

**JULIANO FERREIRA LOPES**

**loimbina e oleína isolados de *Himatanthus lancifolius*  
(Muell.-Arg.) Woodson, Apocynaceae**

**CURITIBA  
2008**

**JULIANO FERREIRA LOPES**

**Ioimbina e uleína isolados de *Himatanthus lancifolius*  
(Muell.-Arg.) Woodson, Apocynaceae**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, pelo curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, do Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Tit. Cid Aimbiré M. Santos

**CURITIBA  
2008**

Lopes, Juliano Ferreira  
Ioimbina e oleína isolados de *Himatanthus lancifolius* (Muell.-Arg.)  
Woodson, Apocynaceae / Juliano Ferreira Lopes. – Curitiba, 2008.  
x, 79 f. : il. ; tabs.

Orientador: Cid Aimbiré de Moraes Santos  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do  
Paraná, Setor de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Farmacêuticas, Área de concentração: Insumos,  
Medicamentos e Correlatos, 2008.

Referências bibliográficas: f. 63-67

1. *Himatanthus lancifolius*. 2. Alcalóides indólicos. 3.  
Apocynaceae. 4. Medicina popular. 5. Farmacognosia - Dissertação.  
I. Santos, Cid Aimbiré de Moraes. II. Unidade Federal do Paraná. III.  
Título.

CDD 615.32

## TERMO DE APROVAÇÃO

**JULIANO FERREIRA LOPES**

Título: "Ioimbina e uleína de *Himatanthus lancifolius*  
(Muell.-Arg.) Woodson, Apocynaceae"

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná, área de concentração Insumos, medicamentos e correlatos.



Prof. Tit. Cid Ambrósio de Moraes Santos  
Orientador



Profa. Dra. Maique Weber Biavatti  
Universidade do Vale do Itajaí



Profa. Dra. Angela Cristina Leal Badaró Trindade  
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 25 de abril de 2008.



## **AGRADECIMENTOS**

**A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização e divulgação deste trabalho.**

**Minha profunda gratidão a todas as pessoas que colaboraram na pesquisa.**

**Agradeço também a CAPES, Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa de mestrado.**

## **DEDICATÓRIA**

**À MINHA FAMÍLIA**

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b>	vi
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	vi
<b>LISTA DE ESQUEMAS</b>	vii
<b>LISTA DE ESPECTROS</b>	vii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	viii
<b>RESUMO</b>	ix
<b>ABSTRACT</b>	x
<b>INTRODUÇÃO</b>	1
Gênero <i>Himatanthus</i>	2
<i>Himatanthus lancifolius</i> (Muell. Arg.) Woodson (Apocynaceae)	3
Alcalóide	5
Definição	5
Distribuição no reino e nos tecidos vegetais	7
Função e classificação	7
Alcalóides indólicos	8
Alcalóides indólicos monoterpênicos	10
<b>OBJETIVOS</b>	12
<b>EXPERIMENTAL</b>	13
Materiais, reagentes e equipamentos.	13
Material botânico	14
Extração e fracionamento inicial	15
Isolamento – Procedimento A	15
Isolamento – Procedimento B	16
Isolamento – Procedimento C	17
Isolamento – Procedimento D	18
Isolamento – Procedimento E	18
Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	19
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	21
Procedimentos de isolamento	21
Substância HL-3	22
Substância HL-4	38
CLAE	59
<b>CONCLUSÃO</b>	62
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	63

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Classificação taxonômica de <i>H. lancifolius</i>	3
<b>Tabela 2</b> – Histórico de isolamento e identificação de alcalóides	5
<b>Tabela 3</b> - Classes e grupos de alcalóides indólicos monoterpênicos	10
<b>Tabela 4</b> - RMN <sup>1</sup> H (400 MHz; CDCl <sub>3</sub> ) de HL-3	29
<b>Tabela 5</b> - RMN <sup>13</sup> C (100 MHz; CDCl <sub>3</sub> ) de HL-3	32
<b>Tabela 6</b> :- Desvios típicos para C-3 e C-6 para alcalóides de esqueleto do tipo ioimbino	34
<b>Tabela 7</b> - Desvio típico para C-14 e C-20 para alcalóides de esqueleto do tipo ioimbino	36
<b>Tabela 8</b> – RMN <sup>1</sup> H (600 MHz; CDCl <sub>3</sub> ) de HL-4	42
<b>Tabela 9</b> – RMN <sup>13</sup> C (150 MHz; CDCl <sub>3</sub> ) de HL-4	51
<b>Tabela 10</b> - DEPT ( <sup>1</sup> H 600 MHz/ <sup>13</sup> C 150 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de HL-4	51
<b>Tabela 11</b> - Correlações carbono-hidrogênio do espectro HMBC de HL-4	56

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – a) Folhas de <i>H. lancifolius</i> (Muell. Arg.) Woodson – APOCYNACEAE e b) área de coleta de <i>H. lancifolius</i> no Brasil.	4
<b>Figura 2</b> – Cascas dessecadas de <i>H. lancifolius</i> .	14
<b>Figura 3</b> - Fluxograma do procedimento de isolamento A.	16
<b>Figura 4</b> - Fluxograma do procedimento de isolamento B.	17
<b>Figura 5</b> - Fluxograma do procedimento de isolamento C.	18
<b>Figura 6</b> - Sistema para cromatografia de adsorção a vácuo.	19
<b>Figura 7</b> - Fluxograma do procedimento de isolamento D.	19
<b>Figura 8</b> – Principais correlações do espectro COSY da uleína (6)	46
<b>Figura 9</b> – Principais correlações do espectro NOESY da uleína (6)	49
<b>Figura 10</b> – Principais correlações do espectro HMBC da uleína (6)	56
<b>Figura 11</b> - Cromatograma de FC. Cromatograma de FC por CLAE. FE: Microsorb C18; 150 mm x 4,6 mm. FM: eluente A (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0,05 %), eluente C (MeCN); FM: 90 A % - C 10 % em 0 min, A 75 % - C 25 % em 7 min, A 10 % - C 90 % em 25 min continuando com eluição isocrática até 30 min. Amostra: FC; 50 µg/ml. loop: 10 µl. Vazão: 0,8 ml/min. detecção: UV em 210 nm.	59
<b>Figura 12</b> – Expansão da figura 11. Cromatograma de FC por CLAE. FE: Microsorb C18; 150 mm x 4,6 mm. FM: eluente A (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0,05 %), eluente C (MeCN); FM: A 90 % - C 10 % em 0 min, A 75 % - C 25 % em 7 min, A 10 % - C 90 % em 25 min continuando com eluição isocrática até 30 min. Amostra: FC; 50 µg/ml. loop: 10 µl. Vazão: 0,8 ml/min. detecção: UV em 210 nm.	60
<b>Figura 13</b> – Cromatograma de HL-4. Cromatograma de HL-4 por CLAE. FE: Microsorb C18; 150 mm x 4,6 mm. FM: eluente A (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0,05 %), eluente C (MeCN); FM: 90 A % - C 10 % em 0 min, A 75 % - C 25 % em 7 min, A 10 % - C 90 % em 25 min continuando com eluição isocrática até 30 min. Amostra: HL-4; 50 µg/ml. loop: 10 µl. Vazão: 0,8 ml/min. detecção: UV em 210 nm.	61
<b>Figura 14</b> – Expansão da figura 13. FE: Microsorb C18; 150 mm x 4,6 mm. FM: eluente A (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0,05 %), eluente C (MeCN); FM: 90 A % - C 10 % em 0 min, A 75 % - C 25 % em 7 min, A 10 % - C 90 % em 25 min continuando com eluição isocrática até 30 min. Amostra: HL-4; 50 µg/ml. loop: 10 µl. Vazão: 0,8 ml/min. detecção: UV em 210 nm.	61

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1</b> - Rota biossintética dos alcalóides indólicos monoterpênóides	11
<b>Esquema 2</b> - Formação do fragmento <i>m/z</i> 156 de HL-3	22
<b>Esquema 3</b> - Formação dos fragmentos <i>m/z</i> 184, 170 e 169 de HL-3	24
<b>Esquema 4</b> – formação do fragmento <i>m/z</i> 170 a partir do fragmento <i>m/z</i> 354	24
<b>Esquema 5</b> - Formação do pico M-1 de HL-3	25
<b>Esquema 6</b> - Modelo de biossíntese da ioimbina	37
<b>Esquema 7</b> - Esquema de formação de picos <i>m/z</i> 194 e 209 de HL-4	40
<b>Esquema 8</b> - Esquema de formação de picos <i>m/z</i> 223, 222 e 208 de HL-4	41
<b>Esquema 9</b> - Esquema de formação de picos <i>m/z</i> 180, 181 e 237 de HL-4	41
<b>Esquema 10</b> – Esquema de formação dos picos <i>m/z</i> 181 e 182 a partir de <i>m/z</i> 237	42
<b>Esquema 11</b> - Modelo de biossíntese da uleína segundo Cordell	58

## LISTA DE ESPECTROS

<b>Espectro 1</b> - Espectros de massas obtidos por ionização química e obtido por impacto eletrônico de HL-3	23
<b>Espectro 2</b> – Espectro de RMN- <sup>1</sup> H com expansão de região aromática de HL-3, 400 MHz, CDCl <sub>3</sub> .	26
<b>Espectro 3</b> – Expansão do espectro de RMN- <sup>1</sup> H de HL-3 da região de 2,6 a 4,4 ppm, 400 MHz, CDCl <sub>3</sub>	27
<b>Espectro 4</b> – Expansão do espectro de RMN- <sup>1</sup> H de HL-3 da região de 0,0 a 2,4 ppm, 400 MHz, CDCl <sub>3</sub> .	28
<b>Espectro 5</b> – Espectro de correlação homonuclear COSY de HL-3, 360 MHz, CDCl <sub>3</sub> .	30
<b>Espectro 6</b> – Expansão da região de 1,0 a 4,5 ppm do espectro de correlação homonuclear COSY de HL-3 (360MHz, CDCl <sub>3</sub> ).	31
<b>Espectro 7</b> – Espectro de RMN- <sup>13</sup> C de HL-3 (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).	33
<b>Espectro 8</b> – Espectro de correlação heteronuclear HMQC de HL-3 (1H 400 MHz/13C 150 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	35
<b>Espectro 9</b> – Espectro de massas por impacto eletrônico de HL-4	39
<b>Espectro 10</b> – Espectros de RMN- <sup>1</sup> H de HL-4 (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).	43
<b>Espectro 11</b> – Expansão da região de 0,0 a 2,7 ppm do espectro de RMN- <sup>1</sup> H de HL-4 (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).	44
<b>Espectro 12</b> – Expansões das regiões de 7,0 ppm a 8,4 ppm; e de 4,0 a 5,4 ppm do espectro de RMN- <sup>1</sup> H de HL-4 (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).	45
<b>Espectro 13</b> - Espectro de correlação homonuclear COSY de HL-4 (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).	47
<b>Espectro 14</b> - Espectro de correlação homonuclear NOESY (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de HL-4	48
<b>Espectro 15</b> – Espectro de RMN- <sup>13</sup> C de HL-4 (150 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	50
<b>Espectro 16</b> – Espectro de DEPT de HL-4 (RMN- <sup>13</sup> C 150 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	52
<b>Espectro 17</b> – Espectro de correlação heteronuclear HMQC de HL-4 ( <sup>1</sup> H 600 MHz/ <sup>13</sup> C 150 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	54
<b>Espectro 18</b> – Espectro de correlação heteronuclear HMBC de HL-4 ( <sup>1</sup> H 600 MHz/ <sup>13</sup> C 150 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).	55

## LISTA DE ABREVIATURAS

CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CC	Cromatografia em Coluna
CCV	Cromatografia em Coluna a Vácuo
CD	Cristalização Direta
CE	Cromatografia de Exclusão
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
<i>d</i>	duplete
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer</i>
<i>dd</i>	duplo duplete
<i>dl</i>	duplete largo
<i>dt</i>	duplo tripleto
EMAR	espectro de massas de alta resolução
EMIE	espectro de massas por impacto eletrônico
EMIQ	espectro de massas por ionização química
EtOH	etanol
FAc	fração acetilada
FC	fração clorofórmica
FM	fase móvel
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Coherence</i>
IQ	ionização química
IV	Infravermelho
<i>J</i>	constante de acoplamento
<i>m</i>	multiplete
MHz	Megahertz
<i>m/z</i>	razão massa/carga
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
ppm	parte por milhão
<i>q</i>	quinteto
RMN- <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
RMN- <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono -13
<i>s</i>	simpleto
<i>sl</i>	simpleto largo
<i>t</i>	tripleto
<i>tl</i>	tripleto largo
TMS	tetrametilsilano
UV	ultravioleta

## RESUMO

A família Apocynaceae é conhecida pela presença de alcalóides indólicos e a espécie *Himatanthus lancifolius* - conhecida popularmente como agoniada - é utilizada na medicina popular para o tratamento de várias doenças de pele, asma, sífilis e como emenagogo. O objetivo deste projeto foi o isolamento e identificação de alcalóides indólicos das cascas de *H. lancifolius*, bem como gerar um perfil químico preliminar de uma fração rica em alcalóides por cromatografia líquida de alta eficiência. A droga vegetal foi adquirida no mercado de plantas medicinais de São Paulo, sendo identificada por análise farmacognóstica em comparação com amostras autênticas depositadas no Laboratório de Farmacognosia da UFPR. Cascas secas e pulverizadas foram percoladas com metanol à exaustão e concentrado sob vácuo, alcalinizado com NaHCO<sub>3</sub> até pH 8, sendo então extraído com clorofórmio até reação negativa ao Dragendorff, gerando 36,7 g de fração clorofórmica (FC). Alíquotas desta fração foram tomadas e vários procedimentos cromatográficos foram realizados, bem como diversas fases estacionárias (gel de sílica, alumina, polidextrose), resultando no isolamento de dois compostos. O composto HL-3 apresentou-se na forma de cristais brancos, p.f. 235 °C (12,0 mg, 0,0007%) e revelação com reagente de Dragendorff apresentou coloração violácea. O composto HL-4 apresentou-se na forma de cristais amarelo-pálido, p.f. 102-105 °C (1,1 g, 0,065%) e revelação com reagente de Dragendorff apresentou coloração amarela. Ambos os compostos foram identificados por métodos espectrométricos: UV, IR, espectrometria de massas e vários métodos de RMN. HL-3 foi identificado como ioimbina, sendo este o primeiro relato deste alcalóide na espécie *Himatanthus*, anteriormente isolado em espécies de *Rauvolfia*, também da família Apocynaceae. HL-4 foi identificado como sendo o alcalóide uleína, já isolado deste material vegetal. Devido à quantidade satisfatória de uleína isolada propôs-se estudá-la na fração clorofórmica. O perfil cromatográfico obtido por cromatografia líquida de alta eficiência da uleína permitiu identificar seu tempo de retenção na fração clorofórmica. Foram alcançados os objetivos iniciais do projeto com o isolamento e identificação de duas substâncias, além de análise preliminar dos constituintes presentes na fração clorofórmica por método de CLAE. A droga vegetal mostrou-se promissora para estudos futuros devido à presença de compostos hidrosolúveis não-identificados, os quais podem ser testados frente a ensaios biológicos.

Palavras-chave: *Himatanthus lancifolius*, agoniada, alcalóides indólicos, Apocynaceae

## ABSTRACT

The Apocynaceae family is known for the presence of indole alkaloids, and the *Himatanthus* species - popularly known as agoniada – is used in the folk medicine for the treatment of several skin diseases, asthma, sifilis and as well as stimulant of menstruation. The objective of this work was the isolation and the identification of the indole alkaloids from the barks of *Himatanthus lancifolius*, as well as to generate a preliminary chemical profile of an alkaloid-rich fraction by high-performance liquid chromatographic. The drug was obtained in the market of medicinal plants of São Paulo, and was identified as such by pharmacognostic analysis in comparison with authentic samples present in the Laboratory of Pharmacognosy, UFPR. Dried and pulverized barks were extracted with methanol to exhaustion and concentrated *in vacuum*, adjusted to pH 8 with NaHCO<sub>3</sub>, which was extracted with chloroform untill negative reaction to Dragendorff, to yield 36,7 g of chloroformic fraction. Samples of this fraction were taken and several chromatographic procedures were tested, also using different stationary phases (silica gel, alumina, polidextrose). Compound HL-3 resulted in white crystals, m.p. 235 °C (12,0 mg, 0,0007 %) and purple color to Dragendorff reagent. Compound HL-4 resulted in light-yellow crystals m.p. 102-105 °C (1,1 g, 0,065 %) and yellow color to Dragendorff reagent. Both were identified by spectrometric methods: UV, IR, Mass spectrometry and several NMR methods. HL-3 was identified as yohimbine, this is the first mention of such alkaloid in the genus *Himatanthus*, previously isolated in *Rauvolfia* species, also from Apocynaceae family. HL-4 was identified as uleine, already known to be present in this species. Due to satisfactory quantities of isolated uleine, it was proposed to study it in the chloroformic fraction. The chromatographic profile of uleine allowed the identification its retention time in the chloroformic fraction. The initial objectives of this project were met with the isolation and identification of two substances, and the preliminary separation of the constituents present in the chloroformic fraction by HPLC. The vegetable drug seems promising to further studies due to water-soluble unidentified compounds, which could also be tested for biological assays.

Key-words: *Himatanthus lancifolius*, agoniada, indole alkaloids, Apocynaceae



## **INTRODUÇÃO**

Drogas vegetais têm sido utilizadas não somente como agentes terapêuticos, mas também com fins alimentícios,<sup>1</sup> para a caça e para a guerra,<sup>2-5</sup> bem como para rituais religiosos,<sup>6</sup> abortivo e procedimentos judiciais.<sup>7</sup>

Dentre os principais objetivos do estudo de plantas medicinais,<sup>3, 8</sup> de maneira geral, estão:

1. Isolamento de seus compostos, para uso como fármaco, enquanto não houver via de síntese viável (e.g. vimblastina).
2. Produção de compostos bioativos de estruturas novas ou conhecidas, como protótipos para síntese/semí-síntese para produção de estruturas de maior atividade e/ou menor toxicidade (e.g. irinotecan a partir de camptotecina).
3. Utilização desses agentes como ferramentas farmacológicas (e.g. ouabaína, (-)-tubocurarina).
4. Utilização de parte ou da totalidade da planta como medicamento (e.g. ginkgo, hipérico).

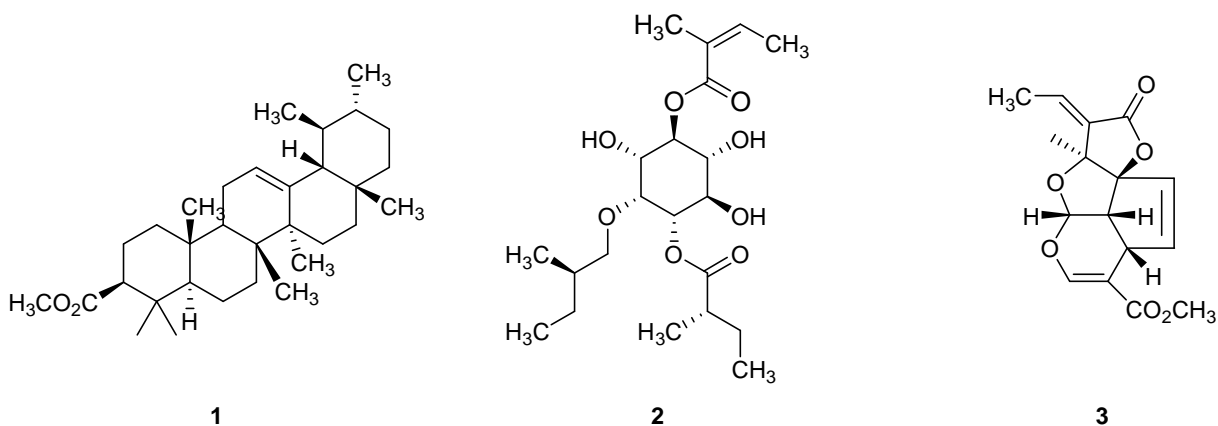
Achados arqueológicos indicam que os seres humanos as vêm utilizando, como medicamentos, por quase 60.000 anos<sup>9</sup> e os primatas superiores por aproximadamente 5 a 6 milhões de anos.<sup>10, 11</sup> Relatos, contudo, limitam-se a aproximadamente 5.000 anos.<sup>12-19</sup>

Estima-se que aproximadamente 65% da população mundial faz uso de plantas medicinais, sendo a fonte principal de terapia devido à dificuldade de acesso a outras formas.<sup>20</sup> Além disso, foi relatado que só se conhece entre 5 e 15% da composição química de 250.000 a 750.000 espécies de plantas superiores desse planeta e que nada se conhece sobre a composição de mais de 99% da flora brasileira,<sup>21</sup> acelerada pela perda contínua de espécies vegetais devido à intensa ocupação humana dos ecossistemas. Isso representa perda não só de diversidade química, bem como de mecanismos de ação únicos.<sup>22, 23</sup>

O impacto dos produtos naturais como fonte de agentes terapêuticos, a partir de estruturas isoladas de produtos naturais, ou a partir deles sintetizados, modificados, pode ser encontrado em literatura.<sup>23-29</sup>

## Gênero *Himatanthus*

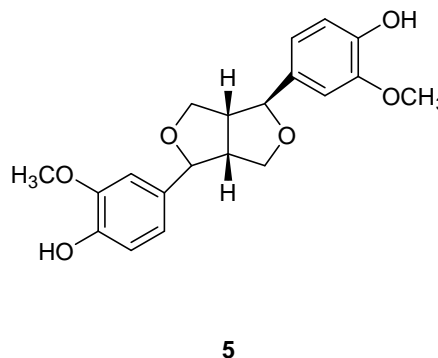
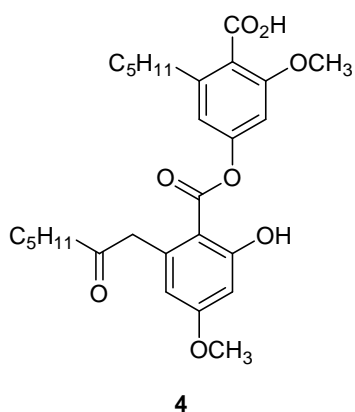
Dentre os compostos já conhecidos do gênero *Himatanthus* cita-se de *H. articulata* (Vahl) Woodson: estigmasterol, sitosterol, cicloartenol, 3 $\beta$ -cinamato de  $\alpha$ -amirina, 3 $\beta$ -cinamato de  $\beta$ -amirina, 3 $\beta$ -acetato de  $\alpha$ -amirina, 3 $\beta$ -acetato de  $\beta$ -amirina (**1**), 3 $\beta$ -cinamato de lupeol, 3 $\beta$ -acetato de lupeol, ácido ursólico, metilmioinositol (**2**), ácido 1 $\beta$ -O- $\beta$ -D-glucopiranosilplumérico, 1 $\beta$ -O- $\beta$ -D-glucopiranosilplumerídio, plumericina (**3**) e isoplumericina.<sup>30</sup>



De *H. succuba* (Spruce) Woodson foram isolados os iridóides fulvoplumierina, plumericina e isoplumericina, além dos ésteres triterpênicos cinamato de lupeol, cinamato de  $\alpha$ -amirina, acetato de lupeol, propionato de  $\beta$ -fenil lupeol e cinamato de  $\alpha$ -amirina. Além disso, foram também descobertos o ácido confluêntico (**4**) e ácido 2'-O-metilperlatólico.<sup>31-34</sup>

De *H. phagedaenicus* (Mart.) Woodson foi isolado o iridóide ácido  $\beta$ -diidropumericínico.<sup>35</sup>

Foram isolados de *H. fallax* (Muell. Arg.) M.M. Plumel, a lignana 7(*R*)-metoxi-8-*epi*-matairesinol e três novos compostos: plumierida, matairesinol e pinioresinol (**5**).<sup>36</sup>



### ***Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson, Apocynaceae**

A espécie em questão foi revista e reclassificada por Plumel<sup>37</sup> sob o gênero *Himatanthus* (anteriormente *H. floribunda* ou *H. lancifolia*) (Tabela 1).

