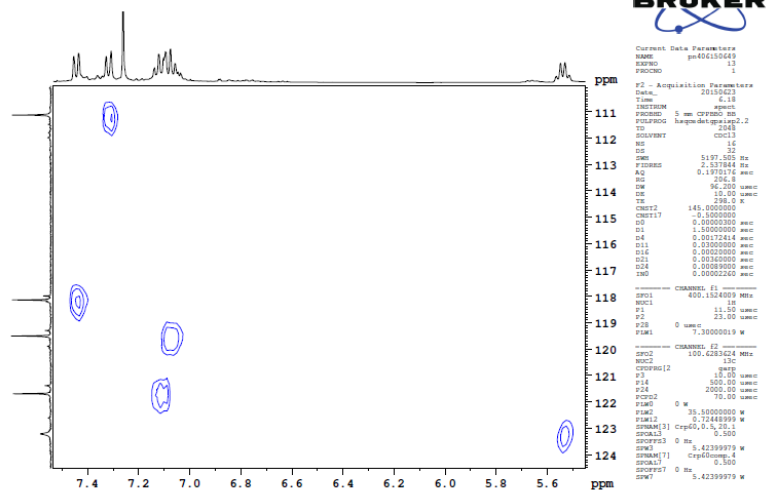
Anexo 3: Espectro de correlação ^{13}C carbono da Isositsiriquina (FBC-1-C) em CDCl_3 (400 MHz).

Anexo 4: Espectro de correlação ^1H - ^{13}C HSQC da Isositsiriquina (FBC-1-C) em CDCl_3 (400 MHz).

FA 2-C - Siani
Op. Eliane

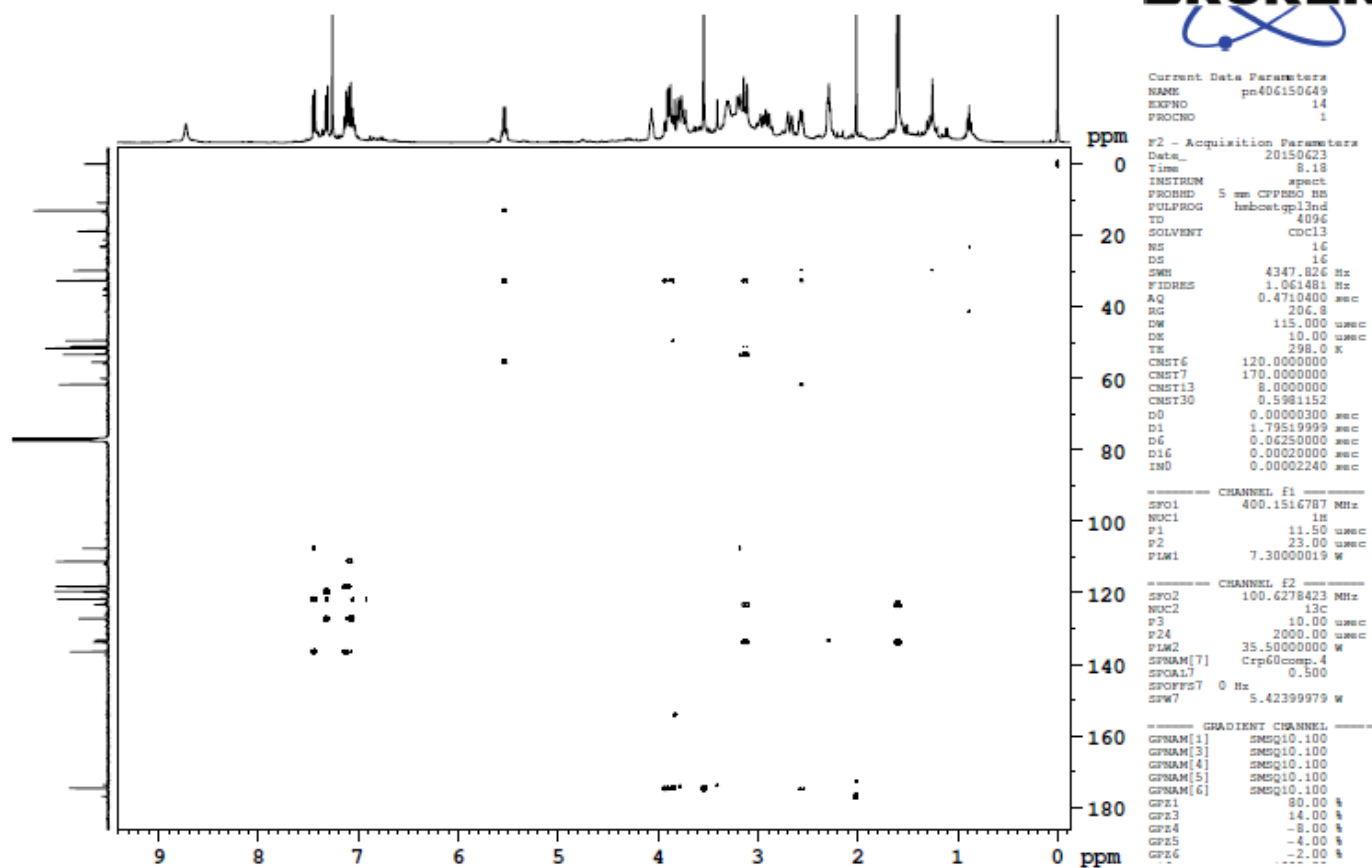


FA 2-C - Siani
Op. Eliane



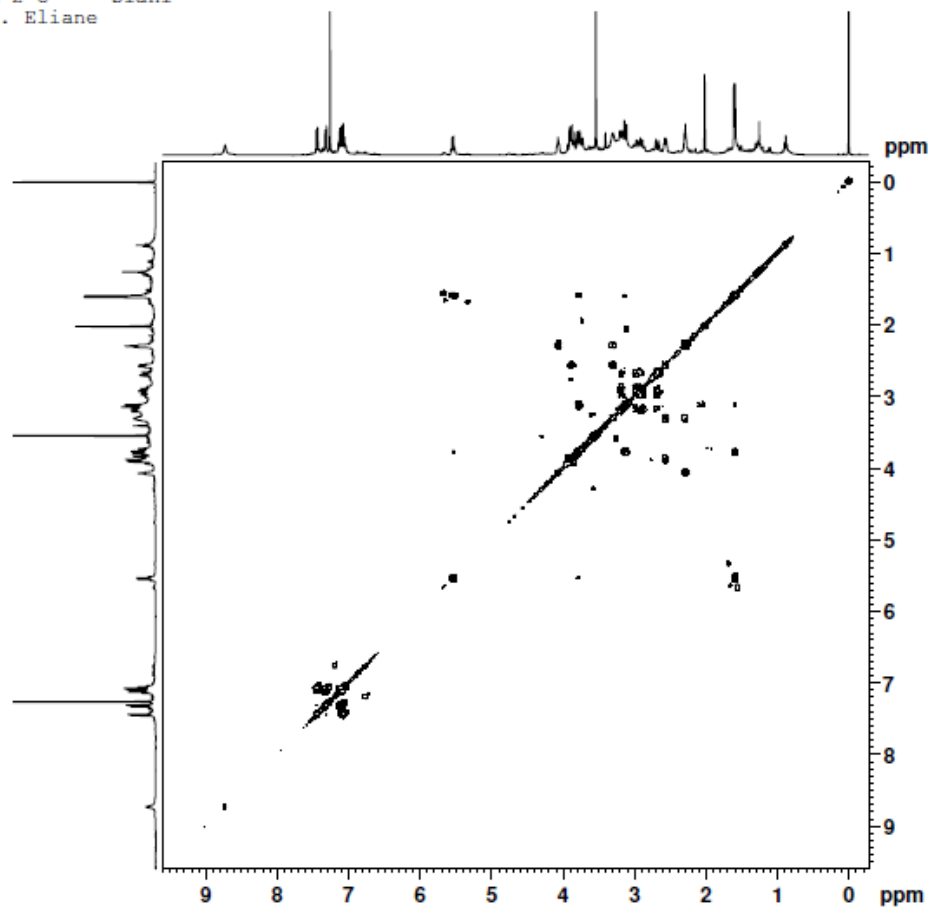
Anexo 5: Espectro de correlação ^1H - ^{13}C HMBC da Isositsiriquina (FBC-1-C) em CDCl_3 (400 MHz).

FA 2-C - Siani
Op. Eliane



Anexo 6: Espectro de correlação ^1H - ^1H COSY da Isositsiriquina (FBC-1-C) em CDCl_3 (400 MHz).

FA 2-C - Siani
Op. Eliane



```
Current Data Parameters
NAME      pn406150649
EXPNO     12
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20150623
Time      4.19
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm CPBPRD HS
PULPROG   cosyppqgF
TD         2048
SOLVENT   CDCl3
NS         16
DS         8
SWH        4347.826 Hz
FIDRES     2.122962 Hz
AQ         0.2355200 sec
RG         46.47
DM         115.000 usec
DE         10.00 usec
TE         298.0 K
D0         0.00000300 sec
D1         1.44743502 sec
D13        0.00000400 sec
D16        0.00020000 sec
DNO        0.00023000 sec

===== CHANNEL f1 =====
SFO1      400.1516787 MHz
NUC1       1H
P0        11.50 usec
P1        11.50 usec
PLW1      7.30000019 W

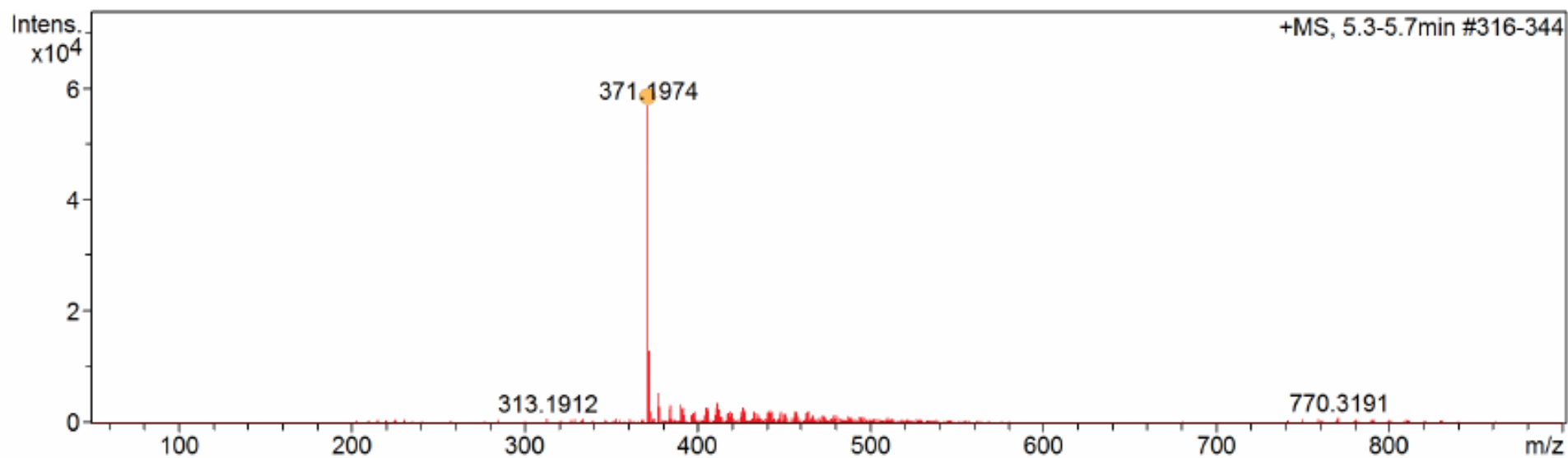
===== GRADIENT CHANNEL =====
GPNAM[1]  SMSQ10.100
GFE1      10.00 %
PIG        1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD         256
SFO1      400.1517 MHz
FIDRES     16.983696 Hz
SW         10.865 ppm
F0MODE     QF

F2 - Processing parameters
SI         2048
SF         400.1500884 MHz
WDW        QSINE
SSB        0
LB         0 Hz
GB         0
PC         0.60

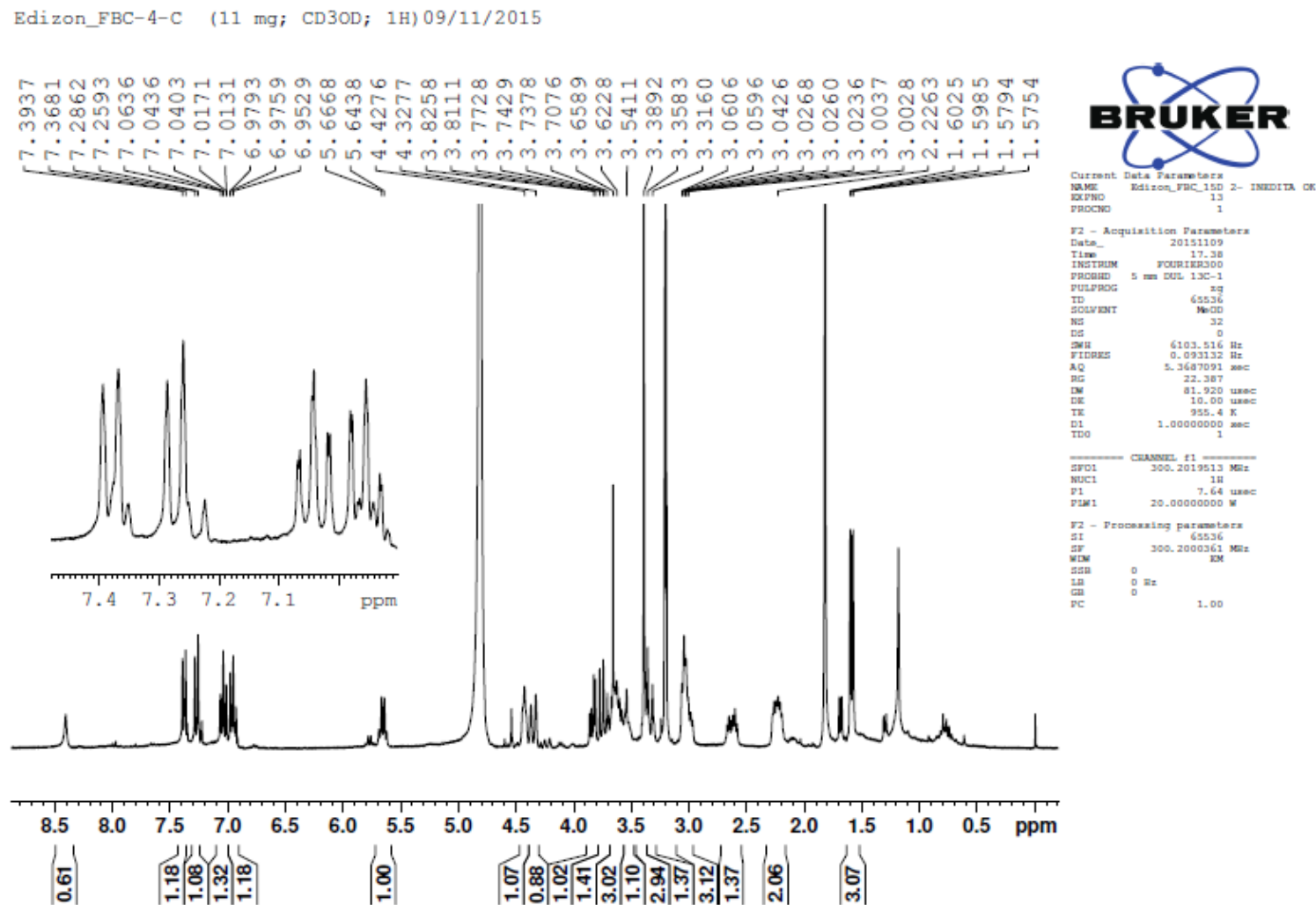
F1 - Processing parameters
SI         1024
MC2        QF
SF         400.1500103 MHz
WDW        QSINE
SSB        0
LB         0 Hz
GB         0
```

Anexo 7: Cromatograma de LC-HRMS da fração FBC-4-C



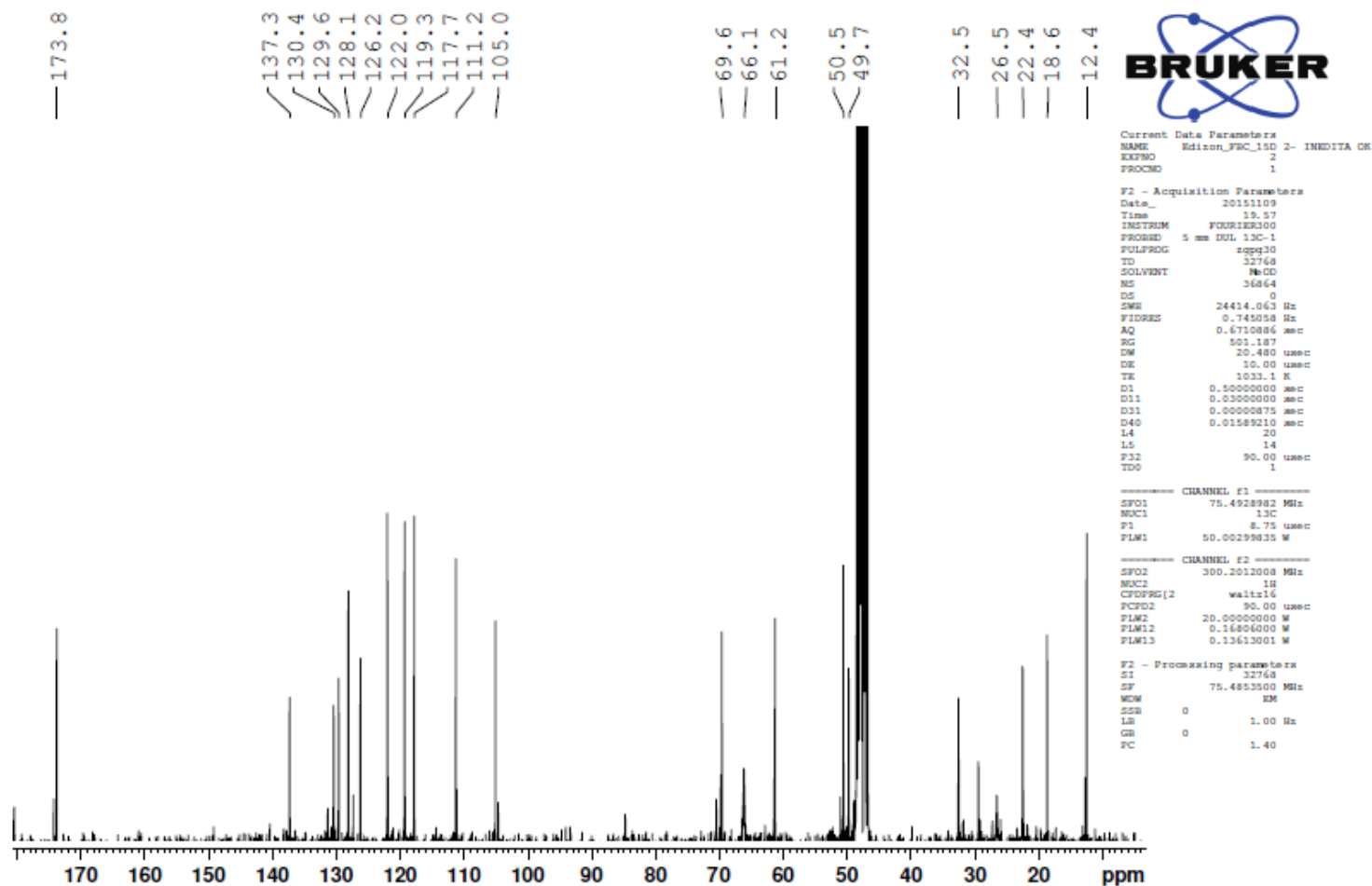
Meas. m/z	#	Ion Formula	Adduct	m/z	err [ppm]	mSigma	Score
371.1974	1	C ₂₁ H ₂₇ N ₂ O ₄	M+H	371.1965	-2.4	6.3	100.00
	2	C ₁₇ H ₂₃ N ₈ O ₂	M+H	371.1938	-9.7	8.0	10.87
	3	C ₂₂ H ₂₃ N ₆	M+H	371.1979	1.2	19.8	97.34
	4	C ₂₆ H ₂₇ O ₂	M+H	371.2006	8.4	33.2	10.18

Anexo 8: Espectro de RMN de ^1H da *N*-óxido-15*S*, 16*S*-*E*-isositsiriquina (**115**). (FBC-4-C) em CDCl_3 (300 MHz).



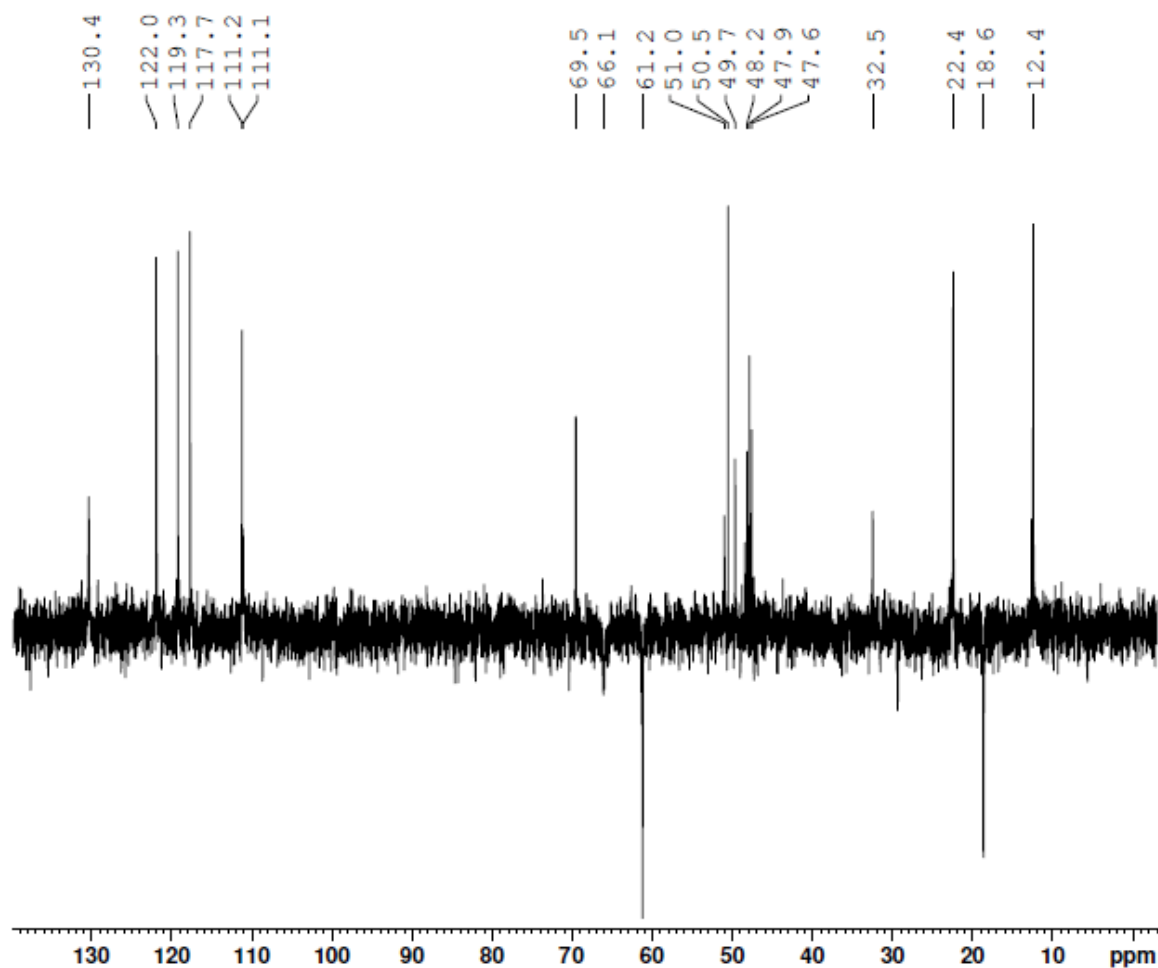
Anexo 9: Espectro de correlação ^{13}C carbono da *N*-óxido-15*S*, 16*S*-*E*-isositsiriquina (**115**) (FBC-4-C) em CDCl_3 (300 MHz).

Edizon_FBC-4-C (11 mg; CD_3OD ; ^{13}C) 09/11/2015



Anexo 10: Espectro de DEPT 135 da *N*-óxido-15*S*, 16*S*-*E*-isositsiriquina (**115**). (FBC-4-C) em CDCl₃ (300 MHz).

Edizon_FBC-4-C (11 mg; CD3OD; DEPT 135)06/11/2015



Current Data Parameters
NAME Edizon_FBC_150 2- INEDITA OK
EXPNO 4
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters

Date_ 20151106
Time 15.13
INSTRUM FOURIER300
PROBHD 5 mm DUL 13C-1
PULPROG zgpg30
TD 65536
SOLVENT MeOD
NS 2048
DS 8
SWH 24414.063 Hz
FIDRES 0.372529 Hz
AQ 1.3421773 sec
RG 501.187
RW 20.480 usec
DE 10.00 usec
TE 1025.4 K
CNS12 145.0000000
D1 2.00000000 sec
D2 0.00344028 sec
D14 0.00001114 sec
D33 0.00000825 sec
D34 0.00344053 sec
D35 0.00345340 sec
L4 40
P32 90.00 usec
TD0 1

CHANNEL f1

SFO1 75.4913881 MHz
NUC1 13C
P1 8.75 usec
P2 17.50 usec
P1M1 50.00299835 W

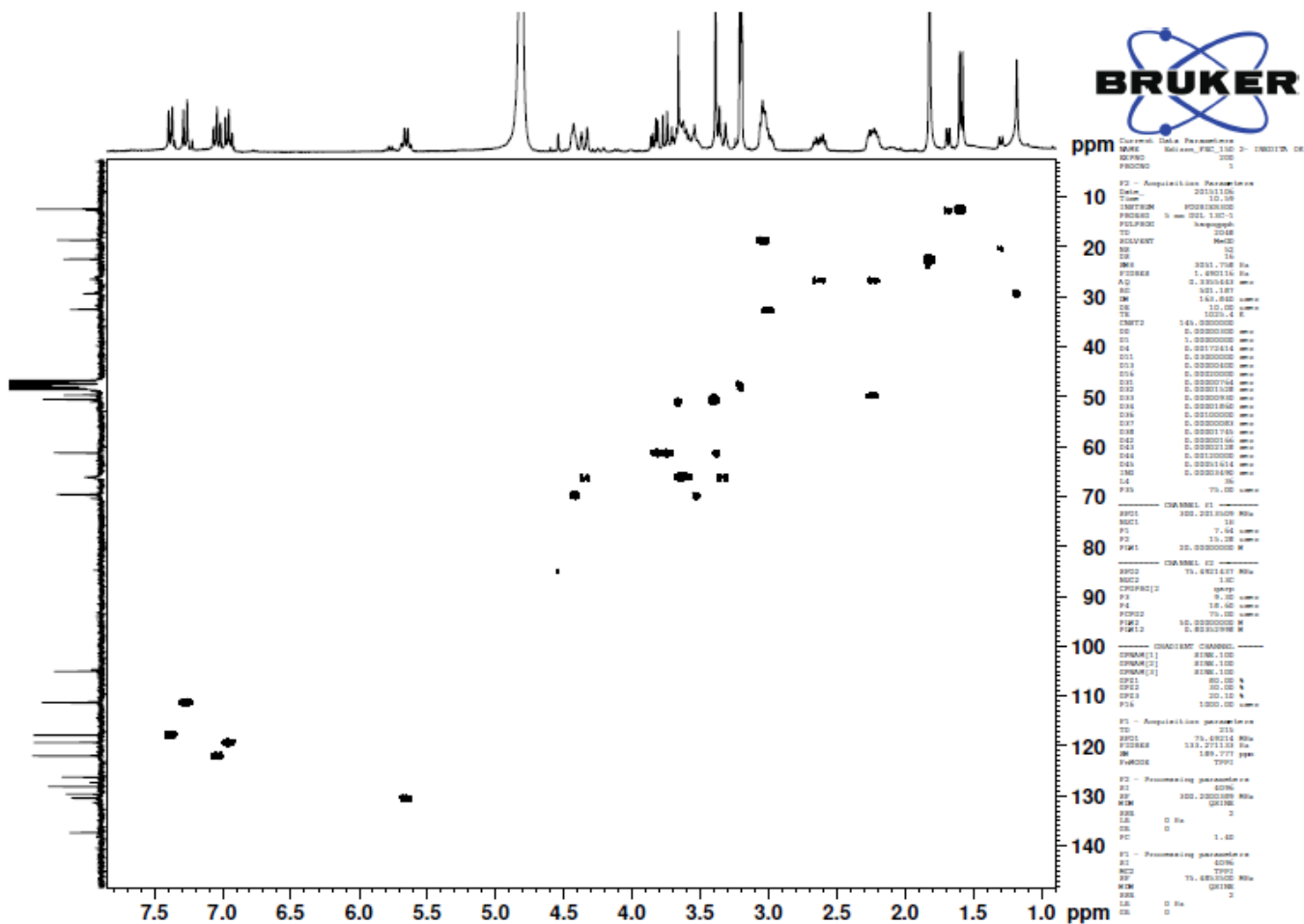
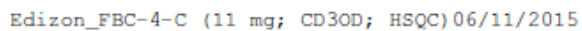
CHANNEL f2

SFO2 300.2009601 MHz
NUC2 1H
CPCPRG12 waltz16
P3 8.25 usec
P4 16.50 usec
PCPD2 90.00 usec
P1M2 20.00000000 W
P1M12 0.16806000 W

F2 - Processing parameters

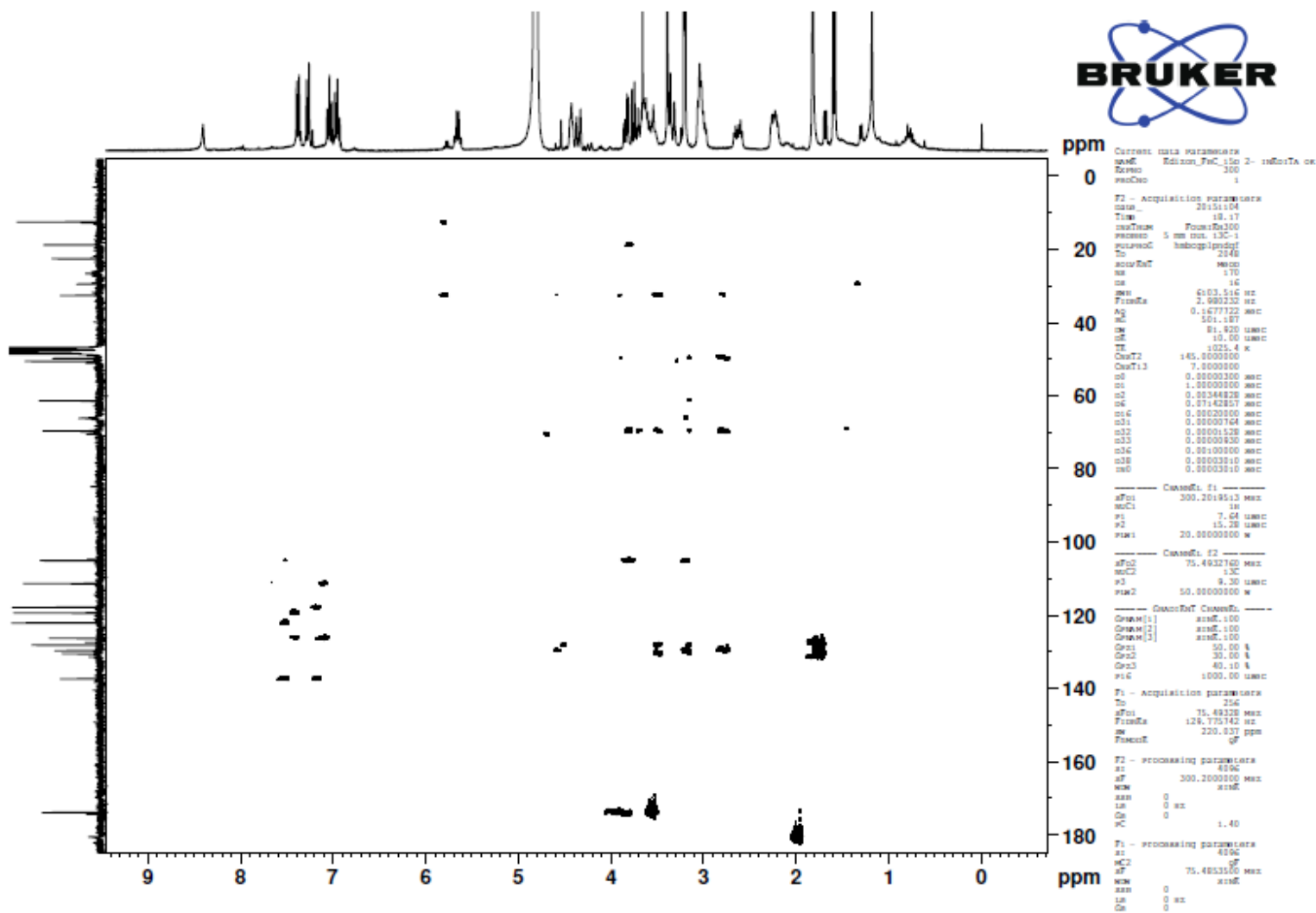
SF 32768
SF 75.4853500 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

Anexo 11: Espectro de correlação ^1H - ^{13}C HSQC da *N*-óxido-15*S*, 16*S*-*E*-isositsiriquina (**115**). (FBC-4-C) em CDCl_3 (300 MHz).

