

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Tese de Doutorado

Estudo Fitoquímico de Espécies Brasileiras de
Rauvolfia (Apocynaceae)

Lucilia Kato
Orientadora: Profa. Dra. Raquel Marques Braga
Instituto de Química
UNICAMP

Março/2001



UNIDADE BC
N.º CHAMADA: 1562
K1562
V. 1 Ex. 1
TOMBO BC/ 46126
PROC. 16-392/01
C ☐ D ☒
PREÇO R\$ 11,00
DATA 17-08-01
CPD

CM00158831-1

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA
UNICAMP

K156e

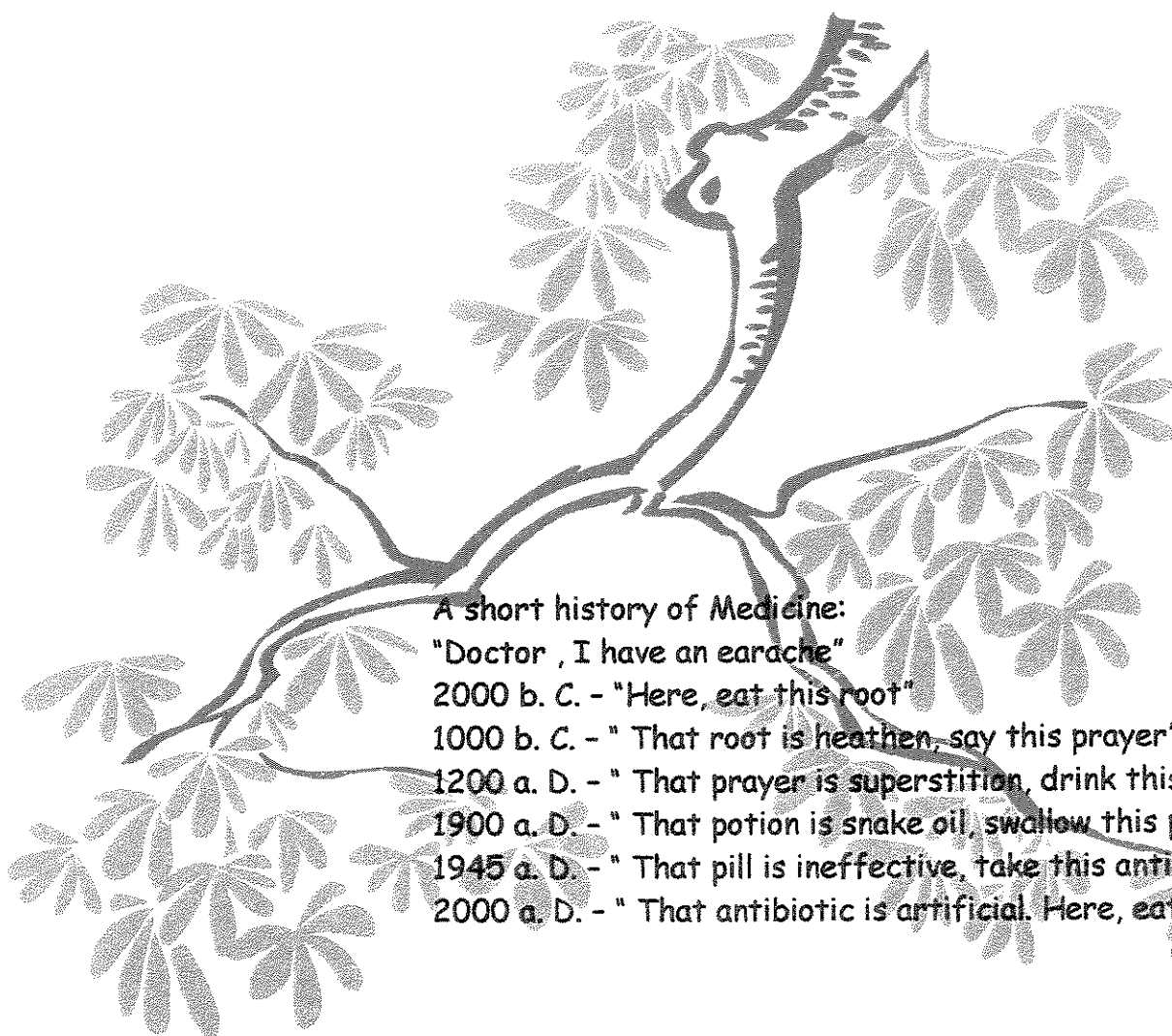
Kato, Lucilia

Estudo fitoquímico de espécies brasileiras
de *Rauvolfia* (Apocynaceae) / Lucilia Kato. --
Campinas, SP: [s.n], 2001.

Orientadora: Raquel Marques Braga.

Tese (doutorado) – Universidade
Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. *Rauvolfia bahienses*. 2. *Rauvolfia*
weddelliana. 3. Alcalóides indólicos. I. Braga,
Raquel Marques. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Química. III. Título.



A short history of Medicine:

"Doctor , I have an earache"

2000 b. C. - "Here, eat this root"

1000 b. C. - " That root is heathen, say this prayer"

1200 a. D. - " That prayer is superstition, drink this potion"

1900 a. D. - " That potion is snake oil, swallow this pill"

1945 a. D. - " That pill is ineffective, take this antibiotic"

2000 a. D. - " That antibiotic is artificial. Here, eat this root"

(Anônimo)



Ào Sérgio,
por ser a minha melhor metade;

Àos meus pais e irmãos
pelo apoio incondicional;

À família Sibov
pelo carinho da acolhida;

Agradeço de coração, a todos que fizeram parte deste trabalho,

- ✓ À Profa. Dra Raquel M. Braga, que confiou em mim e deu todo o suporte para realização deste trabalho, primeiro no Mestrado e agora no Doutorado, sempre disposta a ensinar e orientar, além da amizade e gostar de dançar...
- ✓ À Ingrid Koch, que forneceu as espécies de *Rauvolfia*, além do apoio em tudo que se diz respeito à Botânica.
- ✓ À Valéria (das sacolas) e Cáritas, amigas, que tornam o nosso trabalho mais alegre, além da grande colaboração no laboratório.
- ✓ Às meninas: Elaine, Valéria (de Deus), Valdirene, Valéria (loira), Silvana, Caroline pela alegria na convivência e em especial à Rita e Ray que além de amigas são excelentes técnicas; sem esquecer dos meninos, Marcelo, Artur, Paiva e Eduardo.
- ✓ Aos amigos e colegas, Olyr, Ezequias, Bruno, Paulinho, Lucídio, José, Buba, Sandrinha, Ítalo, Gisele, Celina, Rinaldo, Ilza, Elias...
- ✓ À Bete, Nan, Sá, Helena, Saho, velhas companheiras de guerra.
- ✓ Fázinha, brigada pela revisão de português.
- ✓ Ao Dr. João Ernesto de Carvalho, Luciana e Márcia, pela colaboração e realização dos ensaios de citotoxicidade (CPQBA).
- ✓ À Profa. Dra Anita Marsaioli e Dra. Marisa Nogueira pelo suporte aos testes de bioautografia;
- ✓ À Profa. Eva e Prof. Aderbal, sempre com algo a nos ensinar e as meninas: Miriam, Valéria, Ana, Celira, Lourdes e meninos Paulo e André pelas dicas e paciência nos seminários de grupo;
- ✓ A Profa. Dra. Carol Collins pela correção no Abstract.
- ✓ Ao corpo técnico e funcionários do Instituto de Química, que me deram suporte; em especial às Sônias do RMN (Gemini e Bruker) e CLAE, Bel e André da CPG; Paula do xerox....
- ✓ À Profa. Dra Sonia Giubilei e ao PEIS por me ensinar um pouco mais sobre a vida;
- ✓ ao Júlio que, além de me presentear com o "vinho de Santa Felicidade", me mostrou o PEIS e a Escola de Dança;
- ✓ À Capes pela bolsa concedida;
- ✓ Ao Faep-Unicamp e Fapesp pelo suporte financeiro;
- ✓ Ao IBAMA pelas facilidades durante a viagem de coleta;
- ✓ Ao Instituto de Química;
- ✓ Enfim a todos, que direta ou indiretamente, permitiram que eu concluísse este trabalho.

Resumo

Palavras-chave: *Rauvolfia bahiensis*, *Rauvolfia weddelliana*, alcalóides indólicos.

O nosso trabalho tem por objetivo o estudo fitoquímico de espécies brasileiras do gênero *Rauvolfia* (Apocynaceae), dirigido para o isolamento, identificação e estudo de atividade biológica de alcalóides encontrados nestas plantas. O gênero *Rauvolfia* (família Apocynaceae) é fonte de alcalóides indólicos, dos quais, muitos apresentam atividade biológica e muitos são utilizados como agentes terapêuticos, como por exemplo, a reserpina.

No Brasil existem dezessete espécies de *Rauvolfia*, sendo que catorze não foram quimicamente estudadas para o isolamento de alcalóides.

Iniciamos nosso trabalho com o estudo de *R. bahiensis*. Das folhas e cascas isolamos: picrinina, vinorina, raucafrinolina, normacusina B, norseredamina, seredamina, 10-metoxi-sarpagan-17-ol, norpurpelina e purpelina. Estes alcalóides já foram anteriormente isolados e seus dados espectroscópicos são compatíveis com os da literatura. Isolamos e identificamos quatro alcalóides indólicos inéditos: 12-metoxi-N₈-metil-velosimina, 12-demetoxipurpelina, 12-metoxi-afinisina e 12-metoxi-velosimina. Todos os alcalóides isolados de *R. bahiensis* possuem o núcleo indólico com esqueletos ajmalan ou sarpagan.

Trabalhando com as raízes de *R. weddelliana* isolamos: 18-hidroxi-yohimbina, 3 α -epi-yohimbina e reserpina, que é um importante fármaco, utilizado como antihipertensivo.

Analizamos o perfil cromatográfico dos extratos alcaloídicos de *Rauvolfia weddelliana*, *R. grandiflora* e *R. mattfeldiana* por CG/EM e CLAE, que mostraram claras diferenças com o perfil cromatográfico de *R. bahiensis*.

Testes de citotoxicidade com *Artemia salina* com os extratos alcaloídicos de *R. bahiensis* e *R. weddelliana*, mostraram promissora atividade citotóxica. Essa atividade citotóxica foi confirmada por bioensaios de citotoxicidade *in vitro* com cinco tipos de cultura de células tumorais. Este teste foi realizado no CPQBA com a colaboração do Dr. João Ernesto de Carvalho

Abstract

Indolic alkaloids are found in plants of the *Rauvolfia* genus (Apocynaceae family). This genus is a source of important therapeutical agents. In Brazil there are 17 species of *Rauvolfia*, of which 14 had not been studied chemically for alkaloid isolation. Our work has the objective of a phytochemical study of Brazilian species of *Rauvolfia*, for the isolation and identification of alkaloids and the study of biological activity of alkaloidic extracts of these plants. We began our work with a study of *R. bahienses*. We isolated from leaves: picrinine, vinorine, raucafrinoline and normacusine B; from the bark: norseredamine, seredamine, 10-methoxy-sarpagan-17-ol, norpurpeline and purpeline. These alkaloids already had been previously isolated. Their spectroscopic data are compatible with the literature. We isolated and identified the unknown indolic alkaloids: 12-methoxy-vellosimine, 12-methoxy-N₈-methyl-sarpagan-17-al, 12-demethoxypurpeline, 12-methoxy-affinisine. All NMR data have been assigned. All isolated alkaloids of *R. bahienses* have ajmalan or sarpagan skeletons. Working with the roots of *R. weddelliana* we isolated 18-hydroxy-yohimbine and 3 α -epi-yohimbine. From a study of the acid dicloromethanic extract of the bark of the roots of *R. weddelliana* we isolated the reserpine, an important medicine used as an antihypertensive. Tests of cytotoxicity using *Artemia salina* with *R. bahiensis* alkaloids and extracts of *R. bahiensis* and *R. weddelliana* show promising cytotoxic activity, confirmed by bioassays of 'in vitro' antiproliferative activity in cultures of tumor cells. We analyzed the chromatographic profile of alkaloidic extracts of other Brazilian species of *Rauvolfia* by GC/MS and HPLC, that show clear differences of *R. bahiensis* from the chromatographic profiles of *R. weddelliana*, *R. grandiflora* and *R. mattfeldiana*.

CURRICULUM VITAE

março, 2001

1 DADOS PESSOAIS

Nome: Lucília Kato

Nascimento: 19/09/1970, São Bernardo do Campo/SP - Brasil

CPF: 17654539843

2 FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

1994 - 1996

Mestrado em Química.

Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, São Paulo, Brasil.

Título: Obtenção de aza-açúcares a partir de D-glucitol,

Ano de obtenção: 1996.

Orientador: Raquel Marques Braga.

Bolsista da: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior,

CAPES, Brasil

1989 - 1993

Graduação em Bacharelado Em Química.

Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, São Paulo, Brasil.

3 PRODUÇÃO CIENTÍFICA, TECNOLÓGICA E ARTÍSTICA/CULTURAL**3.1 PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA****3.1.1 Trabalhos completos em eventos**

- 1 KATO, Lucília; BRAGA, Raquel Marques; Análise espectroscópica de derivados acetonídeos do D-glucitol. In: VI ENCONTRO DE USUÁRIOS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR, 1997, Angra dos Reis. Anais VI Encontro de Usuários de RMN. 1997. p.27-33.

3.1.2 Trabalhos resumidos em eventos

- 1 KATO, Lucília; BRAGA, Raquel Marques; KOCH, Ingrid; KOHN, Luciana Konecny; ANTÔNIO, Márcia Aparecida; CARVALHO, João Ernesto de; Alcalóides indólicos de Apocynaceae: Estudo de espécies brasileiras de *Rauvolfia*. In: 23ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2000, Poços de Caldas. Livro de Resumos da 23ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2000. v.2. p. PN109.
- 2 KATO, Lucília; BRAGA, Raquel Marques; KOCH, Ingrid; KOHN, Luciana Konecny; ANTONIO, Márcia Aparecida; CARVALHO, João Ernesto de; Phytochemistry and antiproliferative study of Apocynaceae: *Rauvolfia bahiensis*. In: 22ND IUPAC INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE CHEMISTRY OF NATURAL PRODUCTS, 2000, São Carlos - SP. Abstract Publication - 22nd IUPAC International Symposium on the Chemistry of Natural Products. 2000. p.ppa43.
- 3 KATO, Lucília; BRAGA, Raquel Marques; KOCH, Ingrid; Alcalóides indólicos de Apocynaceae: Estudo de *Rauvolfia bahiensis*. In: 22ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 1999, Poços de Caldas. Livro de resumos da 22ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 1999.v.2. p.PN158

- 4 KATO, Lucília; BRAGA, Raquel Marques; KOCH, Ingrid;. Alcalóides indólicos de Apocynaceae: Estudo de *Rauvolfia bahiensis*. In: IV JORNADA PAULISTA DE PLANTAS MEDICINAIS, 1999, Ribeirão Preto. Programação e Resumos da IV Jornada Paulista de Plantas Medicinais. 1999. p.73-7.06.
- 5 KATO, Lucília, BRAGA, Raquel Marques, KOCH, Ingrid. Alcalóides indólicos de *Rauvolfia*. In: XV SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 1998, Águas de Lindóia. Livro de Programa e Resumos do XV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. 1998. v. p.03-126.
- 6 KATO, Lucília; BRAGA, Raquel Marques; Obtenção de acetonídeos e síntese formal da deoxinojirimicina. In: 20ª REUNIÃO ANUAL DA SBQ, 1997, Poços de Caldas. Livro de Resumos da 19ª Reunião da SBQ. 1997. v.2.
- 7 KATO, Lucília; BRAGA, Raquel Marques; PEREIRA, Juliana Duarte. Obtenção de piperidinas e pirrolidinas a partir do D-glucitol. In: CONGRESSO INTERNO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 1996, Campinas. Livro de resumos do IV Congresso Interno de Iniciação Científica. 1996.
- 8 KATO, Lucília; BRAGA, Raquel Marques; MELO, Lucio Flávio Costa;. Obtenção de 6-amino-7-O-dimetilsililtexil-6,7-diidro-5-H-pirrol[1,2c] imidazol. In: 18ª REUNIÃO ANUAL DA SBQ, 1995, Caxambu. Livro de resumos da 18ª Reunião anual da SBQ. 1995.
- 9 KATO, Lucília; BRAGA, Raquel Marques; MELO, Lucio Flávio Costa;. Síntese de amino-imidazóis análogos a girolina. In: III CONGRESSO INTERNO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 1995, Campinas. 1995.

3.1.3 Artigos completos publicados em periódicos

- 1 KATO, Lucília; BRAGA, Raquel Marques. 1H and 13C NMR spectroscopy analysis of acetonides of D-glucitol derivatives. *Magnetic Resonance in Chemistry*, v.37, p.447-449, 1999.
- 2 MARQUES, Maria de Fátima S, KATO, Lucília, LEITÃO FILHO, Hermógenes, REIS, Francisco de Assis Machado. Indole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*. *Phytochemistry*, v.41, p.963, 1996.

3.1.4 Auxílio no trabalho de orientação dos alunos:

1. Juliana Duarte Pereira – Iniciação Científica (PIBIC/CNPq) - "Obtenção de piperidinas e pirrolidinas a partir do D-glucitol"
2. Amarildo Grando - Iniciação Científica (PIBIC/CNPq) - "Estudo Fitoquímico de *Rauvolfia*"
3. Elaine Pereira – Iniciação Científica (Fapesp) - "Isolamento e identificação dos alcalóides de sementes miméticas de *Ormosia arborea* (Vell) Harms"
4. Raimunda Aparecida de Souza – Estágio de Capacitação Técnica (Fapesp) - "Estudo Fitoquímico de Apocynaceae: *Rauvolfia* e *Himatanthus*"

3.2 DEMAIS TRABALHOS

- 1 KATO, Lucília, MASSON, Nancy Cristina. A interdisciplinaridade da Química. 2000. I Simpósio Regional do Grupo de Estudos e Pesquisas em Educação de Jovens e Adultos (GEPEJA), 2000, Indaiatuba.

Índice Analítico

Índice de Figuras	xix
Índice de Tabelas.....	xxii
Índice de Espectros.....	xxiv
Lista de abreviaturas, símbolos e acrônimos, citados neste trabalho.....	xxvii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Alcalóides	1
1.2 Alcalóides indólicos monoterpênicos.....	3
1.3 Alcalóides de <i>Rauvolfia</i>	7
1.3.1 Alcalóides de espécies brasileiras de <i>Rauvolfia</i>	11
1.4 Gênero <i>Rauvolfia</i>	14
1.5 Atividade biológica/ bioensaios gerais	18
1.5.1 Teste de letalidade para <i>Artemia salina</i> (Brine Shrimp Lethality Test – BSLT).....	19
1.5.2 Bioautografia.....	19
1.5.3 Citotoxicidade, atividade antitumoral e antineoplástica.	20
2 OBJETIVOS.....	23
3. PARTE EXPERIMENTAL	27
3.1 Materiais e Métodos	27
3.2 Estudo Fitoquímico	28
3.2.1 Coleta.....	28
3.2.2 Metodologia	28
3.3 Atividade Biológica.....	55
3.3.1 Ensaio bioautográficos	55
3.3.2 Bioensaio de letalidade para <i>Artemia salina</i>	55
3.3.3 Testes de atividade citotóxica.....	57
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
4.1 Coleta	61
4.2 Estudo Fitoquímico	66
4.2.1 <i>Rauvolfia bahiensis</i>	67
4.2.2 <i>Rauvolfia weddelliana</i> e <i>R. sessilifolia</i>	72
4.2.3 <i>Rauvolfia grandiflora</i> e <i>Rauvolfia mattfeldiana</i>	75
4.2.4 <i>Rauvolfia vomitoria</i>	75

4.3	Análise espectroscópica dos alcalóides isolados:	76
4.3.1	Alcalóides indólicos tipo sarpagan:	76
4.3.2	Alcalóides indólicos tipo ajmalan:	85
4.3.3	Alcalóides indólicos tipo yoimbano e heteroyoimbano:	90
4.4	Estudo por CG/EM	92
	<i>Rauvolfia bahiensis</i> :	93
4.5	Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	106
4.6	Bioensaios	120
4.6.1	Bioautografia.....	120
4.6.2	Teste de letalidade usando <i>Artemia salina</i>	120
4.6.3	Testes de atividade citotóxica:.....	121
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	125
	Apêndice 1 - Tabelas de Dados de RMN ^1H e ^{13}C	129
	Apêndice 2 – Coleta	145
	Apêndice 3 – Espectros.....	149

Índice de Figuras

Figura 1: Exemplos de alcalóides bioativos e as plantas que os contêm ⁴	2
Figura 2: Proposta biossintética para formação de alcalóides monoterpênicos	4
Figura 3: Yohimbina como sistema de numeração aceito baseado na biogênese e proposto por Le Men e Taylor, de acordo Schrippema ⁸	5
Figura 4: Alguns exemplos dos esqueletos mais comuns de alcalóides indólicos monoterpênicos.....	6
Figura 5: Exemplos de alcalóides isolados de <i>Rauvolfia</i>	8
Figura 6: Novos alcalóides isolados de <i>Rauvolfia</i> (a partir de 1987).....	10
Figura 7: Novos alcalóides isolados de <i>Rauvolfia</i> (a partir de 1987) cont.....	11
Figura 8: Alguns alcalóides isolados de espécies brasileiras de <i>Rauvolfia</i>	12
Figura 9: Compostos isolados de <i>R. mattfeldiana</i> e <i>R. grandiflora</i>	13
Figura 10: Mapa mostrando rota (em destaque) da viagem de coleta de Campinas (SP) à Rondonópolis (MS).....	62
Figura 11: Mapa mostrando rota (cont.) da viagem de coleta de Rondonópolis (MS) à Chapada dos Guimarães (MT) e Barão do Melgaço (MT- Pantanal).....	63
Figura 12: Frutos (geminados) de <i>R. sessilifolia</i>	64
Figura 13: <i>Rauvolfia weddelliana</i> coletada no Estado de Mato Grosso (1998)	65
Figura 14: <i>Rauvolfia sessilifolia</i> coletada no Estado de Mato Grosso do Sul (1998)	65
Figura 15: Estruturas dos alcalóides conhecidos isolados de <i>R. bahiensis</i>	68
Figura 16: Estruturas dos alcalóides inéditos isolados de <i>R. bahiensis</i>	68
Figura 17: Esqueleto dos alcalóides indólicos encontrados em <i>Rauvolfia</i>	69
Figura 18: Proposta, de Tamelen, biossintética para formação de alcalóides tipo sarpagina e ajmalina.....	70
Figura 19: Proposta de Lounasmaa para formação da ligação C-5 e C-16. ⁵⁹	71
Figura 20: Sandwicolina isolada de <i>R. serpentina</i>	71
Figura 21: Alcalóides isolados da raiz de <i>R. sessilifolia</i> (724).....	73
Figura 22: Alcalóide isolado de <i>R. weddelliana</i> (exsicata 729)	74
Figura 23: Proposta de formação do íon molecular e m/z M-1 para alcalóides com esqueleto tetrahydro- β -carbolina.....	76
Figura 24: Proposta de fragmentação de compostos tipo sarpagan com formação de m/z 249.....	77
Figura 25: Proposta de fragmentação para alcalóides com esqueleto tipo <i>sarpagan</i> com formação de m/z 169; 170 e 184.....	77
Figura 26: Configurações do anel D, de alcalóides tipo yohimbano.....	90
Figura 27: Deslocamentos de ¹³ C para as configurações normal e epiallo para os alcalóides tipo yohimbina;.....	90
Figura 28: Cromatograma (CIT) de RB12, indicando a presença de vinorina (4); picrinina (1) e um alcalóide com esqueleto tipo sarpagan (a).....	93
Figura 29: E.M. do pico (4) com t.r 13,8, indicando ser vinorina 4.	93
Figura 30: E.M. do pico (1) com t.r 14,6, indicando ser picrinina 1.....	94
Figura 31 A) E.M. do pico (a) com t.r 15,8, e B) E.M de um alcalóide com esqueleto tipo sarpagan, com substituinte carboxílico em C-16 e proposta pela biblioteca NIST e C) a subtração de seus E.M.	95

Figura 32: Cromatograma de LKRB23.1, indicando a presença dos alcalóides 12-demetoxi-purpentina (9); purpentina (10), norpurpentina (11); 12-metoxi-N-metil-velosimina (12); 12-metoxi-afinisina (13) e 12-metoxi-velosimina (14), seredamina (5) e norserdamina (7). Os E.M. correspondentes estão descritos no Apêndice 3.	96
Figura 33: CIT (CG/EM) do extrato diclorometânico neutro das cascas de <i>R. bahiensis</i> (LKRB23-2).....	97
Figura 34: CIT (CG/EM) do extrato diclorometânico básico das cascas de <i>R. bahiensis</i> (LKRB23-3).....	97
Figura 35: CIT (CG/EM) de A) Extrato clorofórmico ácido, B) neutro das folhas de <i>R. weddelliana</i> (exsicata 729). C) E.M do pico a de ambos os extratos e D) E.M da ajmalicina 19 proposta.	99
Figura 36: CIT (CG/EM) do extrato clorofórmico ácido das raízes de <i>R. sessilifolia</i> 724.....	100
Figura 37: CIT (CG/EM) do extrato clorofórmico básico das raízes de <i>R. weddelliana</i> (LKRW31-3) indicando a presença de normaculina B.	101
Figura 38: A) CIT (CG/EM) do extrato clorofórmico ácido das folhas de <i>R. grandiflora</i> , B) EM do pico a com M ⁺ em m/z 322.....	102
Figura 39: CIT (CG/EM) de extrato clorofórmico neutro das cascas de galhos de <i>R. grandiflora</i> e EM dos picos a e b	103
Figura 40: (Continuação) CIT (CG/EM) de EM do pico c e da proposta pela biblioteca NIST.....	104
Figura 41: Cromatograma (CIT/EM) de extrato clorofórmico básico dos galhos de <i>R. mattfeldiana</i> com presença de alcalóides indólicos.....	105
Figura 42: A) Espectros de U.V da reserpina em sobreposição ao espectro de UV do pico 17 do cromatograma de CLAE (B) de LKRW15.1 (extrato clorofórmico ácido das raízes de <i>R. sessilifolia</i> 724)	107
Figura 43: A) Espectros de U.V. do alcalóide 18 hidróxi -yohimbina 15 sobreposto ao U.V do pico 15 do cromatograma de CLAE de LKRW15-4 (extrato acetato básico).....	108
Figura 44: Cromatogramas de CLAE de A) LKRW15.4 (extrato clorofórmico acetato básico) e B) co-injeção de LKRW15.4 com alcalóide 18 hidróxiyohimbina 15.....	108
Figura 45: A) Espectros de U.V. do alcalóide reserpilina 18 sobreposto ao espectro de U.V do pico 18, do cromatograma (B)) de CLAE de LKRW31.1 (extrato clorofórmico ácido das raízes de 729).	109
Figura 46: Cromatogramas de CLAE do extrato clorofórmico ácido LKRW15.1 (B) e LKRW31.1 (A), com presença do alcalóide 18 em LKRW31.1 e do alcalóide 17 em LKRW15.1.	110
Figura 47: A) Cromatograma de CLAE do extrato clorofórmico básico da raiz de <i>R. weddelliana</i> (LKRW31-3) e B) Espectros de U.V. do alcalóide 18-hidróxi yohimbina 15 e do pico 15.....	110
Figura 48: Cromatograma de CLAE de A) extrato clorofórmico ácido (LKRW 051) e B) neutro (LKRW052) das folhas de <i>R. weddelliana</i>	111
Figura 49: Cromatograma CLAE do extrato clorofórmico básico das folhas de <i>R. weddelliana</i> (LKRW05.3).	112
Figura 50: Cromatograma CLAE do extrato clorofórmico básico das folhas de <i>R. weddelliana</i> (LKRW08.3).	112
Figura 51: Cromatograma CLAE do extrato clorofórmico básico das folhas de <i>R. sessilifolia</i> (LKRW06.3).....	113
Figura 52: A) Cromatograma de CLAE e B) o espectro de UV do pico a.....	114
Figura 53: Cromatograma CLAE do extrato clorofórmico neutro das folhas de <i>R. grandiflora</i> (LKRGF 332), identificando a presença de a e do alcalóide 18- hidróxiyohimbina 15.	115
Figura 54: Cromatograma CLAE (C) do extrato clorofórmico básico LKRGF 33-3, mostrando os picos c e d (não identificados), e seus espectros A) e B) de U.V.	116
Figura 55: Cromatograma de CLAE do extrato clorofórmico neutro das cascas de galhos de <i>R. grandiflora</i> (LKRGC342)	117

Fluxograma 1: Fracionamento ácido-base, dirigido para o isolamento de alcalóides.....	30
Fluxograma 2: Fracionamento por CCP de RB12;	35
Fluxograma 3: Fracionamento por CCP do extrato LKRB23.3 das cascas de caule de <i>R. bahiensis</i>	38
Fluxograma 4: Fracionamento do extrato LKRB23.1 (diclorometânico ácido das cascas) de <i>R. bahiensis</i>	41
Fluxograma 5: Fracionamento por CCP das frações de LKRW15.3 (extrato CHCl ₃) da raiz de <i>R. sessilifolia</i>	47
Fluxograma 6: Fracionamento por CCP de frações de LKRW 31-1, extrato clorofórmico ácido das raízes de <i>R. weddelliana</i>	52
Fluxograma 7: Procedimento para diluição de amostra para o teste letalidade para <i>Artemia salina</i>	56

Índice de Tabelas:

Tabela 1: Espécies do gênero <i>Rauvolfia</i> e sinônimas encontradas na América.....	15
Tabela 2: Espécies do gênero <i>Rauvolfia</i> e sinônimas encontradas na América (cont.).....	16
Tabela 3: Distribuição de espécies de <i>Rauvolfia</i> ocorrentes no Brasil.....	17
Tabela 4: Espécies brasileiras de <i>Rauvolfia</i> coletadas.....	23
Tabela 5: Material vegetal disponível para estudo;	28
Tabela 6: Extratos obtidos de <i>Rauvolfia bahiensis</i>	31
Tabela 7: Fracionamento do extrato RB13.....	31
Tabela 8: Fracionamento da fração 12-15 de RB13.....	32
Tabela 9: Fracionamento por CCP da fração 21-48 de RB13.....	33
Tabela 10: Fracionamento do extrato LKRB23.3.....	37
Tabela 11: Fracionamento do extrato LKRB23.1.....	40
Tabela 12: Extratos obtidos de <i>Rauvolfia sessilifolia</i> (724) e <i>R. weddelliana</i> (729).....	45
Tabela 13: Extratos obtidos de <i>Rauvolfia sessilifolia</i> (724) e <i>R. weddelliana</i> (729) (cont.).....	45
Tabela 14: Fracionamento do extrato LKRW15.3.....	46
Tabela 15: Fracionamento de LKRW15.1.....	49
Tabela 16: Fracionamento de LKRW31.1.....	51
Tabela 17: Extratos obtidos de <i>Rauvolfia mattfeldiana</i>	53
Tabela 18: Extratos obtidos de <i>Rauvolfia grandiflora</i>	54
Tabela 19: Extratos etanólicos obtidos de <i>Rauvolfia</i>	66
Tabela 20: Alcalóides isolados de <i>R. bahiensis</i>	67
Tabela 21: Alcalóides obtidos por tratamento do extrato clorofórmico básico das cascas de raízes de <i>R. sessilifolia</i> .72	
Tabela 22: Alcalóides isolados do extrato clorofórmico ácido das raízes de <i>R. weddelliana</i> (LKRW31-1).....	74
Tabela 23: Incrementos no sinal de ^{13}C para os carbonos do anel benzênico:.....	79
Tabela 24: Valores estimados para os carbonos aromáticos do núcleo indólico, usando a afinisina como padrão: 79	
Tabela 25: Deslocamentos de RMN ^1H (δ) para 12-metoxi-afinisina (13).....	80
Tabela 26: Deslocamentos de RMN ^{13}C (δ) para 12-metoxi-afinisina (13).....	80
Tabela 27: Deslocamentos de RMN ^1H (δ) para 12-metoxi-N-metil-velosimina (12).....	82
Tabela 28: Deslocamentos de RMN ^{13}C (δ) para 12-metoxi-N-metil-velosimina (12).....	82
Tabela 29: Dados de ^1H (δ) do alcalóide 12-metoxi-velosimina (14).....	83
Tabela 30: Dados de ^{13}C (δ) do alcalóide 12-metoxi-velosimina (14).....	84
Tabela 31: Dados de ^1H (δ) do alcalóide 12-demetoxi-purpelina (9).....	87
Tabela 32: Dados de ^{13}C (δ) do alcalóide 12-demetoxi-purpelina (9).....	87
Tabela 33: Deslocamentos de ^{13}C para as configurações normal e epiallo para os alcalóides tipo yohimbina:	91
Tabela 34: Programa de aquecimento usado para o CG	92
Tabela 35: Código dos diferentes extratos das raízes de <i>R. weddelliana</i>	107
Tabela 36: Comparação da presença de reserpina (17) e reserpilina (18) nos extratos das raízes de <i>Rauvolfia</i> .109	
Tabela 37: Alcalóides identificados neste trabalho.....	118
Tabela 38: Alcalóides identificados neste trabalho (cont.).....	119

Tabela 39: Valores de LC ₅₀ para os extratos alcalóidicos de <i>R. bahiensis</i> e <i>R. weddelliana</i> (G: graus de liberdade; LI: Limite inferior; LS: Limite superior)	120
Tabela 40: Atividade citotóxica das amostras. Os resultados estão expressos como a média + dp da absorbância (Abs. +dp a 540 nm) e a inibição do crescimento em porcentagem (os números em azul indicam atividade citostática acima de 50% e em vermelho atividade citotóxica)	122
Tabela 41: Dados de ¹ H e ¹³ C para o alcalóide picrinina (1).	129
Tabela 42: Dados de RMN ¹ H e ¹³ C para normacusina B (3)	130
Tabela 43: Dados de RMN ¹ H e ¹³ C para 10-metoxi-sarpagan-17-ol (8)	131
Tabela 44: Dados de RMN ¹ H e ¹³ C para vinorina (4)	132
Tabela 45: Dados de RMN ¹ H e ¹³ C para raucafrinolina (2):	133
Tabela 46: Dados de RMN ¹ H e ¹³ C para norseredamina (7):	134
Tabela 47: Dados de RMN ¹ H e ¹³ C para seredamina (5):	135
Tabela 48: Dados de RMN ¹ H e ¹³ C para sal de seredamina (6):	136
Tabela 49: Dados de RMN ¹ H e ¹³ C para norpurpelina (11):	137
Tabela 50: Dados de RMN ¹ H e ¹³ C para purpelina (10):	138
Tabela 51: Dados de RMN ¹ H e ¹³ C para 18-hidroxi-yohimbina (15)	139
Tabela 52: Dados de RMN ¹ H e ¹³ C para 3-epi- α -hidroxi-yohimbina (16)	140
Tabela 53: Dados de RMN ¹ H e ¹³ C para reserpina (17):	141

Índice de Espectros

E 1: Espectro de I.V. de picrinina (1), filme de CH_2Cl_2	149
E 2: Espectro de Massas (70 eV) da picrinina (1);	149
E 3: Espectro de RMN ^1H de picrinina (1); (CDCl_3/TMS ; 300MHz)	150
E 4: Espectro de RMN ^{13}C de picrinina (1) (CDCl_3/TMS ; 75 MHz)	150
E 5: Experimento de DEPT para a picrinina (1); (CDCl_3/TMS ; 75 MHz).....	151
E 6: Experimento COSY para a picrinina (1)	151
E 7: Experimento HETCOR para a picrinina (1)	152
E 8: Espectro de Massas (70 eV) para raucafrinolina (2).....	152
E 9 Espectro de RMN ^1H de raucafrinolina (2); (CDCl_3/TMS ; 300MHz);	153
E 10: Espectro de RMN ^{13}C de raucafrinolina (2) (CDCl_3/TMS ; 75 MHz).....	153
E 11: Experimento de DEPT para raucafrinolina (2) (CDCl_3/TMS ; 75 MHz)	154
E 12: Experimento COSY para raucafrinolina (2)	154
E 13: Experimento HETCOR para raucafrinolina (2)	155
E 14: Espectro de Massas (70 eV) para normacusina B (3)	155
E 15 Espectro de RMN ^1H de normacusina B (3) (CDCl_3/TMS ; 500MHz)	156
E 16: Espectro de RMN ^{13}C de normacusina B (3) (CDCl_3/TMS ; 125 MHz)	156
E 17: Experimento de DEPT para normacusina B (3) (CDCl_3/TMS ; 125 MHz)	157
E 18: Experimento COSY para normacusina B (3).....	157
E 19: Experimento HETCOR para normacusina B (3).....	158
E 20: Espectro de Massas (70 eV) para vinorina (4).....	158
E 21 Espectro de RMN ^1H de vinorina (4) (CDCl_3/TMS ; 300MHz).....	159
E 22: Espectro de RMN ^{13}C de vinorina (4); (CDCl_3/TMS ; 75 MHz)	159
E 23: Experimento de DEPT para vinorina (4) (CDCl_3/TMS ; 75 MHz)	160
E 24: Experimento COSY para vinorina (4).....	160
E 25: Experimento HETCOR para vinorina (4).....	161
E 26: Espectro de Massas (70 eV) para seredamina (5).....	161
E 27: Espectro de RMN ^1H de seredamina (5) ($\text{CDCl}_3/\text{D}_2\text{O}/\text{TMS}$; 500MHz).....	162
E 28: Espectro de RMN ^{13}C de seredamina (5) (CDCl_3/TMS ; 75 MHz)	162
E 29: Experimento de DEPT para seredamina (5) (CDCl_3/TMS ; 75 MHz)	163
E 30: Experimento COSY para seredamina (5)	163
E 31: Experimento HSQC para seredamina (5).....	164
E 32: Espectro de Massas (70 eV) para sal de seredamina (6).....	164
E 33: Espectro de RMN ^1H de sal de seredamina (6) ($\text{CDCl}_3/\text{D}_2\text{O}/\text{TMS}$; 300MHz).....	165
E 34: Espectro de RMN ^{13}C de sal de seredamina (6) (CDCl_3/TMS ; 75 MHz)	165
E 35: Experimento de DEPT para sal de seredamina (6) (CDCl_3/TMS ; 75 MHz)	166
E 36: Experimento COSY para sal de seredamina (6).....	166
E 37: Experimento HETCOR para sal de seredamina (6).....	167
E 38: Espectro de Massas (70 eV) para norseredamina (7)	167

E 39 Espectro de RMN ^1H de norseredamina (7) (CDCl_3/TMS ; 300MHz).....	168
E 40: Espectro de RMN ^{13}C de norseredamina (7) (CDCl_3/TMS ; 75 MHz).....	168
E 41: Experimento de DEPT para norseredamina (7) (CDCl_3/TMS ; 75 MHz).....	169
E 42: Experimento COSY para norseredamina (7)	169
E 43: Experimento HMBC para norseredamina (7).....	170
E 44: Espectro de Massas (70 eV) para 10-metoxi-sarpagan-17-ol (8).....	170
E 45: Espectro de RMN ^1H de 10-metoxi-sarpagan-17-ol (8) (CDCl_3/TMS ; 300MHz).....	171
E 46: Espectro de RMN ^{13}C de 10-metoxi-sarpagan-17-ol (8) (CDCl_3/TMS ; 75 MHz).....	171
E 47: Experimento de DEPT para 10-metoxi-sarpagan-17-ol (8) (CDCl_3/TMS ; 75 MHz).....	172
E 48: Experimento COSY para 10-metoxi-sarpagan-17-ol (8)	172
E 49: Experimento HSQC para 10-metoxi-sarpagan-17-ol (8)	173
E 50: Espectro de Massas Alta Resolução (70 eV) para 12-demetoxi-purpelina (9)	173
E 51 Espectro de RMN ^1H de 12-demetoxi-purpelina (9) (CDCl_3/TMS ; 500 MHz)	174
E 52: Espectro de RMN ^{13}C de 12-demetoxi-purpelina (9) (CDCl_3/TMS ; 125 MHz)	174
E 53: Experimento de DEPT para 12-demetoxi-purpelina (9) (CDCl_3/TMS ; 125 MHz)	175
E 54: Experimento COSY para 12-demetoxi-purpelina (9).....	175
E 55: Experimento HSQC para 12-demetoxi-purpelina (9).....	176
E 56 Espectro de RMN ^1H de purpelina (10) (CDCl_3/TMS ; 300MHz).....	177
E 57: Espectro de RMN ^{13}C de purpelina (10) (CDCl_3/TMS ; 75 MHz).....	177
E 58: Experimento de DEPT para purpelina (10) (CDCl_3/TMS ; 75 MHz).....	178
E 59: Experimento COSY para purpelina (10)	178
E 60: Experimento HMBC para purpelina (10).....	179
E 61: Espectro de Massas (70 eV) para norpurpelina (11)	179
E 62 Espectro de RMN ^1H de norpurpelina (11) (CDCl_3/TMS ; 300MHz)	180
E 63: Espectro de RMN ^{13}C de norpurpelina (11) (CDCl_3/TMS ; 75 MHz)	180
E 64: Experimento de DEPT para norpurpelina (11) (CDCl_3/TMS ; 75 MHz)	181
E 65: Experimento COSY para norpurpelina (11).....	181
E 66: Experimento HSQC para norpurpelina (11).....	182
E 67: Espectro de I. V. para norpurpelina (11).....	182
E 68: Espectro de Massas Alta Resolução (70eV) para 12-metoxi-N-metil-velosimina (12)	183
E 69: Espectro de I. V. para 12-metoxi- N-metil-velosimina (12) (Filme de CH_2Cl_2).....	183
E 70 Espectro de RMN ^1H de 12-metoxi-N-metil-velosimina (12) (CDCl_3/TMS ; 300MHz)	184
E 71: Espectro de RMN ^{13}C de 12-metoxi-N-metil-velosimina (12) (CDCl_3/TMS ; 125 MHz)	184
E 72: Experimento de DEPT para 12-metoxi-N-metil-velosimina (12) (CDCl_3/TMS ; 125 MHz)	185
E 73: Espectro COSY para 12-metoxi-N-metil-velosimina (12)	185
E 74: Experimento HSQC para 12-metoxi-N-metil-velosimina (12)	186
E 75: Espectro de Massas Alta Resolução (70 eV) para 12-metoxi-afinisina (13)	186
E 76 Espectro de RMN ^1H de 12-metoxi-afinisina (13) (CDCl_3/TMS ; 500 MHz).....	187
E 77: Espectro de RMN ^{13}C de 12-metoxi-afinisina (13) (CDCl_3/TMS ; 125 MHz).....	187
E 78: Experimento de DEPT para 12-metoxi-afinisina (13) (CDCl_3/TMS ; 125 MHz).....	188
E 79: Experimento COSY para 12-metoxi-afinisina (13).....	188

E 80: Experimento HMBC para 12-metoxi-afinisina (13)	189
E 81: Espectro de Massas Alta Resolução (70 eV) para 12-metoxi-velosimina (14)	189
E 82 Espectro de RMN ¹ H de 12-metoxi-velosimina (14) (CDCl ₃ /TMS; 300 MHz)	190
E 83: Espectro de RMN ¹³ C de 12-metoxi-velosimina (14) (CDCl ₃ /TMS; 75 MHz)	190
E 84: Experimento de DEPT para 12-metoxi-velosimina (14) (CDCl ₃ /TMS; 75 MHz)	191
E 85: Experimento COSY para 12-metoxi-velosimina (14)	191
E 86: Experimento HSQC para 12-metoxi-velosimina (14)	192
E 87: Espectro de Massas (70 eV) para 18-hidroxi-yohimbina (15)	192
E 88 Espectro de RMN ¹ H de 18-hidroxi-yohimbina (15) (CDCl ₃ /TMS; 300 MHz)	193
E 89: Espectro de RMN ¹³ C de 18-hidroxi-yohimbina (15) (CDCl ₃ /TMS; 75 MHz)	193
E 90: Experimento de DEPT para 18-hidroxi-yohimbina (15) (CDCl ₃ /TMS; 75 MHz)	194
E 91: Experimento COSY para 18-hidroxi-yohimbina (15)	194
E 92: Experimento HETCOR para 18-hidroxi-yohimbina (15)	195
E 93: Espectro de Massas (70 eV) para 3-α-epi-yohimbina (16)	195
E 94 Espectro de RMN ¹ H de 3-α-epi-yohimbina (16) (CDCl ₃ /TMS; 500MHz)	196
E 95: Espectro de RMN ¹³ C de 3-α-epi-yohimbina (16) (CDCl ₃ /TMS; 125 MHz)	196
E 96: Experimento de DEPT para 3-α-epi-yohimbina (16) (CDCl ₃ /TMS; 125 MHz)	197
E 97: Experimento COSY para 3-α-epi-yohimbina (16)	197
E 98: Experimento HSQC para 3-α-epi-yohimbina (16)	198
E 99: Espectro de Massas (70 eV) para reserpina (17)	198
E 100 Espectro de RMN ¹ H de reserpina (17) (CDCl ₃ /TMS; 500MHz)	199
E 101: Espectro de RMN ¹³ C de reserpina (17) (CDCl ₃ /TMS; 125 MHz)	199
E 102: Experimento de DEPT para reserpina (17) (CDCl ₃ /TMS; 125 MHz)	200
E 103 Espectro de RMN ¹ H de reserpilina (18) (CDCl ₃ /TMS; 300MHz)	200
E 104: Espectro de RMN ¹³ C de reserpilina (18) (CDCl ₃ /TMS; 75 MHz)	201
E 105: Experimento de DEPT para reserpilina (18) (CDCl ₃ /TMS; 75 MHz)	201

Lista de abreviaturas, símbolos e acrônimos, citados neste trabalho:

ATFA: Ácido trifluoracético

CCD: Cromatografia de Camada Delgada

CCP ou CCE: Cromatografia de Camada Preparativa ou Cromatografia de Camada Espessa

CIT (CG/EM): Cromatograma de Íons Totais (Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas)

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

COSY: (**C**orrelated **S**pectroscopy) Experimento 2D de RMN homonuclear que mostra correlações entre sinais de ^1H e ^1H

DEPT: (**D**istortionless **e**nhancement by **p**olarization **t**ransfer) Experimento de RMN ^{13}C que permite, junto com o espectro de RMN de ^{13}C , a diferenciação entre carbonos primários, secundários, terciários e quaternários

E.M.: Espectrometria de Massas

EMAR: Espectrometria de Massas de Alta Resolução

FAEP : Fundo de Apoio ao Ensino e à Pesquisa

HETCOR: (**h**eteronuclear shift **c**orrelation) Experimento 2D de RMN heteronuclear que mostra correlações entre ^1H e ^{13}C

HMBC: (**h**eteronuclear shift correlations via **m**ultiple **b**ond **c**onnectivities) Experimento 2D de RMN heteronuclear que mostra correlações entre ^1H e ^{13}C . (detecção inversa ou reversa)

HMQC: (**h**eteronuclear **m**ultiple **q**uantum **c**oherence). Experimento 2D de RMN heteronuclear que mostra correlações entre ^1H e ^{13}C . (detecção inversa ou reversa)

J: constante de acoplamento

LC₅₀: Lethal Concentration, (Concentração letal para 50% dos indivíduos testados)

LKRB: Lucilia Kato Rauvolfia bahiensis; (usado para identificar os extratos originários de *R. bahiensis*);

LKRGC: Lucilia Kato Rauvolfia Grandiflora cascas; (usado para identificar os extratos originários das cascas de galhos de *R. grandiflora*)

LKRGF: Lucilia Kato Rauvolfia Grandiflora folhas; (usado para identificar os extratos originários das folhas de *R. grandiflora*)

LKRM: Lucilia Kato Rauvolfia Mattfeldiana; (usado para identificar os extratos originários de *R. bahiensis*)

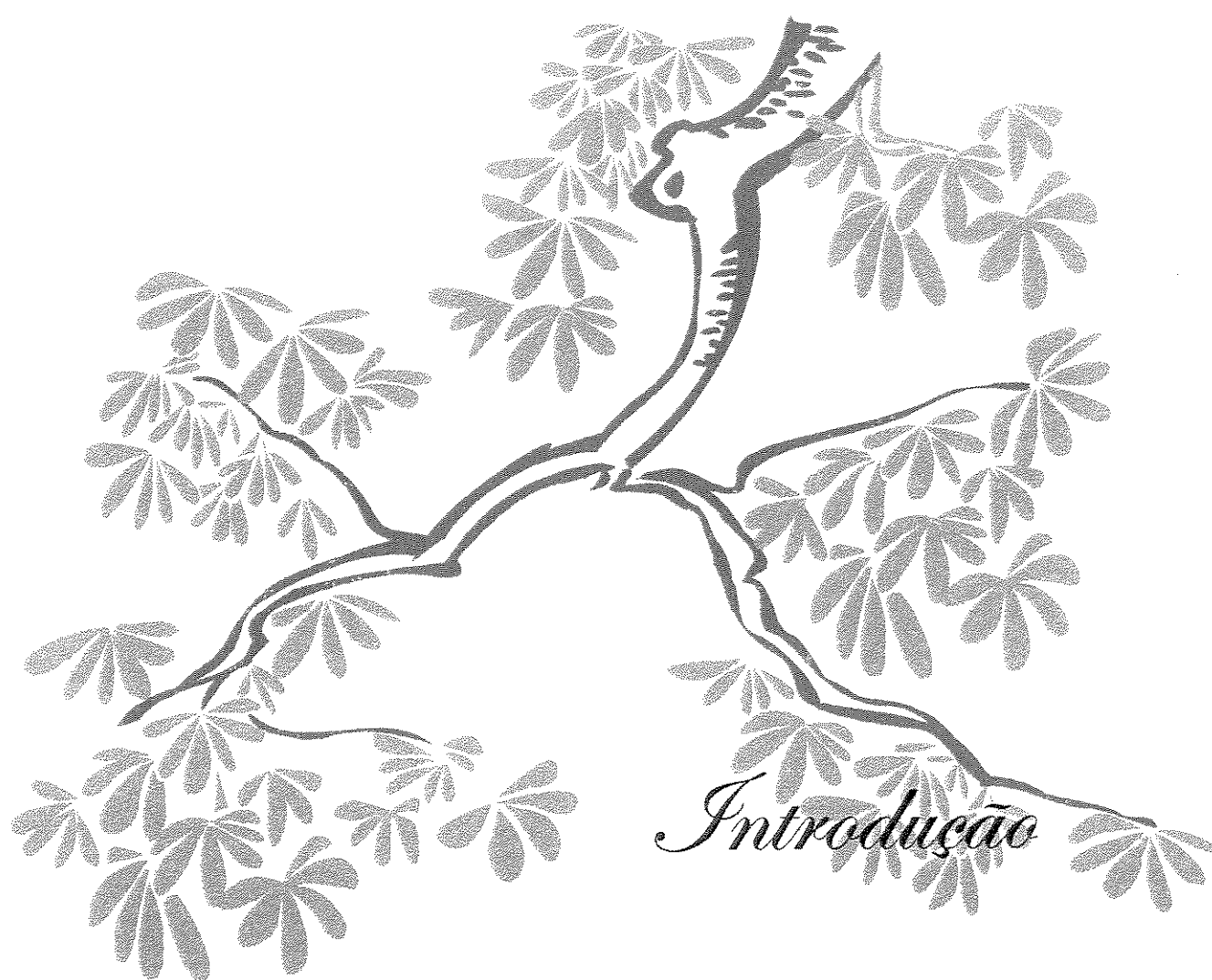
LKRW: Lucilia Kato Rauvolfia Weddelliana; (usado para identificar os extratos originários de *R. weddelliana*)

m/z : relação massa/carga

M⁺: íon molecular

NIST: National Institut of Standards and Technology (Programa da Biblioteca de Espectros de Massa)

t.r. : tempo de retenção (em minutos)



1. INTRODUÇÃO

1.1 Alcalóides

Alcalóides são compostos extremamente difíceis de se definir pois não representam um grupo homogêneo, do ponto de vista químico, bioquímico ou fisiológico¹. O termo alcalóide é lingüisticamente derivado da palavra árabe '*al-qali*', denominação vulgar da planta, de cujas cinzas, a soda (que tem propriedades alcalinas) era originariamente obtida. Este termo, define compostos nitrogenados farmacologicamente ativos, que são encontrados predominantemente em Angiospermas (plantas com flores). Desde a identificação do primeiro alcalóide, a morfina (Figura 1) de *Papaver somniferum*, por Seturner em 1806, cerca de 10.000 alcalóides já foram isolados e tiveram suas estruturas elucidadas².

Encontrar uma definição para essa classe de substâncias é difícil devido à ausência de separação precisa entre alcalóides propriamente ditos e aminas complexas de ocorrência natural. Segundo Pelletier³: "Um alcalóide seria uma substância orgânica cíclica contendo um nitrogênio em estado de oxidação negativo e cuja distribuição é limitada dentro dos organismos vivos". Essa definição englobaria todos os compostos considerados como alcalóides até o momento mas excluiria compostos nitrogenados tais como: aminas simples, aminoácidos, peptídeos, proteínas, ácidos nucleicos, nucleotídeos, porfirinas, vitaminas e compostos nitro e nitrosos.

Dentro dessa definição podemos encontrar os chamados **alcalóides verdadeiros**, que possuem um átomo de nitrogênio em um anel heterocíclico e são classificados de acordo com o sistema anelar presente na molécula. Os compostos com átomo de nitrogênio não pertencente ao sistema heterocíclico são os **protoalcalóides** e os compostos nitrogenados com e sem anéis heterocíclicos que não são derivados de aminoácidos são chamados de **pseudoalcalóides**.

Os alcalóides constituem uma grande classe de metabólitos secundários com grande diversidade estrutural, representando cerca de 20% das substâncias naturais descritas. Na Figura 1, temos alguns alcalóides e as plantas das quais são extraídas. Historicamente, o uso de extratos de plantas contendo alcalóides em poções, remédios e venenos encontra-se registrado desde o início da civilização. Exemplos famosos incluem a morte de Sócrates, em 399 a. C., por

¹ TYLER V. E., BRADY L. R., ROBBERS, J. E.; Pharmacognosy, 9 ed, Philadelphia, Lee & Febiger. 1988

² KUTCHAN, T. M. Alkaloid Biosynthesis – The basis for metabolic engineering of medicinal plants. *The Plant Cell*, v.7, p.1059-1070. 1995

³ PELLETIER, S.W. The Nature and Definition of an alkaloid In: Alkaloid, Chem. Biol. Perspectives, 1983, v1, p1-31

consumo de uma bebida contendo coníina (*Conium maculatum*); e o uso, por Cleópatra, de extratos contendo atropina (*Hyoscyamus muticus*) para dilatar suas pupilas e estas parecerem mais brilhantes⁴.

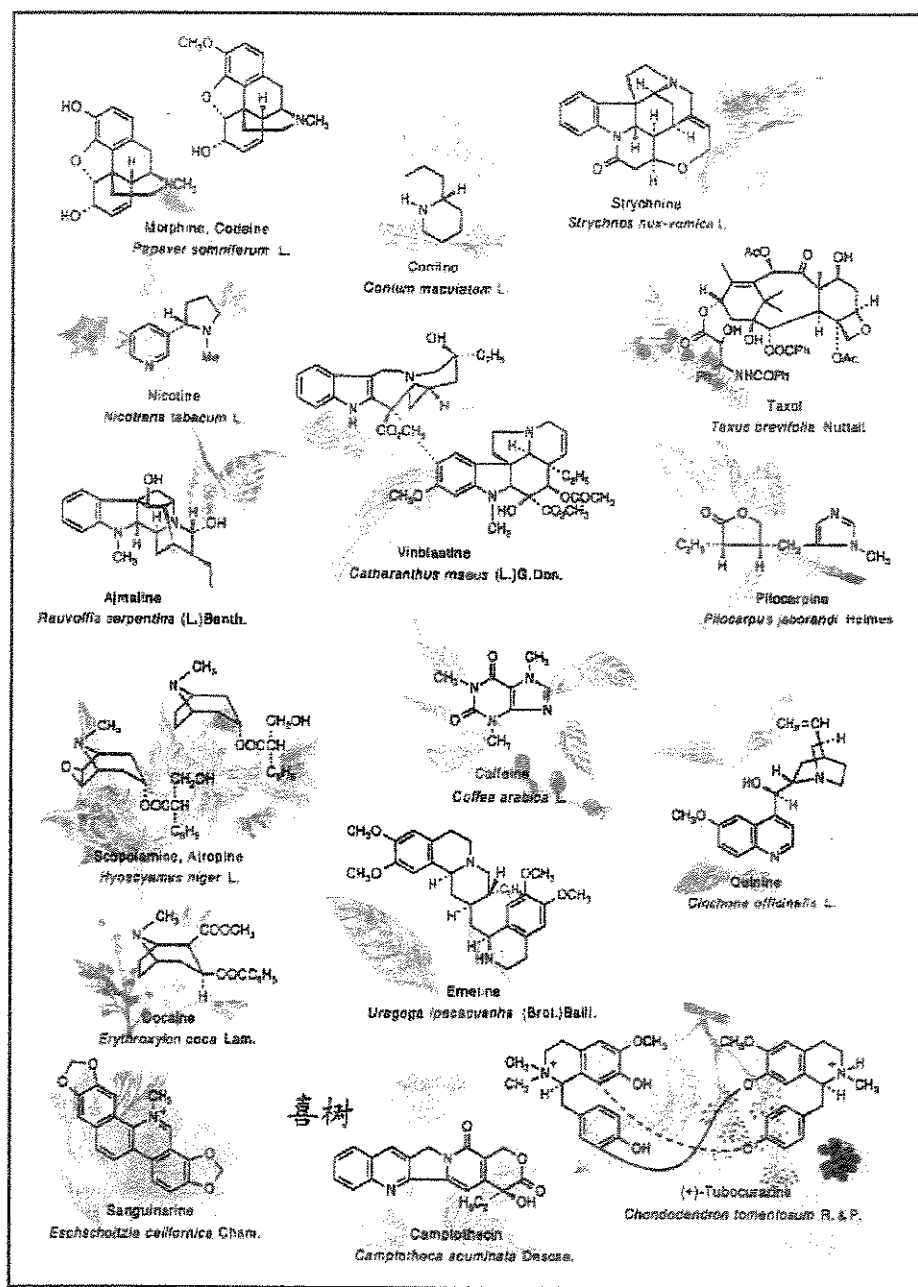


Figura 1: Exemplos de alcalóides bioativos e as plantas que os contêm⁴.

Os alcalóides são encontrados em várias famílias de plantas. Sua distribuição por grupos estruturais é diversificada podendo, em alguns casos, caracterizar um único gênero, como por

⁴ KUTCHAN, T. M. Alkaloid Biosynthesis – The basis for metabolic engineering of medicinal plants. *The Plant Cell*, v.7, p.1059-1070, 1995.

exemplo os alcalóides de *Aconitum spp.* A ocorrência de alcalóides indólicos monoterpênicos em Apocynaceae, Rubiaceae e Loganiaceae, pode ser utilizada como critério para caracterizar a proximidade dessas famílias na Ordem Asteridae.⁵

A família Apocynaceae está largamente distribuída entre os trópicos e possui cerca de 180 gêneros e 1500 espécies.⁶ Alcalóides indólicos podem ser encontrados nos gêneros *Ervatania*, *Alstonia*, *Aspidosperma*, *Geissopermum*, *Hunteria*, *Kopsia*, *Picralina*, *Vinca*, *Rhazya* e *Rauwolfia*.⁷

1.2 Alcalóides indólicos monoterpênicos:

Os alcalóides indólicos monoterpênicos compreendem uma larga família de alcalóides, com mais de 1800 membros de uma rica diversidade estrutural. Muitos destes são fisiologicamente ativos. Como exemplo, temos: a quinina isolada de *Cinchona officinalis*, que é antimalarial; a campotecina usada como droga antineoplásica isolada de *Camphoteca acuminata*, o veneno para ratos, estricnina isolada de *Strychnos nux vômica* e os quimioterápicos e antineoplásicos vimblastina e vincristina isoladas de *Catharantus roseus* (Figura 1).

De um modo geral, os alcalóides são formados a partir de aminoácidos (alcalóides verdadeiros e protoalcalóides). Os alcalóides indólicos monoterpênicos são derivados da triptamina e do monoterpreno (iridóide) secologanina (Figura 2).

⁵ HENRIQUES, A. T.; KERBER, V. A.; MORENO, P. R.; Alcalóides: Generalidades e Aspectos básicos, In: SIMÕES, C., M., O., et. al.; *Farmacognosia, da planta ao medicamento*, 1 ed., Florianópolis, Ed. da UFSC; Porto Alegre; Ed. da Universidade/UFRGS, 1999.

⁶ HEYWOOD, V. H.; *Flowering plants of the world*, 1 ed, Oxford Univ. Press., 1993, 224.

⁷ SIDDIQUI, S.; HAIDER, S. I.; AHMAD S. SALMAN; SULTANA N. The alkaloids of Rauwolfia. *Pakistan J. Sci. Ind. Res.*, v.30 ,n1,p 71-80, 1987

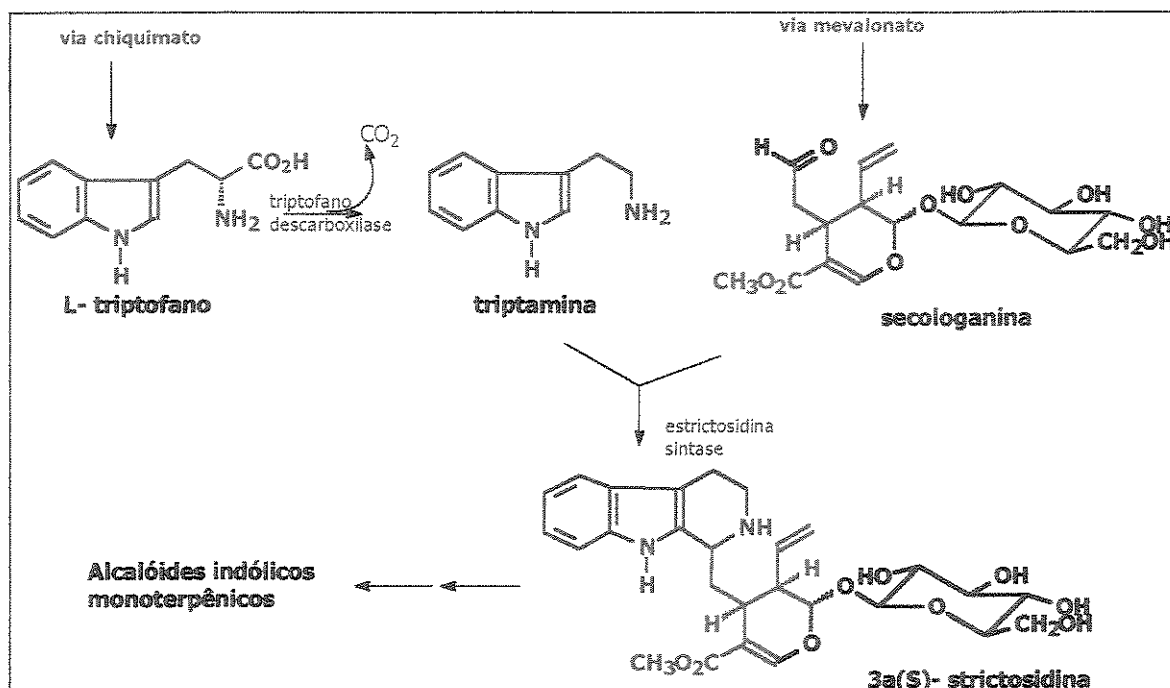


Figura 2: Proposta biossintética para formação de alcalóides monoterpênicos

O sistema indólico é derivado do aminoácido L-triptofano, que é descarboxilado pela enzima triptofano-decarboxilase formando a triptamina. A triptamina, bem como seus produtos de metilação e hidroxilação, são amplamente distribuídos no Reino Vegetal. A condensação da triptamina com a secologanina, por sua vez, é catalisada pela enzima strictosidina sintase formando a strictosidina, que é um alcalóide glicosilado. A transformação desse intermediário, através de reações ainda não bem caracterizadas, leva à formação de diversas classes de alcalóides indólicos monoterpênicos (Figura 2).

De acordo com Schrippe e colaboradores⁸, em 1965, Le Men e Taylor propuseram um sistema de numeração para esses compostos baseados na sua biogênese, sendo que essa numeração ainda é aceita hoje em dia e baseia-se no esqueleto da yohimbina (Figura 3).

⁸ SCHRIPEMA, J.; DAGNINO, D.; GOSMANN, G. Alcalóides indólicos. In: SIMÕES, C., M., O., et. al.; *Farmacognosia, da planta ao medicamento*, 1 ed., Florianópolis, Ed. da UFSC; Porto Alegre; Ed. da Universidade/UFRGS, 1999, p 679-706.

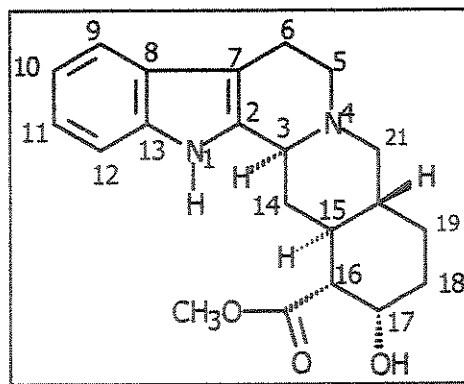


Figura 3: Yohimbina como sistema de numeração aceito baseado na biogênese e proposto por Le Men e Taylor, de acordo Schrippema⁸.

Em 1980, os alcalóides indólicos monoterpênicos foram divididos em 8 classes. De acordo com Simões e colaboradores, Van Beck⁹ em 1984, ampliou essa classificação, adicionando mais três. Foram criadas: uma classe para os alcalóides indólicos monoterpênicos diméricos e uma classe para todos os demais alcalóides indólicos monoterpênicos. As onze classes podem ser subdivididas de acordo com variações menores no esqueleto básico. A porção triptamina pode ser facilmente reconhecida e o fragmento remanescente pode ser classificado como: (Figura 4)

- 1) Corinanteano ou corinano **C** (exemplo: ajmalicina)
- 2) Eburnano **E** (exemplo: vincamina);
- 3) Ibogano **I**; (exemplo: ibogaína);
- 4) Vincosano **D** (exemplo: strictosidina);
- 5) Valesiachotamano **V** (exemplo: valesiachotamina);
- 6) Aspidospermatano **A** (exemplo: stemadenina);
- 7) Estricnano **S** (exemplo: akuamicina);
- 8) Plumerano **P** (exemplo: tabersonina);
- 9) Tacamano **T** (exemplo: tacamina);
- 10) bis-indol;
- 11) diversos;

⁹ In: SIMÕES, C., M., O., et. al.; *Farmacognosia, da planta ao medicamento*, 1 ed., Florianópolis, Ed. da UFSC; Porto Alegre; Ed. da Universidade/UFRGS, 1999, p. 681

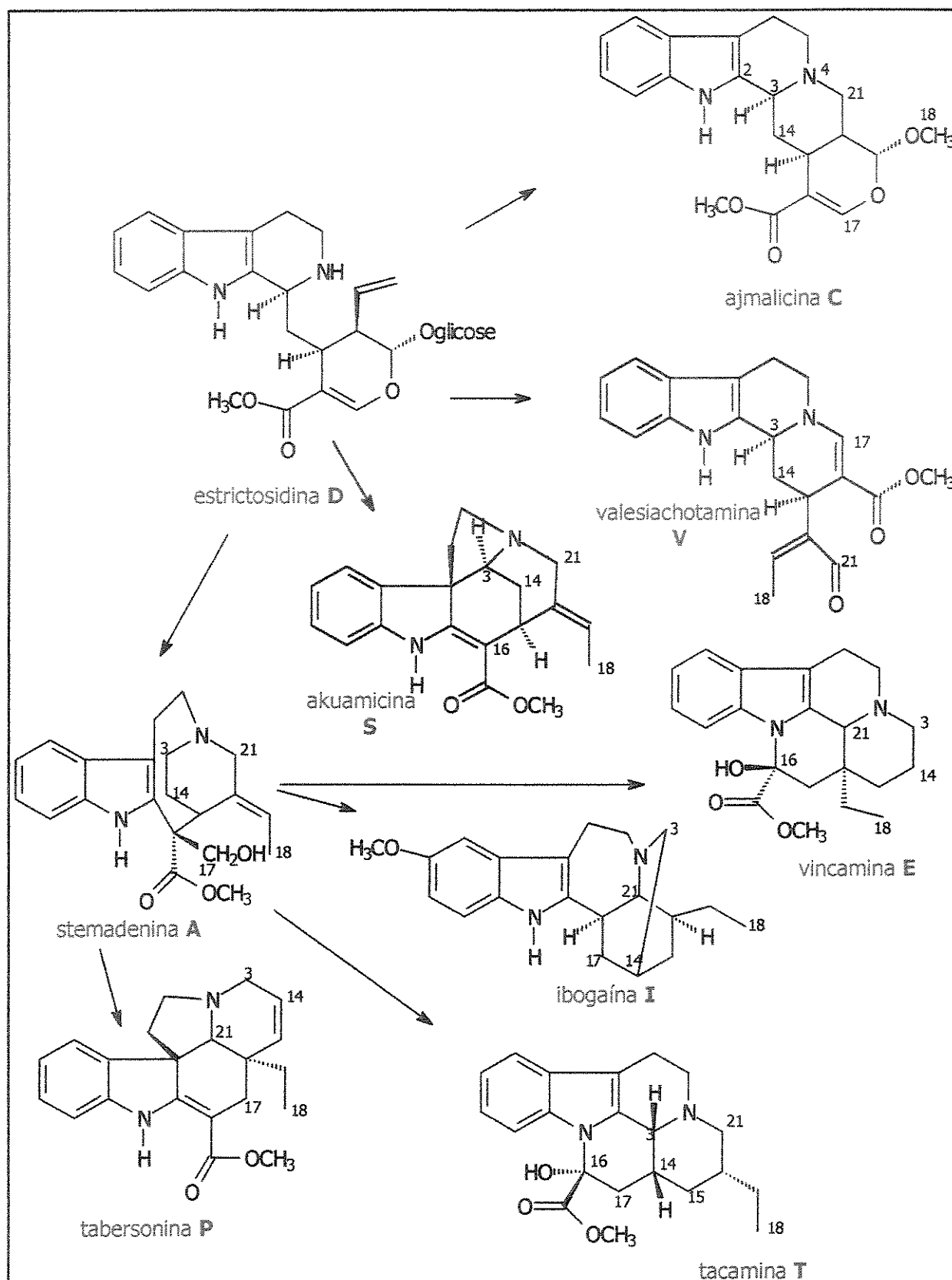


Figura 4: Alguns exemplos dos esqueletos mais comuns de alcalóides indólicos monoterpênicos

1.3 Alcalóides de *Rauwolfia*:

Plantas do gênero *Rauwolfia* são usadas há tempos como fonte de importantes agentes terapêuticos, principalmente como sedativos e anti-hipertensivos.