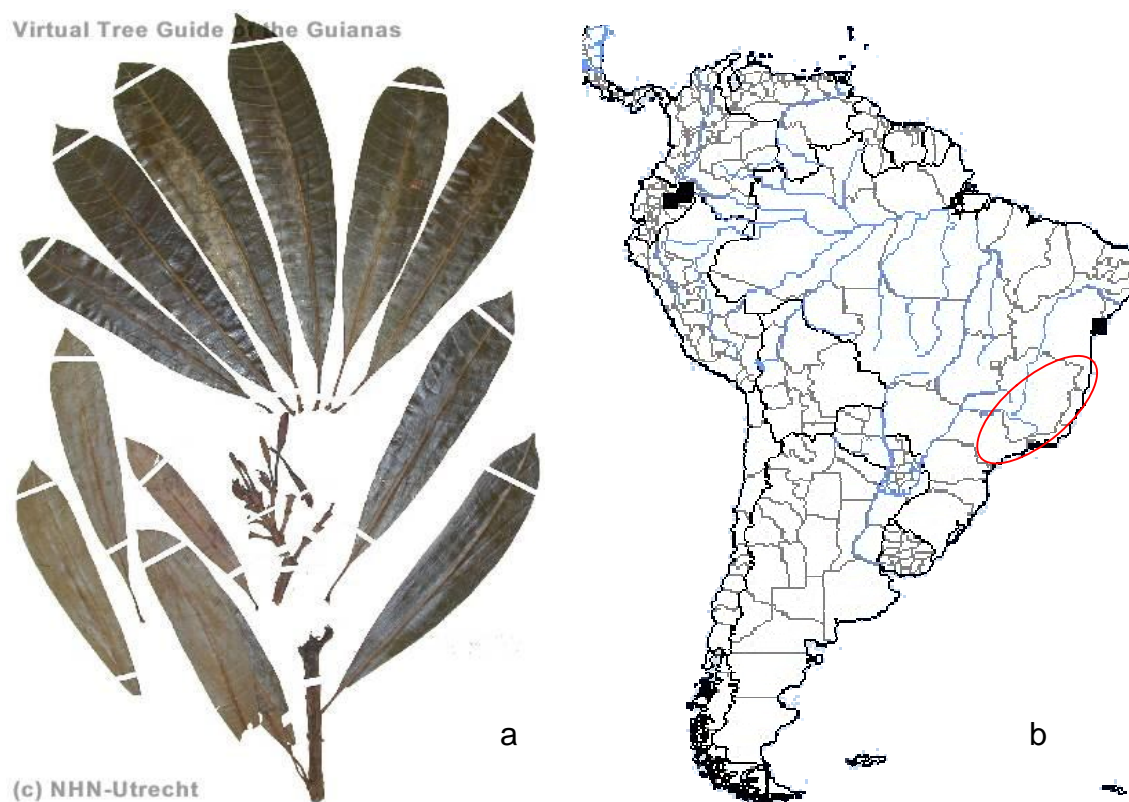
**Tabela 1** - Classificação taxonômica de *H. lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson, Apocynaceae.

Taxa	Segundo CRONQUIST <sup>38</sup>	Segundo ENGLER <sup>39</sup>
<b>Divisão</b>	Magnoliophyta	Angiospermae
<b>Classe</b>	Magnoliatae	Dicotyledoneae
<b>Subclasse</b>	Asteridae	Sympetalae
<b>Ordem</b>	Gentianales	Gentianales
<b>Família</b>	Apocynaceae	Apocynaceae
<b>Gênero</b>	<i>Himatanthus</i>	<i>Himatanthus</i>
<b>Espécie</b>	<i>Himatanthus lancifolius</i> (Muell. Arg.) Woodson	<i>Himatanthus lancifolius</i> (Muell. Arg.) Woodson

As folhas dessa droga vegetal possuem formato de ponta de lança (Figura 1) de onde provém o nome dessa espécie.

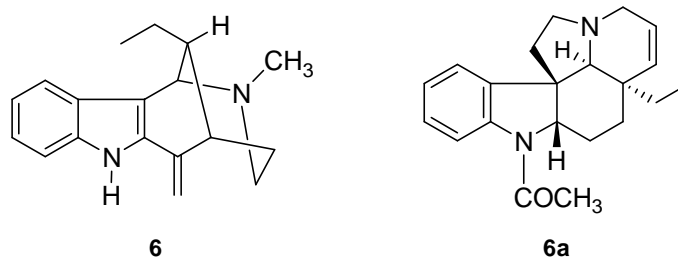
É conhecida popularmente como agoniada, sucubinha, cana-de-macaco e gamelina, e estende-se pela Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais e Rio de Janeiro (Figura 1b), estando inserida na 1<sup>a</sup> edição da Farmacopéia Brasileira.<sup>40</sup>

Além de ser utilizada na medicina tradicional contra afecções de pele, contra constipação, dores e irritação do estômago, bem como expulsão de vermes, afecções do útero e dos ovários, mas que se utilizada em excesso em crianças pode causar diarreias e desidratação, além de cólicas menstruais e afecções gastrintestinais.<sup>40, 41</sup>



**Figura 1** – a) Folhas de *H. lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson – APOCYNACEAE e b) área de coleta de *H. lancifolius* no Brasil.

Isolaram-se os alcalóides uleína (**6**) e (-)-demetoxiaspidospermina (**6a**) de *H. lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson.<sup>42</sup>



Estudos farmacológicos demonstraram que uma fração rica em alcalóides atua inibindo a musculatura vascular e não-vascular, talvez influenciando o influxo de cálcio para o interior dessas células, o que pode em parte explicar a utilização da droga vegetal para tratamento de dismenorréia e como abortivo.<sup>43</sup>

A mesma fração rica em alcalóides também demonstrou possuir atividade bactericida, incluindo *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Staphylococcus epidermidis*,

*Enterococcus faecalis* entre outras espécies.<sup>44</sup> Além disso, a fração em questão também apresentou propriedades gastroprotetoras, por uma variedade de mecanismos.<sup>45</sup>

## Alcalóide

O primeiro conceito de alcalóide foi proposto por Meissner, em 1818: *alcalóides são substâncias derivadas de plantas que reagem como bases*, mas trabalho de isolamento de alcalóides iniciou-se com Sertürner (1783-1841) com a morfina em 1811, e que continua até os dias de hoje (Tabela 2).

**Tabela 2** – Histórico de isolamento e identificação de alcalóides<sup>46, 47</sup>

Composto	Isolamento	Determinação estrutural
Morfina	Sertürner (1805)	Gulland & Robinson (1925)
Emetina	Pelletier & Magendie (1817)	Robinson (1948)
Estricnina	Pelletier & Caventou (1818)	Woodward, Brehm & Nelson (1947)
Colchicina	Geiger & Hesse (1833)	Muller & Velluz (1955)
Quinina	Pelletier & Caventou (1820)	Rabe (1908)
Cafeína	Runge (1820)	E. Fischer (1882)
Piperina	Oersted (1819)	Fittig & Mielch (1874)
Coniina	Giesecke (1827)	Hoffman (1885)
Nicotina	Posselt & Reimann (1821)	Pinner (1893)
Aconitina	Reimann & Peschier (1821)	Wiesner et al (1963)
Atropina	Runge (1819)	Ladenburg (1883)
Cocaína	Niemann & Wöhler (1860)	Willstätter (1898)

## Definição

Entre as definições cunhadas no século XX podem-se citar as três mais importantes, a primeira, de Winterstein e Trier (1910):<sup>46</sup>

*By alkaloids we mean compounds with nitrogen atoms bound in heterocyclic fashion, with a greater or lesser degree of basic character, marked physiological effects, complicated molecular structure, which are found in plants, and, with a few exceptions, are characteristic for particular plant families, genera or species.*

Que poderia ser traduzida como:

*Por alcalóides nos referimos a substâncias com átomos de nitrogênio na forma heterocíclica, com maior ou menor caráter de basicidade, marcados efeitos fisiológicos, estrutura molecular complexa, que são encontrados em plantas e, com algumas exceções, são característicos de algumas famílias, gêneros ou espécies vegetais.*

A segunda, definição de Hegnauer:<sup>48, 49</sup>

*Alkaloids are more or less toxic substances which act primarily on the central nervous system. They have a basic character, contain heterocyclic nitrogen, and are synthesized in plants from aminoacids or their immediate derivatives. In most cases they are of limited distribution in the plant kingdom.*

Que poderia ser traduzida como:

*Alcalóides são substâncias mais ou menos tóxicas que agem primeiramente no sistema nervoso central. Eles possuem caráter básico, contém nitrogênio heterocíclico e são sintetizados em plantas a partir de aminoácidos ou seus derivados imediatos. Na maioria dos casos são de limitada distribuição no reino vegetal.*

Essas definições são incompletas por não abrangerem todas as estruturas conhecidas. O primeiro obstáculo é o estrutural, já que nem todas as estruturas possuem nitrogênio em anel heterocíclico (e.g. efedrina), ou as substâncias contendo esses grupos seriam todas básicas (e.g. ácido aristolóquico). O segundo obstáculo envolve sua distribuição, já que na segunda metade do século XX foram descobertos alcalóides em animais, seja na sua dieta (e.g. castoramina) ou por metabolização animal de anfíbios urodelos e anuros (e.g. samandarina e epibatidina).<sup>47, 50-55</sup> Outro obstáculo é a complexidade estrutural, por se tratar de um termo relativo, devido ao isolamento de estruturas mais simples (e.g. bufotenina) a estruturas mais complexas (e.g. estricnohexamina). Por fim há dúvidas sobre caracterizar uma substância química de acordo com suas propriedades farmacológicas, já que um dos interesses do isolamento de produtos naturais é o seu potencial farmacológico.

Contudo, pode-se estabelecer um conceito através da definição Pelletier (1983):<sup>50</sup>

*An alkaloid is a cyclic organic compound containing nitrogen in a negative oxidation state which is of limited distribution among living organisms.*

Que poderia ser traduzida como:

*Alcalóides são substâncias orgânicas contendo nitrogênio em estado de oxidação negativo e que apresenta limitada distribuição entre organismos vivos.*

### **Distribuição no reino e nos tecidos vegetais**

Os alcalóides encontram-se presentes em um grupo restrito de famílias botânicas, sendo as principais Apocynaceae, Rutaceae, Ranunculaceae, Fabaceae, Papaveraceae, Menispermaceae, Annonaceae, Solanaceae, Rubiaceae, Liliaceae<sup>56</sup> e Loganiaceae.

Tais substâncias distribuem-se em quatro regiões nos vegetais:<sup>50, 57</sup>

- Tecidos de crescimento intenso, frutas em crescimento, etc.;
- Tecidos superficiais (epiderme e camadas adjacentes);
- Ramos vasculares e parênquimas adjacentes e/ou próximos ao tecido vascular;
- Dutos laticíferos, quando presentes.

### **Funções e classificação**

A função de tais substâncias nos vegetais ainda é tema de discussão e entre algumas das propostas consideradas estão: lixo metabólico, proteção contra radiação UV-B, defesa em resposta a um agente patogênico, fonte de nitrogênio.<sup>58-60</sup>

A classificação de tais substâncias, apesar de subjetiva, tende a ser feita com base na origem biossintética, com exceção de alguns casos particulares, em que certos esqueletos são quase exclusivos de determinados gêneros ou famílias. Nesses casos atribui-se uma classificação própria e.g. alcalóides da família Amaryllidaceae, alcalóides do gênero *Erythrina*.

De acordo com a literatura costuma-se classificá-los mais ou menos em quatro grupos, devido às limitações das definições já mencionadas.

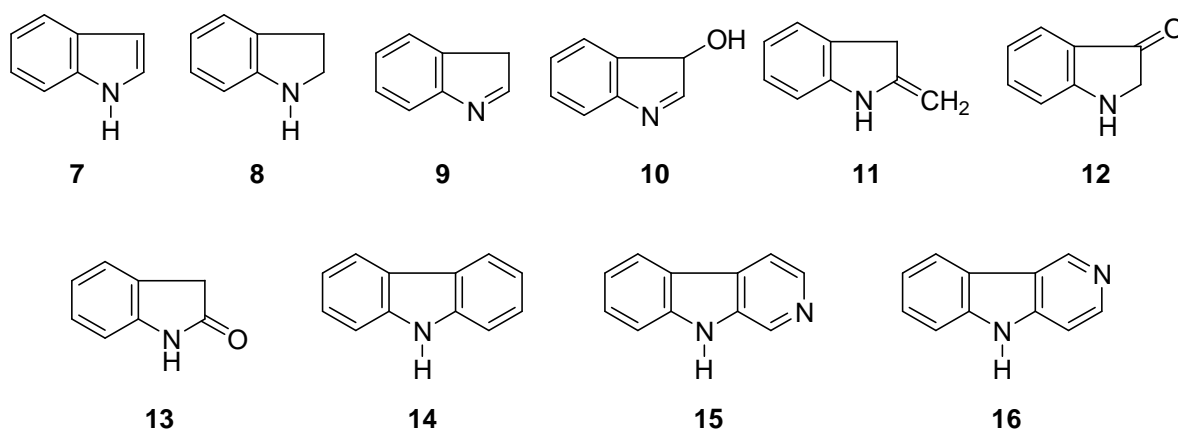
- Alcalóides derivados de aminoácidos, do ácido nicotínico e do ácido antranílico
- Alcalóides derivados do metabolismo do acetato (terpênicos)

- Alcalóides derivados peptídicos
- Alcalóides diversos (bases púricas, macrociclos, etc)

O enfoque desta dissertação será maior sobre os derivados de aminoácidos, mais precisamente os alcalóides indólicos.

### Alcalóides indólicos

Alcalóides indólicos são substâncias derivadas do metabolismo do aminoácido triptofano e que apresentam o cromóforo indol ou seus derivados: indol (**7**), indolina (**8**), indolenina (**9**), hidroxindolenina (**10**),  $\alpha$ -metilindolenina (**11**), pseudoindoxila (**12**), oxindol (**13**), carbazol (**14**),  $\beta$ -carbolina (**15**),  $\gamma$ -carbolina (**16**).<sup>46, 61</sup>



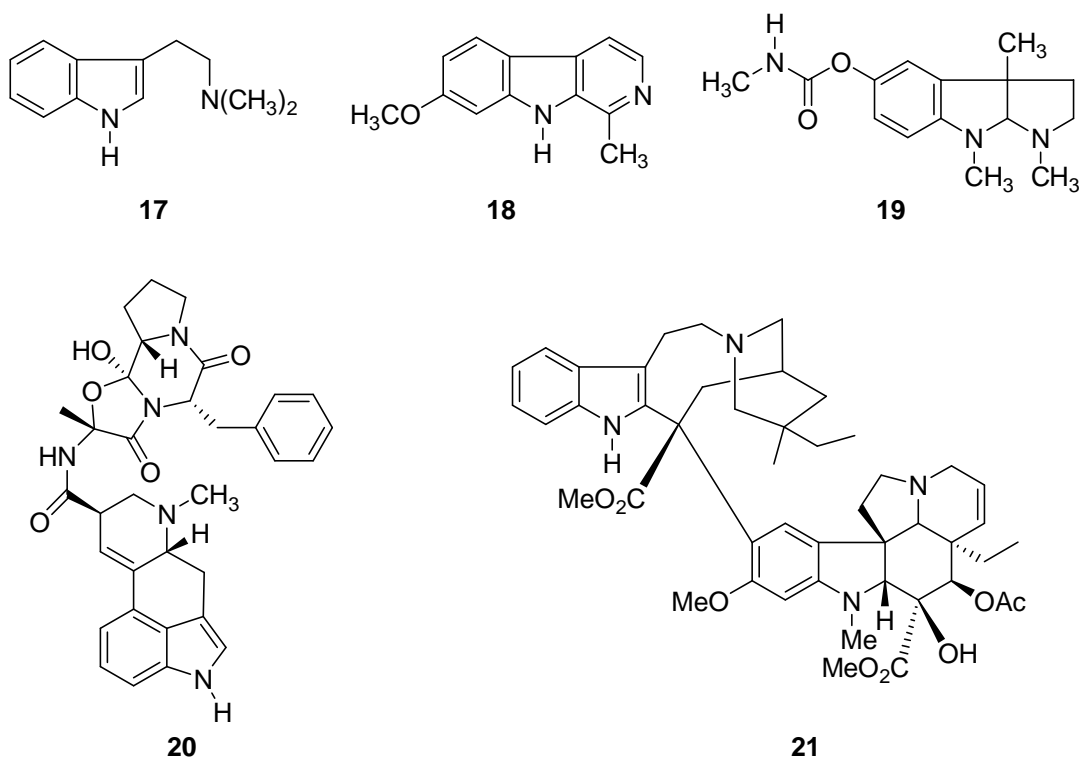
Dentre uma estimativa de 139 mil produtos naturais, em primeiro lugar situam-se os terpenóides (30.500) e os alcalóides (16.833) logo após, sendo que a maior parte é representada pelos alcalóides indólicos (3.874).<sup>62, 63</sup>

Tais alcalóides podem ser classificados em cinco grupos.<sup>64</sup>

- **Alcalóides indólicos simples**, formados por descarboxilação do triptofano, seguida de outras modificações de cadeia lateral [e.g. *N,N*-dimetiltriptamina (**17**)].
- **Alcalóides carbolínicos**, originários da condensação da triptamina com um aldeído ou  $\alpha$ -ceto ácido, seguida de ciclização [e.g. harmina (**18**)].



- **Alcalóides pirroloindólicos**, originários de alquilação seguida de ciclização, formando dois núcleos heterocíclicos adjacentes [e.g. fisostigmina (**19**)].
- **Ergolinas**, nome originário dos alcalóides do esporão do centeio - *ergot* – os quais são formados por várias reações em que se forma um sistema de anéis tetracíclicos. Outras estruturas mais complexas podem ocorrer devido à adição de aminoácidos [e.g. ergotamina (**20**)].
- **Indolmonoterpênicos**, são sintetizados pela condensação do secologanosídeo com triptamina [e.g. vimblastina (**21**)], seguida de rearranjos desta.



Dentre esses grupos, esta dissertação pretende trabalhar com a classe dos alcalóides indólicos monoterpênicos.

Estima-se que a família Apocynaceae está entre a de maior número de alcalóides indólicos monoterpênicos isolados até hoje, bem como o maior número de alcalóides em plantas superiores.<sup>56</sup> Portanto, essa classe de compostos é utilizada como marcadores taxonômicos das espécies presentes naquela família botânica.<sup>65</sup>

## Alcalóides indólicos monoterpênicos

Em contraste com a ampla distribuição dos alcalóides indólicos simples (aproximadamente 35 famílias) os alcalóides indólicos monoterpênicos estão presentes na sua maioria nas famílias Apocynaceae, Rubiaceae e Loganiaceae<sup>50, 61</sup> e com alguns representantes em número reduzido nas famílias Annonaceae, Euphorbiaceae e Sapotaceae, bem como Alanginaceae e Icacinaceae.<sup>66, 67</sup>

A classe de alcalóides indólicos monoterpênicos origina grupos de acordo com os esqueletos formados (Tabela 3), sendo que o critério fundamental para a classificação é o número de ligações entre a porção terpenóide e triptamina.<sup>68</sup>

**Tabela 3** - Classes e grupos de alcalóides indólicos monoterpênicos.<sup>61</sup>

Classe 1		
1.1 Grupo vincosida	1.7 Grupo mavacurina	1.13 Grupo ajamlina
1.2 Grupo corinanteína	1.8 Grupo cinchonamina	1.14 Grupo perakina
1.3 Grupo vallesiachotamina	1.9 Grupo sarpagina	1.15 Grupo oxindol <sup>#</sup>
1.4 Grupo adifolina	1.10 Grupo peraksina	1.16 Grupo pseudoindoxil <sup>#</sup>
1.5 Grupo talbotina	1.11 Grupo picralina	1.17 Grupo condilocarpina
1.6 Grupo estemadenina	1.12 Grupo corimina	1.18 Grupo akuamicina
		1.19 Grupo estricinina
Classe 2		
2.1 Grupo secodina		
Classe 3		
3.1 Grupo quebrachamina	3.4 Grupo vincamina	3.7 Grupo pleiocarpina
3.2 Grupo aspidospermina	3.5 Grupo esquizozigina	3.8 Grupo kopsina
3.3 Grupo esquizofilina	3.6 Grupo vindolinina	3.9 Grupo oxindóis <sup>†</sup>
Classe 4		
4.1 Grupo fruticosina		
Classe 5		
5.1 grupo catharantina	5.2 Grupo pseudoindoxil <sup>†</sup>	

<sup>#</sup> com secologanina não-modificada

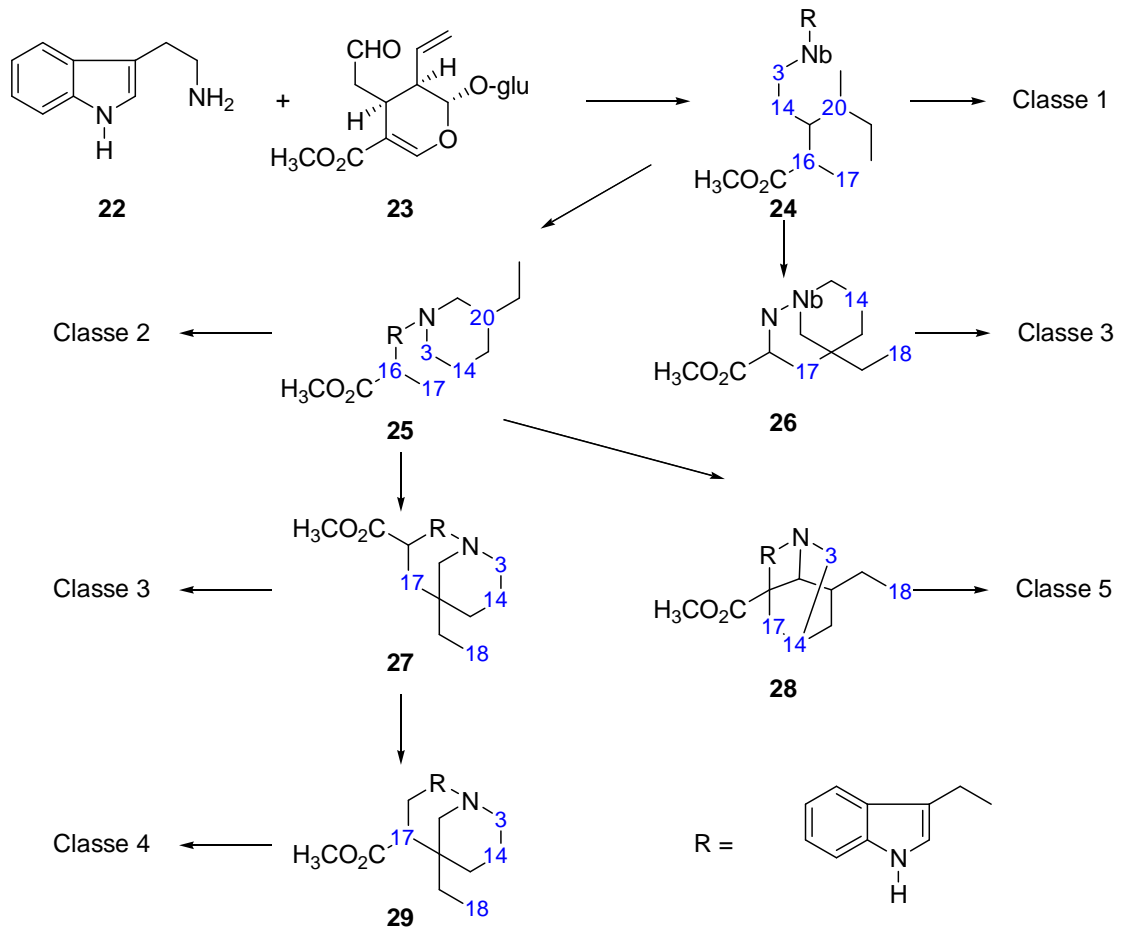
<sup>†</sup> com secologanina modifica

Os alcalóides (-)-demetoxiaspidospermina (**6a**) e uleína (**6**) encaixam-se respectivamente nos grupos 3.2 (grupo aspidospermina) e 1.17 (grupo condilocarpina).

Todos os membros dos grupos acima têm na sua origem, não só no aminoácido triptofano, na forma de triptamina (**22**), mas também outra fonte de carbono, o iridóide secologanina (**23**),<sup>46, 61</sup> produzidos por uma reação de condensação do tipo Mannich,<sup>64</sup> gerando a molécula da strictosidina (**24**).

Após a formação da molécula de strictosidina (**24**), esta não sofre rearranjos, mas apenas ciclizações, gera a Classe 1. Caso a porção secologanina, por rearranjo, forme uma ligação C-17/C-20 (**26**), ela formará alguns dos esqueletos da classe 3 (Esquema 1).

Por outro lado, se houver quebra da ligação C-18/C-19 e na qual C-16 liga-se a C-2 da porção triptamina (**25**), gera a classe 2, a qual pode formar ligação C-14/C-17 (**28**), formando-se a classe 5, ou pode novamente ciclizar entre  $N_b$ -R (**27**), formando outros esqueletos da classe 3. Finalmente, pode ainda haver transferência do grupo metilcarboxila de C-16 para C-17 (**29**), gerando a classe 4 (Esquema 1).<sup>68</sup>



**Esquema 1** - Rota biossintética de alcalóides indólicos monoterpênicos modificada de Kompis.<sup>68</sup>

Assim, o estudo da droga agoniada e dos seus constituintes no presente trabalho se justifica devido ao crescente interesse e utilização industrial do segmento de fitoterápicos no Brasil, além do pouco conhecimento da composição química da droga vegetal que está oficializada na primeira edição da Farmacopéia Brasileira.

**OBJETIVOS**

Contribuir com o conhecimento químico da droga vegetal agoniada, *Himatanthus lancifolius* (Müell.-Arg.) Woodson Apocynaceae, através do isolamento dos alcalóides indólicos presentes nas cascas do caule de agoniada.

