

“A Química Orgânica hoje em dia quase me tira o juízo. Dá-me a impressão de uma floresta virgem tropical cheia de coisas extraordinárias, uma temerosa selva interminável, na qual não nos atrevemos a penetrar com receio de não encontrarmos a saída.”

Fredrich Wöhler

Capítulo 2

Análise Fitoquímica

2.1- Introdução

2.1.1- Considerações sobre os Alcalóides

Conforme mencionado anteriormente, os alcalóides são compostos orgânicos cíclicos que possuem um ou mais átomos de nitrogênio em estado de oxidação negativo, são sintetizados a partir do metabolismo de seres vivos e possuem distribuição limitada (MANN *et alii*, 1993), o que exclui aminoácidos, hormônios, ácidos nucleicos e peptídeos. Devido à presença do átomo de nitrogênio, esses compostos apresentam caráter básico, do qual se originam não apenas o seu nome (alcalóide = semelhante a uma base) como também propriedades importantes tanto para os métodos de extração (Figura 12), quanto no que se refere à atividade biológica que exibem (sendo essa última discutida no próximo capítulo).

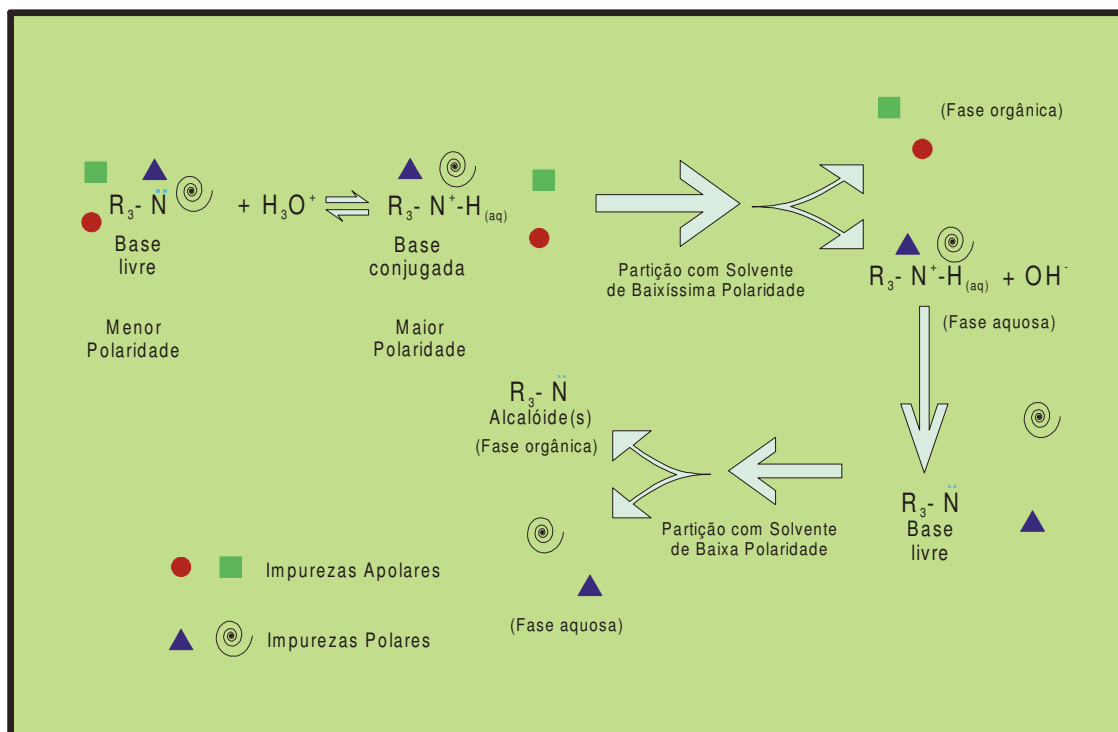


Figura 12 - Papel do caráter anfílico dos alcalóides no processo de extração

A exemplo de outros produtos naturais, eram atribuídos aos alcalóides papéis irrelevantes em relação ao metabolismo por não desempenharem, aparentemente, uma função fisiológica importante para os organismos que os produziam. No entanto, atualmente sabe-se que essa classe de produtos naturais desempenha papel proeminente na natureza em termos de relações inter-específicas (ex.: predação e defesa), intra-específicas (ex.: sinalizadores) e também para a homeostasia dos indivíduos que os produzem, como por exemplo, a serotonina (MANN *et alii*, 1993).

Apesar de tradicionalmente terem sido estudados em vegetais, esses compostos já foram obtidos de espécies pertencentes aos cinco reinos dos seres vivos, conforme Tabela 7 e Figura 13. Ainda assim, o reino vegetal continua a ser a principal fonte dessas substâncias devido ao próprio histórico da exploração de plantas como fonte de produtos naturais, à facilidade de obtenção das espécies a serem exploradas e ao baixíssimo risco biológico para os envolvidos na pesquisa, ao contrário do que ocorre quando se trabalha com animais e microrganismos.

Tabela 7 - Exemplos de alcalóides encontrados nos reinos dos seres vivos

Organismo				
Reino	Gênero	Espécie	Alcalóide	Referência
Animal	<i>Moschus</i>	<i>moschiferus</i>	Muscopiridina	MANN <i>et alii</i> , 1993
Vegetal	<i>Papaver</i>	<i>somniferum</i>	Morfina	SCHULTES <i>et alii</i> , 2000
Protista	<i>Anabaena</i>	<i>flos-aquae</i>	Anatoxinas	CYANOSITE, 2005
Fungi	<i>Claviceps</i>	<i>purpurea</i>	Ácido lisérgico	SCHULTES <i>et alii</i> , 2000
Monera	<i>Vibrio</i>	<i>parahaemoliticus</i>	1,1,3-tris (3-indolil) butano	VELURI <i>et alii</i> , 2003

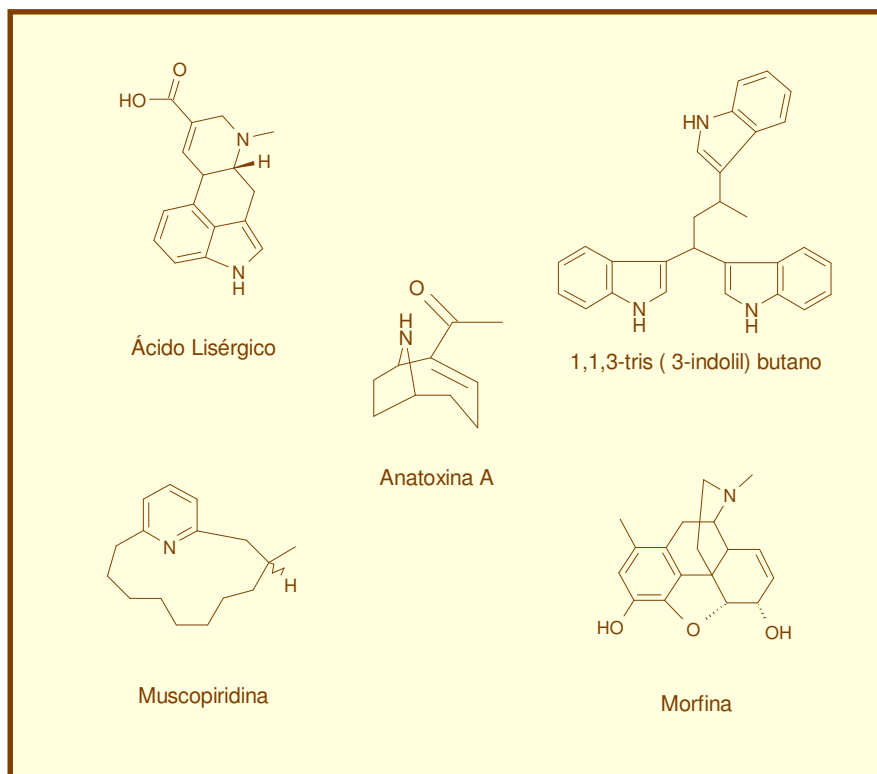


Figura 13 - Exemplos de alcalóides encontrados nos reinos dos seres vivos

Além da importância do ponto de vista biológico, os alcalóides, devido à variedade e complexidade estruturais, são objetos de estudo em síntese orgânica, que, nos últimos anos, não apenas sintetiza e modifica esses compostos, mas também os utiliza como catalisadores. Por exemplo, SEKINO *et alii* (2004) mostraram a utilização de quinina na catálise de um dos passos da síntese enantiosseletiva da (+)-calanolida, uma cumarina ativa contra a transcriptase reversa do HIV-1.

2.1.2- Os Alcalóides Indólicos

Dentre os alcalóides destaca-se, graças ao número de representantes, a classe dos indóis, que receberam esse nome por apresentarem em sua estrutura um ou mais núcleos indólicos (Figura 14).

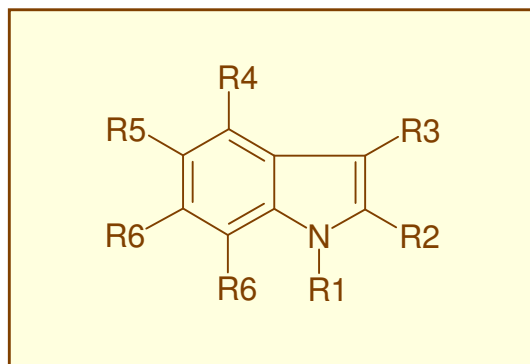


Figura 14 - O núcleo indol

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

Dentro dessa classe, encontramos o subgrupo dos alcalóides indólicos monoterpênicos que apresentam como precursor comum a strictosidina, formada a partir da condensação de triptamina e secologanina na proporção 1:1 (MANN *et alii*, 1993). O fato de todos os esqueletos carbônicos serem formados a partir de um precursor comum é atribuído às diversas possibilidades de reações intramoleculares entre as duplas ligações e carbonilas formadas após a hidrólise do grupamento glicosila presente na strictosidina. A Figura 15 mostra, de maneira resumida, os passos da biossíntese dos alcalóides indólicos monoterpênicos, bem como exemplos de arranjos do esqueleto carbônico apresentados por alguns de seus

membros. Os alcalóides monoterpênicos são agrupados conforme a disposição do esqueleto carbônico ligado ao grupo indol.

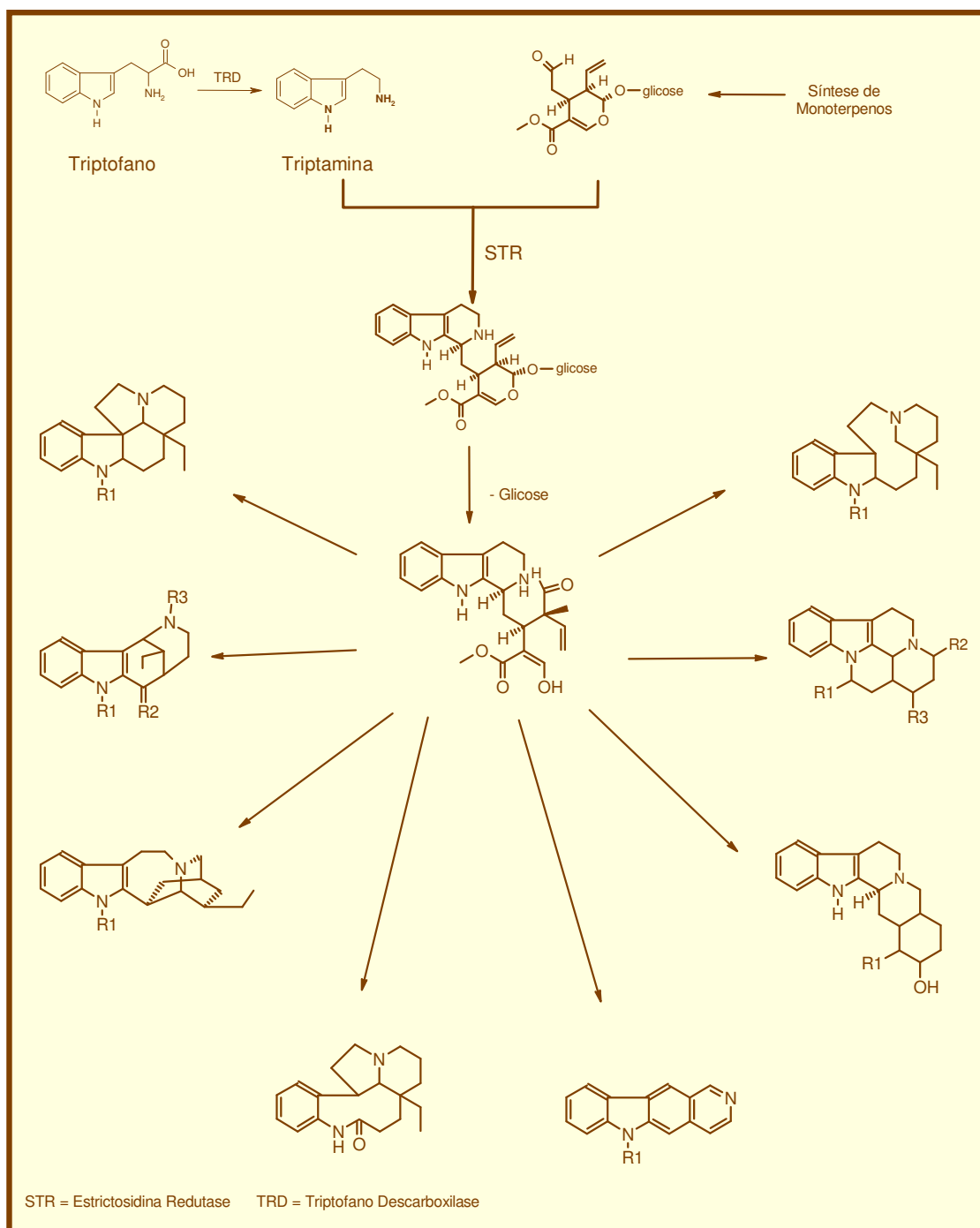


Figura 15 - Exemplos da formação de alcalóides indólicos monoterpênicos a partir do triptofano (GABETTA *et alii*, 1975; MANN, *et alii*, 1993)

Para se ter uma idéia mais concreta da importância dos alcalóides indólicos, pode-se recorrer aos números apresentados por CORDELL *et alii* (2001) nos quais temos que aproximadamente 30 % dos alcalóides isolados de plantas são indólicos. Esses autores afirmam ainda que mais de 12 % desse total foram obtidos somente a partir de *Apocynaceae* da qual destaca-se o gênero *Aspidosperma* (ver Figura 16).

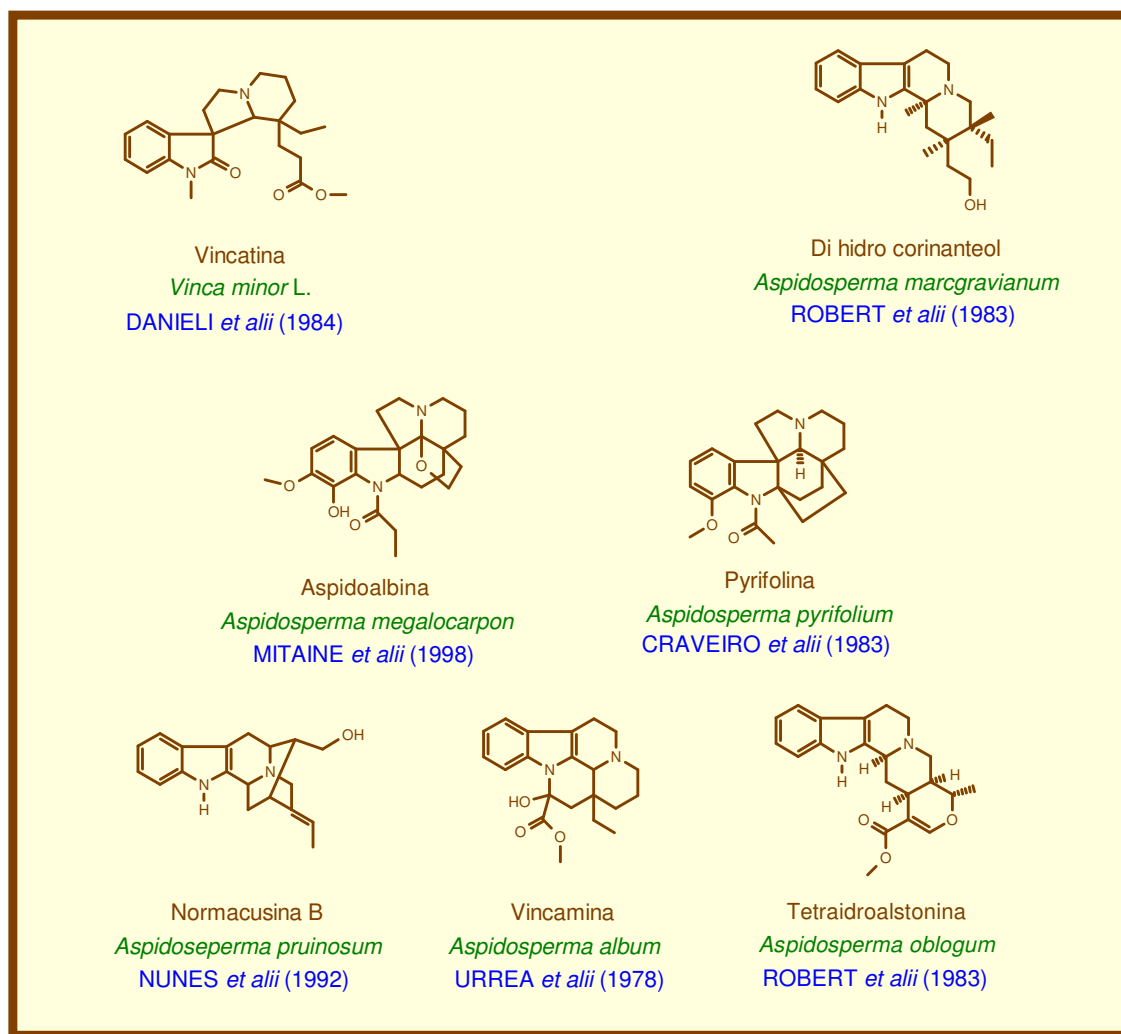


Figura 16 - Exemplos de alcalóides indólicos de *Aspidosperma*

2.1.3- O Gênero *Aspidosperma*

O gênero *Aspidosperma*, nome de origem latina que significa semente em forma de escudo, possui como características principais a presença de látex nos órgãos vegetativos e reprodutivos e de flores com prefloração contorta, ou contorcida (MOREIRA *et alii*, 2004), modo pelo qual se dispõem os elementos do perianto no botão floral no qual cada pétala cobre parte da pétala seguinte, e, é coberta em parte, pela anterior conforme ilustrado pela Figura 17 (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA, 2005). As espécies pertencentes a esse gênero tem sido objeto de estudo, devido sobretudo à presença de alcalóides indólicos em diferentes membros. Na Figura 18 temos a posição taxonômica na qual se encontra o gênero *Aspidosperma* (ENDRESS *et alii*, 2000; REDE DE SEMENTES DO CERRADO, 2005).



Figura 17 – Prefloração contorta
(UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA, 2005)

Reino	<i>Plantae</i>
Superdivisão	<i>Spermatophyta</i>
Divisão	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliospsida</i>
Subclasse	<i>Asteridae</i>
Ordem	<i>Gentianales</i>
Família	<i>Apocynaceae</i>
Sub - Família	<i>Rauvolfioideae</i>
Tribo	<i>Alstonieae</i>
Gênero	<i>Aspidosperma</i>

Figura 18 - Classificação taxonômica do gênero *Aspidosperma*
(ENDRESS *et alii*, 2000; REDE DE SEMENTES DO CERRADO, 2005)

No Brasil, as espécies desse gênero são conhecidas popularmente como perobas (do guarani *pero* = pelado e *oba* = folha) e são utilizadas na produção de móveis, carpintaria, artesanato e também na medicina popular. Dentre as diversas espécies que ocorrem no Brasil podemos citar: *A. olivaceum*, *A. gomesianum*, *A. cylindrocarpum*, *A. illustre*, *A. desmanthum*, *A. populifolium*, *A. eburneum*, *A. polyneuron*, *A. macrocarpon*, *A. parvifolium*, *A. subincanum*, *A. discolor*, *A. pyriforme*, *A. riedelii*, *A. cuspa*, *A. album*, *A. ramiflorum* e *A. tomentosum* (REDE DE SEMENTES DO CERRADO, 2005), sendo estas duas últimas espécies detalhadas a seguir.

Aspidosperma ramiflorum Müell. Arg. (do latim *ramiflorum* = flores que nascem dos galhos mais antigos), conhecida popularmente como Guatambú, Matambú, Peroba Amarela, Pequiá ou Tambú-Peroba, é uma árvore com altura entre 8 e 30 m de altura que possui ramos cinzento-escuros, com algumas lenticelas, apresentando saliências parecidas com verrugas quando mais velhas (WINTERNET, 2002; UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 2005).

Seu tronco possui casca íntegra, fina e que pode ser lisa ou ligeiramente áspera. Suas folhas são simples, elípticas, de ápice agudo a acuminado, membranáceas, levemente brilhante na face superior e com nervuras salientes em ambas as faces, possuem látex e comprimento entre 10 e 20 centímetros. Apresenta flores de coloração variando desde branco-esverdeada a amarelada. Seus frutos são plano-convexos, lenhosos, com lenticelas e folículo piriforme e podem chegar até 15 centímetros de comprimento (Figura 19). Suas sementes são aladas (circundante, amarela e estreita), ovais, quase circulares e castanho-escuras (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 2005; INSTITUTO DE PESQUISAS E ESTUDOS FLORESTAIS, 2005).

Essa espécie apresenta floração entre os meses de abril a junho, frutificação de junho a outubro e é utilizada na construção civil, ornamentação de ambientes, no reflorestamento e na produção de peças torneadas e cabos de ferramentas. Ocorre desde Minas Gerais e Rio de Janeiro até Santa Catarina (DAVE'S GARDEN, 2005; UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 2005).

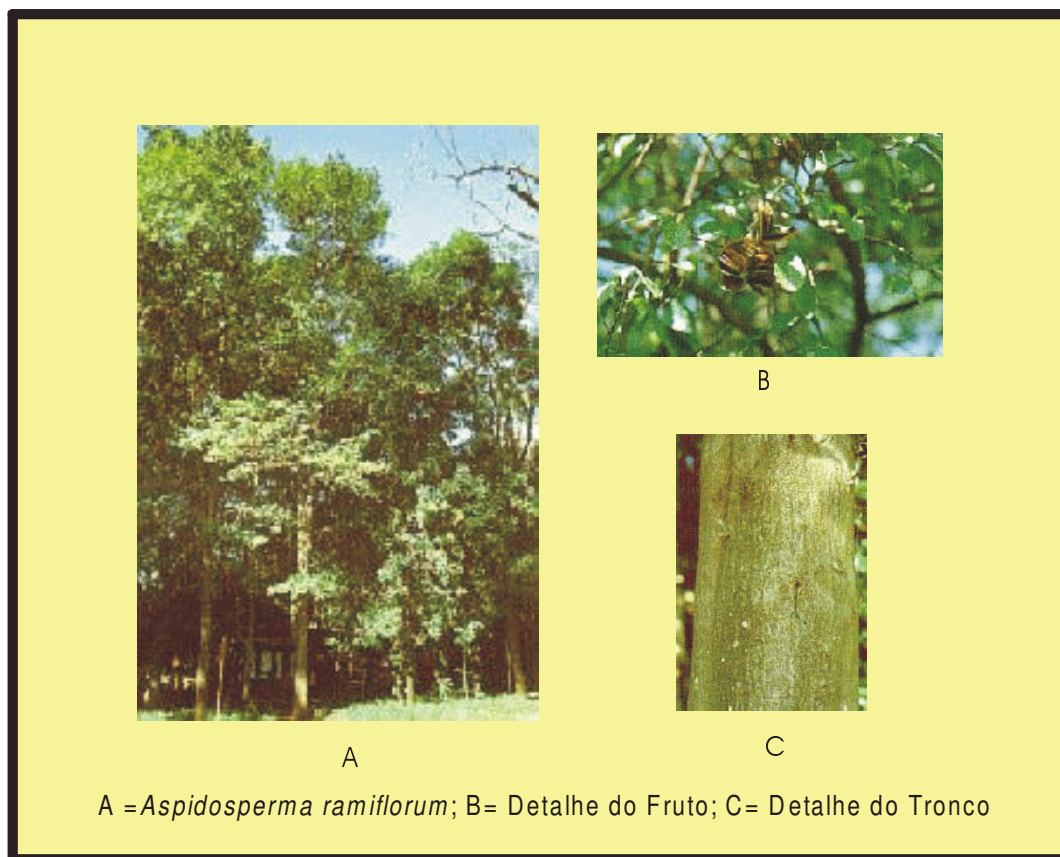


Figura 19 - *Aspidosperma ramiflorum* Müell. Arg. (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 2005)

Já *Aspidosperma tomentosum*, do latim *tomentosum* = piloso, conhecida como Peroba do Campo, Peroba do Cerrado, Pereira-do-Campo ou Pereiro-do-Campo, é uma árvore de porte médio, que pode atingir até 15 metros de altura, apresenta tronco tortuoso de casca espessa profundamente fissurada e cortiça na cor creme e látex branco. Os ramos jovens possuem densa cobertura de tricomas verde-escuros. As folhas são alternas e estão no ápice dos ramos, podendo ter até 30 centímetros de comprimento e 12,5 centímetros de largura. O pecíolo pode ser muito curto ou estar ausente. As folhas são pilosas, sendo as mais novas cor de ferrugem e as adultas de cor verde mas com a superfície inferior mais clara que a superior. A margem é irregular podendo apresentar dentes arredondados (margem do tipo crenada). As flores são pequenas e amareladas e os frutos (tipo folículo) podem ser

gêmeos ou isolados, com densa pilosidade variando de castanho-escuro a prateado e portam de 3 a 4 sementes aladas, ovaladas e concêntricas (Figura 20). É encontrada principalmente na Região do Cerrado e também desde a Bahia até Santa Catarina. Sua floração vai de setembro a outubro e a frutificação ocorre entre os meses de maio e junho. É utilizada na produção de móveis e objetos decorativos (REDE DE SEMENTES DO CERRADO, 2005).



Figura 20 - *Aspidosperma tomentosum* Mart.