Na Índia, desde o século passado, as raízes de *Rauwolfia serpentina* e *R. vomitoria* são ricas fontes de reserpina (I) e ajmalina (II) (Figura 5). Para propósitos industriais, a ajmalina (II) é extraída das raízes de *R. serpentina*, um arbusto encontrado na Índia, Sri Lanka e Indonésia. Contudo, um aumento da demanda pela droga Rauwolfia[#] levou o governo da Índia a limitar a exportação de raízes de *R. serpentina*.

Rauwolfia (grafada com w) é a raiz seca da planta *Rauwolfia serpentina*, que contém cerca de 0,15% de reserpina dentre os alcalóides reserpina-rescinamina. Desde que a reserpina (I) foi isolada, em 1952, muitos trabalhos são publicados descrevendo o isolamento, a química e os aspectos farmacológicos e clínicos da reserpina e de outros alcalóides de *Rauwolfia*. A reserpina (I) está incluída na "WHO List Model of Essential Drugs"¹⁰ (OMS) como um agente hipotensivo e tranquilizante¹¹ encontrada nas raízes de várias espécies de *Rauwolfia*¹². A ajmalina (II) é de considerável interesse farmacêutico devido à sua aplicação no tratamento de doenças cardíacas, especialmente para a regulação de arritmia¹³. Este alcalóide foi isolado de 22 espécies de *Rauwolfia* e é encontrado em maior quantidade, nas espécies de *Rauwolfia vomitoria* Afzel., *R. tetraphylla* L., e *R. serpentina* (L) Benth. ex Kurz.

Outra espécie indiana, a *Rauwolfia nitida*, também encontrada nas Bahamas, Cuba, Jamaica, Dominica, Porto Rico e outras ilhas do Caribe, têm suas raízes utilizadas pela medicina indígena como emética e catártica. Seu estudo fitoquímico mostrou a presença de 33 alcalóides

* De acordo com o Código Internacional de Botânica, a ortografia deve ser a escolhida por C. Linné que latinizou Rauwolf, chamando o gênero de Rauwolfia (trocando o w por v) – In: Abau J.; Philogene, E., Burgeois P., Mèrault G., *J. Nat. Prod.*, v.49, p.5, 829-832. 1986

Rauwolfia, com w, é designado para a droga feita com as raízes de *R. serpentina*.

¹⁰ World Health Organization (1990) The use of essential drugs, Report of WHO Expert Committee, Technical Report Series 685, WHO, Geneva.

¹¹ DEWICK, P. M., Medicinal Natural Products, A biosynthetic approach, 1 ed., N. York, John Willens & Sons, 1997 p 327

¹² Chapman & Hall EPB, Dicionário de Produtos Naturais, Copyright©1999. CD-ROM

¹³ ARENS H.; DEUSNEUMANN B.; ZENK M. H.; Radioimunoassay for the quantitative determination of ajmaline. *Planta Med.*, n.2, p.179, 1987

indólicos dentre eles a reserpina (I), rescinamina (III), reserpilina (IV), deserpidina (V) e perakisina (VI)¹⁴ (Figura 5).

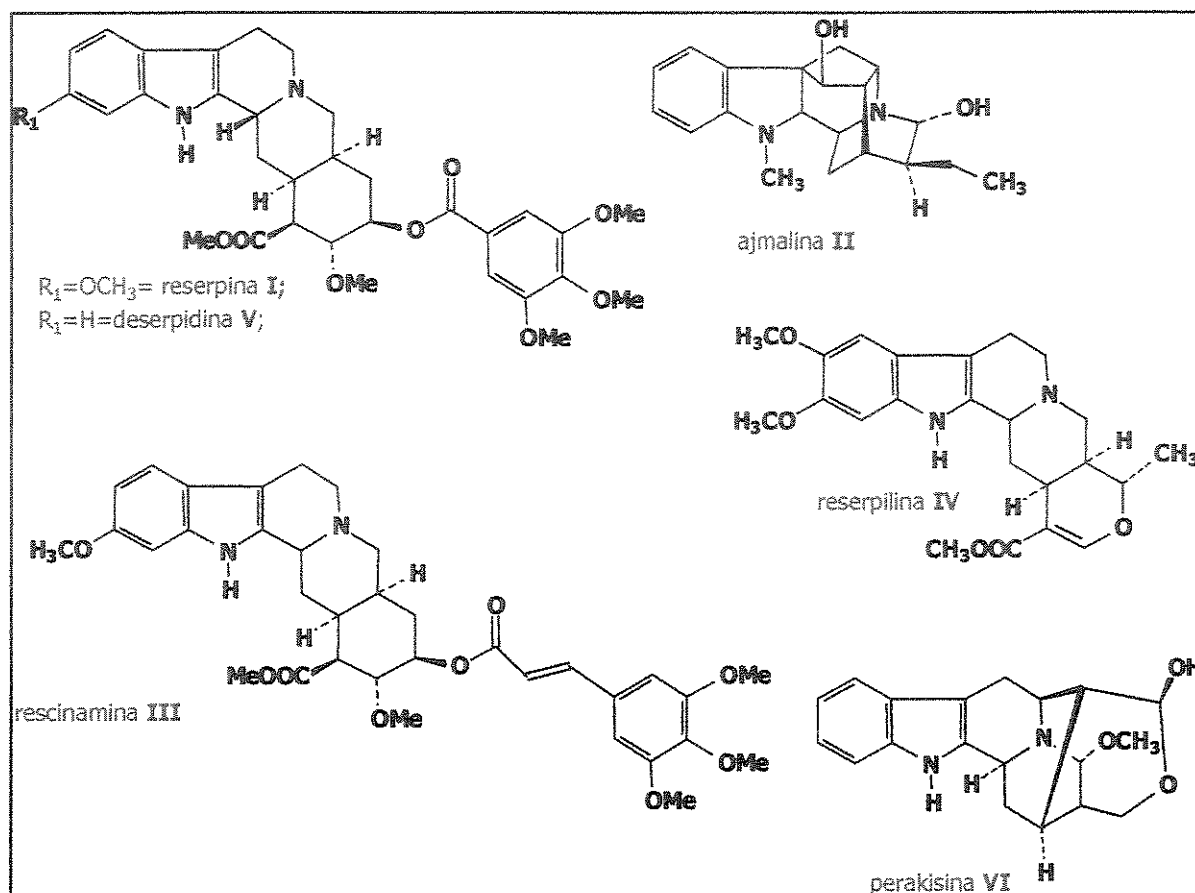


Figura 5: Exemplos de alcalóides isolados de *Rauwolfia*.

As folhas da espécie africana, a *Rauwolfia caffra* Sond. (conhecida também como *R. natalensis* Sond.; *R. inebrians* K. Schum.; *R. obliquenervis* Stapf; *R. ochrosioides* K. Schum. e *R. oxyphylla* Stapf.) são usadas na medicina indígena para o tratamento de gonorréia, doenças de pele e como emético, além de veneno para animais de pequeno porte. O estudo fitoquímico desta espécie, descrito por Nasser e Court¹⁵ mostra o isolamento e identificação de 18 alcalóides indólicos.

¹⁴ AMER M. A.; COURT W. E.; Alkaloids of *Rauwolfia nitida* root bark. *Phytochemistry*, v.20, n.11, p.2569-2573. 1981

¹⁵ NASSER A. M. A. G.; COURT W. E. Leaf alkaloids of *Rauwolfia caffra*. *Phytochemistry*, v.22, n.10, p.2297-2300. 1983

Cerca de 70 espécies de *Rauwolfia* já foram estudadas quimicamente, sendo que destas, poucas espécies são brasileiras. Uma revisão publicada em 1987, por Siddiqui e colaboradores¹⁶ lista o isolamento de 204 alcalóides de várias espécies de *Rauwolfia*.

A partir de 1987, outros novos alcalóides foram isolados de *Rauwolfia*; como exemplo temos os descritos na Figura 6: amerovolfinina **VII** e amerovolfinina **VIII** foram isolados de *Rauwolfia cubana*¹⁷; indobina **IX**¹⁸, ajmalinina **X**¹⁹, ajmalimina **XI**²⁰, rescinamidina **XII**²¹, indobinina **XIII**²², yohambinina **XIV**²³, rescinaminol **XV**²⁴ e ajmalicidina **XVI**²⁵ isolados de *R. serpentina*, metil-12- hidroakuamilan-17-oato **XVII**²⁶ e rausutrina **XX**²⁷ de *R. sumatrama*, macropegastrina **XVIII** foi isolado de *R. verticillata*²⁸ e rauviridina **XIX** de *R. viridis* Roem. et Schult²⁹ (Figura 6 e Figura 7).

¹⁶ SIDDQUI S, HAIDER S.I. The alkaloids of *Rauwolfia*. *Pakistan J. Sci. Ind. Res.*, v.30, n.1, p.71-80. 1987

¹⁷ MARTINEZ, J. A.; GOMEZ, C., SANTANA, T.; VELEZ, H. Alkaloids from *Rauwolfia cubana* stem bark . *Planta Med.*, v. 55, n.3, p.283-285. 1989

¹⁸ SIDDQUI S, HAIDER S.;IMTIAZ, S.; AHMAD, S. S. Indobine – a new alkaloid from *Rauwolfia serpentina* Benth. *Z. Naturforsch., B: Chem. Sci.*, p.783-784. 1987

¹⁹SIDDQUI S.; HAIDER S.;IMTIAZ, S.; AHMAD, S. S. Ajmalinine – a new alkaloid from *Rauwolfia serpentina* Benth *Heterocycles*, v.26, n.2, p.463-467. 1987.

²⁰ SIDDQUI S., AHMAD, S. S.; HAIDER S I. A new alkaloid ajmalimine from roots of *Rauwolfia serpentina*. *Planta Med.*, v.53, n.3, p.288-289. 1987

²¹ SIDDQUI S.;HAIDER S. I.; AHMAD, S. S. A new alkaloid from the roots of *Rauwolfia serpentina* . *J. Nat. Prod.*, v.50, p. 238-240. 1987

²² SIDDQUI S.; AHMAD, S. S.; HAIDER S. I. Isolation of indobinine, a new alkaloid from roots of *Rauwolfia serpentina* Benth. *Indian J. Chem.*, Sect B, v.26B, n.3, p.279-280. 1987

²³ SIDDQUI S; AHMAD, S. S.; HAIDER S.I. Isolation of a new alkaloid, yohambinine, from *Rauwolfia serpentina* Benth *Tetrahedron Lett.*, v.28, n.12, p.1311-12. 1987

²⁴ SIDDQUI S.; AHMAD, S. S.; HAIDER S. I. Rescinnaminol – a new alkaloid from *Rauwolfia serpentina* Benth. *Pak. J. Sci. Res.*, v. 29, n.6, p.401-403. 1986

²⁵ SIDDQUI S., AHMAD, S. S.;HAIDER S I.; Siddiqui, B. Ajmalicidine, an alkaloid from *Rauwolfia serpentina*. *Phytochemistry*, v.26, p.3, p.875-877, 1987.

²⁶ DAYAR, A.; ADNAN, A. Z.; BIRKBECK, A.,A.; BYRNE L., T.,HARAHAP, A. K.; SARGENT, M.V.; Methyl 12-hydroxyakuammilan-17-oate: a new indolenine alkaloid from *Rauwolfia sumatrana*. *Aust. J. Chem.*, v.44, n.7. 1991

²⁷ SUBHADHIRASAKUL, S; TAKAYAMA, H.; AIMI, N.; PONGLUX, D.; SAKAI, S. Novel Indole alkaloids from leaves of *Rauwolfia sumatrama* in Thailand *Chem. Pharm. Bull.*, v.42, n.7, p.1427-1431. 1994

²⁸ LIN M.; YANG B.; YU D.; LIN X.; ZHANG Y.; A quaternary alkaloid from *Rauwolfia verticillata* (Lour.) Baill var. *Haiananensis* Tsiang. Structure of macropegastrine *Yaoxue Xuebao*, v. 22, n.11, p.833-836. 1987

²⁹ PEREZ J. A. M.; ECKACKA A. A. O.; AMARE A. M.; VEITIA, M. M. Alkaloids of *Rauwolfia*. VII. Alkaloids of the stem bark of *Rauwolfia viridis* Roem. et Schult *Rev. Cubana Farm.*, v. 23 , n.1-2, p.117-127. 1989

Das raízes de *R. vomitoria* Afzel³⁰ foram isolados a 3-epi-rescinamina **XXI** e éster metílico do ácido 3,4 dimetoxibenzoil resérpico **XXII**. (Figura 7)

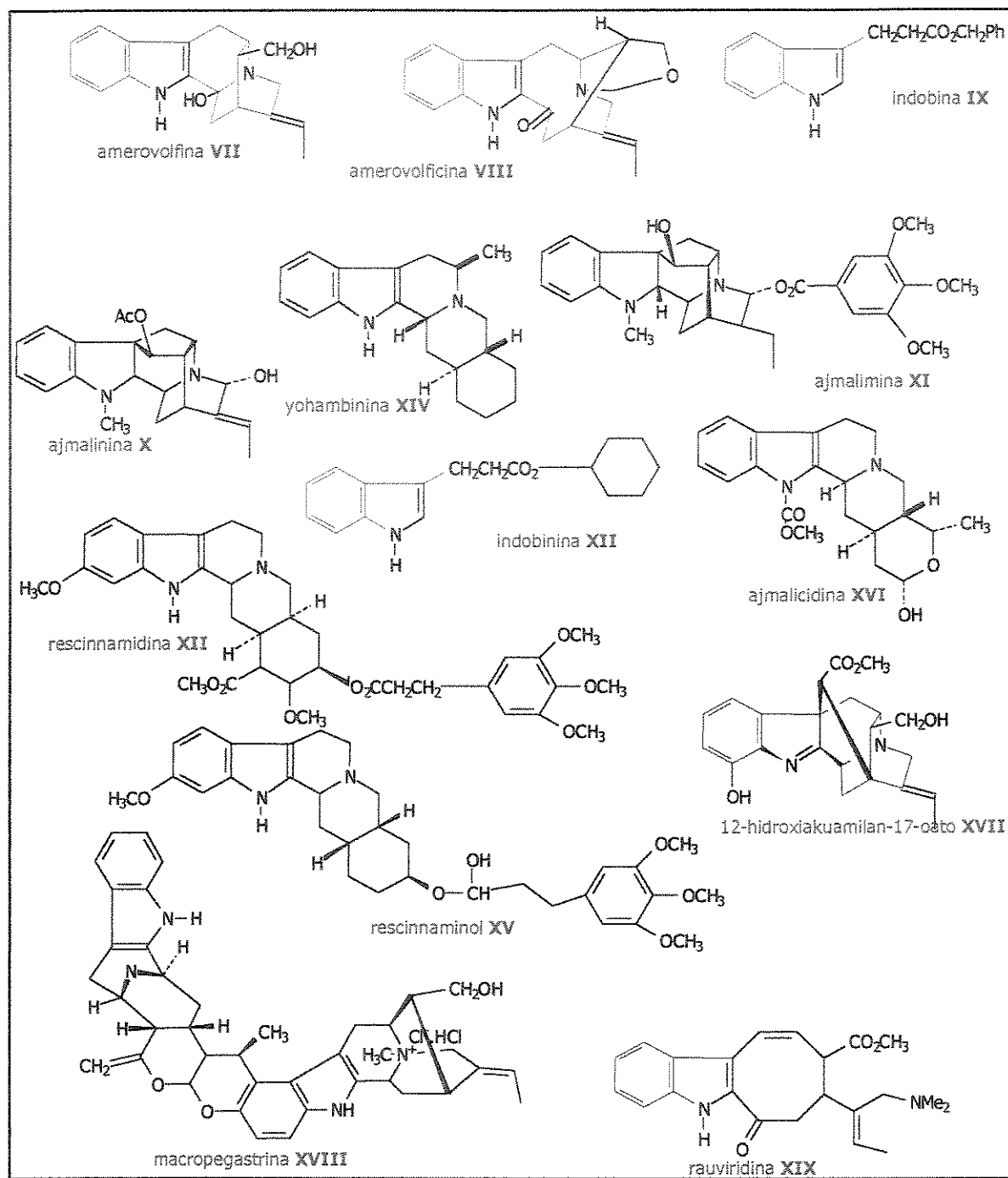


Figura 6: Novos alcalóides isolados de *Rauvolfia* (a partir de 1987).

³⁰ LOVATI, M.; PETERLONGO, F.; RUFFILI, T.; ZINI, G. F. Two new indole alkaloid from *Rauvolfia vomitoria* *Fitoterapia*, p.5. 1996

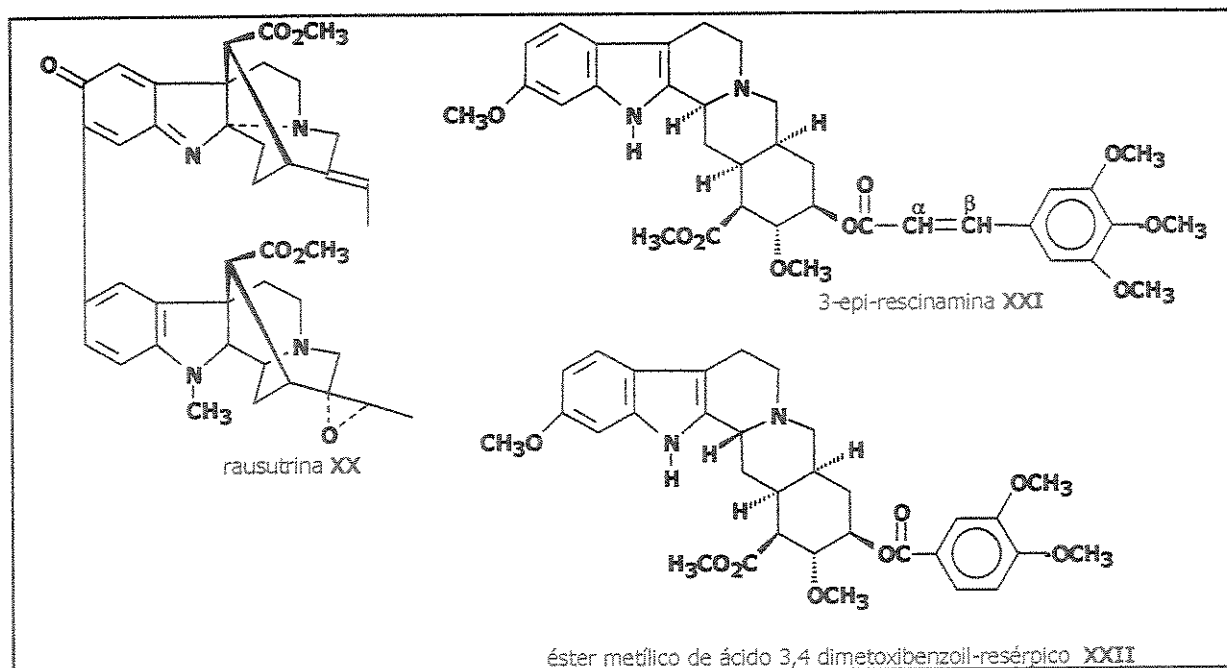


Figura 7: Novos alcalóides isolados de *Rauvolfia* (a partir de 1987) cont.

1.3.1 Alcalóides de espécies brasileiras de *Rauvolfia*.

No Brasil, segundo trabalho descrito por Rao³¹, existe dezessete espécies de *Rauvolfia*, das quais treze não foram quimicamente estudadas para o isolamento de alcalóides.

A *Rauvolfia ligustrina* Roem & Schutt, planta conhecida no nordeste do Brasil como "mata-pasto", é altamente tóxica aos animais da região. O estudo fitoquímico desta espécie, realizado por Oliveira³², indicou a presença de alcalóides indólicos e seu estudo de bioatividade³³ indicou atividade depressora do sistema nervoso central.

Batista e colaboradores³⁴, em 1996, realizaram o estudo fitoquímico de *Rauvolfia selowii* Müll. -Arg., uma espécie coletada no sul do Brasil, em que identificaram e isolaram das folhas,

³¹ RAO, A. S.; A Revision of *Rauvolfia* with particular reference to the American Species *Ann. Mo. Bot. Gard.*, v.43, n.3, p.253-355. 1956

³² OLIVEIRA, F.A; SOUZA M. F.V.; ALMEIDA, R. N. In: XIV Simpósio de Plantas Medicinais, 1996, Florianópolis, Livro de Resumos do XIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Q-103.

³³ OLIVEIRA, F.A; SOUZA M. F.V.; ALMEIDA, R. N. In: XIV Simpósio de Plantas Medicinais, 1996, Florianópolis, Livro de Resumos do XIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, M-025.

³⁴ BATISTA, C. V. F.; SCHISPEMA J.; VEEPORTE R.; RECHE S. B., HENRIQUES A. T. Indole alkaloids from *Rauvolfia selowii*. *Phytochemistry*, v.41, p.969-971. 1996

oito alcalóides indólicos (XXIII –XXX) sendo um deles inédito: a selowina XXX. Belém-Pinheiro e colaboradores³⁵ haviam descrito o isolamento de outros alcalóides de raízes de *R. sellowii*, coletada na Amazônia, tais como a reserpilina XXXI, harmano XXXII, β -yohimbina XXXIII e sarpargina XXXIV (Figura 8).

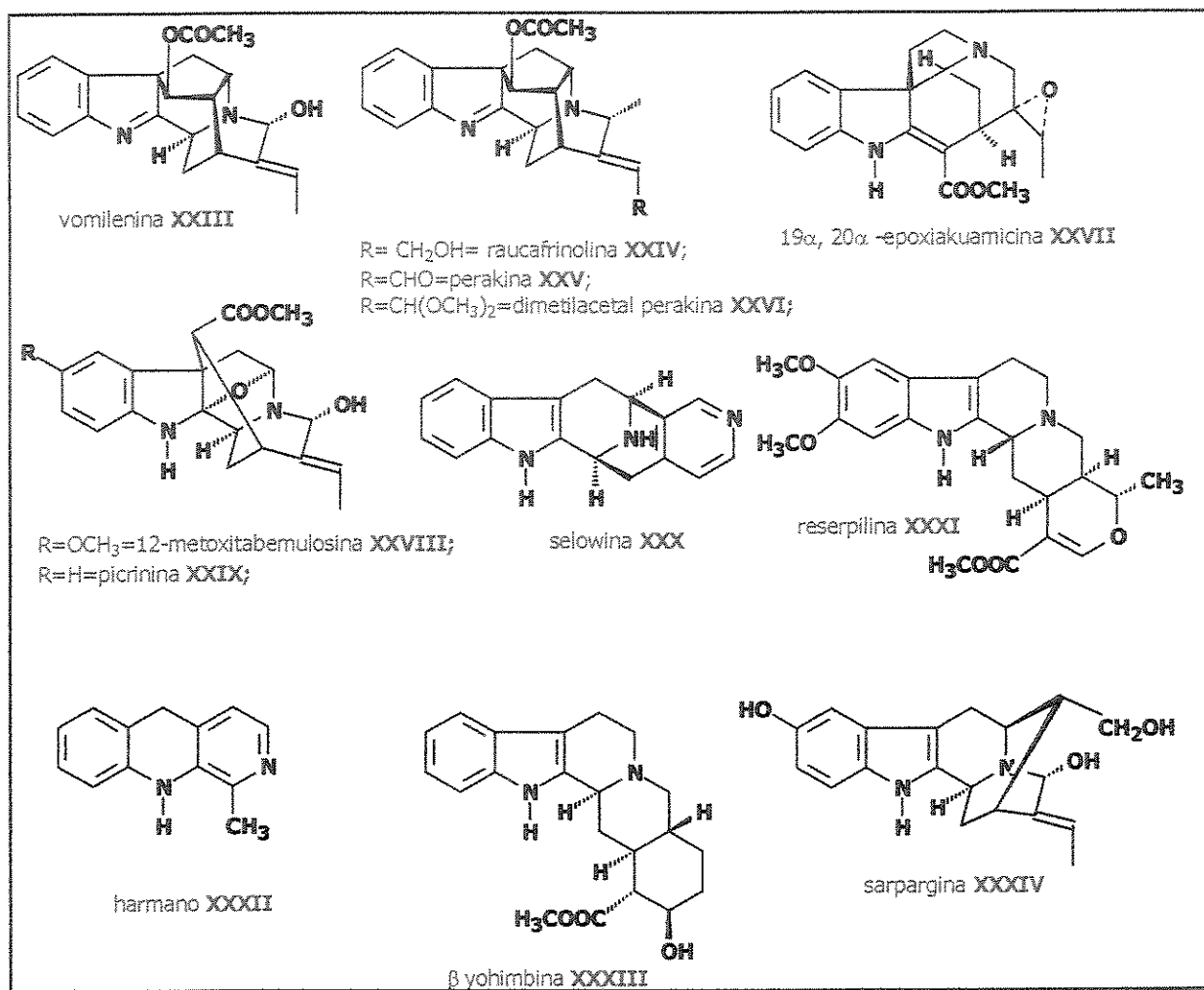


Figura 8: Alguns alcalóides isolados de espécies brasileiras de *Rauwolfia*.

Vieira e colaboradores³⁶, descrevem em 1998, o isolamento de um novo depsídeo XXXV das cascas de caule de *R. mattfeldiana* Markgr, coletada no Espírito Santo, além do isolamento de outros produtos naturais conhecidos, tais como o lupeol XXXVI, o sitosterol XXXVII, o

³⁵ BELÉM-PINHEIRO M. L.; ROCHA A. F. I.; LECLERCQ, J. Q.; WAUTERS, J. N.; ANGENOT L.; Alkaloids of *Rauwolfia sellowii* from Amazonia. *J. Pharm. Belg.*, v. 43, p.5, p.379-381. 1988

³⁶ VIEIRA, I. J. V.; CECCHI C. M. P.; MATHIAS, L.; BRAZ-FILHO, R.; RODRIGUES-FILHO E.; A new depside isolated from the bark of *Rauwolfia mattfeldiana* *J. Braz. Chem. Soc.*, v.2, p91-95. 1998

estigmasterol **XXXVIII** e a xantona **XXXIX**. Bianco e colaboradores ³⁷ descrevem o estudo fitoquímico de outra espécie brasileira, *Rauwolfia grandiflora* Mart. ex. A. DC. e mostra o isolamento dos iridóides **XXXX** - **XXXXIII**. No entanto, nenhum destes dois últimos trabalhos descreve o isolamento de alcalóides (Figura 9).

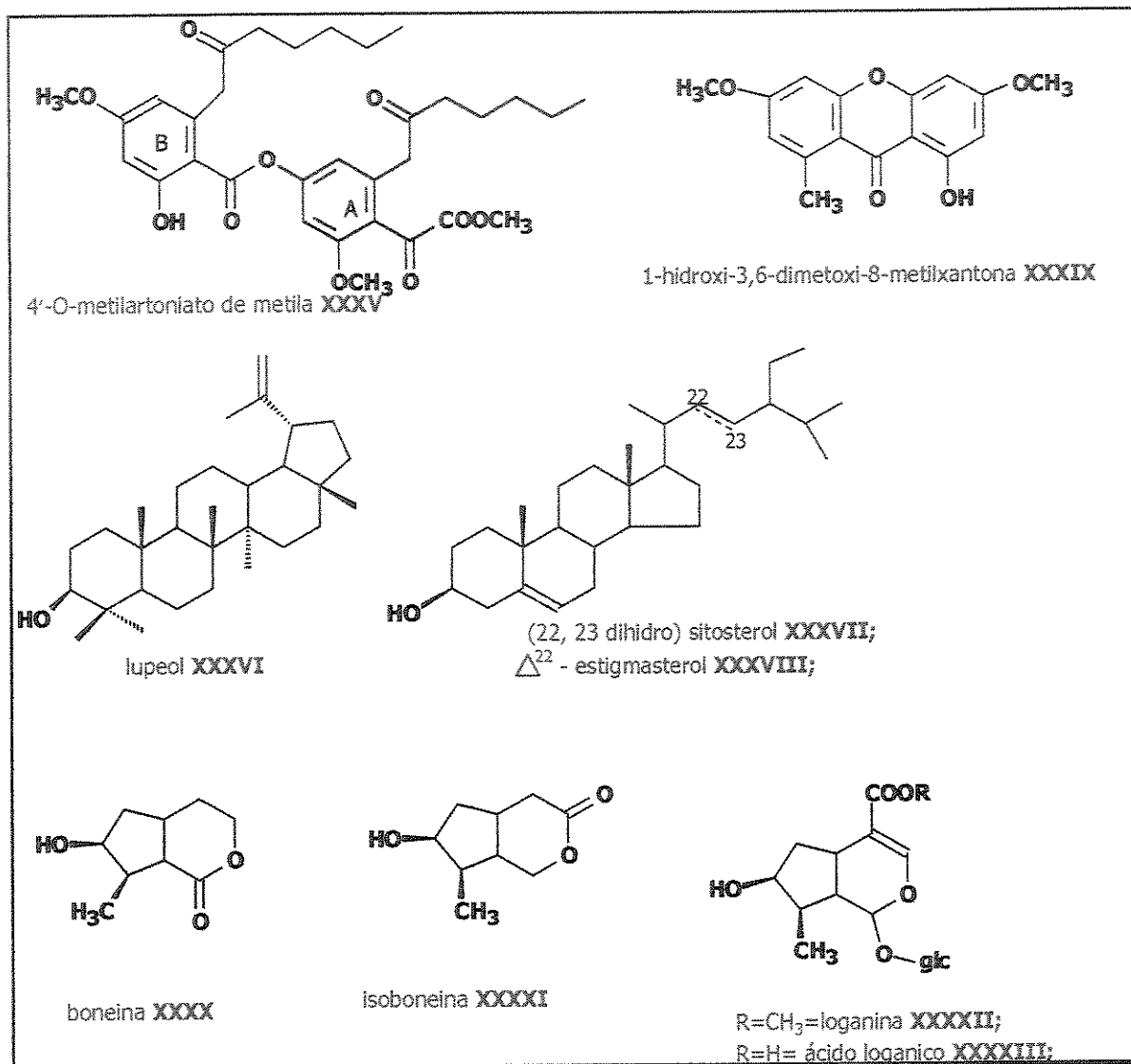


Figura 9: Compostos isolados de *R. mattfeldiana* e *R. grandiflora*

³⁷ BIANCO, A.; et. al. Iridoids of *Rauwolfia grandiflora*. *Phytochemistry*, v.35, n.6, p.1485-1487. 1994

1.4 Gênero *Rauwolfia*³⁸

Recentemente, Endres e Bruyns³⁹, numa revisão taxonômica, reuniram as Famílias Apocynaceae s.str e Asclepiadaceae s.str. , na Família Apocynaceae s.str, onde reconhecem 5 subfamílias: Rauvolfioideae Kostel (=Plumeroideae), Apocynoideae Burnett, Periplocoideae R. Br. ex. Endl, Secamonoideae Endl. e Asclepiadoideae R. Br. ex Burnett. Portanto, o gênero *Rauwolfia* fica assim classificado:

Reino:	Phyta
Classe:	Angiosperma
Subclasse:	Dicotiledôneas
Superordem:	Asteridae
Ordem:	Gentianales
Família:	Apocynaceae
Subfamília:	Rauvolfioideae Kostel
Tribo:	Vincae Duby

Este gênero contém muitas espécies que crescem em regiões tropicais e semi-tropicais e tem este nome em homenagem ao médico e botânico alemão Leonhard Rauwolf, do século XVI, que estudou as plantas medicinais da Ásia e África. As espécies mais investigadas são *R. serpentina* (Linné) Bentham ex Kurz, *R. canescens* Linn., *R. vomitoria* Afzel e *R. heterophylla* Roem.^{40,41}

As 86 espécies de *Rauwolfia* L. estão distribuídas largamente entre os trópicos em 12 seções. Rao, descreve a ocorrência nas Américas divididas em três seções: Macrovolfia, Ochrosioides e Rauwolfia, descritas nas Tabela 1 e Tabela 2⁴².

³⁸ De acordo com o Código Internacional de Botânica, a ortografia deve ser a escolhida por C. Linné que latinizou Rauwolf, chamando o gênero de Rauwolfia (trocando o w por v) – In Abaul J., Philogene, E., Burgeois P., Mèrault G., *J. Nat. Prod*, v.49, n.5, p.829-832. 1986

³⁹ ENDRESS, M. E.; BRUYNS, P. V. A revised classification of the Apocynaceae s.l. *The Botanical Review*, v.66, n.1, p.1-56. 2000

⁴⁰ REMINGTON J. P., Farmacia, 17 ed, 1990, v.1, p. 576.

⁴¹ TYLER V. E; BRADY L. R.; ROBBERS J. E. Pharmacognosy, 9ed, 1988

⁴² WOODSON, R. E.; YOUKGEN, H. W.; SCHILITTLER, E., SCHENEIDER, J. A. *Rauwolfia: Botany, Pharmacognosy, chemistry & pharmacology*, 1 ed, EUA: Little Brown and Company, 1957, p7-11.

Tabela 1: Espécies do gênero *Rauvolfia* e sinônímias encontradas na América⁴²
(as espécies grafadas em vermelho são descritas no Brasil)

Espécies de Rauvolfia	Sinônímia
Seção Macrovolfia M. Pichon, emend. Rao	
América tropical	
<i>Rauvolfia andina</i> Markgraf.	
<i>Rauvolfia bahiensis</i> A. DC.	
<i>Rauvolfia biauriculata</i> Müll. -Arg.	
<i>Rauvolfia cubana</i> A. DC.	
<i>Rauvolfia grandiflora</i> Martt. ex A. DC.	<i>R. affinis</i> Müll. -Arg
<i>Rauvolfia linearifolia</i> Briton & Wilson	
<i>Rauvolfia macrantha</i> K. Sch.	
<i>Rauvolfia mattfeldiana</i> Markgraf.	
<i>Rauvolfia nitida</i> Jacq	<i>R. angustifolia</i> Salisb <i>R. nitidissima</i> Steud.
<i>Rauvolfia pachyphylla</i> Markgraf.	
<i>Rauvolfia paraensis</i> Ducke	<i>R. amazonica</i> Markgraf.
<i>Rauvolfia paucifolia</i> A. DC.	
<i>Rauvolfia penthaphylla</i> Ducke	<i>R. duckei</i> Markgraf.
<i>Rauvolfia polyphylla</i> Benth.	
<i>Rauvolfia praecox</i> K. Sch.	
<i>Rauvolfia purpurascens</i> Standl	
<i>Rauvolfia salicifolia</i> Griseb	
<i>Rauvolfia sanctorum</i> Woods	
<i>Rauvolfia sarapiquensis</i> Woods	
<i>Rauvolfia schueli</i> Speg	<i>R. boliviana</i> Makgraf.
<i>Rauvolfia sellowii</i> Müll. - Arg	
<i>Rauvolfia sessilifolia</i> S. Moore	
<i>Rauvolfia sprucei</i> Müll. -Arg.	<i>R. laurentiana</i> Woods
<i>Rauvolfia steyermarkii</i> Woods	
<i>Rauvolfia weddelliana</i> Müll. -Arg.	<i>R. elliptica</i> Malme

Tabela 2: Espécies do gênero *Rauvolfia* e sinonímias encontradas na América (cont.)⁴²
(as espécies grafadas em vermelho são descritas no Brasil)

Espécies de Rauvolfia	Sinonímia
Seção Ochrosioides M. Pichon	
Hawai	
<i>Rauvolfia sanwicensis</i> A. DC.	
Seção Rauwolfia	
América tropical	
<i>Rauvolfia blanchetii</i> A. DC.	
<i>Rauvolfia ligustrina</i> Roem. & Schult.	<i>R. alphonsiana</i> Müll.-Arg <i>R. indecora</i> Woods <i>R. parvifolia</i> Bert. ex Spreng. <i>R. ternifolia</i> HBK. <i>R. macrocarpa</i> Standl. <i>R. multiflora</i> Riley <i>R. divergens</i> Markgraf.
<i>Rauvolfia littoralis</i> Rusby	
<i>Rauvolfia mollis</i> S. Moore.	
<i>Rauvolfia millissima</i> Markgraf.	
<i>Rauvolfia moricandii</i> A. DC.	
<i>Rauvolfia tetraphylla</i> L.	<i>R. canescens</i> L. <i>R. heterophylla</i> Roem. & Schult. <i>R. hirsuta</i> Jacq. <i>R. odontophora</i> Heurck & M Arg. <i>R. subpubescens</i> L. <i>R. tomentosa</i> Jacq. <i>R. lamarkii</i> A. DC. <i>R. lanceolata</i> Griseb <i>R. latifolia</i> A. DC. <i>R. psychotrioides</i> HBK.
<i>Rauvolfia viridis</i> Roem. & Schult.	
<i>Rauvolfia woodsoniana</i> Standl.	

As espécies descritas no Brasil, (grafadas em vermelho na Tabela 1 e Tabela 2), estão largamente distribuídas pelo país. Os Estados que apresentam o maior número de espécies são: Amazonas, Bahia e Mato Grosso, com cinco a oito cada. No Estado de São Paulo existe apenas uma espécie deste gênero, a *R. sellowii*, conforme descrito Tabela 3.

Tabela 3: Distribuição de espécies de *Rauvolfia* ocorrentes no Brasil

Espécie	Estado
<i>R. moricandii</i>	Bahia
<i>R. blanchetii</i>	Bahia, Espírito Santo
<i>R. ligustrina</i>	Bahia, Ceará, Maranhão, Pará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Mato Grosso
<i>R. mattfeldiana</i>	Bahia, Minas Gerais, Mato Grosso.
<i>R. bahiensis</i>	Bahia
<i>R. grandiflora</i>	Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Pernambuco, Rio de Janeiro
<i>R. pauciflora</i>	Bahia, Espírito Santo
<i>R. pentaphylla</i>	Amazonas, Amapá, Pará
<i>R. praecox</i>	Amazonas
<i>R. polyphylla</i>	Amazonas
<i>R. sprucei</i>	Amazonas
<i>R. paraensis</i>	Amazonas, Pará
<i>R. macrantha</i>	Amazonas
<i>R. weddelliana</i>	Mato Grosso
<i>R. mollis</i>	Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Rio de Janeiro
<i>R. sessilifolia</i>	Mato Grosso
<i>R. sellowii</i>	Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, São Paulo

Acreditamos que a ampla distribuição geográfica deste gênero no país, tenha dificultado seu estudo fitoquímico no Brasil.

Desta forma planejamos uma viagem aos Estados do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, para a coleta de cinco espécies de *Rauvolfia* (*R. weddelliana*, *R. mollis*, *R. sessilifolia*, *R. mattfeldiana* e *R. ligustrina*) com descrição de ocorrência nestes Estados.

1.5 Atividade biológica/ bioensaios gerais:

Um composto é biologicamente ativo quando exerce uma ação específica sobre um determinado ser vivo, seja ele animal, vegetal ou microorganismo. Uma vasta gama de compostos orgânicos de origem vegetal, produtos de metabolismo primário e secundário, é biologicamente ativa, ou seja, tem ação tranquilizante, analgésica, antiinflamatória, citotóxica, anticoncepcional, antimicrobiana, antiviral, fungicida, inseticida, etc.⁴³

Desde a antiguidade é observado o uso da Rauwolfia (droga obtida das raízes de *R. serpentina*), como remédio para picadas de cobra e escorpião, febrífugo e emético. A ação calmante também era conhecida, útil para se tratar casos de ansiedade, psicose tensional ou psicose crônica (ansiedade, hiperatividade psicomotora ou comportamento agressivo compulsivo). Se a dose administrada não for ajustada cuidadosamente, pode levar a casos paradoxicos de ansiedade ou fortes depressões. Devido aos efeitos colaterais, atualmente, a reserpina (I) é usada principalmente como tranquilizante. Também se faz uso dela como antihipertensivo, pois as doses empregadas são bem menores que as necessárias como tranqüilizante.⁴⁴

Um grande número de bioensaios está disponível para bioavaliação de extratos de plantas e metabólitos isolados.⁴⁵ No entanto, grande parte destes bioensaios é relativamente cara, pois necessita de especialistas de diferentes áreas, como farmacólogos, biólogos ou bioquímicos, além de infra-estrutura específica adequada.⁴⁶

O grande número de extratos e frações oriundas de plantas requer bioensaios simples, rápidos, reprodutíveis e baratos. Se o princípio ativo está presente nos extratos, os bioensaios devem ser sensíveis o suficiente para tal detecção. A grande maioria dos laboratórios fitoquímicos interessados em investigação biológica de plantas não possuem tal infraestrutura. Conseqüentemente, muitos esforços são feitos para a introdução de bioensaios simples, rápidos, baratos, ditos "testes de bancada" que possam ser realizados por pessoa não especializada.

⁴³ PLETSCH, M.; Compostos naturais biologicamente ativos. *Biotecnologia*, v.4, p.1-7. 1999. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/bio/home.htm>>

⁴⁴ REMINGTON J. P. Farmacia, 17 ed., Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana S.A 1987, p.575.

⁴⁵ COLE, M. D.; Key antifungal , antibacterial and anti-insect assays- a critical review. *Biochem. Syst. Ecol.*, v.22, n.8, p.837-856. 1994

⁴⁶ HAMBURGUER, M; HOSTETTMANN, K.; Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry*, v.30, n.12, p.3864-3874. 1991

Estes testes de bancada permitem um rápido estudo de extratos e metabólitos isolados, com uma variedade de objetivos, como o já comum teste de citotoxicidade realizado com as larvas de *Artemia salina* e o teste de bioautografia realizado para atividade antifúngica e antibacteriana.

1.5.1 Teste de letalidade para *Artemia salina* (Brine Shrimp Lethality Test – BSLT)⁴⁷

O teste de letalidade usando *Artemia salina*, é um bioensaio geral e capaz de detectar um largo espectro de bioatividade presente em extratos. A técnica é de fácil manuseio, baixo custo e utiliza pequenas quantidades de material. Este teste é indicativo de atividade citotóxica e pesticida.

Os ovos de *Artemia salina* são adquiridos comercialmente e podem ser mantidos por anos em geladeira. Quando colocados em solução salina, os ovos eclodem. As larvas são então, atraídas por uma fonte de luz artificial. Compostos e extratos são testados em triplicatas. Os sobreviventes são contados após 24hs e valores de LC_{50} com 95% de intervalo de confiança são calculados. Desde que este teste foi introduzido em 1982, ele pode ser usado como teste preliminar para a detecção de agentes com atividade antitumoral e pesticida dos compostos isolados a partir de plantas.

1.5.2 Bioautografia

Bioautografia é uma técnica usada para varredura de atividade antibacterial e antifúngica. O método mais comum baseia-se na técnica por difusão em ágar. Uma placa (CCD) eluída com os extratos ou compostos puros é colocada em contato com a placa de agar inoculada com o microorganismo. Os compostos difundem da CCD para a placa de agar e após um período de incubação, halos de inibição podem ser observados. Este procedimento requer o uso de equipamento específico para microbiologia e pode sofrer problemas por diferença de difusão exibida pelas diferentes classes de compostos.⁴⁸

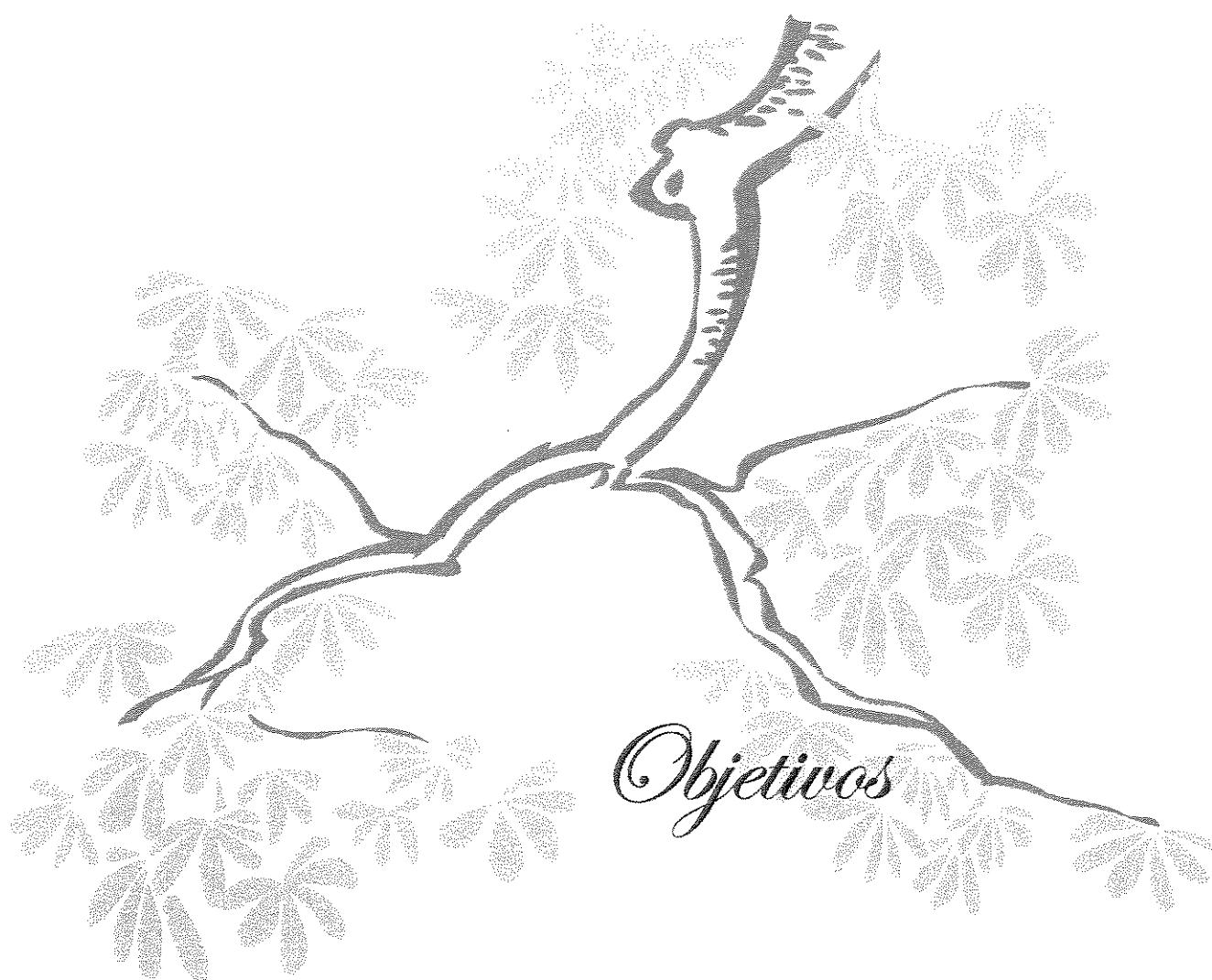
⁴⁷ SAM T. W. Toxicity testing using the brine shrimp: *Artemia salina* In: Collegate, S. M.; Molyneux R. J.; Bioactive natural products, Detection, Isolation and structural determination, USA, CRC Press, Inc., 1993. p441-454.

1.5.3 Citotoxicidade, atividade antitumoral e antineoplástica.

Existe alguma confusão, no meio acadêmico, no uso do melhor termo para descrever as atividades citotóxica, antitumoral e antineoplástica. O Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos, NCI, define os termos precisamente, sendo que: citotoxicidade refere-se à toxicidade *in vitro* para células tumorais, enquanto antineoplástica e antitumorais referem-se à atividade *in vivo* em fases experimentais.

O teste de atividade citotóxica, mais específico, foi realizado com a colaboração e coordenação do Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho, no CPQBA (Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas e Biológicas).

⁴⁸ RIOS, J. L.; RECIO, M. C.; VILLAR, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *J. Ethnopharmacol.* v.23, p.127-149. 1988



2 OBJETIVOS:

Este trabalho tem por objetivos:

- Realização de viagem de coleta aos Estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul para coleta de cinco espécies de *Rauvolfia* (*R. sessilifolia*, *R. weddelliana*, *R. mollis*, *R. ligustrina* e *R. mattfeldiana*).
- O estudo fitoquímico comparativo de alcalóides indólicos existentes nas espécies de *Rauvolfia* que ocorrem no Brasil. Iniciamos o estudo com o isolamento dos alcalóides indólicos de *R. bahiensis* que serão usados como padrão para as outras espécies de *Rauvolfia*. Na Tabela 4 temos descritas as espécies de *Rauvolfia* que foram coletadas para estudo.⁴⁹

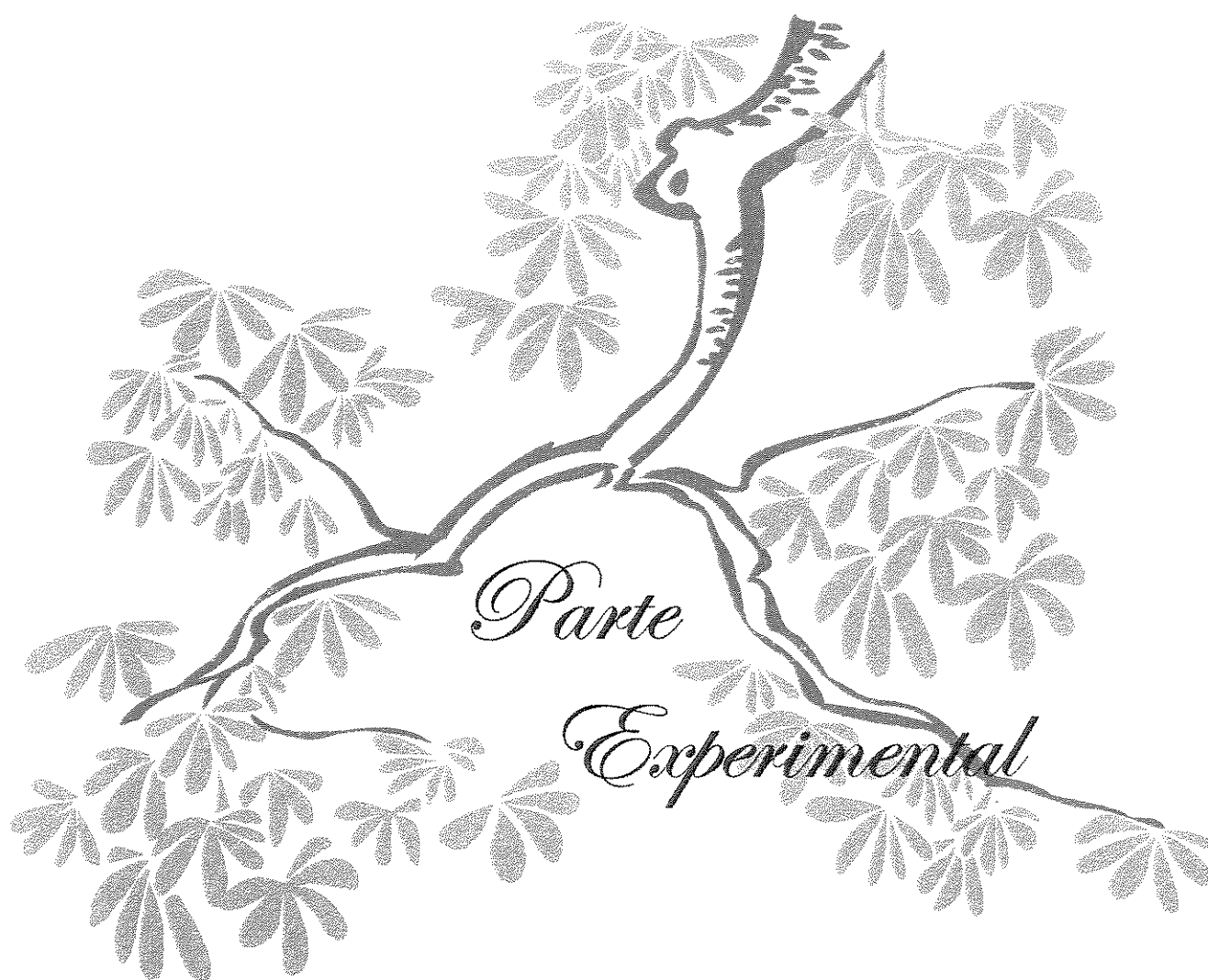
Tabela 4: Espécies brasileiras de *Rauvolfia* coletadas.

Espécie	Material disponível	Estado de origem
<i>R. mattfeldiana</i>	folhas	Bahia
<i>R. bahiensis</i>	folhas e cascas de caule	Bahia
<i>R. grandiflora</i>	folhas	Espírito Santo
<i>R. vomitoria</i>	folhas	São Paulo
<i>R. sessilifolia</i>	folhas e raiz	Mato Grosso do Sul ⁴⁹
<i>R. weddelliana</i>	folhas e raiz	Mato Grosso ⁴⁹

- Desenvolvimento e otimização de condições de análise por CG/EM adequados para a separação e detecção dos alcalóides indólicos.
- Desenvolvimento análogo em relação às análises por CLAE.
- Análise dos extratos alcaloídicos de *R. weddelliana*, *R. mattfeldiana*, *R. grandiflora* e *R. vomitoria* por CG/EM e/ou CLAE comparando com os alcalóides isolados de *R. bahiensis*.
- Avaliação da atividade biológica dos diversos extratos alcaloídicos através da aplicação de alguns bioensaios tais como: letalidade para *Artemia salina*, bioautografia e testes de atividade citotóxica usando cultura de algumas linhagens

⁴⁹ Em jan/1998, realizamos uma viagem para Chapada dos Guimarães (MT) para coleta de *Rauvolfia*, sob coordenação de Ingrid Koch, financiado pelo FAEP.

tumorais humanas, como por exemplo: **K 562** (leucemia), **MCF 7** (mama), **NCI ADR** (mama resistente), **UACC 62** (melanoma), **NCI 460** (pulmão).



3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Materiais e Métodos

Os espectros de infravermelho foram obtidos em um espectrofotômetro FT/IR BOMEM MB, em pastilhas de KBr ou filme com CH_2Cl_2 em celas de NaCl.

Os espectros de RMN ^1H e de RMN ^{13}C (totalmente desacoplado e DEPT) foram obtidos em espectrômetros BRUKER AC 300/P, GEMINI 300 BB (VARIAN) com campo de 7 Tesla e espectros de RMN ^1H e de RMN ^{13}C (totalmente desacoplado e DEPT) e bidimensionais (COSY, HETCOR, HMBC, HSQC), adquiridos em um espectrômetro INOVA 500 (VARIAN) com campo de 11 Tesla, à temperatura ambiente, sendo as amostras dissolvidas em clorofórmio deuterado Aldrich, utilizando como referência interna o tetrametilsilano (TMS) 0,03%.

Os espectros de massas (EM - baixa resolução e alta resolução) foram obtidos em um espectrômetro de massas VG AutoSpec- fisions Instruments, utilizando a técnica de Impacto Eletrônico a 70 eV.

A rotação óptica (α_D) foi obtida em um espectropolarímetro (dicrômetro) JASCO (Japan Spectrometry Company) modelo J-720, com lâmpada de Xenônio de 450W e campo de varredura de 170 a 1100 nm.

Para a cromatografia em coluna foi usada sílica gel 60 (70-230 mesh para cromatografia em coluna clássica e 230-400 mesh para cromatografia em coluna sob média pressão).

As placas de CCD após aplicação e eluição foram reveladas usando-se revelador específico para compostos nitrogenados, reagente de Dragendorff, seguida de nebulização com solução de $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}$ 1:1 e aquecimento ou FeCl_3 em HClO_4 35%, seguido de aquecimento⁵⁰.

As análises de CG/EM foram realizadas em um aparelho Shimadzu de CG/EM, com coluna capilar DB-1 de 30 m, com temperatura inicial 150°C, em rampa de aquecimento e temperatura final de 280 °C, o tempo de análise de aproximadamente 40 min.. As amostras são solubilizadas em acetato de etila ou metanol, numa concentração de 1mg/mL para compostos puros , 10mg/mL para extrato e o volume de injeção de 1 μL .

Os E.M. obtidos a partir do cromatograma (CIT – cromatograma de ions totais CG/EM) são comparados aos espectros de massas da biblioteca do aparelho (NIST). A análise dos alcalóides isolados permite a criação de uma biblioteca particular com os espectros de massas

⁵⁰ COURT, W. E.; IWU, M. M.; Chromogenic reactions of *Rauwolfia* alkaloids after separation by thin-layer chromatography. *J. Chromatogr.*, v.187, p.199-207. 1980

destes alcalóides, para posterior comparação com os extratos estudados. Foi analisada como padrão a maioria dos alcalóides isolados de *R. bahiensis*.

Para a análise de CLAE, usamos um aparelho Hewlett Packard modelo 1090 série II/M, com detector ultravioleta, $\lambda=280\text{nm}$, com coluna C-8, 15 cm comp., 4,6mm ϕ . Sistema eluente: fase móvel A: CH_3CN 10% , ATFA 0,1% em H_2O ; fase móvel B: ATFA 0,1% em CH_3CN ; fluxo de 0,8 mL/min, com gradiente inicial de 100% de fase A e final em 50 min com 50% de fase A e 50 % de fase B. Volume injetado 10 μL , concentração da amostra pura de 1 mg/mL e de extrato de 5mg/mL.

3.2 Estudo Fitoquímico:

3.2.1 Coleta:

O material vegetal foi coletado e identificado pela botânica Ingrid Koch⁵¹, do Instituto de Biologia da Unicamp e suas respectivas exsicatas estão depositadas no Herbário do Instituto de Biologia- UEC.(Tabela 5).

Tabela 5: Material vegetal disponível para estudo;

Espécie	material vegetal	local de coleta	data	exsicata
<i>R. mattfeldiana</i>	folhas e galhos	Barra do Estiva Serra do Sincorá (BA)	abril 1997	I. Koch 711, M. Lisboa & R. Belinelo
<i>R. bahiensis</i>	folhas, galhos e cascas de caule	Barra do Una (BA)	abril 1997	I. Koch 640 & R. Belinelo
<i>R. sessilifolia</i>	folhas, galhos e raízes	Rondonópolis (MS)	janeiro 1998	I. Koch 724; R. Belinelo; R. M. Braga & L. Kato
<i>R. weddelliana</i>	folhas, galhos e raízes	Buritit (MT)	janeiro 1998	I. Koch 729; R. Belinelo; R. M. Braga & L. Kato
<i>R. grandiflora</i> <i>R. vomitoria</i>	folhas e galhos folhas e galhos	Santa Tereza (ES) Campus da Unicamp – Campinas (SP)	janeiro 1997	I. Koch 888 & R. M. Braga

3.2.2 Metodologia:

Depois de seco, o material foi moído e submetido à exaustiva extração etanólica em Soxhlet. O extrato etanólico, após concentração a pressão reduzida, foi submetido à tratamento ácido-base, metodologia padrão para isolamento de alcalóides (Fluxograma 1). Após fracionamento ácido-base, passamos à separação por cromatografia clássica (CC) e/ou rápida, CCE e monitoramento por CCD (Si-gel e Al_2O_3).

Fracionamento ácido – base (Fluxograma 1):

O extrato etanólico é solubilizado com solução aquosa de ácido acético 10% (v/v), e deixado sob agitação e banho de gelo por 24h. Essa solução é filtrada em funil de placa porosa e lavada com solução aquosa ácida até teste de Mayer negativo, fornecendo a **solução aquosa ácida I** e resíduos.

A solução aquosa ácida I é extraída com solvente orgânico (CH_2Cl_2 ou CHCl_3), que é em seguida lavado com solução aquosa de NaHCO_3 5% (m/v), solução aquosa saturada de NaCl , seco sob Na_2SO_4 . O solvente é eliminado em evaporador rotativo à pressão reduzida, fornecendo **solução aquosa ácida II** e **extrato clorofórmico (ou diclorometânico) ácido**.

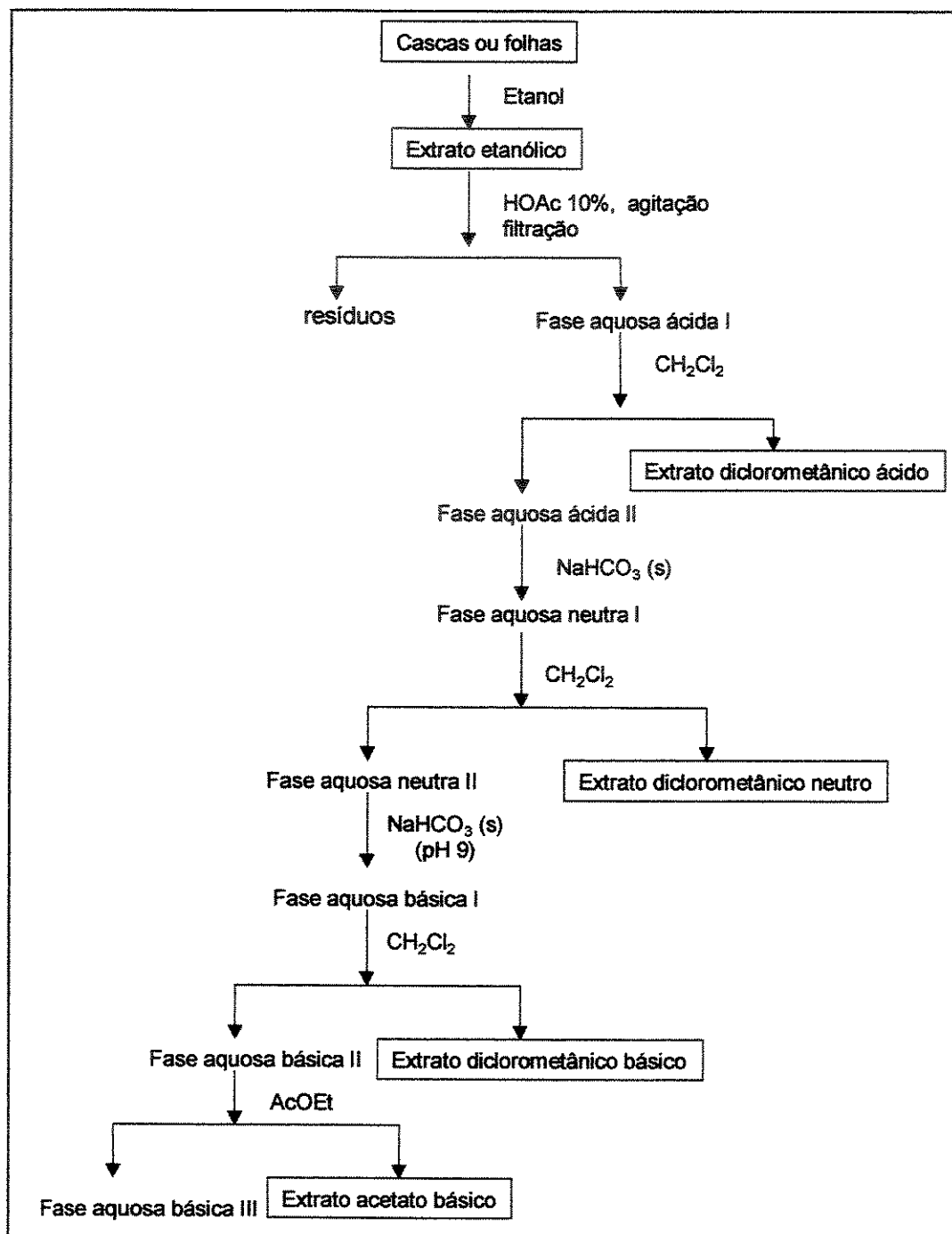
A solução aquosa ácida II é neutralizada com NaHCO_3 (sólido) e extraída com solvente orgânico (CH_2Cl_2 ou CHCl_3), que é em seguida lavado com solução aquosa saturada de NaCl , seco sob Na_2SO_4 . O solvente é eliminado em evaporador rotativo à pressão reduzida, fornecendo **solução aquosa neutra II** e **extrato clorofórmico (ou diclorometânico) neutro**.

A solução aquosa neutra II tem seu pH elevado à 9 com NaHCO_3 (sólido), chamada agora de **solução aquosa básica I** e extraída com solvente orgânico (CH_2Cl_2) que é em seguida lavado com solução aquosa saturada de NaCl , seco sob Na_2SO_4 . O solvente é eliminado em evaporador rotativo à pressão reduzida, fornecendo **solução aquosa básica II** e **extrato clorofórmico (ou diclorometânico) básico**. Em alguns casos optou-se pela elevação direta do pH da solução aquosa ácida I para solução aquosa básica.

A solução aquosa básica I é extraída com acetato de etila, que é em seguida lavado com solução aquosa saturada de NaCl , seco sob Na_2SO_4 ; o solvente é eliminado em evaporador rotativo à pressão reduzida, fornecendo **solução aquosa básica III** e **extrato acetato básico**.

Uso de reveladores específicos de coloração (Dragendorff e solução FeCl_3 em HClO_4 35%) para identificação de alcalóides.

⁵¹ KOCH, I., O gênero *Rauvolfia* L.; (Apocynaceae) nas neotropicais; Tese (em andamento - Doutorado em Botânica), Dep. de Botânica do Instituto de Biologia, Unicamp;- sob orientação de Profa. Dra. Luiza S. Kinoshita e Prof. Dr. Volker Bittrich.



Fluxograma 1: Fracionamento ácido-base, dirigido para o isolamento de alcalóides.

***Rauvolfia bahiensis*:**

Cada parte da planta (folhas, galhos, casca de caule) foi tratada separadamente. Após a extração etanólica exaustiva em Soxhlet, o extrato etanólico resultante foi submetido à tratamento ácido-base conforme Fluxograma 1 e forneceu os seguintes extratos (Tabela 6).

Tabela 6: Extratos obtidos de *Rauvolfia bahiensis*

parte da planta (quantidade)	extrato etanólico massa (g)	extrato CH ₂ Cl ₂ ácido (código e massa (g))	extrato CH ₂ Cl ₂ neutro (código e massa (g))	extrato CH ₂ Cl ₂ básico (código e massa (g))	extrato acetato básico (código e massa (g))
folhas (400 g)	60	LKRB12 1,900	-	LKRB13 0,47	LKRB13A 0,33
galhos (395 g)	32,7	LKRB19.1 0,102	LKRB19.2 0,044	LKRB19.3 0,112	LKRB19.4 0,067
cascas (265 g)	11,8	LKRB23.1 1,160	LKRB23.2 1,990	LKRB23.3 0,420	LKRB23.4 0,187

Extrato diclorometânico básico folhas de *R. bahiensis* (LKRB13)

O extrato **LKRB13** (0,34g) foi fracionado em coluna cromatográfica sob média pressão ($\varnothing_{col} = 2$ cm) e usou-se CH₂Cl₂/ MeOH 10% como sistema eluente e sílica gel 60 (230-400 mesh) como fase estacionária. Foram coletadas 77 frações de 20 mL cada. As frações recolhidas foram reunidas de acordo com as semelhanças observadas por análise em CCD, sendo reagrupadas em 13 frações (Tabela 7).

Tabela 7 Fracionamento do extrato RB13

Eluente	Frações	Massa (mg)	código
CH ₂ Cl ₂ /MeOH 10%	1-6	1,8	
	7-9	27,2	
	10	13,5	
	11	13,4	
	12-15	70,8	LKRB06
	16	9,0	
	17	6,1	
	18-20	4,3	
	21-48	94,2	LKRB16
	49-56	13,1	
	57-66	21,1	
	67-69	12,4	
	70-77	20,3	
CH ₂ Cl ₂ /MeOH 20%			
total		307,2 (91%)	

Purificação por CCE das frações LKRB06 e LKRB16.