Realizar um estudo preliminar de separação de alcalóides presentes na mesma fração de estudo, por cromatografia líquida de alta eficiência.

## **EXPERIMENTAL**

### **Materiais, reagentes e equipamentos**

Utilizou-se Sílica gel 60 (0,063-0,200 mm) Merck<sup>®</sup> (Darmstadt) e óxido de alumínio 90 Merck<sup>®</sup> (Darmstadt) ambos para as cromatografias de adsorção. Já para a cromatografia de exclusão, utilizou-se povidextransa Sephadex LH-20<sup>®</sup> Pharmacia.

Para as CCD preparativas utilizaram-se placas Sílica Gel 60 F<sub>254</sub><sup>®</sup> (20 x 20 cm, 0,25 mm) em vidro Merck, placas de CCD Alugram<sup>®</sup> SIL G (20 x 20 cm, 0,2 mm) em alumínio Machery-Nagel<sup>®</sup> e placas CCD Kieselgel 60 F<sub>254</sub><sup>®</sup> (20x 20 cm. 0,2 mm) em plástico Merck<sup>®</sup>.

Os solventes utilizados foram purificados e secos antes do uso.<sup>69</sup>

Os espectros no ultravioleta (UV) foram obtidos em espectrômetro Shimadzu UV 1601 com cubetas de quartzo fundida de 1 cm de espessura.

As determinações dos pontos de fusão foram realizadas em aparelho Buchi SMP-20 com correção.

O conjunto de espectros RMN-<sup>1</sup>H de 400 MHz e RMN-<sup>13</sup>C de 100 MHz foram obtidos em espectrômetro Varian Inova e 400 Bruker DRX 400 (University of Manchester, Inglaterra) e os espectros RMN-<sup>1</sup>H de 600 MHz e RMN-<sup>13</sup>C de 150 MHz em espectrômetro Varian Inova 500 (University of Tokushima Bunri University, Japão), todos em CDCl<sub>3</sub>. As posições ou os centros dos multipletos são dados na escala  $\delta$  com referência ao TMS como padrão interno.

Os espectros de massa foram obtidos em espectrômetro Kratos Concept (University of Manchester, Reino Unido), usando impacto eletrônico (EMIE) e ionização química (EMIQ). As massas moleculares foram determinadas a partir de medida de massa de precisão.

Os cromatogramas de CLAE foram obtidos em equipamento Varian ProStar 410 Autosampler, bomba modelo 230, detector de arranjo de fotodiodo 335 (Departamento de Farmácia). Em todos os procedimentos de CLAE utilizou-se solventes grau HPLC. A água utilizada foi purificada no sistema Puritech/Permutation PT0020, filtro 0,2  $\mu$ m, apresentando alto grau de pureza.

A coluna utilizada foi Microsorb-MV 100-5 C18 de dimensões 150 mm por 4,6 mm. As amostras foram injetadas utilizando-se *loop* de 10  $\mu$ l e manteve-se uma vazão de 0,8 ml/min. Antes de serem injetadas no equipamento de CLAE as amostras foram filtradas em membrana de celulose regenerada com poros de abertura 0,22  $\mu$ m da Milipore<sup>®</sup>.

Unidades e símbolos foram baseados no *Système Internationale d'Unités* (SI) de acordo com a recomendação da IUPAC.

### Material botânico

Cascas de *H. lancifolius* secas (15 kg) foram obtidas no mercado formal de plantas medicinais da região metropolitana de São Paulo e a identificação da espécie foi realizada através da análise farmacognóstica no próprio Laboratório de Farmacognosia da UFPR, segundo a Farmacopéia Brasileira I, por estudos microscópicos e também por comparação macroscópica com amostras autênticas contidas na herboteca desse mesmo laboratório (Figura 2). Foi depositada amostra da droga na herboteca do Laboratório de Farmacognosia da UFPR (sem número de registro), onde permanece como material de referência e estudo.<sup>43</sup>



**Figura 2** – Cascas dessecadas de *H. lancifolius*.

## Extração e fracionamento inicial

Cascas dessecadas e moídas foram pesadas (1,7 kg), transferidas para o percolador e realizou-se extração metanólica exaustiva, seguida de concentração, em rotavapor até volume final de 800 ml.

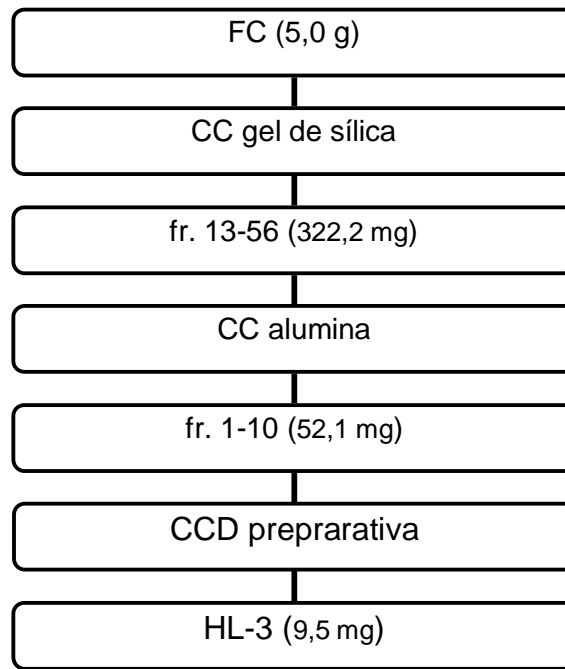
A seguir, o extrato foi particionado com *n*-hexano (3 x 200 ml) com o intuito de retirar matéria apolar, a qual teve o solvente evaporado, resultando em 4,3 g de massa seca não reagente ao reativo de Dragendorff.

O extrato desengordurado foi então transferido para funil de separação e alcalinizado ( $\text{NaHCO}_3$ ) até pH 8,2, realizando-se, então, extração clorofórmica a frio e exaustiva, ou seja, até reação negativa ao reativo de Dragendorff.<sup>70</sup> A fração clorofórmica (FC) foi então secada com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro e transferido para balão oval, seguido de secagem a vácuo em dessecador contendo sílica gel com indicador de umidade (2 h), fornecendo 36,7 g de FC seca. A FAq positiva ao reativo de Dragendorff, foi guardada em geladeira.

## Isolamento – Procedimento A

Uma alíquota da FC (5,0 g) foi submetida à CC de alumina com aproximadamente  $10\text{ cm}^3$  de gel de sílica e eluída com os seguintes solventes DCM, DCM- $\text{CHCl}_3$  (1:1),  $\text{CHCl}_3$ , AcOEt, AcOEt-EtOH (1:1), EtOH que resultou em 404 frações, as quais foram reunidas em dez grupos de acordo com seu perfil cromatográfico em CCD.

As frações de número 13 a 56 reunidas foram submetidas à CC em alumina com aproximadamente  $10\text{ cm}^3$  alumina e eluídas com os seguintes solventes DCM, DCM- $\text{CHCl}_3$  (1:1) e  $\text{CHCl}_3$  com concentrações crescentes de MeOH, resultando em 37 frações. As frações de número 1 a 10 foram submetidas à CCD preparativa, utilizando-se como FM tolueno-AcOEt-dietilamina (70:20:10), de onde foi isolado o composto HL-3 (9,5 mg), com rendimento de  $5,6 \times 10^{-4}\%$ .



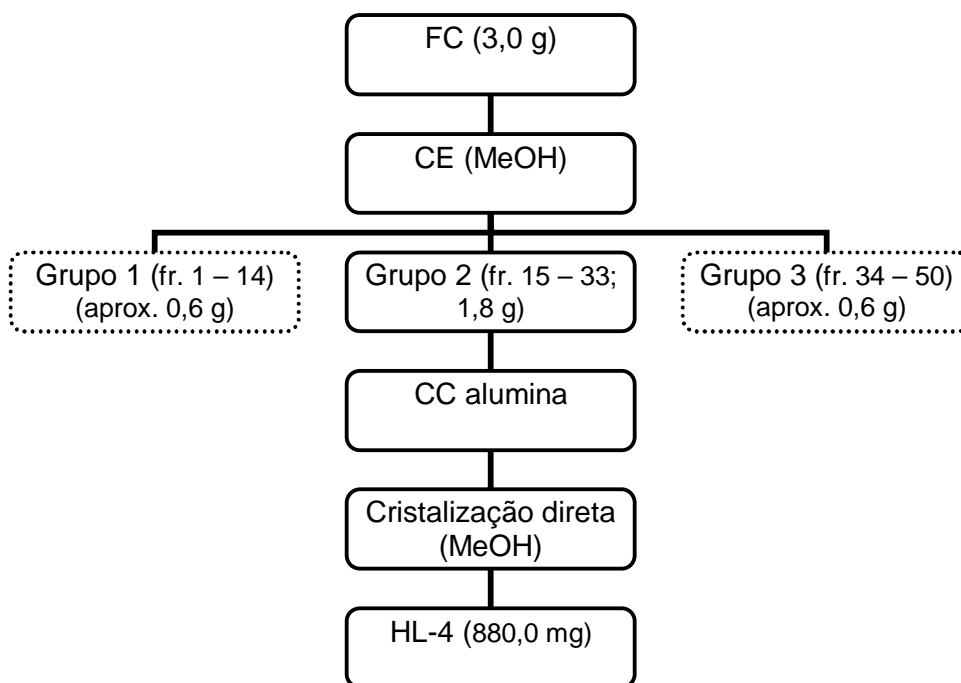
**Figura 3** – Fluxograma do procedimento de isolamento A

### Isolamento – Procedimento B

Uma alíquota de 3,0 g de FC foi submetida à CE de polidextrana, ambientada em metanol por 24 horas, e eluída com metanol como fase móvel, sendo que a eluição foi monitorada por CCD [FM: tolueno-AcOEt-dietilamina (70:20:10)]. Obteve-se três grupos de frações distintas, o primeiro (frações 1 a 14) e o último (frações 34 a 50) continham substâncias que não foram eluídos, ou seja, se mantinham no ponto de aplicação nessa fase móvel, e um grupo intermediário (frações 15 a 33) contendo a maioria dos compostos observados por CCD.

Foi realizada CC de alumina com o grupo intermediário (FM:  $\text{CHCl}_3$ -AcOEt em concentrações crescentes), seguido de cristalização direta com MeOH, obtendo-se cristais de coloração variando do amarelo pálido ao alaranjado e classificado como HL-4 (880,0 mg), com rendimento de  $5,2 \times 10^{-2} \%$ .



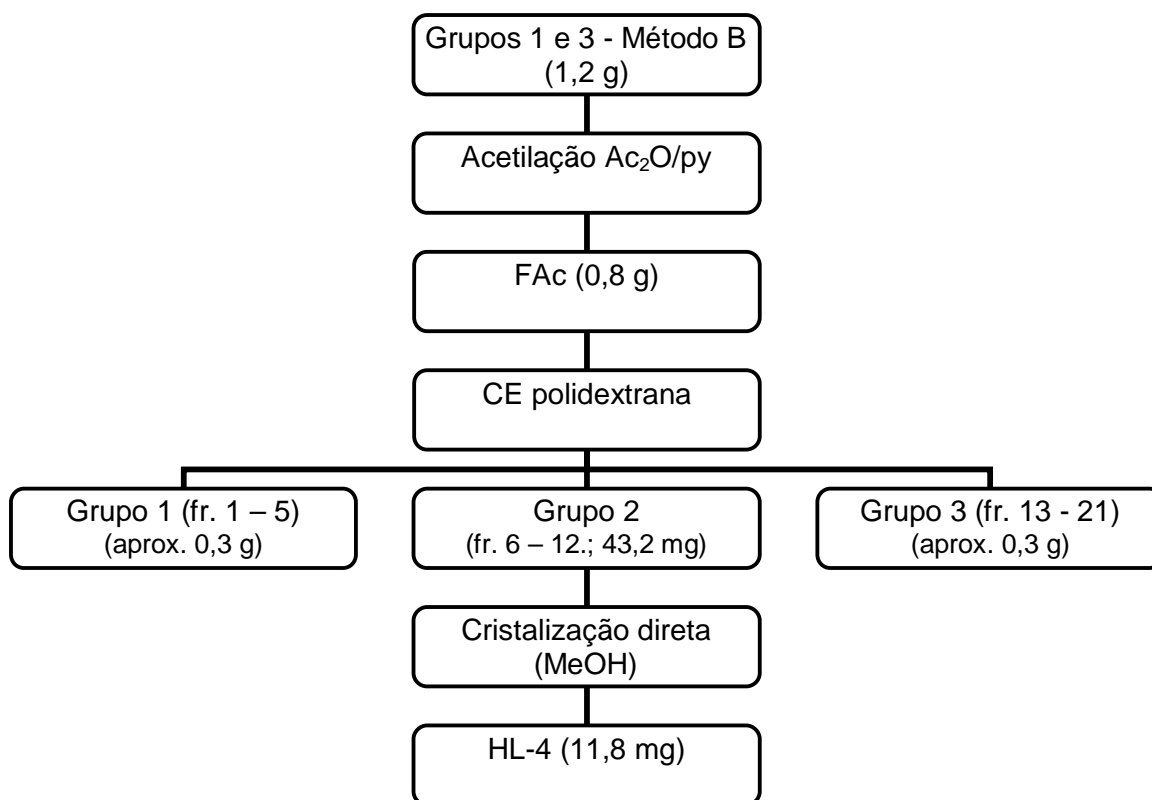


**Figura 4** – Fluxograma do procedimento de isolamento B

### Isolamento – Procedimento C

O material contendo as substâncias que se mantiveram no ponto de aplicação no procedimento B (1,2 g) foi reunido e em seguida acetilados em anidrido acético (aprox. 10 ml/g) e piridina (aprox. 5 ml/g) à temperatura ambiente por 12 horas. Após evaporação sob pressão reduzida da mistura azeotrópica com tolueno, o resíduo foi suspenso em clorofórmio, lavado com solução de NaHCO<sub>3</sub> 10% e percolado através de coluna de alumina (tipo UG1 desativada por 5% de solução aquosa de AcOH a 10%). O produto acetilado foi então obtido por evaporação.

Obteve-se 0,8 g de FAc a qual foi aplicada à CE de povidextransa, cujas subfrações foram eluídas com MeOH e monitoradas por CCD [FM: tolueno-AcOEt-dietilamina (70:20:10)]. As frações resultantes foram reunidas em três grupos de polaridade distintas (frações 1-5, frações 6-12 e frações 13-21). Pelo fato de apenas o grupo intermediário desenvolver coloração após reação com reagente de van Urk, essa foi posteriormente purificada por cristalização direta, isolando-se 11,8 mg do alcalóide HL-4, com rendimento de  $6,9 \times 10^{-4}$  %.



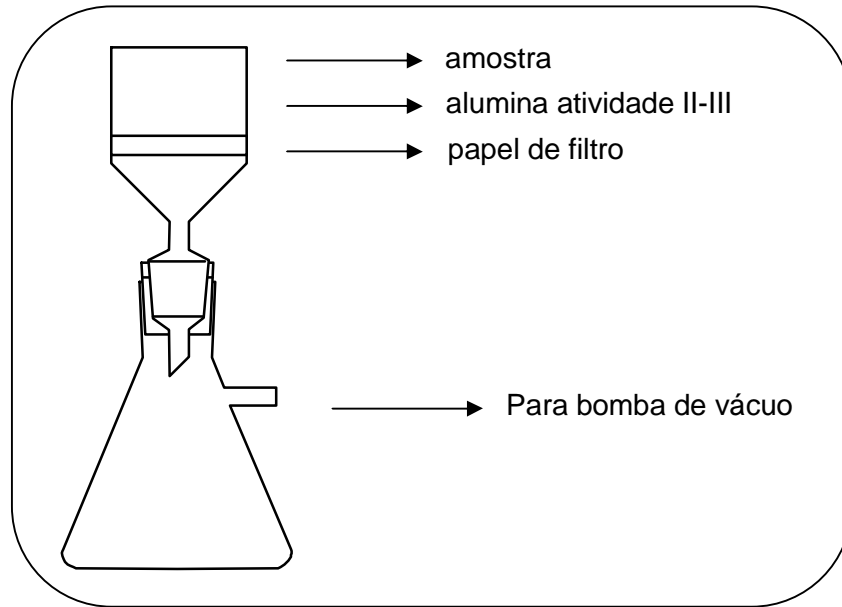
**Figura 5** – Fluxograma do procedimento de isolamento C

### Isolamento – Procedimento D

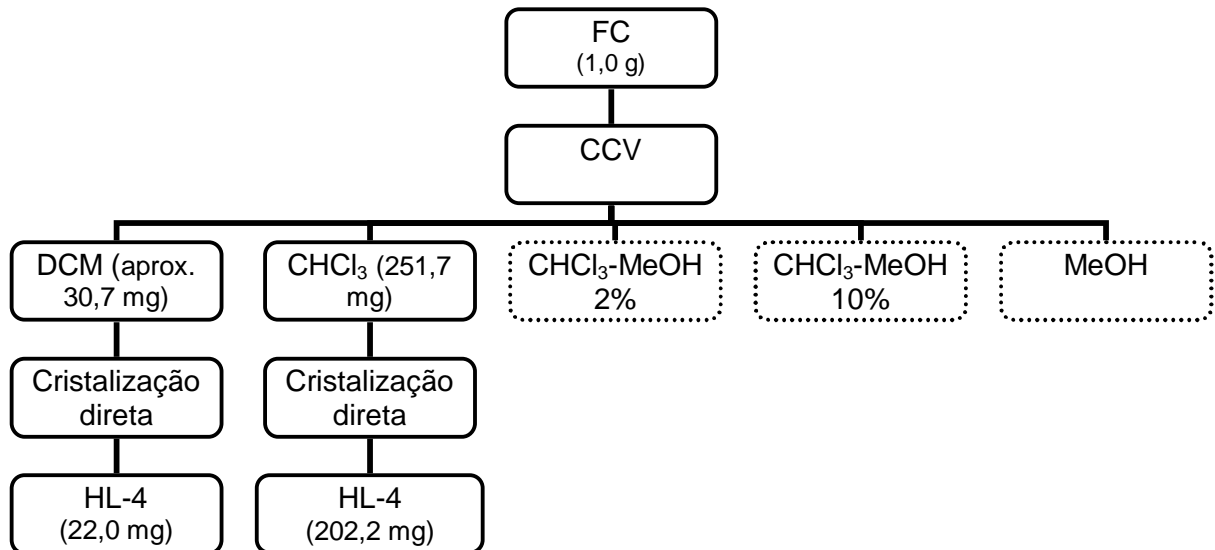
De um extrato previamente preparado de *H. lancifolius* pelo grupo de pesquisa, contendo uleína (31,0 mg) (identificado por coinjeção),<sup>43</sup> foi realizada CCD preparativa [FM: tolueno-AcOEt-dietilamina (70:20:10)], da qual obteve-se 15,0 mg de HL-4.

### Isolamento – Procedimento E

Esse método foi adaptado do processo de separação de Pelletier (1986).<sup>71</sup> Aproximadamente 1,0 g de FC foi empacotada a um sistema de funil de büchner-kitasato, já contendo 40,0 g de alumina, e o sistema foi conectado à bomba de vácuo (Figura 6). O sistema foi eluído com as seguintes fases móveis: DCM, CHCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub>-MeOH 2%, CHCl<sub>3</sub>-MeOH 10% e MeOH. Foram coletadas frações de 100 ml, as quais foram concentradas em rotavapor. Das frações eluídas com DCM e CHCl<sub>3</sub>, após cristalização com MeOH, obteve-se o alcalóide HL-4 (224,2 mg), com rendimento de  $1,3 \times 10^{-2}$  %.



**Figura 6** – Sistema para cromatografia de adsorção a vácuo.



**Figura 7** – Fluxograma do procedimento de isolamento D.

### Cromatografia Líquida de alta Eficiência

Em virtude da importância do alcalóide e a venda de produtos à base de agoniada no mercado, foi iniciado o desenvolvimento de um método preliminar de análise dos alcalóides em FC por meio de CLAE. Inicialmente tentou-se atingir os

resultados obtidos por Gerasimenko<sup>72</sup> através de adaptação do método proposto em artigo, porém devido a resultados pouco satisfatórios, procurou-se adaptar o método de análise proposto por Rattmann,<sup>43</sup> adotando-se as seguintes condições: eluente A ( $\text{H}_3\text{PO}_4$  0,05 %), eluente C (MeCN); FM: A % - C 10 % em 0 min, A 75 % - C 25 % em 7 min, A 10 % - C 90 % em 25 min continuando com eluição isocrática até 30 min. Fluxo: 0,8 ml/min; Detecção UV em  $\lambda = 210$  nm. As cromatografias foram realizadas com as amostras (FC e HL-4) nas concentrações de 50  $\mu\text{g/ml}$ , diluídas em MeOH, injetando-se o volume de 10  $\mu\text{l}$ .

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Após diversas tentativas de separação dos alcalóides das cascas de *H. lancifolius*, foram obtidas duas substâncias, denominados de HL-3 e HL-4, que apresentaram características de alcalóides após reação com os reagentes gerais de alcalóides Também apresentaram, após revelação com solução de sulfato cérico amoniacal em placas de cromatografia em camada delgada, coloração característica do núcleo indólico.

### **Procedimentos de isolamento**

Com relação aos procedimentos adotados, observou-se grande variedade de resultados, sendo que em relação ao procedimento A, este se mostrou útil por sua sensibilidade em discriminar o alcalóide ioimbina dos outros, apesar de seu baixo rendimento ( $5,6 \times 10^{-4} \%$ ) e grande demanda de tempo (aproximadamente dois meses de trabalho)

Em seguida foi adotado o método B, o qual, apesar da grande quantidade de tempo necessária para a conclusão e de se tratar de método trabalhoso, extraiu grande quantidade de uleína de FC ( $5,2 \times 10^{-2} \%$ ).

O procedimento C não gerou resultado satisfatório ( $6,9 \times 10^{-4}$ ), já que dele apenas confirmou-se a presença de uleína em FC. O procedimento D teve como finalidade a purificação do alcalóide uleína de um extrato obtido por outro meio de extração de agoniada, porém sem que se soubesse a sua concentração na fração em questão.

Contudo, o método mais promissor de todos sem dúvida é o método E. Nele utilizou-se materiais de uso comum em qualquer laboratório, além disso, do momento da preparação da amostra até a obtenção dos cristais de uleína não perdurava mais do que cinco dias, sem haver comprometimento em rendimento ( $1,3 \times 10^{-2} \%$ ). Em outras palavras, trata-se de um procedimento barato, rápido, de rendimento muito bom e não muito trabalhoso, podendo num futuro próximo, superar métodos mais convencionais como CC, ou até CE.

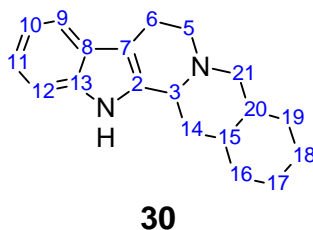
### Susbtância HL-3

A substância HL-3 apresentou-se na forma de cristais brancos, p.f. 235°C<sup>73</sup> (12,0 mg, 0,0007%) apresentou R<sub>f</sub> 0,39 (FM: tolueno-AcOEt-dietilamina 70:20:10), que em CCD, após revelação com reagente de Dragendorff apresentou coloração violácea. Foi isolada pelo procedimento A. Sua identificação foi feita por métodos espectrométricos: UV, IV, RMN-<sup>1</sup>H, e RMN-<sup>13</sup>C, além de RMN-2D (COSY, HMQC), e espectrometria de massas.

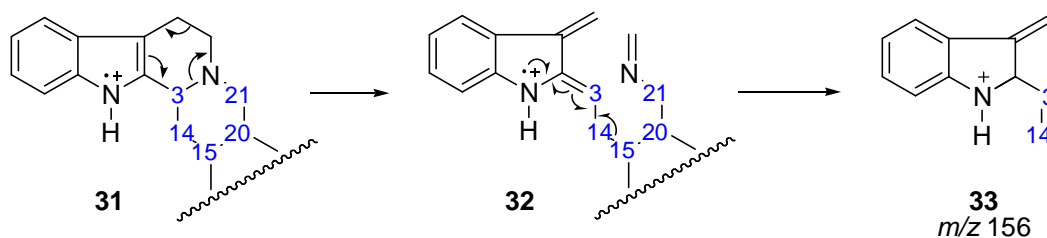
As bandas de absorção no espectro de UV em 270 e 224 nm foram típicas de cromóforo indólico sem substituições no anel aromático.<sup>74</sup> Já dos dados de espectros de IV pôde-se observar a presença de grupamento carbonila pelo estiramento em 1722 cm<sup>-1</sup>, sendo provável que pertença a grupo éster; presença de sinal de hidroxila em 3475 cm<sup>-1</sup>; presença de alquil-éster em 1261 cm<sup>-1</sup> e de álcool secundário em 1099 cm<sup>-1</sup>.

Da expansão de EMAR do sinal do pico do íon molecular, obteve-se *m/z* 354,1932, calculada para C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>O<sub>3</sub>N<sub>2</sub>, 354,1938.