(REDE DE SEMENTES DO CERRADO, 2005)

Após revisão bibliográfica feita junto ao Chemical Abstracts, à base eletrônica Web of Science e ao sistema de busca Google, encontrara-se apenas dois trabalhos tendo como tema o estudo fitoquímico de *Aspidosperma tomentosum*, e outros dois que tratavam de *Aspidosperma ramiflorum*.

MARQUES *et alii* (1996) descreveram a presença de ramiflorina A e B nos ramos, H-17- α -ramiflorina A e H-17- β -ramiflorina B em folhas e β -ioimbina e 10-metóxi-geissoschizol nas sementes de *A. ramiflorum*. Num trabalho posterior, FERREIRA *et alii* (2004) também relataram a presença de ramiflorina A e B nas folhas dessa espécie.

SILVA *et alii* (2005) relataram a presença de uleína no caule de *A. tomentosum*. Ainda em relação a essa espécie, ARNDT *et alii* (1967) reportaram a presença de uleína e 12-hidóxi-N-acetil-aspidospermatidina, embora não explicitem em seu estudo a parte do material vegetal utilizado na extração.

Esses dados apontam para a necessidade de uma investigação mais aprofundada da composição alcaloídica dos materiais vegetais oriundos de ambas as espécies.

2.2- Materiais e Métodos

2.2.1- Material Vegetal

As sementes de *Aspidosperma ramiflorum* Müell. Arg. foram adquiridas no Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais do Estado de São Paulo (lote PI251). Essas sementes tiveram os seus pericarpos, membranas envoltórias das sementes, retirados sendo esta a fonte de alcalóides tanto para a análise fitoquímica quanto na análise biológica. Essa medida foi tomada após verificação através de CG-EM que o extrato de alcalóides totais dos pericarpos era semelhante aquele obtido a partir das sementes e teve como objetivo a redução da quantidade de material graxo a ser utilizado na etapa de extração dos alcalóides. Já as folhas, ramos e sementes de *Aspidosperma tomentosum* Mart. foram coletados na Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu, Fazenda Campininha, localizada em Martinho Prado, Mogi Guaçu- SP com exemplar testemunha depositado no Herbário do Instituto Botânico de São Paulo (Moreno 53). Como os pericarpos das sementes desta espécie eram de difícil remoção, optou-se pelo trabalho com as sementes em sua forma integral, isto é, sementes com pericarpos.

Também foram utilizados os arilos das sementes, que correspondem aos envoltórios externos das sementes que as possibilitam planar no ar.

2.2.2- Extração dos Alcalóides

A extração de ramos e de folhas foi realizada através de maceração sucessiva com etanol do material previamente pulverizado. Os extratos etanólicos obtidos por esse método foram concentrados até a secura em evaporador rotatório a vácuo. O extrato concentrado resultante foi utilizado para a obtenção dos alcalóides. O

método que leva em conta a natureza básica destes compostos, consiste da partição do extrato bruto da planta entre uma fase orgânica e uma fase aquosa ácida (conforme Figura 12). Em seguida, essa fase ácida foi alcalinizada com hidróxido de amônio concentrado e extraída com diclorometano. A fase orgânica obtida foi então secada com sulfato de sódio anidro e concentrada em evaporador rotatório a vácuo até a secura. O sólido resultante era formado por uma mistura de alcalóides, que doravante será chamada de extrato de alcalóides totais.

Para a extração dos pericarpos de *A. ramiflorum* fez-se inicialmente a retirada total dos arilos e em seguida dos pericarpos (com o intuito de eliminar de partida o inconveniente da grande quantidade de material graxo das sementes) que por sua vez foram moídos, alcalinizados com hidróxido de amônio concentrado e extraídos com diclorometano através do método de extração contínua, feito em aparelho Soxhlet. A fase orgânica obtida foi concentrada até a secura em evaporador rotatório a vácuo. O extrato resultante foi ressuspenso em ácido fosfórico (0,1mol/L) e extraído com hexano com o intuito de remover do extrato, principalmente, ácidos graxos restantes. A fase ácida foi então alcalinizada com hidróxido de amônio concentrado, para que os alcalóides aí presentes passassem para a forma de base livre, tornando-os menos polares, sendo posteriormente extraídos em diclorometano. A fase orgânica obtida nesse processo foi então secada com sulfato de sódio anidro e concentrada até a secura. O sólido obtido ao final dessa sequência consistia no extrato de alcalóides totais.

Já as sementes de *A. tomentosum* tiveram seus arilos parcialmente retirados, devido à alta adesão destes às sementes, e foram extraídas com hexano em aparelho Soxhlet para a retirada de compostos de baixa polaridade, como por exemplo, ácidos graxos. A fase hexânica obtida foi então extraída com uma solução

de ácido fosfórico (0,1 mol/L). Essa fase ácida foi basificada com hidróxido de amônio concentrado e em seguida extraída com diclorometano, que foi secado em sulfato de sódio anidro e concentrado em evaporador rotatório a vácuo até a secura. O sólido obtido a partir desse processo foi então chamado de extrato de alcalóides totais I. Com as sementes que foram extraídas com hexano fez-se uma nova extração aos moldes da realizada para as sementes de *A. ramiflorum*, sendo que o sólido resultante ao final desse processo foi chamado de extrato de alcalóides totais II. A união desses dois extratos (I e II) foi nomeada de extrato de alcalóides totais das sementes de *A. tomentosum*, sendo esse o material utilizado no cálculo do rendimento, na análise da composição do extrato e na análise biológica.

Os arilos obtidos das sementes das duas espécies foram extraídos de maneira semelhante à utilizada para os pericarpos de *A. ramiflorum*.

Todas as etapas dos processos de extração acima detalhadas foram acompanhadas pela reação de precipitação com o reagente de Dragendorff, detalhada no Anexo I (MEDINA *et alii*, 1977; SVENDSEN *et alii*, 1983).

A passagem de uma etapa de extração para a seguinte só ocorria após a obtenção de resultado negativo para a reação entre o reagente de Dragendorff e a fase na qual era executada a extração.

As Figuras 21, 22 e 23 mostram os fluxogramas dos métodos de extração empregados.

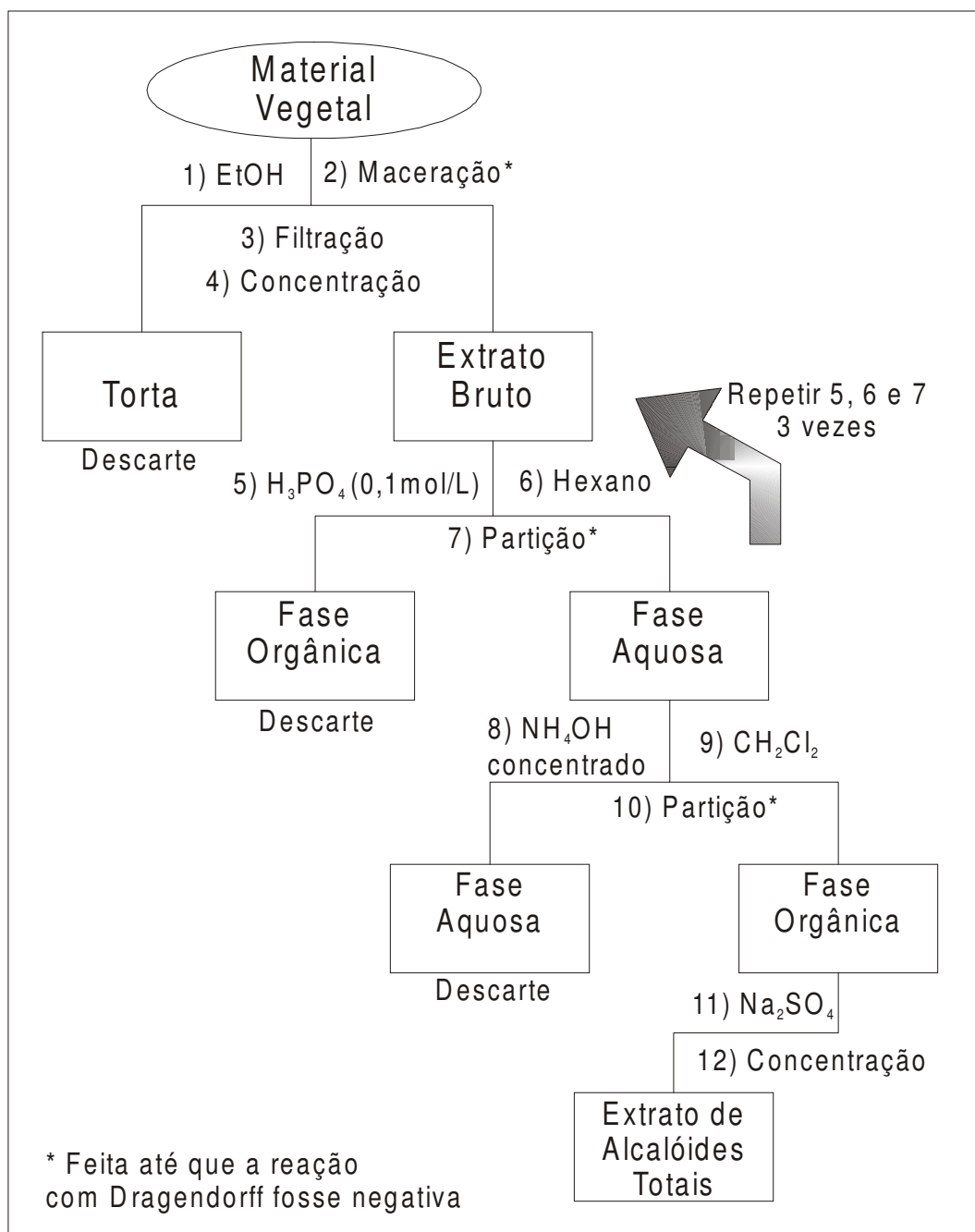


Figura 21 - Esquema da metodologia empregada na obtenção dos alcalóides dos ramos e folhas de *A. tomentosum*

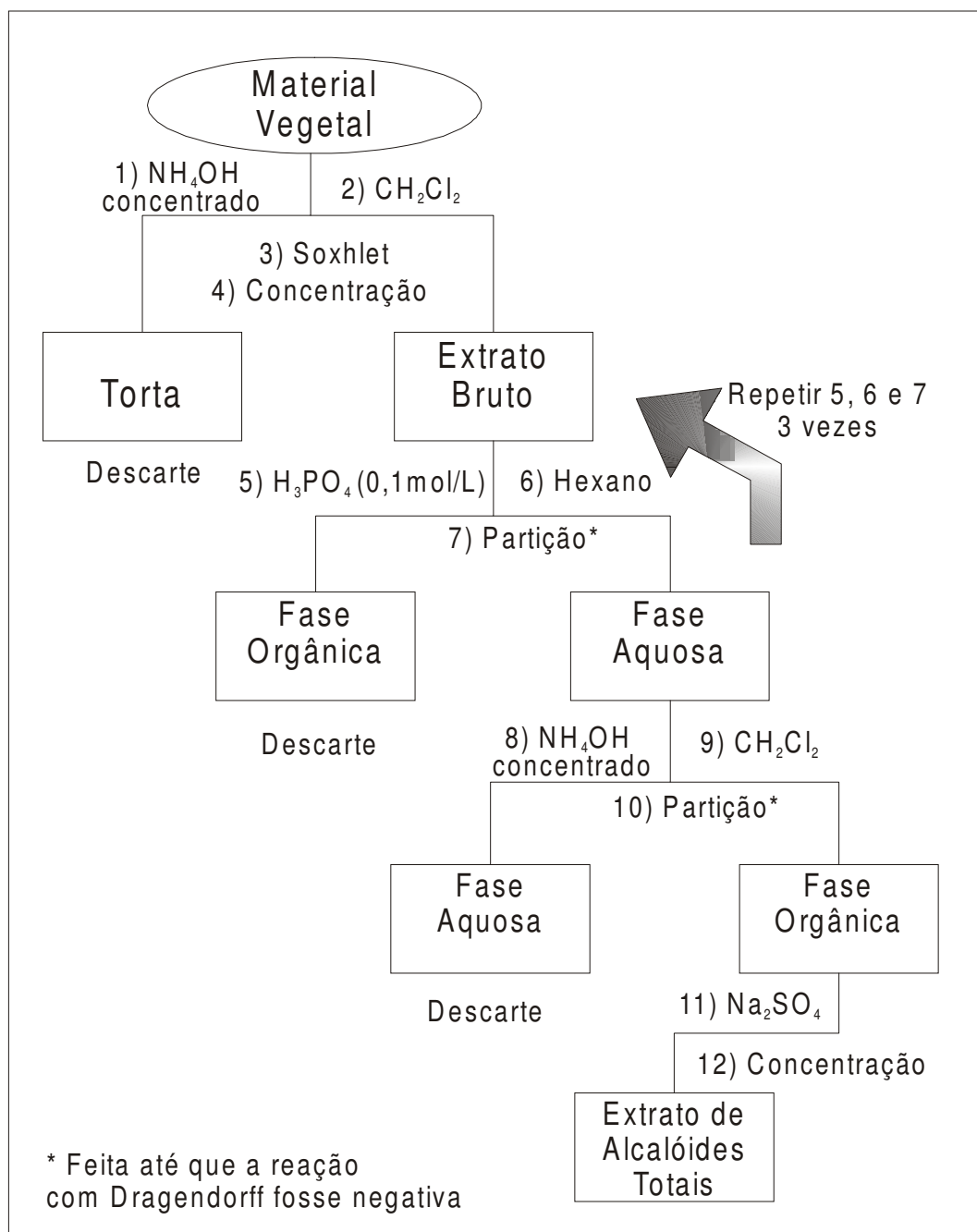


Figura 22 - Esquema da metodologia empregada na obtenção dos alcalóides dos pericarpos de *A. ramiflorum* e dos arilos das sementes de *A. ramiflorum* e de *A. tomentosum*

2.2.3- Metodologia de Separação e Análise Estrutural dos Extratos de Alcalóides Totais e de suas Frações

Todos os solventes utilizados tanto na extração quanto nos procedimentos cromatográficos eram de grau comercial sendo retificados por destilação previa a seu emprego nas análises.

Utilizou-se Cromatografia em Camada Delgada (CCD) analítica, de acordo com as condições descritas na Tabela 8, para nortear a união de frações que possuíam o mesmo perfil cromatográfico, bem como para a avaliação preliminar da pureza da amostras obtidas pelos métodos cromatográficos descritos a seguir.

Tabela 8 - Sistemas de CCD utilizados na análise dos extratos de alcalóides totais e de suas frações

Fase Móvel			Fase Estacionária
Método	Composição	Proporção entre os Solventes (V : V)	
1a	CH ₂ Cl ₂ :MeOH	98:2	Sílica
2a	CH ₂ Cl ₂ :MeOH	95:5	Sílica
3a	CH ₂ Cl ₂ :MeOH	90:10	Sílica
4a	CH ₂ Cl ₂ : Hexano: MeOH	90:5:5	Sílica
5a	CH ₂ Cl ₂	100	Alumina
6a	CH ₂ Cl ₂ :Hexano	90:10	Alumina
7a	CH ₂ Cl ₂ :Hexano	93:7	Alumina

* Placas analíticas prontas da Merck

** Os resultados das eluições foram visualizadas através do uso dos seguintes reveladores: reativo de sulfato cérico amoniacal, descrito no Anexo II (FARNSWORTH *et alii*, 1967), Reagente de Dragendorff e ácido sulfúrico 25% (V:V)

Para o fracionamento dos extratos de alcalóides totais das sementes de *A. tomentosum* utilizou-se apenas CCD preparativa. Para todos os outros extratos de alcalóides totais, além dessa técnica, foi empregada também Coluna Cromatográfica (MITAINE *et alii*, 1996, 1998; VERPOORTE, 1986). As placas cromatográficas, preparadas de modo que a espessura da camada de gel de sílica fosse de aproximadamente 1,0 mm, receberam uma quantidade de amostra de, no máximo, 20 mg. As condições empregadas no fracionamento e purificação dos alcalóides através de CCD preparativa estão descritas na Tabela 9.

Tabela 9 - Sistemas de CCD utilizados na separação e purificação dos extratos e das frações de alcalóides de *A. tomentosum* e de *A. ramiflorum*

Método	Fase Móvel		Fase Estacionária
	Composição	Proporção dos Solventes (V:V)	
1b	CH ₂ Cl ₂ :MeOH	(98:2)	Sílica
2b	CH ₂ Cl ₂ :MeOH	(95:5)	Sílica
3b	CH ₂ Cl ₂ :MeOH	(90:10)	Sílica
4b	CH ₂ Cl ₂ : Hexano: MOH	(90:5 :5)	Sílica

Já no caso da Coluna Cromatográfica, a amostra a ser fracionada era solubilizada em diclorometano e em seguida incorporada a aproximadamente 0,5 g da fase estacionária utilizada no empacotamento da mesma. Foram utilizados como fase estacionária Sílica 60F (Merck) e Alumina Neutra 90F (Merck).

A análise dos extratos de alcalóides totais foi realizada através de Cromatografia à Gás acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM). Para isso foi utilizado Cromatógrafo a Gás acoplado a Espectrômetro de Massas Agilent Series 6890, equipado com coluna HP-5 (30,0 m x 0,25 mm e filme de 0,25 µm).

O gás de arraste utilizado foi Hélio, com fluxo contínuo de 1 mL/min; a energia de ionização empregada foi de 70 eV e o volume de injeção de amostra, cuja concentração era de aproximadamente 0,1 mg/mL, foi igual a 2,0 µL. A temperatura do injetor era igual a 290°C. As rampas de aquecimento utilizadas estão esquematicamente representadas na Figura 24, na qual as temperaturas, as taxas de aquecimento e o tempo são dados respectivamente em graus Celsius (°C), graus Celsius/minuto (°C/min) e minuto (min).

Os espectros obtidos foram comparados com o banco de espectros do próprio aparelho (Wiley) e também com dados de literatura. Os espectros de massas referentes aos compostos analisados aparecem na cor preta, enquanto os espectros da biblioteca do espectrômetro de massas estão destacados nas cores azul, verde e/ou rosa.

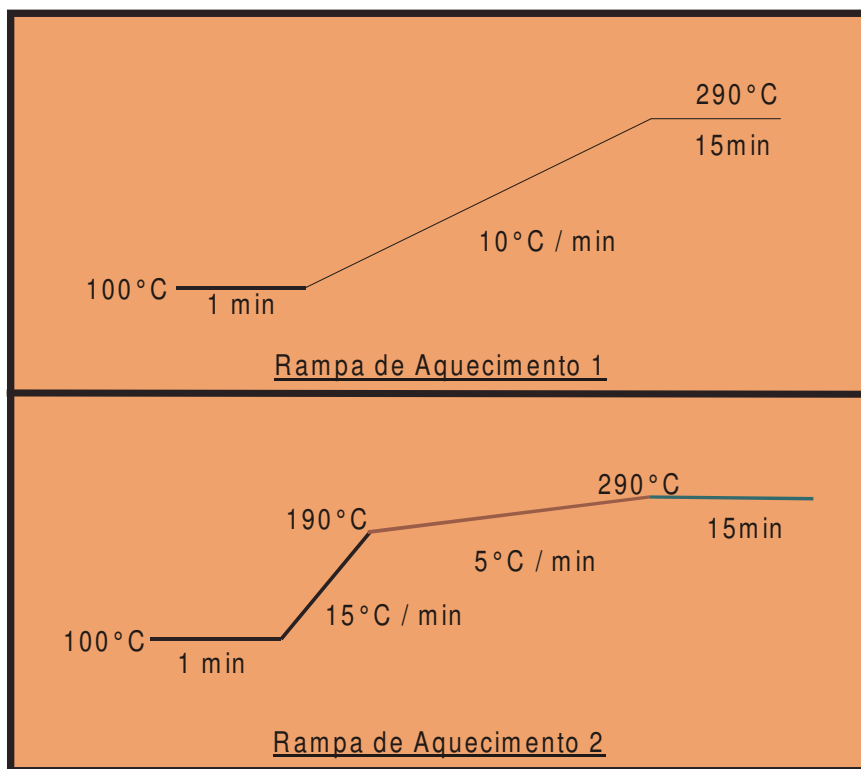


Figura 24 - Esquema das rampas de aquecimento utilizadas nas análises por CG-EM

Além dessa técnica, a análise das substâncias contou também com Ressonância Magnética Nuclear (RMN) do Nuclídeo de Hidrogênio (^1H) e de Carbono (^{13}C), feitas em aparelho Varian Unit Inova 300.

Os detalhes pertinentes à separação, purificação e análise estrutural das frações oriundas de cada um dos extratos de alcalóides totais são descritos a seguir.

2.2.3.1- Alcalóides de *Aspidosperma ramiflorum*

2.2.3.1.1- Pericarpos

A análise prévia do extrato de alcalóides totais por CCD analítica (métodos 2a e 3a, Tabela 8) e por CG-EM, Rampa de Aquecimento 2 (Figura 24), mostraram que o mesmo possuía um único composto majoritário, que correspondia a cerca de 80% do extrato de alcalóides totais. A Figura 25 mostra as etapas do isolamento desse componente majoritário.

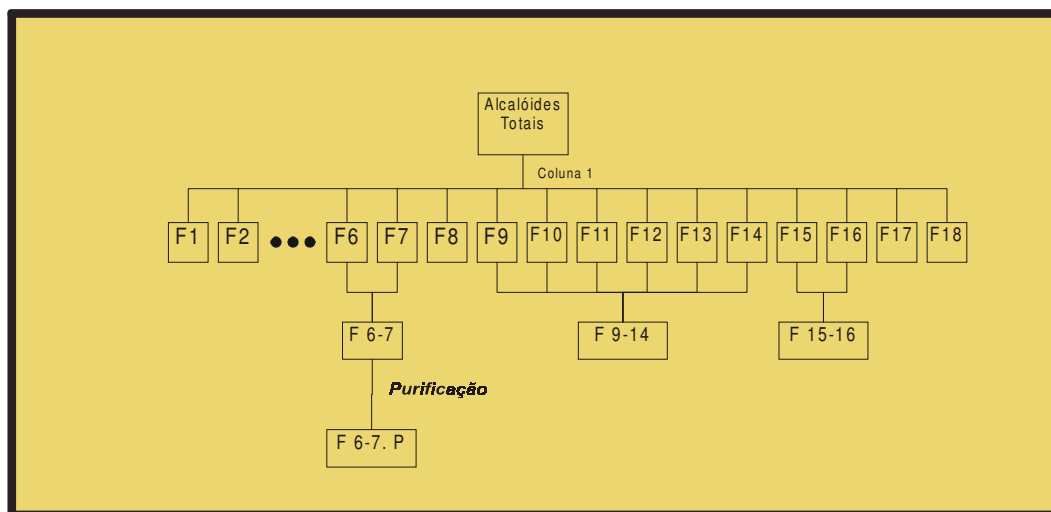


Figura 25 - Esquema de separação dos alcalóides das sementes de *A. ramiflorum*

A Tabela 10 apresenta os pormenores da etapa identificada na Figura 23 como Coluna 1.

Após o fracionamento foi verificado através de CCD analítica, métodos 1a, 2a, 6a e 7a da Tabela 8, que o composto majoritário estava presente nas frações 6 e 7 obtidas a partir da Coluna 1. A reunião dessas duas frações originou uma outra fração, chamada de 6-7, ou ainda Sar 6-7, que foi posteriormente purificada (Sar 6-7P), conforme o método 3b (Tabela 9). O alcalóide obtido foi analisado por RMN de ^{13}C .

Tabela 10 - Condições de eluição da Coluna 1 na separação dos alcalóides das sementes de *A. ramiflorum*

Fase Móvel (CH ₂ Cl ₃ : MeOH)	Volume (mL)	Fração
99:1	500	de 1 a 5
98:2	500	de 6 a 8
75:25	500	de 9 a 13
97,7:2,5	200	de 14 a 16
50:50	200	17
0:100	100	18

Coluna: fase estacionária : Alumina 90F (massa: 100 g, altura: 12 cm, diâmetro interno: 3,5 cm)

Massa da amostra: 2,5 g

2.2.3.1.2- Arilos

O extrato de alcalóides totais dos arilos foi analisado por CCD (métodos 2a, 3a e 6a, Tabela 8) pela qual verificou-se que a composição desse extrato era semelhante à observada no extrato de alcalóides dos pericarpos de *A. ramiflorum* também a presença de um composto majoritário, cujo Fator de Retenção (R_f) era idêntico ao composto majoritário presente no extrato dos pericarpos. Assim, fez-se a

análise por CG-EM, Rampa de Aquecimento 2, Figura 24, do extrato de alcalóides dos arilos.

Devido à semelhança do perfil cromatográfico entre os extratos obtidos de sementes e seus arilos, não foram feitas separações cromatográficas dos últimos.

2.2.3.2- Alcalóides de *Aspidosperma tomentosum*

2.2.3.2.1- Ramos

A análise prévia do extrato de alcalóides totais por CCD, conforme os métodos 2a e 3a (Tabela 8), mostrou a presença de um composto majoritário. A partir dessa informação, fez-se o fracionamento do mesmo com o intuito de isolar tal componente, conforme apresentado esquematicamente pela Figura 26.

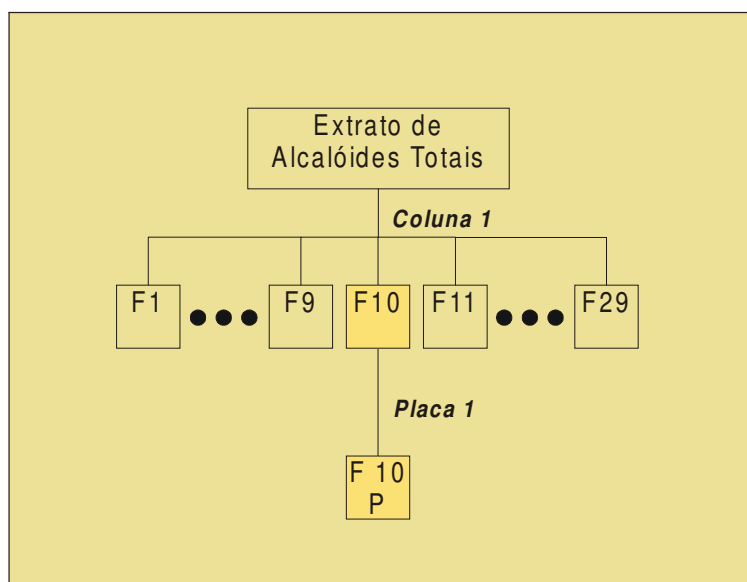


Figura 26 - Esquema de separação dos alcalóide dos ramos de *A. tomentosum*

A Tabela 11 detalha a etapa denominada Coluna 1 na Figura 26.