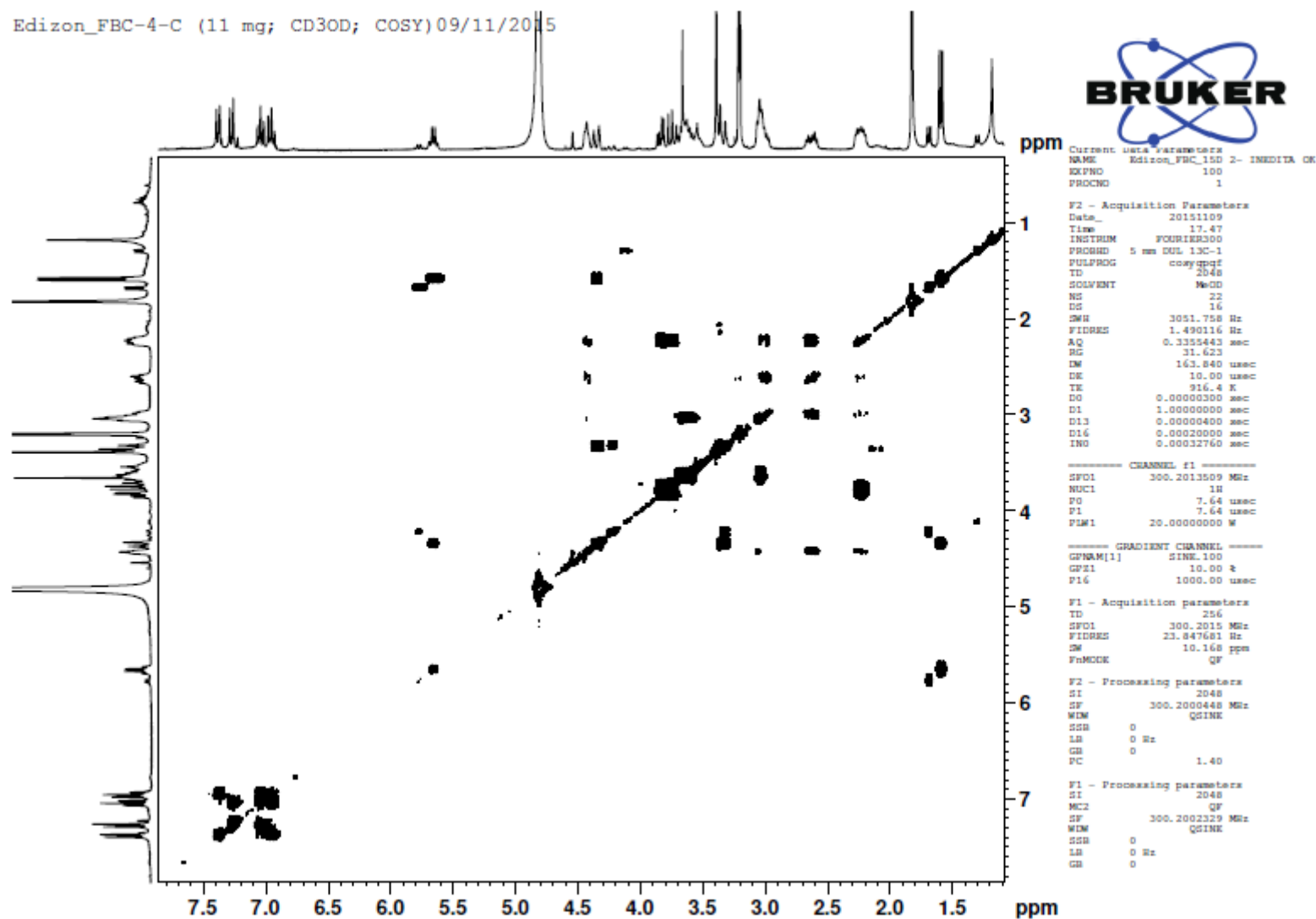


Anexo 12: Espectro de correlação ^1H - ^{13}C HMBC da *N*-óxido-15*S*, 16*S*-*E*-isositsiriquina (**115**). (FBC-4-C) em CDCl_3 (300 MHz).

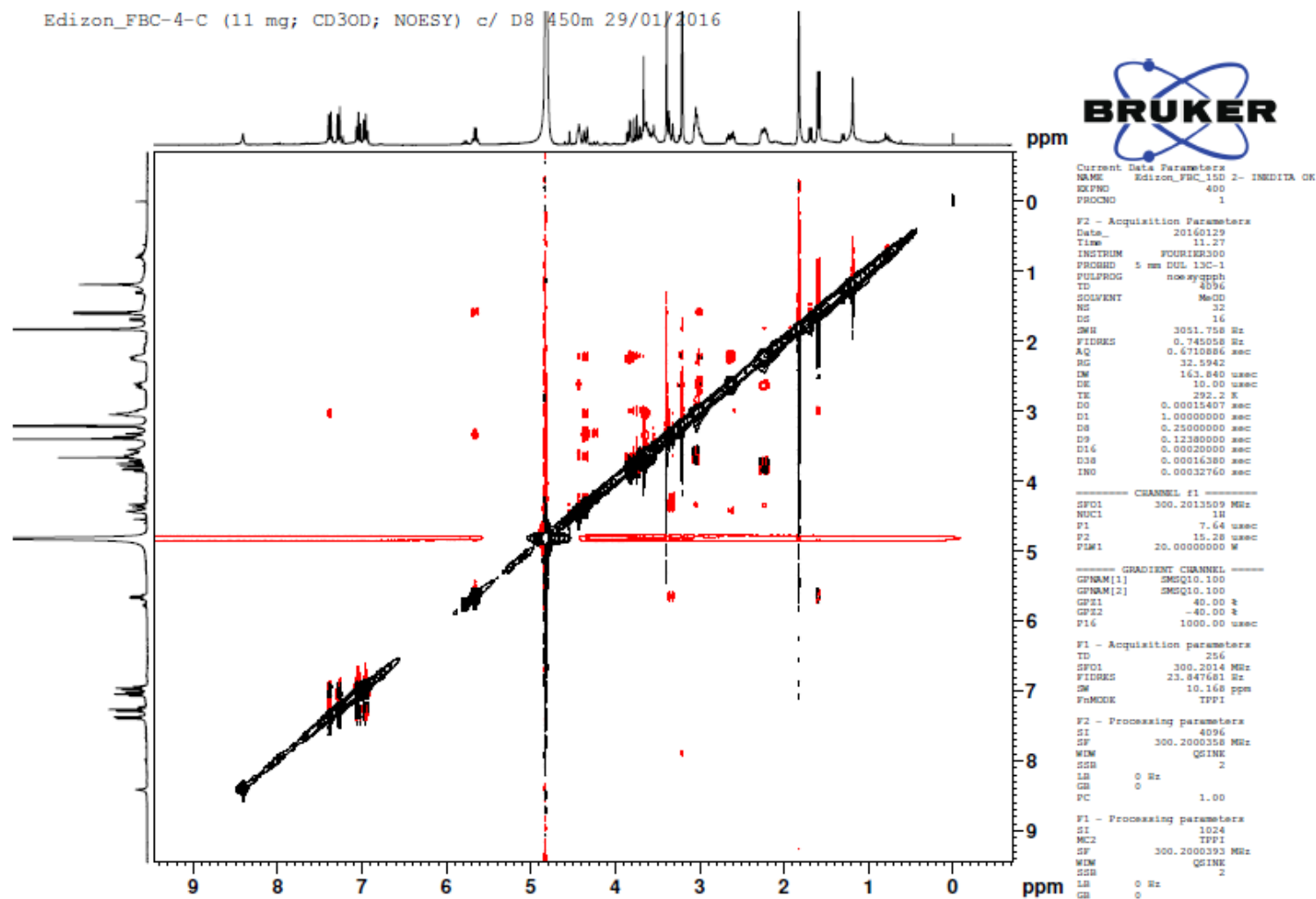
Edizon_FBC-4-C(CD3OD, 11mg, HMBC)Em 04/11/2015



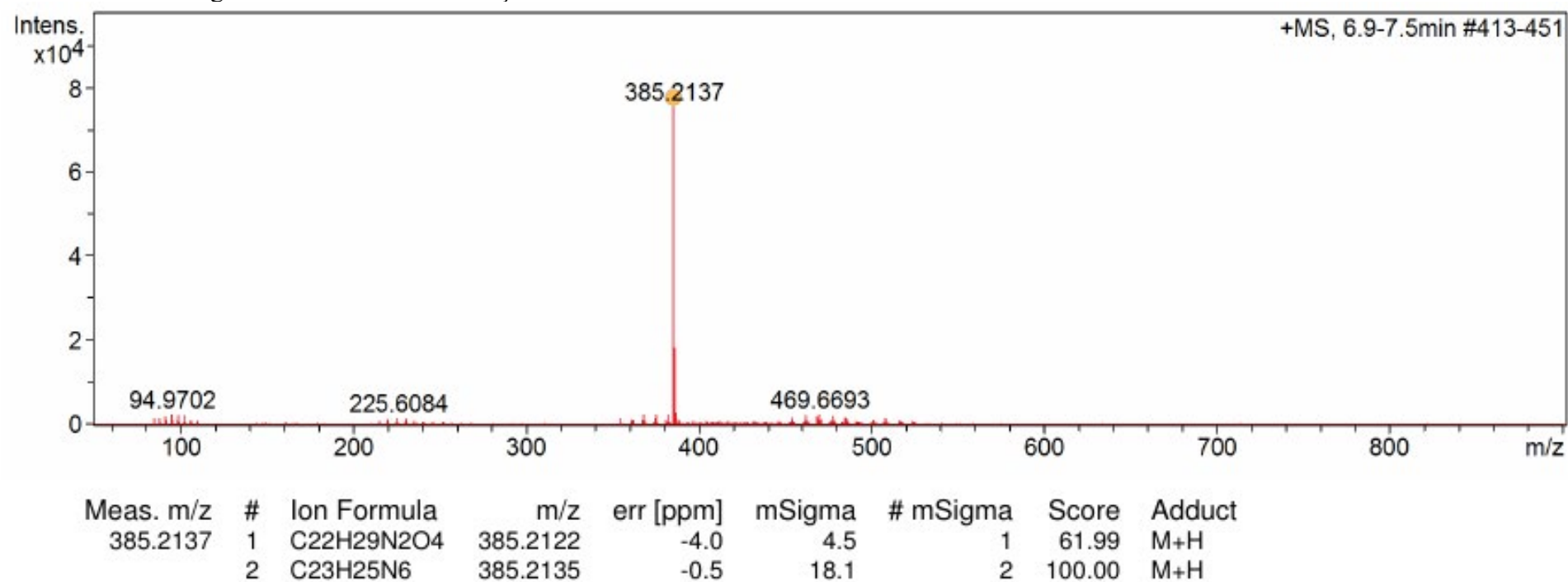
Anexo 13: Espectro de correlação ^1H - ^1H COSY da *N*-óxido-15*S*, 16*S*-*E*-isositsiriquina (**115**). (FBC-4-C) em CDCl_3 (300 MHz).



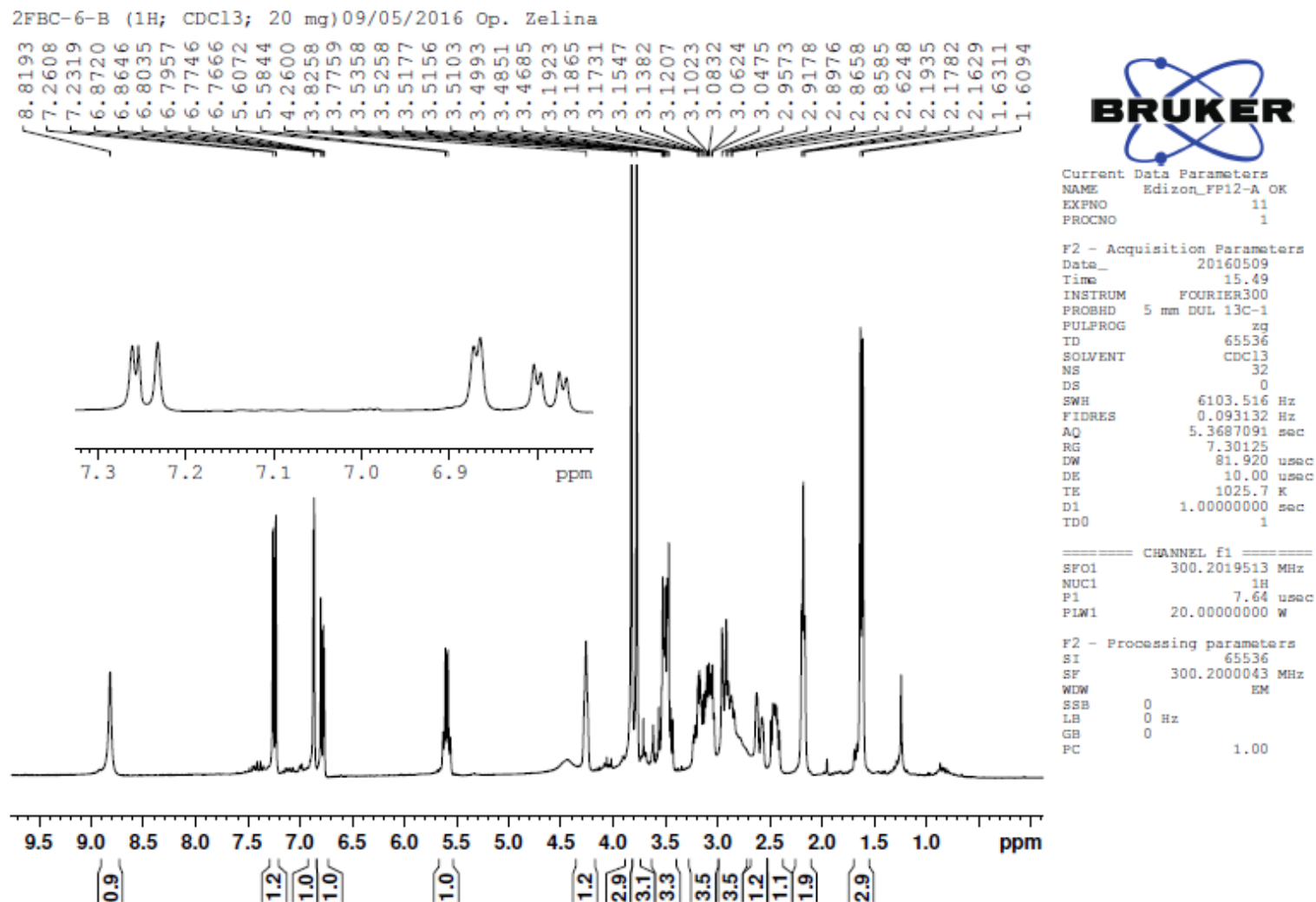
Anexo 14: Espectro de correlação ^1H - ^1H NOESY da *N*-óxido-15*S*, 16*S*-*E*-isositsiriquina (**115**). (FBC-4-C) em CDCl_3 (300 MHz).



Anexo 15: Cromatograma de LC-HRMS da fração 2FBC-6-B.

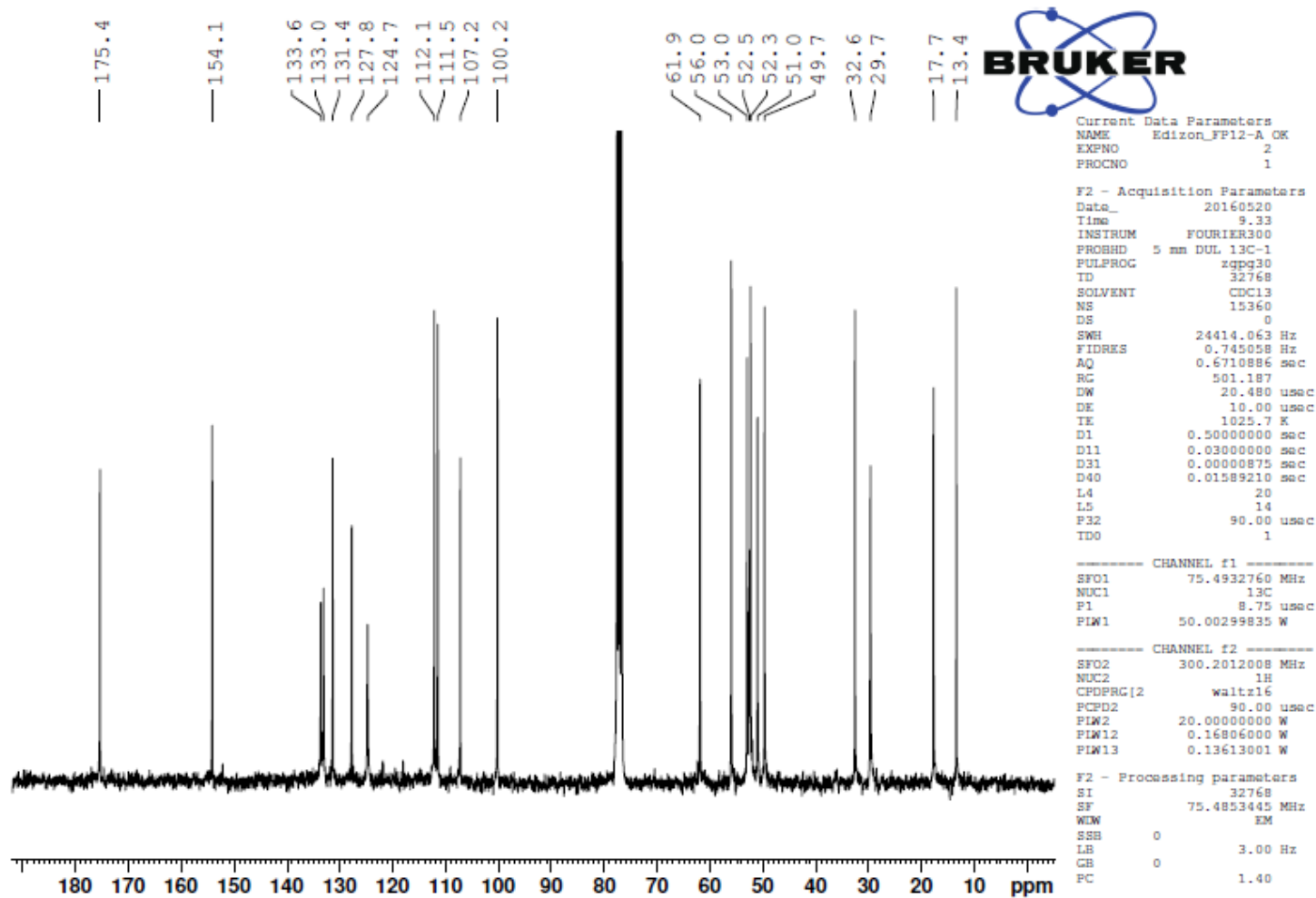


Anexo 16: Espectro de RMN de ^1H da 10-metoxi-15*S*, 16*S-E*-isositsiriquina (**113**) (2FBC-6-B) em CDCl_3 (300 MHz).

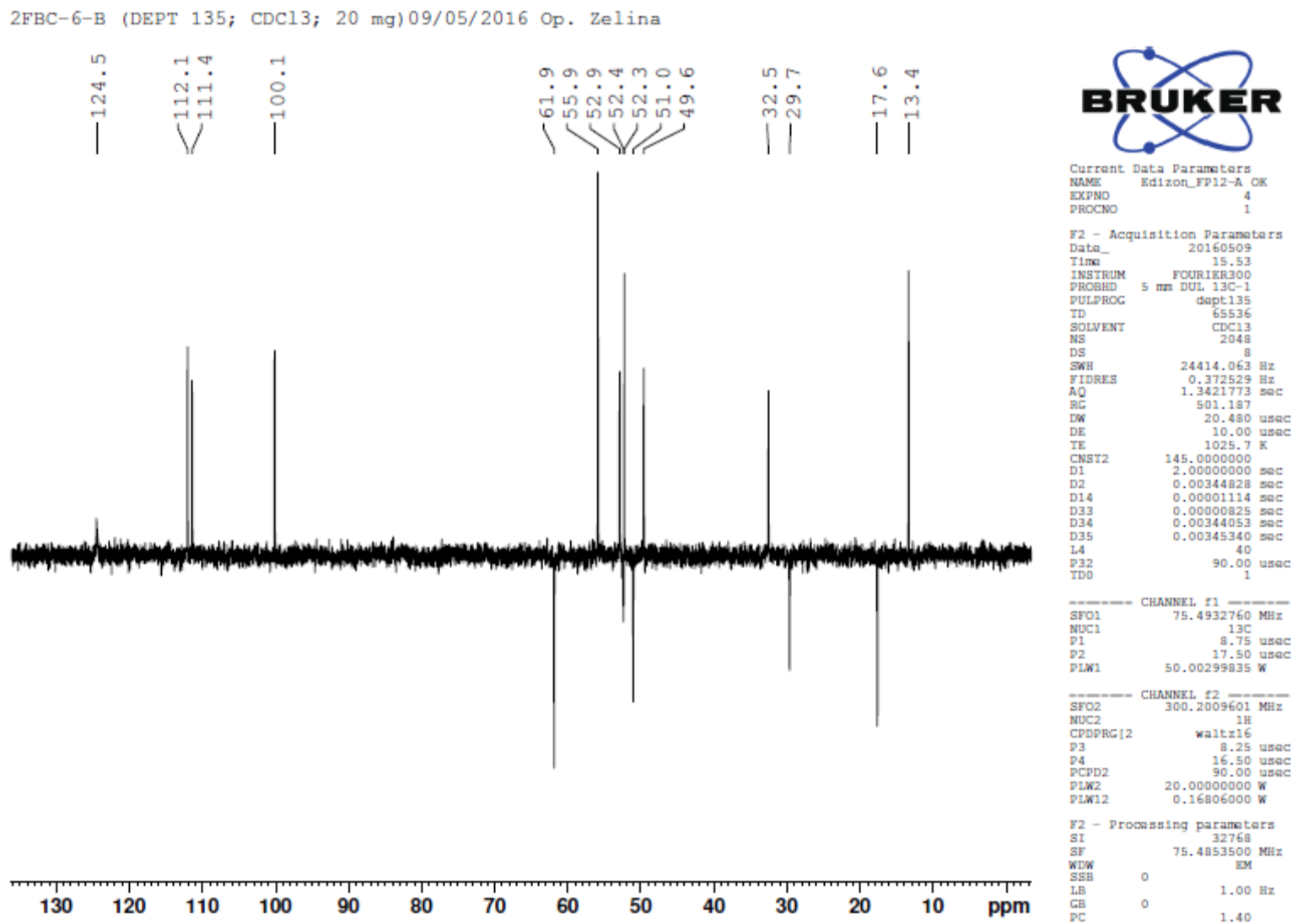


Anexo 15: Espectro de RMN de ^{13}C da 10-metoxi-15*S*, 16*S-E*-isositsiriquina (**113**) (2FBC-6-B) em CDCl_3 (300 MHz).