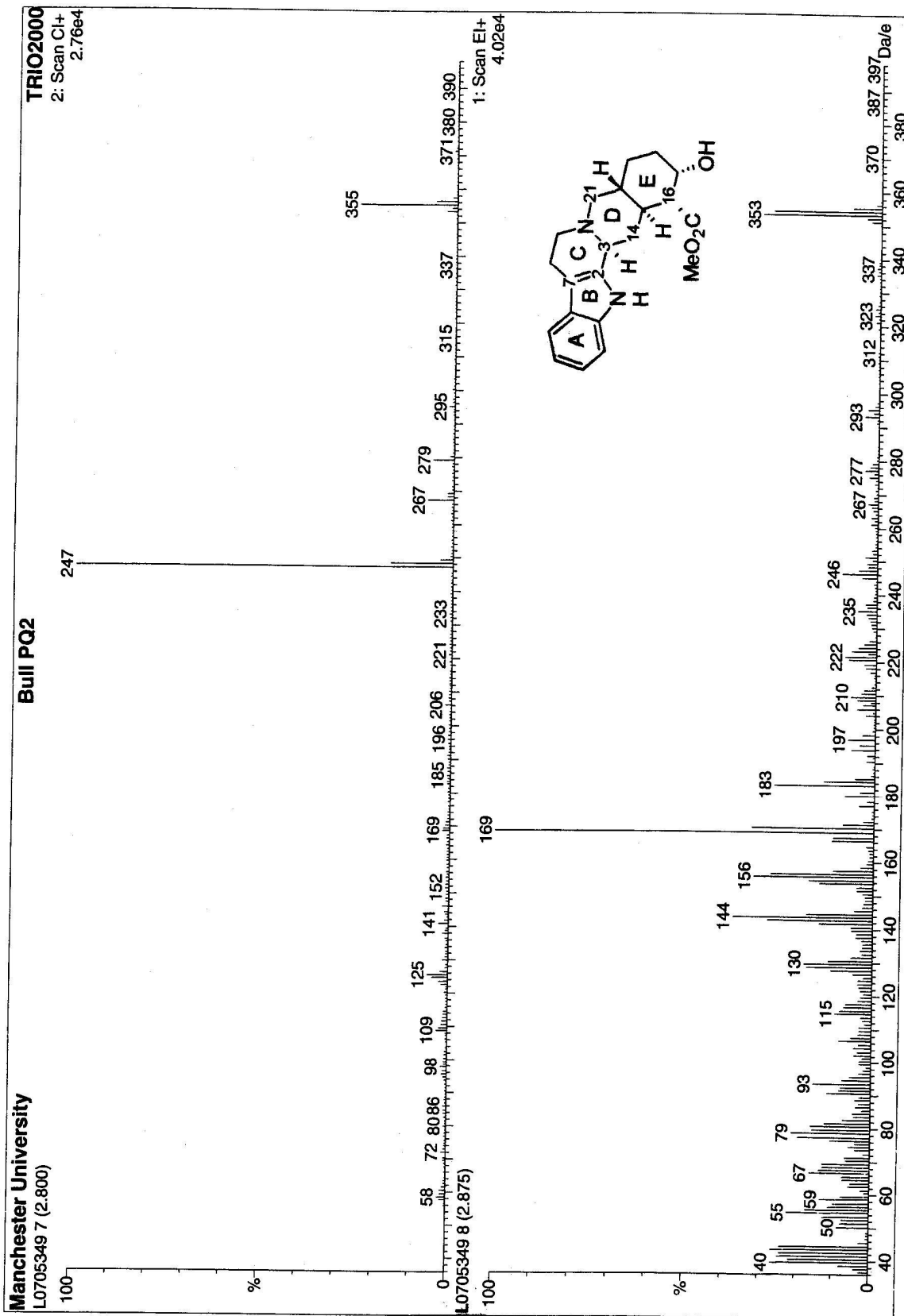
No EMIE (Espectro 1) observa-se o padrão de fragmentação típico de esqueleto ioimbano (**30**), cuja numeração segue à convencional por Lemen<sup>75</sup> contendo quatro fragmentos característicos *m/z* 183, 170, 169 e 156.<sup>61, 76</sup>



A formação do pico *m/z* 156 (**33**) dá-se numa primeira etapa por fragmentação retro-Diels-Alder do anel C em **31**, seguida de fissão homolítica da ligação C-14/C-15 ativada em **32**<sup>77</sup> (Esquema 2).

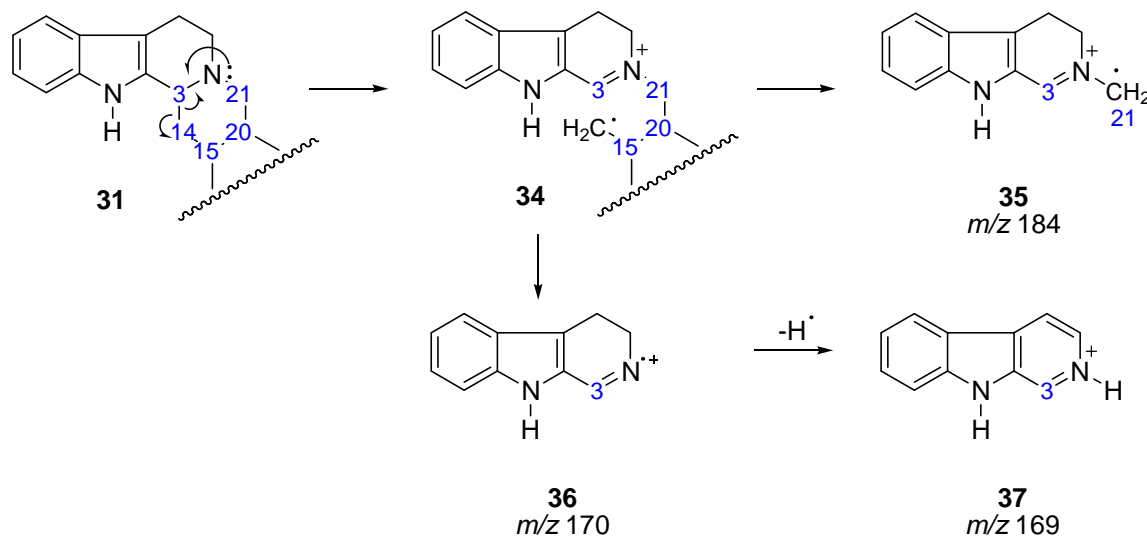


**Esquema 2** – Formação do fragmento *m/z* 156 de HL-3.



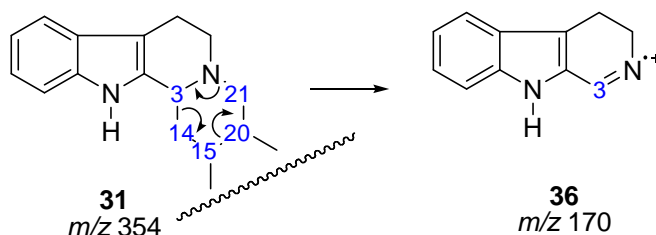
**Espectro 1** – Espectros de massas obtidos por ionização química (acima) e por impacto eletrônico (abaixo) de HL-3

Os fragmentos  $m/z$  184 (**35**), 170 (**36**) e 169 (**37**) foram provavelmente gerados a partir de homólise da ligação C-3/C-14, formando intermediário radicalar **34**, o qual, por clivagem da ligação N<sub>b</sub>/C-21, forma a di-hidro-β-carbolina (**36**), e a expulsão subsequente de um hidreto leva à formação do íon β-carbolinium (**37**). Se, de outra forma, a ligação C-20/C-21 fosse quebrada, isso geraria o fragmento (**35**)<sup>77</sup> (Esquema 3).



**Esquema 3** – Formação dos fragmentos  $m/z$  184, 170 e 169 de HL-3.

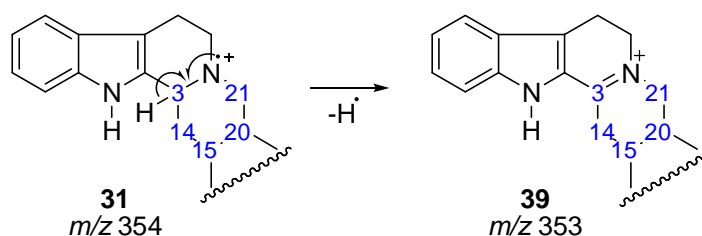
O fragmento  $m/z$  170 (**36**) pode ser também formado por fragmentação retro-Diels-Alder do anel D em **31**<sup>77</sup> (Esquema 4).



**Esquema 4** – Formação do fragmento  $m/z$  170 a partir do fragmento  $m/z$  354.

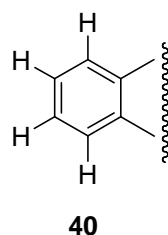
A formação do pico do íon M-1 (**39**)  $m/z$  353 é um dos principais meios de identificar os alcalóides do grupo ioimbina, e provavelmente ocorre pela perda de hidrogênio em C-3 do íon molecular  $m/z$  354 (**38**), cuja estrutura iônica é estabilizada por conjugação com o anel indólico o que justifica a intensidade do respectivo pico (Esquema 5).<sup>77</sup>





**Esquema 5** - Formação do pico M-1 de HL-3.

Os dados principais que evidenciaram a estrutura em estudo foram obtidos dos espectros de RMN- $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Na região menos blindada do espectro de RMN- $^1\text{H}$  (Espectro 2 e Tabela 4) evidencia-se a presença do sinal do grupo amino secundário em 7,75 ppm na forma de simpleto largo, seguido dos sinais dos hidrogênios aromáticos H-9 (7,47 ppm, *d*,  $J = 8,3$  Hz), H-12 (7,30 ppm, *d*,  $J = 8,3$  Hz), H-11 (7,14 ppm, *dt*,  $J = 8,3$  e 1,5 Hz) e H-10 (7,09 ppm, *dt*,  $J = 8,3$  e 1,5 Hz). As duas constantes de acoplamento *orto* ( $^3J_{HH} = 8,3$  Hz e 8,3 Hz) e a constante de acoplamento *meta* ( $^4J_{HH} = 1,5$  Hz) evidenciam um padrão de substituição representado pela estrutura (40).



Para a região intermediária do espectro de RMN- $^1\text{H}$  (Espectro 3 e Tabela 4), em região mais blindada, H-17 (4,23 ppm, *s*) foi encontrado com multiplicidade simpleto, devido à presença de hidroxila ligada a C-17. Além disso, foram encontrados sinais referentes a: OMe (3,82, *s*), característica para esse deslocamento químico e para essa multiplicidade. Além disso, houve também a presença de simpleto na região de 3,82 ppm, característico de grupo metoxila. Encontrou-se ainda H-3 (3,34 ppm) desblindado pela sua proximidade a  $N_b$  e ao anel indólico. Todos esses dados encontram-se de acordo com os dados da literatura.<sup>78</sup>

Os sinais entre 3,10 ppm e 2,94 ppm foram atribuídos aos núcleos H-5, H-6 e H-21, devido a semelhantes ambientes químicos e sem que houvesse distinção clara entre os respectivos sinais em relação aos dados da literatura.<sup>78</sup> A seguir foram observados os sinais de H-6 (2,73 ppm, *dl*,  $J = 13,1$  Hz), H-5 (2,64 ppm, *dt*,  $J = 4,7$  Hz e 13,1 Hz) cujos deslocamentos químicos e multiplicidades apresentavam-se mais exatos que os afirmados pela literatura.<sup>78</sup>



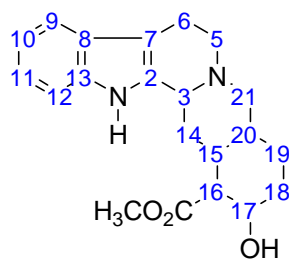




Já na região mais blindada do espectro (Espectro 4 e Tabela 4) observou-se os sinais de H-16 (2,36 ppm, *dd*,  $J = 10,9$  Hz e 2,7 Hz), H-21 (2,26 ppm, *dd*,  $J = 13,7$  Hz e 10,9 Hz), H-14 (2,01 ppm, *dl*,  $J = 2,7$  Hz), H-15 (1,98 ppm, *dl*,  $J = 2,7$  Hz) além dos sinais referentes a H-14, H-20, 2H-18 e 2H-19 (1,70 a 1,20 ppm) (Espectro 5), com pequenas variações tanto de deslocamentos químicos como de multiplicidades em relação aos dados de literatura, devido à grande sobreposição de sinais.<sup>78</sup>

**Tabela 4** –Dados de RMN <sup>1</sup>H (400 MHz; CDCl<sub>3</sub>) de HL-3.

<sup>1</sup> H (δ, sinal, multiplicidade <i>J</i> )	Clivio (1991) <sup>78</sup> 300 MHz
NH (7,75, <i>sl</i> )	NH (8,16, <i>sl</i> )
H-9 (7,47, <i>d</i> , $J = 8,3$ Hz)	H-9 (7,45, <i>dl</i> , 7,0 Hz)
H-12 (7,30, <i>d</i> , $J = 8,3$ Hz)	H-12 (7,27, <i>dl</i> , 7,0 Hz)
H-11 (7,14, <i>dt</i> , $J = 8,3$ e 1,5 Hz)	H-11 (7,11, <i>dt</i> , 7,0 e 1,0 Hz)
H-10 (7,0, <i>dt</i> , $J = 8,3$ e 1,5 Hz)	H-10 (7,06, <i>dt</i> , 7,0 e 1,0 Hz)
H-17 (4,23, <i>s</i> )	H-17 (4,21, <i>sl</i> )
OMe (3,82, <i>s</i> )	OMe (3,78, <i>s</i> )
H-3 (3,34, <i>dl</i> , $J = 10,8$ Hz)	H-3 (3,28, <i>dl</i> , 11,7 Hz)
H-5; H-6 e H-21 (2,94 – 3,10, <i>m</i> )	H-5 e H-6 (2,94-3,10, <i>m</i> )
H-6 (2,73, <i>dl</i> , $J = 13,1$ Hz)	H-21 (2,90, <i>dd</i> , 12,0 e 2,0 Hz),
H-5 (2,64, <i>dt</i> , $J = 4,7$ Hz e 13,1 Hz)	H-6 (2,64 – 2,76, <i>m</i> )
H-16 (2,36, <i>dd</i> , $J = 10,9$ Hz e 2,7 Hz)	H-5 (2,53 – 2,64, <i>m</i> )
H-21 (2,26, <i>dd</i> , $J = 13,7$ Hz e 10,9 Hz)	H-16 (2,32, <i>dd</i> , 11,5 e 2,0 Hz)
H-14 (2,01, <i>dl</i> , $J = 2,7$ Hz)	H-21 (2,19, <i>dd</i> , 12,0 e 9,0 Hz)
H-15 (1,98, <i>dl</i> , $J = 2,7$ Hz)	H-14, H-18 e H-19 (1,90-2,09, <i>m</i> )
H-20; H-18 e H-19 (1,70 – 1,50, <i>m</i> )	H-18, H-19 e H-20 (1,46-1,62, <i>m</i> )
H-19, H-14, H-18 (1,50 – 1,20, <i>m</i> )	H-15 (1,35-1,42, <i>m</i> )
	H-14 (1,31, <i>q</i> , 11,7 Hz)



Na região menos blindada do espectro de COSY (Espectro 6) pôde-se observar os acoplamentos entre os hidrogênios do núcleo indólico H-9/H-10, H-12/H-11. Na porção mais blindada observa-se os acoplamentos de H-17/H-16, H-16/H-21, H-16/H-15, e o acoplamento dos sinais, ainda que sobrepostos, de H-20/H-15.



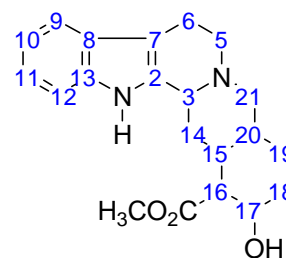


No espectro RMN- $^{13}\text{C}$  (Espectro 7 e Tabela 5) observou-se o mesmo padrão de assinalamento dos núcleos de  $^1\text{H}$  referentes àqueles encontrados na literatura quando da síntese total da ioimbina,<sup>79</sup> ou seja: sinal de carbono de carbonila em região menos blindada (175,6 ppm) característico de grupo éster; quatro átomos de carbono quaternários  $\text{sp}^2$ , C-2 (134,4 ppm) e C-13 (135,9 ppm), C-7 (108,3 ppm) e C-8 (127,4 ppm) todos adjacentes a  $\text{N}_a$ ; contém também outros quatro sinais de carbono  $\text{sp}^2$ , C-9 (118,1 ppm), C-10 (119,4 ppm), C-11 (121,4 ppm) C-12 (110,7 ppm), em região mais blindada em relação aos carbonos aromáticos não-hidrogenados.

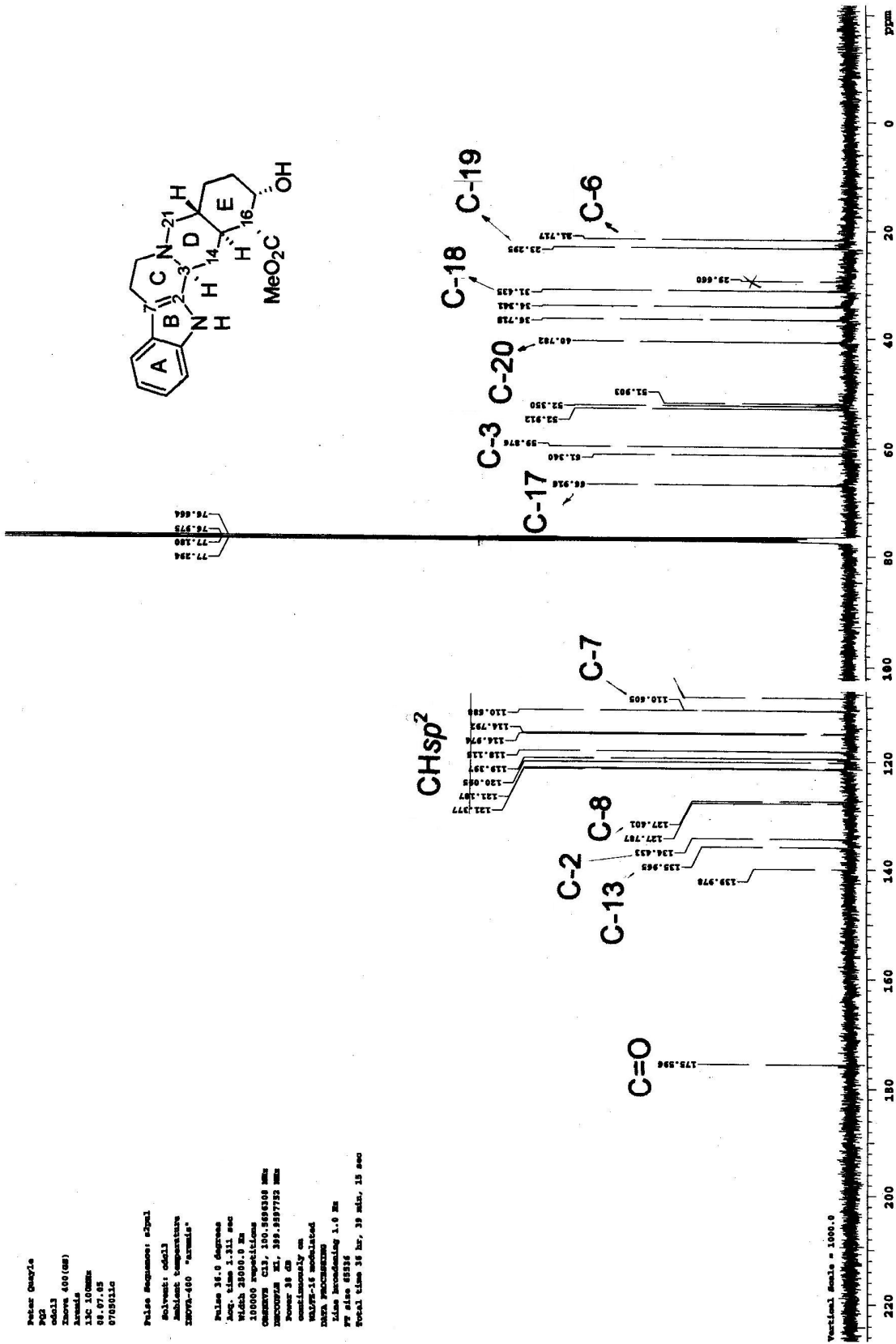
A seguir, em região mais blindada, observaram-se os seguintes sinais: C-17 (66,9 ppm), C-21 (61,3 ppm) e C-3 (59,9 ppm), C-16 (52,9 ppm), C-5 (52,3 ppm) em região menos blindada que o sinal do carbono do grupo metoxila (51,9 ppm). Já abaixo desse sinal, observou-se os sinais de C-14 (34,3 ppm) referente ao anel D da ioimbina (**41**), e o sinal de C-6 (21,7 ppm) referente ao anel C da ioimbina (**41**), já os outros sinais, são referentes ao anel E da ioimbina (**41**): C-20 (40,8 ppm), C-15 (36,7 ppm), C-18 (31,4 ppm) e C-19 (23,3 ppm)

**Tabela 5:-** Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) de HL-3

$^{13}\text{C}$	$\delta$	Wenkert(1976) <sup>79</sup>
C=O	175,6	175,1
C-13	135,9	135,8
C-2	134,4	134,3
C-8	127,4	127,0
C-11	121,4	120,8
C-10	119,4	118,8
C-9	118,1	117,7
C-12	110,7	110,6
C-7	108,3	107,5
C-17	66,9	66,9
C-21	61,3	61,0
C-3	59,9	59,8
C-16	52,9	52,6
C-5	52,3	52,1
-OMe	51,9	51,7
C-20	40,8	40,2
C-15	36,7	36,4
C-14	34,3	33,8
C-18	31,4	31,4
C-19	23,3	23,1
C-6	21,7	21,5







Espectro 7 – Espectro de RMN <sup>13</sup>C de HL-3 (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

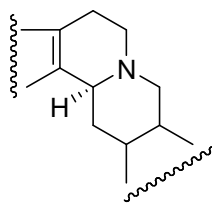
Com o espectro de HMQC (Espectro 8) foi possível confirmar quais hidrogênios estavam sobrepostos na região menos blindada, através dos sinais de carbono, o que gerou pequena discrepância em relação aos dados encontrados na literatura em relação ao assinalamento dos sinais presentes na região de 1,7 ppm a 1,2 ppm no espectro de RMN-<sup>1</sup>H (Tabela 4).

Além disso, com os dados de RMN-<sup>13</sup>C foi possível identificar qual é a configuração dos esqueletos da porção secologanina dessa molécula, podendo determinar se ela é normal, *allo*, *pseudo* ou *epiallo*.