Tabela 11 - Condições de eluição da Coluna 1 (Figura 26)

Fração	Fase Móvel (CH ₂ Cl ₂ :MeOH)	Volume (mL)
1	100:0	150
2, 3	99:1	150
4	98:2	150
5, 6	96:4	150
7, 8	95:5	150
9, 10	94:6	150
11, 12	93:7	150
13, 14	92:8	150
15, 16	90:10	150
17, 18	88:12	150
19, 20	85:15	150
21, 22	80:20	150
23, 24	65:35	100
25, 26	50:50	100
27	25:75	100
28, 29	0:100	100

Coluna: fase estacionária Sílica 60 F (massa: 35 g, altura: 10 cm, diâmetro interno: 3,5 cm); Massa de amostra: 4,18 g

Após a análise por CCD das frações obtidas com a Coluna 1, métodos 1a, 2a e 3a (Tabela 8), verificou-se que o composto majoritário estava presente em grande proporção na fração 10, juntamente com algumas impurezas. Assim, essa fração foi purificada através do método 2b de CCD preparativa (Tabela 9).

Tanto o extrato de alcalóides totais, quanto a fração purificada a partir deste foram analisadas por CG-EM segundo o Rampa de Aquecimento 2 (Figura 24).

2.2.3.2.2- Folhas

As análises por CCD analítica do extrato de alcalóides totais, segundo os métodos 1, 2 e 3a (Tabela 8), revelaram que este possuía complexa mistura de alcalóides, sendo também analisada por CG-EM, Rampa de Aquecimento 2 (Figura 24). Seu fracionamento é mostrado esquematicamente na Figura 27 e detalhado na Tabela 12.

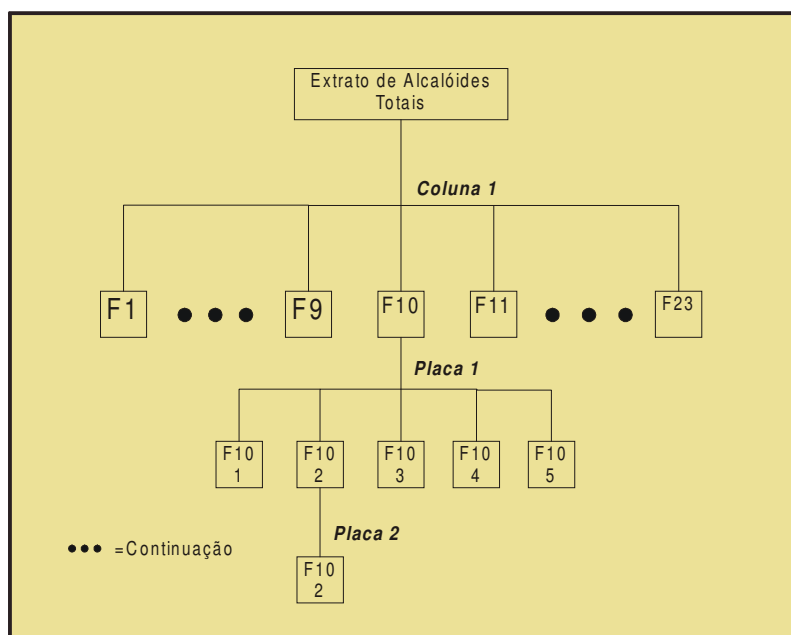


Figura 27 - Esquema de fracionamento do extrato de alcalóides das folhas de *A. tomentosum*

A separação, por CCD preparativa (Placa 1, Figura 27), foi feita de acordo com o método 2b (Tabela 9). A fração obtida foi analisada por CG-EM de acordo com Rampa de Aquecimento 1 (Figura 24).

Tabela 12 - Condições de eluição da “Coluna 1” (Figura 25)

Fração	Fase Móvel (CH ₂ Cl ₂ : MeOH)
1,2	100:0
3,4	99:1
5,6	98:2
7,8,9	96:4
10,11,12,13	92:8
14,15,16	84:16
17,18,19,20,21	68:32
22	36:64
23	0:100

Coluna: fase estacionária Sílica 60 F (massa: 30 g, altura: 6 cm, diâmetro interno: 3,5 cm)

Massa de Amostra: 400 mg

Volume de Cada Sistema de Solventes: 100 mL

2.2.3.2.3- Sementes

A análise preliminar do extrato de alcalóides totais através de (CCD), métodos 1a, 4a e 6a (Tabela 8), revelou a presença de basicamente três compostos, sendo que um deles apresentava-se em concentração maior que os outros dois e que foi isolado através de CCD, conforme esquematiza a Figura 28, que é detalhada na Tabela 13.

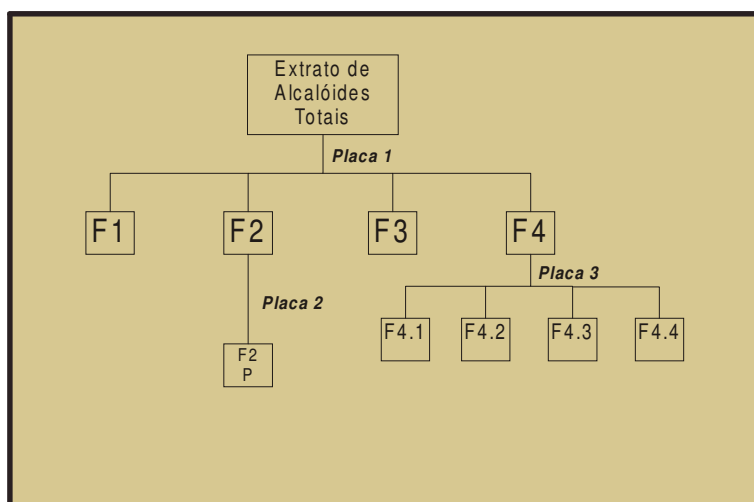


Figura 28 - Esquema de separação dos alcalóides das sementes de *A. tomentosum*

Tabela 13 - Detalhes dos métodos de separação e de purificação do extrato de alcalóides das sementes de *A. tomentosum*

Etapa	Sistema Cromatográfico*
Placa 1	1b
Placa 2	1b**
Placa 3	3b
Placa 4	3b**

* Código referente ao exposto na Tabela 9

** Cuba saturada com vapores de amônia

As frações obtidas pela separação com a Placa 1 foram analisadas por CCD analítica (método 2b, Tabela 8) através da qual, verificou-se que o composto majoritário estava concentrado na fração 2 (F2) porém, apresentava algumas impurezas. Assim, fez-se nova placa, denominada Placa 2, com o intuito de isolar esse composto. Com esse procedimento, foi obtido um sólido (fração F2P) que se apresentava sob forma de cristais brancos acúleos, e, devido à sua aparente instabilidade quando em presença de luz, ar e temperatura acima de 20°C, foi mantido sob atmosfera de argônio a -20°C.

A fração 4 (F4), que continha o segundo majoritário, foi particionada sendo que as frações 1 e 2 (F4.1 e F4.2) foram analisadas por CG-EM, segundo a Rampa de Aquecimento 2 da Figura 24.

Posteriormente fez-se a análise por RMN ¹H da fração F4.1, dada a sua pureza.

2.2.3.2.4- Arilos

A análise prévia do extrato de alcalóides totais dos arilos por CCD, condições 1a, 4a e 5a (Tabela 8), revelou a presença de mais de um composto majoritário. Observou-se também que os R_{fs} dos componentes desse extrato eram semelhantes aos observados para os compostos presentes no extrato de alcalóides das sementes. Essa constatação, juntamente com a pouca quantidade desse extrato e a pretensão em se realizar ensaios biológicos com o mesmo, fez com que se optasse apenas em analisá-lo por CG-EM, segundo a Rampa de Aquecimento 2 (Figura 24).

2.2.4- Resultados e Discussão

2.2.4.1- Obtenção do Extrato de Alcalóides Totais

A Tabela 14 apresenta o rendimento da etapa de extração dos alcalóides dos materiais vegetais das duas espécies.

Tabela 14 - Rendimento da extração dos alcalóides de *A. ramiflorum* e de *A. tomentosum*

Planta	Parte da Planta	Massa do Material Vegetal (g)	Massa do Extrato de Alcalóides Totais (g)	Rendimento (%)
<i>A. ramiflorum</i>	Arilos	200,3	1,12	0,56
	Pericarpos	49,5	2,71	5,46
<i>A. tomentosum</i>	Ramos	2.080	6,51	0,31
	Folhas	250,0	0,45	0,18
	Sementes	40,0	2,06	5,10
	Arilos	21,9	0,10	0,46

Diante dos resultados da Tabela 14, podemos classificar os materiais vegetais em quatro grupos de acordo com o rendimento da etapa de extração de alcalóides totais.

No primeiro, (grupo 1) temos os pericarpos de *A. ramiflorum* e as sementes de *A. tomentosum* que apresentaram um rendimento médio de 5,28%, enquanto o segundo (grupo 2), constituído pelos arilos de ambas as espécies, apresentou rendimento médio de 0,51%. Os grupos 3 e 4, formados respectivamente pelas folhas e ramos de *A. tomentosum*, apresentaram rendimento de 0,18 e 0,31 %. Ou seja, o grupo 1 apresentou rendimento médio que é cerca de dez vezes maior que o apresentado pelo grupo 2, vinte nove vezes maior que o grupo 3 e dezessete vezes maior do que o grupo 4. Nota-se ainda que a extração de alcalóides do grupo 2 teve

resultado três vezes maior do que o obtido com o grupo 3 e quase duas vezes maior do que o grupo 4.

MITAINE *et alii* (1998), obtiveram rendimento de 1,2% na extração de alcalóides totais das cascas do tronco de *Aspidosperma megalocarpon*. Já ROBERT *et alii* (1983) obtiveram rendimento de 2,59% na extração de alcalóides totais das sementes de *Aspidosperma oblongum*.

CRAVEIRO *et alii* (1982), ao isolarem os alcalóides majoritários das folhas de *A. pyrifolium*, obtiveram um rendimento de 0,16 %, que é muito próximo do obtido com as folhas de *A. tomentosum* (Tabela 14).

Considerando esses dados da literatura, vemos que o rendimento alcançado com a extração de ramos e folhas de *A. tomentosum* é cerca de seis vezes menor do que o atingido com as cascas do tronco de *A. megalocarpon*. Porém, quando observamos os rendimentos obtidos com a extração de sementes de *A. tomentosum* e pericarpos de *A. ramiflorum*, nota que os mesmos são aproximadamente duas vezes maior do que o alcançado com as sementes de *A. oblongum*.

Com base nesses dados pode-se concluir que, levando em conta apenas a questão de rendimento, as sementes de *A. tomentosum* e os pericarpos de *A. ramiflorum* representam uma fonte interessante de alcalóides.

A comparação do rendimento da extração de alcalóides dos arilos com dados da literatura não pôde ser realizada, uma vez que não foi encontrado nenhum relato sobre a obtenção de alcalóide a partir dessa fonte.

2.2.4.2- Fracionamento, Purificação e Análise Espectroscópica e Espectrométrica dos Extratos de Alcalóides Totais e de Suas Frações

2.2.4.2.1- *Aspidosperma ramiflorum*

2.2.4.2.1.1- Pericarpos

A Figura 29 traz a análise por CG-EM do extrato de alcalóides totais dos pericarpos.

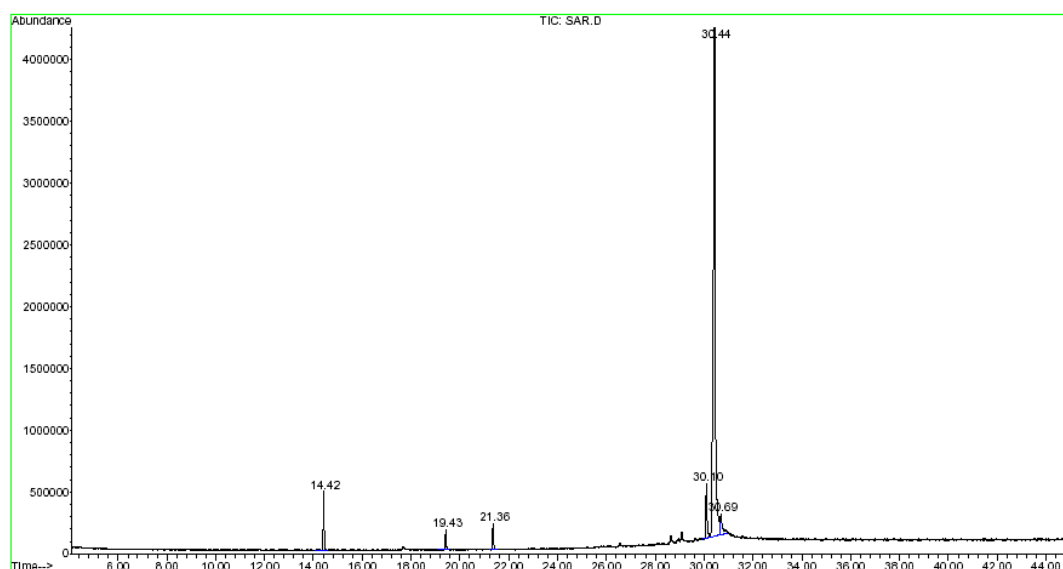


Figura 29- Cromatograma do extrato de alcalóides totais das sementes de *A. ramiflorum* feito segundo a rampa de aquecimento 2 (Figura 24)

Pela análise do cromatograma (Figura 29) vê-se a presença de um composto majoritário, confirmando as análises prévias do extrato por CCD analítica (métodos 2a e 3a, Tabela 8), que mostraram a presença de um composto majoritário que correspondia quase que a totalidade do extrato (cerca de 83% do extrato de alcalóides totais), com tempo de retenção (TR) igual a 30,44min, cujo padrão de fragmentação (Figura 30) é compatível com o apresentado pela ioimbina (Figura 31).

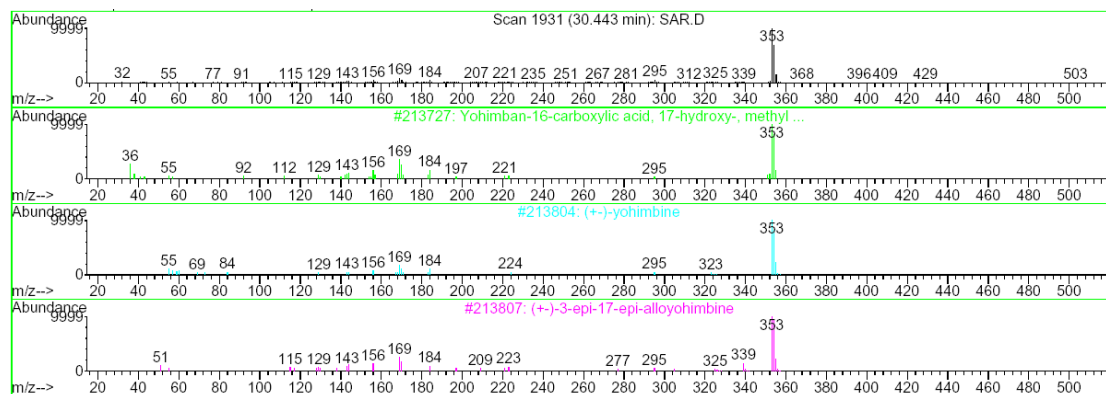


Figura 30 – Espectro de massas do composto com TR = 30,4 min, obtido dos alcalóides das sementes de *A. ramiflorum* (rampa de aquecimento 2, Figura 24)

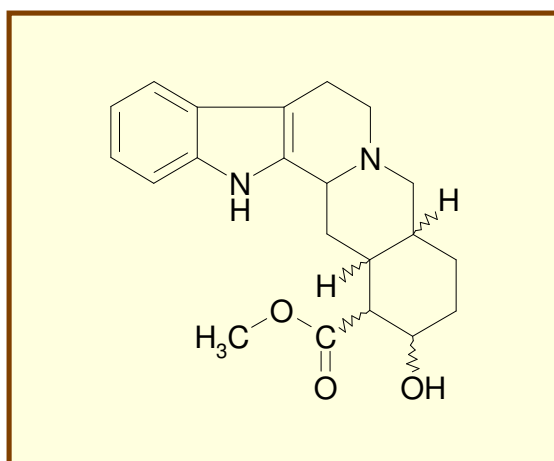


Figura 31 - Representação da molécula de ioimbina

A origem dos fragmentos observados no espectro de massas da ioimbina pode ser explicada através do mecanismo de fragmentação ilustrado na Figura 32 (BUDZIKIEWICZ *et alii*, 1964).

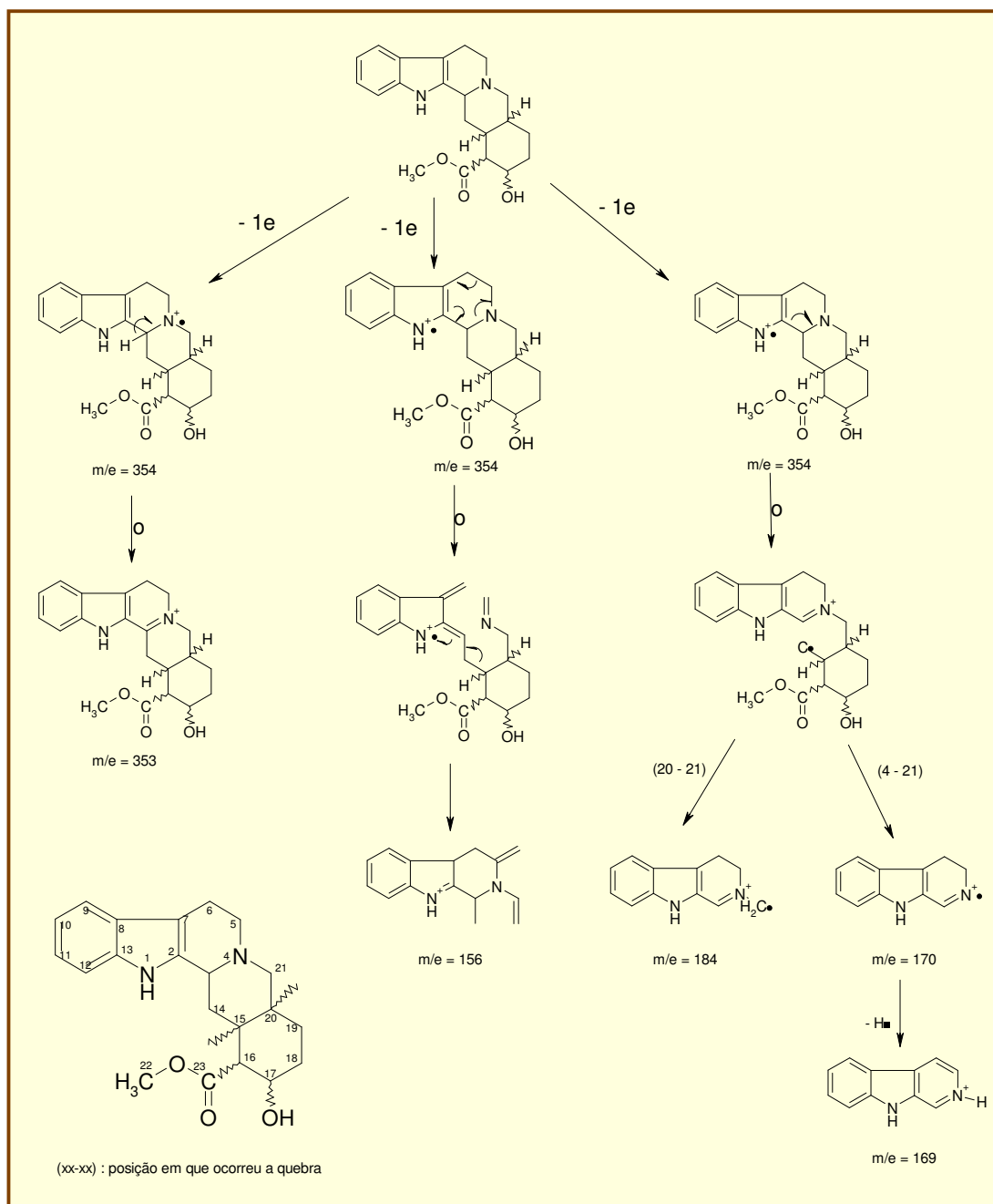


Figura 32 - Mecanismo de fragmentação da ioimbina (Budzikiewicz *et alii*, 1964)

Anteriormente, MARQUES *et alii* (1996) relataram a β -ioimbina como o alcalóide majoritário nas sementes de *A. ramiflorum*, apesar de não descreverem qual a técnica utilizada na determinação estrutural. Adicionalmente, OLIVEIRA (1999) verificou a presença desse alcalóide nas folhas da mesma espécie, sendo o mesmo identificado através de ponto de fusão e por espectrometria de massas.

Porém, BUDZIKIEWICZ *et alii* (1964) discutiram a impossibilidade de se fazer a diferenciação entre os diversos isômeros da ioimbina através da comparação direta do padrão de fragmentação obtido por EM.

Posteriormente, SPLITTER *et alii* (1993) reportaram a possibilidade de diferenciação por CG-EM de isômeros da ioimbina (Figura 33) através da razão das intensidades do íon molecular ($m/z = 354$) e de um fragmento de $m/z = 184$. Calculando-se essa razão no espectro de massas do composto de TR = 30,4 min, obteve-se uma razão de 0,13, valor intermediário ao obtido para a β -ioimbina (0,17) e para a α -ioimbina (0,10). Como o valor obtido era muito próximo tanto de um quanto de outro isômeros, não foi possível determinar qual era de fato o isômero.

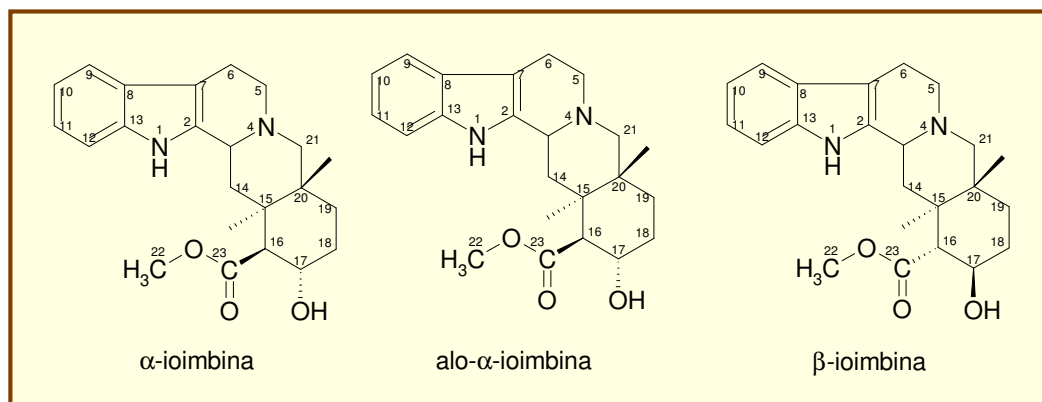


Figura 33 - Alguns isômeros da ioimbina (Staerk *et alii*, 2000; WENKERT *et alii*, 1976)

Sabendo da possibilidade da determinação da configuração da ioimbina através de RMN ^{13}C do mesmo em $\text{d}^6\text{-DMSO}$ (WENKERT *et alii*, 1976), fez-se então o fracionamento do extrato de alcalóides, de acordo com as condições apresentadas na Figura 25 e Tabela 10.

A análise por CCD analítica das frações obtidas revelou que o composto majoritário aparecia nas frações 6 e 7, as quais foram reunidas, originando a fração Sar 6-7, que por sua vez foi purificada por CCD preparativa (método 2b, Tabela 9) e analisada por RMN ^{13}C (Figura 34).

A Tabela 15 traz a comparação entre os deslocamentos químicos mais díspares de seis isômeros da ioimbina e também da amostra Sar 6-7.

VER PDF COM A
PÁGINA 84

Tabela 15 - Comparação entre os deslocamentos químicos de RMN ^{13}C de compostos ioimbóides obtidos por WENKERT *et alli* (1976) e os dados obtidos para a amostra Sar 6-7

	Ioimbina	β -ioimbina	Corinantina	Pseudo-ioimbina	α -ioimbina	3-Epi- α -ioimbina	Amostra Sar 6-7
C (3)	59,8	59,0	60,5	53,7	60,1	53,7	59,5
C (15)	36,4	41,6	34,7	32,4	37,9	32,5	42,2
C (16)	52,6	57,1	51,1	52,4	54,6	54,1	57,2
C (17)	66,9	71,6	65,9	66,6	66,0	65,7	70,9
C (20)	40,2	39,1	36,5	39,5	36,4	35,6	38,6

Comparando os valores dos deslocamentos químicos com dados da literatura apresentados por WENKERT *et alli* (1976), vemos, que os sinais dos carbonos C15 e 17 são muito próximos daqueles apresentados pela β -ioimbina e ao mesmo tempo, bem diferente dos observados para os isômeros que apresentam a configuração alfa.

A presença de β -ioimbina nas sementes de *A. ramiflorum* está de acordo com os trabalho feito por MARQUES *et alii* (1996). A análise dos outros compostos presentes no extrato de alcalóides totais mostrou-se difícil devido a alta polaridade e à pequena quantidade dos mesmos no extrato.

Apesar da presença de ioimbina nas sementes de *A. ramiflorum* já ter sido relatada na literatura, deve-se apontar para sua predominância nesse extrato. O fato da extração dos pericarpos de *A. ramiflorum* ter como resultado o rendimento de 5,46% aliado à composição do extrato de alcalóides totais, composto basicamente por ioimbina (cerca de 83 %), significa que mais de 4,0% desse material vegetal correspondem a esse alcalóide.

Sabendo que o rendimento obtido com a extração de alcalóides das cascas do tronco do ioimbé (*Corynanthe yohimbe*), árvore que é a principal fonte de ioimbina, é de aproximadamente 6%, dos quais 15% corresponde a ioimbina (DR.RAY SAHELIAN, 2005; MUSHROOM GALAXY, 2005), ou seja, 0,9% da massa das cascas é constituída por ioimbina, a extração das sementes de *A. ramiflorum* apresentou um rendimento quatro vezes daquele obtido com as cascas do tronco do ioimbé. Logo, vemos que os pericarpos de *A. ramiflorum* representam excelente fonte para o alcalóide em questão.