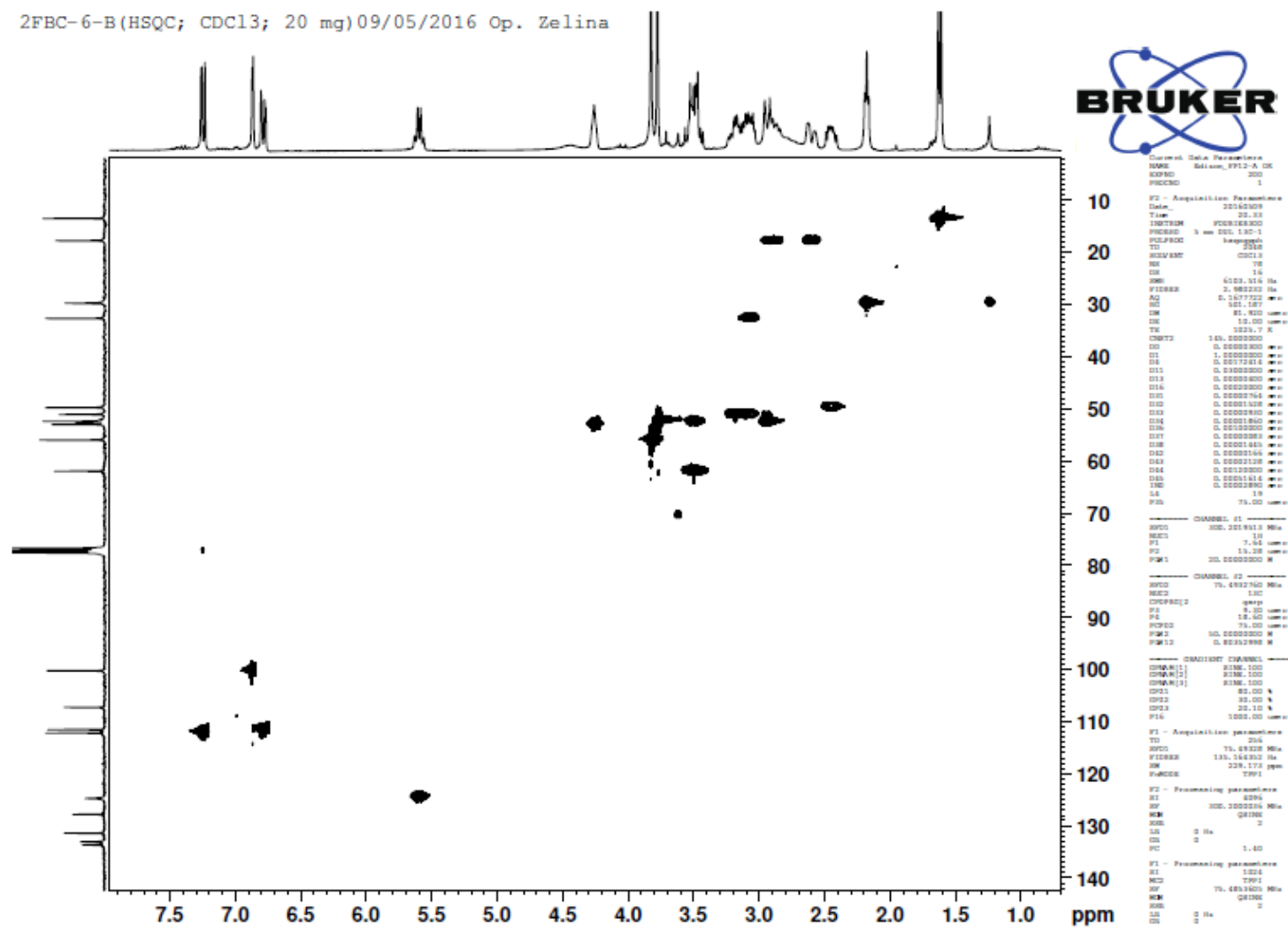
2FBC-6-B(13C; CDCl_3 ; 20 mg)20/05/2016 Op. Zelina



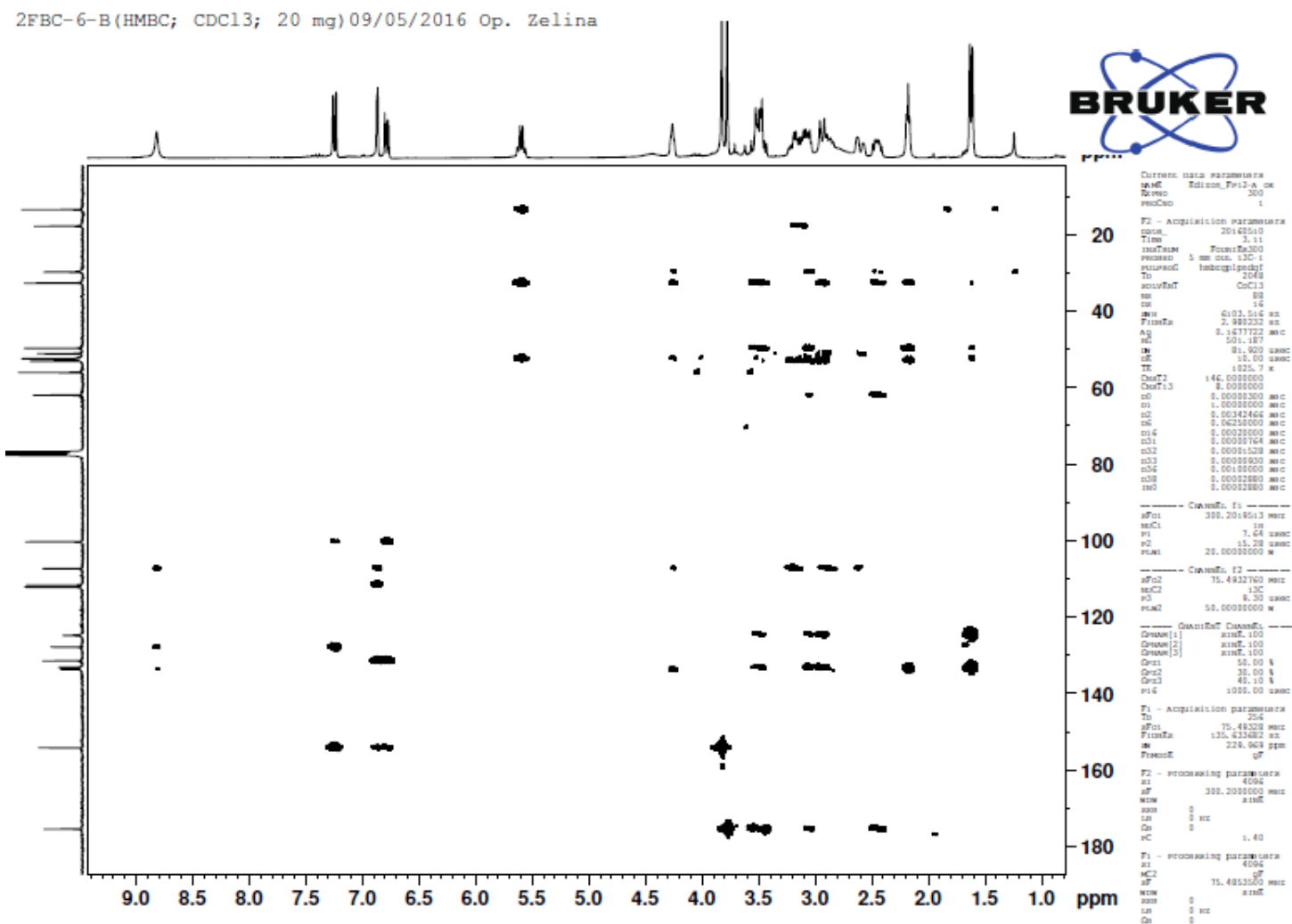
Anexo 16: Espectro de RMN de DEPT 135 da 10-metoxi-15*S*, 16*S*-*E*-isositsiriquina (**113**) (2FBC-6-B) em CDCl₃ (300 MHz).



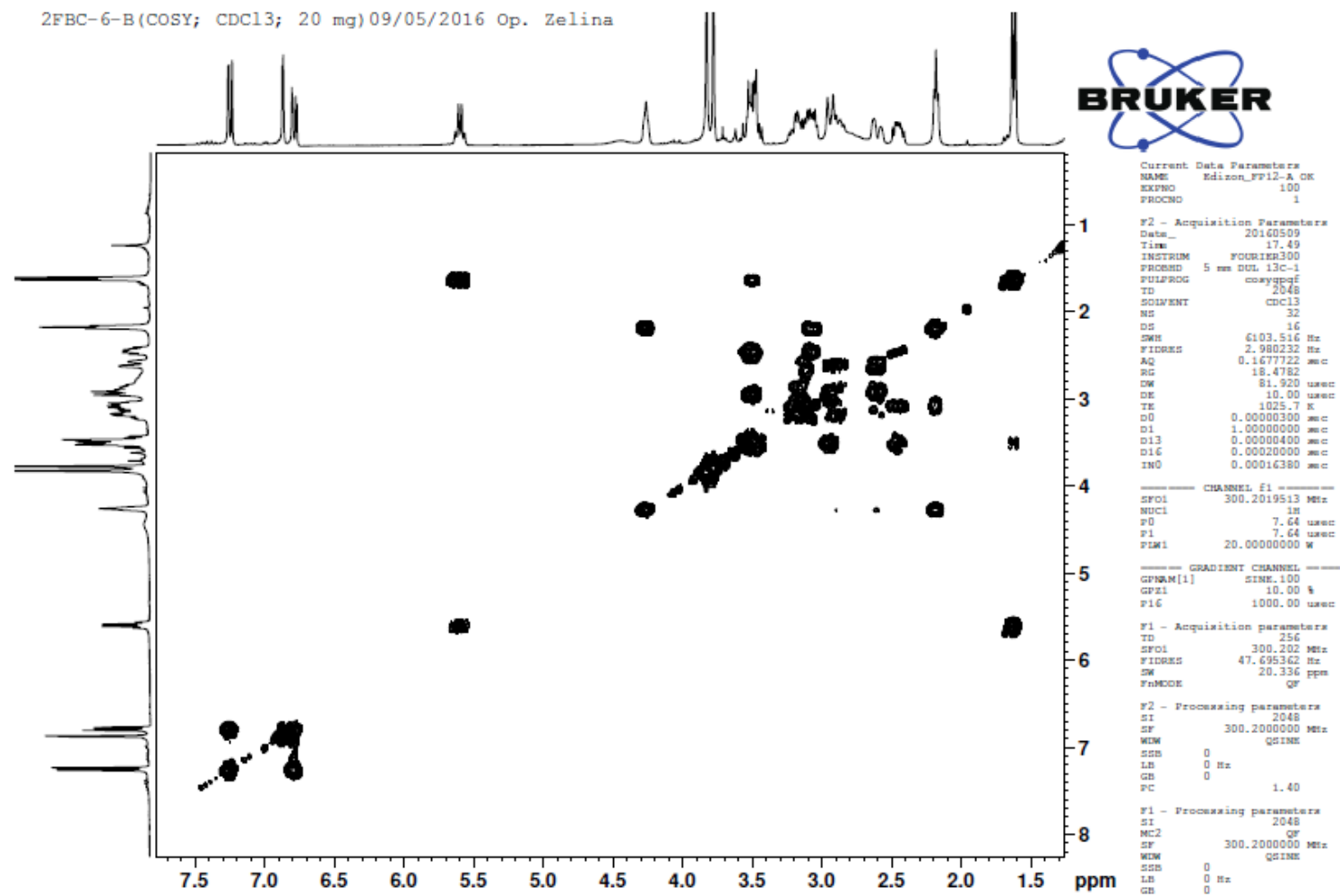
Anexo 17: Espectro de RMN de ^1H - ^{13}C HSQC da 10-metoxi-15*S*, 16*S*-*E*-isositsiriquina (**113**) (2FBC-6-B) em CDCl_3 (300 MHz).



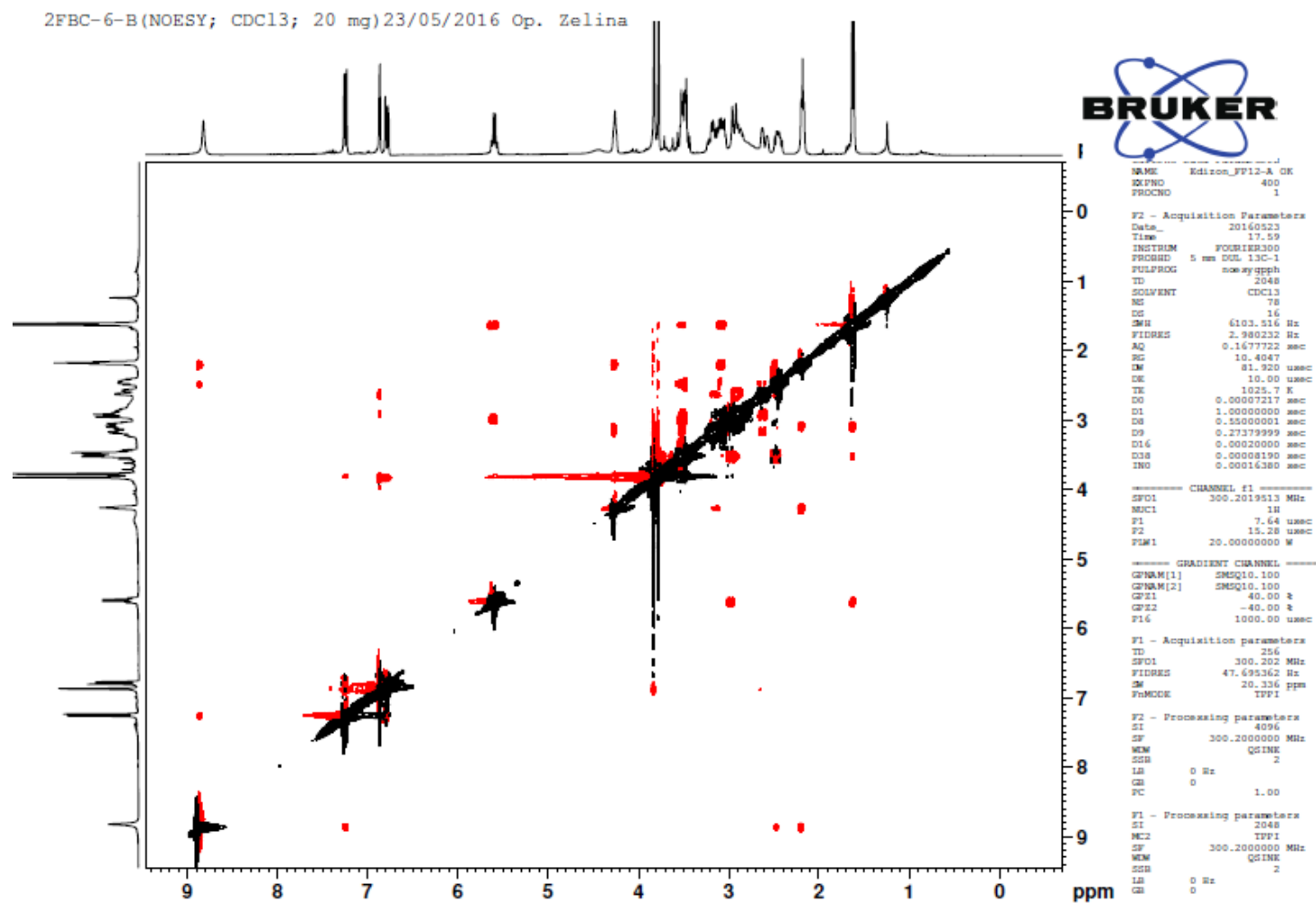
Anexo 18: Espectro de RMN de ^1H - ^{13}C HMBC da 10-metoxi-15*S*, 16*S*-*E*-isositsiriquina (**113**) (2FBC-6-B) em CDCl_3 (300 MHz).



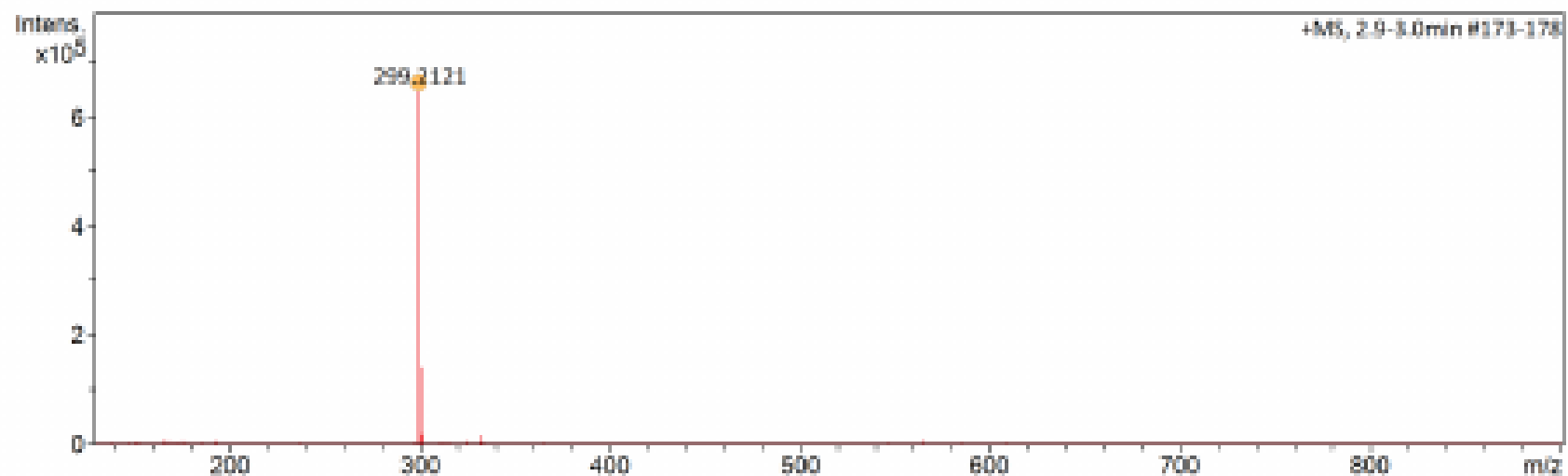
Anexo 19: Espectro de RMN de ^1H - ^1H COSY da 10-metoxi-15*S*, 16*S*-*E*-isositsiriquina (**113**) (2FBC-6-B) em CDCl_3 (300 MHz).



Anexo 20: Espectro de RMN de ^1H - ^1H NOESY da 10-metoxi-15*S*, 16*S*-*E*-isositsiriquina (**113**) (2FBC-6-B) em CDCl_3 (300 MHz).



Anexo21: Cromatograma de LC-HRMS da fração FBC-3-A



Bruker Compass DataAnalysis 4.2

printed: 10/19/2018 4:36:14 PM

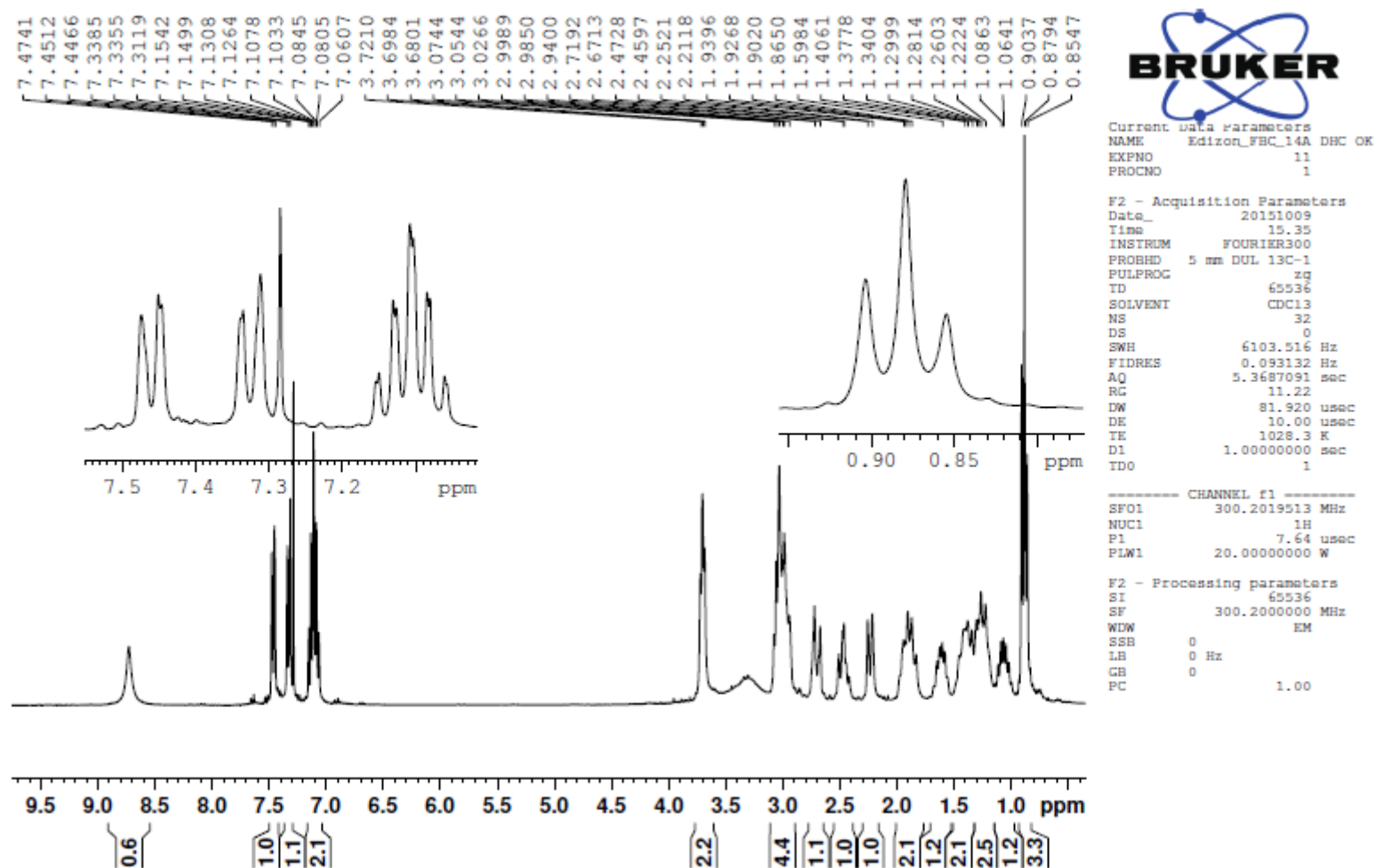
by: BDAL@DE

Page 1 of 1

Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdB	e ⁻	Conf	N-Rule
299.2121	1	C ₁₉ H ₂₇ N ₂ O	299.2118	-1.1	1.3	1	100.00	7.5	even		ok

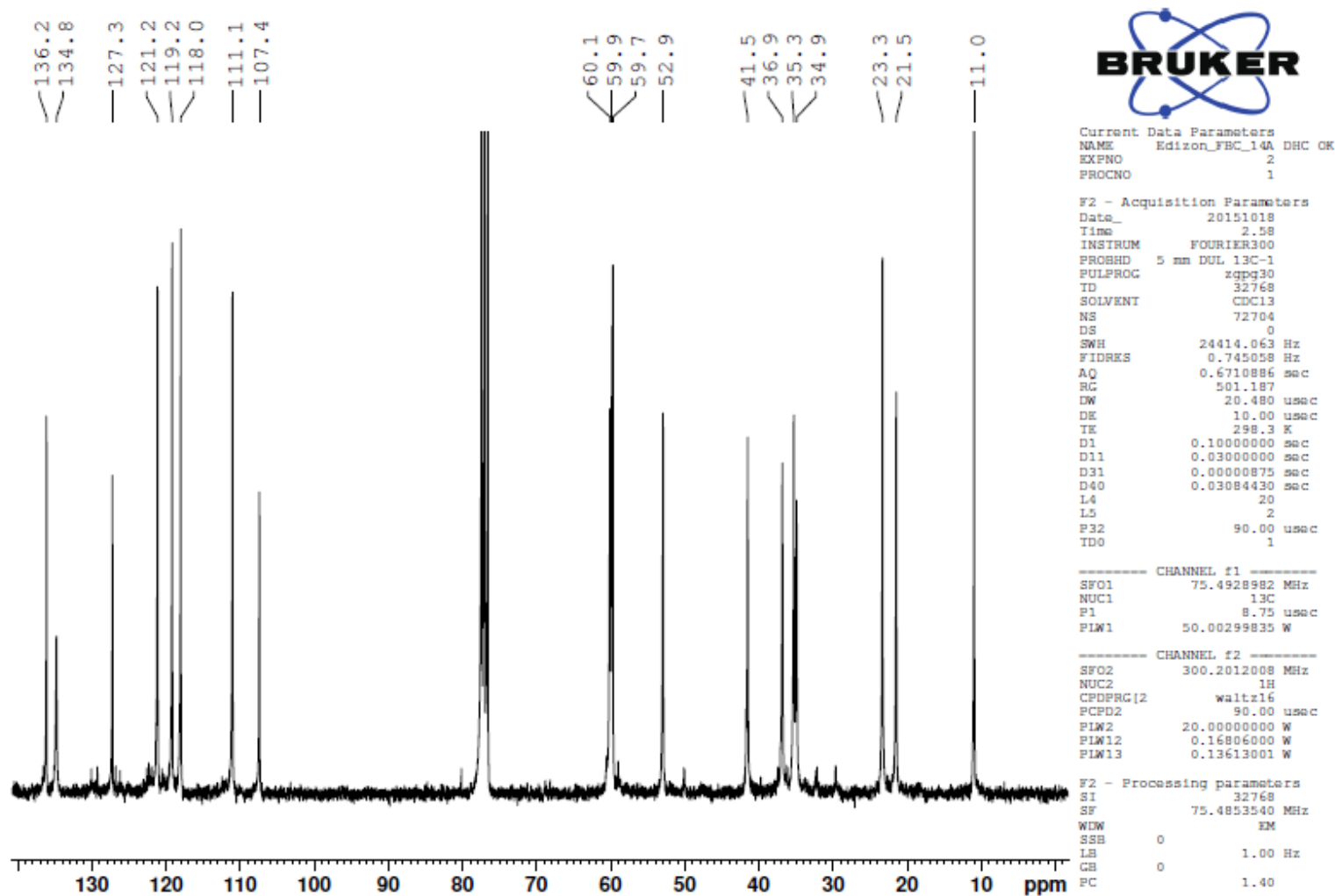
Anexo 22: Espectro de RMN de ^1H da 3α , 20β corinan-17-ol, (**76**) (FBC-3-A) em CDCl_3 (300 MHz).

Edizon_FBC-3-A (26 mg; CDCl_3 ; 1H) 09/10/2015

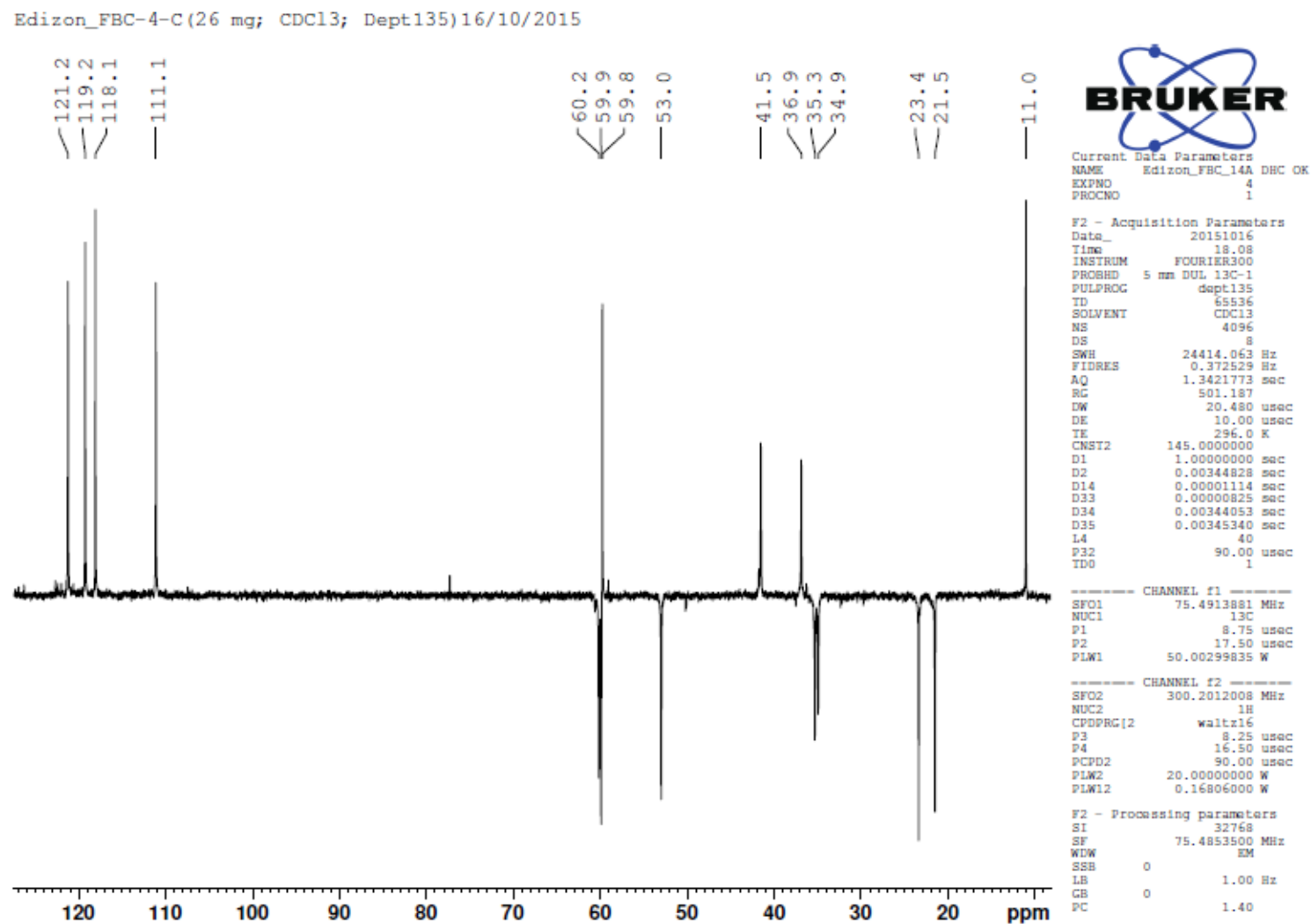


Anexo 23: Espectro de correlação ^{13}C carbono da 3α , 20β corinan-17-ol, (**76**) (FBC-3-A) em CDCl_3 (300 MHz).