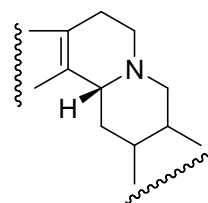
A ausência de um simpleto largo em 4,4 ppm referente a H-3 indica uma união de anéis na forma *trans*-quinolizidina.<sup>73, 80</sup> De acordo com as sínteses orgânicas de ioimbinas, pode-se determinar entre os isômeros C/D *trans* [normal/*allo*] (**41**) e os isômeros C/D *cis* [*pseudo*/*epiallo*] (**42**) dos derivados da ioimbina pelos sinais no espectro de RMN-<sup>13</sup>C dos carbonos C-3 e C-6, no qual o primeiro grupo apresenta os sinais de C-3 e C-6 com valores maiores que o segundo grupo (Tabela 6).<sup>79</sup>

**Tabela 6** – Deslocamentos químicos típicos para C-3 e C-6 para alcalóides de esqueleto do tipo ioimbino.<sup>79</sup>

	Normal/ <i>allo</i> (δ)	<i>Pseudo</i> / <i>epiallo</i> (δ)	HL-3 (δ)
C-3	60 ± 1	53,5 ± 0,5	59,9
C-6	21,5 ± 0,5	16,5 ± 0,5	21,7



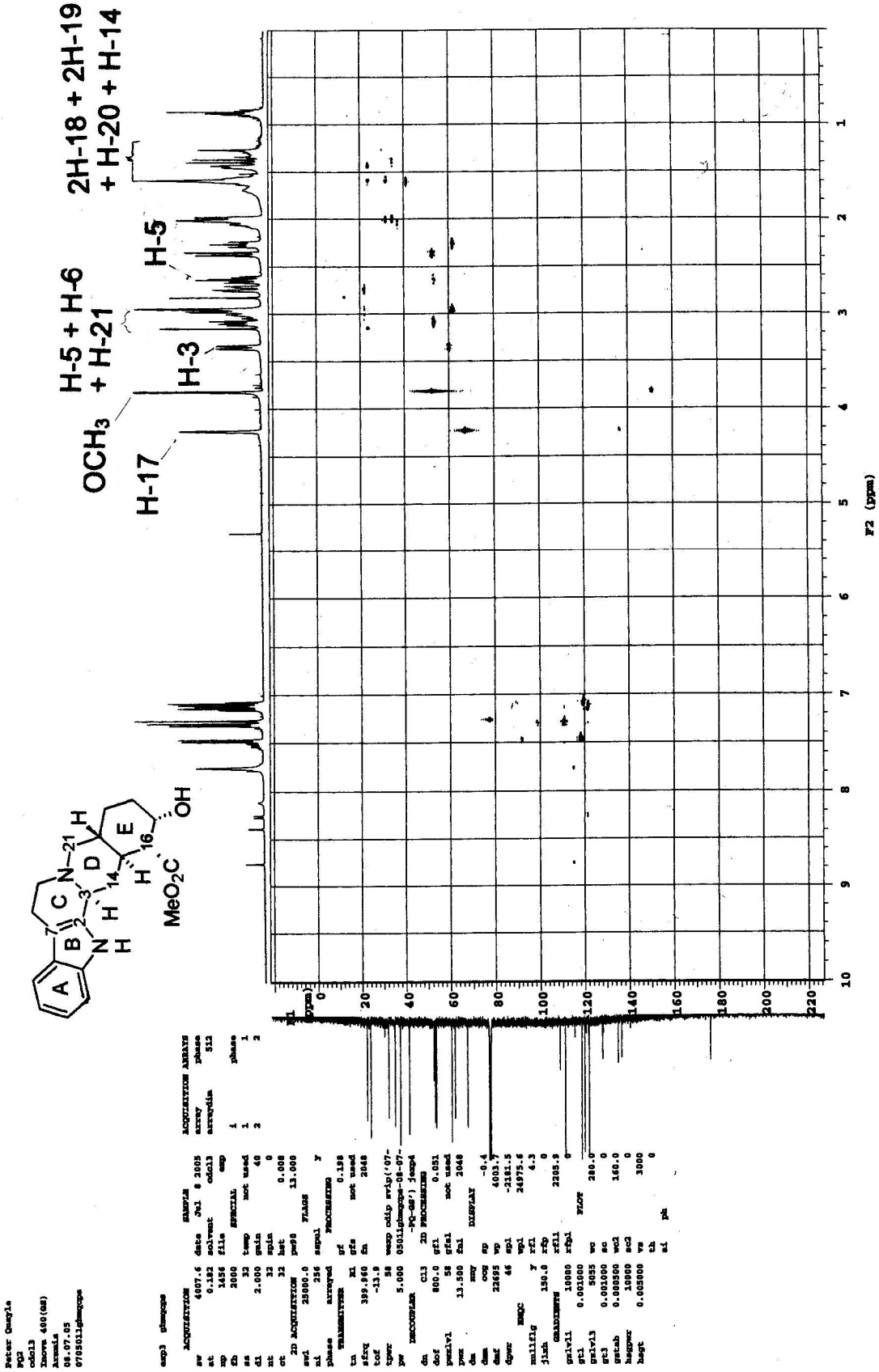
**41**



**42**

Como os valores encontrados de deslocamentos químicos de C-3 e C-6 para HL-3 foram 59,9 e 21,7 ppm, respectivamente, conclui-se que a junção do anel C/D de HL-3 é do tipo *trans* (**41**).

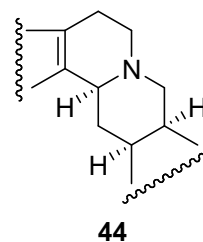
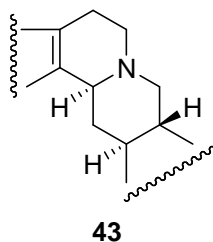
Já para diferenciar entre normal e *allo* observam-se os deslocamentos do C-14, e C-20, em normal (junção D/E *trans*) (**43**) os deslocamentos químicos estão, respectivamente, em torno de 34 e 40 ppm, já em *allo* (junção D/E *cis*) (**44**) os deslocamentos químicos estão em torno de 31 e 32 ppm respectivamente,<sup>81</sup> (Tabela 7).



Espectro 8 – Espectro de correlação heteronuclear de HMQC de HL-3 (1H 400 MHz/ 13C 150 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

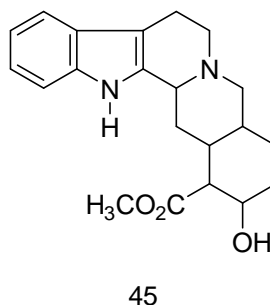
**Tabela 7** – Deslocamentos químicos típico para C-14 e C-20 para alcalóides de esqueleto do tipo ioimbina.<sup>75</sup>

	Normal ( $\delta$ )	<i>Allo</i> ( $\delta$ )	HL-3 ( $\delta$ )
C-14	34	31	34,3
C-20	40	32	40,8

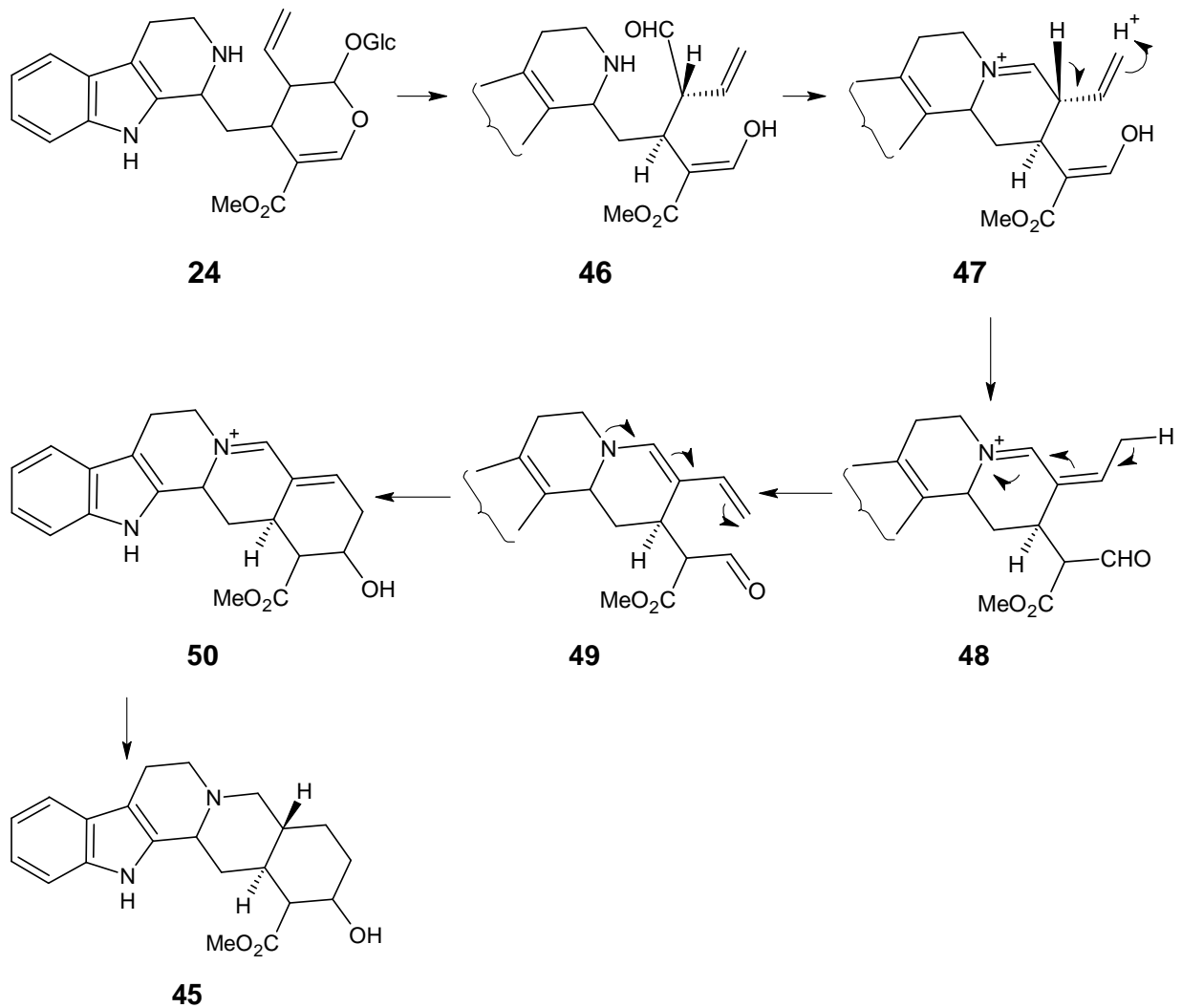


Os valores encontrados de deslocamento químico de C-14 e C-20 para HL-3 foram de 34,3 e 40,8 ppm, respectivamente, mais próximos daqueles de configuração normal.

De acordo com esses resultados pode-se afirmar que HL-3 possui configuração correspondente à normal. A análise do conjunto de dados obtidos permitiu concluir que o composto HL-3 trata-se do alcalóide indólico ioimbina (**45**).



Uma possível rota de biossíntese para esse alcalóide,<sup>64</sup> ocorre após a formação de strictosidina (**24**), a qual após hidrólise da função glucosídeo permite abertura do hemiacetal, e expõe o grupo aldeído (**46**) que reage com a amina secundária gerando uma base de Schiff quaternária (**47**). Isomerização alílica de **47** com transferência da dupla ligação vinílica para conjugação com o íon imínio gera desidrogeissoschizina na forma ceto **48**, que por isomerização homoalílica gera **49**. O ataque nucleofílico conjugado à carbonila de **49** gera **50**, que após redução, fornece o alcalóide ioimbina (**45**) (Esquema 6).



**Esquema 6** - Modelo de biossíntese da ioimbin (45).

Esse alcalóide foi isolado pela primeira vez em 1900 por Spiegel, estando presente nas famílias Apocynaceae (*Pausinystalia*, *Corynanthe*, *Lochnera*, *Hunteria*, *Rauwolfia*, *Amsonia*, *Vallesia*, *Aspidosperma* e *Catharanthus*), Loganiaceae (*Gelsemium*, *Strychnos*) e Euphorbiaceae (*Alchornea*).<sup>61, 73</sup> porém, este é o primeiro relato do isolamento de ioimbin das cascas de *H. lancifolius*.

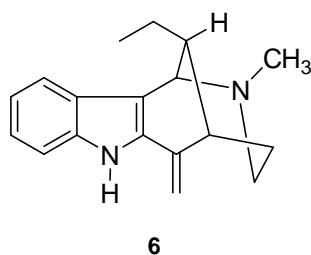
É conhecida tanto como potente inibidor de receptores adrenérgicos  $\alpha_2$ , como por sua atividade no tratamento de disfunção erétil, e recentemente contra disfunção sexual feminina.<sup>82, 83</sup>

## Substância HL-4

A substância HL-4 foi isolada em quatro dos procedimentos descritos, após comparação do seu  $R_f$  0,69 [FM: tolueno-AcOEt-dietilamina (70:20:10)] em CCD, mas sendo o procedimento E que apresentou melhor resultado. Para sua identificação foram utilizados os métodos espectrométricos UV, IR,  $^1\text{H}$ -RMN, e  $^{13}\text{C}$ -RMN, além de RMN-2D (COSY, HMQC, HMBC, NOESY), e espectrometria de massas.

A substância apresentou forma cristalina, em agulhas finas, com ponto de fusão 102-105 °C (76-118 °C)<sup>76</sup> (1,1 g, 0,065%). No espectro de UV observou-se uma extensão do cromóforo pela presença da dupla ligação exocíclica, em comparação com o espectro característico de cromóforo indol e com três bandas de absorção, em 219 nm, em 307 e em 316 nm.<sup>74</sup>

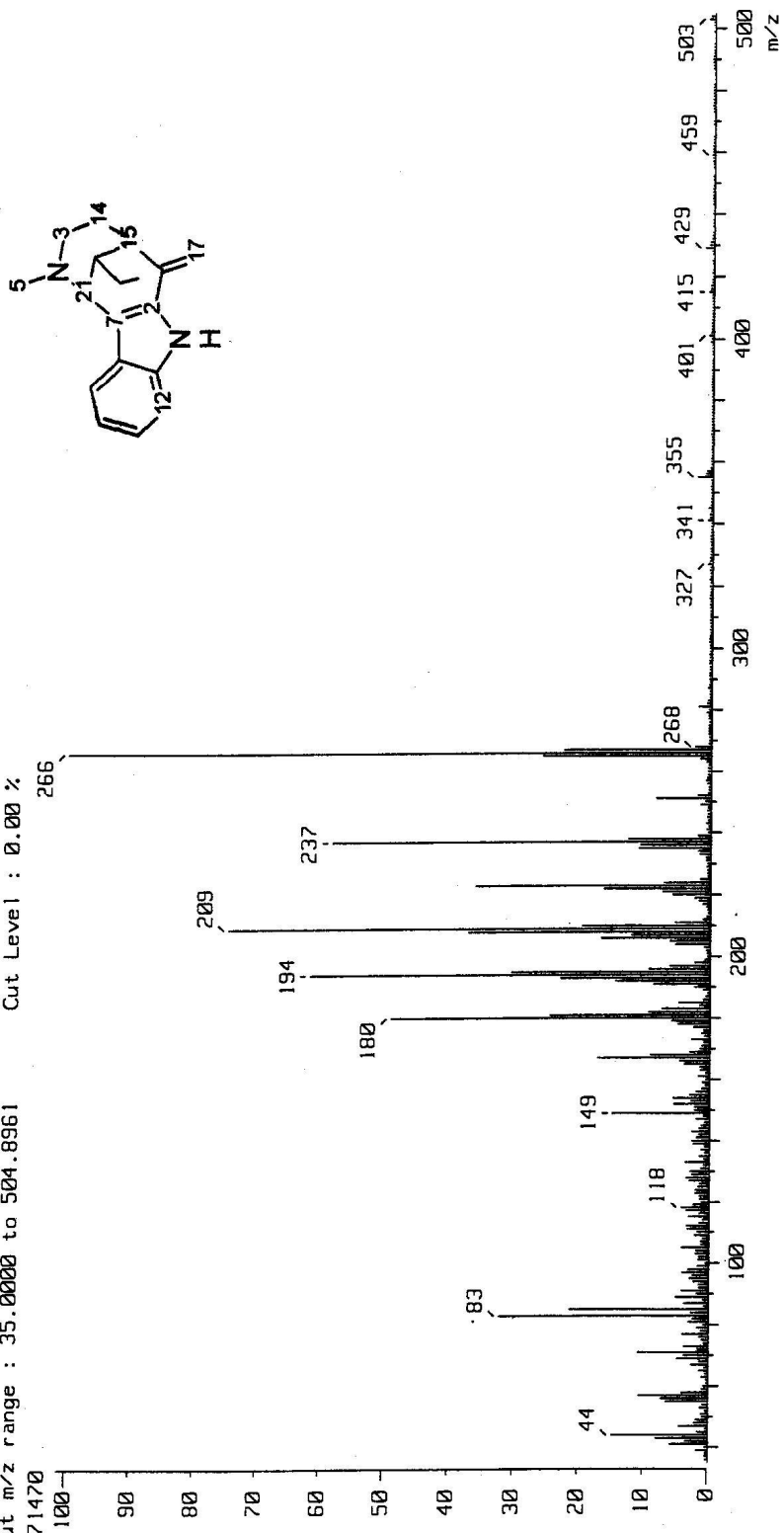
No espectro de massas (Espectro 9) de HL-4 foi observado o pico do íon molecular em  $m/z$  266, assim como por picos importantes em  $m/z$  251 (M-CH<sub>3</sub>), 237 (M-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>), 223, 222, 209, 194, 181, 180 e 167. Devido à presença do íon molecular em  $m/z$  266, junto com os picos importantes em  $m/z$  194 e 180, sugeriu tratar-se do alcalóide uleína (**6**), o qual já havia sido isolado desse material vegetal.<sup>42</sup> Da mesma forma, o íon em  $m/z$  167 ocorre em todos os derivados da uleína e assume-se que seja devido ao íon carbazol.<sup>84</sup>



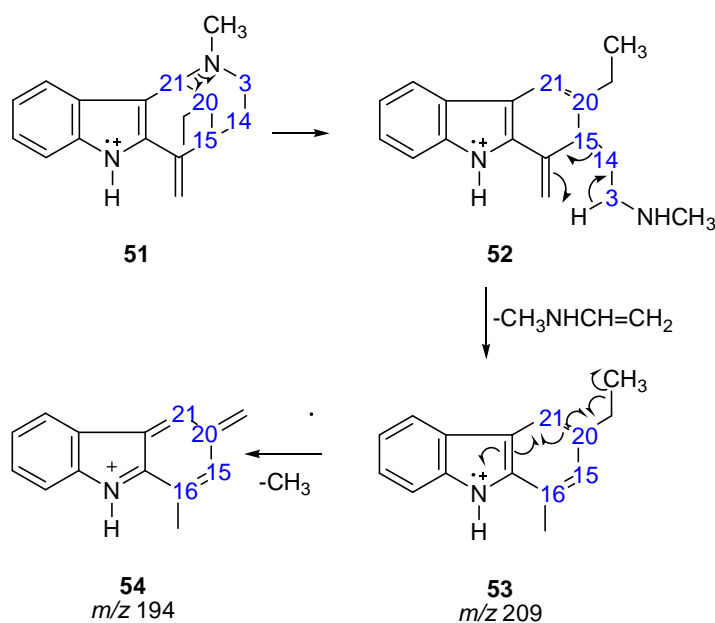
O íon molecular **51** sofre fissão da ligação  $N_b/C$ -21, além de C-20 ceder o átomo de hidrogênio para  $N_b$  decompondo-se para um estado de transição cíclico de seis membros (**52**), e ocorrendo rearranjo da dupla exocíclica, a qual é internalizada, com perda de grupo enamina, gerando sinal carbazólico **55**.

Por outro lado, o intermediário **52** pode decompor-se quando da formação de um estado de transição de seis membros, formando o íon  $m/z$  209 (**53**), o qual, por perda de metila, gerar o sinal  $m/z$  194 (**54**) (Esquema 7).<sup>84</sup>

[ Mass Spectrum ]  
 Data : FUKUYAMA-EI.19-JUL-07.001 Date : 19-Jul-2007 11:57  
 Sample: HL-9  
 Note : MStation  
 Inlet : Direct Ion Mode : EI+  
 Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]  
 RT : 0.90 min Scan# : 28  
 BP : m/z 266.0000 Int. : 1599.98  
 Output m/z range : 35.0000 to 504.8961  
 16971470 Cut Level : 0.00 %



Espectro 9 – Espectro de massas de HL-4 por impacto eletrônico.



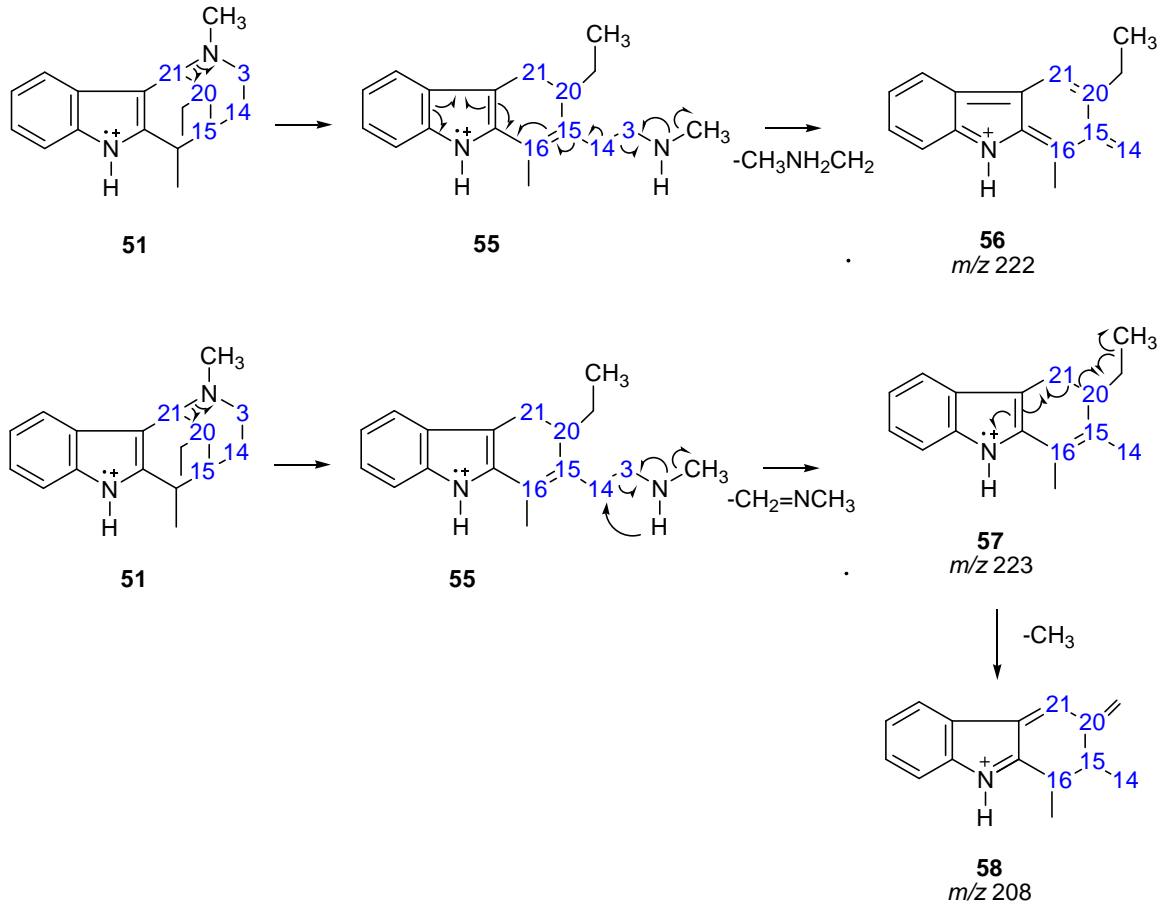
**Esquema 7** – Esquema de formação de picos  $m/z$  194 e 209 de HL-4.

Outro padrão de fragmentação de carbazóis substituídos, inicia-se também pela clivagem da ligação  $N_b/C-21$  do pico do íon molecular **51** da mesma forma que no Esquema 7, porém o intermediário formado **55** pode sofrer clivagem da ligação  $C-3/C-14$ , sem transferência de hidrogênio, para formar o pico  $m/z$  222 (**56**). O intermediário **55** pode também sofrer a mesma quebra na ligação  $C-3/C-14$ , mas com transferência de hidrogênio, para formar o pico em  $m/z$  223 (**57**), que pode, ainda, perder metil radicalar da cadeia etila terminal para formar o pico  $m/z$  208 (**58**). (Esquema 8).<sup>84</sup>

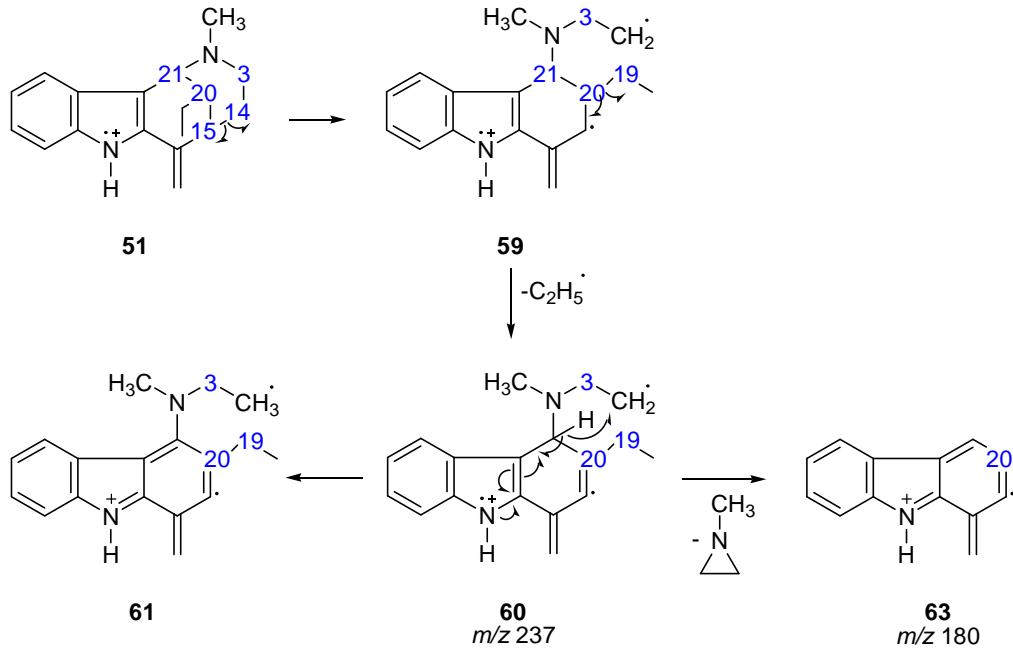
Os três picos remanescentes ( $m/z$  180, 181 e 237) no espectro podem ser explicados por clivagem de alguma ligação do íon molecular na posição alilicamente lábil  $C-14/C-15$ . O íon resultante **59** perderia um radical etila, formando o fragmento  $m/z$  237 (**60**), o qual poderia sofrer rearranjo para uma forma mais estável para formar **61**. De outra maneira, a perda da cadeia lateral contendo amina, na forma de aziridina N-metilada em **60** geraria a espécie conjugada  $m/z$  180 (**63**) (Esquema 9).<sup>84</sup>

A perda do substituinte em  $C-21$ , com transferência do hidrogênio do grupo  $N_b$ -metila em  $m/z$  237, geraria  $m/z$  181 (**62**), enquanto a subsequente perda benzílica do hidrogênio  $C-21$  (**62**) em  $m/z$  181 geraria a espécie conjugada  $m/z$  180 (**63**)<sup>84</sup> (Esquema 10).