LKRB06

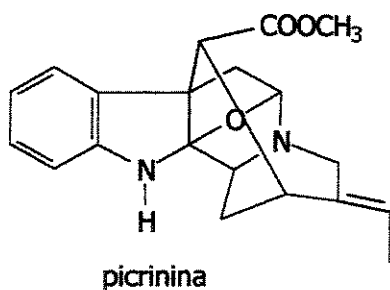
A fração LKRB06 (fração 12-15 com 70,8 mg - Tabela 7) foi purificada por CCE, usando como sistema eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 3% com a cuba saturada com NH_3 , e como fase estacionária uma placa de sílicagel G/GF₂₅₄. A fração LKRB6.04 (Tabela 8) foi identificada como sendo o **alcalóide 1**, com 20,9 mg.

Tabela 8: Fracionamento da fração 12-15 de RB13

frações	massa (mg)
LKRB06.1	9,0
LKRB06.2	8,3
LKRB06.3	13,0
LKRB06.4	20,9*
LKRB06.5	8,2
total	59,4 (84%)

Alcalóides isolados:

alcalóide 1: picrinina



- $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_3$; MM: 338;
- metil 2,5-epoxi-1,2 diidroakuamilan-17-oato;
- alcalóide já isolado de espécies dos gêneros *Alstonia* e *Vinca* e de *Rauvolfia vomitoria*, *R. cumminsi*, *R. oreogiton* e *R. selowii*⁵²;
- forma física: sólido branco;
- **EM** (70 eV, m/z (%)) : 338 (M^{+} , 17), 320 (100), 261 (46), 239 (51), 168 (22), 97 (40), 71 (67), 55 (69);
- **RMN ^1H e ^{13}C** : Tabela 41 do Apêndice 1, pág. 129;
- Espectros: E 3 e E 4, Apêndice 3, pág. 150;

⁵²BATISTA, C. V. F.; SCHISPEMA J.; VEEPORTE R.; RECHE S. B., HENRIQUES A. T Indole alkaloids from *Rauvolfia selowii*. *Phytochemistry*, v.41, p.969-971. 1996

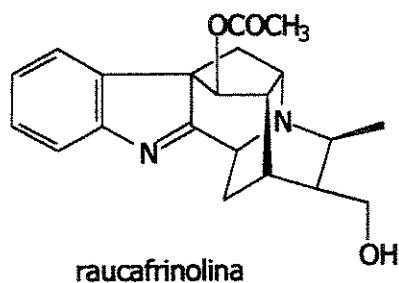
LKRB16

A fração 21-48 (94,2 mg) foi cromatografada em placa preparativa usando como sistema eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 4% com atmosfera de NH_3 , fornecendo 5 frações.

Tabela 9: Fracionamento por CCP da fração 21-48 de RB13

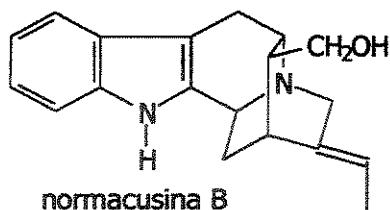
frações	massa (mg)
LKRB16.0	43,1
LKRB16.1	9,1
LKRB16.2	6,6
LKRB16.3	18,0
LKRB16.4	6,2
total	83,0 (88%)

Destas frações foram identificados o alcalóide **2** (LKRB16.1) e alcalóide **3** (LKRB16.3).

Alcalóides isolados:**alcalóide 2 : raucafrinolina**

- $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_3$; MM: 352;
- 1,2 dideidro-1-demetil-21-metil-18-norajmalan-17.19-diol-17 acetato;
- alcalóide já isolado de cascas de raízes de *R. caffra* e *R. nitida* e folhas de *R. vomitoria*⁵³;
- forma física: sólido branco;
- **EM (70 eV, m/z (%))** : 352 (M^+ , 26), 293 (11), 261 (19), 169 (12), 168 (15), 167 (31);
- **RMN ^1H e ^{13}C** : Tabela 45 (Apêndice 1, pág. 133); Espectros E 9, E 10(Apêndice 3 pág. 149)

⁵³ Chapman & Hall EPB, Dicionário de Produtos Naturais, Copyright©1999. CD-ROM



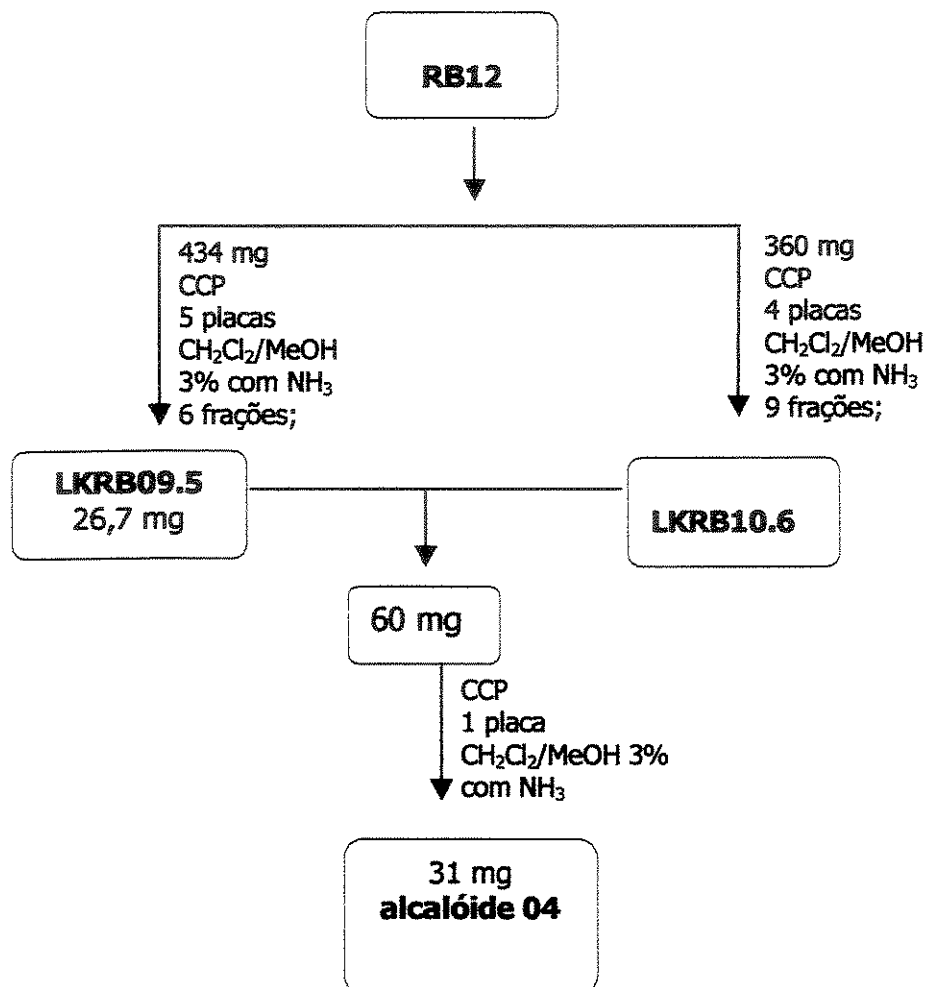
alcalóide 3: normacusina B

- $C_{19}H_{22}N_2O$; MM: 294;
- Sarpagan-17-ol; velosiminol, deoxisarpagina;
- alcalóide já isolado de *Geissoporum vellosi*, muitas espécies de *Rauvolfia* e *Strychnos*⁵⁴ (Apocynaceae e Strychnaceae);
- forma física: sólido branco;
- **EM (70 eV, m/z (%))** 294 (M^+ , (100)), 293 (83), 279 (12), 263 (37), 169 (94), 168 (70), 167 (17);
 - **RMN 1H e ^{13}C :** Tabela 42 (Apêndice 1, pág. 130); Espectros E 15, E 16 (Apêndice 3 pág.149)

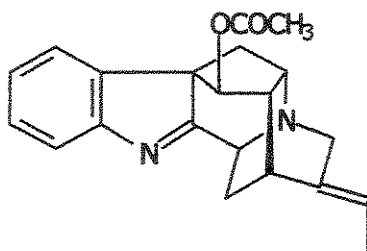
Extrato diclorometânico ácido das folhas de *R. bahiensis* (RB12)

O extrato **RB12**, (diclorometânico ácido das folhas de *R. bahiensis*) foi purificado por CCP, usando várias placas preparativas, tendo como sistema eluente $CH_2Cl_2/MeOH$ 4% e atm. saturada de NH_3 , tendo-se isolado 31 mg do alcalóide **4** (Fluxograma 2):

⁵⁴ SOUTHON, I. W. ; BUCKINGHAM, J.; *Dictionary of alkaloids*, 1 ed. London:Chapman & Hall Ltd. , 1989, v.1.



Fluxograma 2: Fracionamento por CCP de RB12;

Alcalóides isolados:**alcalóide 4: vinorina**

vinorina

- $C_{21}H_{22}N_2O_2$; MM: 334
- 21-deoxi-vomilenina; (1,2,19,20-tetrahydro-1-demetil-ajmalan-17-acetato).
- alcalóide já isolado de *R. caffra*, *R. perakensis* e *Vinca minor* (Apocynaceae);
- amorfo;
- **EM** (70 eV, m/z (%)): 352 (M^{+} , 26), 293 (11), 261 (19), 169 (12), 168 (15), 167 (31);
- **RMN 1H e ^{13}C** : Tabela 44 (Apêndice 1, pág. 132);

Espectros E 21, E 22 (Apêndice 3, pág. 159)

Extrato clorofórmico básico das cascas de *R. bahiensis* (LKRB23.3)

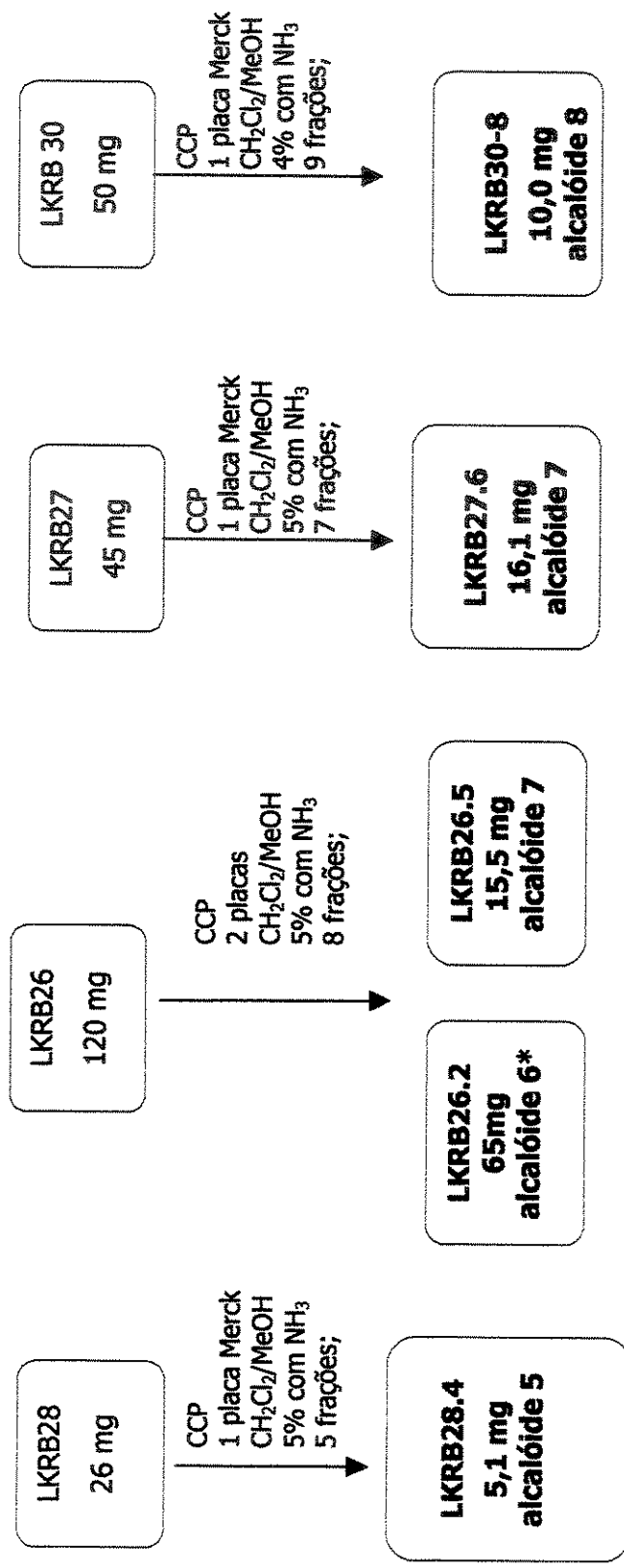
O extrato **LKRB23.3** (0,46g) foi fracionado em coluna cromatográfica sob média pressão ($\varnothing_{col} = 2$ cm) e usou-se $CHCl_3/MeOH$ 8% como sistema eluente.

Foram coletadas 72 frações de 20 mL cada. As frações recolhidas foram reunidas de acordo com as semelhanças observadas por análise em CCD, resultando em 17 frações.

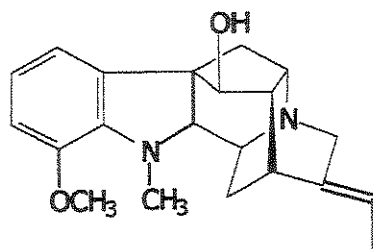
Tabela 10: Fracionamento do extrato **LKRB23.3**

Eluente	Frações	Massa (mg)	código
$CHCl_3/MeOH$ 8%	1-5	21,6	
	6	5,8	
	7	6,3	
	8	4,2	
	9	41,8	
✓	10	15,0	
✓	11	13,7	
	12	8,8	
✓	13	6,0	
✓	14-17	26,0	LKRB28
✓	18-24	54,1	LKRB30
	25-28	47,2	LKRB27
✓	29-51	121,8	LKRB26
$CHCl_3/MeOH$ 10%	52-68	36,4	
	69-70	3,5	
$CHCl_3/MeOH$ 15% (200 mL)	71	28,8	
$CHCl_3/MeOH$ 20% (300mL)	72	14,4	
total		455,40 (99%)	

Em seguida, as frações **LKRB 26, 27, 28 e 30** foram estudadas e purificadas por CCP. A seguir, temos o fluxograma 3 que esquematiza o estudo das frações, os métodos isolados para purificação dos compostos e os dados espectrais dos alcalóides isolados.

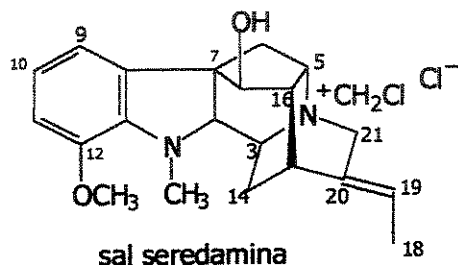


Fluxograma 3: Fracionamento por CCP do extrato **LKRB23.3** das cascas de caule de *R. bahiensis*

Alcalóides isolados:**alcalóide 5: seredamina**

seredamina

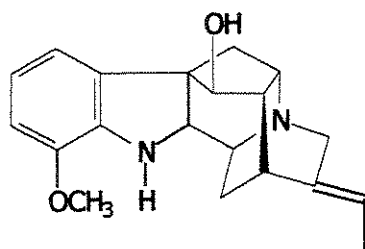
- $C_{21}H_{26}N_2O_2$; MM: 338;
- ajmalan-17-ol, 19, 20-dideidro-12-metoxi (17R, 19E)
- alcalóide já isolado de raízes e cascas de caule de *R. cumminsii* e *R. vomitoria*;
- forma física: óleo amarelo;
- **EM** (70 eV, m/z (%)) : 338 (M^{+} , 100), 322 (9), 308 (21), 213 (18);
- **RMN 1H e ^{13}C** : Tabela 47 (Apêndice 1, pág. 135);
Espectros E 27, E 28 (Apêndice 3, pág. 162);



sal seredamina

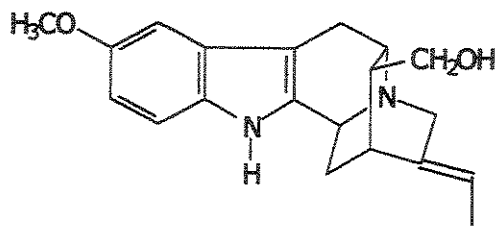
alcalóide 6: sal de seredamina

- $C_{21}H_{26}N_2O_2 (CH_2Cl)Cl$; MM: 338;
- sal de seredamina;
- **EM** (70 eV, m/z (%)) : 338 (M^{+} , 3), 324 (9), 84 (100), 83 (96);
- **RMN 1H e ^{13}C** : Tabela 48 (Apêndice 1, pág.136);
Espectros E 33, E 34 (Apêndice 3, pág. 165);

alcalóide 7 : norseredamina

norseredamina

- ajmalan-17-ol, 19, 20-dideidro-1-demetil-12-metoxi (17R, 19E)
- $C_{20}H_{24}N_2O_2$; MM: 324
- alcalóide já isolado de folhas de *R. cumminsii*, cascas de caules de *R. vomitoria* e *R. sumatrana*.
- forma física: agulhas;
- **EM (70 eV, m/z (%))**: 324(M^{+} , 100), 293(10), 199 (8), 198 (27);
- **RMN 1H e ^{13}C** : Tabela 46 (Apêndice 1, pág. 134)
Espectros: E 39, E 40 (Apêndice 3, pág. 168)



10-metoxi-normacusina B

alcalóide 8: 10-metoxi-sarpagan-17-ol

- $C_{20}H_{24}N_2O_2$; MM: 324;
- 10-metoxi- sarpagan-17-ol;
- isolado de *R. sprucei* (Apocynaceae);
- forma física: óleo amarelo;
- **EM (70 eV, m/z (%))** : 338 (M^+ , 100), 323 (86), 293 (40), 199 (46). 198 (38), 169 (8);
- **RMN 1H e ^{13}C** : Tabela 43 (Apêndice 1, pág 131); Espectros: E 45, E 46, (Apêndice 3, pág.171);

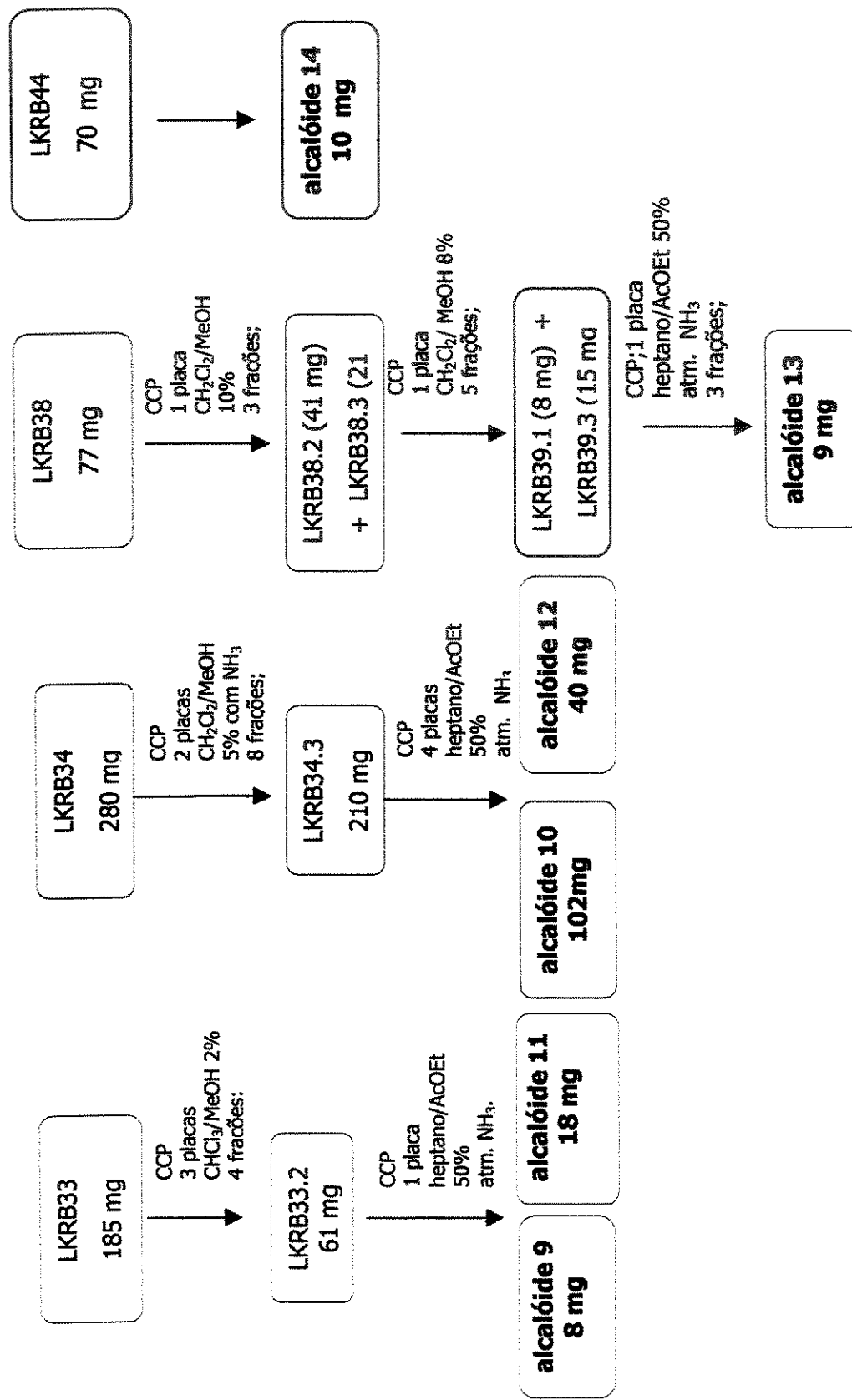
Extrato diclorometânico ácido cascas caule de *R. bahiensis* (LKRB 23.1)

O extrato **LKRB23.1** (1,16g) foi fracionado em coluna cromatográfica sob média pressão ($\varnothing_{col} = 4$ cm), usou-se como sistema eluente $CHCl_3/MeOH$ 5%.

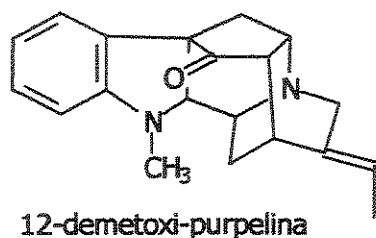
Foram coletadas 70 frações de 30 mL cada. As frações recolhidas foram reunidas de acordo com as semelhanças observadas por análise em CCD, resultando em 15 frações (Tabela 11).

Tabela 11: Fracionamento do extrato **LKRB23.1**

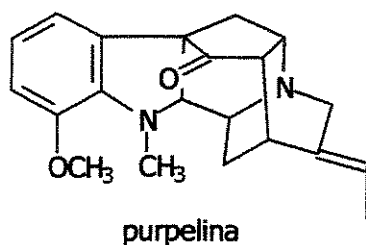
Eluente	Frações	Massa (mg)	código
$CHCl_3/MeOH$ 5%	1-3	7,0	
	4-8	185,4	LKRB33
	9-11	283,7	LKRB34
	12-14	86,4	LKRB37
	15-16	36,1	
	17-21	77,2	LKRB38
	22-26	70,0	LKRB44
	27-28	36,6	
	29-39	123,3	LKRB47
	40-43	8,6	
$CHCl_3/MeOH$ 10%	44-50	29,3	
	51-57	49,5	
	58-65	46,3	
$CHCl_3/MeOH$ 25%	66-69	66,6	
	70	28,0	
(300mL)			
total		1134 (97%)	



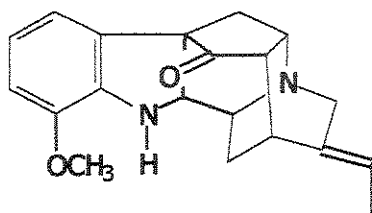
Fluxograma 4: Fracionamento do extrato LKB23.1 (diclorometânico áddo das cascas) de *R. bahiensis*.

Alcalóides isolados:**alcalóide 9: 12-demetoxi-purpelina**

- $C_{20}H_{22}N_2O$; MM: 306,17332 (encontrado), 306,17322 (calculado);
- 19,20-dideidro-ajmalan-17-ona;
- forma física: amorfo (óleo amarelo);
- $[\alpha_D]^{25}_{MeOH} 22,1$ (MeOH, c: $5.7 \cdot 10^{-3}$ mg/mL);
- UV λ_{284} nm (log ϵ) 246 (3,61); 280 (3,32); 294 (3,31);
- **alcalóide inédito;**
- **EM (70 eV, m/z (%)):** 306 (M^+ , 100), 277 (11), 219 (12), 144 (34);
- **RMN 1H e ^{13}C :** (Tabela 31 e Tabela 32 em Resultados e Discussão, pág. 87); Espectros E 51 e E 52 (Apêndice 3, pág.174);

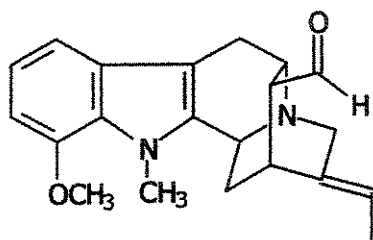
**alcalóide 10: purpelina**

- $C_{21}H_{24}N_2O_2$; MM: 336;
- 19,20-dideidro-12-metoxi-ajmalan-17-ona;
- alcalóide já isolado de cascas de caules de *R. cummininsii* e *R. vomitoria* e folhas de *R. mombasiana* e *R. reflexa*;
- **EM (70 eV, m/z (%)) :** 336 (M^+ , 100), 307 (27), 293 (9), 213 (13), 174 (37);
- **RMN 1H e ^{13}C :** Tabela 50 (Apêndice 1, pág. 138) Espectros: E 56, E 57, (Apêndice 3 pág. 177)

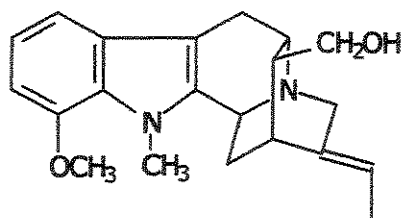
alcalóide 11: norpurpelina

norpurpelina

- $C_{20}H_{22}N_2O_2$; MM: 322;
 - 19,20-dídeidro-12-metoxi-1-demetil-ajmalan-17-ona;
 - alcalóide já isolado de cascas de caules de *R. cummininsii*, *R. mombasiana* e *R. vomitoria* e folhas de *R. mombasiana*;
 - amorfo;
 - **EM** (70 eV, m/z (%)): 322 (M^{+} , 100), 294 (16), 293 (55), 279 (17), 199 (21), 173 (14), 160 (23);
 - **RMN 1H e ^{13}C** : Tabela 49 (Apêndice 1, pág. 137);
- Espectros: E 62, E 63 (Apêndice 3, pág. 180)

alcalóide 12: 12-metoxi-N- metil- velosimina12-metoxi-N_a-metil-vellosimina

- $C_{21}H_{24}N_2O_2$; MM: 336,18360 (encontrada), 336,18378 (calculada);
- 12-metoxi-N-metil-sarpagan-17-al;
- forma física: óleo amarelo;
- $[\alpha_D]^{25}$: +1,1 (MeOH, c: $3.6 \cdot 10^{-3}$ mg/mL);
- UV λ_{284} nm (log ϵ) 284 (3,10); (MeOH)
- **alcalóide inédito**;
- **EM** (70 eV, m/z (%)) : 336 (M^{+} , 87), 307 (100), 213 (33), 212 (32), 197 (22) 168 (3);
- **RMN 1H e ^{13}C** : (Tabela 27 e Tabela 28 em Resultados e Discussão, pág. 82) Espectros: E72, E 71 Apêndice 3, pág. 184)

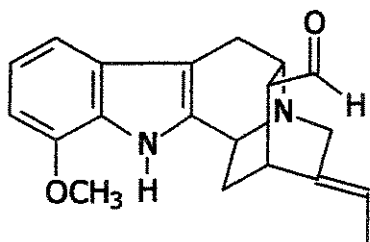


12-metoxi-afinisina

alcalóide 13: 12-metoxi afinisina

- $C_{20}H_{22}N_2O_2$; MM: 338,19972 (encontrado); 338,19943 (calculado)
- 12-metoxi-N-metil-sarpagan-17-ol
- forma física: óleo amarelo,
- $[\alpha_D]^{25}$: -0,6 (MeOH, c: $3.9 \cdot 10^{-3}$ mg/mL);
- UV λ_{284} nm (log ϵ) 274 (3,25); (MeOH);
- **alcalóide inédito**
- **EM (70 eV,m/z (%))**: 338 (M^{+} , 100), 337 (86), 323 (18), 307 (44), 213 (38), 212 (38),
- **RMN 1H e ^{13}C** : (Espectros: E 76, E 77, Apêndice 3

Discussão pág.80)



12-metoxi-velosimina

alcalóide 14: 12-metoxi-velosimina

- $C_{20}H_{22}N_2O_2$; MM: 322,16772 (encontrada), 322,16813 (calculada);
- 19,20-dideidro-12-metoxi-1-demetil-sarpagan-17-al;
- forma física: óleo amarelo;
- $[\alpha_D]^{25}$: +0,4 (MeOH, c: $5.3 \cdot 10^{-3}$ mg/mL);
- UV λ_{284} nm (log ϵ) 254 (3,78); (MeOH); 230 (4,20);
- **alcalóide inédito.**
- **EM (70 eV,m/z (%))** : 322 (M^{+} , 100), 321 (28), 293 (81), 199 (18), 181 (36)
- **RMN 1H e ^{13}C** : (Tabela 29 e Tabela 30 em Resultados e Discussão, pág 83; Espectros em E 82, E 83 em Apêndice 3, pág.:190)

Rauvolfia weddelliana* e *Rauvolfia sessilifolia

Cada parte da planta (folhas, galhos e cascas de raiz) foi tratada separadamente. Após extração etanólica exaustiva em Soxhlet, o extrato etanólico resultante, tendo eliminado o solvente em evaporador rotativo à pressão reduzida, foi submetido à tratamento ácido-base conforme fluxograma 1 e forneceu os seguintes extratos (Tabela 12 e Tabela 13)

Tabela 12: Extratos obtidos de *Rauvolfia sessilifolia* (724) e *R. weddelliana* (729)

entrada	parte da planta (quantidade em gramas)	local de coleta	exsicata	extrato etanólico (g)	extrato CHCl ₃ ácido (g)
1	folhas (186)	Buritis	729	45	LKRW05.1 1,164
2	folhas (254)	Rondonópolis	724	99	LKRW06.1 0,569
3	folhas (201g)	Buritis	729	81	LKRW08.1 1,300
4	cascas de raízes (131g)	Rondonópolis	724	22	LKRW15.1 1,760
5	cascas de raízes (g)	Buritis	729	45	LKRW31.1 1,046

Tabela 13: Extratos obtidos de *Rauvolfia sessilifolia* (724) e *R. weddelliana* (729) (cont.)

entrada	extrato CHCl ₃ neutro(g)	extrato CHCl ₃ básico (g)	extrato acetato básico (g)
1	LKRW05.2 0,236	LKRW05.3 0,144	LKRW05.4 0,289
2	LKRW06.2 0,569	LKRW06.3 0,066	LKRW06.4 0,129
3	LKRW08.2 0,223	LKRW08.3 0,047	LKRW08.4 0,229
4	LKRW15.2 1,760	LKRW15.3 0,630	LKRW15.4 0,370
5	LKRW31.2 1,046	LKRW31.3 0,169	LKRW31.4 0,1309

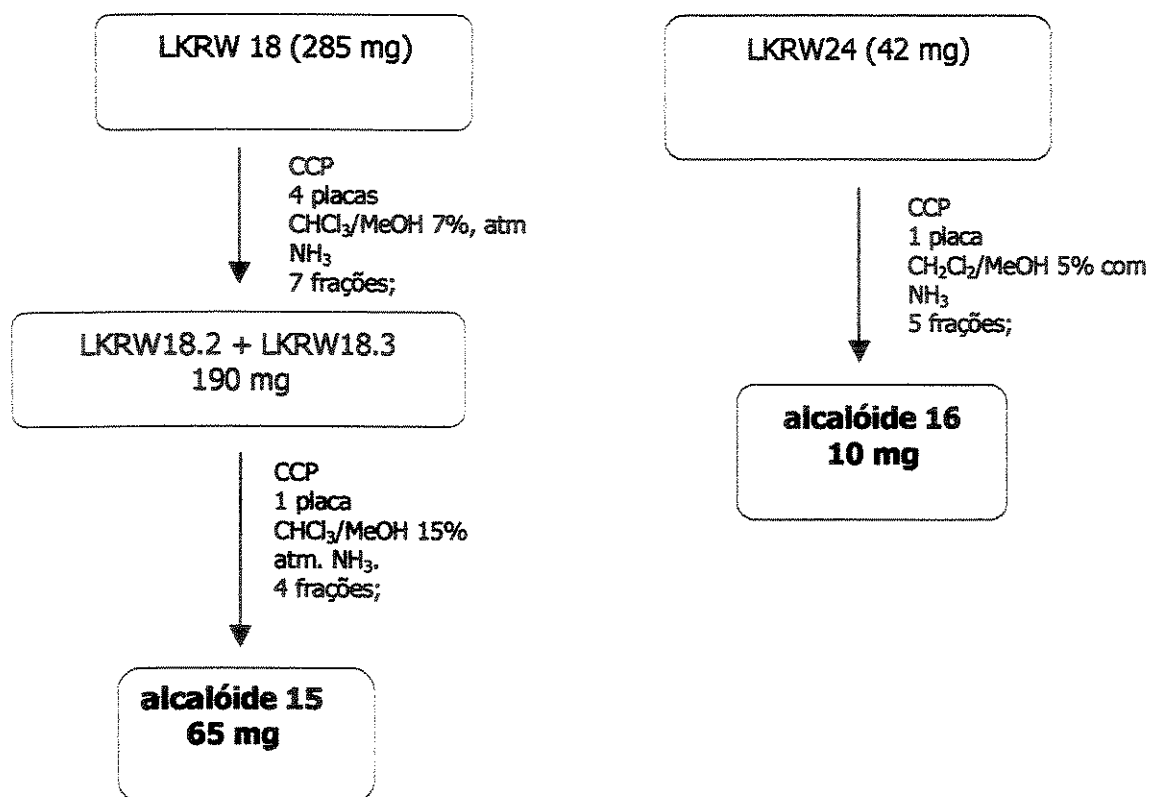
Extrato clorofórmico básico raízes - *R. sessilifolia* (LKRW15.3)

O extrato **LKRW15.3** (0,57g) foi fracionado em coluna cromatográfica sob média pressão ($\varnothing_{col} = 3$ cm); usou-se como sistema eluente $CHCl_3/MeOH$ 5% .

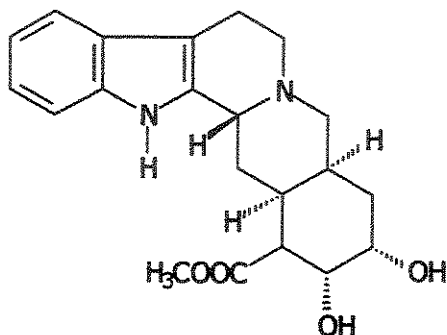
Foram coletadas 82 frações de 20 mL cada. As frações recolhidas foram reunidas de acordo com as semelhanças observadas por análise em CCD, resultando em 21 frações (Tabela 14);

Tabela 14: Fracionamento do extrato **LKRW15.3**

Eluente	Frações	Massa (mg)	código
$CHCl_3/MeOH$ 5%	1-4	1,9	LKRW24
	5-8	5,2	
	9-10	6,5	
	11	2,9	
	12	1,5	
	13-14	6,5	
	15-16	5,1	
	17-21	11,4	
	22-27	11,1	
	28	2,3	
	29	6,1	
	30-35	28,8	
	36-44	48,3	
	45	4,6	
$CHCl_3/MeOH$ 10%	46-47	13,1	LKRW18
	48-49	20,9	
	50-69	196,7	
	70-77	46,8	
	78-80	18,4	
	81	16,3	
$CHCl_3/MeOH$ 20% (250 mL)	82	17,6	
$CHCl_3/MeOH$ 30% (300mL)			
total		472 (100%)	



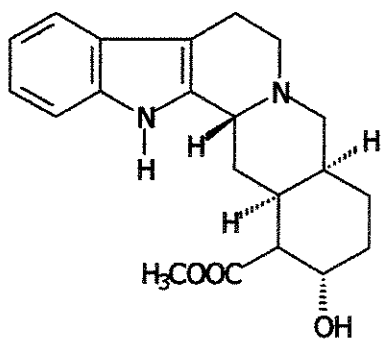
Fluxograma 5: Fracionamento por CCP das frações de LKRW15.3 (extrato CHCl₃) da raiz de *R. sessilifolia*

Alcalóides isolados:

18-hidroxi-yohimbina

alcalóide 15: 18-hidroxi-yoimbina

- $C_{21}H_{26}N_2O_4$; MM: 370
- 18-hidroxi-yoimbina
- Alcalóide isolado de outras espécies de *Rauvolfia*
- forma física: sólido amarelo
- **EM (70 eV, m/z (%))** : 370 (M^{+} , 100); 369 (94); 355 (13); 221(20); 170 (21); 169 (30); 168 (13);
- **RMN 1H e ^{13}C** : (Tabela 51 – Apêndice 1)
Espectros: E 88, E 89 Apêndice 3, pág.193;

alcalóide 16: 3-epi- α -yoimbina3 α -epi-yohimbina

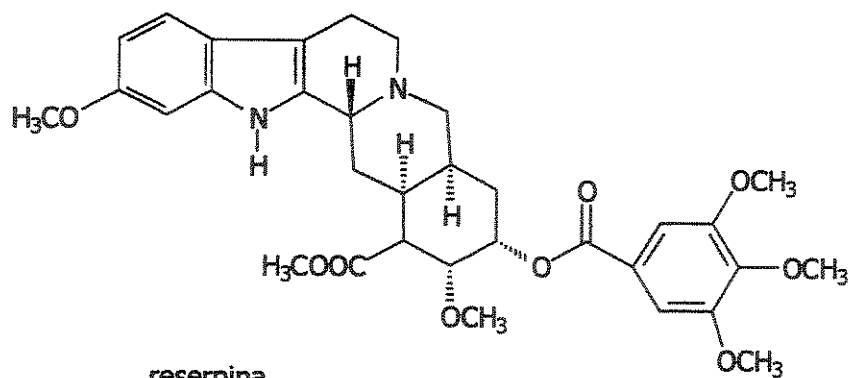
- $C_{21}H_{26}N_2O_3$; MM 354;
- (3 β ,16 β ,17 α ,20 α)-17-hidroxiyoimban-16-carboxilato de metila.
- 3-epirauwolscina
- Alcalóide já isolado de *R. serpentina* e *Voacanga africana*. (Apocynaceae)
- **EM (70 eV, m/z (%))** : 354(M^{+} , 18), 353 (16); 307 (8); 279 (7); 208 (14); 167(20); 149* (100);
- **RMN 1H e ^{13}C** (Tabela 52 -Apêndice 1, pág. 140);
Espectros: E 94, E 95 ; Apêndice 3, pág 196;

Extrato clorofórmico ácido das raízes de *R. sessilifolia* –724 (LKRW 15.1)

O extrato **LKRW15.1** (0,40g) foi fracionado em coluna cromatográfica sob média pressão ($\varnothing_{col} = 3$ cm), usou-se como sistema eluente $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 5%. Foram coletadas 42 frações de 20 mL cada, que foram reunidas de acordo com as semelhanças observadas por análise em CCD, resultando em 12 frações e isolamento de 38,1 mg da reserpina (**17**) (Tabela 15) identificada por análise da fração 4.

Tabela 15: Fracionamento de LKRW15.1

eluente	frações	massa	código
$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 5%	1-3	8,4	alcalóide 17
	4	38,1	
	5-7	97,7	
	8	26,3	
	9-11	33,8	
	12	3,5	
	13	3,1	
	14-18	41,0	
	19-27	29,7	
	28-40	15,4	
$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 10% (150 mL)	41	11,5	
$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 20% (200mL)	42	22,9	
		331,4 (93%)	

Alcalóides isolados:**alcalóide 17: reserpina**

- $C_{33}H_{40}N_2O_9$; MM:608
- (3 β , 16 β , 17 α , 18 β , 20 α)-11, 17-dimetoxi-18-[3,4,5-trimetoxibenzoila]] yohimban-16-ester metil carboxílico⁵⁵.
- serpasil, sermix,
- Alcalóide isolado de *R. serpentina*, *R. vomitoria*, *R. macrophylla* e muitas outras espécies de *Rauvolfia*; *Tenduzia longifolia*, *Vallesia dichotoma* e *Excavatia coccinea*⁵⁶.
- amorfo.
- **EM (70 eV, m/z (%))** : 608(M⁺, 100); 607 (41); 593 (11); 577 (8); 413 (13); 395 (49); 381 (21); 251(22); 221 (22); 195 (60); 169 (16);
- **RMN ¹H e ¹³C** (Tabela 53- Apêndice 1, pág. 141) Espectros: E 100, E 101; Apêndice 3, pág.199;

⁵⁵ *The Merck Index on CD-ROM*, Copyright ©Merck & Co, Inc, Whitehouse Station, London:Chapman & Hall EPD; 1998 CD-ROM.

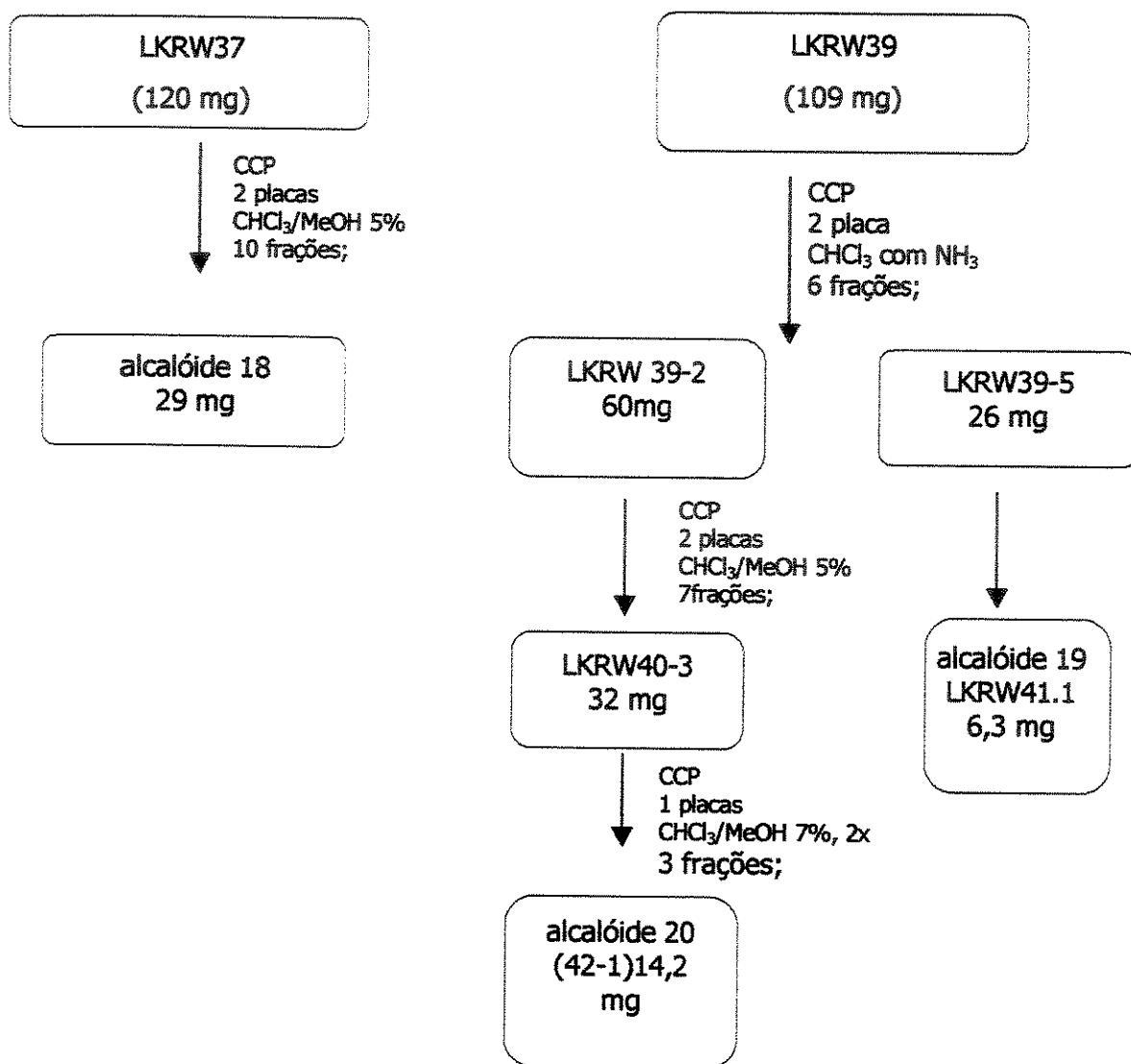
⁵⁶ SOUTHON, I. W. ; BUCKINGHAM, J.; *Dictionary of alkaloids*, 1 ed. London:Chapman & Hall Ltd. , 1989, v.1, p.914

Extrato clorofórmico ácido raízes de *R. weddelliana* -729 (LKRW 31.1)

O extrato **LKRW31.1** (0,53g) foi fracionado em coluna cromatográfica sob média pressão ($\varnothing_{col} = 3$ cm), usou-se como sistema eluente $CHCl_3/MeOH$ 5%. Foram coletadas 84 frações de 20 mL cada, que foram reunidas de acordo com as semelhanças observadas por análise em CCD resultando em 19 frações.

Tabela 16: Fracionamento de LKRW31.1

eluente	frações	massa	código
$CHCl_3/MeOH$ 5%	1-3	48,0	LKRW37
	4	124,6	
	5-6	110,3	LKRW39
	7	12,2	
	8-9	3,6	
	10-12	14,4	
	13-14	2,6	
	15-21	29,6	
	22	1,4	
	23-28	7,9	
	29-32	3,9	
	33-34	2,0	
$CHCl_3/MeOH$ 10%	35-54	8,9	
	55-64	5,1	
	64-72	72,6	
	73-84	10,2	
	85	53,8	
$CHCl_3/MeOH$ 20% (150 mL)			
$CHCl_3/MeOH$ 50% (200mL)	86	16,7	
total		527,8	(99%)



Fluxograma 6: Fracionamento por CCP de frações de LKRW 31-1, extrato clorofórmico ácido das raízes de *R. weddelliana*

Rauvolfia mattfeldiana

O material vegetal foi submetido à extração etanólica, seguida de tratamento ácido-base, tais como descrito para as outras espécies de *Rauvolfia*. Na Tabela 17 descrevemos os extratos obtidos de *R. mattfeldiana*.

Tabela 17: Extratos obtidos de *Rauvolfia mattfeldiana*

parte da planta (massa em gramas)	extrato etanolico massa (g)	extrato CHCl ₃ ácido (código e massa (g))	extrato CHCl ₃ básico (código e massa (g))	extrato acetato básico (código e massa (g))
folhas (165)	36,4	LKRM06.1 0,15	LKRM06.2 0,34	LKRM06.3 0,23
galhos (300)	16,3	LKRM03.1 0,90	LKRM03.2 0,34	LKRM03.3 0,45

Os extratos foram analisados por CG/EM e CLAE/UV e comparados aos extratos já estudados; para análise de CG usamos um aparelho Shimadzu de CG/EM, com coluna capilar DB-1 de 30 m, temperatura inicial 150 °C, rampa de aquecimento e temperatura final de 280 °C, com o tempo de análise de aproximadamente 1h. As amostras são solubilizadas em acetato de etila ou metanol, numa concentração de 10mg/mL e o volume de injeção de 1 µL.

Para análise por CLAE, usamos um aparelho Hewlett Packard modelo 1090 série II/M , com detector ultravioleta , $\lambda=280\text{nm}$, com coluna C-8, 15 cm comp., 4,6mm ϕ . Sistema eluente: fase móvel A: CH₃CN 10% , ATFA 0,1% em H₂O; fase móvel B: ATFA 0,1% em CH₃CN ; fluxo de 0,8 mL/min, com gradiente inicial de 100% de fase A e final em 50 min com 50% de fase A e 50 % de fase B⁵⁷. Volume injetado 10 µL e concentração de extrato de 5mg/mL.

⁵⁷ KLYUSHNICHENKO, V. E. et. al.; Determination of indole alkaloids from *R. serpentina* and *R. vomitoria* by high-performance liquid chromatography and high-performance thin-layer chromatography. *J. Chrom A*, v.704, p.357-362. 1995

Rauvolfia grandiflora

O material vegetal (folhas e cascas de galhos) foi submetido à extração etanólica, seguida de tratamento ácido-base, tal como descrito para as outras espécies de *Rauvolfia*. Na Tabela 18 descrevemos os extratos obtidos de *R. grandiflora*.

Tabela 18: Extratos obtidos de *Rauvolfia grandiflora*

parte da planta (g) / extrato etanólico (g)	extrato CHCl ₃ ácido (código e massa (g))	extrato CHCl ₃ neutro (código e massa (g))	extrato CHCl ₃ básico (código e massa (g))	extrato acetato básico (código e massa (g))
folhas (79)/ 32g	LKRGF 33.1 0,399	LKRGF 33.2 0,128	LKRGF 33.3 0,092	LKRGF 33.4 0,273
galhos (300)/ 80g	LKRGC 34.1 0,337	LKRGC 34.2 0,255	LKRGC 34.3 0,064	LKRGC 34.4 0,061

Os extratos foram analisados por CG/EM e CLAE/UV e comparados aos extratos já estudados, conforme descrito aos extratos obtidos de outras espécies de *Rauvolfia* neste trabalho.

3.3 Atividade Biológica:

3.3.1 Ensaios bioautográficos

Laboratório da Profa. Dra Anita Marsaiolli (IQ – Unicamp)

As amostras a serem testadas foram aplicadas em placas de CCD de sílica, com dimensões 5,5X5,5 cm utilizando-se uma microseringa. Aplicamos 60 µg de extrato em cada 'spot'.

Em cada placa de CCD, aplicamos: 10 µg de controle (antibiótico - Loprox®) e as amostras a serem testadas. Após eluição em sistema adequado, as placas de CCD foram colocadas em placas de Petri, preenchidas com 20 mL de meio de cultura. Após solidificação do meio estas placas foram inoculadas com 100 µL de uma suspensão (10^6 células/mL) de microorganismo, que foi espalhado com auxílio de uma alça. As placas foram incubadas em estufa apropriada à 27°C e após sete dias observados os halos de inibição e comparados com a placa de CCD controle.

Para cada fungo testado, utilizamos duplicatas das placas de CCD, uma para revelação com agentes químicos e outra para o crescimento dos microorganismos.

Os fungos utilizados para os bioensaios adquiridos através da Fundação Tropical André Tosello, Campinas. Foram utilizados os seguintes fungos: *Rhizopus orizae* CCT 4964, *Aspergillus fumigatus* CCT 01277, *Cladosporium cladosporioides* CCT 5039, *Fusarium oxysporium* CCT 3244, *Alternaria alternata* CCT 1250 e *Penicillium funiculosum* CCT 049.

Os bioensaios foram realizados nas dependências do laboratório da Profa. Dra. Anita J. Marsaiolli do Instituto de Química, sob supervisão da Dra. Marisa Alves Nogueira.

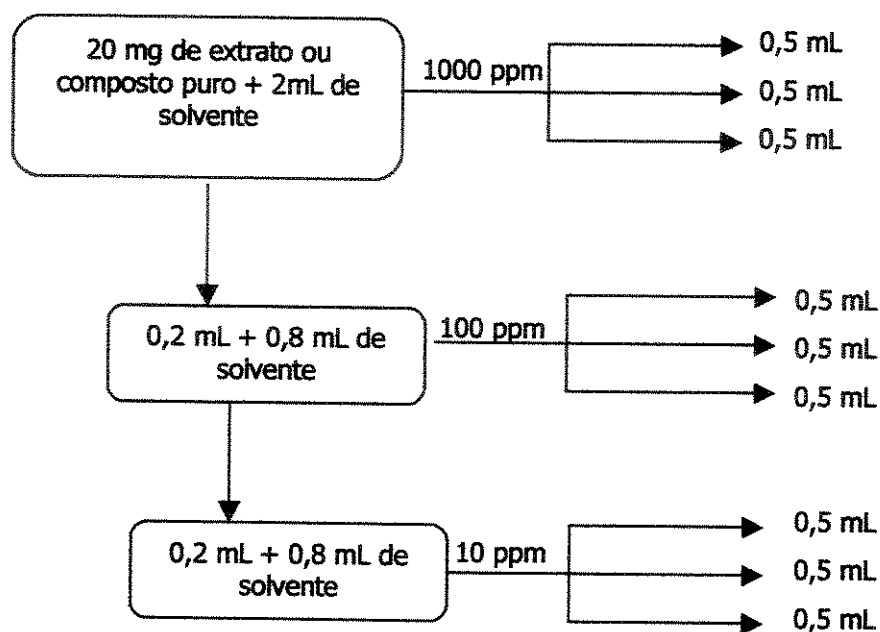
3.3.2 Bioensaio de letalidade com *Artemia salina*.

Ovos de *Artemia salina* foram colocados para eclosão em solução de sal marinho (38g/L), num recipiente coberto parcialmente, para que os ovos fiquem na parte escura e ao eclodirem, as larvas se desloquem para a parte iluminada.

As amostras são testadas inicialmente em 3 concentrações: 1000, 100 e 10 ppm (µg/mL) (Fluxograma 7). A cada frasco contendo as amostras adiciona-se: DMSO (o suficiente para

solubilizar a amostra), 3 mL de solução aquosa de sal marinho (38 g/L) e 10 larvas de *Artemia* com 48 h de vida. O volume final deve ser completado a 5mL com solução aquosa de sal marinho.

Esse teste é realizado em triplicata e com um controle (branco). As larvas sobreviventes são então contadas após 24h de ensaio. Os dados são analisados por um programa de computador que indica o valor de LC_{50} com 95% de intervalo de confiança.⁵⁸ Outras diluições são testadas após esse primeiro resultado.



Fluxograma 7: Procedimento para diluição de amostra para o teste letalidade para *Artemia salina*.

⁵⁸ MCLLAUGHLIN J. L., CHANG C.J., SMITH D.L., " "Bench-top" bioassays for the discovery of bioactive natural products: an update" - *Studies in Natural Prod. Chem.*, v.9, p.383-409. 1991.

3.3.3 Testes de atividade citotóxica.

Laboratório de Ensaíos Biológicos – CPQBA - Unicamp.

Foram realizados testes de bioatividade dos extratos etanólicos e frações alcaloídicas, para teste de inibição de proliferação de células 'in vitro', no CPQBA – UNICAMP. Este trabalho em colaboração com Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho, teve a avaliação da atividade citotóxica de cada extrato ou composto puro realizada nas 05 linhagens celulares, derivadas de 04 tipos de tumores humanos, codificados como K562 (leucemia), MCF-7 (mama), NCI-ADR (mama resistente à doxorubicina), NCI-460 (pulmão) e UACC-62 (melanoma). Dessa forma as substâncias, nas concentrações de 0,025; 0,25; 2,5; 25 e 250 µg/ml, foram adicionados em placas de 96 divisões, contendo uma linhagem por placa. Após um período de incubação de 48 horas, as células foram fixadas através da adição de ácido tricloroacético (50%). Após 60 minutos, o ácido tricloroacético foi removido por aspiração e a seguir as placas foram lavadas com água corrente para, após secagem, serem coradas com a sulforodamina B 0,4% em ácido acético 1% (SRB). O excesso de SRB foi removido das placas após 30 minutos, através de lavagem com solução de ácido acético a 1%. Finalmente, o corante foi solubilizado por adição de tampão tris base. A leitura óptica foi realizada por leitor de ELISA em 540 nm.



4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Algumas espécies de *Rauvolfia* em estudo foram coletadas em diferentes regiões do País pela botânica Ingrid Koch, outras foram coletadas nos Estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, numa viagem financiada pela FAEP. Suas exsicatas estão depositadas no Herbário do Instituto de Biologia (UEC) - Unicamp, conforme descrito na Parte Experimental deste trabalho.

4.1 Coleta:

Como um dos objetivos do nosso trabalho é o de fazer o estudo comparativo de diferentes espécies de *Rauvolfia* ocorrentes no Brasil, realizamos uma viagem, no período de 6 a 16 de janeiro de 1998, aos Estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, onde havia indicação da ocorrência de cinco espécies diferentes de *Rauvolfia*, com objetivo de coletarmos material vegetal para estudo fitoquímico.

Esta viagem foi realizada com apoio financeiro da FAEP-UNICAMP e teve participação de:

- Profa. Dra. Raquel Marques Braga
- Ingrid Koch (botânica responsável pela identificação das espécies)
- Lucilia Kato
- Renato Belinelo (motorista e ajudante de campo)

Conforme as indicações obtidas através de etiquetas de exsicatas, iniciamos o trabalho de busca e coleta das espécies de *Rauvolfia* na região de Coxim (MS), próximo ao trevo de Silviolândia, onde foram encontrados apenas dois indivíduos de *R. sessilifolia* em uma formação de cerrado aberto, bastante perturbado. A busca continuou na estrada que vai de Coxim (MS) a Rondonópolis (MT), mas nada foi encontrado até este município, uma vez que pouco resta da vegetação nativa nesta região. Atualmente, ela se encontra totalmente ocupada por plantações de soja.

Pouco depois do município de Rondonópolis outros indivíduos de *R. sessilifolia* foram encontrados, devido à ocorrência da vegetação nativa de cerrado na beira da estrada. De um destes indivíduos (exsicata 724), foi extraída uma parte da raiz para estudo químico, por esta estrutura ser geralmente rica em alcalóides. Além da raiz (rizoma), foi coletada uma grande quantidade de material para estudo químico e taxonômico desta espécie.

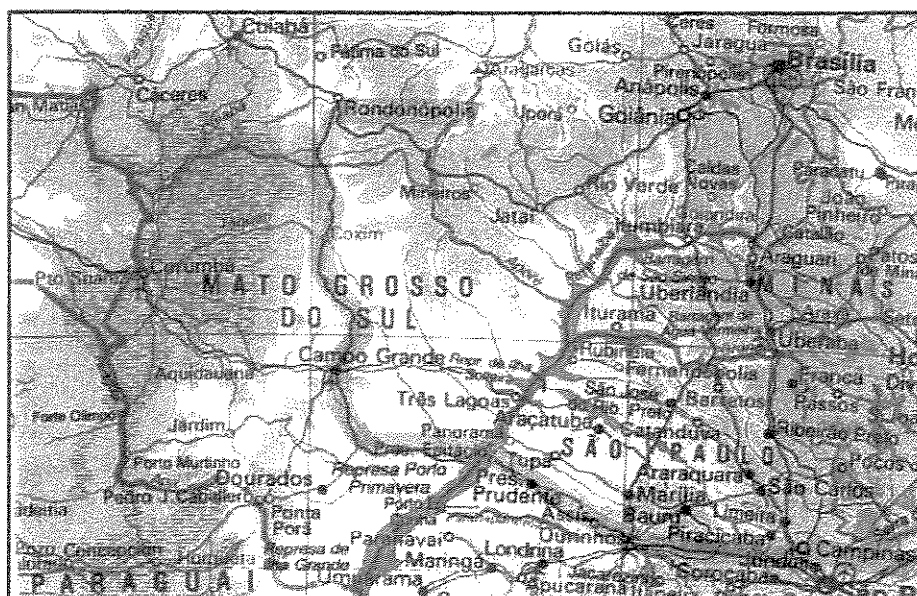


Figura 10: Mapa mostrando rota (em destaque) da viagem de coleta de Campinas (SP) à Rondonópolis (MS).

Novas coletas foram feitas posteriormente apenas na região da Chapada dos Guimarães. Próximo à cidade, foram encontrados vários indivíduos de *R. weddelliana*, em local de vegetação de cerrado aberto. Esta espécie se mostrou bastante semelhante à *R. sessilifolia*, exceto pelo seu tamanho, já que *R. weddelliana* é de menor porte. Iniciou-se então um trabalho intenso de observação e coleta nas populações desta espécie, a fim de auxiliar o estudo taxonômico. Vários indivíduos foram coletados em localidades diversas, mas para estudo fitoquímico foi coletado material apenas na região próxima ao colégio dos Buritis, Chapada dos Guimarães.

Além das formações de cerrado aberto, próximas à cidade de Chapada dos Guimarães, foram vasculhadas as vegetações de cerrado *sensu stricto*, matas ciliares e uma formação de campo de altitude em diferentes localidades do Parque. Nenhuma outra espécie de *Rauvolfia* foi encontrada na região do Parque Nacional da Chapada dos Guimarães, apesar de ainda termos contado com o auxílio de um funcionário do IBAMA, profundo conhecedor das plantas daquela região.

A partir de então, iniciou-se a busca de *R. ligustrina* na região entre Sto. Antônio de Leverger e Mimoso (Pantanal). Esta área se apresentou bastante perturbada, principalmente nas margens do Rio Cuiabá, local de nosso maior interesse. Foram realizadas coletas em matas ciliares e em formações sujeitas a encharcamento, ao longo da estrada de Sto. Antônio até próximo ao Rio Mutum e por barco nas margens dos rios Mutum e Cuiabá. Não foi encontrada nenhuma espécie de *Rauvolfia* nesta região.

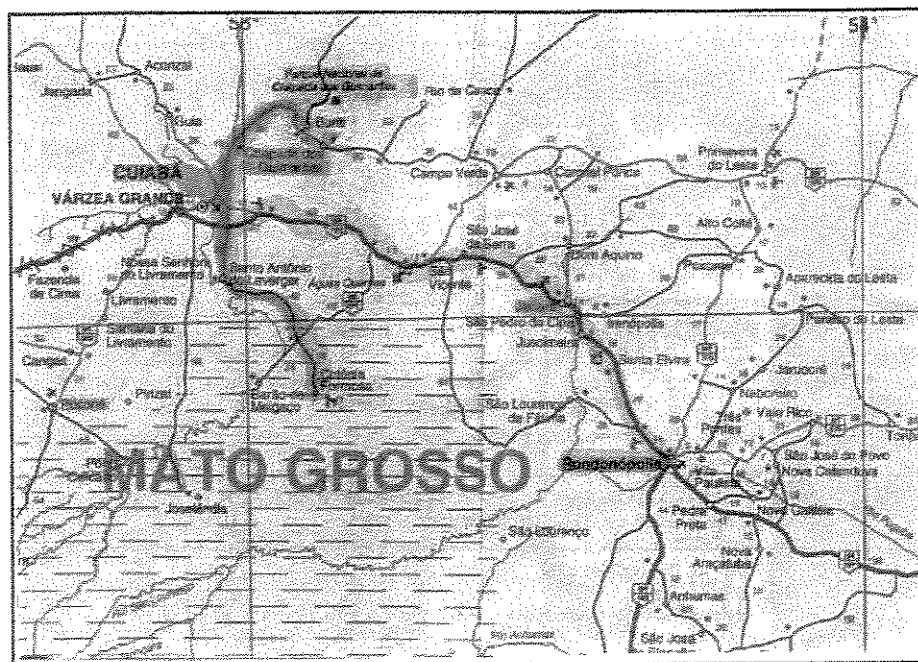


Figura 11: Mapa mostrando rota (cont.) da viagem de coleta de Rondonópolis (MS) à Chapada dos Guimarães (MT) e Barão do Melgaço (MT - Pantanal).

Desta forma, das cinco espécies com indicação de ocorrência, foram encontradas apenas duas. Isto pode ter acontecido por várias razões, entre elas: a falta de informação precisa da localização dos indivíduos; o alto índice de perturbação em algumas áreas, que podem sugerir o rareamento ou extinção de algumas espécies e o padrão disperso e pontual de distribuição de algumas espécies deste gênero, o que dificulta o trabalho de busca em regiões muito amplas.

As espécies *R. sessilifolia*, coletada em MS e *R. weddelliana* em MT, após um estudo botânico (taxonômico) mais detalhado, parecem pertencer a uma única espécie a *R. weddelliana*. Por terem sido inicialmente confundidas, resolvemos realizar seu estudo fitoquímico separadamente (por CG-EM e ou CLAE), como se fossem duas espécies diferentes, na expectativa de que esse estudo possa auxiliar ou corroborar esta classificação.

Durante a viagem, após a coleta, as plantas eram identificadas por um número, colocadas individualmente entre pranchas de jornal e madeira e postas para secar em uma estufa, que era montada toda noite. Essa estufa é constituída, basicamente, de madeiras formando uma caixa, com espaço para as pranchas com as plantas e um fogareiro à gás. Esse cuidado foi tomado para evitar a perda do material por decomposição ou ataque de fungos.

Nossa participação na coleta foi bastante importante pois possibilitou que acompanhássemos a dificuldade no reconhecimento das plantas, onde a correta identificação das espécies exige um especialista no gênero e a escolha na época da coleta deve ser feita

preferencialmente na floração das espécies desejadas, visto que as flores são um importante dado para correta identificação. No caso específico da *Rauvolfia*, os frutos também são importantes pois muitos são alongados e geminados dois a dois, o que ajuda na sua identificação.



Figura 12: Frutos (geminados) de *R. sessilifolia*

Essa viagem permitiu ainda a familiarização com diversas espécies de plantas e com os aspectos que devem ser observados para uma identificação preliminar, por exemplo: tipo de sementes (exposta, fruto ou vagem), flores (tipo, número de pétalas) e habitat (tipo de terreno, campo aberto, etc).

Além disso, foram coletados 126 novos números de plantas diversas, que foram doadas ao herbário do IB/UNICAMP (UEC). Estas amostras estão listadas no Apêndice 1I divididas por região de ocorrência e apresentadas por Família.

As espécies de *Rauvolfia* coletados nos Estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, foram inicialmente classificadas como *R. weddelliana* e *R. sessilifolia* (Figura 13 e Figura 14), como descritas na Tabela 19; no entanto, posteriormente à coleta, em uma análise mais detalhada, a botânica responsável acredita que estas duas são pertencentes à mesma espécie, ou seja, indivíduos de *R. weddelliana*.

Com a existência dessa dúvida e como estes indivíduos foram coletados em locais diferentes e em diferentes estágios de desenvolvimento, optamos pelo estudo fitoquímico em separado, visando uma possível contribuição química à resolução dessa dúvida.



Figura 13: *Rauvolfia weddelliana* coletada no Estado de Mato Grosso (1998)



Figura 14: *Rauvolfia sessilifolia* coletada no Estado de Mato Grosso do Sul (1998)

4.2 Estudo Fitoquímico:

O material vegetal foi seco em estufa à 40°C, moído e submetido à extração etanólica, cujos extratos obtidos estão descritos na Tabela 19.

Tabela 19: Extratos etanólicos obtidos de *Rauvolfia*.

código	material	massa vegetal seca (g)	espécie (exsicata)	extrato etanólico (g)
LKRB12	folhas	400	<i>R. bahiensis</i> (640)	60,0
LKRB19	galhos	395	<i>R. bahiensis</i> (640)	32,7
LKRB23	cascas de caule	265	<i>R. bahiensis</i> (640)	11,8
LKRM06	folhas	165	<i>R. mattfeldiana</i> (711)	36,4
LKRM03	galhos	300	<i>R. mattfeldiana</i> (711)	16,3
LKRGf33	folhas	79	<i>R. grandiflora</i>	32,0
LKRGc34	galhos	80	<i>R. grandiflora</i>	80,0
LKRW05	folhas	186	<i>R. weddelliana</i> (729)	46,0
LKRW06	folhas	254	<i>R. sessilifolia</i> (724)	98,9
LKRW08	folhas	200	<i>R. weddelliana</i> (729)	81,4
LKRW14	raízes (cascas)	131	<i>R. sessilifolia</i> (724)	22,0
LKRW29	raízes (cascas)	17	<i>R. sessilifolia</i> (724)	1,9
LKRW31	raízes (cascas)	45	<i>R. weddelliana</i> (729)	5,8

Devido ao caráter básico dos alcalóides e seus diferentes pK_{as} , o tratamento ácido-base (Fluxograma Parte experimental) dos extratos etanólicos de *Rauvolfia*, direciona o nosso trabalho para o isolamento destes compostos. Após esse fracionamento, analisamos esses extratos orgânicos por CCD na procura de um sistema que promova a melhor separação possível, usando cromatografia em coluna e/ou sucessivas separações por CCE.

4.2.1 *Rauvolfia bahiensis*.

Realizamos o estudo fitoquímico de folhas e cascas de caule de *Rauvolfia bahiensis*.

Descrevemos o isolamento e identificação de 13 alcalóides (Tabela 20) das folhas e cascas de *R. bahiensis* com estudos detalhados de RMN ^1H , ^{13}C , 1D e 2D para sua determinação estrutural. As estruturas estão descritas na Tabela 20 e Figura 15.