Edizon_FBC-3-A (26 mg; CDCl_3 ; ^{13}C) 16/10/2015

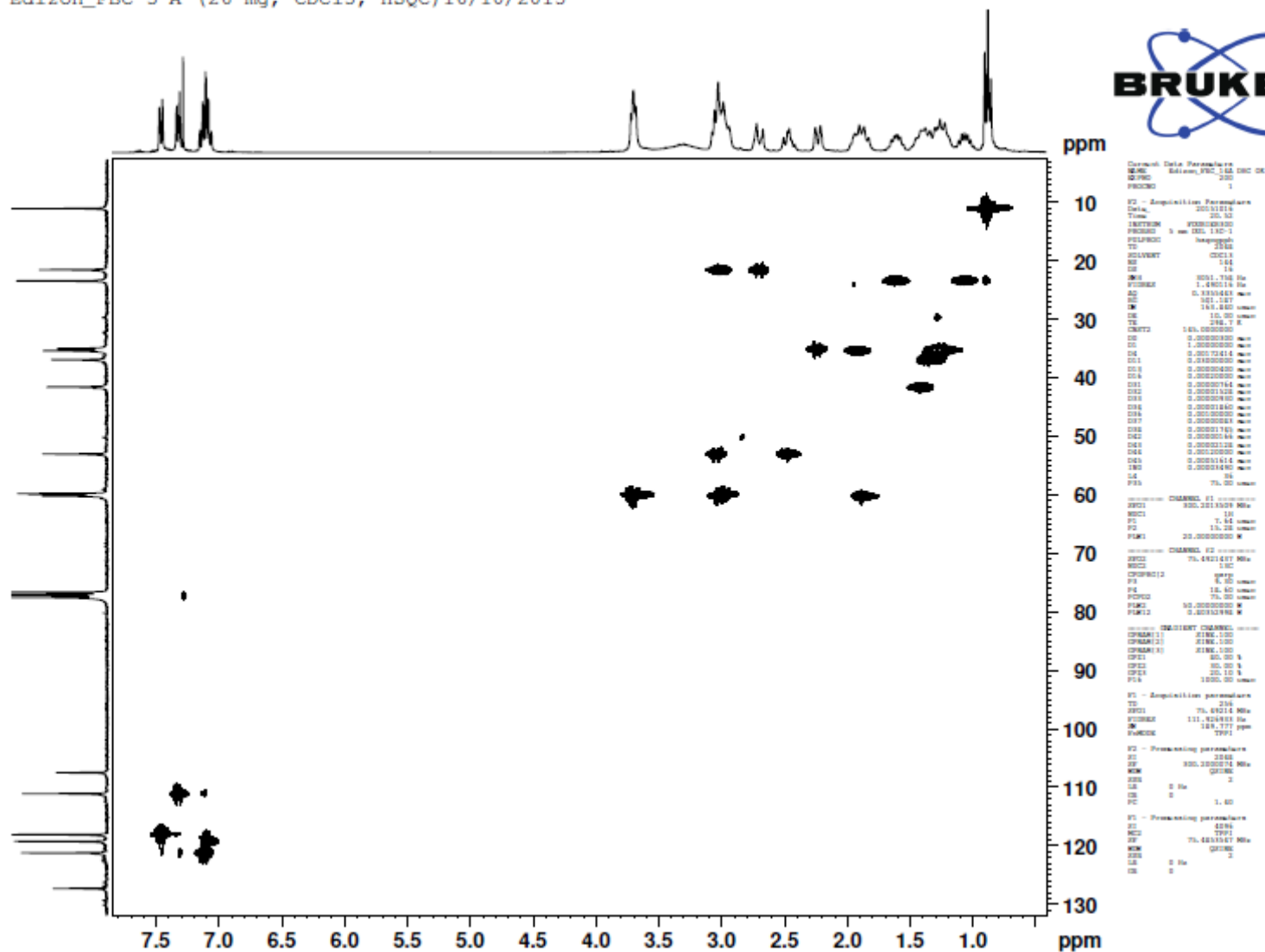


Anexo 24: Espectro de DEPT 135 da 3 α , 20 β corinan-17-ol, (**76**) (FBC-4-C) em CDCl₃ (300 MHz).



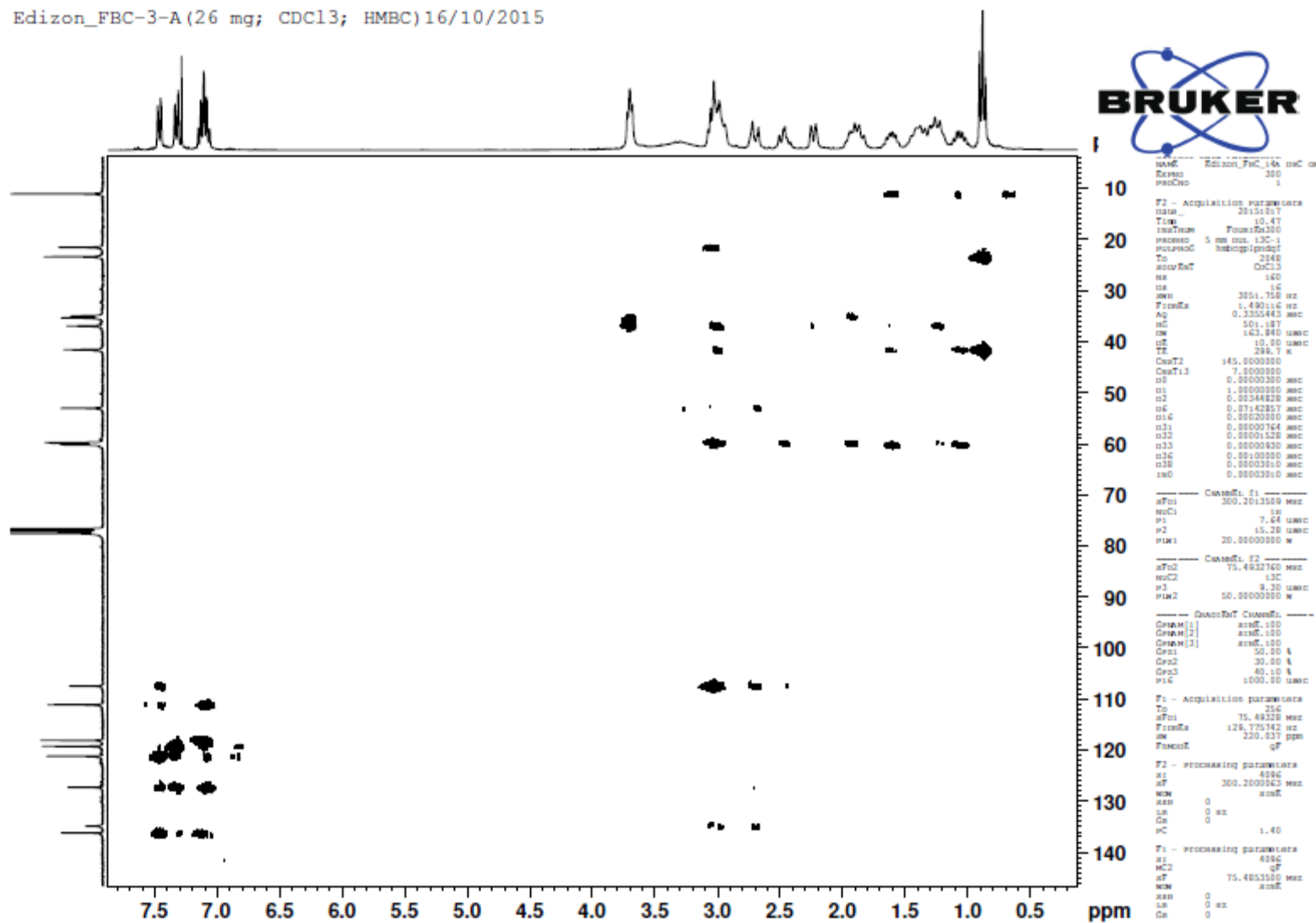
Anexo 25: Espectro de correlação ^1H - ^{13}C HSQC da 3 α , 20 β corinan-17-ol, (76) (FBC-3-A) em CDCl_3 (300 MHz).

Edizon_FBC-3-A (26 mg; CDCl_3 ; HSQC) 16/10/2015



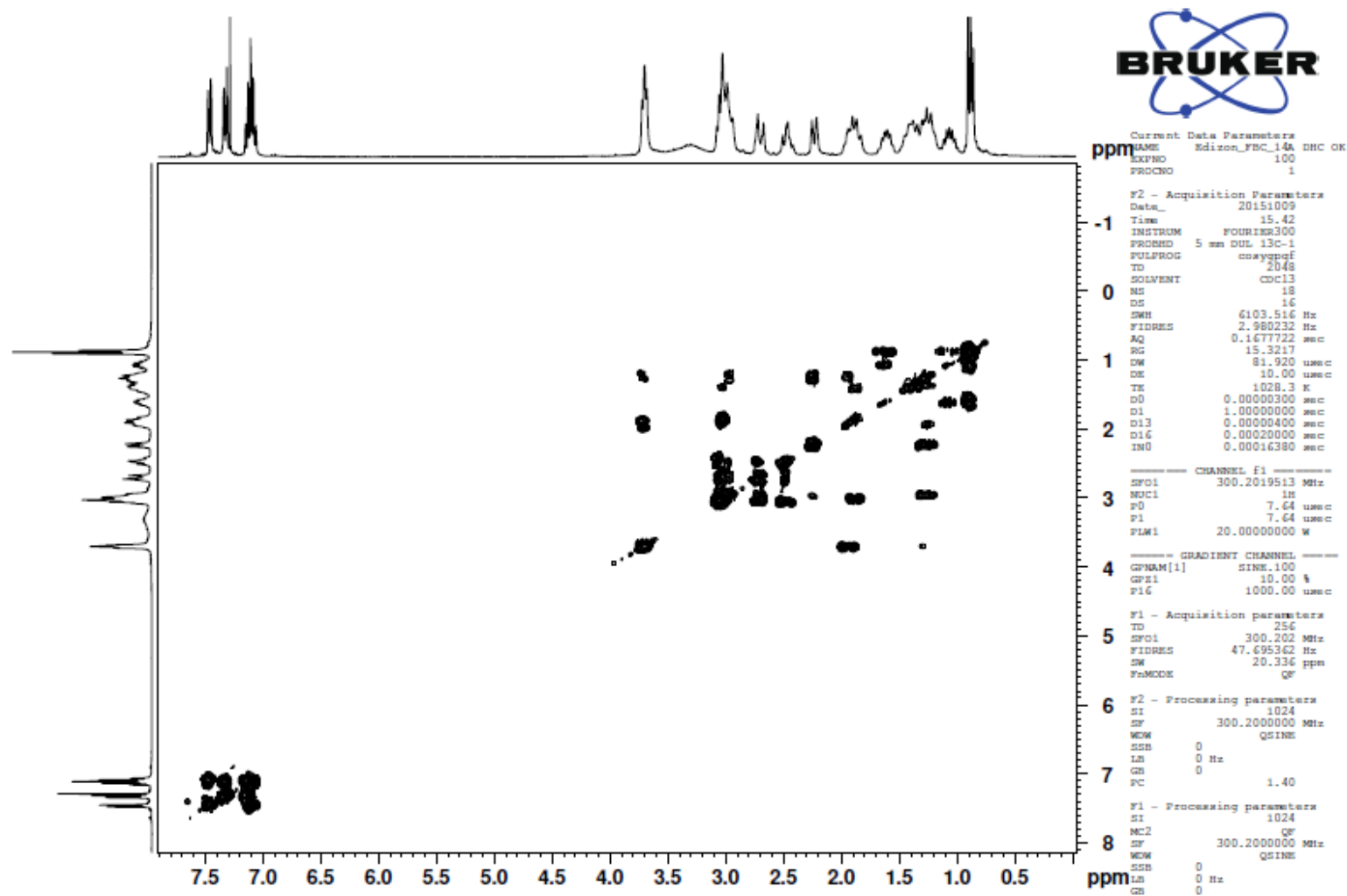
Anexo 26: Espectro de correlação ^1H - ^{13}C HMBC da 3 α , 20 β corinan-17-ol, (76) (FBC-3-A) em CDCl_3 (300 MHz).

Edizon_FBC-3-A(26 mg; CDCl_3 ; HMBC)16/10/2015

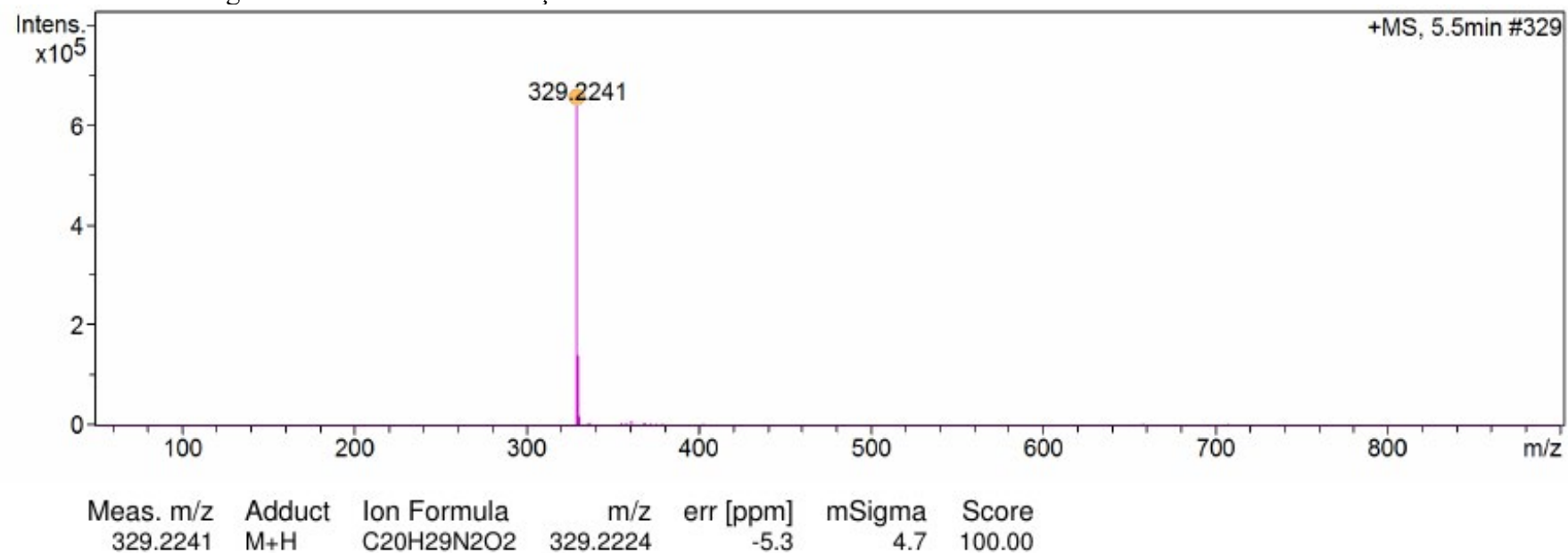


Anexo27: Espectro de correlação ^1H - ^1H COSY da 3 α , 20 β corinan-17-ol, (76) (FBC-3-A) em CDCl_3 (300 MHz).

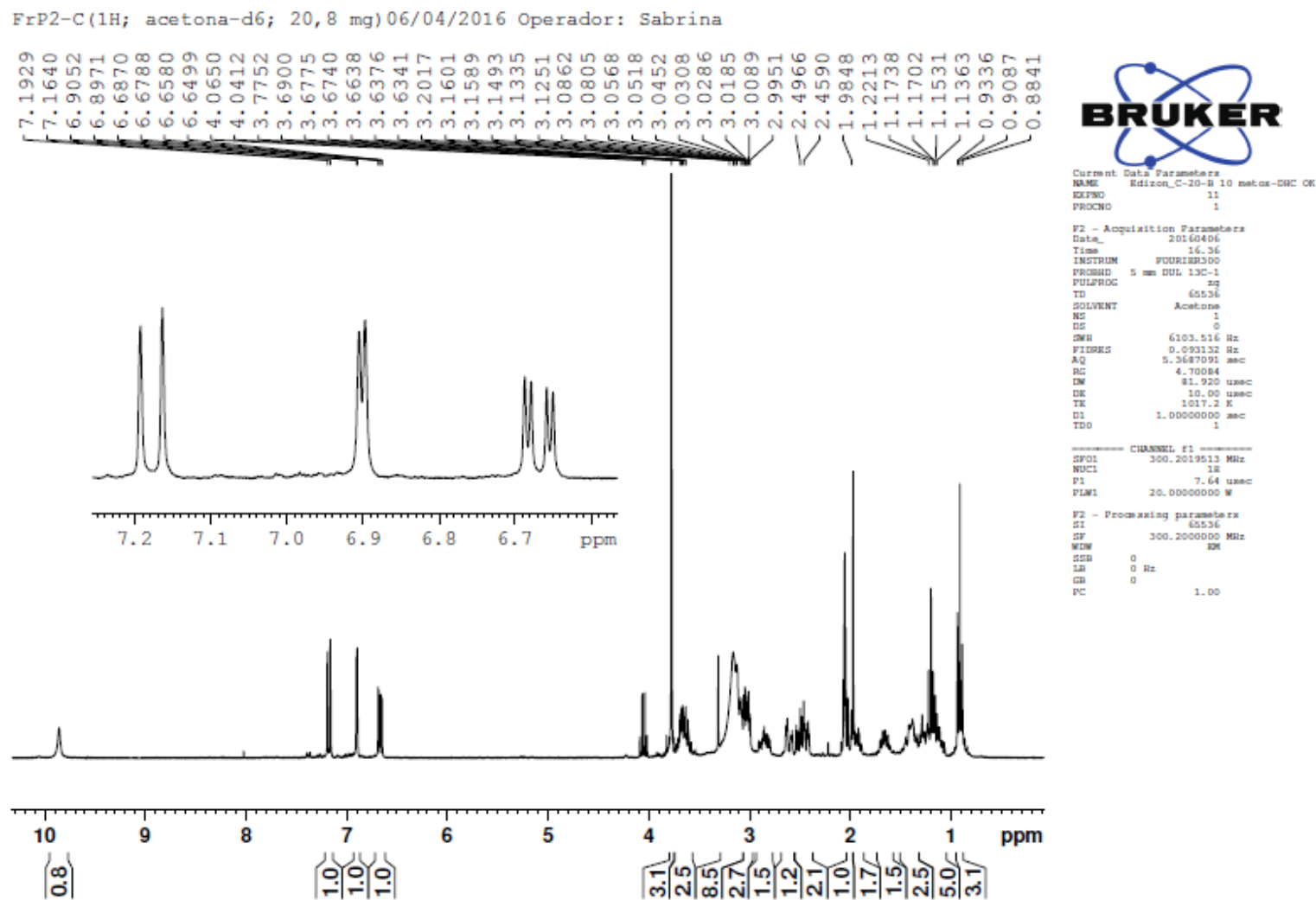
Edizon_FBC-3-A (26 mg; CDCl_3 ; COSY) 09/10/2015



Anexo 28: Cromatograma de LC-HRMS da fração FrP2-C.

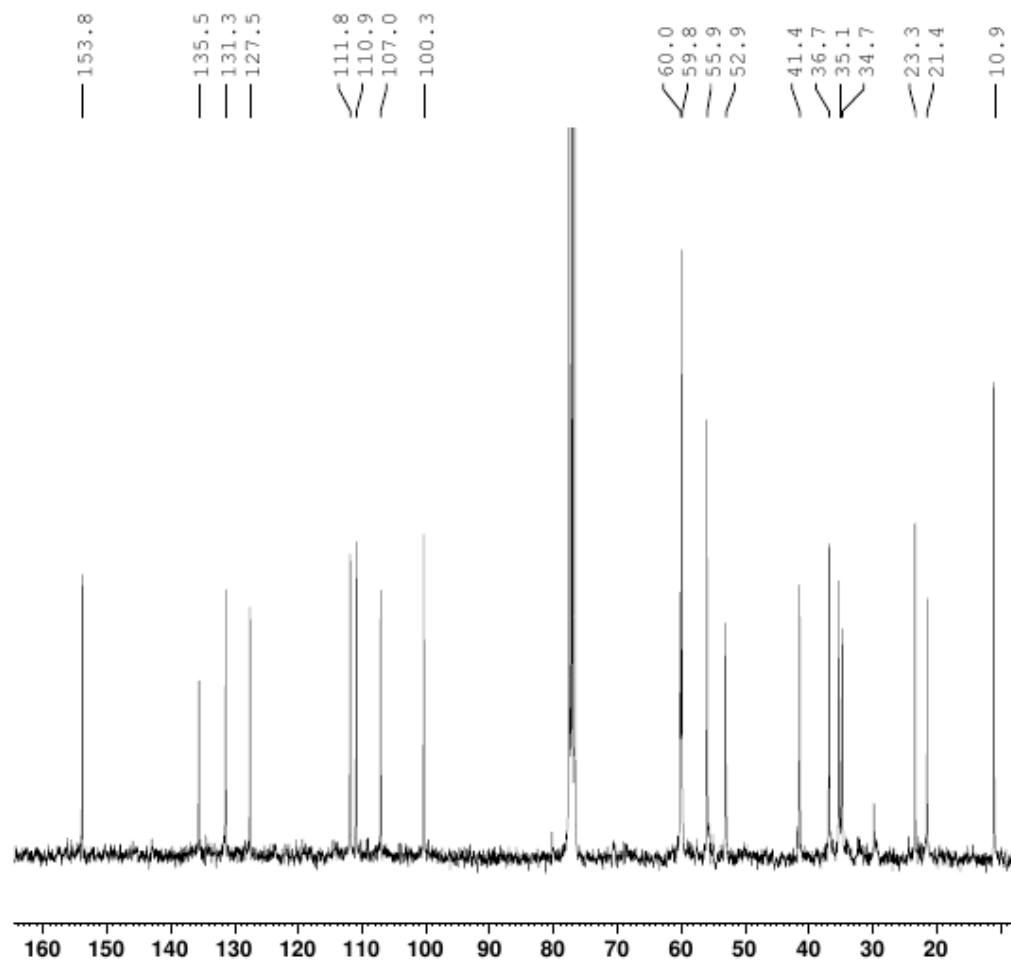


Anexo 179: Espectro de RMN de ^1H da 10-metoxi-corinan-17-ol (**119**) (FrP2-C) em CDCl_3 (300 MHz).



Anexo 30: Espectro de correlação ^{13}C carbono da 10-metoxi-corinan-17-ol (**119**) (FrP2-C) em CDCl_3 (300 MHz).

Edizon_FP14-A (25 mg; CDCl_3 ; ^{13}C) 18/05/2016
Op. Zelina



Current Data Parameters
NAME Edizon_FP14-A -C-20-B
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20160519
Time_ 9.28
INSTRUM FOURIER300
PROBHD 5 mm DUL 13C-1
PULPROG zgpg30
TD 32768
SOLVENT CDCl_3
NS 10985
DS 0
SWH 24414.063 Hz
FIDRES 0.745058 Hz
AQ 0.6710886 sec
RG 501.187
DW 20.480 usec
DE 10.00 usec
TE 1025.7 K
D1 0.50000000 sec
D11 0.03000000 sec
D31 0.00000875 sec
D40 0.01589210 sec
L4 20
L5 14
P32 90.00 usec
TDO 1

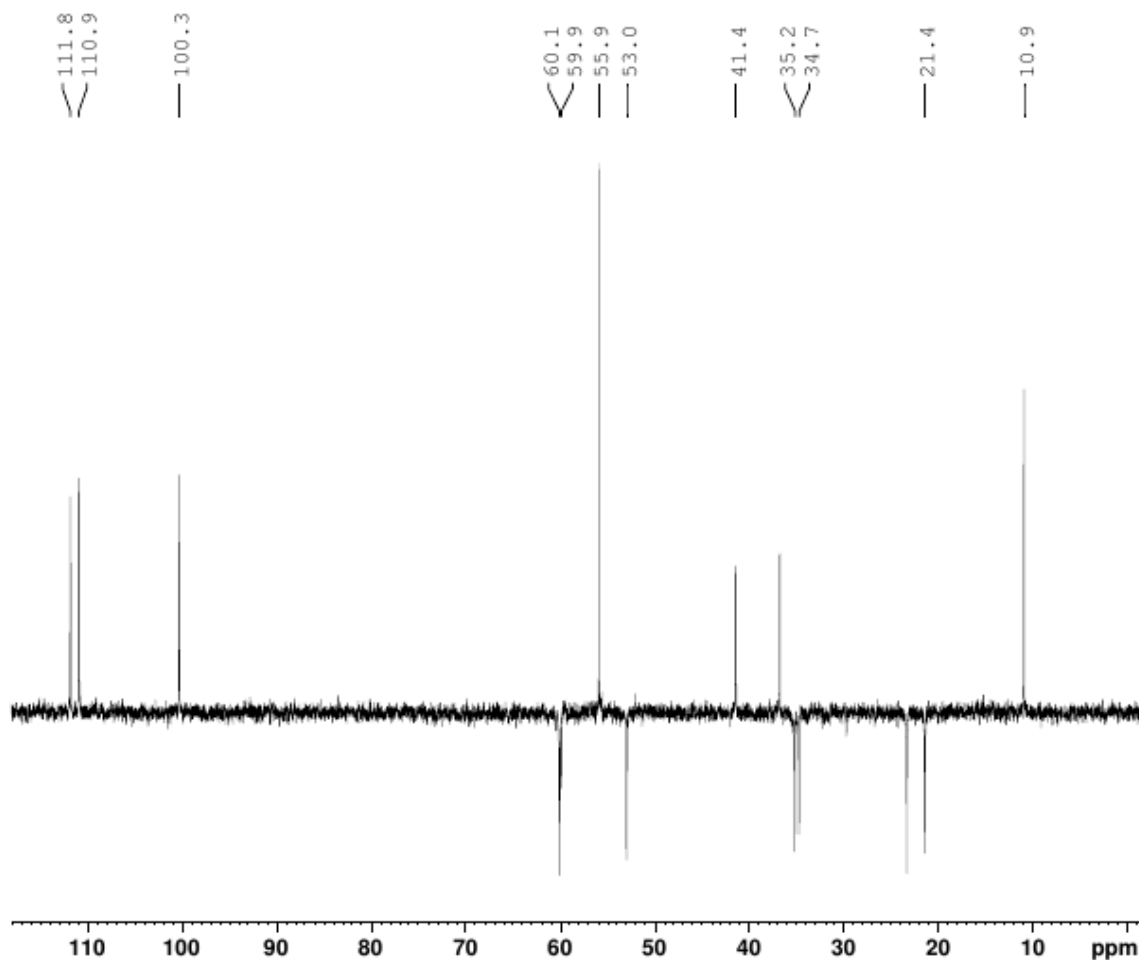
===== CHANNEL f1 =====
SF01 75.4932760 MHz
NUC1 ^{13}C
P1 8.75 usec
PLW1 50.00299835 W

===== CHANNEL f2 =====
SF02 300.2012008 MHz
NUC2 ^1H
CPDPRG2 waltz16
PCPD2 90.00 usec
PLW2 20.00000000 W
PLW12 0.16806000 W
PLW13 0.13613001 W

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 75.4853500 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 3.00 Hz
GB 0
PC 1.40

Anexo 31: Espectro de DEPT 135 da 10-metoxi-corinan-17-ol (**119**) (FrP2-C) em CDCl_3 (300 MHz).