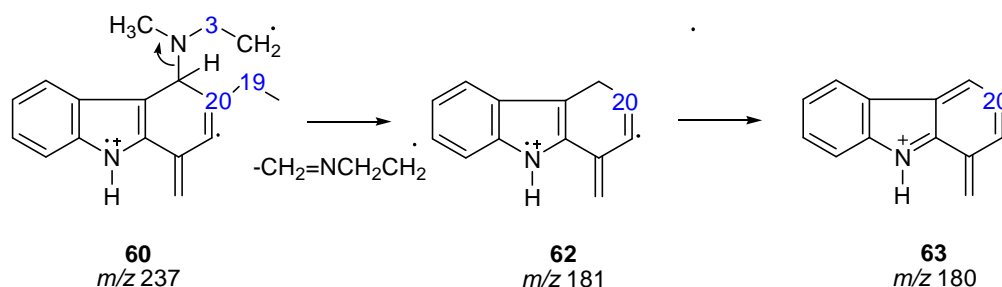




**Esquema 8** – Esquema de formação de picos  $m/z$  223, 222 e 208 de HL-4.



**Esquema 9** – Esquema de formação de picos  $m/z$  180, 181 e 237 de HL-4

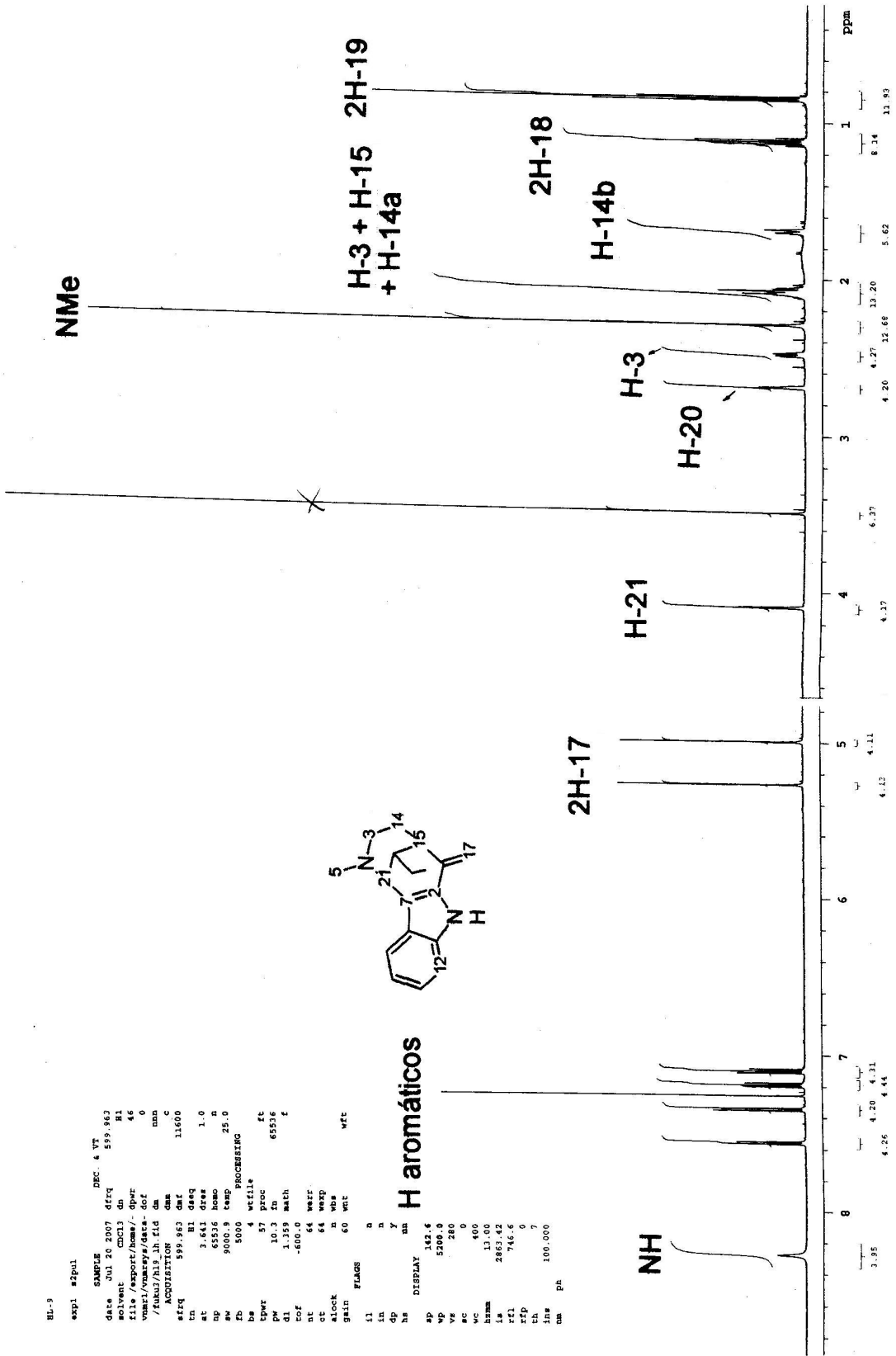


**Esquema 10** – Esquema de formação dos picos  $m/z$  181 e 182 a partir de  $m/z$  237

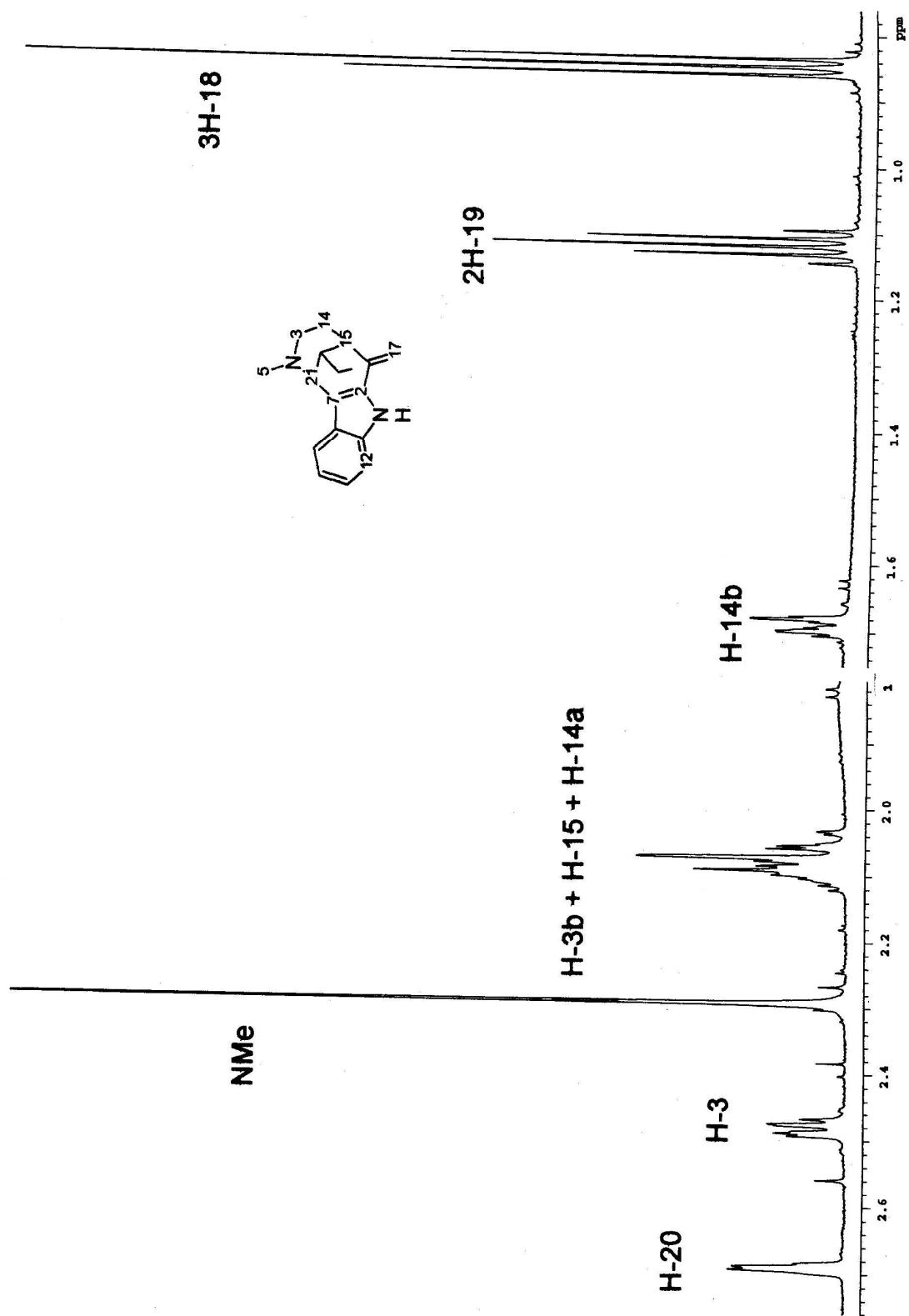
No espectro de RMN- $^1\text{H}$  da uleína (Espectro 10, Tabela 8) observou-se cinco sinais em região menos blindada do espectro: NH (8,28 ppm; *s*), H-9 (7,56 ppm; *d*,  $J = 8,0$  Hz), H-12 (7,35 ppm; *d*,  $J = 8,0$  Hz), H-11 (7,19 ppm, *dt*,  $J = 7,8$  Hz) e H-10 (7,10 ppm; *dt*,  $J = 7,8$  Hz). A seguir foram observados sinais em região de olefina referentes a 2H-17 (5,26 ppm, *s* e 4,98 ppm, *s*), H-21 (4,09 ppm, *s*,  $J = 2,5$  Hz) e H-20 (2,68 ppm, *s*,  $J = 2,8$  Hz), H-3 (2,46-2,48 ppm, *m*,  $J = 2,5$  e 8,2 Hz),  $\text{CH}_3\text{-N}$  (2,29 ppm, *s*). Entre 2,09 e 2,06 ppm ocorreu sobreposição dos sinais referentes a H-3, H-15 e H-14. Pôde-se observar também o sinal de H-14 (1,66-1,72 ppm, *m*), além dos sinais de 2H-19 (1,12 ppm, *q*;  $J = 7,4$  Hz) e 3H-18 (0,85 ppm; *t*,  $J = 7,4$  Hz).

**Tabela 8** – Dados de RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) de HL-4.

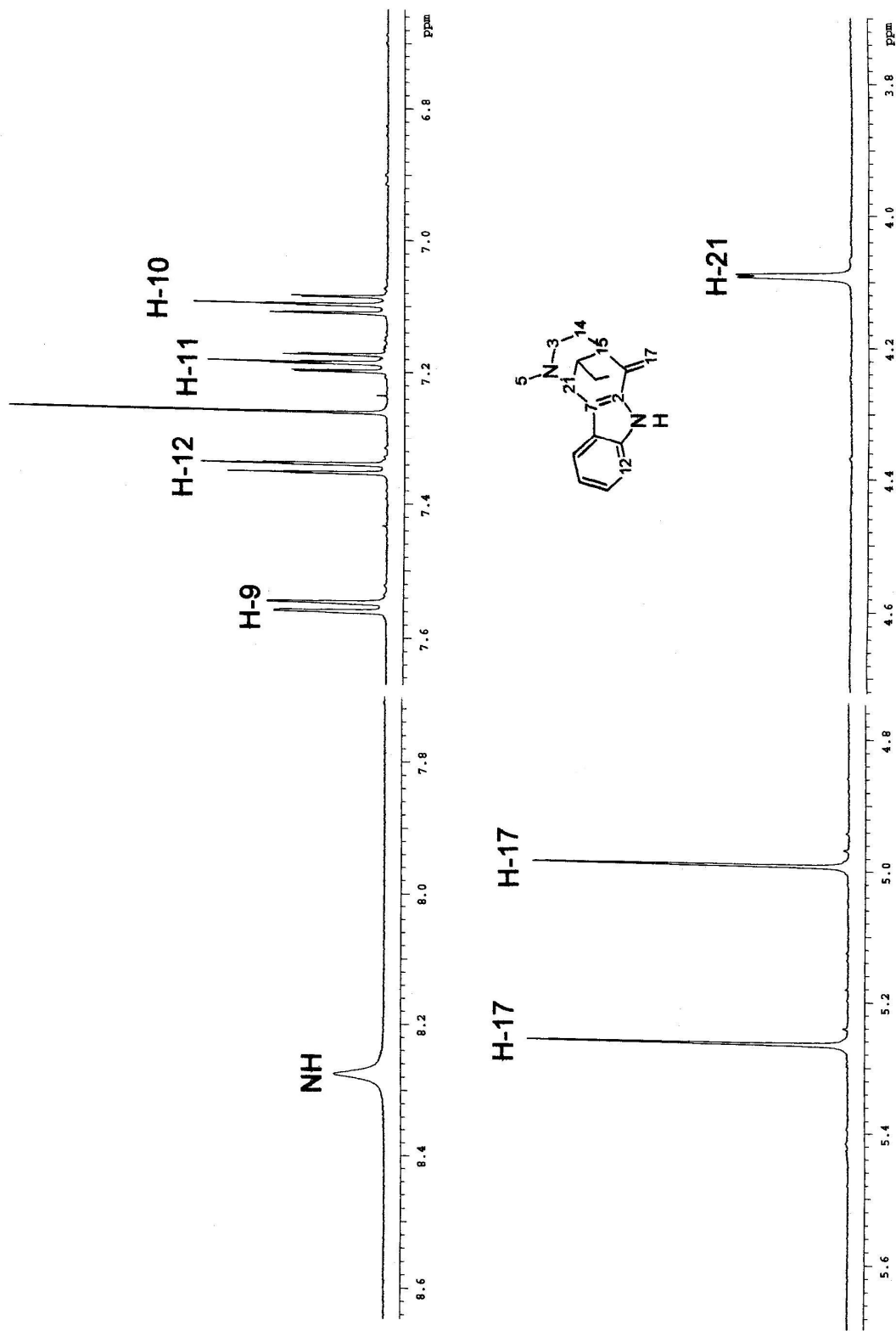
$^1\text{H}$ ( $\delta$ , sinal, multiplicidade ( $J$ ))	França (2000) <sup>42</sup> 400 MHz
NH (8,28; <i>s</i> )	NH (9,0, <i>s</i> )
H-9 (7,56; <i>d</i> , $J = 8,0$ Hz)	H-9 (7,49; <i>dd</i> , $J = 8,1$ Hz)
H-12 (7,35; <i>d</i> , $J = 8,0$ Hz)	H-12 (7,46; <i>dd</i> , $J = 8,1$ Hz)
H-11 (7,19, <i>dt</i> , $J = 7,8$ e 1,1 Hz)	H-11 (7,26, <i>t</i> , $J = 7,37$ Hz)
H-10 (7,10; <i>dt</i> , $J = 7,8$ e 1,1 Hz)	H-10 (7,18, <i>t</i> , $J = 7,37$ Hz)
H-17 (5,26; <i>s</i> )	H-17 (5,59; <i>s</i> )
H-17 (4,98; <i>s</i> )	H-17 (5,21; <i>s</i> )
H-21 (4,09; <i>d</i> , $J = 2,5$ Hz)	H-21 (4,55, <i>d</i> , $J = 1,51$ Hz)
H-20 (2,68; <i>d</i> ; $J = 2,8$ Hz)	H-20 (2,99, <i>dl</i> , $J = 6,9$ Hz)
H-3a (2,46-2,48, <i>m</i> , $J = 2,5$ e 8,2 Hz)	H-15 (2,82, <i>d</i> , $J = 1,51$ Hz)
3H-5 (2,29, <i>s</i> )	H-3 (2,67, <i>dl</i> )
H-3b, H15, H14a (2,09-2,06; <i>m</i> )	$\text{CH}_3\text{-N}$ (2,59, <i>s</i> )
H-14b (1,66-1,72, <i>m</i> )	H-14 (2,52; <i>d</i> , $J = 8,47$ Hz)
2H-19 (1,12, <i>q</i> ; $J = 7,4$ Hz)	H-3 (1,80; <i>dl</i> , 9,4 Hz)
3H-18 (0,85; <i>t</i> , $J = 7,4$ Hz)	H-14 (1,27; <i>s</i> )
	2H-19 (1,15; <i>q</i> ; $J = 7,4$ Hz)
	3H-18 (0,88; <i>t</i> , $J = 7,4$ Hz)



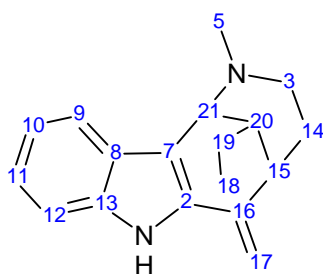
Espectro 10 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H de HL-4 (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



**Espectro 11** – Expansão da região de 0,0 a 2,7 ppm do espectro de RMN <sup>1</sup>H de HL-4 (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

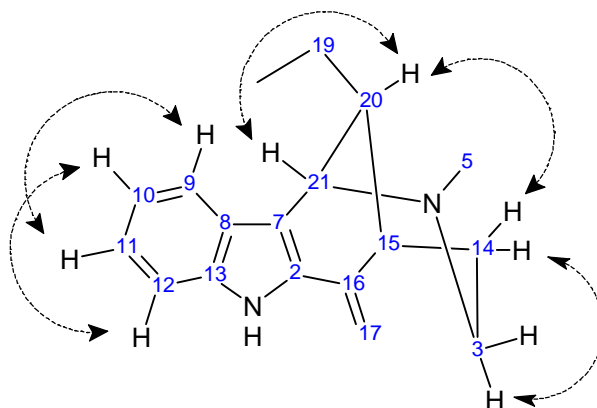


**Espectro 12** – Expansões das regiões de 7,0 a 8,4 ppm, e de 4,0 a 5,4 ppm do espectro de RMN <sup>1</sup>H de HL-4 (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



No espectro de COSY (Espectro 15), as correlações indicaram duas porções, uma região menos blindada com as seguintes correlações: H-12/H11 (fraco; 7,35 ppm – 7,19 ppm), H-12/H-10 (7,35 ppm – 7,10 ppm), H-9/H-11 (7,56 ppm – 7,19 ppm), H-9/H-10 (fraco; 7,56 ppm – 7,10 ppm), H-11/H-10 (7,19 ppm – 7,10 ppm) indicando a presença do fragmento aromático –CH=CH-CH=CH- com padrão de substituição *orto*.

Em região mais blindada puderam ser evidenciadas pelo menos cinco correlações H-21/H-20 (fraco; 4,09 ppm - 2,68 ppm) e H-20/H-14b (fraco, 2,68 ppm - 1,69 ppm); H-3a/H-14b (2,48 ppm - 1,69 ppm), H-19/H-18 (1,12 ppm - 0,85 ppm) pertencente ao grupo etila terminal.



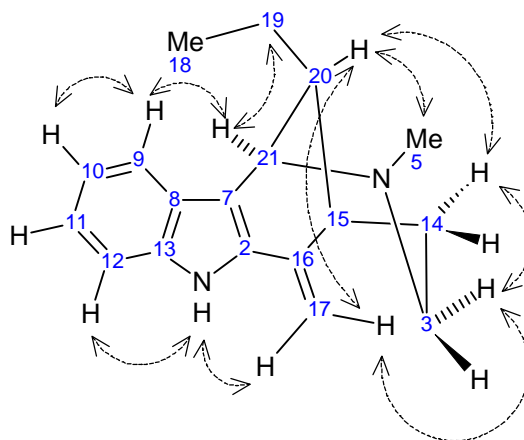
**Figura 8** – Algumas correlações do espectro COSY da uleína (6).

No espectro de NOESY (Espectro 18) foi possível observar as correlações no espaço entre os seguintes hidrogênios:  $N_aH$  /H-12, H-9/H-10,  $N_aH$ /H-17 em que pôde-se observar a extensão do cromóforo do anel indólico e H-9/H-21. Puderam ser observadas também as correlações: H-17/H-17', H-17'/H-3a, H-21/sobreposição, H-21/2H-19, H-21/3H-18, H-20/sobreposição, H-3/sobreposição, H-20/H-14, H-3/H-14, H-20/2H-19, sobreposição/H-14b, H-20/3H-18, sobreposição/2H-19, sobreposição/3H-18, 2H-19/3H-18. Com isso, confirma-se que o grupo etila apresentou-se ligado à C-20 e que a proximidade entre H-20 e H-14 confirmou a configuração de C-20.





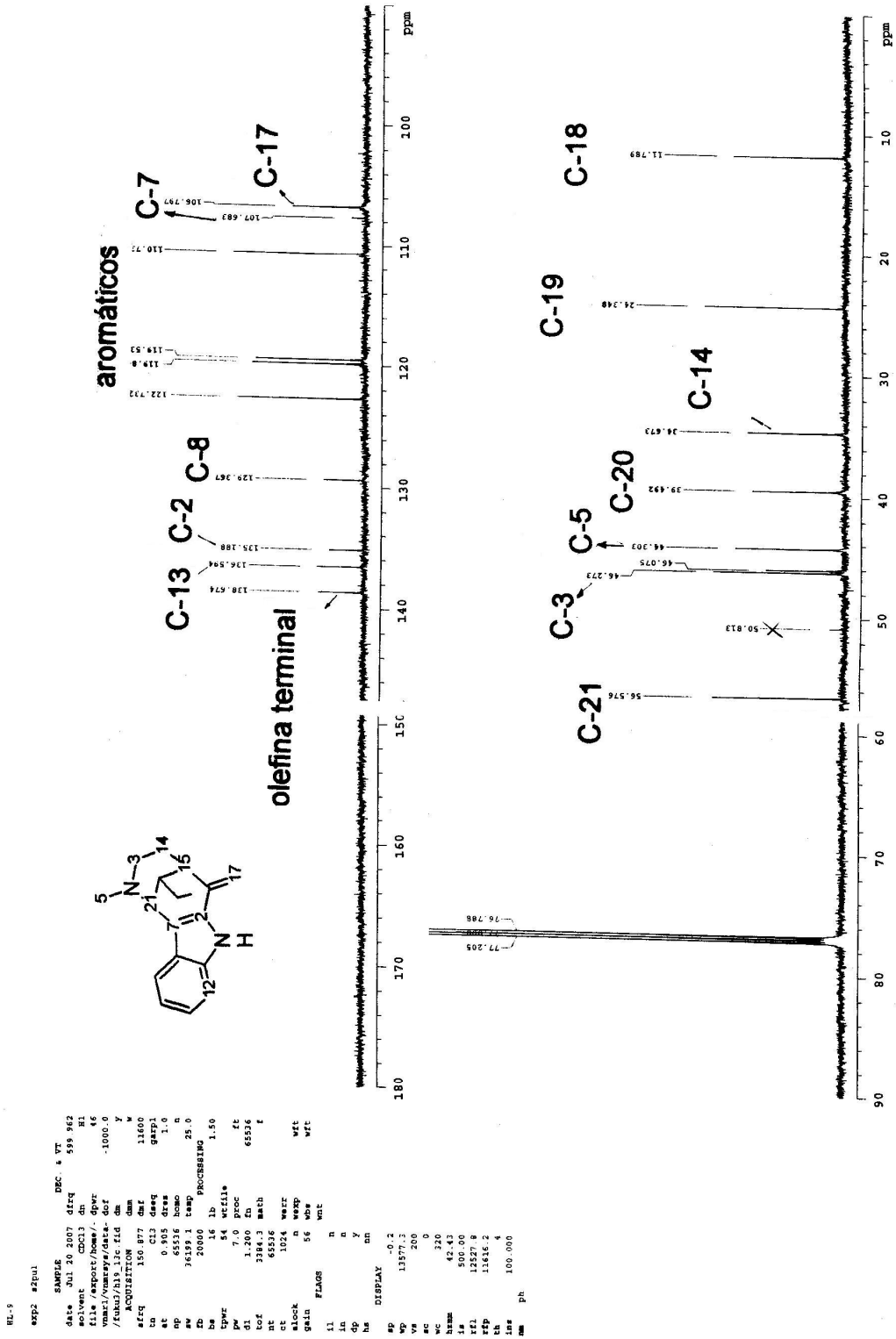




**Figura 9** – Principais correlações do espectro NOESY da uleína (6)

No espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (Espectro 13 – Tabela 9) observou-se a presença de duas porções distintas na molécula. A primeira na região menos blindada, a presença de oito sinais em  $^{13}\text{C}$ , quatro referentes aos carbonos aromáticos C-9 (119,5 ppm), C-10 (119,9 ppm), C-11 (122,7 ppm) e C-12 (110,7 ppm), além de outros cinco referentes a carbonos não-hidrogenados C-16 (138,7 ppm), C-2 (135,2 ppm), C-7 (107,7 ppm), C-8 (129,4 ppm) e C-13 (136,6 ppm).<sup>61</sup>

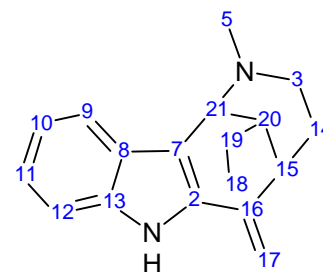
Pôde-se observar também o pico, em região de olefinas, referente a C-17 (106,8 ppm), do carbono do grupo metileno terminal. Também observou-se a presença de outros sinais: três referentes aos três carbonos: C-21 (56,6 ppm), C-15 (39,5 ppm), C-20 (46,1 ppm), e os outros sinais dos carbonos adjacentes ao  $N_b$ : C-3 (46,2 ppm) e C-5 (44,3 ppm), além de dos sinais de C-14 (34,7 ppm) e da etila terminal C-19 (24,4 ppm), C-18 (11,8 ppm), em conformidade com os resultados encontrados na literatura.<sup>61</sup>



Espectro 15 – Espectro RMN <sup>13</sup>C de HL-4 (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

**Tabela 9** – Dados do Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) de HL-4.

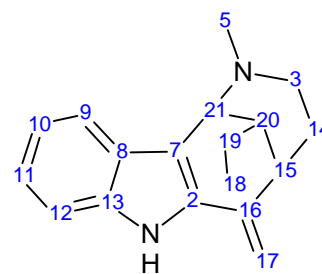
$^{13}\text{C}$	$\delta$	Cordell(1983) <sup>85</sup>
C-16	138,7	138,7
C-13	136,6	136,8
C-2	135,2	135,5
C-8	129,4	129,3
C-11	122,7	122,4
C-10	119,9	119,6
C-9	119,5	119,3
C-12	110,7	110,8
C-7	107,7	110,8
C-17	106,8	106,9
C-21	56,6	56,6
C-3	46,2	46,2
C-20	46,1	45,8
C-5	44,3	44,1
C-15	39,5	39,4
C-14	34,7	34,5
C-19	24,4	24,2
C-18	11,8	11,6



No espectro de DEPT (Espectro 14 – Tabela 10), observaram-se sinais da presença de dois grupos metila (11,8 ppm e 44,3 ppm), quatro metilenos (106,8 ppm, 46,3 ppm, 34,7 ppm e 24,4 ppm), sete metinos (122,7 ppm ; 119,9 ppm; 119,5 ppm; 110,7 ppm; 56,6 ppm; 46,1 ppm e 39,5 ppm).(comentar sobre região de sobreposição)

**Tabela 10** – Dados do espectro de DEPT (RMN- $^{13}\text{C}$  150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de HL-4.

