

**UNIVERSIDADE FEDERAL
RURAL DO RIO DE JANEIRO**

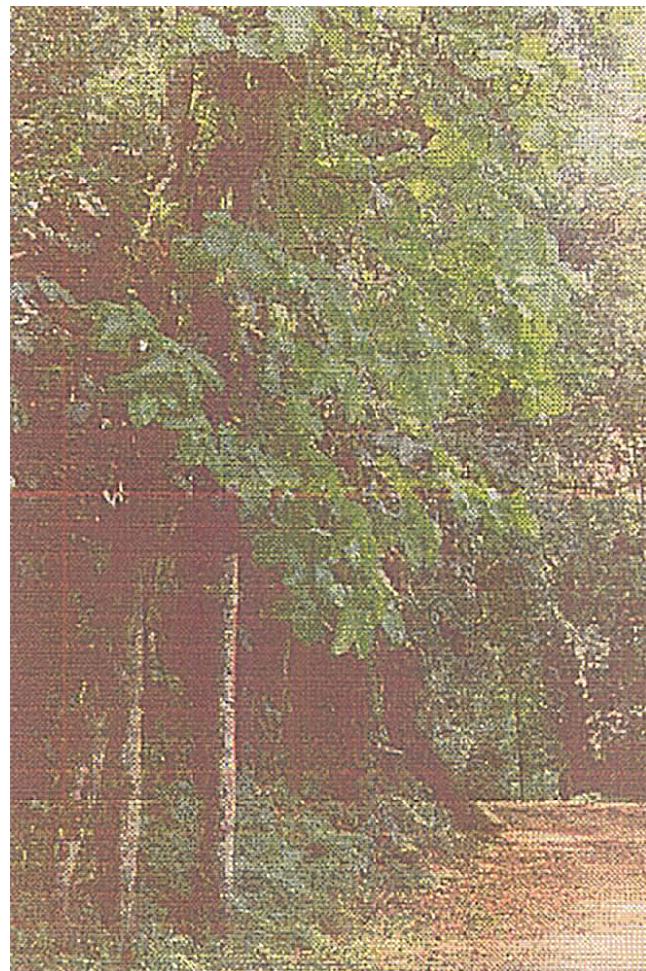
**CONSTITUINTES: QUÍMICOS
ISOLADOS
DAS CASCAS DE
*Simira glaziovii***

**ANA BEATRIZ FARIAS D'OLIVEIRA BASTOS
TESE DE MESTRADO**

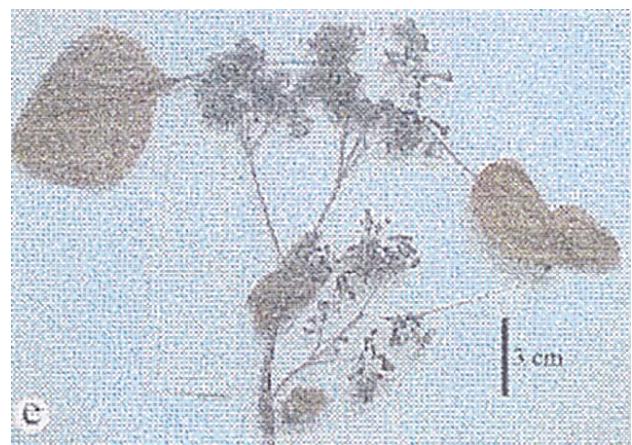
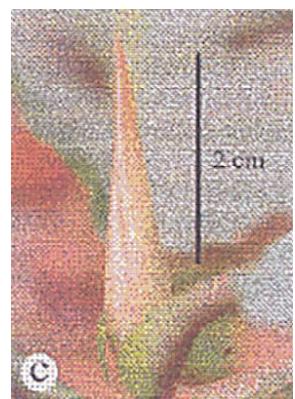
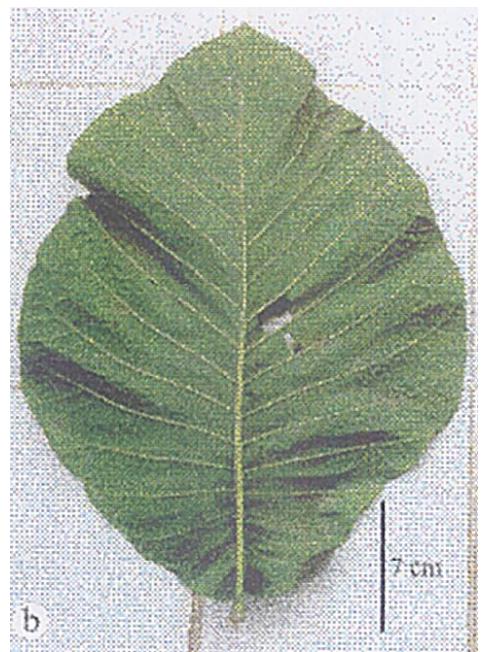
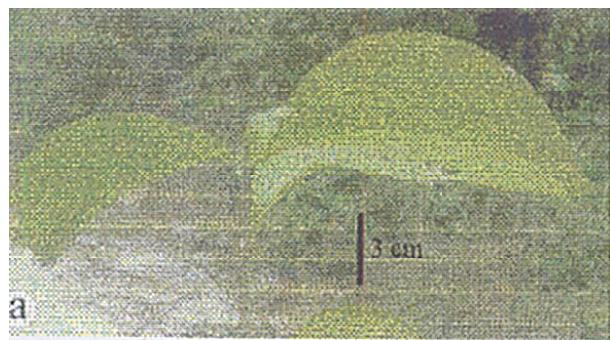
PROFº. DR. MÁRIO GERALDO DE CARVALHO

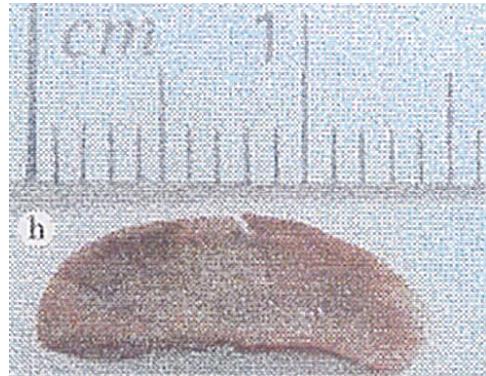
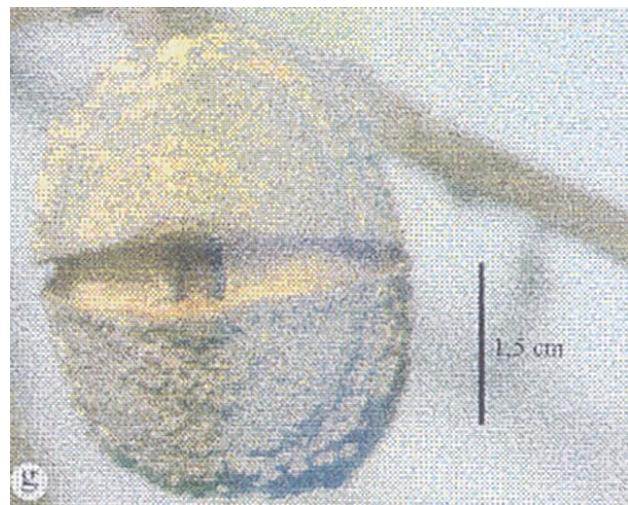
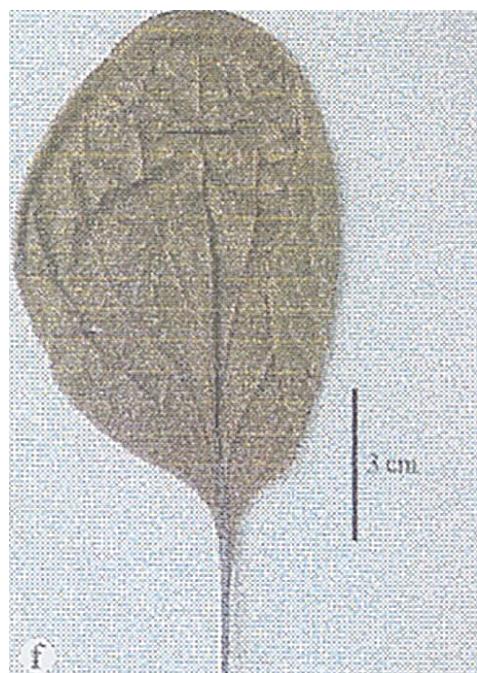
2001

A espécie *Simira glaziovii*.



S. glaziovii: Hábito e corte transversal da madeira.





- a- Ramo;
- b- Folha;
- c- Estípula;
- d- Flor
- e- Inflorescência com calicofilo;
- f- Detalhe do calicofilo;
- g- Fruto;
- h- Semente.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA ORGÂNICA

CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS DAS CASCAS DE

Simira glaziovii (Rubiaceae)

ANA BEATRIZ FARIAZ D'OLIVEIRA BASTOS

Seropédica, Rio de Janeiro

2001

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA ORGÂNICA

CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS DAS CASCAS DE

Simira glaziovii (Rubiaceae)

ANA BEATRIZ FARIAZ D'OLIVEIRA BASTOS

SOB ORIENTAÇÃO DO PROFESSOR

DR. MÁRIO GERALDO DE CARVALHO

Tese submetida como requisito
parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências. Área de
concentração em Química
Orgânica.

Seropédica, Rio de Janeiro

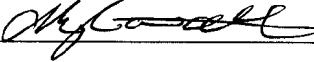
2001

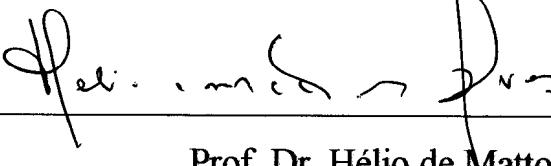
CONSTITUINTES ISOLADOS DAS CASCAS DE

Simira glaziovii (Rubiaceae)

ANA BEATRIZ FARIAS D'OLIVEIRA BASTOS

APROVADO EM: 12 / 02 / 2001.


Prof. Dr. Mário Geraldo de Carvalho
Departamento de Química-UFRRJ
(Orientador)


Prof. Dr. Hélio de Mattos Alves
Departamento de Farmácia-UFRJ


Prof. Dr. Carlos Maurício de Sant'Anna
Departamento de Química-UFRRJ


Prof. Dr. Márcia Cristina Campos de Oliveira
Departamento de Biologia-FEDUC
(Suplente)

*"Em tudo dai graças, porque esta é a vontade de Deus
em Cristo Jesus para convosco."*

Ts. 5:18

AGRADECIMENTOS

A DEUS por tudo.

A Valdete Félix, minha mãe, pelo apoio e dedicação permanente.

Ao Josemar Moura pelo amor, incentivo, compreensão e dedicação.

A todos da minha família que apoiaram o meu crescimento profissional.

Ao Prof. Dr. Mário Geraldo de Carvalho, um exemplo de profissional, pela excelente orientação, dedicação e amizade.

Ao Prof. Dr. Raimundo Braz-Filho, um exemplo de profissional, pela colaboração indispensável, incentivo e amizade.

Ao Prof. Dr. Javier Rincón Velandia pelo incentivo, amizade e colaboração neste trabalho.

Ao botânico Prof. Sebastião José da Silva Neto, do jardim Botânico-RJ (PMA), pela coleta e identificação do material vegetal de *Simira glaziovii*.

A todos os professores pertencentes ao Curso de Pós-graduação em Química Orgânica da UFRRJ.

A todos os funcionários pela convivência amiga e boa vontade nos serviços prestados.

A todos os colegas estudantes do Curso de Pós-graduação em Química Orgânica da UFRRJ pela amizade.

Aos amigos do Laboratório de Química de Produtos Naturais pela união e amizade.

A Patrícia Alexandra de Souza Félix, Michele de Castro Reis e Adriana Machado da Silva, queridas irmãs, pela união e amizade.

As amigas Cássia Alves, Tânia Sarmento e Lucilene Faustina pelo incentivo, pela colaboração e amizade.

A Maria Raquel, Márcia Cristina, Patrícia, Geizi e Rogéria pela amizade e incentivo.

Ao Dr. D. G. Kingston, da Virgínia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, USA, por permitir o uso dos espectômetros de RMN e massas.

A Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pela oportunidade de realizar este trabalho.

A CAPES pela bolsa de estudos.

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1: Elaboração dos extratos das cascas de <i>Simira glaziovii</i>	22
Esquema 2: Fracionamento cromatográfico do extrato hexânico das cascas de <i>Simira glaziovii</i>	23
Esquema 3: Fracionamento cromatográfico de SGCM-11-13	25
Esquema 4: Fracionamento cromotográfico do extrato metanólico das cascas de <i>Simira glaziovii</i>	26
Esquema 5: Marcha para alcalóides. Fracionamento cromatográfico de SGCM-33-35	28
Esquema 6: Fracionamento cromatográfico de SGCM-43-53	29
Esquema 7: Fracionamento cromatográfico de SGCM-54-71	30
Esquema 8: Reação de metilação de 7	31
Esquema 9: Reação de acetilação de 7	33
Esquema 10: Proposta de fragmentação de 7 no espectro de massas usando ionização por FAB	51
Esquema 11: Proposta de fragmentação de 7 no espectro de massas usando ionização por IQ	52
Esquema 12: Proposta para rota biossintética do alcalóide (7)	69
Esquema 13: Biossíntese do alcalóide harmana (6)	70
Esquema 14: Biossíntese dos esteróides (1), (2), (3) e (4)	71

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Algumas espécies do gênero <i>Simira</i>	8
Tabela 2: Classificação botânica de <i>Simira glaziovii</i>	14
Tabela 3: Dados de RMN ^{13}C de (1 + 2) e comparação com dados da literatura	38
Tabela 4: Comparação dos dados de RMN ^{13}C de (3 + 4 + 5) com valores da literatura	42
Tabela 5: Dados de RMN ^1H e ^{13}C de (6) e comparação com dados da literatura	45
Tabela 6: Dados de RMN ^1H e ^{13}C , incluindo 2D (HMBC, HMQC, HOMOCOSY) de (7) em DMSO	53
Tabela 7: Comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C de (7) com valores descritos na literatura em D_2O	54
Tabela 8: Dados de RMN ^1H e ^{13}C , incluindo 2D (HMBC, HMQC, HOMOCOSY) de (7) em D_2O	55
Tabela 9: Comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C de (8) com valores da literatura	58
Tabela 10: Dados de RMN ^1H e ^{13}C de (8a) e comparação com valores da literatura	60

Tabela 11: Dados de RMN ^1H e ^{13}C do produto acetilado	
(9)	63
Tabela 12: Dados de RMN ^1H e ^{13}C do produto acetilado (10)	66
Tabela 13: Resultado da avaliação de toxicidade frente a <i>Artemia salina</i>	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Espectro de RMN ^1H (200 MHz) de SGCH-1 (1 + 2) registrado em CDCl_3	83
Figura 2: Espectro de RMN ^{13}C de SGCH-1 (1 + 2) registrado em CDCl_3	84
Figura 3: Espectro de RMN ^{13}C de SGCH-1 (1 + 2) com DEPT ($\theta = 90$ e 135°) registrado em CDCl_3	85
Figura 4: Espectro de RMN ^1H (200 MHz) de SGCM-1 (3 + 4 + 5) registrado em CDCl_3	86
Figura 5: Espectro de RMN ^{13}C de SGCM-1 (3 + 4 + 5) registrado em CDCl_3	87
Figura 6: Espectro de RMN ^{13}C de SGCM-1 (3 + 4 + 5) com DEPT ($\theta = 90$ e 135°) registrado em CDCl_3	88
Figura 7: Espectro de RMN ^1H (200 MHz) de SGCM-2 (6) registrado em CDCl_3	89
Figura 8: Espectro de RMN 2D ($^1\text{H} \times ^1\text{H-COSY}$) de SGCM-2 (6) registrado em CDCl_3	90
Figura 9: Espectro de RMN ^{13}C de SGCM-2 (6) com DEPT ($\theta = 90$ e 135°) registrado em CDCl_3	91

Figura 10: Expansão do espectro de RMN 2D (^1H x ^{13}C -COSY, $^1\text{J}_{\text{CH}}$) de SGCM-2 (6) registrado em CDCl_3	92
Figura 11: Expansão do espectro de RMN 2D (^1H x ^{13}C -COSY, $^{2,3}\text{J}_{\text{CH}}$) de SGCM-2 (6) registrado em CDCl_3	93
Figura 12: Espectro de IV de SGCM-3 (7) em filme de NaCl	94
Figura 13: Espectro de RMN ^1H (400 MHz) de SGCM-3 (7) registrado em DMSO	95
Figura 13a: Expansão (9,0-6,5 ppm) do espectro de RMN ^1H (400 MHz) de SGCM-3 (7) registrado em DMSO	96
Figura 13b: Expansão (6,0-4,5 ppm) do espectro de RMN ^1H (400 MHz) de SGCM-3 (7) registrado em DMSO	97
Figura 13c: Expansão (4,5-3,5 ppm) do espectro de RMN ^1H (400 MHz) de SGCM-3 (7) registrado em DMSO	98
Figura 13d: Expansão (3,5-2,5 ppm) do espectro de RMN ^1H (400 MHz) de SGCM-3 (7) registrado em DMSO	99
Figura 14: Espectro de RMN 2D (^1H x ^1H -COSY) de SGCM-3 (7) registrado em DMSO	100
Figura 14a: Expansão (8,8-6,2 ppm) do espectro de RMN 2D (^1H x ^1H -COSY) de SGCM-3 (7) registrado em DMSO	101

Figura 14b: Expansão (6,0-2,5 ppm) do espectro de RMN 2D (^1H x ^1H -COSY) de SGCM-3 (7) registrado em DMSO	102
Figura 15: Espectro de RMN ^{13}C PND de SGCM-3 (7) registrado em DMSO	103
Figura 16: Espectro de RMN ^{13}C de SGCM-3 (7) com DEPT ($\theta = 90^\circ$ e 135°) registrado em DMSO	104
Figura 17: Espectro de RMN 2D (^1H x ^{13}C -COSY, $^1\text{J}_{\text{CH}}$)-HMQC de SGCM-3 (7) registrado em DMSO	105
Figura 17a: Expansão do espectro de RMN 2D (^1H x ^{13}C -COSY, $^1\text{J}_{\text{CH}}$)-HMQC de SGCM-3 (7) registrado em DMSO	106
Figura 18: Espectro de RMN 2D (^1H x ^{13}C -COSY, $^{2,3}\text{J}_{\text{CH}}$)-HMBC de SGCM-3 (7) registrado em DMSO	107
Figura 18a: Expansão do espectro de RMN 2D (^1H x ^{13}C -COSY, $^{2,3}\text{J}_{\text{CH}}$)-HMBC de SGCM-3 (7) registrado em DMSO	108
Figura 19: Espectro de massas de SGCM-3 (7) por ionização química	109
Figura 20: Espectro de massas de SGCM-3 (7) por FAB com glicerol como matriz	110
Figura 21: Espectro de RMN ^1H (400 MHz) de SGCM-3 (7) registrado em D_2O	111

Figura 22: Espectro de RMN ^{13}C PND de SGCM-3 (7) registrado em D_2O	112
Figura 23: Espectro de RMN ^{13}C de SGCM-3 (7) com DEPT ($\theta = 90^\circ$ e 135°) registrado em D_2O	113
Figura 24: Expansão do espectro de RMN 2D ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -COSY, $^{2,3}\text{J}_{\text{CH}}$)-HMBC de SGCM-3 (7) registrado em D_2O	114
Figura 25: Expansão do espectro de RMN 2D ($^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ -COSY, $^1\text{J}_{\text{CH}}$)-HMQC de SGCM-3 (7) registrado em D_2O	115
Figura 26: Expansão do espectro de RMN 2D ($^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ -COSY, $^{2,3}\text{J}_{\text{CH}}$)-HMBC de SGCM-3 (7) registrado em D_2O	116
Figura 27: Espectro de RMN ^1H (200 MHz) de SGCM-8 (8) registrado em MeOd_4	117
Figura 28: Espectro de RMN 2D ($^1\text{Hx}^1\text{H}$ -COSY) de SGCM-8 (8) registrado em MeOd_4	118
Figura 28a: Expansão do espectro de RMN 2D ($^1\text{Hx}^1\text{H}$ -COSY) de SGCM-8 (8) registrado em MeOd_4	119
Figura 29: Espectro de RMN ^{13}C de SGCM-8 (8) registrado em MeOd_4	120
Figura 30: Espectro de RMN ^1H (200 MHz) de (7b + 8) registrado em MeOd_4	121

Figura 31: Espectro de RMN ^{13}C de (7b + 8) com DEPT ($\theta = 90$ e 135°) registrado em MeOD_4	122
Figura 32: Espectro de RMN ^1H (200 MHz) de SGCM-9 (8a) registrado em CDCl_3	123
Figura 33: Espectro de RMN ^{13}C de SGCM-9 (8a) registrado em CDCl_3	124
Figura 34: Espectro de RMN ^{13}C de SGCM-9 (8a) com DEPT ($\theta = 90$ e 135°) registrado em CDCl_3	125
Figura 35: Espectro de RMN ^1H (400 MHz) de SGCM-10 (9) registrado em CDCl_3	126
Figura 35a: Expansão (5,5-4,0 ppm) do espectro de RMN ^1H (400 MHz) de SGCM-10 (9) registrado em CDCl_3	127
Figura 36: Espectro de RMN 2D ($^1\text{Hx}^1\text{H-COSY}$) de SGCM-10 (9) registrado em CDCl_3	128
Figura 36a: Expansão (5,6-3,4 ppm) do espectro de RMN 2D ($^1\text{Hx}^1\text{H-COSY}$) de SGCM-10 (9) registrado em CDCl_3	129
Figura 37: Espectro de RMN ^{13}C PND de SGCM-10 (9) registrado em CDCl_3	130
Figura 37a: Expansão (170-110 ppm) do espectro de RMN ^{13}C PND de SGCM-10 (9) registrado em CDCl_3	131

Figura 42c: Expansão (2,8-1,0 ppm) do espectro de RMN ^1H (400 MHz) de SGCM-11 (10) registrado em CDCl_3	141
Figura 43: Espectro de RMN 2D ($^1\text{Hx}^1\text{H-COSY}$) de SGCM-11 (10) registrado em CDCl_3	142
Figura 43a: Expansão (9,0-6,5 ppm) do espectro de RMN 2D ($^1\text{Hx}^1\text{H-COSY}$) de SGCM-11 (10) registrado em CDCl_3	143
Figura 43b: Expansão (6,0-1,0 ppm) do espectro de RMN 2D ($^1\text{Hx}^1\text{H-COSY}$) de SGCM-11 (10) registrado em CDCl_3	144
Figura 44: Espectro de RMN ^{13}C PND de SGCM-11 (10) registrado em CDCl_3	145
Figura 44a: Expansão (170-100 ppm) do espectro de RMN ^{13}C PND de SGCM-11 (10) registrado em CDCl_3	146
Figura 44b: Expansão (100-20 ppm) do espectro de RMN ^{13}C PND de SGCM-11 (10) registrado em CDCl_3	147
Figura 45: Espectro de RMN ^{13}C de SGCM-11 (10) com DEPT ($\theta = 90$ e 135°) registrado em CDCl_3	148
Figura 46: Espectro de RMN 2D ($^1\text{Hx}^{13}\text{C-COSY}$, $^1\text{J}_{\text{CH}}$)-MQC de SGCM-11 (10) registrado em CDCl_3	149
Figura 46a: Expansão (150-90 ppm) do espectro de RMN 2D ($^1\text{Hx}^{13}\text{C-COSY}$, $^1\text{J}_{\text{CH}}$)-HMQC de SGCM-11 (10) registrado em CDCl_3	150

Figura 47: Espectro de RMN 2D (^1H x ^{13}C -COSY, $^{2,3}\text{J}_{\text{CH}}$)-HMBC de SGCM-11 (10) registrado em CDCl_3	151
Figura 47a: Expansão (173-162 ppm) do espectro de RMN 2D (^1H x ^{13}C -COSY, $^{2,3}\text{J}_{\text{CH}}$)-HMBC de SGCM-11 (10) registrado em CDCl_3	152
Figura 47b: Expansão (145-100 ppm) do espectro de RMN 2D (^1H x ^{13}C -COSY, $^{2,3}\text{J}_{\text{CH}}$)-HMBC de SGCM-11 (10) registrado em CDCl_3	153
Figura 47c: Expansão (140-40 ppm) do espectro de RMN 2D (^1H x ^{13}C -COSY, $^{2,3}\text{J}_{\text{CH}}$)-HMBC de SGCM-11 (10) registrado em CDCl_3	154
Figura 48: Espectro de RMN NOESY de SGCM-11 (10) registrado em CDCl_3	155

ABREVIATURAS

δ	deslocamento químico medido em ppm
α_D	ângulo de desvio da luz polarizada
1D	unidimensional
2D	bidimensional
ax	axial
CC	cromatografia em coluna
CCDA	cromatografia em camada delgada analítica
CCDP	cromatografia em camada preparativa
CG - EM	cromatografía de gás acoplada a espectrômetro de massas
COSY	correlation spectroscopy
COLOC	correlation spectroscopy via long-range couplings
DEPT	distortionless enhancement by polarization transfer
d	oubleto
dd	duplo doubleto
EM	espectroscopia de massas
EM-FAB	espectroscopia de massas com ionização por bombardeio rápido de átomos
EM-IQ	espectroscopia de massas com ionização por ionização química

Ext.	extrato
eq	equatorial
HETECOSY	heteronuclear correlated spectroscopy
HMBC	heteronuclear multiple bond connectivity
HMQC	heteronuclear multiple quantum coherence
HOMOCOSY	homonuclear correlated spectroscopy
Hz	Hertz
IV	infravermelho
Int.	intensidade
J	constante de acoplamento
Lit.	literatura
LQPN	laboratório de química de produtos naturais
m	multiplet
Me	metila
MHz	megahertz
min	minutos
mL	mililitro
m/z	relação massa-carga
nOe	nuclear Overhauser effect
NOESY	nuclear Overhauser and exchange spectroscopy

RESUMO

O estudo fitoquímico das cascas de *Simira glaziovii* conduziu ao isolamento e identificação dos esteróides sitostenona e estig mastenona do extrato hexânico; do extrato metanólico foram isolados sitosterol, estigmast erol, 3,4-dimetoxicinamato de metila e dois alcalóides β -carbolínicos harmana (9H-pirido[3,4b]indol) e um novo enantiômero da ofiorina B, a (-)ofiorina B. As estruturas destas substâncias naturais foram determinadas com base na análise de espectros de IV, RMN e de massas. A reação da (-)ofiorina B com diazometano, forneceu o lialosilato de metila. Este éster metílico foi tratado com anidrido acético e piridina e forneceu o tetra-O-acetyl lialosilato de metila. O mesmo tratamento da (-)ofiorina B forneceu dois novos derivados acetilados, o ácido pentaacetil lialosídico e o monoterpeno β -carbolínico, tetraacetil glicosídeo (1,22-lactamil-lialosídeo).

ABSTRACT

The phytochemical study of the bark of *Simira glaziovii* (Rubiaceae) afforded the sitostenone and estigmastenone isolated from hexanic extract and sitosterol, stigmasterol, methyl dimethoxy cynamate, the harman alkaloid and the new enantiomer of ophiorine B, (-)ophiorine B from methanolic extract. The structures of the compounds were established by IR, NMR and mass spectra analysis of the natural substances and derivatives. The methyl lialosilate of ophiorone B, after treatment with acetic anhydride and pyridine, yielded the tetraacetyl derivative. The same treatment of ophiorine B yielded two new acetyl derivatives, pentaacetyl lyalosidic acid and the β -carboline monoterpene tetraacetyl glucoside (1,22-lactam-lyaloside).

1. INTRODUÇÃO GERAL

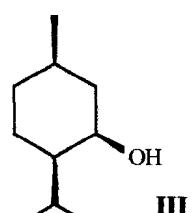
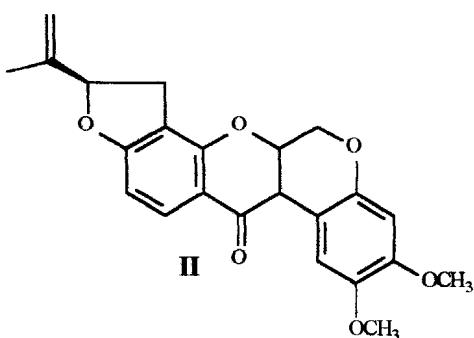
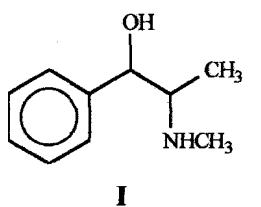
A pesquisa em produtos naturais tem adquirido grande interesse devido à ansiedade do homem em explorar a biodiversidade em seu benefício, procurando o melhor entendimento dos fenômenos do meio ambiente, como também à procura de alimentos e medicamentos naturais.

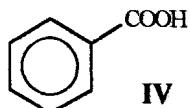
Mais de 600.000 espécies de plantas superiores constituem a flora mundial e representam um grande desafio para os pesquisadores interessados em ampliar o conhecimento da química das espécies vegetais. Um dos principais objetivos do trabalho dos químicos de produtos naturais é a busca de novas substâncias que possam ser úteis para a humanidade¹.

A maioria da população dos países menos desenvolvidos depende da medicina caseira, utilizando-se de plantas para suas necessidades primárias de saúde. Em muitos casos, a pesquisa nesta área de conhecimento mostra os acertos com que são empregadas algumas plantas e permite detectar erros cometidos pelo emprego de espécies cujas atividades não são comprovadas. Neste sentido a química de produtos naturais deve continuar contribuindo com os processos de investigação de plantas usadas tradicionalmente para o conhecimento do princípio ativo das espécies, como também para avaliar os perigos da adoção de determinados vegetais como medicamentos tradicionais.

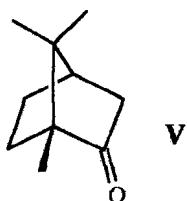
O conhecimento das espécies vegetais contribui para a química orgânica em geral, fornecendo modelos adequados para transformações químicas na obtenção de produtos úteis. Além disso, geram informações para outras áreas de conhecimento, que se beneficiam dos trabalhos dos químicos de produtos naturais, como a botânica, agricultura, estudos de ecologia e taxonomia química.

O potencial químico dos organismos vivos estimula o interesse das indústrias farmacêuticas pelas plantas como fonte de fármacos como, por exemplo, a efedrina [I]; como fonte de agroquímicos, fornecendo fungicidas e inseticidas naturais, como por exemplo, a rotenona [II]; como fonte de substâncias naturais usadas na indústria alimentícia, podemos citar o mentol [III] e o ácido benzólico [IV] e como componentes de perfumes naturais, a cânfora [V] e o linalol [VI], que são utilizados na indústria de cosméticos².

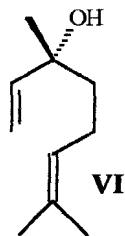




IV



V



VI

A eficácia das substâncias naturais já conhecidas e a necessidade de se resolver problemas atuais da humanidade têm motivado investimentos para a avaliação do potencial terapêutico de plantas medicinais e de seus constituintes. Uma variedade de substâncias pertencentes a diversas classes de constituintes, como flavonóides, alcalóides, terpenóides e lignóides, tem sido objeto de estudos farmacológicos através de testes pré-clínicos com animais. Muitas destas substâncias têm grandes possibilidades de, futuramente, serem incluídas entre os agentes medicinais existentes³⁻⁶.

A medicina alopática utiliza drogas com estruturas definidas, que são extraídas de plantas superiores. A existência de muitas espécies cuja química é desconhecida permite deduzir que muitas substâncias com atividade medicinal possam ser isoladas destes organismos vegetais.

Apesar de uma planta possuir centenas de metabólitos especiais, somente os compostos presentes em maior concentração são geralmente isolados e estudados pela fitoquímica tradicional. A análise de substâncias

ativas é muito mais complexa e longa já que, na maioria das vezes, os compostos presentes em menor proporção na planta são os que apresentam melhores efeitos biológicos. Por isso, emprega-se atualmente o sistema de estudo monitorado com testes específicos para a análise dos extratos antes do fracionamento, e posteriormente, a análise dos compostos puros. Este tipo de trabalho tem sido feito por grupos que procuram resultados imediatos com finalidades específicas e, consequentemente, descartam muitos materiais que poderiam ser usados para outros estudos científicos⁷.

Das inúmeras espécies vegetais nativas do Brasil, muitas são usadas, principalmente, como fonte de material para construção e carpintarias, para fabricação de celulose, carvão e para exportação de componentes químicos com valor comercial atendendo, inclusive, a demanda internacional. Assim, ocorre um processo desordenado e indiscriminado de devastação, destruindo espécies vegetais, prejudicando o equilíbrio ambiental e eliminando um poderoso laboratório vivo de produtos naturais. Muitos deles úteis para a manutenção do sistema ecológico e, às vezes, com potencial para ser explorado pelo homem de forma racional e solucionar muitos de seus problemas.

2. A PLANTA.

2.1. A família Rubiaceae

A família Rubiaceae apresenta cerca de 650 gêneros e 12000 espécies, sendo que a maioria dessas espécies, é encontrada nas regiões tropicais e subtropicais e são adaptadas para regiões úmidas⁸.

Esta vasta família possui, uma química pouco variável, mas com um potencial farmacológico muito significativo, caracteriza-se pela produção de repelentes químicos tais como iridóides, antraquinonas e vários tipos de alcalóides, especialmente alcalóides indólicos, mas também quinolínicos, isoquinolínicos e purínicos, às vezes, taníferos e proantocianinas⁹.

O gênero mais abundante nesta família é o gênero *Psychotria* com cerca de 700 espécies. Outros gêneros bastante conhecidos da família Rubiaceae são o gênero *Cinchona*, conhecido como fonte de quinina [VII] e alcalóides relacionados, o gênero *Coffea*, fonte de cafeína [VIII] e o gênero *Rubia*, principalmente a espécie *R. tinctorium*, cuja madeira era utilizada tradicionalmente como fonte de tinta vermelha, a alizarina [IX], que atualmente é preparada artificialmente⁹.

2.2. O Gênero *Simira*.

O gênero *Simira* engloba 37 espécies distribuídas do México ao Sul do Brasil e Paraguai. No Brasil ocorrem 16 espécies nos Estados do Amazonas, Pará, Goiás, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina, em formação florestal na Mata Atlântica e em mata ciliar¹⁰.

Este gênero, da família Rubiaceae, vem despertando interesse para estudo devido principalmente as atividades fototóxicas apresentadas por alguns constituintes isolados e pelas informações etnomédicas de *S. rubescens* cujas cascas são usadas no tratamento de manchas dentárias¹¹. Até o momento apenas as espécies *S. maxonii*¹²⁻¹⁴, *S. mexicana*¹⁵, *S. salvadorensis*¹⁶ e *S. rubra*^{16,17} foram estudadas quimicamente. Estes trabalhos revelam a presença de policetídeos, alcalóides furoquinolínicos e β-carbolínicos os quais têm sido caracterizados como substâncias fotossensibilizantes¹⁵. Os alcalóides mais comuns neste gênero são a harmana (6), maxonina [X]¹² e estrictosamida [Xl]¹⁷.

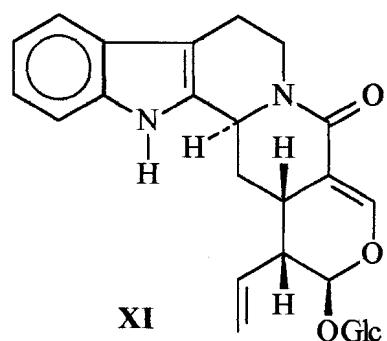
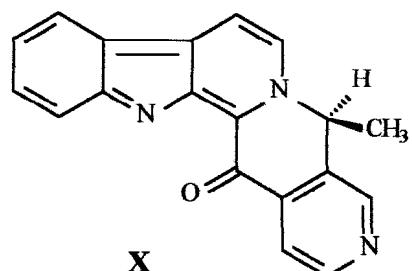
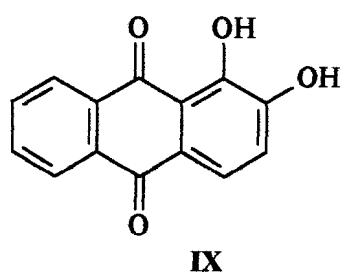
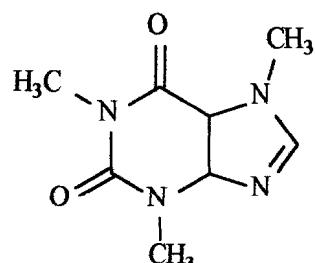
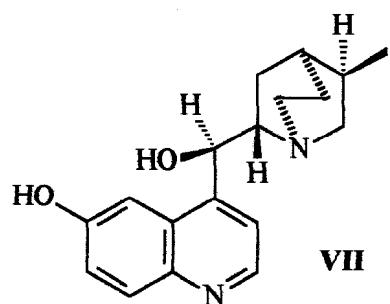


Tabela 1: Algumas espécies do gênero *Simira*.

Espécies	Substâncias isoladas	Uso popular	Localidade
<i>S. maxonii</i>	Maxonina [X]	Purgativo, antifebril	Panamá Costa Rica
<i>S. mexicana</i>	Estrictosamida [XI] Harmana (6)	No tratamento de malária e dengue	México
<i>S. salvadorensis</i>	Harmana (6)	Construção, corante	Belize
<i>S. rubra</i>	Harmana (6)	-	-
<i>S. rubescens*</i>	-	Clareamento dos dentes	Peru
<i>S. viridiflora</i>	Éster metílico da ofiorina (7b) ¹⁸	-	Sudeste do Brasil
<i>S. glaziovii</i>	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7	Construção, arborização	Sudeste do Brasil
<i>S. tinctoria*</i>	-	Corante, confecção de talheres, construção	Amazônia
<i>S. samapoiana*</i>	-	Artesanato, arborização, construção	Sudeste do Brasil
<i>S. grazielae*</i>	-	Arborização, construção	Sudeste do Brasil
<i>S. elierezeriana*</i>	-	Arborização, construção	Sudeste do Brasil

*Espécies ainda não estudadas.

2.2.1. Características Botânicas:

Inflorescências: em panículas decussadas ou tirso, longas ou curtas.

Flores: bracteoladas vermelhas, rosadas, amarelas ou esverdeadas, pentâmeras ou tetrâmeras, hermafroditas, actinomorfas ou subzigomorfas.

Cálice: campanulado ou cupuliforme internamente com ou sem glândulas, às vezes, aumentado em limbo foliáceo.

Corola: tubulosa, ventricosa ou infundibuliforme, freqüentemente com membrana circular disposta entre os estames e a fauce; prefloração fechada ou aberta.

Androceu: com 4-5 estames exsertos, geralmente presos na metade inferior do tubo; filamentos subulados, glabros ou pilosos na base; anteras sagitadas, dorsifixas; grão de pólen globoso, finamente granulado, tricolporado, com 10 a 20 μm de diâmetro. Disco inteiro, às vezes sulcado.

Gineceu: com ovário bicarpelar, bilocular, com muitos óvulos por lóculo, horizontalmente bisseriados; estilete exerto, atenuado, cilíndrico; estigmas 2, crassos, recurvados ou revolutos.

Fruto: cápsula loculicida globosa ou largamente oblonga, bivalvar, polisperma, lenticelada; valvas inteiras ou bipartidas.

Sementes: aladas, com núcleo embrionário semi-oblongo e albúmем carnoso; embrião grande, oblíquo, com cotilédones foliáceos e radícula longa, cilíndrica ou ligeiramente comprimido-clavada.

Folhas: pecioladas, glabras ou pilosas, inteiras, repandas ou sinuadas, congestas no ápice dos ramos; padrão de nervação broquidódromo, frequentemente com domáceas de tipos variados na axila das nervuras secundárias; estômatos na epiderme inferior dos tipos paracítico e anomocítico; estípulas interpeciolares, glandulosas na face interna, na base.

Porte: árvores de pequeno ou grande porte, com córtex crasso, muitas vezes suberoso, cinéreo.

Madeira: Ceme marrom ou acinzentado, alburno amarelado ou acinzentado quando fresco, geralmente adquirindo coloração vermelha, rósea ou violácea quando exposto ao ar, uniforme ou variegado, tornando-se amarelado em direção à superfície. Brilho médio ou reduzido; inodoro e com sabor levemente amargo. Densidade variável em diferentes espécies, textura fina, uniforme. Madeira boa para trabalhos de carpintaria, porém, com baixa resistência à decomposição¹⁰.

2.2.2. Características gerais:

O nome *Simira* é popular na Guiana. No Brasil, as espécies desse gênero são conhecidas como arariba, arariba-vermelha, arariba-rosa, arariba-branca, quina-rosa, canela-samambaia, maiate e marfim. As espécies brasileiras desse gênero, algumas vezes conhecidas como quineiras têm ação tônica e antifebril, devem conter substâncias amargas e alcalóides afins da quinina [VII]. Essas espécies têm muitos características em comum; entretanto, o que as leva a serena reconhecidas pelo mesmo nome vulgar é o fato de seu córtex tornar-se vermelho ou rosado quando exposto ao ar¹⁰.

A espécie *S. tinctoria*, da Amazônia, é usada na confecção de colheres e gamelas e, algumas vezes, em construção. Essa espécie foi utilizada como corante nos Estados Unidos durante a primeira guerra mundial. A espécie *S. salvadorensis* é utilizada em construções e seu corante vermelho é empregado no tingimento de redes e outros artigos¹⁰.

S. maxonii, do Panamá e da Costa Rica, é considerada pelos indígenas como medicinal e utilizada como purgativo e antifebril. *S. glaziovii*, *S. sampaioana* e *S. grazielae* destacam-se pela magnitude dos exemplares arbóreos, inclusive com potencialidades comerciais, tanto do ponto de vista de produção de madeira como de aproveitamento medicinal. Estas espécies ocorrem em mata alta¹⁰.

As espécies do sudeste do Brasil são algumas vezes utilizadas em construção interior, como tabuados e tacos, artesanato, tinturaria e arborização de ruas. Ainda não foi feita uma tentativa de cultivo dessas espécies em escala comercial e nenhuma avaliação crítica dos componentes químicos utilizáveis na indústria farmacêutica.

O estudo das espécies do gênero *Simira* é relevante, visto que, neste gênero, substâncias de valor farmacológico já foram identificadas e muitas espécies são usadas pelos nativos como produtos de substâncias corantes, antifebris e tónicas¹⁰.

2.3. A Espécie *Simira glaziovii*.

O nome específico é uma homenagem ao botânico francês A. F. M. Glaziou que, na segunda metade do século XIX, trabalhou como botânico e paisagista no Brasil, tendo coletado o material que serviu de base para a descrição da espécie¹⁰.

No Brasil, área de ocorrência da espécie *Simira glaziovii*, se resume aos Estados do Espírito Santo, Minas Gerais e Rio de Janeiro. Os termos arariba (RJ, ES), quina-rosa (MG), arariba-vermelha (RJ, ES, MG) são nomes populares dados a esta espécie, conforme a região. Esta espécie floresce predominantemente de dezembro a janeiro e frutifica cerca de seis meses após a floração¹⁰.

A espécie *S. glaziovii* pertence a um gênero que apresenta como característica a presença de alcalóides β -carbolínicos, que estão presentes em plantas conhecidas por afetar o Sistema Nervoso Central. Como exemplo, pode-se citar as espécies *Ailanthus altissima* e *Passiflora incarnata*, cujas atividades farmacológicas estão associadas à unidade indólica desses alcalóides. Outra característica do gênero *Simira* é a presença de substâncias fototóxicas, que funcionam como mecanismo de defesa para a planta, causando fotodermatites em humanos e animais predadores. A toxicidade mediante a luz confere vantagem evolutiva às plantas que possuem essas

substâncias 16. A revisão bibliográfica revelou que a espécie *Simira glaziovii* ainda não havia sido estudada anteriormente. Sendo este, portanto, o primeiro estudo da espécie que está sendo realizado pelo Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN-UFRJ).

2.3.1. Classificação botânica da Espécie

Tabela 2: Classificação botânica de *Simira glaziovii*^{10,19}.

Reino	Plantae
Ordem	Gentianales
Tribo	Rondeletieae
Família	Rubiaceae
Subfamília	Cinchonoideae
Gênero	<i>Simira</i>
Espécie	<i>Simira glaziovii</i>
Denominação Vulgar	"Arariba-vermelha"

2.3.2. Descrição botânica da espécie.

Porte: árvore com até 30 m de altura, fuste cilíndrico, ereto, com até 18 m de comprimento, diâmetro à altura do peito de até 56 cm; ramos cilíndricos, glabros, lenticelados; lenticelas pardacentas, circulares ou alongadas.

Folhas: largamente obovada, repanda, cartácea, com ápice obtuso a curtoacuminado e base ligeiramente auriculada; prefoliação aberta; nervuras secundárias, cerca de 20 pares, depressas na face superior e salientes na face inferior; veias terciárias oblíquoas, salientes; terminações vasculares predominantemente simples; estômatos anomocíticos.

Pecíolo: cerca de 1,2 cm de comprimento, crasso, glabro, lenticelado.

Inflorescência: em panículas decussadas terminais, multifloras.

Cálice: campanulado com cerca de 0,15 cm de comprimento e 0,25 cm de largura, denteado, às vezes com um dos lacínios aumentado em limbo foliáceo.

Corola: ligeiramente infudibuliforme com cerca de 0,6 cm de comprimento, prefloração aberta; dobra membranácea na face interna da corola, próxima à fauce.

Estames: 4, exsertos; filetes pilosos na base; anteras oblongas, sagitadas, vermelhas ou, mais raramente, amarelas.

Ovário: ínfero, bilocular com numerosos óvulos; estilete glabro, bífido.

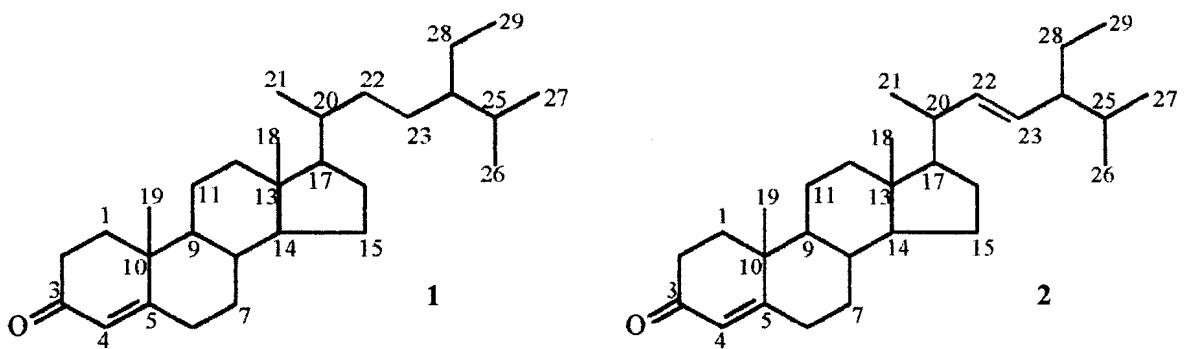
Cápsula: com cerca de 5,5cm de diâmetro, levemente comprimida, lenhosa. Sementes cerca de 45 por fruto, plantas, com 2,3 cm de comprimento e 0,9 cm de larguras na região mediana, oblongo-reniformes; embrião reto com 0,45 cm de comprimento, com cotilédones largamente ovados e ápice rotundado.

3. CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *Simira glaziovii*.

3.1. Constituintes isolados das cascas:

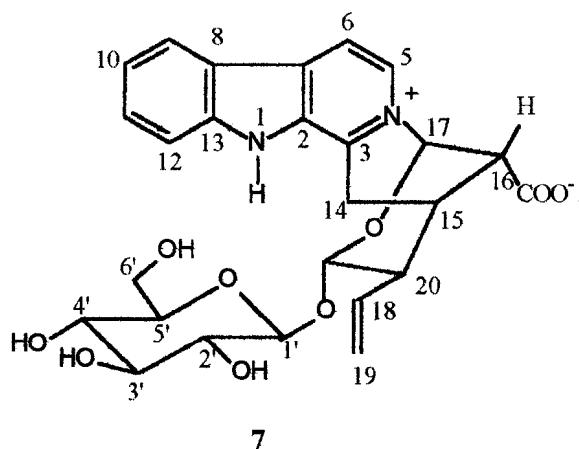
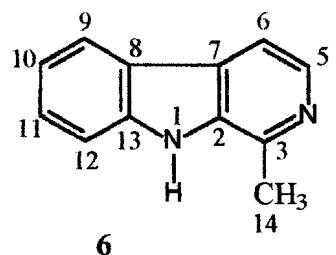
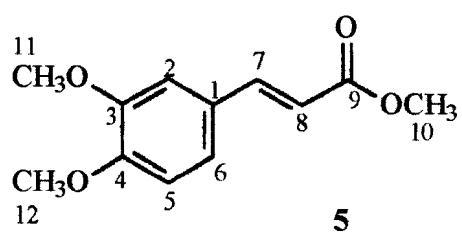
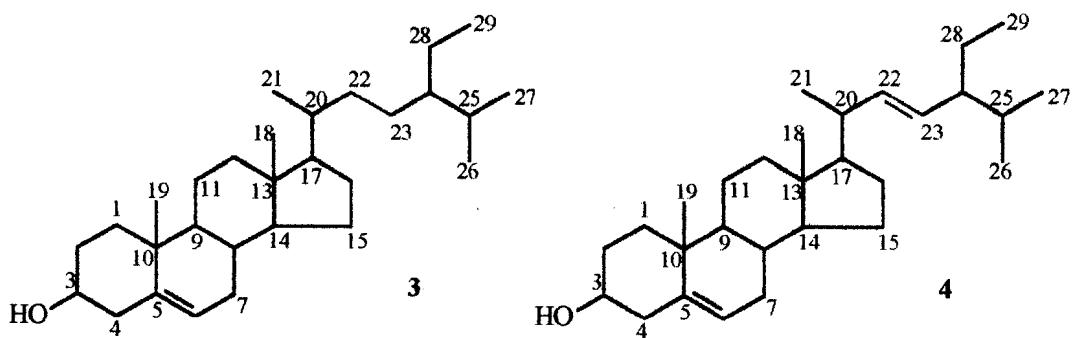
3.1.1. Extrato hexânico

O fracionamento do extrato hexânico das cascas de *S. glaziovii* permitiu a identificação de uma mistura de dois esteróides, sitostenona (1) e estigmastenona (2). A análise do espectro de infravermelho das demais frações desse extrato, a maioria em pequenas quantidades, revelou a presença de material alifático.

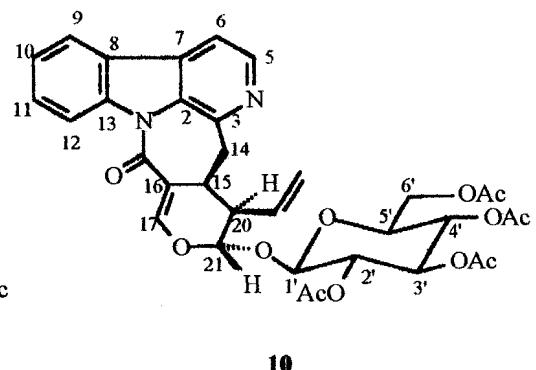
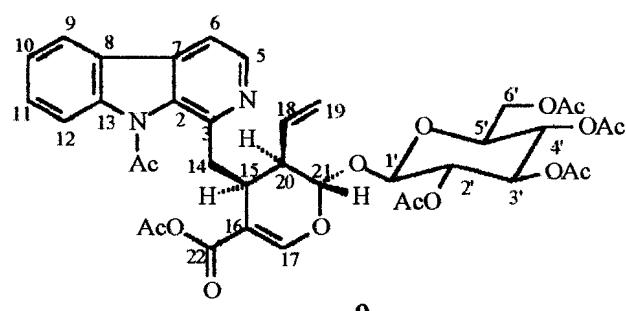
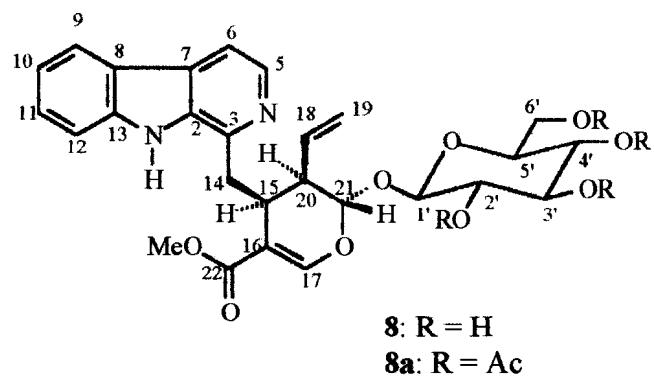
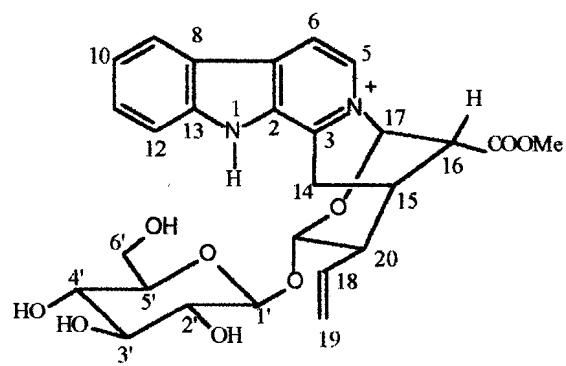


3.1.2. Extrato metanólico

O estudo fitoquímico realizado com o extrato metanólico das cascas desta espécie permitiu o isolamento e a caracterização de dois esteróides, sitosterol (3) e estigmasterol (4), em mistura com o 3,4-dimetoxicinamato de metila (5), e dois alcalóides indólicos harmania (6) e ofiorina B (7).



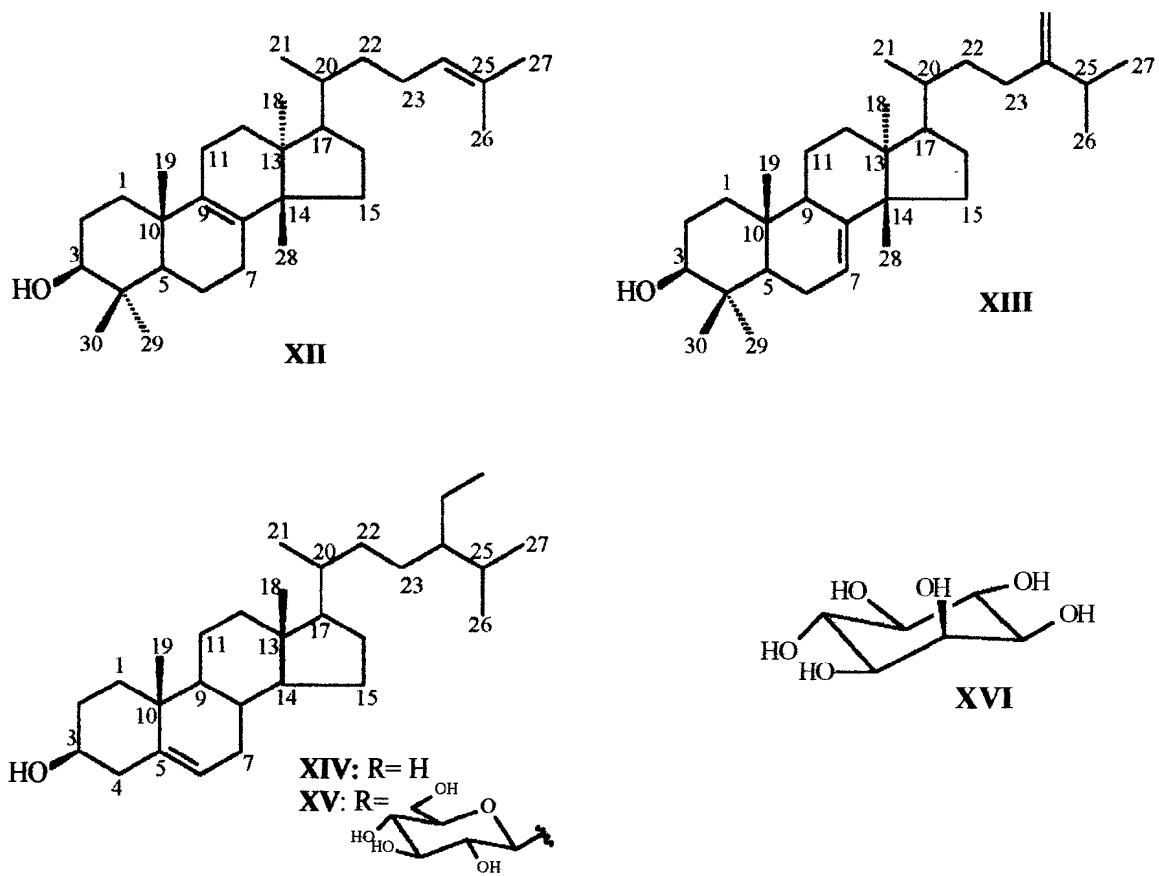
3.1.3. Derivados da ofiorina B (7).



3.2. Constituintes isolados de outras partes da planta.

O estudo químico do extrato hexânico das folhas de *Simira glaziovii* realizado no LQPN (PPGQO-DEQUIM-UFRRJ), permitiu o isolamento e a identificação de triterpenos do tipo eufol [XII] e do tipo butirospermol [XIII], em mistura.

Do extrato metanólico das folhas foram isolados e identificados esteróides como o β -sitosterol [XIV], β -O- β -D-glicopiranositosterol [XV] e inositol [XVI]²⁰.