Edizon_FP14-A (25 mg; CDCl_3 ; Dept135)18/05/2016
Op. Edizon



NAME Edizon_FP14-A -C-20-B
EXPNO 4
PROCNO 1

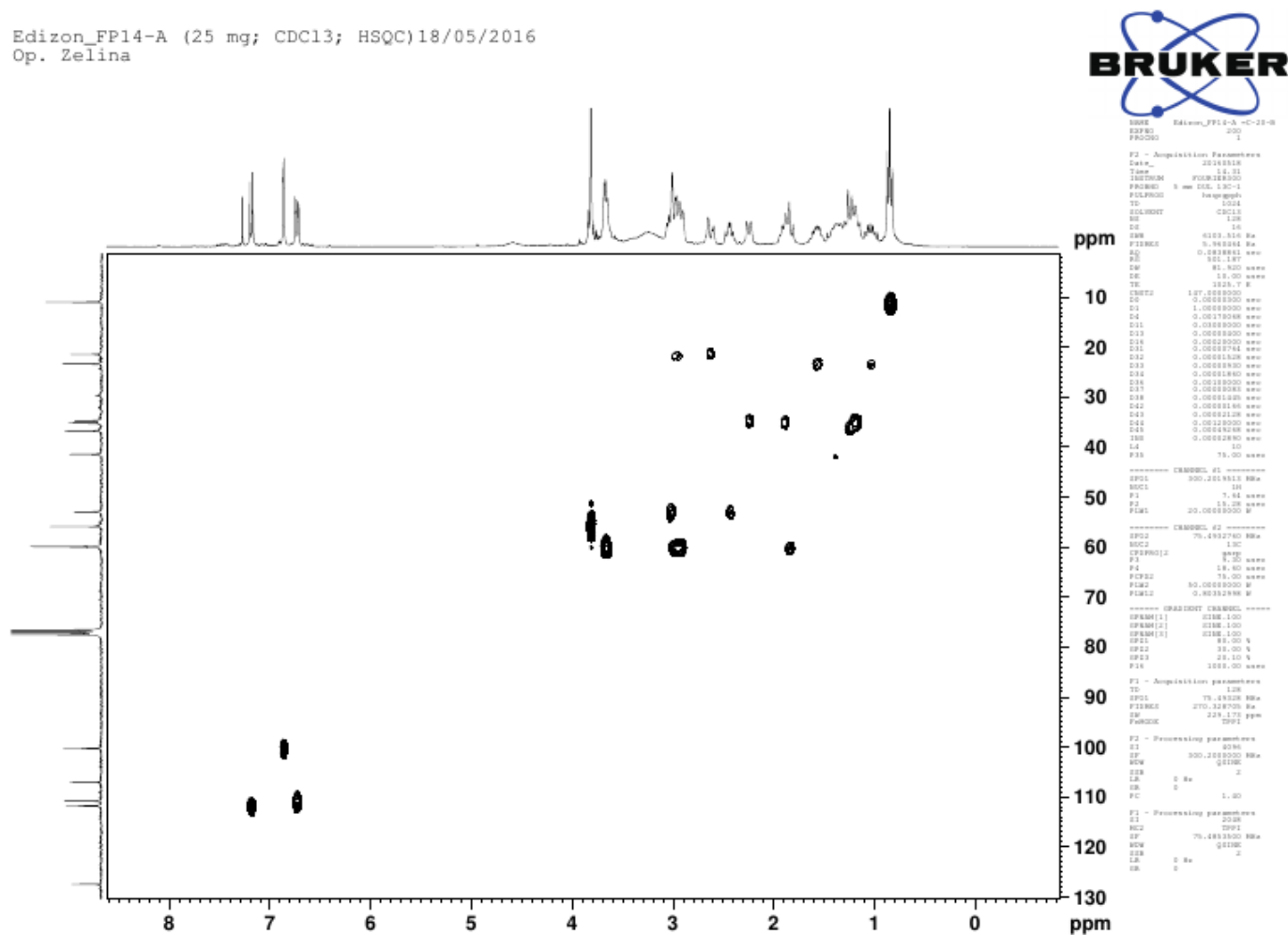
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20160518
Time 11.10
INSTRUM FOURIER300
PROBHD 5 mm DUL 13C-1
PULPROG dept135
TD 65536
SOLVENT CDCl_3
NS 521
DS 8
SWH 24414.063 Hz
FIDRES 0.372529 Hz
AQ 1.3421773 sec
RG 501.187
DW 20.480 usec
DE 10.00 usec
TE 1025.7 K
CNST2 147.000000
D1 3.00000000 sec
D2 0.00340136 sec
D14 0.00001114 sec
D33 0.00000825 sec
D34 0.00339361 sec
D35 0.00340649 sec
L4 40
P32 90.00 usec
TD0 1

----- CHANNEL f1 -----
SF01 75.4932760 MHz
NUC1 13C
P1 8.75 usec
P2 17.50 usec
PLW1 50.00299835 W

----- CHANNEL f2 -----
SF02 300.2009601 MHz
NUC2 1H
CPDPRG2 waltz16
P3 8.25 usec
P4 16.50 usec
PCPD2 90.00 usec
PLW2 20.00000000 W
PLW12 0.16806000 W

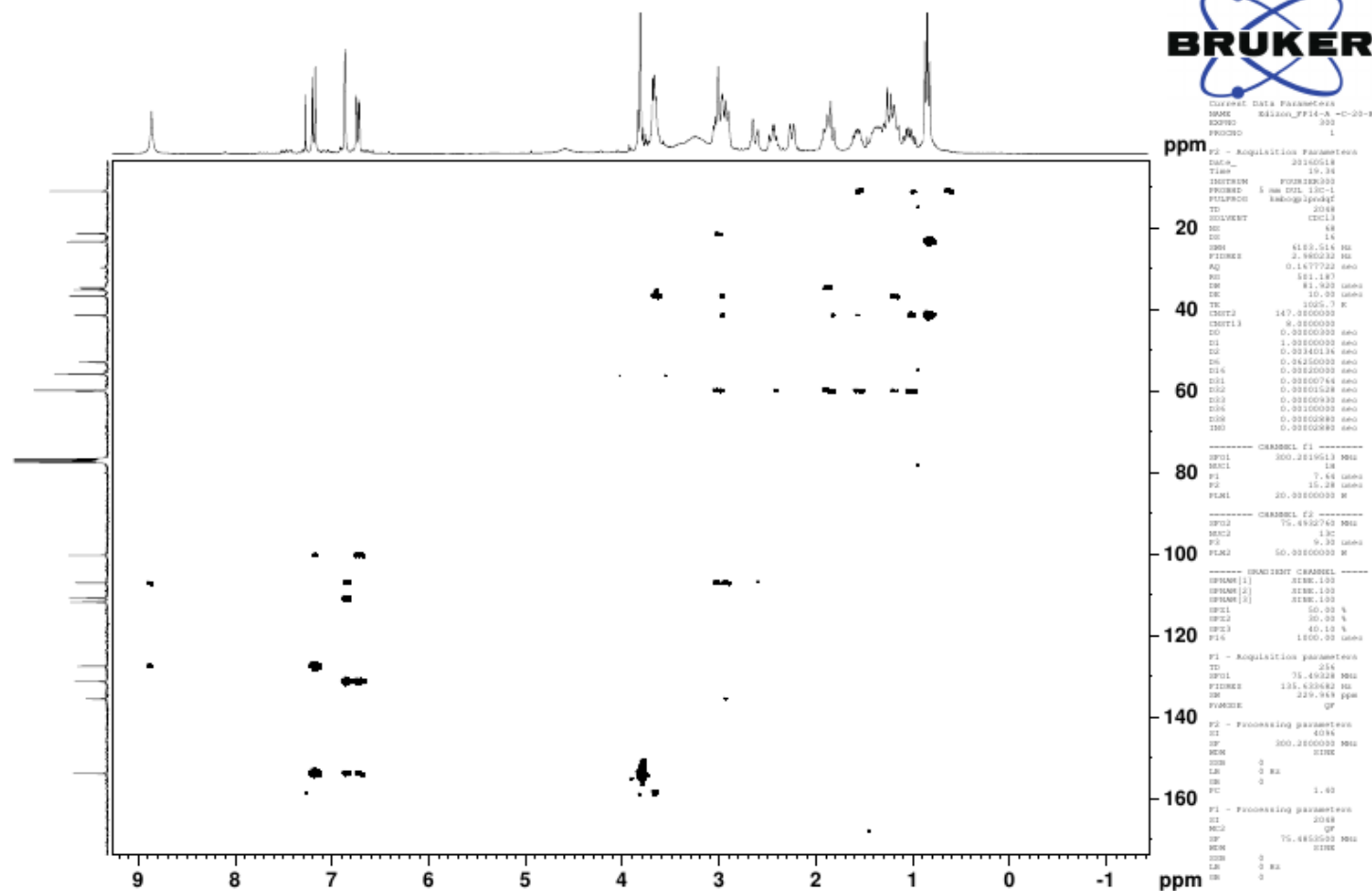
F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 75.4853500 MHz
MDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

Anexo 32: Espectro de correlação ^1H - ^{13}C HSQC 10-metoxi-corinan-17-ol (**119**) (FrP2-C) em CDCl_3 (300 MHz).

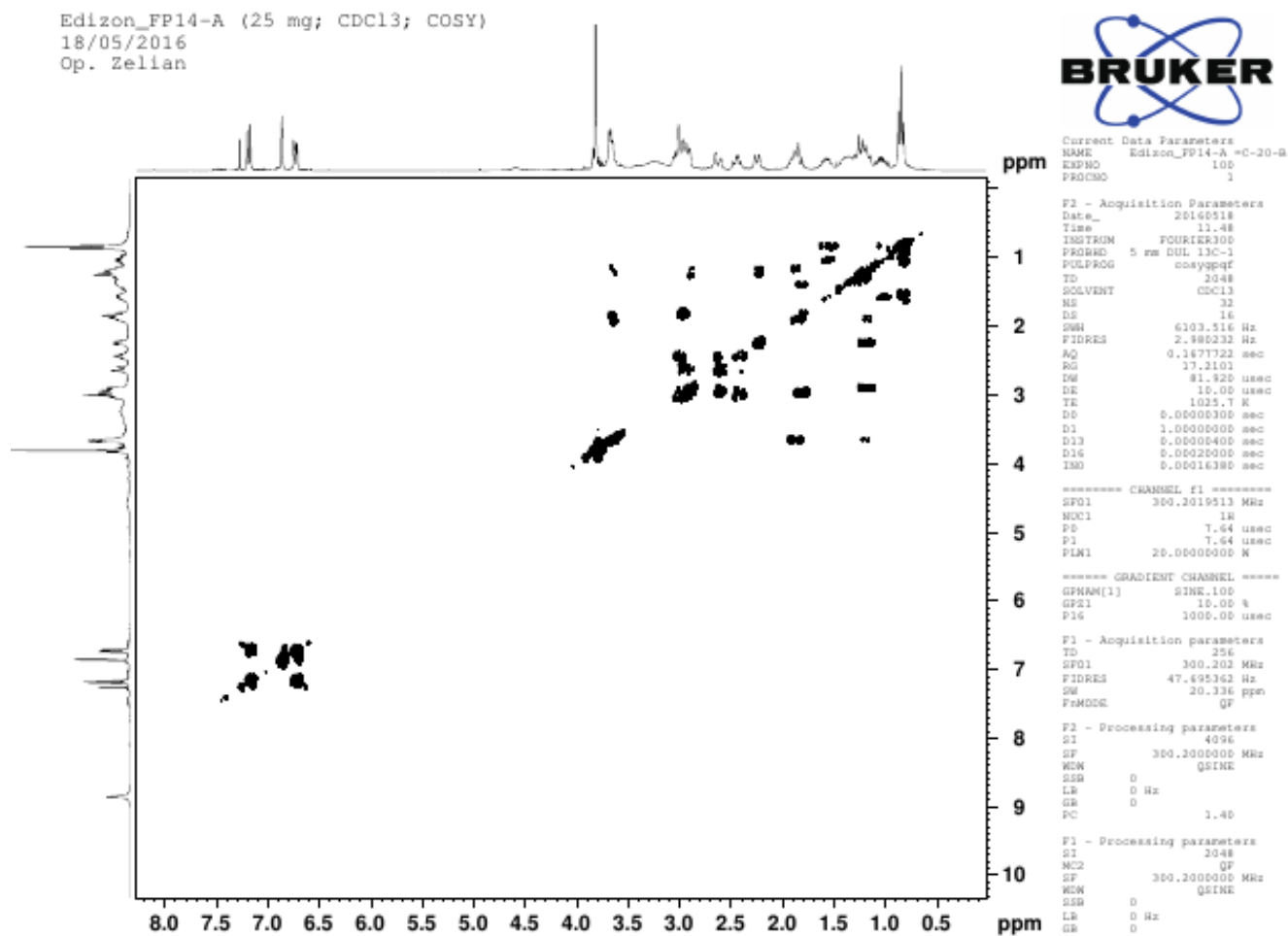


Anexo 33: Espectro de correlação ^1H - ^{13}C HMBC da 10-metoxi-corinan-17-ol (**119**) (FrP2-C) em CDCl_3 (300 MHz).

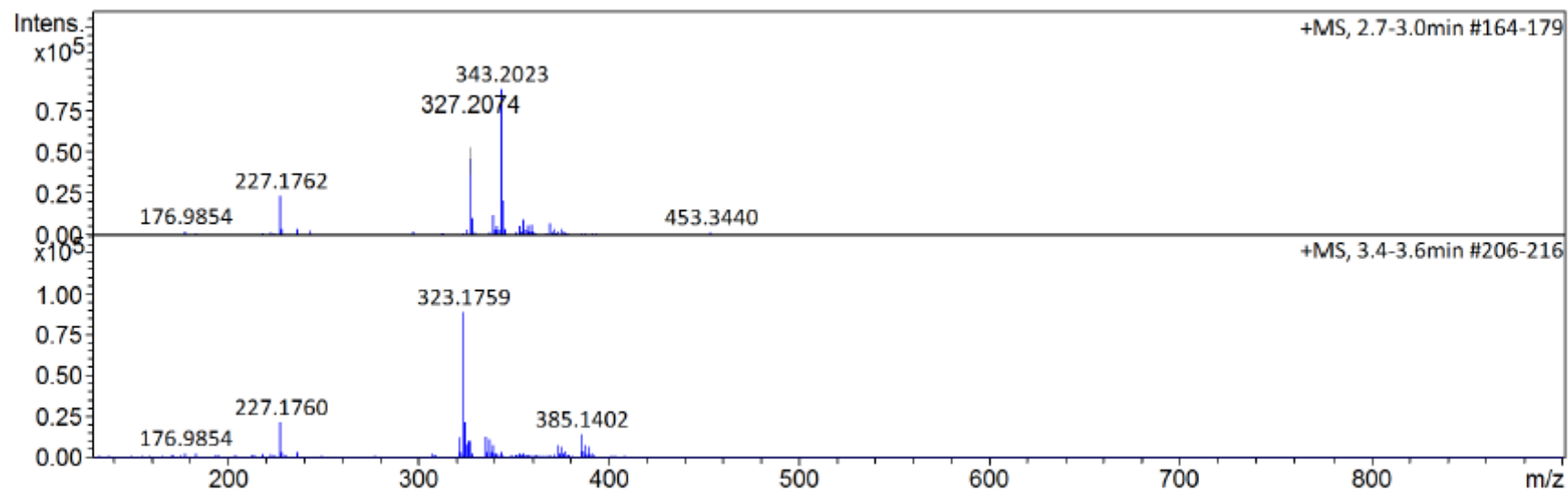
Edizon_FP14-A (25 mg; CDCl_3 ; HMBC) 18/05/2016
Op. Zelina



Anexo 34: Espectro de correlação ^1H - ^1H COSY da 10-metoxi-corinan-17-ol (**119**) (FrP2-C) em CDCl_3 (300 MHz).

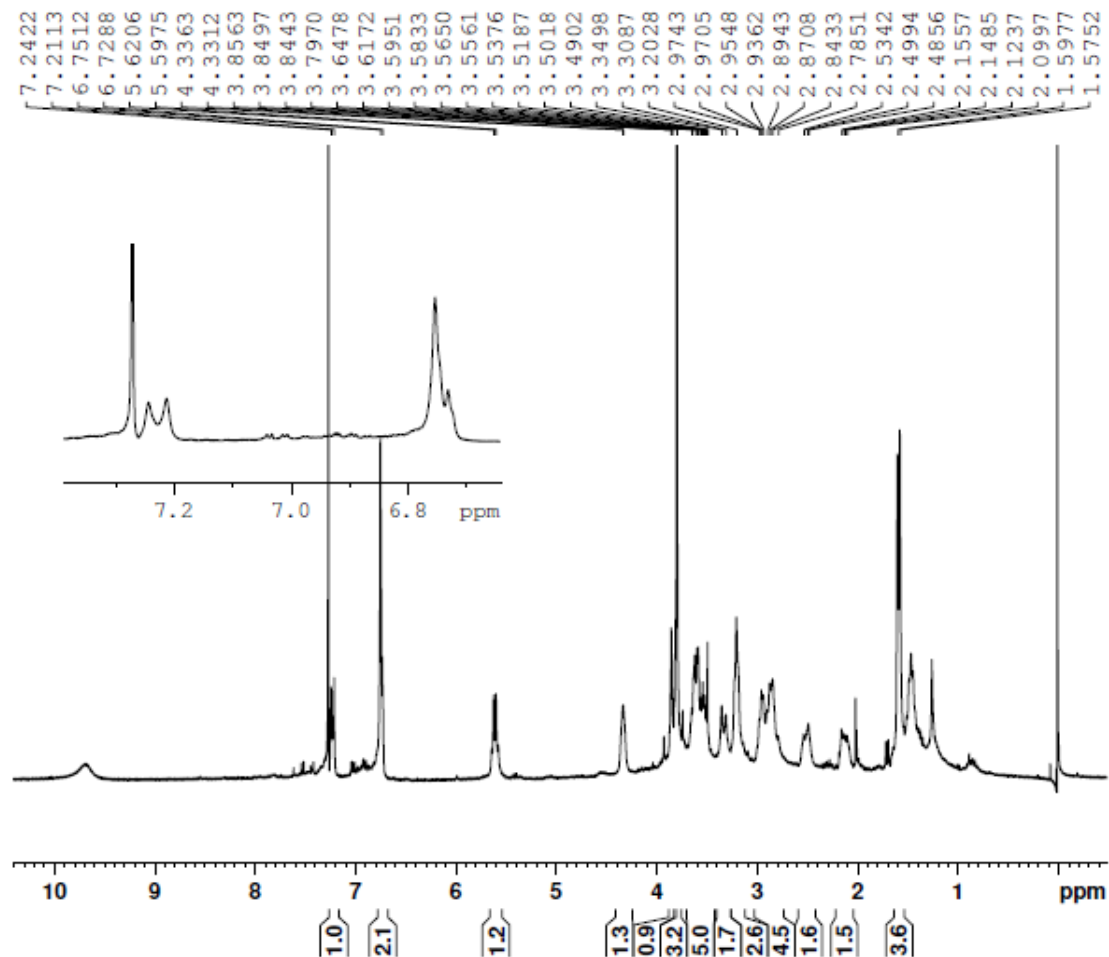


Anexo 35: Cromatograma de LC-HRMS da fração 2FAC-7-A.



Anexo 3618: Espectro de RMN de ^1H da 3 α , 15 α -10-metoxi-geissosquizol (**74**) (2FAC-7-A) em CDCl_3 (300 MHz).

2FAC-7-A_CP16-C (1H, 6.0 mg; CDCl_3) c/ giro
30/10/2017 Op. Zelina



Current Data Parameters
NAME Edizon17_CP16-C-geissosquizol
EXPNO 14
PROCNO 1

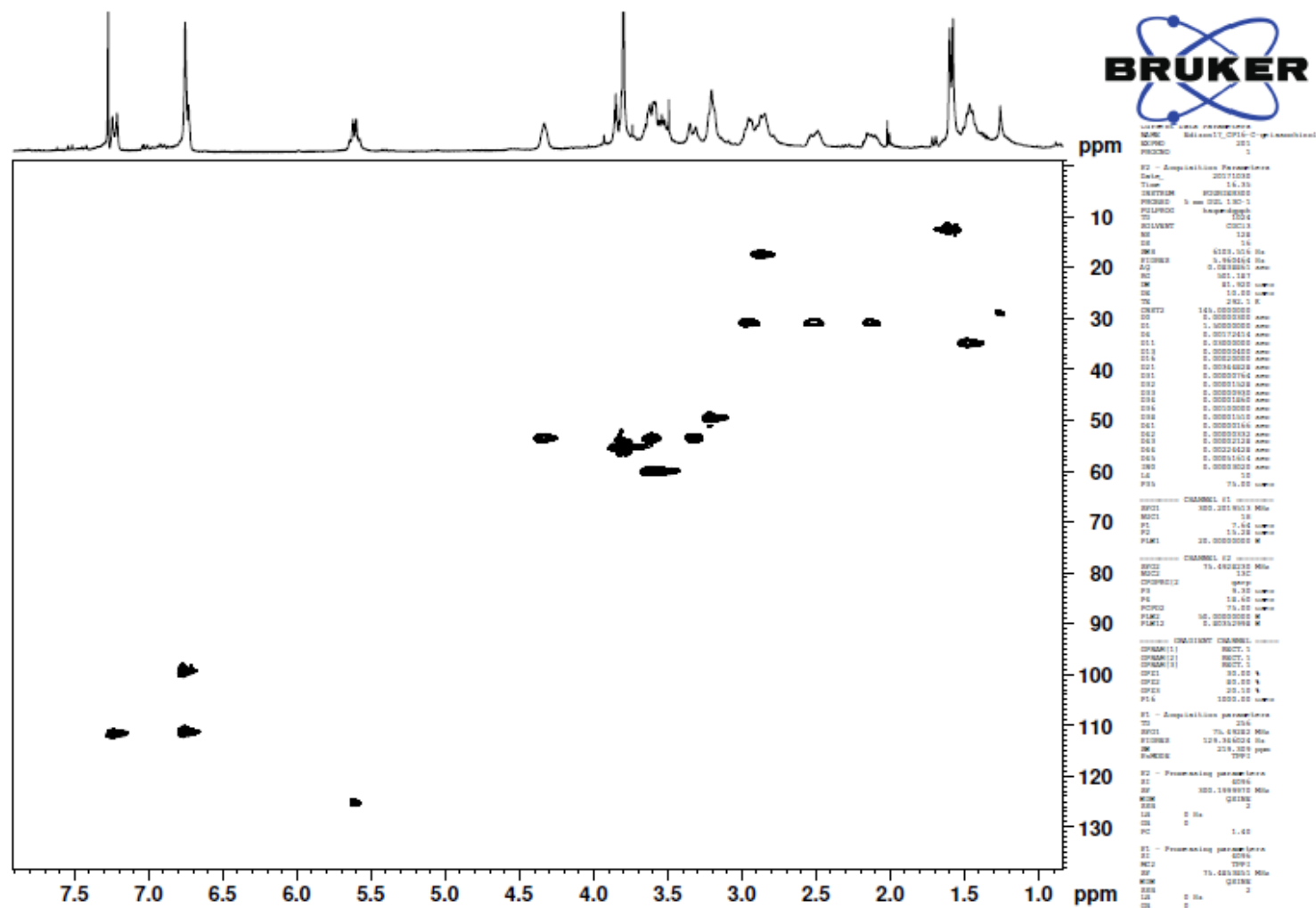
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20171031
Time 17.46
INSTRUM FOURIER300
PROBHD 5 mm BBO-1
PULPROG zgpg30
TD 65536
SOLVENT CDCl_3
NS 64
DS 0
SWH 6103.516 Hz
FIDRES 0.093132 Hz
AQ 5.3687091 sec
RG 23.3169
DM 81.920 usec
DE 10.00 usec
TE 290.9 K
D1 1.00000000 sec
TDO 1

CHANNEL f1
SFO1 300.2019513 MHz
NUC1 1H
P1 7.88 usec
PLW1 20.00000000 W

F2 - Processing parameters
SI 65536
SF 300.1999995 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0 Hz
GB 0
PC 1.00

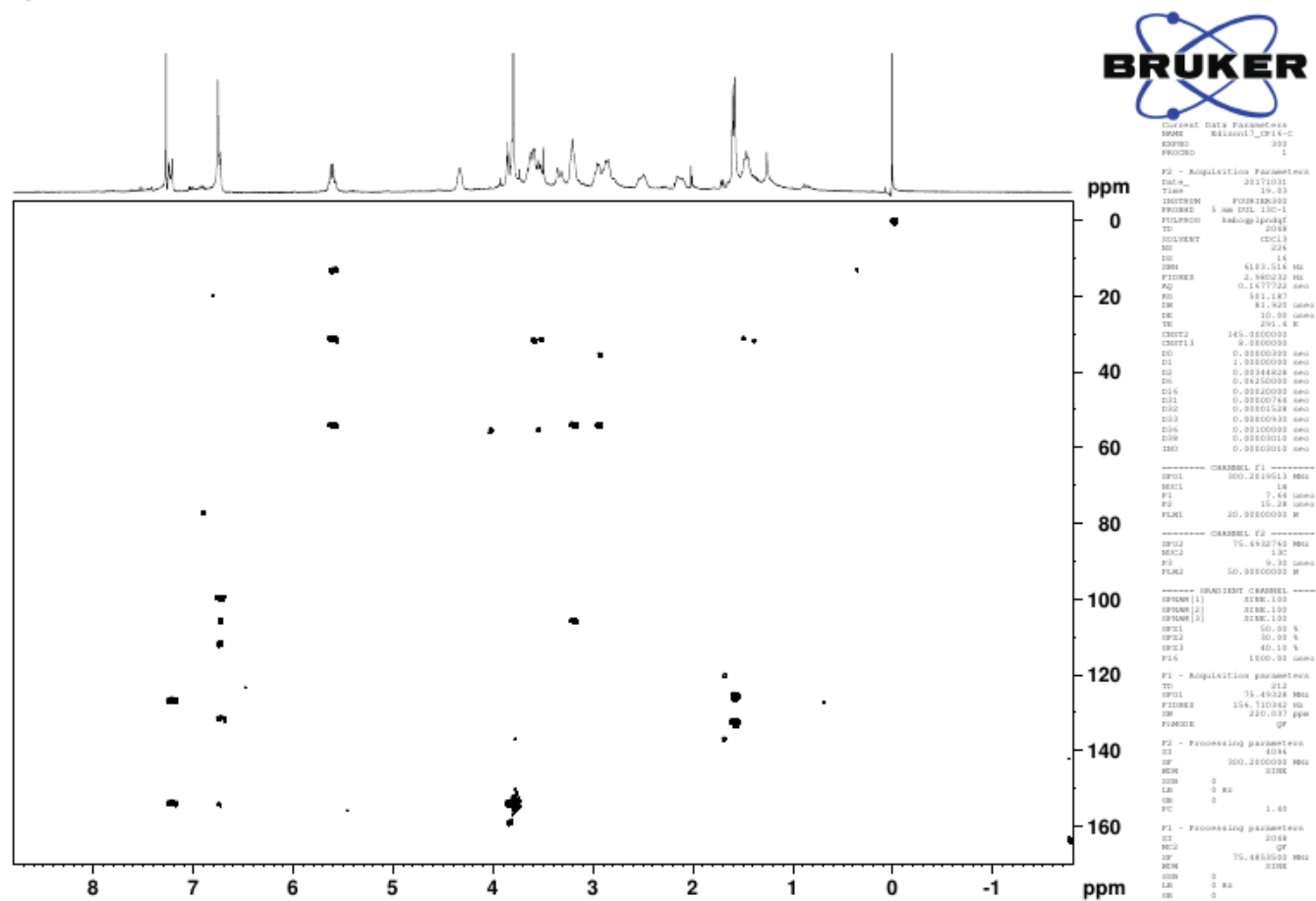
Anexo 197: Espectro de correlação ^1H - ^{13}C HSQC da 3 α , 15 α -10-metoxi-geissosquizol (**74**) (2FAC-7-A) em CDCl_3 (300 MHz).

2FAC-7-A_CP16-C (HSQCed, 6.0 mg; CDCl₃)
30/10/2017 Op. Zelina

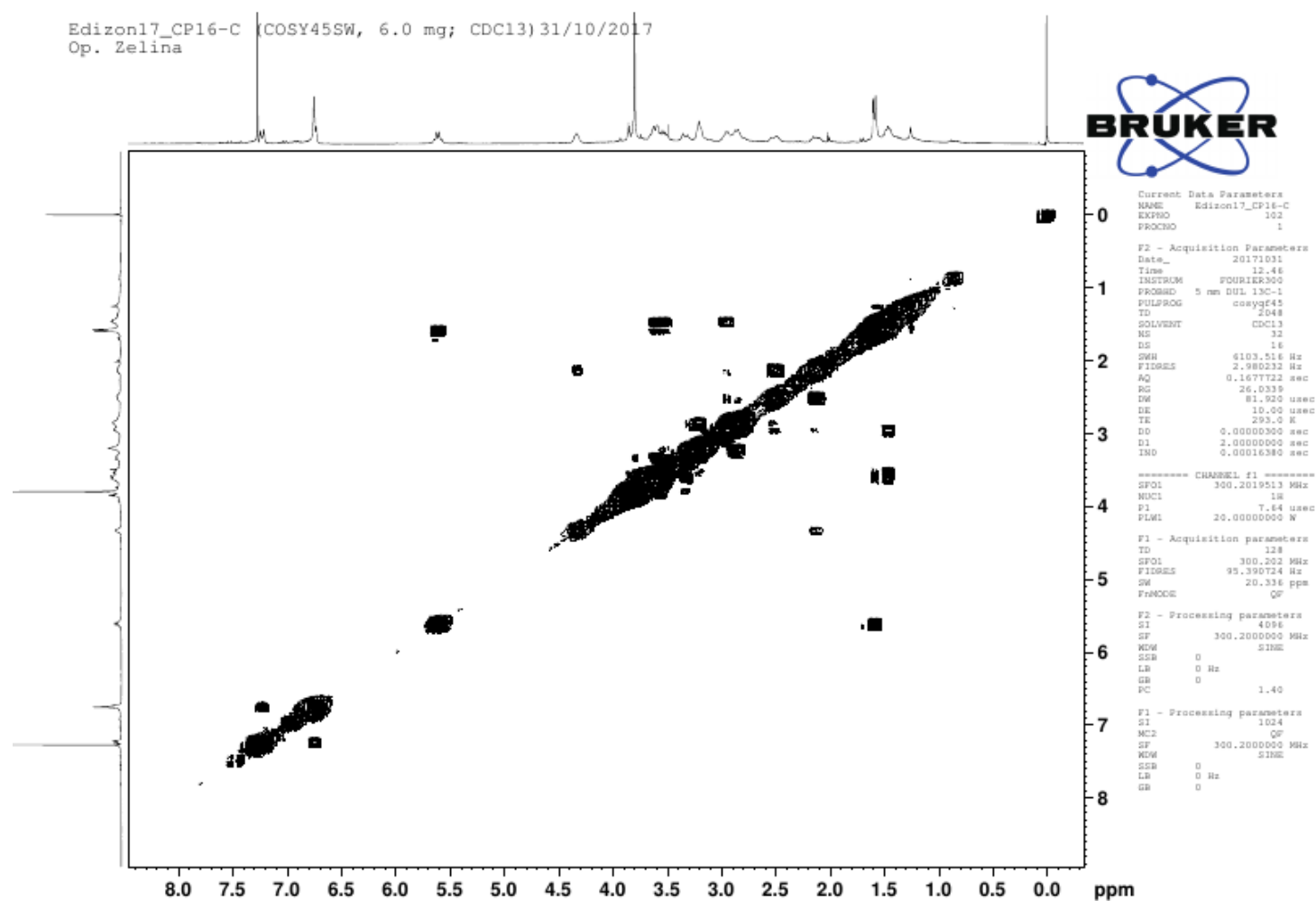


Anexo 38: Espectro de correlação ^1H - ^{13}C HMBC da 3 α , 15 α -10-metoxi-geissosquizol (74) (2FAC-7-A) em CDCl_3 (300 MHz).