Tabela 20: Alcalóides isolados de *R. bahiensis*.

alcalóide	material de origem	quantidade (mg)
picrinina (1)		20
raucafrinolina (2)	extrato dicloro básico folhas (LKRB13)	9
normacusina B (3)		18
vinorina (4)	extrato dicloro ácido folhas (LKRB12)	31
seredamina (5)		65
sal de seredamina (6)	extrato dicloro básico cascas (LKRB23.3)	15
noreseredamina (7)		14
10-metoxi-sarpagan-17-ol (8)		10
12-demetoxi-purpelina (9)		8
purpelina (10)		18
norpurpelina (11)	extrato dicloro ácido cascas (LKRB23.1)	100
12-metoxi-N-metil vellosimina (12)		40
12-metoxi-afinisina (13)		9
12-metoxi-velosimina (14)		10

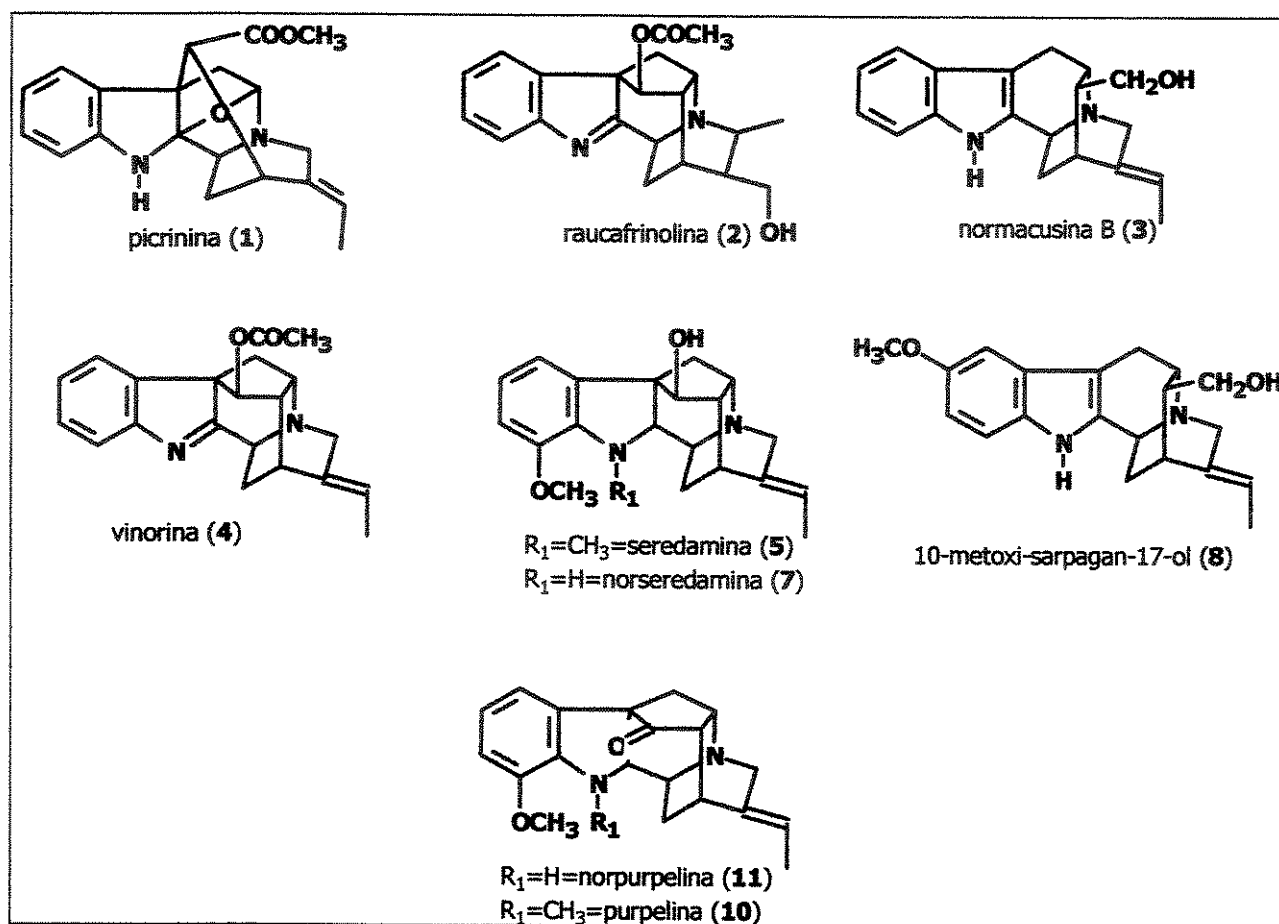


Figura 15: Estruturas dos alcalóides conhecidos isolados de *R. bahiensis*.

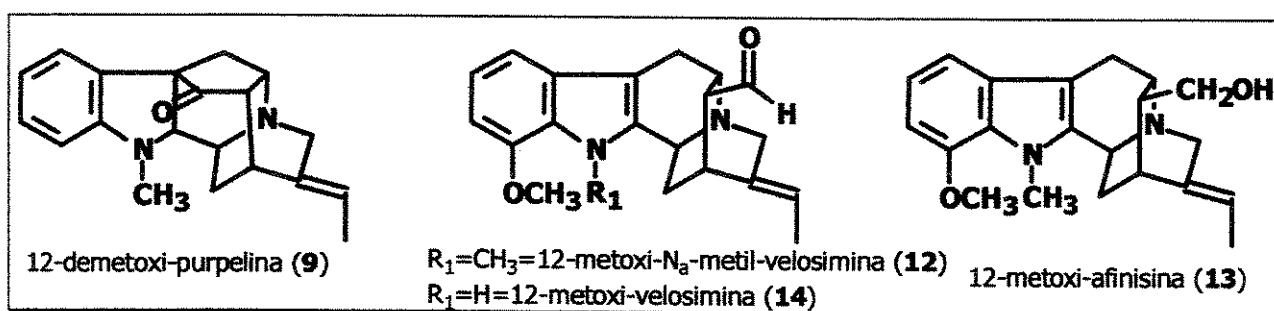


Figura 16: Estruturas dos alcalóides inéditos isolados de *R. bahiensis*.

Os alcalóides isolados de *R. bahiensis* são alcalóides indólicos com o esqueleto tipo ajmalan (ou sarpagan), bastante similares aos alcalóides já encontrados em outras espécies de *Rauvolfia*.

Os alcalóides 12-demetoxy-purpelina (**9**), 12-metoxy-N-metil-velosimina (**12**), 12-metoxy-afinisina (**13**) e 12-metoxy-velosimina (**14**), também possuem esse tipo de esqueleto, mas ainda não estão descritos em literatura, pois possuem substituintes em posições diferentes às dos isolados anteriormente.

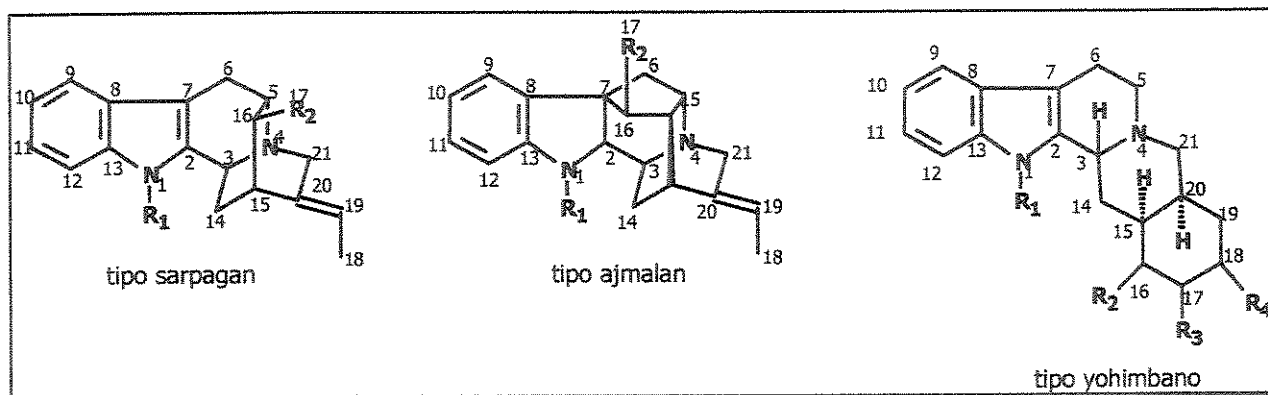


Figura 17: Esqueleto dos alcalóides indólicos encontrados em *Rauvolfia*.

Os alcalóides com esqueleto tipo sarpagan, ajmalan e yohimbano se enquadram nos alcalóides tipo corinante, na rota biossintética dos alcalóides indólicos monoterpênicos

A formação dos alcalóides tipo sarpagina/ajmalina é discutida por Lounasmaa e Hanhinen,⁵⁹ onde a proposta de Tamelen, até então aceita, é questionada.

⁵⁹ LOUNASMAA, M.; HANHINEN, P.; Biogenetic Formation of Sarpagine/Ajmaline Type Indole Alkaloids *Planta Med.* v.64, p.572-574. 1998

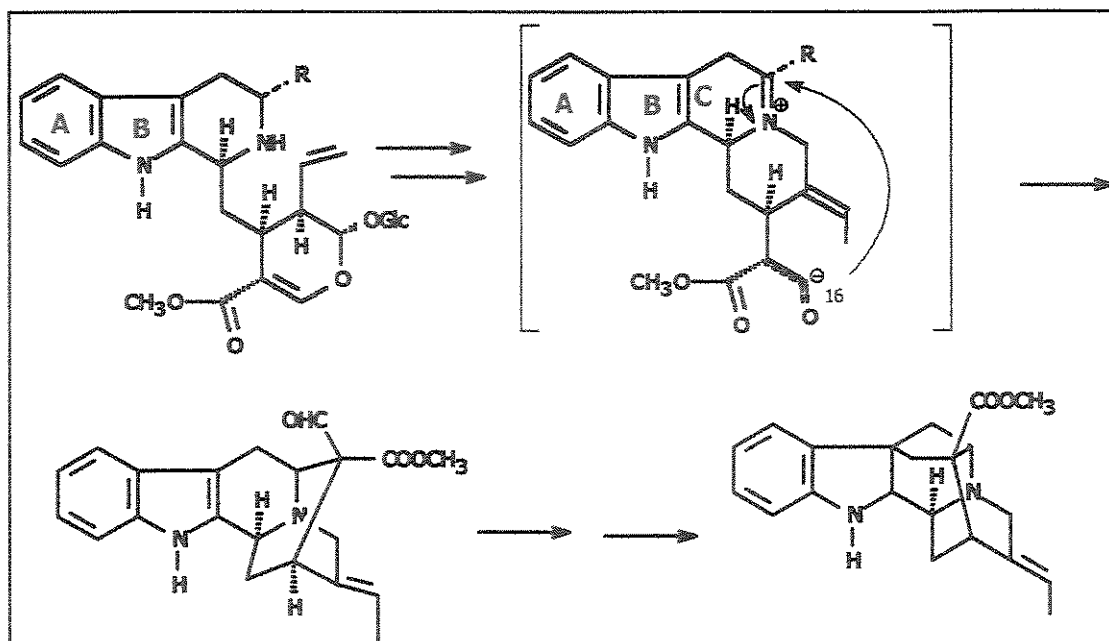


Figura 18: Proposta, de Tamelen, biossintética para formação de alcalóides tipo sarpagina e ajmalina

Nesta proposta, o intermediário iminium é atacado pelo ânion C-16 (reação de Mannich) levando ao esqueleto sarpagan e posteriormente ao esqueleto ajmalan (Figura 18).

Contudo após várias tentativas sintéticas de obtenção espontânea da ligação C-5/C-16⁶⁰, inspiradas na rota biogenética de Van Tamelen, Lounasmaa propõe, que a formação da ligação C-5/C16 ocorra antes do fechamento do anel D, conforme Figura 19.

⁶⁰ LOUNASMAA, M.; HANHINEN, P.; Studies on the biomimetic preparation of sarpagan ring system. Attempts to apply the spontaneous Biogenetic-type Cyclization of van Tamelen to bond formation between C-5 and C16 in Corynantheine series. *Tetrahedron*, v.52, p.15225-15242. 1996

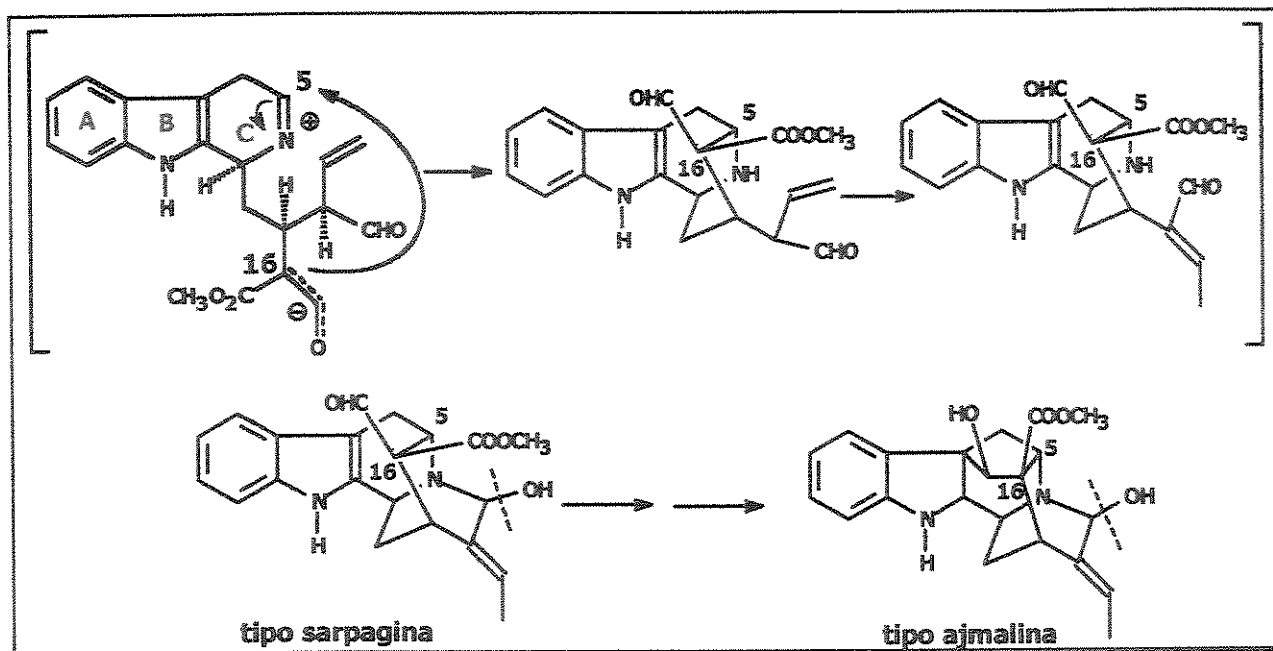


Figura 19: Proposta de Lounasmaa para formação da ligação C-5 e C-16.⁵⁹

A observação do comprimento de ligação entre C5 e C16 nos dois intermediários iminium, mostra que, no intermediário proposto por Lounasmaa, a distância de 1,5 Å é mais favorável à formação, do que no intermediário iminium proposto por Van Tamelen (2,7 Å).

O isolamento da sandwicolina (Figura 20), de *R. serpentina* por Siddiqui⁶¹, corrobora esta proposta de formação da ponte C5-C16 antes do fechamento do anel D.

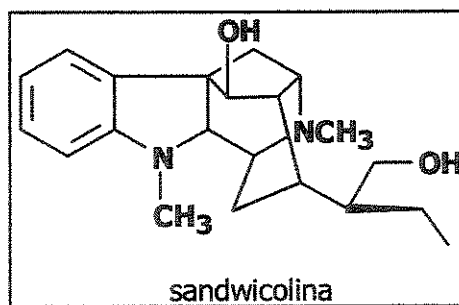


Figura 20: Sandwicolina isolada de *R. serpentina*.⁶²

⁶¹ SIDDQUI, S., AHMAD, S. S., HAIDER, S. I., SIDDQUI, B. S. Isolation and structure of a new alkaloid from the roots of *Rauwolfia serpentina* benth *Heterocycles*, v. 23, n.3, p.617-622. 1985

⁶² LOUNASMAA, M.; HANHINEN, P.; Biogenetic Formation of Sarpagine/Ajmaline Type Indole Alkaloids *Planta Med.* v.64, p.572-574. 1998

4.2.2 *Rauvolfia weddelliana* e *R. sessilifolia*

Durante a viagem de coleta realizada em 1998, os indivíduos de *Rauvolfia*, coletados na região de Buritis, foram inicialmente identificados como *R. weddelliana* (exsicata 729) e os indivíduos coletados em Rondonópolis, identificados como *R. sessilifolia* (exsicata 724).

Uma revisão taxonômica mais detalhada, indica serem indivíduos da mesma espécie, *R. weddelliana*, contudo este estudo taxonômico ainda não está concluído⁶³.

Na tentativa do estudo fitoquímico auxiliar no trabalho botânico, realizamos este estudo fitoquímico nas duas plantas, como se fossem diferentes espécies, e para melhor identificação e diferenciação, ao lado de cada extrato, está descrito o número da exsicata, 724 ou 729.

Extrato clorofórmico básico da raiz de *R. sessilifolia* (724) (LKRW15.3)

O tratamento por cromatografia rápida em coluna, do extrato diclorometânico básico (LKRW15.3) de *R. sessilifolia*, com posterior tratamento por CCE das frações permitiu o isolamento dos alcalóides descritos na Tabela 21 e na Figura 21:

Tabela 21: Alcalóides obtidos por tratamento do extrato clorofórmico básico das cascas de raízes de *R. sessilifolia*.

frações	massa (mg)	Identificação
LKRW 19.2 (sal de seredamina) (6)	13	CG e co-CCD
LKRW19.4 (18-hidroxi-yoimbina) (15)	65	RMN
LKRW24-3 (3 α -epi-yohimbina) (16)	10	RMN

Nas raízes de *R. sessilifolia* foram isolados, além do sal de seredamina (6), alcalóides com esqueleto yoimbano que não foram encontrados em *R. bahiensis*.

⁶³ KOCH, I., O gênero *Rauvolfia* L.; (Apocynaceae) nas neotropicais; Tese (em andamento - Doutorado em Botânica), Dep. de Botânica do Instituto de Biologia, Unicamp;- sob orientação de Profa. Dra. Luiza S. Kinoshita e Prof. Dr. Volker Bittrich

Extrato clorofórmico ácido das cascas de raízes de *R. sessilifolia* (724)

O tratamento por cromatografia rápida em coluna de 390 mg de extrato diclorometânico ácido (**LKRW15.1**), levou-nos à obtenção de 38 mg do alcalóide reserpina (**17**), importante medicamento, usado comercialmente para o tratamento de hipertensão e arritmia, um rendimento de 0,13% em relação à massa vegetal seca. Amer e Court⁶⁴ isola das cascas de raízes de *R. nitida*, 685 mg de reserpina, o que representa 0,034% de rendimento em relação à massa vegetal seca.

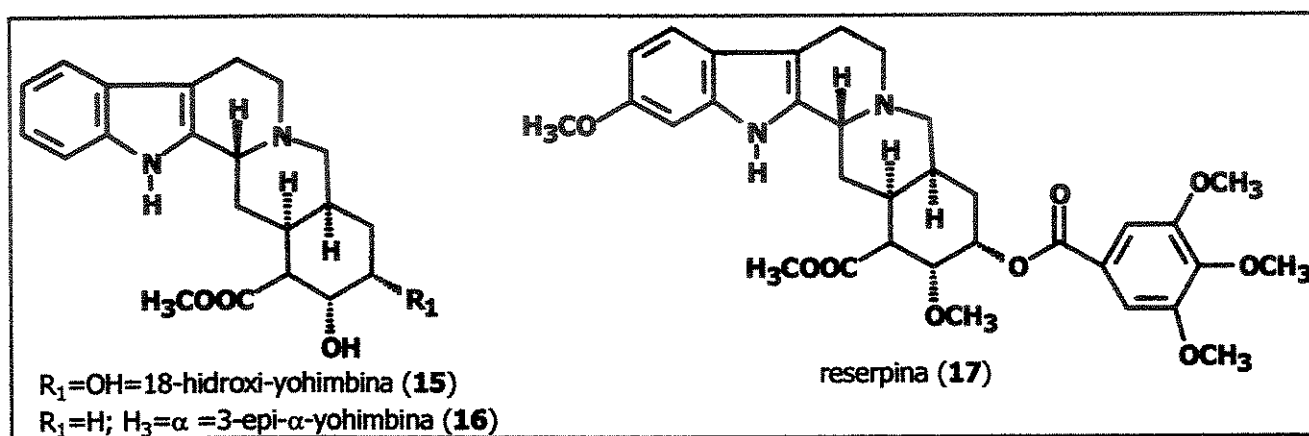


Figura 21: Alcalóides isolados da raiz de *R. sessilifolia* (724)

⁶⁴ AMER, M. A.; COURT, W. E.; Alkaloids of *Rauwolfia nitida* root bark. *Phytochemistry*, v.20, n.11, p.2569-2573. 1981

Extrato clorofórmico ácido das cascas de raízes de *R. weddelliana* (729 - LKRW 31.1)

Visto a possibilidade dos indivíduos de *Rauvolfia*, coletada em Buritis, ser pertencente à outra espécie, iniciamos a marcha fitoquímica desses indivíduos separadamente. O mesmo tratamento ácido-base foi realizado, conforme já descrito para as outras espécies de *Rauvolfia*.

Iniciamos a triagem fitoquímica para o extrato clorofórmico ácido das raízes de *R. 729*, onde por CCD, observamos a ausência de reserpina (**17**) e a presença de um outro alcalóide diferente dos observados nos extratos de LKRW15 (indivíduo 724).

O tratamento por cromatografia rápida em coluna de 520mg desse extrato com posterior tratamento por CCE possibilitou o isolamento do alcalóide reserpilina **18** :

Tabela 22: Alcalóides isolados do extrato clorofórmico ácido das raízes de *R. weddelliana* (LKRW31-1)

frações	quantidade (mg)
LKRW37-5	29,9
reserpilina (18)	

O alcalóide reserpilina **18**, já isolado de outras espécies de *Rauvolfia*, possui esqueleto yohimbano, diferente dos isolados de *Rauvolfia* 724, pela presença do heteroátomo no anel E.

Interessante notar que não foi observada a presença de reserpina **17** neste extrato.

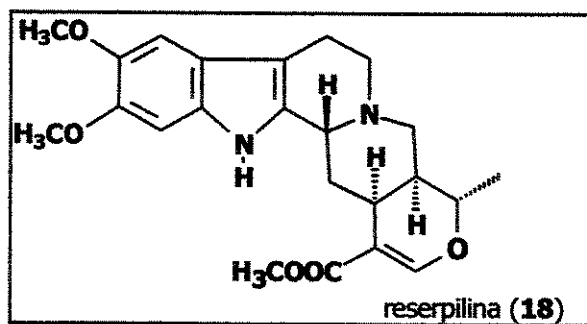


Figura 22: Alcalóide isolado de *R. weddelliana* (exsicata 729)

***Rauvolfia sessilifolia* (exsicata 724) e *R. weddelliana* (exsicata 729)**

As frações alcaloídicas, provenientes dos outros extratos de folhas e raízes de *R. sessilifolia* e *R. weddelliana* (724 e 729, descritos nas Tabela 19 e Tabela 35) foram analisadas por CG/EM e CLAE/UV, que serão posteriormente discutidas.

4.2.3 *Rauvolfia grandiflora* e *Rauvolfia mattfeldiana*.

Realizamos o tratamento ácido-base para os extratos etanólico das folhas e galhos de *R. grandiflora*, coletados em Santa Tereza no Espírito Santo e *R. mattfeldiana* coletada na Bahia.

O estudo fitoquímico destas duas espécies se restringiu ao estudo das frações alcaloídicas por CG/EM e CLAE que será discutido posteriormente.

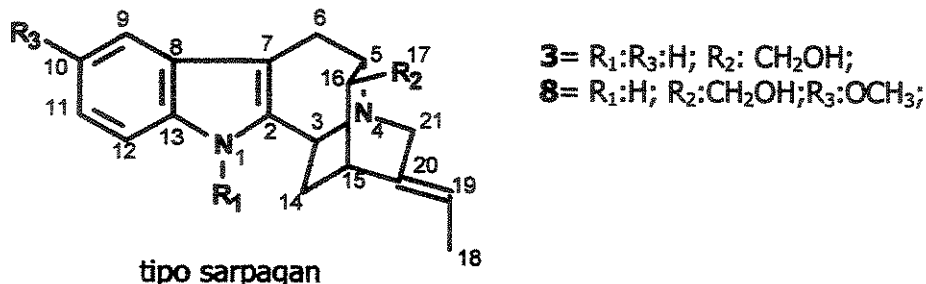
4.2.4 *Rauvolfia vomitoria*

Realizamos o tratamento ácido-base para os extratos etanólico das folhas e galhos de *R. vomitoria*, coletados no Campus.

O seu estudo fitoquímico fez parte do trabalho de Iniciação Científica do aluno Amarildo Grando (PIBIC-CNPq).

4.3 Análise espectroscópica dos alcalóides isolados:

4.3.1 Alcalóides indólicos tipo sarpagan:



normacusina B (3); 10-metoxi-sarpagan-17-ol (8)

O espectro de massas dos alcalóides com esqueleto tipo sarpagan mostra pico do íon molecular pronunciado e pico em m/z (M-1), que é característico de esqueleto tetrahydro- β -carbolina e é atribuído à perda do hidrogênio ligado ao C-3 com formação de fragmento cuja carga é estabilizada por conjugação com o sistema indólico e par de elétrons do N_b.⁶⁵

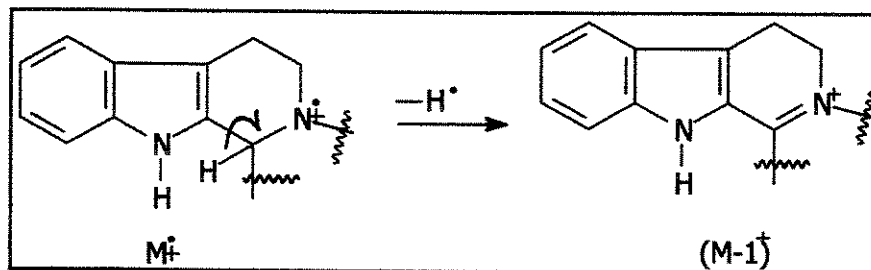


Figura 23: Proposta de formação do íon molecular e m/z M-1 para alcalóides com esqueleto tetrahydro- β -carbolina.

Outro pico característico de esqueletos tipo sarpagina é a perda de C-16, com seus substituintes, mais um hidrogênio. Este pico torna-se mais pronunciado quando C-16 é mais substituído.⁶⁵

⁶⁵ DJERASSI, C., BUDZIKIEWICZ, H.; WILLIAMS, D. H., *Structure elucidation of natural products by mass spectrometry*, vol I: alkaloids, São Francisco, Holden-Day, Inc, 1964. p.77-88.

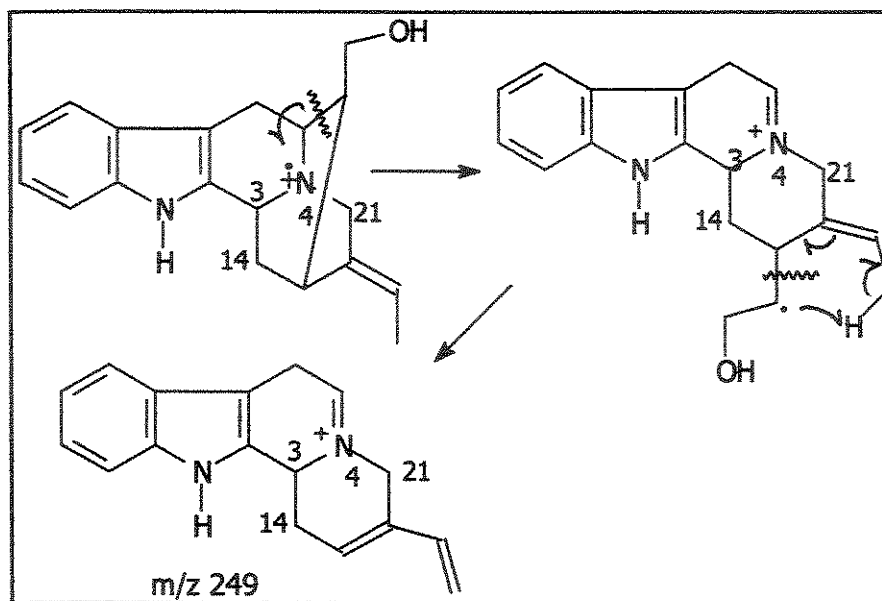


Figura 24: Proposta de fragmentação de compostos tipo sarpagan com formação de m/z 249

A produção de m/z 169, 168, 170 e 184 pode ser visualizada pela homólise da ligação C3-C14 (Figura 25).

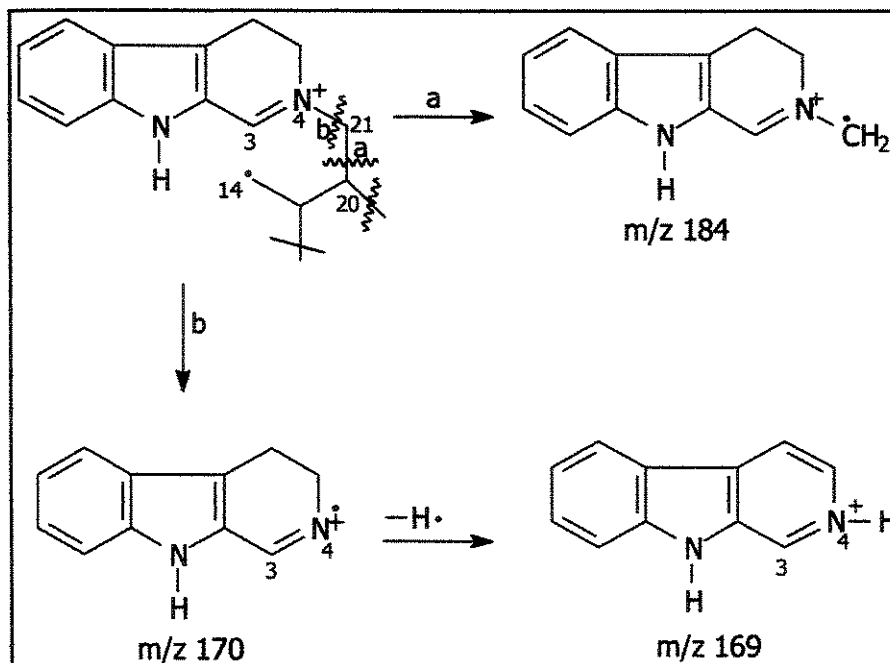


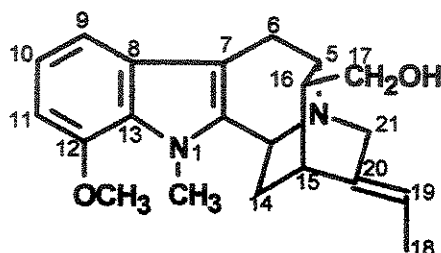
Figura 25: Proposta de fragmentação para alcalóides com esqueleto tipo *sarpagan* com formação de m/z 169; 170 e 184

O 10-metoxi-sarpagan-17-ol (**8**), apresenta a mesma fragmentação proposta para a normacusina B, acrescida de 30 daltons, correspondente ao substituinte metoxila no anel aromático.

Analizamos detalhadamente os espectros de RMN ^1H e ^{13}C com a devida atribuição dos sinais, que estão descritas na Tabela 42 e Tabela 43, no Apêndice 1, págs. 130 e 131).

Uma característica importante do esqueleto tipo sarpagan é a presença de 4 sinais de ^{13}C sp^2 na região 134 a 104 δ que são atribuídos aos carbonos quaternários do núcleo indólico.

12-metoxi-afinisina (**13**) (alcalóide inédito)



O espectro de massas (alta resolução) mostra íon molecular (m/z)=338,19972, concordante com a fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_2$ (massa calculada: 338,19958). O íon molecular excede 14 daltons o íon molecular da 10-metoxi-sarpagan-17-ol (m/z 324) sugerindo a substituição de um hidrogênio por uma metila e excede 44 daltons o íon molecular da normacusina (m/z 294) sugerindo a substituição de um hidrogênio por uma metila e de outro por uma metoxila. Outro pico importante (m/z 307) sugere a perda de CH_2OH .

O espectro de RMN ^1H mostra o singlete em 3,91 δ (3H) correlacionado ao ^{13}C em 32,43 δ o que revela a presença de N-metila.

O desdobramento dos prótons aromáticos em 6,61 (1H, d, 8Hz), 6,96 (1H, t, 8 Hz) e 7,05 (1H, d, 8Hz) sugere que o anel seja monossustituído na posição 9 ou 12. O sinal em 3,93 (3H) e ^{13}C em 55,40 δ , confirma a presença da metoxila.

A atribuição da substituição na posição 12 do anel aromático do núcleo indólico foi feita considerando-se o efeito do substituinte nos deslocamentos químicos de ^{13}C do anel.

Assim, tornando-se a afinisina como padrão, calculamos os deslocamentos químicos de ^{13}C para substituição nas posições 9 e 12 utilizando os incrementos descritos por Silverstein e

colaboradores⁶⁶ para o efeito do substituinte no deslocamento do sinal de ^{13}C para o anel benzênico (Tabela 23 e Tabela 24):

Tabela 23: Incrementos no sinal de ^{13}C para os carbonos do anel benzênico:

substituinte	C1	C2	C3	C4
$-\text{OCH}_3$	+31,4	-14,4	+1,0	-7,7

Tabela 24: Valores estimados para os carbonos aromáticos do núcleo indólico, usando a afinisina como padrão:

C	afinisina ⁶⁷	previsto 9-metoxi	previsto 12-metoxi	observado alcalóide 13
9	117,9	149,3	110,2	111,1
10	118,7	104,3	119,7	119,2
11	120,8	121,8	106,4	102,5
12	108,5	100,8	139,9	147,5

Visto essa análise além da comparação dos seu dados com os alcalóides normacusina B (**3**), e 10-metoxi-sarpagan-17-ol (**8**) sugere-se que o composto (**13**) seja o derivado 12-metoxi substituído do conhecido alcalóide afinisina ^{67, 68}

⁶⁶ SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G.C.; TERENCE, C.M. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 5th Ed., New York, John Wiley & Sons, 1991, p240.

⁶⁷ CLIVIO, P et al., Alkaloids from leaves and root bark of *Ervatania hirta*, *Phytochemistry*, v. 30, p. 3785-3792, 1991.

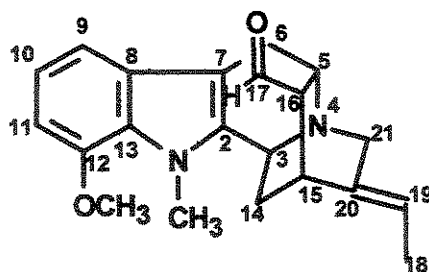
⁶⁸ BRAGA, R.M.; REIS, F.A.M.; Quaternary alkaloids from *Peschiera fuchsiaefolia*. *Phytochemistry*, v.26,n.3 p.833-836, 1987.

Tabela 25: Deslocamentos de RMN ^1H (δ) para **12-metoxi-afinisina (13)**.

posição	^1H (δ)	multiplicidade ; J (Hz)
3	4,19	d; 8
5	2,80	
6 α	2,59	d; 15
6 β	3,04	dd; 15, 5
9	7,05	d; 8
10	6,96	t; 8
11	6,61	d; 8
14	1,67	dt; 12, 3
	2,07	td, 12, 2
15	2,80	
16	1,80	dd; 7, 2
17	3,50	dd; 11, 9
	3,57	dd,; 11, 6
18	1,64	d, 7
19	5,41	q, 7
21	3,63	
N $_a$ -CH $_3$	3,91	s
O-CH $_3$	3,93	s

Tabela 26: Deslocamentos de RMN ^{13}C (δ) para **12-metoxi-afinisina (13)**.

posição	^{13}C (δ)
2	135,8
3	49,4
5	54,2
6	27,0
7	103,8
8	126,6
9	111,1
10	119,2
11	102,5
12	147,5
13	129,4
14	32,9
15	27,5
16	44,3
17	65,0
18	12,8
19	116,7
20	139,7
21	56,2
N $_a$ -CH $_3$	32,4
O-CH $_3$	55,4

12-metoxi-N-metil-velosimina (12) (alcalóide inédito)

O espectro de massas (alta resolução) mostra íon molecular (m/z) = 336,18378, concordante com a fórmula molecular $C_{21}H_{24}N_2O_2$ (massa calculada: 336,18392). O espectro de IV mostra a presença de função carbonila (1721 cm^{-1}).

No espectro de RMN ^1H , (E 69 – Apêndice 3) observamos um singlete em 3,90 δ que corresponde a 6 hidrogênios (6H) que atribuímos à metoxila (substituinte no anel aromático) e à metila do N-indol, pois no experimento de HETCOR este sinal de ^1H está correlacionado aos carbonos metílicos em 32,45 e 55,35 ppm, confirmando a presença de N-metila e metoxila no anel aromático.

Pelo desdobramento dos sinais na região de H aromáticos (6,61 δ (dd, 7,3 e 0,7 Hz), 6,96 δ (t, 7,7Hz) e 7,02 δ (dd, 7,7 e 0,7Hz)) deduzimos que a substituição seria ou na posição 9 ou na 12, (devido à multiplicidade dos sinais e pelos valores das constantes de acoplamento). Pela correlação com os seus respectivos deslocamentos de ^{13}C (HETCOR) e a comparação com dados anteriormente descritos para 12-metoxi afinisina (13), atribuímos a posição da metoxila em 12.

A presença de um singlete em 9,61 δ (1H) correlacionado a um C em 202,6 δ evidenciou a presença de um aldeído.

Os sinais em 5,35 δ (q, 7Hz, 1H) e em 1,61 δ (dt, 7 e 2 Hz, 3H) revelam a presença de um etilideno com um C em 117,0 (CH) e outro em 12,6 δ (CH_3).

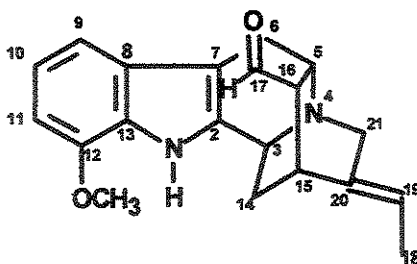
A ausência de deslocamentos de ^{13}C na região próxima à 60 δ , a presença de deslocamentos de carbono sp^2 na região entre 103 e 147 δ , típicos de carbonos indólicos e análise de HETCOR e COSY nos sugerem um alcalóide indólico com esqueleto sarpagan. O deslocamento em 27,2 δ atribuído ao C6 e 32,9 δ ao C14, demonstram que o grupo aldeídico (CHO) em C16 deve estar próximo ao núcleo aromático. A atribuição completa está descrita na Tabela 27 e Tabela 28.

Tabela 27: Deslocamentos de RMN ^1H (δ) para **12-metoxi-N-metil-velosimina (12)**.

posição	^1H (δ)	multiplicidade ; J (Hz)
3	4,23	dd; 2, 10
5	3,63	sl
6α	2,56	dd; 2, 16
6β	3,11	dd; 6, 16
9	7,04	t; 7
10	6,96	dd; 7, 1
11	6,61	t; 7
14α	2,11	ddd, 12, 4, 2
14β	1,75	td, 12, 2
15	3,18	m
16	2,46	d; 12, 6
17	9,61	d; 1
18	1,61	dt; 7, 2
19	5,35	q, 7
21	3,63	sl
N$_2$-CH$_3$	3,90	s
O-CH$_3$	3,90	s

Tabela 28: Deslocamentos de RMN ^{13}C (δ) para **12-metoxi-N-metil-velosimina (12)**.

posição	^{13}C (δ)
2	134,5
3	49,3
5	50,4
6	27,2
7	103,3
8	126,7
9	111,1
10	119,4
11	102,6
12	147,6
13	129,2
14	32,3
15	26,5
16	54,6
17	202,6
18	12,6
19	117,0
20	139,3
21	56,0
N$_2$-CH$_3$	32,5
O-CH$_3$	55,4

12-metoxi-velosimina (14) (alcalóide inédito)

O espectro de massas (alta resolução) mostra íon molecular (m/z)=322,16772, concorda com a fórmula molecular $C_{20}H_{22}N_2O_2$ (massa calculada: 322,16826), 14 daltons a menos que o alcalóide **12**, sugerindo a substituição de CH_3 por H.

O espectro de RMN 1H e ^{13}C sugerem um alcalóide indólico tipo sarpagan similar ao alcalóide **12**, exceto pela integração do singlete em 3,96 δ (3H) correspondente apenas à metoxila do anel aromático, ou seja há ausência do sinal correspondente à N-metila e presença de singlete em 8,20 δ correspondente ao próton N-indólico.

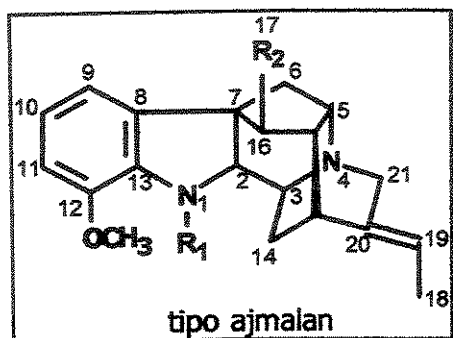
Tabela 29: Dados de 1H (δ) do alcalóide **12-metoxi-velosimina (14)**

posição	1H (δ)	multiplicidade; J (Hz)
1	8,20	s
3	4,28	d; 9
5	3,65	t;
6α	2,58	dd; 16, 1
6β	3,18	dd; 16, 5
9	7,07	d; 8
10	7,02	t; 8
11	6,64	d; 8
14	1,83	d; 12
	2,10	td; 12, 2
15	3,20	sl
16	2,51	d; 7
17	9,61	s
18	1,60	d; 7
19	5,34	q; 7
21	3,6~3,7	m
O-CH₃	3,96	s

Tabela 30: Dados de ^{13}C (δ) do alcalóide **12-metoxi-velosimina (14)**

posição	^{13}C (δ)
2	133,5
3	50,2
5	50,4
6	27,1
7	104,6
8	126,6
9	111,1
10	120,0
11	102,0
12	146,0
13	133,5
14	32,8
15	26,8
16	54,8
17	202,3
18	12,6
19	117,3
20	136,8
21	55,3
O-CH₃	55,4

4.3.2 Alcalóides indólicos tipo ajmalan:



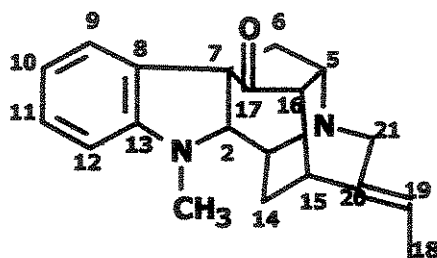
- 5** = $R_1:CH_3$; $R_2:OH$;
7 = $R_1:H$; $R_2:OH$;
10 = $R_1:H$; $R_2:CO$;
11 = $R_1:CH_3$; $R_2:CO$;

norseredamina (7), seredamina (5), norpurpelina (10) e purpelina (11):

Observamos no E.M destes alcalóides que o íon molecular é bastante pronunciado e apresenta pouca fragmentação. O pico em m/z (M-1) não é tão evidente como nos alcalóides tipo sarpagan. Um pico comum entre esses alcalóides (sarpagan e ajmalan) é em m/z 169 (acrescido de 30 daltons (m/z 199) quando há presença de metoxila no anel aromático ou acrescido de 44 daltons quando há substituição do H por N_a-CH_3 e metoxila (m/z 213)) cuja proposta de fragmentação é a mesma descrita na Figura 25.

Os dados de RMN ^{13}C se diferenciam pela presença de sinal de C_{β} em torno de 60 atribuído ao C7 e presença de C_{sp^3} em torno de 70 atribuído ao C2.

A total atribuição dos dados de RMN de 1H e ^{13}C para estes alcalóides já conhecidos na literatura, estão nas Tabela 46, Tabela 47, Tabela 49 e Tabela 50 do Apêndice 1.(págs :134, 135, 137 e 138).

12-demetoxi-purpelina (9) (Alcalóide inédito)

O espectro de massas (alta resolução) mostra íon molecular (m/z)=306,17323 concordante com a fórmula molecular $C_{20}H_{22}N_2O$ (massa calculada: 306,17336) e 30 daltons a menos que o íon molecular encontrado para purpelina **10**.

O espectro de RMN 1H , mostra os singletos em 2,82 δ (3H) correlacionado ao ^{13}C em 34,4 δ , revelando a presença de N-metila.

Os deslocamentos em 5,34 δ (1H, q, 7Hz) e em 1,66 δ (3H, d, 7Hz) revelam a presença de um etilideno com C em 116,7 (CH) e 13,0 δ (CH_3).

Pelo espectro de RMN ^{13}C observamos a presença de carbonila em 213,2 ppm. A presença de carbonos sp^3 em 58,3 δ (C7) e 78,8 δ (C2) sugerem que o alcalóide tenha esqueleto ajmalan com a carbonila em C17. A comparação com a purpelina **10** e norpurpelina **11** sugere que o alcalóide **9** seja um derivado da purpelina **10**, sem a substituição no anel aromático. A atribuição completa está descrita na Tabela 31 e Tabela 32 (pág 87).

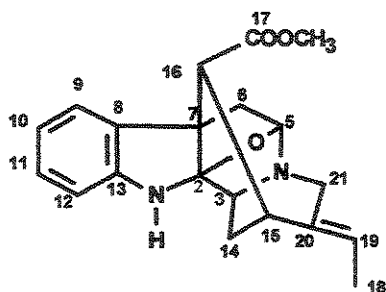
Tabela 31: Dados de ^1H (δ) do alcalóide **12-demetoxi-purpelina (9)**

posição	^1H (δ)	multiplicidade ; J (Hz)
2	3,77	d; 10
5	3,31	t; 6
6α	1,73	dd; 12, 5
6β	2,50	d; 12
8	7,24	dl; 7
9	6,86	tl; 7
10	7,18	tl; 8
11	6,68	dl; 8
14α	1,95	tl; 14
14β	1,45	dd; 14, 4
15	3,23	t; 6
16	2,66	m; -
18	1,66	d; 7
19	5,34	q; 7
21	3,55	sl
N$_2$-CH$_3$	2,82	s

Tabela 32: Dados de ^{13}C (δ) do alcalóide **12-demetoxi-purpelina (9)**

posição	^{13}C (δ)
2	78,8
3	50,0
5	53,3
6	34,8
7	58,3
8	129,0
9	122,5
10	120,1
11	128,2
12	110,0
13	154,0
14	31,4
15	28,5
16	50,3
17	213,2
18	13,0
19	116,7
20	136,5
21	55,4
N$_2$-CH$_3$	34,4

Picrinina 1:



Observamos que no E.M. da picrinina o pico correspondente ao pico do íon molecular não é tão evidente quanto nos outros alcalóides, o pico base tem 16 daltons a menos. Outra característica é o pico em m/z ($M - 59$) correspondente à perda de OCOCH_3 .

No espectro de I.V. observa-se uma banda fina em 1723 cm^{-1} característica de carbonila e uma banda fina em 3390 cm^{-1} que foi atribuída ao estiramento N-H.

No espectro de RMN ^1H observamos a presença de um sistema em $\delta 7,15$ (d, $J=7\text{ Hz}$), $7,09$ (t, $J=7\text{ Hz}$), $6,80$ (d, $J=7\text{ Hz}$), $6,75$ (t, $J=7\text{ Hz}$), correspondente aos quatro prótons aromáticos do núcleo indólico.

Os deslocamentos em $5,40\delta$ (1H, q, 7 Hz) e em $1,50\delta$ (3H, d, 7 Hz) revelam a presença de um etilideno com Csp^2 em $120,5$ (CH) e Csp^3 em $12,4\delta$ (CH_3).

O sinal em $2,45\delta$ (dd, $J=3\text{ Hz}$) correlacionado ao sinal de ^{13}C em $51,6\delta$ (CH) foi atribuído ao C16, ligado ao C17 em $172,8\delta$ (COCH_3 (CH_3 em $51,3\delta$)).

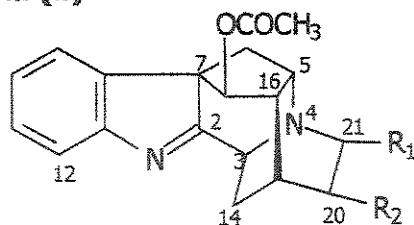
Outro sinal interessante é o deslocamento em $4,83\delta$ correlacionado ao CH em $87,3\delta$ correspondente ao C5 ligado ao oxigênio.

Atribuímos o sinal de ^{13}C $106,9\delta$ ao C2 e $51,0\delta$ ao C7, indicando a perda de aromaticidade do núcleo indólico.

Os dados de RMN ^1H e ^{13}C são concordantes com a literatura^{69, 70}. (Tabela 41 – Apêndice 1, pág. 129).

⁶⁹ BATISTA, C. V. F.; SCHISPEMA J.; VEEPORTE R.; RECHE S. B.; HENRIQUES A. T. Indole alkaloids from *Rauwolfia selowii*. *Phytochemistry*, v.41, p.969-971. 1996

⁷⁰ ABE F.; CHEN R-F.; YAMAUCHI T.; MARUBAYASHI N.; UEDA, I.; *Chem. Pharm. Bull.*, v.37, n.4, p.887-890. 1989

vinorina (4) e raucafrinolina (2)

vinorina : $R_1:H$; $R_2:=CHCH_3$;

raucafrinolina: $R_1:CH_3$; $R_2:CH_2OH$;

Os E.M. da raucafrinolina (2) e da vinorina (4) apresentam o íon molecular em 100% de abundância relativa, além de mostrar o pico em m/z ($M - 59$) correspondente à perda de $OCOCH_3$, presente nos dois alcalóides (C17).

No espectro de RMN de 1H e ^{13}C , observamos a presença de sinal de CH em torno de 77 δ , correlacionado a um H em 5,04 δ , que foi atribuído ao C17 ligado ao $OCOCH_3$. A presença de sinal em 170,3 δ e de sinal de CH_3 em 20,9 δ correlacionado à 3H em 2,18 δ também evidencia a presença de $OCOCH_3$. Outro sinal em ^{13}C que diferencia esses alcalóides é a presença de $C\ sp^2$ em 183,7 δ , que foi atribuído ao C2 e em 156,7 δ foi atribuído ao C13 (ambos ligados ao N_a).

A total atribuição dos dados de RMN de 1H e ^{13}C estão descritos na Tabela 44 e Tabela 45 (Apêndice 1, pág. 132 e 133).

4.3.3 Alcalóides indólicos tipo yohimbano e heteroyohimbano:

Os alcalóides tipo yohimbano e heteroyohimbano são classificados com base na configuração relativa dos C3, C15 e C20 do anel D. Sendo divididos em 4 grupos: *normal* (a), *pseudo* (b), *allo* (c) e *epiallo* (d). (Figura 26).

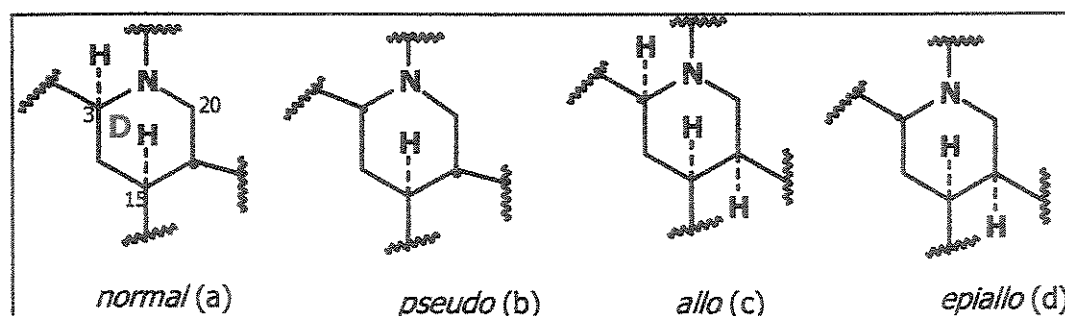


Figura 26: Configurações do anel D, de alcalóides tipo yohimbano.

A configuração no anel D implica na variação dos deslocamentos de RMN de ^{13}C de C3 e C6 principalmente, devido às interações γ gauche.

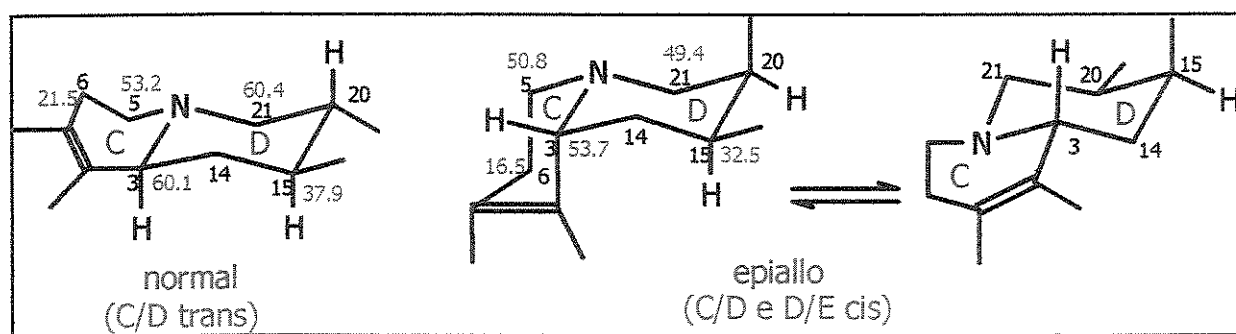


Figura 27: Deslocamentos de ^{13}C para as configurações normal e epiallo para os alcalóides tipo yohimbina;

Baseados nos diferentes valores de sinais do C3, podemos diferenciar os possíveis epímeros (α, β). De fato, se o próton no C3 é α -axial (*normal*) um valor de C3 próximo à $\delta 60$ seria encontrado, enquanto que se o próton é β equatorial (*epiallo*) o valor diminui para $\delta 54$. Por outro lado, a conformação dos anéis (C/D e D/E cis ou trans) pode ser estabelecida de acordo com os δ C5, C15 e C21.

De acordo com esses deslocamentos atribuímos a configuração epiallo e C/D e D/E aos alcalóides 18-hidroxi-yohimbina (**15**), 3-epi- α -yohimbina (**16**) e reserpina (**17**), conforme comparação dos dados descritos na Tabela 33.⁷¹

Tabela 33: Deslocamentos de ^{13}C para as configurações normal e epiallo para os alcalóides tipo yohimbina⁷²:

C	normal/allo	epiallo	15	16	17
3	60 \pm 1	54 \pm 1	53,9	53,8	53,8
6	21,5 \pm 0,5	16,5 \pm 0,5	16,6	16,6	16,8
5	53,2	50,8	50,9	50,9	51,2
15	37,9	32,5	32,4	32,5	32,3
21	60,4	49,4	49,3	49,5	49,1

A atribuição completa dos dados de RMN está descrita na Tabela 53 e Tabela 52 no Apêndice 1, págs. 140 e 141.

⁷¹ ALMEIDA, M. B.; GUSMAN C.C. Rescinnamine and reserpine – a comparative study of their ^{13}C NMR spectra. *J. Pharm. Biom. Anal.*, v.6, n.2, p185-189. 1988.

⁷² WEHRLI, F.W.; NISHIDA, T. The use of Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Natural Products Chemistry, In: *Fortschritte der Chemie oranisher naturstoffe Progress in the chemistry of organica natural products*, v36, Wien – Springer-Verlag, 1979.p131-138.

4.4 Estudo por CG/EM

O objetivo dos estudos de CG/EM foi preparar uma biblioteca com os alcalóides já isolados e identificados de *Rauvolfia bahiensis* de tal forma que pudessem ser utilizados para identificação dos alcalóides presentes nos extratos das outras espécies de *Rauvolfia*.

Desta forma, os alcalóides isolados e identificados de *R. bahiensis* foram analisados por CG/EM e tiveram seus espectros de massas adicionados a uma biblioteca no software do aparelho, o que auxiliaria na elucidação dos cromatogramas e na identificação dos alcalóides isolados dos extratos alcaloídicos das outras espécies de *Rauvolfia*. Esta é uma proposta de identificação baseada no tempo de retenção dos alcalóides e na fragmentação de seus E.M.. Contudo, uma análise qualitativa detalhada necessita também de um estudo do tempo de retenção pelo índice de Kovats e confirmação por co-injeção. As propostas de identificação de alcalóides para os extratos não submetidos a tratamento para isolamento de alcalóides foram também baseadas no estudo por CCD dos mesmos.

Após seguidas análises de CG, o melhor método usado foi: coluna DB-1 com 30 metros de comprimento, com grade de temperatura, descrita na Tabela 34:

Tabela 34: Programa de aquecimento usado para o CG

temp. inicial (°C)	velocidade de aquecimento (°C/min.)	temp. final (°C)	tempo (min.)
150	15	260	5
	4	280	15

Para confirmar a validade do método, injetamos os extratos de *Rauvolfia bahiensis* e comparamos aos dados da biblioteca .

Isto nos mostrou que o método permite a identificação, dentro destes extratos, dos alcalóides isolados e de alguns outros que, por estarem em pequena quantidade não foram isolados, mas se encontram nestes extratos.

Rauvolfia bahiensis:***Extrato diclorometânico ácido das folhas (RB12)***

O estudo fitoquímico do extrato diclorometânico ácido de folhas de *R. bahiensis* permitiu o isolamento de vinorina (4). A análise do seu cromatograma indica a presença, além da vinorina (4), de picrinina (1) e de um alcalóide com esqueleto tipo sarpagan com $M^+ = 350$.

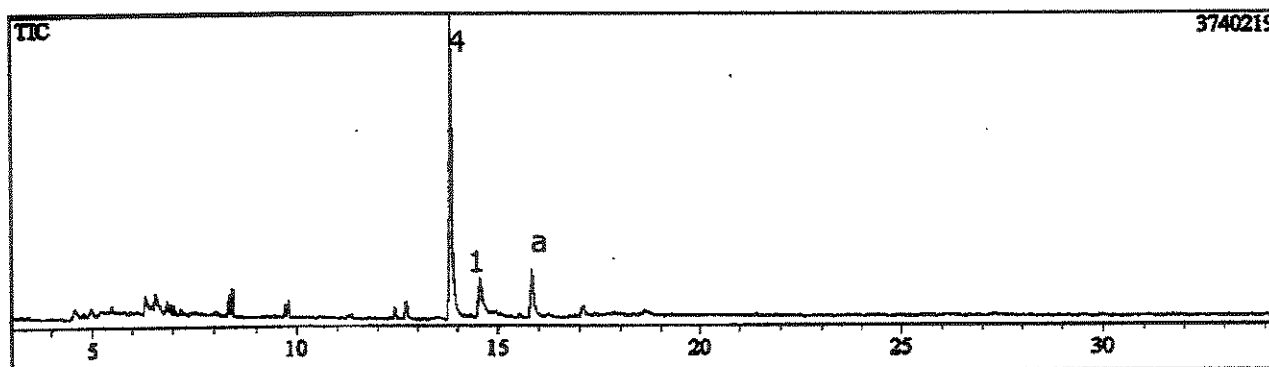


Figura 28: Cromatograma (CIT) de RB12, indicando a presença de vinorina (4); picrinina (1) e um alcalóide com esqueleto tipo sarpagan (a).

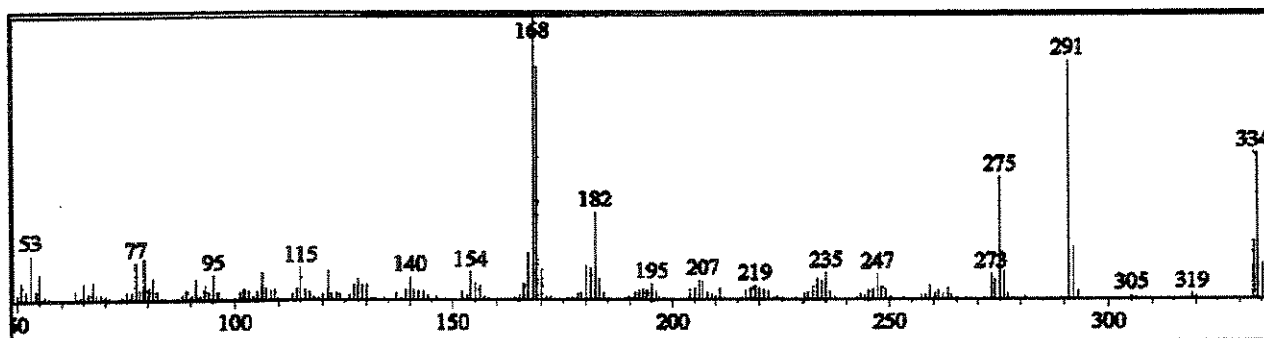


Figura 29: E.M. do pico (4) com t.r 13,8, indicando ser vinorina 4.

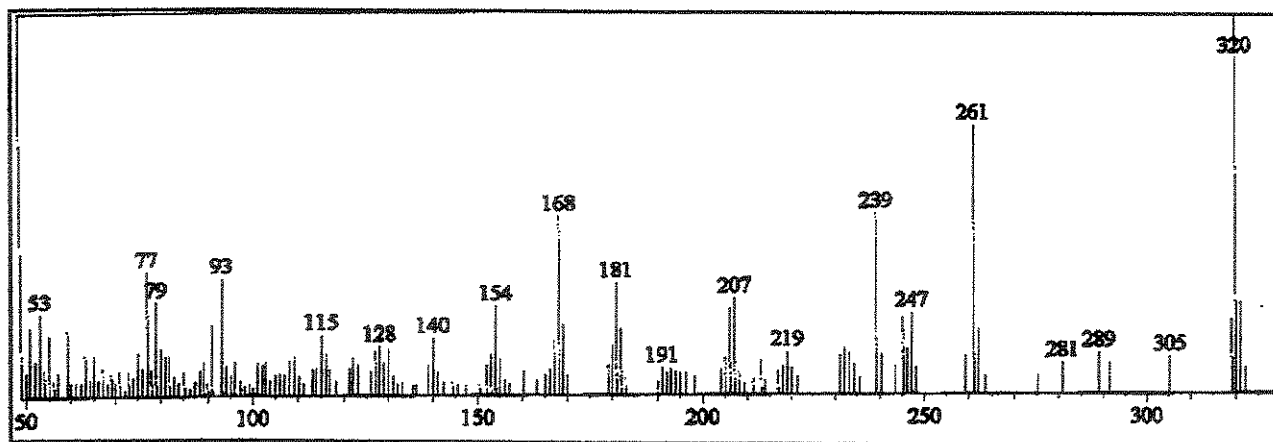


Figura 30: E.M. do pico (1) com t.r 14,6, indicando ser picrinina 1.

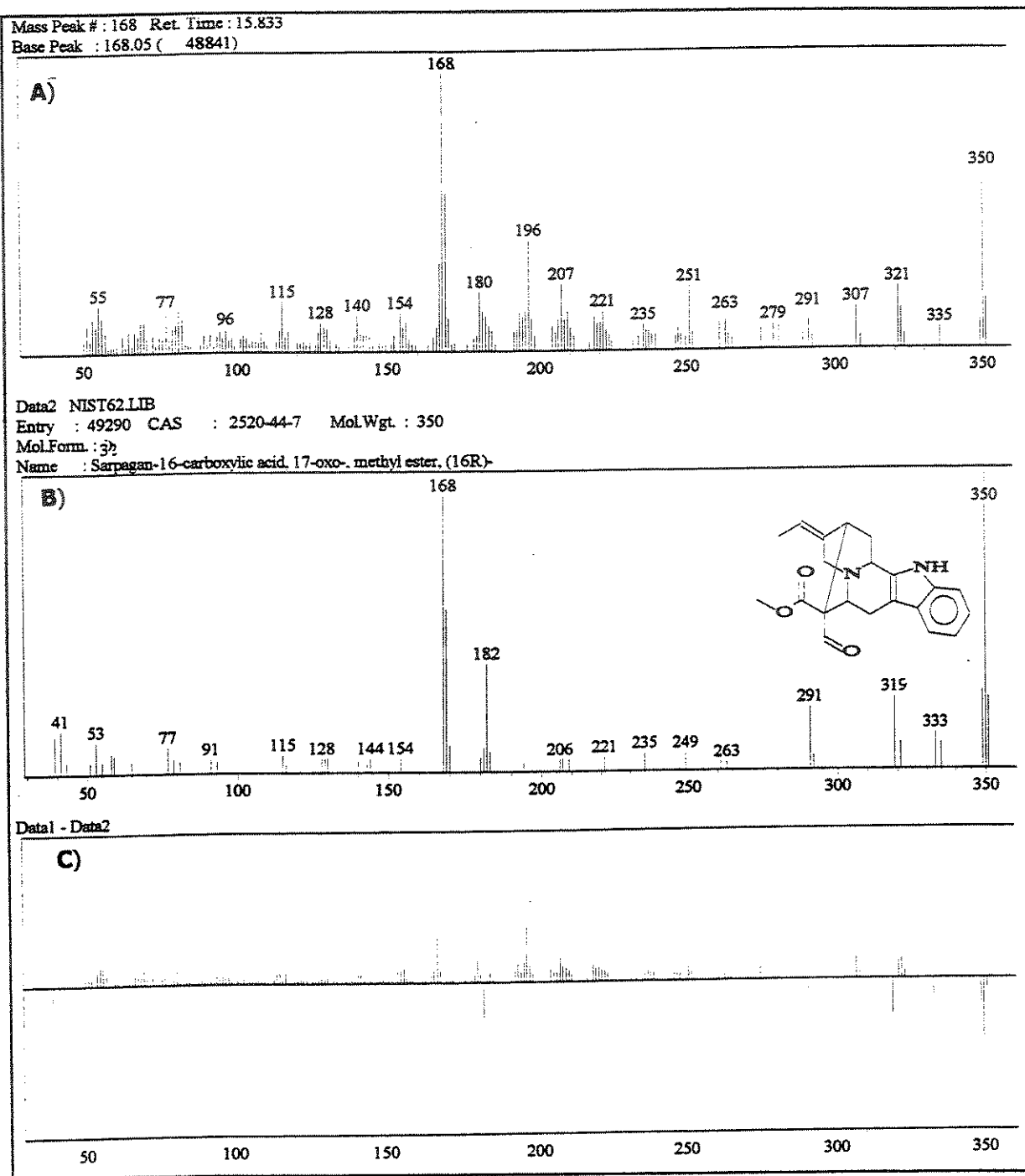


Figura 31 A) E.M. do pico (a) com t.r 15,8, e B) E.M de um alcalóide com esqueleto tipo sarpagan, com substituinte carboxílico em C-16 e proposta pela biblioteca NIST e C) a subtração de seus E.M.

Extrato diclorometânico ácido das cascas de *R. bahiensis* - LKRB23.1

Isolamos do extrato diclorometânico ácido das cascas de *R. bahiensis*, os alcalóides 12-demetoxy-purpelina (**9**); purpelina (**10**), norpurpelina (**11**); 12-metoxy-N-metil-velosimina (**12**); 12-metoxy-afinisina(**13**) e 12-metoxy-velosiminina (**14**).

No cromatograma, pudemos observar, além destes alcalóides, a presença de seredamina (**5**) e 10-metoxy-sarpagan-17-ol (**8**).

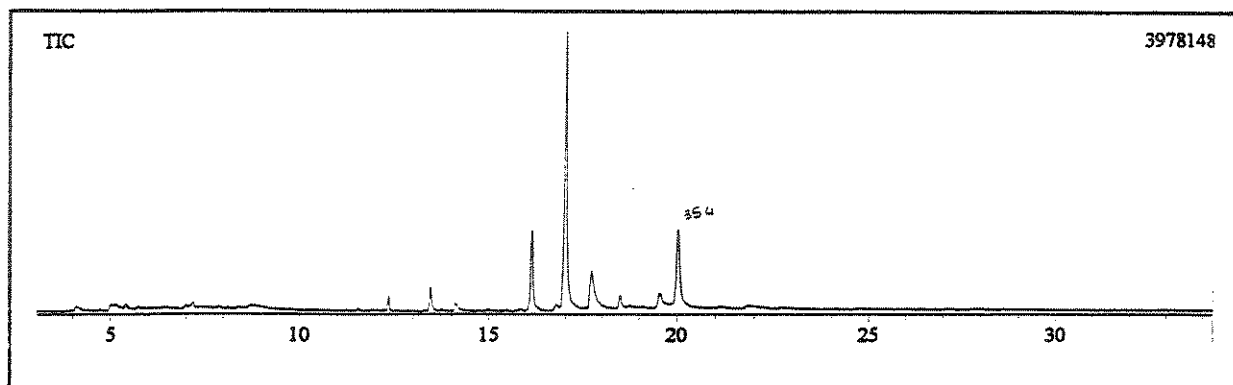


Figura 32: Cromatograma de LKRB23.1, indicando a presença dos alcalóides 12-demetoxy-purpelina (**9**); purpelina (**10**), norpurpelina (**11**); 12-metoxy-N-metil-velosimina (**12**); 12-metoxy-afinisina (**13**) e 12-metoxy-velosiminina (**14**), seredamina (**5**) e norserdamina (**7**). Os E.M. correspondentes estão descritos no Apêndice 3.