2.2.4.2.1.2- Arilos

No Cromatograma obtido com a análise por CG-EM do extrato de alcalóides totais dos arilos (Figura 35) vemos a presença de cinco compostos principais. O primeiro composto (TR = 8,37 min) possui padrão de fragmentação (espectro não mostrado) compatível com um hidrocarboneto de baixo peso molecular, evidenciada pela diferença de 14 unidades entre os fragmentos. Os três compostos seguintes (TR = 14,42, 19,43 e 21,36 min) apresentaram padrão de fragmentação compatível com o observado com ftalatos (SILVERSTEIN *et alii*, 2000), que, em análise posterior, comprovou-se que estavam presentes no solvente utilizado para solubilizar a amostra. Por fim, temos um composto cujo tempo de retenção (TR = 30,33 min) e padrão de fragmentação (Figura 36) eram idênticos aos apresentados pela β -ioimbina (Figura 31) a exemplo do que ocorreu com os pericarpos dessa mesma planta.

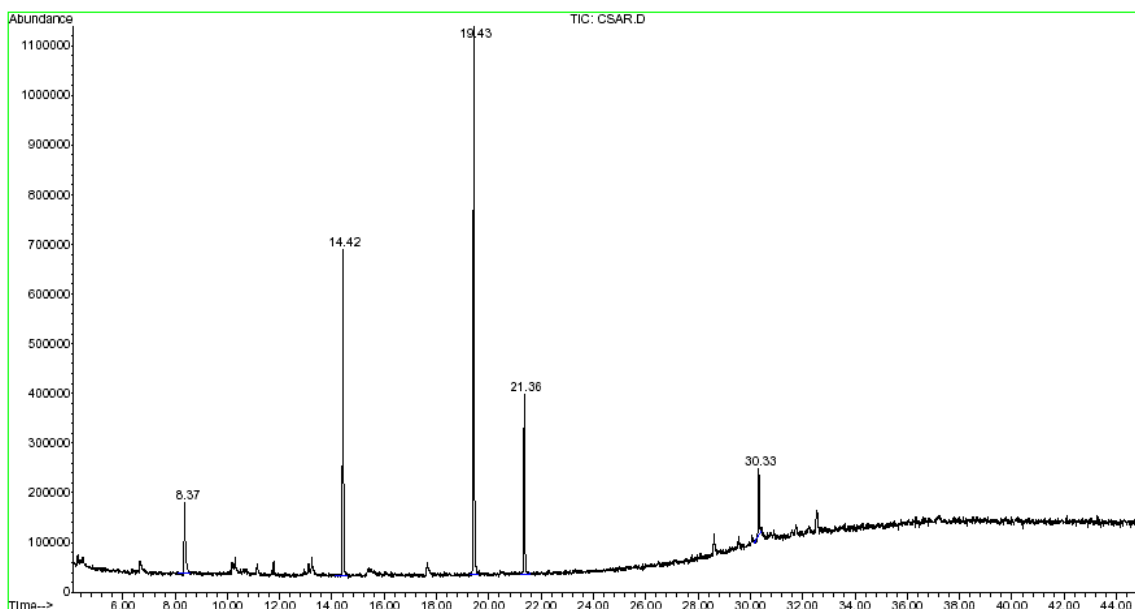


Figura 35 - Cromatograma do extrato de alcalóides totais obtido dos arilos de *A. ramiflorum*, feito segundo a rampa de aquecimento 2 (Figura 24)

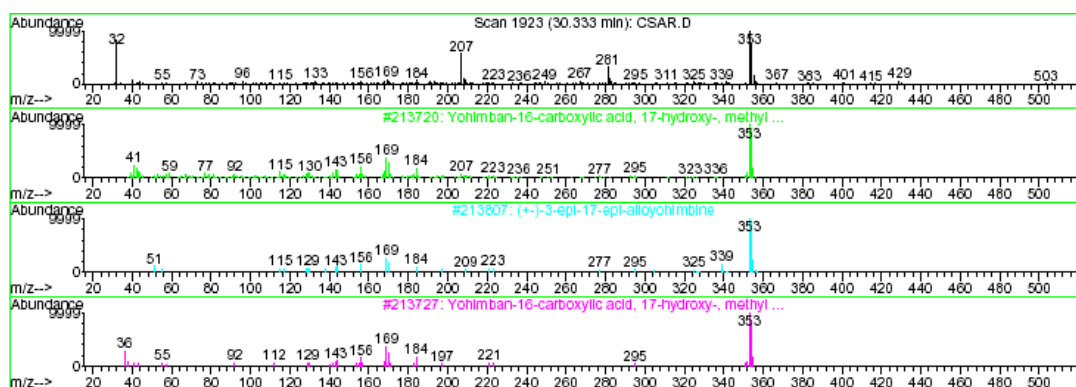


Figura 36 – Espectro de massas do composto com TR = 30,3 min presente nos arilos de *A. ramiflorum* (rampa de aquecimento 2, Figura 24)

Assim, esses arilos poderiam ser utilizados como fonte para estudos fitoquímicos sobre os alcalóides das sementes, quando estas tenham que ser empregadas em outros tipos de estudos, como por exemplo, de germinação ou ainda para a obtenção de plântulas *in vitro*. Todavia, para tanto deve ser considerado o baixo rendimento alcançado com a extração de alcalóides dessa fonte, quando comparado com aqueles dos pericarpos.

2.2.4.2.2– *Aspidosperma tomentosum*

2.2.4.2.2.1– Ramos

A análise da amostra de alcalóides totais dos ramos por CG-EM (Figura 37), confirmou o resultado obtido por CCD, na qual verificou-se a presença de um composto majoritário (TR = 17,67 min) correspondendo a aproximadamente 55 % da amostra, cujo espectro de massas (Figura 38) era semelhante ao da uleína (Figura 39).

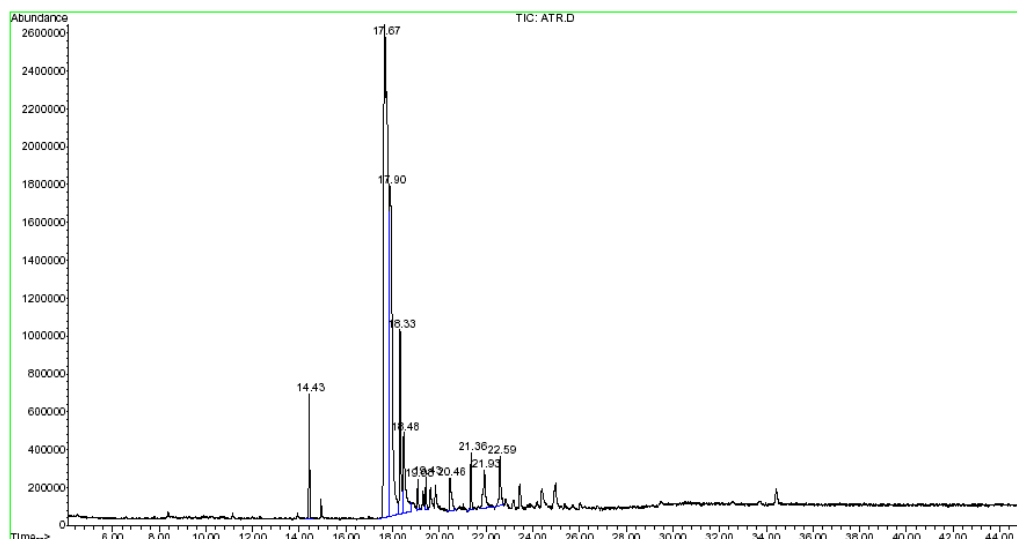


Figura 37 - Cromatograma do extrato de alcalóides totais obtido dos ramos de *A. tomentosum*, feito segundo a rampa de aquecimento 2 (Figura 24)

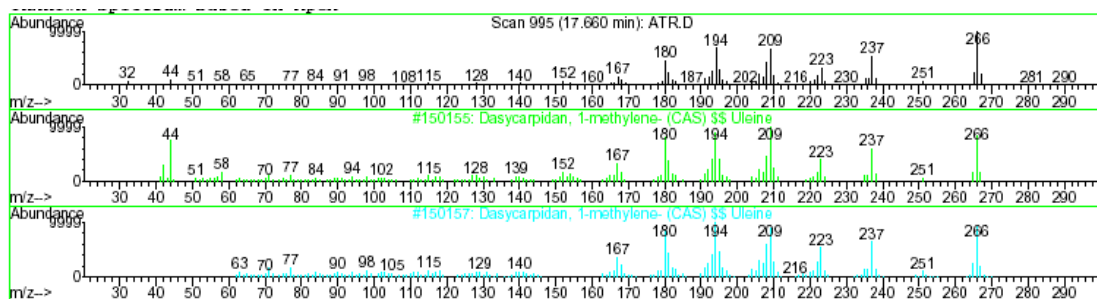


Figura 38 – Espectro de massas do composto com TR = 17,7 min obtido do extrato de alcalóides totais dos ramos de *A. tomentosum* (rampa de aquecimento 2, Figura 24)

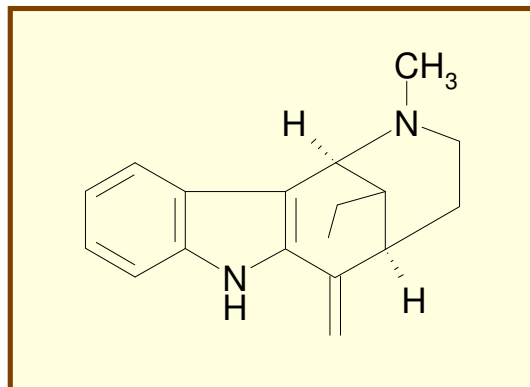


Figura 39 - Representação estrutural da uleína

Ao compararmos o espectro de massas do composto majoritário da amostra com o da uleína vemos que ambos apresentam os mesmos fragmentos principais ($m/z = 266, 251, 237, 223, 209, 194, 180$ e 167).

O mecanismo de fragmentação apresentado no trabalho de JOULE *et alii* (1964) para explicar a formação dos principais fragmentos da uleína está representado na Figura 40.

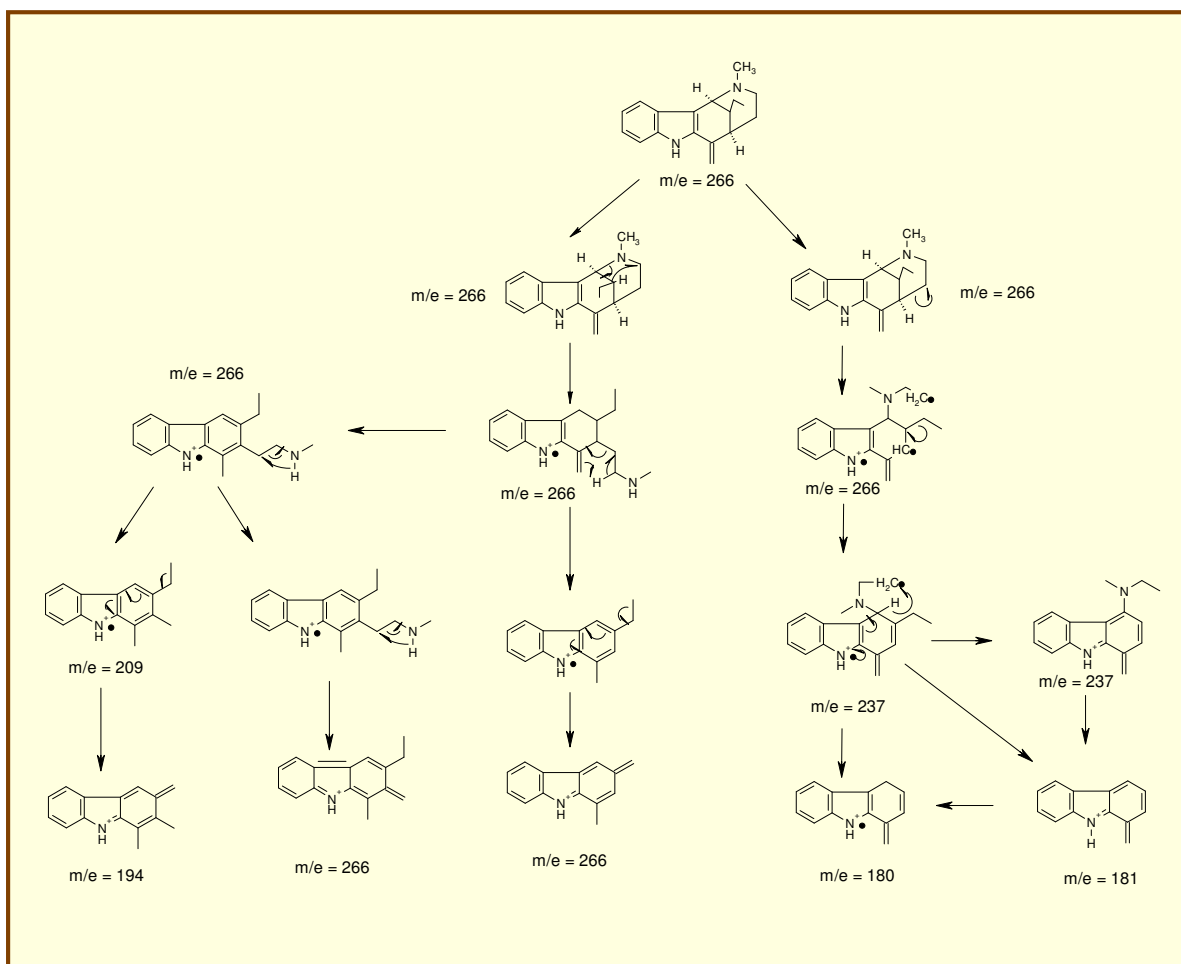


Figura 40 - Mecanismo de fragmentação da uleína (JOULE *et alii*, 1964)

Após o fracionamento do extrato de alcalóides totais, item 2.2.3.2.1, constatou-se, através de CCD analítica, que esse composto majoritário aparecia relativamente purificado na fração F10. Posteriormente, essa fração foi purificada por CCD preparativa, originando a fração F10P, a qual foi analisada por CCD analítica (métodos 1a 2a 4a e 7a, Tabela 8), revelando a presença de apenas um composto. Após essa análise fez-se então CG-EM dessa fração, sendo os resultados apresentados nas Figuras 41 e 42.

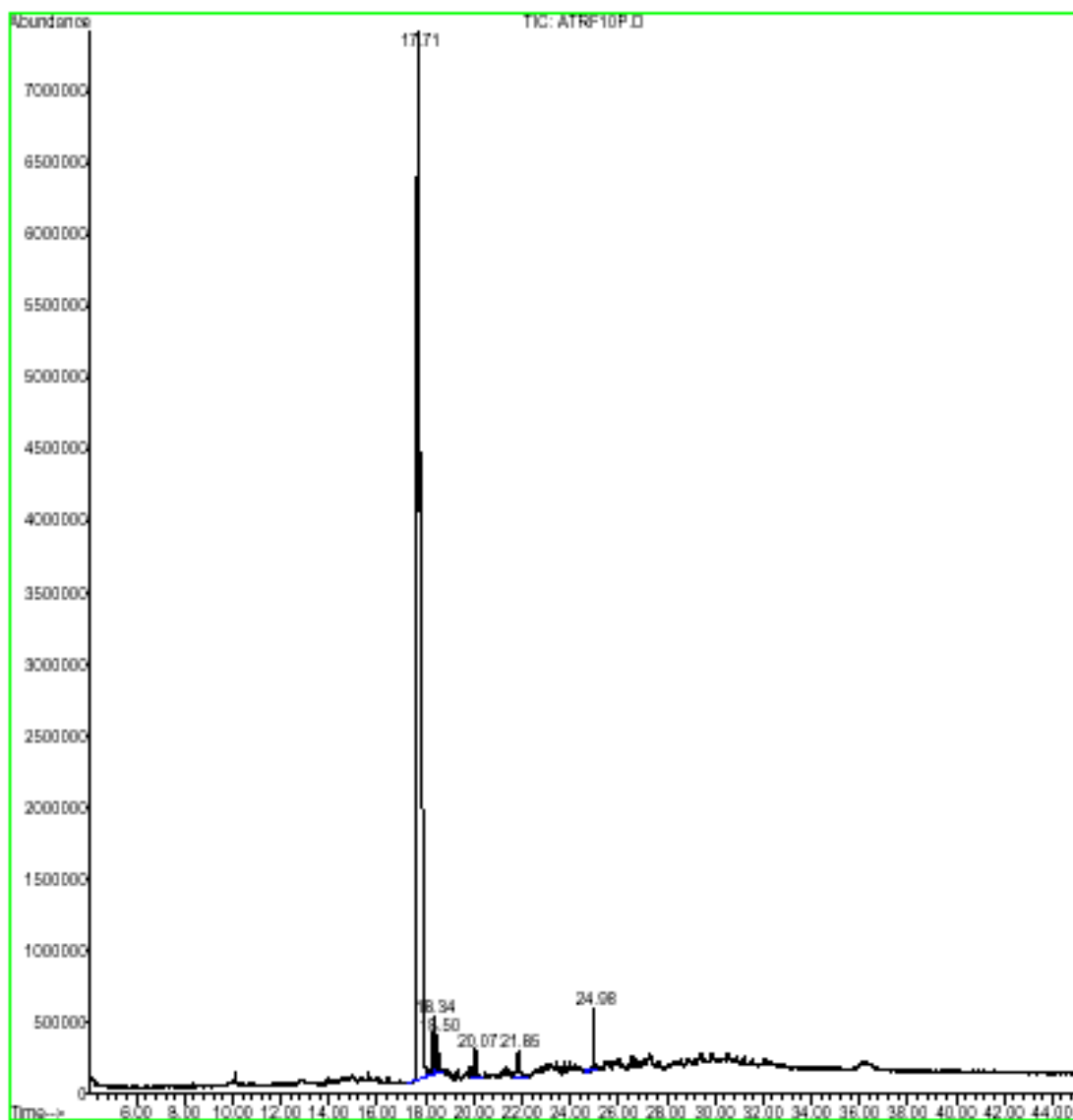


Figura 41 - Cromatograma da fração F10P dos alcalóides dos ramos de *A. tomentosum*, feita segundo a rampa de aquecimento 2 (Figura 24)

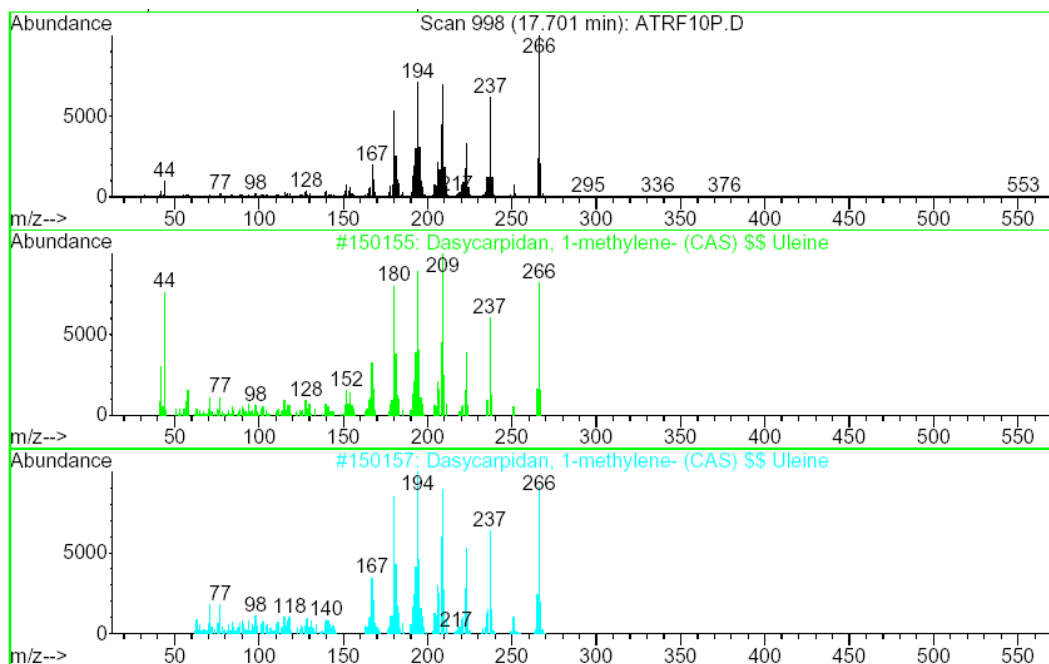


Figura 42 - Padrão de fragmentação do composto com TR = 17,7 min da fração F10P dos alcalóides dos ramos de *A. tomentosum*

A área do pico correspondente ao composto majoritário, cuja fragmentação é compatível com a da uleína, corresponde a cerca de 92 % da área total (Figura 39).

Apesar da compatibilidade entre o espectro obtido, a descrição da literatura e os dados disponíveis no banco de espectros, havia ainda a possibilidade de que o composto isolado na fração F10P fosse, a 20-epi-uleína (Figura 43), diastereômero da uleína encontrado em duas outras espécies de *Aspidosperma* (BORRIS *et alii*, 1983; GARCIA *et alii*, 1976).

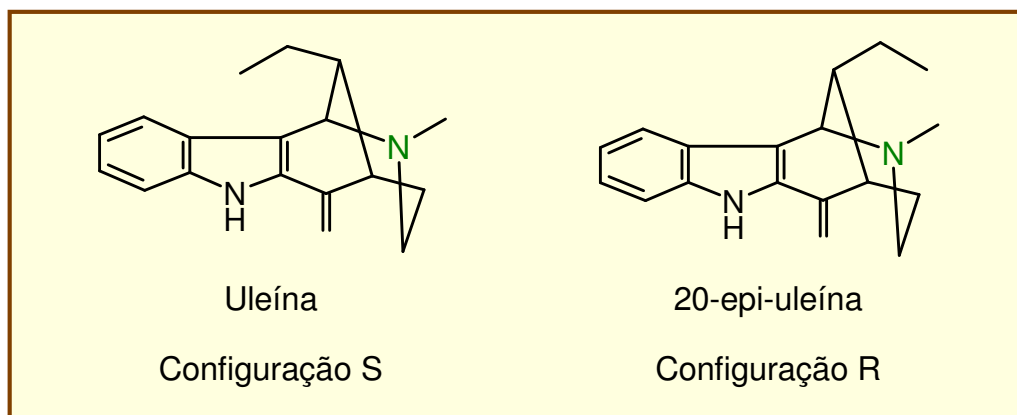


Figura 43 - Representação da uleína e de seu epi isômero

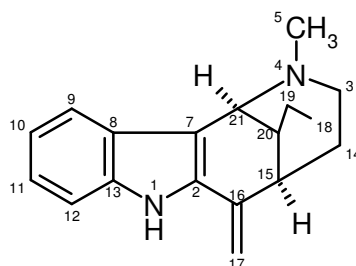
Para esclarecer essas questões, recorreu-se a análise da amostra por RMN de ^{13}C , que segundo BORRIS *et alii* (1983) seria possível distinguir entre a uleína e seu epímero.

A Figura 44 traz o espectro de RMN de ^{13}C da fração F10P e na Tabela 16 são mostrados entre os valores de deslocamentos químicos encontrados na presente análise e os relatados por BORRIS *et alii* (1983).

VER PDF COM A
PÁGINA 94

Tabela 16 - Deslocamentos químicos da uleína, seu epi-isômero e da amostra F10P frente a RMN¹³C (75 MHz) feito em CDCl₃

Carbono	Deslocamento Químico (ppm)		
	Uleína*	20-Epi-uleína*	Amostra F10P
2	135,5	136,4	135,7
3	46,2	46,2	46,1
5	44,1	44,4	43,6
7	107,3	110,0	107,8
8	129,3	127,9	129,0
9	119,3*	119,0*	119,2
10	119,6*	119,8*	120,1
11	122,4	122,6	122,9
12	110,8	111,0	111,0
13	136,8	136,6	136,7
14	34,5	27,8	34,0
15	39,4	37,7	39,0
16	138,7	141,1	138,1
17	106,9	106,1	106,4
18	11,6	12,0	11,6
19	24,2	23,3	24,2
20	45,8	44,2	45,2
21	56,6	55,3	56,8



*BORRIS *et alii*, 1983

Vemos no espectro que exceto pelo sinal em 178 ppm (correspondente a uma carbonila pertencente a impureza presente na amostra) há apenas os picos referentes á uleína. A comparação entre os dados de BORRIS *et alii* (1983) e os obtidos na análise da fração F10P apresentada na Tabela 17 confirmaram os dados de CG-EM que indicaram a uleína como sendo a estrutura majoritária da fração. Assim, comparando o deslocamento químico do carbono da posição 14 exclui-se a

possibilidade do alcalóide em questão ser a 20-epi-uleína. Outro dado que evidencia a presença da uleína no extrato em questão é o fato desse alcalóide ter sido isolado anteriormente nessa espécie (ARNDT *et alii*, 1967; SILVA *et alii*, 2005).

Após a confirmação da presença da uleína no extrato, partimos para análise dos espectros de massas dos compostos minoritários que apareceram no cromatograma do extrato de alcalóides totais (Figura 38).

O composto com TR = 17,9 min apresentou espectro de massas que diferia daquele da uleína pela presença de um fragmento com $m/z = 252$ (Figura 45). Este fragmento pode ser decorrente da co-eluição da uleína com a nor-uleína, (Figura 46), de massa molar igual a 252 Daltons (GABETTA *et alii*, 1975), e que foi encontrada por JOULE *et alii* (1965) nas cascas de *Aspidosperma dasycarpon*, juntamente com outros alcalóides correlatos, dentre eles, a uleína e a desmetileno-oxo-uleína.