Carbonos	$\delta$	
C-11	122,7	CH
C-10	119,9	CH
C-9	119,5	CH
C-12	110,7	CH
C-17	106,8	$\text{CH}_2$
C-21	56,6	CH
C-3	46,3	$\text{CH}_2$
C-20	46,1	CH
C-5	44,3	$\text{CH}_3$
C-15	39,5	CH
C-14	34,7	$\text{CH}_2$
C-19	24,4	$\text{CH}_2$
C-18	11,8	$\text{CH}_3$





Espectro 16 – Espectro de DEPT de HL-4 (RMN <sup>13</sup>C 150 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

No espectro de HMQC (Espectro 16), pôde-se verificar o acoplamento dos respectivos carbonos e hidrogênios na região menos blindada, em comparação aos espectros unidimensionais (Espectros 10, 11, 12 e 13) além de se distinguir as sobreposições na região entre 2,68 ppm e 1,69 ppm do espectro do hidrogênio, uma vez que o sinal de C-20 (46,1 ppm) apresentou-se associado ao sinal de H-20 em 2,68 ppm; o sinal de C-3 (46,2 ppm) apresentou-se associado aos sinais dois átomos de H-3a e H-3b em 2,46-2,48 ppm e 2,09-2,06 ppm, o sinal de C-15 (39,5 ppm) apresentou-se associado ao sinal do átomo de H-15 em 2,09-2,06 ppm e o sinal de C-14 (34,7 ppm) associado aos sinais de H-14a (2,09-2,06 ppm) e H-14b (1,66-1,72 ppm).

No espectro de HMBC (Espectro 17), pôde-se evidenciar as correlações do anel indólico através das correlações H-9/C-8, H-12/C-13, H-21/C-7 e H-17a/C-2.

O sistema azabíciclo, bem como a forma como se liga ao anel indólico pode ser observados pelas correlações seguintes: H-21/C-7, H-17/C-16, H-14/C-3, H-3/C-21, 3H-5/C-3, 3H-5/C-21, H-20/C-15, H-20/C-21, de modo que CH<sub>3</sub>-N está posicionado entre C-21 e C-3. Curiosamente a forma como o grupo etila liga-se ao sistema azabíciclo, não pode ser evidenciado por este espectro.

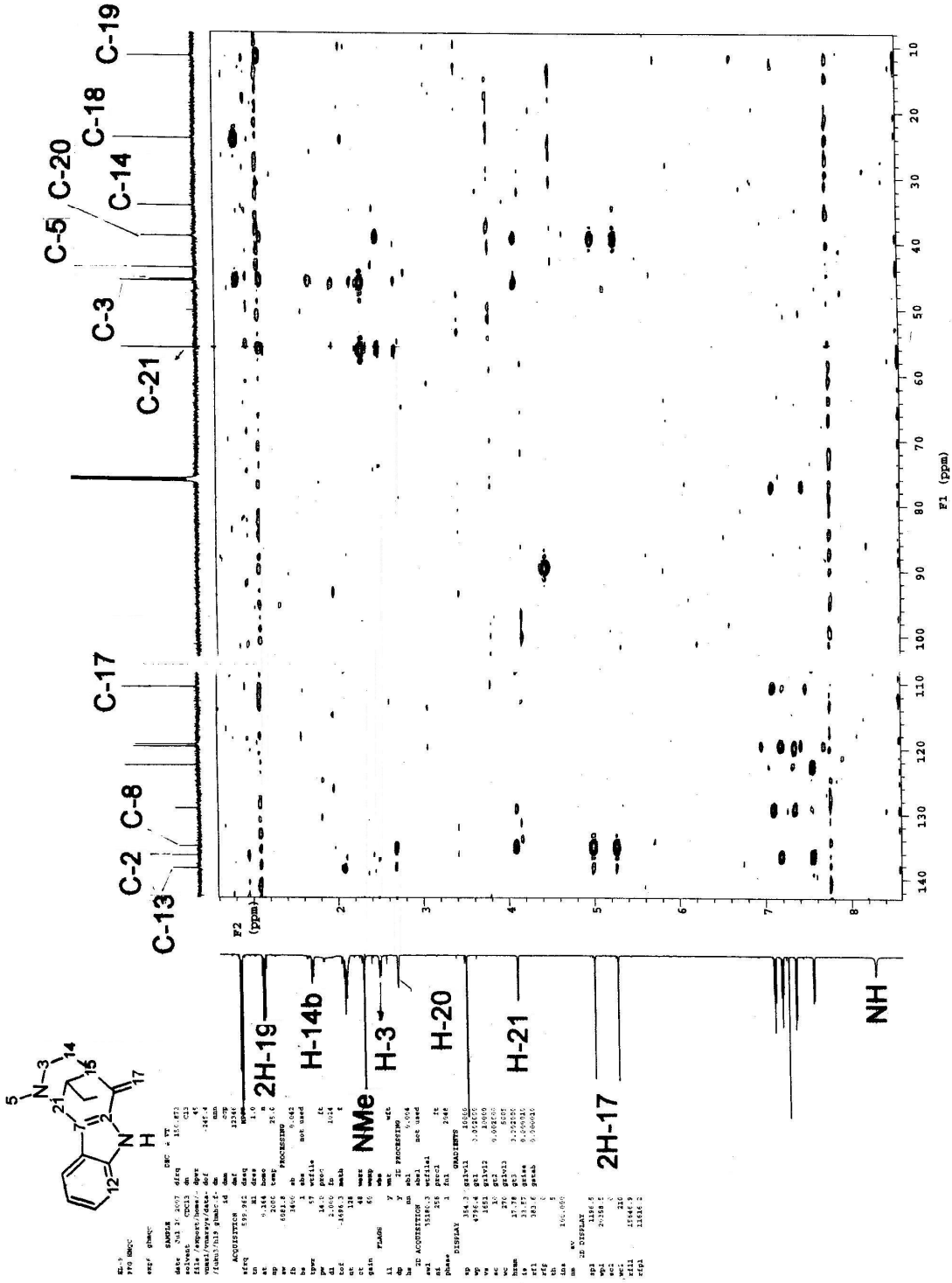
Apesar das sobreposições dos sinais referentes a H-3b, H-14a e H-15, pôde-se deduzir dois fragmentos, o primeiro sendo -CH-CH-CH- (C-15/C-20/C-21), e o segundo -CH<sub>2</sub>=C-CH- referente a (C-17/C-16/C-15).

Sabendo-se que C-21 está ligado a C-2, e como C-17 apresentou-se na forma hibridizada sp<sup>2</sup> (Tabela 10), então supõe-se que o fragmento C-17/C-16/C-15 está ligado ao núcleo indólico por C-16.

Como C-20 apresentou-se apenas com um átomo de hidrogênio, (Tabela 10) supõe-se que o radical etila estivesse ligado ao esqueleto na forma seguinte C-18/C-19/C-20

Assim, por critério de exclusão, a presença de C-14 (dois átomos de hidrogênio no estado de hibridização sp<sup>3</sup>, Tabela 10) só poderia estar entre C-3 e C-15.

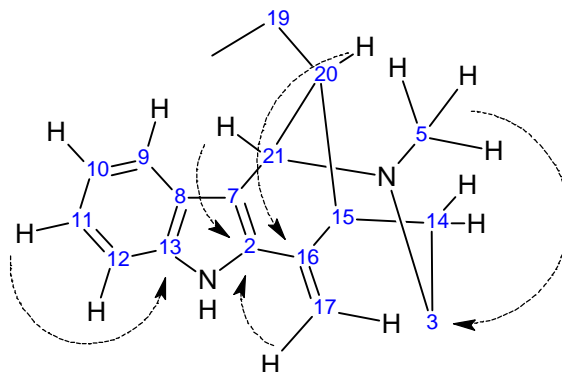




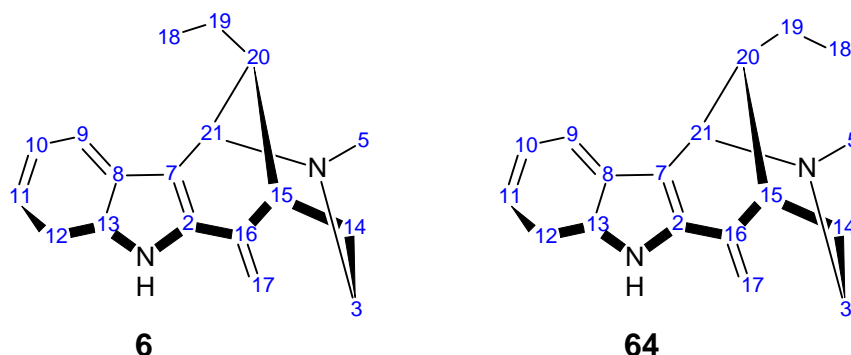
Espectro 18 - Espectro de correlação heteronuclear HMQC de HL-4 (<sup>1</sup>H 600 MHz/ <sup>13</sup>C 150 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

**Tabela 11** – Correlações Carbono - Hidrogênio do espectro de HMBC de HL-4

Hidrogênio	Carbonos correlacionados (H → C)
H-3	C-21, C-20, C-15(fraco), C-14 (fraco)
H-3'	sobrepostos
3H-5	C-21, C-3
H-9	C-8, C-11 (fraco), C-10
H-10	C-8, C-12
H-11	C-13, C-9, C-12
H-12	C-13, C-11
H-14	C-3
H-14'	sobrepostos
H-15	sobrepostos
H-17	C-16, C-2, C-20, C-14 (fraco)
H-17'	C-16, C-2, C-20
3H-18	C-3, C-19
2H-19	C-18, C-14 (fraco), C-21
H-20	C-16, C-17, C-21, C-15
H-21	C-2, C-7, C-3, C-20

**Figura 10** – Principais correlações do espectro HMBC da uleína (**6**).

Para diferenciar entre os isômeros uleína (**6**) e *epi*-uleína (**64**) utilizaram-se as distinções em relação às propriedades físicas (p.f., solvente de cristalização) entre os dois, já que não há dados até o momento de solvente de cristalização e, portanto, nem ponto de fusão para a *epi*-uleína (**64**).



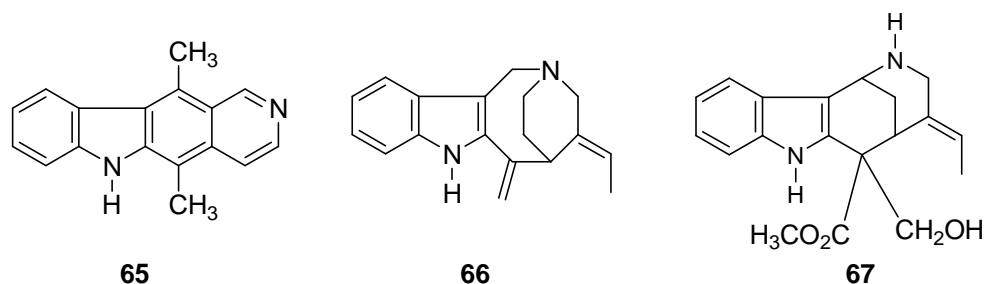


Ocorrem também distinções entre os espectros de RMN-<sup>1</sup>H das duas espécies, já que na uleína (**6**) o sinal referente a 3H-18 está localizado em 0,85 ppm e da *epi*-uleína (**64**) o sinal está localizado em 1,88 ppm, devido à presença e ausência, respectivamente, de blindagem dos elétrons  $\pi$  do anel indólico.<sup>61</sup>

Ainda foi possível evidenciar a proximidade espacial entre os núcleos H-20 e H-14 na estrutura da uleína (**6**) no espectro de NOESY.

Diversos trabalhos que relatam o isolamento deste alcalóide apresentaram dados que auxiliaram a sua identificação, mas os mesmos apresentam divergências desde seu ponto de fusão até a determinação dos sinais dos espectros de RMN.<sup>73</sup> Uma provável justificativa para essa divergência de dados pode ser atribuída ao grau de purificação da substância, incluindo desde produtos de degradação, outros isômeros e resíduo de solvente de recristalização. Dessa forma, apesar de ser um composto bastante conhecido pelo grupo de Pesquisa em Farmacognosia da UFPR, pretende-se aqui, baseado na pureza dos cristais e nos espectros agora obtidos, sugerir dados definitivos para a identificação da uleína.

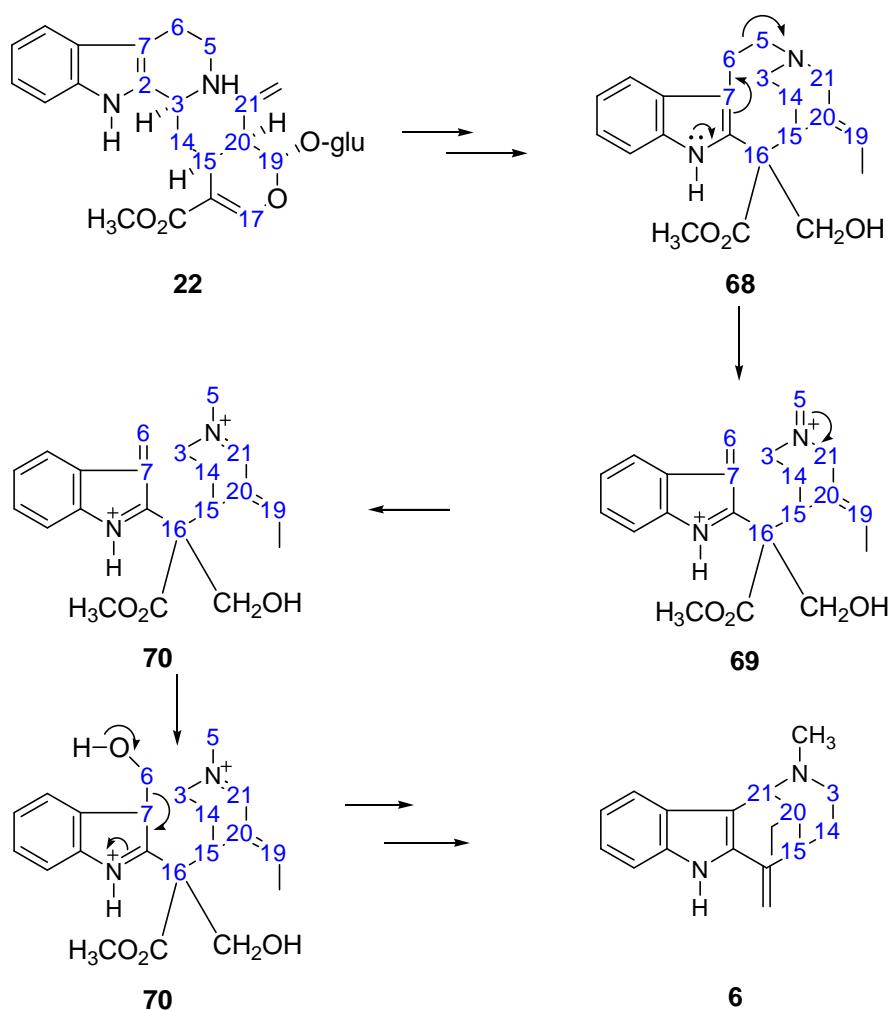
A uleína foi isolada pela primeira vez das cascas de *Aspidosperma ulei* Markgr, e também é encontrada em várias espécies do gênero *Aspidosperma* da família Apocynaceae.<sup>76</sup> Sua importância do ponto de vista de produto de origem natural, reside no elo entre as outras estruturas em estados de oxidação mais reduzidos e as mais oxidadas na série homóloga das bases condilocarpina, além disso observa-se semelhanças com as estruturas da elipticina (**65**), aparicina (**66**) e vallesamina (**67**).<sup>61</sup>



Nessas estruturas observa-se a presença do anel indólico, bem como a ausência de uma ponte C-5/C-6 triptamina, porém, nos casos da aparicina (**66**) e da vallesamina (**67**) há também a presença de biclos heterocíclicos de oito (**66**) e nove (**67**) membros. Outra característica daqueles são os substituintes metileno terminais.

Uma proposta não comprovada experimentalmente para a biossíntese desse alcalóide<sup>61,64</sup> pode ocorrer primeiramente com a formação do intermediário estemadenina (**68**) a partir da strictosidina (**22**). A estemadenina, então, sofreria quebra da ligação C-5/C-6 com rearranjo eletrônico para formar o intermediário **69**. A seguir ocorre rearranjo eletrônico formando **70**, seguido de oxidação do grupo metileno em C-6 a álcool primário para formar **71** (Esquema 10).

Com a perda do grupo CH<sub>2</sub>OH e rearranjo eletrônico de **71**, voltaria-se a formar o anel indólico. Por fim de alguma forma ocorreria ciclização com formação da ligação C-21/C-7, gerando a estrutura bicíclica da uleína (**6**), mas sem a ponte C-5/C-6 de seu precursor estemadenina (**68**).



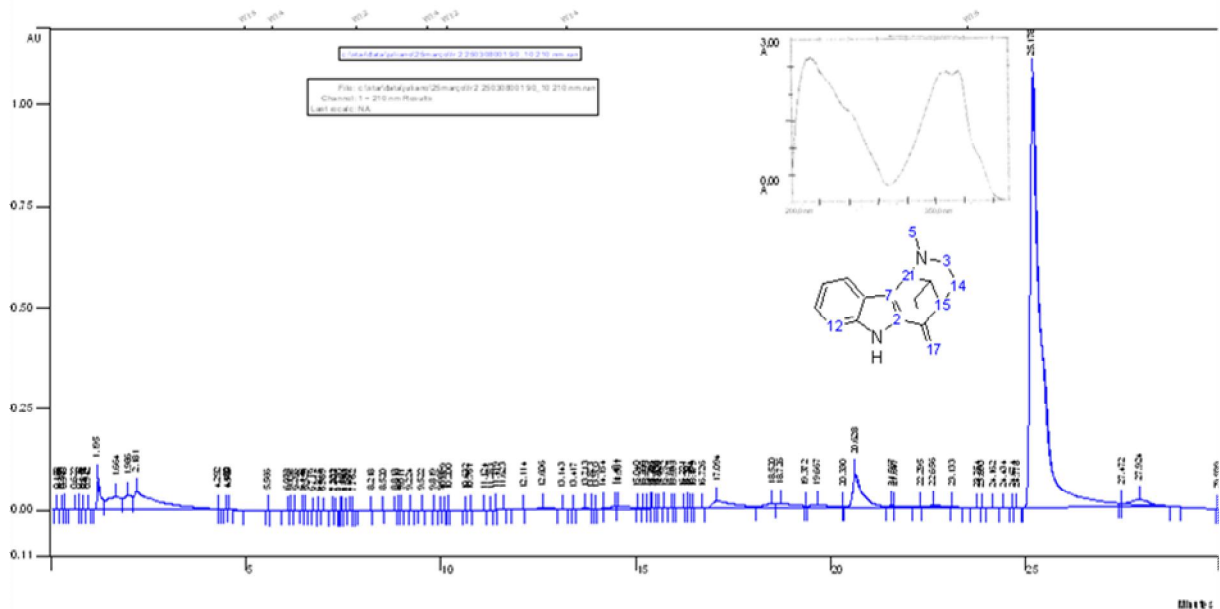
Esquema 11 – Modelo de biossíntese da uleína segundo Cordell.<sup>61, 64</sup>

## CLAE

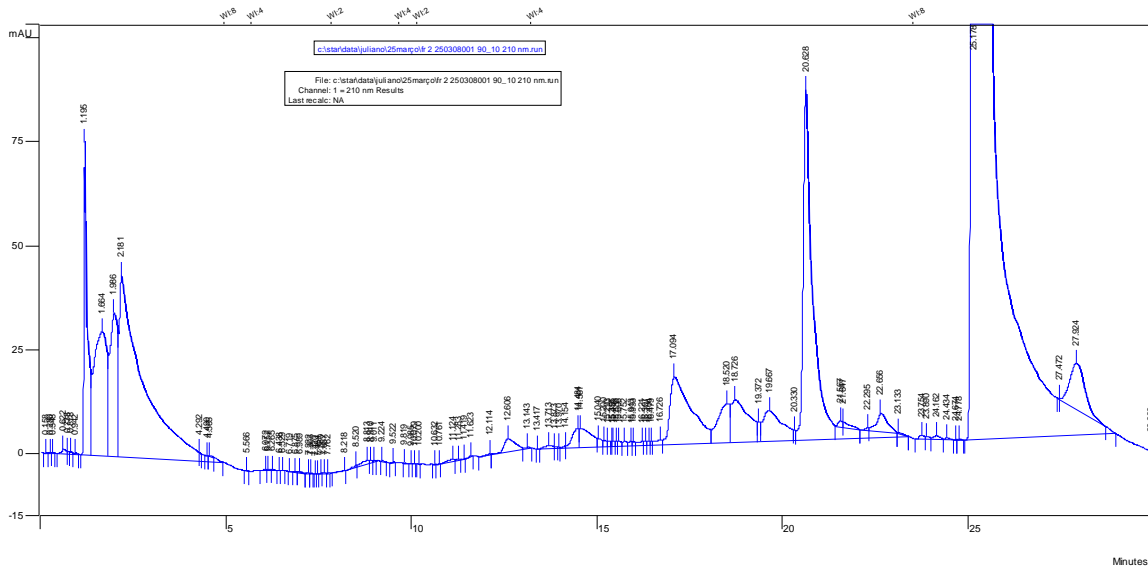
Através do espectro de UV da FC, em MeOH, obteve-se quatro bandas de absorção: 210 nm, 233 nm, 307 nm e 316 nm.

Com o intuito de analisar os alcalóides presentes na FC foi adotado o comprimento de onda de 210 nm, sendo que foi possível observar apenas um sinal de grande intensidade (Figuras 12). Com a respectiva expansão do cromatograma de FC (Figura 13) pôde-se observar a presença de outros sinais de menor intensidade.

Num primeiro momento, entre 0 e 7 min, por tratar-se de eluição em fase reversa, observou-se a eluição dos compostos mais polares da fração. Com o decorrer da análise foram eluídos outros compostos de baixa intensidade neste comprimento de onda, além de outros dois sinais em 20, 628 min e em 25,178 min, sendo que esses dois seriam de menor polaridade em relação aos demais compostos eluídos.