Extrato diclorometânico neutro de cascas de *R. bahiensis* (LKRB23.2)

A análise de seu CIT (CG/EM) indica a presença de normacusina B (**3**), norseredamina (**7**), e o pico principal indica ser 10 metoxi-sarpagan-17-ol (**8**). O cromatograma apresenta ainda um pico em t_r 19 min, com EM muito semelhante a norpurpelina (**11**), com seu pico base m/z 322.

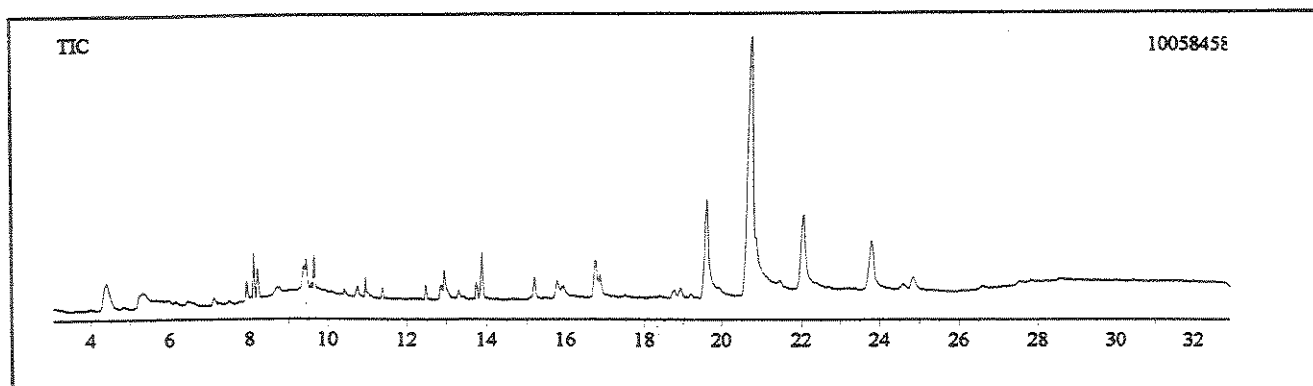


Figura 33: CIT (CG/EM) do extrato diclorometânico neutro das cascas de *R. bahiensis* (LKRB23-2)

Extrato diclorometânico básico das cascas de *R. bahiensis* (LKRB23.3)

Isolamos do extrato diclorometânico básico das cascas de *R. bahiensis* os alcalóides: norseredamina (**7**), seredamina (**5**), 10-metoxisarpagan-17-ol (**8**) e o sal de seredamina (**6**).

A análise do CIT (CG/EM) mostra como pico principal a presença de norseredamina (**7**), além de seredamina (**5**), normacusina B (**3**); 10-metoxi-sarpagan-17-ol (**8**) e purpelina (**10**).

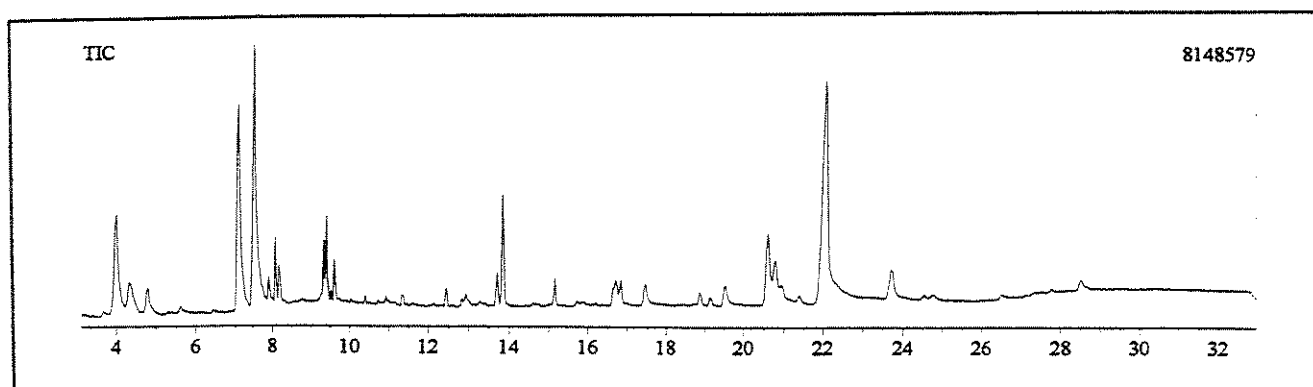


Figura 34: CIT (CG/EM) do extrato diclorometânico básico das cascas de *R. bahiensis* (LKRB23-3)

R. weddelliana* e *R. sessilifolia

A análise por CG/EM, não se mostrou adequada aos extratos de *R. weddelliana* e *R. sessilifolia*. Por análise de CCD verificamos que os compostos presentes nestes extratos eram diferentes dos já encontrados em *R. bahiensis*. Pudemos analisar apenas alguns extratos por este método.

O estudo fitoquímico dos extratos das raízes de *R. sessilifolia* forneceu os alcalóides 18-hidroxiyoimbina (**15**), 3- α -epi-yohimbina (**16**), reserpina (**17**) e reserpilina (**18**), diferentes dos alcalóides isolados de *R. bahiensis*.

Tentamos encontrar um método adequado de análise por CG/EM para os extratos de *R. sessilifolia*, tomando como padrão a reserpina comercial; contudo, verificamos a sua decomposição na coluna. Optamos então, pela análise por CLAE destes extratos.

Folhas de *R. weddelliana*:

Os CITs (CG/EM) do estrato clorofórmico ácido (LKRW05.1) e neutro (LKRW05.2) das folhas de *R. weddelliana* (exsicata 729) são bastante semelhantes, tendo como componente principal um pico em t.r 24 min. cujo E.M., indica ser o alcalóide com íon molecular em $m/z=352$ e íons em m/z 184, 169 e 156; que a biblioteca do NIST indica ser o alcalóide ajmalicina **19**.

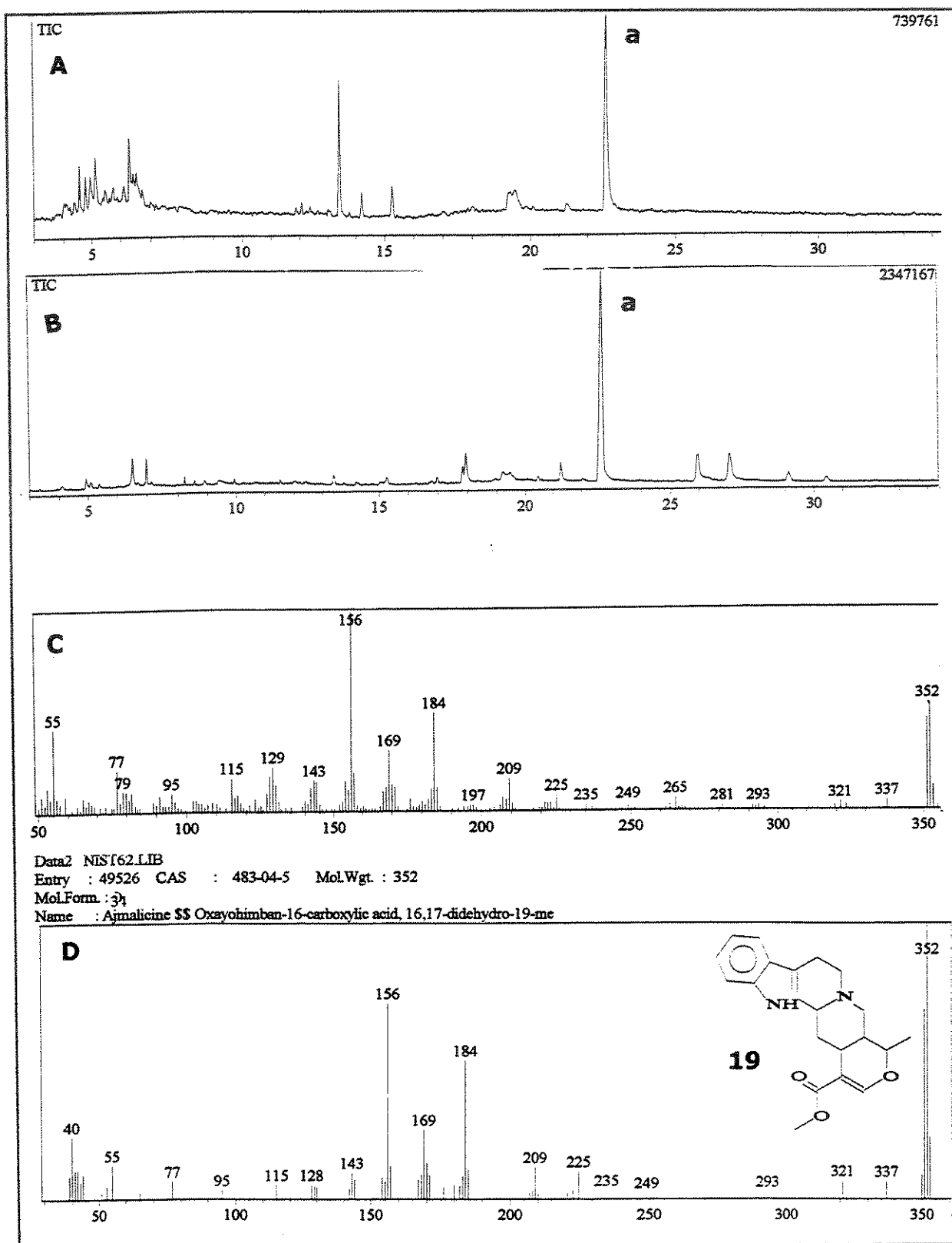


Figura 35: CIT (CG/EM) de **A**) Extrato clorofórmico ácido, **B**) neutro das folhas de *R. weddelliana* (exsicata 729). **C**) E.M do pico a de ambos os extratos e **D**) E.M da ajmalicina **19** proposta.

Raízes de *R. sessilifolia*

A análise do CIT (CG/EM) do extrato clorofórmico ácido das raízes de *R. sessilifolia* (exsicata 724), LKRW15.1, mostra a presença majoritária de um pico em $t_r=17$ min, cuja fragmentação no EM, indica um alcalóide semelhante ao alcalóide **9** (12-demetoxi purpelina) com M^+ em m/z 306; e picos em m/z : 277, 263, 183 e 168; contudo, as abundâncias relativas destes picos, são diferentes em comparação ao E.M. do alcalóide **9**.

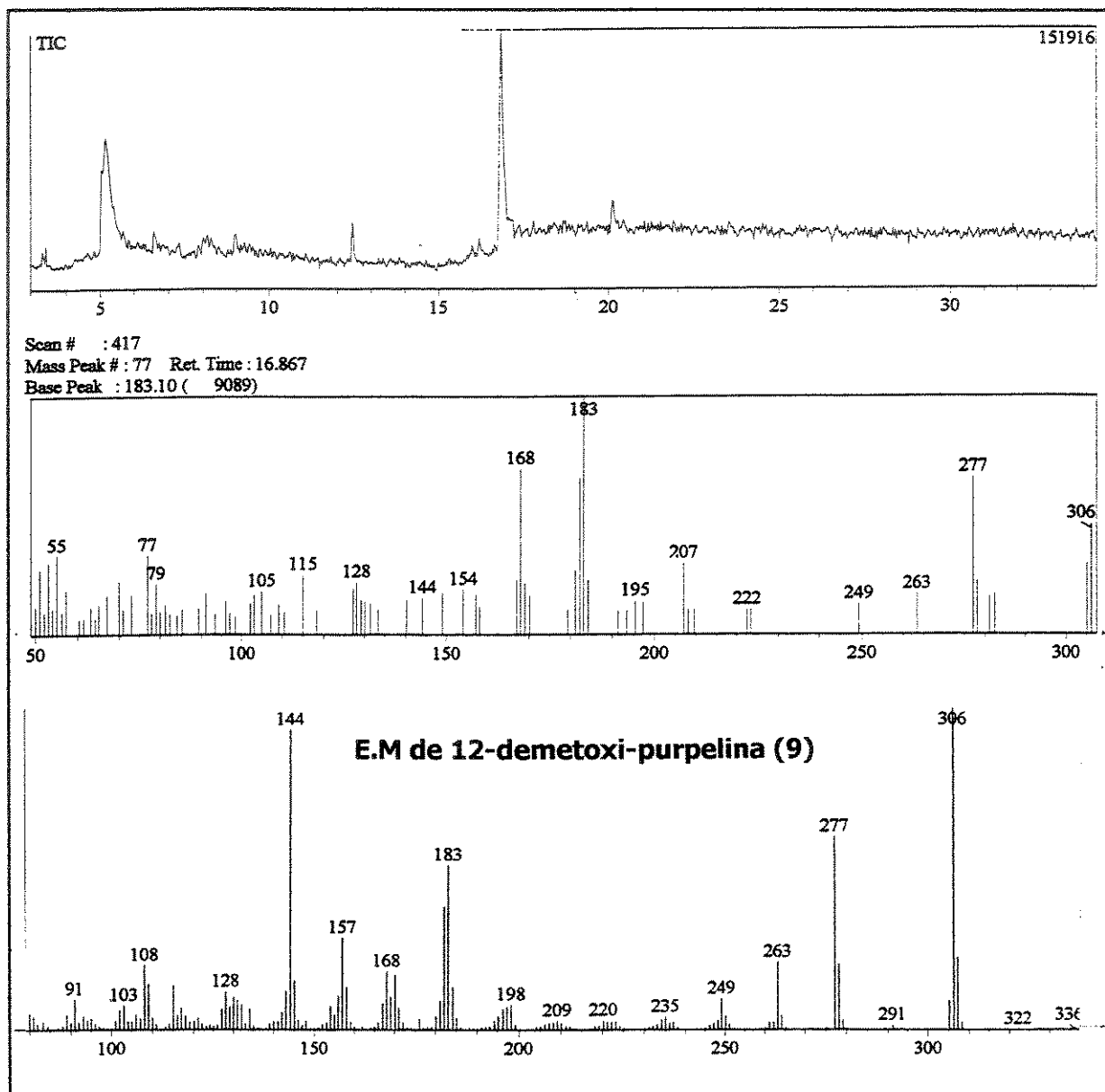


Figura 36: CIT (CG/EM) do extrato clorofórmico ácido das raízes de *R. sessilifolia* 724.

***Rauvolfia weddelliana* – exsicata 729**

O CIT (CG/EM) do extrato clorofórmico básico das raízes de *R. weddelliana* (LKRW313) mostra a presença do alcalóide normacusina B (**3**);

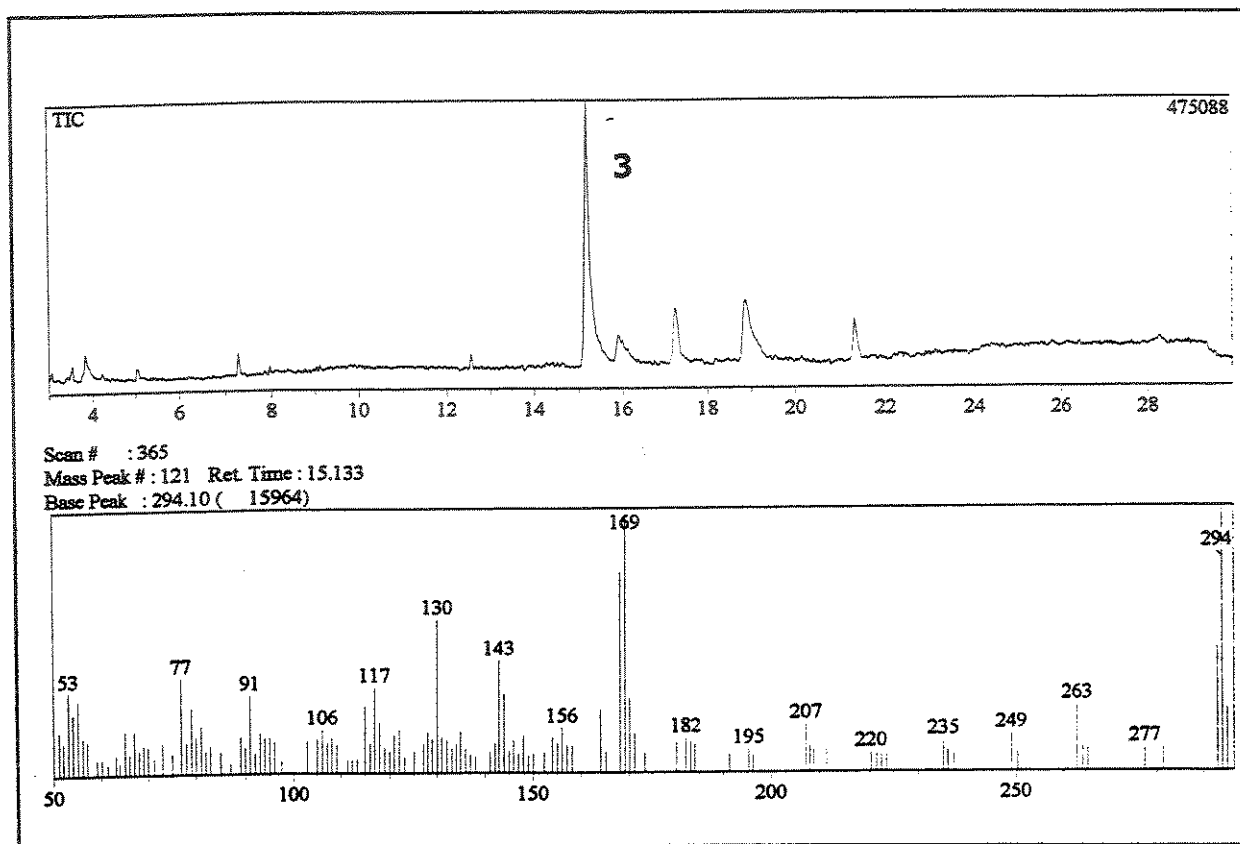


Figura 37: CIT (CG/EM) do extrato clorofórmico básico das raízes de *R. weddelliana* (LKRW31-3) indicando a presença de normacusina B.

***Rauvolfia grandiflora*:**

Submetemos as folhas e cascas de galhos de *R. grandiflora*, à extração ácido-base e analisamos os extratos obtidos por CCD, CG/EM e CLAE.

Folhas:

A análise dos cromatogramas dos extratos clorofórmicos (ácido, neutro e básico) de folhas de *R. grandiflora*, não mostra semelhança com os extratos anteriores. O perfil cromatográfico em CG é diferente, ou seja, a maioria dos picos tem tempo de retenção entre 14 e 17 min. Não observamos a presença de alcalóides já isolados de *R. bahiensis*.

Extrato clorofórmico ácido das folhas de *R. grandiflora* (LKRGF331)

O CIT (CG/EM) de LKRGF331, mostra predominantemente, a presença de um pico em 14 min, cujo EM mostra M^+ em 322, e pico base em m/z 263 ($M-59$), que geralmente caracteriza perda de $COOCH_3$;

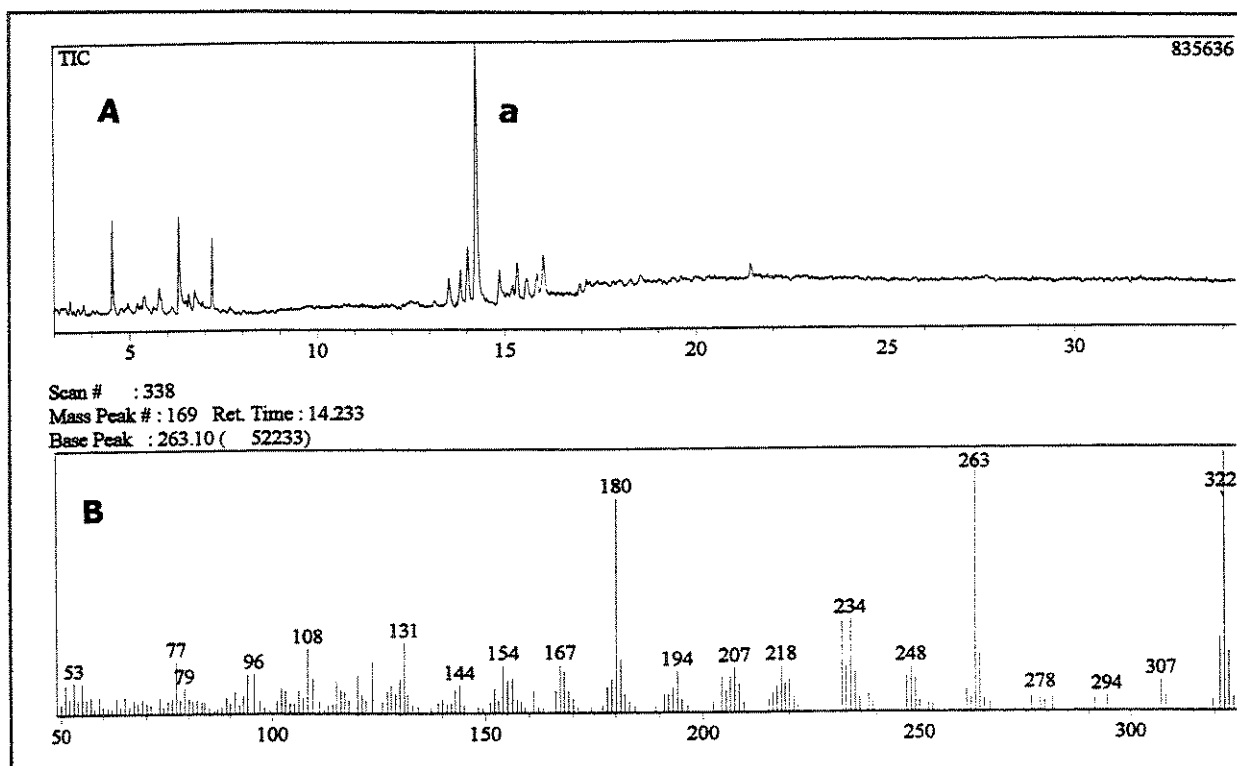


Figura 38: A) CIT (CG/EM) do extrato clorofórmico ácido das folhas de *R. grandiflora*, **B)** EM do pico a com M^+ em m/z 322.

Extrato clorofórmico neutro das cascas de *R. grandiflora* (LKRGC342)

A análise do CIT (CG/EM) do extrato clorofórmico neutro das cascas de *R. grandiflora* (LKRGC342), mostra três picos principais, com M^+ em m/z 292, 308 e 350, diferentes dos já isolados, contudo, os três possuem nos seus E.M. m/z em 168/169/170 com abundância relativa alta, características de núcleo indólico, sem substituição em N_a e o pico m/z 183 é característico de núcleo indólico com metila ligado ao N_a .

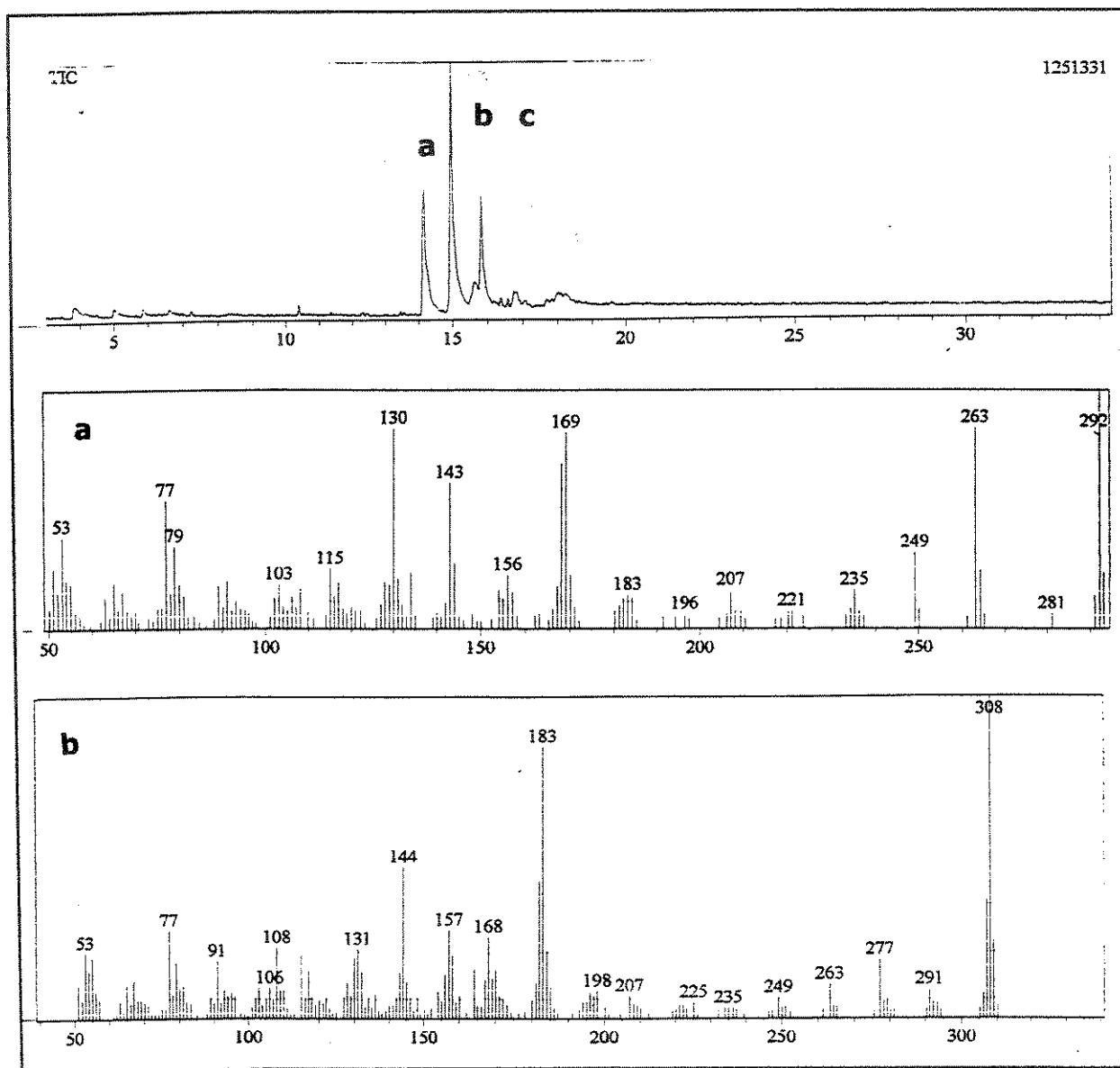


Figura 39: CIT (CG/EM) de extrato clorofórmico neutro das cascas de galhos de *R. grandiflora* e EM dos picos a e b

R. mattfeldiana

O extrato clorofórmico básico dos galhos de *R. mattfeldiana*, mostraram por CG/EM a presença de alcalóides indólicos não identificados, cuja fragmentação de seus EM, mostra m/z 168/169 característico de núcleo indólico sem substituição no anel.

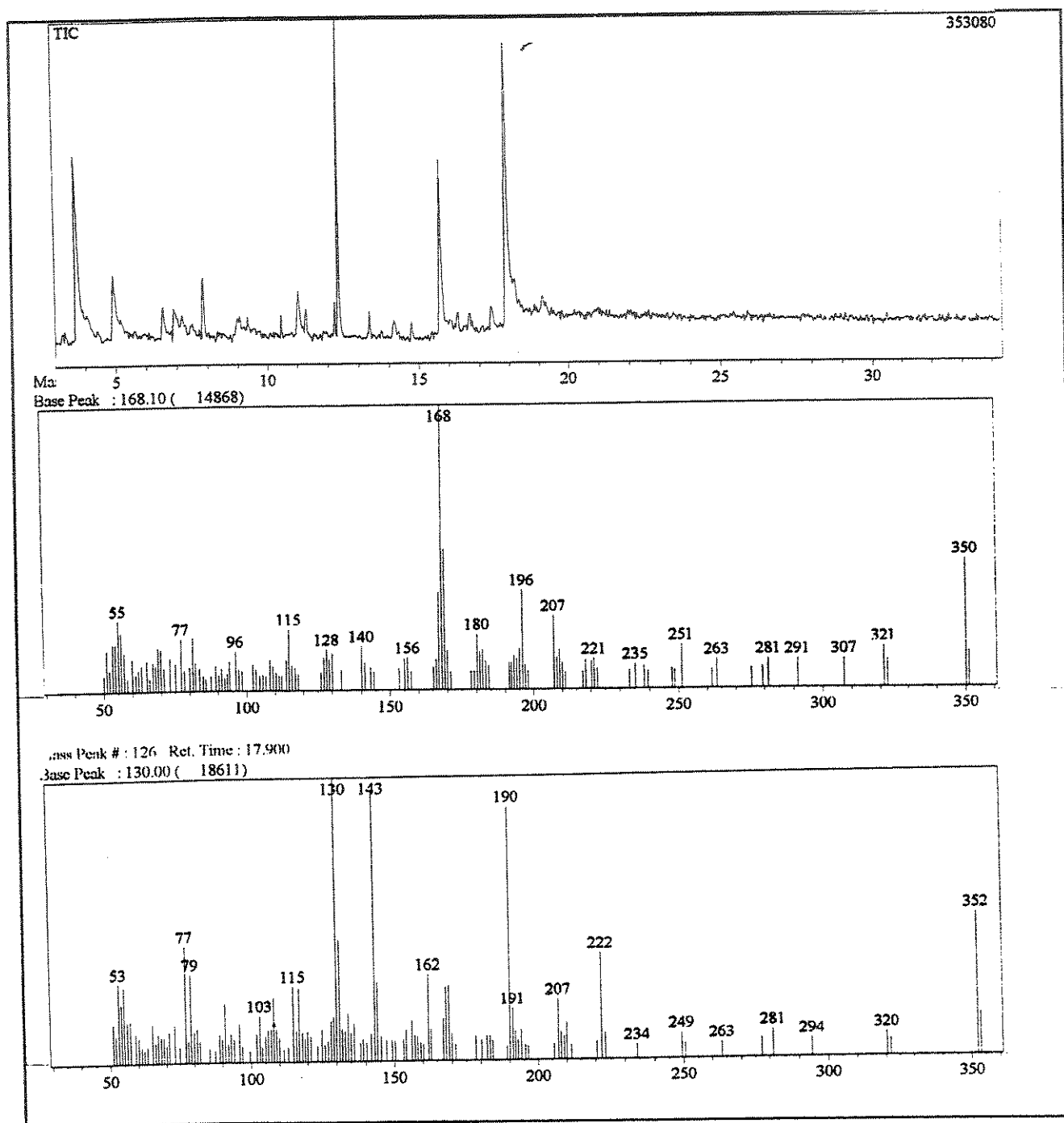


Figura 41: Cromatograma (CIT/EM) de extrato clorofórmico básico dos galhos de *R. mattfeldiana* com presença de alcalóides indólicos.

4.5 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Visto a análise da reserpina comercial e também dos extratos obtidos a partir de *R. weddelliana* não ter sido muito eficiente em CG/EM, iniciou-se um estudo por CLAE dos extratos alcaloídicos de *Rauvolfia*, tendo como referência bibliográfica o desenvolvimento de vários trabalhos usando cultura de células ou tecidos de *R. serpentina* e *R. vomitoria* para a produção de metabólitos, principalmente alcalóides indólicos, o que torna o estudo e o uso de CLAE extremamente importante e necessário. A escolha da metodologia foi baseada no estudo realizado por Klyushnichenco, V. E. e colaboradores⁷³, que analisa qualitativamente e quantitativamente extratos obtidos de culturas de células de *Rauvolfia*, usando os alcalóides ajmalina, ajmalicina, reserpina, raucafricina, serpentina e yoimbina como padrão.

Iniciamos os estudos por CLAE, injetando os alcalóides isolados de *R. bahiensis* como padrão e analisando os extratos alcaloídicos das espécies de *Rauvolfia* coletadas. Pretendemos analisar o perfil cromatográfico destes extratos e determinar a presença de alcalóides usando o seu tempo de retenção, espectro de UV e confirmando quando possível, por co-injeção.

Usamos uma coluna C-8 e como fase móvel usamos H₂O/CH₃CN/ATFA (89,9:10:0,1) = solvente **A** e CH₃CN /ATFA=solvente **B** (99,9:0,1), em gradiente de concentração inicial de 100% de **A** e final de 50% **A**: 50% **B** em 50 min.

Analizamos a reserpina (**17**) por CLAE e verificamos a possibilidade de sua identificação nos extratos alcaloídicos das raízes de *Rauvolfia* por este método.

Usamos como padrão os alcalóides isolados de *R. bahiensis*, contudo o método de CLAE não foi adequada para análise destes alcalóides.

Apresentaremos apenas os resultados observados para os extratos de *R. sessilifolia*, coletadas em Rondonópolis (exsicata 724) e em Buritis (exsicata 729), e para alguns extratos de *R. grandiflora*.

⁷³ KLYUSHNICHENCO, V. E et al, Determination of indole alkaloids from *R. serpentina* and *R. vomitoria* by high-performance liquid chromatography and high-performance thin-layer chromatography *J. Chrom. A*, v.704, p.357-362. 1995

Rauvolfia weddelliana

Raízes de R. weddelliana:

Analisaremos os cromatogramas de CLAE dos extratos clorofórmicos ácido, neutro e básico das raízes de *R. weddelliana* e *R. sessilifolia* coletadas em Rondonópolis e Buritis.

local de coleta	exsicata	ácido	neutro	básico
Rondonópolis (MS)	724	LKRW15.1	LKRW15.2	LKRW15.3
Buritis (MT)	729	LKRW31.1	LKRW31.2	LKRW31.3

Tabela 35: Código dos diferentes extratos das raízes de *R. weddelliana*

Isolamos do extrato clorofórmico ácido (LKRW15-1) das raízes de *R. sessilifolia* (exsicata 724), a reserpina **17** e do extrato clorofórmico básico (LKRW15-3) isolamos os alcalóides 3 α -epi-yohimbina **16** e 18-hidroxi-yoimbina **15**.

Na análise por CLAE foi possível observar a presença da reserpina (**17**) no extrato clorofórmico ácido (LKRW 15.1) das raízes de *R. sessilifolia* em tr. próximo a 40 min, observando a sobreposição dos seus espectros de U.V, com a reserpina comercial.

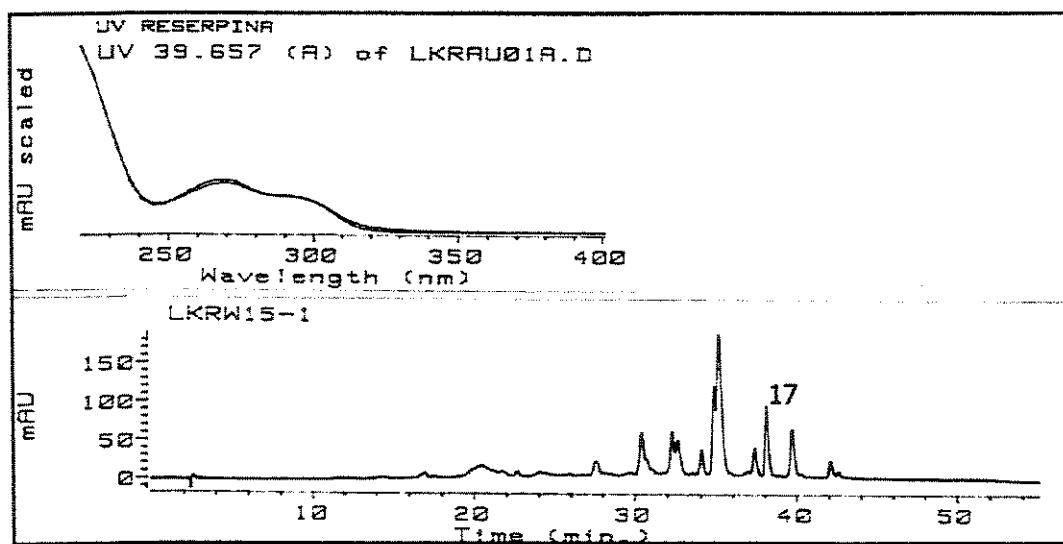


Figura 42: A) Espectros de U.V da reserpina em sobreposição ao espectro de UV do pico 17 do cromatograma de CLAE (B) de LKRW15.1 (extrato clorofórmico ácido das raízes de *R. sessilifolia* 724)

A análise por CLAE dos extratos clorofórmicos neutro (LKRW15-2), básico (LKRW15-3) e acetato básico (LKRW15-4) das raízes de *R. sessilifolia* (exsicata 724) não mostra a presença de

reserpina (**17**), contudo os três extratos mostram a presença do alcalóide 18-hidroxiyohimbina (**15**), que foi confirmada pela sobreposição de seus espectros de UV.

Para confirmação da presença do alcalóide 18-hidroxi-yohimbina **15** no extrato, realizou-se a co-injeção do extrato acetato básico das raízes de *R. sessilifolia* (LKRW15.4) e do alcalóide 18-hidroxi-yohimbina **15**; e verificou-se um aumento na proporção do pico com $t_r=19\text{min}$. (Figura 44).

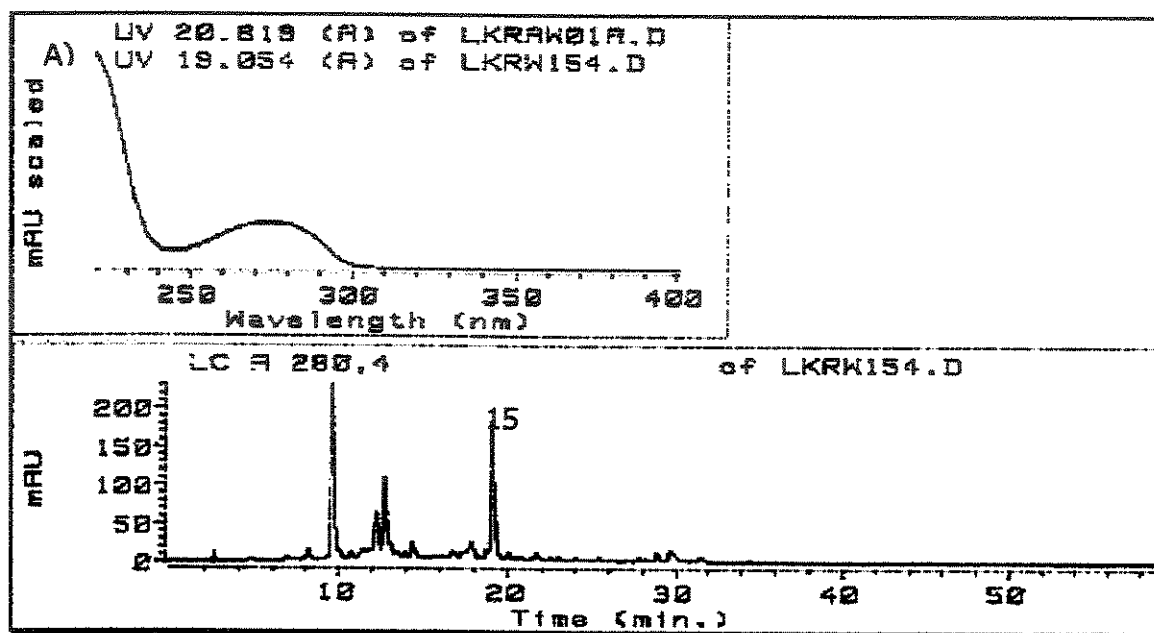


Figura 43: A) Espectros de U.V. do alcalóide 18 hidroxi -yohimbina **15** sobreposto ao U.V do pico 15 do cromatograma de CLAE de LKRW15-4 (extrato acetato básico)

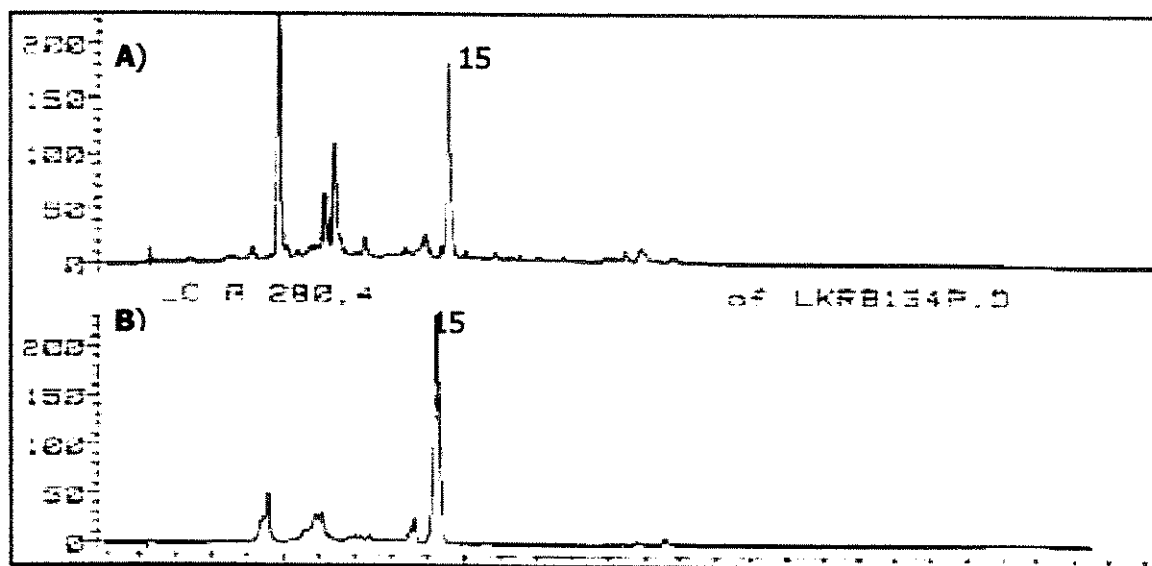


Figura 44: Cromatogramas de CLAE de A) LKRW15.4 (extrato clorofórmico acetato básico) e B) co-injeção de LKRW15.4 com alcalóide 18 hidroxiyohimbina **15**.

***Rauvolfia weddelliana* (exsicata 729)**

Ao se analisar o extrato clorofórmico ácido (LKRW31.1) da raiz de *R. weddelliana* (exsicata 729), verifica-se a presença de um pico com t.r em 24 min., cujo espectro de UV é sobreponível ao espectro da reserpilina **18** com o mesmo tempo de retenção.

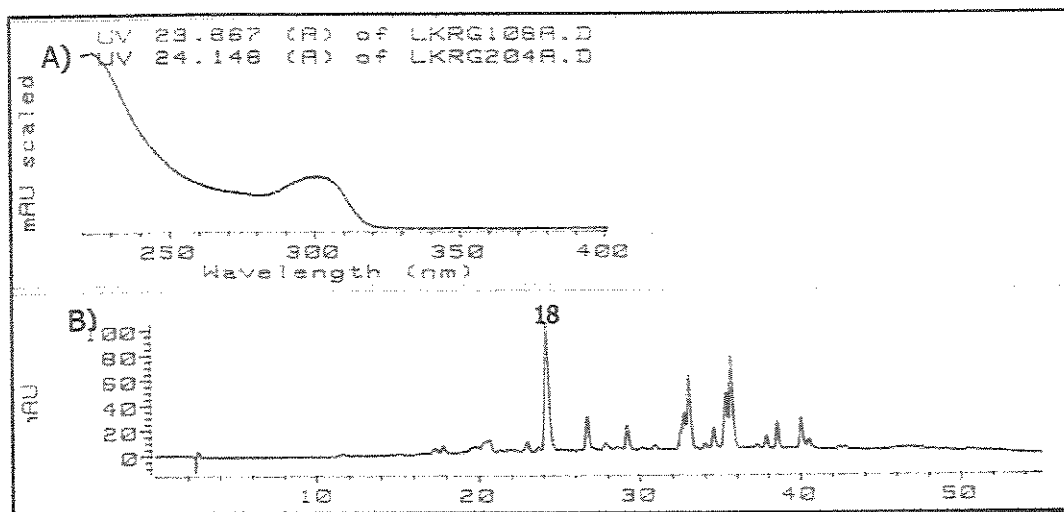


Figura 45: A) Espectros de U.V. do alcalóide reserpilina **18** sobreposto ao espectro de U.V. do pico 18, do cromatograma (B) de CLAE de LKRW31.1 (extrato clorofórmico ácido das raízes de 729).

Não foi possível a identificação de reserpina (**17**) em nenhum outro extrato alcaloídico de *Rauvolfia* estudada, nem mesmo nos extratos das raízes de *R. weddelliana* exsicata 729, submetida ao mesmo processo de extração.

Interessante notar que os extratos clorofórmico ácido da raiz de *R. sessilifolia* coletada em Rondonópolis, exsicata 724, (LKRW15-1) e coletada em Buritis, exsicata 729, (LKRW31-1) ou seja, de plantas da mesma espécie coletadas em diferentes locais, mostram um perfil cromatográfico diferente, conforme Figura 46 e onde se pode observar principalmente a presença e ausência de reserpina (**17**) e reserpilina (**18**) em cada um dos extratos clorofórmicos ácidos (Tabela 36).

Tabela 36: Comparação da presença de reserpina (**17**) e reserpilina (**18**) nos extratos das raízes de *Rauvolfia*.

local de coleta	exsicata	ácido	reserpina (17)	reserpilina (18)
Rondonópolis (MS)	724	LKRW15.1	presença	ausência
Buritis (MT)	729	LKRW31.1	ausência	presença

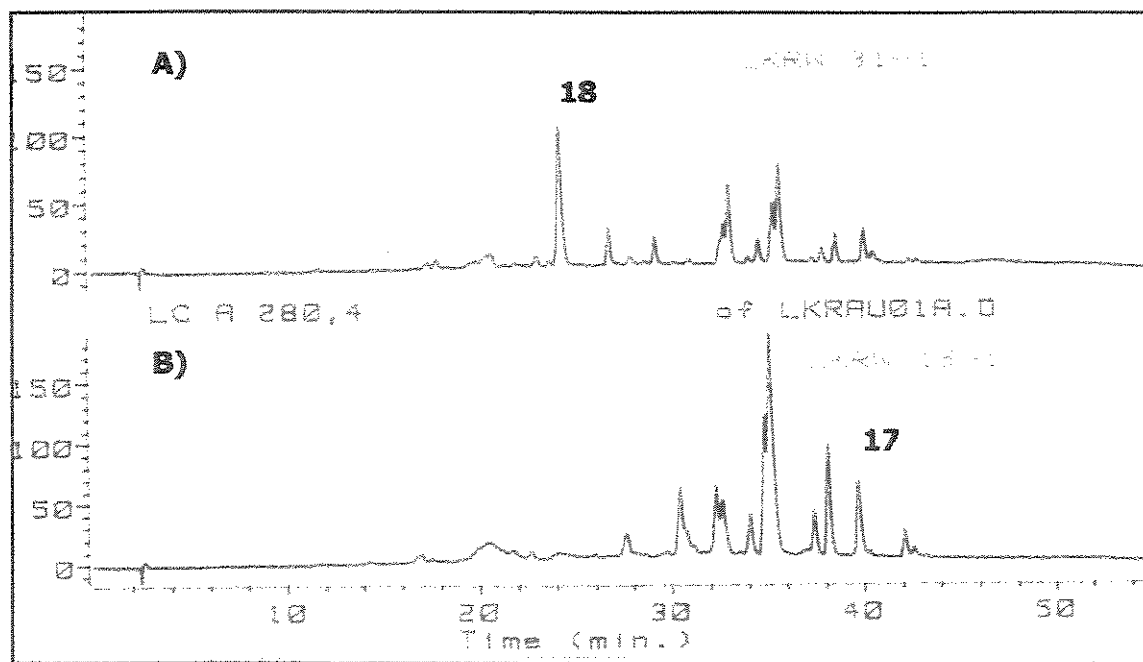


Figura 46: Cromatogramas de CLAE do extrato clorofórmico ácido LKRW15.1 (B) e LKRW31.1 (A), com presença do alcalóide **18** em LKRW31.1 e do alcalóide **17** em LKRW15.1.

A análise por CLAE do extrato clorofórmico básico (LKRW31.3) das raízes de *R. weddelliana* (exsicata 729) mostra principalmente a presença do alcalóide **15**. (Figura 47)

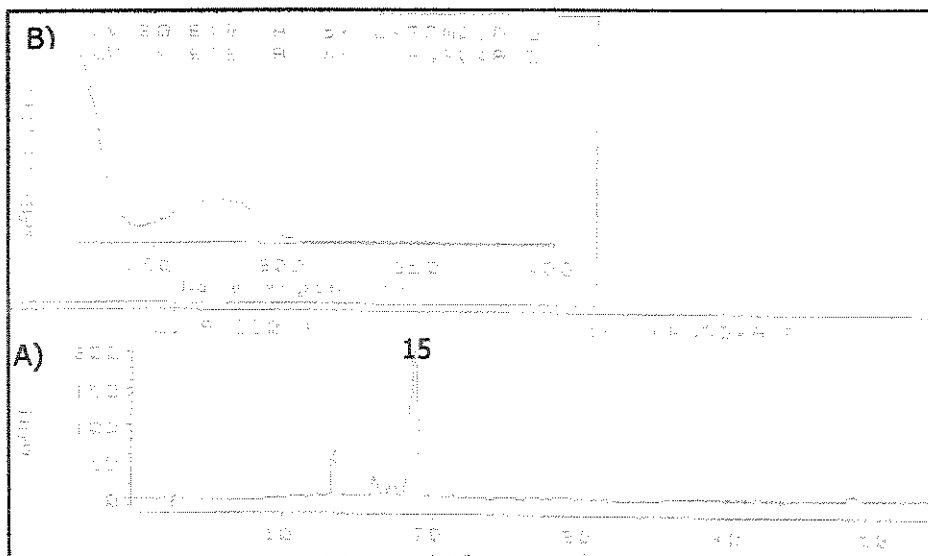


Figura 47: A) Cromatograma de CLAE do extrato clorofórmico básico da raiz de *R. weddelliana* (LKRW31-3) e B) Espectros de U.V. do alcalóide 18-hidroxi yohimbina **15** e do pico 15.

Extrato clorofórmico ácido (LKRW05.1) e neutro (LKRW05.2) das folhas de *R. weddelliana* (729)

Estes extratos possuem um perfil cromatográfico (CG e CLAE) diferente dos obtidos até agora, e não mostram a presença de alcalóides já isolados neste trabalho.

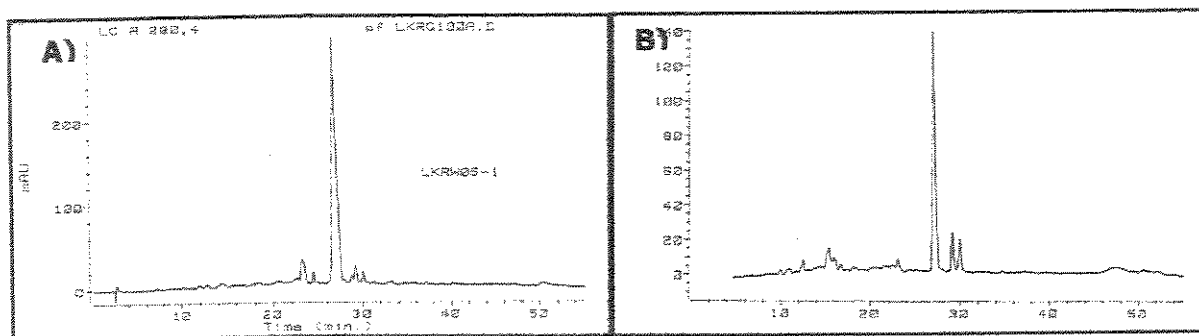


Figura 48: Cromatograma de CLAE de **A)** extrato clorofórmico ácido (LKRW 051) e **B)** neutro (LKRW052) das folhas de *R. weddelliana*.

A análise de CG/EM (Figura 35) também indica a presença majoritária de um alcalóide, cujo EM sugere ser um alcalóide indólico de esqueleto sarpagan, com pico base em m/z 352, a ajmalicina **19**.

Extrato clorofórmico básico de *R. weddelliana* e *R. sessilifolia*.

Para exemplificar a diferença entre o conteúdo alcaloídico de plantas de mesma espécie, coletados em locais diferentes (Tabela 13), apresentamos o cromatograma de CLAE, de extratos análogos (extrato clorofórmico básico das folhas) de plantas coletadas em Buritis (LKRW05.3 e LKRW08.3) e coletada em Rondonópolis (LKRW06.3).

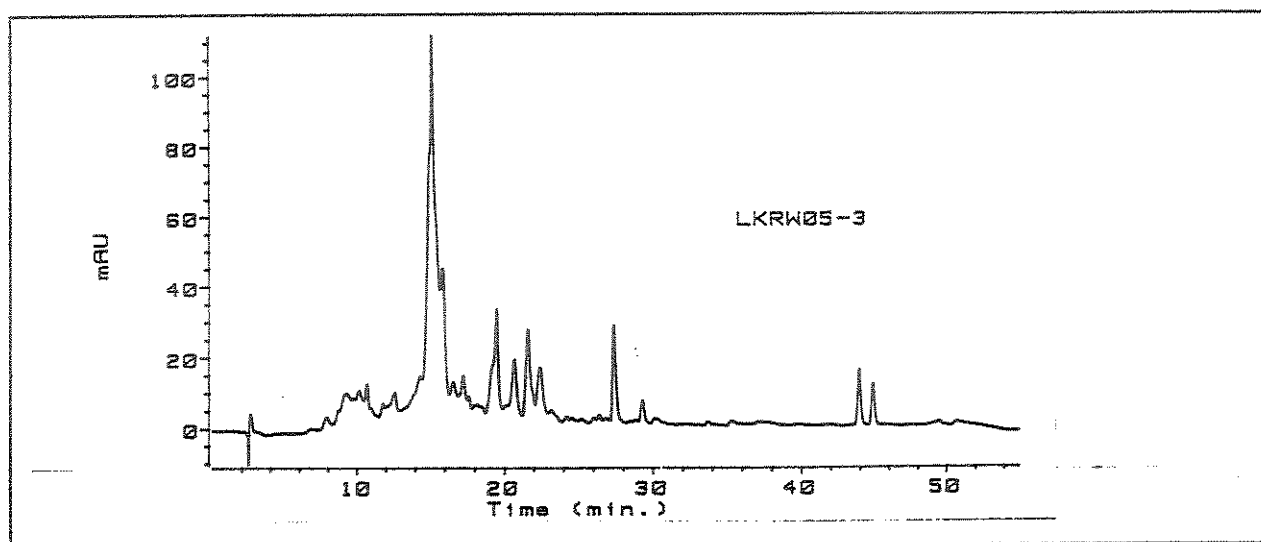


Figura 49: Cromatograma CLAE do extrato clorofórmico básico das folhas de *R. weddelliana* (LKRW05.3).

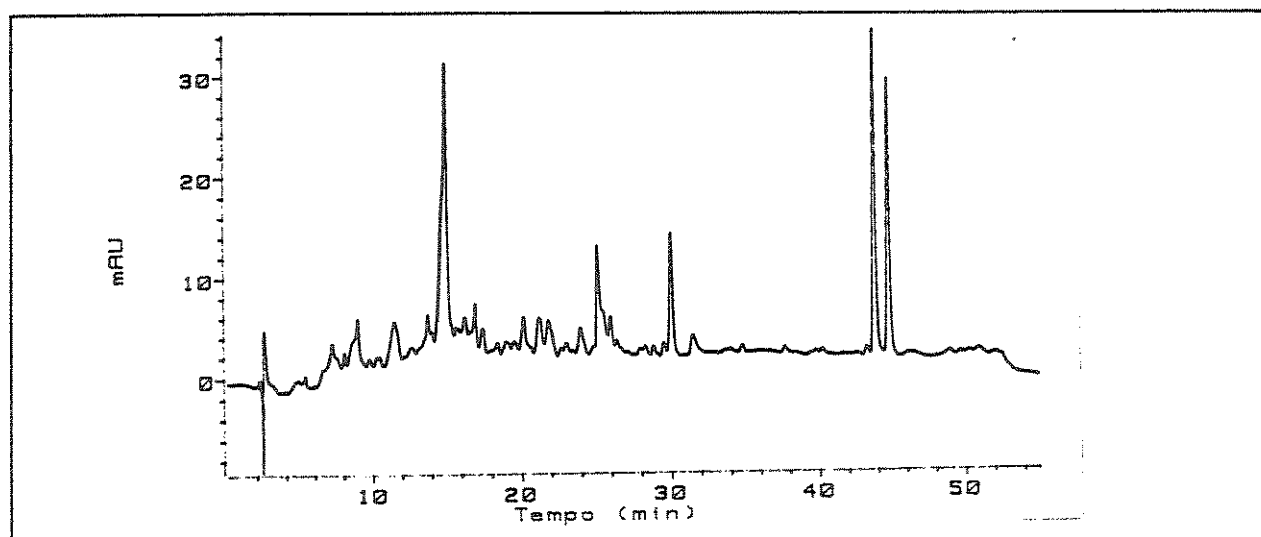


Figura 50: Cromatograma CLAE do extrato clorofórmico básico das folhas de *R. weddelliana* (LKRW08.3).

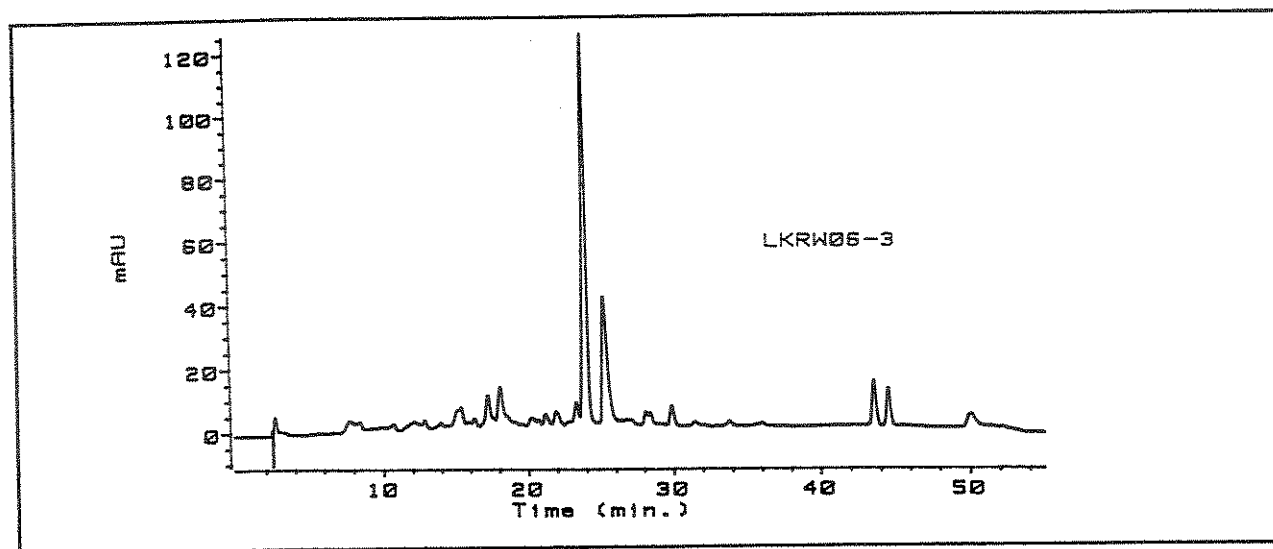


Figura 51: Cromatograma CLAE do extrato clorofórmico básico das folhas de *R. sessilifolia* (LKRW06.3).

Esses extratos foram obtidos de modo análogo e de plantas da mesma espécie, contudo mostram perfis cromatográficos diferentes, mostrando que o conteúdo alcaloídico, ou de metabólitos de modo geral, dependem de outros fatores além do local de coleta, pois os extratos obtidos LKRW08.3 e LKRW05.3 são de plantas coletadas no mesmo local. O que torna sempre necessário o estudo fitoquímico detalhado de todas as plantas disponíveis.

Esta observação reflete a importância do controle de qualidade rigoroso, no que diz respeito, à produção e utilização de fitoterápicos, já que plantas da mesma espécie coletadas no mesmo local, podem apresentar perfil cromatográfico diferente.

Rauvolfia grandiflora

A análise por CLAE do extrato clorofórmico ácido das folhas de *R. grandiflora*, mostra um pico principal **a** com t.r. em 19 min, com espectro de UV com máximos de absorção em 240, 300 e 340 com perfil bem diferente aos alcalóides já isolados de *R. bahiensis* e *R. weddelliana*.

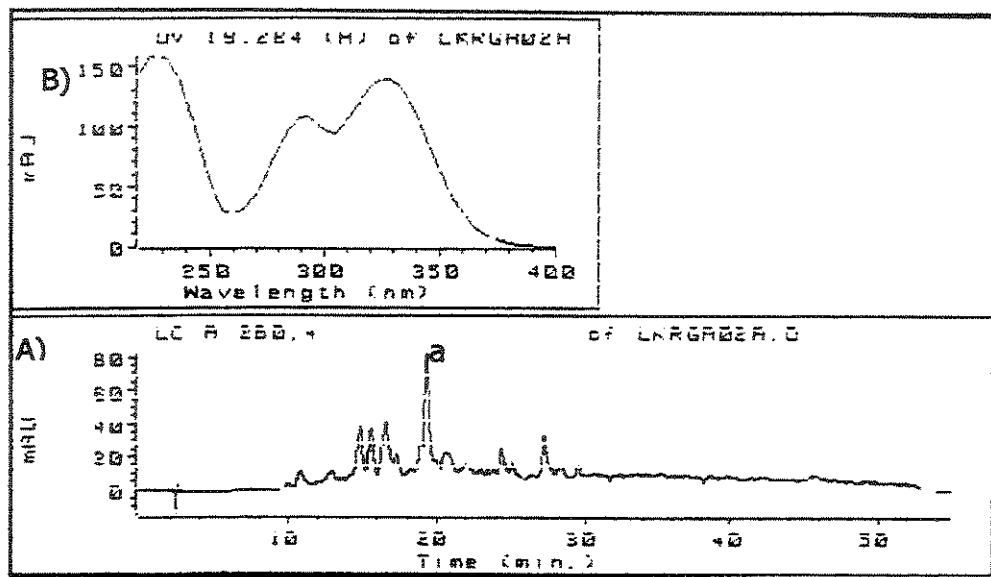


Figura 52: A) Cromatograma de CLAE e B) o espectro de UV do pico **a**.

Extrato clorofórmico neutro (LKRGF33-2) e básico (LKRGF33-3) das folhas de *R. grandiflora*.

O cromatograma de CLAE do extrato clorofórmico neutro (LKRGF 332) das folhas de *R. grandiflora* mostra dois picos principais, onde o pico **a**, mostra espectro de UV., com absorção máxima em 330 nm, semelhante ao pico **a** observado no extrato clorofórmico ácido (LKRGF331), e o outro pico com t.r. de 20 min, identificado como 18-hidroxiyohimbina **15**.

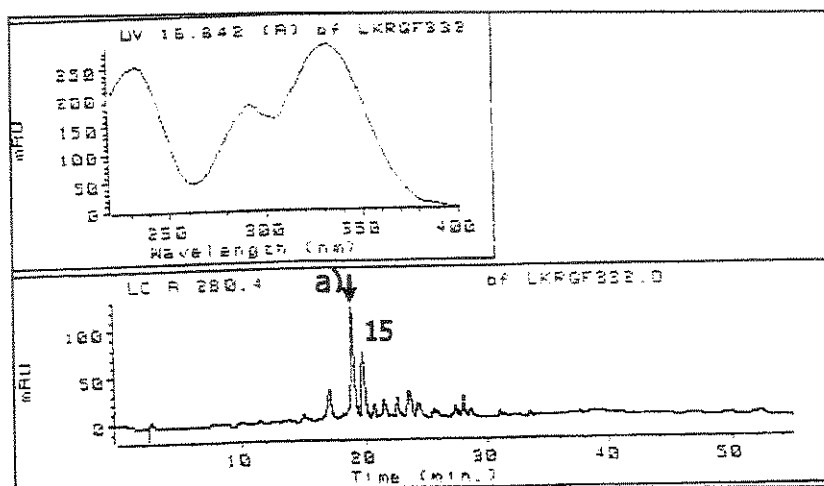


Figura 53: Cromatograma CLAE do extrato clorofórmico neutro das folhas de *R. grandiflora* (LKRGF 332), identificando a presença de **a** e do alcalóide 18- hidroxiyohimbina **15**.

O cromatograma de CLAE do extrato clorofórmico básico LKRGF 33.3 mostra dois picos majoritários onde o pico **c** com t.r. em 17 min tem UV semelhante ao pico **a** observado no extrato clorofórmico ácido (LKRGF331) e neutro (LKRGF332) das folhas de *R. grandiflora*. O pico **d** em t.r. 18, não foi identificado, apesar de seu t.r. assemelhar-se ao alcalóide noreseredamina (7), seus espectros de UV, não são sobreponíveis.

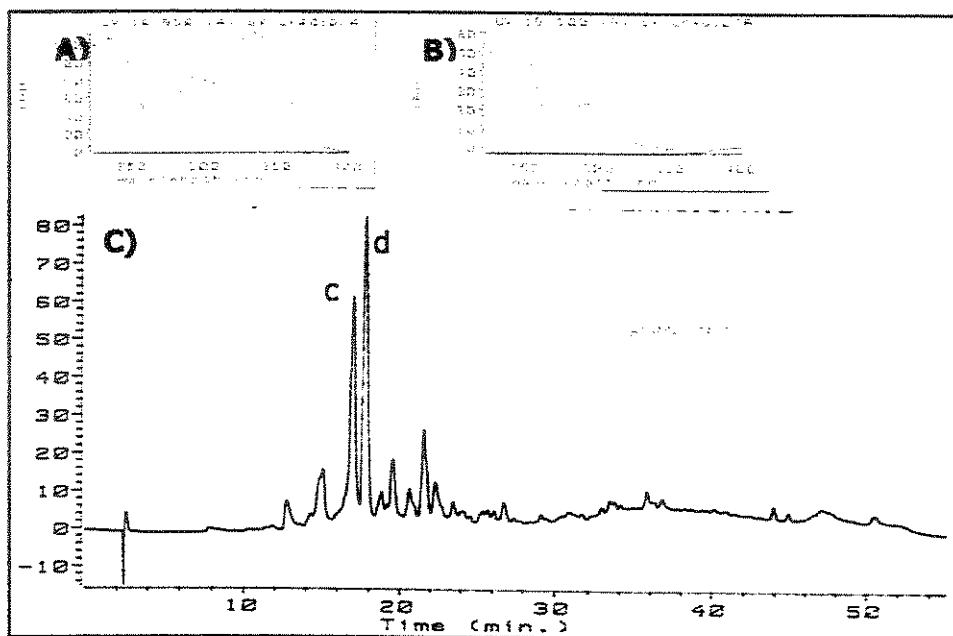


Figura 54: Cromatograma CLAE (C) do extrato clorofórmico básico LKRGF 33-3, mostrando os picos **c** e **d** (não identificados), e seus espectros **A**) e **B**) de U.V.

Cascas de galhos de *Rauvolfia grandiflora*:

Assim, como as folhas, os extratos alcaloídicos das cascas de galhos de *R. grandiflora*, não mostraram a presença de alcalóides semelhantes aos isolados de *R. bahiensis*.

O cromatograma de CLAE mostra dois picos principais com tr em 13 e 23 min; mas seus espectros de UV não são sobreponíveis aos espectros dos alcalóides já descritos neste trabalho.

O cromatograma de CLAE do extrato clorofórmico neutro (LKRGC342) das cascas de *R. grandiflora* mostra um pico principal com tr em 20 min, com UV semelhante ao alcalóide 18-hidroxi yohimbina **15**.