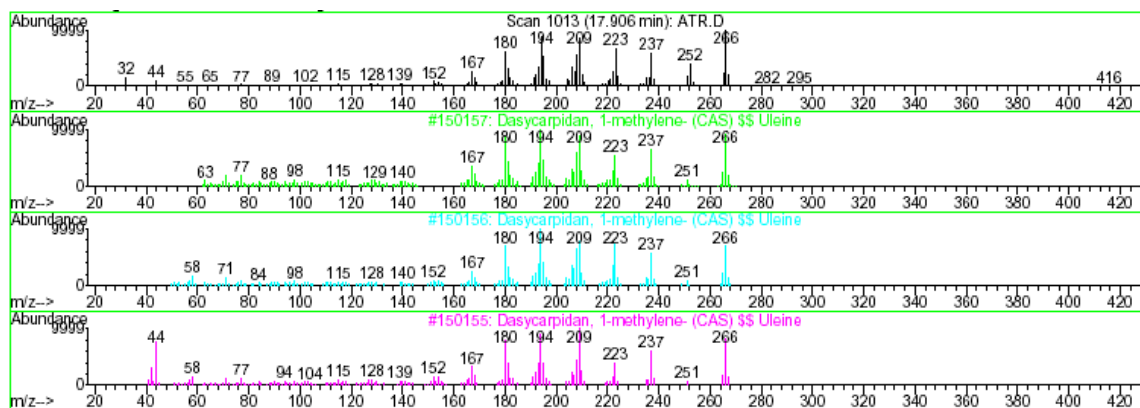


Figura 45 - Padrão de fragmentação do composto com TR = 17,90 min obtido do extrato de alcalóides totais dos ramos de *A. tomentosum*

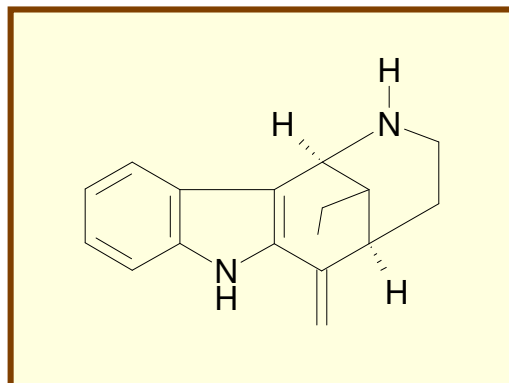


Figura 46 - Representação da nor-uleína

A presença do íon molecular da uleína ($M^{+•} = 266$) no mesmo espectro pode ser explicado pela falta de resolução entre os picos com TR = 17,6 e 17,9 min (Figura 37), que correspondem respectivamente à uleína e ao composto em questão. Como o restante do padrão de fragmentação da nor-uleína é o mesmo esperado para a uleína (GABETTA *et alii*, 1975) e também pelo fato desse alcalóide ter sido encontrado com outros derivados da uleína, podemos inferir que o alcalóide em questão (TR = 17,9 min, Figura 38) é de fato a nor-uleína.

O composto de TR = 18,3 min apresentou um padrão de fragmentação semelhante ao da desmetileno-oxo-uleína (Figuras 47 e 48), alcalóide encontrado concomitantemente com a uleína em duas espécies de *Aspidosperma*, a saber: *A. multiflorum* A. (GILBERT *et alii*, 1965) e *A. dasycarpon* (JOULE *et alii*, 1965).

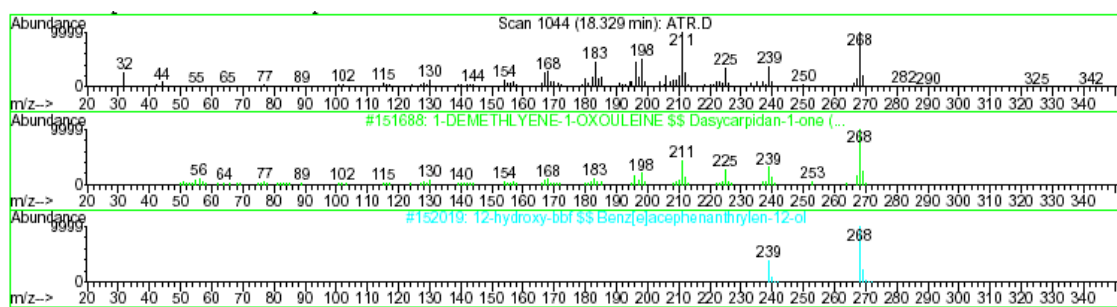


Figura 47 - Espectro de massas do composto TR = 18,3 min obtido do extrato de alcalóides totais dos ramos de *A. tomentosum*, feito segundo a rampa de aquecimento 2 (Figura 24)

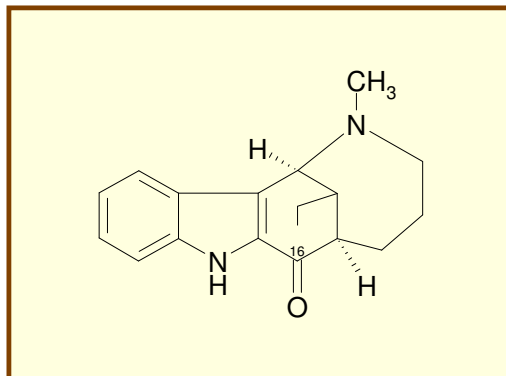


Figura 48 - Estrutura da desmetileno-oxo-uleína

No espectro obtido, o íon molecular ($M^{+•} = 268$) e os fragmentos com m/z igual a 239, 225, 211, 198, 196 e 183, encontram-se duas unidades acima daqueles obtidos para a uleína, os quais podem ser explicados como o resultado da substituição do grupo metileno ($=CH_2$) por um átomo de oxigênio na posição 16 (GABETTA *et alii*, 1975).

Esses dados, juntamente com a descrição do isolamento da desmetileno-oxo-uleína e da uleína a partir de um mesmo extrato (GILBERT *et alii*, 1965; JOULE *et alii*, 1965) são evidências de que o composto com TR = 18,3 min (Figura 47) trata-se da desmetileno-oxo-uleína.

Com TR = 18,5 min observou-se outro composto com fragmentação semelhante a da uleína (Figura 49) porém, em concentração muito inferior, quando comparada à uleína (TR = 17,7 min).

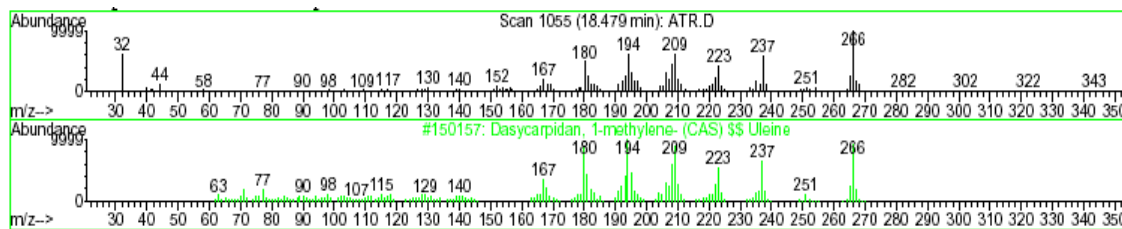


Figura 49 - Espectro de massas do composto TR = 18,5 min obtido do extrato de alcalóides totais dos ramos de *A. tomentosum*, feito segundo a rampa de aquecimento 2 (Figura 24)

Esse resultado poderia indicar a presença no extrato de mais de um isômero da uleína.

GARCIA *et alii* (1976), ao investigarem os alcalóides presentes nas cascas de *Aspidosperma formosum* encontraram tanto a uleína, quanto seu epímero, a 20-epi-uleína, sendo que o primeiro alcalóide apareceu em maior concentração; BORRIS *et alii* (1983) descrevem a presença de uleína e de seu epímero nas cascas de *Aspidosperma subincanum*. Apesar da uleína apresentar três carbonos estereogênicos, não foram encontrados relatos sobre o isolamento de outros isômeros além da 20-epi-uleína.

Partindo do princípio de que o alcalóide é a 20-epi-uleína pode-se ainda explicar o maior tempo de retenção desse em decorrência de menor impedimento estérico de seu grupo etila do que na uleína, promovendo melhor empacotamento das moléculas e favorecendo a atuação de forças intermoleculares de van der Waals (Figura 50).

Essa observação é ainda apoiada pela diferença de ponto de fusão entre a uleína e seu epímero. O primeiro alcalóide apresenta ponto de fusão entre 76 e 118°C (SCHMUTZ *et alii*, 1957) enquanto o segundo funde entre 125 e 132°C (JACKSON *et alii* 1969).

Essas observações sugerem que o alcalóide de TR = 18,5 min trata-se da 20-epi-uleína.

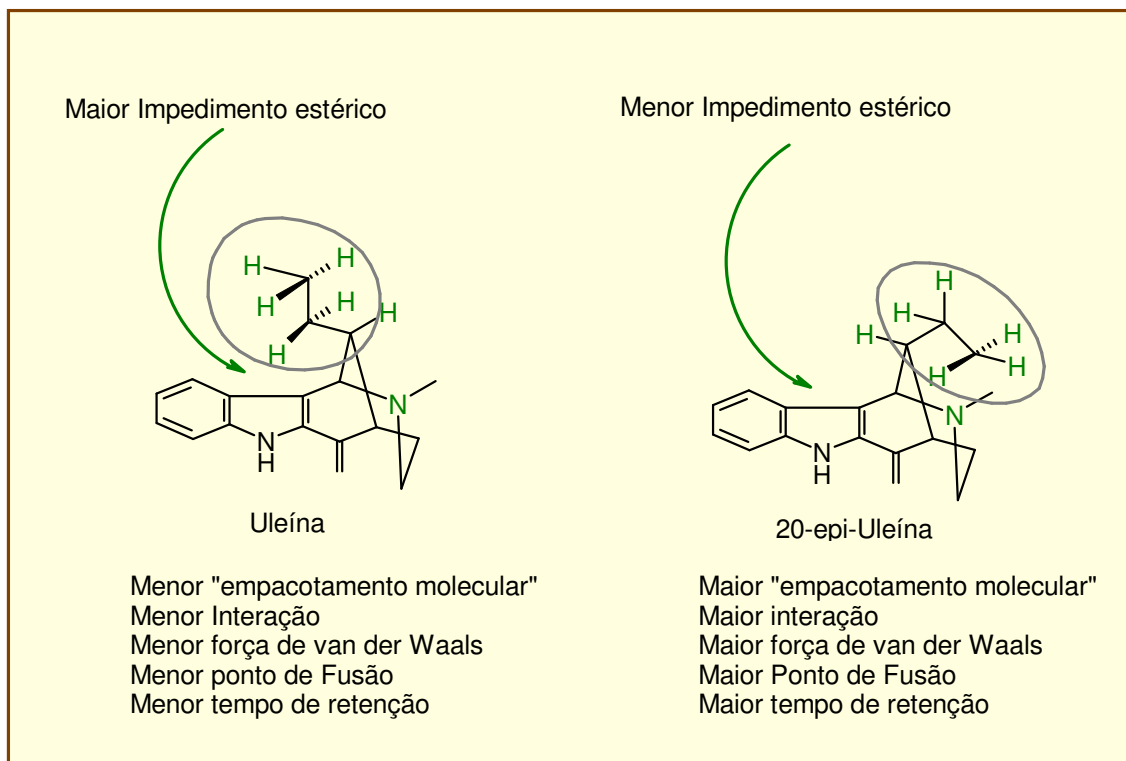


Figura 50 - Hipótese sobre a influência da configuração dos isômeros da uleína no tempo de retenção observado nos Cromatogramas 4 e 5

Com TR = 14,40 min temos um composto cujo padrão de fragmentação, sobretudo o pico base com $m/z = 149$, é semelhante ao do ftalato (SILVERSTEIN *et alii*, 2000), contaminante presente no solvente utilizado em algumas das análises por CG-EM.

Observando agora o cromatograma da fração F10P (Figura 41), vemos um outro composto de TR = 20,1 min, cujo padrão de fragmentação (Figura 51) foi identificado pela base de dados do aparelho como a eburnamonin-19-ona (Figura 52).

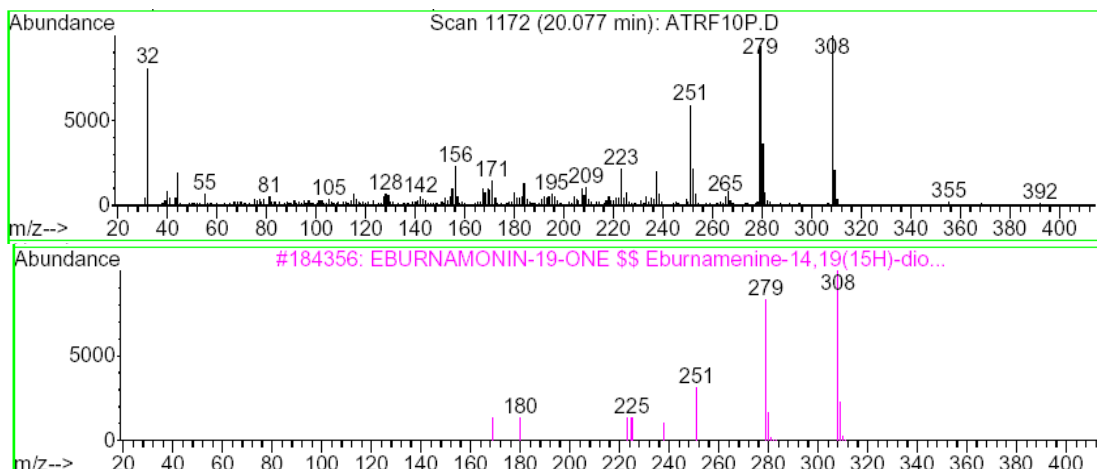


Figura 51 - Espectro de massas do composto TR = 20,08 min obtido do extrato de alcalóides totais dos ramos de *A. tomentosum*, feito segundo a rampa de aquecimento 2 (Figura 24)

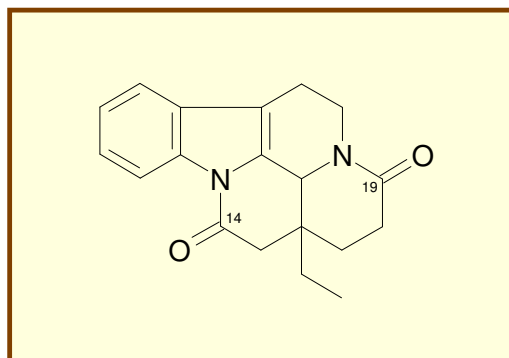


Figura 52 - Representação da eburnamin-19-ona

A partir dessa informação e da análise do padrão de fragmentação, buscou-se dados a respeito desse composto na literatura, sendo encontrados informações referentes à fragmentação da eburnamonina, análogo encontrado em *Vinca minor* L. (*Apocynaceae*) que apresenta estrutura semelhante ao composto em questão (DR. DUKE'S, 2005; RAINFOREST, 2005), com exceção à carbonila na posição 19 (carbonila adjacente ao nitrogênio não indólico, conforme mostrado na Figura 52). No espectro obtido para o composto com TR = 20,08 min, todos os fragmentos possuíam relação m/z com 14 unidades acima da observada para a eburnamonina, exceto aquele com m/z = 224, que não apresenta a carbonila da posição 19 (Figura

53) e por isso aparece tanto no espectro de massas da eburnamonina quanto da eburnamonin-19-ona.

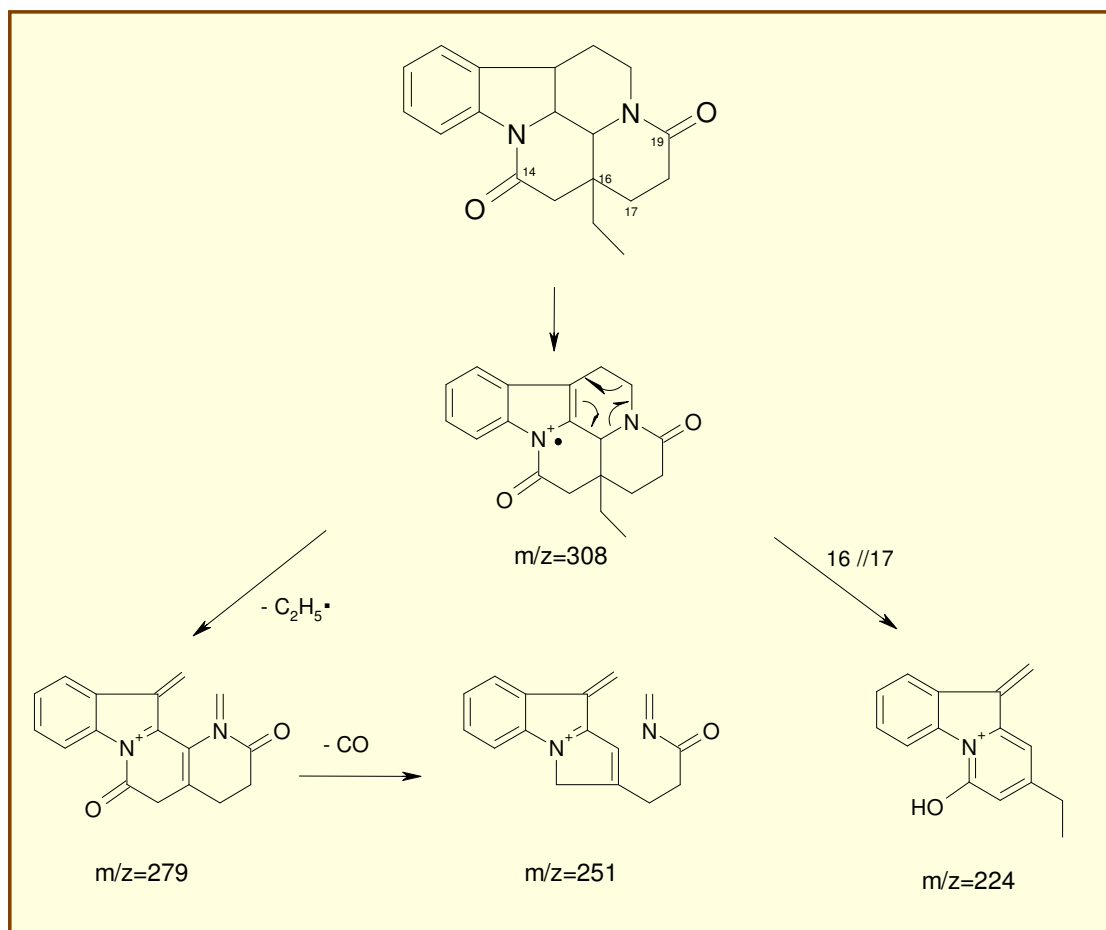


Figura 53 - Esquema de fragmentação da eburnamonin-19-ona baseado na proposta de BUDZIKIEWICZ *et alii* (1964) para a fragmentação da eburnamonina

Com base no mecanismo de fragmentação, pode-se concluir que o composto com TR = 25,0 min é a eburnamonin-19-ona.

A separação e identificação dos outros compostos minoritários presentes no extrato de alcalóides totais mostrou-se difícil, uma vez que os mesmos estão em baixa concentração e possuíam R_{fs} muito semelhantes.

2.2.4.2.2.2– Folhas

A Figura 54 representa a análise por CG do extrato de alcalóides totais, na qual observou-se a presença de apenas 3 picos principais com TR = 14,4; 17,6 e 21,4 min.

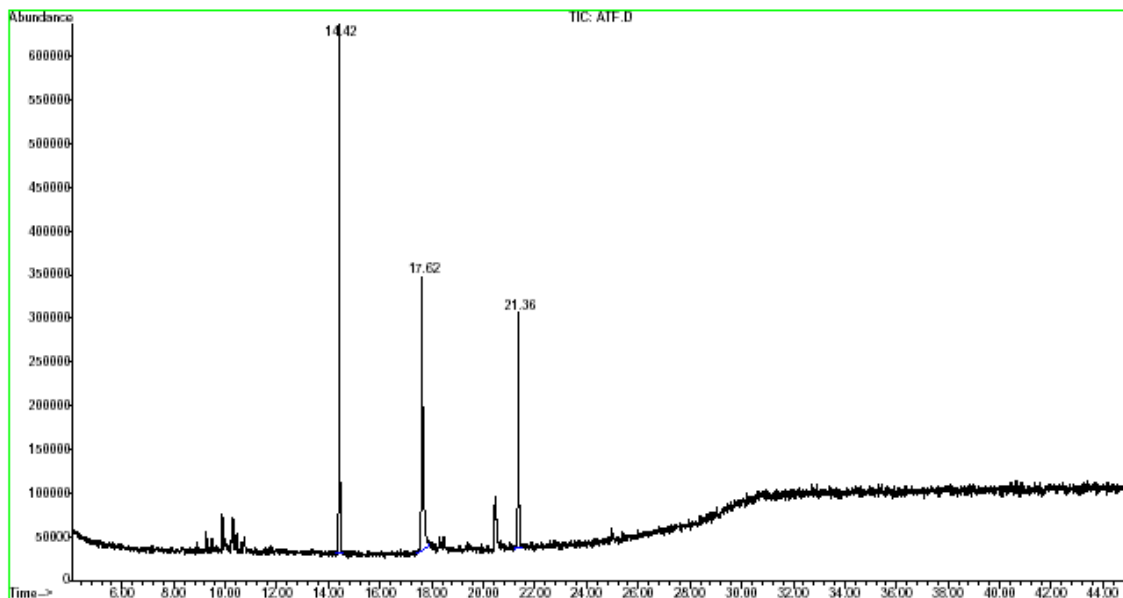


Figura 54 – Cromatograma do extrato de alcalóides obtido das folhas de *A. tomentosum*, feito segundo a rampa de aquecimento 2 (Figura 24)

O padrão de fragmentação dos compostos que deram origem a esses três picos foi compatível com o apresentado pelas seguintes substâncias: ftalato (TR = 14,4 min), uleína (TR = 17,6 min, Figura 55) e um outro tipo de ftalato (TR = 21,3 min).

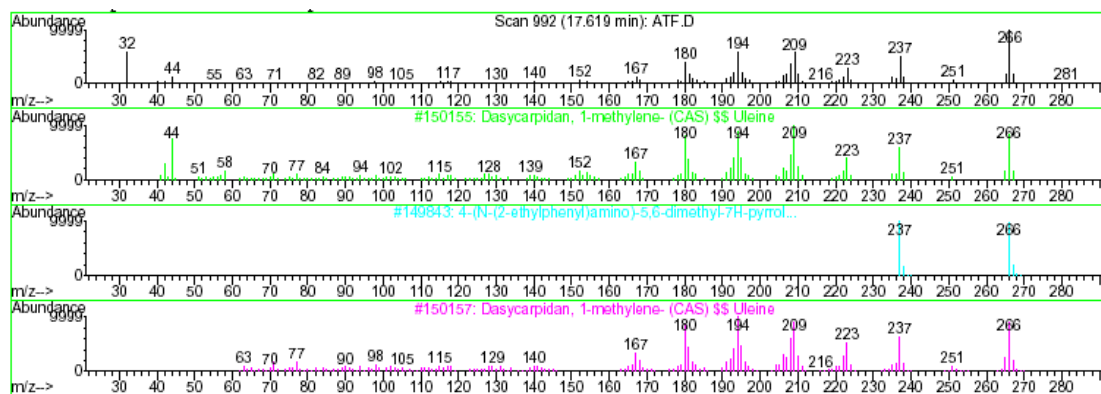


Figura 55 - Espectro de massas do composto TR = 17,6 min obtido do extrato de alcalóides totais das folhas de *A. tomentosum*, feito segundo a rampa de aquecimento 2 (Figura 24)

Como o composto majoritário do extrato de alcalóides totais das folhas apresentou o mesmo tempo de retenção e o mesmo padrão de fragmentação que o composto majoritário do extrato de alcalóides dos ramos dessa mesma espécie, decidiu-se estudar os compostos minoritários. Assim, após separação prévia (Coluna 1, Figura 27), e análise das frações por CCD, métodos 1a, 2a e 3a, Tabela 8, escolheu-se a fração F10, que após purificação, método 3b, Tabela 9, gerou a fração F10-2, analisada posteriormente por CG-EM, Rampa de Aquecimento 1 da Figura 24, sendo o perfil cromatográfico apresentada na Figura 56

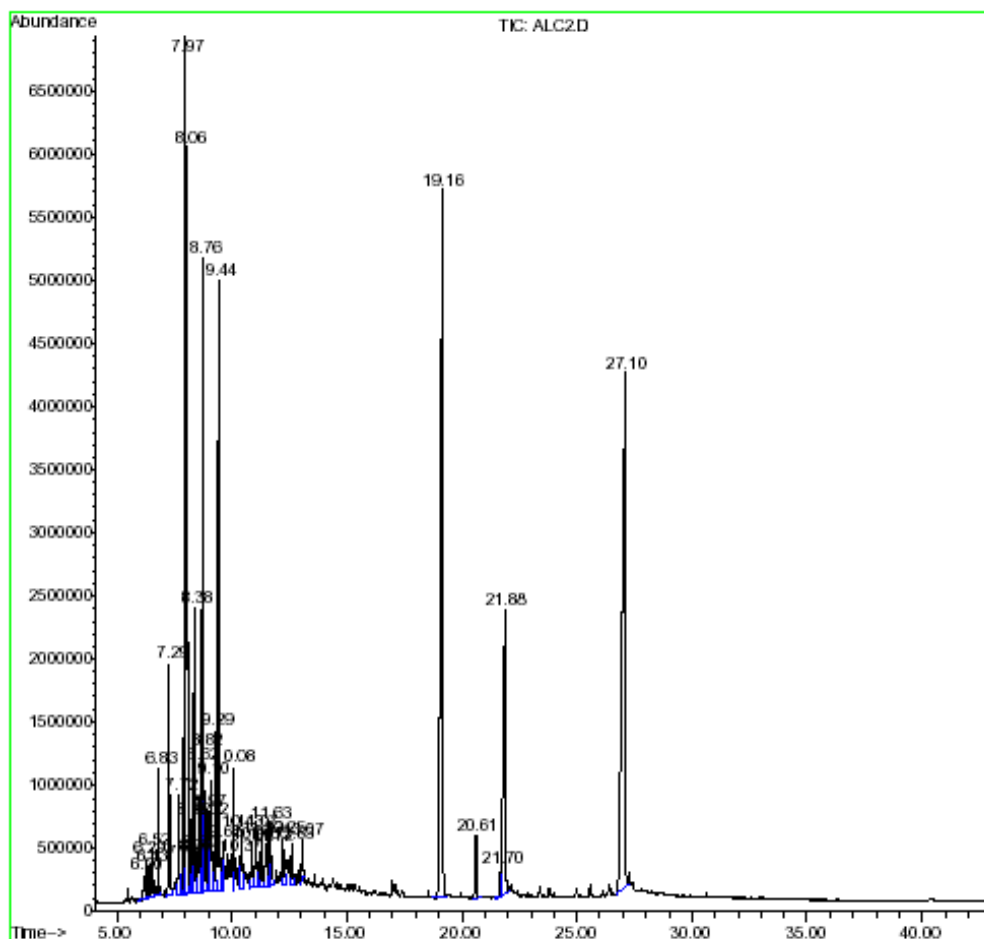


Figura 56 - Cromatograma da Fração F10-2 obtida do extrato de alcalóides totais das folhas de *A. tomentosum* (rampa de aquecimento 1, Figura 24)

As substâncias que apresentaram tempo de retenção menor que 15 minutos eram, em sua maioria, compostos de baixo peso molecular (espectros não apresentados).