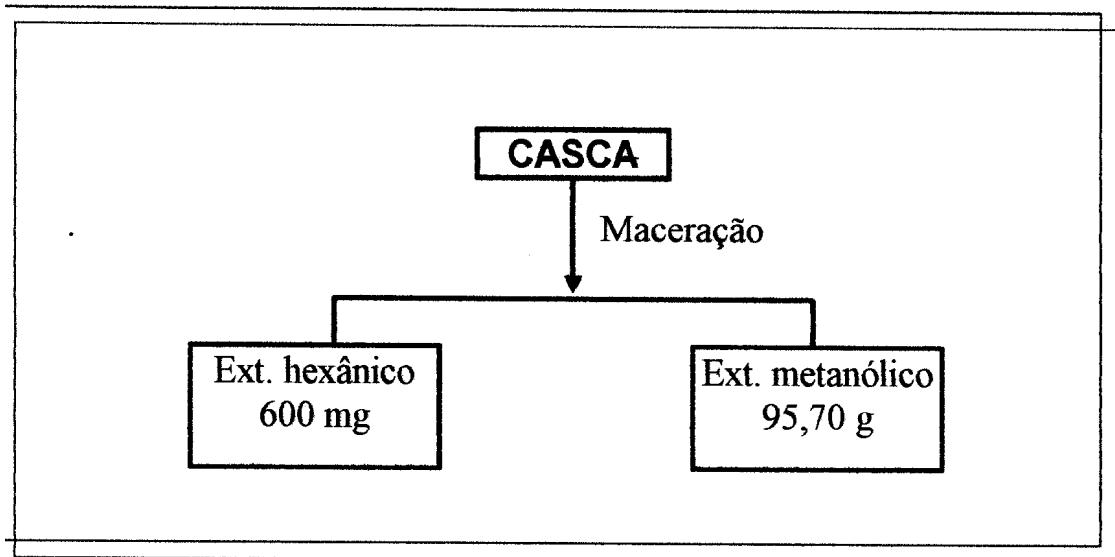
4. PARTE EXPERIMENTAL.

4.1. Coleta da planta.

O espécime de *Simira glaziovii* foi coletado na Reserva Florestal de Tinguá, Nova Iguaçu, RJ, pelo botânico Sebastião José da Silva Neto. A autenticação foi feita através de comparação com a excicata depositada no herbário do Departamento Botânica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

4.2. Elaboração dos extratos.

O material vegetal (casca), após ser separado e seco naturalmente, foi reduzido a pó em moinho de facas. O pó das cascas (930 g) foi submetido a extrações sucessivas em hexano e metanol, através do processo de maceração, fornecendo 600 mg de material do extrato hexânico SGCH (*Simira glaziovii*, Casca, Hexano) e 97,5 g de material do extrato metanólico SGCM (*Simira glaziovii*, Casca, Metanol), (Esquema 1).

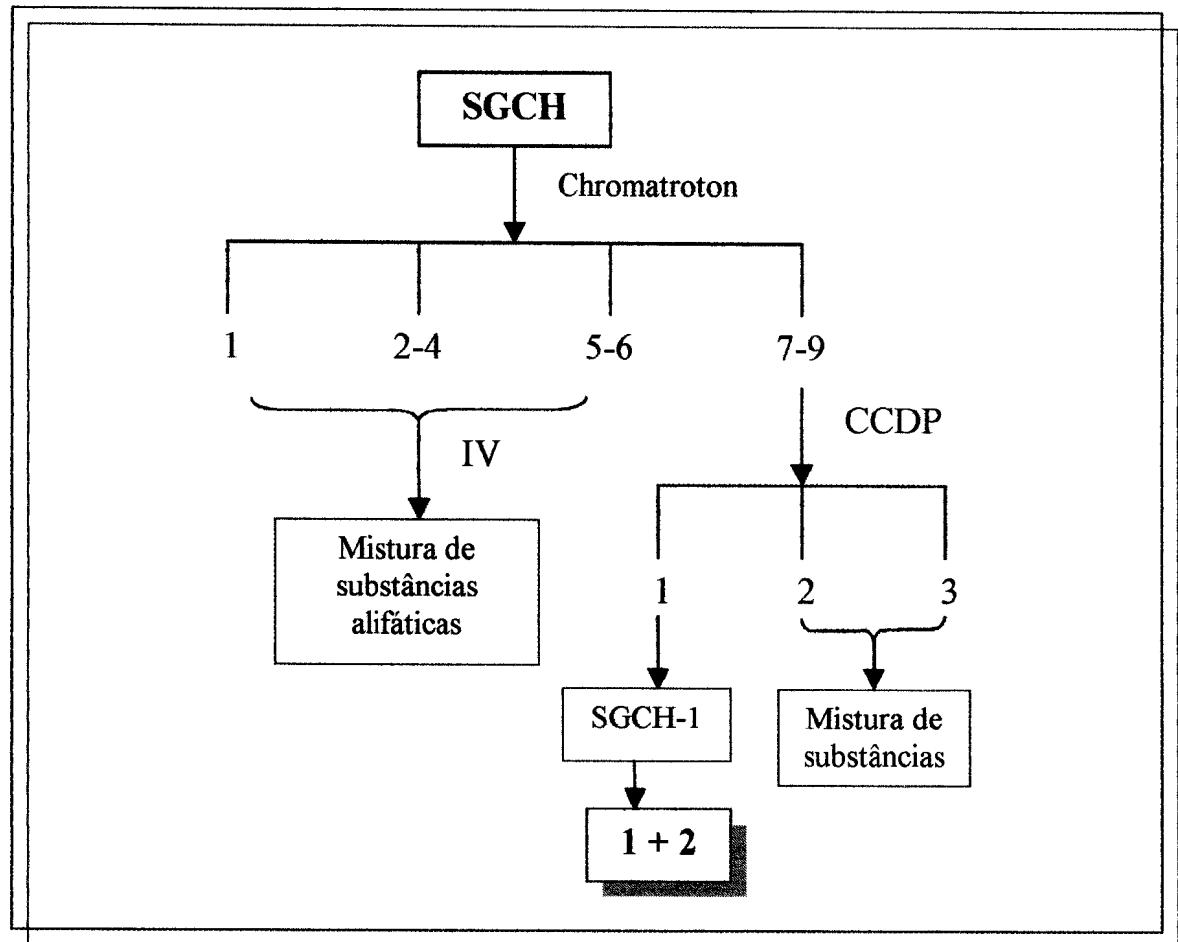


Esquema 1: Elaboração dos extratos das cascas de *Simira glaziovii*

4.3. Isolamento e purificação de constituintes das cascas

4.3.1. Extrato hexânico

O extrato hexânico foi submetido a fracionamento em cromatografia circular, Chromatotron, obtendo-se um total de 197 frações que foram analisadas através de cromatografia em camada delgada analítica e reveladas com vapores de iodo (Esquema 2). A fração 7-9 (81,7 mg) foi submetida à cromatografia em camada delgada preparativa, da qual a fração 1 (SGCH-1), foi analisada através de espectro de RMN ^1H e ^{13}C . Com esta análise identificou-se a mistura de sitostenona (1) e estigmastenona (2). As demais frações foram caracterizadas como sendo constituídas de material alifático através da análise por espectrometria de infravermelho.



Esquema 2: Fracionamento cromatográfico do extrato hexânico das cascas de *Simira glaziovii*

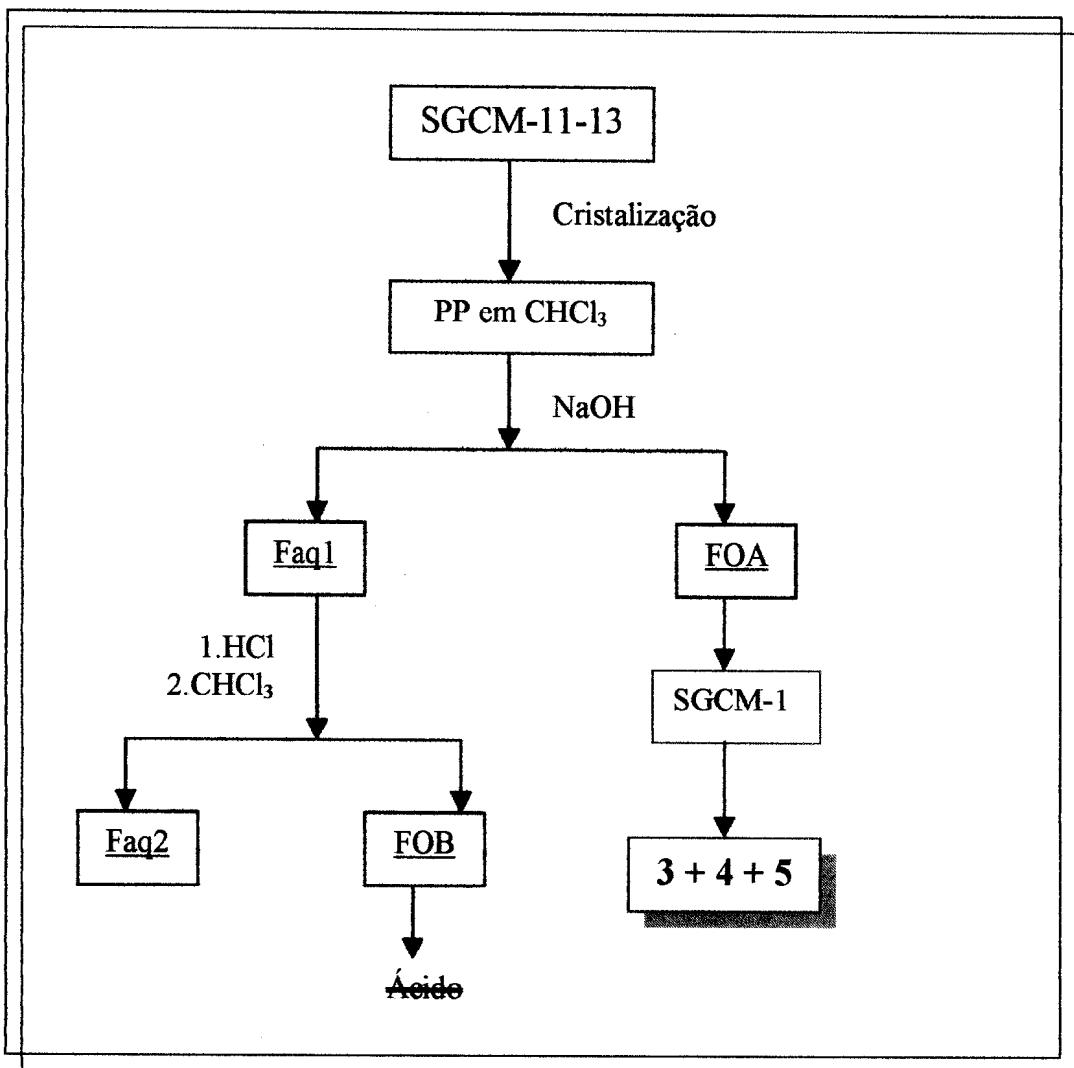
4.3.2. Extrato metanólico

Após análise em cromatografia em camada delgada analítica de sílica gel, o extrato metanólico (SGCM) foi submetido ao fracionamento cromatográfico em coluna de sílicagel, obtendo-se 71 frações. Através de

análises comparativas em CCDA, as frações semelhantes foram reunidas em 14 grupos.

Da fração SGCM-11-13 obtiveram-se cristais brancos (55 mg), cuja análise por RMN ¹H e ¹³C, permitiu identificar a presença de uma mistura de esteróides (estruturas 3 e 4) e um éster orgânico (5), (Esquema 3).

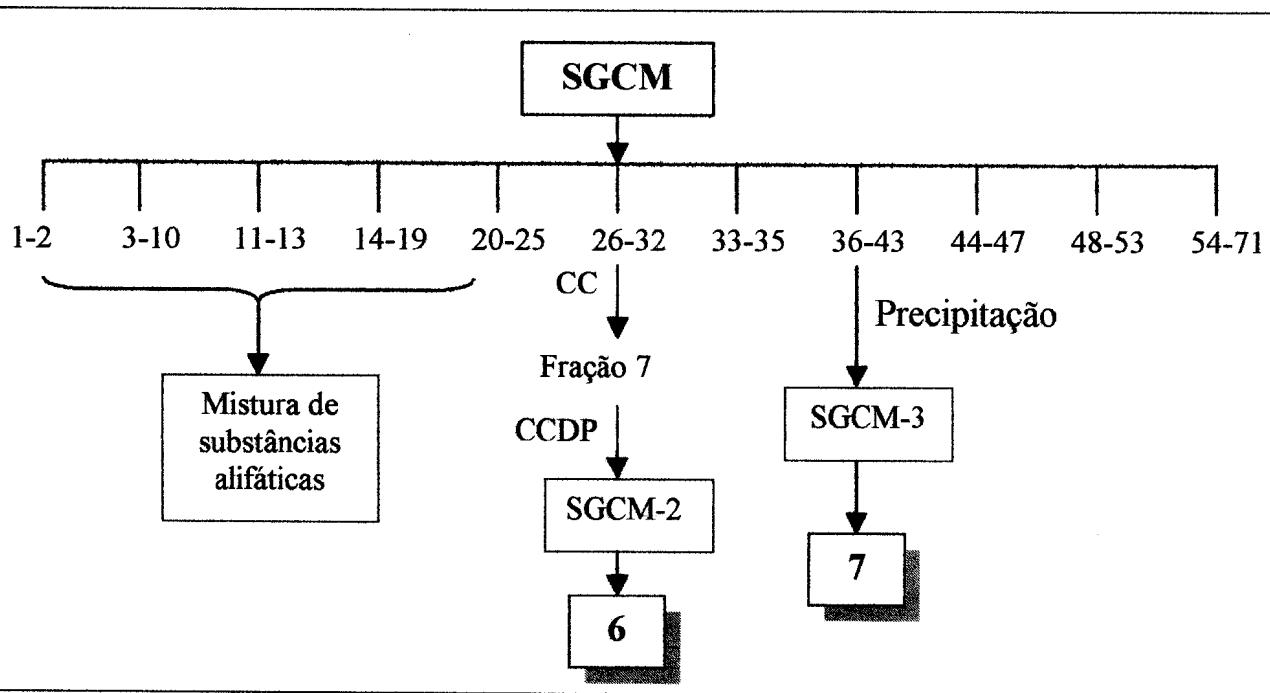
Inicialmente, suspeitou-se que a fração SGCM-11-13, fosse uma mistura de esteróides (3 e 4) e de um ácido orgânico. Com objetivo de confirmar ou não a presença do ácido, foi feita uma extração ácido-base. A amostra foi dissolvida em clorofórmio e logo após, tratada com NaOH. Obtiveram-se duas fases, uma orgânica e outra aquosa. A fase aquosa (Faq1) foi acidificada com solução de HCl 10% e extraída em clorofórmio. As fases orgânicas FOA e FOB foram secas com sulfato de sódio anidro, concentradas em evaporador rotativo e, posteriormente, analisadas por RMN ¹H. A fase FOB não revelou a presença do ácido, enquanto que na fase FOA encontrou-se a mistura dos esteróides (3 e 4) e do éster aromático (5). Uma análise posterior do espectro de RMN ¹³C permitiu confirmar a proposta estrutural dos componentes da mistura.



Esquema 3: Fracionamento cromatográfico da fração SGCM-11-13

As frações SGCM-26-32 (21,7g) foram submetidas ao fracionamento em coluna de sílica gel usando clorofórmio e metanol como eluentes e foram recolhidas 64 frações (Esquema 4). A fração 7 (278,0 mg), que revelou o maior grau de pureza, foi submetida a fracionamento através de cromatografia em camada delgada preparativa e da fração SGCM-2, obtendo-se o alcalóide harmana (6), (50 mg, PF=230 °C).

As frações SGCM-36-43 foram dissolvidas em metanol a quente e, após o resfriamento da solução, obteve-se uma grande quantidade de precipitado amarelo (3,5g, Esquema 4). Este sólido apresentou resultado positivo frente ao teste para alcalóides, precipitando com os reagentes de Mayer e Dragendorff²¹ e foi analisado usando os espectros de IV, RMN ¹H e ¹³C e espectrometria de massas FAB e IQ. A análise dos espectros e comparação dos dados de RMN ¹H e ¹³C registrados em D₂O, incluindo experimentos 1D e 2D, permitiu distinguir entre os dois epímeros ofiorinas A (7a) e B (7), (tabela 7, pág.55) e caracterizar o alcalóide indólico ofiorina B como constituinte da amostra SGCM-3.



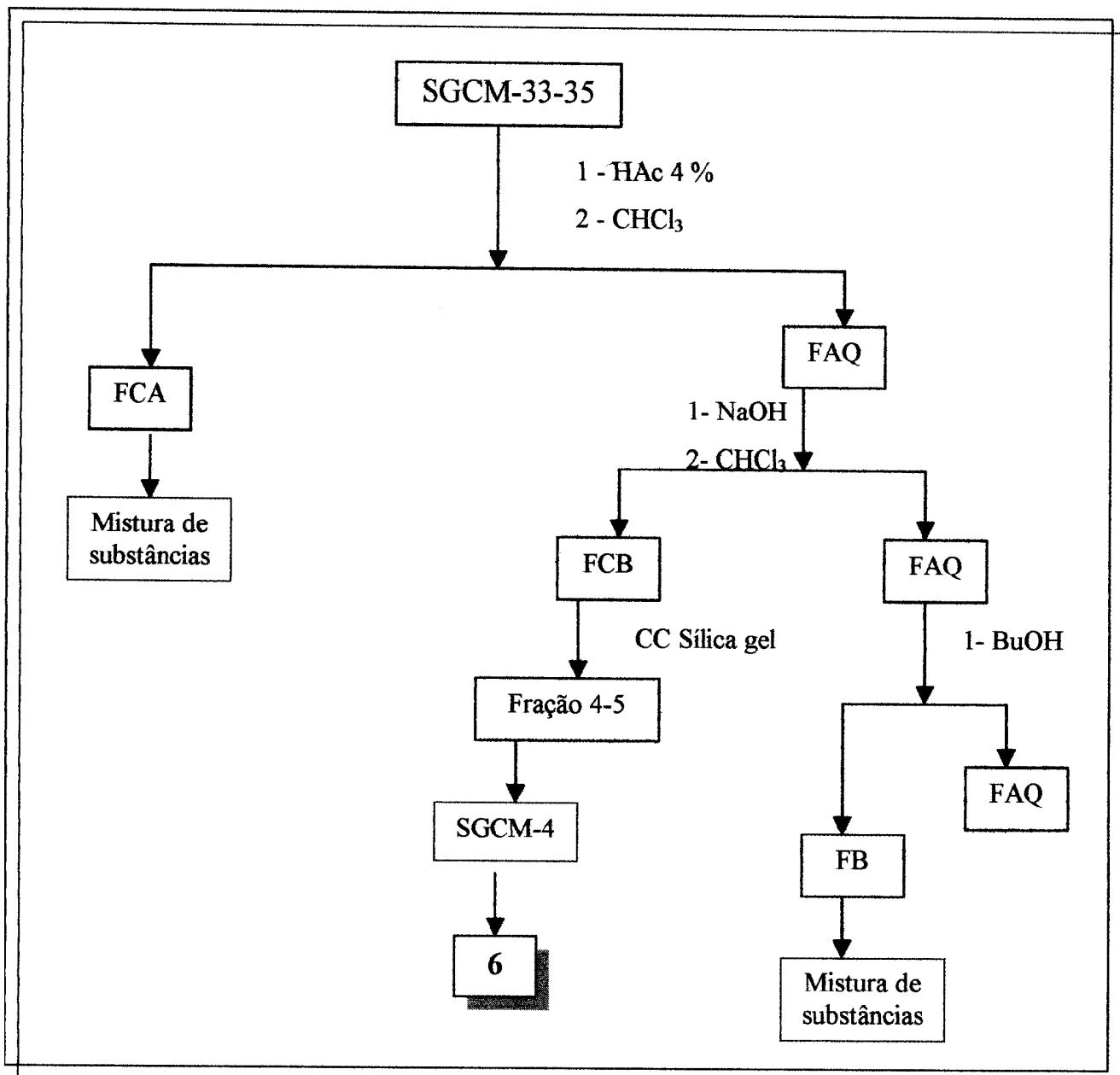
Esquema 4: Fracionamento cromatográfico do extrato metanólico das cascas de *Simira glaziovii*

A fração SGCM-33-35 (14,46g) foi submetida a um fracionamento usando a marcha para alcalóides (Esquema 5). Após adição de ácido acético 4%, com agitação constante, a mistura foi extraída com CHCl_3 , fornecendo duas fases, uma fase clorofórmica ácida (FCA-138mg) e uma fase aquosa. Esta última foi alcalinizada com hidróxido de sódio a pH 9-10 em banho de gelo. Extraiu-se novamente com CHCl_3 , obtendo-se uma fase clorofórmica básica (FCB-79,9mg) e uma fase aquosa, que foi extraída com butanol, obtendo-se uma fase butanólica (FB-278mg) e uma fase aquosa, que foi rejeitada; A fase FCA apresentou resultado negativo no teste para alcalóides, enquanto que a FCB apresentou resultado positivo, precipitando com os reagentes de Mayer e Dragendorff²¹.

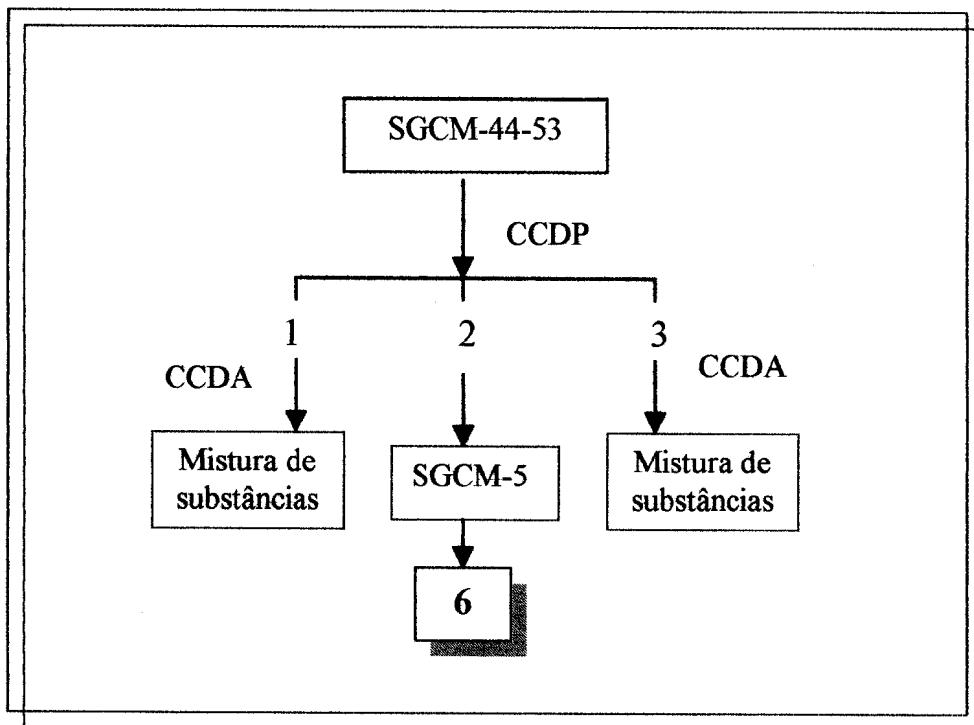
A FCB foi submetida à coluna flash de sílica obtendo-se 11 frações, sendo que a SGCM-4 foi analisada através de espectros de RMN ^1H e comparação com dados espectrométricos da harmana o que permitiu identificar este alcalóide nesta função.

Uma porção do grupo de frações SGCM-44-53 (246 mg) foi fracionada por cromatografia em camada preparativa (Esquema 6), obtendo-se 3 frações das quais a fração 2 (SGCM-5) apresentou uma única mancha em CCDA e foi comparada com o padrão do alcalóide harmana, usando como eluentes diclorometano, clorofórmio e acetato de etila. A fração SGCM-5 se revelou

idêntica nos três solventes e foi caracterizada como o alcalóide harmana, que já havia sido isolado das cascas de *S. glaziovii* da fração SGM-26-32. A análise por CCDA das frações 1 e 3 apresentou várias manchas, revelando uma mistura de substâncias.



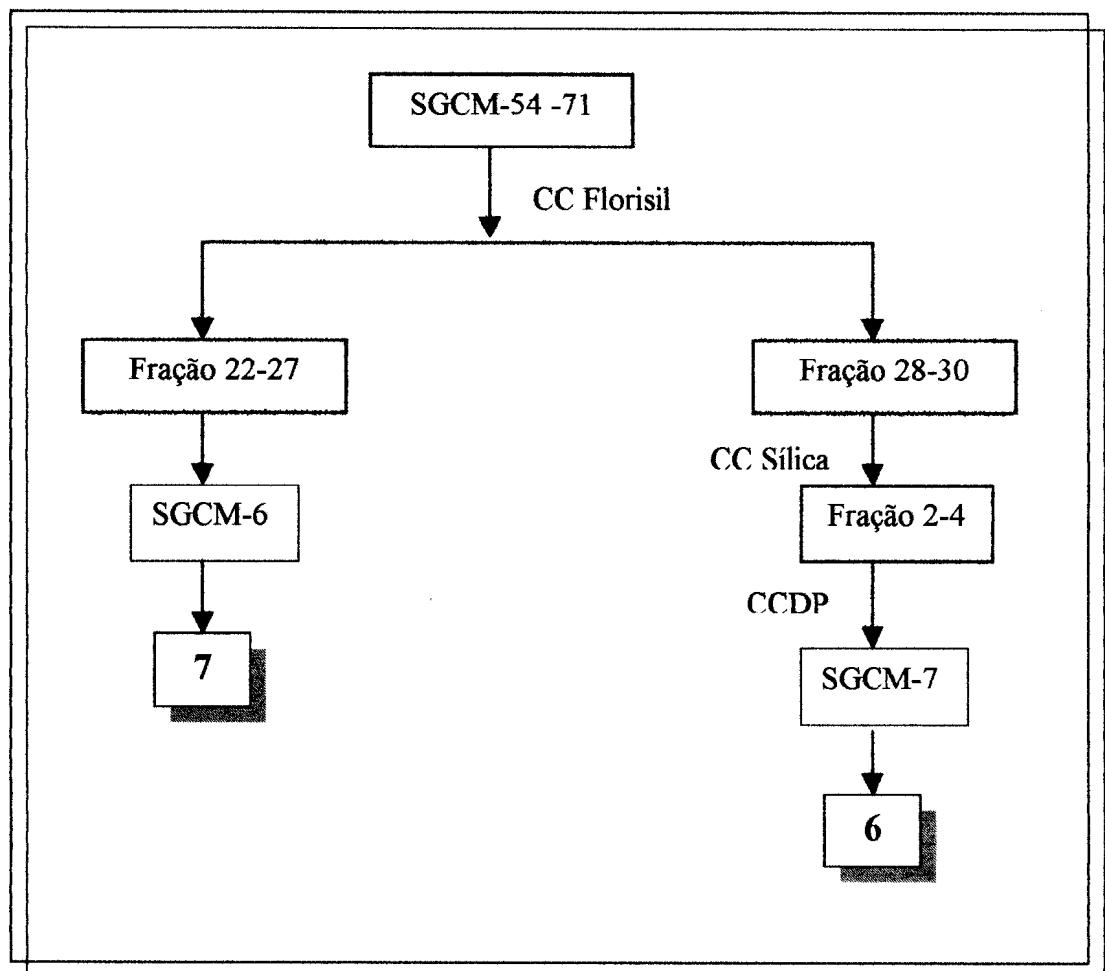
Esquema 5: Marcha para alcalóides.Fracionamento da fração SGCM-33-35.



Esquema 6: Fracionamento cromatográfico da fração SGCM-43-53.

A fração SGCM-54-71 (6,70 g) foi submetida ao fracionamento em coluna de fiorisil (Esquema 7), obtendo-se 48 frações que foram eluídas em clorofórmio e metanol em ordem crescente de polaridade e reunidas através de análise em cromatografia em camada fina analítica revelada em vapores de iodo, luz ultravioleta e reagente de Dragendorff ²¹. Desse fracionamento a fração 22-27 (SGCM-6) forneceu um precipitado de cor amarela (70 mg; PF=175 °C). Através das análises de RMN ¹H e ¹³C e DEPT e comparação com os dados do alcalóide ofiorina B, concluiu-se que SGCM-6 corresponde a este alcalóide.

A fração 28-30 foi submetida à cromatografia em coluna flash de sílica gel, obtendo-se 10 frações. A fração 1 (108 mg) foi fracionada em cromatografia em coluna de sílica gel, fornecendo 12 frações sendo que a fração 2-4 foi fracionada através de cromatografia em camada delgada preparativa. A fração 1 (SGCM-7) foi analisada através de RMN ¹H e após comparação de espectros foi identificado o alcalóide harmana (6) impuro.

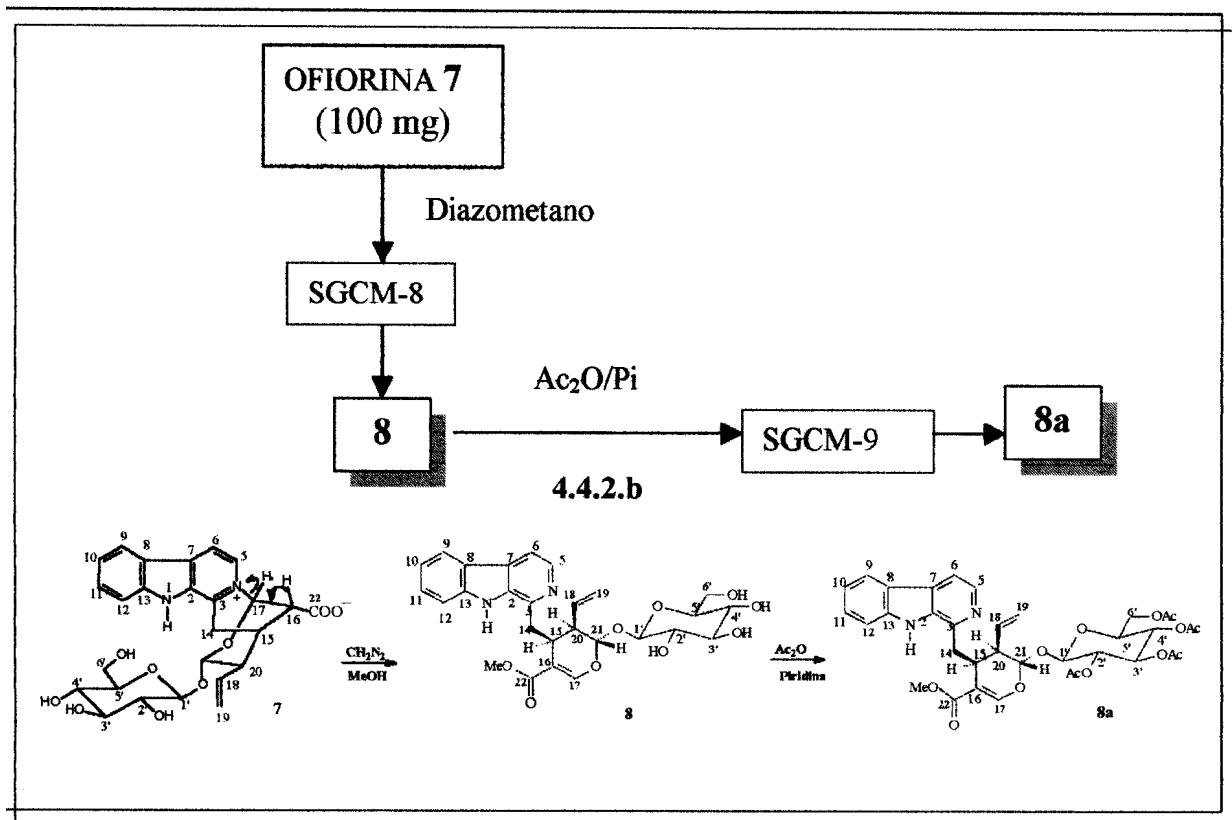


Esquema 7: Fracionamento cromatográfico da fração SGCM-54-71.

4.4 - Reações de derivatização

4.4.1. Metilação

100 mg de 7 foram dissolvidas em metanol e, então, adicionou-se excesso de diazometano. Este reagente foi obtido da destilação de uma solução etérea de N-metil-N-nitroso-sulfonamida (Diazald®) tratada com solução etanólica de hidróxido de potássio. O destilado foi mantido em banho de gelo (Esquema 9). Após a evaporação do solvente, fez-se análise do resíduo com RMN ^1H e ^{13}C , que confirmou a formação do lialosídeo 8 (SGCM-8), 5.2.1., conforme citado na literatura²².



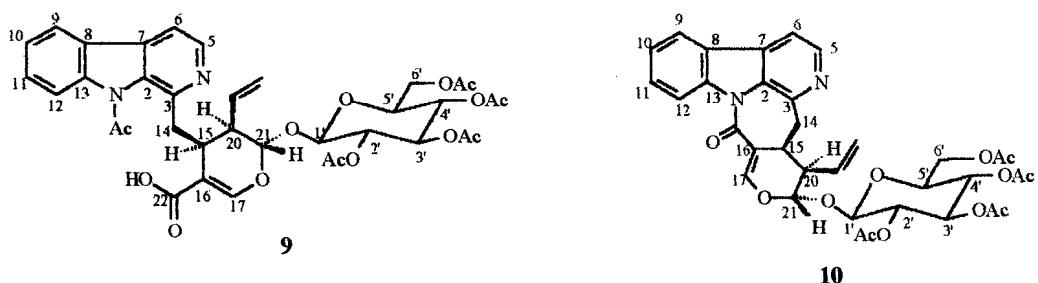
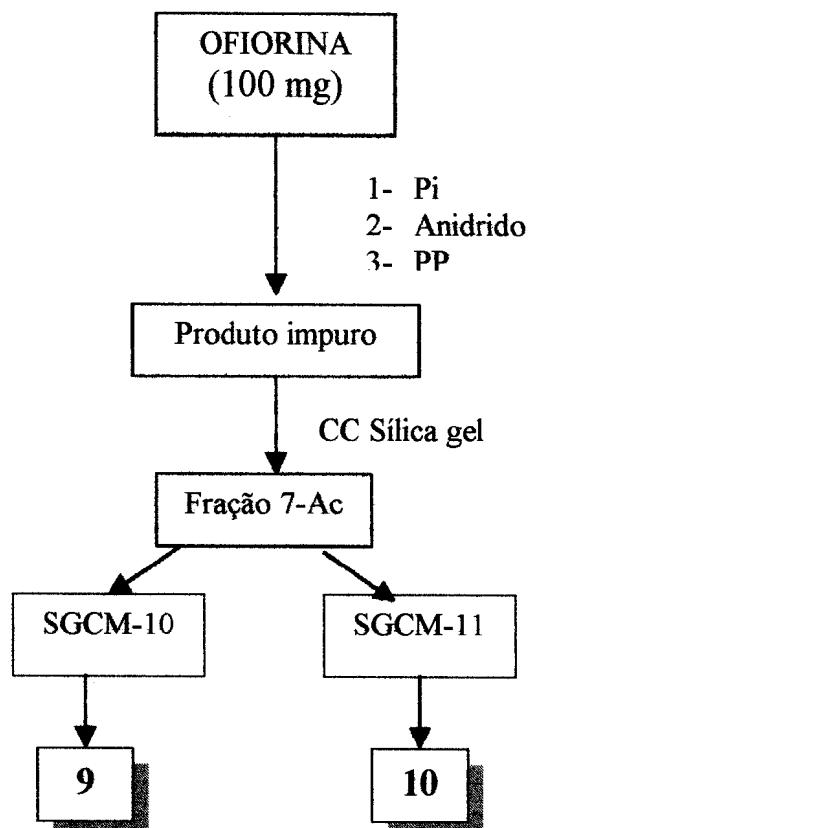
Esquema 8: Reação de preparação dos derivados da ofiorina B (7).

4.4.2. Acetilação

a) Acetilação de 7: 100 mg de 7 foram dissolvidas em piridina (2,0 mL) e adicionado anidrido acético (2,0 mL) e 2 mg de pirrolidinopiridina (PP). A solução foi submetida a refluxo durante 3 horas. Adicionou-se água gelada 4,0 mL e extraiu-se com clorofórmio (3 x 10,0 mL). A solução orgânica foi lavada com HCl (10 %) e com água. Após secagem com sulfato de sódio anidro, o solvente foi evaporado e o resíduo filtrado em coluna de sílicagel, eluída com $\text{CHCl}_3 + \text{MeOH}$ (9:1). A fração 7-Ac (71,6 mg) foi fracionada em camada preparativa de sílica gel (acetato de etila 100 %). As frações 3 (10,3 mg) e 4 (19,5 mg) deste fracionamento revelaram-se puras através de análise som CCDA em diferentes eluentes. Estes produtos foram caracterizados como sendo os derivados acetilados 9 (SGCM-10) e 10 (SGCM-11), respectivamente (Esquema 9).

b) Acetilação de 8: após purificação através de CCDP, 15 mg de 8 Foram dissolvidos em piridina (1mL) e adicionou-se anidrido acético (1mL), Esquema 8). Essa solução ficou em repouso por 24 horas. Adicionou-se água gelada e extraiu-se com CHCl_3 . A solução orgânica foi lavada com HCl para tirar o excesso de piridina e com água, seca com sulfato de sódio anidro e o

solvente evaporado. O produto da reação, lialosídeo acetilado (**8a**) foi analisado através de RMN ¹H e ¹³C (PND e DEPT).



Esquema 9: Reação de acetilação do alcalóide **7**.

4.5. Especificação dos materiais e equipamentos

Os solventes de grau analítico da Merck, Grupo Químico e Vetec, após destilação, foram utilizados para extrações, partições e sistemas cromatográficos.

Para cromatografia em coluna sob pressão atmosférica utilizou-se como adsorvente sílica-gel 60 da Merck, partículas 63-210 μm .

Para CCDA (espessura de 0,25 mm) e CCDP (espessura de 1,0 mm) utilizou-se como adsorvente sílica-gel 60 da Merck. As placas analíticas foram reveladas com vapores de iodo e irradiação no UV (254 e 356 nm). As placas de CCDP foram reveladas com irradiação no UV (254 e 356 nm).

Os espectros de RMN ^1H (1D) e (2D) foram registrados em espectrômetro Bruker AC-200 (^1H : 200 MHz; ^{13}C : 50 MHz); e UN-400 (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz), utilizando-se como solvente CDCl_3 , MeOD_4 , DMSO-d6 e TMS como referência interna. Os deslocamentos químicos foram medidos em unidades ppm (δ) da freqüência aplicada e as áreas relativas dos picos de absorção obtidas por integração eletrônica.

Os espectros de absorção na região do IV foram registrados em espectrômetro Perkin Elmer FT - IR 1600 em pastilhas de KBr. Os valores para as absorções foram medidos em unidades de números de ondas (cm^{-1}) e

os espectros calibrados com filme de poliestireno de 0,5 cm de espessura, utilizando a absorção em 1601 cm^{-1} como referência.

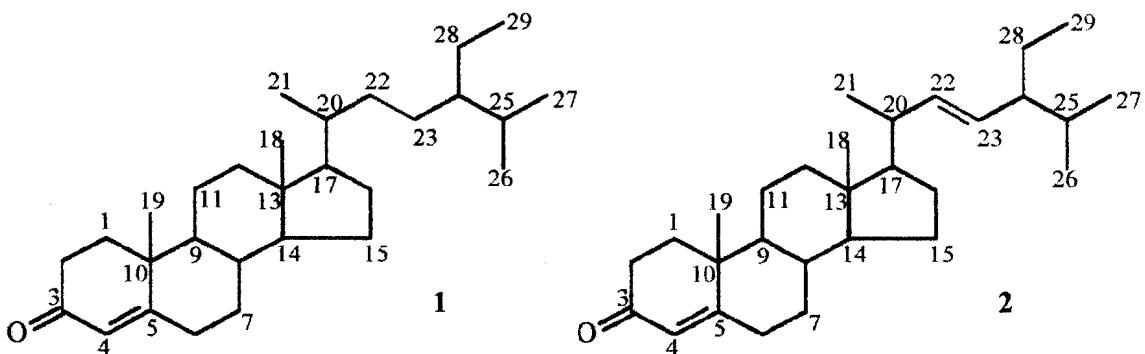
Os espectros de massas foram registrados em um espectrômetro VG Quattro-Gc 8000 Triploquadrupolo/GD/MS-MS - da Fisions Instruments.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Determinação estrutural dos constituintes isolados

5.1.1. Extrato hexânico

5.1.1.1. Determinação estrutural de 1 + 2



Os compostos 1 e 2 foram obtidos em mistura e identificados através da análise dos espectros de RMN e da comparação com dados da literatura^{23,24}. O espectro de RMN ¹H (fig. 1) revela a presença de vários sinais em campo alto, entre 0,6 a 1,5 ppm, correspondentes aos hidrogênios metílicos e metilênicos de esteróides. O multiplet em δ_H 5,1 corresponde aos hidrogênios olefínicos CH-22 e CH-23 de 2 e o singlet em 5,69 ao H-4 da enona. Os espectros de RMN ¹³C (PND e DEPT), (fig.2-3) revelam a presença de sinais de um carbono quaternário olefínico atribuído ao C-5 (δ_C 171,7), um carbono

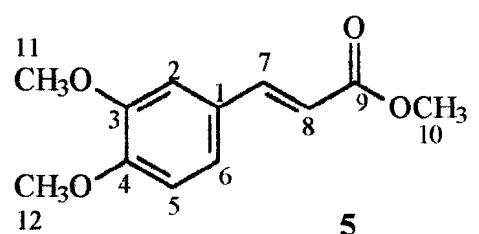
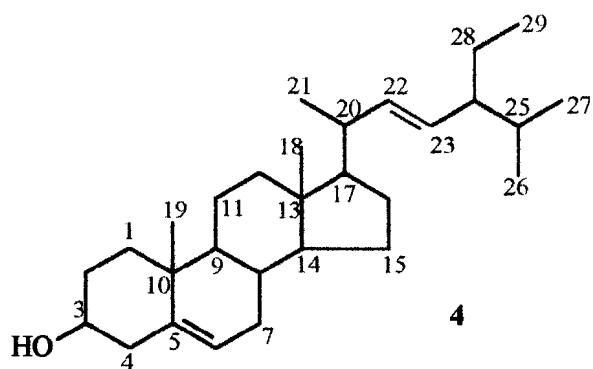
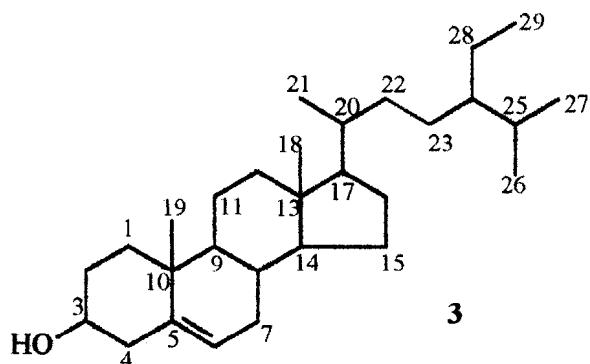
carbonílico C-3 (δ_c 199,6), um carbono olefínico metínico CH-4 (δ_c 123,7) e dois adicionais em δ_c 138,1 e δ_c 129,3, correspondentes aos carbonos CH-22 e CH-23 da estigmastenona (2), (Tabela3). Estes dados e a comparação dos demais valores com os da literatura permitiram identificar a sitostenona (1) e a estigmastenona (2) como componentes da fração analisada^{23,24}.

Tabela 3: Comparação dos dados de deslocamentos químicos de **1** e **2** com dados da literatura^{23,24}.

C	1 δ_C	2 δ_C	Sitostenona δ_C	Estigmasterona δ_C
5	171,7			171,0
10	38,5			38,8
13	42,3			42,4
3	199,6			198,9
CH				
6	32,9			32,9
8	35,5			35,7
9	53,7			53,8
14	55,8			55,9
17	55,9			56,1
20	36,0	40,4	35,7	40,5
22	-	138,0	-	138,4
23	-	129,3	-	129,3
24	45,7	51,2	45,0	51,3
25	29,0	31,3	27,9	22,5
CH ₂				
1	35,6			35,7
2	33,9			33,9
4	123,7			123,6
7	31,9			32,1
11	20,9			21,0
12	39,5			39,4
15	24,1			24,1
16	28,1			28,1
22	33,9	-	36,1	-
23	26,9	-	26,0	-
28	22,9	25,4	23,0	22,8
CH ₃				
18	11,8			12,0
19	17,3			17,4
21	18,6	21,3	18,7	21,1
26	18,9	21,2	19,1	22,5
27	19,7	19,0		19,0
29	11,9			12,3

5.1.2. Extrato metanólico

5.1.2.1. Determinação estrutural de 3 + 4 + 5



Os esteróides 3 e 4 foram obtidos numa mistura que pela análise por CCDA eluída em vários solventes revelou numa única mancha.

O espectro de RMN ^1H (Fig. 4) revela vários sinais na região entre δ_{H} 0,6-1,8 correspondentes aos grupos metílicos e metilênicos dos esteróides. O multiplet em δ_{H} 3,5 corresponde ao hidrogênio carbinólico H-3, o singuleto largo em δ_{H} 5,4 corresponde ao hidrogênio olefínico H-6 de (3) e (4) e o multiplet em torno de δ_{H} 5,1 corresponde aos hidrogênios olefínicos dos carbonos 22 e 23 para o estigmasterol (4), Tabela 4. Estes dados e os sinais de deslocamento químico dos carbonos olefinicos, carbinólicos e alifáticos foram comparados com a literatura²⁴.

Os espectros de RMN ^{13}C PND e DEPT (Fig. 5-6) revelam a presença de sinais de carbonos olefínicos metínicos atribuídos aos carbonos CH-6 (δ_{C} 121,7) do sitosterol (3) e estigmasterol (4), CH-22 (δ_{C} 138,3) e CH-23 (δ_{C} 129,2) do estigmasterol (4), um carbono quaternário olefínico atribuído ao C-5 (δ_{C} 140,7) e um carbono carbinólico metínico CH-3 (δ_{C} 71,8) pertencentes aos dois esteróides. Os sinais adicionais no espectro de RMN ^1H (fig. 4) da fração contendo 3 e 4 sugerem a presença de uma unidade aromática na amostra. Os sinais de doubletos em δ_{H} 7,6 (H-7; J=15,9 Hz) e outro em δ_{H} 6,3 (H-8; J= 15,9 Hz) formam um sistema AB da unidade cinamoíla de (5). Os sinais de grupos metoxílicos e o valor do deslocamento químico δ_{C} 71,78 do C-

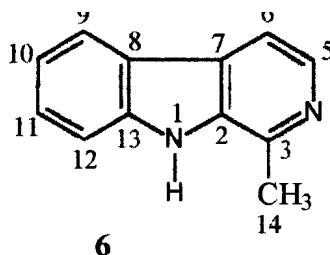
3 de 3 e 4 permitiu descartar a possibilidade de ésteres aromáticos de esteróides. A adição de NaOH na solução da mistura em CHCl₃ e posterior agitação, não forneceu substância orgânica na fase aquosa, confirmando assim, a ausência de ácido ou fenol nesta fração. Além dos sinais citado acima, aparecem multipletos em 6,8 e 7,0 ppm no espectro de RMN ¹H que são correspondentes a hidrogênios de anel aromático H-2, H-5 e H-6. Os sinais de menor intensidade presentes no espectro de RMN ¹³C (fig. 5), δ_C 168 (C-9), 145 (C-7), 123 (C-6), 115,5 (C-2), 115,2 (C-8), 109 e 51,6 (C-10 foram comparados com os dados da literatura 25 (Tabela 4). Os sinais em δ_H 3,89, 3,70 e 3,60 permitem sugerir a presença do 3,4-dimetoxicinamato de metila (5) como um componente da mistura.

Tabela 4: Comparação dos dados de deslocamentos químicos de **3**, **4** e **5** com dados da literatura²³.

C	3 δ_C	4 δ_C	Sitosterol δ_C	Estigmasterol δ_C	5 δ_C	3,4dimetoxi cinamato de metila δ_C
5	140,7			140,7	115,5	115,8
10	36,5			36,5	51,3	*
13	42,3		42,3	42,2	-	-
CH						
3	71,8			71,8	138,8	148,2
6	121,7			121,7	123,2	123,2
8	31,9			31,9	115,2	114,6
9	50,1			50,1	168,0	166,9
14	56,8	56,8		56,8	-	-
17	55,9	55,9	56,0	55,9	-	-
20	37,1	40,4	36,1	40,5	-	-
22	-	138,3	-	138,3	-	-
23	-	129,2	-	129,2	-	-
24	45,8	51,2	45,0	51,2	-	-
25	29,1	31,9	29,1	31,9	-	-
CH ₂						
1	37,2			37,2	130,0	125,9
2	31,6			31,6	109,2	11,5
4	42,2			42,3	148,3	148,6
7	31,9			31,9	145,0	145,4
11	21,0			21,1	55,9	*
12	39,8		39,8	39,7	55,9	55,1
15	24,3		24,3	24,4	-	-
16	28,2		28,2	28,9	-	-
22	33,9	-	33,9	-	-	-
23	25,9	-	26,0	-	-	-
28	22,9	25,4		23,0	25,4	-
CH ₃						
18	11,8		11,9	11,9	12,0	-
19		19,4		19,4	-	-
21	18,9		19,8	18,8	21,1	-
26	19,4		19,8	19,8	21,1	-
27	19,4		21,0		-	-
29		11,9		12,0	12,3	-

* Sinais não observados

5.1.2.2. Determinação estrutural de 6



O espectro de RMN ¹H de 6 (fig. 7) mostrou sinais de hidrogênios aromáticos que compõem a unidade β-carbolínica. Esta dedução foi facilitada pela análise do espectro de RMN 2D [¹Hx ¹H-COSY] (fig. 8), que permitiu identificar as interações de acoplamento entre o triplete em 7,20 (H-10) com os sinais em 7,51 (t, H-11) e 8,20 (d, H-9), de 7,51 (H-11) com 7,59 (d, H-12) e dos doubletos (*J*= 6Hz) em 7,85 (H-6) e 8,25 (H-5), que acoplam entre si. Estas deduções estão de acordo com a unidade aromática citada acima. O singuleto em δ_{H} 2,77 corresponde aos hidrogênios metílicos de C-14, cujo deslocamento químico no espectro de RMN ¹³C é 20,2 (Fig. 9).

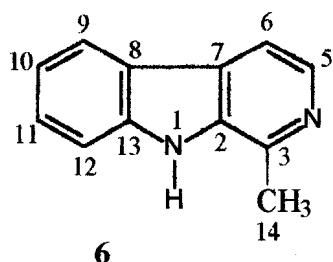
Os sinais de deslocamento químico de CH, CH₃ de 6 foram deduzidos através dos experimentos de RMN ¹³C DEPT (fig. 9), que confirmam a presença de 6 x CH e 1 x CH₃. O espectro de ¹H x ¹³C-COSY- ¹J_{CH} (fig. 10) permitiu a atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono e hidrogênio ligados entre si: CH-5 (δ_{C} = 138,3 e $\delta_{\text{H}}= 8,25$), CH-6 ($\delta_{\text{C}}=113,4$ e

$\delta_H = 7,85$), CH-9 ($\delta_C = 121,8$ e $\delta_H = 8,20$), CH-10 ($\delta_C = 120,0$ e $\delta_H = 7,20$), CH-11 ($\delta_H = 128,2$ e $\delta_H = 7,51$) e CH-12 ($\delta_H = 111,6$ e $\delta_H = 7,59$). Os deslocamentos químicos dos carbonos quaternários foram confirmados através das correlações heteronucleares a longa distância, (Fig.11), $^1H \times ^{13}C$ -COSY, C-3 ($\delta_C = 141,4$; $^2J_{CH}$: H-14 e $^3J_{CH}$: H-5); C-13 ($\delta_C = 140,8$; $^3J_{CH}$: H-9 e H-11); C-2 ($\delta_C = 134,7$; $^3J_{CH}$: H-14 e H-6); C-7 ($\delta_C = 128,3$; $^3J_{CH}$: H-5 e H-9); C-8 ($\delta_C = 121,8$; $^3J_{CH}$: H-12).

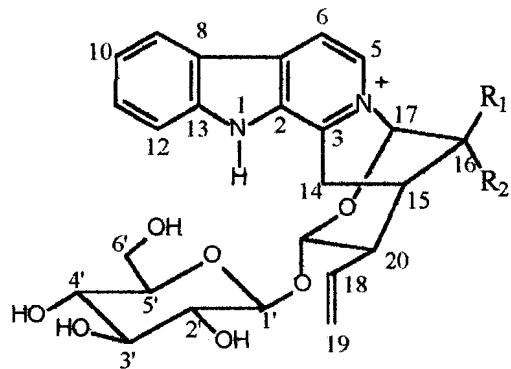
O dicionário de produtos naturais usa a nomenclatura: 1-metil-9H-pirido(3,4-b)indol para a harmania 26. Esta seria a numeração correta a ser usada. Entretanto, para facilitar as comparações dos valores e as discussões posteriores usamos a numeração semelhante à empregada pela literatura^{14,25} nos trabalhos relacionados a alcalóides β -carbolínicos como, por exemplo, as ofiorinas A (7a) e B (7), maxonina [X], entre outros.

Tabela 5: Comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **6** com os valores descritos na literatura para o alcalóide harmana²⁵.

C	δC		δH	
	Harmana	6	Harmana	6
2	140,5	140,8	-	-
3	142,0	141,4	-	-
7	121,1	121,8	-	-
8	127,2	128,3	-	-
13	134,6	134,7	-	-
CH				
5	137,3	138,3	8,38	8,25 (d,J=5,2)
6	112,2	113,4	7,83	7,85 (d,J=5,2)
9	121,2	121,8	8,13	8,20 (s l)
10	119,0	120,0	7,29	7,20 (s l)
11	127,5	128,2	7,50	7,51 (s l)
12	111,5	111,6	7,51	7,59 (s l)
HN-1	-	-	-	10,65 (sl)
CH ₃				
14	18,4	20,3	-	2,77 (s)



5.1.2.3. Determinação estrutural de 7



7: $R_1 = H$; $R_2 = COO^-$

7a: $R_1 = COO^-$; $R_2 = H$

O espectro de IV de 7 (Fig. 12) apresenta bandas de absorção em: 3380, 2924, 1631, 1594, 1525 e 1455 cm^{-1} , de estiramento O-H, C=C, C-O.

O espectro de RMN 1H (Fig. 13) de 7 mostra sinais de seis hidrogênios aromáticos correspondentes à unidade carbolínica. Os sinais de interação de acoplamento presentes no espectro de RMN de 1H (2D, $^1Hx^1H$ -COSY), (Fig.14-14a), permitem confirmar a presença da unidade aromática (β -carbolínica) com seis hidrogênios. Estes sinais revelam as interações de acoplamento abaixo que justificam a proposta desta unidade:

- o H-10 (δ 7,12, t, 8 Hz) acopla com o H-11(δ 7,42, t, 8 Hz) e com H-9 (δ 8,05, d, 8 Hz).
- o H-11(δ 7,42, t, 8 Hz) acopla com o dubbleto em δ 7,53 (H-12).

- c) os sinais em 8,29 (H-6) e em 8,57 (H-5, d, 6 Hz) formam um sistema AB de dois hidrogênios vizinhos pertencentes a um heterociclo nitrogenado, (Fig. 14a).
- d) as observações feitas nos itens a e b confirmam a sustentação de 4 hidrogênios vizinhos de um mesmo anel aromático.

Os sinais de interação presentes nos espectros RMN ^{13}C com DEPT, 2D [HMQC ($^1\text{J}_{\text{CH}}$) e HMBC ($^{2,3}\text{J}_{\text{CH}}$)], (Figs. 16, 17 e 18, respectivamente) permitiram identificar os deslocamentos químicos dos carbonos protonados e dos carbonos quaternários desta unidade aromática ($\text{C}_{11}\text{H}_6\text{N}_2$), Tabela 6. A análise dos espectros de RMN $^1\text{H}-x^{13}\text{C}$ -COSY, conduziu às deduções a seguir:

- a) O grupo vinila foi identificado pelos sinais dos carbonos: metínico δ 136,70 (C-18), ligado ao hidrogênio que absorve em δ 5,88 (H-18, ddd; 6,4; 10,8 e 17,2 Hz), e metilênico δ 120,08 (C-19), ligado aos hidrogênios representados pelos sinais em 5,31 (H-19a; d, 11,2 Hz) e 5,27 (H-19b; d, 18,0 Hz), (Fig. 17a);
- b) A unidade de glicose foi proposta através dos sinais δ_{C} 98,90 (C-1'), ligado ao hidrogênio que absorve em δ 4,24 (d; 8,0 Hz) e dos carbonos metínicos δ_{C} 73,25 (C-2'), 76,86 (C-3'), 66,95 (C-4'), 77,19 (C-5') e metilênico 60,70 (C-6'). Os sinais de interação a uma ligação permitiram

identificar os deslocamentos químicos dos hidrogênios desta unidade glicosídica, $C_6H_{11}O_6$, (Fig. 17-17a);

c) Após a identificação das unidades descritas acima, fez-se comparação dos dados espectrométricos desta substância com valores registrados na literatura para alcalóides β -carbolínicos glicosilados^{22,25}.