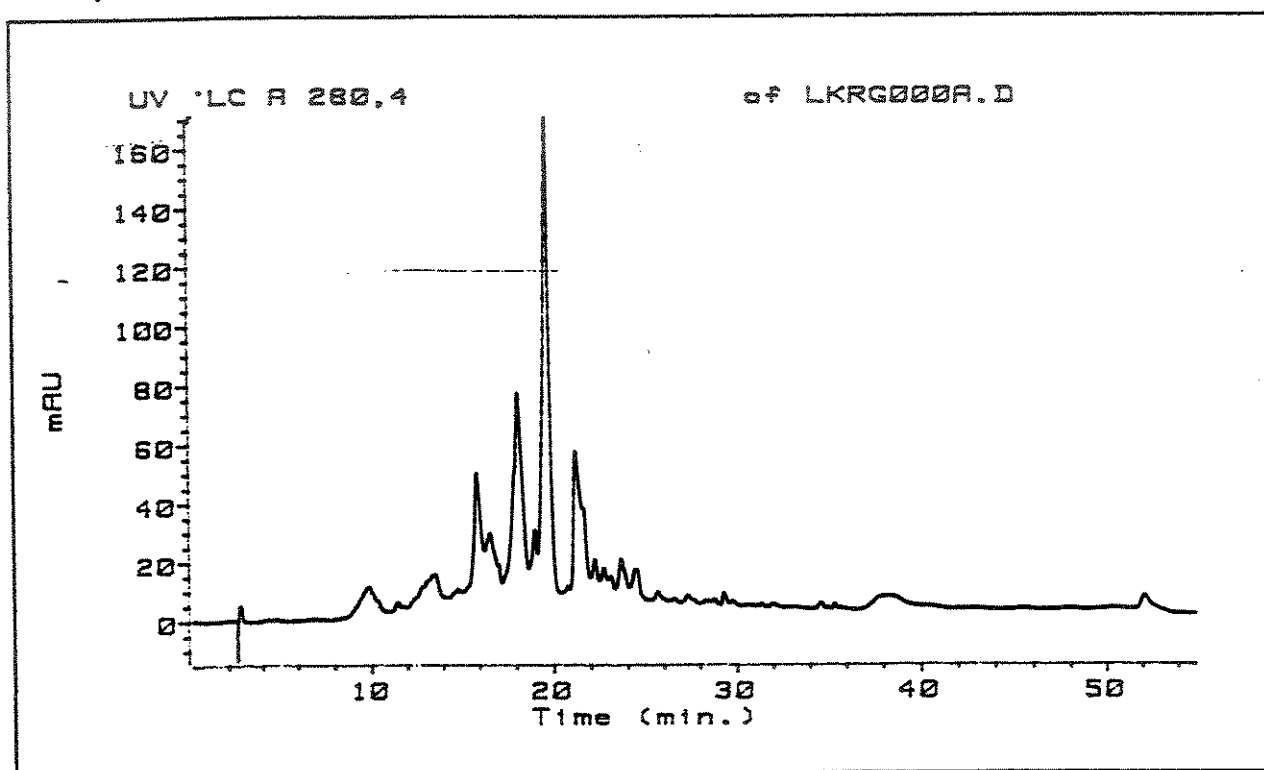


Figura 55: Cromatograma de CLAE do extrato clorofórmico neutro das cascas de galhos de *R. grandiflora* (LKRGC342)

O estudo fitoquímico, a análise por CCD, CG e CLAE, mostrou a presença dos seguintes alcalóides indólicos nas espécies brasileiras de *Rauvolfia* estudadas.

Tabela 37: Alcalóides identificados neste trabalho

material de origem	alcalóide	método de identificação
extrato dicloro básico folhas de <i>R. bahiensis</i> (LKRB13)	picrinina (1)	UV, IV, RMN ^1H e ^{13}C , EM
	raucafrinolina (2)	IV, RMN ^1H e ^{13}C , EM
	normacusina B (3)	IV, RMN ^1H e ^{13}C , EM
extrato dicloro ácido folhas de <i>R. bahiensis</i> (LKRB12)	vinorina (4)	RMN ^1H e ^{13}C , EM
	picrinina (1)	CG/EM
extrato dicloro básico cascas <i>R. bahiensis</i> (LKRB23.3)	seredamina (5)	RMN ^1H e ^{13}C , EM
	sal de seredamina (6)	RMN ^1H e ^{13}C , EM
	noreseredamina (7)	RMN ^1H e ^{13}C , EM
	10-metoxi-sarpagan-17-ol (8)	RMN ^1H e ^{13}C , EM
	normacusina B (3)	CG/EM
	purpelina (10)	CG/EM
extrato dicloro ácido cascas de <i>R. bahiensis</i> (LKRB23.1)	12-demetoxi-purpelina (9)	RMN ^1H e ^{13}C , EM
	purpelina (10)	RMN ^1H e ^{13}C , EM
	norpurpelina (11)	RMN ^1H e ^{13}C , EM
	12-metoxi-N-metil vellosimina (12)	RMN ^1H e ^{13}C , EM
	12-metoxi-afinisina (13)	RMN ^1H e ^{13}C , EM
	12-metoxi-velosimina (14)	RMN ^1H e ^{13}C ; EM
	seredamina (5)	CG/EM
	10-metoxi-sarpagan-17-ol (8)	CG/EM
extrato dicloro neutro cascas <i>R. bahiensis</i> (LKRB23.2)	10-metoxi-sarpagan-17-ol (8)	CG/EM
	normacusina B (3)	
	norseredamina (7)	

Tabela 38: Alcalóides identificados neste trabalho (cont)

material de origem	alcalóide	método de identificação
extrato clorofórmico básico das raízes de <i>R. sessilifolia</i> (724) (LKRW15.3)	18-hidroxiyohimbina (15) 3- α -epi-yohimbina (16) sal de seredamina (6)	RMN ^1H e ^{13}C ; EM RMN ^1H e ^{13}C ; EM CCD
extrato clorofórmico ácido das raízes de <i>R. sessilifolia</i> (724) (LKRW15.1)	reserpina (17)	RMN ^1H e ^{13}C ; EM
extrato acetato básico das raízes de <i>R. sessilifolia</i> (724) (LKRW15.4)	18-hidroxiyohimbina (15)	CLAE
extrato clorofórmico ácido das raízes de <i>R. weddelliana</i> (729) (LKRW31.1)	reserpilina (18)	RMN ^1H e ^{13}C ; EM
extrato clorofórmico básico das raízes de <i>R. weddelliana</i> (729) (LKRW31.3)	normacusina B (3) 18-hidroxiyohimbina (15)	CG/EM CLAE
extrato clorofórmico ácido das folhas de <i>R. weddelliana</i> (729) (LKRW05.1)	ajmalicina 19 (proposta)	CG/EM
extrato clorofórmico neutro das folhas de <i>R. weddelliana</i> (729) (LKRW05.2)	ajmalicina 19 (proposta)	CG/EM
extratos de <i>R. grandiflora</i> e <i>R. mattfeldiana</i>	alcalóides não identificados b, c, d com núcleo indólico sem substituição em N _a .	CG/EM e CLAE

4.6 Bioensaios

4.6.1 Bioautografia

Testamos os extratos diclorometânico ácido (**LKRB23.1**), neutro (**LKRB23.2**) e básico (**LKRB23.3**), das cascas do caule de *R. bahiensis* e extratos clorofórmicos ácido (**LKRW15.1**) e básico (**LKRW15.3**) das cascas de raízes de *R. sessilifolia*.

Estes extratos não apresentaram halo de inibição para o crescimento dos microorganismos: *Rhizopus orizae*, *Aspergillus fumigatus*, *Cladoporium cladosporioides*, *Fusarium oxysporium*, *Alternaria alternata* e *Penicillium*, numa concentração de 10^{-6} células/mL e usando o antifúngico Loprox® (10ppm) como controle positivo.

Estes resultados não indicam a atividade antifúngica para estes organismos nesta concentração.

4.6.2 Teste de letalidade usando *Artemia salina*.

Testamos os extratos diclorometânico ácido (**LKRB23.1**), neutro (**LKRB23.2**), e básico (**LKRB23.3**), das cascas do caule de *R. bahiensis* e extratos diclorometânico ácido (**LKRW15.1**) e básico (**LKRW15.1**) das cascas de raízes de *R. weddelliana*. cujos resultados obtidos para LC_{50} estão na Tabela 39:

Tabela 39: Valores de LC_{50} para os extratos alcaloídicos de *R. bahiensis* e *R. weddelliana* (G: graus de liberdade; LI: Limite inferior; LS: Limite superior)

Extratos	espécie	LC_{50} (ppm)	G	LI	LS
LKRB23.1	<i>R. bahiensis</i>	15,8	0,21	3	35
LKRB23.2		90,5	0,13	52	159
LKRB23.3		73,3	0,19	28	170
LKRW15.1	<i>R. sessilifolia</i>	19,1	0,42	5	179
LKRW15.3		257	0,19	115	796

Esses resultados são indicativos de possível atividade citotóxica e/ou inseticida e de acordo com a literatura os resultados de LC_{50} menores que 1000 ppm para extratos, mostram boa citotoxicidade ou atividade inseticida. Partimos, portanto, para um teste mais específico de atividade citotóxica.

4.6.3 Testes de atividade citotóxica:

Testes *in vitro* realizados no CPQBA – Unicamp.

Os extratos e alcalóides de *R. bahiensis* e *R. weddelliana* (exiscata 724) foram submetidos a estudo de citotoxicidade, visto os resultados de *Artemia salina* indicarem atividade citotóxica.

Uma avaliação preliminar com os extratos mostrou boa atividade citotóxica, o que incentivou a realização de bioensaios para os alcalóides puros, numa tentativa de avaliação da resposta para os alcalóides puros ou de existência de um sinergismo dos mesmos no extrato. A avaliação da atividade citotóxica de cada extrato ou alcalóide puro foi realizada em 05 linhagens celulares, derivadas de 4 tipos de tumores humanos, codificados como: **MCF7** (mama), **NCIARDR** (mama -resistente à droga); **UACC62** (melanoma), **K562** (leucemia) e **NCI 460** (pulmão). Dessa forma as substâncias, nas concentrações de 0,025; 0,25; 2,5; 25 e 250 µg/ml, foram adicionados em placas de 96 divisões, contendo uma linhagem por placa. Após um período de incubação de 48 horas, as células foram fixadas através da adição de ácido tricloroacético (50%). Após 60 minutos, o ácido tricloroacético foi removido por aspiração e a seguir as placas foram lavadas com água corrente para, após secagem, serem coradas com a sulforrodamina B 0,4% em ácido acético 1% (SRB). O excesso de SRB foi removido das placas após 30 minutos, através de lavagem com solução de ácido acético a 1%. Finalmente, o corante foi solubilizado por adição de tampão tris base. A leitura óptica foi realizada por leitor de ELISA em 540 nm.

Os resultados estão descritos na Tabela 40, mostrando a atividade citotóxica, em que os resultados positivos indicam a porcentagem de inibição do crescimento (atividade citostática) e os resultados negativos a porcentagem de morte das células tumorais testadas (atividade citotóxica). Ou seja, a maioria dos alcalóides testados mostra atividade citotóxica, inibindo o crescimento das células tumorais ou até mesmo levando à morte das mesmas. Um valor acima de 50 % demonstra um resultado interessante e serão feitos outros bioensaios para melhor avaliação desta bioatividade, com a construção de uma curva de dose e efeito da citotoxicidade.

Estes bioensaios são realizados pela aluna de mestrado Luciana K. Kohn, sob orientação do Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho, do CPQBA – Unicamp.

Tabela 40: Atividade citotóxica das amostras. Os resultados estão expressos como a média \pm dp da absorbância (Abs. \pm dp a 540 nm) e a inibição do crescimento em porcentagem (os números em azul indicam atividade citostática acima de 50% e em vermelho atividade citotóxica)

Grupos	Linhasgens concentração (μ g/mL)	K 562 Abs. (% inib.)	MCF 7 Abs. (% inib.)	NCI ADR Abs. (% inib.)	UACC 62 Abs. (% inib.)	NCI 460 Abs. (% inib.)
controle T0	--	0,239 \pm 0,096	0,157 \pm 0,013	0,207 \pm 0,008	0,380 \pm 0,067	0,348 \pm 0,098
controle T1	--	1,376 \pm 0,059	0,749 \pm 0,151	0,477 \pm 0,035	1,193 \pm 0,113	2,03 \pm 0,092
LKRW15.4	125	0,535 \pm 0,072 (73)	0,185 \pm 0,033 (95)	0,426 \pm 0,004 (18)	0,787 \pm 0,047 (49)	1,417 \pm 0,008 (36)
LKRB23.4	125	0,349 \pm 0,027 (90)	0,177 \pm 0,075 (96)	0,386 \pm 0,034 (33)	0,606 \pm 0,038 (72)	1,096 \pm 0,049 (55)
normacusina B (3)	125	0,607 \pm 0,134 (67)	0,180 \pm 0,029 (96)	0,467 \pm 0,055 (3)	0,834 \pm 0,002 (44)	1,305 \pm 0,177 (43)
norpurpelina (11)	125	0,647 \pm 0,072 (64)	0,232 \pm 0,089 (87)	0,389 \pm 0,011 (32)	0,798 \pm 0,115 (48)	1,470 \pm 0,059 (33)
vinorina (4)	125	0,683 \pm 0,054 (60)	0,225 \pm 0,035 (88)	0,349 \pm 0,016 (47)	0,792 \pm 0,075 (49)	1,584 \pm 0,056 (26)
purpelina (10)	125	0,476 \pm 0,042 (79)	0,120 \pm 0,023 (-23)	0,306 \pm 0,028 (63)	0,776 \pm 0,034 (51)	1,445 \pm 0,005 (34)
10-metoxi-sarpagan- 17-ol (8)	125	0,549 \pm 0,062 (72)	0,159 \pm 0,065 (99)	0,393 \pm 0,007 (31)	0,833 \pm 0,07 (44)	1,560 \pm 0,163 (27)
norseredamina (7)	125	0,850 \pm 0,058 (46)	0,292 \pm 0,002 (77)	0,503 \pm 0,025 (0)	1,013 \pm 0,107 (22)	1,802 \pm 0,019 (13)
12-metoxi-N- metilvelosimina (12)	125	0,459 \pm 0,039 (80)	0,192 \pm 0,013 (94)	0,247 \pm 0,026 (85)	0,553 \pm 0,026 (78)	1,500 \pm 0,004 (31)
picrinina (1)	125	0,606 \pm 0,016 (67)	0,167 \pm 0,047 (98)	0,395 \pm 0,009 (30)	1,036 \pm 0,063 (42)	1,662 \pm 0,052 (24)
raucafrinolina (2)	125	1,063 \pm 0,230 (41)	0,317 \pm 0,007 (83)	0,518 \pm 0,004 (18)	1,036 \pm 0,063 (42)	0,932 \pm 0,006 (65)
18-hidroxiyohimbina (15)	125	0,675 \pm 0,051 (61)	0,214 \pm 0,127 (90)	0,447 \pm 0,011 (11)	0,806 \pm 0,0095 (47)	1,660 \pm 0,052 (21)
3-epi- α -yoimbina (16)	125	0,721 \pm 0,095 (57)	0,271 \pm 0,004 (80)	0,456 \pm 0,040 (7)	0,917 \pm 0,010 (33)	1,745 \pm 0,0018 (16)
reserpina (17)	125	0,291 \pm 0,043 (95)	0,136 \pm 0,045 (-13)	0,244 \pm 0,014 (86)	0,349 \pm 0,042 (-8)	0,491 \pm 0,028 (91)

(LKRW15.4 é o extrato acetato básico da raiz de *R. sessilifolia* exsiccata 724 e LKRB23.4 é o extrato acetato básico das cascas de caule de *R. bahiensis*)



5 CONSIDERAÇÕES FINAIS:

Neste trabalho, realizamos o estudo fitoquímico mais detalhado de duas espécies brasileiras do gênero *Rauvolfia*: a *R. bahiensis* e *R. weddelliana* e análise por CG/EM e CLAE dos extratos de *R. weddelliana*, *R. grandiflora* e *R. mattfeldiana*.

O estudo fitoquímico de *R. bahiensis* permitiu o isolamento de 14 alcalóides indólicos com esqueleto sarpagan e ajmalano, comuns em espécies deste gênero. Destes 14 alcalóides, 4 alcalóides são inéditos, 12-metoxi-N-metil-velosimina (**12**); 12demetoxipurpeline (**9**); 12-metoxiafinisina (**13**) e 12-metoxi velosimina (**14**); reforçando a grande potencialidade da natureza na produção de novas substâncias com possível atividade biológica.

O estudo de *R. weddelliana* mostrou a presença de alcalóides com esqueleto yohimbano que não foi observado em *R. bahiensis*. Dentre eles, isolamos a reserpina (**17**), conhecido fármaco utilizado como antihipertensivo, além das conhecidas 18-hidroxi yohimbina (**15**) e 3 α -epi-yohimbina (**16**).

A análise qualitativa realizada para os extratos alcaloídicos de *R. weddelliana*, *R. grandiflora* e *R. mattfeldiana*, por CLAE e CG/EM indica a presença de metabólitos diferentes dos isolados de *R. bahiensis* e *R. weddelliana*, o que demonstra um perfil alcaloídico diferente em plantas do mesmo gênero. Isto mostra que plantas do mesmo gênero não necessariamente possuem o mesmo conteúdo alcaloídico, sendo importante, portanto estudar detalhadamente cada espécie disponível.

A análise fitoquímica (CG/EM e CLAE) de indivíduos da mesma espécie, coletados em locais diferentes, indica a presença de alcalóides diferentes. Isto pode ser influência do local de coleta e/ou idade da planta. Isto pode ser observado, principalmente, na análise das espécies inicialmente classificadas como *R. weddelliana* (729) e *R. sessilifolia* (724), mas que, após detalhada análise taxonômica, revelarem ser a mesma espécie, *R. weddelliana*. A análise por

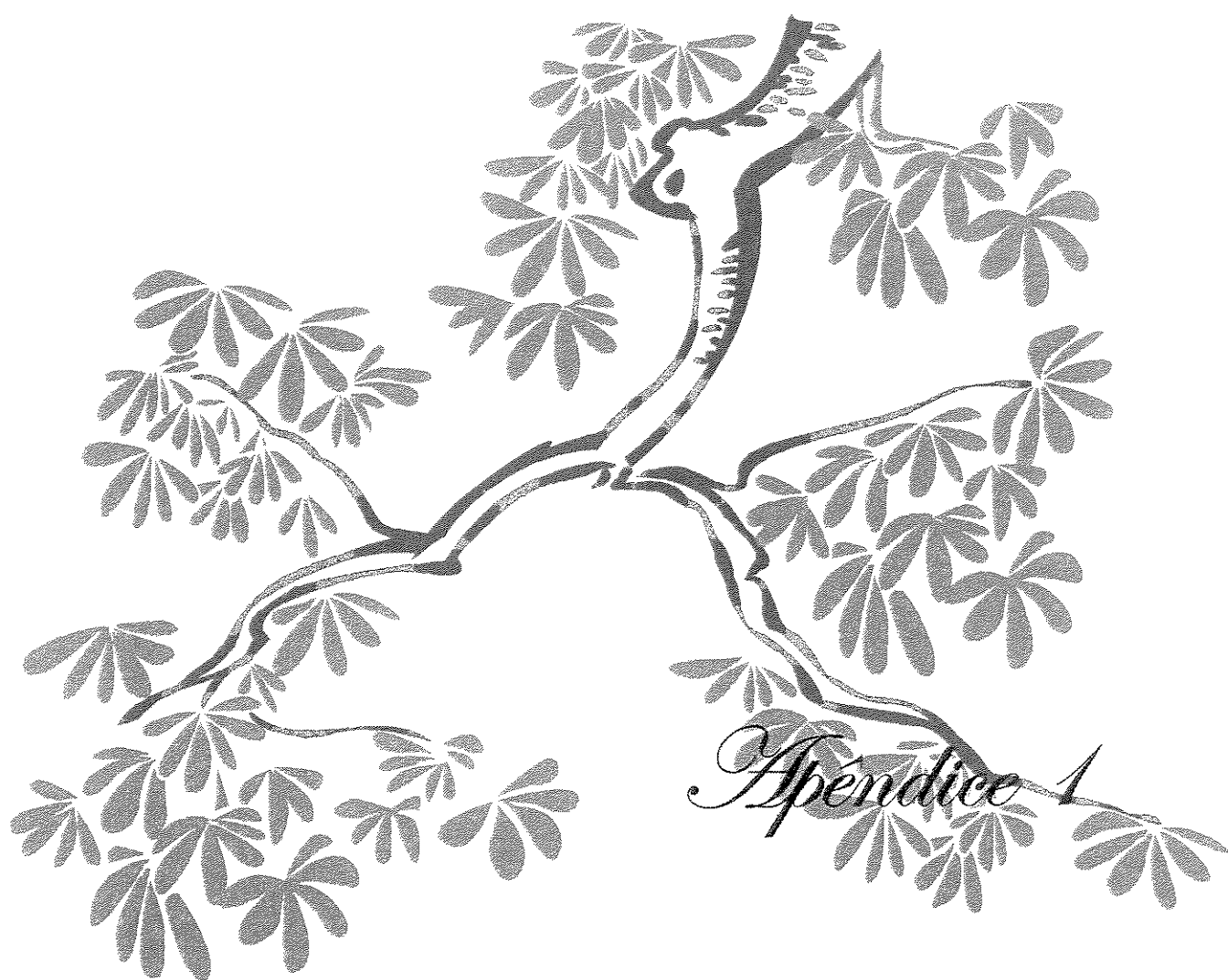
CLAE mostra claras diferenças no perfil cromatográfico destas espécies. O extrato CHCl_3 de *R. sesselifolia* mostra a presença de reserpina **17** e ausência de reserpilina **18**, enquanto que a análise do extrato clorofórmico ácido de *R. weddelliana* mostra a presença de reserpilina **18** e ausência de reserpina **17**.

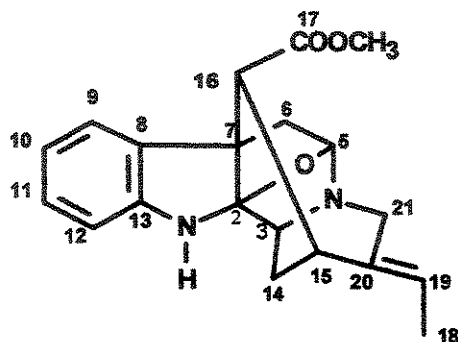
A análise de diferentes indivíduos da mesma espécie coletados no mesmo local mostra diferença no seu perfil cromatográfico. Isto mostra a importância de um controle de qualidade rigoroso na utilização e produção de fitoterápicos.

Os testes de citotoxicidade com *Artemia salina* , com os extratos alcaloídicos de *R. bahiensis* e *R. weddelliana*, mostraram promissora atividade citotóxica. Essa atividade foi confirmada por bioensaios de citotoxicidade 'in vitro' com cinco tipos de cultura de células tumorais. (CPQBA).

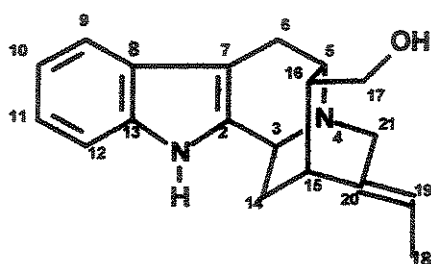
Os resultados de bioatividade, principalmente citotóxica, inicialmente indicada pelo teste de *Artemia salina*, foram posteriormente corroborados pelos ensaios mais específicos, com células tumorais. Isto demonstra a utilidade e importância do uso de testes de bancada, ou seja, de testes mais simples, economicamente mais acessíveis, sem a necessidade de material e mão-de-obra especializada, como indicativo de bioatividade de extratos obtidos. Ou seja, uma ferramenta a mais para o fitoquímico.

Desta forma, neste trabalho realizamos o estudo fitoquímico de espécies brasileiras do gênero *Rauvolfia*, que permitiu o isolamento de 18 alcalóides indólicos, com grande potencial biológico.

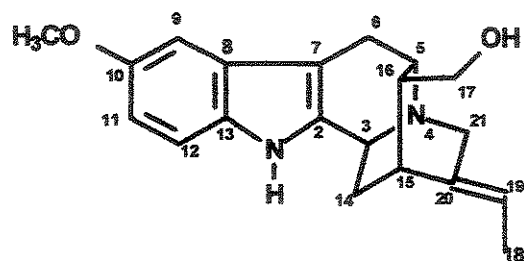


Apêndice 1 - Tabelas de Dados de RMN ^1H e ^{13}C :**Tabela 41:** Dados de ^1H e ^{13}C para o alcalóide picrinina (1).

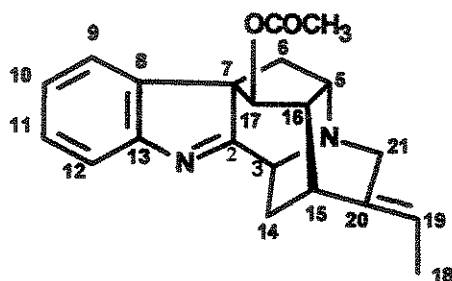
posição	$\delta^1\text{H}$	multiplicidade e $J(\text{Hz})$	$\delta^{13}\text{C}$
01	4,90	sl	-
02	-	-	106,9
03	3,59	d, 5	51,8
05	4,83	d, 2	87,3
06α	2,25	dd, 14, 2	40,3
06β	3,42	d, 14	-
07	-	-	51,0
08	-	-	136,4
09	7,15	d, 7	125,2
10	6,80	d, 7	120,8
11	7,09	t, 7	128,1
12	6,75	t, 7	110,7
13	-	-	147,8
14α	1,85	dd, 13, 2	25,7
14β	2,15	dt, 13, 4	-
15	3,30	sl	30,8
16	2,45	dd, 3	51,6
17	-	-	172,8
18	1,50	dd, 7, 2	12,4
19	5,40	q, 7	120,5
20	-	-	135,4
21	3,15	d, 18	46,1
	3,75	dl, 18	51,3

Tabela 42: Dados de RMN ^1H e ^{13}C para normacusina B (**3**)

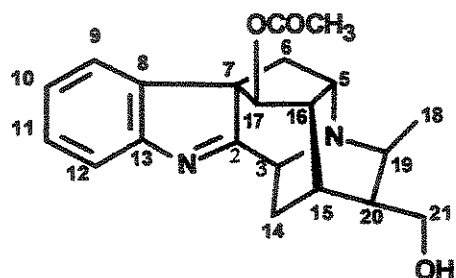
posição	δ ^1H	multiplicidade e J (Hz)	δ ^{13}C
1	8,15	1 H, s	-
2	-	-	134,6
3	4,15	d, 10	50,5
5	2,85	t, 6, 1	54,6
6 α	3,07	dd, 16 e 6	26,8
6 β	2,66	d, 16	-
7	-	-	104,5
8	-	-	127,5
9	7,45	d, 8	118,1
10	7,10	t, 8	119,5
11	7,18	t, 8	121,6
12	7,33	d, 8	111,1
13	-	-	136,4
14 α	2,01	t, 10	33,3
14 β	1,80	sl	-
15	2,80	sl	27,6
16	1,80	sl	44,0
17	3,53	m	64,9
18	1,60	d, 7	12,8
19	5,30	q, 7	117,3
20	-	-	137,3
21	3,53	2H, m	55,7

Tabela 43: Dados de RMN ^1H e ^{13}C para 10-metoxi-sarpagan-17-ol (**8**)

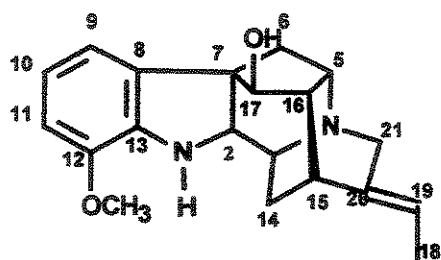
posição	$\delta \text{ } ^1\text{H}$	multiplicidade e $J(\text{Hz})$	$\delta \text{ } ^{13}\text{C}$
1	8,50	sl	-
2	-	-	134,4
3	4,10	q; 10	50,6
5	3,42	m; -	55,6
6α	3,04	dd; 15, 5	26,9
6β	-	-	-
7	-	-	104,1
8	-	-	128,1
9	6,88	d; 8	100,6
10	-	-	154,3
11	6,77	dd; 8, 2	11,5
12	7,20	d; 8	112,1
13	-	-	131,8
14α	1,98	ddl; 13, 10	33,3
14β	1,64	d; 13	-
15	2,60	ml; -	27,5
16	1,80	q; 7	44,1
17	3,46	(2H), d; 7	64,9
18	1,54	(3H); d; 7	12,8
19	5,20	sl; -	117,6
20	-	-	138,4
21	3,42	sl; -	55,6
O-CH₃	3,82	(3H), s; -	56,0

Tabela 44: Dados de RMN ^1H e ^{13}C para vinorina (4)

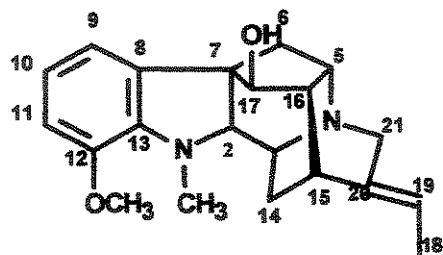
posição	δ ^1H	multiplicidade e J (Hz)	δ ^{13}C
2	-	-	183,7
3	4,27	dd; 7, 4	55,9
5	3,44	t; 6	57,9
6 α	1,75	d; 12	36,9
6 β	2,75	dd; 12, 5	-
7	-	-	64,2
8	-	-	137,5
9	7,47	d; 7	123,9
10	7,23	t; 7	125,7
11	7,45	t; 7	128,9
12	7,63	d; 7	121,2
13	-	-	156,7
14 α	1,95	(2H), t; 4	26,2
14 β	-	-	-
15	3,29	sl; -	27,2
16	2,45	t; 6	48,8
17	5,04	s; -	77,6
18	1,67	d; 7	12,7
19	5,34	q; 7	116,2
20	-	-	136,5
21	3,56	(2H), sl; -	53,8
OCOCH ₃	2,18	(3H); s; -	20,9
CO	-	-	170,3

Tabela 45: Dados de RMN ^1H e ^{13}C para raucafrinolina (2):

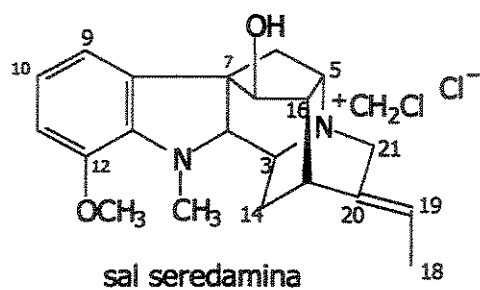
posição	δ ^1H	multiplicidade e J (Hz)	δ ^{13}C
2	-	-	183,5
3	4,15	d; 10	57,1
5	3,65	m	51,2
6 α	2,80	dd; 12, 5	37,5
6 β	1,63	dd; 12	
7	-	-	65,0
8	-	-	136,4
9	7,47	d; 7	123,8
10	7,22	t; 7	125,4
11	7,38	t; 7	128,6
12	7,60	d; 7	120,9
13	-	-	156,5
14 α	1,94	dd; 15, 10	21,6
14 β	1,54	dd; 15, 6	
15	2,48	m	26,5
16	2,38	tl; 6	49,3
17	5,00	s; -	78,2
18	1,27	d; 7	18,3
19	2,52	m; -	53,1
20	1,54	dd; 15, 6	45,7
21	3,75	(2H), dd; 11, 6	61,9
OCOCH ₃	2,17	(3H); s; -	21,2
CO	-	-	170,0

Tabela 46: Dados de RMN ^1H e ^{13}C para norseredamina (**7**):

posição	$\delta^1\text{H}$	multiplicidade e J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$
1	7,62	sl; -	-
2	4,35	s; -	77,7
3	3,3~3,4	m; -	53,0
5	3,04	t; 6	56,6
6 α	1,92	dd; 12, 5	34,2
6 β	2,00	d; 12	
7	-	-	57,0
8	-	-	134,9
9	6,74	d; 7	110,1
10	6,77	t; 7	116,8
11	7,16	d; 7	120,5
12	-	-	146,3
13	-	-	140,8
14 α	1,73	dl; 5	29,7
14 β	1,82	dl; 9	
15	3,14	t; 6	28,5
16	2,21	t; 6	52,4
17	3,3~3,4	m	73,2
18	1,67	d; 6	12,9
19	5,28	q; 6	115,6
20	-	-	138,8
21	3,16	m; -	55,2
O-CH ₃	3,82	s; -	55,6

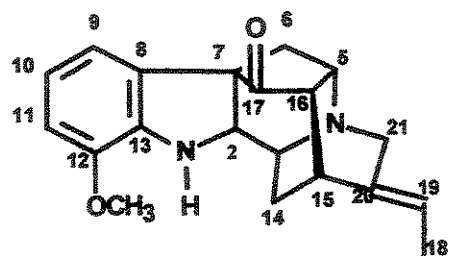
Tabela 47: Dados de RMN ^1H e ^{13}C para seredamina (5):

posição	δ ^1H	multiplicidade e J (Hz)	δ ^{13}C
2	4,47	s; -	77,42
3	3,56	d; 10	52,63
5	3,07	t; 6	56,26
6 α	1,89	dd; 12, 6	35,37
6 β	2,03	d; 12	
7	-	-	55,64
8	-	-	135,25
9	6,77	d; 4	112,6
10	6,78	d; 3	120,86
11	7,14	dd; 6; 3	116,45
12	-	-	147,78
13	-	-	142,23
14 α	1,65	d, 6	29,70
14 β	1,84	d; 10	
15	3,14	t; 6	28,33
16	3,56	d; 10	49,0
17	2,62	s; -	80,2
18	1,65	3H, d; 7	12,91
19	5,26	q; 7	115,0
20	-	-	139,3
21	3,43	2H, t, 3	55,3
N ₂ -CH ₃	3,03	3H, s; -	37,2
O-CH ₃	3,79	3H, s; -	56,3

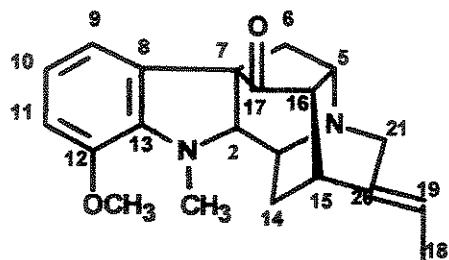
Tabela 48: Dados de RMN ^1H e ^{13}C para sal de seredamina (**6**):

posição	$\delta \text{ } ^1\text{H}$	multiplicidade e $J(\text{Hz})$	$\delta \text{ } ^{13}\text{C}$
2	4,46	s	74,4
3	5,18	sl	62,1
5	3,76	s	63,6
6 α	2,12	dl, 15	30,0
6 β	2,4	m	
7	-	-	53,7
8	-	-	128,7
9	6,66	d, 8	110,2
10	6,76	t, 8	121,6
11	7,19	d, 8	116,8
12	-	-	145,9
13	5,18	sl	62,5
14 α	1,9	sl	28,5
14 β	2,4	m	
15	3,44	s, -	27,4
16	2,85	t, -	52,1
17	3,36	s, -	70,0
18	1,67	3H, d, 7	13,0
19	5,40	q, 7	121,0
20	-	-	138,6
21	5,8	dl, 9	64,5
	6,2	dl, 9	
O-CH ₃	3,65	3H, s	55,5
CH ₂ -Cl	3,7	s	63,6

Tabela 49: Dados de RMN ^1H e ^{13}C para norpurpelina (**11**):

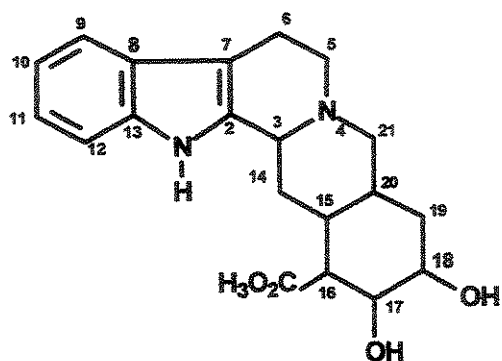


posição	$\delta^1\text{H}$	multiplicidade e J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$
1	4,15	sl	-
2	3,36	s	72,2
3	3,61	d; 10	52,8
5	3,22	t; 6	53,0
6α	2,58	d; 12	33,9
6β	1,77	dd; 12, 5	
7	-	-	59,7
8	-	-	130,4
9	6,72	dd; 8,1	110,5
10	6,82	t; 8	115,9
11	6,88	dd; 8, 1	120,9
12	-	-	146,2
13	-	-	137,6
14α	1,88	dd; 14, 10	31,4
14β	1,40	dd; 14, 4	
15	3,18	t; 5	28,4
16	2,58	td; 8, 2	50,2
17	-	213,7	213,7
18	1,65	(3H), d, 7	12,9
19	5,30	q; 7	115,4
20	-	-	140,3
21	3,51	(2H), dl; 2	55,6
O-CH₃	3,84	s; -	55,6

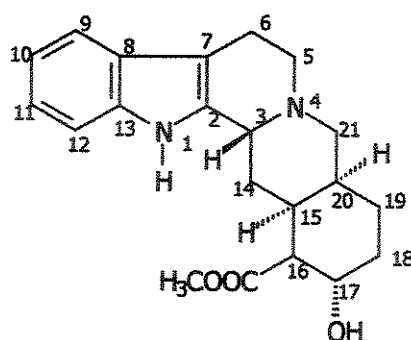
Tabela 50: Dados de RMN ^1H e ^{13}C para purpelina (**10**):

posição	$\delta \text{ } ^1\text{H}$	multiplicidade e $J(\text{Hz})$	$\delta \text{ } ^{13}\text{C}$
2	2,64	s	78,9
3	3,71	d; 10	49,5
5	3,24	t; 5	53,1
6 α	1,64	m; -	35,2
6 β	2,40	d; 12	
7	-	-	58,6
8	-	-	131,1
9	6,78	dd; 6, 5	112,8
10	6,85	d; 5	121,5
11	6,85	d; 6	115,7
12	-	-	147,7
13	-	-	142,0
14 α	1,42	dd; 14, 5	31,5
14 β	1,93	m; -	
15	3,21	t; 6	28,5
16	2,60	dt; 6, 1	50,3
17	-	-	213,8
18	1,64	(3H), dt, 7, 2	12,9
19	5,32	q; 7	116,3
20	-	-	137,1
21	3,51	(2H), t; 2	55,6
N-CH ₃	3,06	s; -	36,9
O-CH ₃	3,80	s; -	56,1

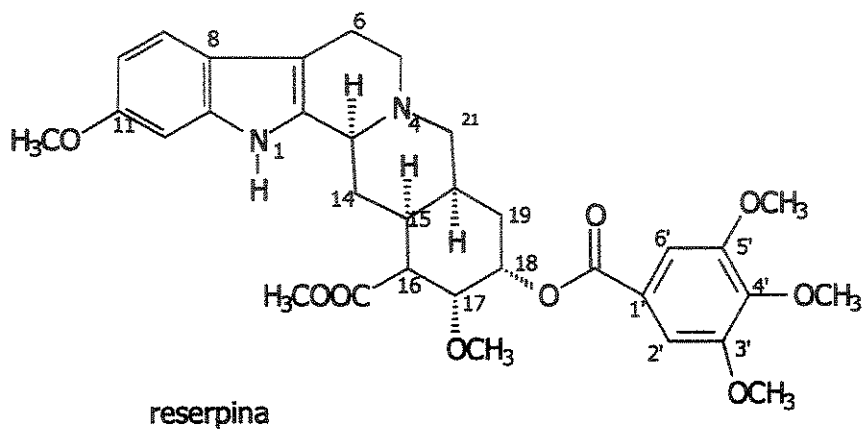
Tabela 51: Dados de RMN ^1H e ^{13}C para 18-hidroxi-yohimbina (**15**)



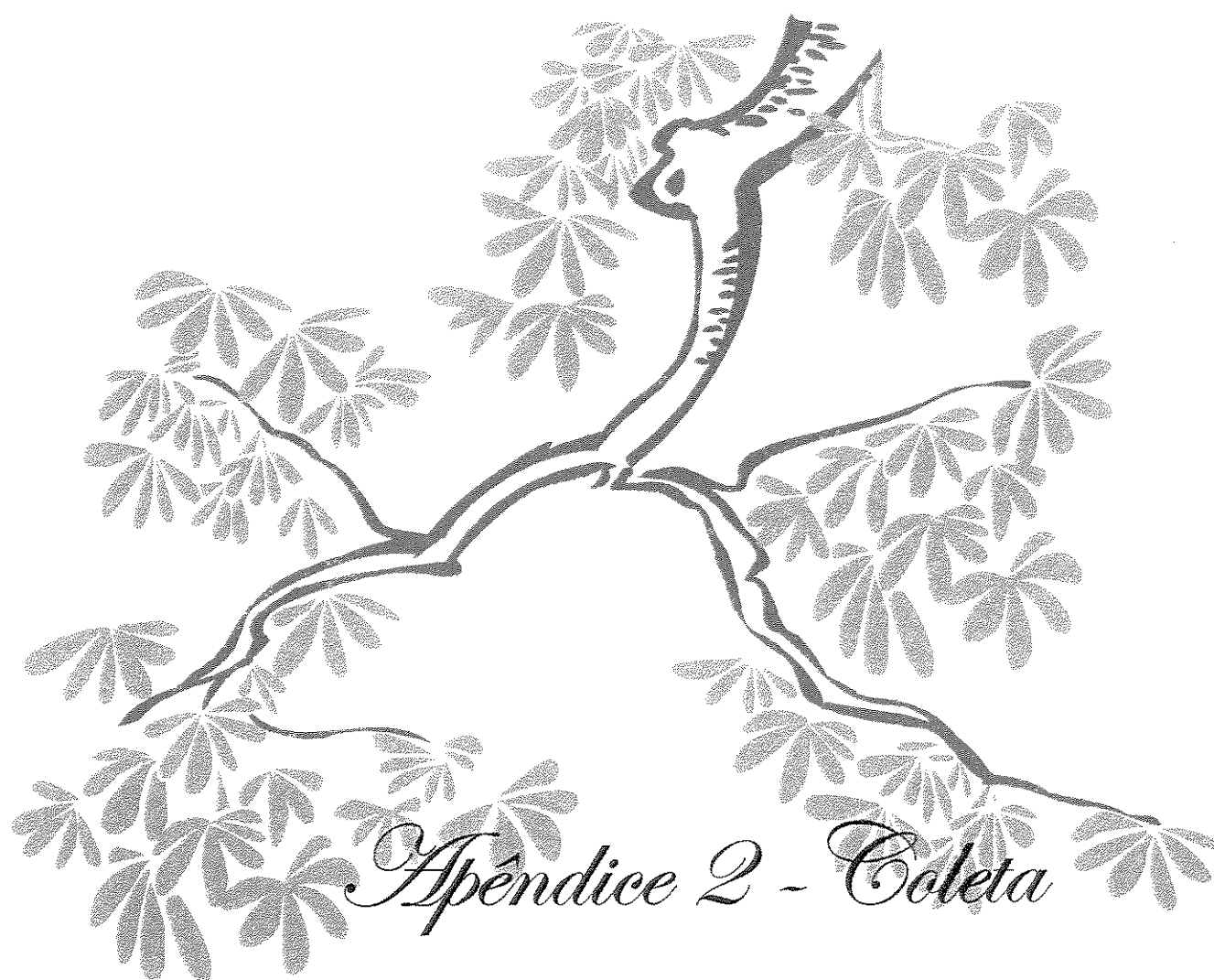
posição	$\delta \text{ } ^1\text{H}$	multiplicidade e J (Hz)	$\delta \text{ } ^{13}\text{C}$
1	8,13	s; -	-
2	-	-	131,9
3	4,41	sl	53,6
5	3,12	m; -	50,9
6 α	2,4~2,6	m; -	16,6
6 β	1,6~1,8	m; -	-
7	-	-	107,8
8	-	-	127,6
9	7,44	d; 7	117,9
10	7,08	t; 7	119,4
11	7,14	t; 8	121,4
12	7,32	d; 8	110,9
13	-	-	135,7
14 α	2,1~2,3	m; -	24,1
14 β	1,6~1,8	-	-
15	1,9~2,0	m; -	32,4
16	4,40	sl; -	53,6
17	3,94	m; -	71,2
18	3,50	m; -	74,3
19	1,6~1,8	m; -	31,7
20	1,64	m; -	34,2
21	2,96	dl; 9	49,3
	2,4~2,6	m; -	-
OCO-CH ₃	-	-	173,9
OCO-CH ₃	3,80	(3H), s; -	52,0

Tabela 52: Dados de RMN ^1H e ^{13}C para 3-epi- α -hidroxi-yohimbina (**16**)**3 α -epi-yohimbina**

posição	δ ^1H	multiplicidade e J (Hz)	δ ^{13}C
1	8,10	sl; -	-
2	-	-	131,7
3	4,54	sl	53,8
5	3,25	m; -	50,9
6α	3,00	m; -	16,6
6β	2,58	d; 13 -	
7	-	-	107,8
8	-	-	127,5
9	7,48	d; 8	118,7
10	7,13	t; 7	119,7
11	7,19	t; 7	121,8
12	7,36	d; 8	111,1
13	-	-	135,9
14α	2,20	m; -	23,7
14β	1,79	d; 12	
15	2,1	m; -	32,5
16	2,43	sl; -	54,1
17	4,08	m; -	65,8
18	1,79	d; 12	24,0
	2,2	m; -	
19	2,13	dd; 12, 4;	33,2
	1,32	dd; 12, 4	
20	1,70	dl; -	35,6
21	3,07	dd; 12, 4;	49,5
	2,58	dl; 12;	
OCO-CH₃	-	-	174,9
OCO-CH₃	3,87	(3H), s; -	52,0

Tabela 53: Dados de RMN ^1H e ^{13}C para reserpina (**17**):

posição	$\delta^{13}\text{C}$
1	
2	129,8
3	53,8
5	51,2
6 α	16,8
6 β	
7	108,5
8	122,2
9	118,6
10	109,1
11	156,3
12	95,2
13	136,4
14 α	24,3
14 β	
15	32,3
16	51,8
17	77,8
18	78,0
19	29,7
20	34,0
21	49,1
11-OCH ₃	55,8
1'	125,4
2'	106,8
3'	152,9
4'	142,1
5'	153,4
6'	105,3
3'-OCH ₃	56,3
4'-OCH ₃	60,8
5'-OCH ₃	56,3
OCO-CH ₃	172,9
OCO-CH ₃	
OCO	152,9



Apêndice 2 - Coleta

Apêndice 2 – Coleta

Na viagem de coleta, além das espécies do gênero *Rauvolfia* e *Himathantus* para estudo fitoquímico foram coletados 126 novos números de plantas diversas, que foram doadas ao herbário da UNICAMP. Estas amostras estão listadas abaixo, divididas por região de ocorrência e apresentadas por família:

Região de Coxim (MS)

Apocynaceae	<i>Rauvolfia sessilifolia</i>
Asclepiadaceae	indet. (1)
Bombacaceae	indet. (1)
Clusiaceae	<i>Clusia</i> sp.
Cyperaceae	<i>Eleocharis</i> sp. (2)
Leguminosae	indet. (1)
Vochysiaceae	<i>Qualea</i> sp. (1)

Área entre Rondonópolis e Cuiabá (MT)

Apocynaceae	<i>Rauvolfia sessilifolia</i>
Apocynaceae	<i>Rauvolfia weddelliana</i>
Lecythidaceae	<i>Bertholletia</i> sp. (1)

Chapada dos Guimarães

Apocynaceae	<i>Hancornia speciosa</i> , <i>Mandevilla illustris</i> , <i>Mandevilla pohliana</i> , <i>Mandevilla tenuifolia</i> , <i>Rauvolfia weddelliana</i> , <i>Stipicoma peltigera</i>
Bignoniaceae	<i>Arrabidaea</i> sp. (2), indet. (1)
Clusiaceae	<i>Clusia</i> sp. (1)
Compositae	indet. (2); <i>Piptadenia</i> sp. (1)
Connaraceae	<i>Rourea</i> sp. (1)
Eriocaulaceae	<i>Paepalanthus</i> sp. (1)
Erythroxylaceae	<i>Erythroxylum</i> sp. (3)
Euphorbiaceae	<i>Sapium</i> sp. (1)
Guttiferae	<i>Kielmeyera</i> sp. (2)
Iridaceae	<i>Trimezia</i> sp. (2)
Labiatae	<i>Salvia</i> sp. (2)
Lecythidaceae	<i>Bertholletia</i> sp. (1)
Leguminosae	<i>Hymenaea</i> sp.(1), <i>Chamaechrista</i> sp. (1), <i>Miroxylum</i> sp (1), indet. (3)
Loganiaceae	indet. (1)
Lythraceae	indet. (1)
Malpighiaceae	indet. (2)
Malpighiaceae	indet. (1)

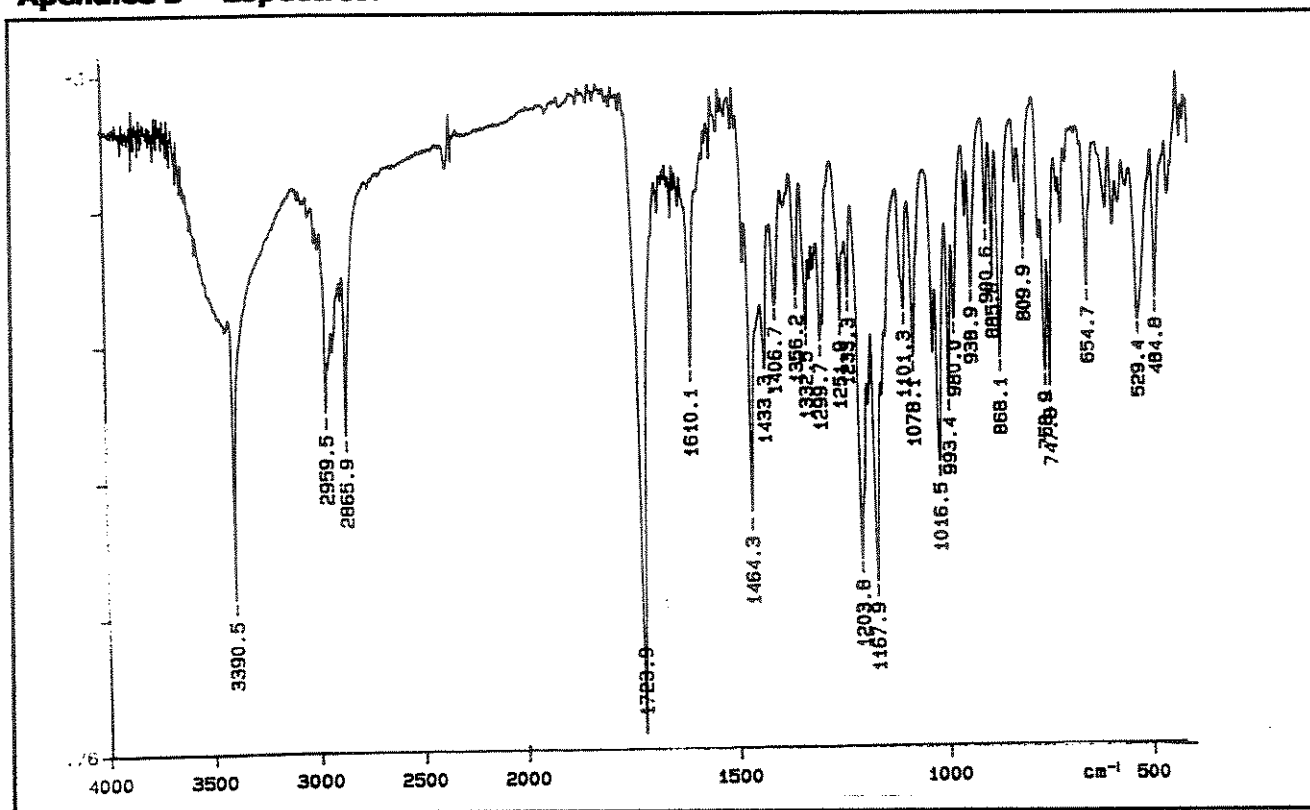
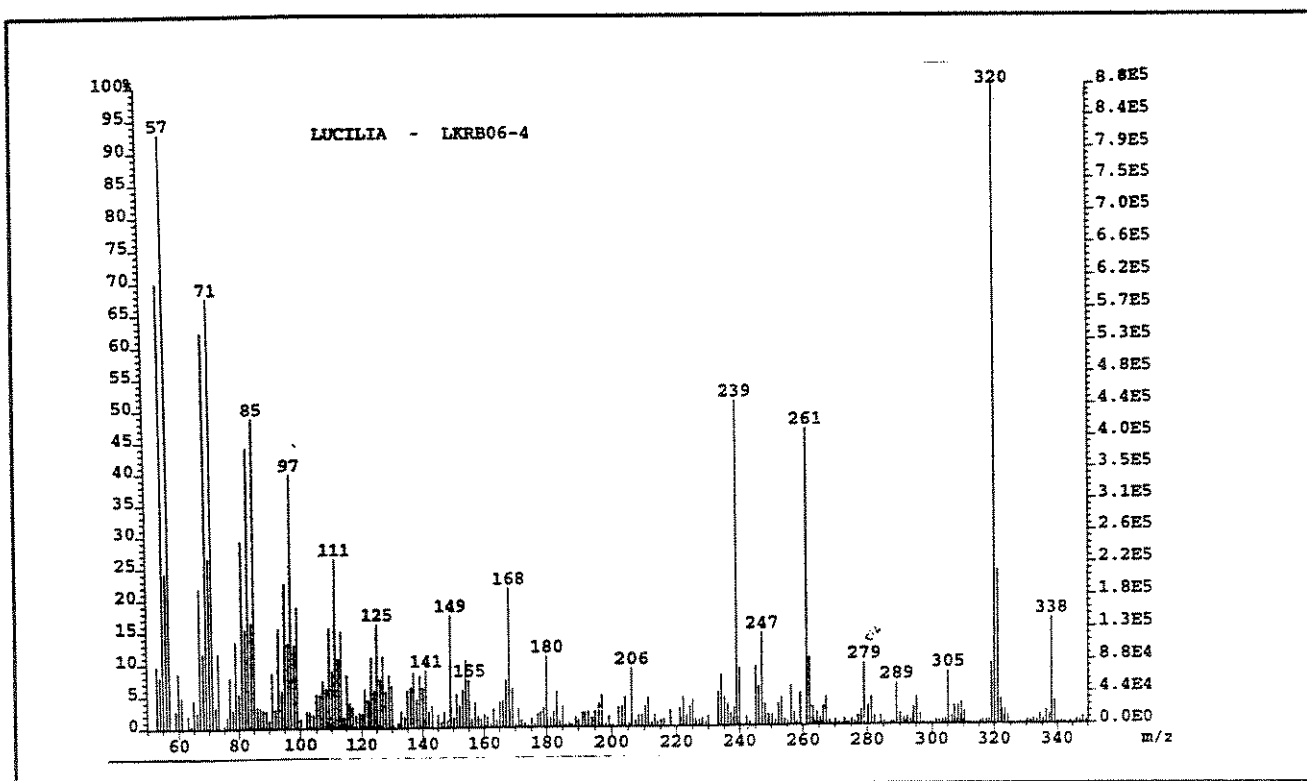
Melastomataceae	<i>Miconia sp.</i> (2), indet. (1)
Meliaceae	<i>Guarea sp.</i> (1)
Monimiaceae	<i>Siparuna sp.</i> (1)
Moraceae	<i>Ficus sp.</i> (1)
Myrtaceae	indet. (1)
Orchidaceae	indet. (1)
Poaceae	indet. (1)
Rosaceae	indet. (1)
Rubiaceae	indet. (1)
Verbenaceae	<i>Stachytarpheta sp.</i> (1)
Vitaceae	<i>Cissus sp.</i> (2)
Vochysiaceae	<i>Qualea grandiflora</i> , <i>Qualea sp.</i> (2), <i>Vochysia sp.</i> (4)
indeterminadas	(15)

Região de Santo Antônio de Leverger e Mimoso

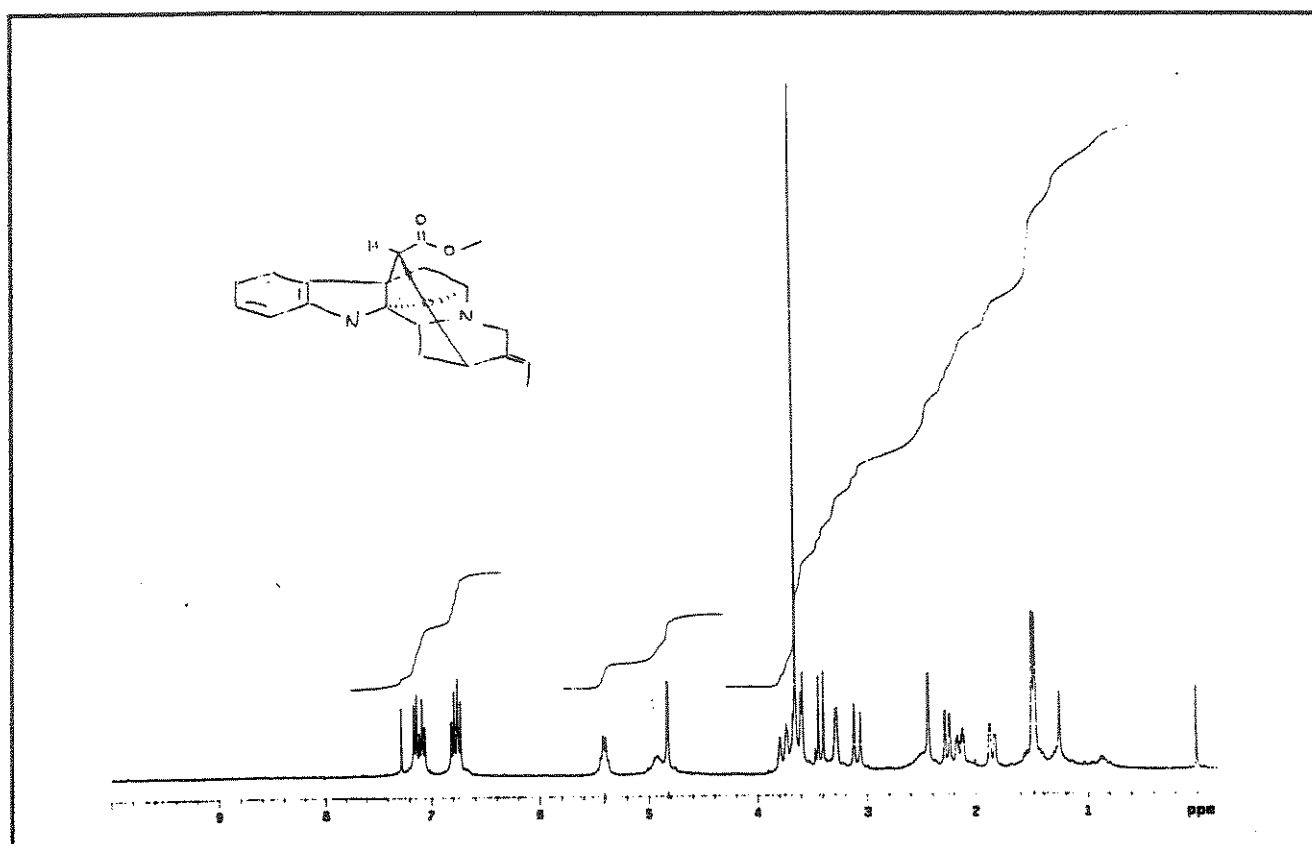
Acanthaceae	indet. (2)
Alismataceae	<i>Echinodorus sp.</i>
Amaranthaceae	indet. (1)
Amaryllidaceae	<i>Alstroemeria sp.</i> (1)
Apocynaceae	<i>Himatanthus obovatus</i>
Apocynaceae	<i>Rhabdadenia pohlii</i>
Apocynaceae	<i>Thevetia peruviana</i> .
Apocynaceae	indet. (1)
Bignoniaceae	indet. (1)
Cyperaceae	<i>Eleocharis sp.</i> (2)
Euphorbiaceae	<i>Dalechampia sp.</i> (2)
Leguminosae	indet. (4)
Leguminosae	<i>Bauhinia sp.</i> (1)
Leguminosae	<i>Macroptilium sp.</i> (1)
Loranthaceae	<i>Psittacanthus sp.</i> (1)
Passifloraceae	<i>Passiflora sp.</i> (2)
Rubiaceae	<i>Alibertia sp.</i> (1)
Sapindaceae	<i>Serjania sp.</i> (1)
Vochysiaceae	<i>Vochysia sp.</i> (1)
indet.	(5)



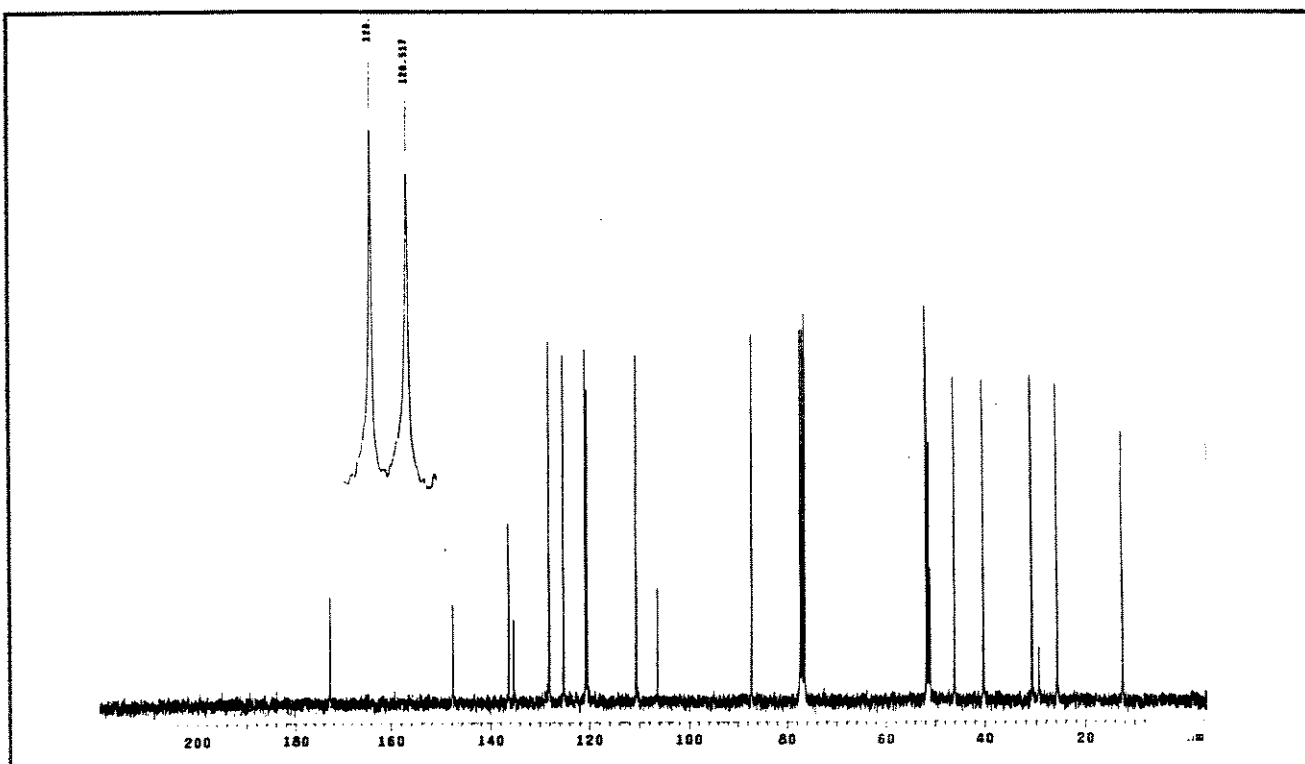
Apêndice 3 – Espectros.