Para o composto com TR = 19,2 min, encontramos um padrão de fragmentação ($m/z = 268$ ($M^{+\bullet}$), 239, 225, 211, 198, 183, 168, 154, 130) compatível com o da desmetileno-oxo-uleína (Figura 57), representada na anteriormente na Figura 48.

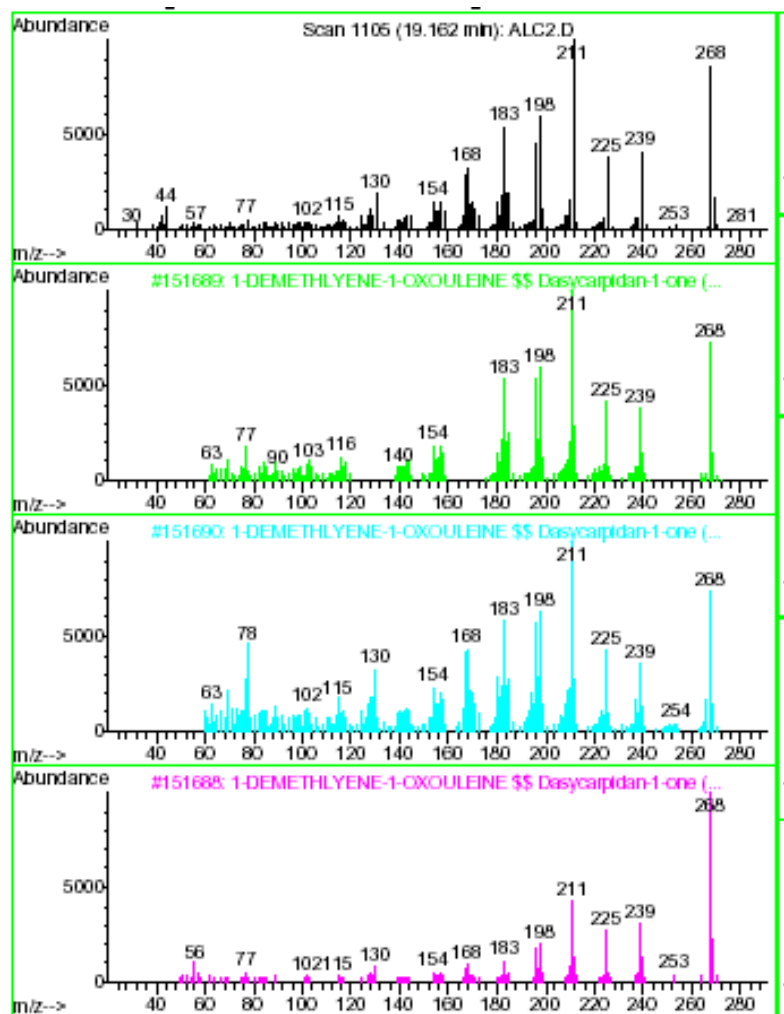


Figura 57 – Espectro de massas do composto TR = 19,2 min obtido da fração F10 do extrato de alcalóides totais das folhas de *A. tomentosum*, feito segundo a rampa de aquecimento 2 (Figura 24)

Embora o composto tenha sido identificado por CG-EM, o método de purificação utilizado não se mostrou eficaz para o isolamento do mesmo. Em relação aos demais compostos da amostra, não foi possível realizar o isolamento devido a pequena concentração e alta polaridade.

2.2.4.2.2.3– Sementes

Através da análise do extrato de alcalóides totais das sementes por CG, Rampa de Aquecimento 2, Figura 24, nota-se a presença de três compostos principais e de quatro compostos em menor proporção (Figura 58).

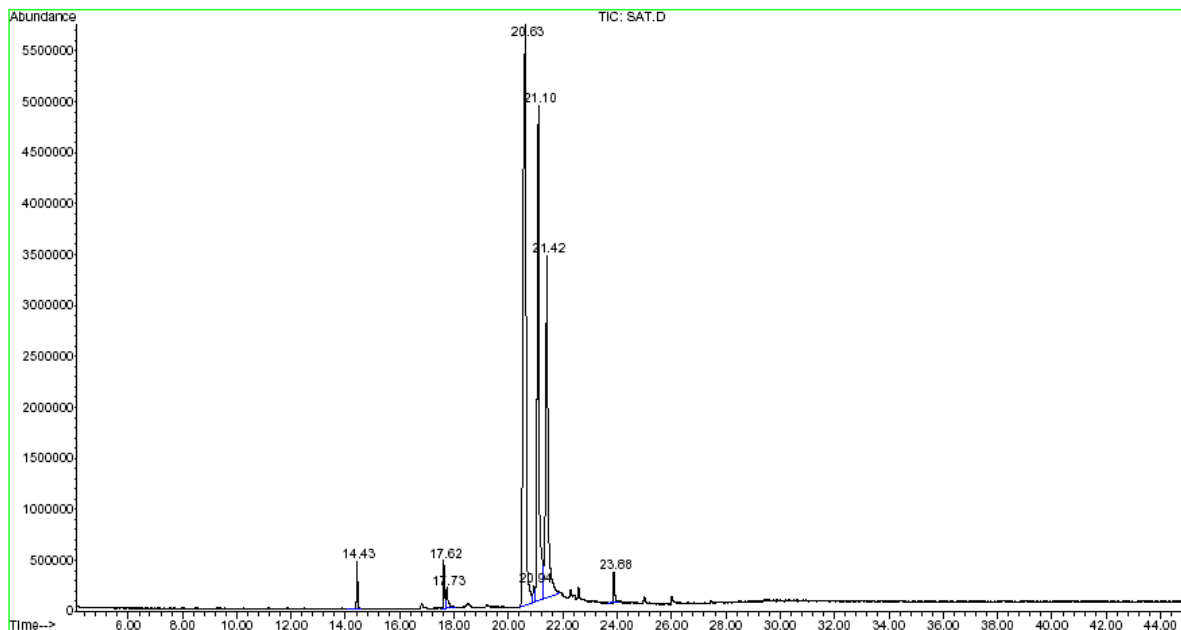


Figura 58 - Cromatograma do extrato de alcalóides totais das sementes de *A. tomentosum*, feito de acordo com a rampa de aquecimento 2 (Figura 24)

O composto com TR = 17,6 exibiu padrão de fragmentação semelhante ao da uleína (Figuras 59), isolada anteriormente nos ramos de *A. tomentosum*.

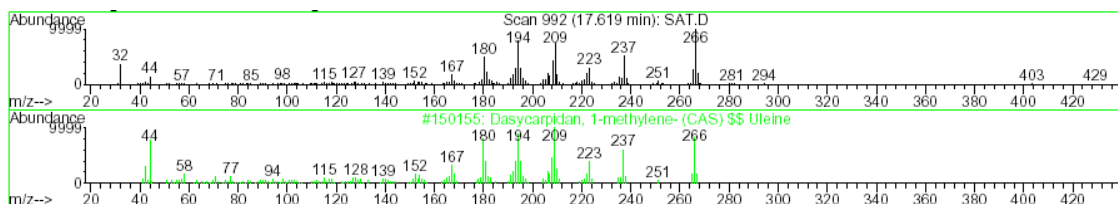


Figura 59 - Padrão de fragmentação do composto com TR = 17.6 min, obtido das sementes de *A. tomentosum*, de acordo com a rampa de aquecimento 2 (Figura 24)

O composto majoritário (cerca de 47 % da amostra) com TR = 20,6 minutos apresentou padrão de fragmentação (Figura 60) compatível ao da quebrachamina (Figura 61), alcalóide anteriormente isolado de *Aspidosperma album* (URREA *et alii*, 1978), *Aspidosperma quebracho-blanco* (BIEMANN *et alii*, 1963) e *Aspidosperma polyneuron* (TAYLOR *et alii*, 1959).

O mecanismo que explica a formação dos fragmentos principais que compoem o espectro de massas da quebrachamina é mostrado na Figura 62 (BUDZIKIEWICZ *et alii*, 1964).

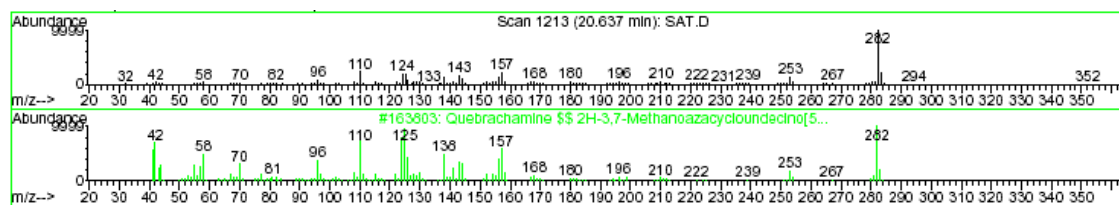


Figura 60 – Espectros de massas do composto com TR = 20,6 min presente extrato de alcalóides totais das sementes de *A. tomentosum*, feito segundo a rampa de aquecimento 2 (Figura 24)

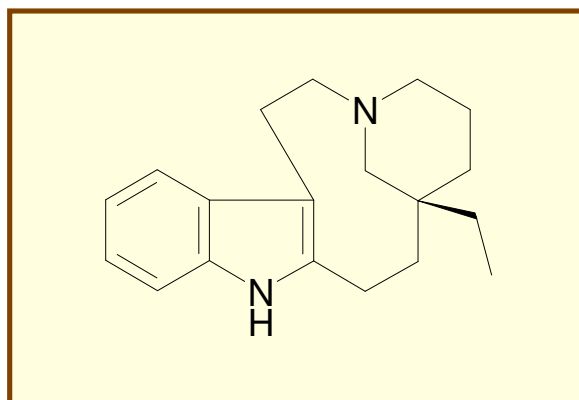


Figura 61 - Estrutura da quebrachamina

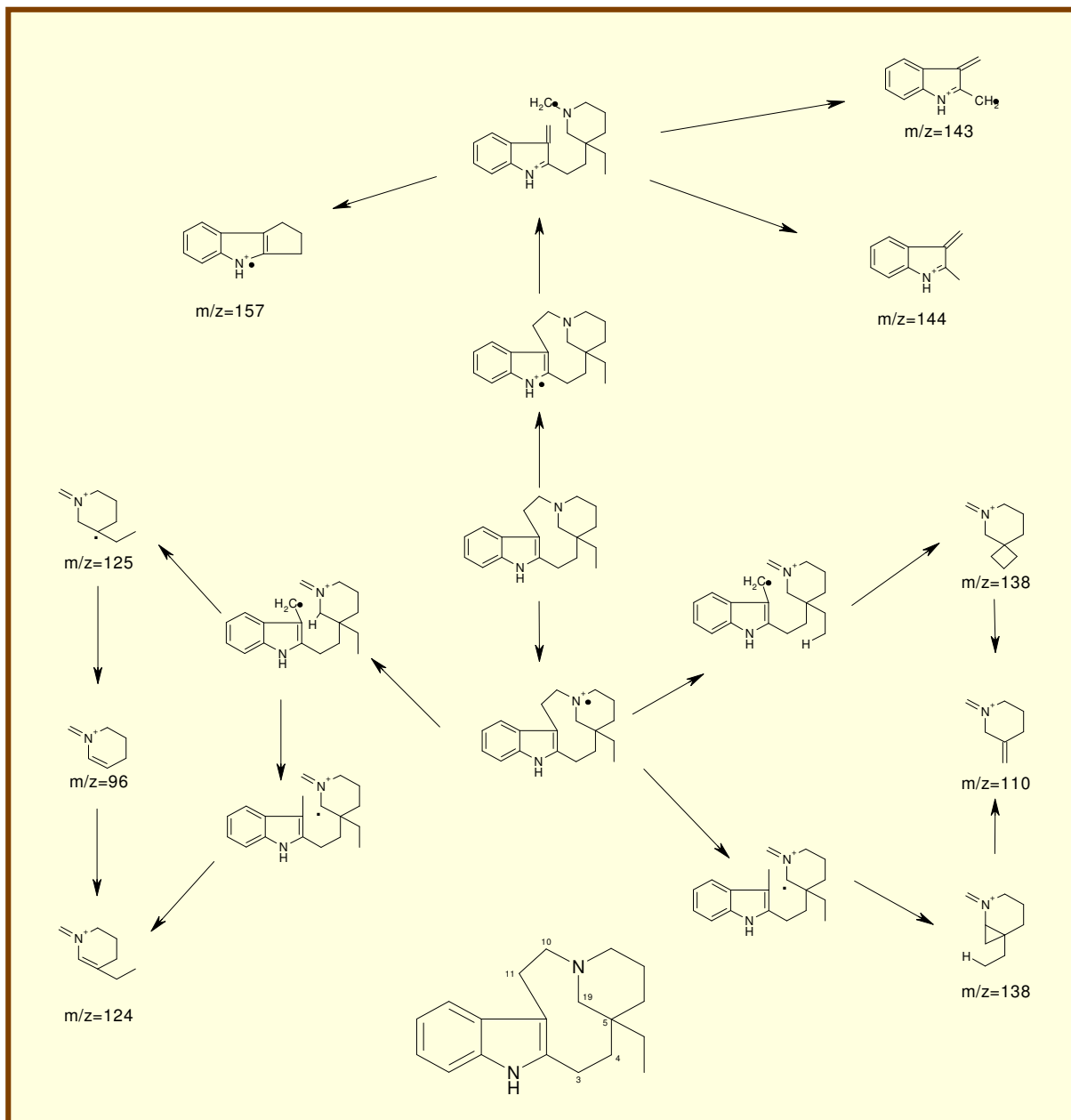


Figura 62 - Mecanismo de fragmentação da quebrachamina (BUDZIKIEWICZ *et alii*, 1964)

Após a análise do extrato de alcalóides totais, fez-se a investigação das frações obtidas com a separação pela Placa 1 (Figura 28), a começar pela F2, que previamente revelou em análise por CCD (métodos 2a, 4a, 6a e 7a, Tabela 8) a presença de um composto majoritário posteriormente purificado, Figura 28 e Tabela 13, e que, ao final, foi chamado de fração F2P; esta, por sua vez, foi analisada por

CG-EM (Figuras 63), Rampa de Aquecimento 2, Figura 24, revelando um composto majoritário (cerca de 93% da fração), que apresentou padrão de fragmentação e TR compatíveis com aqueles da quebrachamina.

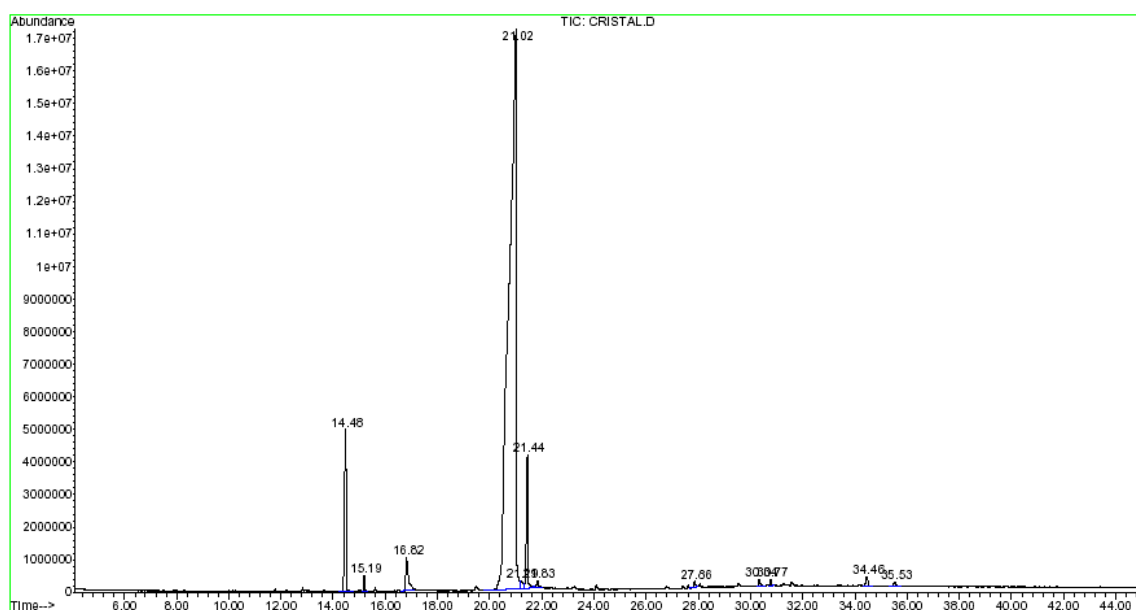


Figura 63 - Cromatograma da fração F2P obtida do extrato de alcalóides totais das sementes de *A. tomentosum*, feito segundo a rampa de aquecimento 2 (Figura 24)

Esta fração foi posteriormente analisada por RMN de ^1H (Figuras 64 e 65), sendo que os resultados obtidos foram comparados aos de TEMME *et alii* (1998), utilizados na caracterização da quebrachamina.

VER PDF COM A
PÁGINA 111

VER PDF COM A
PÁGINA 112

No espectro de RMN ^1H (Figuras 64 e 65) vemos a presença de um tripleto em 0,87 ppm ($J = 7,5$ Hz) correspondente a um grupo metilênico, que pode ser atribuído a uma etila terminal e um hidrogênio com 7,70 ppm ligado ao hidrogênio indólico. Há também um singleto em 1,49 ppm que pode ser atribuído aos hidrogênios da posição 19 (Figura 62). Além disso, observa-se a presença de multipletos em campo alto e na região aromática compatíveis com aqueles observados para anéis indólicos, não substituídos e apresentam deslocamentos químicos compatíveis com aqueles descritos na literatura para a quebrachamina (TEMME *et alii*, 1998).

Logo, através desses dados espectroscópicos, aliados à presença de quebrachamina em outras espécies de *Aspidosperma* e também e ao resultado da análise por CG-EM, é possível inferir que o composto majoritário da fração F2P é a quebrachamina.

Continuando a análise do Cromatograma apresentado na Figura 58, vemos a presença de um composto minoritário com TR = 16,8 min cujo padrão de fragmentação (Figura 66) é compatível com o observado para a di-desidro-aspidospermidina (Figura 67).

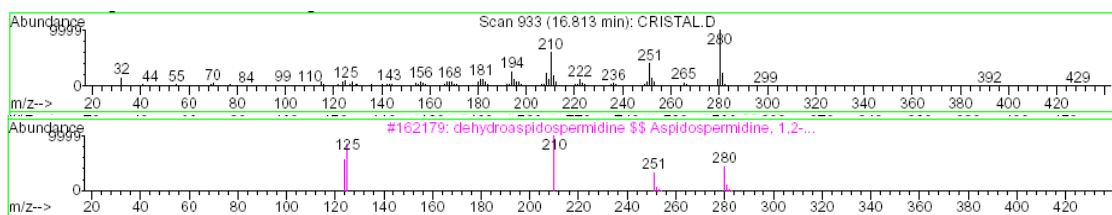


Figura 66 - Espectro de massas do composto com TR = 16,8 presente na fração F2.P obtida do extrato de alcalóides totais da sementes de *A. tomentosum*

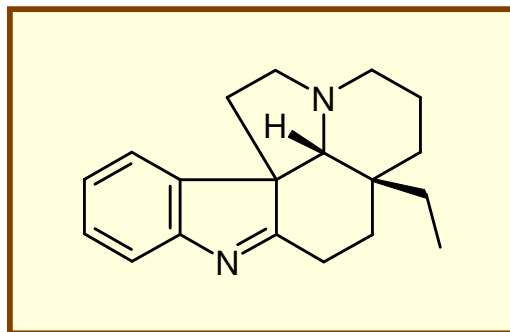


Figura 67 - Representação da di-desidro-aspidospermidina

A semelhança entre o espectros de massas, somada ao fato da di-desidro-aspidospermidina já ter sido isolado de outras espécies de *Apocynaceae*, sugerem para o composto em questão a estrutura da di-desidro-aspidospermidina.

Ainda em relação ao isolamento da quebrachamina observou-se que esse alcalóide sofria aparente transformação de cristal acúlfome branco para um sólido amorfo amarelo, quando exposto à luz, em solventes (como clorofórmio) ou ao ar, por períodos curtos de tempo (cerca de 1 hora) e temperaturas em torno de 25 °C.

Frente a essa transformação, fez-se a irradiação de uma amostra destes cristais (idêntica à utilizada para as análises de CG-EM e de RMN ^1H vistas nas Figuras 63, 64 e 65), que apresentavam apenas traços de aspidospermidina, diluídos em clorofórmio, com luz UV ($\lambda = 254 \text{ nm}$) por um período de trinta minutos. Após secagem, o sólido resultante foi então exposto ao ar durante três dias, até que todos os cristais de quebrachamina fossem aparentemente transformados.

Com o sólido amorfo resultante, realizou-se análise por CCD, através dos sistemas 1a, 2a, 3a, 4a, 6a e 7a (Tabela 8) com a qual, observou-se uma mancha com o mesmo R_f da quebrachamina e outra, logo abaixo, na forma de rastro, além de uma terceira no ponto de aplicação. Essa mistura foi posteriormente analisada por CG-EM, Rampa de Aquecimento 2 (Figura 24), cujo Cromatograma, visto na Figura 68, revelando a presença de substâncias com padrão de fragmentação

semelhantes ao da 5,21-di-desidro-aspidospermidina (TR = 16,8 min, Figura 69), da quebrachamina (TR = 20,5 min, Figura 70) e da 1-acetil-aspidospermidina (TR = 22,6 min, Figura 71), representadas na Figura 72.

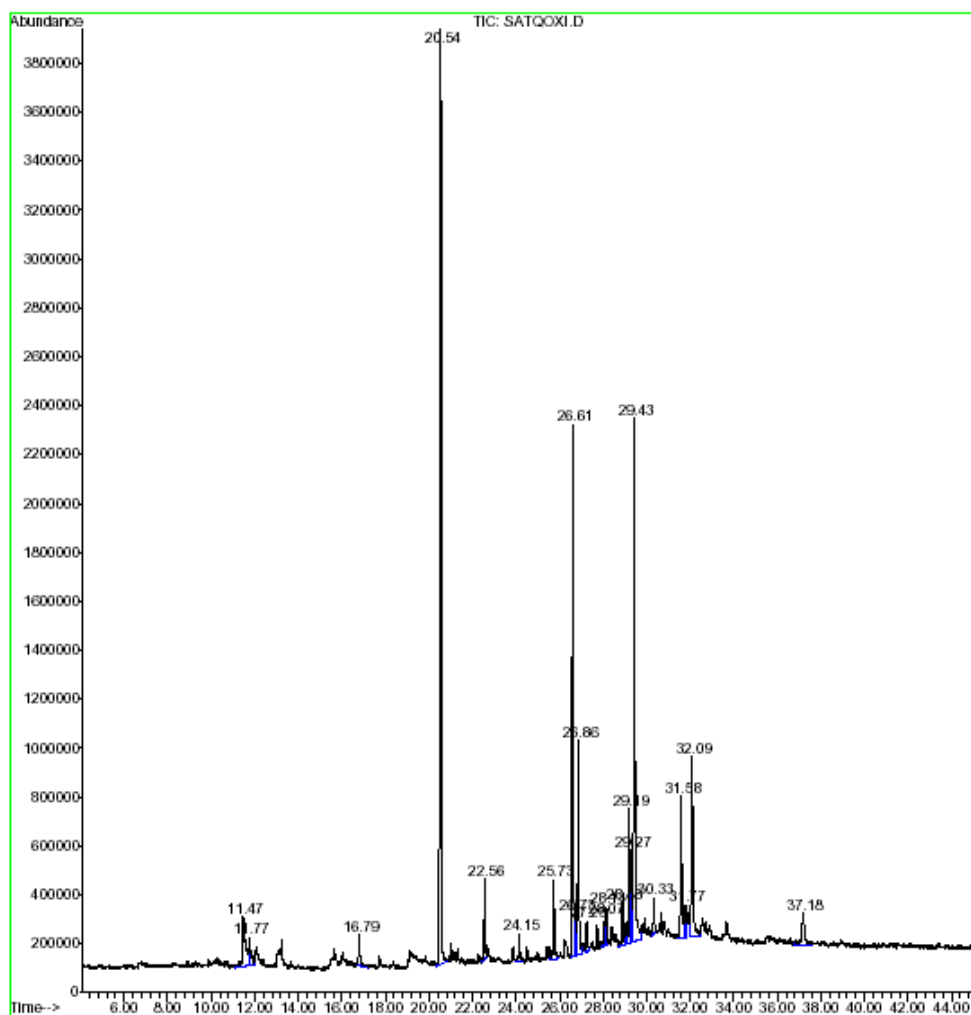


Figura 68 - Análise por CG da quebrachamina exposta à luz UV

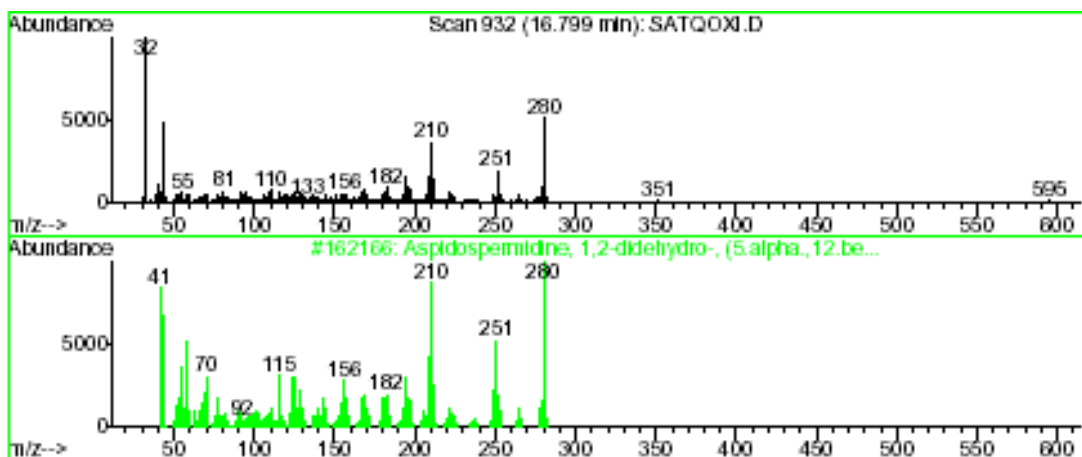


Figura 69 - Espectro de massas do composto com TR = 16,8 min obtido da amostra de quebrachamina submetida à luz UV