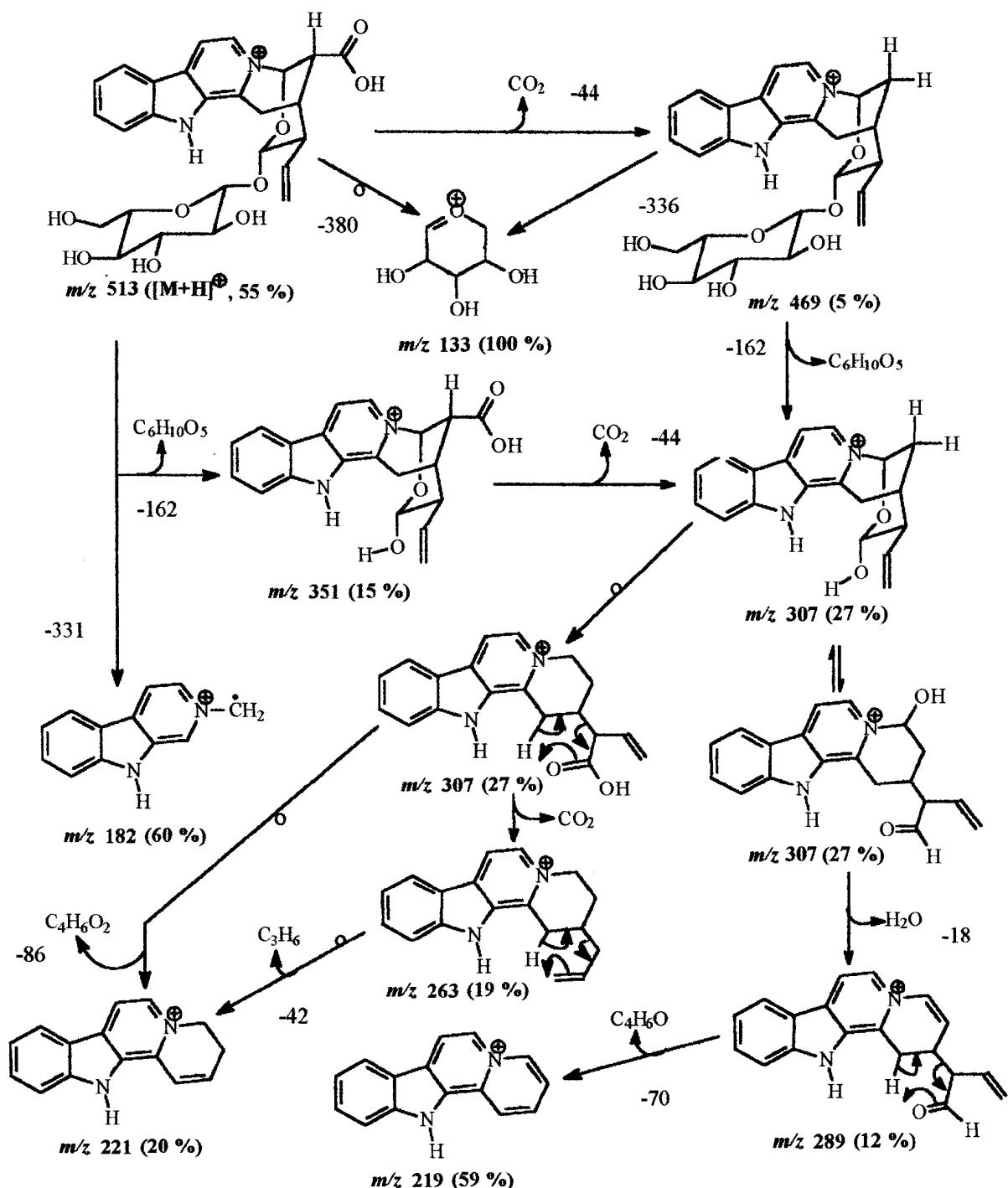
Constatou-se que os sinais remanescentes nos espectros de RMN ^{13}C (fig. 15) δ_C 94,3 (C-21), 89,1 (C-17), 47,2 (C-20), 46,2 (C-16) e 30,8 (C-15) e um sinal de carboxila em δ_C 170,6 (C-22) são semelhantes aos do alcalóide ofiorina. O sinal do CH_2 -14 não foi detectado no espectro registrado em D_2O , (Fig. 22, tabela 7), mas o valor 24,4 (CH_2) detectado no espectro obtido em DMSO (Fig. 15, tabela 6) foi atribuído a este carbono. O valor do pico molecular m/z 513 (55%, $C_{26}H_{29}O_9N_2$), revelado pelo espectro de massas-FAB (Fig.20) está de acordo com a estrutura desta substância. A análise comparativa dos dados obtidos dos espectros de RMN 1H e ^{13}C (Tabelas 7 e 8) registrados em D_2O , incluindo experimentos 1D e 2D, permitiu verificar as diferenças dos deslocamentos químicos dos carbonos 20 e 16, confirmando que o C-16 está mais protegido que o C-20, e não o contrário conforme a literatura^{22,27} (fig. 25, pág. 119); e dos carbonos 3, 7 e 13 (fig. 18, pág. 111). Propondo uma atribuição inequívoca destes carbonos, uma vez que os valores dos deslocamentos químicos da literatura foram atribuídos apenas com base

em experimentos unidimensionais^{229,27}. Estas observações permitiram distinguir entre os dois epímeros ofiorinas A (7a) e B (7) e caracterizar o alcalóide indólico 7 como ofiorina B (Tabela 7).

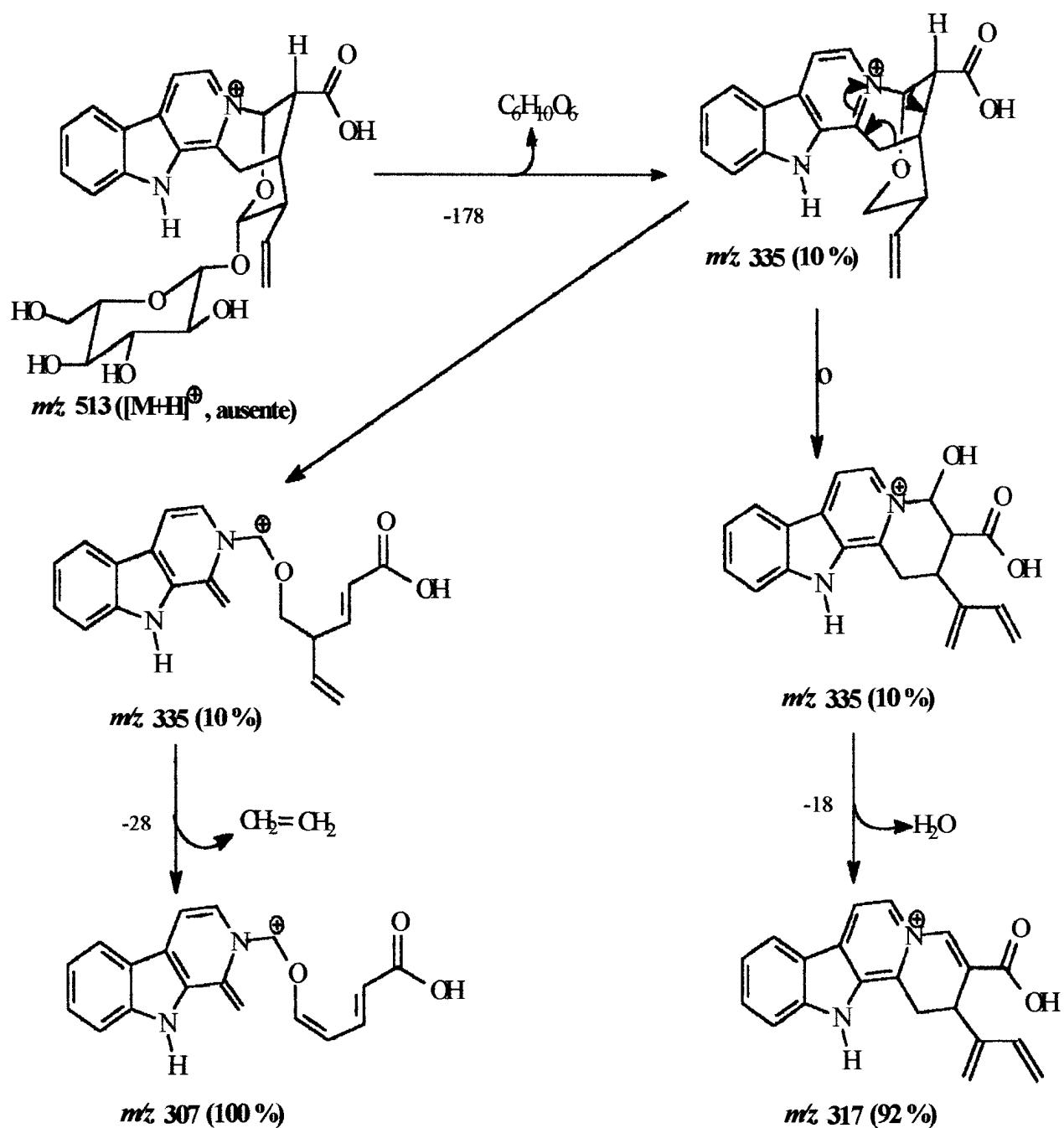
A leitura da rotação óptica de 7, $[\alpha]_D = -13,95$ ($c=0,043$, MeOH), permitiu postular a configuração (-)ofiorina B para 7 e identificá-la como o enantiômero da ofiorina B registrado na literatura²⁰, $[\alpha]_D = + 18,0$. Levando-se em consideração que apenas o enantiômero (+)ofiorina B está registrado na literatura, pode-se destacar o alcalóide 7 isolado no presente trabalho como sendo inédito na literatura.

A análise detalhada dos espectros de massas confirma a facilidade de fragmentação desta substância. O espectro obtido com ionização por FAB (glicerol como matriz - Esquema 10) revela sinais cuja interpretação permite deduzir diferenças significativas de fragmentação quando se usa a ionização química (IQ - Esquema 11, Fig. 19)). Este espectro mostra o pico $[M+1]$ em m/z 513 (55%), $C_{26}H_{29}O_9N_2$, e os picos adicionais observados em m/z 469 [5%, m/z 513 - 44 (CO_2), $C_{25}H_{29}O_7N_2$], 351 [15%, m/z 513 - 162 ($C_6H_{10}O_5$)], $C_{20}H_{19}O_4N_2$], 307 [27%, m/z 513 - 44(CO_2) - 162 ($C_6H_{10}O_5$) e/ou m/z 513 - 162 ($C_6H_{10}O_5$) - 44(CO_2), $C_{19}H_{19}O_2N_2$], 219 [59%, $C_{15}H_{11}N_2$], 221 [20%, 307 - $C_4H_6O_2$], que confirma a perda da unidade alifática, 182 [60%, $C_{12}H_{10}N_2$] e 133 [100%, $C_5H_9O_4$]. Os íons fragmentários 219 e 221 são justificados através

do rearranjo de McLafferty e perde, respectivamente, C_4H_6O e C_3H_6 da unidade terpênica. No espectro com ionização química, (Fig. 19) o pico $[M+1]$ m/z 513 não foi observado e os picos principais aparecem em m/z 335 [10%, m/z 513 ($C_{26}H_{29}O_9N_2$) – 178 ($C_6H_{10}O_6$), m/z 329 [27%, m/z 513 – 184 ($C_5H_{12}O_7$), $C_{21}H_{17}O_2N_2$], 317 [92%, m/z 335 - 18 (H_2O), $C_{20}H_{17}O_2N_2$] e 307 [100%, m/z 335 - 28 ($CH_2=CH_2$), $C_{18}H_{15}O_3N_2$]. Estes picos são atribuídos a fragmentos formados através de reações relativamente simples, informativas e previstas pela estrutura. Estas interpretações revelam que a técnica IQ gera fragmentos diferentes da técnica FAB e, entretanto, o uso de valores de íons fragmentários para propor estruturas de alcalóides que tenham unidades adicionais, como terpenoídicas e glicosídicas, não pode conduzir a resultados conclusivos.



Esquema 10: Proposta de fragmentação do alcalóide 7 no espectrômetro de massas usando ionização por FAB (modo positivo, glicerol como matriz).



Esquema 11: Proposta de fragmentação do alcalóide 7 no espectrômetro de massas usando ionização química (IQ).

Tabela 6 : Dados de RMN ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz), incluindo 2D[$^1\text{H},^1\text{H}$ -COSY; HMQC e HMBC] de **7** em DMSO.

C	HMQC		HMBC	
	δC	δH	^2JCH	^3JCH
2	132,8	-	-	H-6
3	138,8	-	-	H-5,H17
7	130,9	-	-	H-5,H9
8	118,1	-	-	-
13	144,1	-	-	H-9,H-11
22	170,6	-	-	-
CH				
5	133,3	8,58 (d,J=6,8)	H-6	-
6	115,8	8,27 (d,J=6,8)	H-5	-
9	122,8	8,07 (d,J=8,0)	-	H-11
10	120,9	7,10 (t,J=8,0)	-	-
11	130,8	7,42 (t,J=8,0)	-	-
12	113,3	7,55 (d,J=8,0)	-	H-10
15	30,8	3,12 (m)	-	
16	46,2	3,33	-	H-14
17	89,0	6,58 (s l)	-	H-5
18	134,5	5,88 (dd,J=6,4;10,8;17,2)	2H-19	-
20	47,2	2,68 (m)	-	2H-19
21	94,2	4,65 (d,J=9,6)	-	H-1'
1'	98,9	4,24 (d,J=8,8)	H-2'	H-21
2'	73,1	2,85 (t,J=8,8)	H-3'	-
3'	76,7	2,99 (m)	H-2', H-4'	-
4'	69,9	2,83 (m)	H-3'	-
5'	77,0	2,75 (m)	H-4'	-
CH ₂				
14	24,3	3,59	-	-
		3,96		
19	119,2	5,25 (d,J=11,2)	-	-
		5,35 (d,J=18,0)		
6'	60,7	3,01	-	-
		3,22		

Tabela 7: Comparação dos dados de ^{13}C RMN de **7** com os valores descritos na literatura para as ofiorinas A e B (em D_2O)^{22,27}.

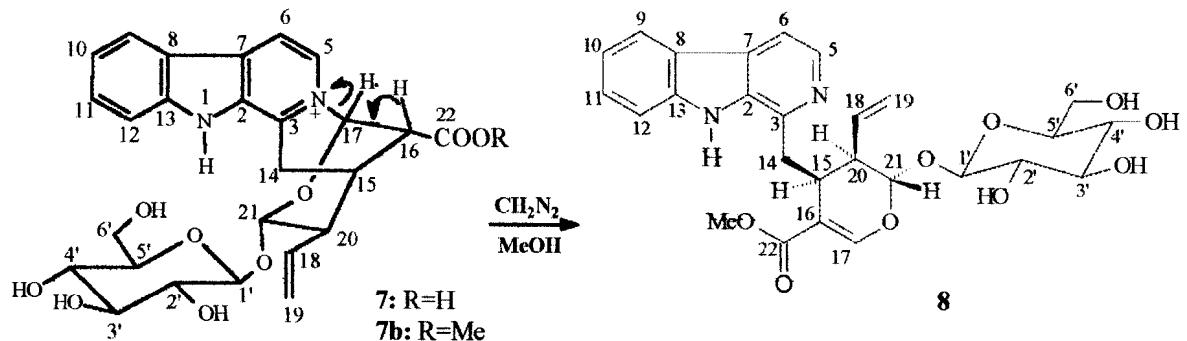
C	7 (100MHz)	A ²² (67.5MHz)	B ²² (67.5MHz)	A ²⁷ (67.5MHz)	B ²⁷ (67.5MHz)
2	134,70	134,80	135,60	135,10	135,20
3	137,81	146,40	146,40	145,40	145,00
7	132,47	140,20	140,40	139,20	138,70
8	119,64	122,10	121,90	120,90	120,30
13	144,26	135,80	134,70	134,00	134,30
22	175,02	176,90	177,40	176,30	176,00
CH					
5	133,64	136,90	136,80	135,00	133,90
6	117,17	135,90	135,80	118,50	117,50
9	123,36	124,60	124,60	124,60	123,90
10	122,54	119,20	119,20	123,80	122,80
11	132,69	125,50	125,50	133,80	133,70
12	113,27	115,40	115,30	114,50	113,80
15	31,04	33,00	33,00	32,40	31,40
16	46,59	49,80	47,40	49,00	45,70
17	89,44	91,70	91,50	90,80	90,00
18	134,70	134,80	134,80	136,00	135,60
20	47,64	48,80	46,00	47,90	44,30
21	96,22	98,20	98,20	97,50	96,70
1'	99,71	101,80	102,20	101,00	107,00
2'	73,15	75,40	75,40	74,50	73,70
3'	76,19	78,80	78,90	77,50	76,60
4'	70,15	72,20	72,20	71,10	70,50
5'	76,26	78,40	78,30	78,10	77,60
CH ₂					
14	23,50	26,00	29,10	25,20	28,00
19	120,08	121,90	122,30	121,40	120,60
6'	61,06	63,30	63,20	62,40	61,60

Tabela 8 : Dados de RMN ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz), incluindo 2D[$^1\text{H},^1\text{H}$ -COSY; HMQC e HMBC] de **7** em D_2O .

C	HMQC		HMBC	
	δC	δH	^2JCH	^3JCH
2	134,7	-	-	H-6
3	137,8	-	-	H-5,H17
7	132,7	-	-	H-5,H9
8	119,6	-	-	H-6,H-10,H-12
13	144,3	-	-	H-9,H-11
22	175,2	-	H-16	-
CH				
5	133,6	8,28 (d,J=6,8)	H-6	H-17
6	117,2	7,97 (d,J=6,8)	H-5	-
9	123,4	7,67 (d,J=8,0)	-	H-11
10	122,5	7,05 (t,J=8,0)	-	
11	132,7	7,41 (t,J=8,0)	-	-
12	113,3	7,16 (d,J=8,0)	H-11	H-10
15	31,4	3,10 (m)	-	
16	46,6	3,39	-	H-14
17	89,4	6,48 (s l)	H-16	H-5
18	134,7	5,76 (dd,J=6,4;10,8;17,2)	2H-19	-
20	47,6	2,78 (m)	-	2H-19,H-16,H-1'
21	96,2	4,53 (d,J=9,6)	-	H-17,H-18
1'	99,7	4,34 (d,J=8,8)	H-2'	-
2'	73,2	2,99 (t,J=8,8)	H-3'	-
3'	76,2	3,17 (m)	H-2'	-
4'	70,2	3,01 (m)	H-3'	-
5'	76,3	2,90 (m)	H-4'	-
CH ₂				
14	23,5	3,40	-	-
19	120,1	5,19 (d,J=10,8) 5,20 (d,J=17,2)	-	-
6'	61,1	3,25 (dd,J=2;12) 3,20 (dd,J=6;12)	-	-

5.2. Determinação estrutural dos derivados

5.2.1. Derivado metilado 8



A reação de 7 com diazometano forneceu o éster metílico resultante da perda do H-16 pela ação da base formando o produto metilado 8. Este produto é conhecido como lialosídeo, e foi obtido com o mesmo procedimento da literatura para confirmar a proposta estrutural de 7^{22,25,28}.

A identificação de 8 foi conduzida através da análise dos espectros de RMN ¹H e ¹³C (Fig. 27-29). O espectro de RMN ¹Hx¹H-COSY, (Fig. 28a) mostra sinais de interação dos hidrogênios do sistema aromático. O multiplet em 7,53 ppm com integração para 3 hidrogênios, que estão acoplando com o H-10 (7,2, m) e com o doubleto do H-12 (7,54, d, 7 Hz), revelando a presença do H-11, e o hidrogênio adicional corresponde ao H-17 (7,49, s) da enona de

8. Os demais sinais interpretáveis no espectro de RMN ^1H em MeOD_4 estão de acordo com os sinais dos hidrogênios do produto. Os sinais mais intensos do espectro de RMN ^{13}C (Fig. 29-31) foram comparados com os deslocamentos químicos do lialosídeo da literatura e serviu para garantir a formação de 8. Estes sinais são, (Tabela 9):

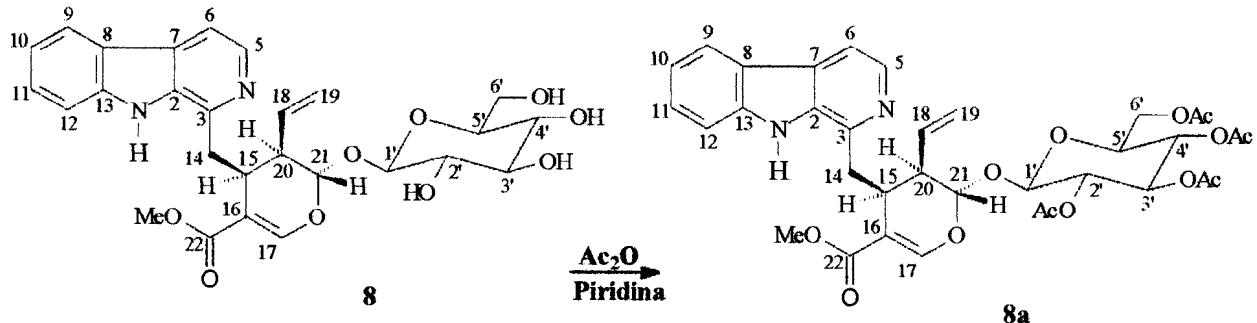
- a) o sinal de CH em 154,0 do carbono C-17 β -oxigenado da enona (Fig. 29);
- b) os sinais de carbonos quaternários em δ_{C} 169,4 (C-22) e 110,1 (C-16) justifica a enona (Fig. 29);
- c) o sinal em δ_{C} 90,6 (C-17) é de pouca intensidade e, revelado pertencentes a impureza (original metilado, 7b) e não de 8, (Fig. 31).
- d) Presença de apenas dois sinais de CH (sp^3) em 34,3 (C-15) e 45,3 (C-20); o sinal em 31,6 ppm corresponde ao CH-15 de 7b.
- e) os demais sinais justificam a formação do produto rearranjado (8) contendo a ofiorina metilada (7b) como impureza, (Fig. 31).
- f) o produto 8a forneceu espectros com melhor resolução e serviu para confirmar o produto 8.

Tabela 9: Dados de RMN ^{13}C de **8** e comparação com valores descritos na literatura²⁵.

C	δC	δH		
		Lit.(DMSO-d ₆)	8 (CDCl ₃)	Lit.(DMSO-d ₆)
2	140,3	142,3	-	-
3	143,8	145,1	-	-
7	121,0	122,5	-	-
8	126,9	124,7	-	-
13	134,6	135,3	-	-
16	109,9	110,9	-	-
C=O	166,6	169,4	-	-
CH				
5	137,3	137,8	8,45	8,18
6	112,4	114,1	8,05	7,92(d,J=5,2)
9	121,5	120,7	8,40	8,14(d,J=7)
10	119,0	119,2	7,40	7,24(ddd,J=8;6;2)
11	127,6	129,8	7,70	7,50
12	111,8	112,8	7,75	7,54
15	30,1	34,3		*
17	151,6	154,0	7,61	7,52(sl)
18	134,0	134,7	5,95	5,85(m)
20	42,9	45,4	3,05	*
21	95,9	97,4	5,80	*
1'	98,8	100,1	4,85	*
2'	73,1	74,5	3,05 a 3,65	*
3'	77,3	77,9		*
4'	70,1	71,5		*
5'	76,8	78,4		*
CH ₂				
19	118,6	119,4	5,10	*
			5,30	
14	32,1	30,6	3,00	5,71(d,J=6)
			3,40	
6'	61,2	62,7	3,78	*
			3,90	
CO ₂ Me	50,6	51,6	3,85	*

* Sinais não observados

5.2.2. Derivado acetilado 8a

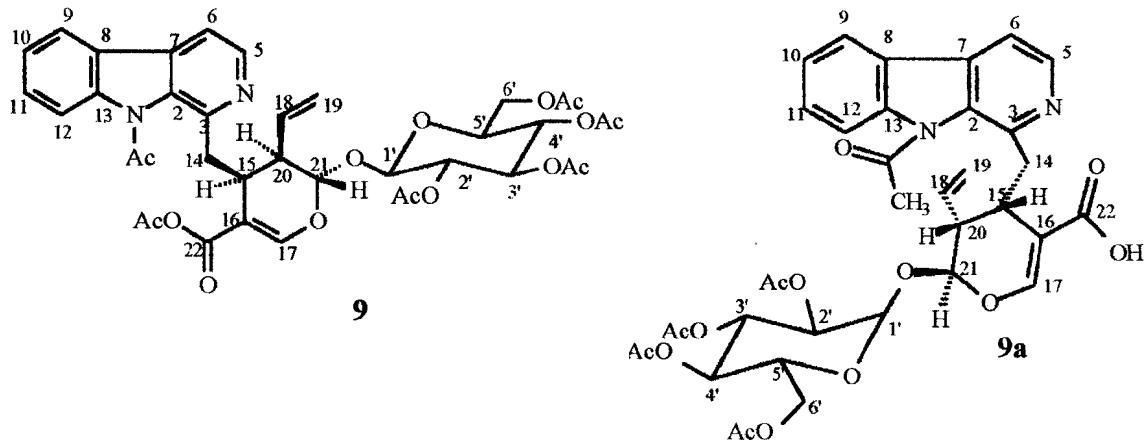


O produto 8 foi acetilado com anidrido acético e piridina e purificado através de cromatografia em camada delgada preparativa. Obteve-se 8a, correspondente ao acetato de lialosídeo metilado e serviu para confirmar a formação do produto identificado acima, tetra-O-acetyl lialosídeo²⁸. A tabela 10 mostra os deslocamentos químicos revelados nos espectros de RMN ¹H e ¹³C PND e DEPT de 8a, (Fig. 32-34). Foram fundamentais para a confirmação do produto, os sinais da enona δ_{C} (Fig. 33): 152,2 (CH-17), 110,17 (C-16), 168,6 (C-22) e os sinais de quatro metilas δ_{H} (Fig. 32): 1,9 (s, 3 x CH₃) e 2,0 (s, 1 x CH₃) e δ_{C} : 20,5. Além dos sinais de carbono carbolínico em δ_{C} 168,6 (C-22), 170,6, 170,2, 169,3 e 168,8 correspondentes às carbonilas dos acetatos (Fig. 33). Os demais sinais são semelhantes aos do lialosídeo descrito na literatura, (Fig. 33). Os derivados 8 e 8a já foram descritos na literatura^{25,28}.

Tabela 10: Comparação dos dados de ^{13}C RMN de com valores descritos na literatura²⁸ para o derivado acetilado **8a**.

C	δC		δH	
	Lit.(DMSO-d ₆)	8a (CDCl ₃)	Lit.(DMSO-d ₆)	8a (CDCl ₃)
2	134,2	140,4	-	-
3	143,2	143,9	-	-
7	126,7	121,6	-	-
8	121,0	128,6	-	-
13	140,1	134,5	-	-
16	110,9	110,6	-	-
C=O	166,5	168,8	-	-
CH				
5	137,2	137,0	7,29	8,21
6	112,5	128,1	7,92	7,92(d,J=5,2)
9	121,6	119,6	8,17	8,14(d,J=7)
10	119,0	120,4	7,20	7,24(ddd,J=8;6;2)
11	127,6	121,6	7,52	7,48
12	111,8	113,4	7,52	7,50
15	27,5	35,2	3,65	3,20
17	150,7	152,0	7,48	7,43 (sl)
18	132,8	132,8	5,54	5,59 (m)
20	42,0	44,1	2,86	2,52
21	96,5	96,5	5,23	5,47
1'	95,5	96,7	4,56	4,84
2'	70,2	70,7	3,02	4,99
3'	71,6	72,1	3,18	a
4'	67,9	67,9	3,07	
5'	70,9	72,4	3,18	5,10
CH ₂				
19	119,5	111,9	4,15; 4,89	4,90;5,10
14	31,1	31,9	3,02; 3,65	3,63; 3,20
6'	61,7	61,6	3,45; 3,60	4,07; 4,17
CO ₂ CH ₃	51,0	51,6	3,55	3,79
H ₃ C-CO	19,8;20,3; 20,4;20,5	20,5 (x 4)	1,89;1,96 1,98;2,00	1,90(x 3); 2,01
H ₃ C-CO	168,5;169,1 169,4;169,9	168,6; 169,3; 170,2; 170,6	-	-

5.2.3. Derivado acetilado 9



O tratamento de 7 com anidrido acético e piridina, forneceu dois produtos cuja análise dos dados espectrométricos de RMN ^1H e ^{13}C permitiu propor as estruturas dos acetatos 9 e 10 (Tabelas 11 e 12, respectivamente). Esta identificação foi feita através da comparação com os dados da substância original 7. Os derivados acetilados estão sendo publicados pela primeira vez na literatura²⁹.

O produto 9 foi identificado através da análise dos dados de RMN ^1H e ^{13}C (PND e DEPT) incluindo HMQC e HMBC. As unidades β -carbolínica e da glicose foram identificadas através de comparações dos valores dos δ_{H} e δ_{C} de 7 e interpretação dos sinais de acoplamento homonuclear (^1H x ^1H - COSY)

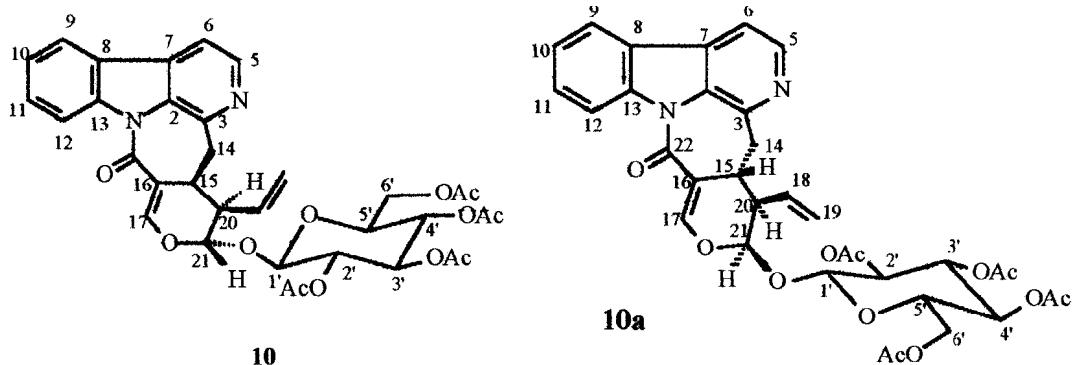
e acoplamento heteronuclear (^1H x ^{13}C - COSY), $^1\text{J}_{\text{CH}}$ e $^{2,3}\text{J}_{\text{CH}}$, (Figs. 36, 39 e 40), relacionados na tabela 11.

Os cinco grupos acetatos foram identificados através dos deslocamentos químicos dos singletos em δ_{H} 2,36, 2,23, 2,1, 2,08, 2,08 que acoplam a uma ligação ($^1\text{J}_{\text{CH}}$) com os carbonos em δ_{C} 20,9, 20,7 20,6, 20,6, 20,5, (Fig. 39a) e $^2\text{J}_{\text{CH}}$ com os carbonos carbolínicos com deslocamento químico δ_{C} em 170,6, 170,0, 169,7, 169,5, 169,3, (Fig. 40a). O sinal em 167,3 corresponde a carbonila do éster conjugado, pois não está ligado a grupo metila. O sinal de acoplamento a longa distância entre C-22 (167,3) e H-17 (6,95, d, 2,8Hz) confirma a presença da enona em 9, (fig 40a). Os sinais de interação do C-17 com H-21 (Fig. 40b) ligado ao (δ_{C} 95,5) que acopla com o C-18 ($^3\text{J}_{\text{CH}}$) do grupo alila e acopla com C-20 (δ_{C} 42,9, $^2\text{J}_{\text{CH}}$) (Fig. 40). O espectro 2D NOESY (Fig. 41) de 9 mostra sinais de interação entre H-19 com os hidrogênios 5'e 20. O sinal de nOe entre os hidrogênios da metila em 2,36 e o H-20 justifica os valores atribuídos para a amida em 9, propondo a conformação 9a.

Tabela 11 : Dados de RMN ^1H e ^{13}C para o produto acetilado **9**.

C	9			
	δ_{C}	δ_{H} [mult., J(Hz) HMQC]	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$
2	134,7	-		H-6
3	144,3	-		H-5
5	143,1	8.56(d;4.8)		H-6
6	113,2	7.45(d;4.8)		H-5
7	133,4	-		H-9;5
8	124,2	-		H-10
9	120,8	7.99(d;8.0)		H-11
10	124,6	7.44(t;8.0)		H-12
11	130,2	7.61(t;8.0)		H-9
12	118,5	8.58(d;8.0)		H-10
13	140,7	-		H-11;9
14	33,9	2.2(m)		
15	34,8	4.50(ddd;4.4;3.2;-)		H-20
16	114,6	-		H-17;H20
17	1476	6.95(d;2.8)*		H-21
18	131,5	5.42(ddd;16.0;10.0;8.0)		H-21
19	120,4	5.30(dd;16.0;2.0)		H-19
20	42,9	5.04(dd;8.0;2.0)		
21	95,5	2.97(dm;6.0)		H-15;H-18
22	95,8	-		
1'	95,8	5.28(d;2.8)		H-17
2'	70,3	4.96(d;8.0)		H-2'
3'	72,2	5.04(t;8.0)		H-1';H-3'
4'	68,2	5.30(t;9.6)		H-2';H-4'
5'	72,3	5.13(t;9.0)		H-3';H-5'
6'	61,7	3.8(dm;12.8;2.4)		H-4';H-6'
$\text{H}_3\text{C}-$	20,9; 20,7			
CO	20,6; 20,5; 17,8	4.2(dd;12.8;2.4)		H-5';H-6'
	170,6; 170,0			
OCO	169,7; 169,5; 169,3	4.37(dd;12.8;4.8)		H-5';H-6'

5.2.4. Derivado acetilado 10



O espectro de RMN ^1H do derivado acetitado 10 mostra seis sinais de hidrogênios aromáticos da unidade carbolínica, (Fig. 42). As informações presentes nos espectros de RMN ^{13}C PND e DEPT, (Fig. 44-45) aliados aos dados de 2D (HMQC $^1\text{J}_{\text{CH}}$ e HMBC $^{2,3}\text{J}_{\text{CH}}$), (Fig. 46-47) permitiram a identificação dos deslocamentos químicos dos carbonos protonados δ_{C} 142,1 (C-5), 113,9 (C-6), 120,7 (C-9), 123,18 (C-10), 130,1 (C-11) e 118,2 (C-12) e dos carbonos quaternários δ_{C} 137,3 (C-2), 143,7 (C-3), 132,8 (C-7), 123,2 (C-8), 140,6 (C-13) e 166,3 (C-22) desta unidade aromática, que não foi modificada pela reação. As principais diferenças entre o produto acetilado 10 e a substância original, são:

- O espectro de RMN ^1H (Fig. 42c) possui 6 singletos na região de metilas de acetato. Entretanto, análise do espectro de RMN 2D ($^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ -COSY) $^1\text{J}_{\text{CH}}$ permite observar os sinais de interações de acoplamento e

deduzir que quatro destes sinais são das unidades de acetato. Quatro metilas possuem sinais de $^{2,3}J_{\text{CH}}$ (Fig. 47b) dos hidrogênios (δ_{H} 2,08, 1,88, 2,01, 1,46) com os carbonos dos acetatos (δ_{C} 170,4, 169,8, 169,2, 168,7). Sendo assim, os outros sinais são de impureza;

- b) A ausência do singuleto largo em δ_{H} 6,6 ppm (H-17) e do sinal em δ_{H} 3,3 ppm (H-16) no espectro de RMN ^1H (Fig. 42) e a ausência dos sinais em δ_{C} 89,0 (C-17) e δ_{C} 49,8 (C-16) no espectro de RMN ^{13}C (Fig. 44);
- c) Além dos demais sinais de δ_{H} e δ_{H} semelhantes aos do reagente (7), aparecem sinais em δ_{C} 167,3 (C-22), 150,9 (CH-17) e 114,5 (C-16) que podem ser atribuídos aos carbonos da enamida sustentando o oxigênio em β e, então, justificar o sinal em 7,8 (H-17, d, 2,8Hz; Fig.42a) que, de acordo com o espectro de HMQC (Fig. 46), está ligado ao carbono δ_{C} 150,9 (CH-17). O valor $J=2,8$ Hz corresponde ao acoplamento W deste hidrogênio com o H-15, (fig 43).
- d) O H-21 (δ_{C} 5,3) está ligado ao carbono com δ_{C} 96,00 (Fig 46).

As observações acima e as atribuições de δ_{H} e δ_{C} dos demais hidrogênios e carbonos de 10, tabela 11, justificam a proposta deste produto. O nOe entre os hidrogênios H-1' e H-5' , H-1' e H-19b, H-20 e H-19b observados no espectro de NOESY (Fig. 48) de 10 permite propor a configuração cis alil/O-glicose (10a) para este produto.

Tabela 12 : Dados de RMN ^1H e ^{13}C para o produto acetilado **10**.

C		10			
	δ_{C}	δ_{H} [mult., J(Hz) HMQC]	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	$^1\text{Hx}^1\text{H-COSY}$
2	137,3				
3	143,7			H*;H-5	
5	141,9	8,4 (d;5,2)			H-6
6	113,8	7,8 (d;5,2)		H-5	H-5
7	132,8			H-5	
8	123,2			H-10	
9	120,6	8,2 (d;8,0)		H-11	H-10
10	123,8	7,4 (t;8,0)		H-12	H-9;H-11
11	130,1	7,6 (8,0)		H-9	H-10;H-12
12	118,3	8,6 (d;8,0)		H-10	H-11
13	140,6			H-11;H-9	
14	31,1	2,2 (s)			
15	32,7	3,5 (m)		H-17	H-20
16	112,6			H?*;H-17	
17	150,9	7,8 (d;2,8)		H-21	H-15
18	132,2			H-17	H-19;H-20
19	121,2	5,4 (dm;16,8) 5,3 (dm;13,2)			H-18 H-18
20	45,3	2,8 (m)		H-19a;19b	H-15;H-18;H-21
21	96,0	5,3 (d;6,4)		H-17	H-20
22	166,3			H-17	
1'	95,6	4,9 (d;8,0)		H-2'	H-2'
2'	70,4	4,8 (t;8,0)		H-3'	H-1';H-3'
3'	72,0	5,1 (t;9,6)		H-2'	H-2';H-4'
4'	67,8	5,0 (t;9,6)		H-3'	H-3';H-5'
5'	72,1	3,7 (dm;10,0)		H-4';	H-6';H-4'
6'	61,5	4,1 (dm;12,0) 4,3 (dd;12,0;6,0)			H-5';H-6' H-6';H-5'
<u>H₃C-</u>	20,7;20,5;	2,1;2,0;			
CO	20,4;19,9	1,8;15			
<u>OOC</u>	170,4;169,8 169,2;168,7			H-3';H-4'	

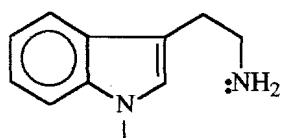
Obs.: H*[?; 4.25;s]

6. CONSIDERAÇÕES BIOSSINTÉTICAS

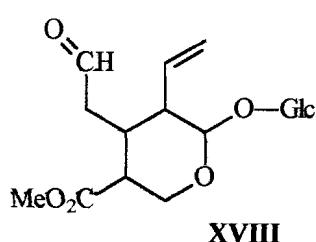
Para o químico de produtos naturais, o conhecimento dos precursores e, às vezes das etapas necessárias para a elaboração das diferentes classes de substâncias naturais, é a base fundamental de raciocínio para a determinação estrutural das substâncias isoladas. A origem biossintética não pode ser discutida em termos gerais, cada grupo de substâncias tem uma rota metabólica diferente. É importante a apresentação de propostas biossintéticas para as substâncias isoladas da planta. Os esquemas 12 e 13 representam as propostas da rota biossintética dos alcalóides (-)ofiorina B e harmana, respectivamente; e o esquema 14, a biossíntese dos esteróides.

A biossíntese dos alcalóides indólicos monoterpênicos é bastante conhecida uma vez que várias foram isoladas e caracterizadas. Estes alcalóides são, quase sempre, produtos de condensação da triptamina [XVII] com o secoiridóide, secologanina [XVIII], que é formado a partir do monoterpeno geraniol [XIX]. A condensação de triptamina com secologanina é catalisada pela enzima estrictosidina sintase formando estrictosidina [XX], um alcalóide glicosilado considerado o principal intermediário na biossíntese destes alcalóides^{29,30}. A transformação desse intermediário, através de reações ainda não caracterizadas totalmente, leva à formação dos vários grupos de alcalóides indólicos. A partir dessa etapa, pouco se sabe sobre os detalhes das

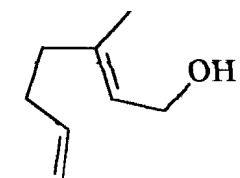
rotas biossintéticas que levam à formação dos vários compostos. Entre eles há alguns compostos de grande importância farmacológica, como por exemplo, a vincristina [XXI] e a vimblastina [XXII], que tiveram as últimas etapas da sua biossíntese investigadas^{30,31}.



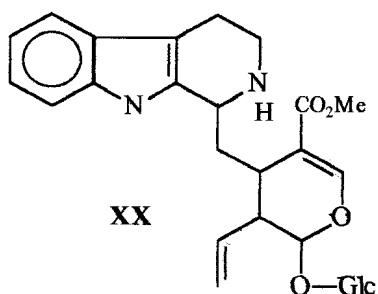
XVII



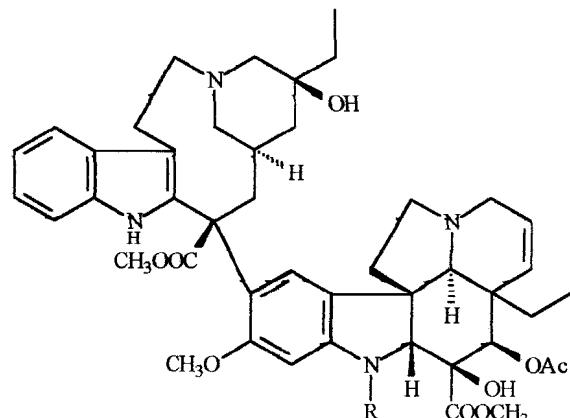
XVIII



XIX

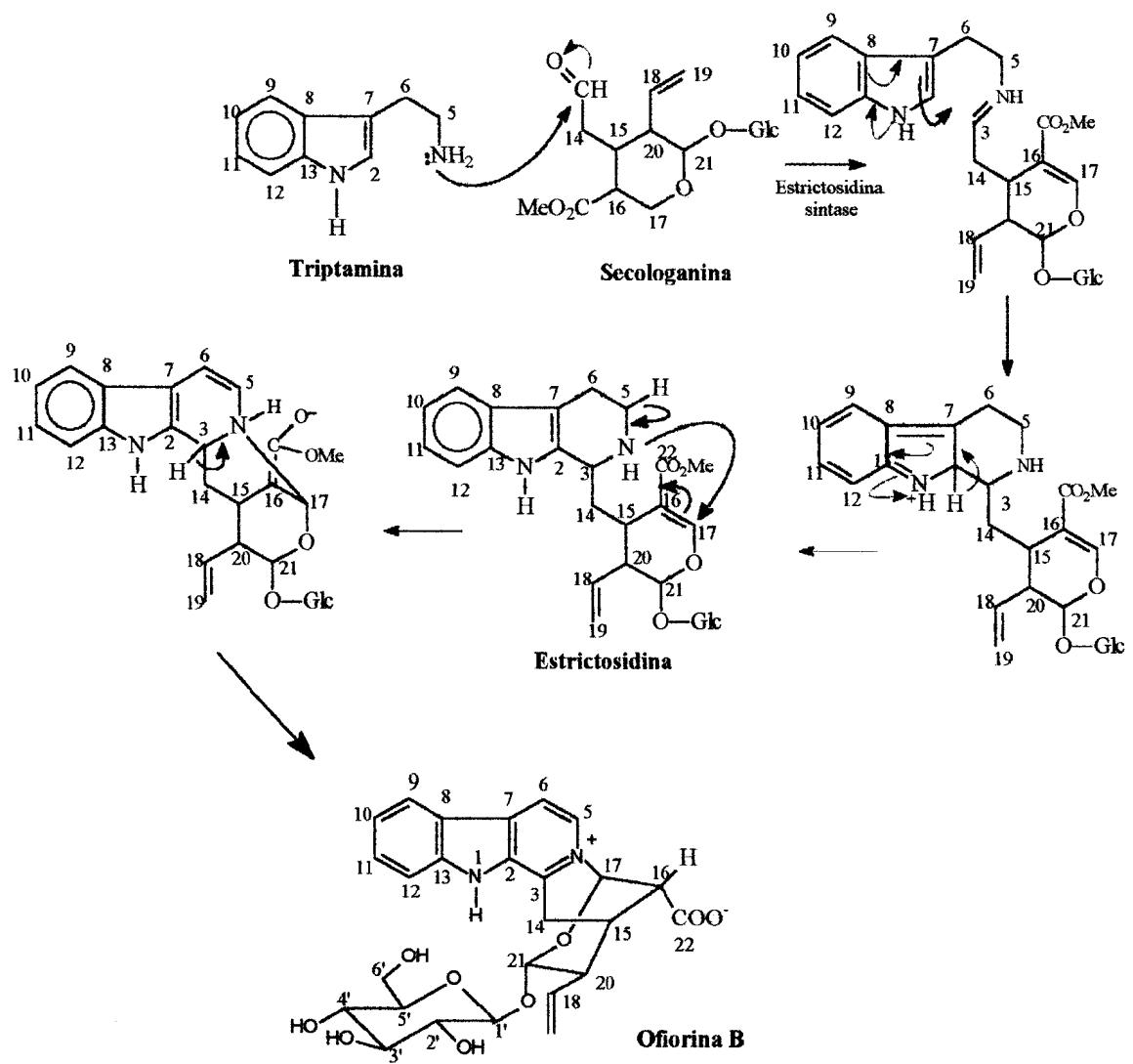


XX

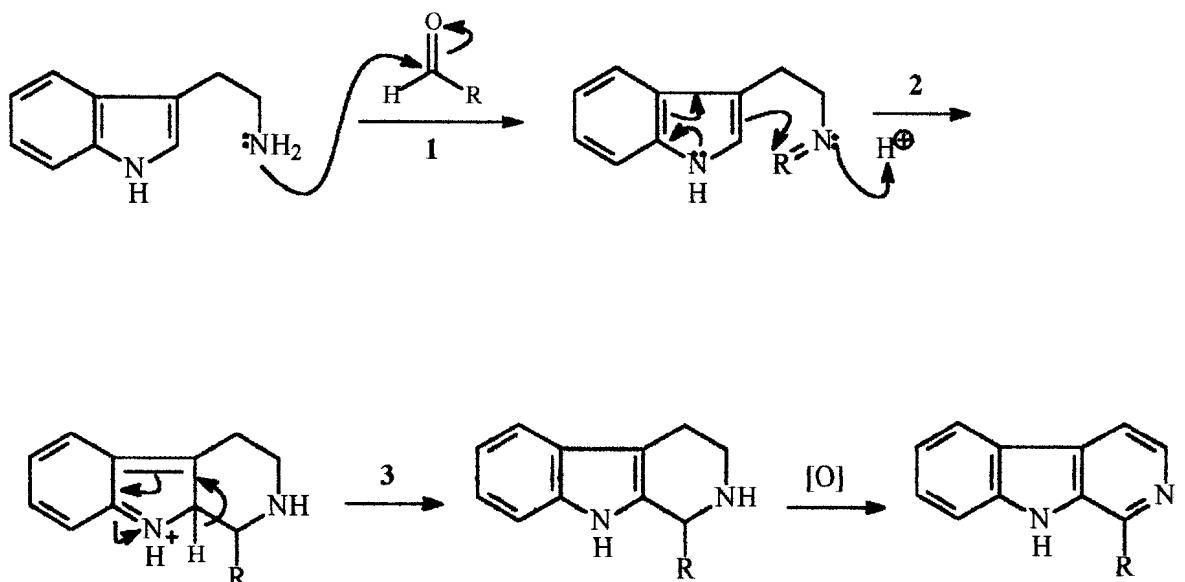


XXI : R = CHO

XXII : R = CH₃



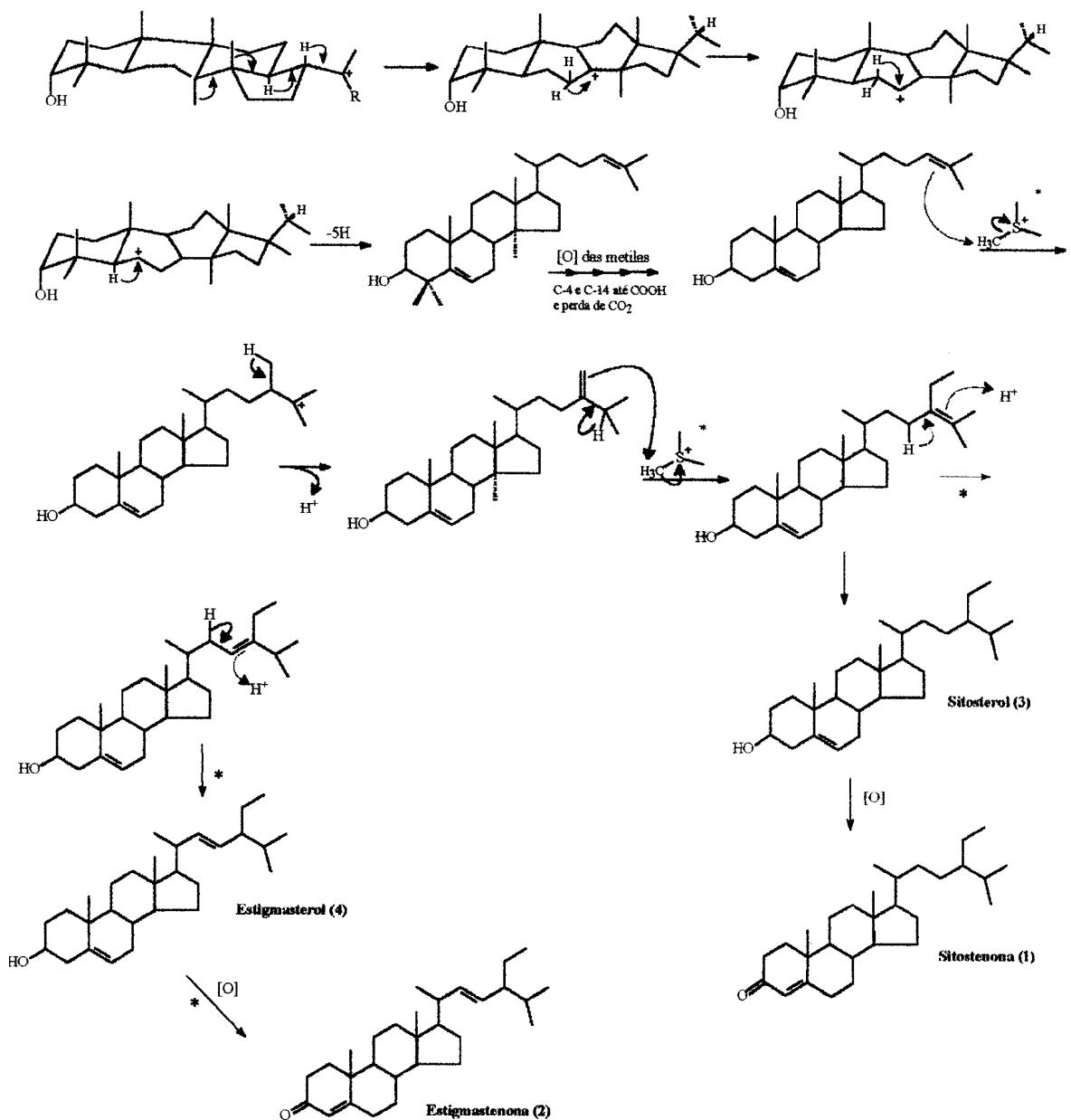
Esquema 12: Proposta para a rota biossintética do alcalóide ofiorina B (7).



Harmanine, R= CH₃

1. Formação de base de Schiff usando aldeído
2. Reação do tipo Mannich(C- α = Nu)
3. Tautomerismo para restaurar a aromaticidade

Esquema 13: Biossíntese do alcalóide harmanina.



Esquema 14: Formação dos esteróides.

7. ENSAIOS BIOLÓGICOS

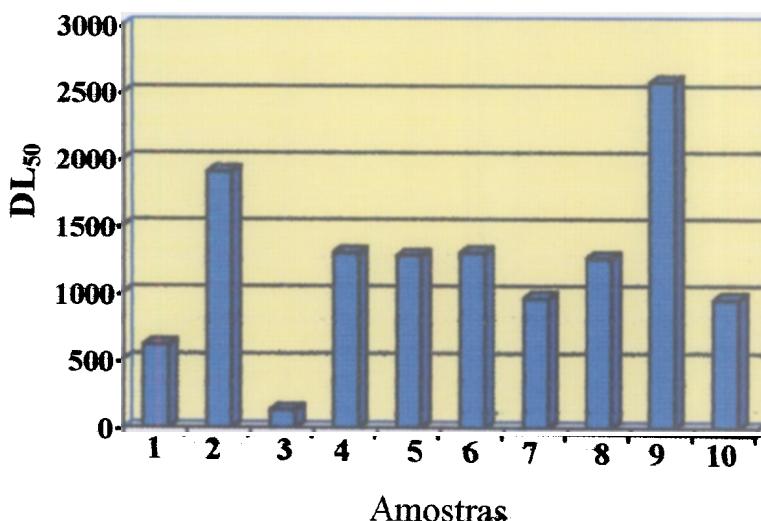
A avaliação preliminar com bioensaios é o ponto de partida na estratégia de procura de substância biologicamente úteis.

Substâncias bioativas são quase sempre tóxicas em altas doses. Desta forma, a letalidade de um organismo animal simples pode ser usado para um rápido e simples monitoramento da atividade de substâncias naturais e sintéticas. Uma técnica simples capaz de detectar substâncias bioativas é o Ensaio de Letalidade de *Artemia salina* Leach (ELAs)³². Esta técnica é fácil de ser realizada, de baixo custo e pode ser feita com pequena quantidade de material. A finalidade deste método é obter um procedimento básico que pode servir de indicativo para bioensaios mais específicos, que às vezes são de difícil elaboração e geralmente são realizados após o isolamento das substâncias com monitoramento preliminar.

Os resultados do teste com *Artemia salina* estão representados na tabela 13 e no gráfico abaixo. A fração 3 que se apresentou mais tóxica ($DL_{50}=129,1$ ppm) é a fração da qual se isolou o alcalóide (6), a harmana. Em contrapartida, o alcalóide (7), (-)ofiorina B, foi isolado da fração 5 que não apresentou toxidez significativa ($DL_{50} = 1272,7$ ppm) frente à *A. salina*.

Tabela 13: Resultado do monitoramento frente a *Artemia salina*.

Amostra	DL ₅₀ (ppm)
1= Ext. metanólico	616,6
2= SGCM-20-25	1905,5
3= SGCM-26-32	129,1
4= SGCM-32-35	>1272,7
5= SGCM-36-43	1272,7
6= SGCM-44-47	>1272,7
7= SGCM-48-53	955,0
8= SGCM-54-59	1258,9
9= SGCM-60-67	2570,4
10= SGCM-68-71	>945,5

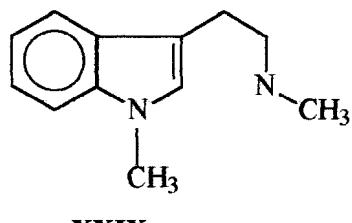
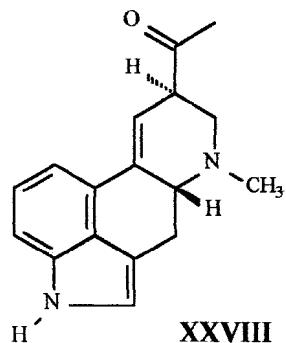
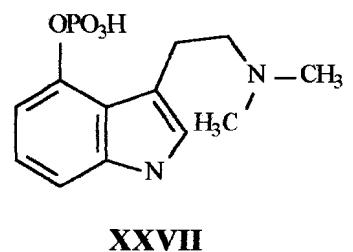
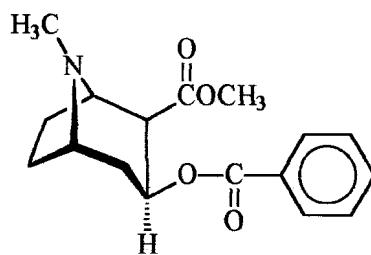
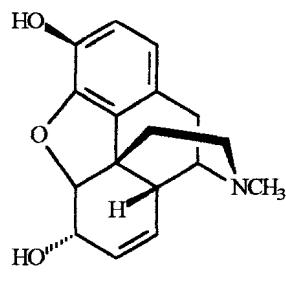
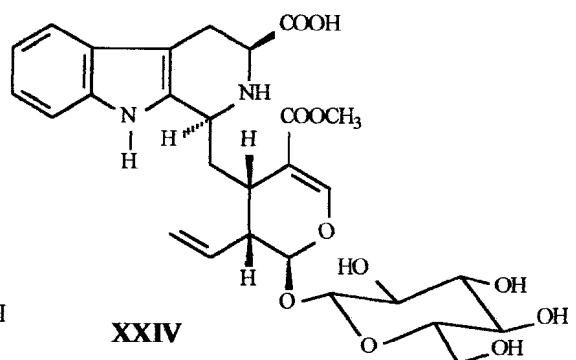
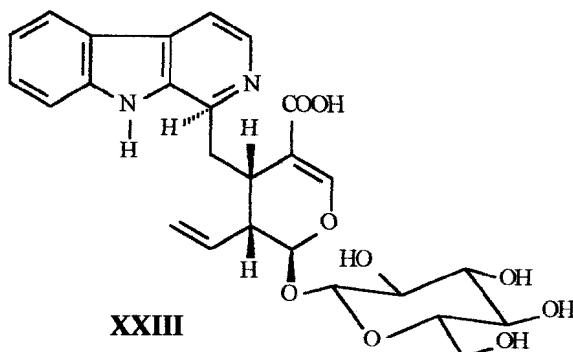
Gráfico 1: Resultado do monitoramento frente a *Artemia salina*.

Os alcalóides com estrutura β -carbolínica podem ser o princípio ativo de diversas plantas medicinais que são utilizadas tradicionalmente. Por isso, as plantas que apresentam estes alcalóides são de grande interesse da ciência farmacêutica³³. Estes compostos estão presentes em plantas conhecidas por afetar o Sistema Nervoso Central, provocando sedação, lentidão dos movimentos, prolongação do sono. Esta atividade farmacológica está associada à unidade indólica destes alcalóides³⁴.

O alcalóide harmana (6) foi isolado pela primeira vez de *Peganum harmala* e a literatura relata para esta substância efeito tóxico à *Artemia salina* ($LC_{50} = 25 \mu\text{g/mL}$) e à *Plasmodium falciparum* ($IC_{50} = 0,97 \text{ mg/mL}$). Apresenta também efeito citotóxico e é um agente intercalante²⁶.