E 1: Espectro de I.V. de picrinina (1), filme de CH₂Cl₂

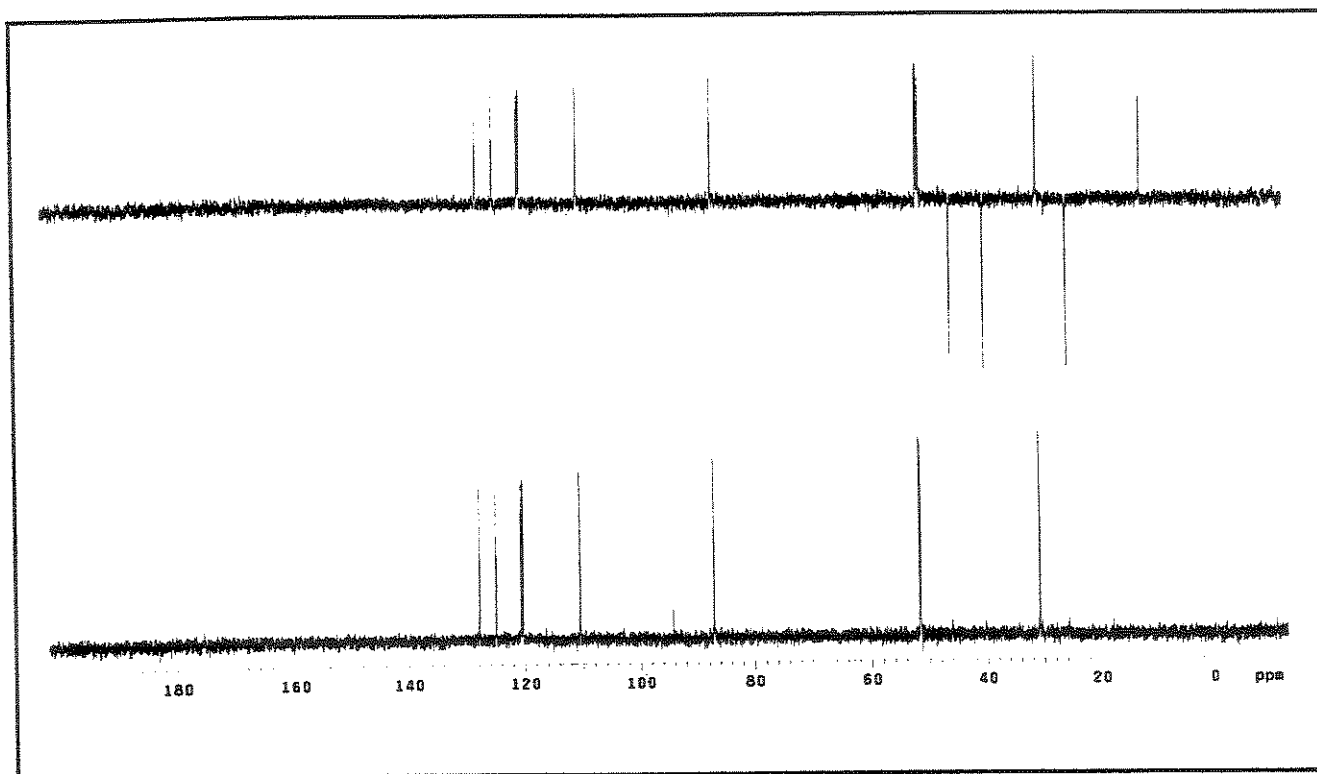
E 2: Espectro de Massas (70 eV) da picrinina (1);



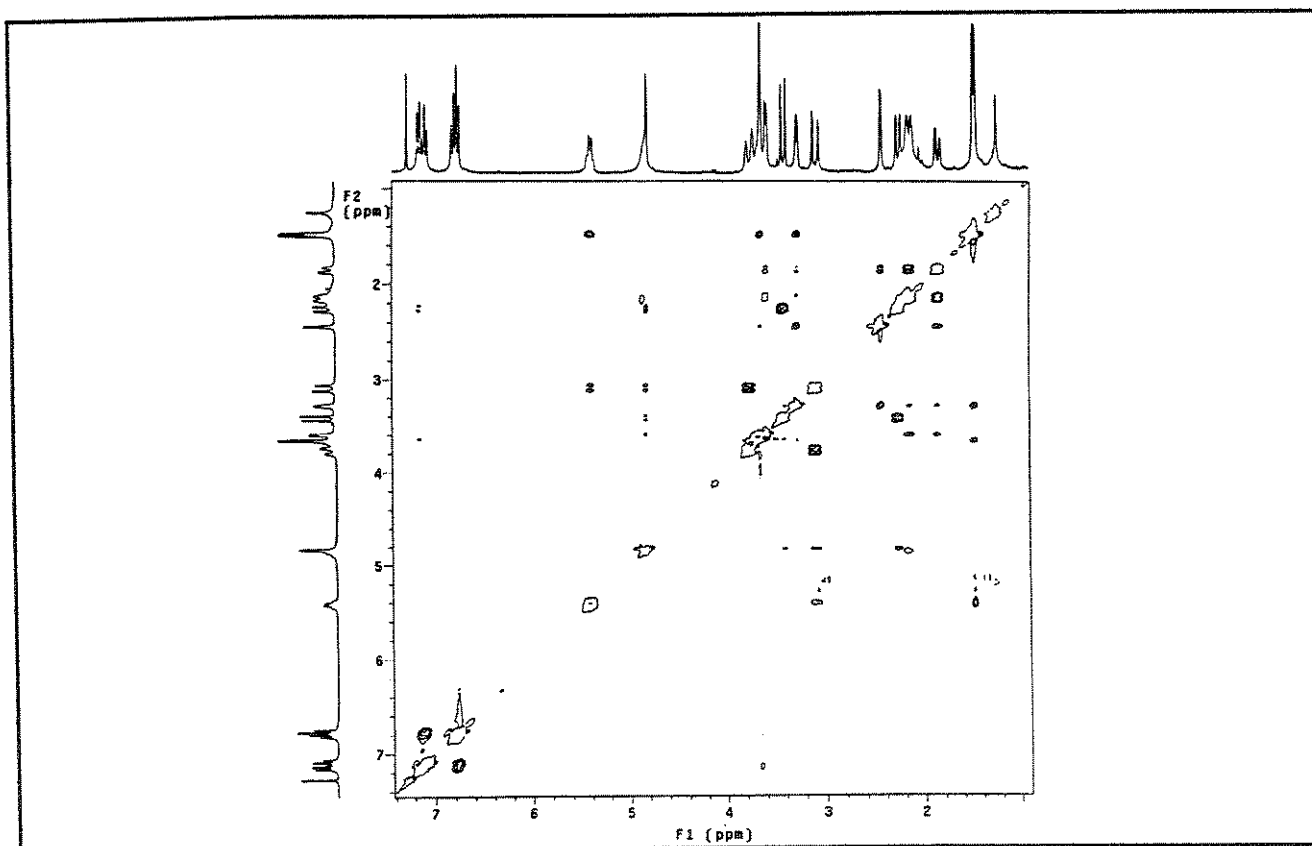
E 3: Espectro de RMN ^1H de picrinina (1); (CDCl_3/TMS ; 300MHz)



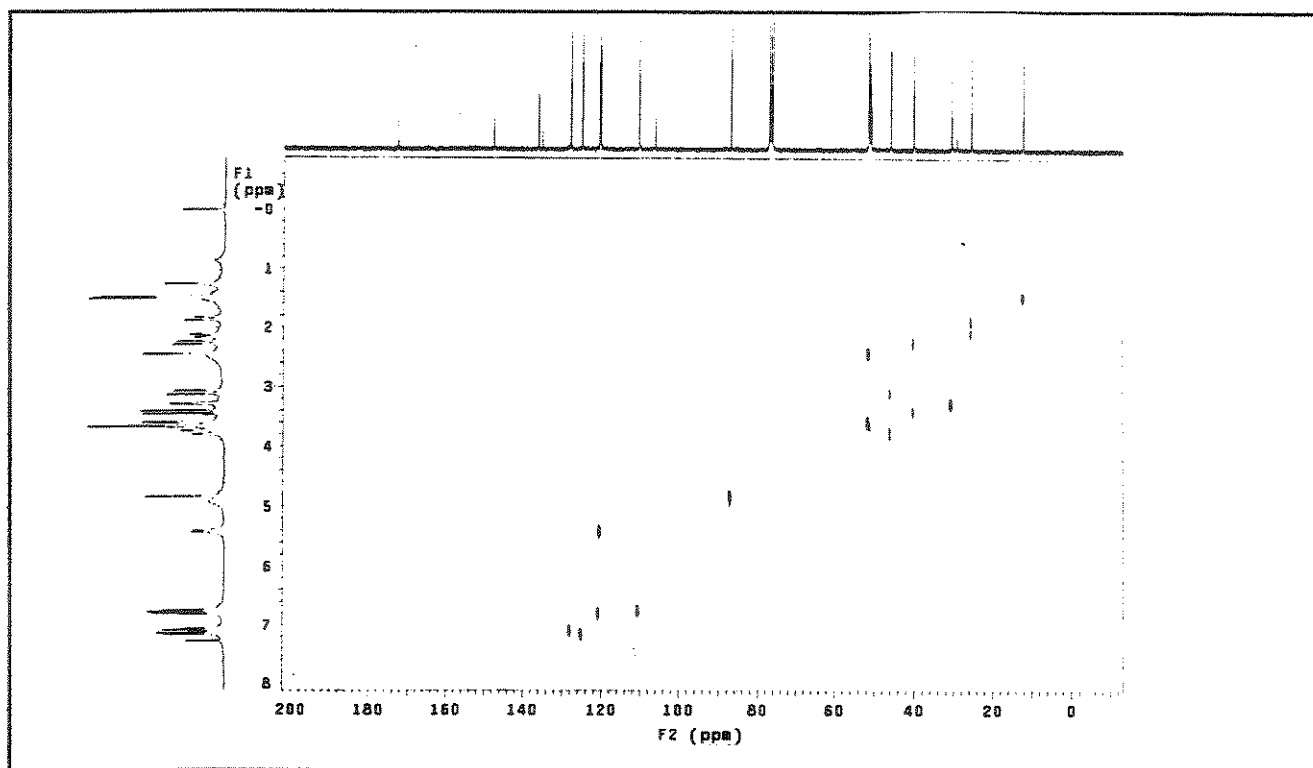
E 4: Espectro de RMN ^{13}C de picrinina (1) (CDCl_3/TMS ; 75 MHz)



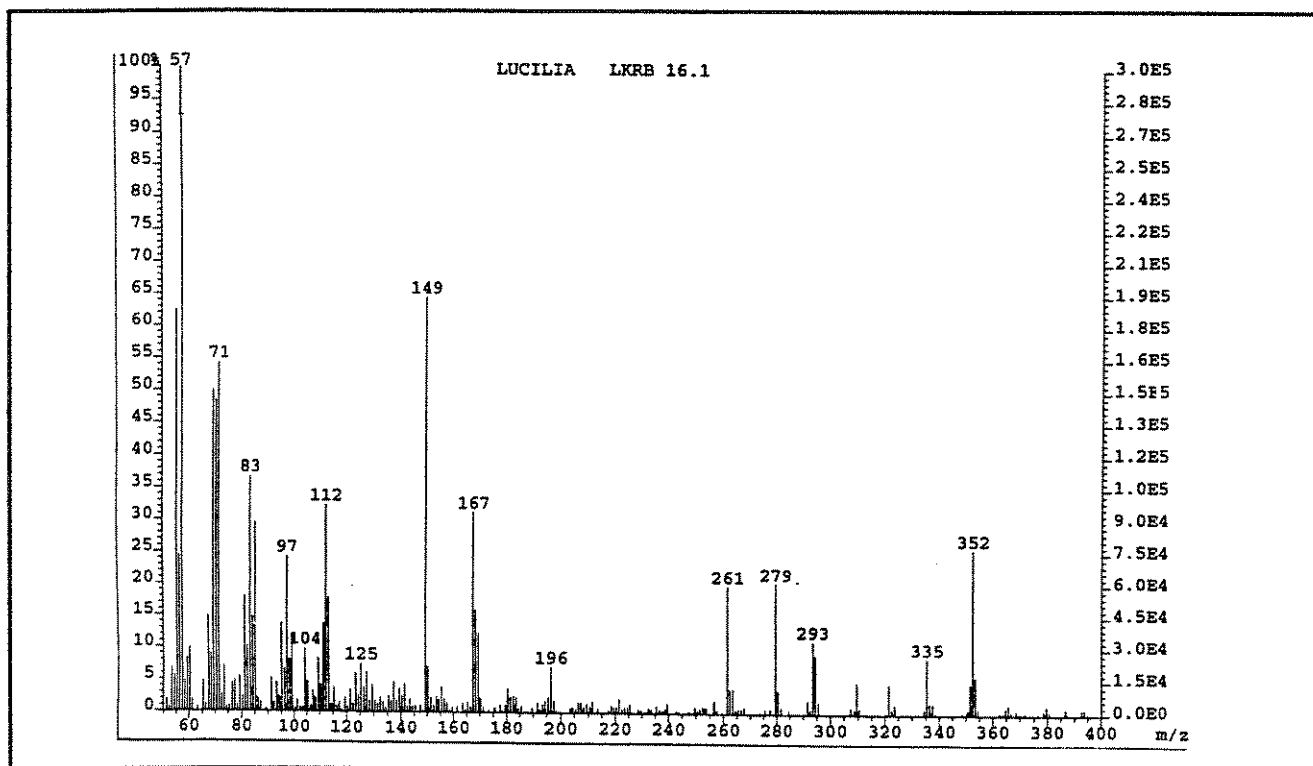
E 5: Experimento de DEPT para a picrinina (1); (CDCl_3/TMS ; 75 MHz)



E 6: Experimento COSY para a picrinina (1)

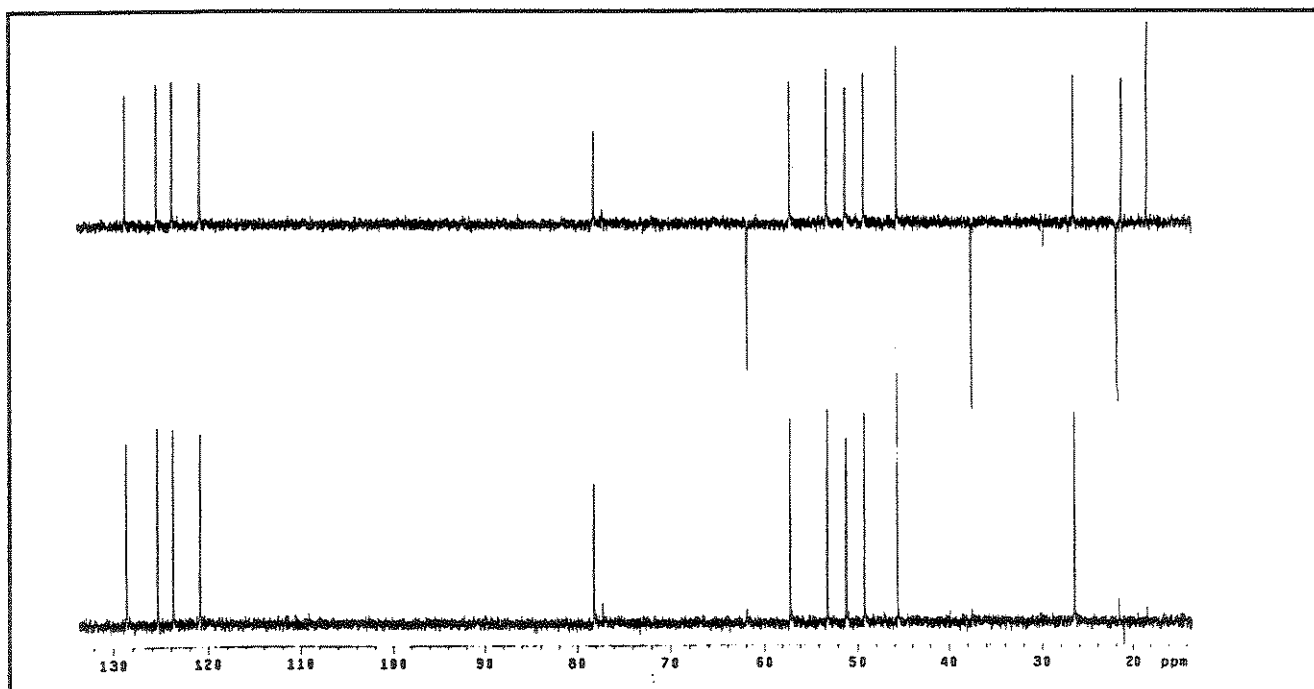


E 7: Experimento HETCOR para a picrinina (1)

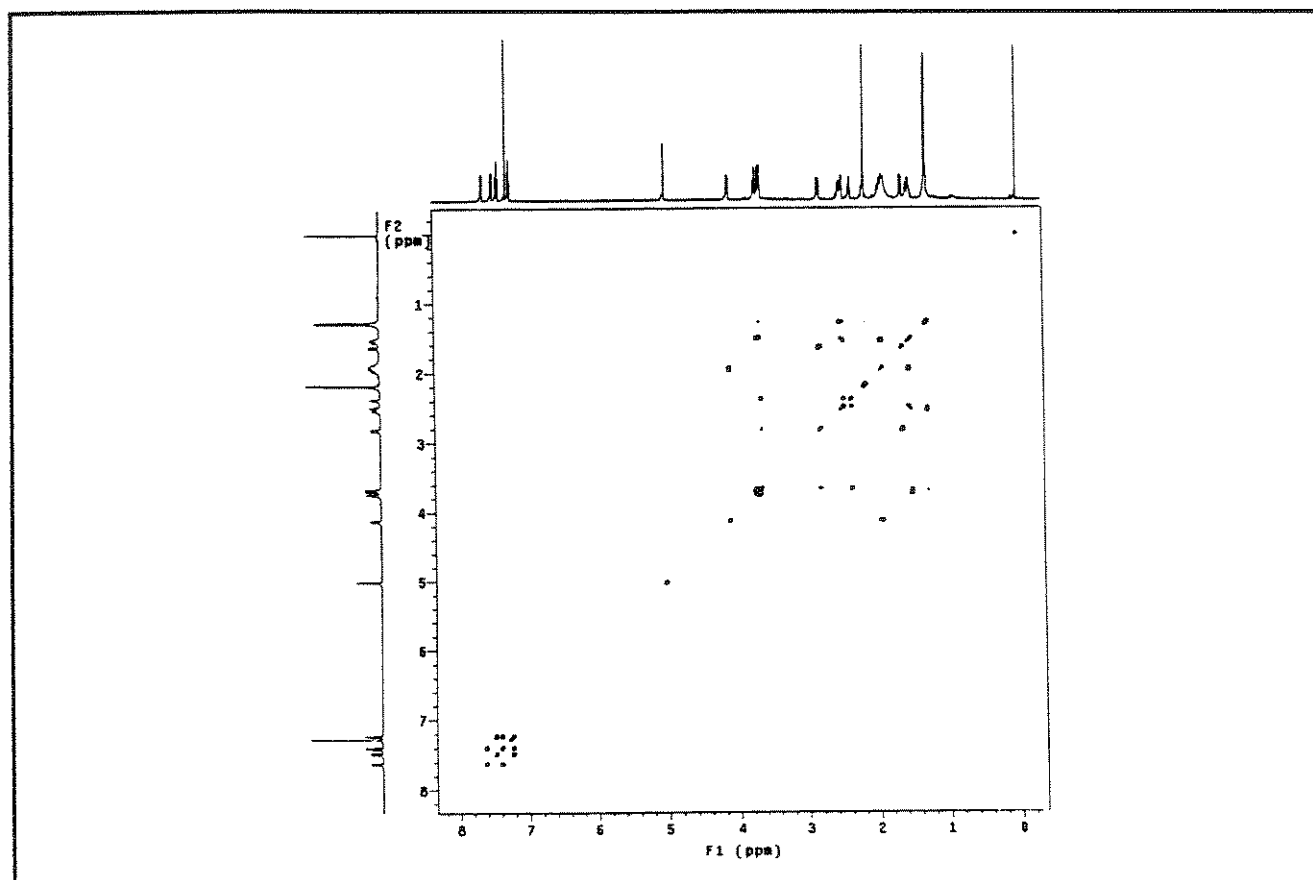


E 8: Espectro de Massas (70 eV) para raucaffrinol (2)

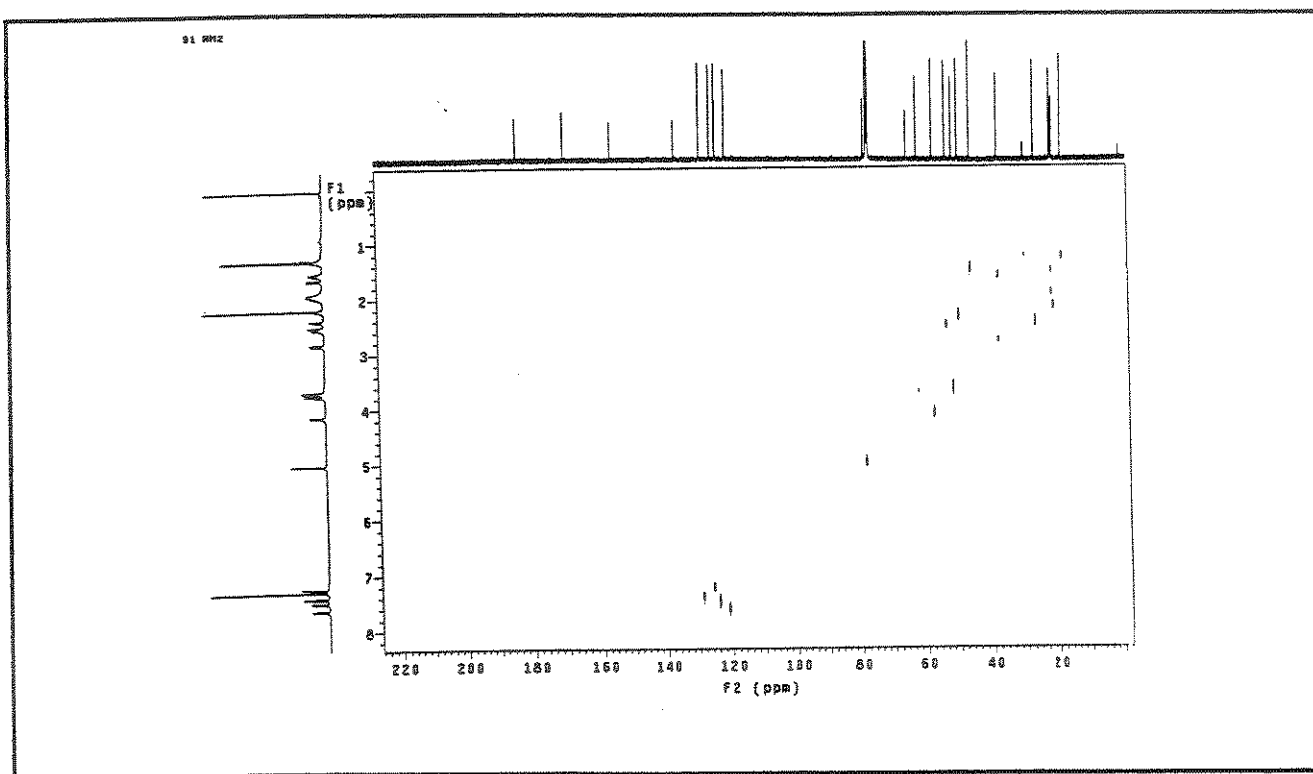




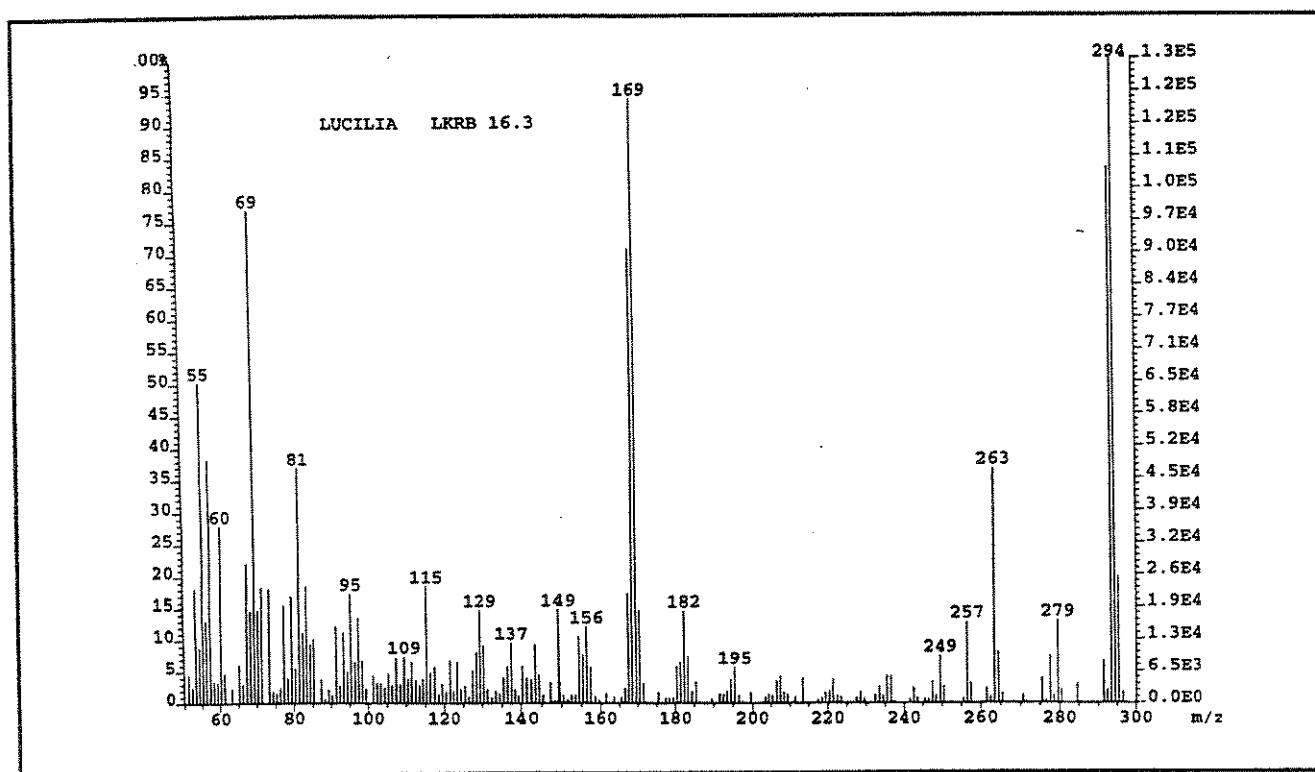
E 11: Experimento de DEPT para raucafrinolina (2) (CDCl₃/TMS; 75 MHz)



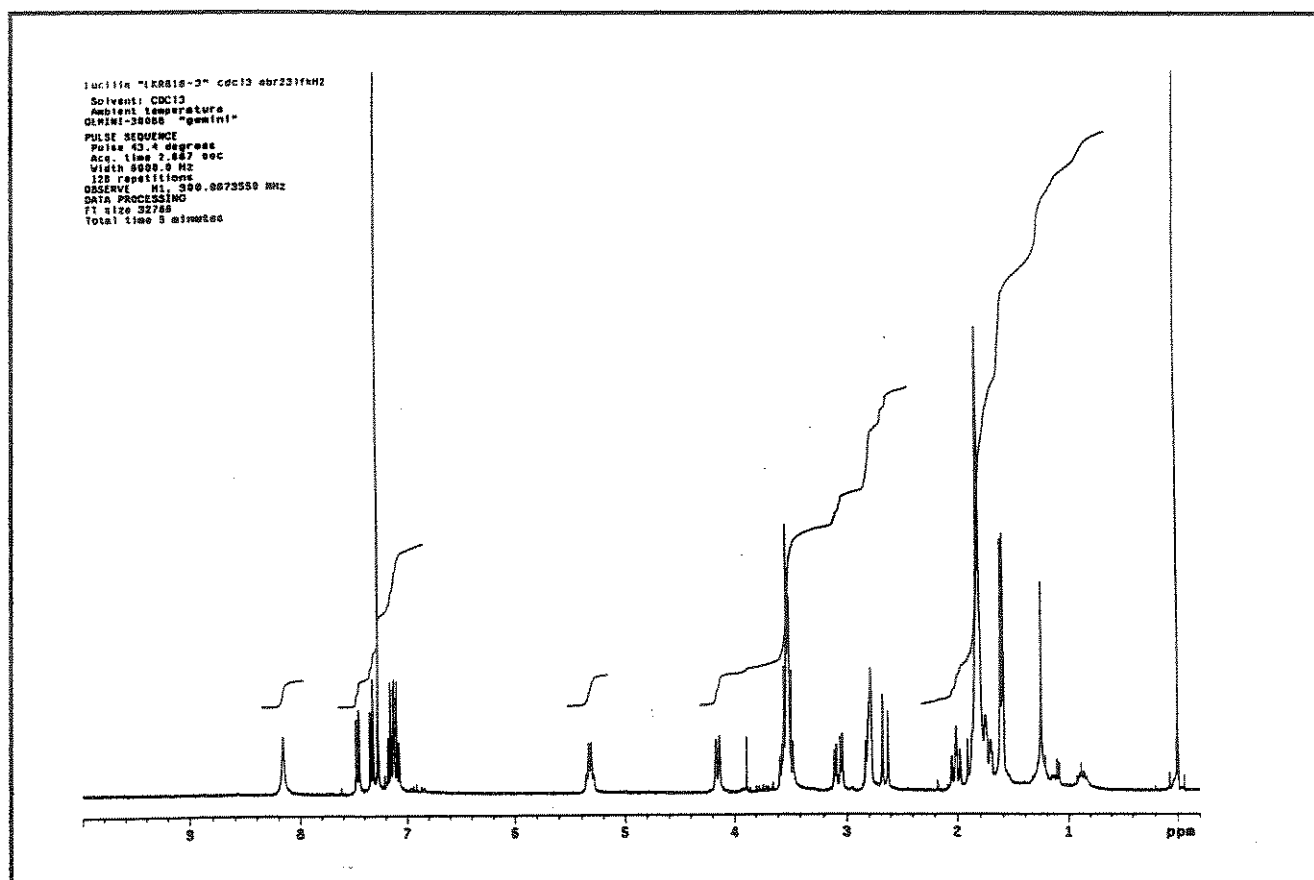
E 12: Experimento COSY para raucafrinolina (2)



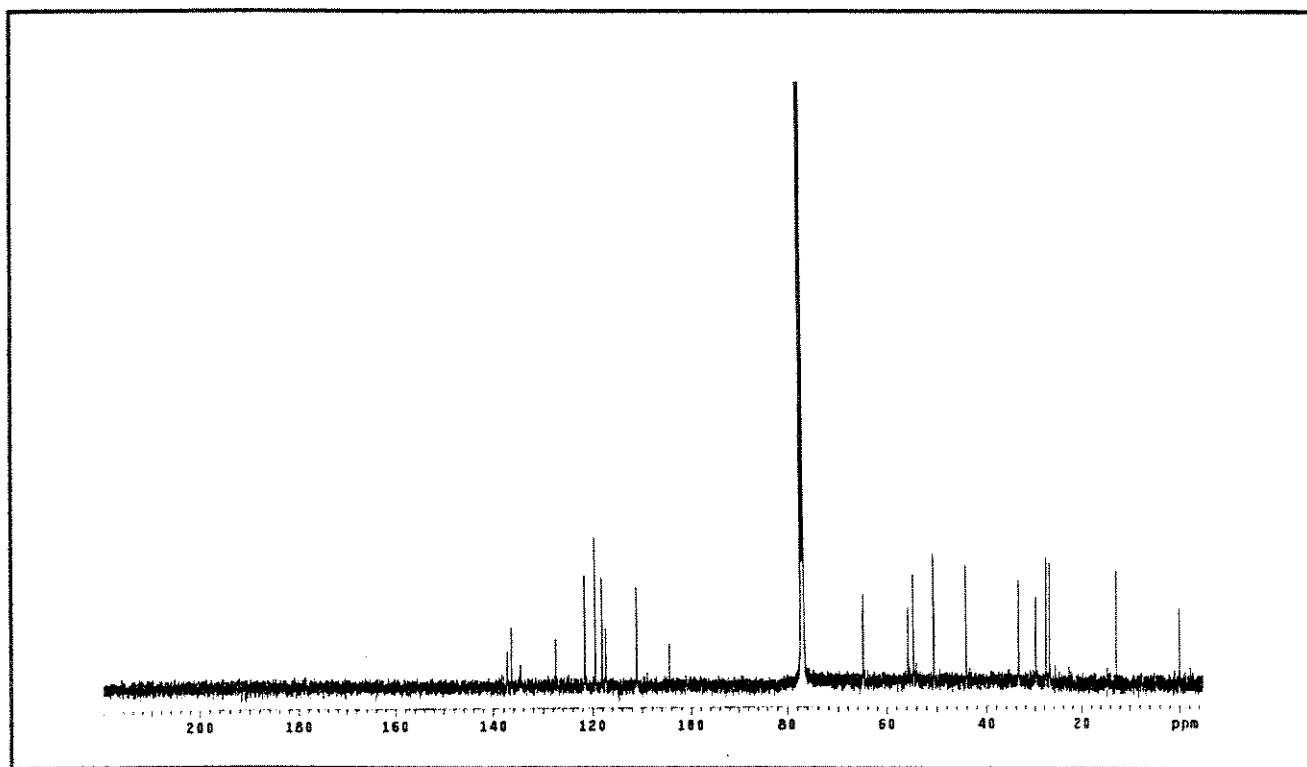
E 13: Experimento HETCOR para raucafrinolina (2)



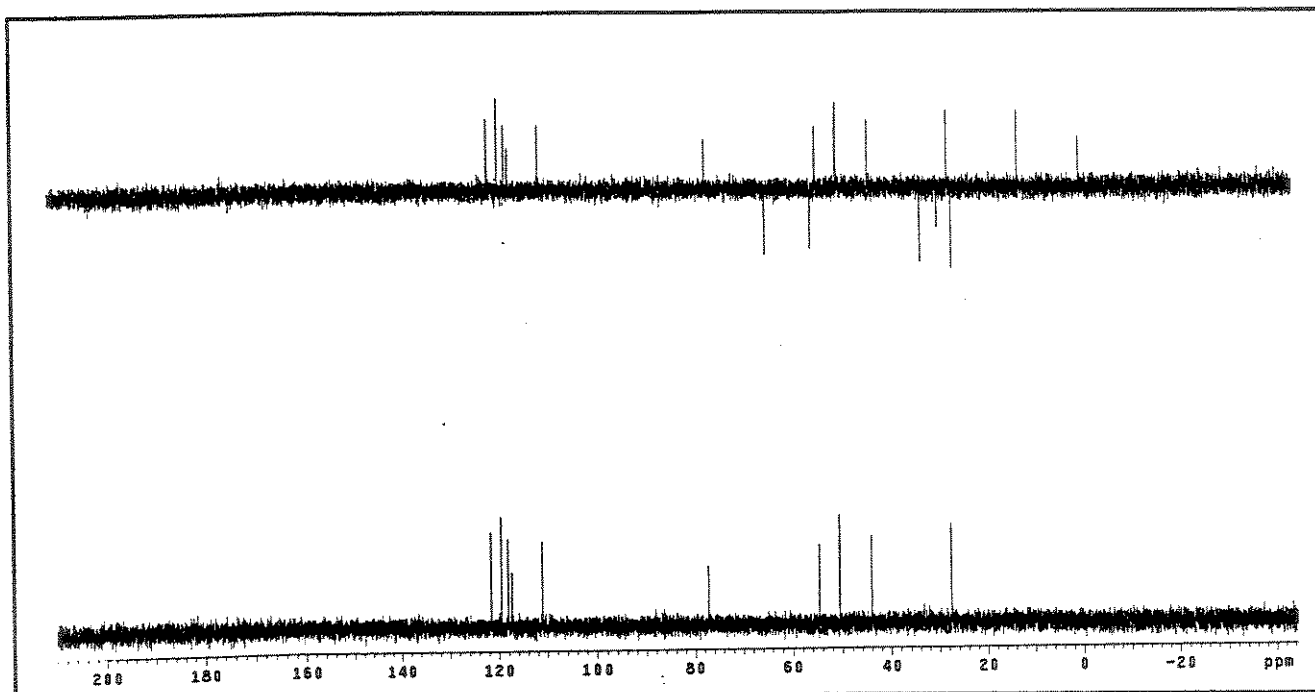
E 14: Espectro de Massas (70 eV) para normacusina B (3)



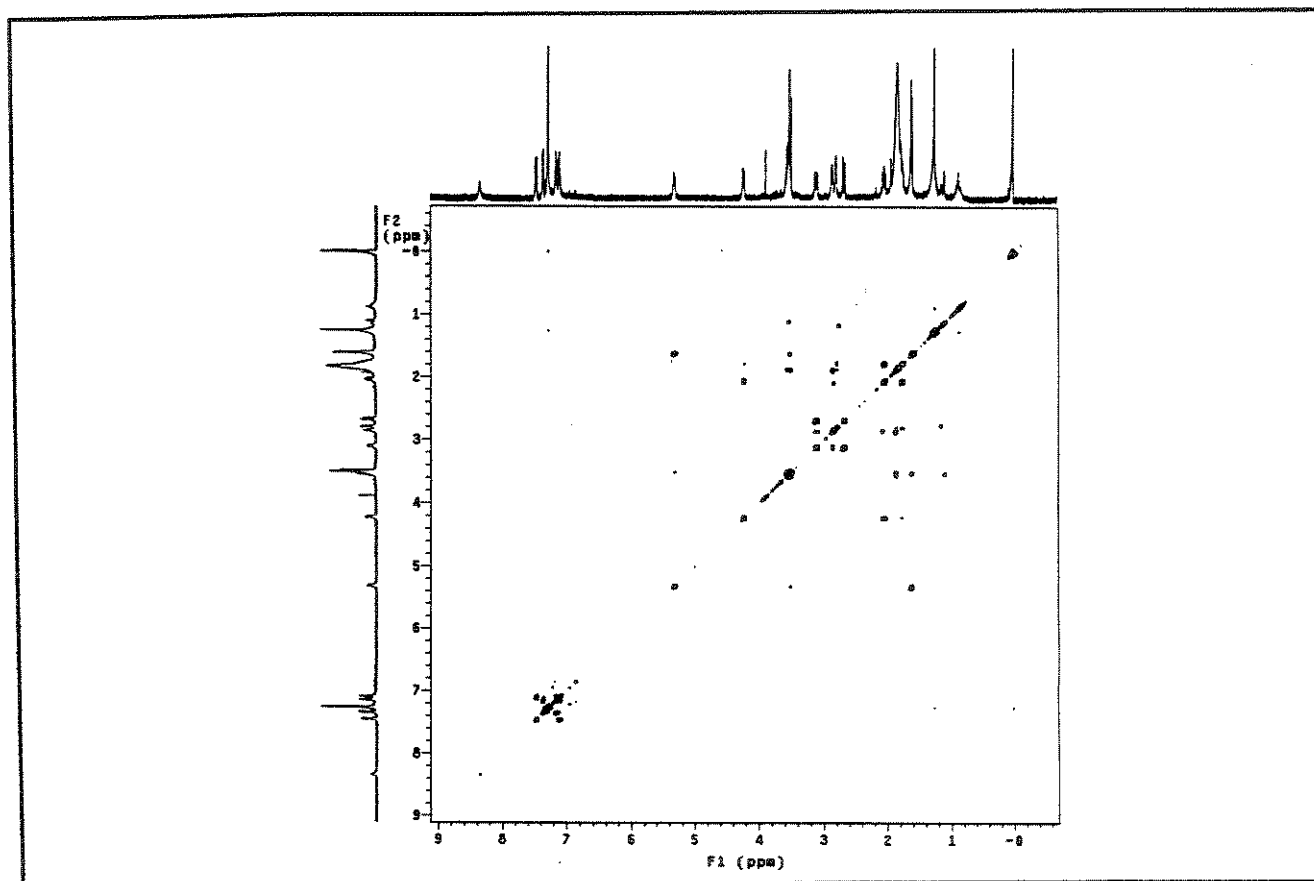
E 15 Espectro de RMN ^1H de normacusina B (**3**) (CDCl_3/TMS ; 500MHz)



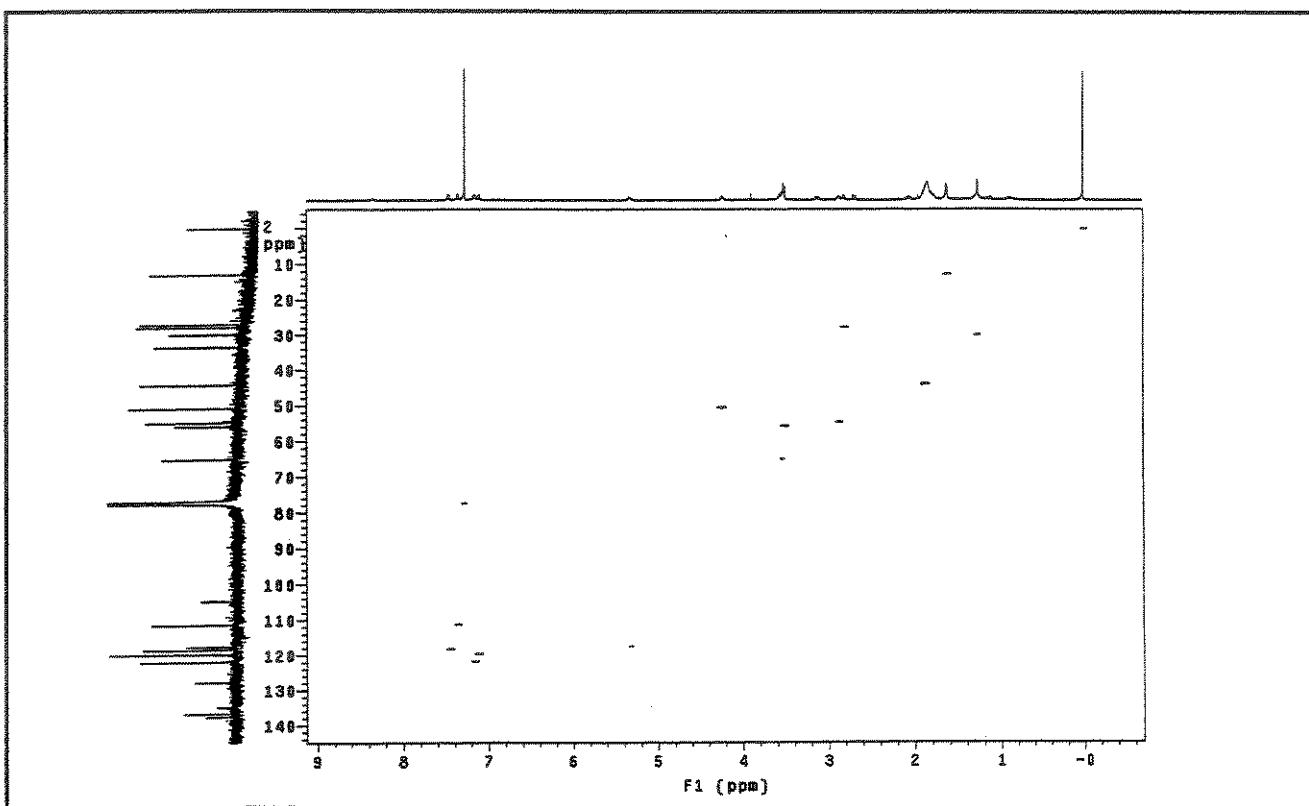
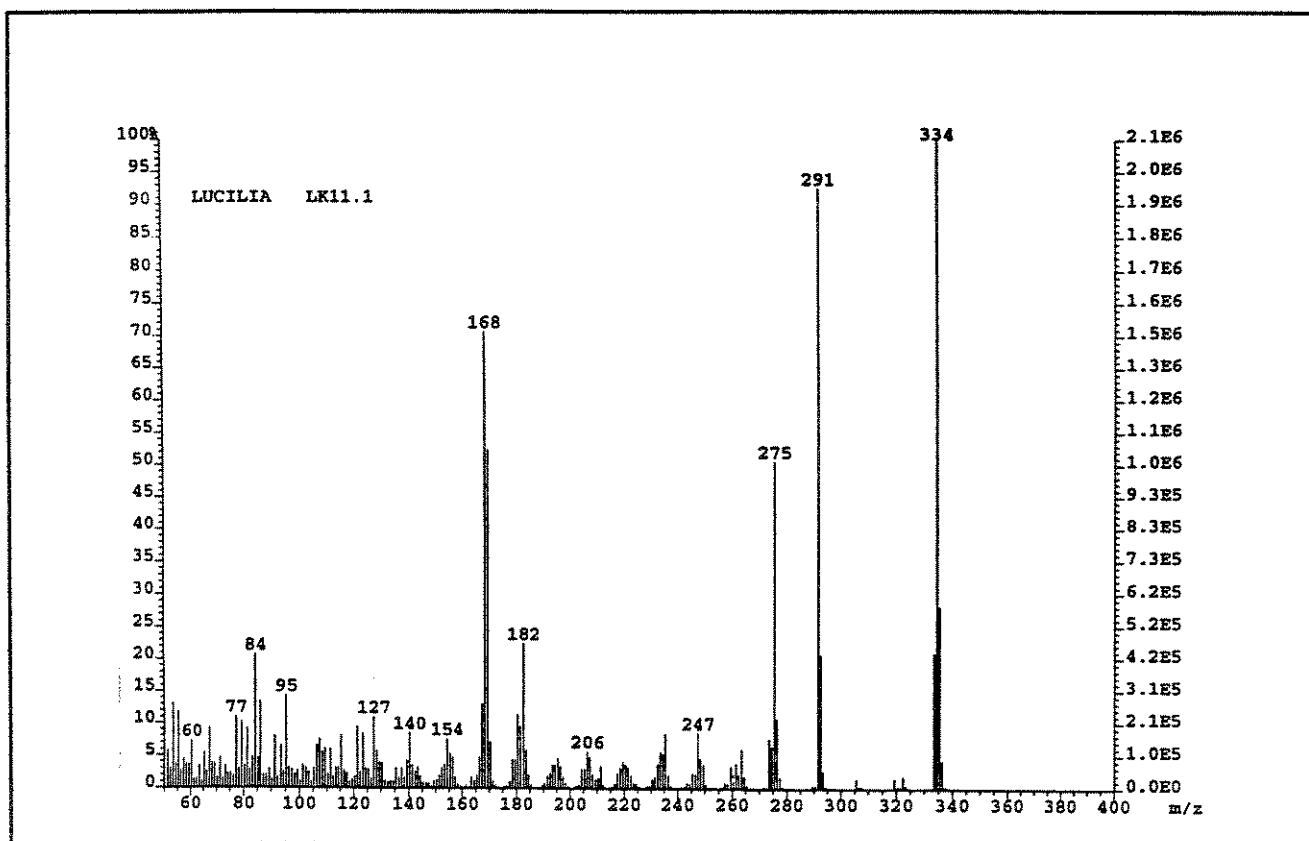
E 16: Espectro de RMN ^{13}C de normacusina B (**3**) (CDCl_3/TMS ; 125 MHz)

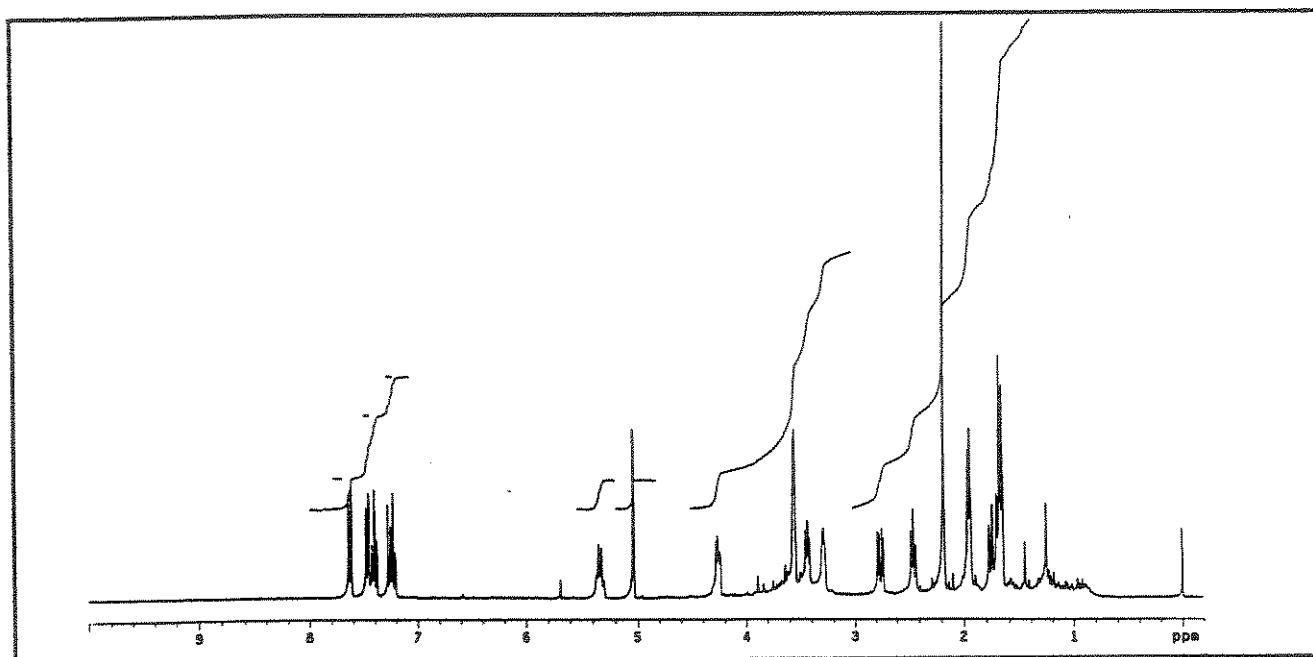
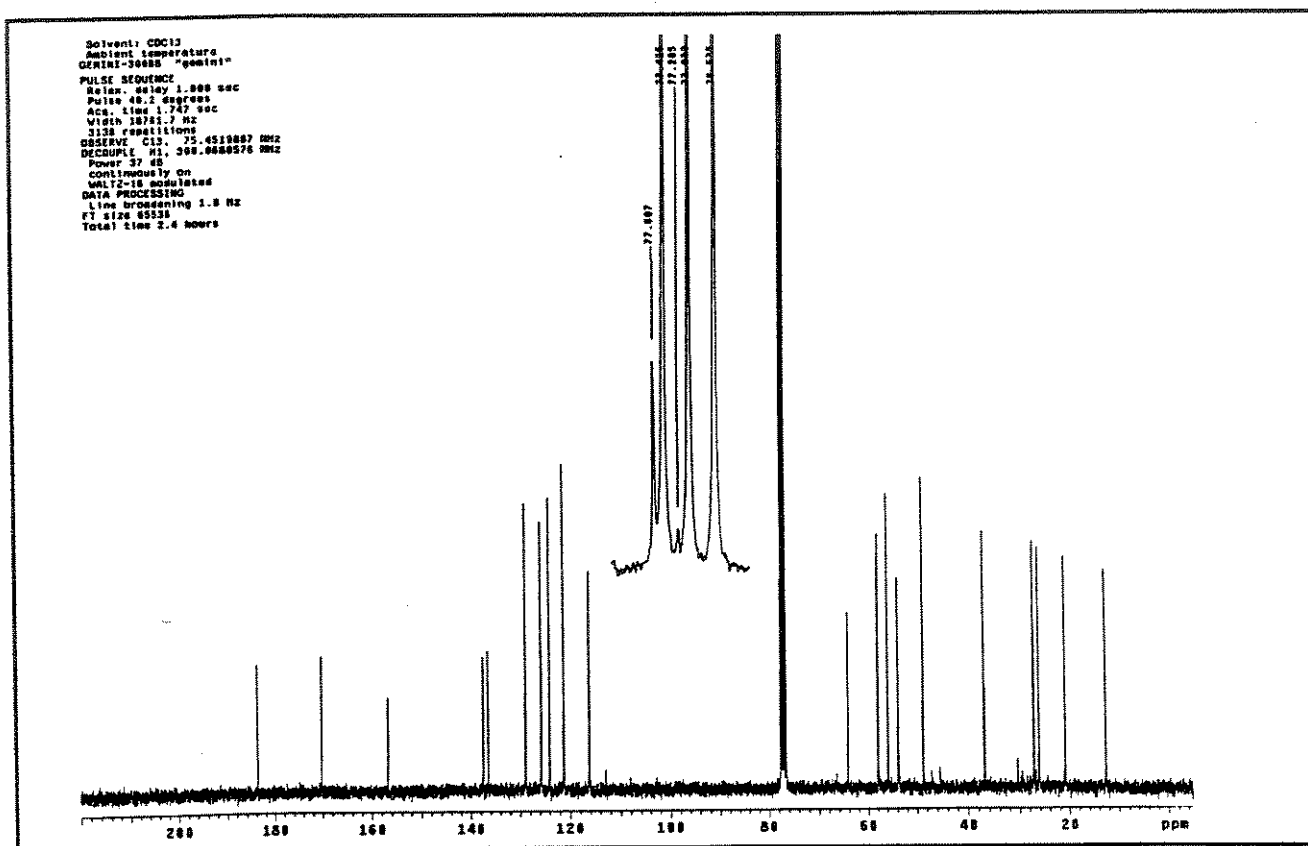


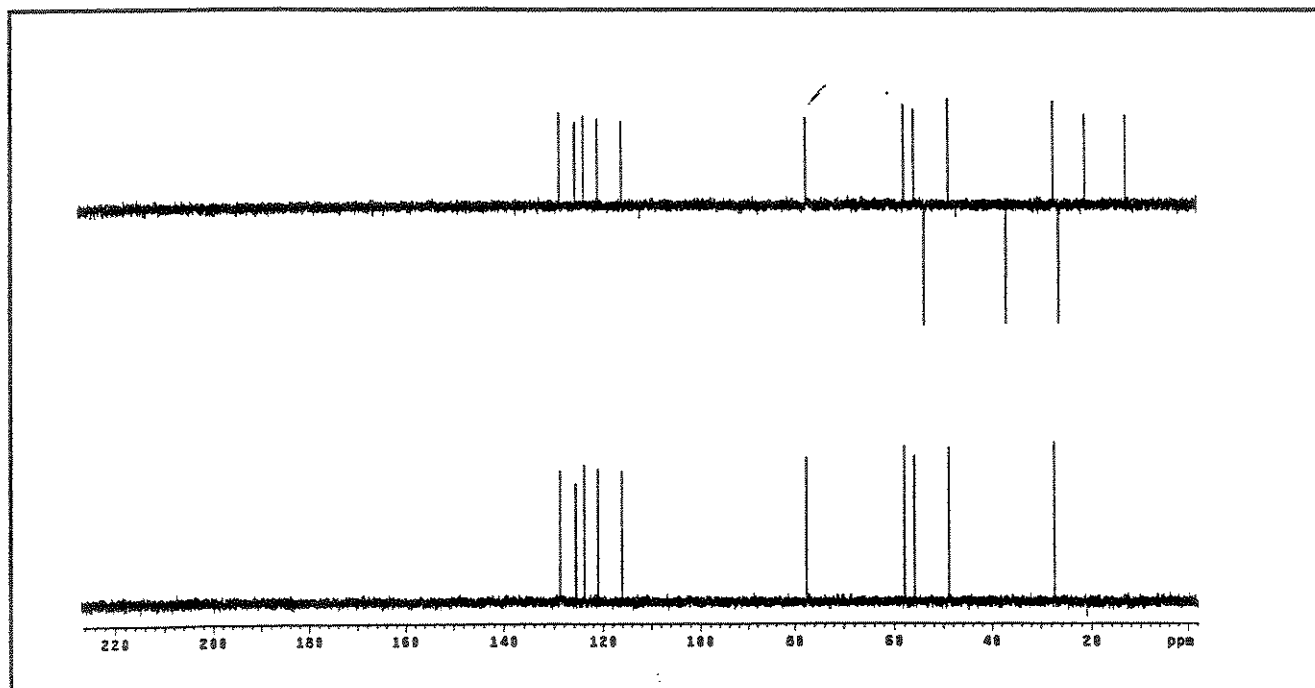
E 17: Experimento de DEPT para normacusina B (**3**) (CDCl₃/TMS; 125 MHz)



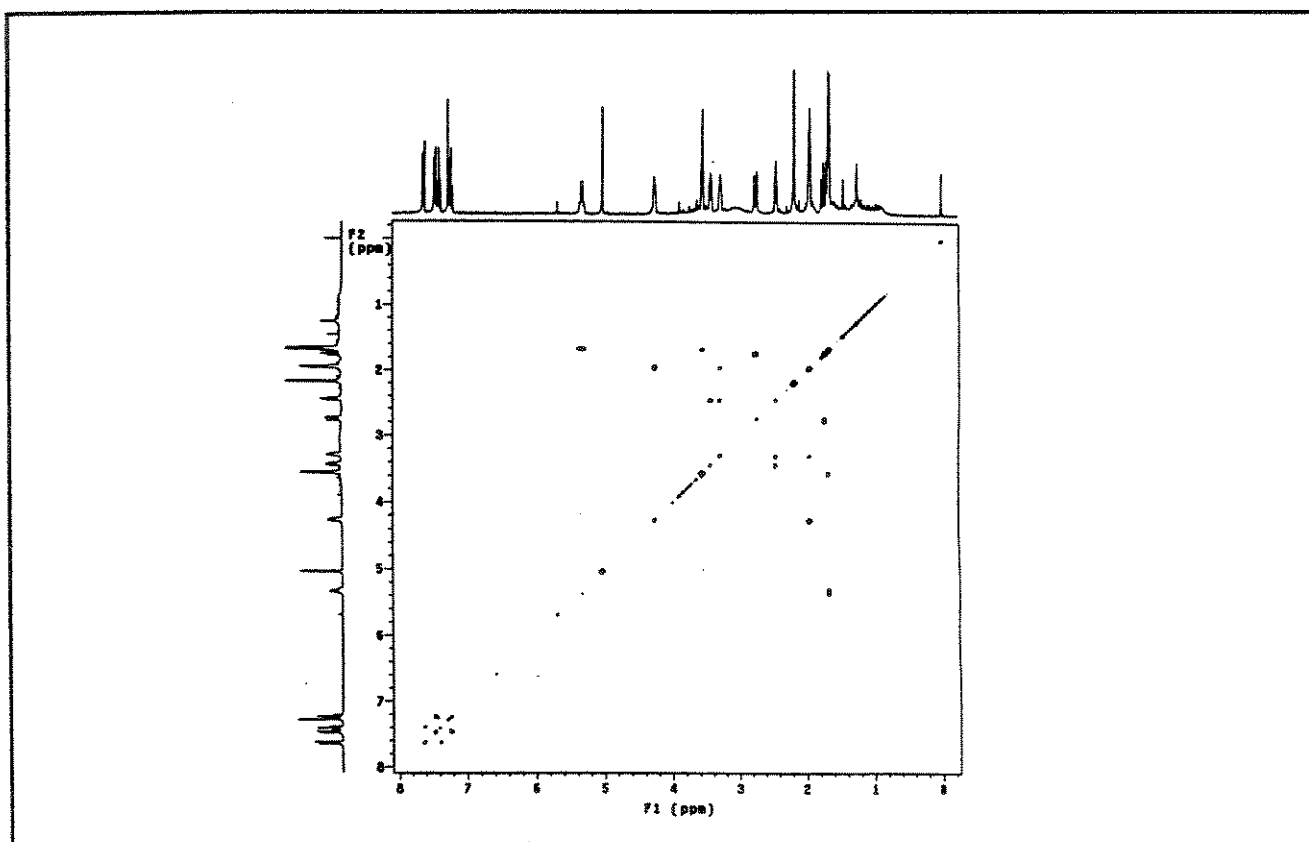
E 18: Experimento COSY para normacusina B (**3**)

**E 19:** Experimento HETCOR para normacusina B (**3**)**E 20:** Espectro de Massas (70 eV) para vinorina (**4**)

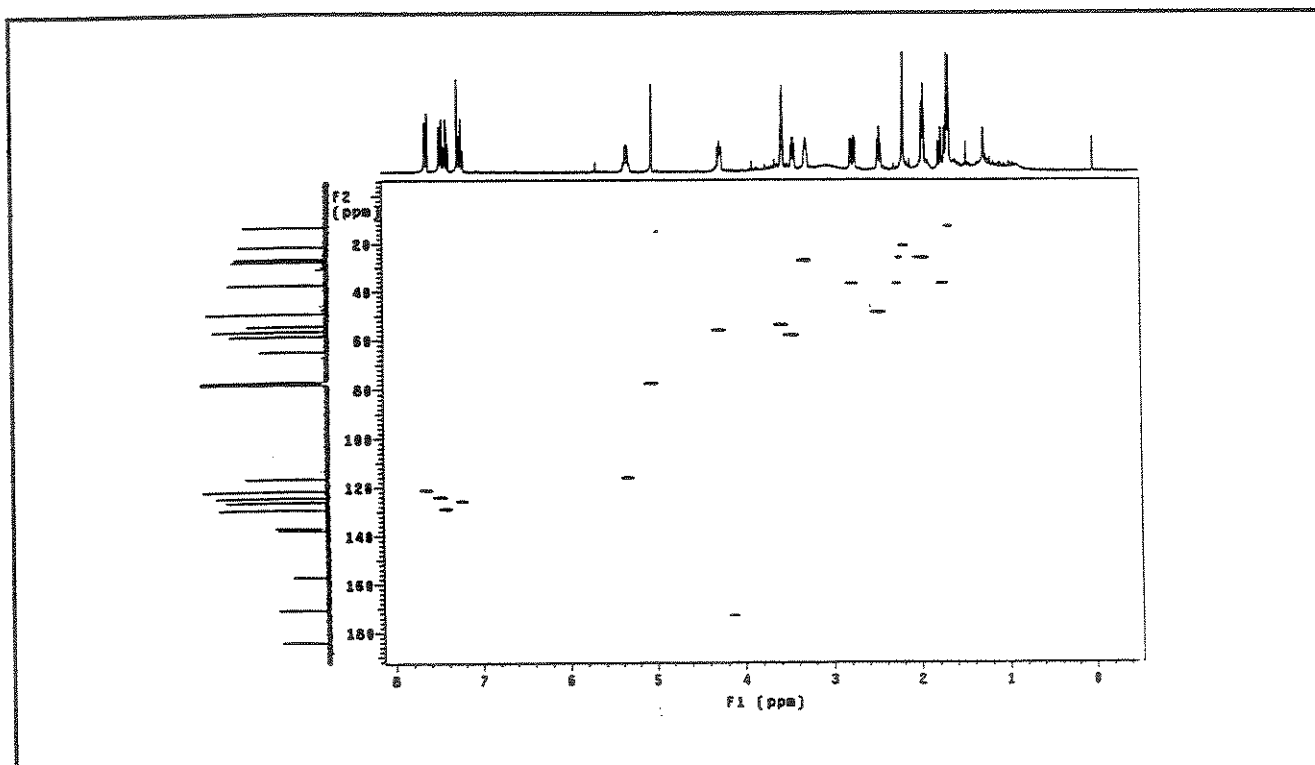
**E 21** Espectro de RMN ¹H de vinorina (4) (CDCl₃/TMS; 300MHz)**E 22:** Espectro de RMN ¹³C de vinorina (4); (CDCl₃/TMS; 75 MHz)



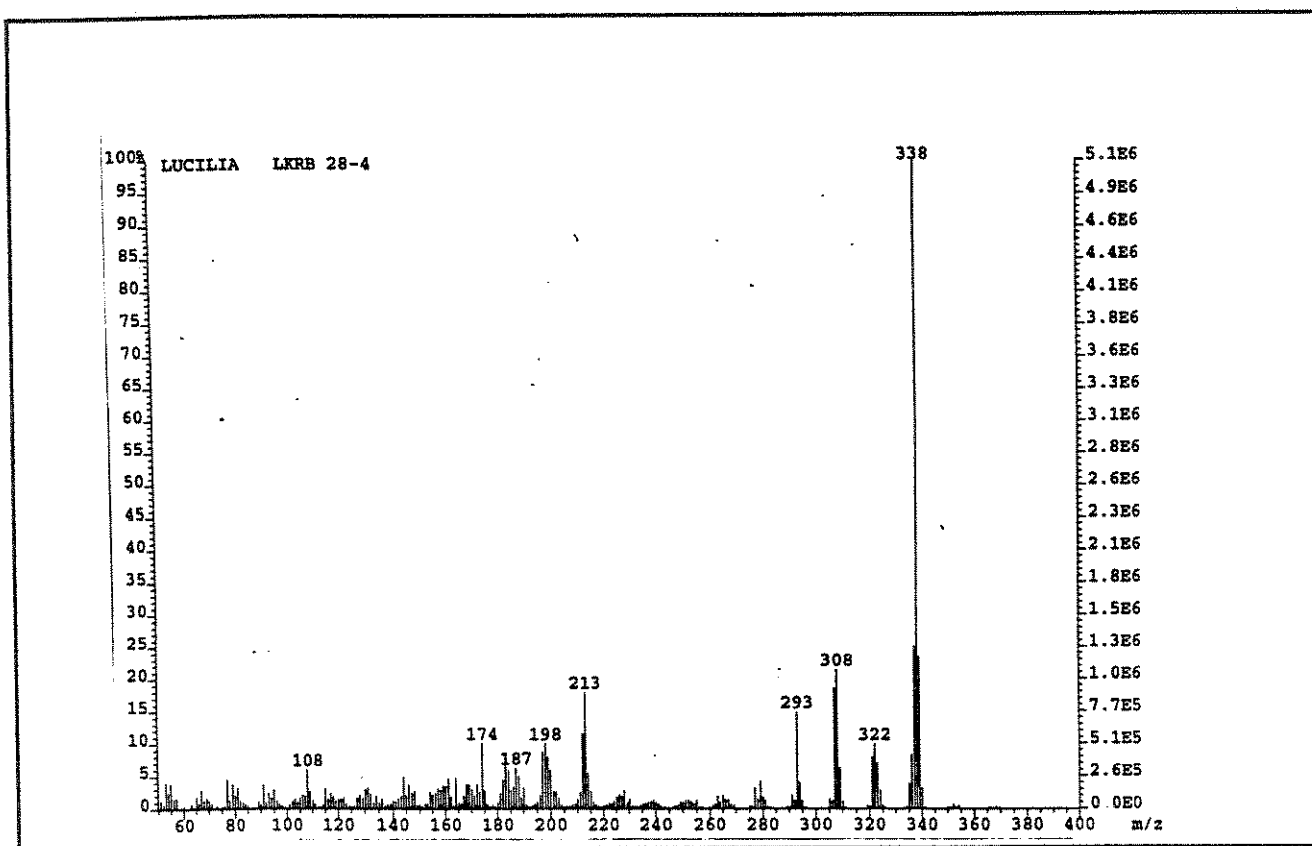
E 23: Experimento de DEPT para vinorina (4) (CDCl_3/TMS ; 75 MHz)



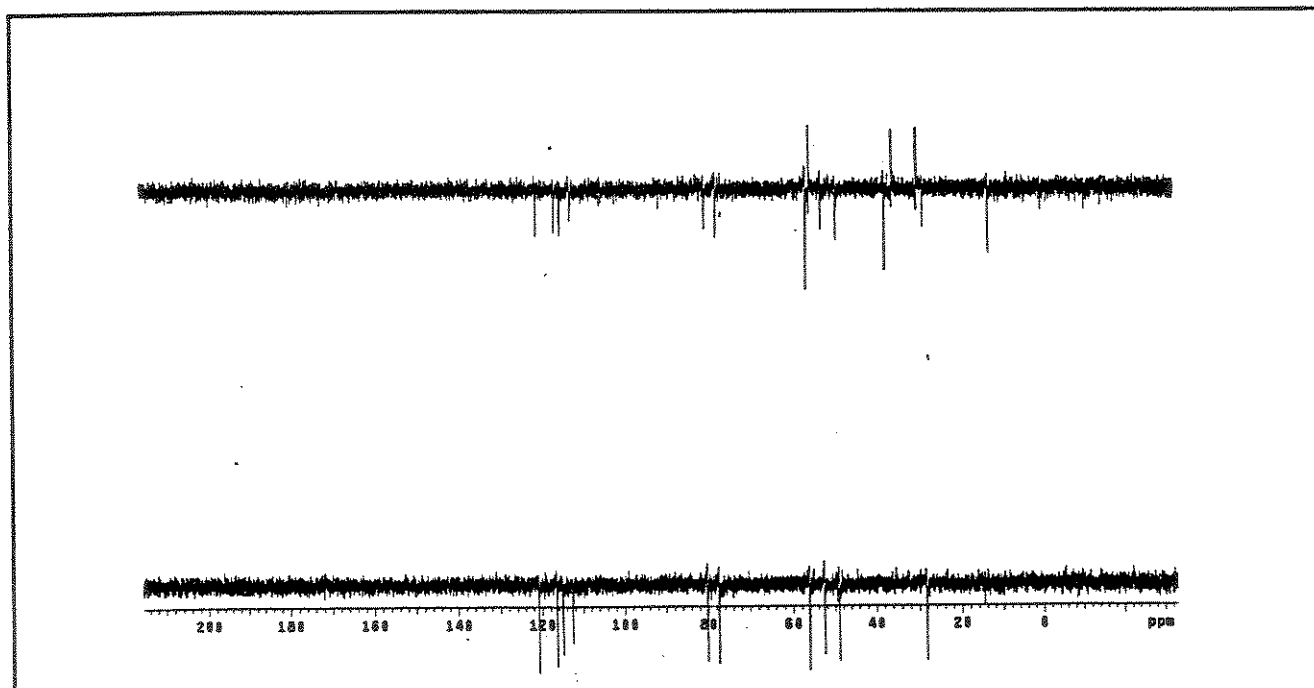
E 24: Experimento COSY para vinorina (4)



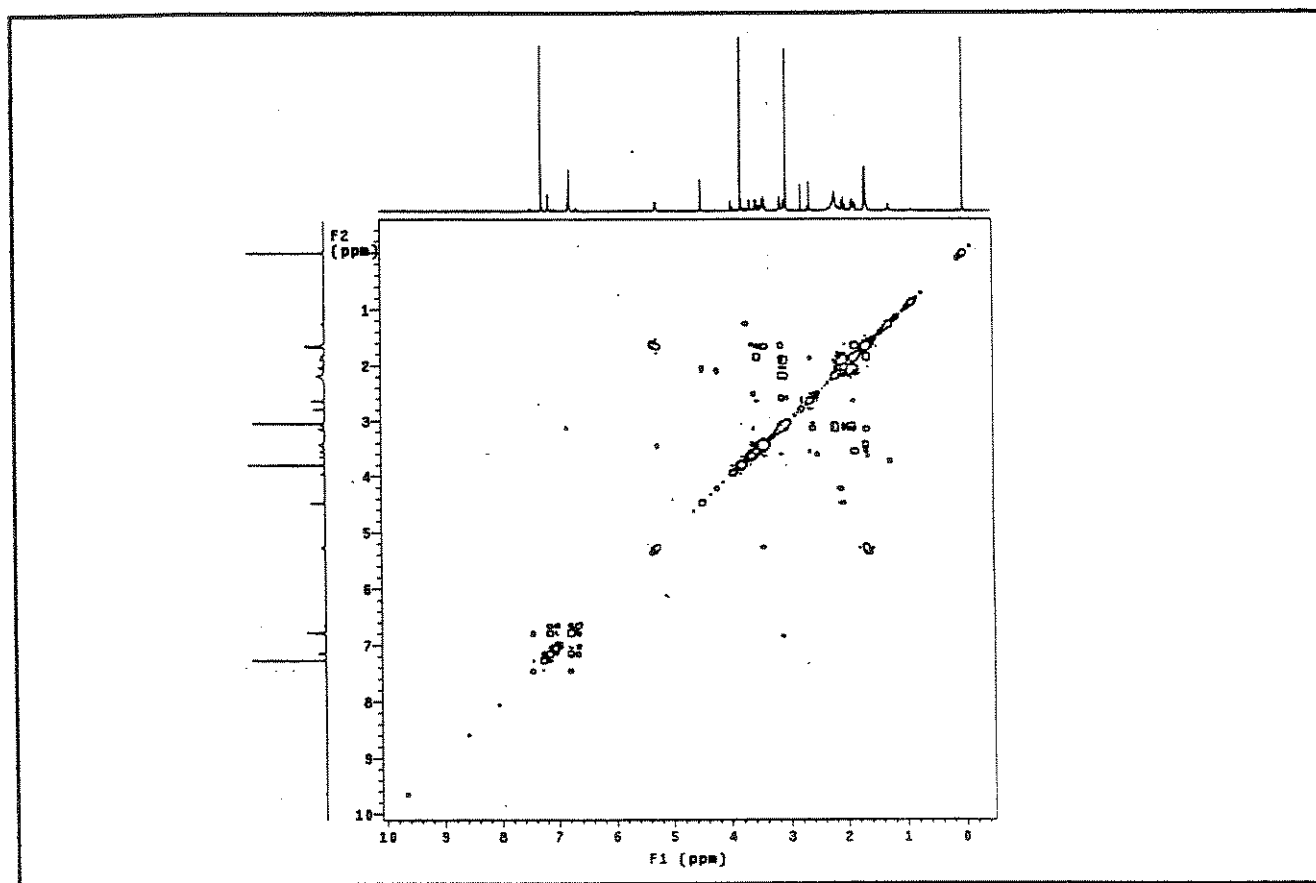
E 25: Experimento HETCOR para vinorina (4)