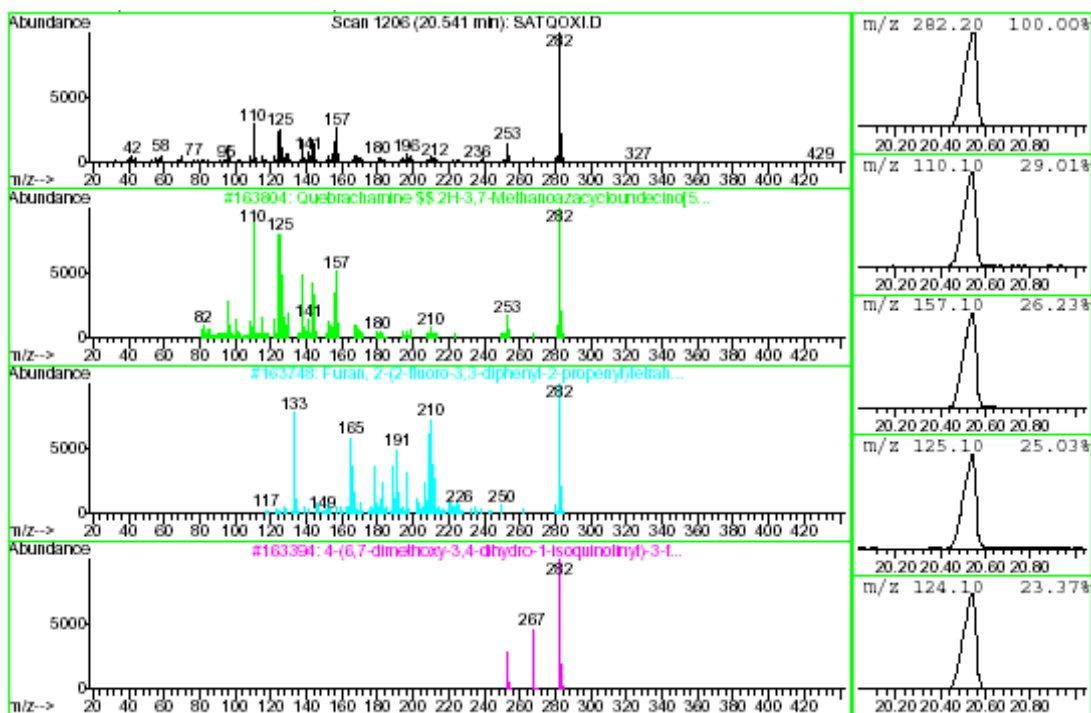


Figura 70 - Espectro de massas do composto majoritário, TR = 20,5 min, da amostra de querachamina submetida à luz UV

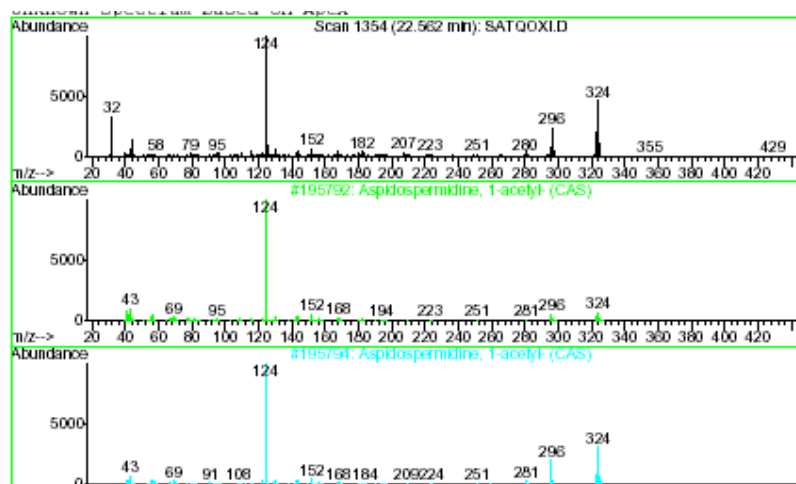


Figura 71 - Espectro de massas do composto com TR = 22,6 min obtido da amostra de quebrachamina submetida à luz UV

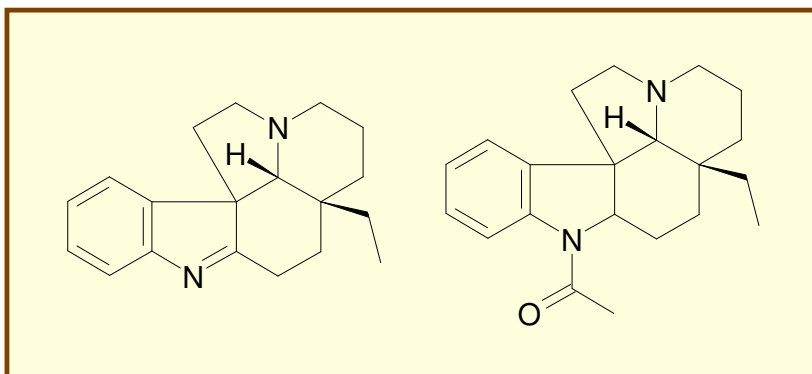


Figura 72 - Representação da 1,2 di-desidro-aspidospermidina e da 1-acetil-aspidospermidina

Ao compararmos os resultados de CG-EM antes e depois da exposição da quebrachamina (Figuras 63 e 68 respectivamente), nota-se um aumento da quantidade de compostos, cujos padrões de fragmentação não correspondem a alcalóides, mas possivelmente a produtos de degradação da estrutura alcaloídica.

CAMERMAN *et alii* (1965) realizaram a síntese da aspidospermidina a partir da quebrachamina. Nesse mesmo trabalho é feita a referência da obtenção da di-desidro-aspidospermidina a partir da quebrachamina. Dessa forma, poder-se-ia inferir a ocorrência de conversão da quebrachamina em 1-acetil-aspidospermidina e na 5,21-di-desidro-aspidospermidina. Porém, devido à falta de experimentos

quantitativos que pudessem comprovar essa transformação, não foi possível a confirmação de tal evento.

Retornando agora ao Cromatograma do extrato de alcalóides totais (Figura 58) observamos a preseça de um composto com TR = 21,10 min, cujo padrão de fragmentação é semelhante ao da razinilama, Figuras 73 e 74, alcalóide isolado de *Rhazya stricta* Descaisne (BANERJI *et alii*, 1970; SILVA *et alii*, 1972) e em *Leuconotis eugenifolia* (GOH *et alii*, 1986) e também nas folhas de *Aspidosrperma quebracho-blanco* (LYON *et alii*, 1973), todas percentences à família *Apocynaceae*.

O mecanismo de formação dos principais fragmentos que compõem o espectro de massas da razinilama é apresentado na Figura 75.

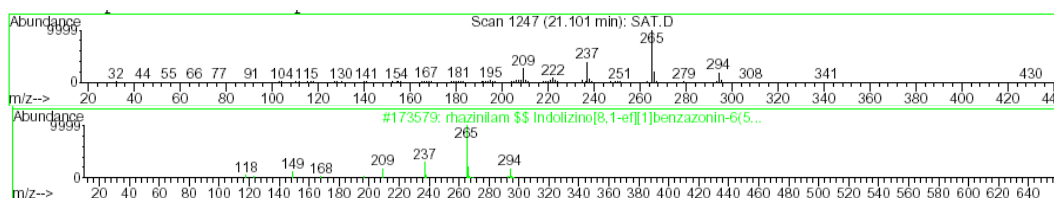


Figura 73 - Padrão de fragmentação do composto com TR = 21,1 min, obtido das sementes de *A. tomentosum*

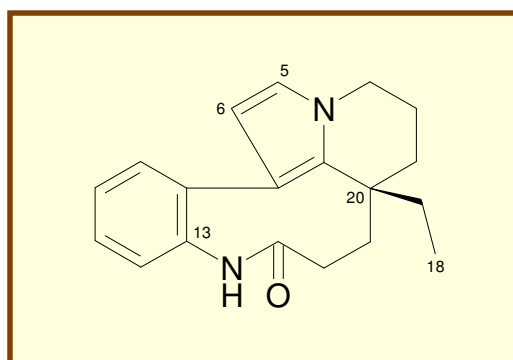


Figura 74 - Representação da razinilama

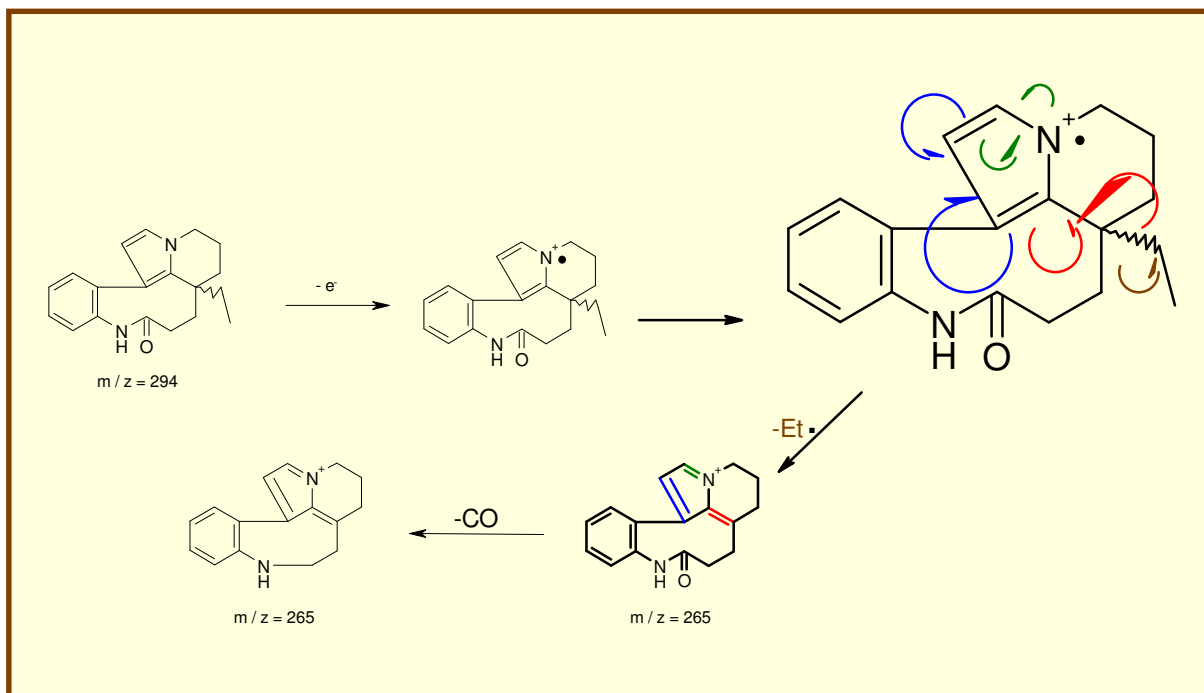


Figura 75 - Mecanismo de fragmentação da razinilama (BANERJI *et alii*, 1970)

Como esse composto era um dos majoritários presentes no extrato de alcalóides totais, partiu-se para seu isolamento, feito por CCD preparatória, de acordo conforme visto no item 2.2.3.2.3.

Feito isso, chegou-se a fração 4.1, que foi posteriormente analisada por CG-EM, cujo resultado é apresentado nas Figuras 76 e 77.

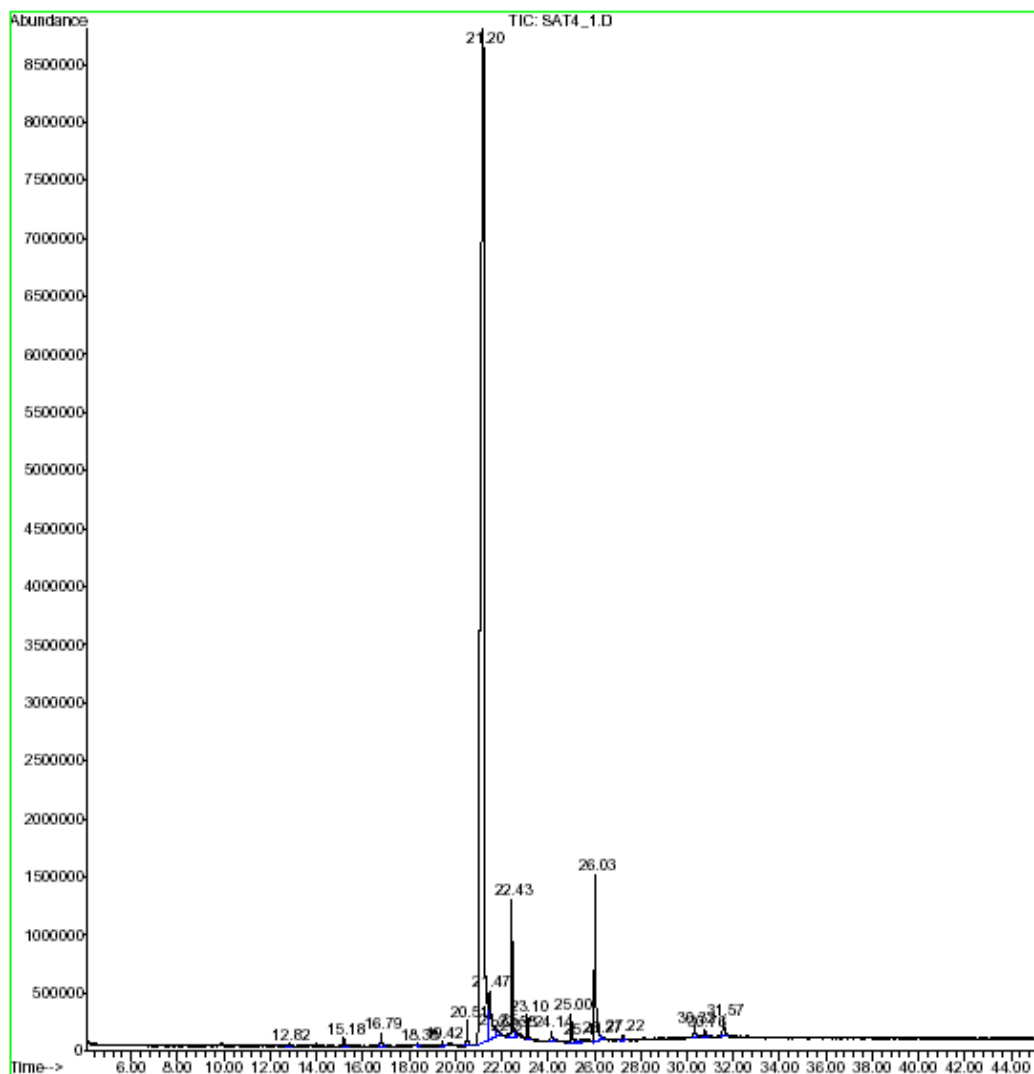


Figura 76 - Análise da fração 4.1 do extrato de alcalóides totais das sementes de *A. tomentosum*

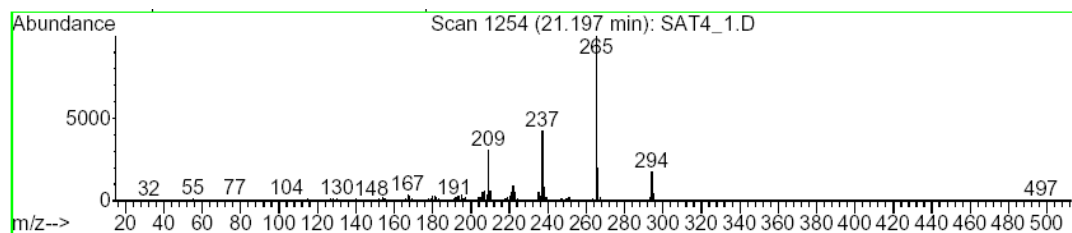


Figura 77 - Padrão de fragmentação do composto majoritário da fração 4.1 (TR = 21,20 min) do extrato de alcalóides totais das sementes de *A. tomentosum*

Pelo Cromatograma da Figura 75 vemos que o composto com TR = 21,20 min aparece em alta concentração (cerca de 81 %).

A análise do espectro desse composto (Espectro 76) mostrou que o mesmo apresenta padrão de fragmentação idêntico ao da razinilama.

Devido a pureza e à quantidade de material disponível, fez-se então a análise dessa fração por RMN de ^1H (Figuras 78 e 79).

VER PDF COM A
PÁGINA 122

VER PDF COM A
PÁGINA 123

Podemos observar através dos espectros de RMN de ^1H apresentados nas Figuras 78 e 79 a presença de um tripleto em 0,77 ppm ($J = 7,5$ Hz) que pode ser atribuído aos hidrogênios ligados ao C18 e um singlete em 6,62 ppm que corresponde a um hidrogênio ligado ao nitrogênio amídico vizinho ao C13. Também vemos a presença de um dubleto em 5,76 ppm (H6; $J = 2,7$ Hz) e outro em 6,51 ppm (H5; $J = 2,7$ Hz) presentes na parte superior da molécula. Os deslocamentos químicos observados para todos os hidrogênios são semelhantes aqueles reportados por BANERJI *et alii* (1970) para a razinilama.

Assim, com base na comparação entre as informações da literatura e os dados obtidos através de CG-EM e de RMN ^1H pode-se concluir que o composto majoritário da fração 4.1 (TR = 21,1 min) é a razinilama.

Já a fração F4.2, obtida por Cromatografia de acordo com o esquema mostrado na Figura 26 (Placas 3 e 4) e detalhado na Tabela 13, que aparentava ser constituída por um único alcalóide, revelou, por CG, Rampa de Aquecimento 2, Figura 24, a presença de dois componentes principais, conforme a Figura 80.

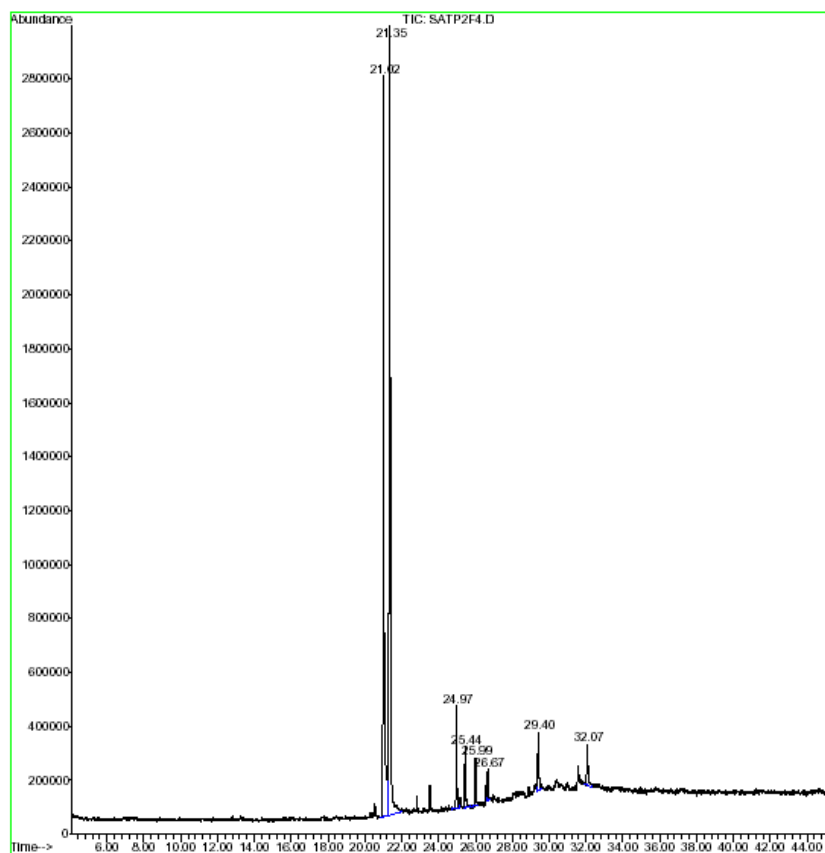


Figura 80 – Cromatograma da fração F4.2 obtida do extrato de alcalóides totais das sementes de *A. tomentosum*, feito segundo a rampa de aquecimento 2, (Figura 24)

O composto com TR = 21,02 min apresentou padrão de fragmentação (Figura 81) compatível com o da razinilama.

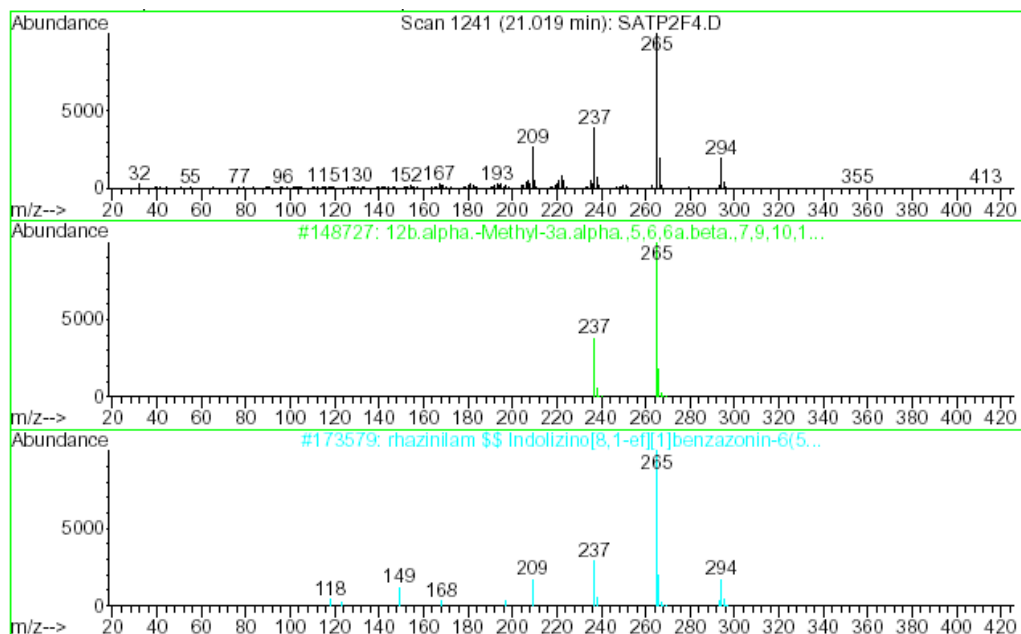


Figura 81 – Espectro de massas do composto com TR = 21,0 min da fração F4.2 do extrato de alcalóides totais das sementes de *A. tomentosum*, obtido segundo a rampa de aquecimento 2 (Figura 24)

Já o outro composto em maior concentração (TR = 21,4 min) apresentou padrão o íon molecular ($M^{+•} = 296$) duas unidades acima daquele observado para a razinilama e um padrão de fragmentação mais complexo (Figura 82).

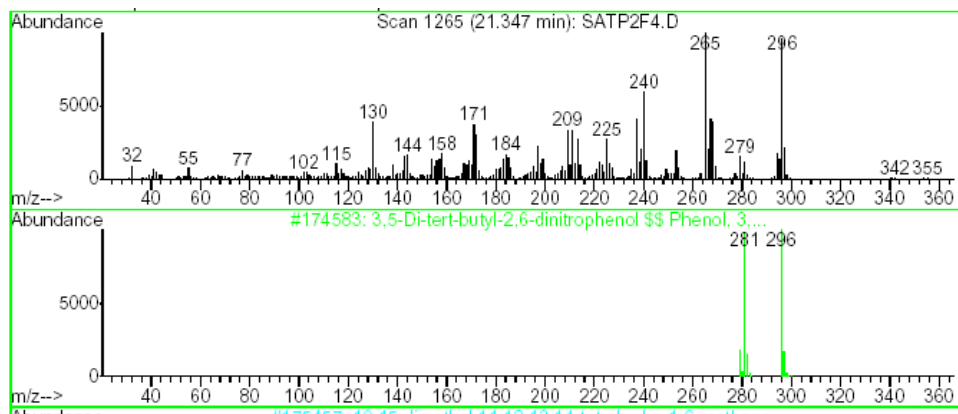


Figura 82 - Espectro de massas do composto com TR = 21,4 min da fração F4.2 do extrato de alcalóides totais das sementes de *A. tomentosum*, obtido segundo a rampa de aquecimento 2 (Figura 24)

Supondo que o composto seja um análogo di-hidrogenado da razinilama, duas estruturas são compatíveis para o alcalóide em questão.

A primeira apresenta uma função álcool ao invés de uma cetona na posição 2. A redução da carbonila à hidroxila implicaria no aumento da polaridade da estrutura, o que explica o tempo de retenção maior desta em relação à razinilama. A outra estrutura possível seria indentica à da razinilama, exceto pela ausência do anel pirrólico e presença do anel 3-pirrolínico (Figura 83).

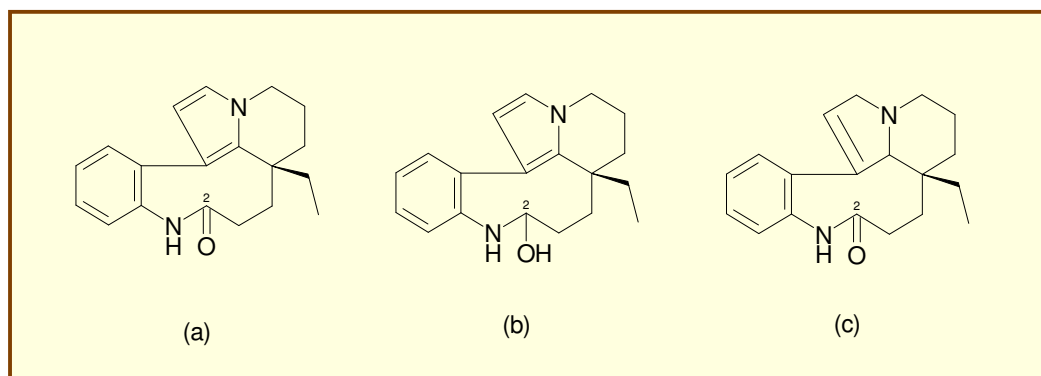


Figura 83 - Estrutura da razinilama (a) e de seus supostos análogos: um hidroxilado (b) e outro com uma dupla ligação a menos (c)

Como o par de elétrons do nitrogênio não indólico da estrutura (c) não está delocalizado numa estrutura aromática, como ocorre nas estruturas a e b da (Figura 83), este composto apresentará maior densidade eletrônica localizada sobre o átomo de nitrogênio, fazendo com que a mesma seja mais polar do que a razinilama, explicando assim, seu maior tempo de retenção em relação a este composto. Uma evidência para que a molécula em questão seja a di-hidro-razinilama, é dada por GOH *et alli* (1986) que isolaram tal alcalóide de *Leuconotis eugenifolia* (*Apocynaceae*) concomitantemente com a razinilama.