Os alcalóides ofiorina A (7a), ofiorina B (7), ácido lialosídico [XXIII], 5- α -carboxi-estrictosidina [XXIV] foram isolados de *Sickingia williamsii*. Esta planta é utilizada popularmente no Peru como analgésico e antiinflamatório e seus compostos ativos são similares aos presentes em *Tabernanthe iboga*, que é utilizada no tratamento da dependência de drogas, conduzindo à redução do consumo de morfina [XXV] e cocaína [XXVI]. Estudos sobre os alcalóides indólicos estão sendo desenvolvidos quanto ao seu potencial no tratamento de abuso de drogas³⁵.

Vários alcalóides indólicos como a psilocibina [XXVII], lisergida (LSD) [XXVIII], N,N-dimetiltriptamina [XXIX] e derivados da harmana (6) possuem marcante atividade alucinógena. A psilocibina é o princípio ativo do cogumelo *Psilocybe mexicana* e o LSD foi sintetizado a partir do ácido lisérgico, por Hoffmann em 1943, e tornou-se uma notória droga alucinógena³⁰. No Brasil, um chá extraído do cipó jagube (*Banisteropsis caapi*-Malpigiaceae) e da folha chacrona (*Psychotria viridis*-Rubiaceae), conhecido como Ayahuasca, apresenta alcalóides indólicos produzidos por estas espécies; e é utilizado como alucinógeno em rituais religiosos do Santo Daime. Os alcalóides β-carbolínicos simples apresentam efeito inibitório da monoamino-oxidase (MAO), ação convulsiva, ansiolítica, antihelmíntica, antitripanossomal e antileishimanal³⁶. Estes compostos podem apresentar efeitos antioxidantes, uma vez que seus precursores biossintéticos, o triptofano e a triptamina, apresentam essa atividade³⁷.



8. CONCLUSÃO

O estudo de espécies do gênero *Simira* é relevante, visto que apresenta como característica a presença de alcalóides β -carbolínicos e substâncias fototóxicas¹⁶; e que substâncias de valor farmacológico já foram identificadas neste gênero¹⁰. O estudo fitoquímico de *Simira glaziovii* confirma a presença destes alcalóides.

Deste trabalho, obteve-se seis substâncias isoladas pela primeira vez no gênero *Simira*, que são:

- quatro esteróides: sitostenona (1), estigmostenona (2), sitosterol (3) e estigmasterol (4);
- um éster: 3,4-dimetoxicinamato de metila (5);
- um alcalóide: (-)ofiorina B (7).

O alcalóide harmana (6) já havia sido isolado de outras espécies do gênero *Simira* e algumas de suas bioatividades já foram investigadas^{15,16}.

O composto (-)ofiorina B é inédito na literatura, uma vez que, apenas o enantiômero (+)ofiorina B foi registrado até o momento.

Foram corrigidos os erros registrados na literatura para os deslocamentos químicos dos carbonos (C-3, C-7, C-13, C-16 e C-20) do alcalóide ofiorina B. Isto foi possível pela obtenção de espectros com boa resolução através de técnicas bidimensionais como HMBC e HMQC,

enquanto que a literatura registrava apenas dados obtidos através de técnicas unidimensionais.

Preparou-se os derivados: metilado (8) e acetilados (9) e (10) do alcalóide (-)ofiorina B (7). A reação de acetilação forneceu dois produtos (9 e 10) inéditos na literatura.

O presente trabalho contribui para o estudo fitoquímico de Espécies Brasileiras e deixa perspectivas para um estudo biológico mais detalhado, visto que iniciamos a investigação das atividades antifúngica, antibactericida e espasmolítica.

A avaliação do efeito relaxante do alcalóide (7) sobre músculos lisos foi proposta devido à literatura registrar a atividade espasmolítica de alcalóides indólicos. Até o momento temos um parecer parcial e a próxima etapa será a elucidação do mecanismo de ação do alcalóide (-)ofiorina B, e esta etapa torna-se mais interessante porque se trata de uma substância inédita.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gottlieb, O. R.; Kaplan, M. A. C.; **1990**. *Ciência Hoje*, 11, (61), 18.
2. Ribeiro, D.; “*Universidade para quê?*”; **1986**. Série UnB, Ed. Universidade de Brasília, Brasília, DF.
3. Farnsworth, N.R.; *J. Ethnopharmacol.*; **1980**, 2, 173.
4. Havsteen, B.; *Biochem. Pharmacol.*; **1983**, 32, 1141.
5. Calixto, J. B.; Yunes, R. A.; Rae, G. A.; Medeiros, Y. S.; *In Bradykinin Antagonists: Basic and Clinical Research*; R. M. Burch, Marcel Dekker Inc.; N. Y.; **1990**, 88.
6. Samuelsson, G.; *Acta Pharma. Fen.*; **1992**, 101, 33.
7. Cechinel Filho, V.; Tese de *Doutorado em Química*, UFSC, Florianópolis, SC, **1995**.
8. Delprete, P.G.; *Rondeletieae (Rubiaceae)*, Flora Neotropica, NY, **1999**.
9. Cronquists, A.; An Intregated System of Classification of Flowering Plants. Part II- New York Botanic Garden; Columbia University Press. N.Y., **1981**.
10. Peixoto, A. L. ; *As Espécies de Simira (Rubiaceae, Rondeletieae) do Norte do Estado do Espírito Santo*. Arquivo UFRRJ, Jul./dez., **1982**.
11. Lewis, W.H.; Elvin-Lewis, M. P. F.; in *Plants and Dental Care Among the Jivaro of the Upper Amazon Basin. Advances in Economic Botany*

Ethnobotany in the Neotropics G. T., France & J.A. Kallunki(Eds) New York, Botanical Garden Bronx, NY (1984), I, 53-61.

12. Castro, O.; Lopes, V. J., *Ing. Cienc. Quim.* **1986**, 10, 56-57
13. Hasbun, C. P.; Calseron, M.; Castro, O.; Gacs-Baitz, E.; Delle Monache, G.; Delle Monache, F. *Tetrahedron Letters*, **1989**, 30, 6199.
14. Kelly, T.; Xu, W.; Sundaresan, J. *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 6176.
15. Castaneda, P.; Albor,C.; Matar, R.; Bye, R.; Linares, E. *Fitoterapia* **1991**, 62, 366.
16. Arnason, T.; Morand, P.; Salvador, J.; Reyes, I.; Lambert, J.Towers, G.H.N. *Phytochemistry* **1983**, 22, 594.
17. Rydberg, P. A. (1915) in NorthAmerican Flora, 32, part 2, New York, Botanical Garden, New York.
18. Felix, P. A. S.; Velandia, J. R.; Carvalho, M. G. de; Braz-Filho, R.; Livro de Resumos – SBQ, **1999**, PN- 110.
19. Torsell, K. B. G.; Natural Products Chemistry. “*A mechanistic and biosynthetic approach to secondary metabolism*” John Wiley e Sons Ltda, **1983**.
20. Carvalho, G. A.; Cranchi, D. C.; Carvalho, M. G. de; Braz-Filho, R.; Livro de Resumos SBQ, **1997**, PN-026.

21. Stahl, E. ; Thin-Layer Chromatography. A Laboratory Handbook. Springer-Verlag, 2^a ed.; N.Y., 1970.
22. Aimi, N.; Tsuyuki, T.; Murakami, N.; Sakai, S. I.; Haginiwa, J. *Tetrahedron Letters*, **1985**, 26, 5299.
23. Blunt, J. W.; Stothers, J. B.; *Org. Magn. Resson.*; **1977**, 9, 439.
24. Wright, J. L. C., McInnes, A. G., Shimizu, S., Smith, D. G., Walter, J. A., Idler, D. and Khalil, W. *Can. J. Chem.* **1979**, 56, 1898.
25. Levesque, J.; Jacquesy, R.; Foucher, J. P.; *Tetrahedron*, **1982**, 38, 1417.
26. Buckingham, J. (Editor); *Dictionary of Organic compounds* (5th. Ed.) Vol. 4, 3785 (1982). Chapman & Hall, London.
27. Aquino R.; Garofalo, N. T.; Ugaz, O. L.; Pizza, C.; *Phytochemistry*, **1994**, 37, 5, 1471.
28. Valverde, J.; Tamayo, G.; Hesse, M.; *Phytochemistry*, **1999**, 54, 1485-1489.
29. Bastos, A. B. F. O.; Velandia, J. R.; Carvalho, M. G. de; Braz-Filho, R.; “*Oftiorina B e outros constituintes isolados de Simira glaziovii*”. Química Nova, **2000**,(submetido).
30. Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R.; *Farmacognosia, da planta ao medicamento*. Editora da UFSC, 2^a edição, **2000**.

31. Bruneton, J.; *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants.* Lavoisier Publishing Inc., **1995**.
32. Bastos, A. B. F. O.; Oliveira, M. C. C.; Velandia, J.R.; Carvalho, M.G.; Braz-Filho, R.; Livro de Resumos SBQ, **1997**, PN-077.
33. Tsuchiya, H.; Hayashi, H.; Shimizu, H; Iinuma, M.; *Phytochemical Analysis*, 10, 247-253, **1999**.
34. Dewick, P. M.; Medicinal Natural Products. “ A biosynthetic approach.” John Wiley e Sons Ltda, **1998**.
35. Capasso, A; Aquino, R.; Garofalo, F. S.; Sorrentino, L.; *J. Pharm. Pharmacol.*; **1996**, 48, 592-595.
36. Capasso, A; Aquino, R.; Garofalo, F. S.; Sorrentino, L.; *J. Pharm. Pharmacol.*; **1997**, 49, 712-714.
37. Rehwald, A.; Sticher, O.; *Phytochemical Analysis*, 6, 96-100, **1995**.

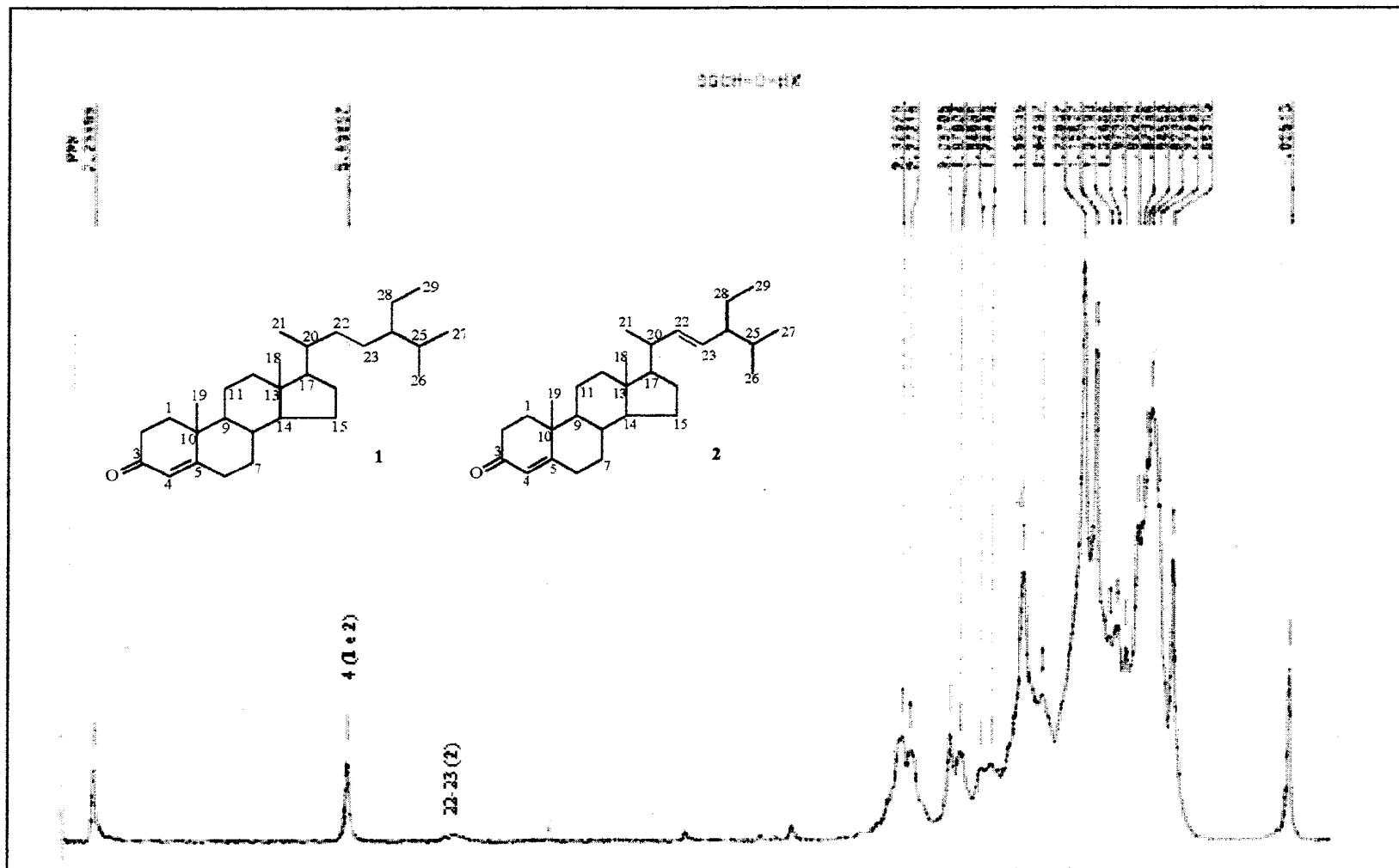


Figura 1: Espectro de RMN ^1H (200 MHz) de SGCH-1 (**1 + 2**) registrado em CDCl_3 .

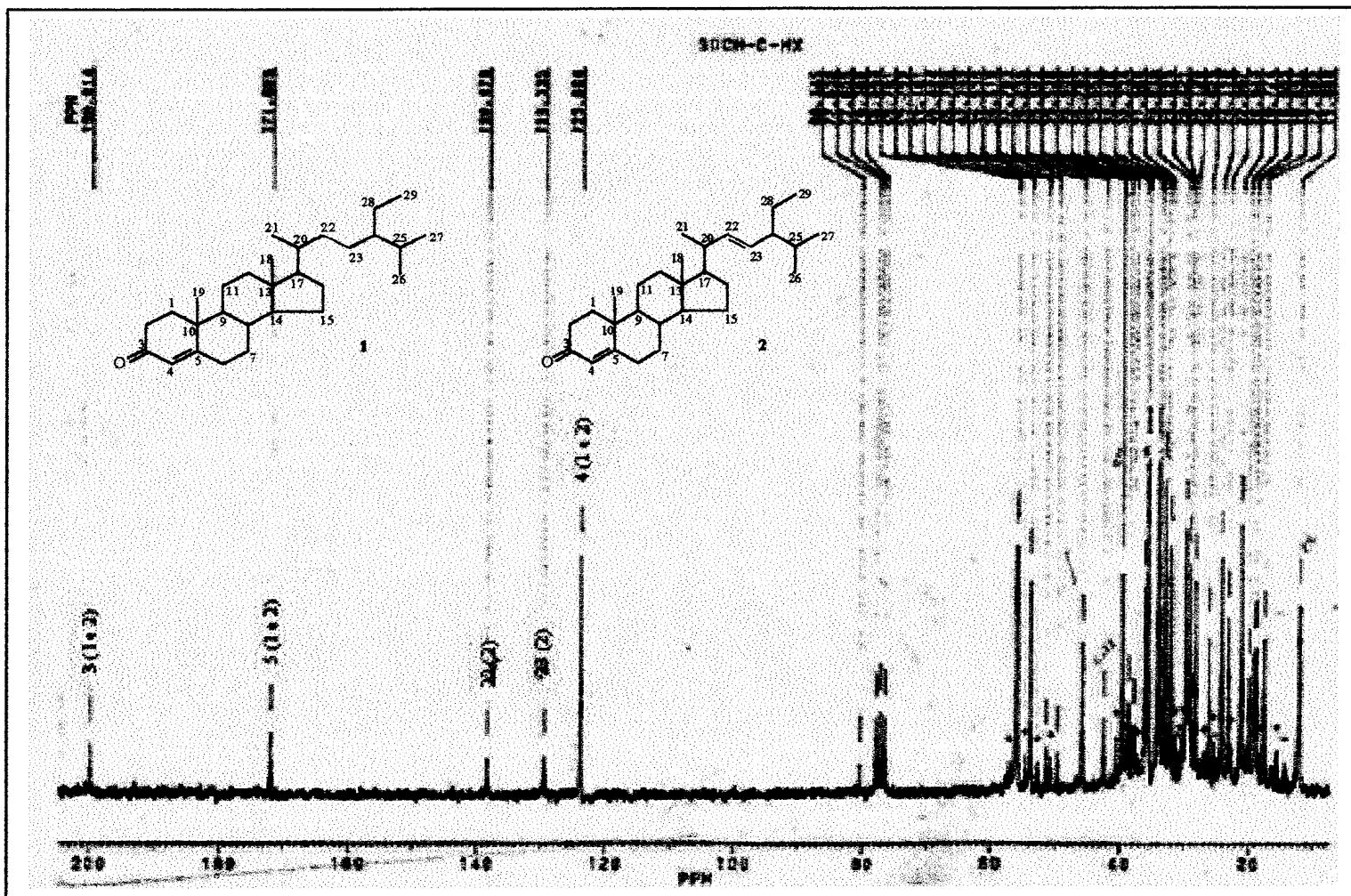


Figura 2: Espectro de RMN ^{13}C de SGCH-1 (**1** + **2**) registrado em CDCl_3 .

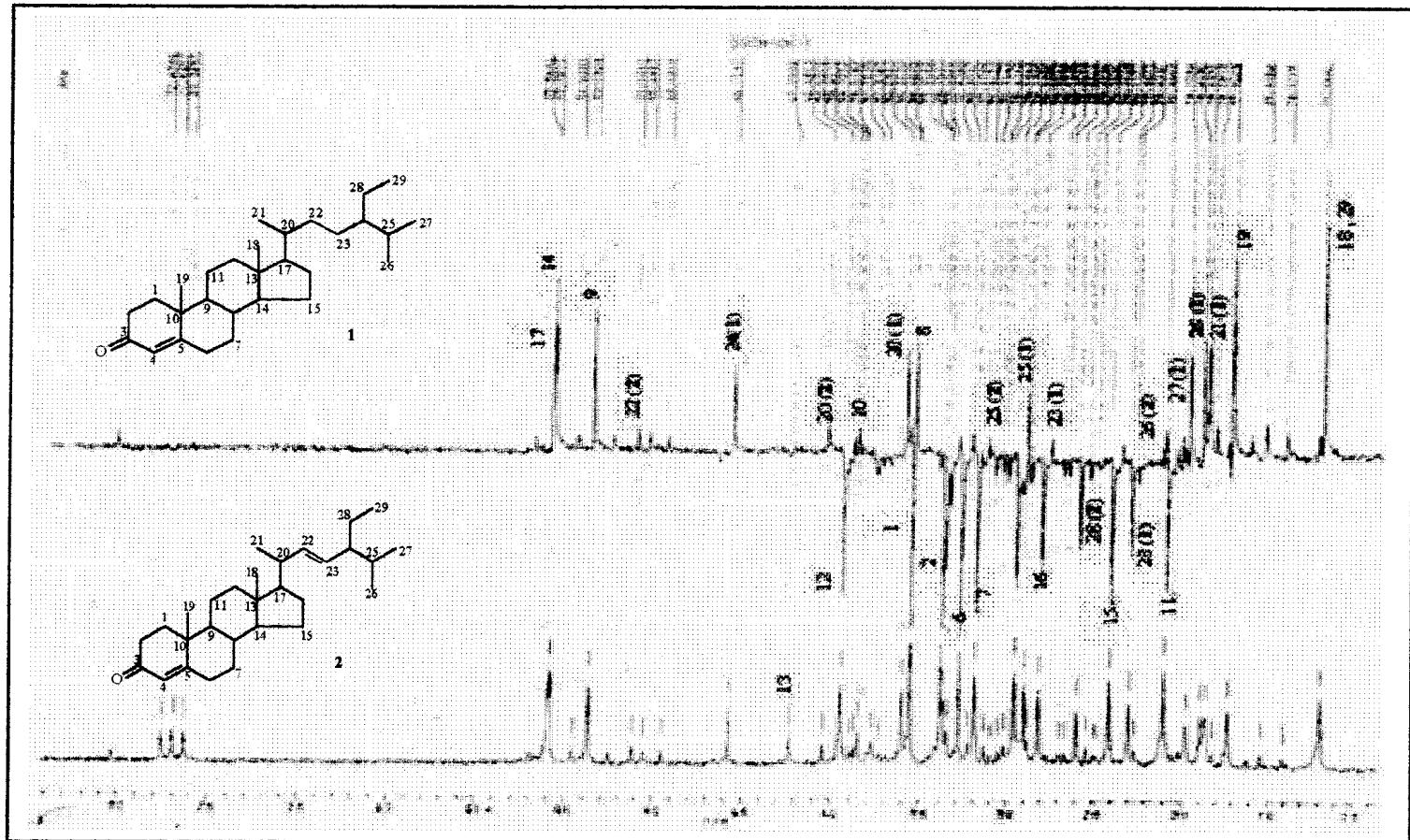


Figura 3: Espectro de RMN ^{13}C de SGCH-1 (**1 + 2**) com DEPT ($\theta = 90^\circ$ e 135°) registrado em CDCl_3 .

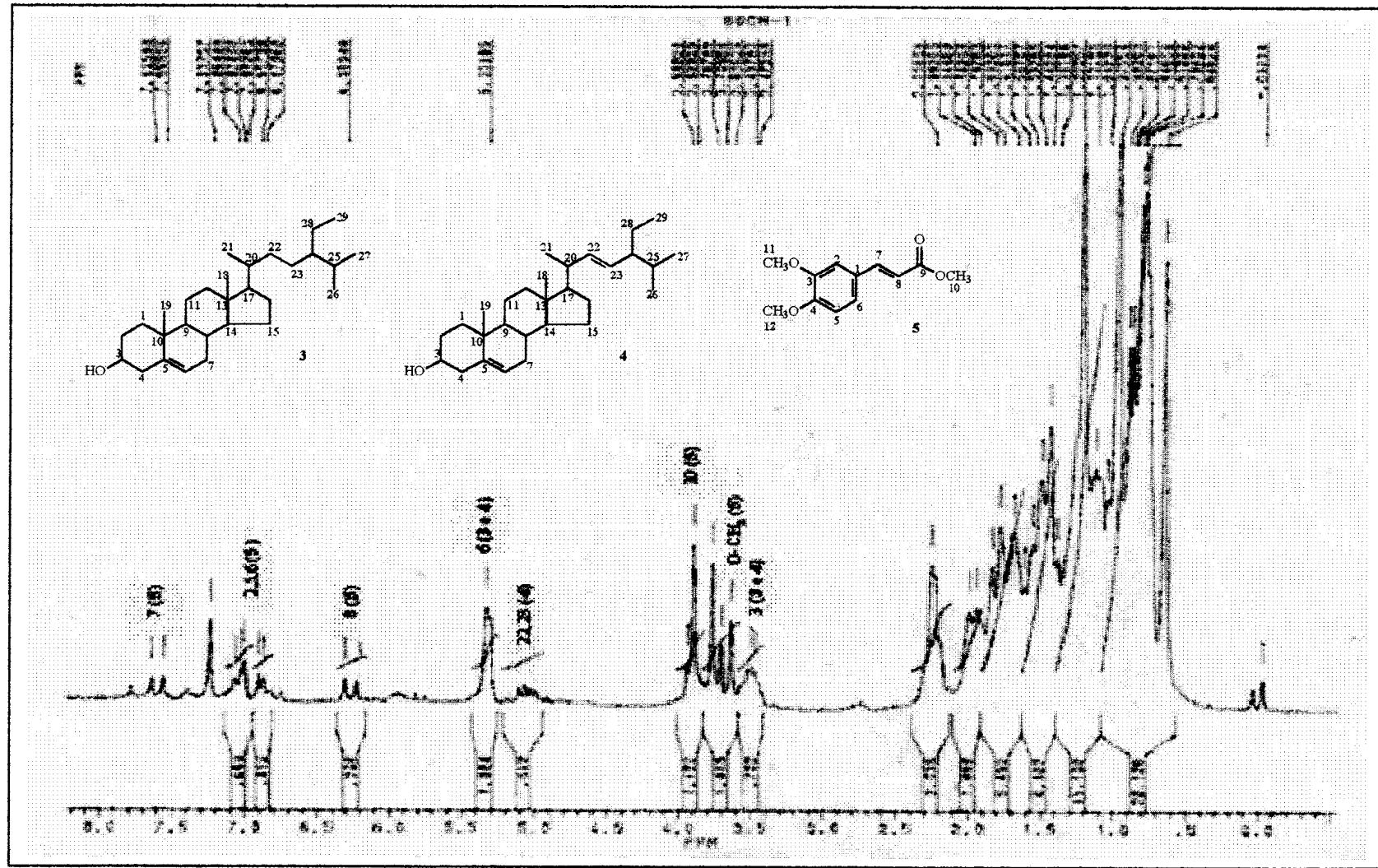


Figura 4: Espectro de RMN ^1H (200 MHz) de SGCM-1 (**3 + 4 + 5**) registrado em CDCl_3 .

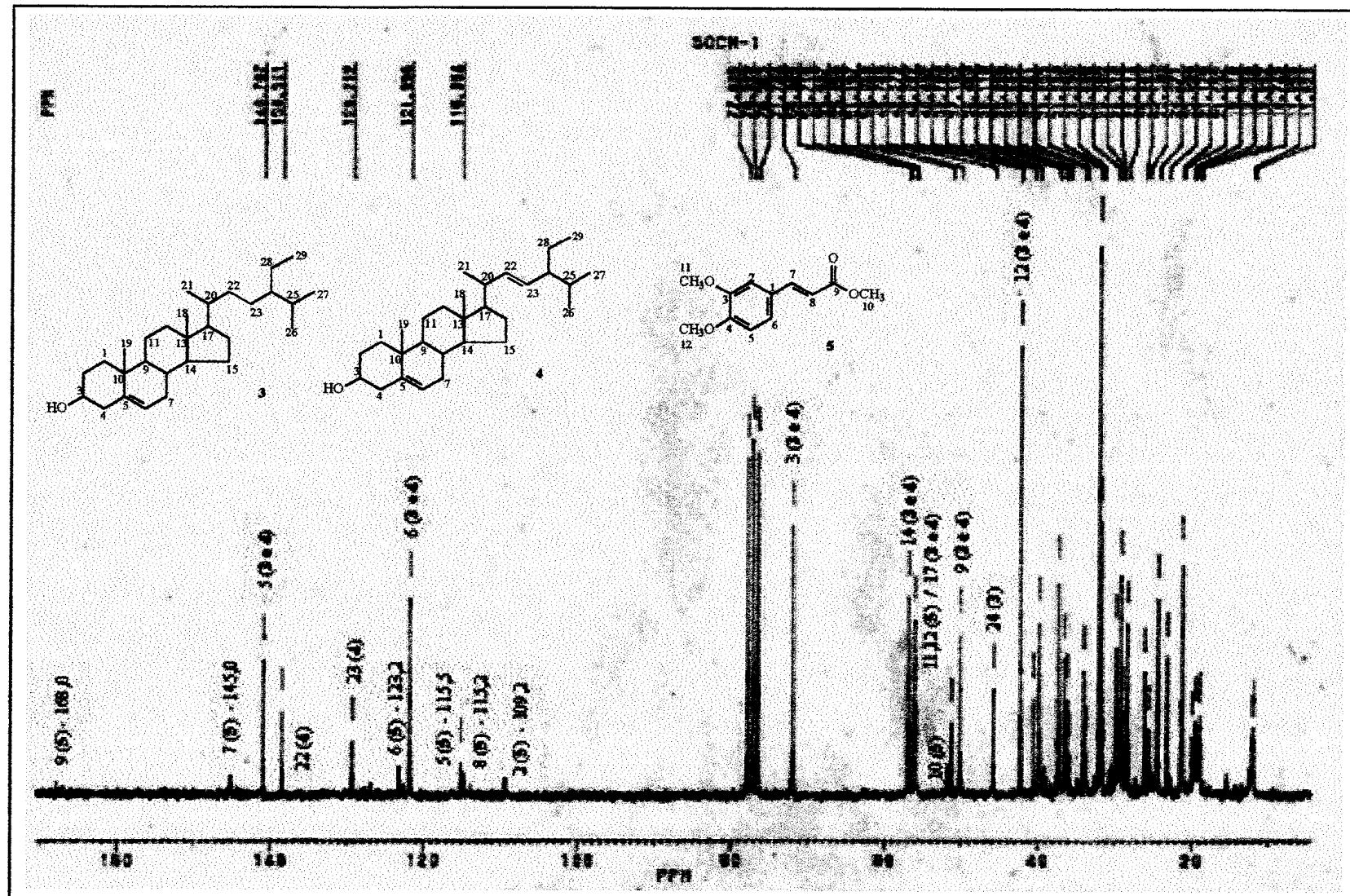


Figura 5: Espectro de RMN ^{13}C de SGCM-1 (**3 + 4 + 5**) registrado em CDCl_3 .

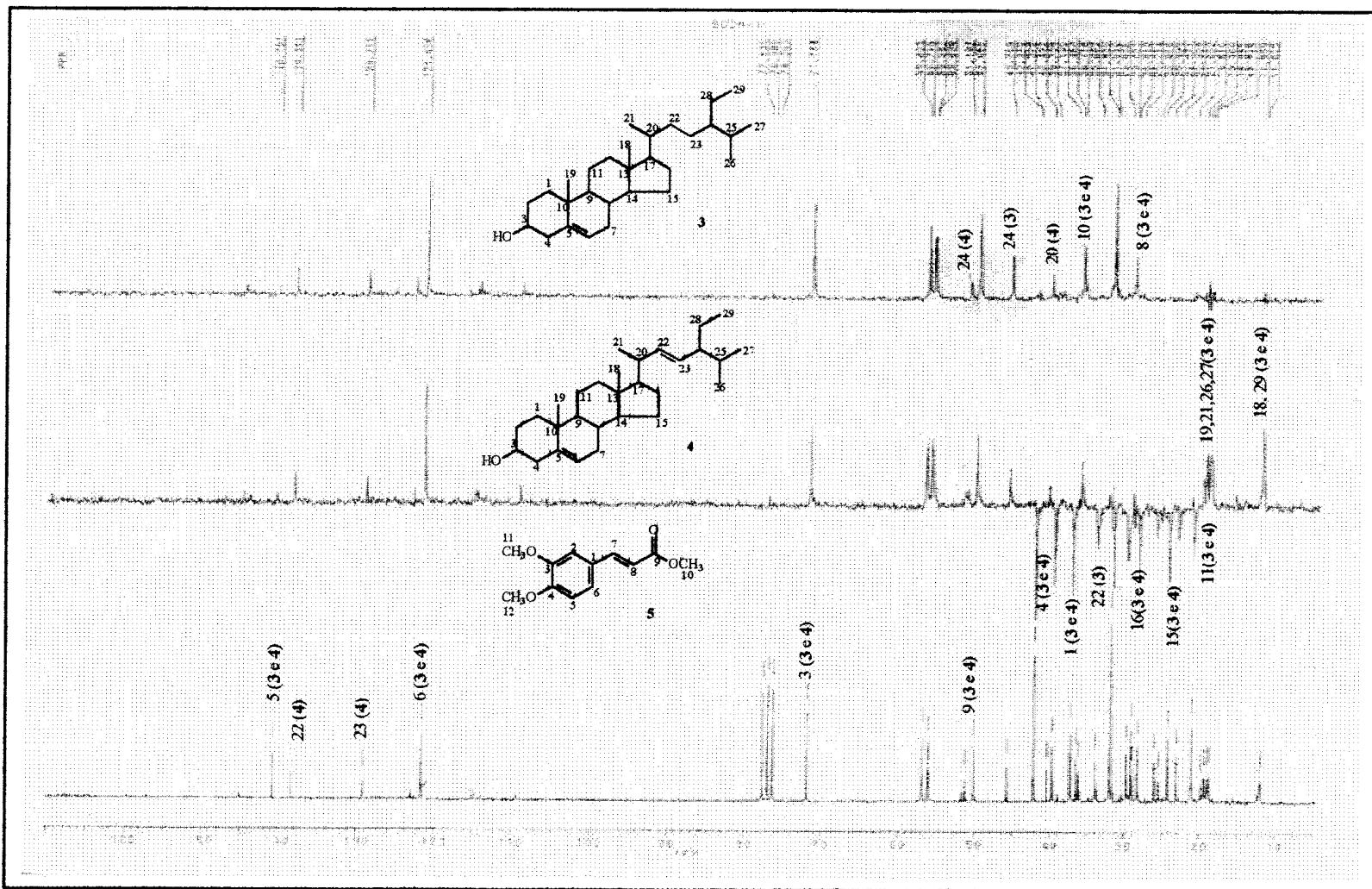


Figura 6: Espectro de RMN ^{13}C de SGCM-1 (**3** + **4** + **5**) com DEPT ($\theta = 90^\circ$ e 135°) registrado em CDCl_3 .

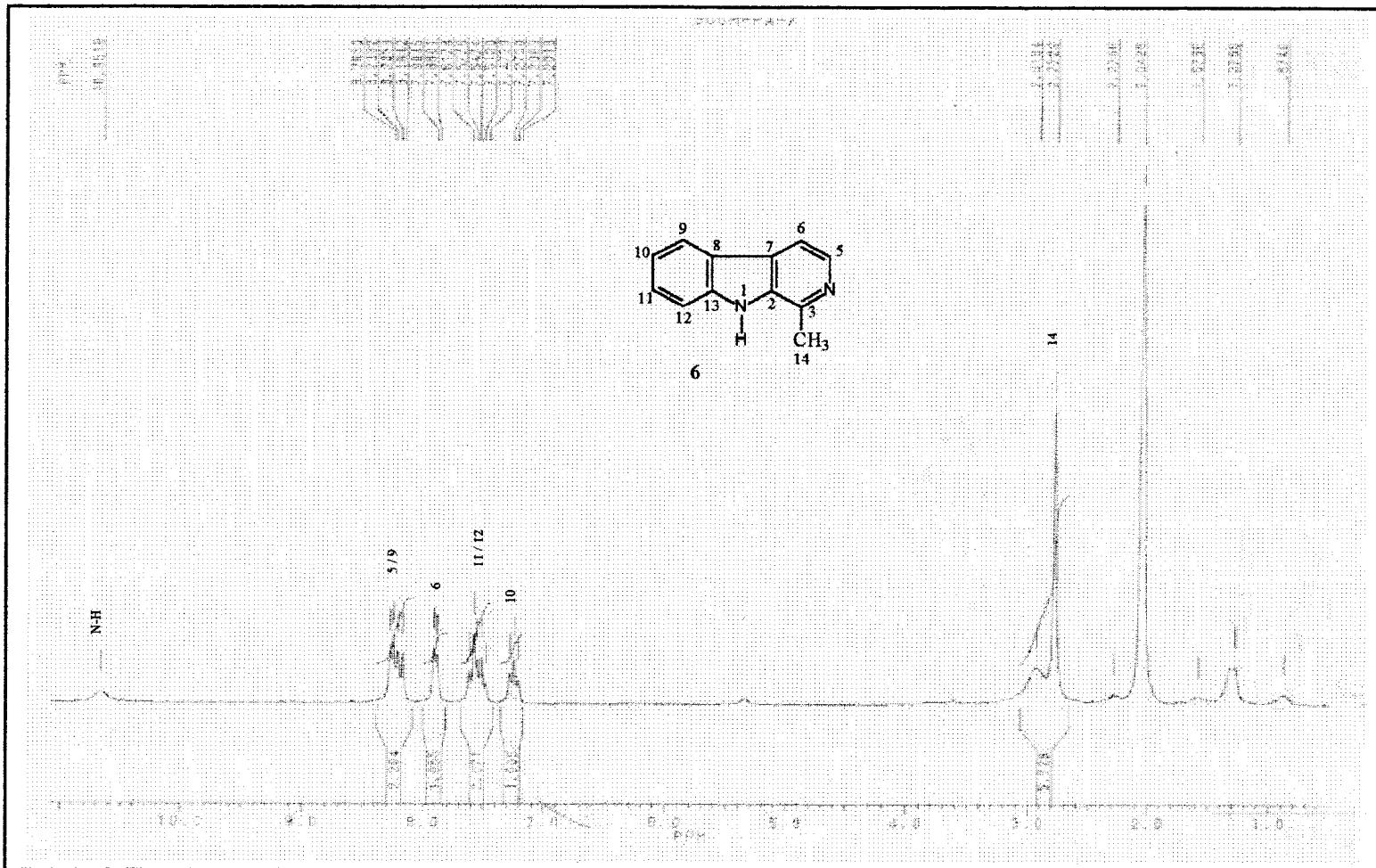


Figura 7: Espectro de RMN ^1H (200 MHz) de SGCM-2 (**6**) registrado em CDCl_3 .

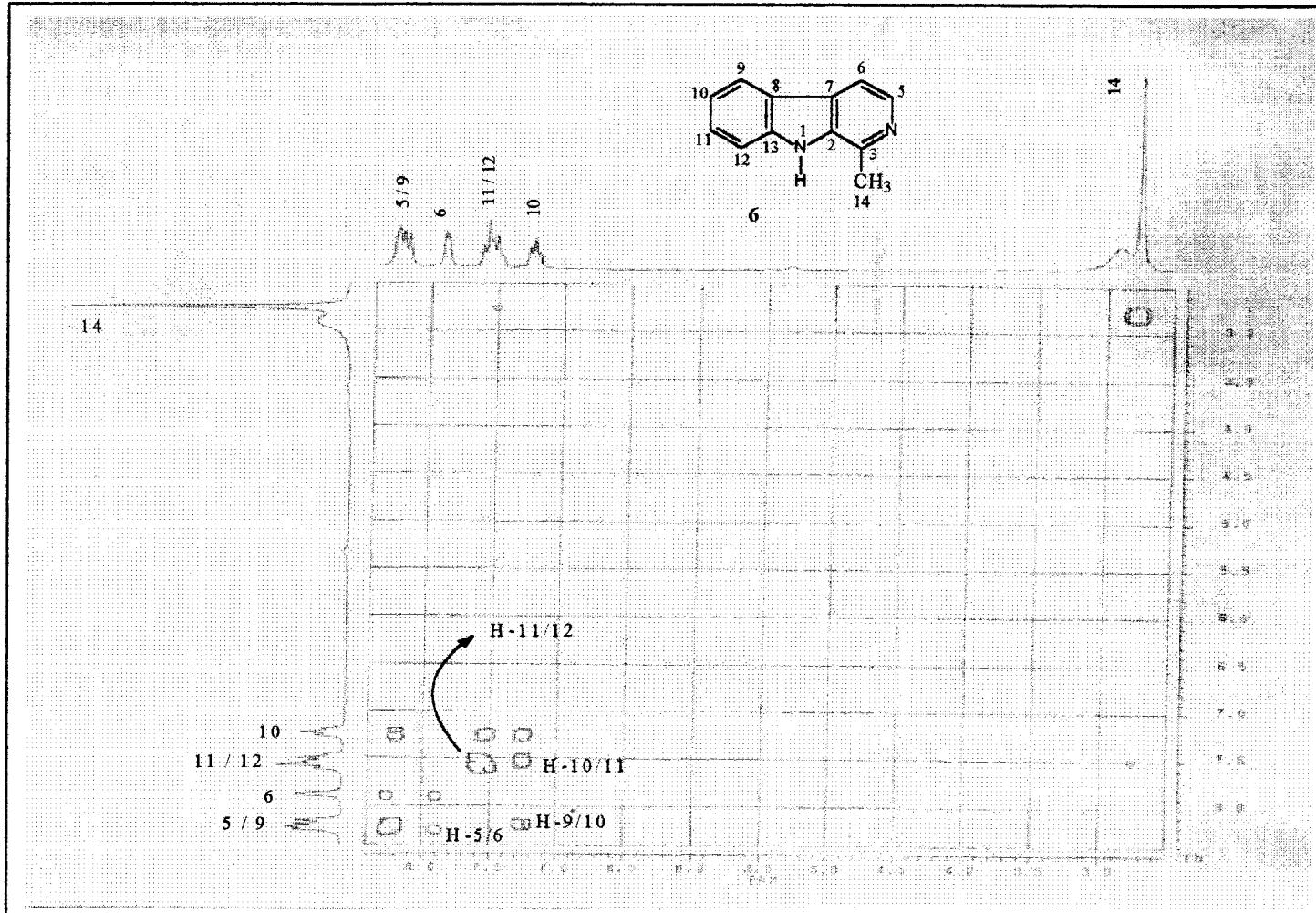


Figura 8: Espectro de RMN 2D (^1H x ^1H -COSY) de SGCM-2 (**6**) registrado em CDCl_3 .

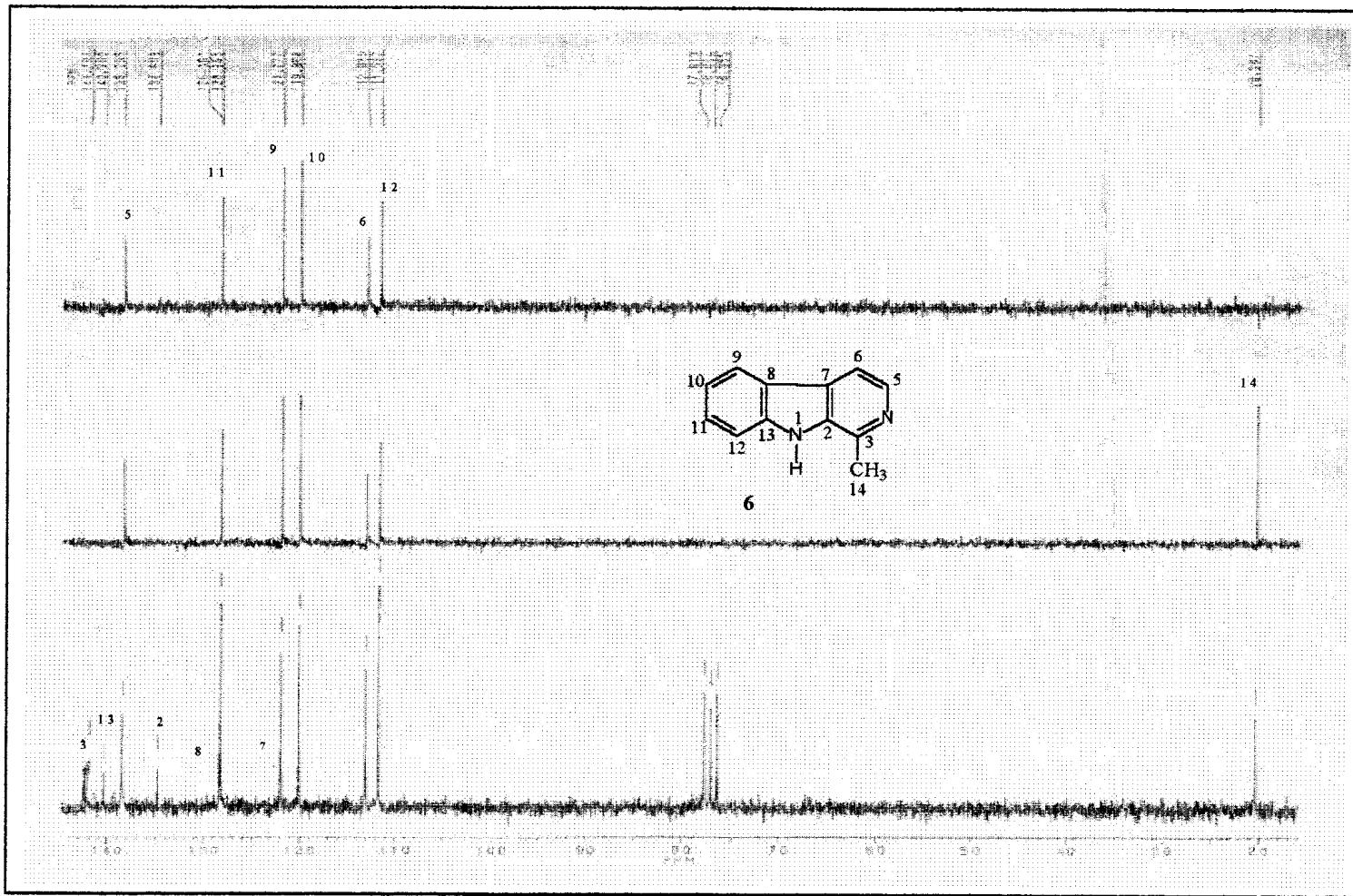


Figura 9: Espectro de RMN ^{13}C de SGCM-2 (**6**) com DEPT ($\theta = 90$ e 135°) registrado em CDCl_3 .

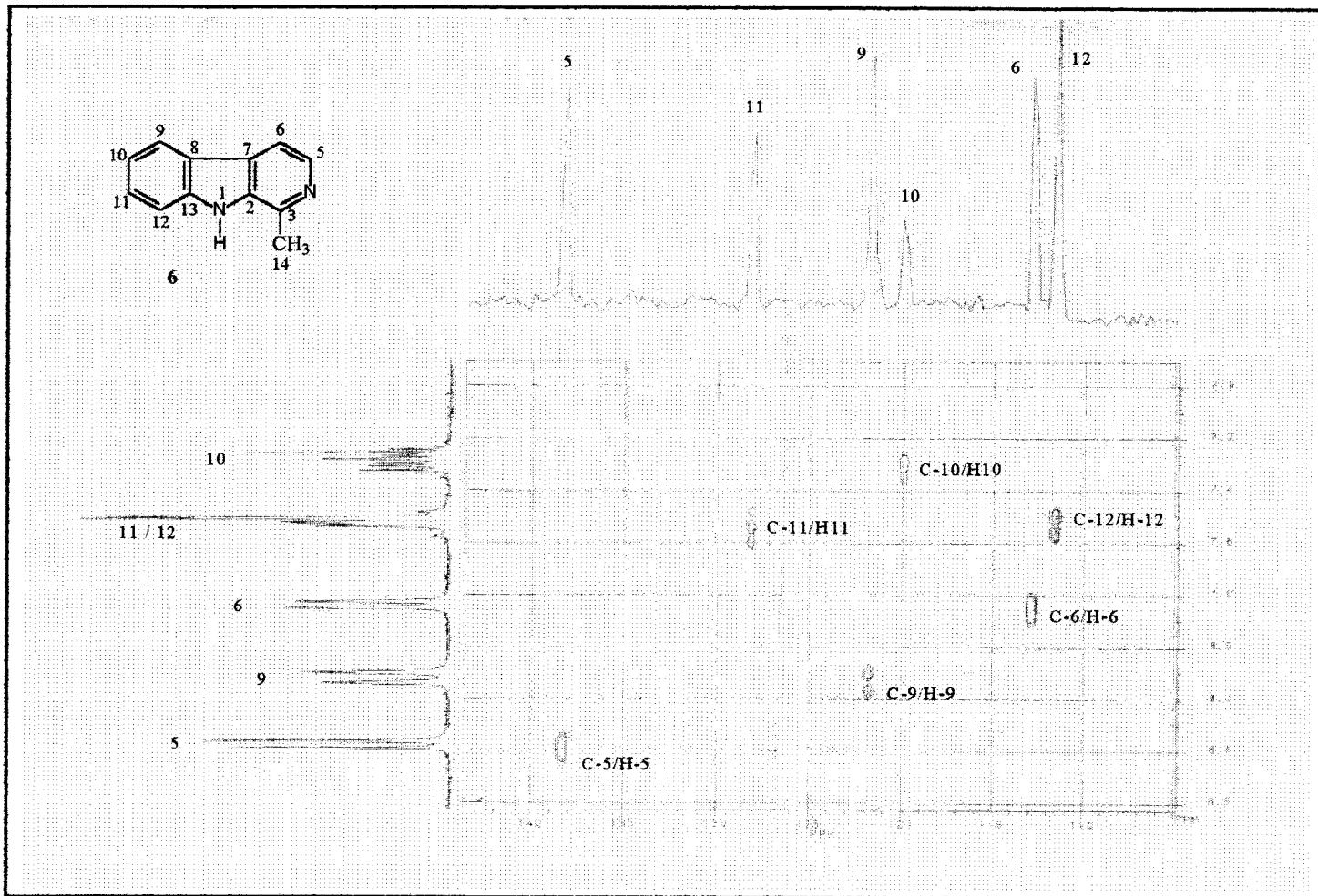


Figura 10: Expansão do espectro de RMN 2D ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -COSY, $^1\text{J}_{\text{CH}}$) de SGCM-2 (**6**) registrado em CDCl_3

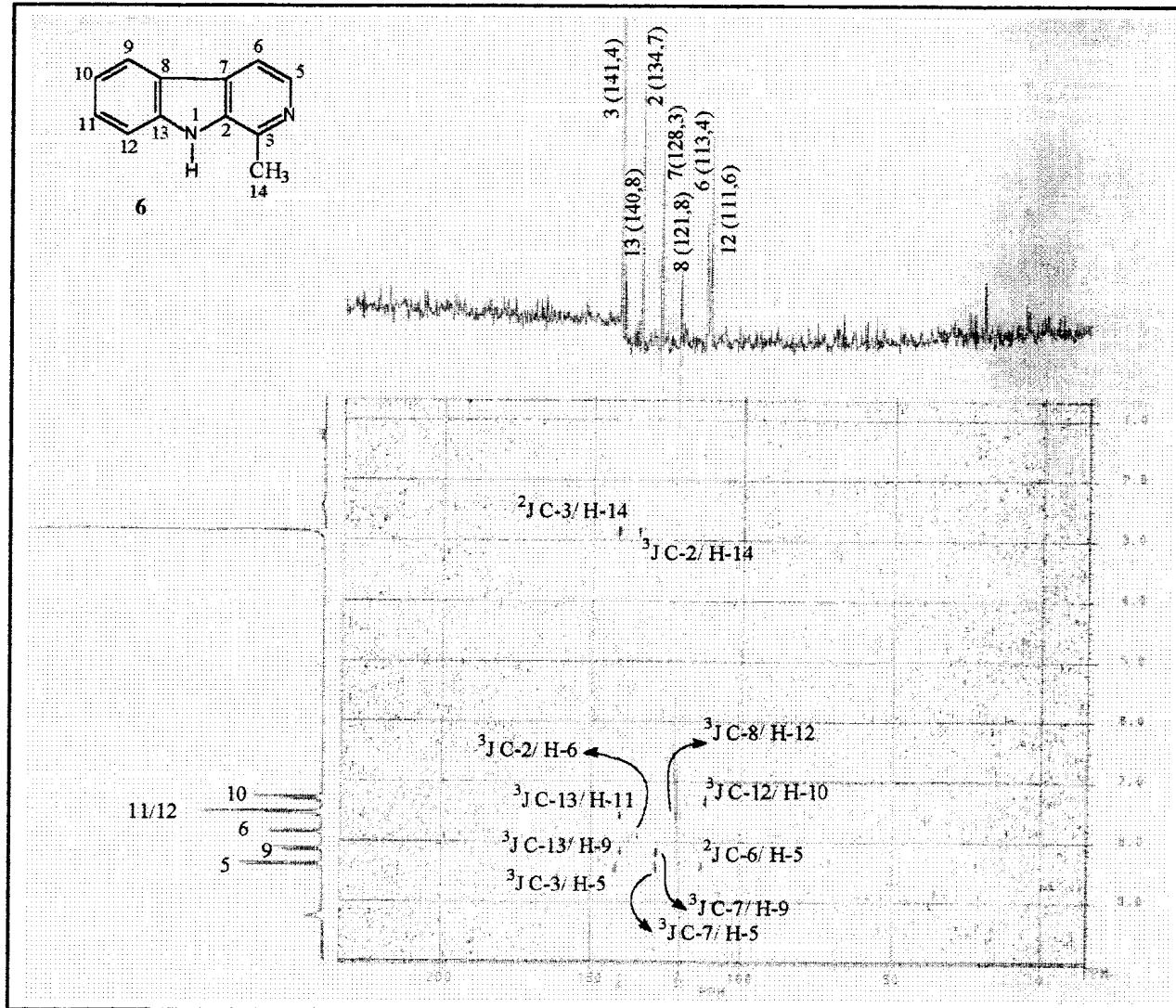


Figura 11: Expansão do espectro de RMN 2D (^1H x ^{13}C -COSY, $^{2,3}\text{J}_{\text{CH}}$) de SGCM-2 (6) registrado em CDCl_3 .

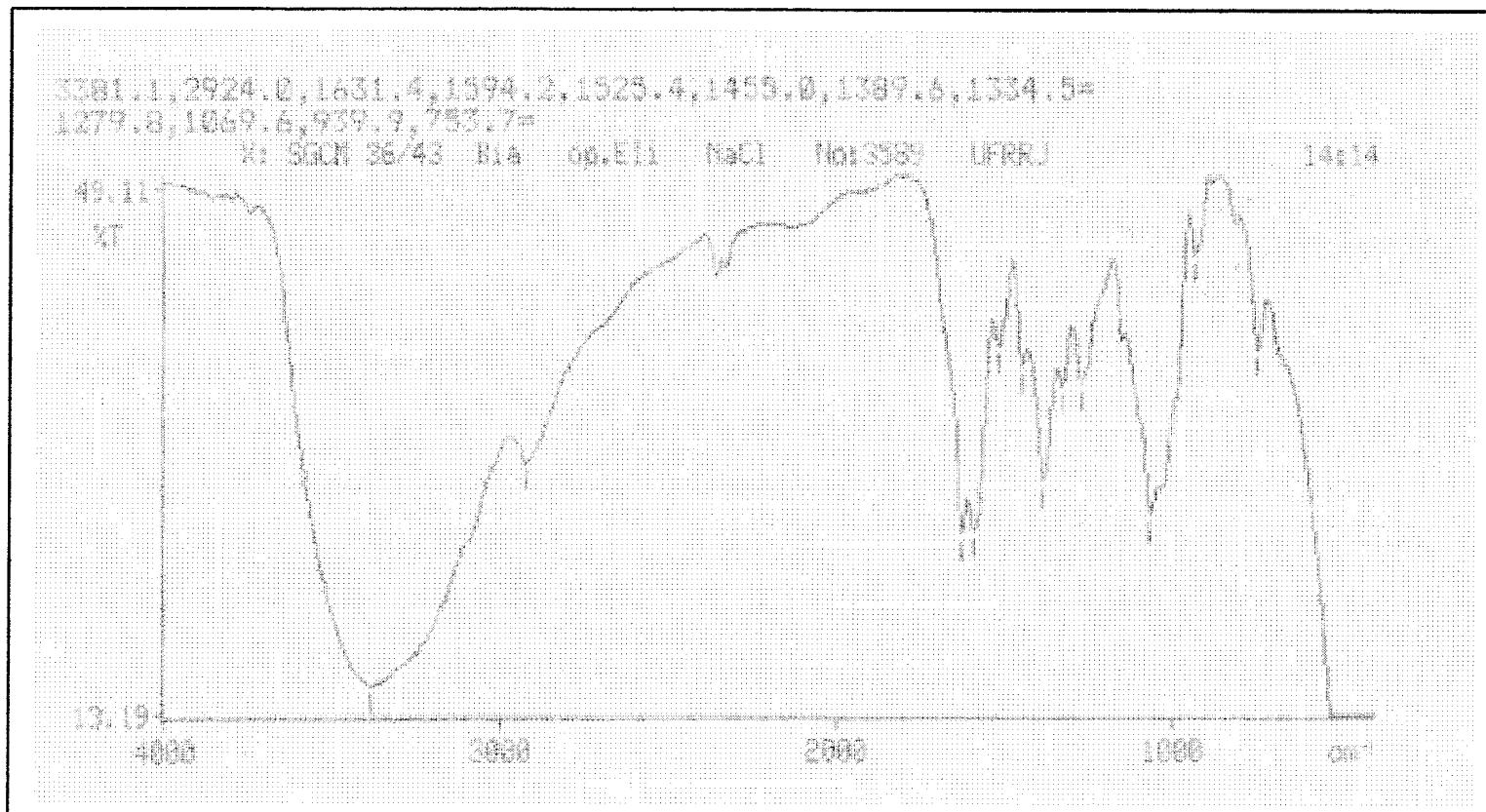


Figura 12: Espectro de IV de SGCM-2 (7) em filme de NaCl.

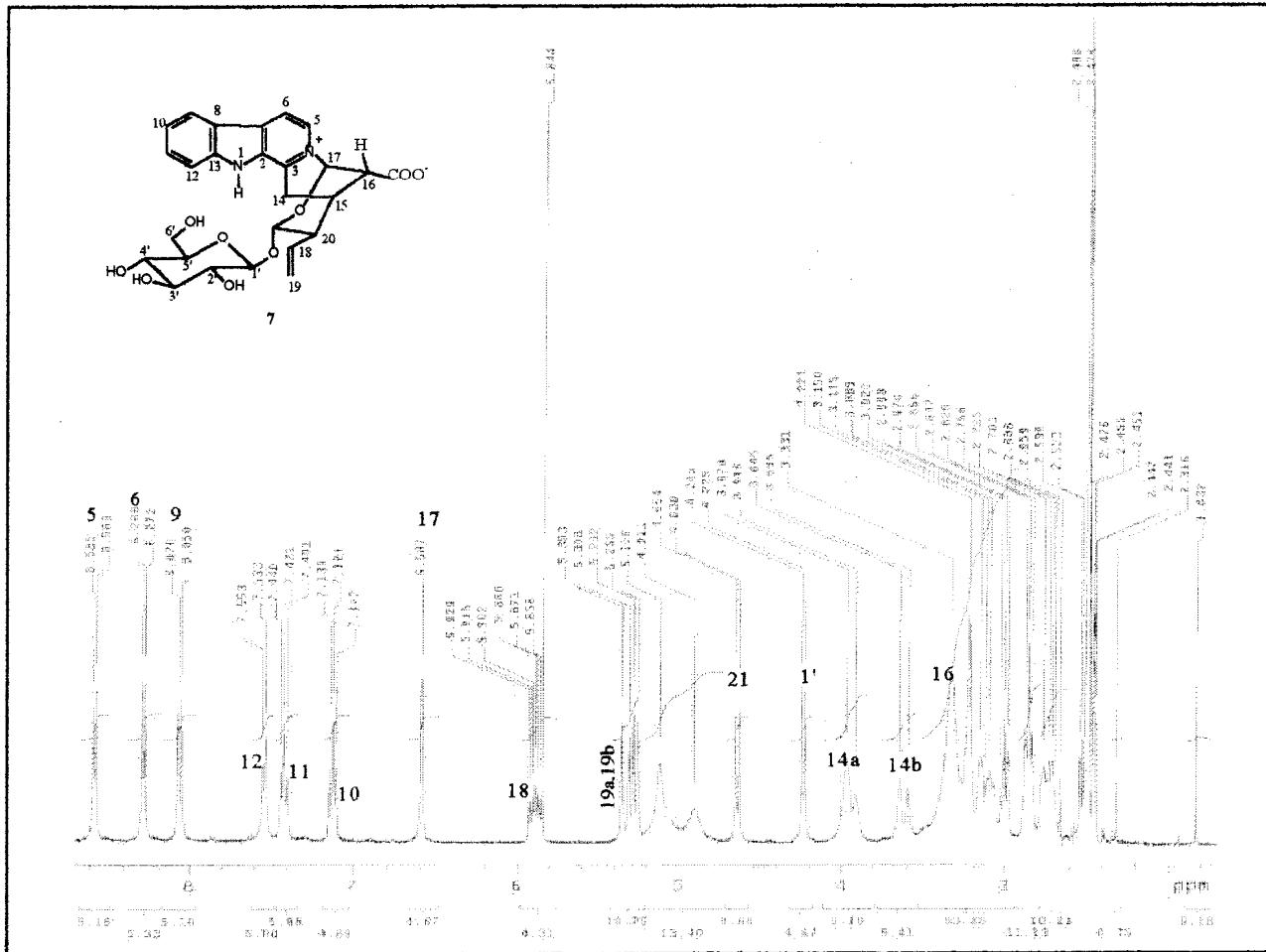


Figura 13: Espectro de RMN ^1H (400 MHz) de SGCM-3 (7) registrado em DMSO.