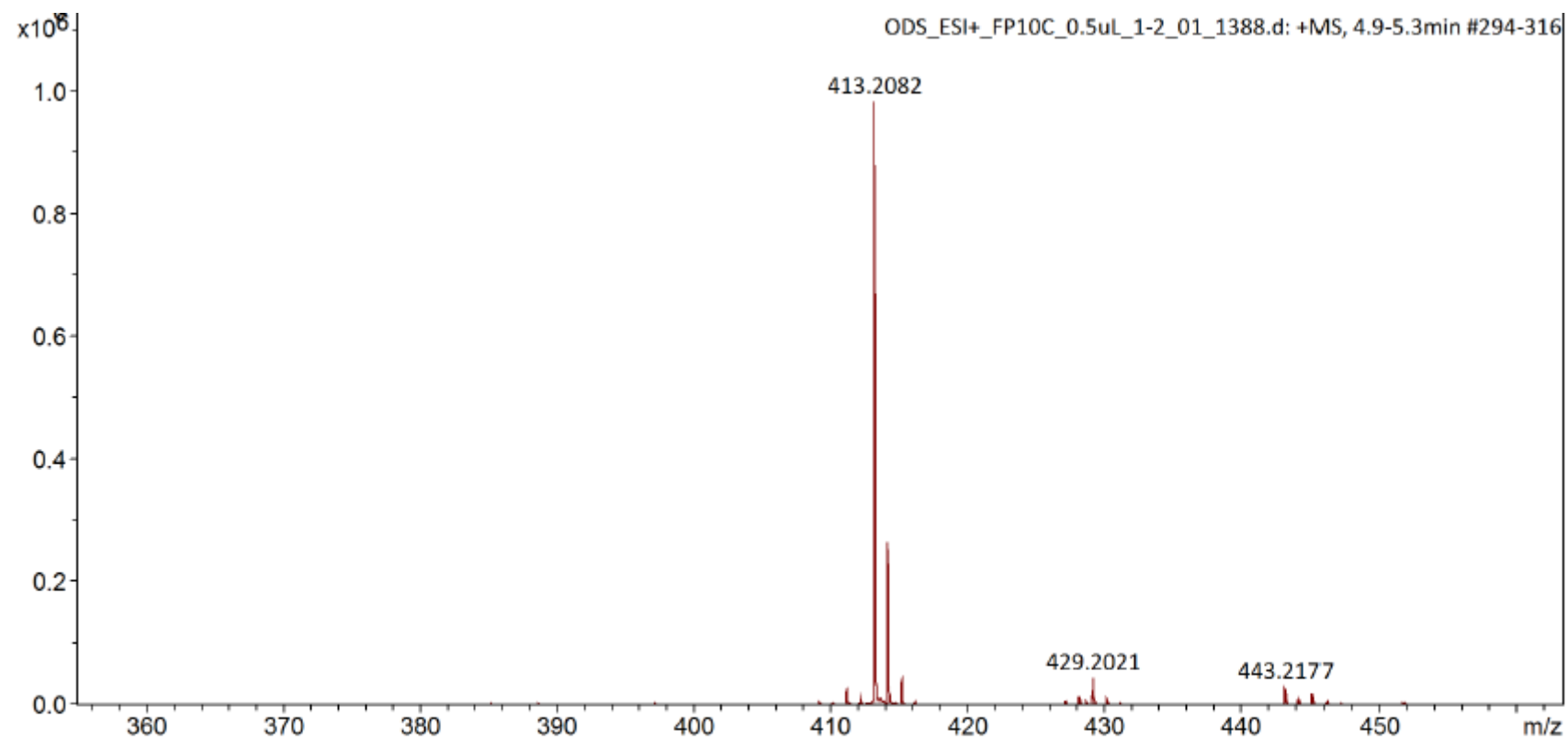
Edizon17_CP16-C (HMBC, 6.0 mg; CDCl_3) 31/10/2017
Op. Zelina



Anexo 39: Espectro de correlação ^1H - ^1H COSY da 3 α , 15 α -10-metoxi-geissosquizol (74) (2FAC-7-A) em CDCl_3 (300 MHz).

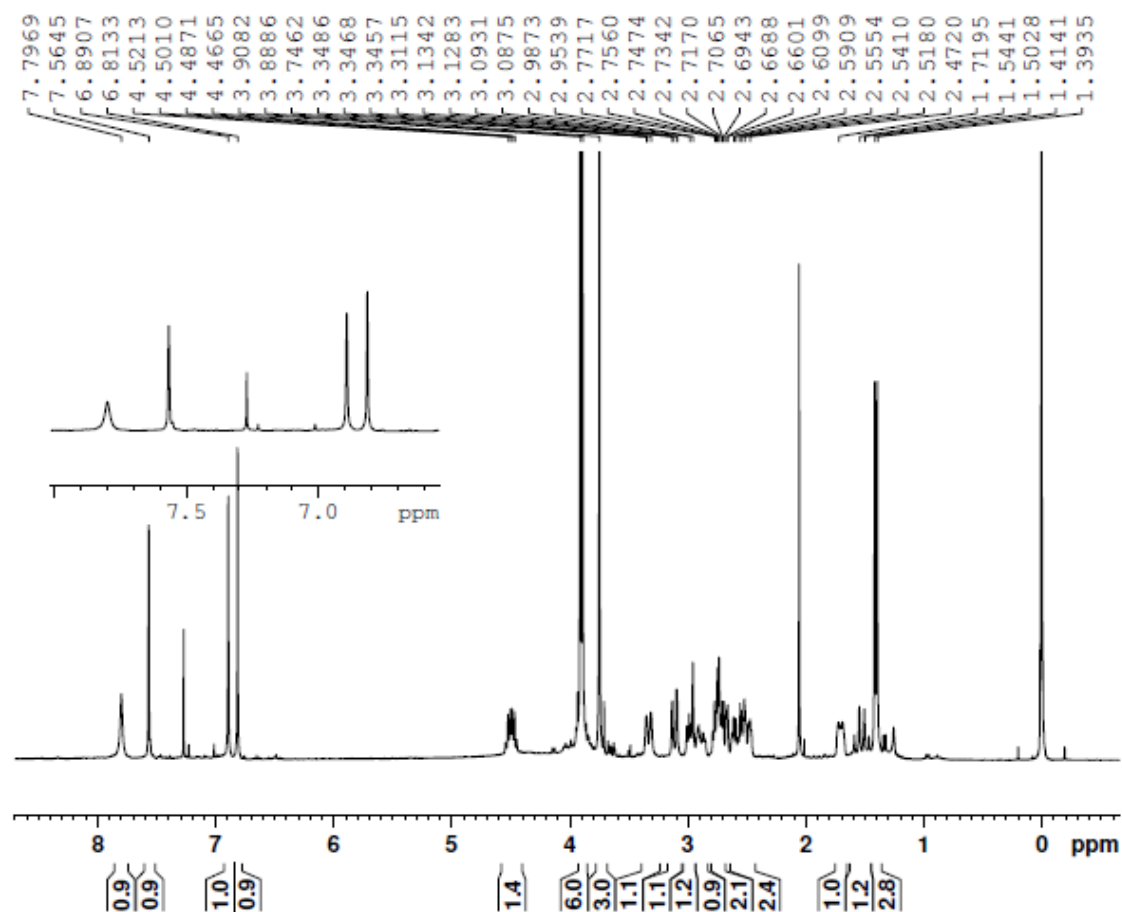


Anexo 40: Cromatograma de LC-HRMS da fração FrP1-B



Anexo 41: Espectro de RMN de ^1H da isoereserpilina (**47**) (FrP1-B) em CDCl_3 (300 MHz).

FrP1-B (14.8 mg; CDCl_3 ; ^1H) 07/08/18
Op. Zelina



Current Data Parameters
NAME Edizon18_FC13-B
EXPNO 14
PROCNO 1

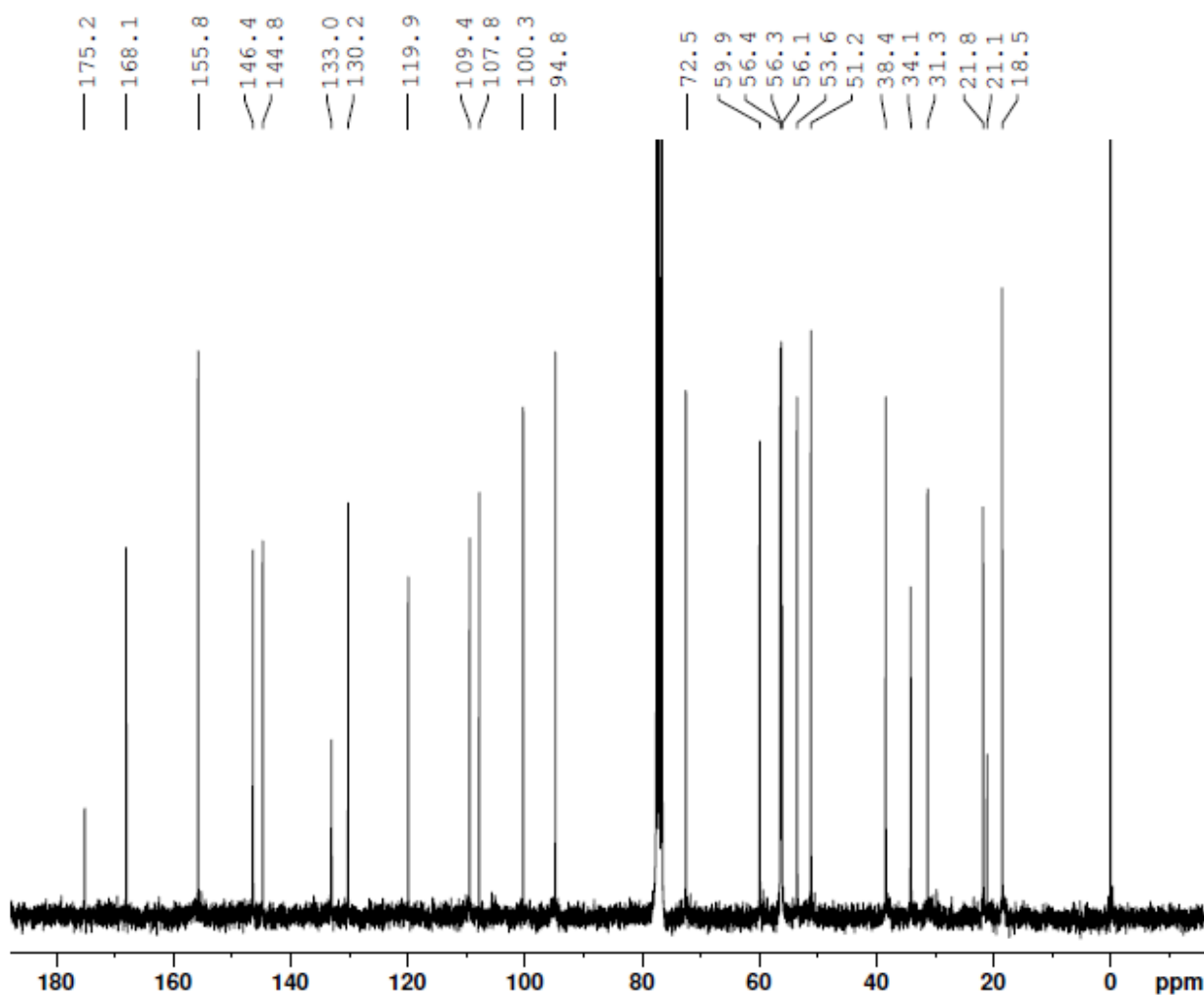
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20180807
Time 17.38
INSTRUM FOURIER300
PROBHD 5 mm DUL 13C-1
PULPROG zg
TD 65536
SOLVENT CDCl_3
NS 64
DS 1
SWH 6103.516 Hz
FIDRES 0.093132 Hz
AQ 5.3687091 sec
RG 11.3463
DW 81.920 usec
DE 10.00 usec
TE 292.2 K
D1 1.00000000 sec
TD0 1

===== CHANNEL f1 =====
SFO1 300.2019513 MHz
NUC1 ^1H
P1 7.88 usec
PLW1 20.00000000 W

F2 - Processing parameters
SI 65536
SF 300.2000000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0 Hz
GB 0
PC 1.00

Anexo 42: Espectro de correlação ^{13}C da issoreserpilina (**47**) (FrP1-B) em CDCl_3 (300 MHz).

FrP1-B(14.8 mg; CDCl_3 ; ^{13}C) 07/08/18 Op. Zelina



Current Data Parameters
NAME Edizon18_FC13-B
EXPNO 2
PROCNO 1

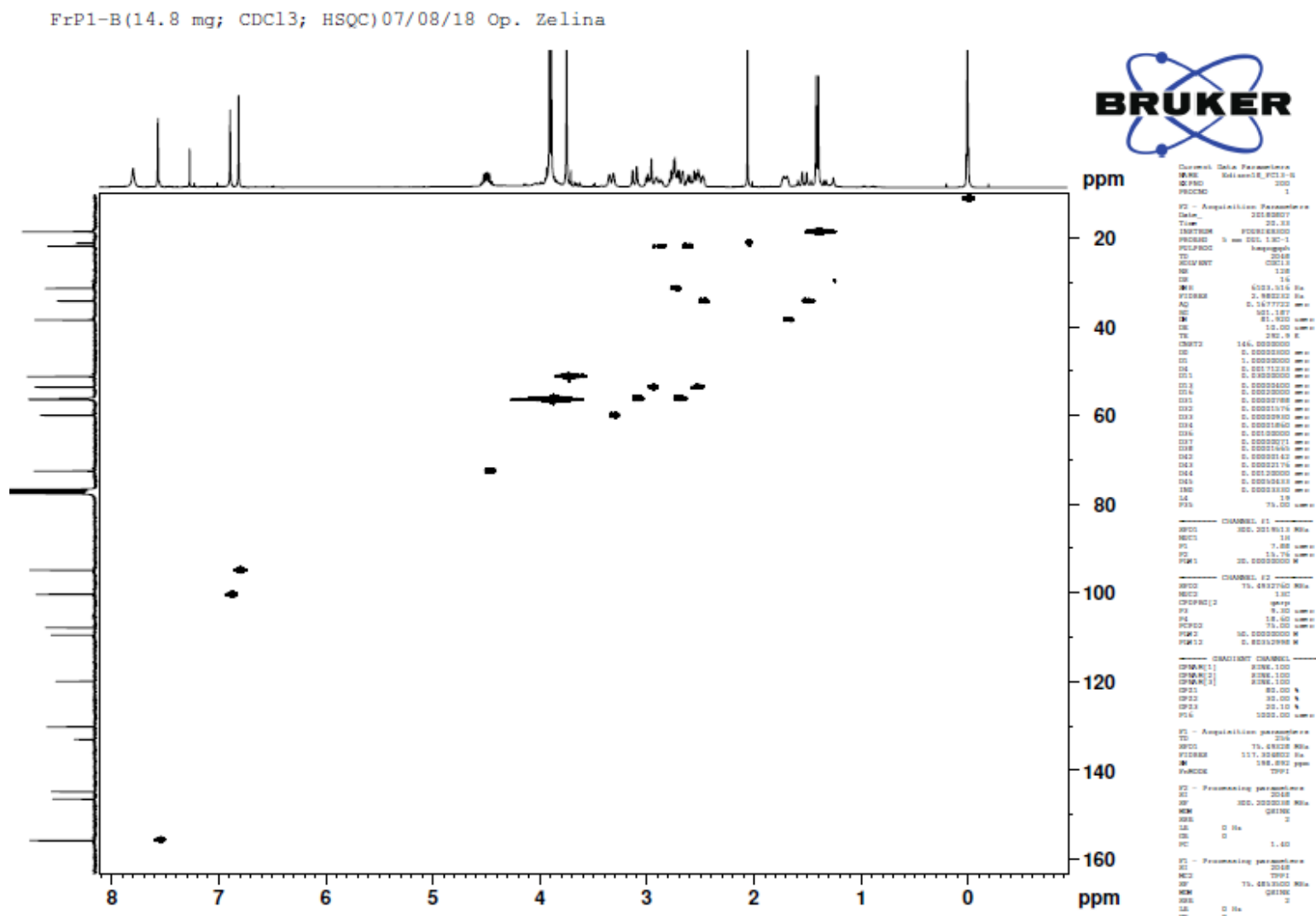
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20180808
Time 7.27
INSTRUM FOURIER300
PROBHD 5 mm DUL 13C-1
PULPROG zgpg30
TD 32768
SOLVENT CDCl_3
NS 30428
DS 0
SWH 24414.063 Hz
FIDRES 0.745058 Hz
AQ 0.6710886 sec
RG 501.187
DW 20.480 μs
DE 10.00 μs
TE 294.6 K
D1 0.40000001 sec
D11 0.03000000 sec
D31 0.00000875 sec
D40 0.01963016 sec
L4 20
L5 11
P32 90.00 μs
TD0 1

CHANNEL f1
SFO1 75.4928982 MHz
NUC1 ^{13}C
P1 8.75 μs
PLW1 50.00299835 W

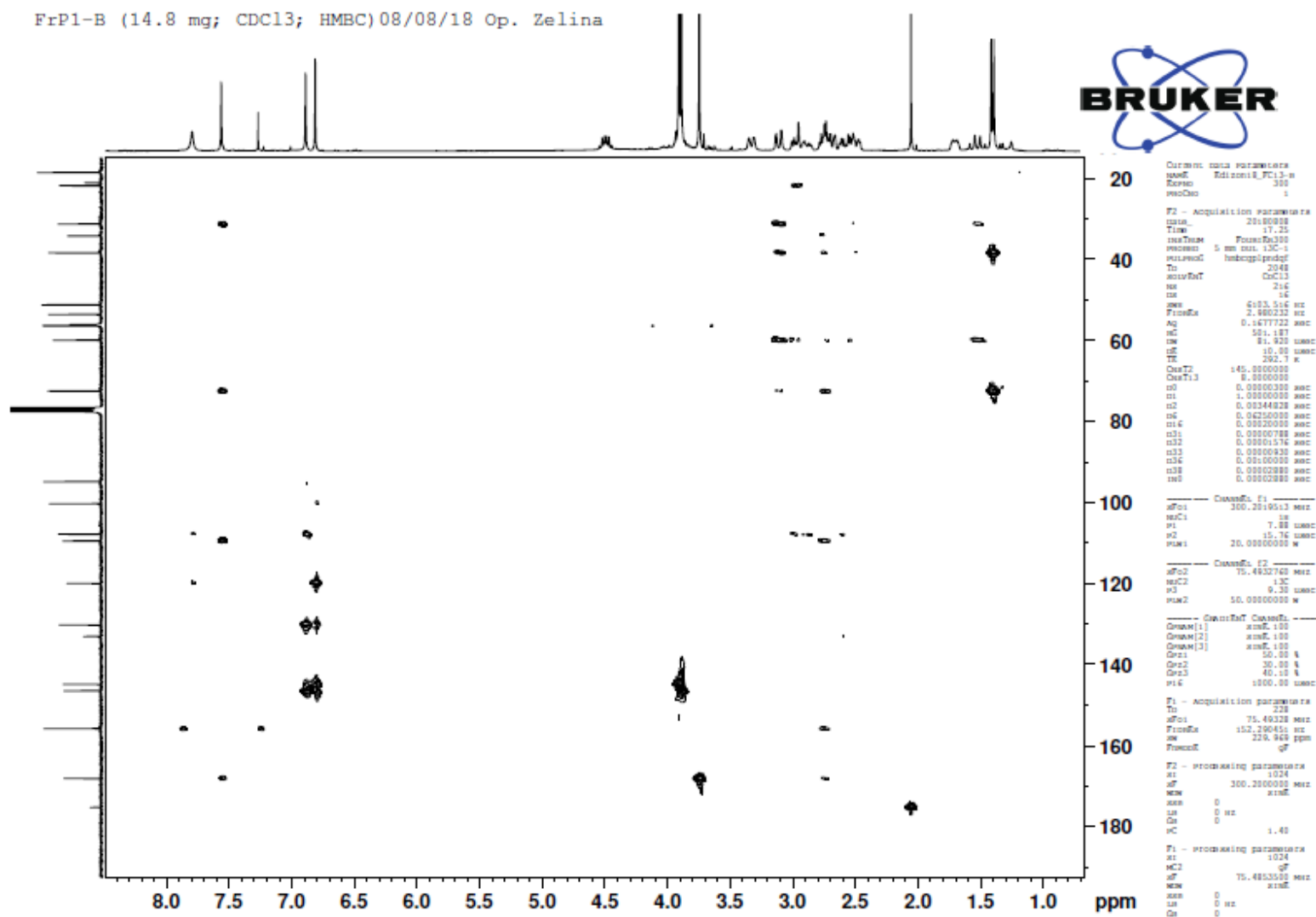
CHANNEL f2
SFO2 300.2012008 MHz
NUC2 ^1H
CPDPRG2 waltz16
PCPD2 90.00 μs
PLW2 20.00000000 W
PLW12 0.16806000 W
PLW13 0.13613001 W

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 75.4853500 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

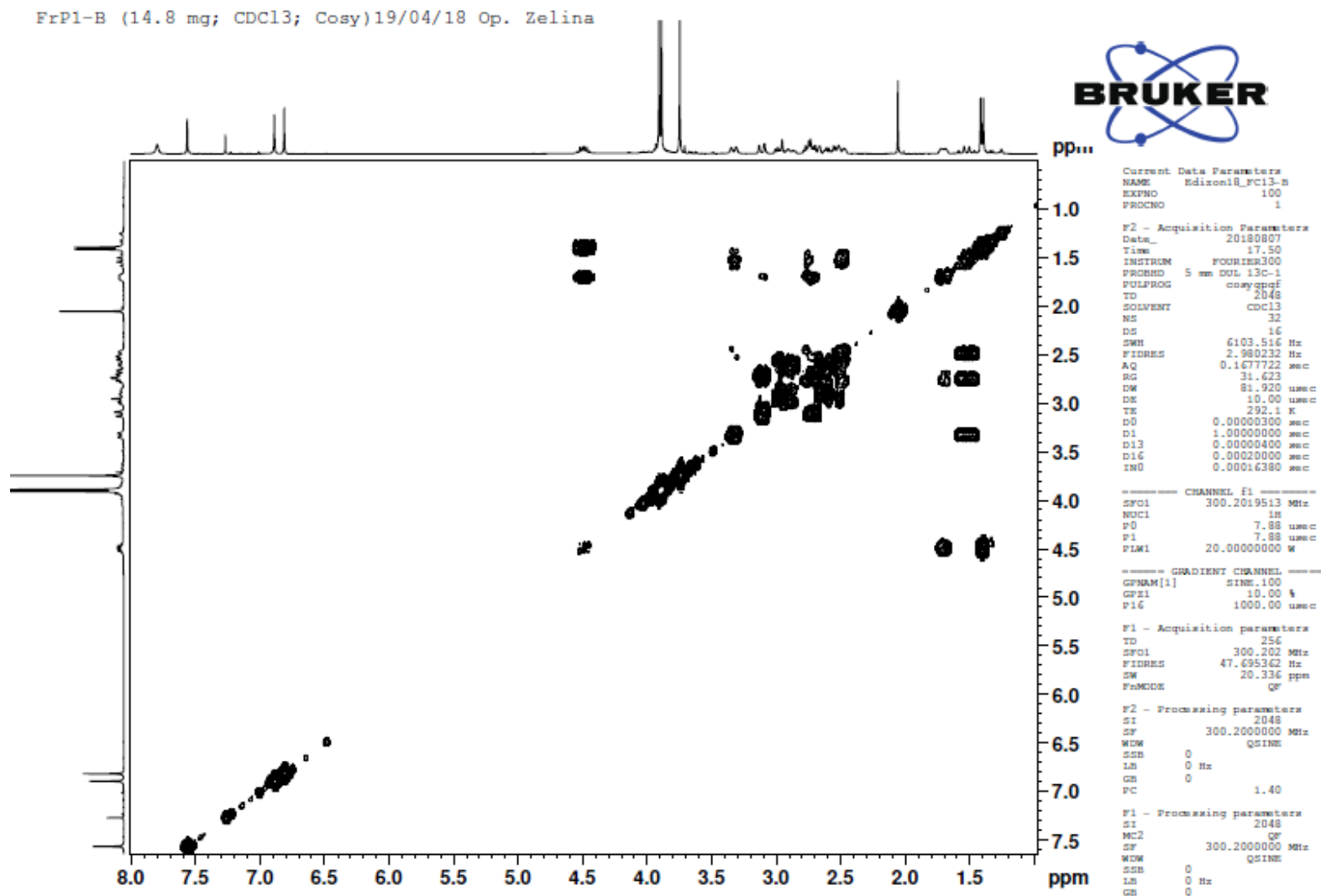
Anexo 43: Espectro de correlação ^1H - ^{13}C HSQC isoreserpilina (**47**) (FrP1-B) em CDCl_3 (300 MHz).



Anexo 44: Espectro de correlação ^1H - ^{13}C HMBC da isoreserpilina (47) (FrP1-B) em CDCl_3 (300 MHz).

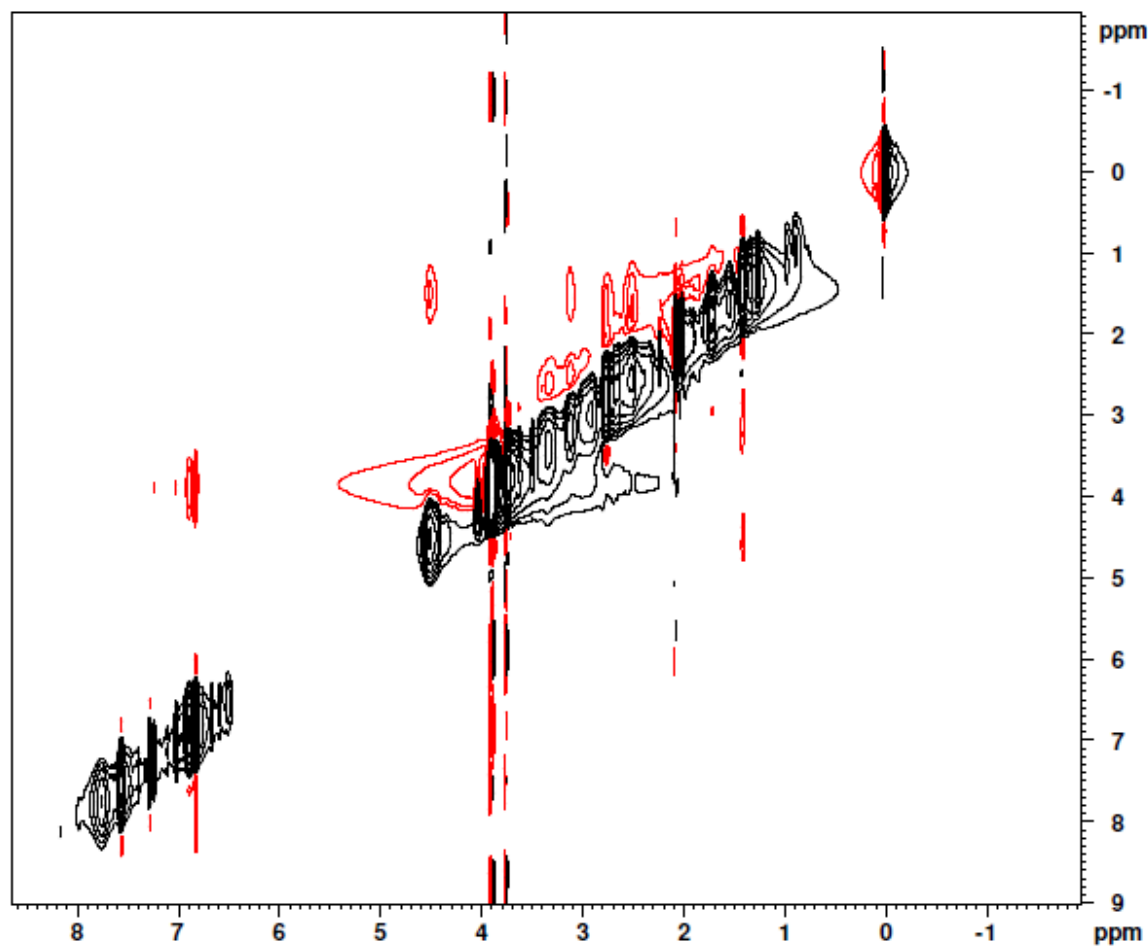


Anexo 45: Espectro de correlação ^1H - ^1H COSY da isoreserpilina (47) (FrP1-B) em CDCl_3 (300 MHz).



Anexo 46: Espectro de correlação ^1H - ^1H NOESY da isoreserpilina (47) (FrP1-B) em CDCl_3 (500 MHz).