Além disso, a análise mais minuciosa do espectro de massas desse composto revela a presença de um fragmento com $m/z = 294$, cuja origem pode ser explicada através de rearranjo sigmatrópico seguido da perda de uma molécula de hidrogênio, favorecida por aumentar a aromaticidade do fragmento (Figura 84); a partir deste, todos os demais seriam formados de acordo com o mecanismo descrito para a razinilama (BANERJI *et alii*, 1970; BIEMANN, 1962; MORRISON *et alii*, 1996).

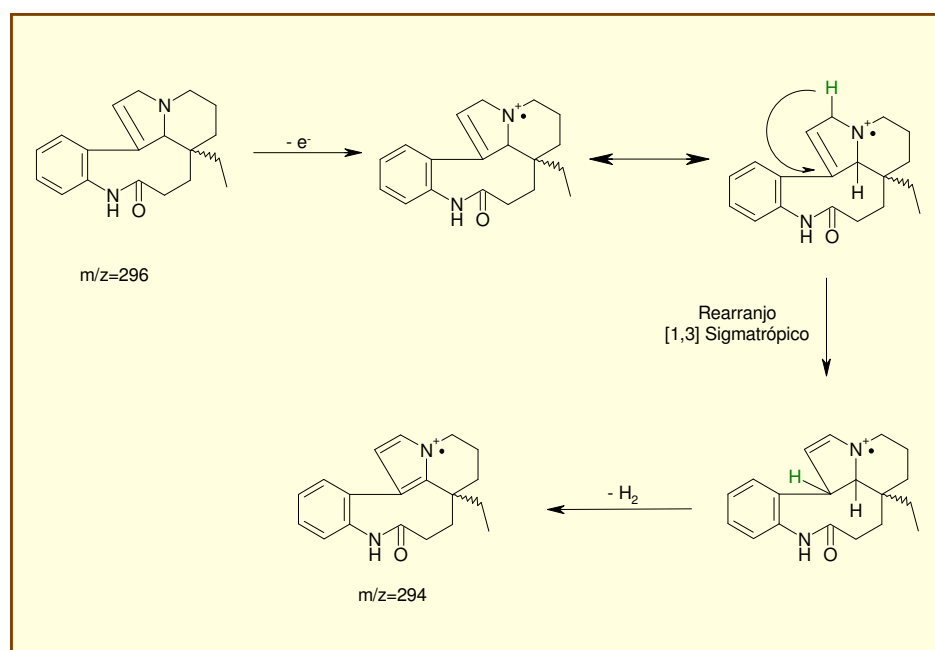


Figura 84 - Proposta de mecanismo de formação do fragmento de $m/z = 294$, a partir da di-hidrorazinilama ($m/z = 296$) baseado nos trabalhos de JOULE *et alii* (1964), BIEMANN (1962) e na possibilidade de rearranjo sigmatrópico (MORRISON *et alii*, 1996)

Outro fato importante é a ausência de fragmentos que indiquem a perda de molécula de água (M-18) e de hidroxila (M-17), característicos de estruturas que possuem o grupo hidroxila (SILVERSTEIN *et alii*, 1998) e que deveriam ser observados caso o composto em questão apresentasse a estrutura “b” (Figura 83).

Com base nas análises do padrão de fragmentação do espectro de massas e no isolamento desse alcalóide, juntamente com a razinilama em outras espécies de *Apocynaceae*, pode-se atribuir ao composto com TR = 21,4 min a estrutura da di-hidro-razinilama.

Embora no espectro de massas do extrato de alcalóides totais esse composto apareça em considerável concentração, as tentativas para isolá-lo mostraram-se infrutíferas. A explicação para essa dificuldade foi dada por GOH *et alii* (1970), que observaram a conversão da di-hidro-razinilama em razinilama durante os processos de purificação do primeiro.

O composto com o maior tempo de retenção presente na amostra (TR = 28,9 min) apresentou fragmentação (Figura 85) compatível com a do alcalóide 1 acetil-17 metóxi-aspidospermidina (Figura 86).

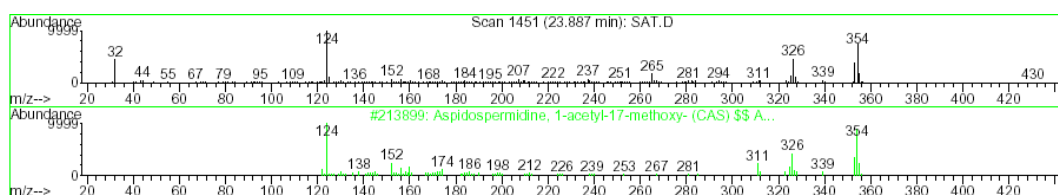


Figura 85 - Espectro de massas do composto com TR = 28,9 min do extrato de alcalóides totais das sementes de *A. tomentosum*, obtido segundo a rampa de aquecimento 2 (Figura 24)

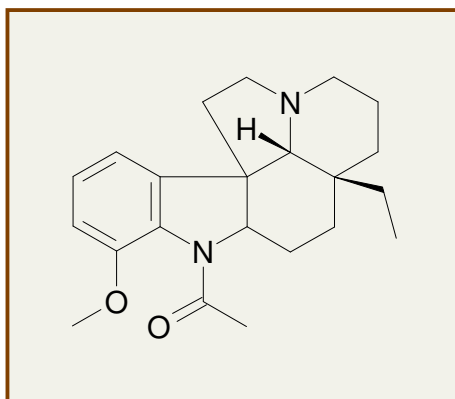


Figura 86 – Representação da estrutura da 1-acetil-17-metóxi-aspidospermidina

A descrição do mecanismo que explica a formação de alguns dos principais fragmentos observados no espectro de massas da 1-acetil-17-metóxi-aspidospermidina é apresentada na Figura 87.

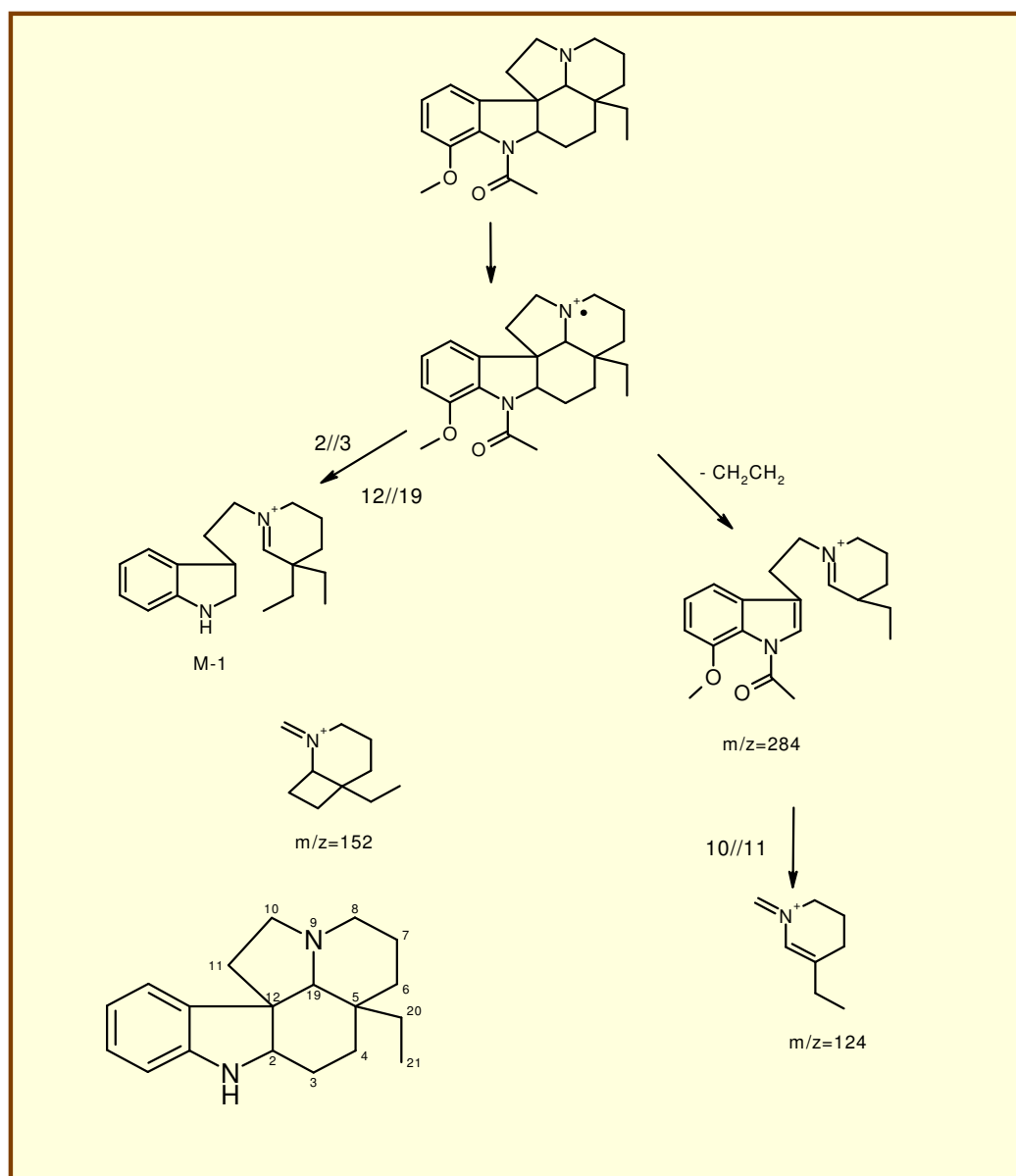


Figura 87 - Mecanismo de fragmentação da 1-acetil-17-metóxi-aspidospermidina (BUDZIKIEWICZ *et alii*, 1964)

Analisado o espectro do composto em questão notamos que o padrão de fragmentação exibido apresenta semelhança com o da 1-acetil-17-metóxi-aspidospermidina.

Essa informação, somada aos relatos da literatura, exibidos anteriormente, sobre o isolamento desse alcalóide e de seus correlatos em outras espécies de *Aspidosperma*, são evidências de que o composto com tempo de retenção igual a 28,9 minutos seja de fato a 1-acetil-17-metóxi-aspidospermidina.

Por fim, ao compararmos os alcalóides identificados nas sementes de *A. tomentosum* percebemos que os três tipos básicos de esqueletos carbônicos (do tipo quebrachamina, aspidospermidina e razinilama), apresentam similaridades que poderiam ser interpretadas de duas maneiras.

Na primeira, pode-se atribuir essa similaridade à presença de um sistema enzimático comum à biossíntese dos três tipos de esqueletos carbônicos. A segunda possibilidade é de que tanto a aspidospermidina quanto a razinilama sejam produtos da transformação da quebrachamina, conforme a exposição que será feita a seguir.

Durante o processo de isolamento da quebrachamina verificou-se a presença insistente de pequena quantidade de di-desidro-aspidospermidina e na fração que correspondia à quebrachamina purificada.

Soma-se a esses dados a síntese da (+)-aspidospermidina a partir da (-)-quebrachamina por CAMERMAN *et alii* (1965), que postularam a presença de um imínio intermediário na reação (Figura 88).

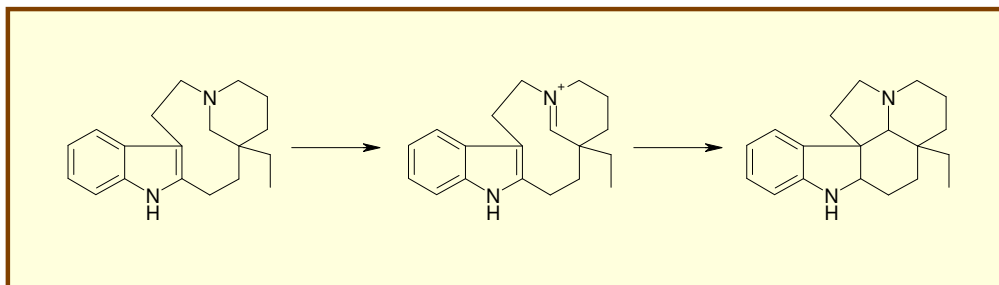


Figura 88 – Conversão da (+)-quebrachamina em (-)-aspidospermidina (CAMERMAN *et alii*, 1965)

Por último, encontrou-se na literatura postulado que a formação da razinilama, caracterizado como produto de degradação da di-desidro-razinilama (GOH *et alii*, 1986, SILVA *et alii*, 1972), ocorre a partir de um intermediário semelhante à aspidospermidina, originado de uma estrutura análoga à da 5,21-desidro-aspidospermidina (HUGEL *et alii*, 1974)

Assim, propõe-se a formação da aspidospermidina e da razinilama a partir da quebrachamina através da rota ilustrada na Figura 89.

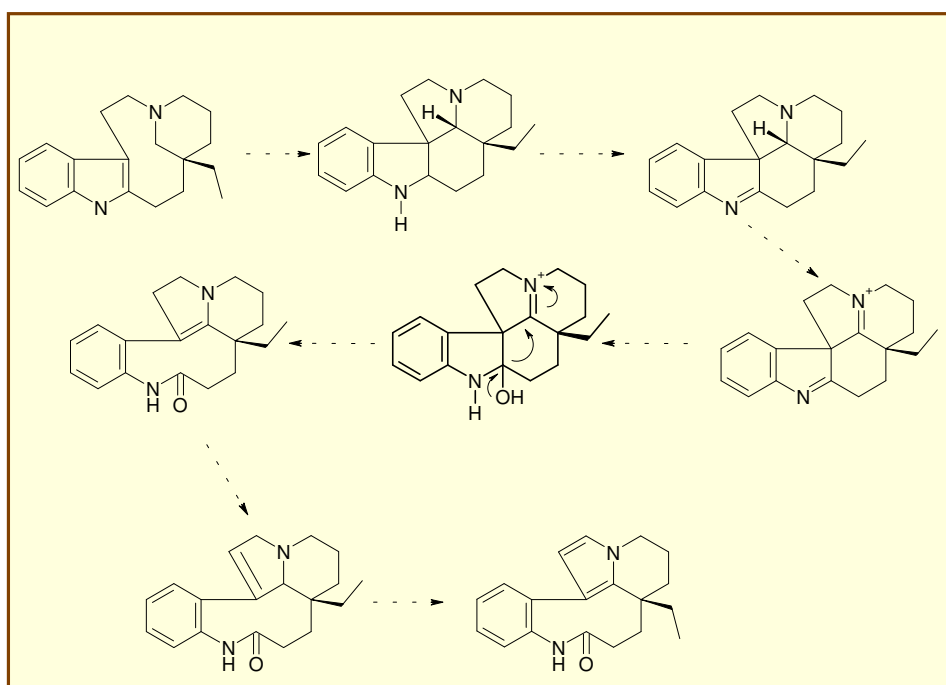


Figura 89 - Proposta da rota de formação da razinilama e aspidospermidina a partir da quebrachamina

A formação do intermediário imínio para a conversão da quebrachamina em aspidospermidina e dessa em razinilama *in vivo* poderia ser intermediada por enzimas do citocromo P450 (CASTAGNOLI Jr *et alii*, 2005).

Desta maneira, estes derivados da quebrachamina não podem ser considerados meros artefatos.

2.2.4.2.2.4– Arilos

A análise por CG-EM do extrato de alcalóides totais dos arilos é vista nas Figuras de 90 até 95.

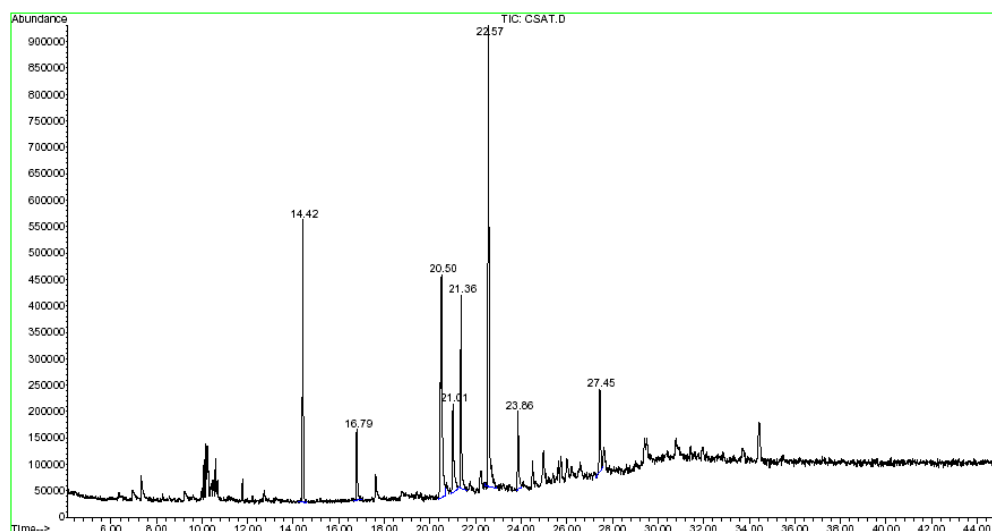


Figura 90 - Cromatograma do extrato de alcalóides totais dos arilos de *A. tomentosum*, feito de acordo com a rampa de aquecimento 2 (Figura 24)

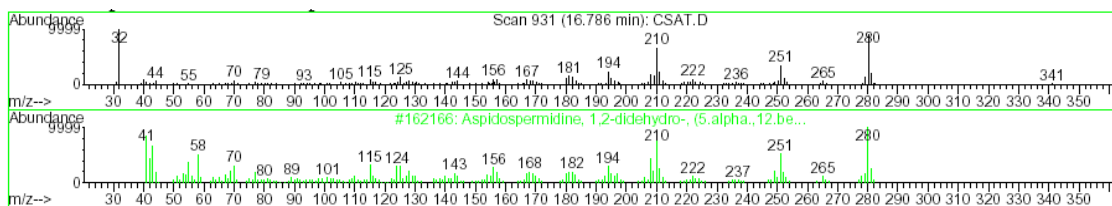


Figura 91 - Espectro de massas do composto com TR = 16,8 min do extrato de alcalóides totais dos arilos de *A. tomentosum*, obtido segundo a rampa de aquecimento 2 (Figura 24)

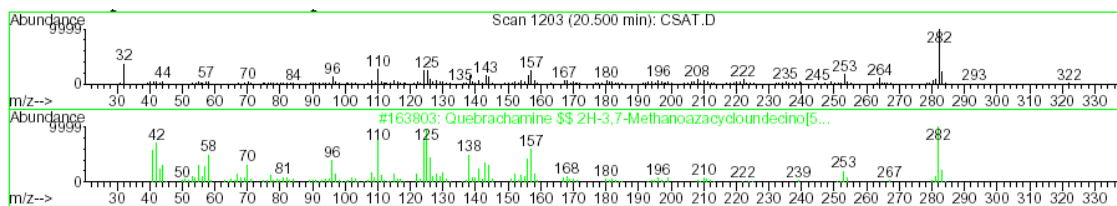


Figura 92 - Espectro de massas do composto com TR = 20,5 min do extrato de alcalóides totais dos arilos de *A. tomentosum*, obtido segundo a rampa de aquecimento 2 (Figura 24)

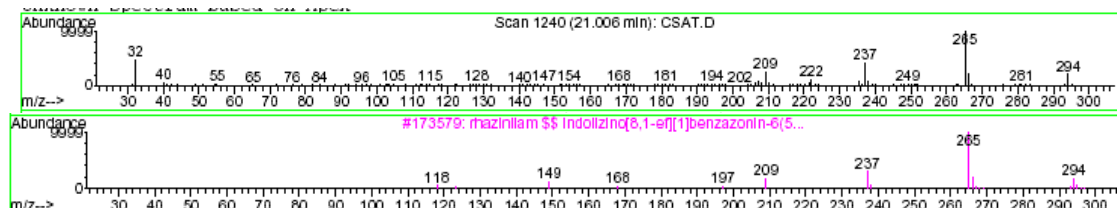


Figura 93 - Espectro de massas do composto com TR = 21,0 min do extrato de alcalóides totais dos arilos de *A. tomentosum*, obtido segundo a rampa de aquecimento 2 (Figura 24)

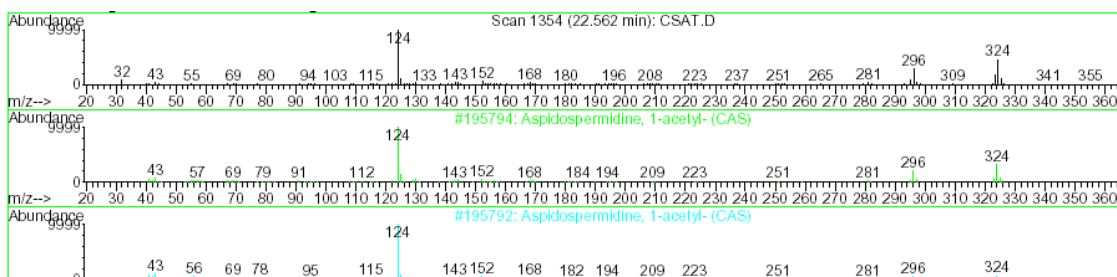


Figura 94 - Espectro de massas do composto com TR = 22,6 min do extrato de alcalóides totais dos arilos de *A. tomentosum*, obtido segundo a rampa de aquecimento 2 (Figura 24)

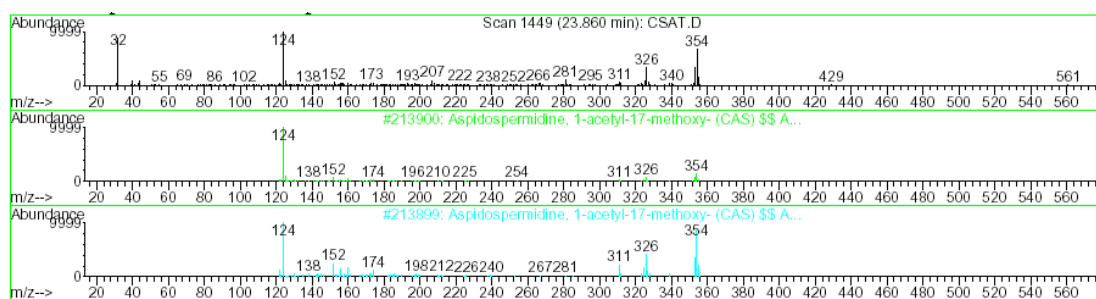


Figura 95 - Espectro de massas do composto com TR = 23,8 min do extrato de alcalóides totais dos arilos de *A. tomentosum*, obtido segundo a rampa de aquecimento 2 (Figura 24)

A análise por CG-EM do extrato de arilos de *A. tomentosum* revelou cinco compostos com os mesmos padrões de fragmentação e tempos de retenção daqueles encontrados no extrato de alcalóides das sementes dessa mesma espécie a saber: 1,2 di-desidro-aspidospermidina (TR = 16,8 min), quebrachamina (TR = 20,5 min), razinilama (TR = 21,0 min), 1- acetil-aspidospermidina (TR = 22,6 min) e a 1-acetil-17 metóxi-aspidospermidina (TR = 23,8 min), dentre os quais, pode-se destacar a quebrachamina e a razinilama, que tiveram suas estruturas determinadas por CG-EM e confirmadas por RMN ^1H . As estruturas desses alcalóides são apresentadas na Figura 96.

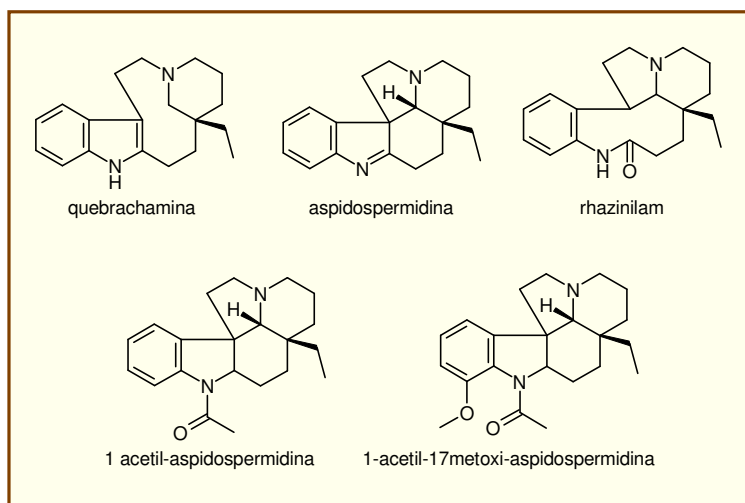


Figura 96 - Estrutura dos alcalóides identificados por CG-EM no extrato obtido a partir de arilos de *A. tomentosum*

Devido à semelhança dos tempos de retenção e dos padrões de fragmentação desses alcalóides e daqueles observados nas sementes dessa mesma espécie, podemos inferir que a composição dos alcalóides das sementes e dos arilos de *A. tomentosum*, é semelhante em relação aos compostos majoritários.

As principais diferenças observadas são: a presença de uleína e de di-desidrorazinilama apenas no extrato de alcalóides das sementes e, por outro lado, a presença da 1-acetil aspidospermidina somente nos arilos; outra importante diferença está na proporção na qual os alcalóides aparecem em cada um dos extratos.

Enquanto no extrato de alcalóides totais das sementes o alcalóide majoritário é a quebrachamina, seguida pelo rhazinila, di-desidro-rhazinila, 1-acetil-17-metóxi-aspidospermidina e uleína, encontramos a seguinte ordem decrescente de concentração no extrato de alcalóides dos arilos: 1-acetil-aspidospermidina, quebrachamina, razinilama e 1-acetil-17-metóxi-aspidospermidina.

Diante dos resultados e da discussão desenvolvida nesse capítulo pode-se concluir que os materiais vegetais estudados podem ser considerados fontes importantes para a obtenção de alcalóides indólicos como a ioimbina (arilos e pericarpos de *A. ramiflorum*), a quebrachamina e a razinilama (arilos e sementes de *A. tomentosum*) e a uleína (folhas e ramos de *A. tomentosum*).

Durante essa etapa do trabalho verificou-se que a separação e a análise estrutural dos alcalóides minoritários foi dificultada não só pela pequena proporção como também pela polaridade dos mesmos. Assim, para um estudo minucioso sobre a estrutura desses alcalóides é necessário a utilização de técnicas de separação mais eficientes como coluna com fase estacionária composta por sílica de fase reversa ou Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) preparativa e emprego de CLAE-RMN para a análise estrutural.