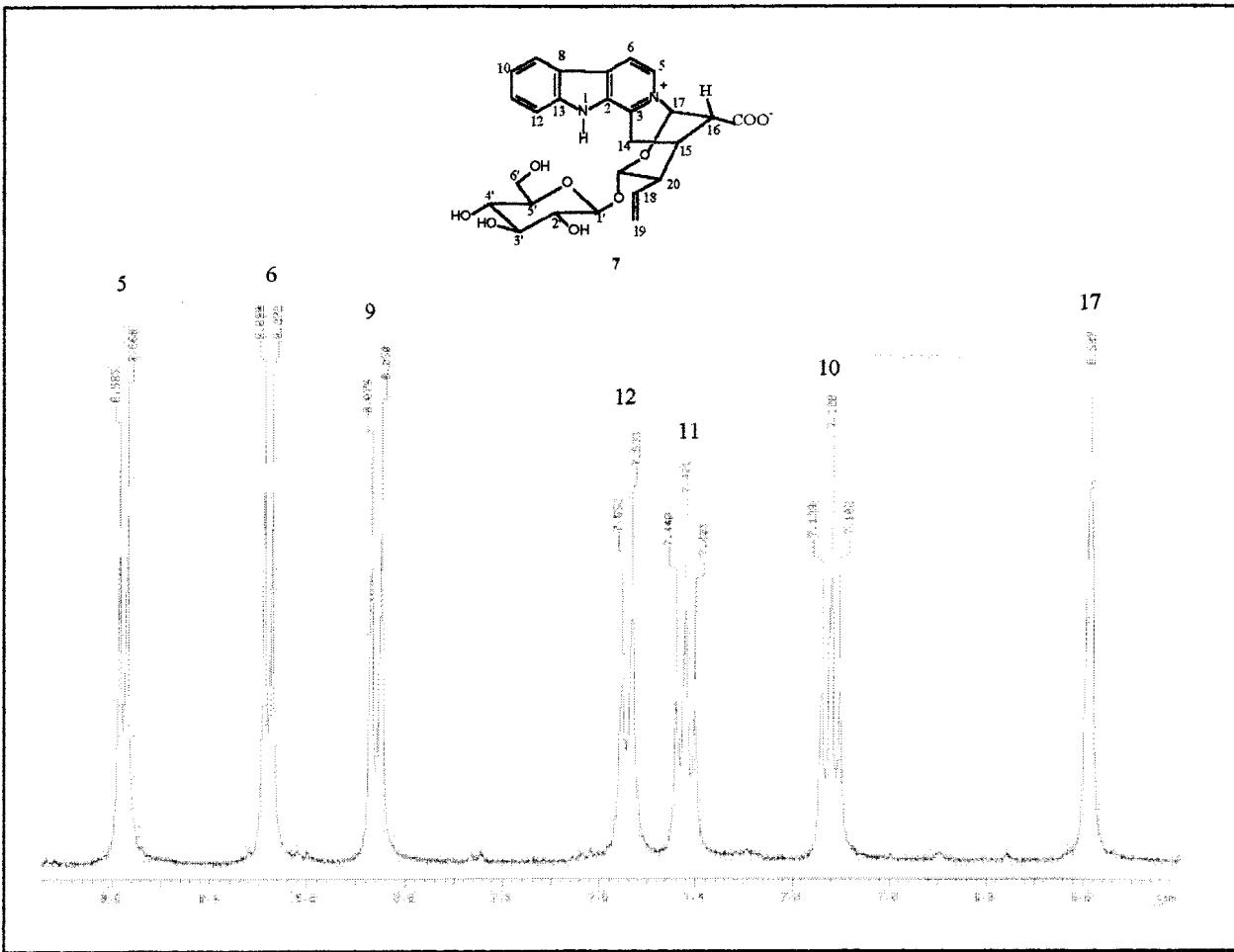


Figura 13a: Expansão (9,0-6,5 ppm) do espectro de RMN ^1H (400 MHz) de SGCM-3 (7) registrado em DMSO.

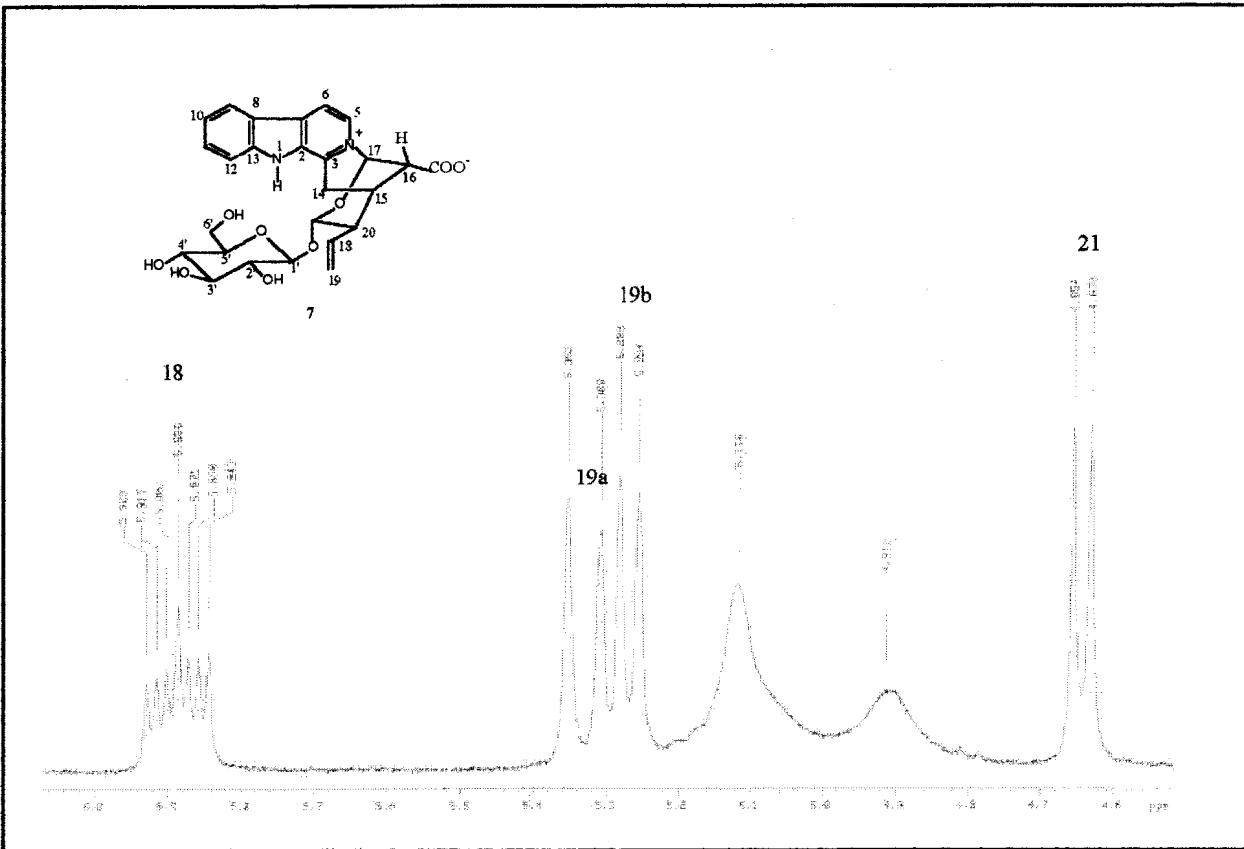


Figura 13b: Expansão (6,0-4,5 ppm) do espectro de RMN ^1H (400 MHz) de SGCM-3 (7) registrado em DMSO.

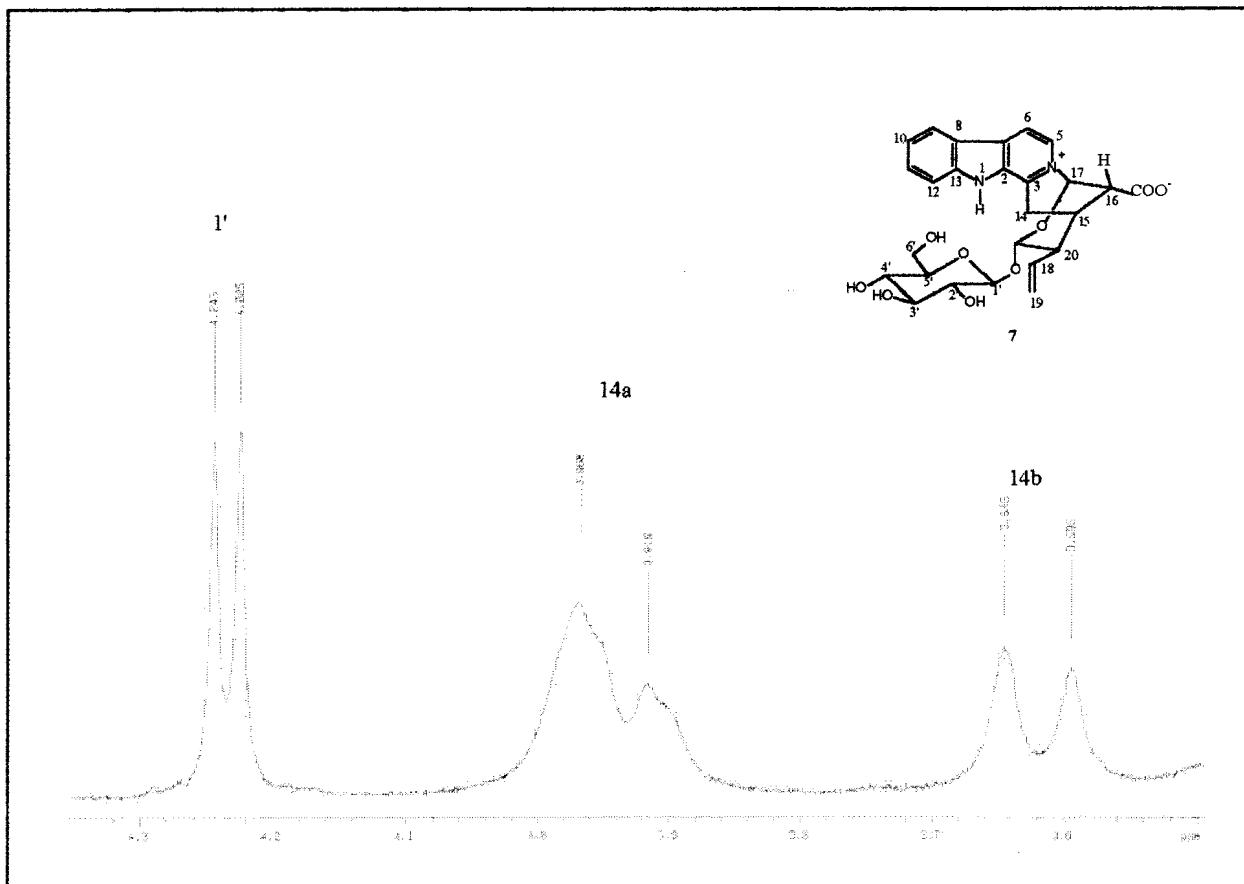


Figura 13c: Expansão (4,5-3,5 ppm) do espectro de RMN ^1H (400 MHz) de SGCM-3 (7) registrado em DMSO.

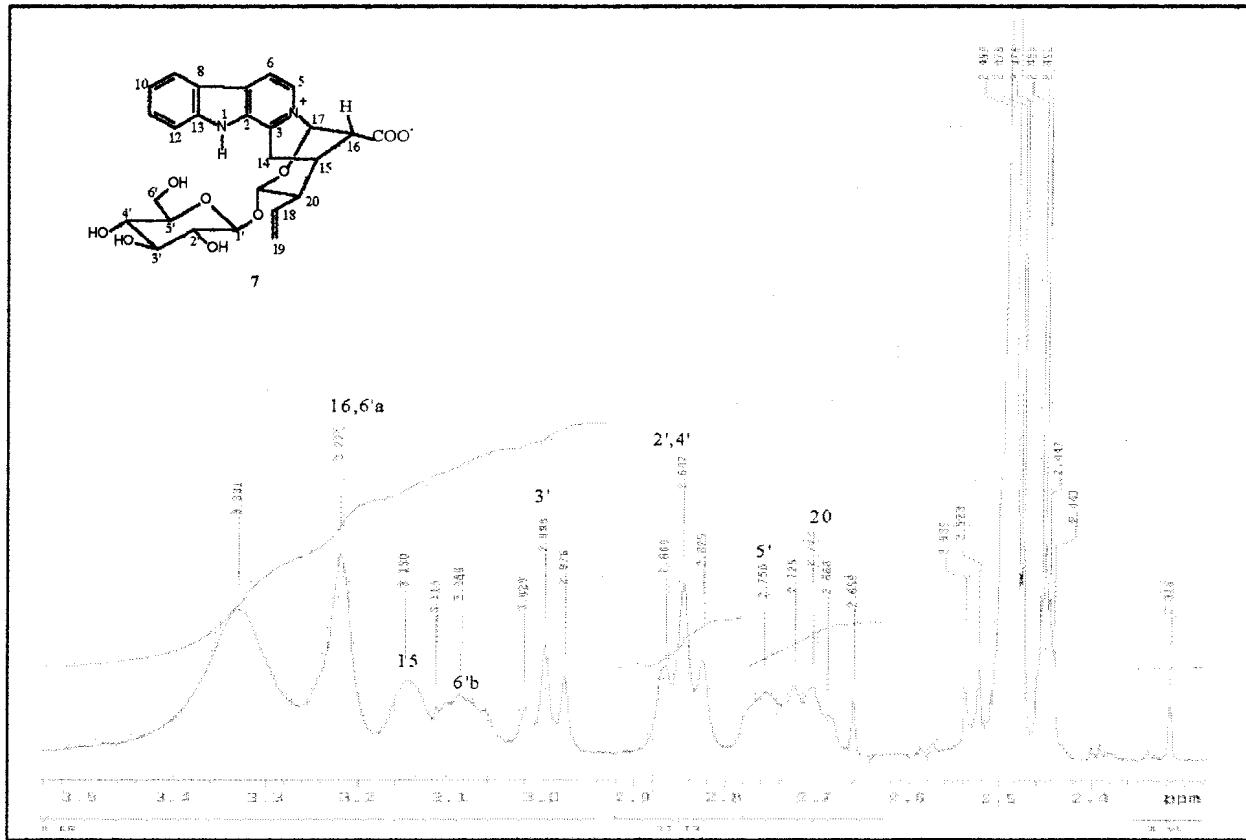


Figura 13d: Expansão (3,5-2,5 ppm) do espectro de RMN ^1H (400 MHz) de SGCM-3 (7) registrado em DMSO.

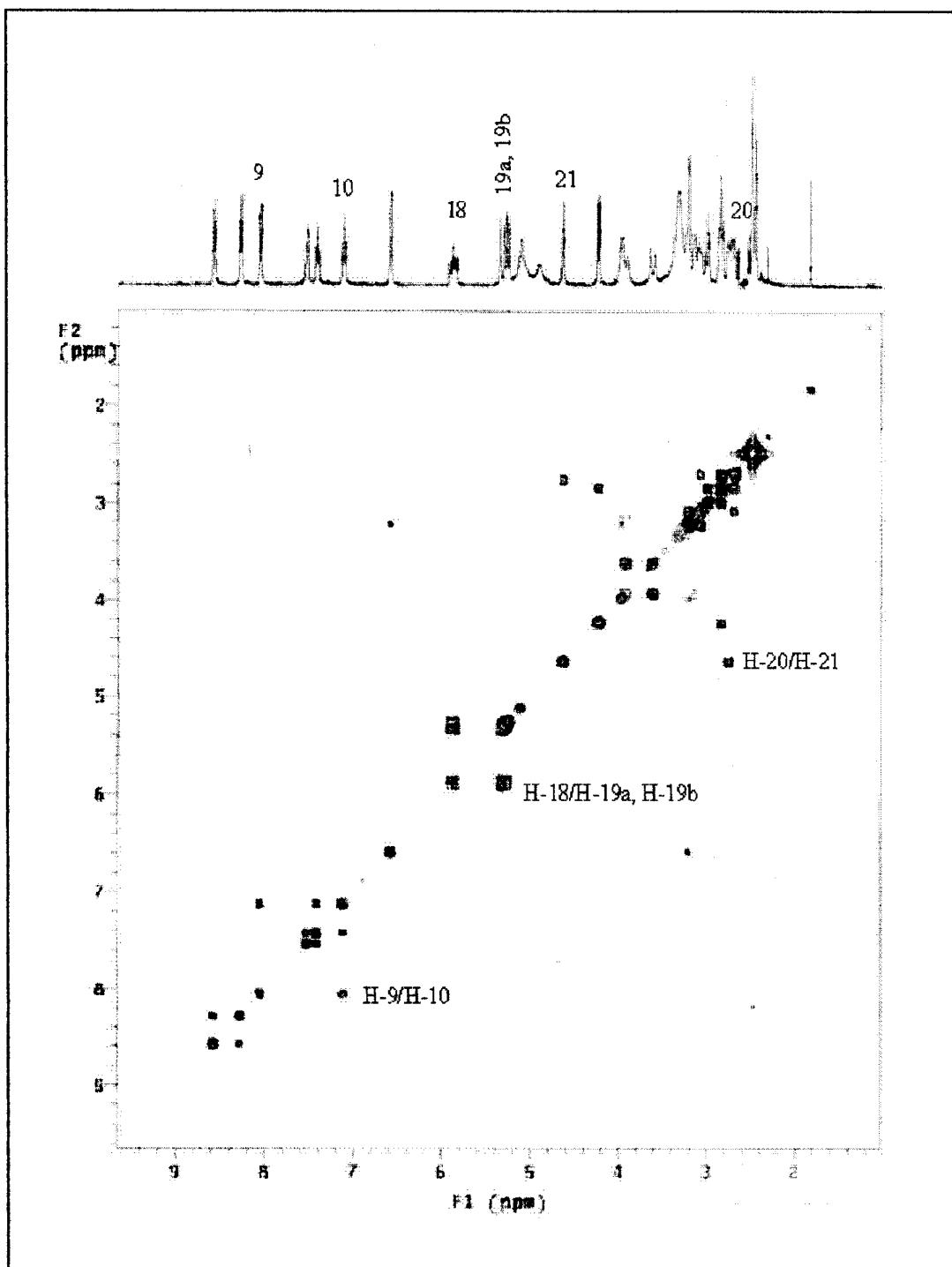


Figura 14: Espectro de RMN 2D ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY) de SGCM-3 (7)
registrado em DMSO.

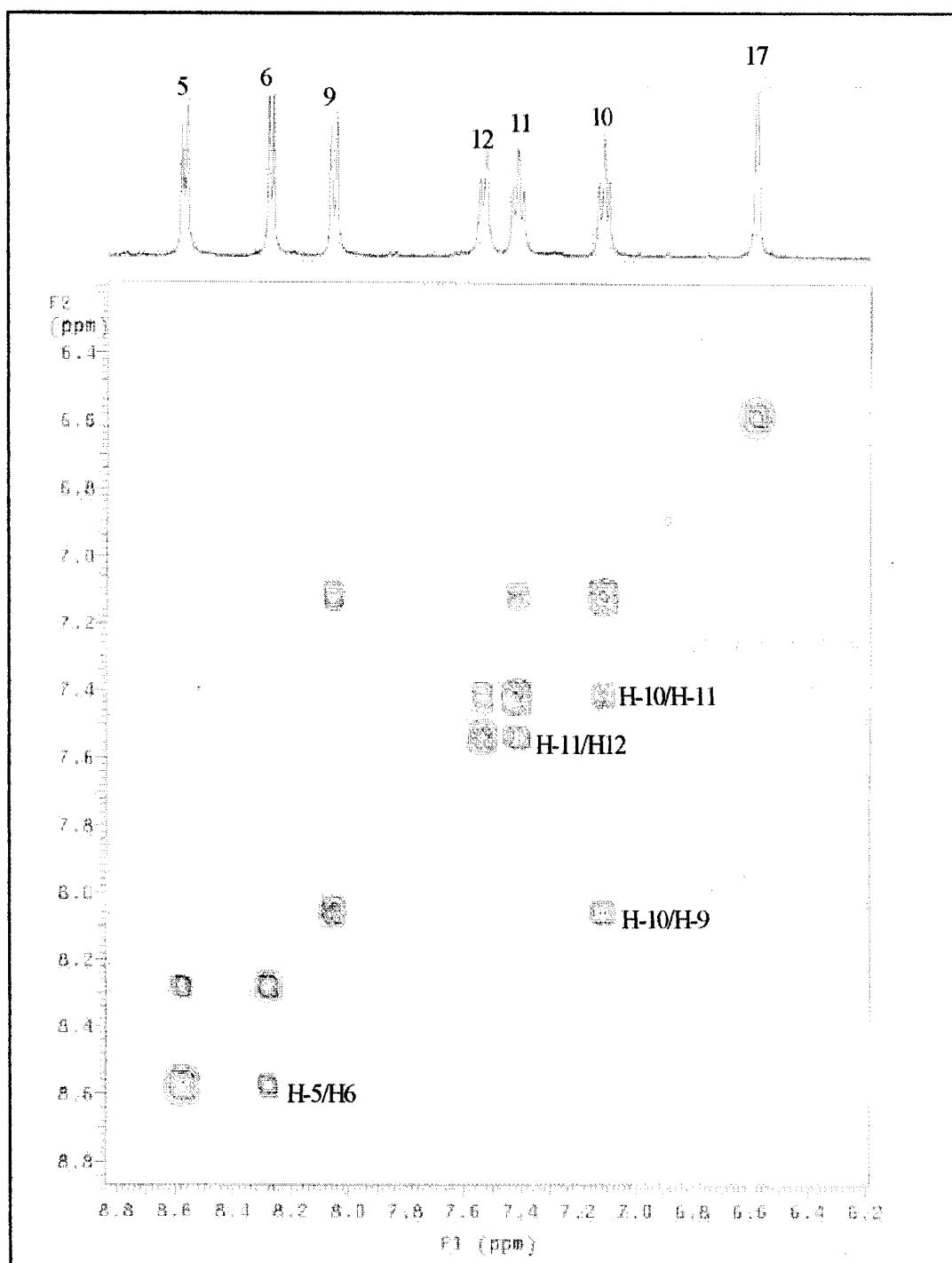


Figura 14a: Expansão (8,8-6,2 ppm) do espectro de RMN 2D ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY) de SGCM-3 (7) registrado em DMSO.

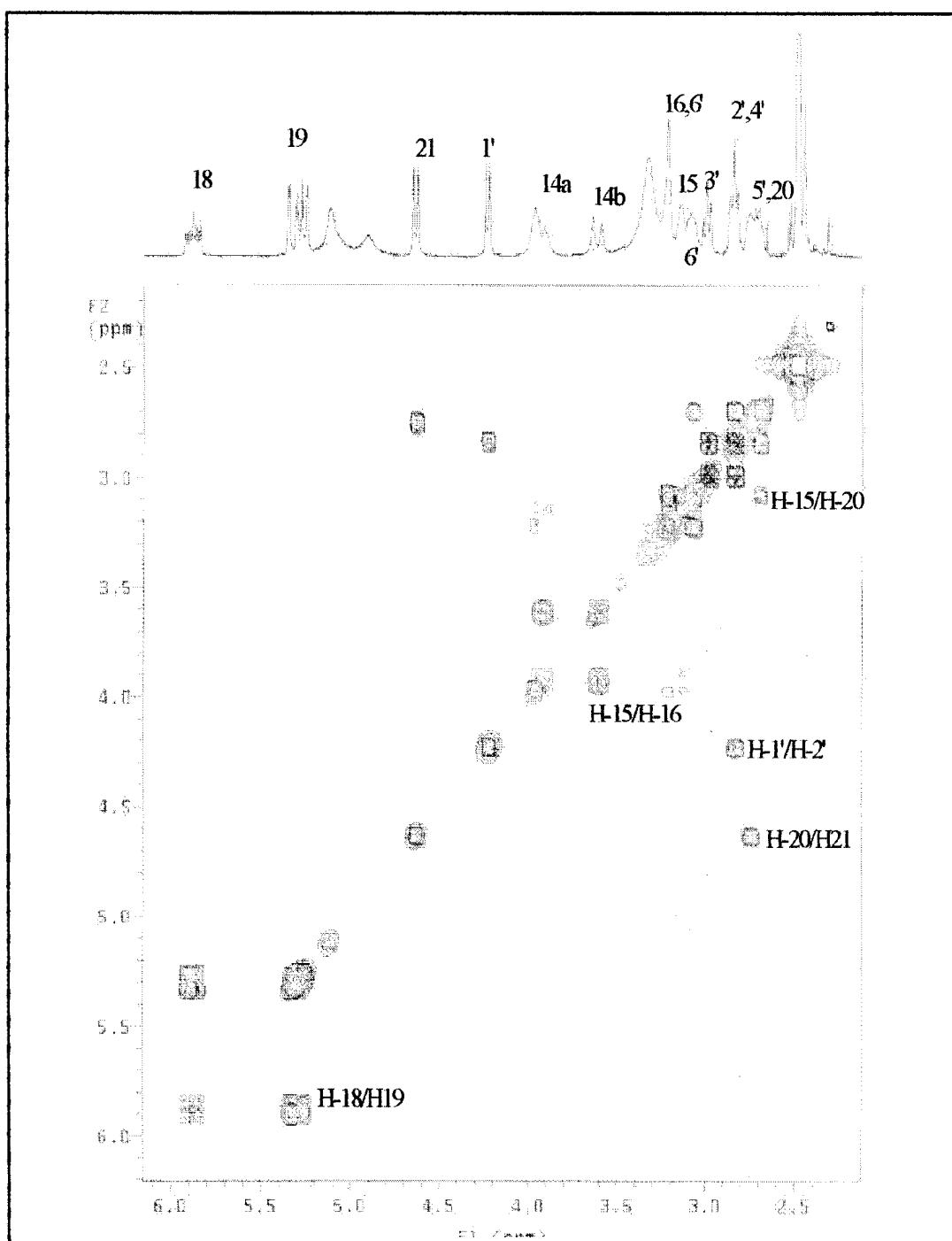
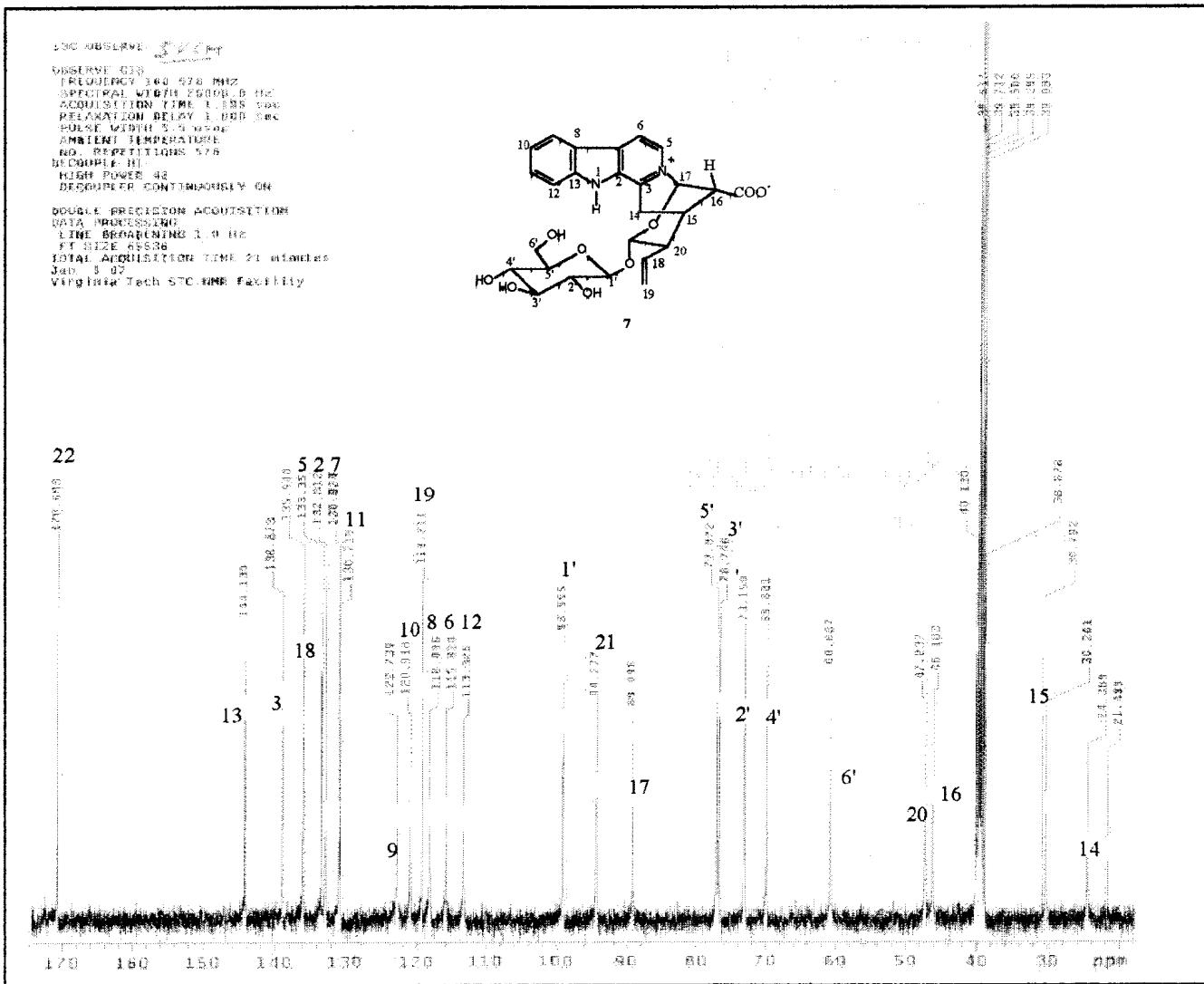


Figura 14b: Expansão (6,0-2,5 ppm) do espectro de RMN 2D ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY) de SGCM-3 (7) registrado em DMSO.



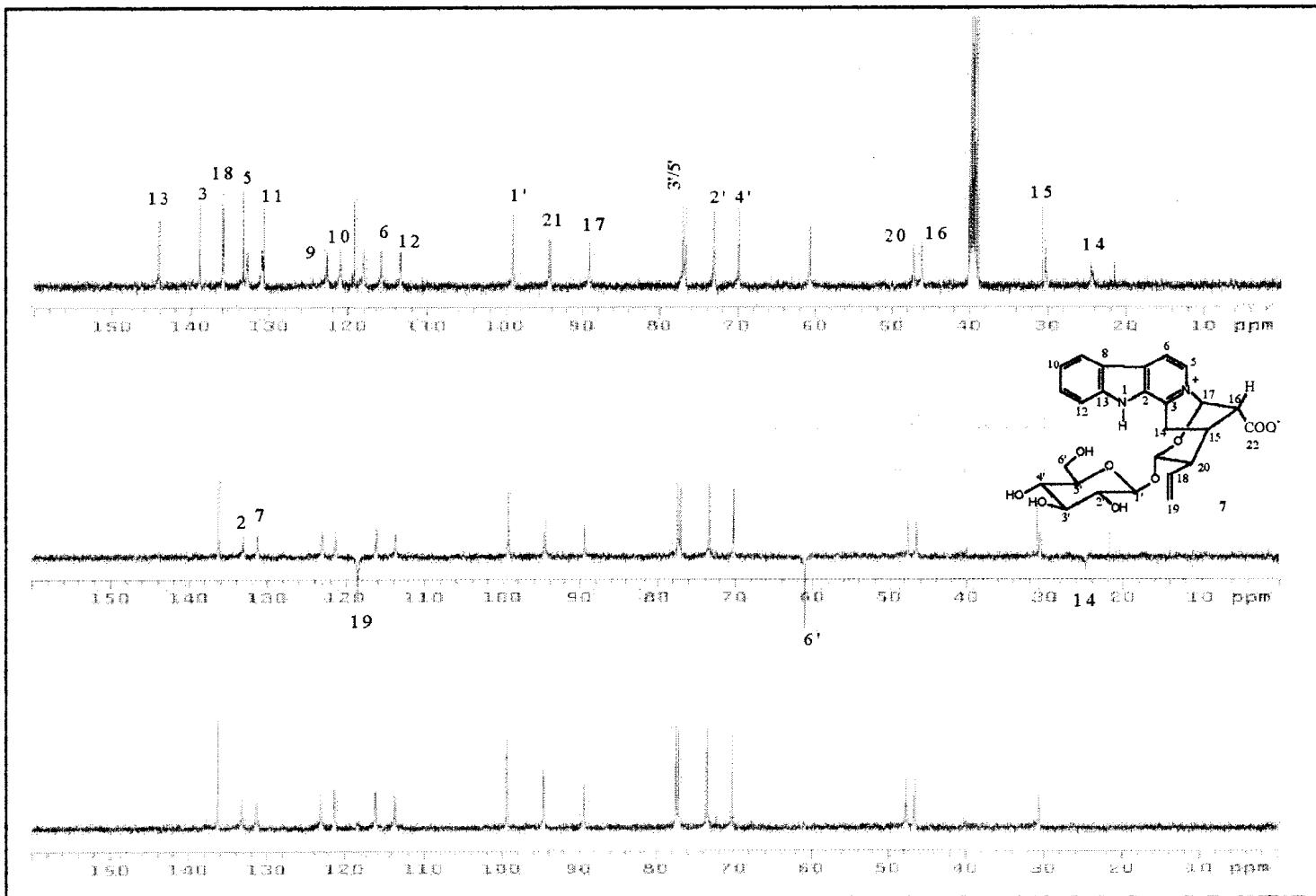


Figura 16: Espectro de RMN ^{13}C de SGCM-3 (7) com DEPT ($\theta = 90$ e 135°) registrado em DMSO.

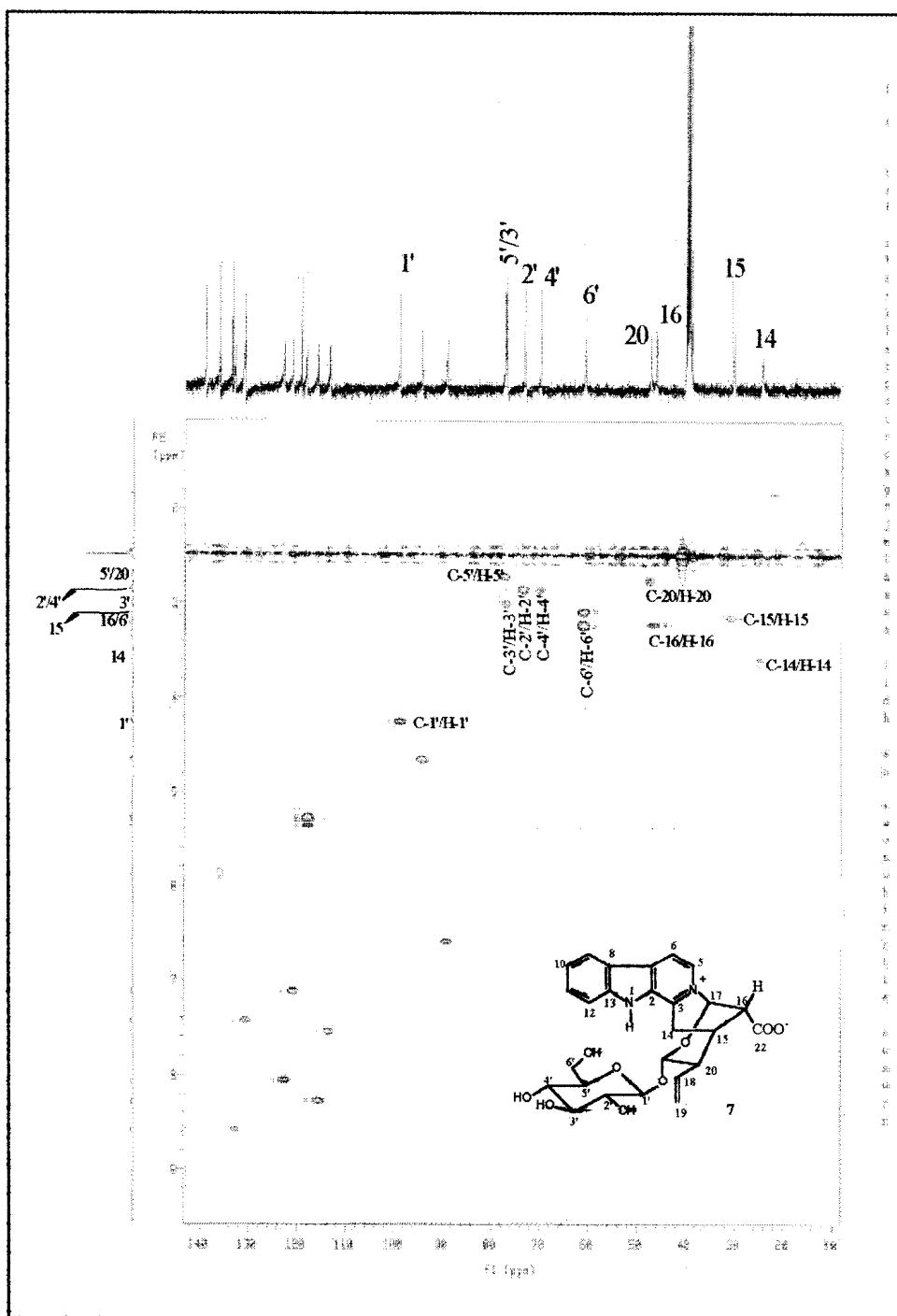


Figura 17: Espectro de RMN 2D ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -COSY, $^1\text{J}_{\text{CH}}$)-HMQC de SGCM-3 (7) registrado em DMSO.

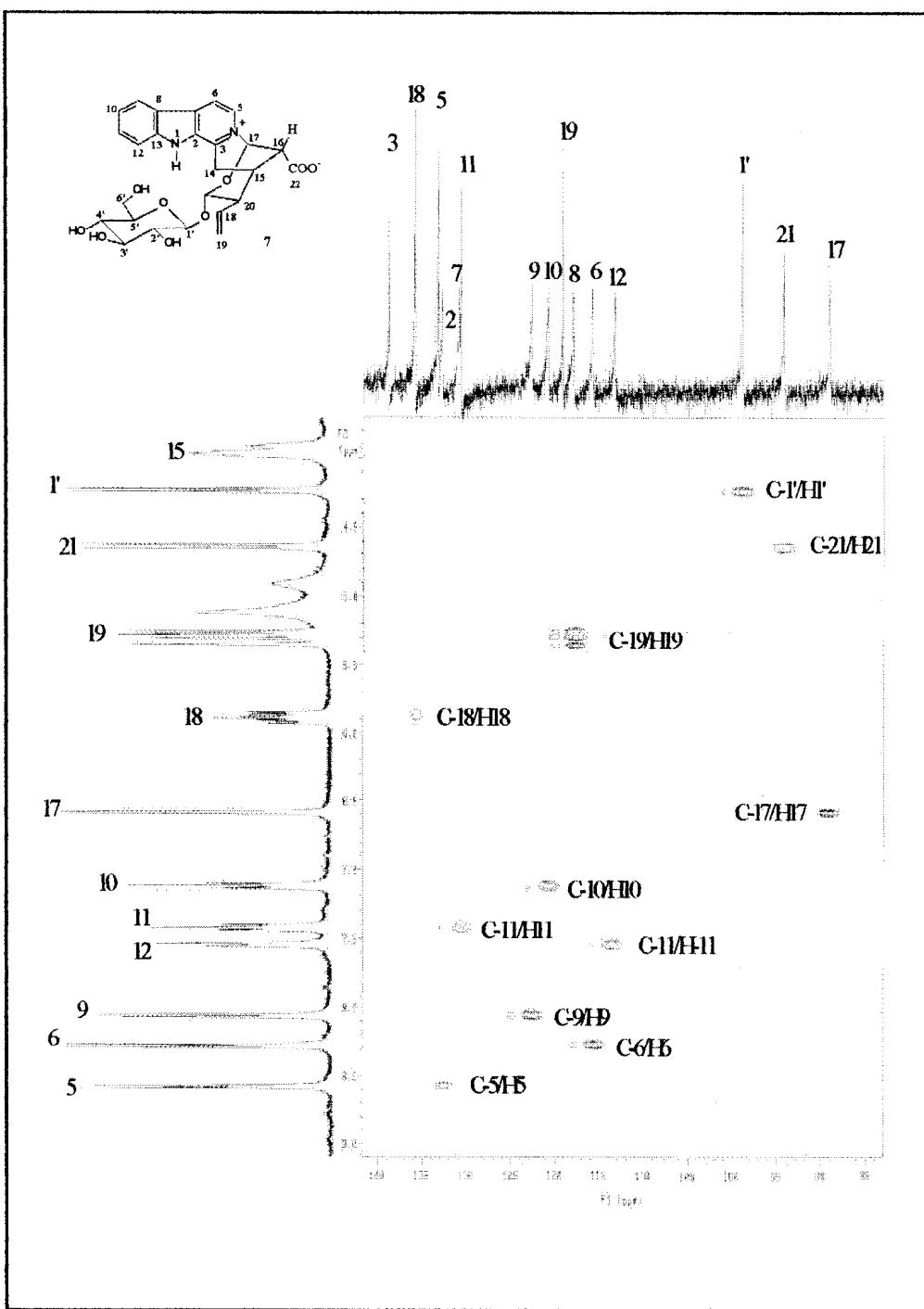


Figura 17a: Expansão do espectro de RMN 2D ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -COSY, $^1\text{J}_{\text{CH}}$)-HMQC de SGCM-3 (7) registrado em DMSO.

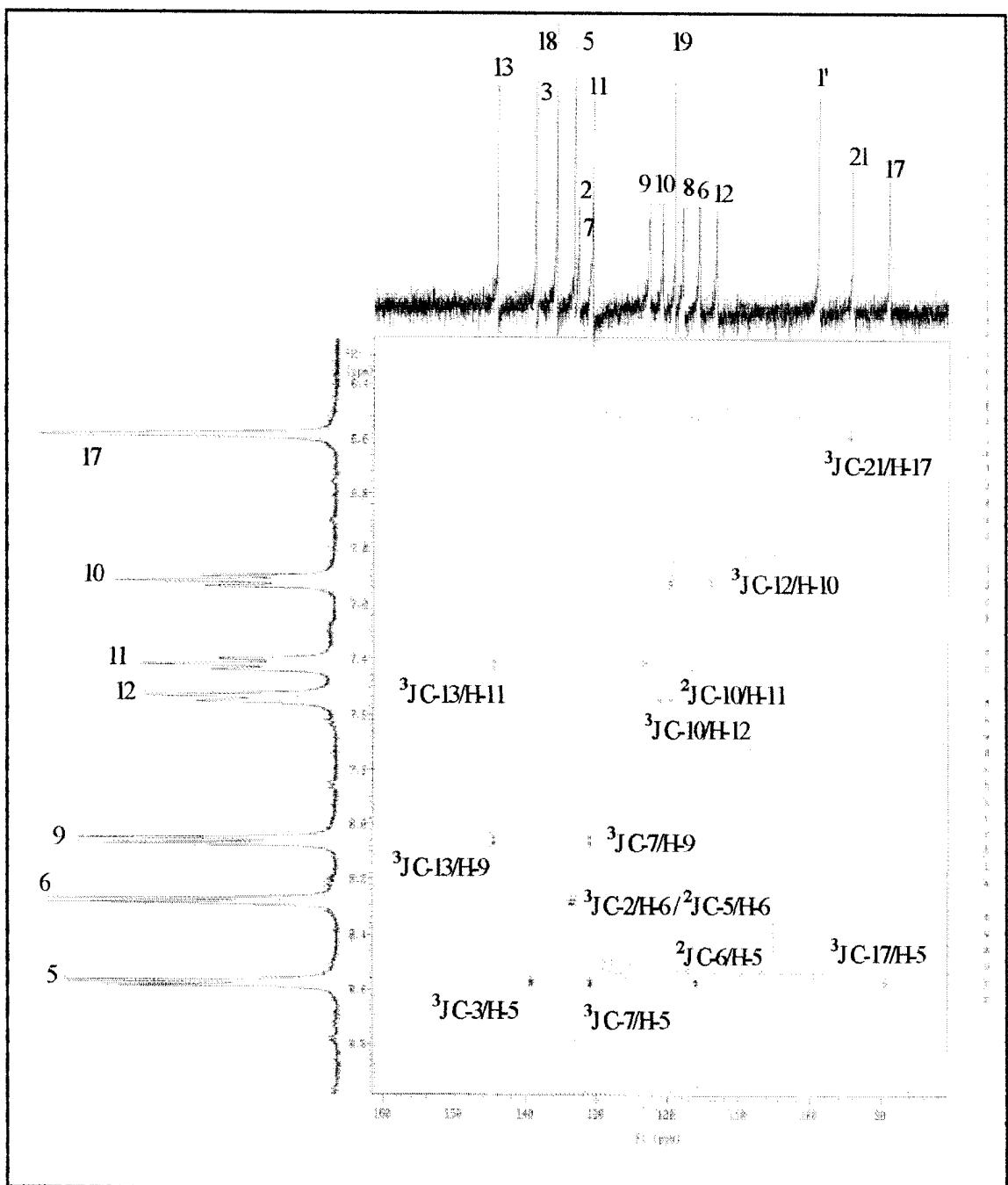


Figura 18: Espectro de RMN 2D (^1H x ^{13}C -COSY, $^{2,3}\text{J}_{\text{CH}}$)-HMBC de SGCM-3 (7) registrado em DMSO.

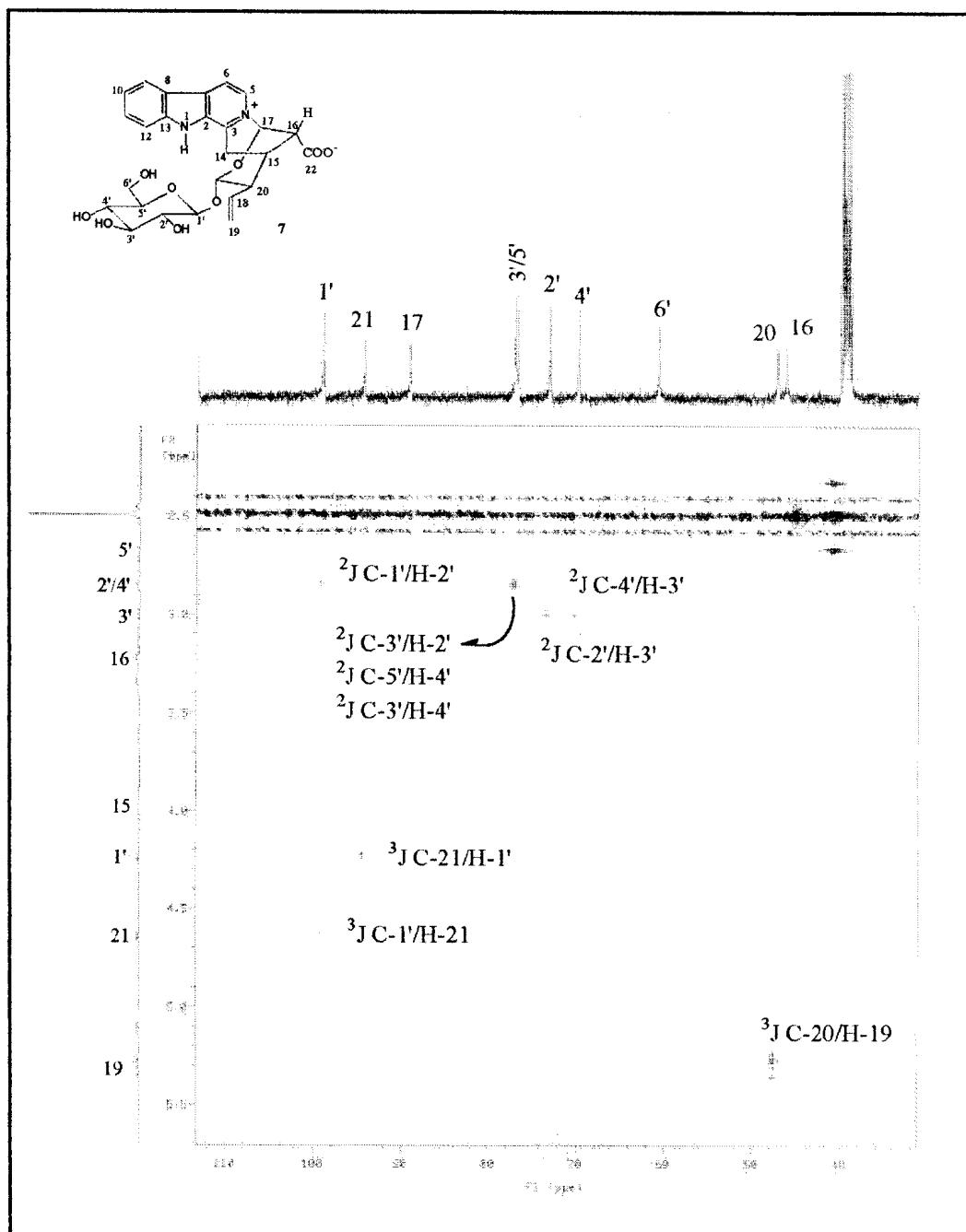


Figura 18a: Expansão do espectro de RMN 2D ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -COSY, $^{2,3}\text{J}_{\text{CH}}$)-HMBC de SGCM-3 (7) registrado em DMSO.

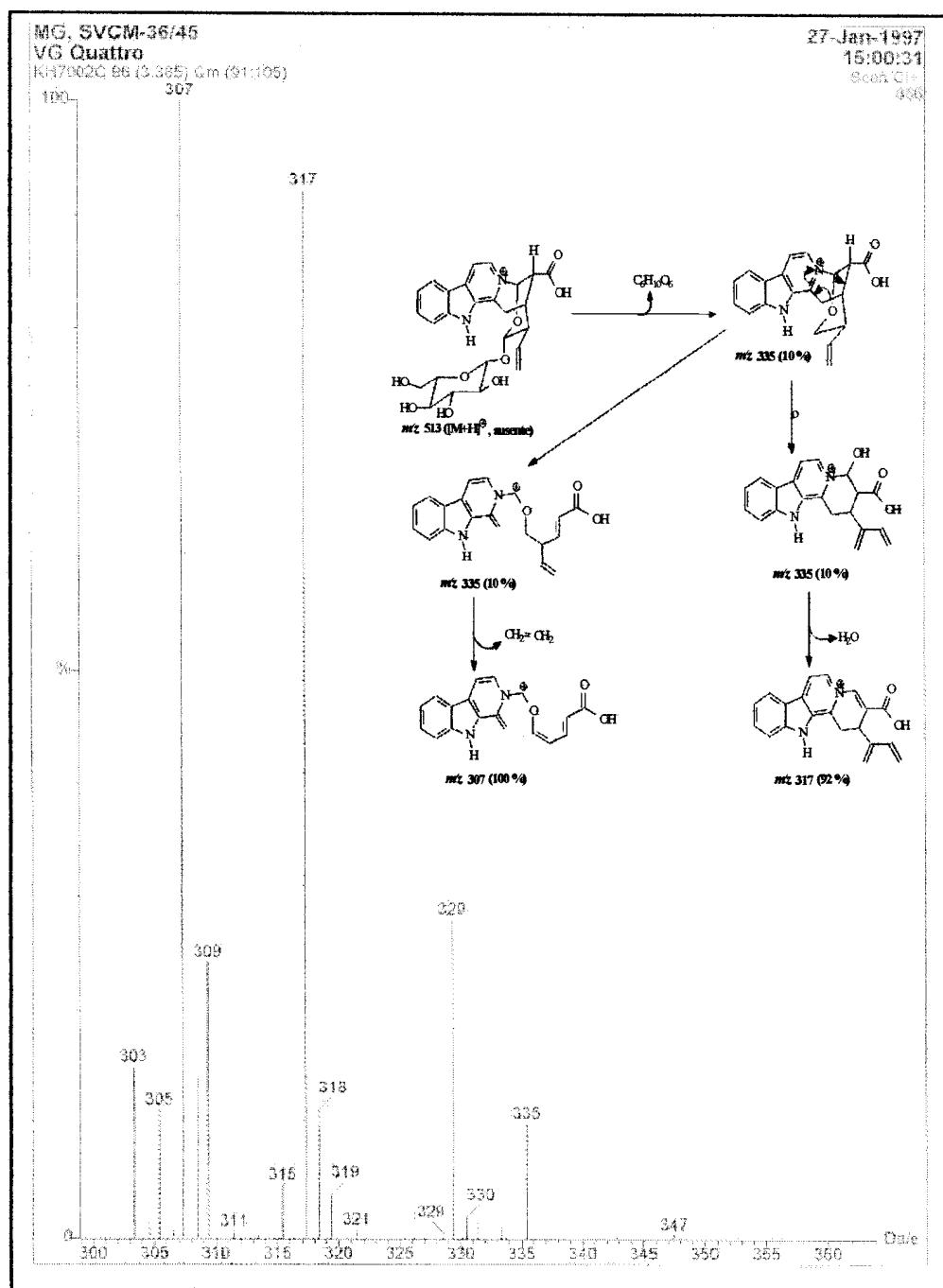


Figura 19: Espectro de massas de SGCM-3 (7) por ionização química.

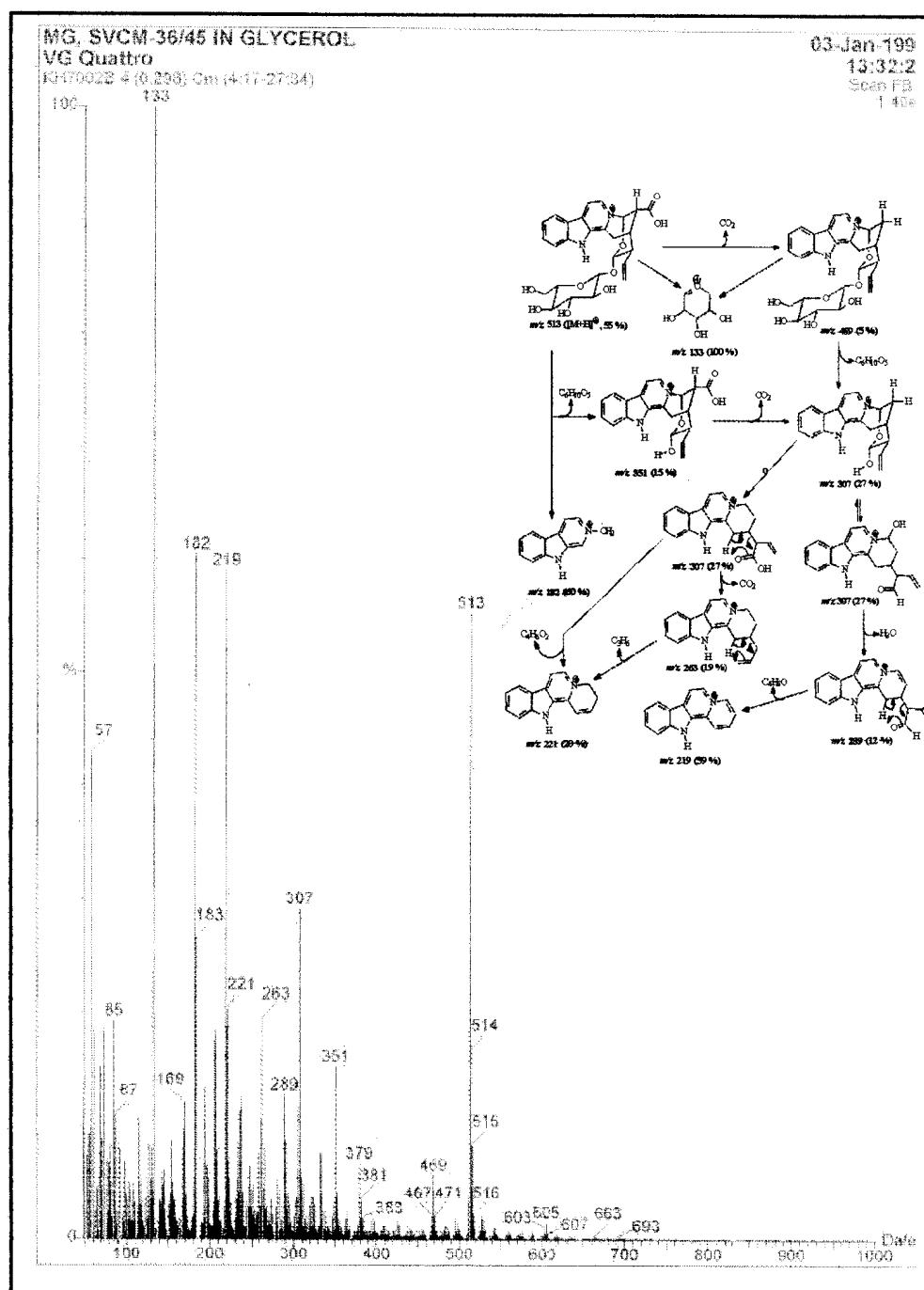


Figura 20: Espectro de massas de SGCM-3 (7) por FAB

com glicerol como matriz.