NOESY_1H-1H Amostra: FrP1-B Solv: CDC13 OP: KIDNEY



Current Data Parameters
NAME 189-797-18_EDSON_VEIGA
EXPNO 400
PROCNO 1

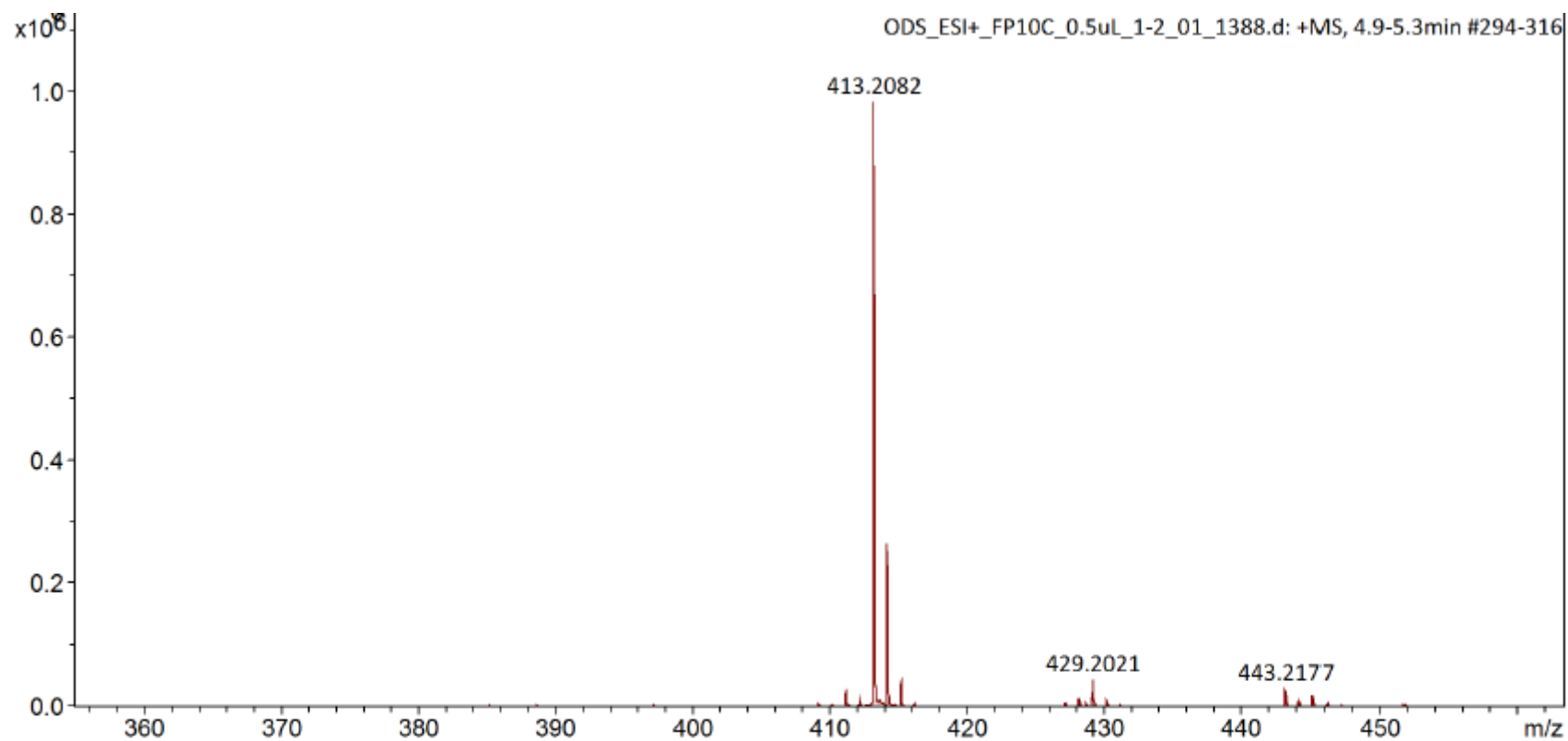
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20181016
Time 11.53 h
INSTRUM spect
PROBHD x119470_0223 (
PULPROG noeyzgpgpg
TD 2048
SOLVENT CDC13
NS 64
DS 8
SWH 7716.049 Hz
FIDRES 3.767602 Hz
AQ 0.1327104 sec
RG 104.08
DM 64.800 usec
DE 10.00 usec
TE 298.1 K
D0 0.00005283 sec
D1 2.00000000 sec
D8 0.50000000 sec
D11 0.03000000 sec
D12 0.00002000 sec
D16 0.00020000 sec
INO 0.00012960 sec
TDaw 1
SFO1 500.1328104 MHz
NUC1 1H
P1 9.40 usec
P2 18.80 usec
P17 2500.00 usec
P1M1 20.32299995 W
P1M10 1.99530005 W
GPMAM[1] SMSG10.100
GPE1 40.00 %
P1G 1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD 64
SFO1 500.1328 MHz
FIDRES 241.126541 Hz
SW 15.428 ppm
F2MODE States-TPPI

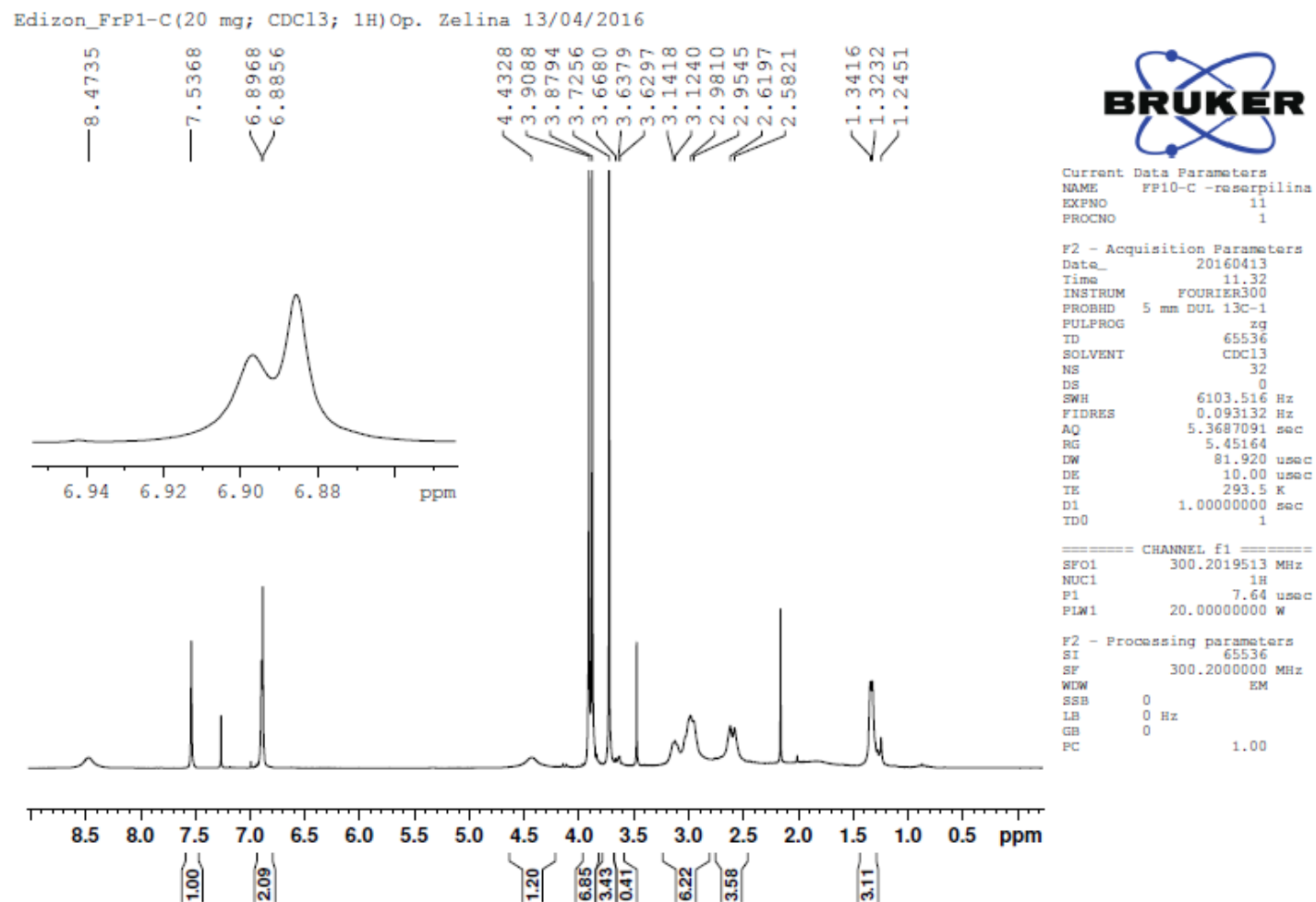
F2 - Processing parameters
SI 4096
SF 500.1300000 MHz
WDW QSINE
SSB 2
LB 0 Hz
GB 0
PC 1.00

F1 - Processing parameters
SI 1024
MC2 States-TPPI
SF 500.1300000 MHz
WDW QSINE
SSB 2
LB 0 Hz
GB 0

Anexo 47: Cromatograma de LC-HRMS da fração FrP1-C.

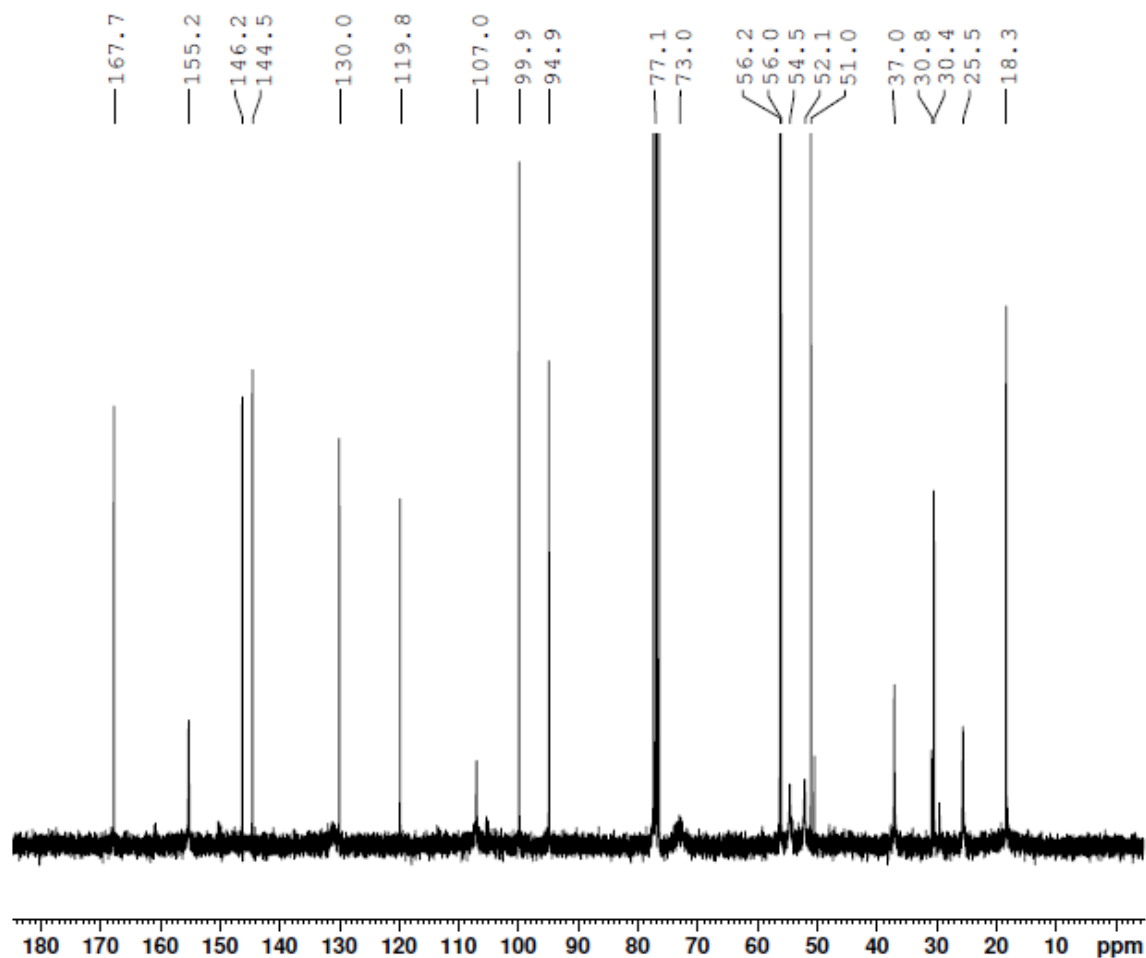


Anexo 48: Espectro de RMN de ^1H da reserpilina (**48**) (FrP1-C) em CDCl_3 (300 MHz).



Anexo 49: Espectro de correlação ^{13}C carbono da reserpilina (FrP1-C) em CDCl_3 (300 MHz).

Edizon_FrP1-C(20 mg; CDCl_3 ; ^{13}C)Op. Zelina 13/04/2016



Current Data Parameters
NAME FP10-C -reserpilina
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20160414
Time 3.27
INSTRUM FOURIER300
PROBHD 5 mm DUL 13C-1
PULPROG zgpg30
TD 32768
SOLVENT CDCl_3
NS 13372
DS 0
SWH 24414.063 Hz
FIDRES 0.745058 Hz
AQ 0.6710886 sec
RG 501.187
DW 20.480 usec
DE 10.00 usec
TE 292.7 K
D1 0.50000000 sec
D11 0.03000000 sec
D31 0.00000875 sec
D40 0.01589210 sec
L4 20
L5 14
P32 90.00 usec
TD0 1

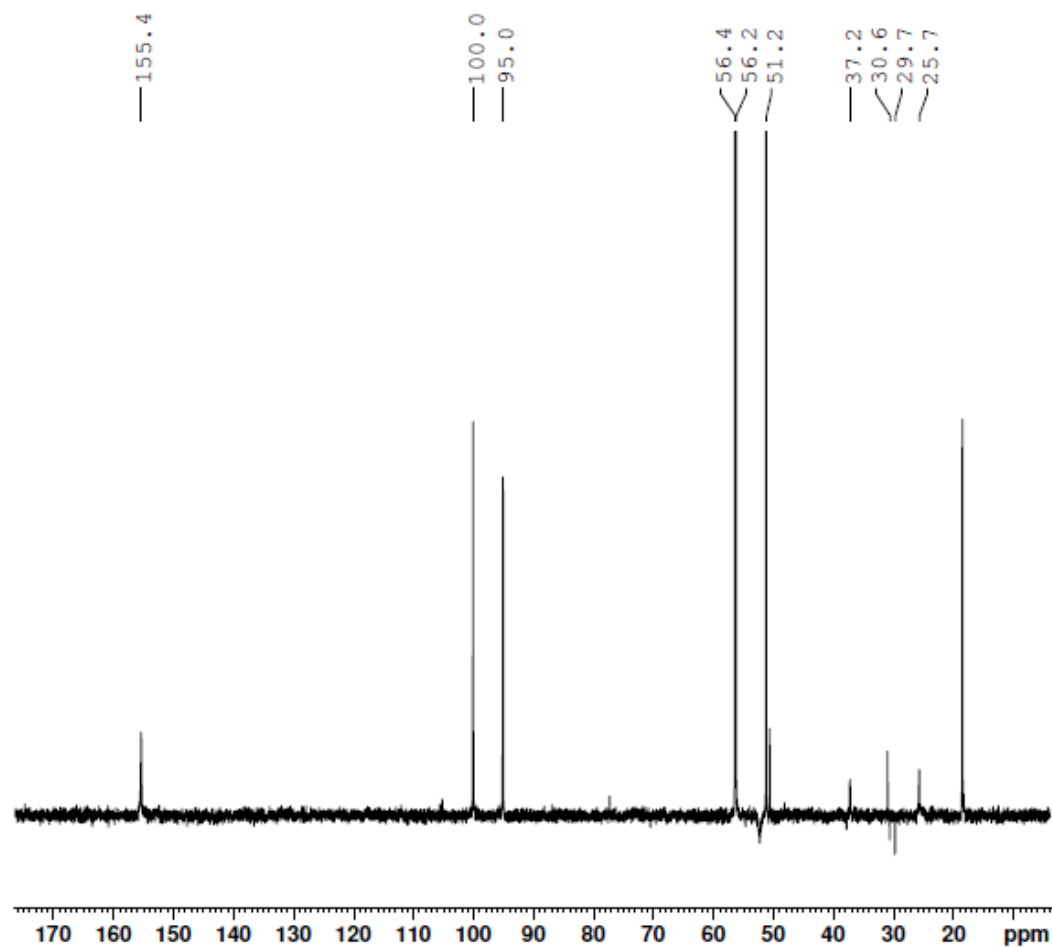
----- CHANNEL f1 -----
SFO1 75.4928982 MHz
NUC1 ^{13}C
P1 8.75 usec
PLW1 50.00299835 W

----- CHANNEL f2 -----
SFO2 300.2012008 MHz
NUC2 ^1H
PCPD2 waltz16
PCPD2 90.00 usec
PLW2 20.00000000 W
PLW12 0.16806000 W
PLW13 0.13613001 W

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 75.4853647 MHz
WDW no
SSB 0
LB 0 Hz
GB 0
PC 1.40

Anexo 50: Espectro de DEPT 135 da reserpilina (FrP1-C) em CDCl_3 (300 MHz).

Edizon_FrP1-C(20 mg; CDCl_3 ; Dept135)Op. Zelina 3/04/2016



C1
NAME FrP10-C - reserpilina
EXPNO 4
PROCNO 1

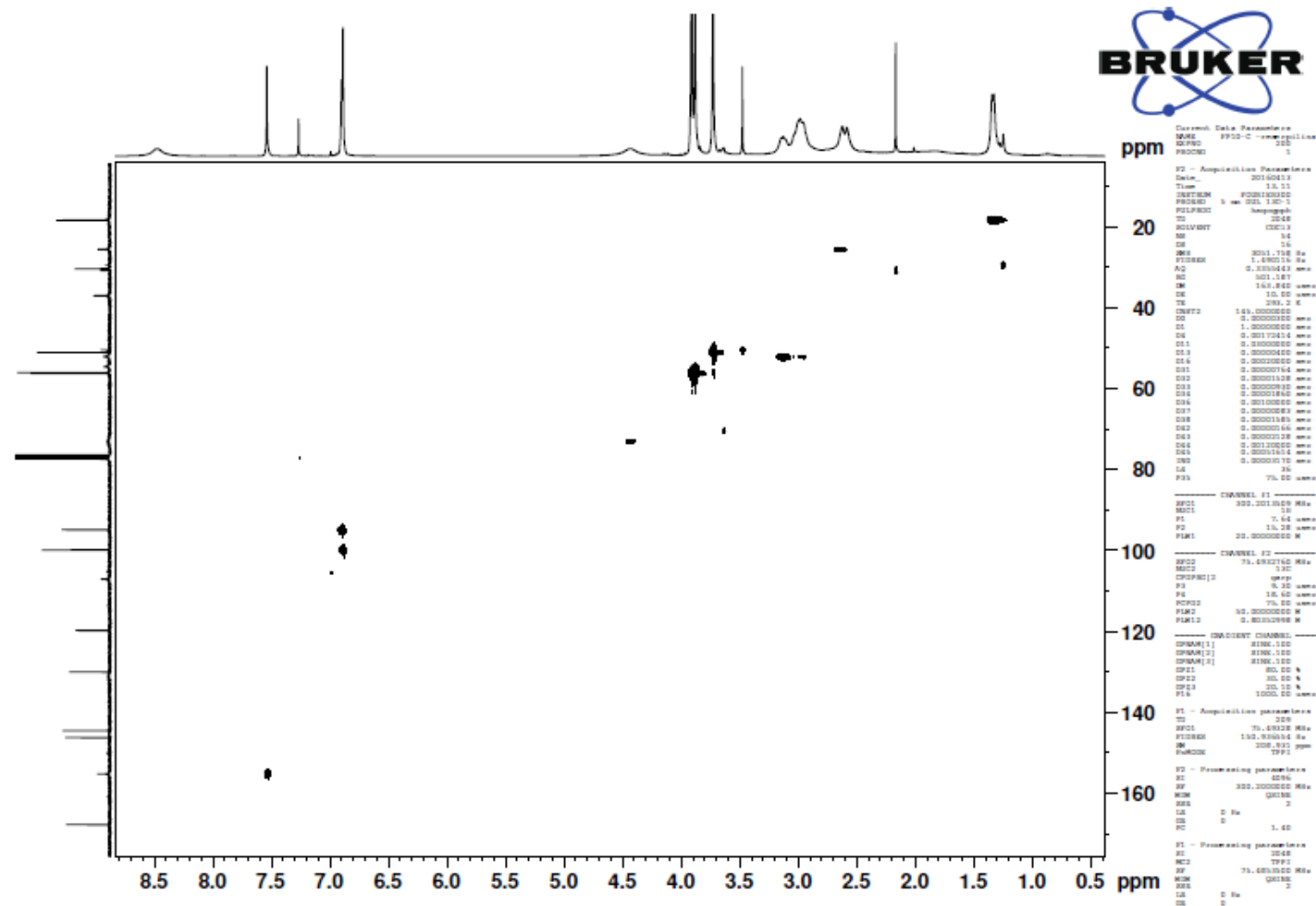
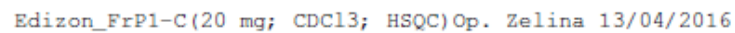
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20160413
Time 17.28
INSTRUM FOURIER300
PROBHD 5 mm DUL 13C-1
PULPROG dapt135
TD 65536
SOLVENT CDCl_3
NS 2048
DS 8
SWH 24414.063 Hz
FIDRES 0.372529 Hz
AQ 1.3421773 sec
RG 501.187
DW 20.480 usec
DE 10.00 usec
TE 295.2 K
CNS12 145.0000000
D1 2.00000000 sec
D2 0.00344828 sec
D14 0.00001114 sec
D33 0.00000825 sec
D34 0.00344053 sec
D35 0.00345340 sec
L4 40
P32 90.00 usec
TD0 1

----- CHANNEL f1 -----
SFO1 75.4932760 MHz
NUC1 ^{13}C
P1 8.75 usec
P2 17.50 usec
PLW1 50.00299835 W

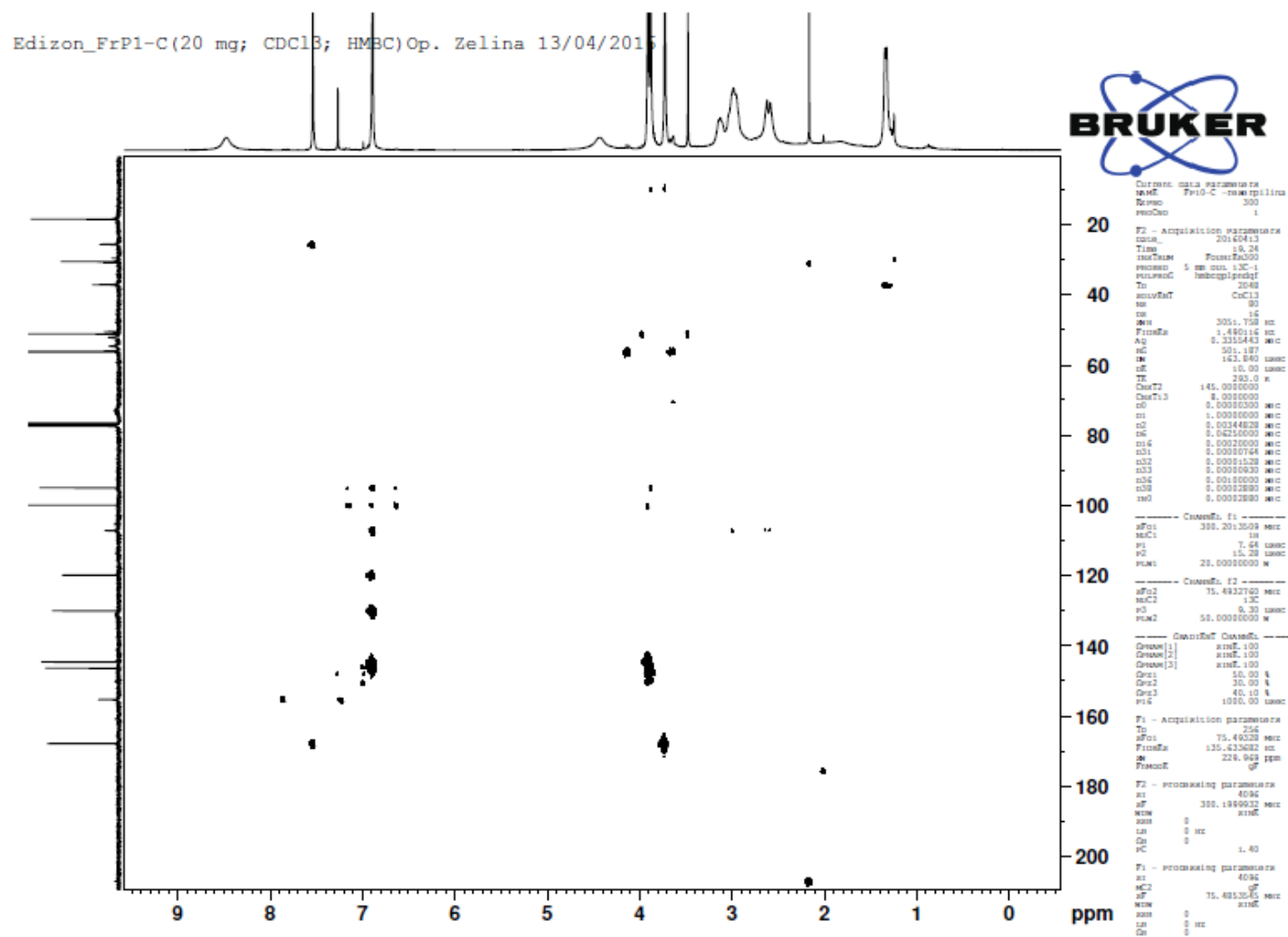
----- CHANNEL f2 -----
SFO2 300.2009601 MHz
NUC2 ^1H
CPDPRG2 waltz16
P3 8.25 usec
P4 16.50 usec
PCPD2 90.00 usec
PLW2 20.00000000 W
PLW12 0.16806000 W

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 75.4853500 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

Anexo 51: Espectro de correlação ^1H - ^{13}C HSQC reserpilina (FrP1-C) em CDCl_3 (300 MHz).

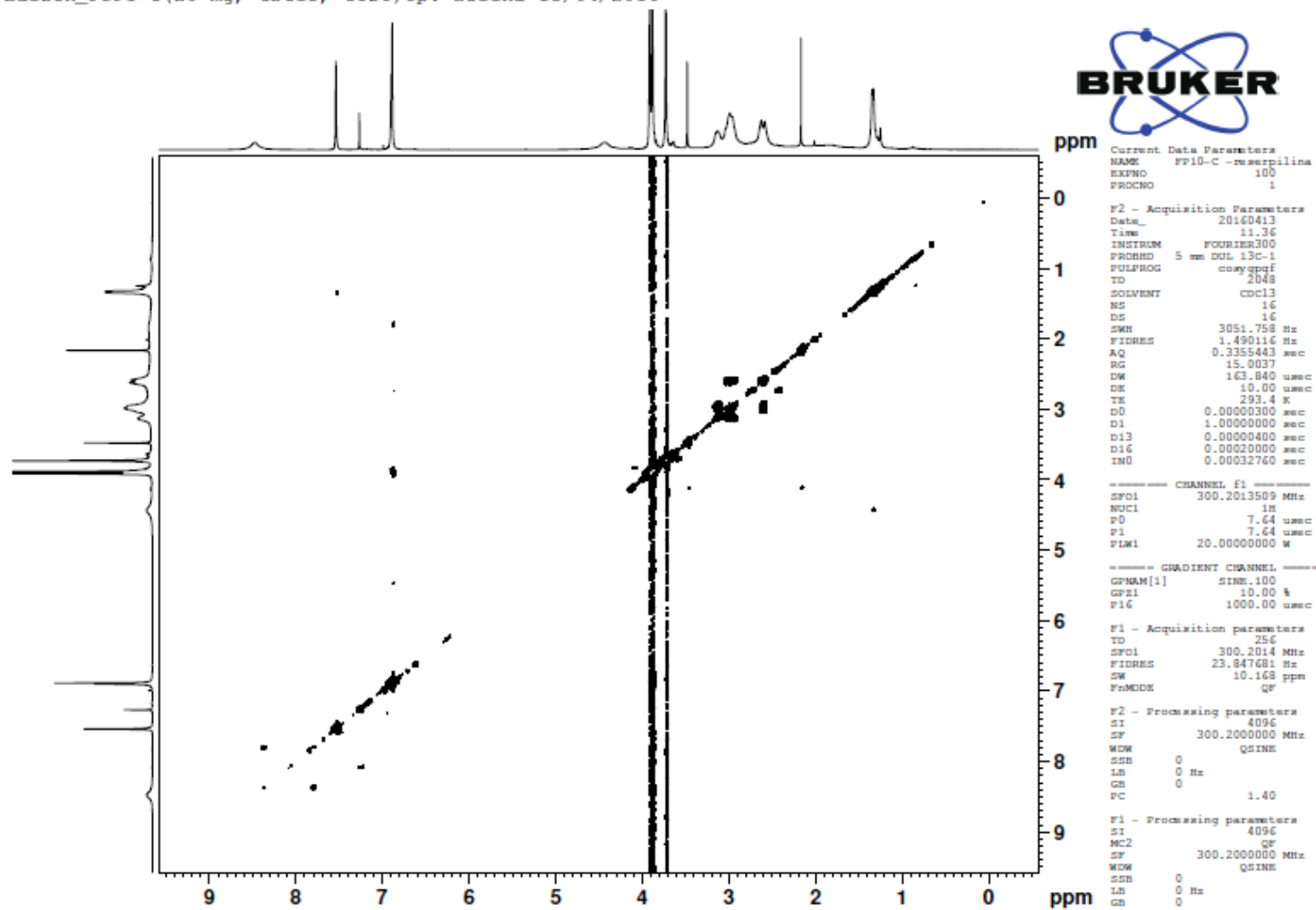


Anexo52: Espectro de correlação ^1H - ^{13}C HMBC da reserpilina (FrP1-C) (FBC-3-A) em CDCl_3 (300 MHz).

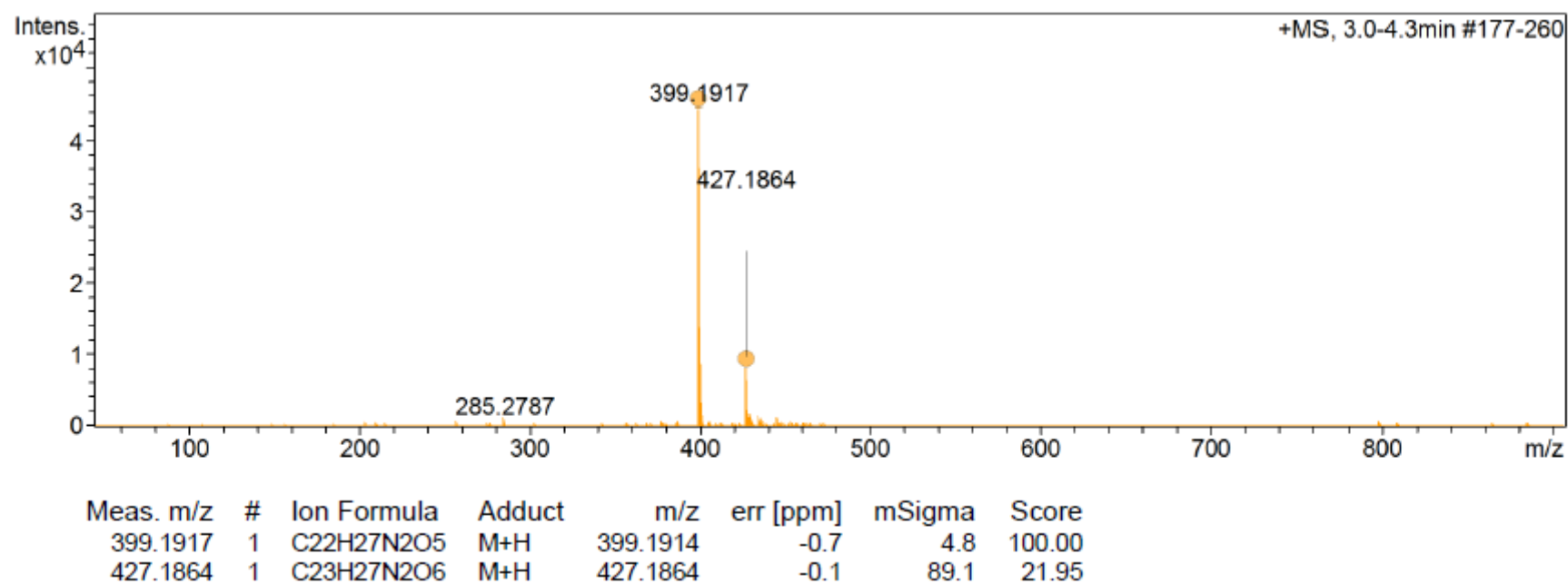


Anexo53: Espectro de correlação ^1H - ^1H COSY da reserpilina (FrP1-C) (FBC-3-A) em CDCl_3 (300 MHz).