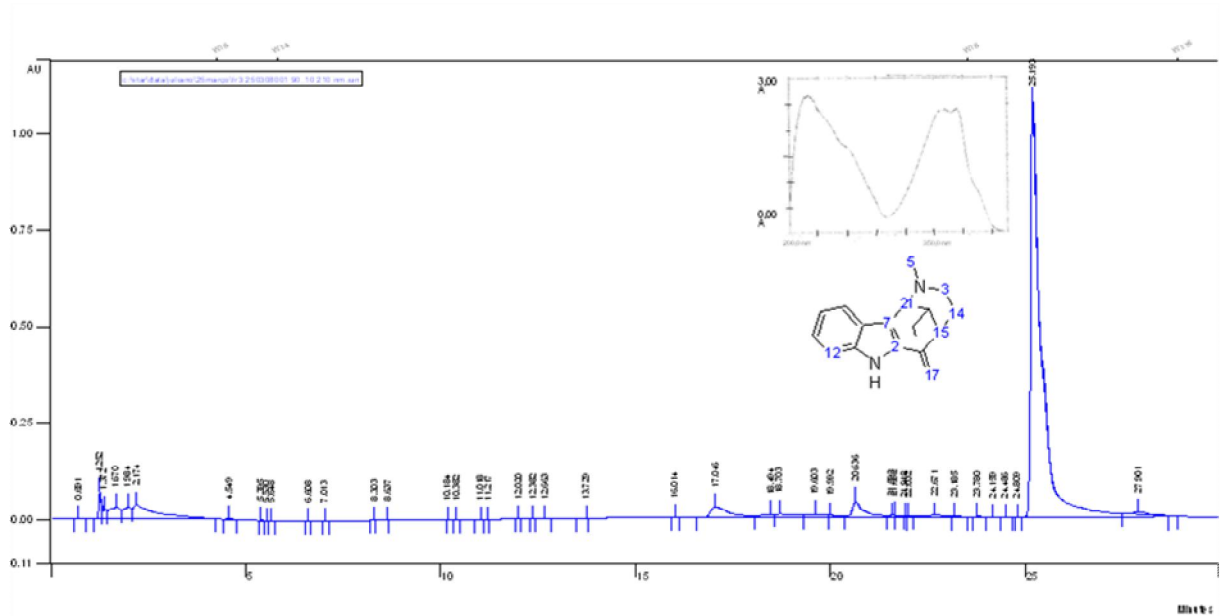
**Figura 11** – Cromatograma de FC por CLAE. FE: Microsorb C18; 150 mm x 4,6 mm. FM: eluente A ( $H_3PO_4$  0,05 %), eluente C (MeCN); FM: A 90 % - C 10 % em 0 min, A 75 % - C 25 % em 7 min, A 10 % - C 90 % em 25 min continuando com eluição isocrática até 30 min. Amostra: FC; 50  $\mu\text{g/ml}$ . *loop*: 10  $\mu\text{l}$ . Vazão: 0,8 ml/min. detecção: UV em 210 nm.



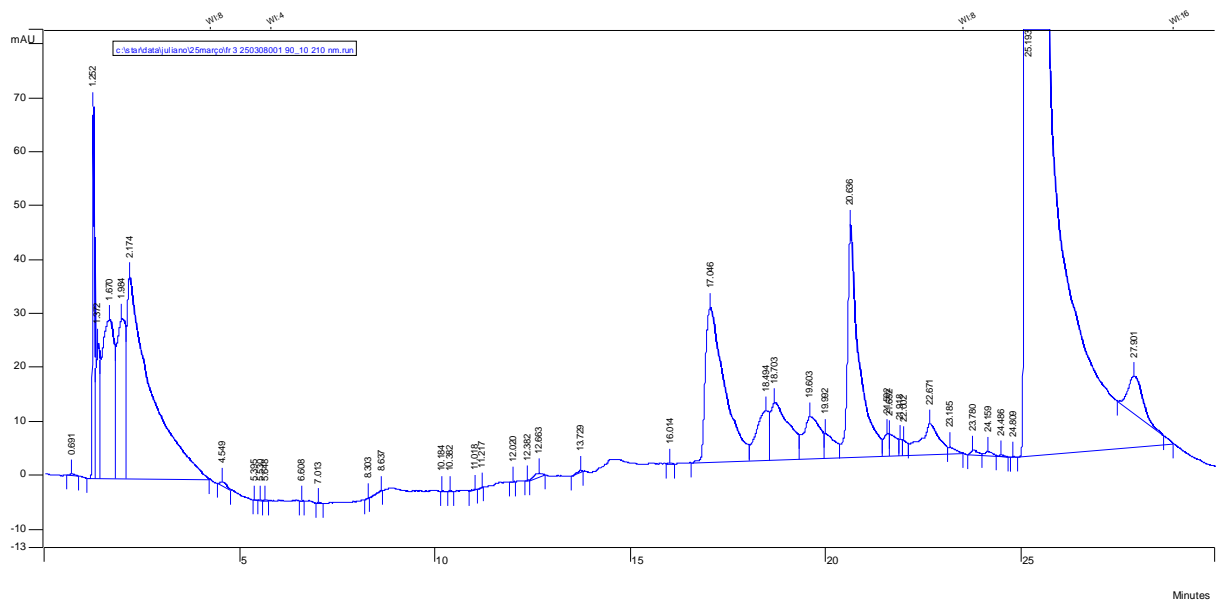
**Figura 12** – Expansão da Figura 11. Cromatograma de FC por CLAE. FE: Microsorb C18; 150 mm x 4,6 mm. FM: eluente A ( $\text{H}_3\text{PO}_4$  0,05 %), eluente C (MeCN); FM: A 90 % - C 10 % em 0 min, A 75 % - C 25 % em 7 min, A 10 % - C 90 % em 25 min continuando com eluição isocrática até 30 min. Amostra: FC; 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . *loop*: 10  $\mu\text{l}$ . Vazão: 0,8 ml/min. detecção: UV em 210 nm.

Na análise cromatográfica de HL-4 (Figuras 13 e 14) pôde-se observar que o pico responsável pelo alcalóide isolado possuía tempo de retenção de 25,193 min, logo, em comparação com os tempos de retenção dos cromatogramas de FC, tratava-se de uma substância menos polar que a maioria dos compostos eluídos por tratar-se de cromatografia com eluição em fase reversa. O perfil cromatográfico também mostrou-se semelhante ao de FC por apresentar impurezas mais polares.

Pode-se sugerir, para futuras análises cromatográficas desse material, algum tipo de modificador de fase móvel (ex. ácido hexanosulfônico) que possa diminuir a afinidade dos sinais encontrados nos cinco minutos iniciais, levando a menor alargamento dos picos. Além disso, pode-se diminuir o ruído presente na linha de base (*baseline drift*) alterando-se o comprimento de onda para 230 nm (dados não apresentados), porém com comprometimento das intensidades de todos os sinais do cromatograma.



**Figura 13** – Cromatograma de HL-4 por CLAE. FE: Microsorb C18; 150 mm x 4,6 mm. FM: eluente A ( $\text{H}_3\text{PO}_4$  0,05 %), eluente C (MeCN); FM: A 90 % - C 10 % em 0 min, A 75 % - C 25 % em 7 min, A 10 % - C 90 % em 25 min continuando com eluição isocrática até 30 min. Amostra: HL-4; 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . *loop*: 10  $\mu\text{l}$ . Vazão: 0,8 ml/min. detecção: UV em 210 nm.



**Figura 14** – Expansão de Figura 13. FE: Microsorb C18; 150 mm x 4,6 mm. FM: eluente A ( $\text{H}_3\text{PO}_4$  0,05 %), eluente C (MeCN); FM: A 90 % - C 10 % em 0 min, A 75 % - C 25 % em 7 min, A 10 % - C 90 % em 25 min continuando com eluição isocrática até 30 min. Amostra: HL-4; 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . *loop*: 10  $\mu\text{l}$ . Vazão: 0,8 ml/min. detecção: UV em 210 nm.

## **CONCLUSÃO**

Foram isolados e identificados dois alcalóides indólicos, ioimbina e uleína, sendo o primeiro isolado pela primeira vez no gênero *Himatanthus*. Em relação à uleína, dados da literatura apresentavam divergências quanto à sua identificação e, em função da pureza do alcalóide e a alta resolução dos espectros obtidos, foi possível identificar este alcalóide. Além de separação destes dois constituintes na fração clorofórmica, foi obtido um perfil cromatográfico desta fração.

O isolamento dos demais alcalóides presentes nesta droga é um desafio para os trabalhos futuros deste grupo de pesquisa, uma vez que diversos métodos foram testados e que demonstravam a dificuldade da separação em função da proximidade dos seus coeficientes de retenção em cromatografia em camada delgada e em cromatografia de coluna.

A droga vegetal apresenta-se promissora para estudos futuros devido à sua ampla comercialização em produtos fitoterápicos e ações biológicas diversas descritas na literatura popular. A presença de outros alcalóides e de compostos hidrossolúveis ainda não identificados mostram-se promissores frente a ensaios biológicos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sullivan, R. J.; Hagen, E. H., Psychotropic substance-seeking: evolutionary pathology or adaptation? *Addiction* 2002, 97, (4), 389-400.
2. Bisset, N. G., Arrow and dart poisons. *J Ethnopharmacol* 1989, 25, (1), 1-41.
3. Bisset, N. G., One man's poison, another man's medicine? *J Ethnopharmacol* 1991, 32, (1-3), 71-81.
4. Neuwinger, H. D., Alkaloids in arrow poisons. In *Alkaloids : biochemistry, ecology, and medicinal applications*, Plenum Press: New York, 1998.
5. Prance, S. G. T., Ethnobotany and Ethnomedicine of the Amazonian Indians. In *Handbook of medicinal plants*, Food Products Press : Haworth Medical Press: New York, 2005; 139-153.
6. Schultes, R. E.; Hofmann, A.; Røtsch, C., *Plants of the gods : their sacred, healing, and hallucinogenic powers*. Rev. and expanded ed.; Healing Arts Press: Rochester, Vt., 2001; 208.
7. Kutalek, R.; Prinz, A., African medicinal plants. in food products press : Haworth Medical Press: New York, 2005; 97-124.
8. Fabricant, D. S.; Farnsworth, N. R., The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environ Health Perspect* 2001, 109 Suppl 1, 69-75.
9. Solecki, R. S., Shanidar IV, a Neanderthal flower burial in northern Iraq. *Science* 1975, 190, (28), 880-881.
10. Gibbons, A., Plants of the apes. *Science* 1992, 255, (5047), 921.
11. Huffman, M. A., Animal self-medication and ethno-medicine: exploration and exploitation of the medicinal properties of plants. *Proc Nutr Soc* 2003, 62, (2), 371-81.
12. de Pasquale, A., Pharmacognosy: the oldest modern science. *J Ethnopharmacol* 1984, 11, (1), 1-16.
13. Parsche, F.; Balabanova, S.; Pirsig, W., Drugs in ancient populations. *Lancet* 1993, 341, (8843), 503.
14. Brownstein, M. J., A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, 90, (12), 5391-3.
15. A pictorial history of herbs in medicine and pharmacy. *HerbalGram* 1998, 42, 33-47.
16. Morris, K., Celebrating the vegetable kingdom. *Lancet* 1998, 352, (9128), 660.
17. Capasso, L., 5300 years ago, the Ice Man used natural laxatives and antibiotics. *Lancet* 1998, 352, (9143), 1864.
18. De Costa, C., St Anthony's fire and living ligatures: a short history of ergometrine. *Lancet* 2002, 359, (9319), 1768-70.
19. Bruhn, J. G.; De Smet, P. A.; El-Seedi, H. R.; Beck, O., Mescaline use for 5700 years. *Lancet* 2002, 359, (9320), 1866.
20. Farnsworth, N. R.; Akerele, O.; Bingel, A. S.; Soejarto, D. D.; Guo, Z., Medicinal plants in therapy. *Bull World Health Organ* 1985, 63, (6), 965-81.
21. Balandrin, M. F.; Klocke, J. A.; Wurtele, E. S.; Bollinger, W. H., Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. *Science* 1985, 228, (4704), 1154-60.
22. Johnston, B. A., Major diversity loss: 1 in 8 plants in global study threatened. *HerbalGram* 1998, 43, 54.
23. De Smet, P. A. G. M., The role of plant-derived drugs and herbal medicines in healthcare. *Drugs* 1997, 54, (6), 801-840.

24. Clark, A. M., Natural products as a resource for new drugs. *Pharmaceutical Research* 1996, 13, (8), 1133-1141.
25. Cragg, G. M.; Newman, D. J.; Snader, K. M., Natural products in drug discovery and development. *J Nat Prod* 1997, 60, (1), 52-60.
26. Shu, Y. Z., Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. *J Nat Prod* 1998, 61, (8), 1053-71.
27. Newman, D. J.; Cragg, G. M.; Snader, K. M., The influence of natural products upon drug discovery. *Nat Prod Rep* 2000, 17, (3), 215-34.
28. Cragg, G. M.; Newman, D. J., Medicinals for the millennia: the historical record. *Ann N Y Acad Sci* 2001, 953, 3-25.
29. Koehn, F. E.; Carter, G. T., The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2005, 4, (3), 206-20.
30. Barreto, A. D.; De Carvalho, M. G.; Nery, I. d. A.; Kaplan, M. A. C., Chemical constituents from *Himatanthus articulata*. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 1998, 9, (5), 430-4.
31. Perdue, G. P.; Blomster, R. N., South American plants III: Isolation of fulvoplumierin from *Himatanthus sucuuba* (M. Arg.) Woodson (Apocynaceae). *J Pharm Sci* 1978, 67, (9), 1322-3.
32. Endo, Y.; Hayashi, H.; Sato, T.; Maruno, M.; Ohta, T.; Nozoe, S., Confluent acid and 2'-O-methylperlatolic acid, monoamine oxidase B inhibitors in a Brazilian plant, *Himatanthus sucuuba*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1994, 42, (6), 1198-201.
33. Silva, J. R. d. A.; Rezende, C. M.; Pinto, A. C.; Pinheiro, M. L. B.; Cordeiro, M. C.; Tamborini, E.; Young, C. M.; Bolzani, V. d. S., Ésteres triterpênicos de *Himatanthus sucuuba* (Spruce) Woodson. *Quimica Nova* 1998, 21, (6), 702-704.
34. Wood, C. A.; Lee, K.; Vaisberg, A. J.; Kingston, D. G.; Neto, C. C.; Hammond, G. B., A bioactive spiro lactone iridoid and triterpenoids from *Himatanthus sucuuba*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2001, 49, (11), 1477-8.
35. Veloso, M. P.; Nagem, T. J.; De Oliveira, T. T., beta -dihidroplumericinic acid from *Himatanthus phagedaenicus*. *Biochemical Systematics and Ecology* 1999.
36. Abdel-Kader, M. S.; Wisse, J.; Evans, R.; van der Werff, H.; Kingston, D. G., Bioactive iridoids and a new lignan from *Allamanda cathartica* and *Himatanthus fallax* from the Suriname rainforest. *J Nat Prod* 1997, 60, (12), 1294-7.
37. Plumel, M. M., Le genre *Himatanthus* (Apocynaceae) révision taxonomique. *Bradea* 1991, 5, 60-63, 65.
38. Cronquist, A., *The evolution and classification of flowering plants*. 2nd ed.; New York Botanical Garden: Bronx, N.Y., USA, 1988; viii, 555.
39. Joly, A. B., *Botânica: introdução à taxonomia vegetal*. 13 ed.; Companhia Editora Nacional: São Paulo, 2002.
40. Correa, M. P., *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. imprensa Nacional: Rio de Janeiro, 1984; Vol. 01.
41. Di Stasi, L. C.; Hiruma-Lima, C. A., *Plantas medicinais na amazônia e na mata atlântica*. 2 ed.; Unesp: São Paulo, 2002; 379.
42. Franca, O. O.; Brown, R. T.; Santos, C. A., Uleine and demethoxyaspidospermine from the bark of *Plumeria lancifolia*. *Fitoterapia* 2000, 71, (2), 208-10.
43. Rattmann, Y. D.; Terluk, M. R.; Souza, W. M.; Santos, C. A. M.; Biavatti, M. W.; Torres, L. B. H.; Mesia-Vela, S.; Rieck, L.; da Silva-Santos, J. E.; Marques, M. C. D., Effects of alkaloids of *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson,



- Apocynaceae, on smooth muscle responsiveness. *Journal of Ethnopharmacology* 2005, 100, (3), 268-275.
44. Souza, W. M.; Stingen, A. E. M.; Santos, C. A. M., Antimicrobial activity of alkaloidal fraction from barks of *Himatanthus lancifolius*. *Fitoterapia* 2004, 75, (7-8), 750-753.
  45. Baggio, C. H.; Otofujii, G. D.; de Souza, W. M.; Santos, C. A. D.; Torres, L. M. B.; Rieck, L.; Marques, M. C. D.; Mesia-Vela, S., Gastroprotective mechanisms of indole alkaloids from *Himatanthus lancifolius*. *Planta Medica* 2005, 71, (8), 733-738.
  46. Hesse, M., Introduction. In *Alkaloids: nature's curse or blessing?*, Hesse, M., Ed. Verlag Helvetica Chimica Acta ;Wiley-VCH: Zürich; Weinheim; New York, 2002.
  47. Hosztafi, S., The discovery of alkaloids. *Pharmazie* 1997, 52, (7), 546-50.
  48. Correia, C. R. D., *Síntese estereosseletiva de alcalóides e n-heterociclos*. EdUFSCar: São Carlos, 2001; 97.
  49. Farnsworth, N. R., Biological and phytochemical screening of plants. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1966, 55, (3), 225-&.
  50. Bruneton, J., Alcaloides. In *Farmacognosia Fitoquímica Plantas Medicinales*, 2 ed.; Editorial Acribia: Zaragoza, 2001; 778.
  51. Daly, J. W., Marine toxins and nonmarine toxins: convergence or symbiotic organisms? *J Nat Prod* 2004, 67, (8), 1211-5.
  52. Daly, J. W., The chemistry of poisons in amphibian skin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, 92, (1), 9-13.
  53. Evans, W. C., Alkaloids. In *Trease and evans pharmacognosy*, 14 ed.; WB Saunders: London, 1998; 340.
  54. Weldon, P. J., Avian chemical defense: toxic birds not of a feather. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, 97, (24), 12948-9.
  55. Kutchan, T. M., Ecological arsenal and developmental dispatcher. The paradigm of secondary metabolism. *Plant Physiol* 2001, 125, (1), 58-60.
  56. Cordell, G. A.; Quinn-Beattie, M. L.; Farnsworth, N. R., The potential of alkaloids in drug discovery. *Phytother Res* 2001, 15, (3), 183-205.
  57. James, W. O., Alkaloids in the Plant. In *The Alkaloids: chemistry and physiology*, Manske, R. H. F., Ed. Academic Press: New York, London, 1950; Vol. I.
  58. Larson, R. A.; Marley, K. A., Quenching of singlet oxygen by alkaloids and related nitrogen heterocycles. *Phytochemistry* 1984, 23, (10), 2351-2354.
  59. Kutchan, T. M., Alkaloid Biosynthesis\_The Basis for metabolic engineering of medicinal plants. *Plant Cell* 1995, 7, (7), 1059-1070.
  60. Levin, D. A.; York, B. M. J., The toxicity of plant alkaloids: an ecogeographic perspective. *Biochemical Systematics and Ecology* 1978, 6, (1), 61-76.
  61. Cordell, G. A., Alkaloids derived from tryptophan. In *Introduction to alkaloids : a biogenetic approach*, Wiley: New York, 1981.
  62. Verpoorte, R., Pharmacognosy in the new millennium: leadfinding and biotechnology. *J Pharm Pharmacol* 2000, 52, (3), 253-62.
  63. Hegnauer, R., Biochemistry, distribution and taxonomic relevance of higher plant alkaloids. *Phytochemistry* 1988, 27, (8), 2423-2427.
  64. Dewick, P. M., Alkaloids. In *Medicinal Natural Products*, 2 ed.; John Wiley & Sons: Chichester, 2006; pp 346-376.
  65. Bolzani, V. D.; Da Silva, M. F. D. F.; Da Rocha, A. I.; Gottlieb, O. R., Plant chemosystematics and phylogeny. 23. Indole alkaloids as systematic markers of the Apocynaceae. *Biochemical Systematics and Ecology* 1984, 12, (2), 159-166.

66. Snieckus, V., The distribution of indole alkaloids in plants. In *The alkaloids: chemistry and physiology*, Manske, R. H. F., Ed. Academic Press: New York, London, 1968; Vol. XI.
67. Waterman, P. G., Chemical taxonomy of alkaloids. In *Alkaloids : biochemistry, ecology, and medicinal applications*, Plenum Press: New York, 1998.
68. Kompis, I.; Hesse, M.; Schmid, H., Alkaloids .144. Approach to biogenetic classification of indole alkaloids. *Lloydia* 1971, 34, (3), 269-&.
69. Armarego, W. L. F.; Perrin, D. D., *Purification of laboratory chemicals*. 4th ed.; Butterworth Heinemann: Oxford ; Boston, 1996; p xi, 529.
70. Phillipson, J. D.; Bisset, N. G., Artifacts produced by chloroform and methylene dichloride during extraction of amines and alkaloids .1. Quaternization and oxidation of strychnine and brucine during plant extraction. *Phytochemistry* 1972, 11, (8), 2547-2553.
71. Pelletier, S. W.; Chokshi, H. P.; Desai, H. K., Separation of diterpenoid alkaloid mixtures using vacuum liquid-chromatography. *Journal of Natural Products* 1986, 49, (5), 892-900.
72. Gerasimenko, I.; Sheludko, Y.; Unger, M.; Stockigt, J., Development of an efficient system for the separation of indole alkaloids by high performance liquid chromatography and its applications. *Phytochemical Analysis* 2001, 12, (2), 96-103.
73. Manske, R. H. F., Alkaloids of *Pseudocinchona* and *Yohimbe*. In *The Alkaloids. chemistry and physiology*, Manske, R. H. F., Ed. Academic Press: New York, London, 1965; Vol. VIII. The indole alkaloids.
74. Sangster, A. W.; Stuart, K. L., Ultraviolet spectra of alkaloids. *Chemical Reviews* 1965, 65, (1), 69-&.
75. Lemen, J.; Taylor, W. I., A Uniform numbering system for indole alkaloids. *Experientia* 1965, 21, (9), 508-&.
76. Gilbert, B., The alkaloids of *Aspidosperma*, *Diplorrhyncus*, *Kopsia*, *Ochrosia*, *Pleiocarpa*, and related genera In *The Alkaloids. Chemistry and physiology*, Manske, R. H. F., Ed. Academic Press: New York, London, 1965; Vol. VIII. The indole alkaloids
77. Budzikiewicz, H.; Djerassi, C.; Williams, D. H., Tetrahydro-beta-carboline alkaloids. In *Structure elucidation of natural products by mass spectrometry*, Holden-Day: San Francisco, 1964.
78. Clivio, P.; Richard, B.; Deverre, J. R.; Sevenet, T.; Zeches, M.; Lemenoliver, L., Alkaloids from leaves and root bark of *Ervatamia hirta*. *Phytochemistry* 1991, 30, (11), 3785-3792.
79. Wenkert, E.; Chang, C. J.; Chawla, H. P. S.; Cochran, D. W.; Hagaman, E. W.; King, J. C.; Orito, K., General methods of synthesis of indole alkaloids .14. Short routes of construction of yohimboid and ajmalicinoid alkaloid systems and their C-13 Nuclear Magnetic-Resonance spectral analysis. *Journal of the American Chemical Society* 1976, 98, (12), 3645-3655.
80. Wenkert, E.; Leicht, C. L.; Wickberg, B., Stereochemistry of ajmalicine and tetrahydroalstonine. *Journal of the American Chemical Society* 1961, 83, (24), 5037-&.
81. Honty, K.; Baitzgacs, E.; Blasko, G.; Szantay, C., Synthesis of yohimbines .4. Synthesis of (+/-)-3-epi-alpha-yohimbine and (+/-)-3,17-epi-alpha-yohimbine - C-13 Nuclear Magnetic-Resonance investigation of yohimbine stereoisomers. *Journal of Organic Chemistry* 1982, 47, (26), 5111-5114.

82. Goldberg, M. R.; Robertson, D., Yohimbine - a pharmacological probe for study of the alpha-2-adrenoreceptor. *Pharmacological Reviews* 1983, 35, (3), 143-180.
83. Gorny, P. Combinaison d'un antagoniste alpha-adrenergique et d'un agent donneur d'oxide d'azote pour le traitement de dysfonctions sexuelles feminines. WO9940917, 1999.
84. Budzikiewicz, H.; Djerassi, C.; Williams, D. H., Simple indole alkaloids. In *Structure elucidation of natural products by mass spectrometry*, Holden-Day: San Francisco, 1964.
85. Borris, R. P.; Lankin, D. C.; Cordell, G. A., Studies on the uleine alkaloids .1. C-13 nmr-studies on uleine, 20-epiuleine and (4S)-uleine-Nb-oxide. *Journal of Natural Products* 1983, 46, (2), 200-205.
86. Jacome, R. L. R. P.; de Oliveira, A. B.; Raslan, D. S.; Wagner, H., Chemical constituents and chromatographic profile of the stem bark of *Aspidosperma parvifolium* A. DC. ("Pau-pereira"). *Quimica Nova* 2004, 27, (6), 897-900.