STANDARD: 1H DSS/DETE

OBSERVE: 1H

FREQUENCY: 399.951 MHz

SPECTRAL WIDTH: 5280.0 Hz

ACQUISITION TIME: 5.744 sec

RELAXATION DELAY: 1.0000 sec

PULSE WIDTH: 3.0 °WRC

SWEEP WIDTH: 10.0 Hz

NO. REPETITIONS: 32

DOUBLE PRECISION: ACQUISITION

DATA PROCESSING:

FT SIZE: 55536

TOTAL ACQUISITION TIME: 2. minutes

Mar. 12 9:20 AM 2008

Virginia Tech ETC NMR Facility

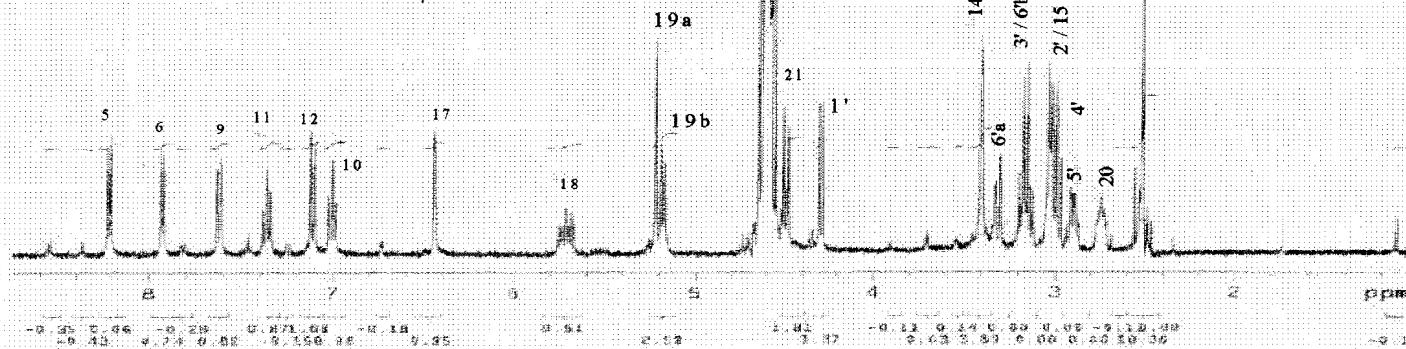
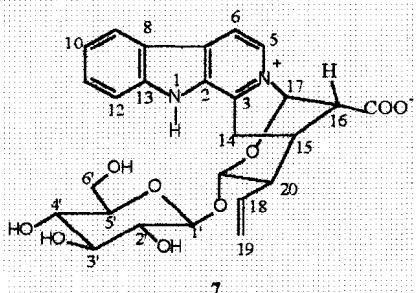


Figura 21: Espectro de RMN ¹H (400 MHz) de SGCM-3 (7) registrado em D₂O.

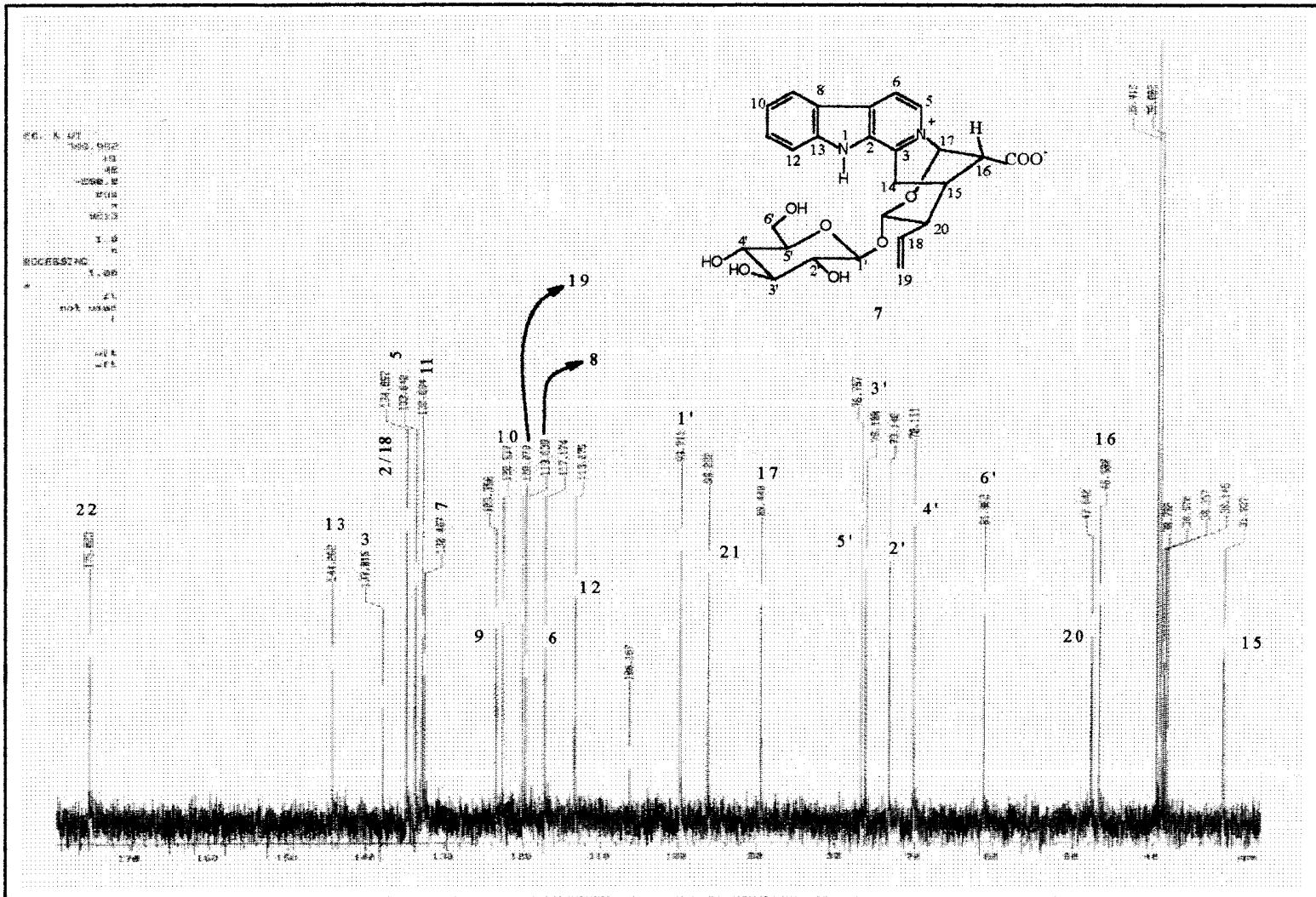


Figura 22: Espectro de RMN ^{13}C PND de SGCM-3 (7) registrado em D_2O .

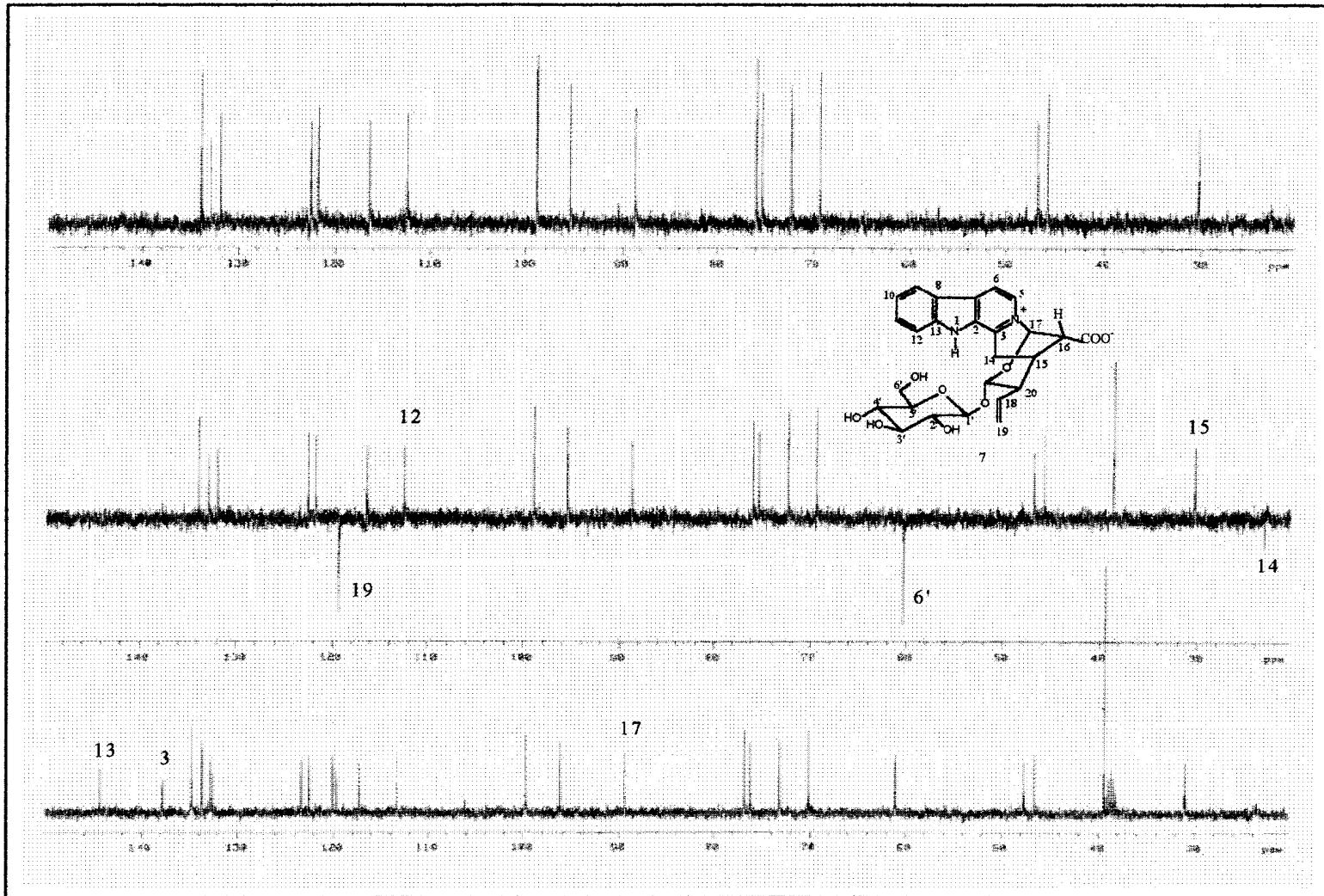


Figura 23: Espectro de RMN ^{13}C de SGCM-3 (7) com DEPT ($\theta = 90$ e 135°) registrado em D_2O .

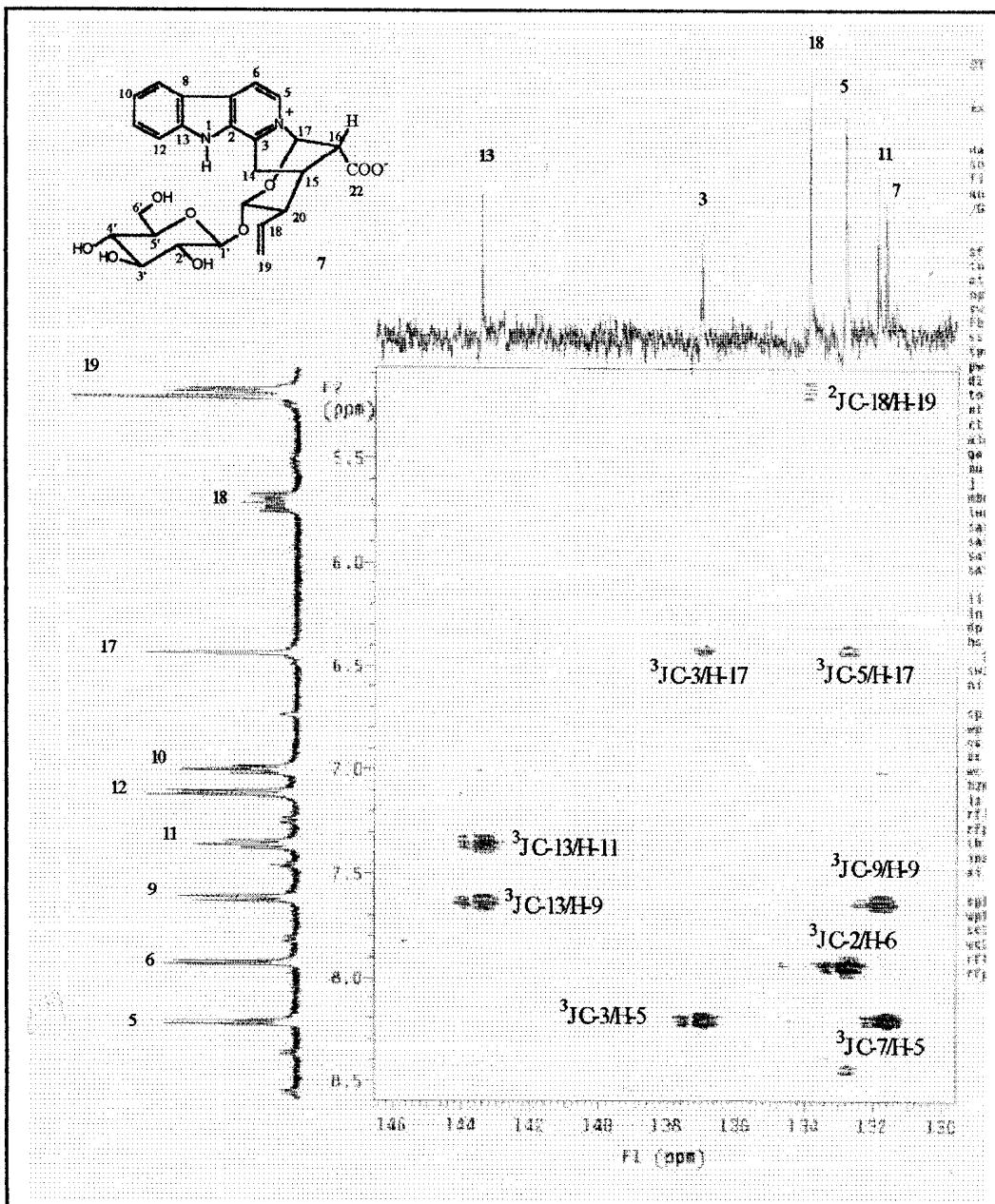


Figura 24: Expansão do espectro de RMN 2D ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -COSY, $^{2,3}\text{J}_{\text{CH}}$)-HMBC de SGCM-3 (7) registrado em D_2O .

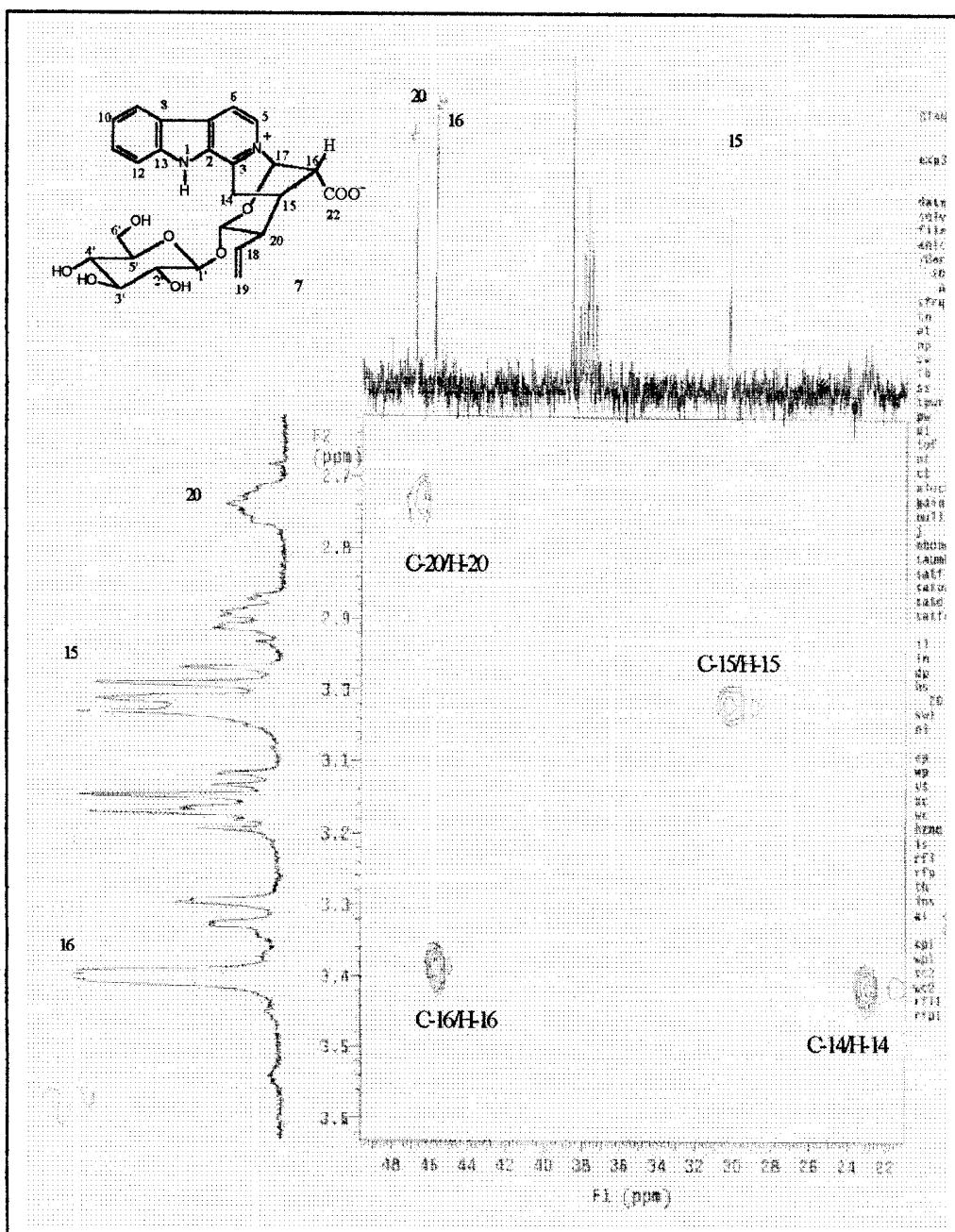


Figura 25: Expansão do espectro de RMN 2D ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -COSY, $^1\text{J}_{\text{CH}}$)-HMQC de SGCM-3 (7) registrado em D_2O .

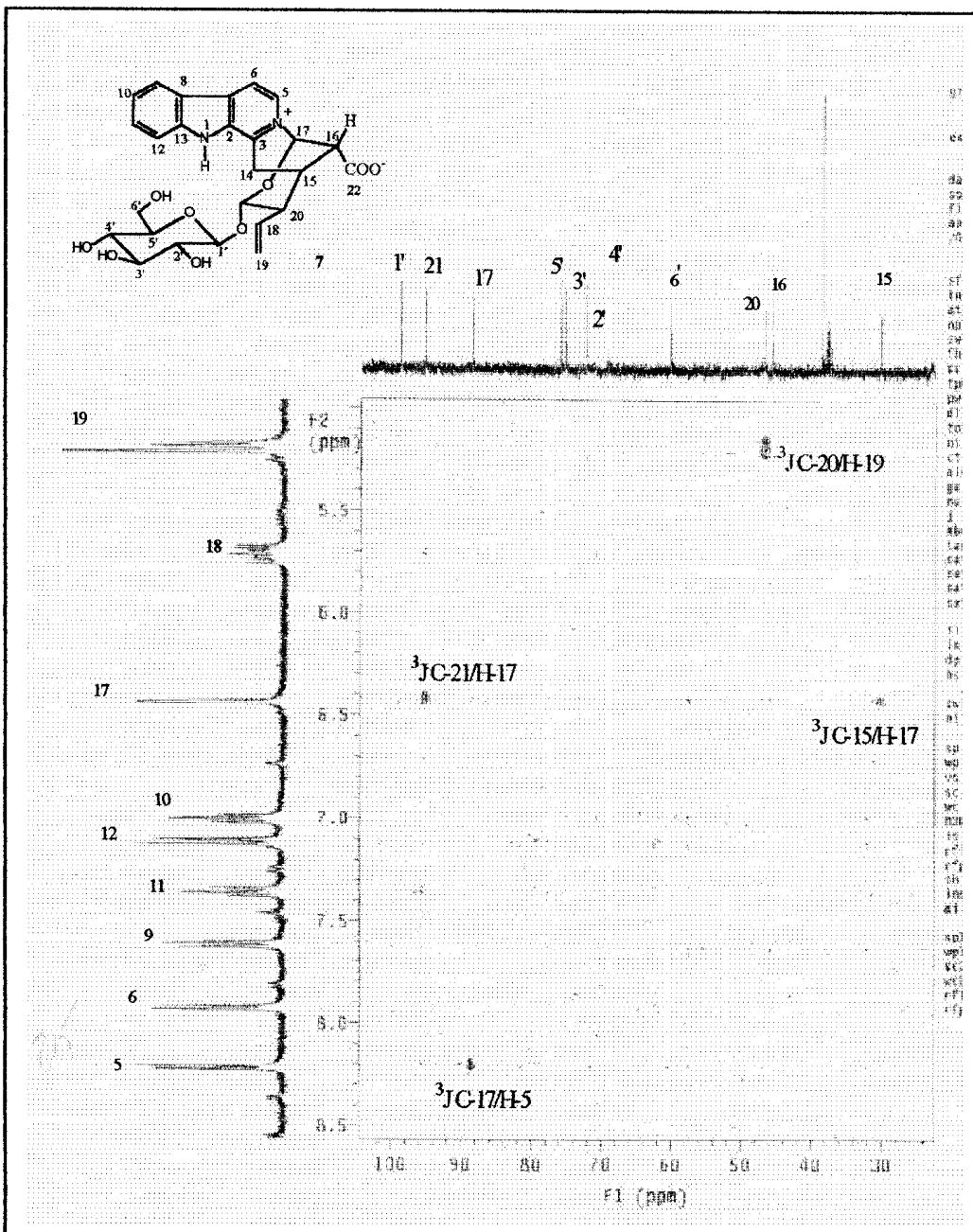


Figura 26: Expansão do espectro de RMN 2D ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -COSY, $^{2,3}\text{J}_{\text{CH}}$)-HMBC de SGCM-3 (7) registrado em D_2O .

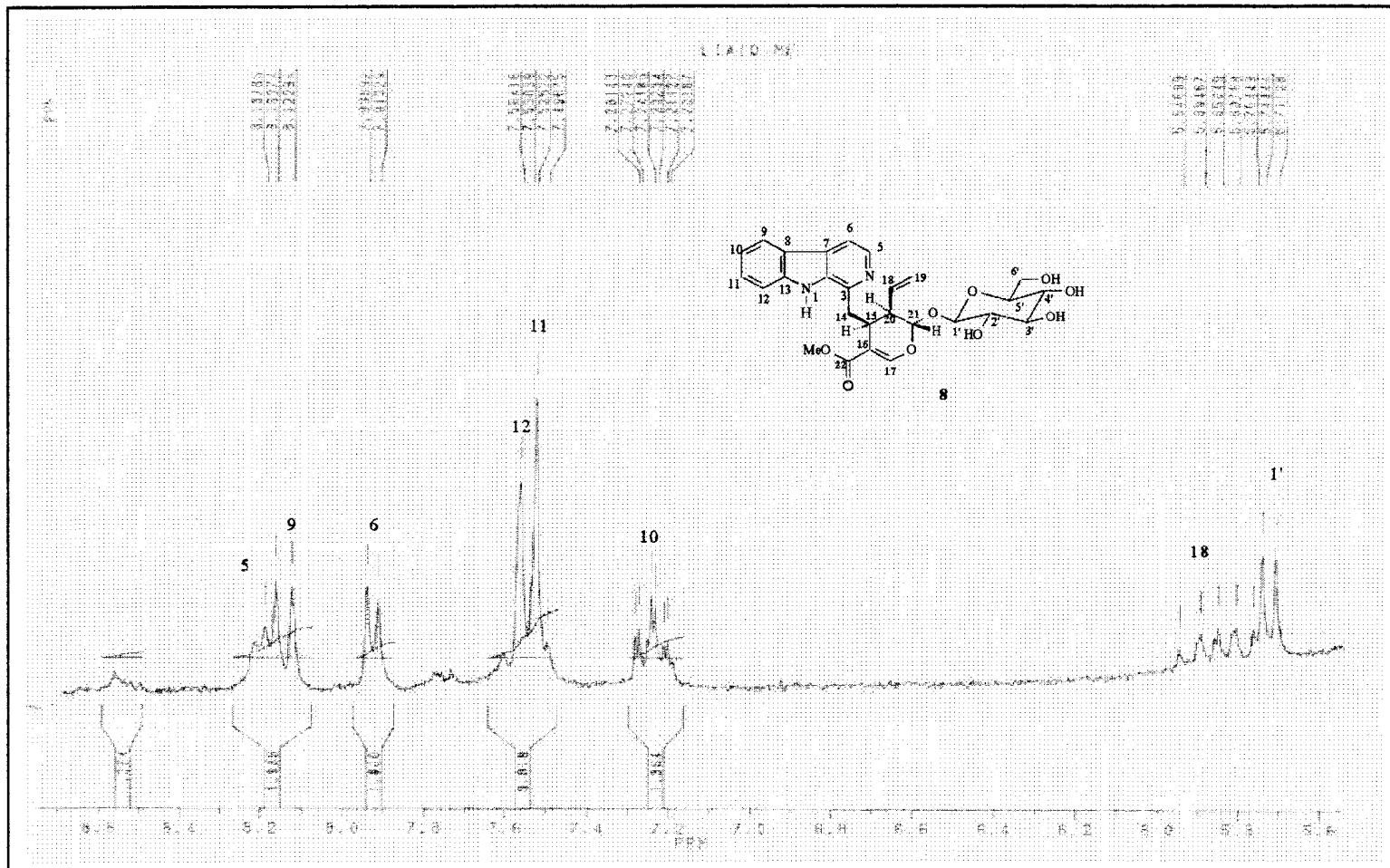


Figura 27: Espectro de RMN ^1H (200 MHz) de SGCM-8 (**8**) registrado em MeOD_4 .

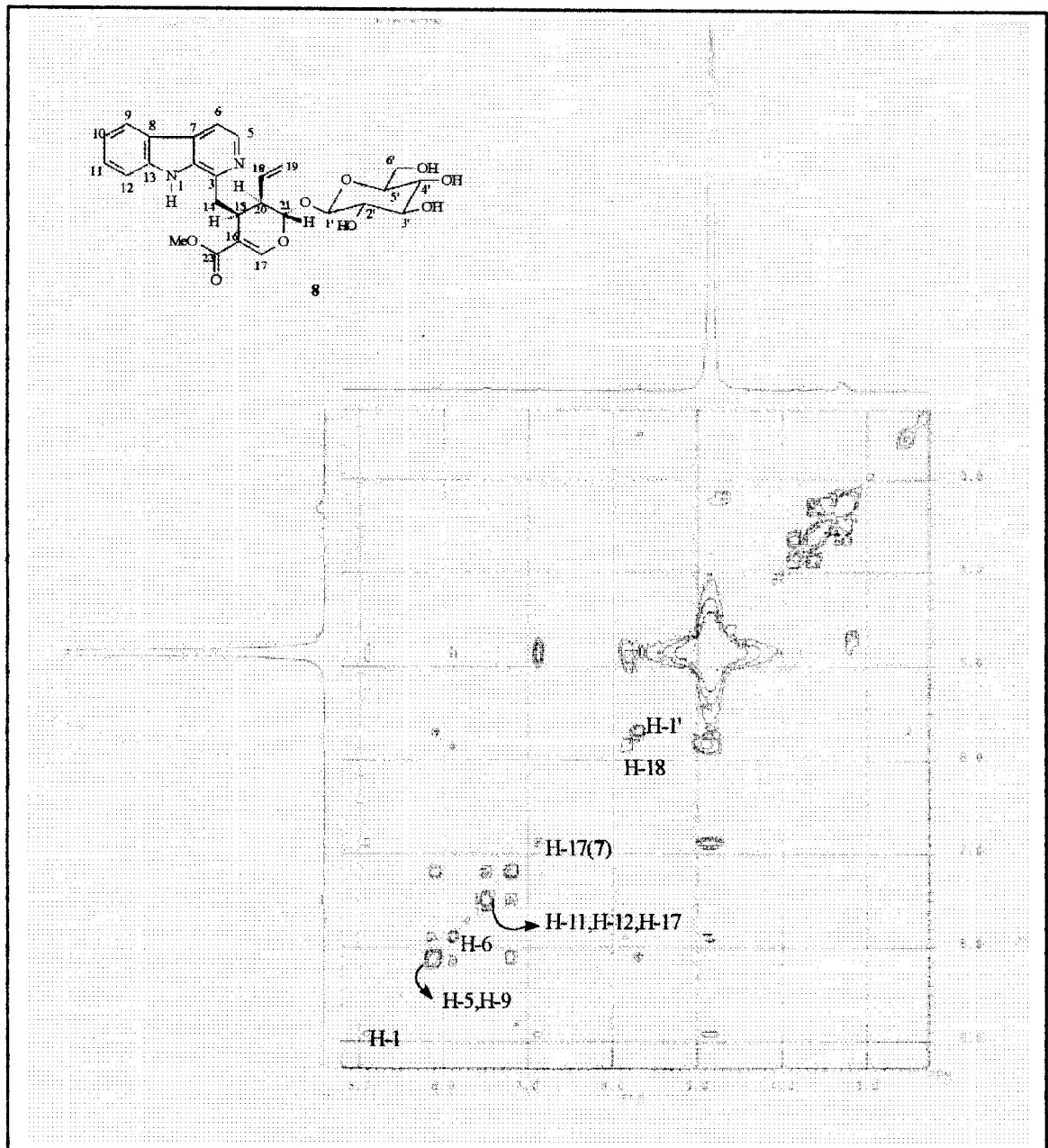


Figura 28: Espectro de RMN 2D ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY) de SGCM-8 (8) registrado em MeOD_4 .

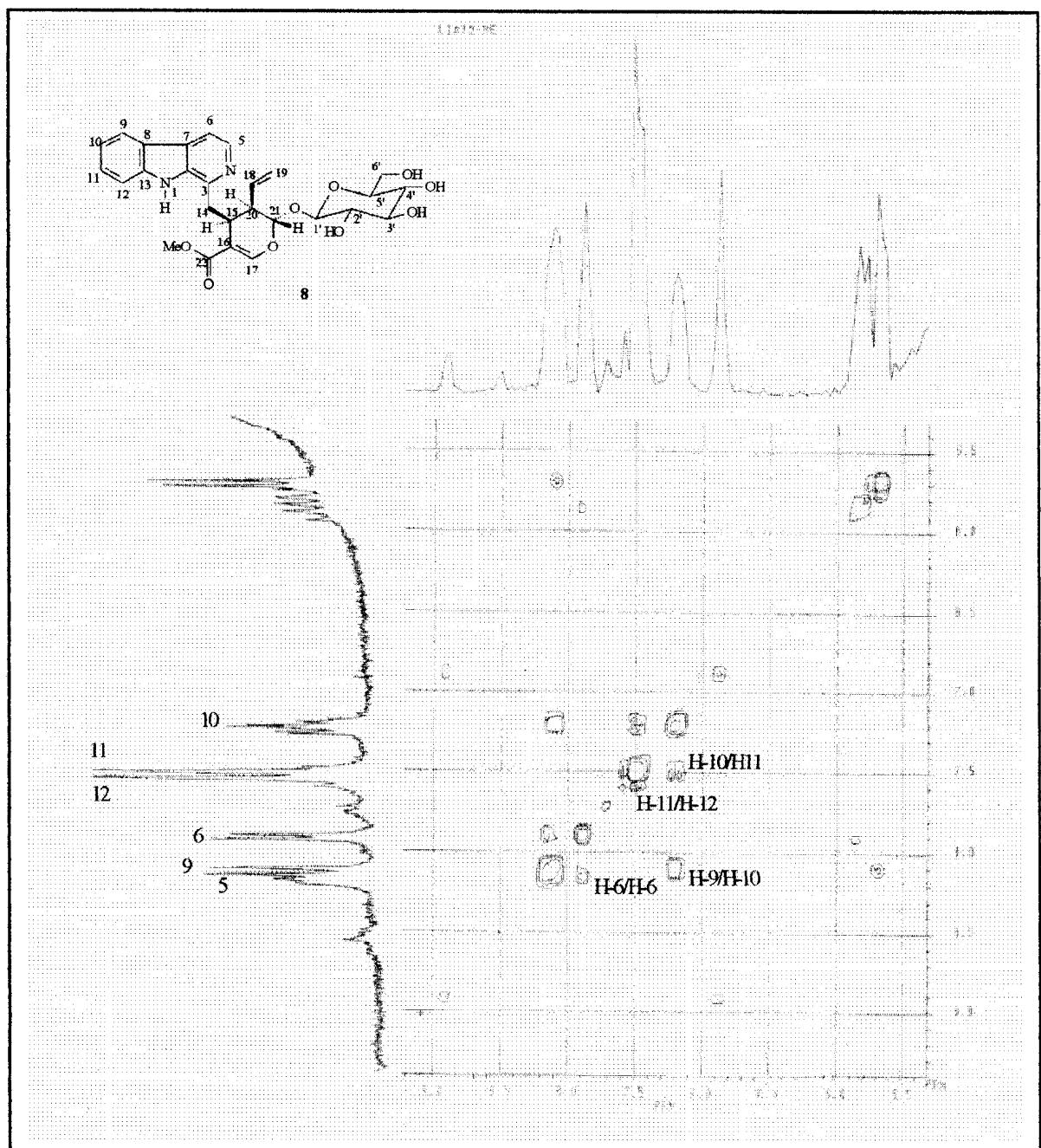


Figura 28a: Expansão do espectro de RMN 2D (^1H x ^1H -COSY) de SGCM-8 (8) registrado em MeOD_4 .

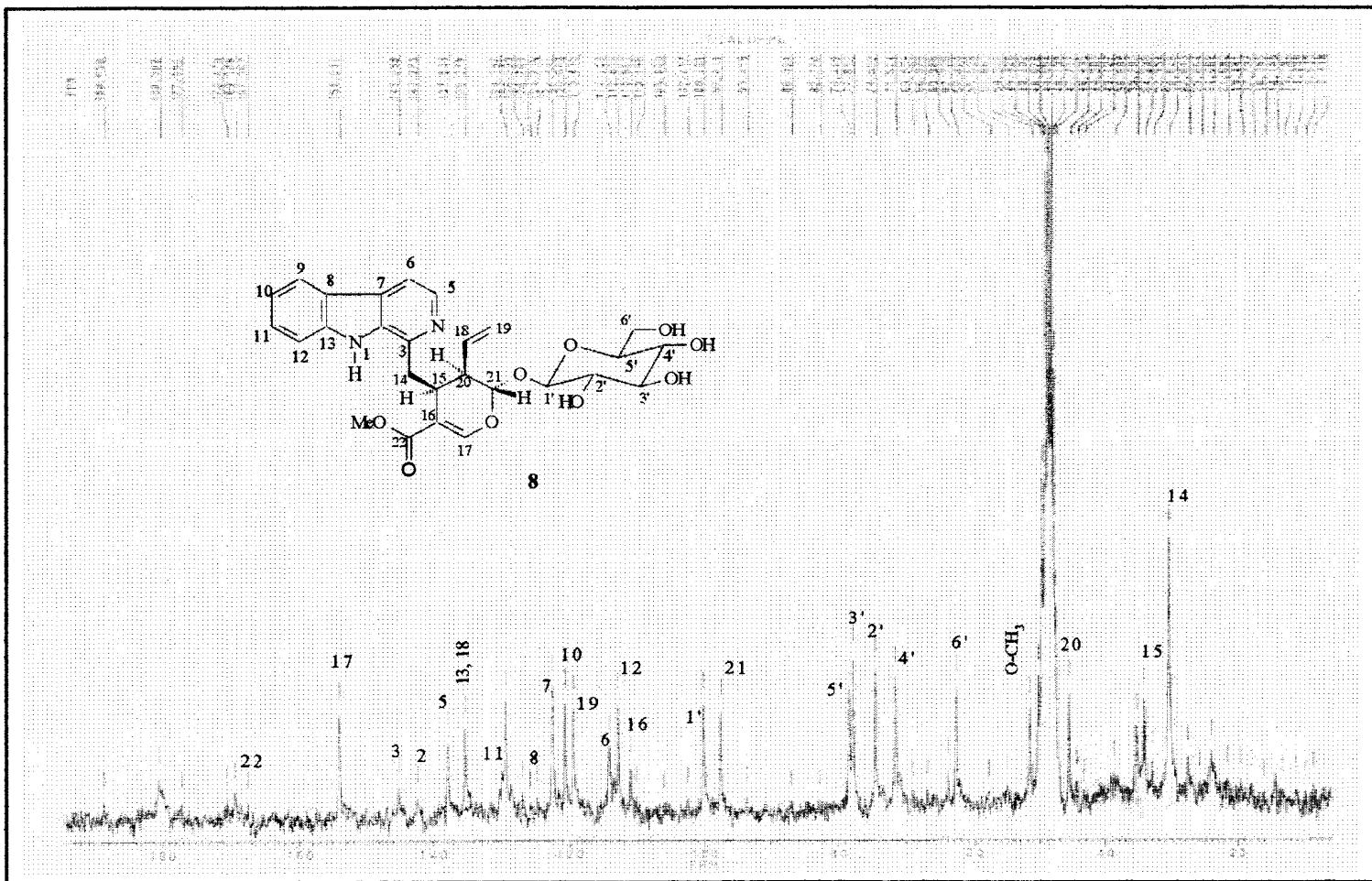


Figura 29: Espectro de RMN ^{13}C de SGCM-8 (**8**) registrado em MeOD_4 .

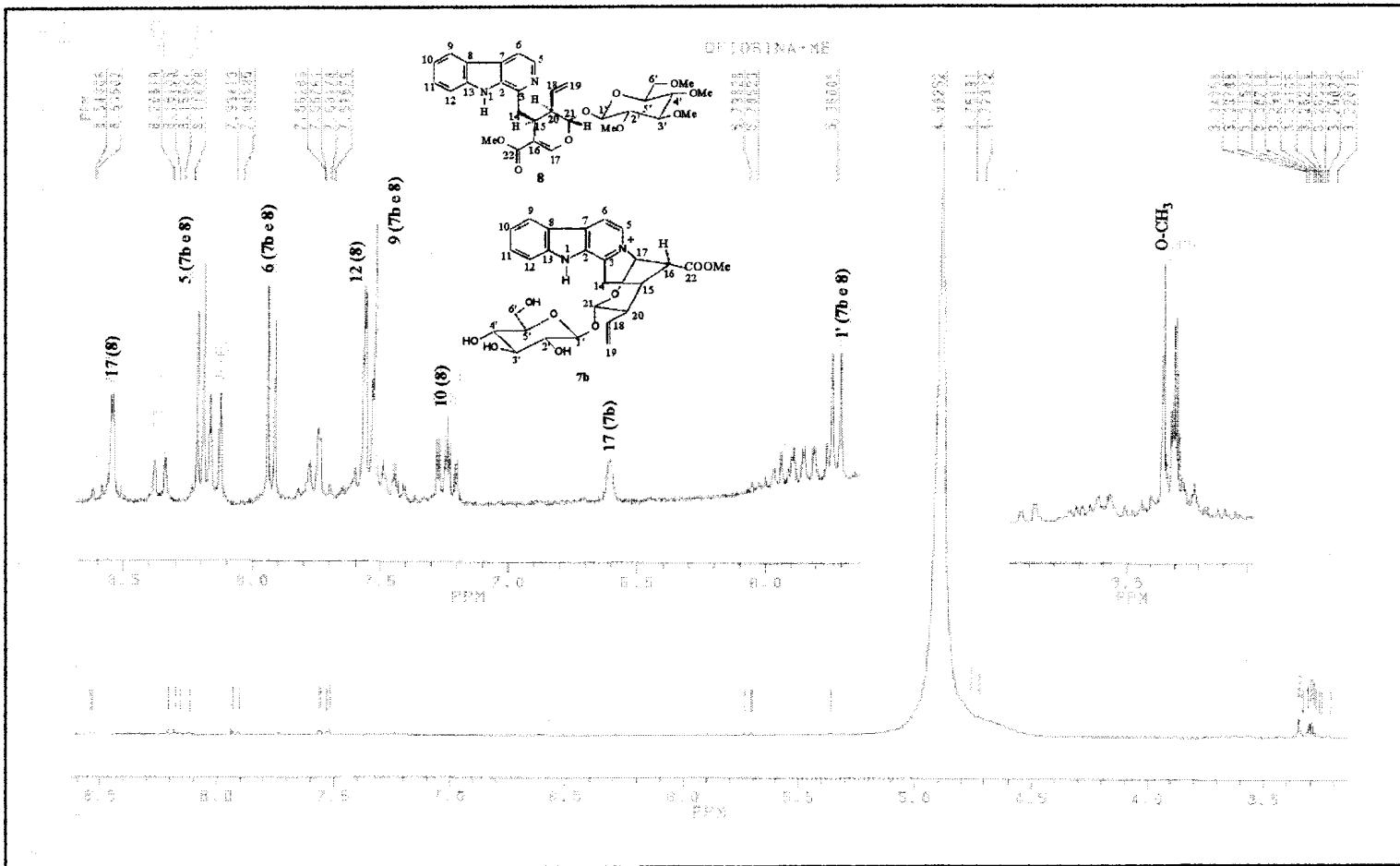


Figura 30: Espectro de RMN ^1H (200 MHz) de (**7b + 8**) registrado em MeOD_4 .

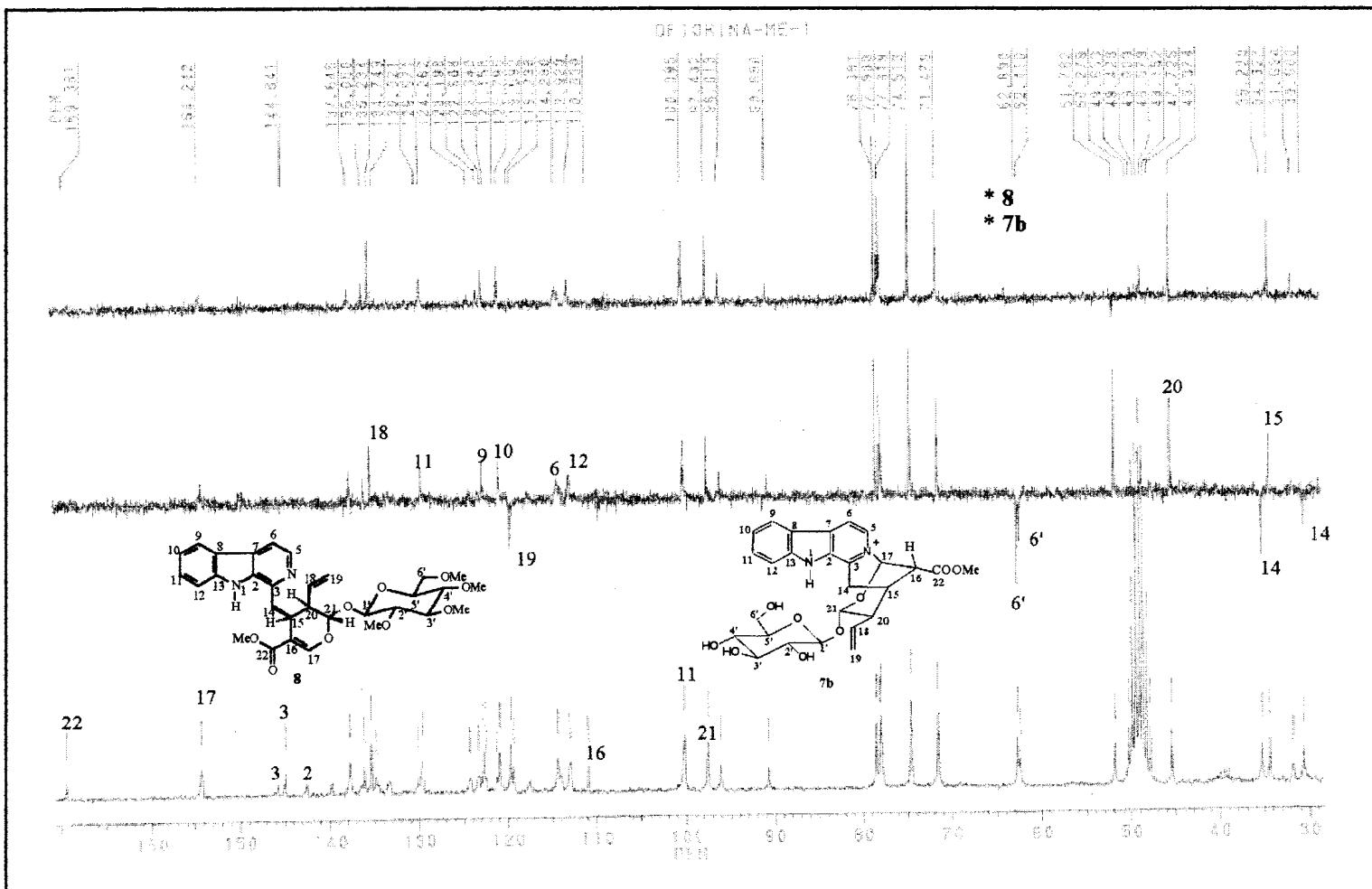


Figura 31: Espectro de RMN ^{13}C de (**7b + 8**) com DEPT ($\theta = 90$ e 135°) registrado em MeOD_4 .

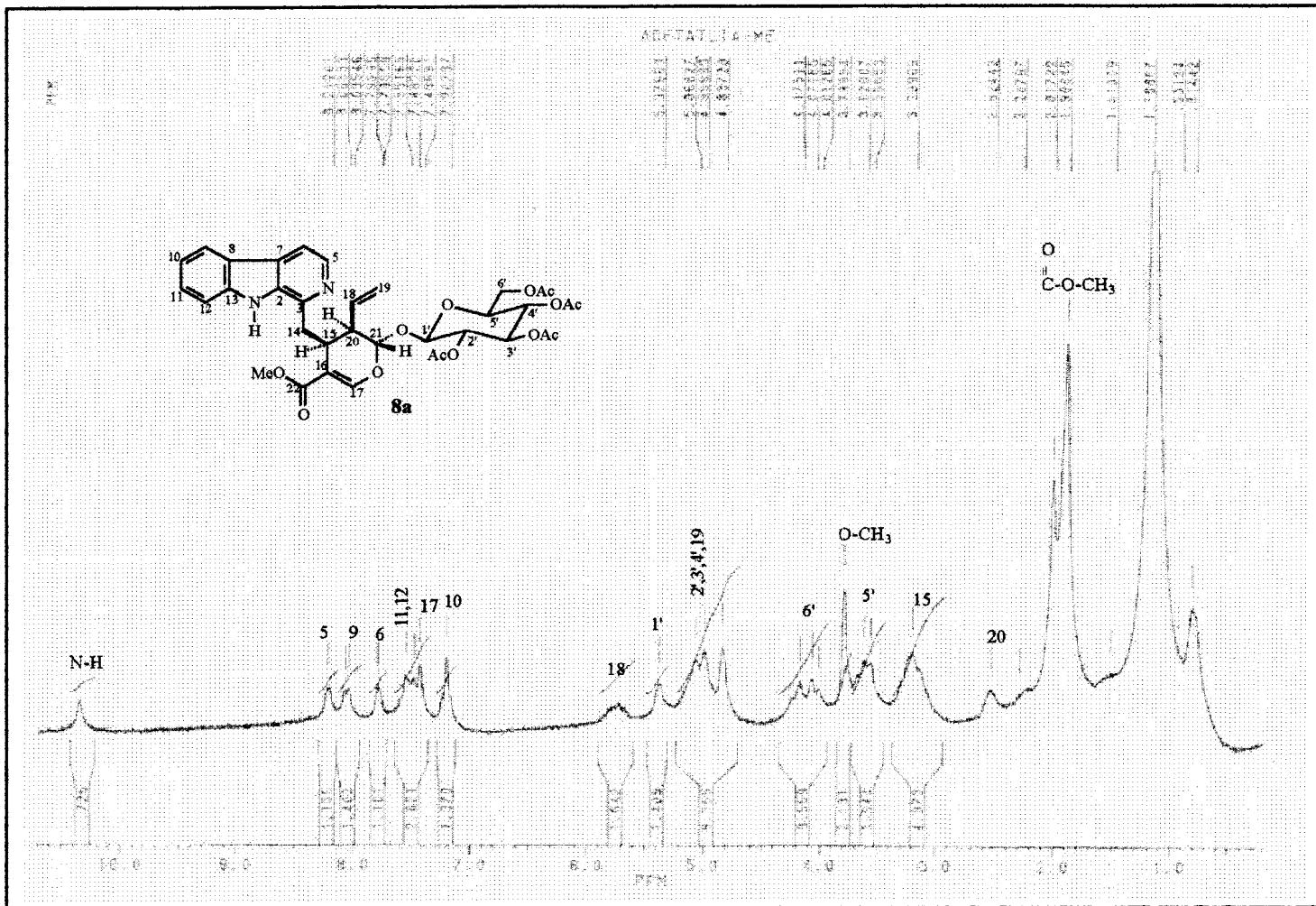


Figura 32: Espectro de RMN ^1H (200 MHz) de SGCM-9 (**8a**) registrado em CDCl_3 .

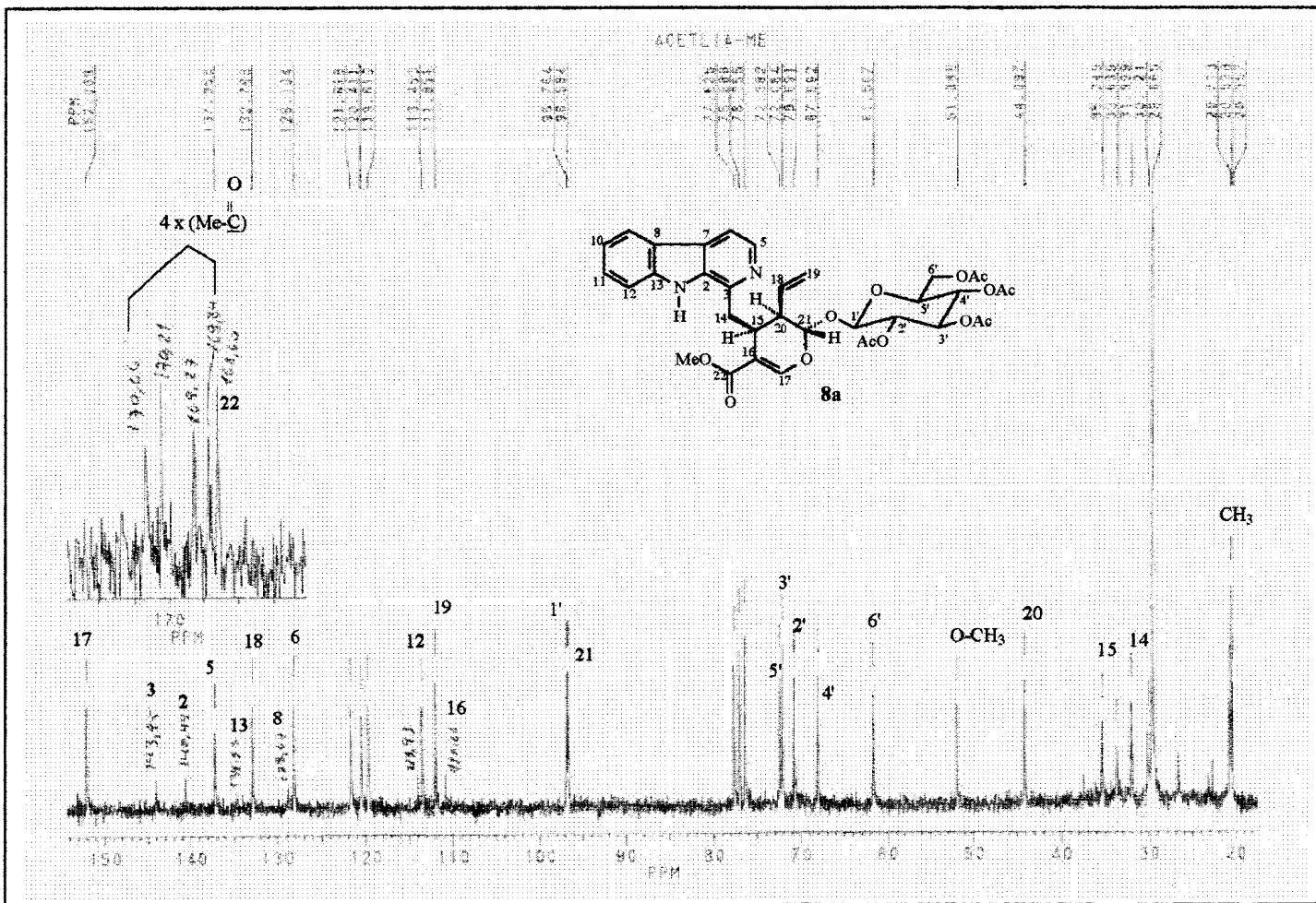


Figura 33: Espectro de RMN ^{13}C de SGCM-9 (**8a**) registrado em CDCl_3 .

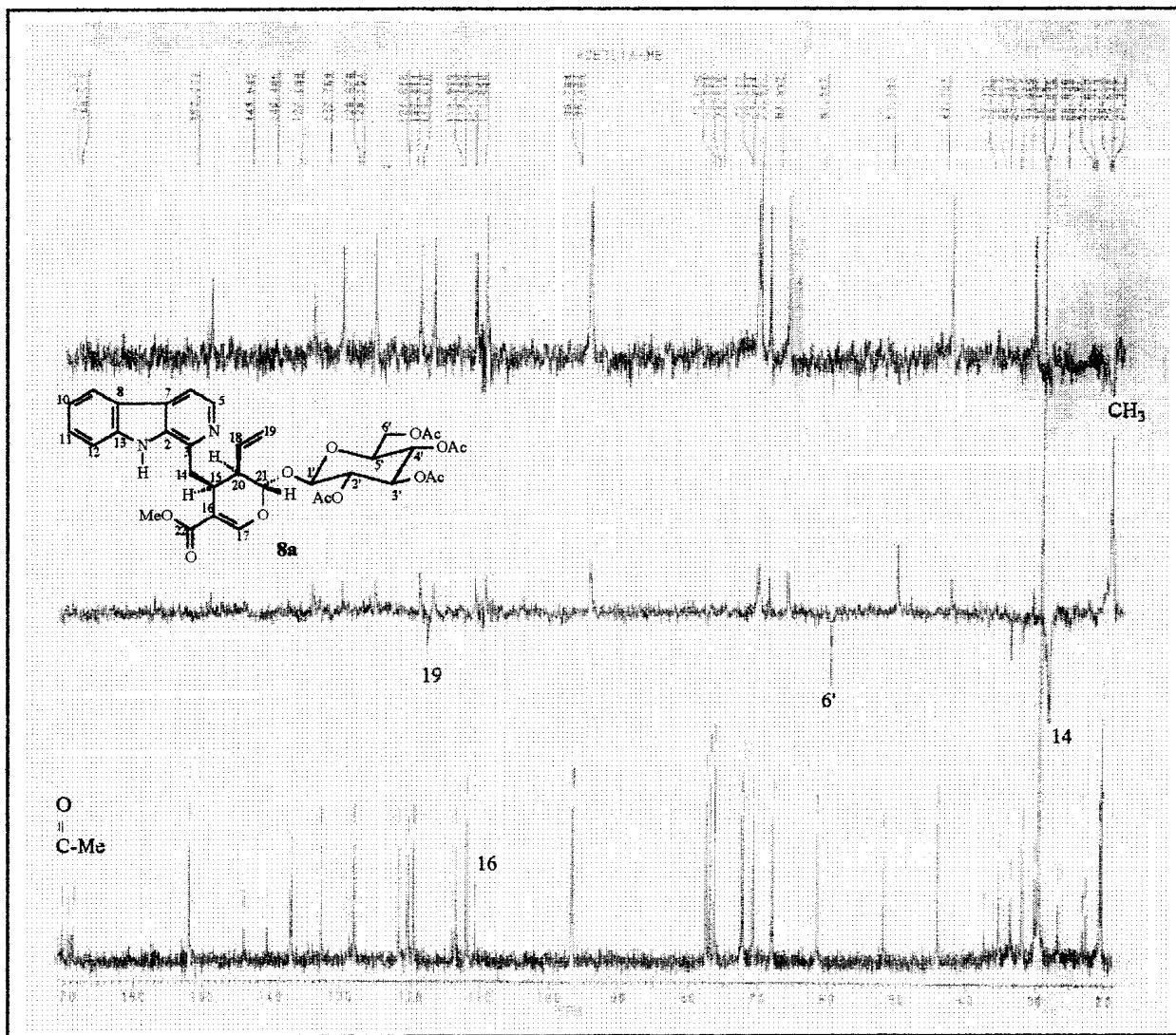


Figura 34: Espectro de RMN ^{13}C de SGCM-9 (**8a**) com DEPT ($\theta = 90$ e 135°) registrado em CDCl_3 .