Edizon_FrP1-C(20 mg; CDCl_3 ; COSY)Op. Zelina 13/04/2016

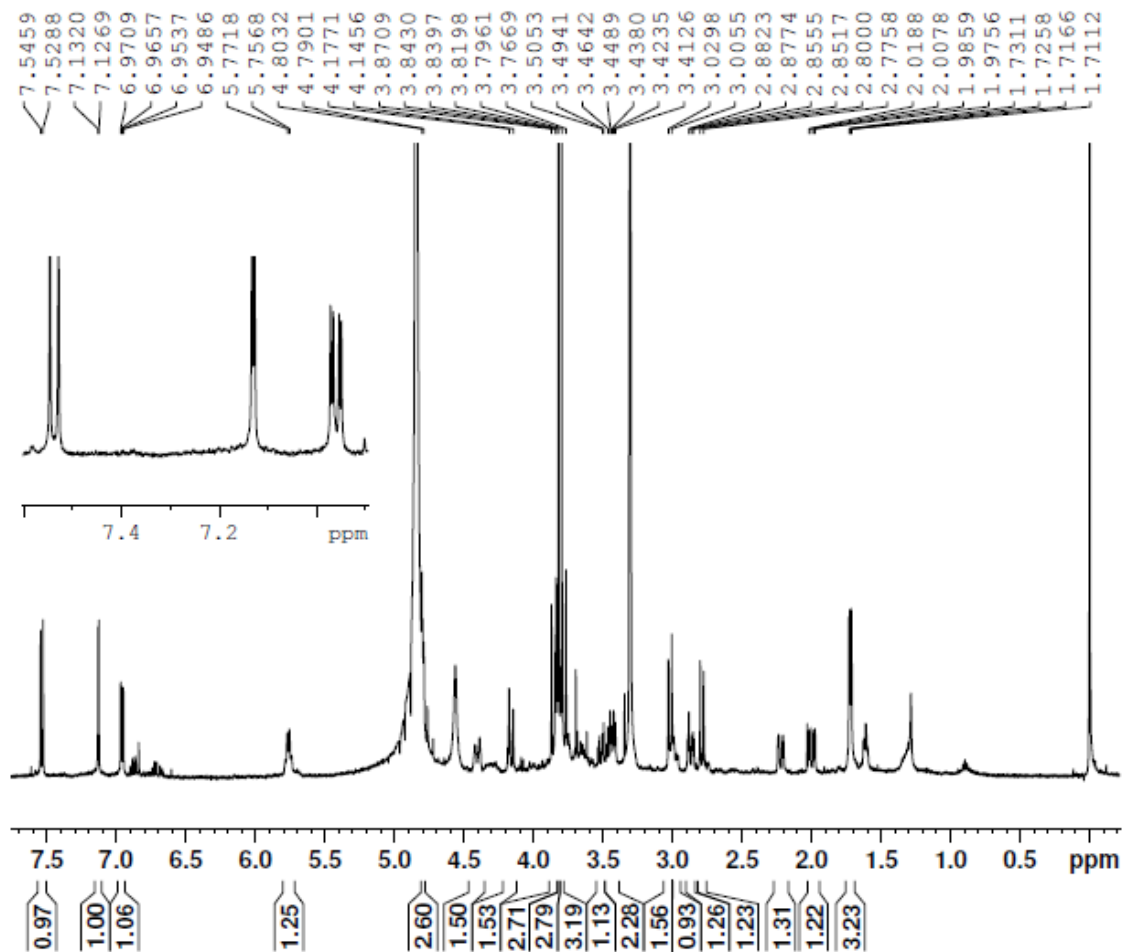


Anexo 54: Cromatograma de LC-HRMS da substância 2FBC-4-A.



Anexo 55: Espectro de RMN de ^1H da substância 2F BC-4-A. em MeOD (500 MHz).

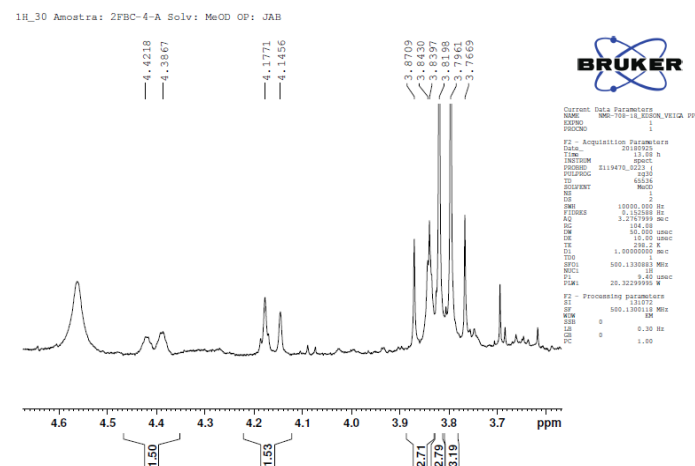
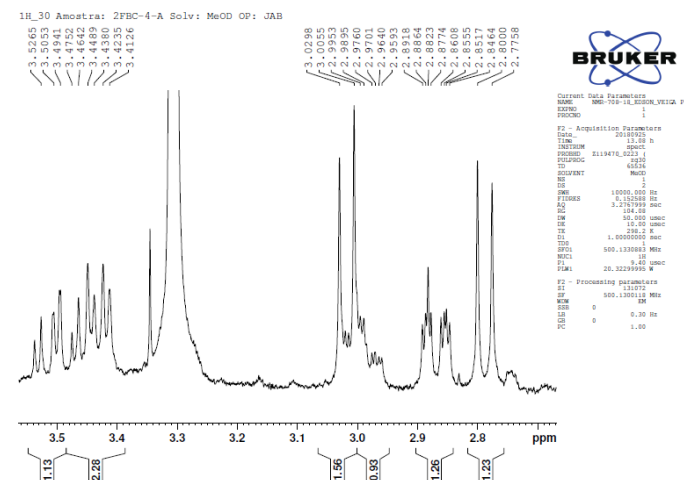
1H_30 Amostra: 2FBC-4-A Solv: MeOD OP: JAB



Current Data Parameters
NAME NMR-708-18_EDSON_VEIGA_PP
EXPNO 1
PROCNO 1

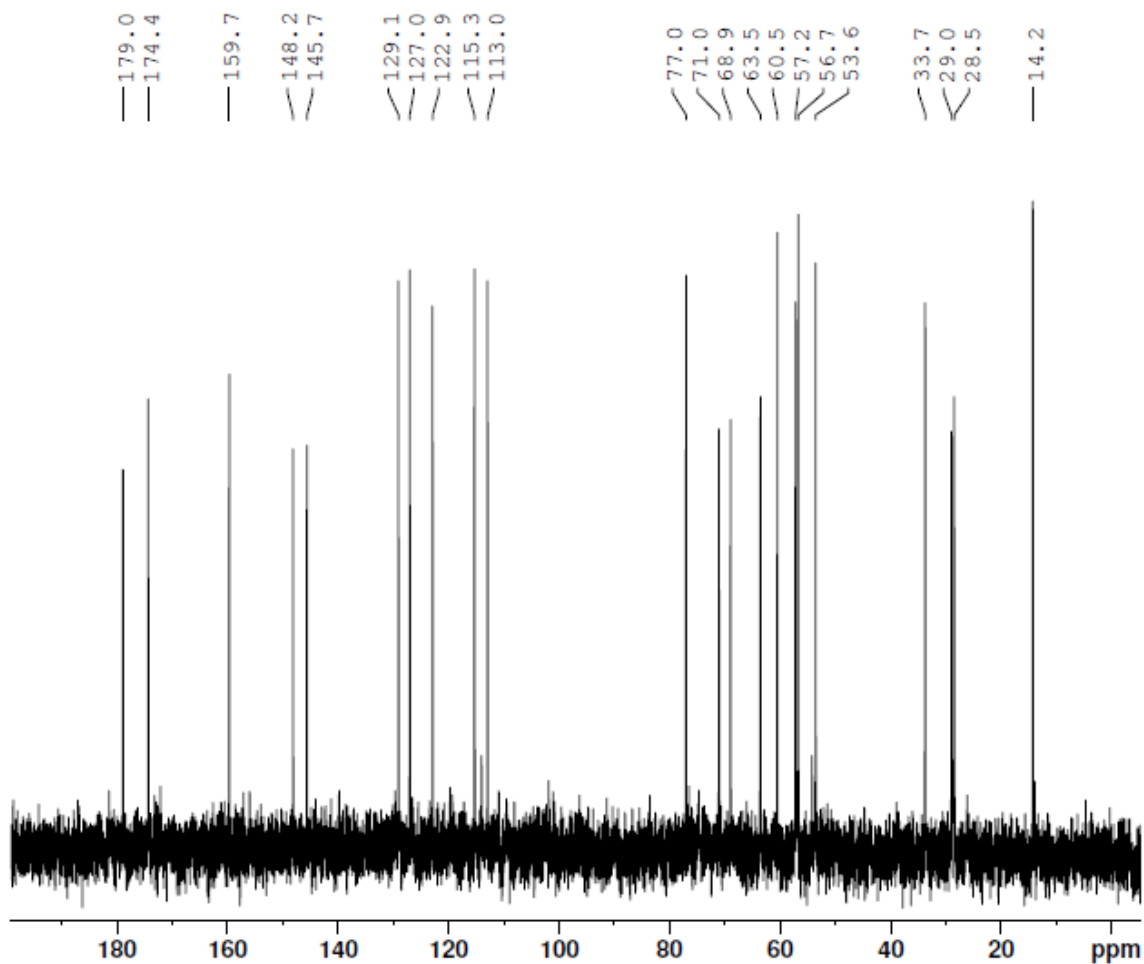
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20180925
Time 13.08 h
INSTRUM spect
PROBHD Z119470_0223 (1
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT MeOD
NS 1
DS 2
SWH 10000.000 Hz
FIDRES 0.152588 Hz
AQ 3.2767999 sec
RG 104.08
DW 50.000 usec
DE 10.00 usec
TE 298.2 K
D1 1.00000000 sec
TDO 1
SFO1 500.1330883 MHz
NUC1 1H
P1 9.40 usec
PLW1 20.32299995 W

F2 - Processing parameters
SI 131072
SF 500.1300118 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00



Anexo 57: Espectro de RMN de ^{13}C da substância 2F BC-4-A. em MeOD (300 MHz).

Edizon_2FBC-4-A (9 mg, ^{13}C , (D₂O) 11/03/2016 Op. Zelina



Current Data Parameters
NAME Edizon18_H-B
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20160311
Time 15.04
INSTRUM FOURIER300
PROBHD 5 mm DUL 13C-1
PULPROG zgpg30
TD 32768
SOLVENT D2O
NS 11964
DS 4
SWH 24414.063 Hz
FIDRES 0.745058 Hz
AQ 0.6710886 sec
RG 501.187
DW 20.480 usec
DE 10.00 usec
TE 978.0 K
D1 0.10000000 sec
D11 0.03000000 sec
D31 0.00000875 sec
D40 0.03084430 sec
L4 20
L5 2
P32 90.00 usec
TD0 1

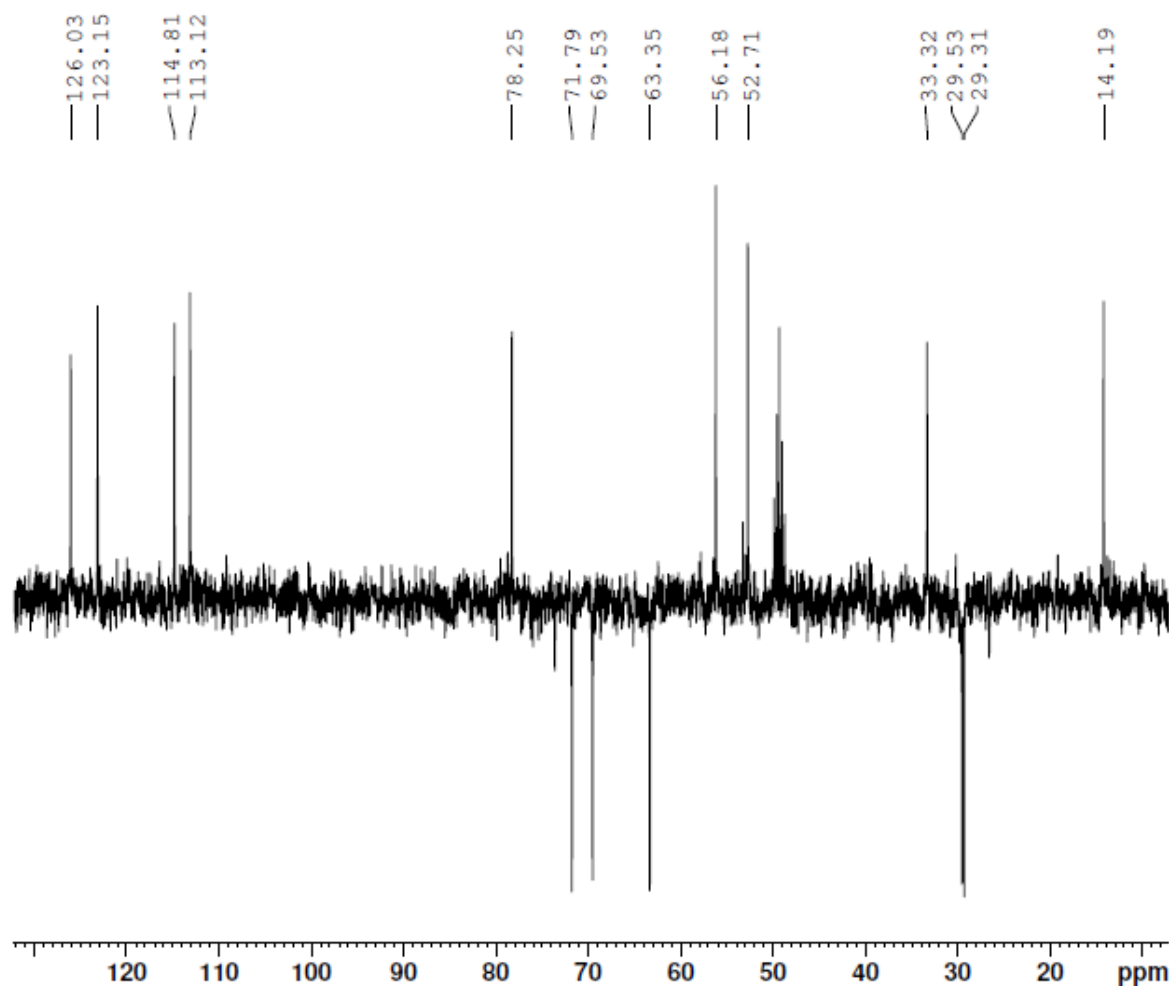
----- CHANNEL f1 -----
SFO1 75.4933511 MHz
NUC1 ^{13}C
P1 8.75 usec
PLW1 50.00299835 W

----- CHANNEL f2 -----
SFO2 300.2012008 MHz
NUC2 ^1H
CPDPRG2 waltz16
PCPD2 90.00 usec
PLW2 20.00000000 W
PLW12 0.16806000 W
PLW13 0.13613001 W

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 75.4852717 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

Anexo 58: Espectro de RMN de DEPT135 da substância 2F BC-4-A. em MeOD (300 MHz).

Edizon18_2FBC-4-A (Dept 135, ~ 1,0 mg, MeOD)21/08/2018
Op. Zelina



Current Data Parameters
NAME Edizon18_H-B
EXPNO 4
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20180821
Time 11.12
INSTRUM FOURIER300
PROBHD 5 mm DUL 13C-1
PULPROG dept135
TD 65536
SOLVENT MeOD
NS 4192
DS 8
SWH 24414.063 Hz
FIDRES 0.372529 Hz
AQ 1.3421773 sec
RG 501.187
DW 20.480 usec
DE 10.00 usec
TE 1032.1 K
CNST2 145.0000000
D1 2.00000000 sec
D2 0.00344828 sec
D14 0.00001114 sec
D33 0.00000825 sec
D34 0.00344053 sec
D35 0.00345340 sec
L4 40
P32 90.00 usec
TD0 1

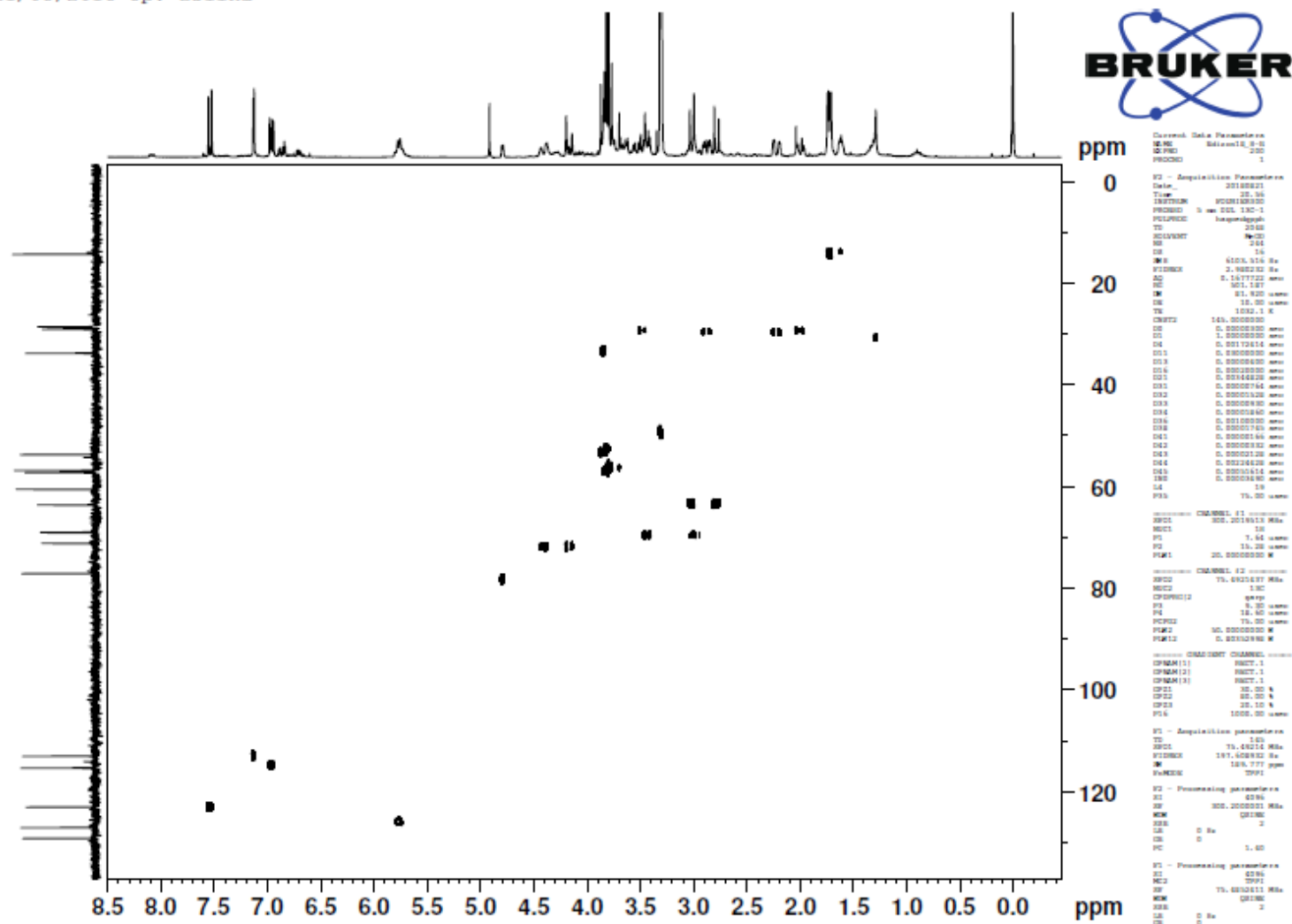
----- CHANNEL f1 -----
SFO1 75.4913881 MHz
NUC1 13C
P1 8.75 usec
P2 17.50 usec
PLW1 50.00299835 W

----- CHANNEL f2 -----
SFO2 300.2009601 MHz
NUC2 1H
CPDPRG2 waltz16
P3 8.25 usec
P4 16.50 usec
PCPD2 90.00 usec
PLW2 20.00000000 W
PLW12 0.16806000 W

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 75.4852411 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 2.00 Hz
GB 0
PC 1.40

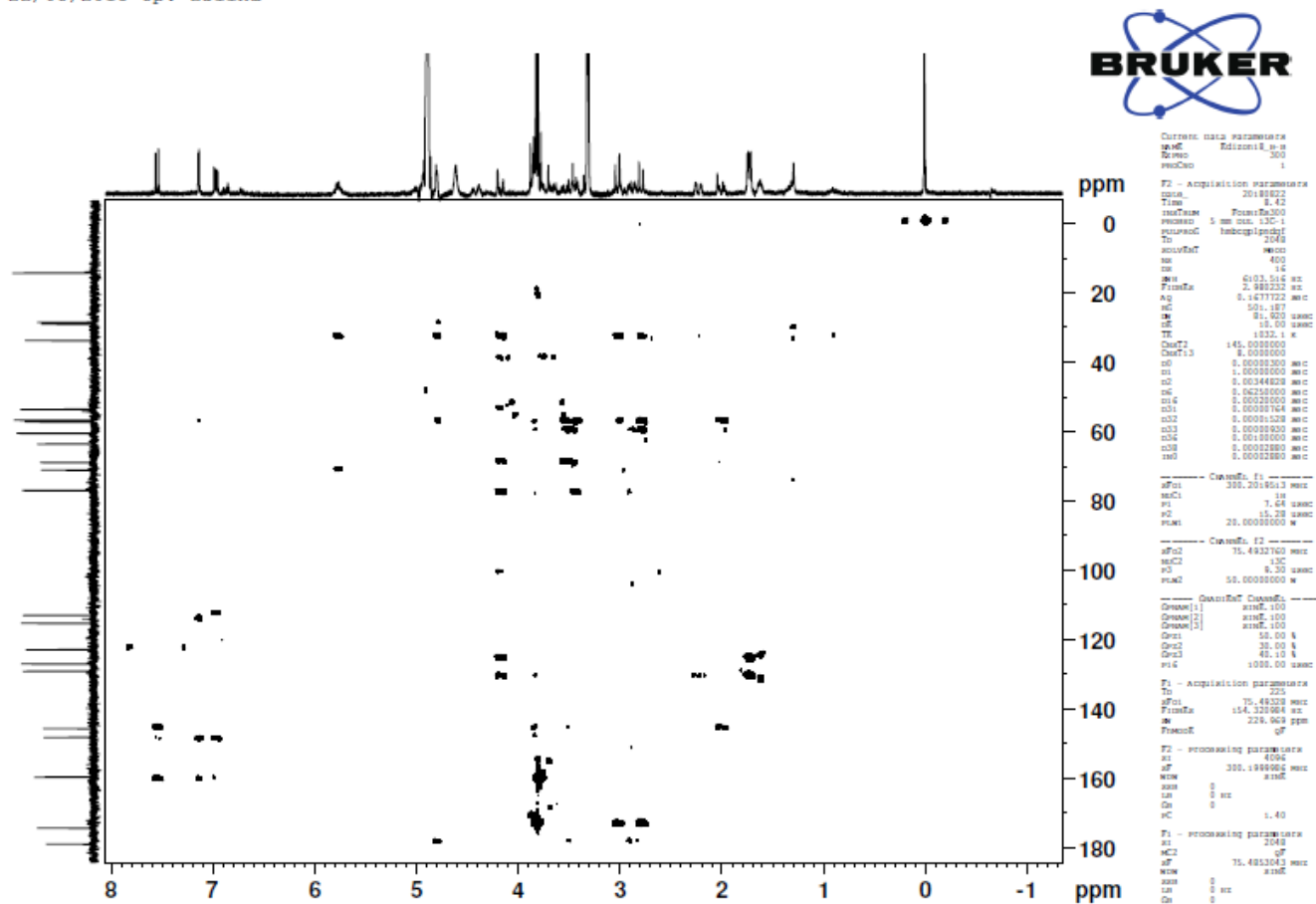
Anexo 59: Espectro de correlação ^1H - ^{13}C HSQC da substância 2F BC-4-A. em MeOD (300 MHz).

Edizon18_2FBC-4-A (HSQCed ~ 1,0 mg, MeOD) TD(F2xF1) *2
21/08/2018 Op. Zelina



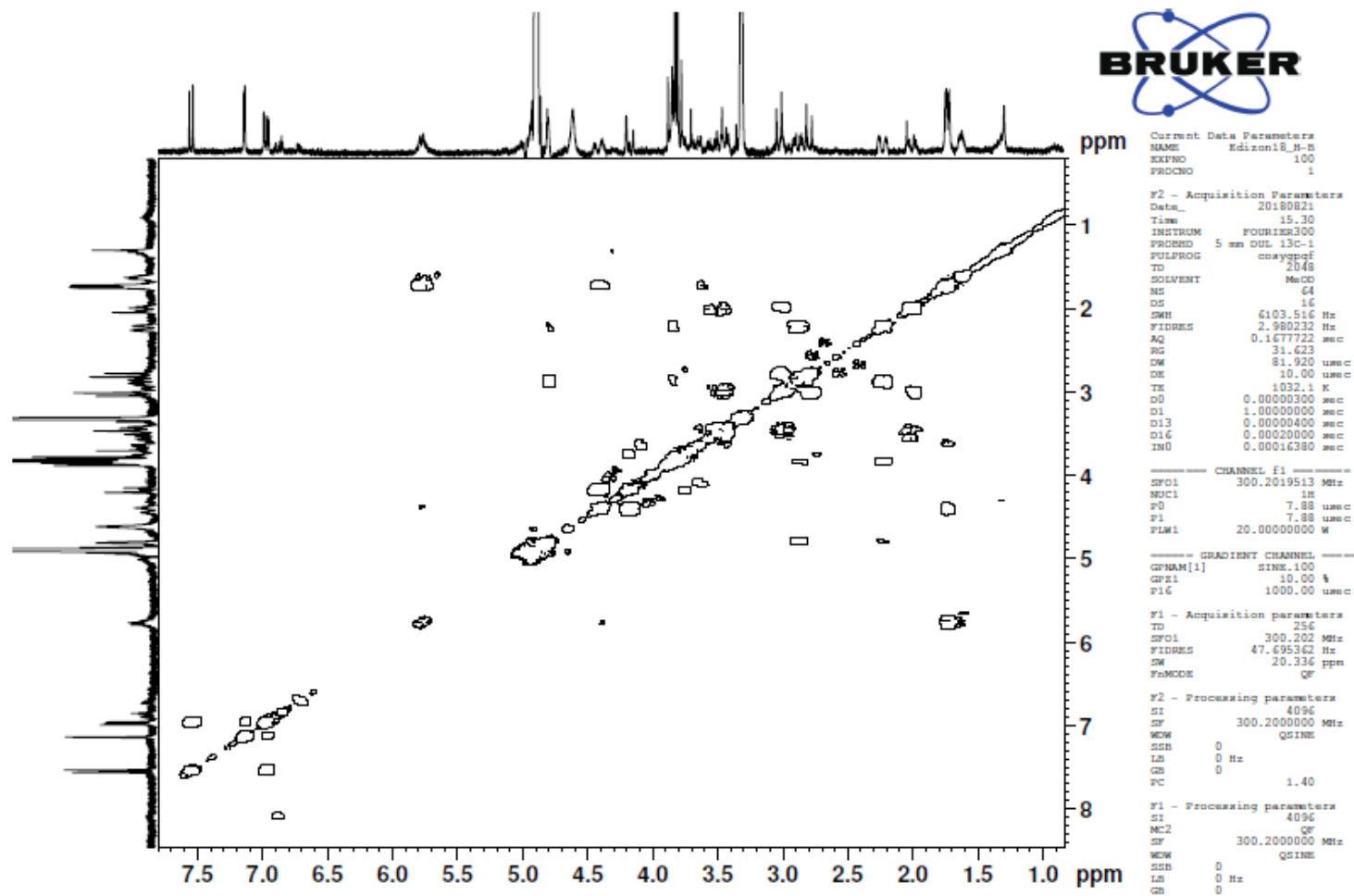
Anexo 60: Espectro de correlação ^1H - ^{13}C HMBC da substância 2F BC-4-A. em MeOD (300 MHz).

Edizon18_2FBC-4-A (HMBC, ~ 1,0 mg, MeOD) c/TMS c/giro
22/08/2018 Op. Zelina



Anexo 61: Espectro de correlação ^1H - ^{13}C COSY da substância 2F BC-4-A. em MeOD (300 MHz).

Edizon18_2FBC-4-A (COSY ~ 1,0 mg, MeOD) 21/08/2018
Op. Zelina



Anexo 61: Espectro de correlação ^1H - ^{13}C NOESY da substância 2F BC-4-A. em MeOD (500 MHz).