STANDARD 1H OBSERVE

OBSERVE 1H

FREQUENCY 399.831 MHz
SPECTRAL WIDTH 5000.0 Hz
ACQUISITION TIME 5.244 sec
RELAXATION DELAY 1.000 sec
SWEEPS 3.000 sec
AMBIENT TEMPERATURE
NO. REPETITIONS 32
DOUBLE PRECISION ACQUISITION
DATA PROCESSING
FID SIZE 65536
TOTAL ACQUISITION TIME 2 minutes
Date 5/87
Virginia Tech ATC NMR Facility

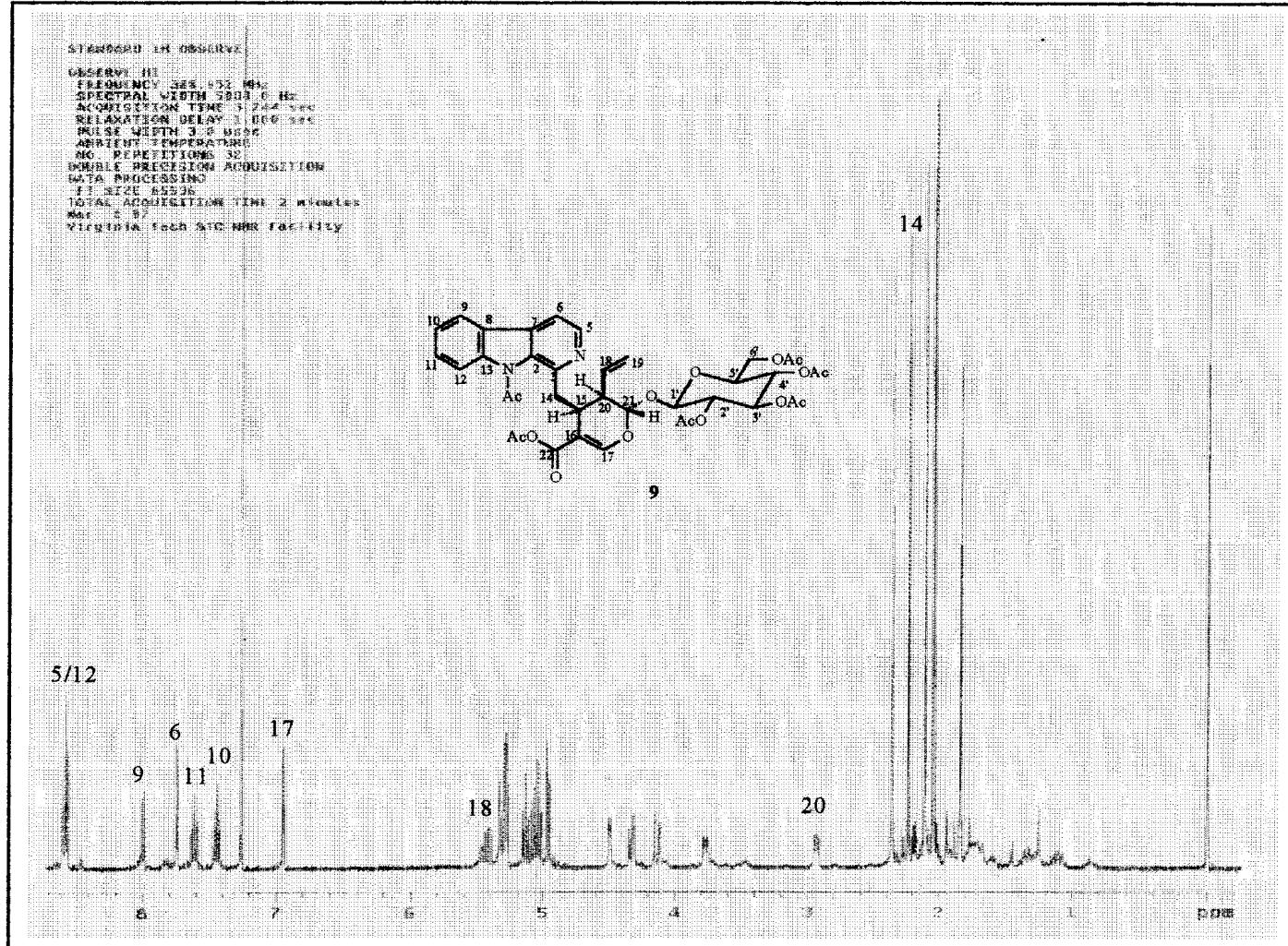
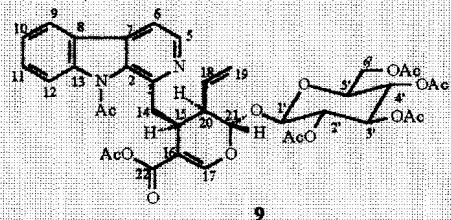


Figura 35: Espectro de RMN ¹H (400 MHz) de SGCM-10 (9) registrado em CDCl_3 .

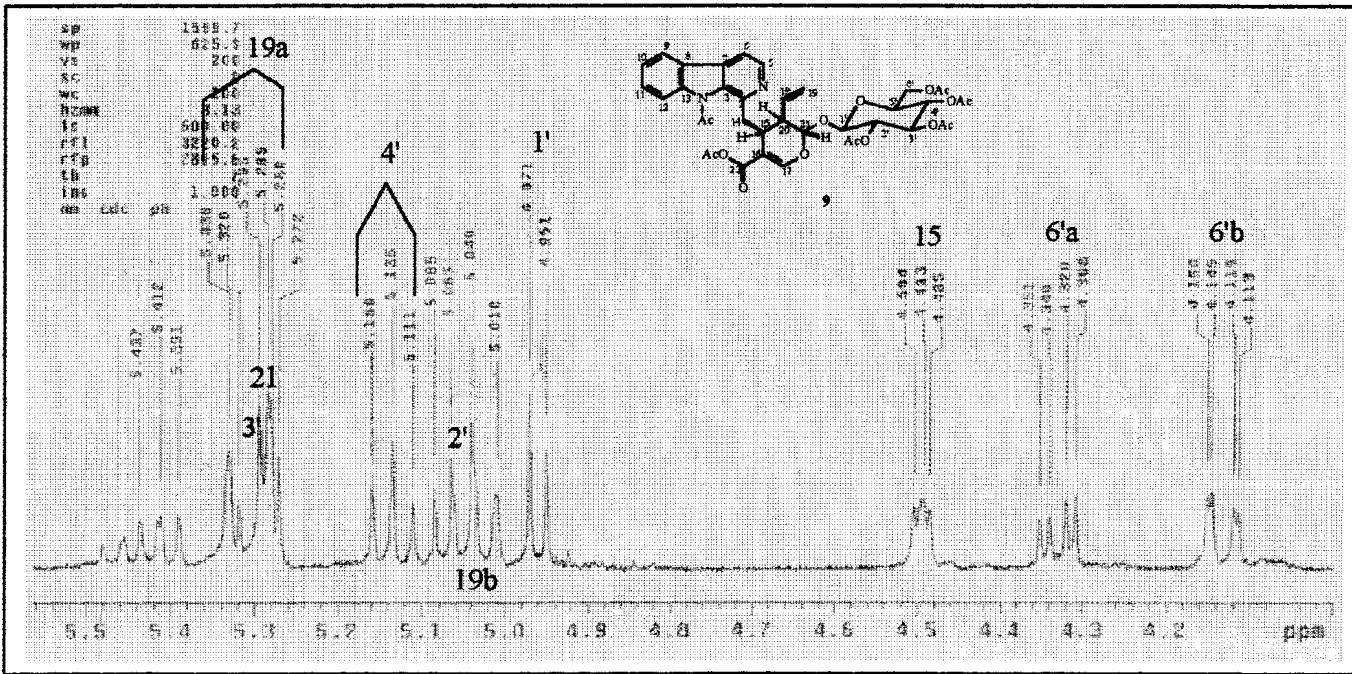


Figura 35a: Expansão (5,5-4,0 ppm) do espectro de RMN ^1H (400 MHz) de SGCM-10 (9) registrado em CDCl_3 .

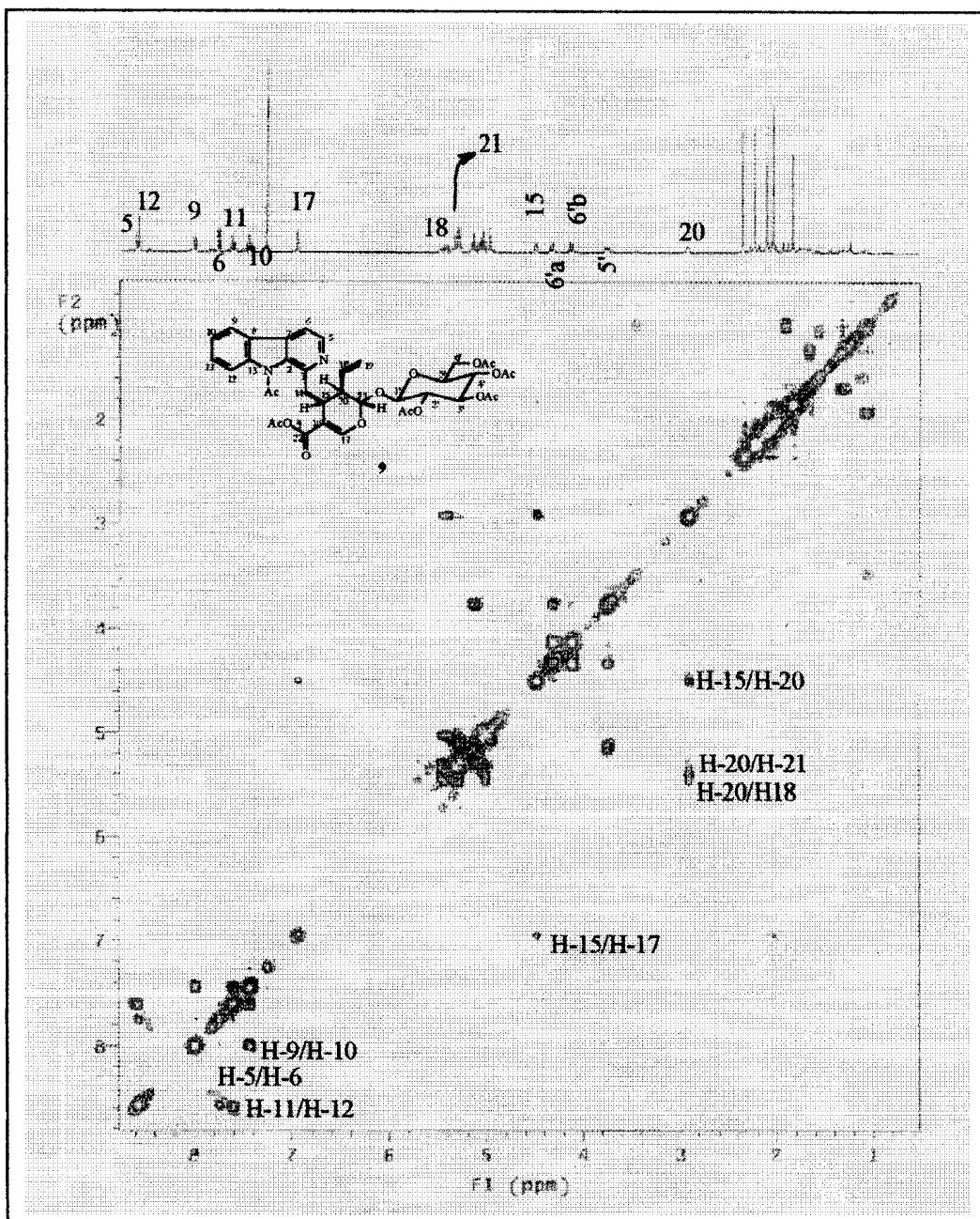


Figura 36: Espectro de RMN 2D (^1H x ^1H -COSY) de SGCM-10 (9) registrado em CDCl_3 .

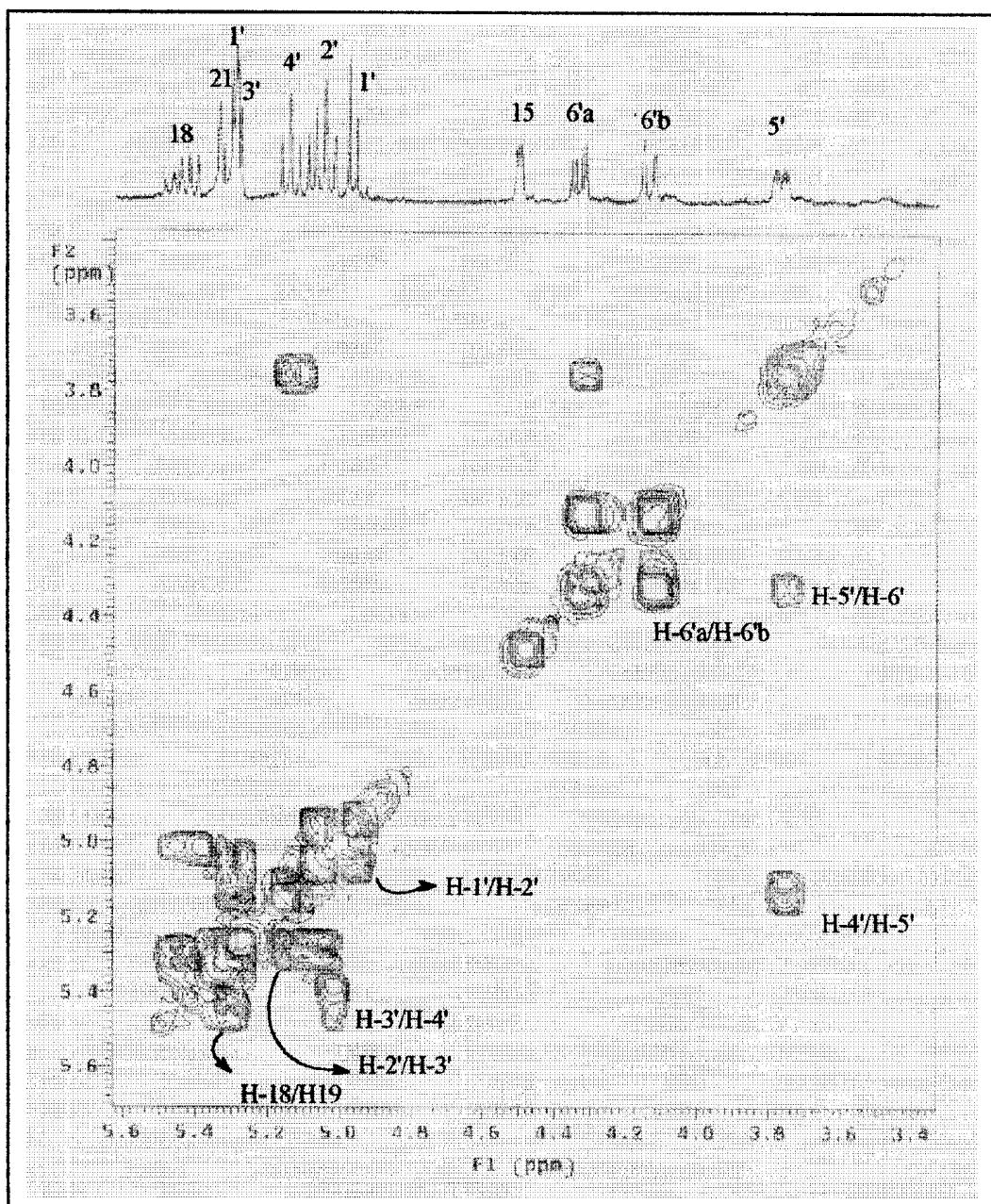


Figura 36a: Expansão (5,6-3,4 ppm) do espectro de RMN 2D ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY) de SGCM-10 (9) registrado em CDCl_3 .

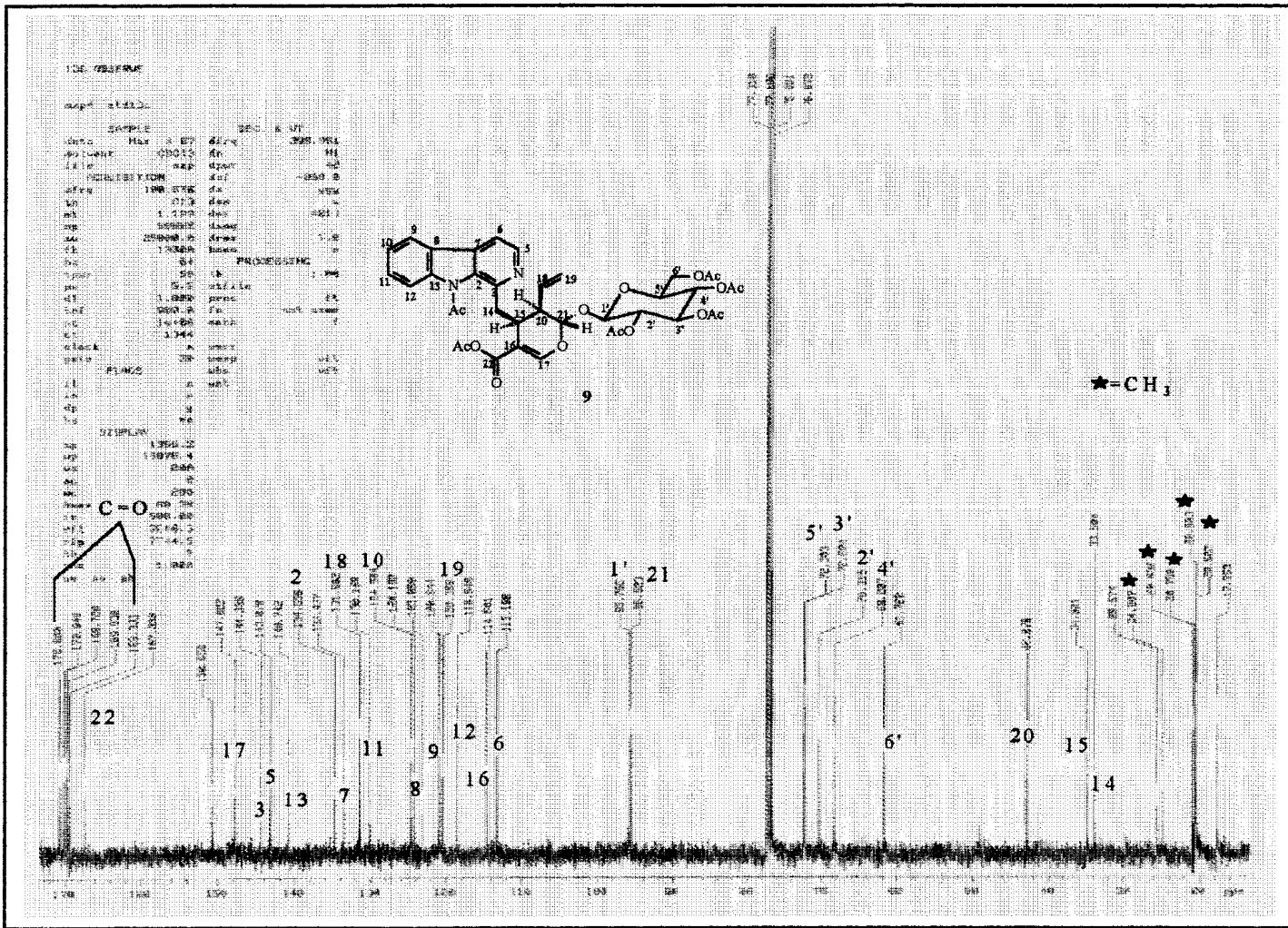


Figura 37: Espectro de RMN ^{13}C PND de SGCM-10 (**9**) registrado em CDCl_3 .

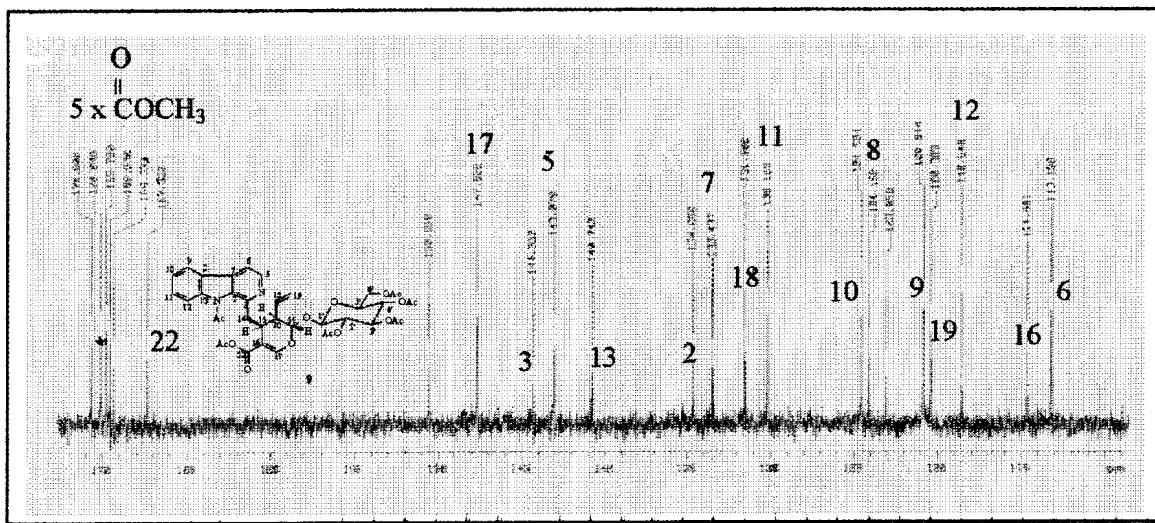


Figura 37a: Expansão (170-110 ppm) do espectro de RMN ^{13}C PND de SGCM-10 (**9**) registrado em CDCl_3 .

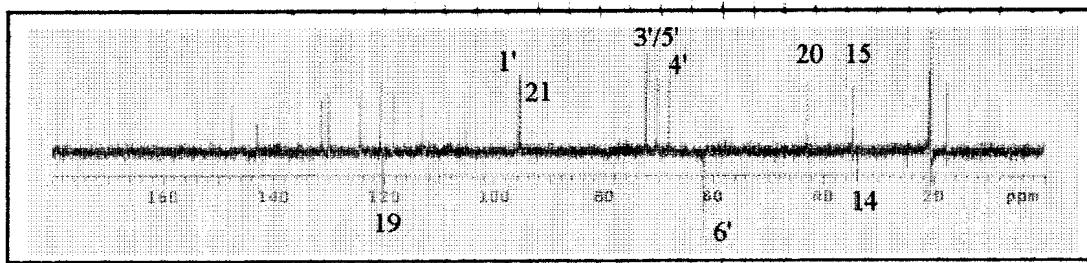


Figura 38: Espectro de RMN ^{13}C de SGCM-10 (**9**) com DEPT ($\theta = 90$ e 135°) registrado em CDCl_3 .

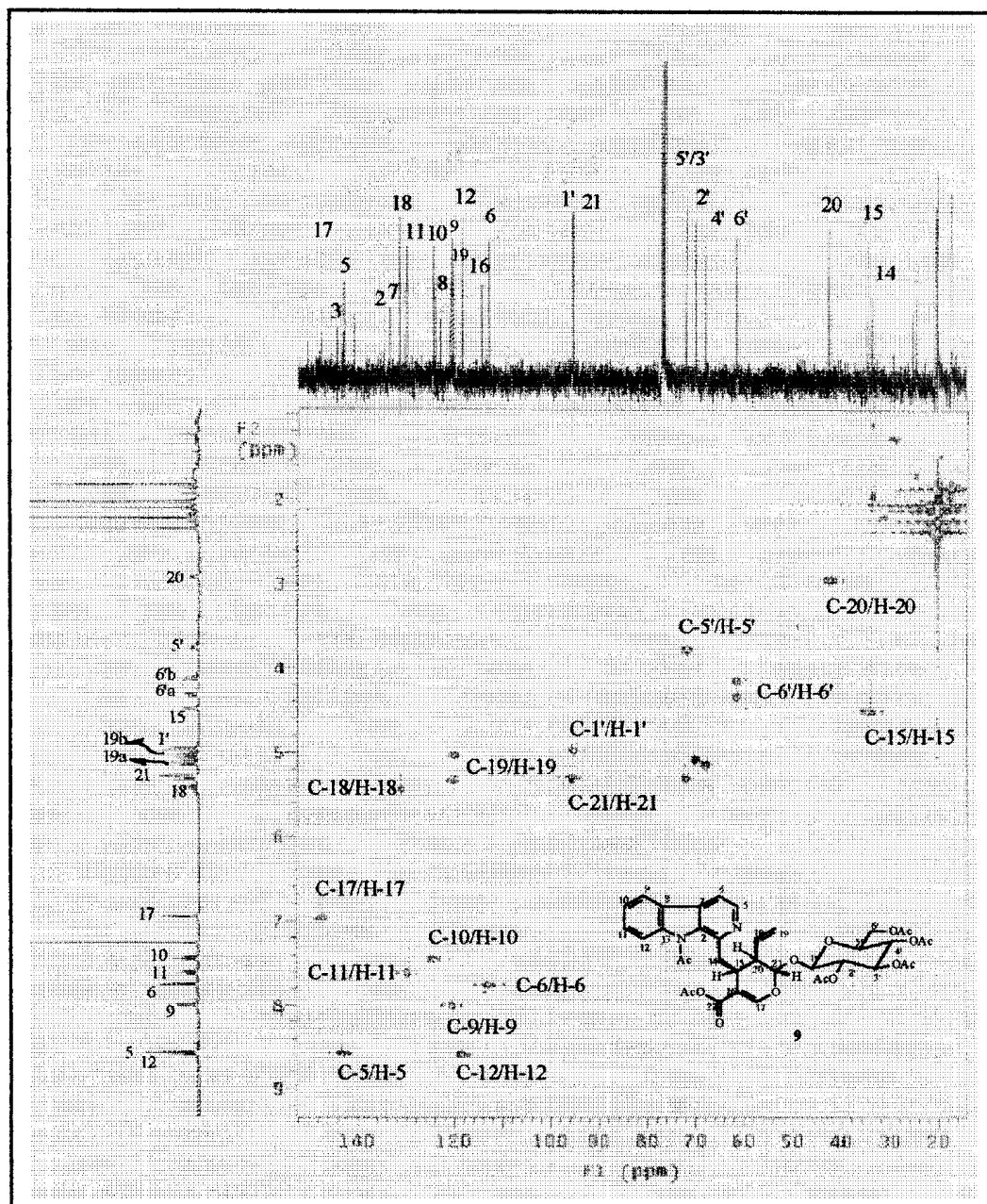


Figura 39: Espectro de RMN 2D ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -COSY, $^1\text{J}_{\text{CH}}$)-HMQC de SGCM-10 (**9**) registrado em CDCl_3 .

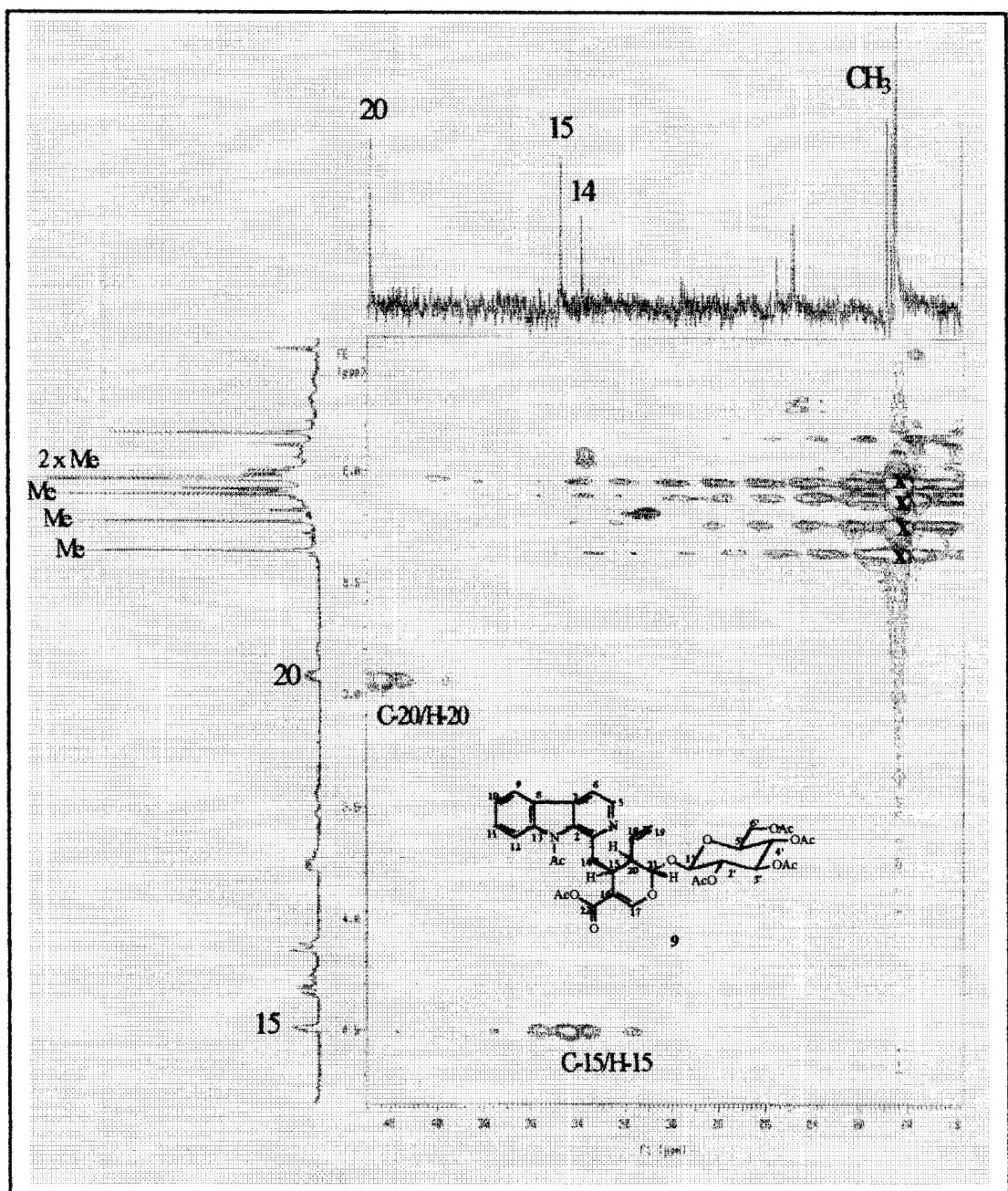


Figura 39a: Expansão do espectro de RMN 2D ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -COSY, $^1\text{J}_{\text{CH}}$)-HMQC de SGCM-10 (**9**) registrado em CDCl_3 .

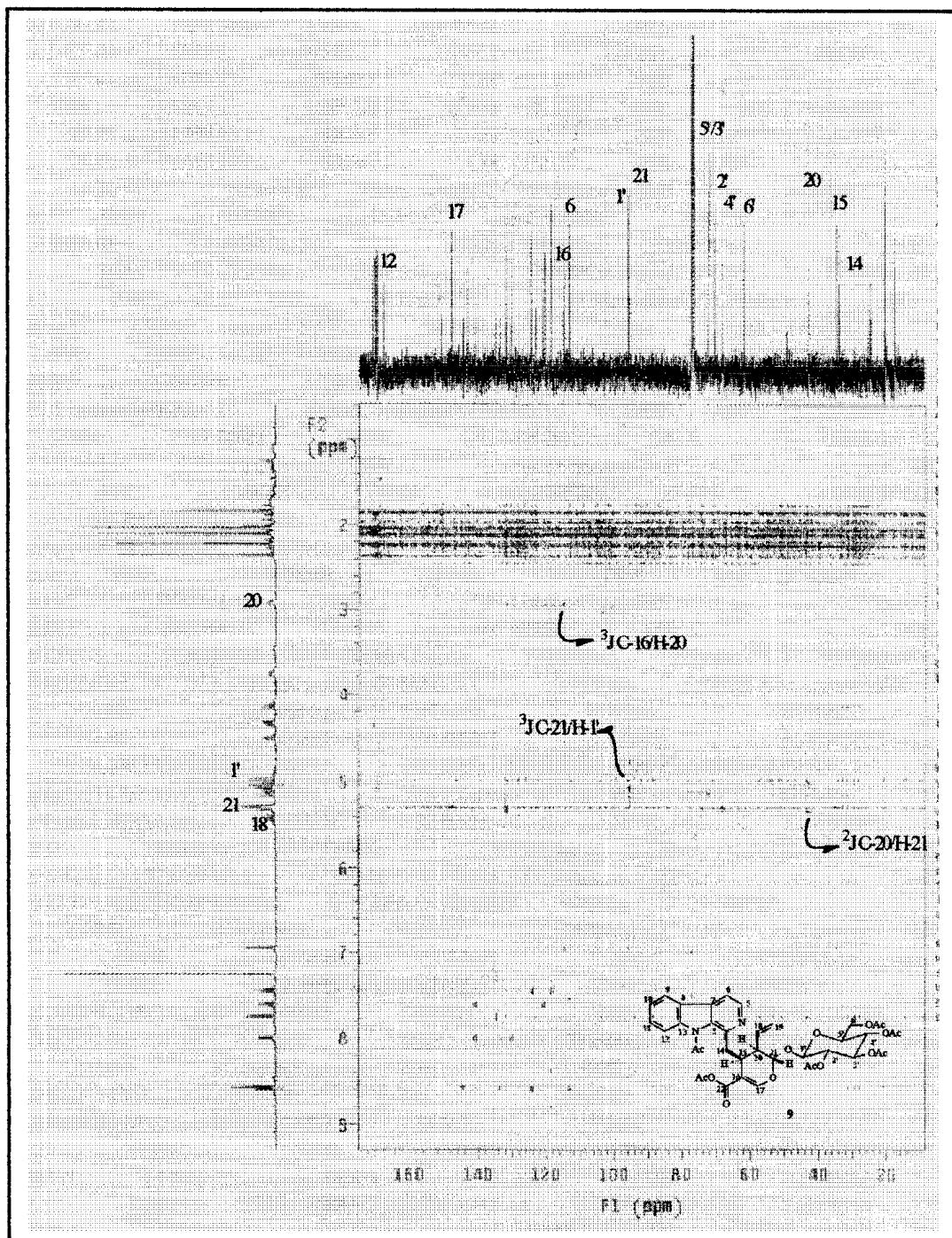


Figura 40: Espectro de RMN 2D ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -COSY, $^{2,3}\text{J}_{\text{CH}}$)-HMBC de SGCM-10 (9) registrado em CDCl_3 .

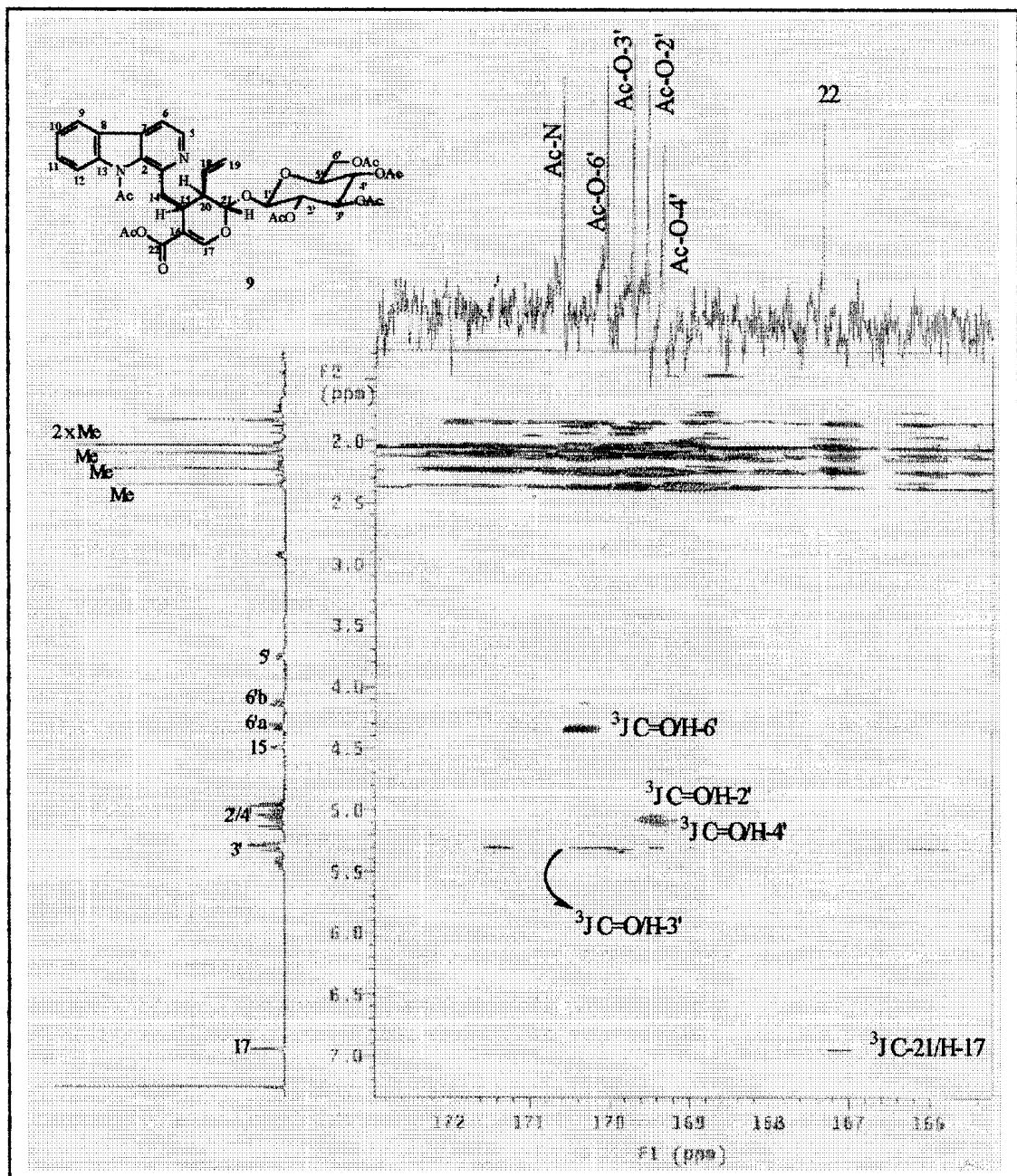


Figura 40a: Expansão (175-160 ppm) do espectro de RMN 2D (¹H x ¹³C-COSY, ^{2,3}J_{CH})-HMBC de SGCM-10 (**9**) registrado em CDCl₃.

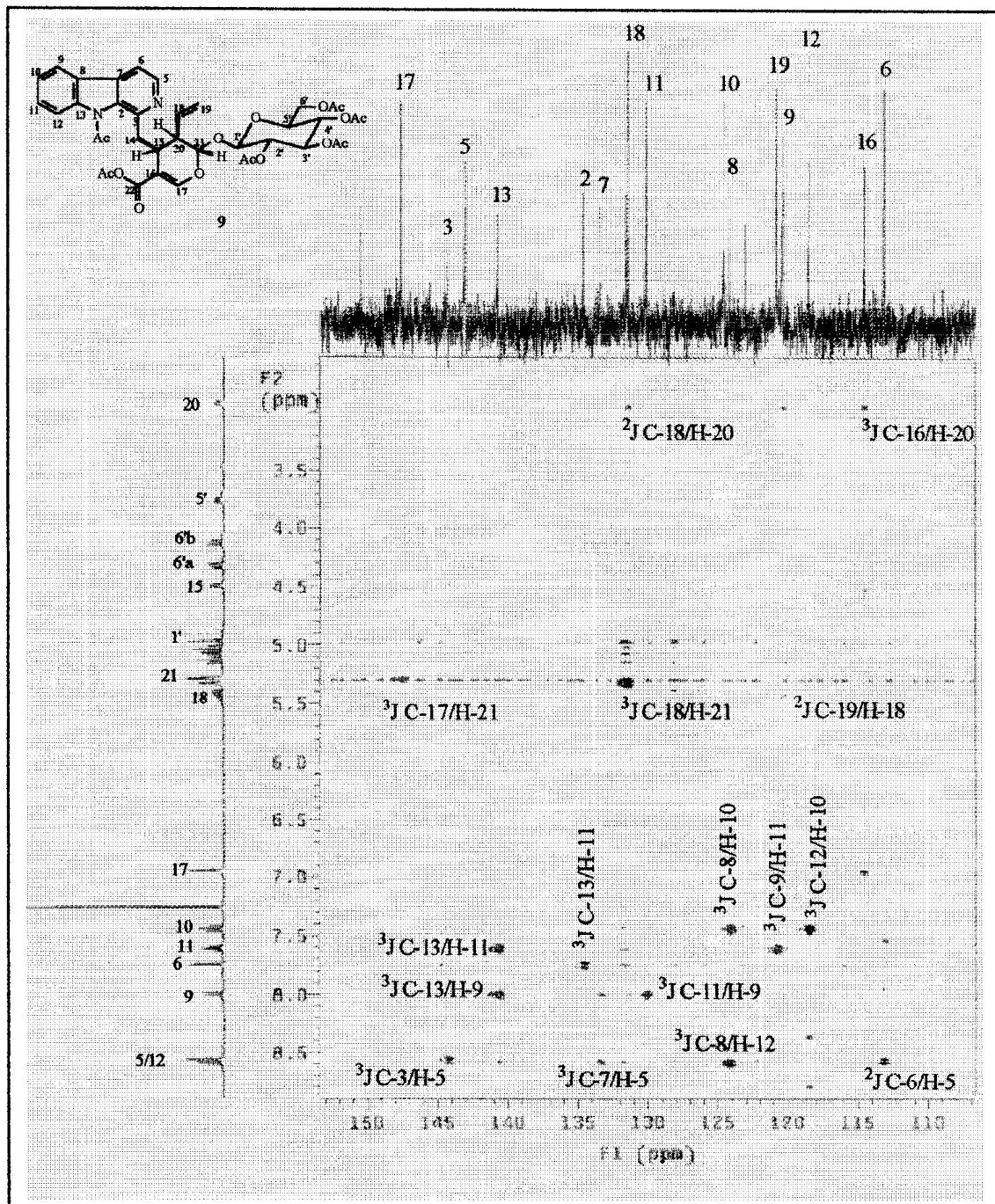


Figura 40b: Expansão (150-110 ppm) do espectro de RMN 2D ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -COSY, $^{2,3}\text{J}_{\text{CH}}$) -HMBC de SGCM-10 (**9**) registrado em CDCl_3 .

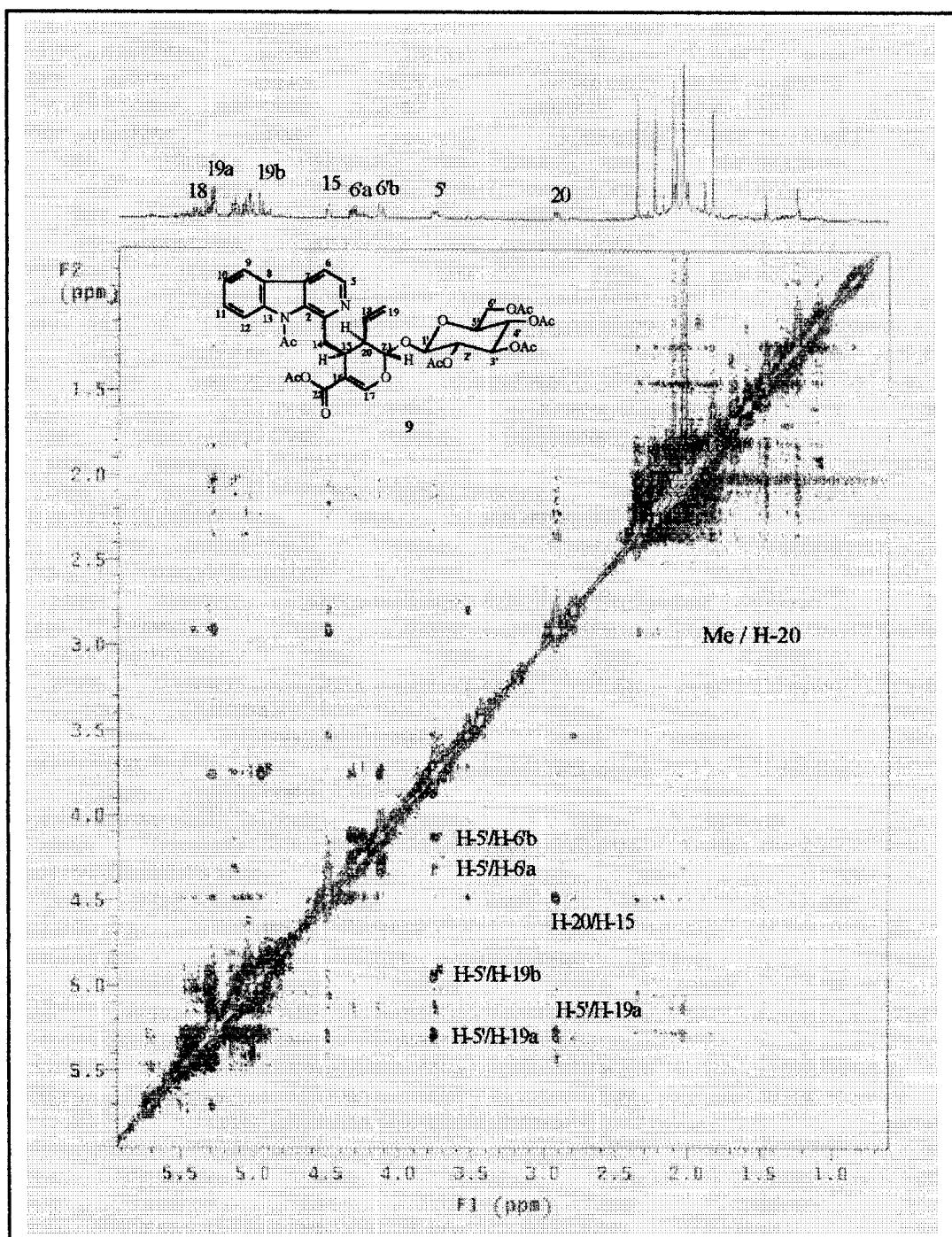


Figura 41: Espectro de RMN NOESY de SGCM-10 (**9**) registrado em CDCl_3 .

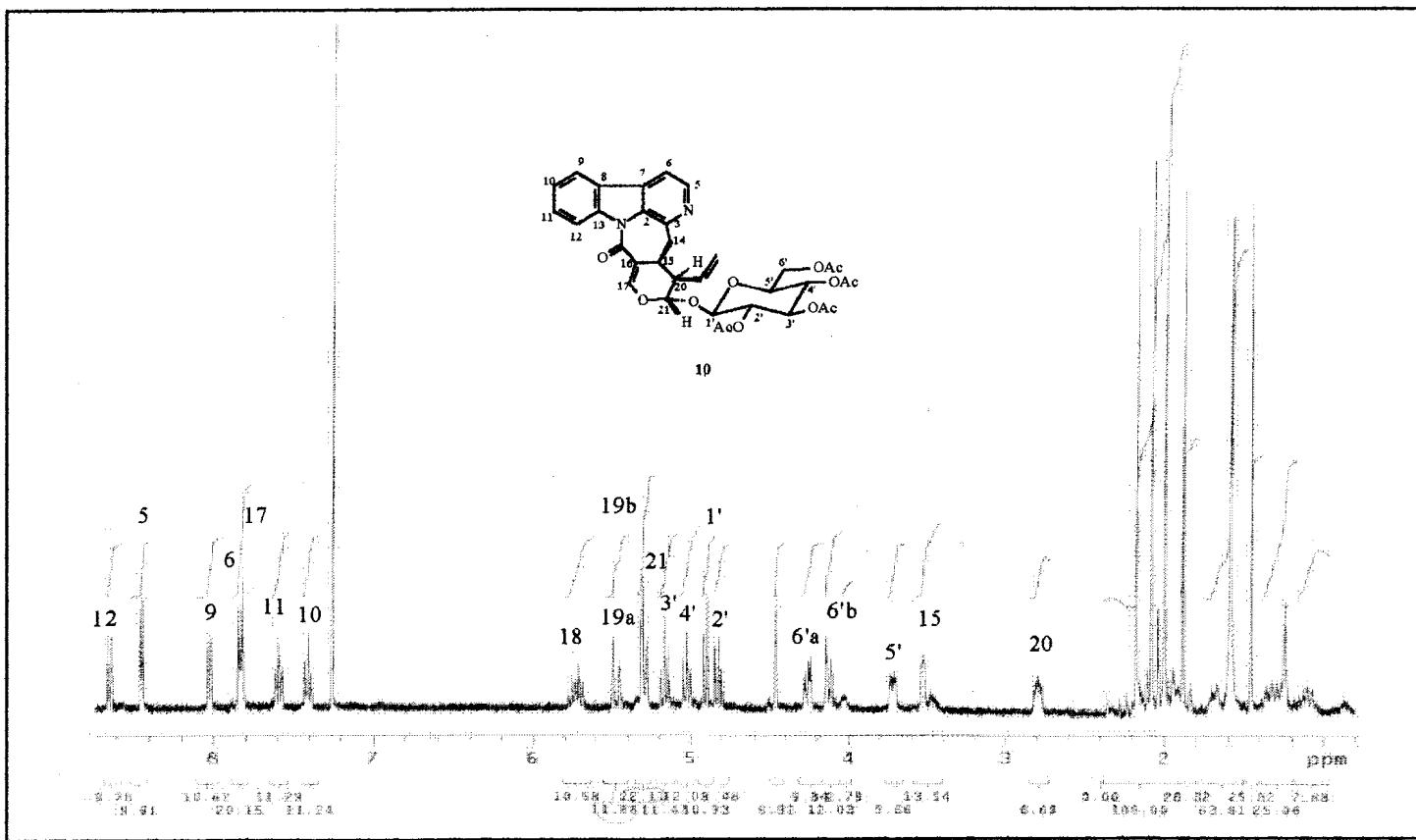


Figura 42: Espectro de RMN ^1H (400 MHz) de SGCM-11 (**10**) registrado em CDCl_3 .

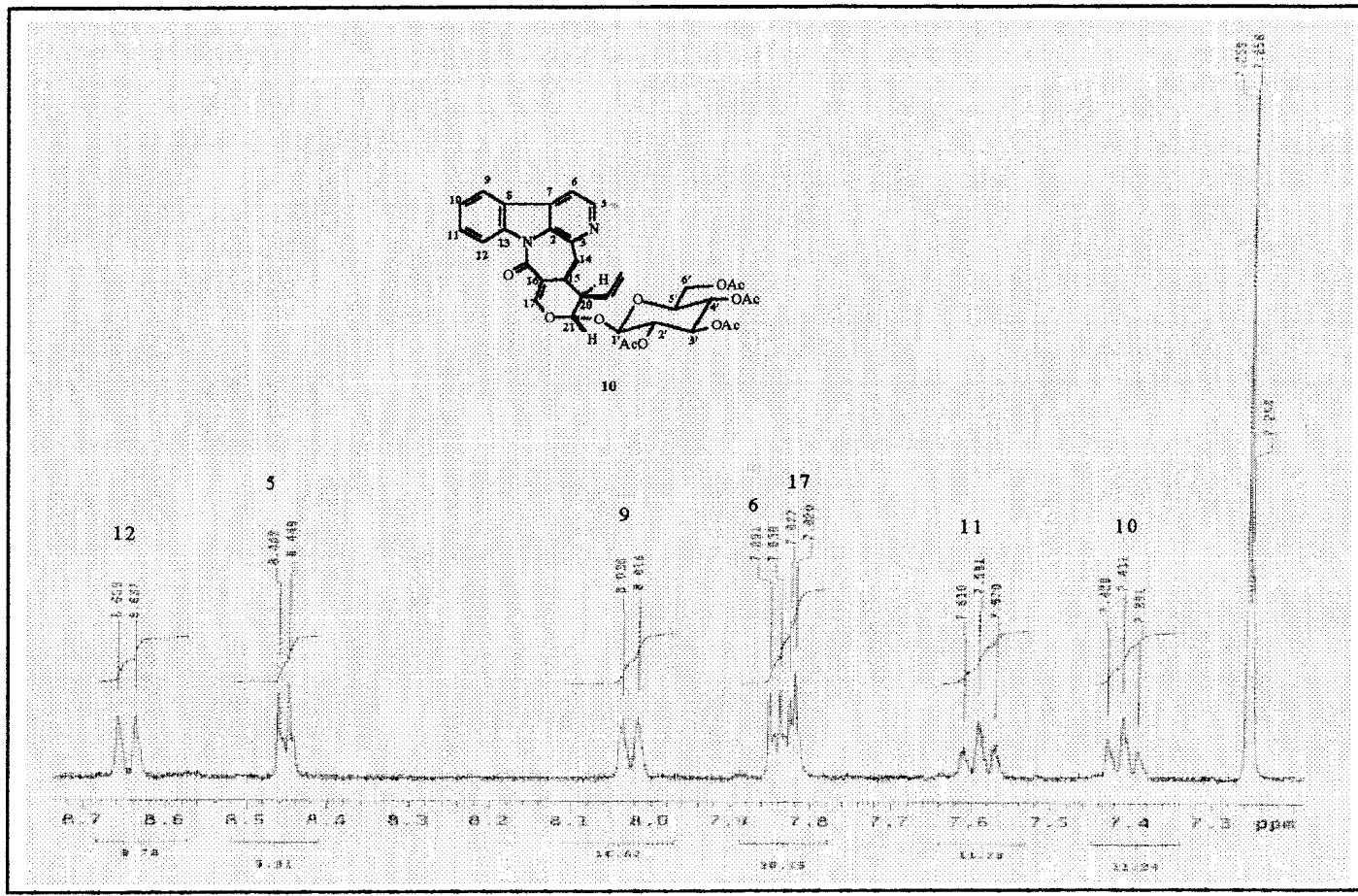


Figura 42a: Expansão (8,7-7,0 ppm) do espectro de RMN ^1H (400 MHz) de SGCM-11 (**10**) registrado em CDCl_3 .

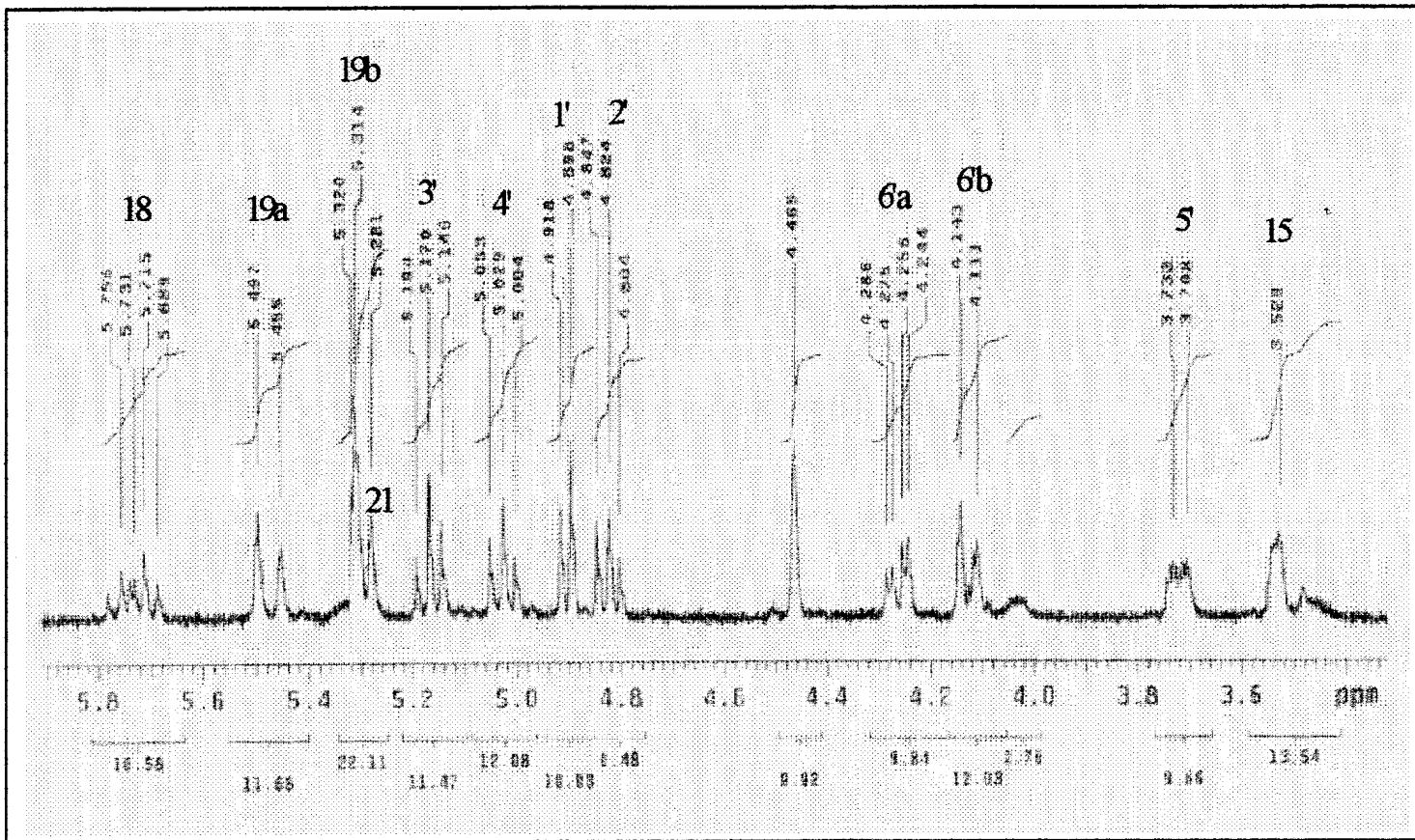


Figura 42b: Expansão (5,8-3,5 ppm) do espectro de RMN ^1H (400 MHz) de SGCM-11 (**10**) registrado em CDCl_3 .

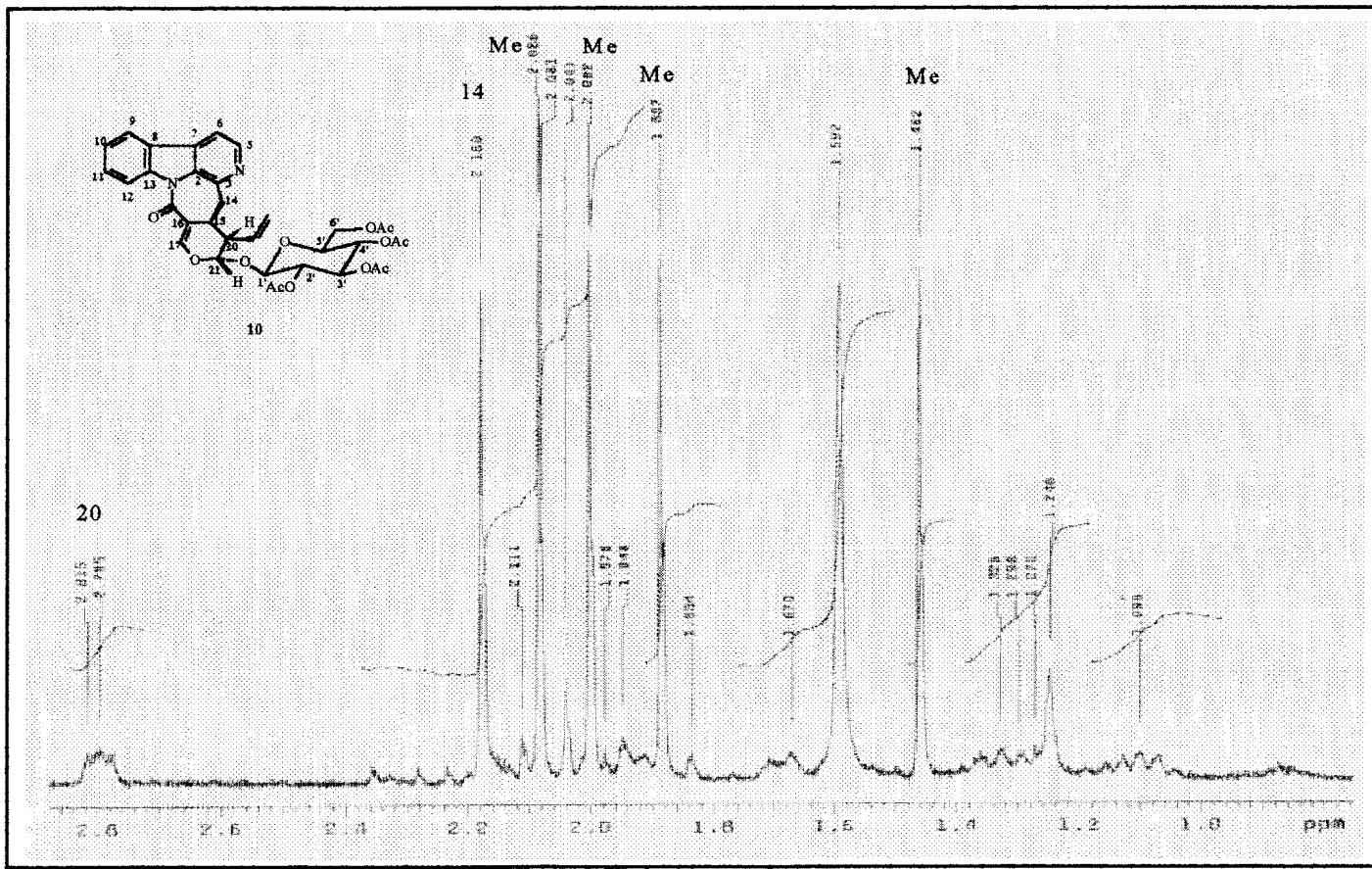


Figura 42c: Expansão (2,8–1,0 ppm) do espectro de RMN ^1H (400 MHz) de SGCM-11 (**10**) registrado em CDCl_3 .

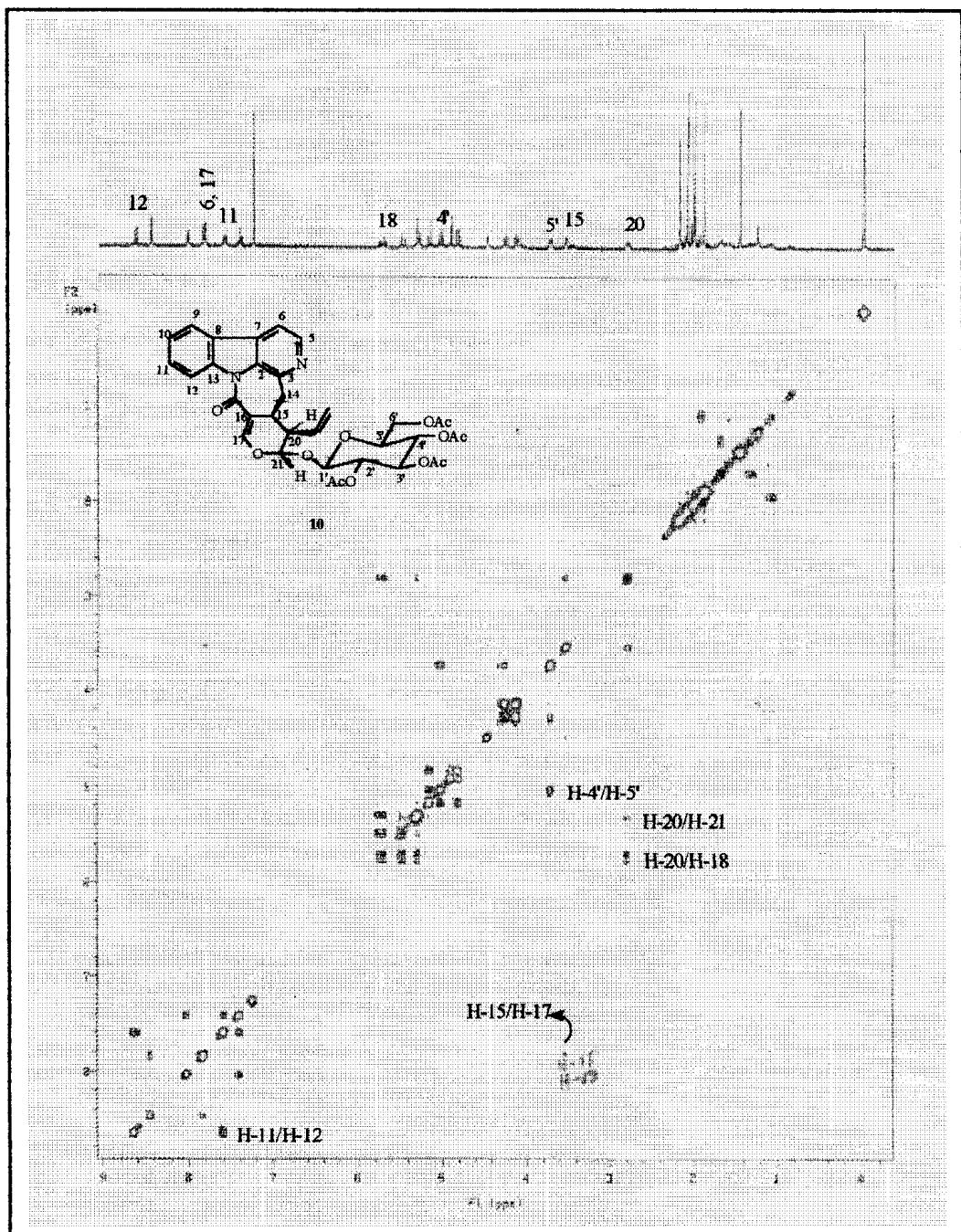


Figura 43: Espectro de RMN 2D (^1H x ^1H -COSY) de SGCM-11 (**10**) registrado em CDCl_3 .

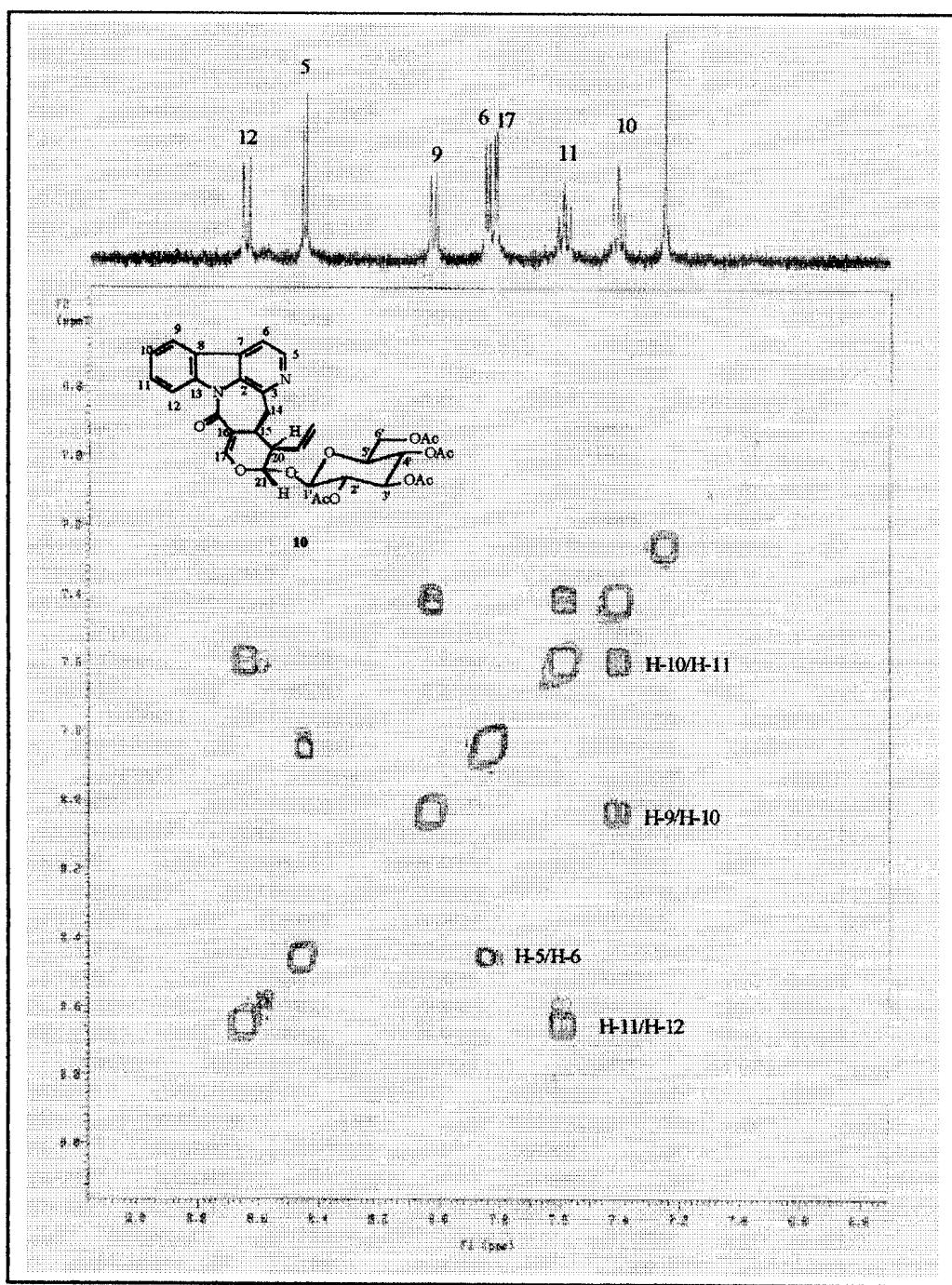


Figura 43a: Expansão (9,0-6,5 ppm) do espectro de RMN 2D (¹Hx¹H-COSY) de SGCM-11 (10) registrado em CDCl₃.

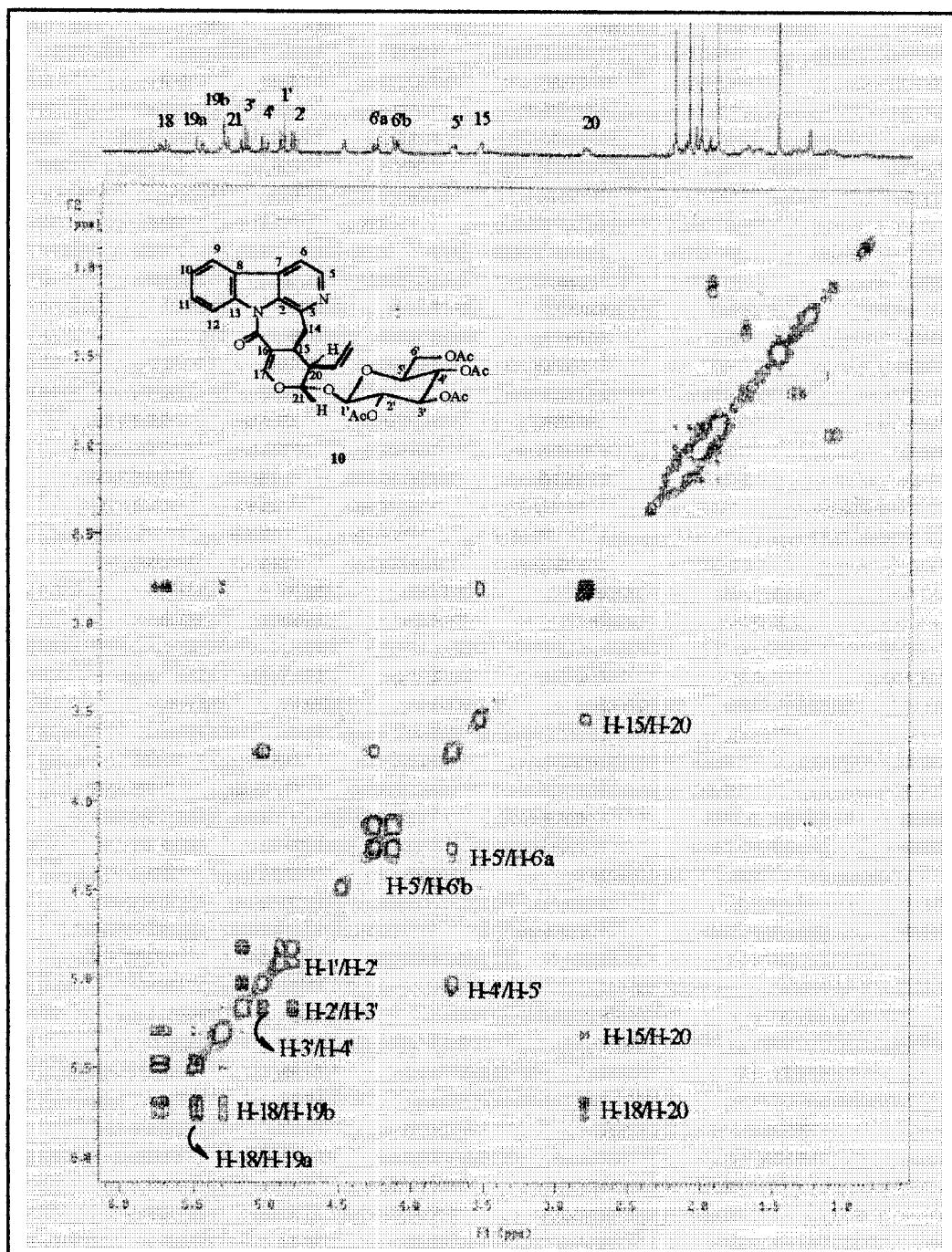


Figura 43b: Expansão (6,0-1,0 ppm) do espectro de RMN 2D ($^1\text{H}x^1\text{H}$ -COSY) de SGCM-11 (**10**) registrado em CDCl_3 .

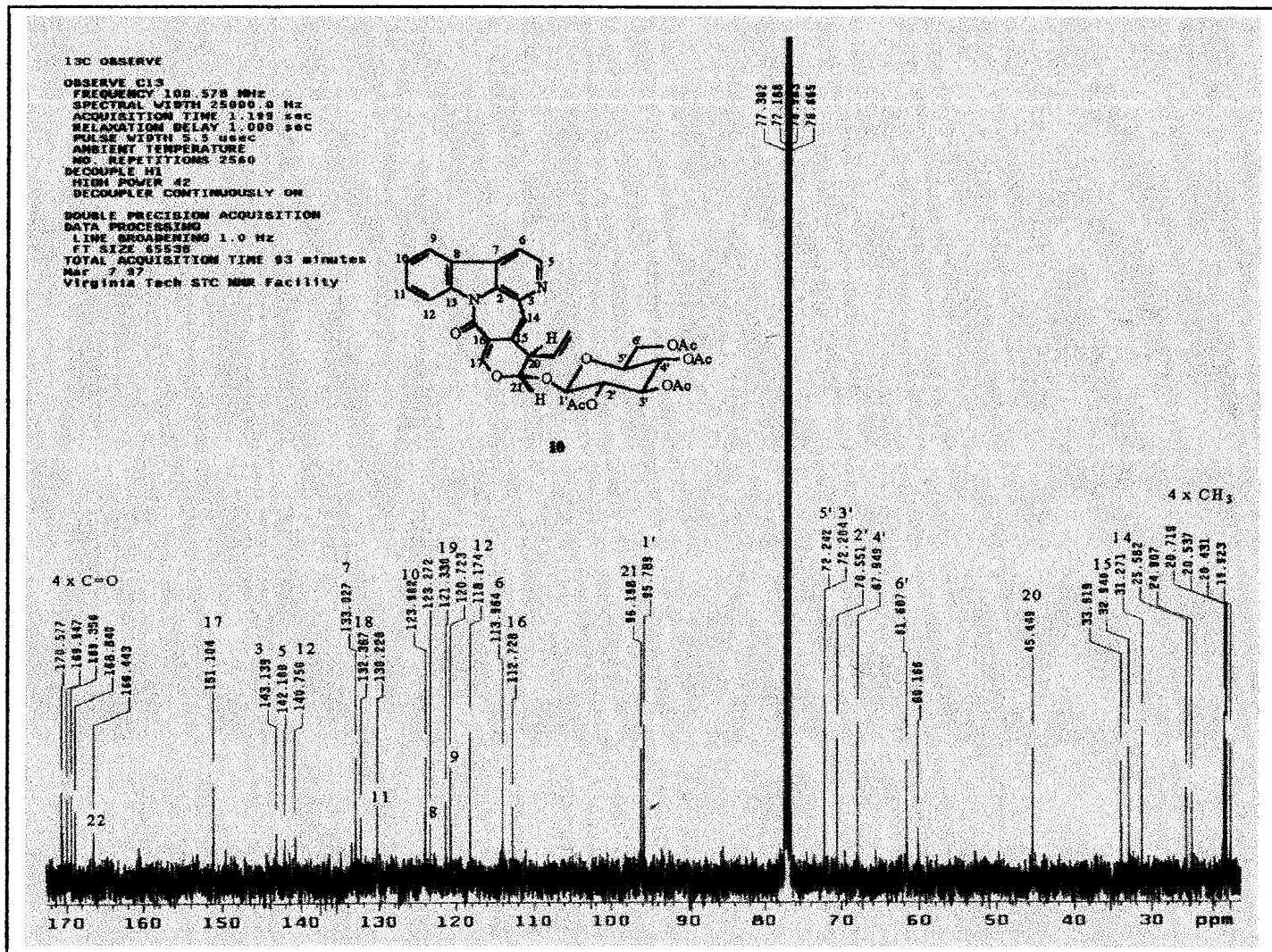


Figura 44: Espectro de RMN ^{13}C PND de SGCM-11 (**10**) registrado em CDCl_3 .

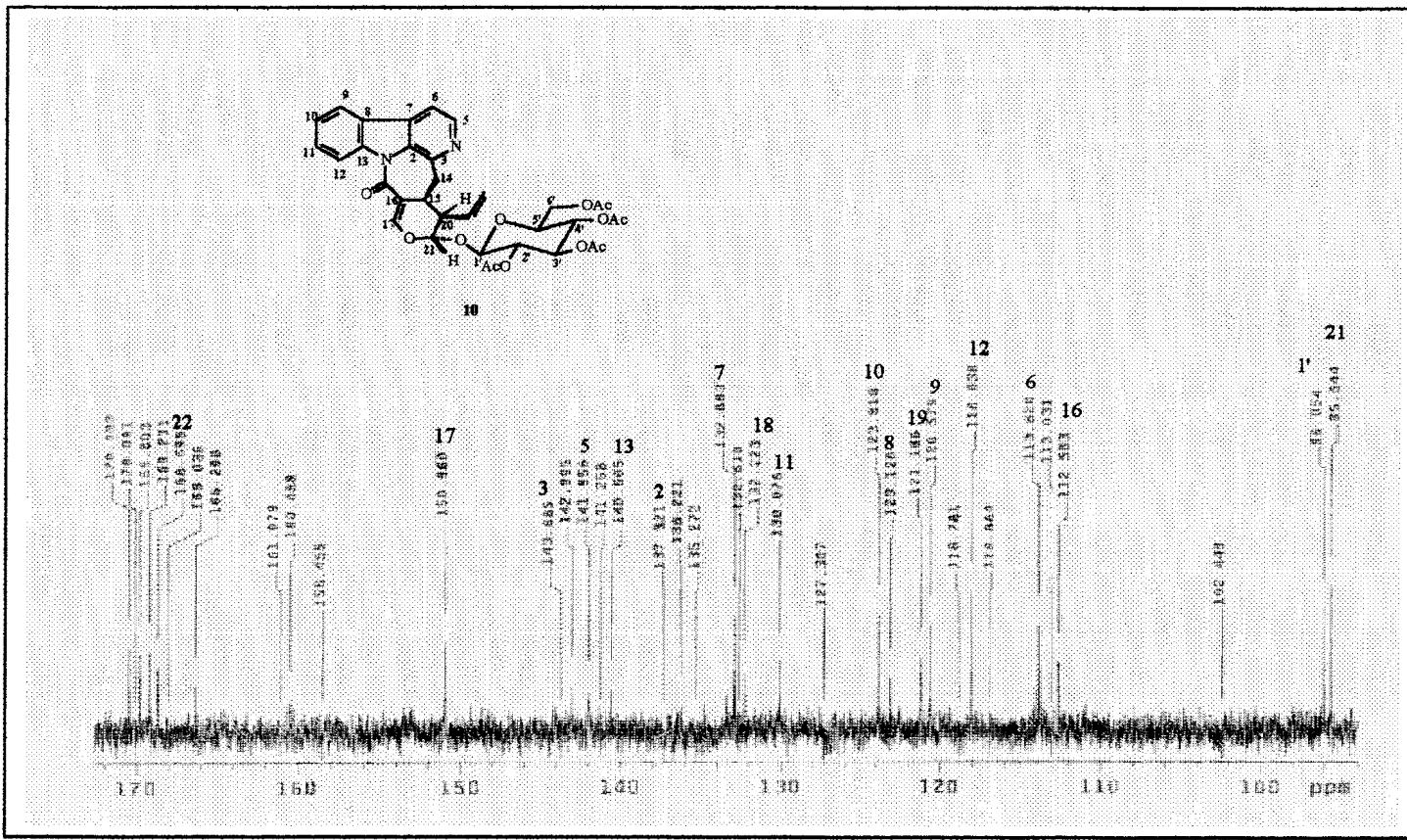


Figura 44a: Expansão (170-100 ppm) do espectro de RMN ^{13}C PND de SGCM-11 (**10**) registrado em CDCl_3 .

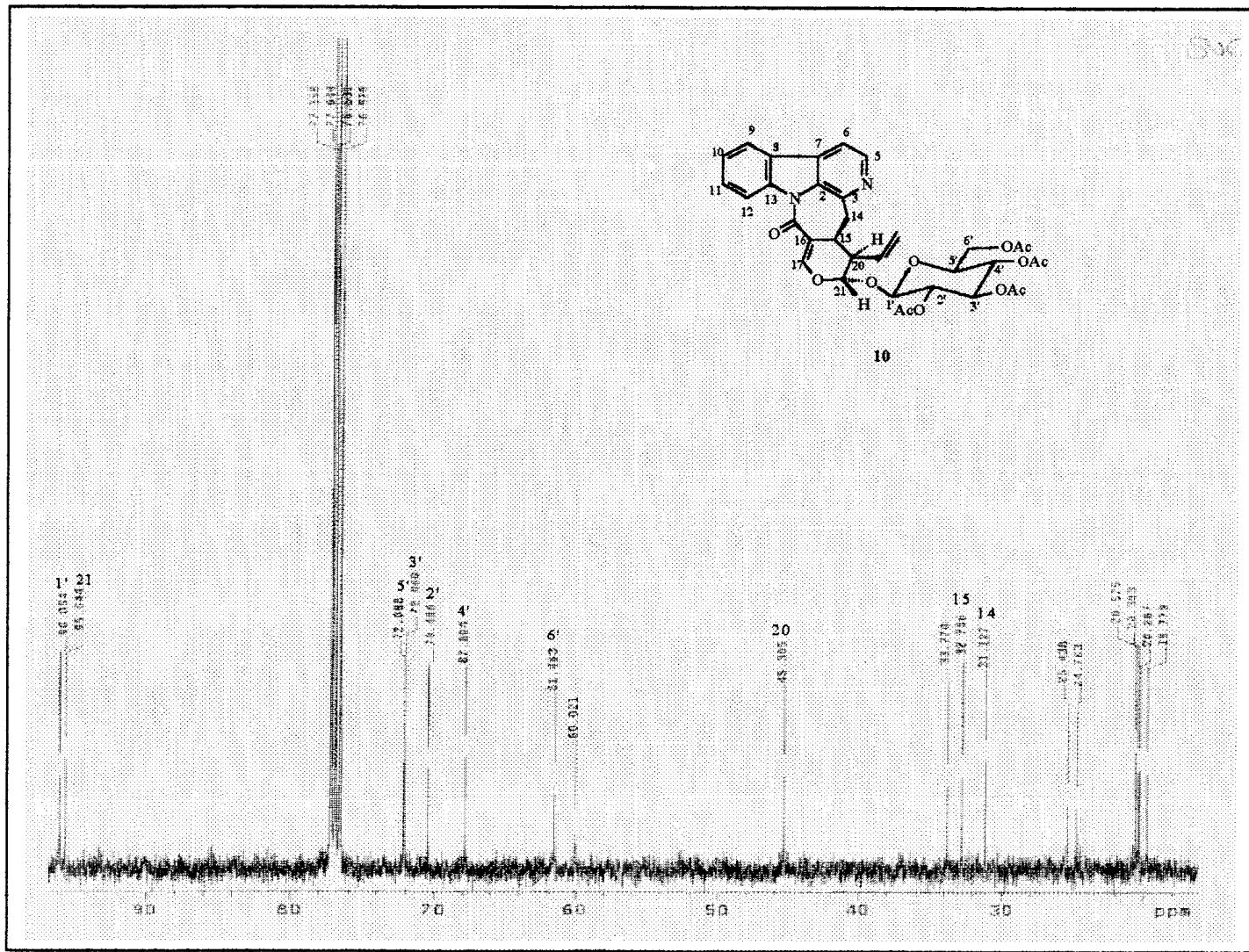


Figura 44b: Expansão (100-20 ppm) do espectro de RMN ^{13}C PND de SGCM-11 (**10**) registrado em CDCl_3 .

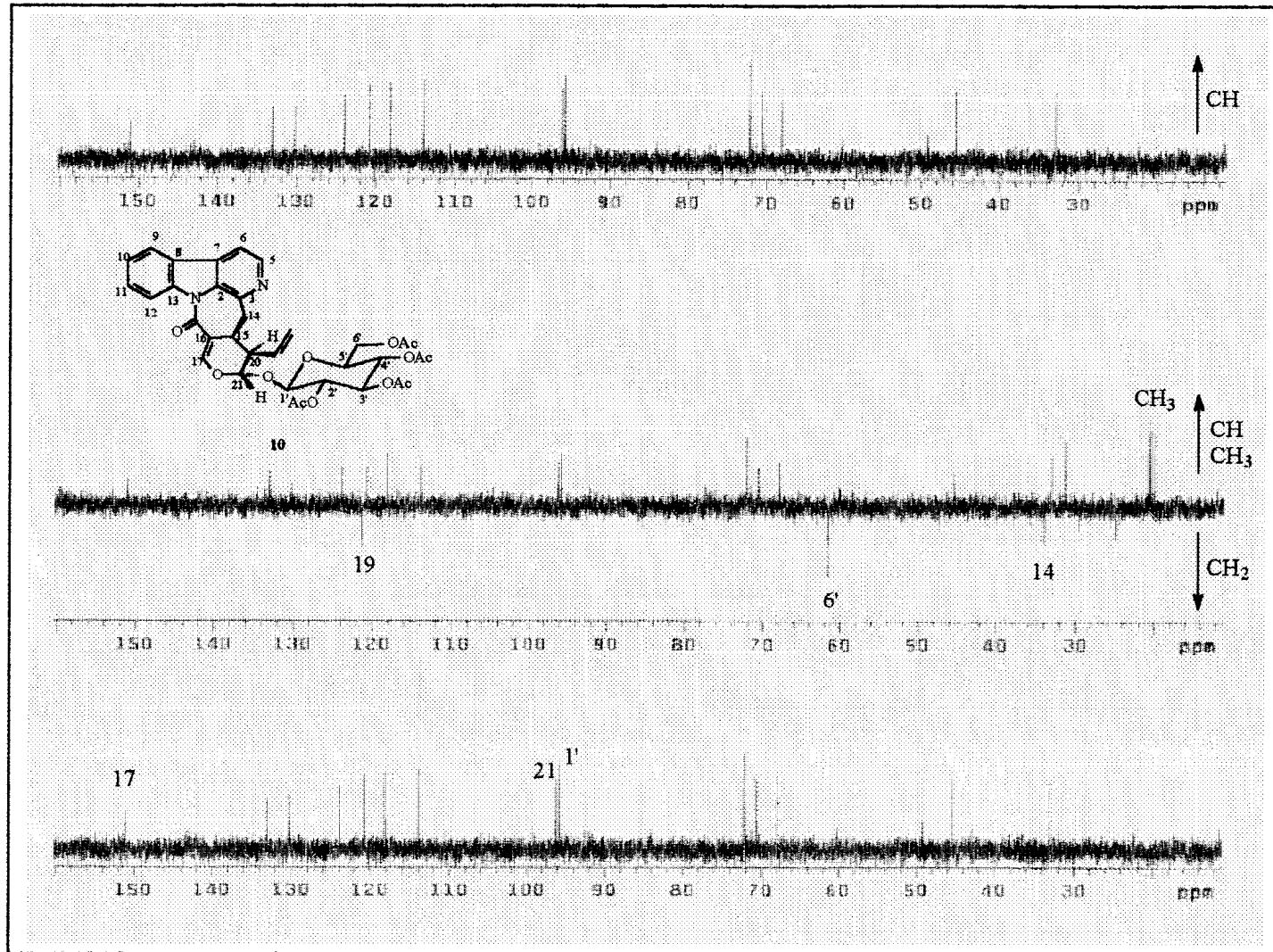


Figura 45: Espectro de RMN ^{13}C de SGCM-11 (10) com DEPT ($\theta = 90$ e 135°) registrado em CDCl_3 .

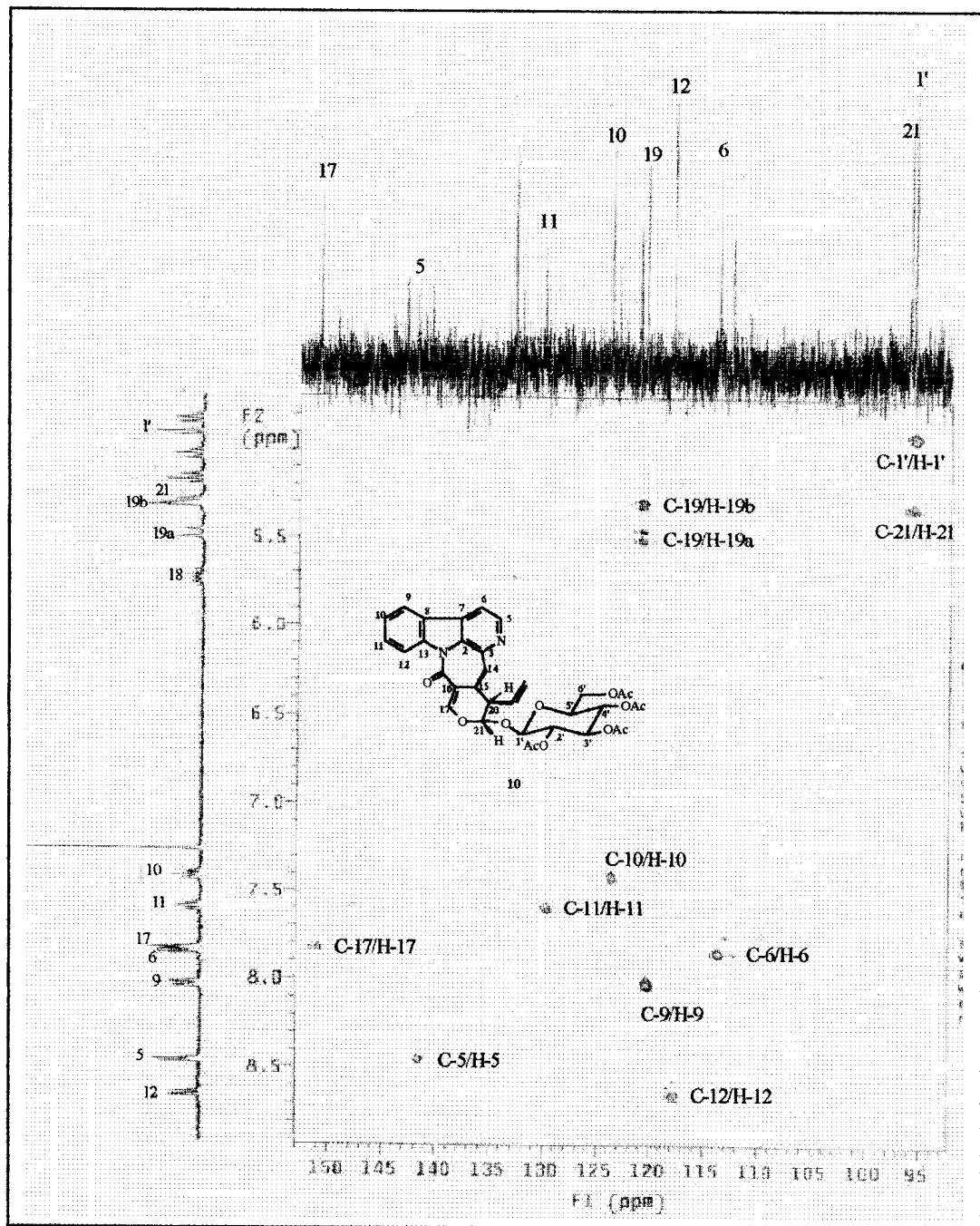


Figura 46: Espectro de RMN 2D($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -COSY, $^1\text{J}_{\text{CH}}$)-HMQC de SGCM-11 (**10**) registrado em CDCl_3 .

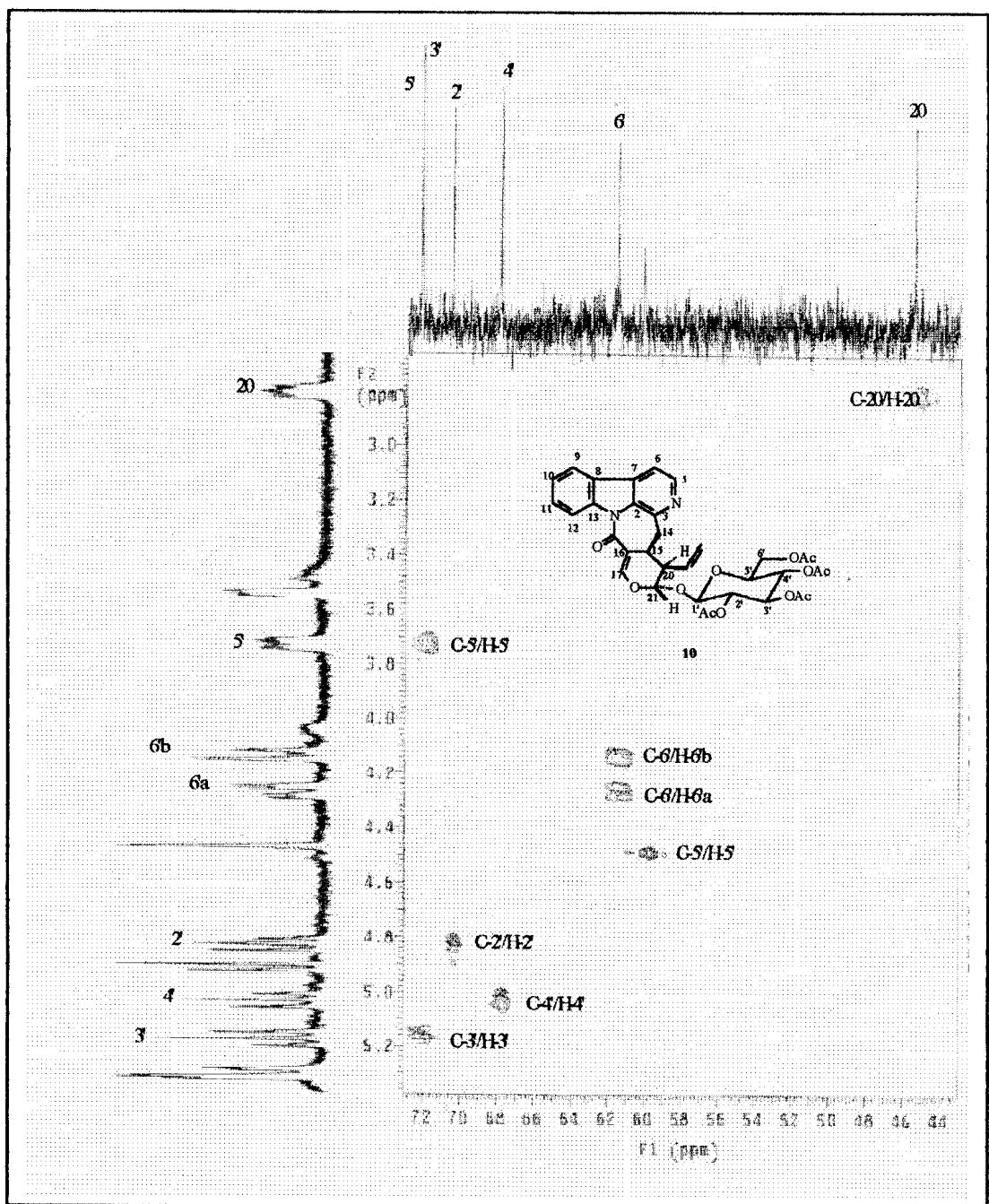


Figura 46a: Expansão (72-44 ppm) do espectro de RMN 2D ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -COSY, $^1\text{J}_{\text{CH}}$)-HMQC de SGCM-11 (**10**) registrado em CDCl_3 .

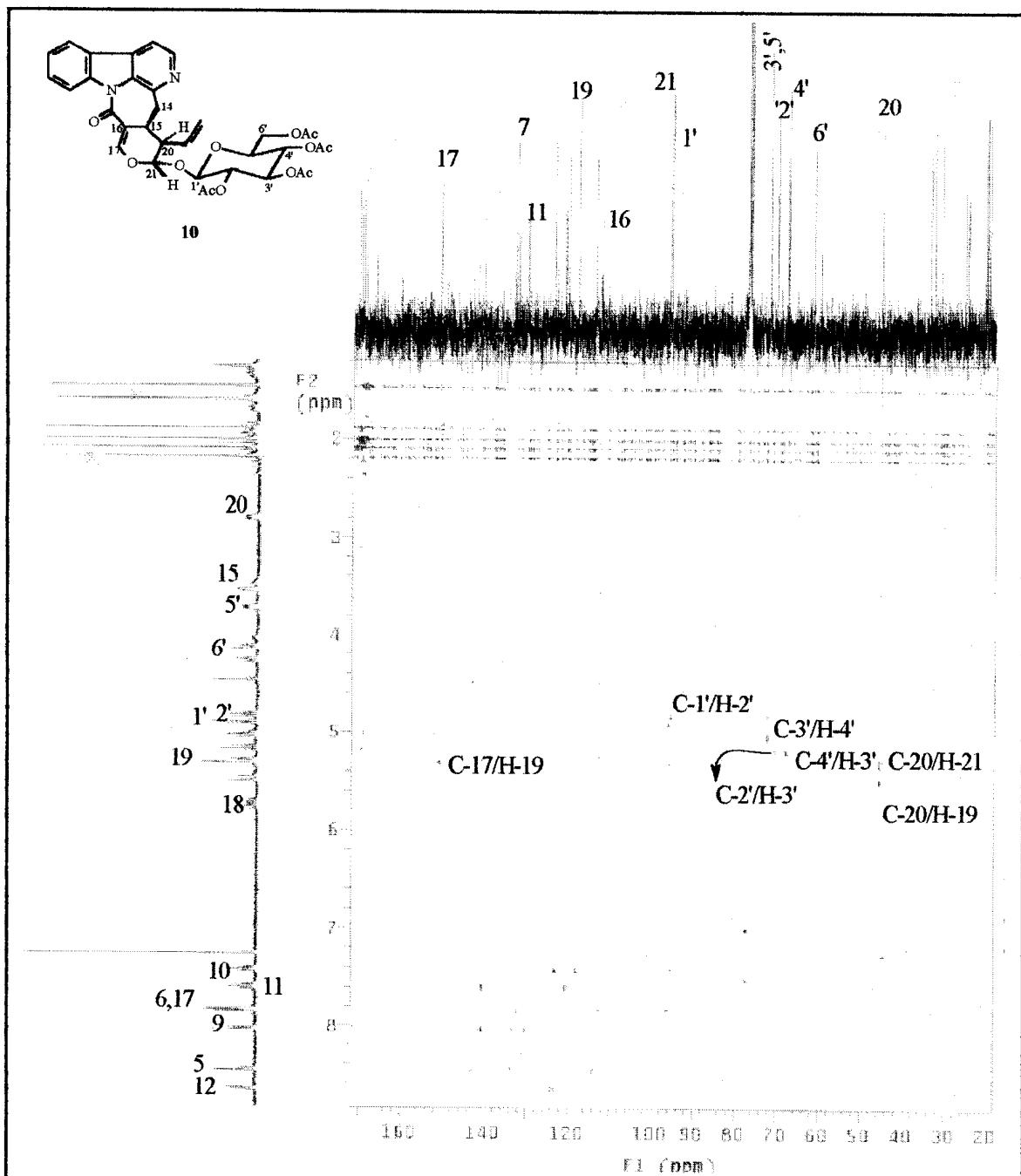


Figura 47: Espectro de RMN 2D ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -COSY, $^{2,3}J_{\text{CH}}$)-HMBC de SGCM-11 (**10**) registrado em CDCl_3 .

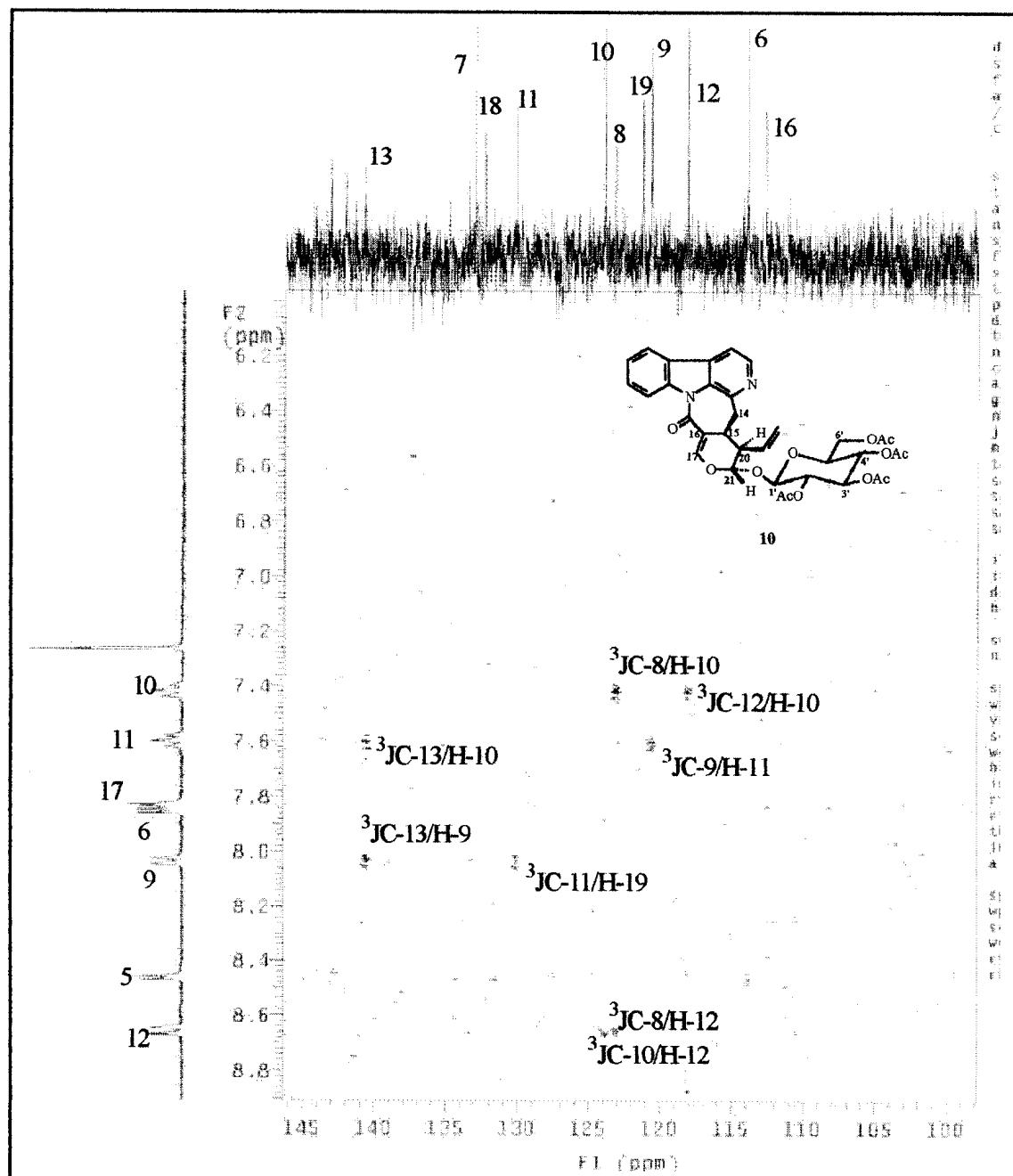


Figura 47a: Expansão (173-162 ppm) do espectro de RMN 2D

$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -COSY, $^{2,3}\text{J}_{\text{CH}}$ -HMBC de SGCM-11 (**10**) registrado em CDCl_3 .

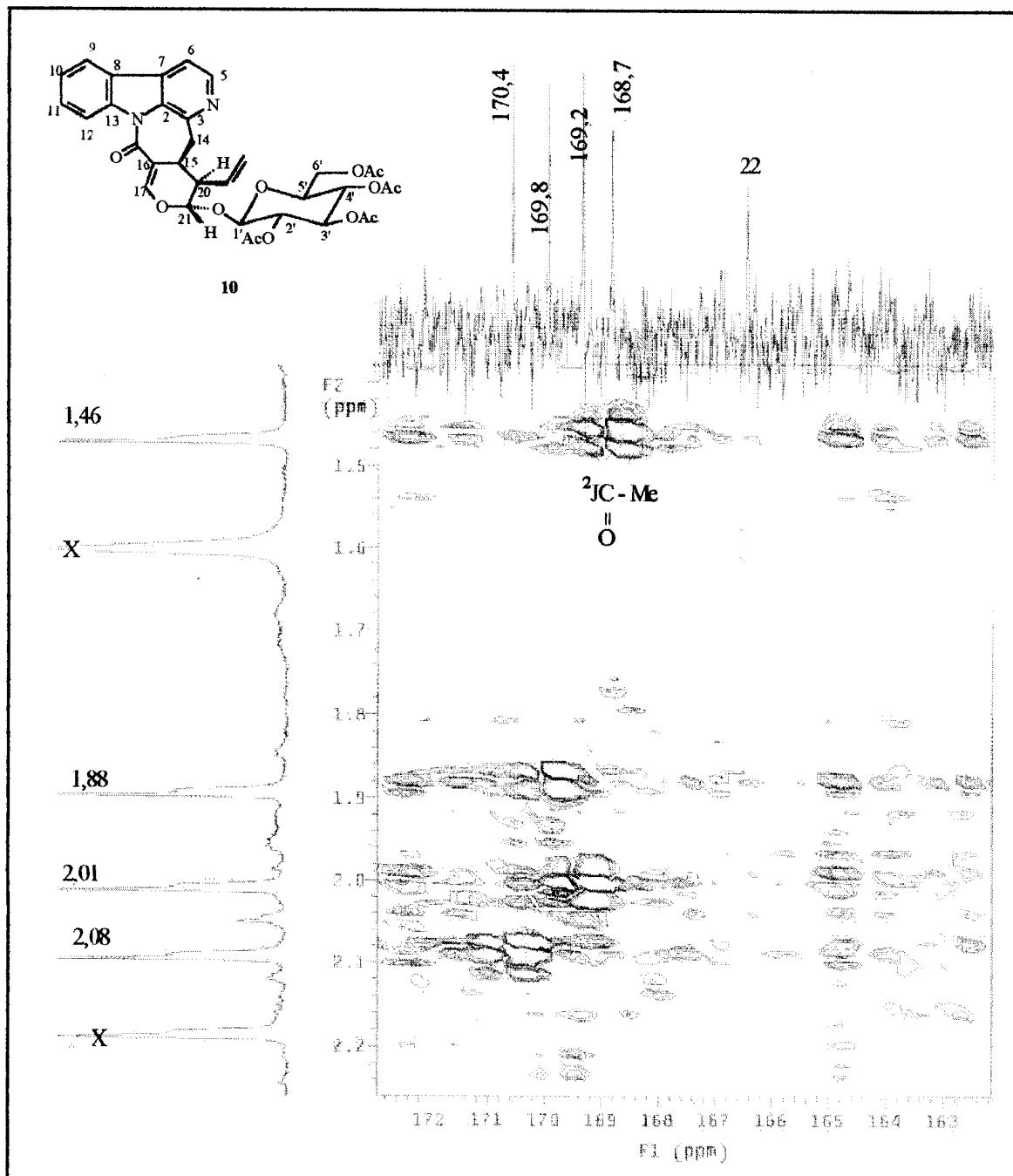


Figura 47b: Expansão (145-100 ppm) do espectro de RMN 2D (¹H x ¹³C-COSY, ^{2,3}J_{CH}-HMBC) de SGCM-11 (**10**) registrado em CDCl₃.

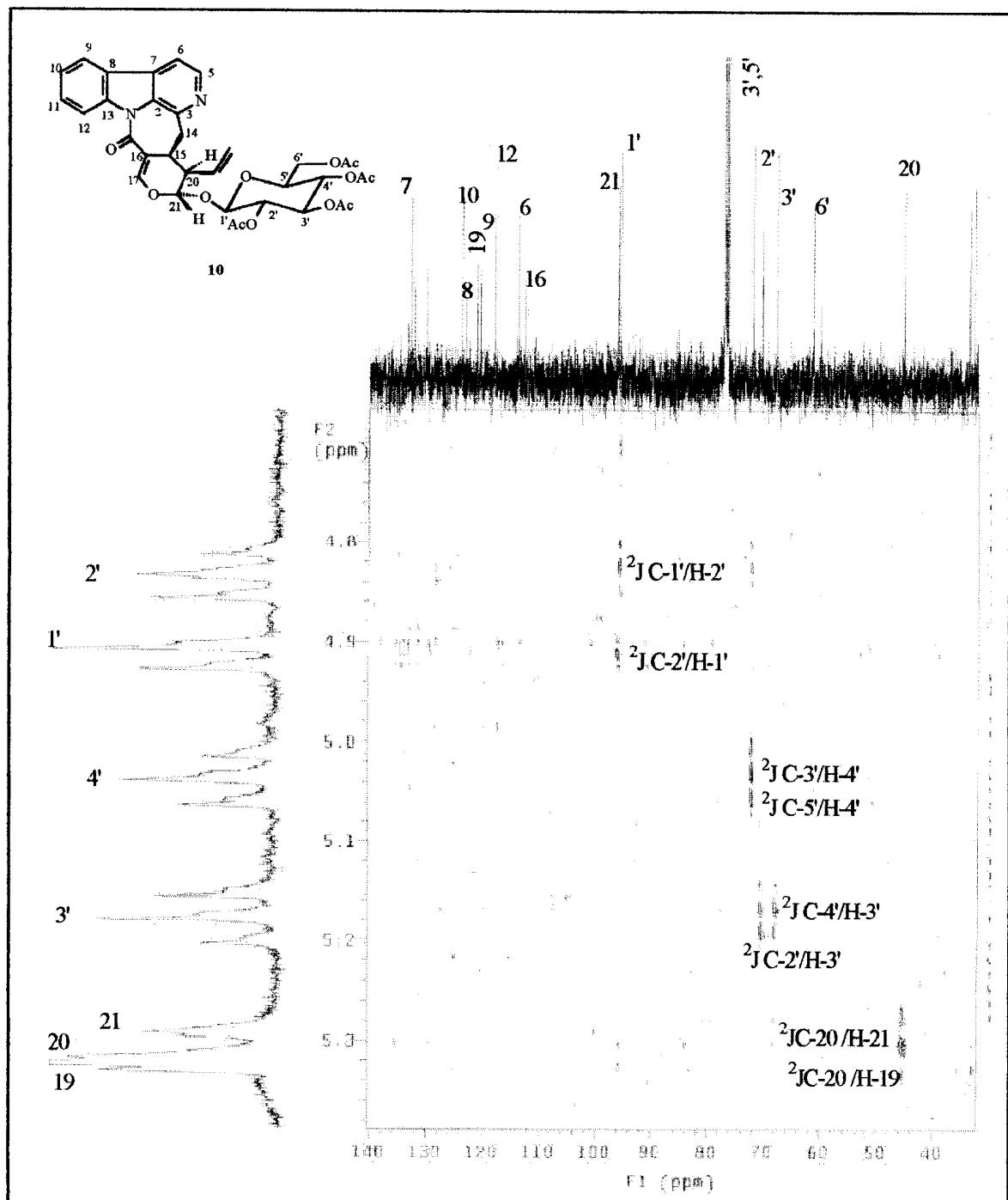


Figura 47c: Expansão (140-40 ppm) do espectro de RMN 2D

($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -COSY, $^{2,3}\text{J}_{\text{CH}}$)-HMBC de SGCM-11 (**10**) registrado em CDCl_3 .

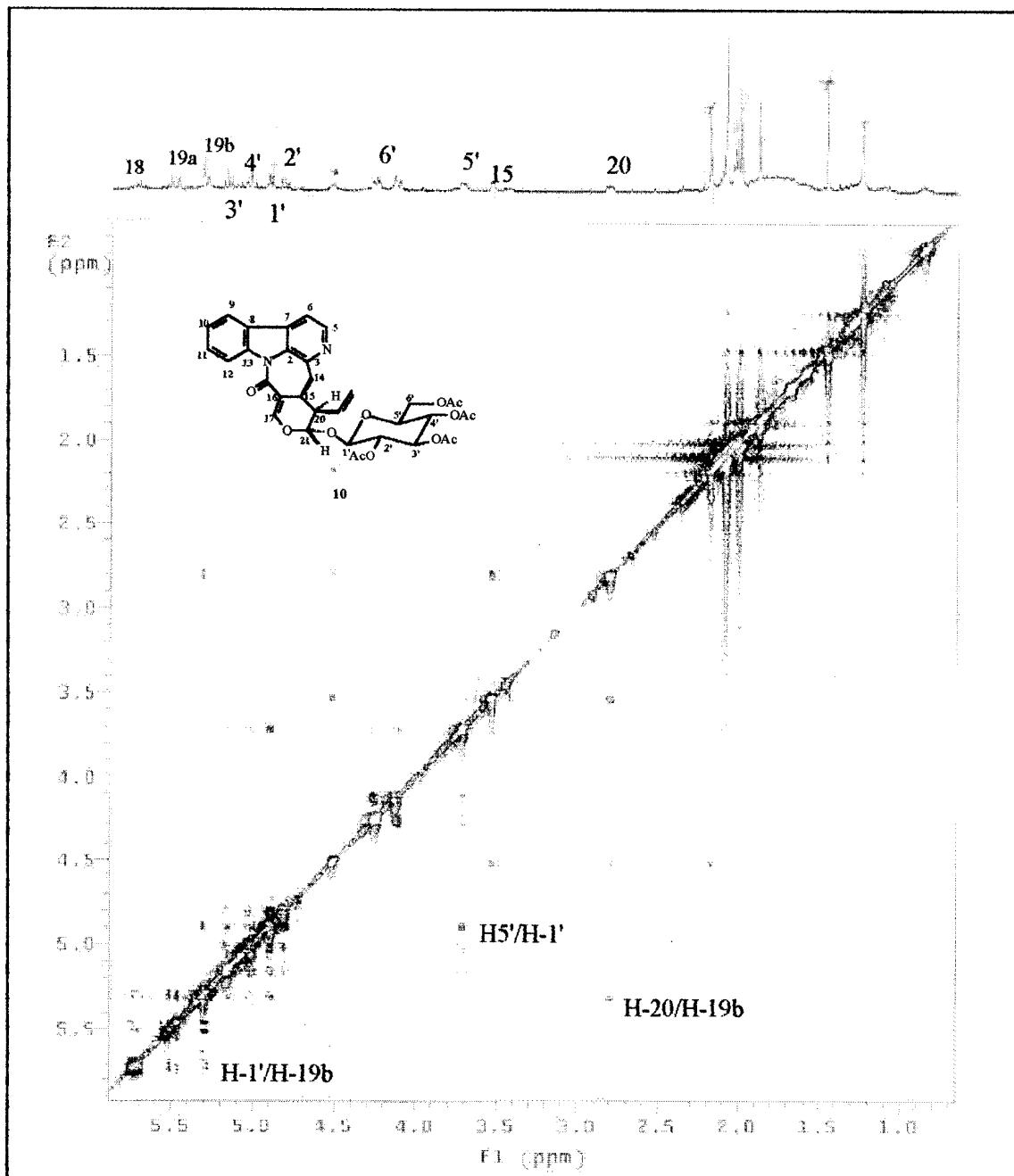


Figura 48: Espectro de RMN NOESY de SGCM-11 (**10**)
registrado em CDCl_3 .

“Instruir-te-ei, e ensinar-te-ei o caminho que deves seguir, guiar-te-ei com os meus olhos.”

Sl. 32:8