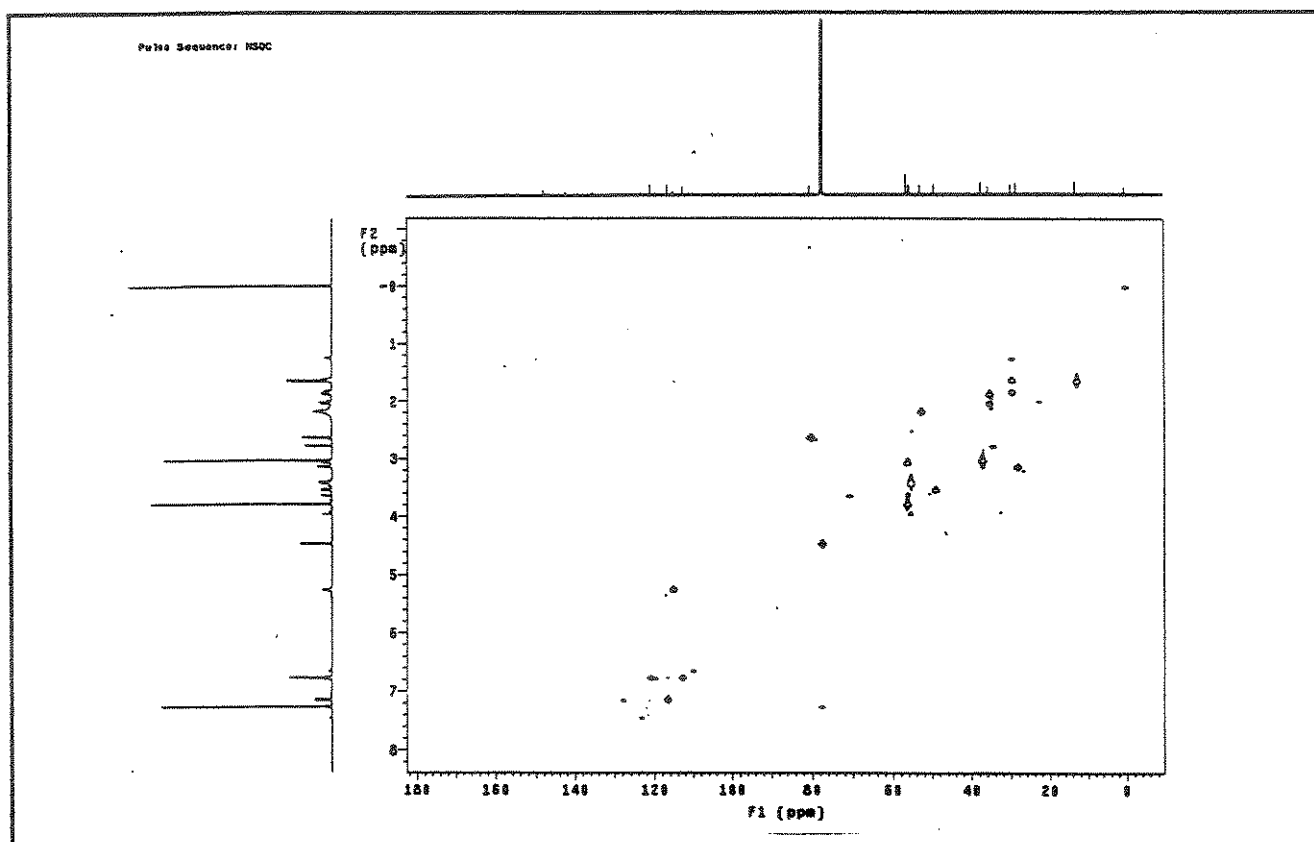
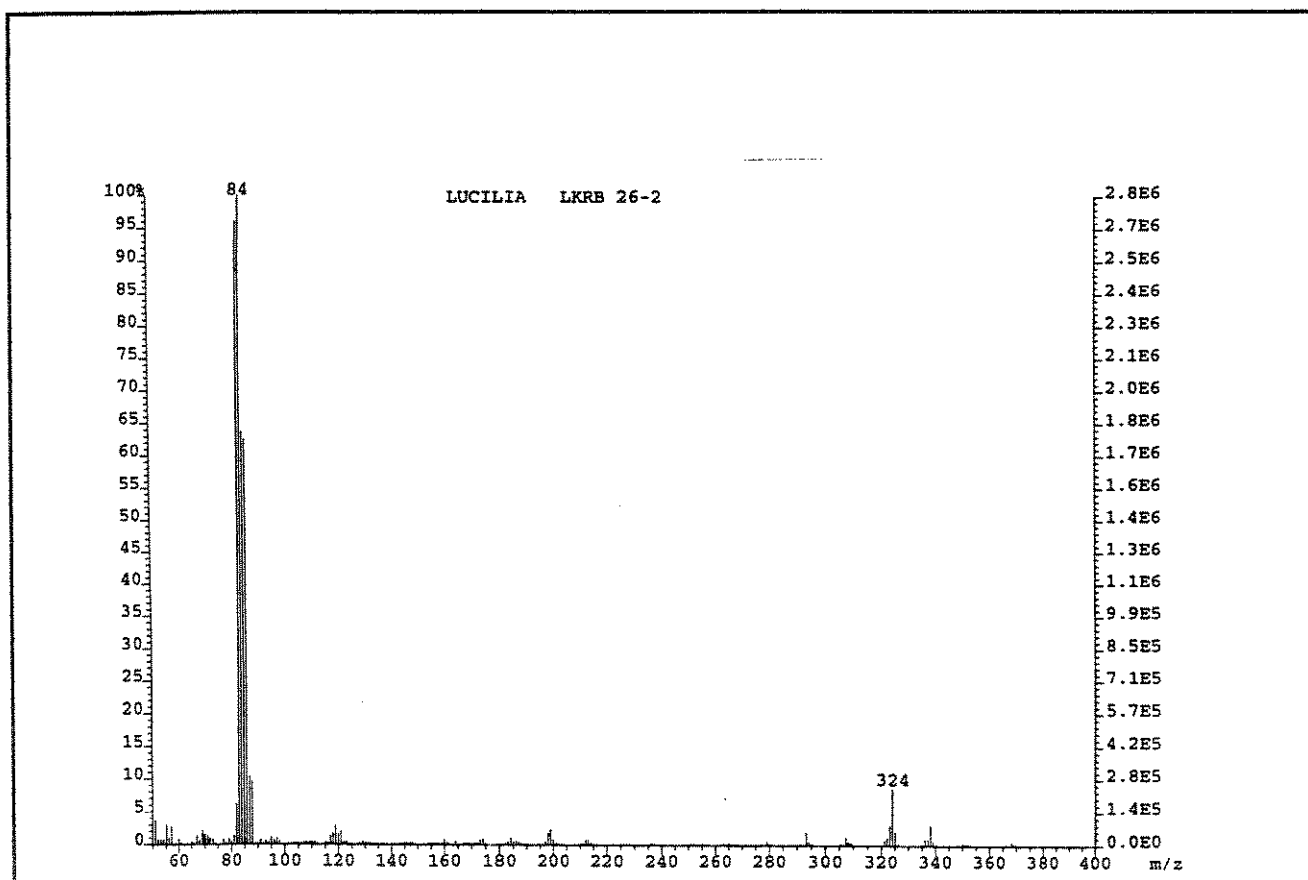
E 26: Espectro de Massas (70 eV) para seredamina (5)

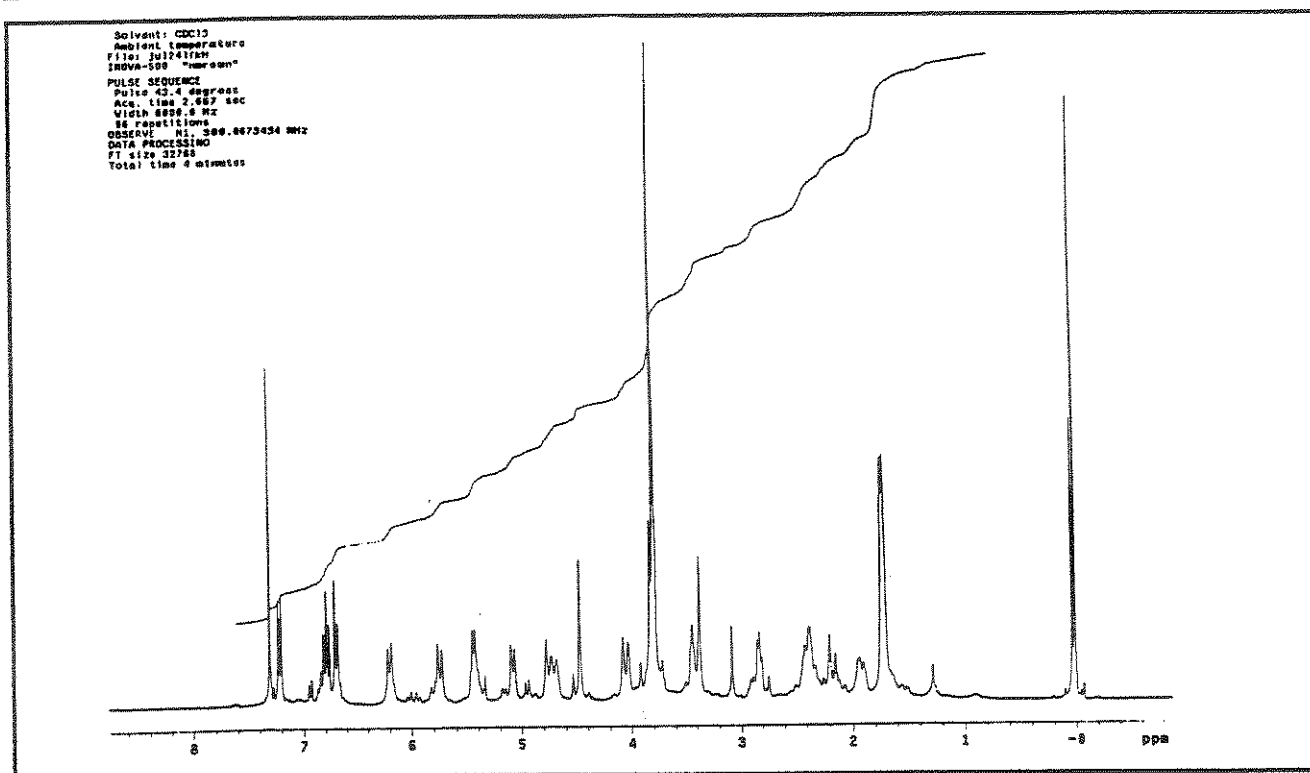


E 29: Experimento de DEPT para seredamina (5) (CDCl_3/TMS ; 75 MHz)

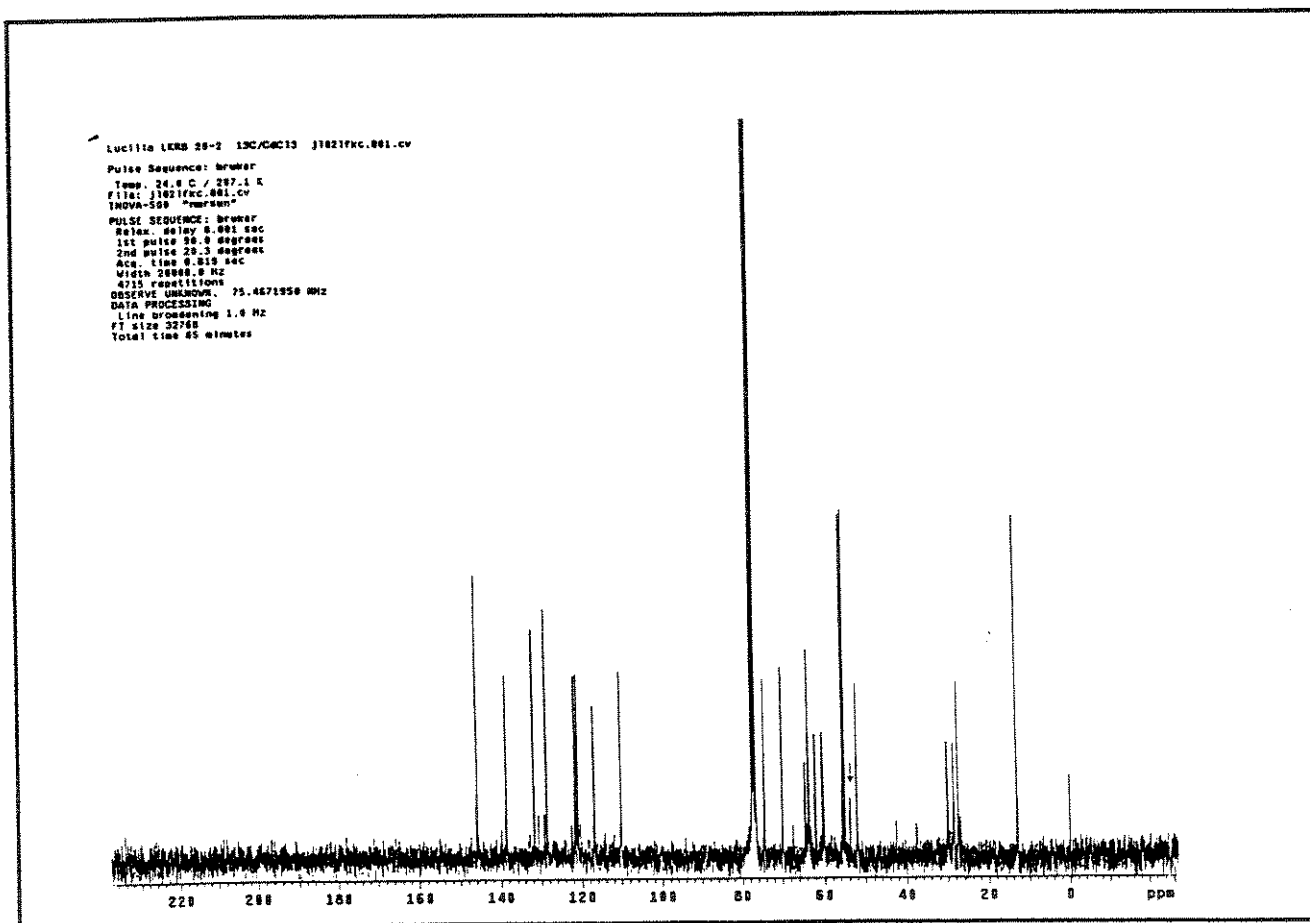


E 30: Experimento COSY para seredamina (5)

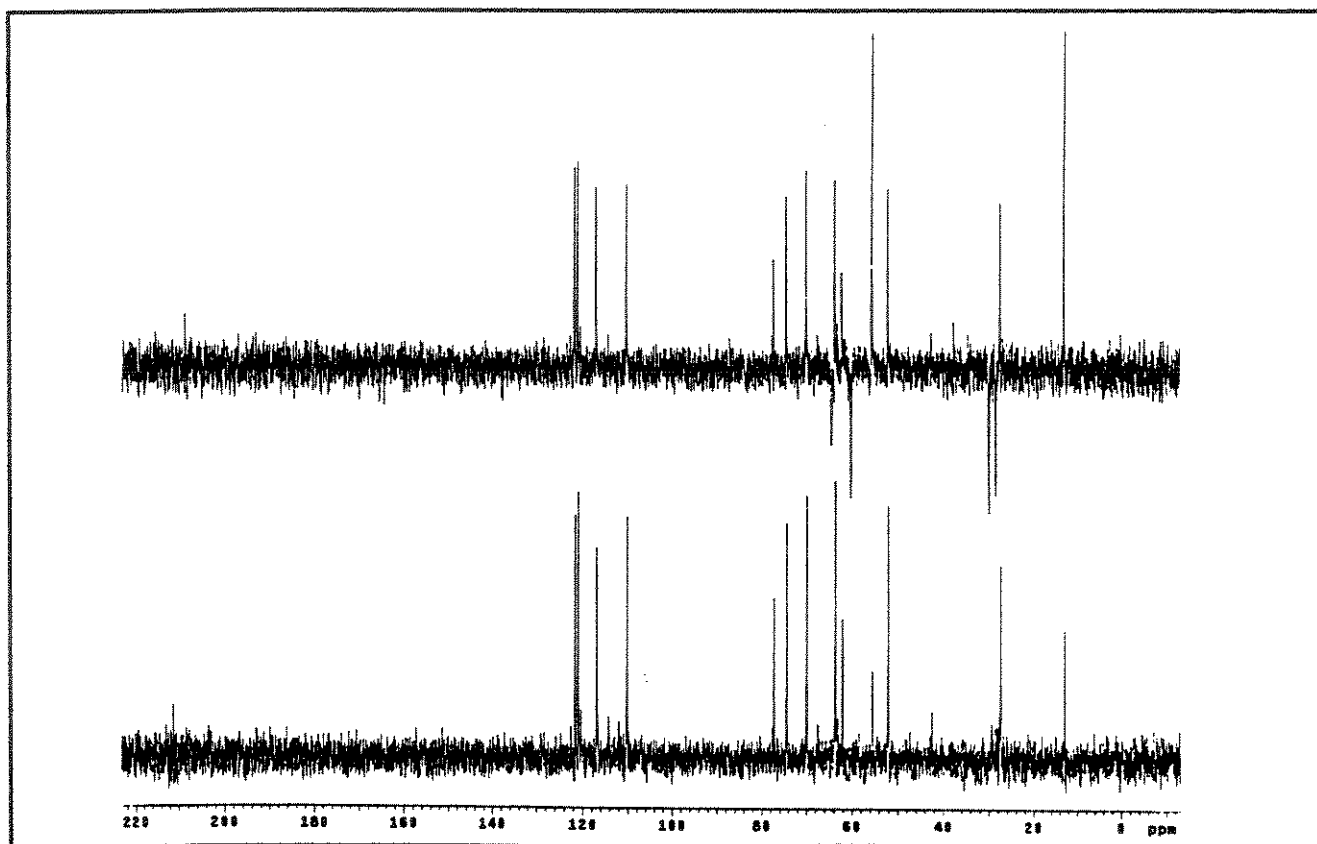
**E 31:** Experimento HSQC para seredamina (5)**E 32:** Espectro de Massas (70 eV) para sal de seredamina (6)



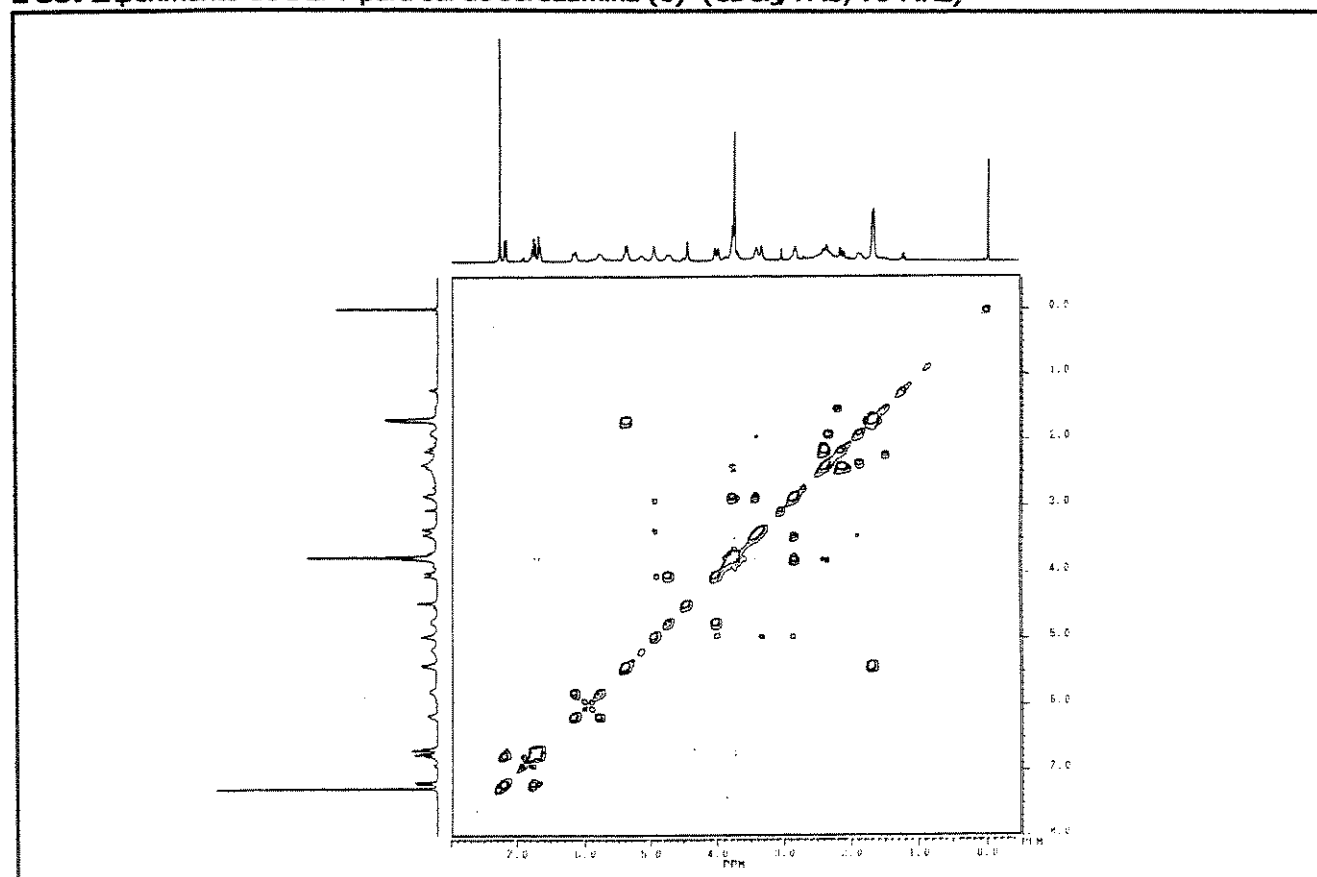
E 33: Espectro de RMN ¹H de sal de seredamina (6) (CDCl₃/D₂O/TMS; 300MHz)



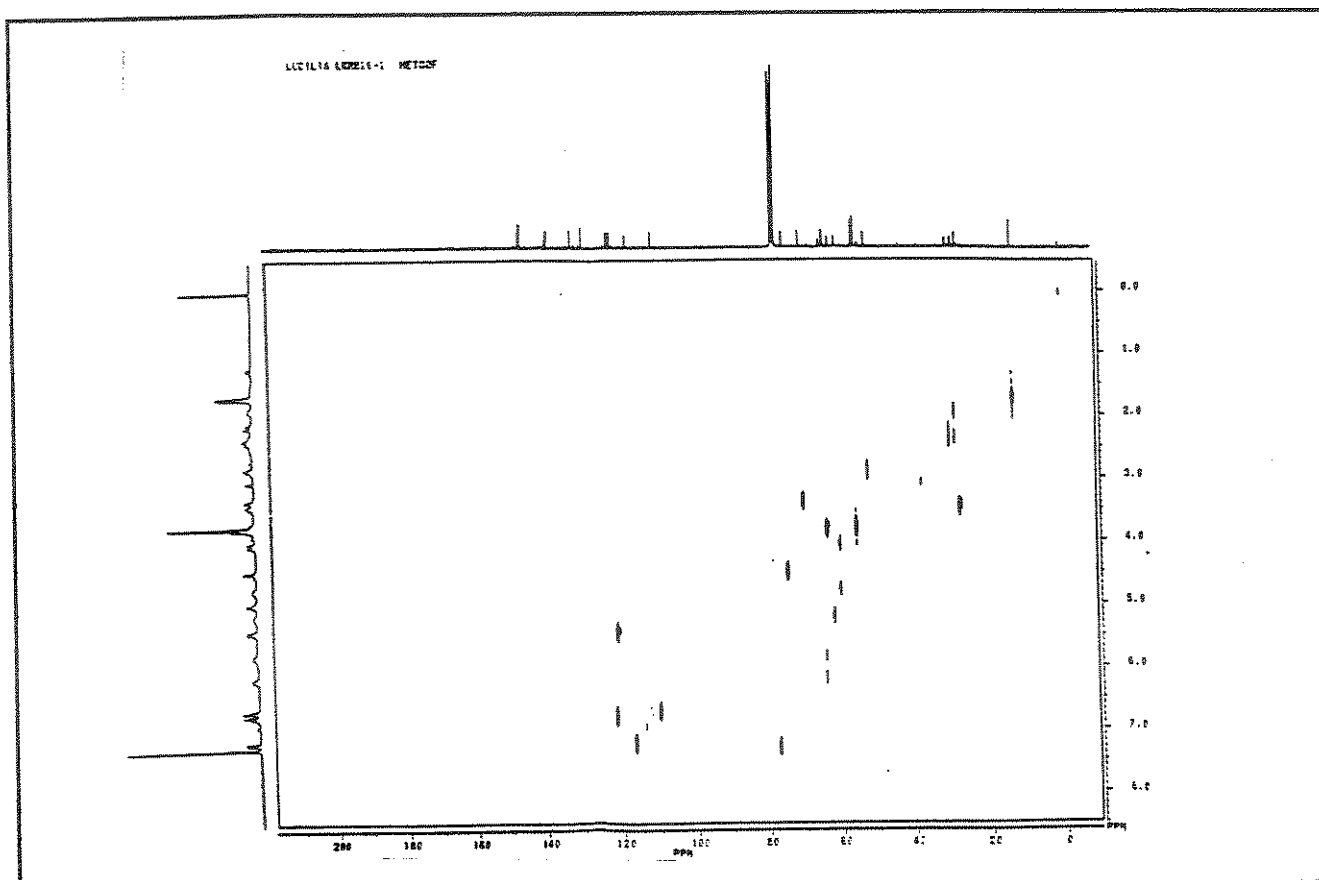
E 34: Espectro de RMN ¹³C de sal de seredamina (6) (CDCl₃/TMS; 75 MHz)



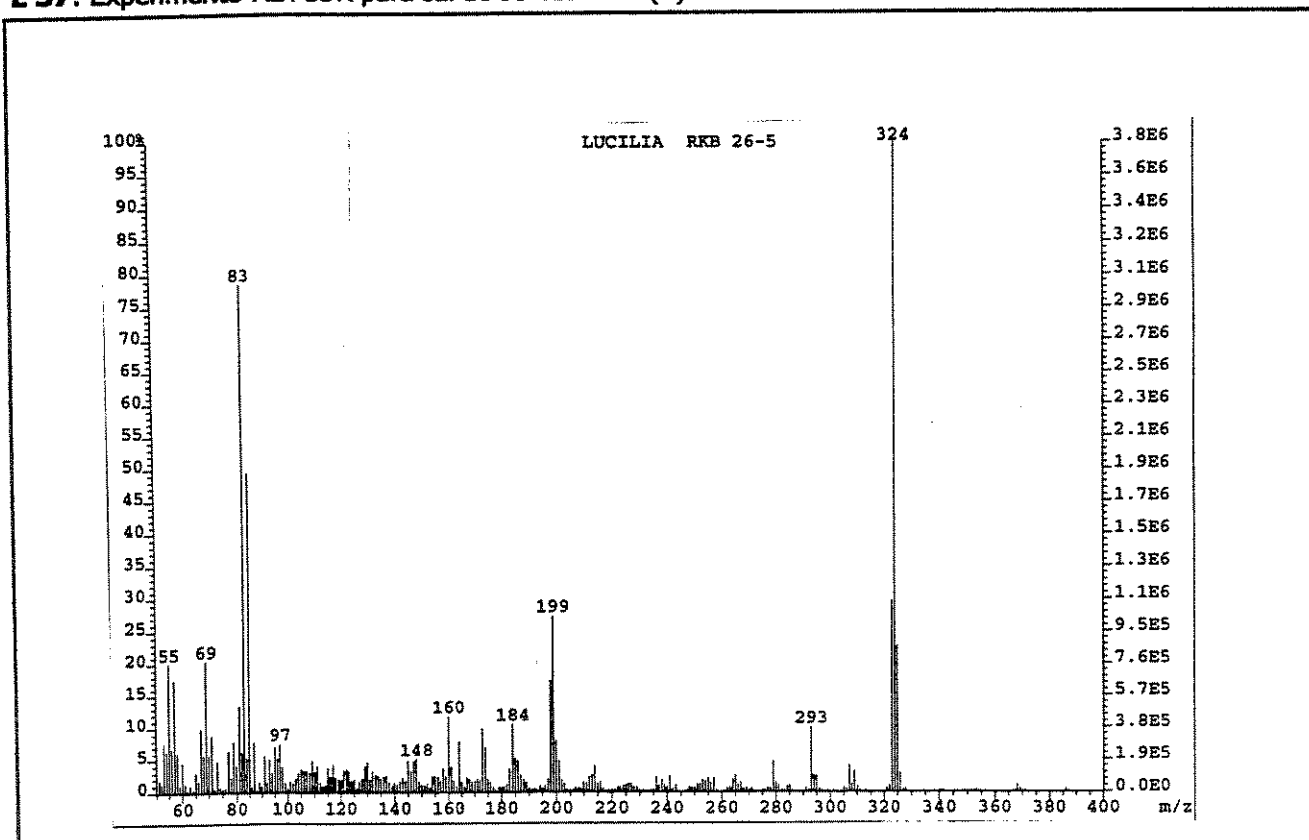
E 35: Experimento de DEPT para sal de seredamina (6) (CDCl_3/TMS ; 75 MHz)



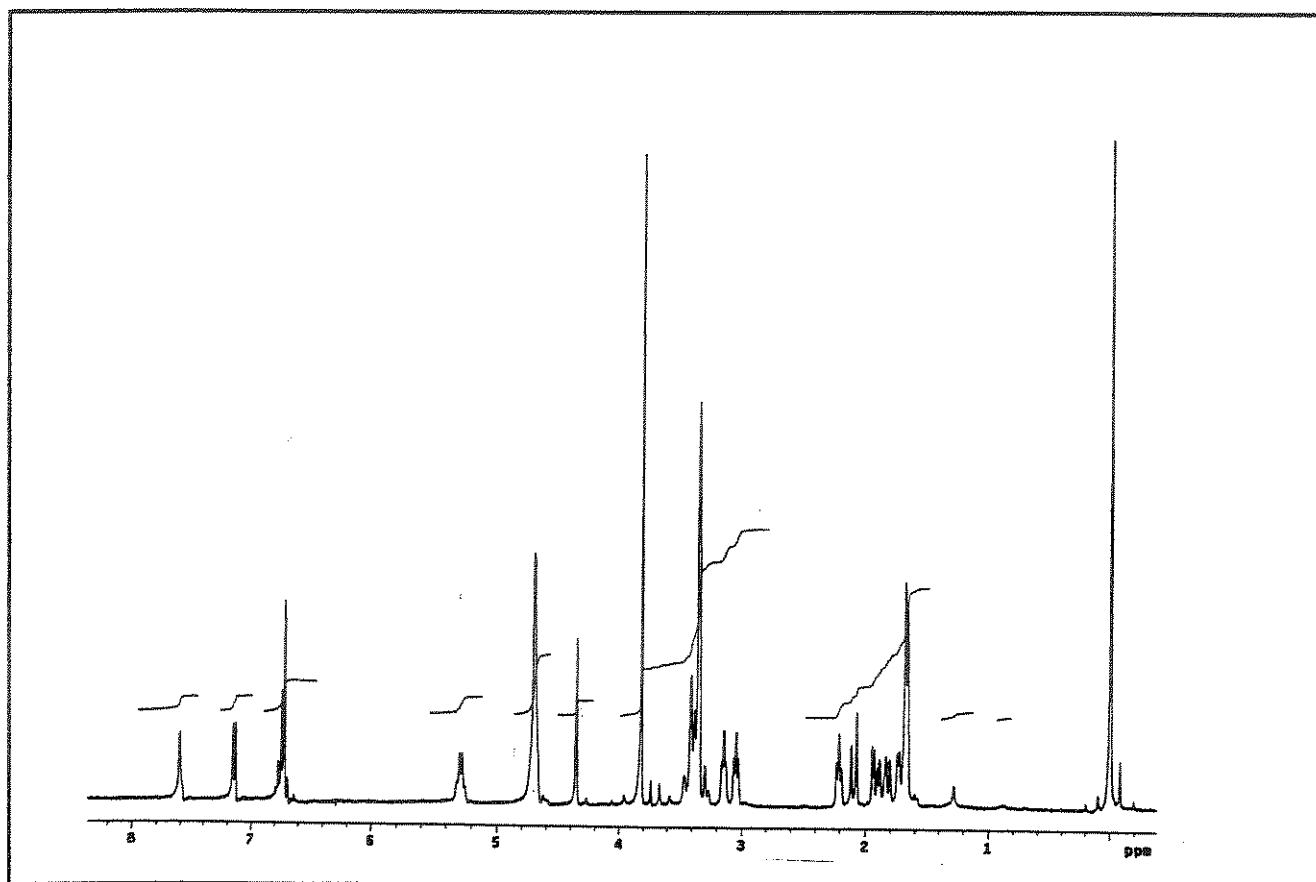
E 36: Experimento COSY para sal de seredamina (6)



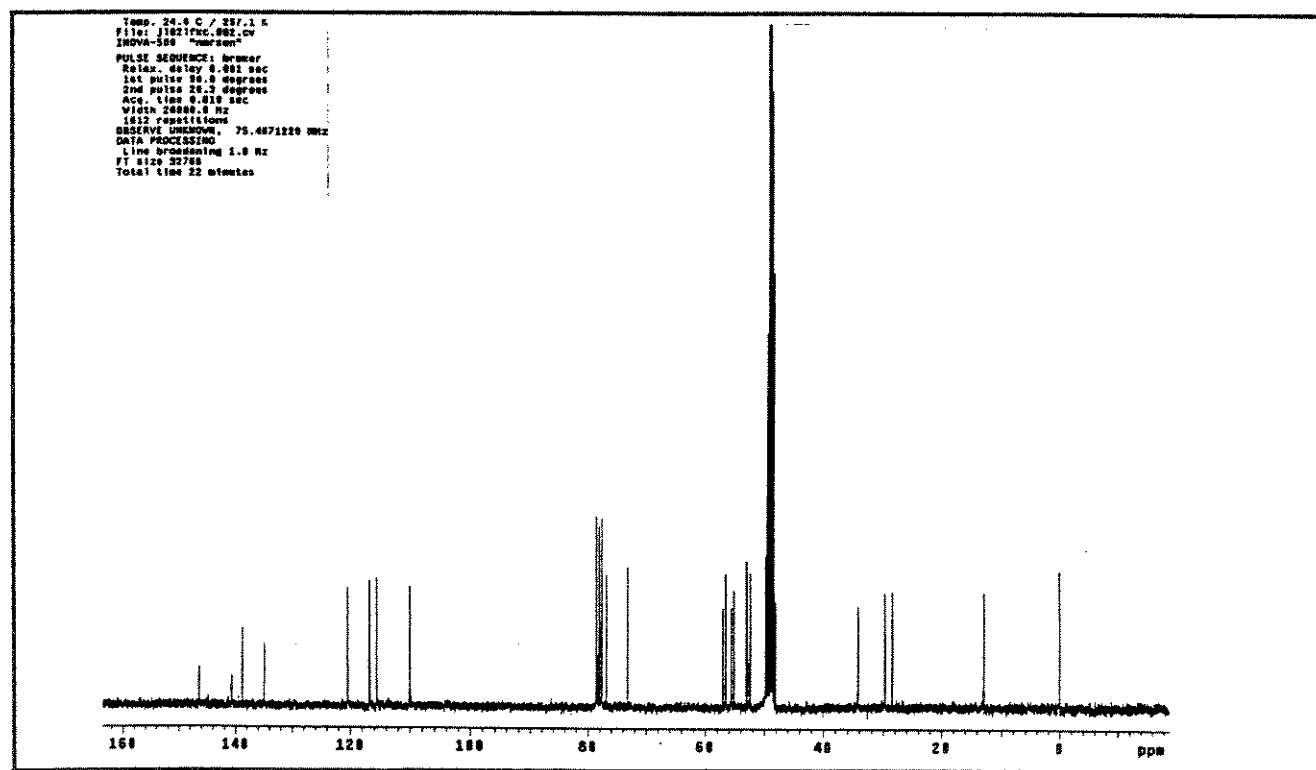
E 37: Experimento HETCOR para sal de seredamina (6)



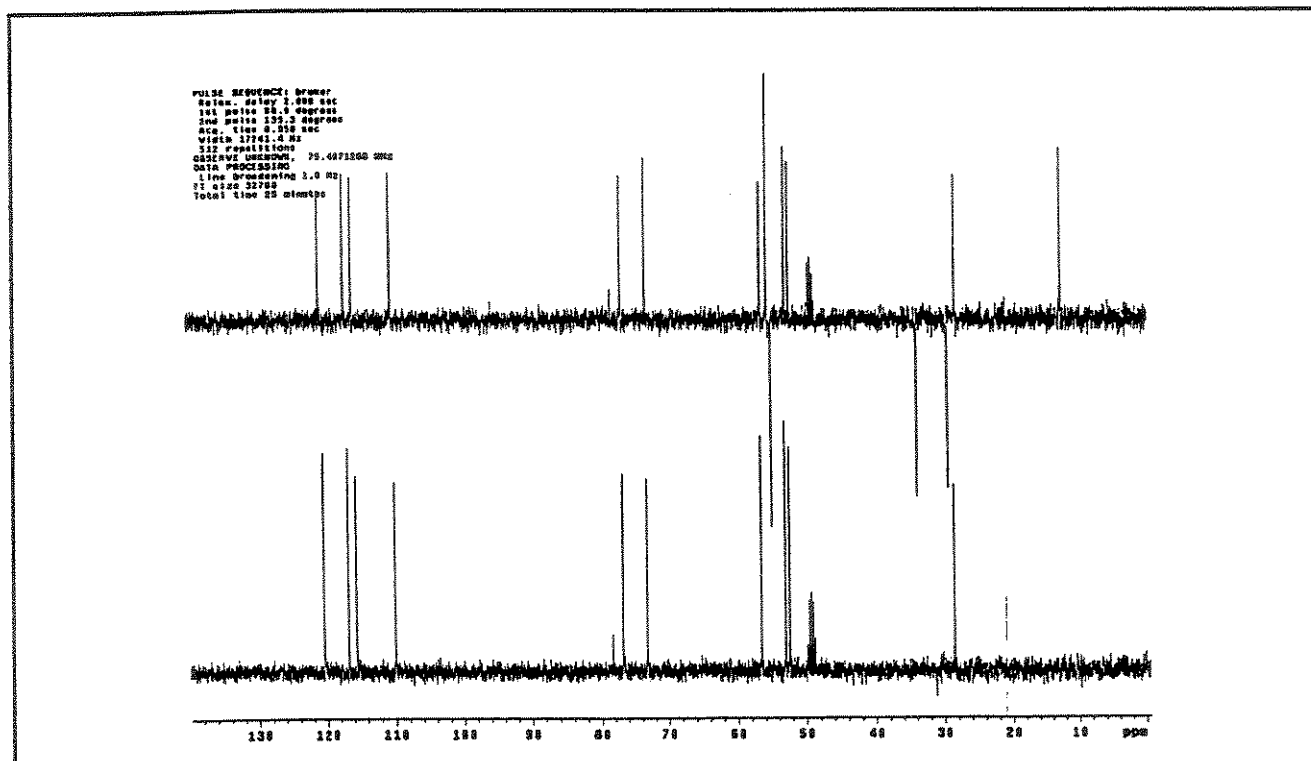
E 38: Espectro de Massas (70 eV) para norseredamina (7)



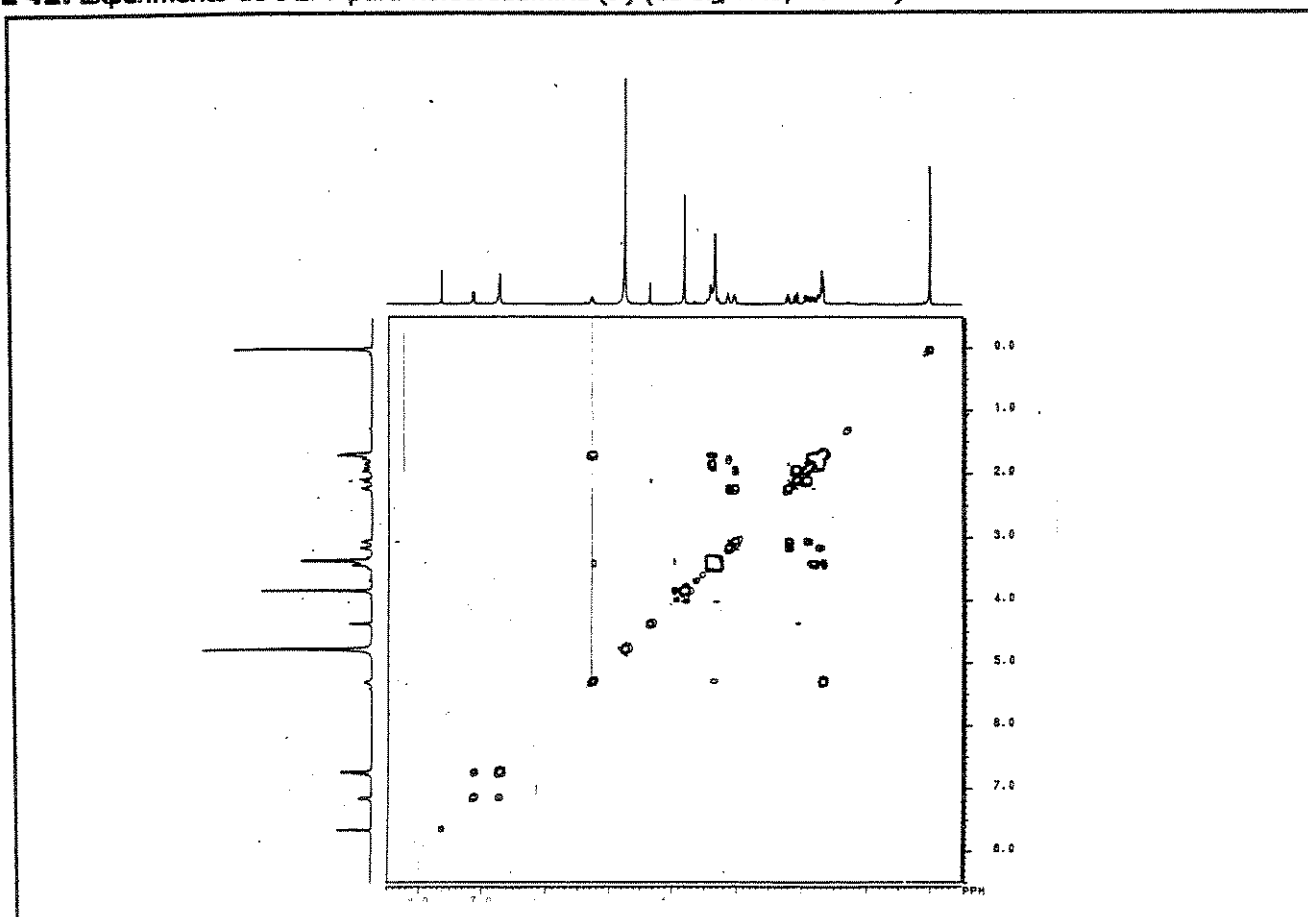
E 39 Espectro de RMN ^1H de norseredamina (**7**) (CDCl_3/TMS ; 300MHz)



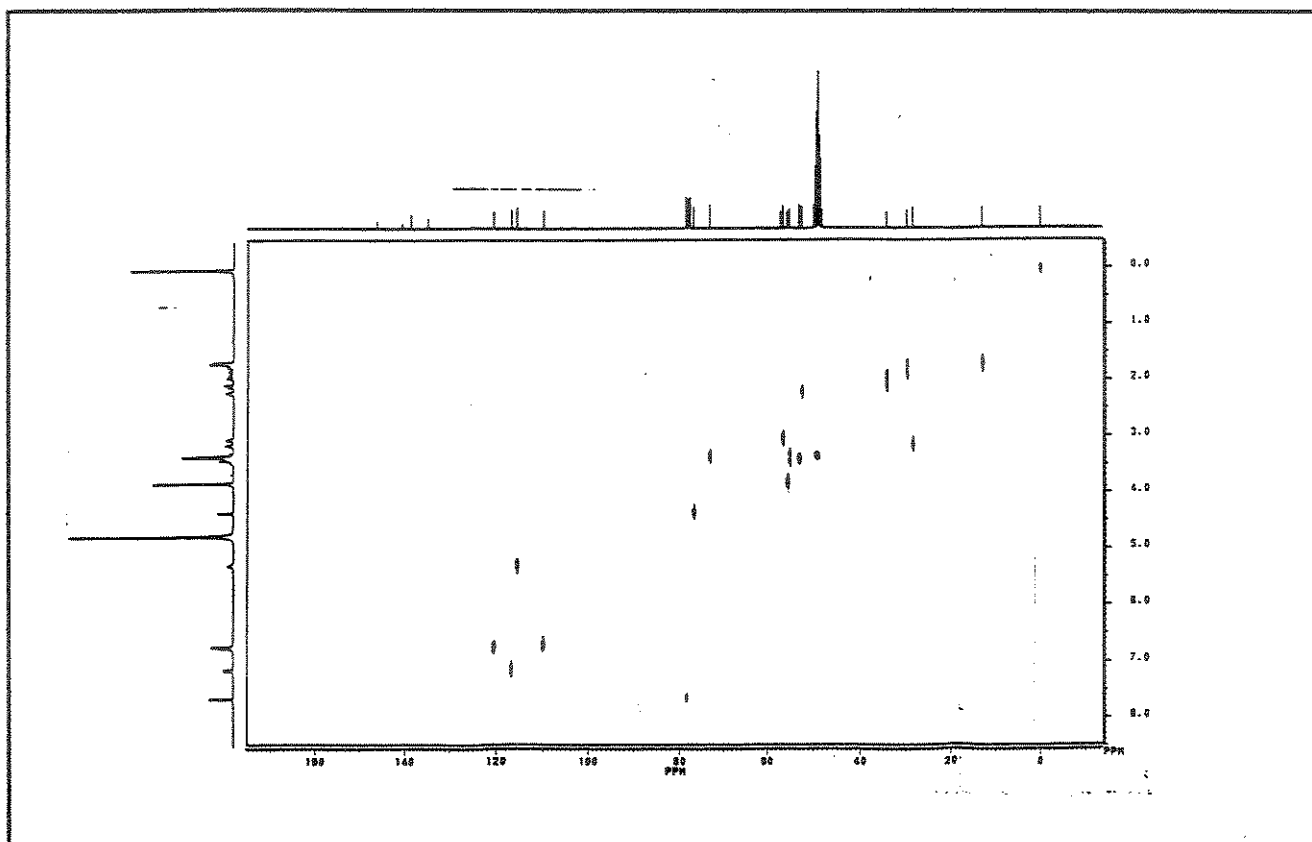
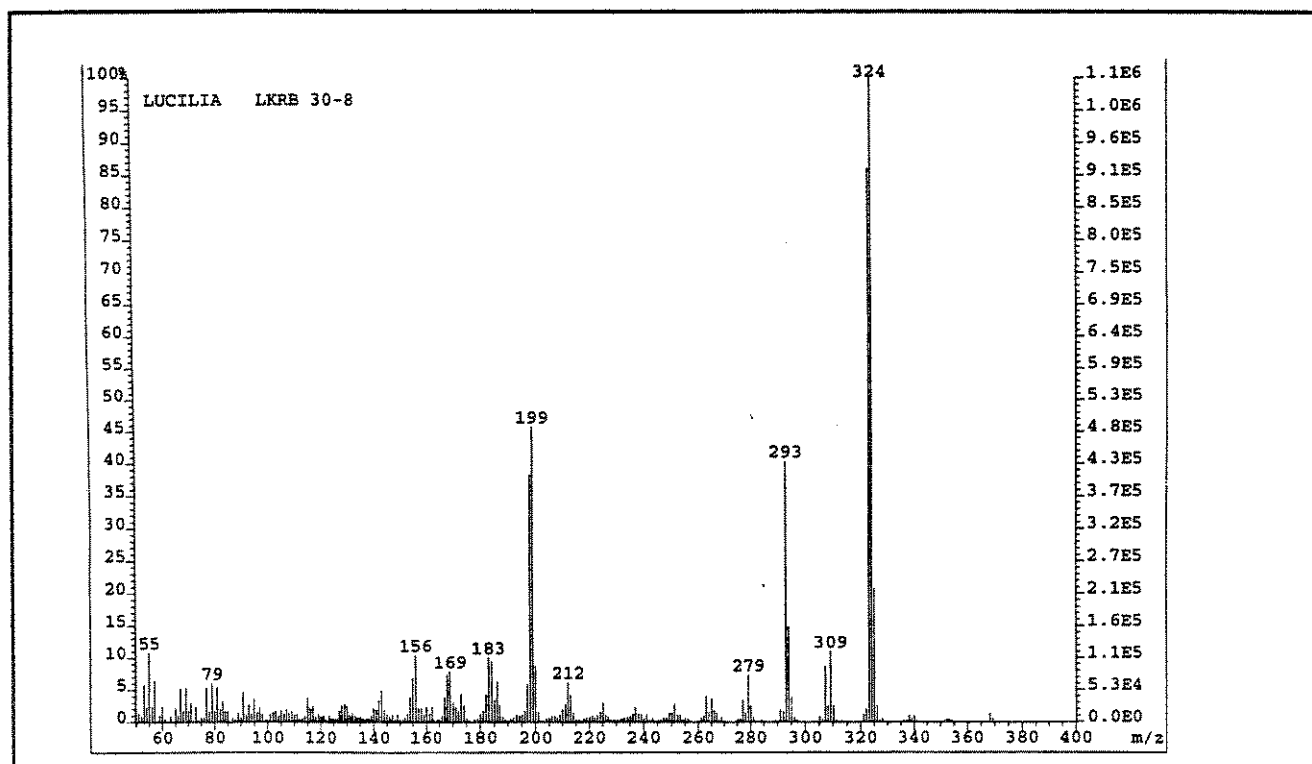
E 40: Espectro de RMN ^{13}C de norseredamina (**7**) (CDCl_3/TMS ; 75 MHz)

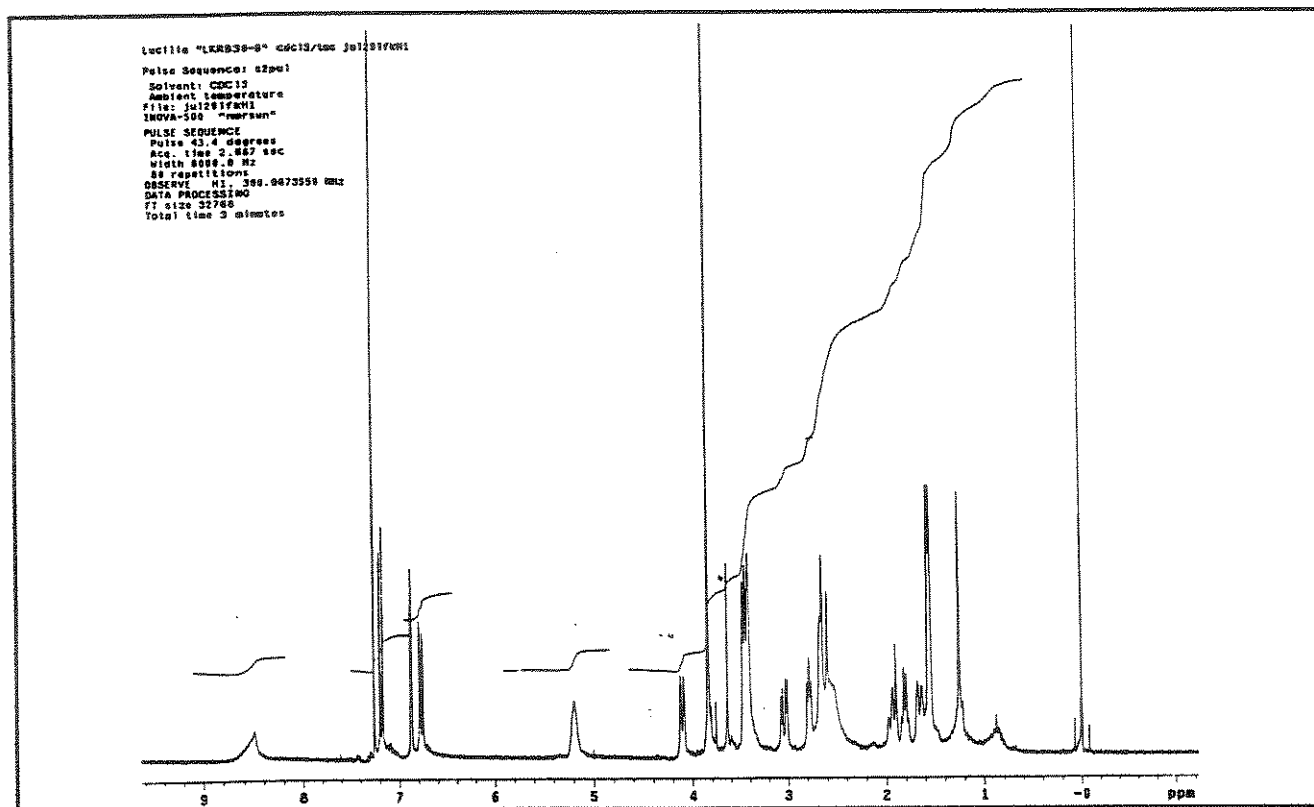


E 41: Experimento de DEPT para norseredamina (7) (CDCl₃/TMS; 75 MHz)

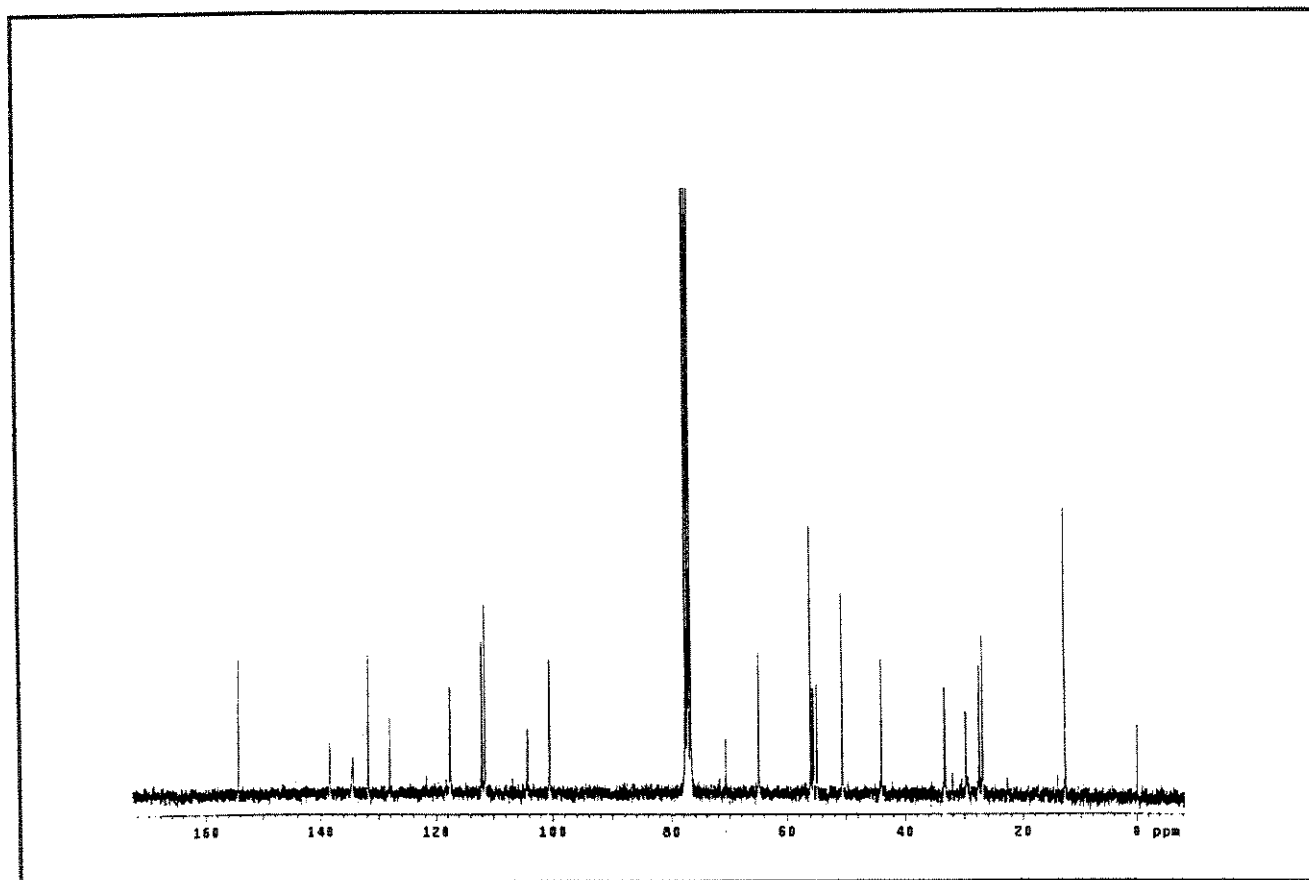


E 42: Experimento COSY para norseredamina (7)

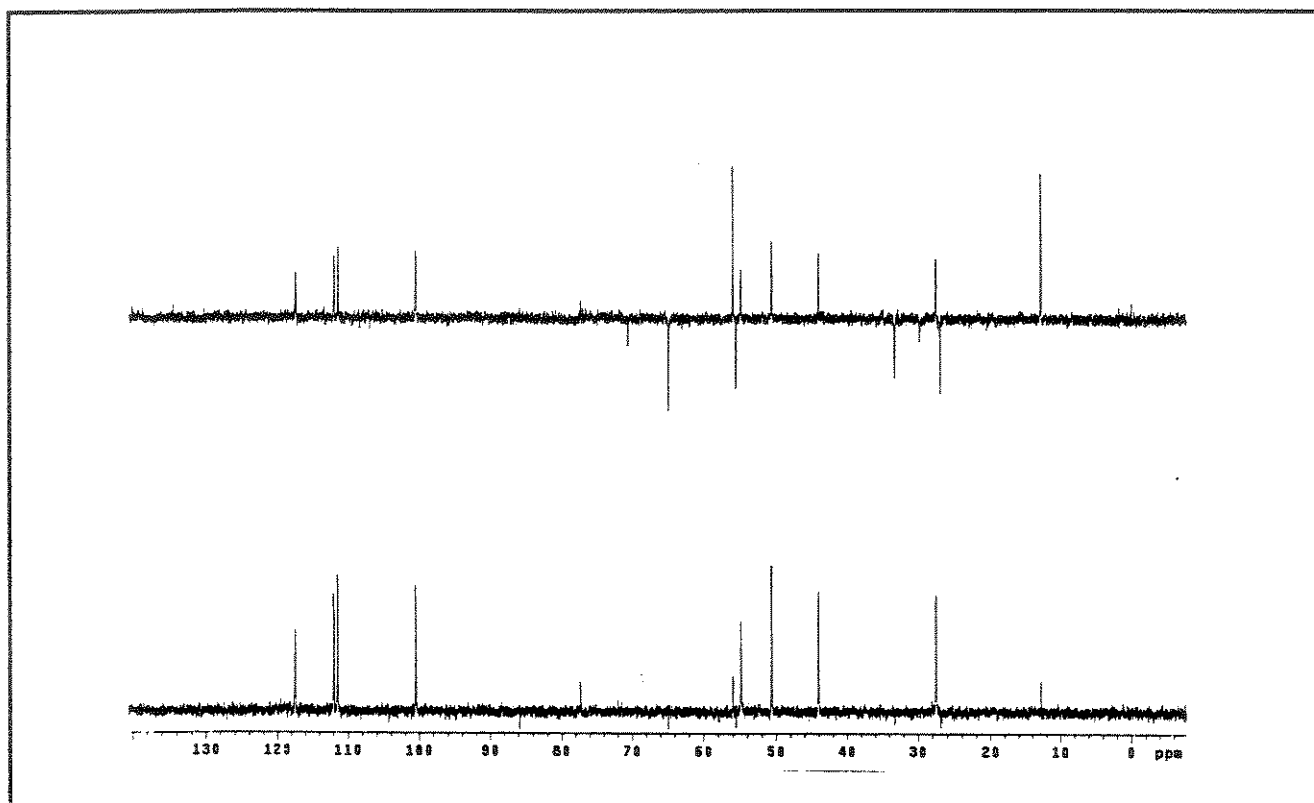
**E 43:** Experimento HMBC para norseredamina (**7**)**E 44:** Espectro de Massas (70 eV) para 10-metoxi-sarpagan-17-ol (**8**)



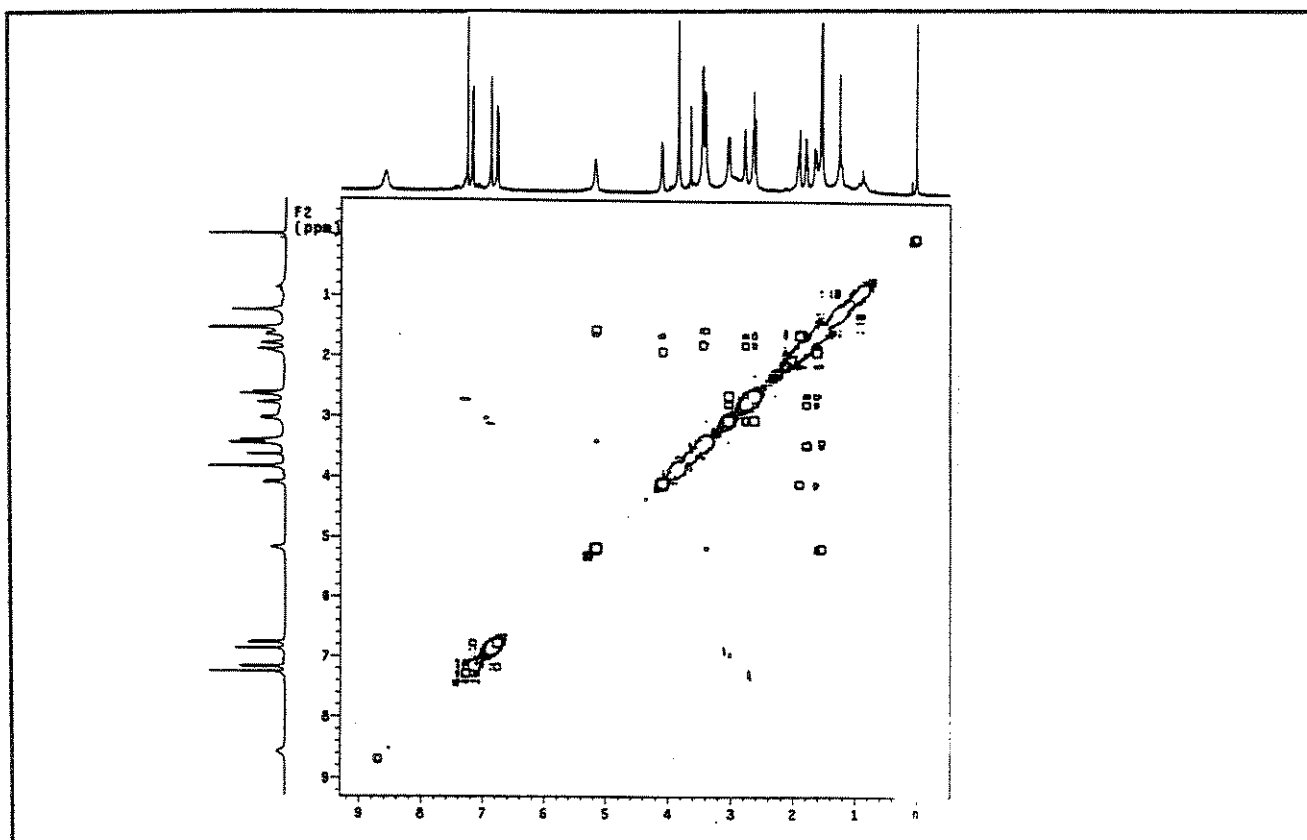
E 45: Espectro de RMN ^1H de 10-metoxi-sarpagan-17-ol (**8**) (CDCl_3/TMS ; 300MHz)



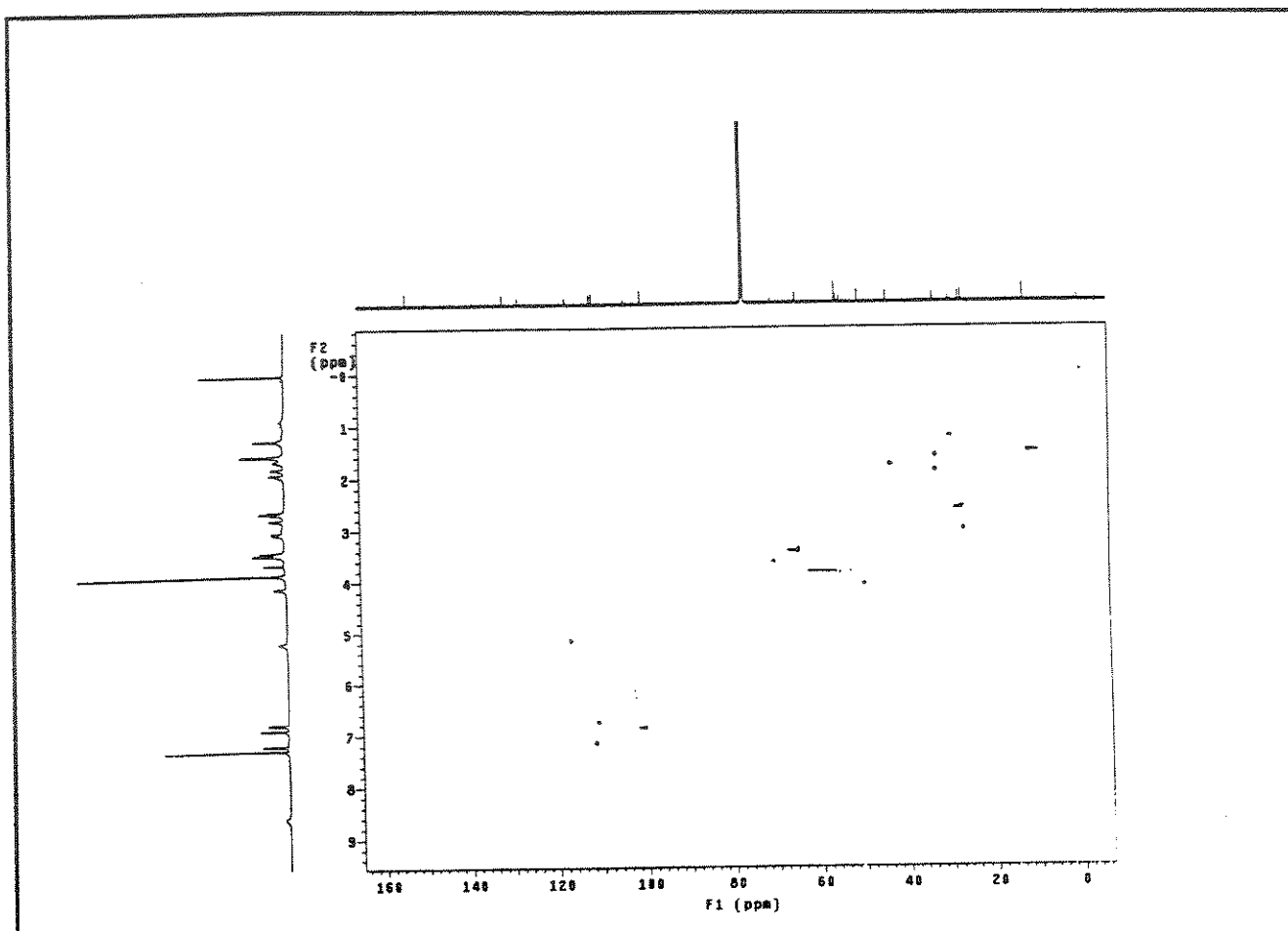
E 46: Espectro de RMN ^{13}C de 10-metoxi-sarpagan-17-ol (**8**) (CDCl_3/TMS ; 75 MHz)



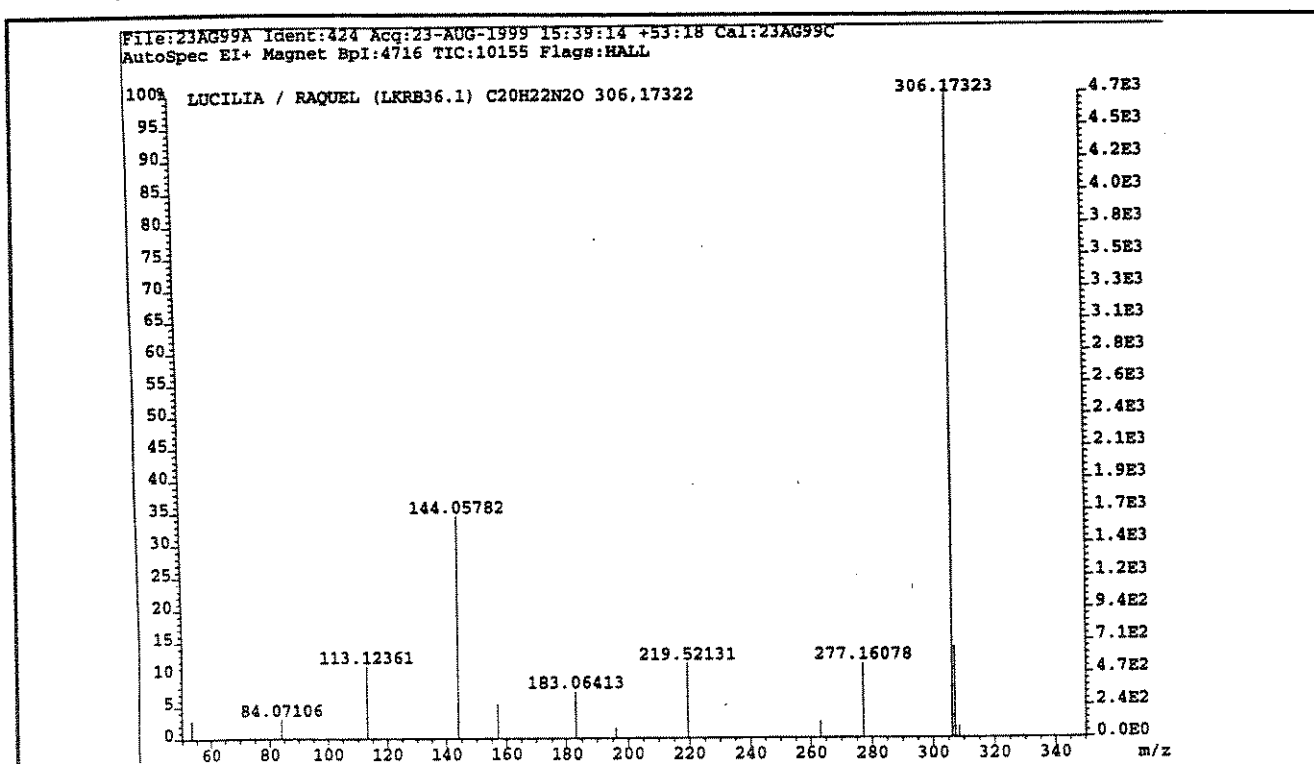
E 47: Experimento de DEPT para 10-metoxi-sarpagan-17-ol (**8**) (CDCl_3/TMS ; 75 MHz)



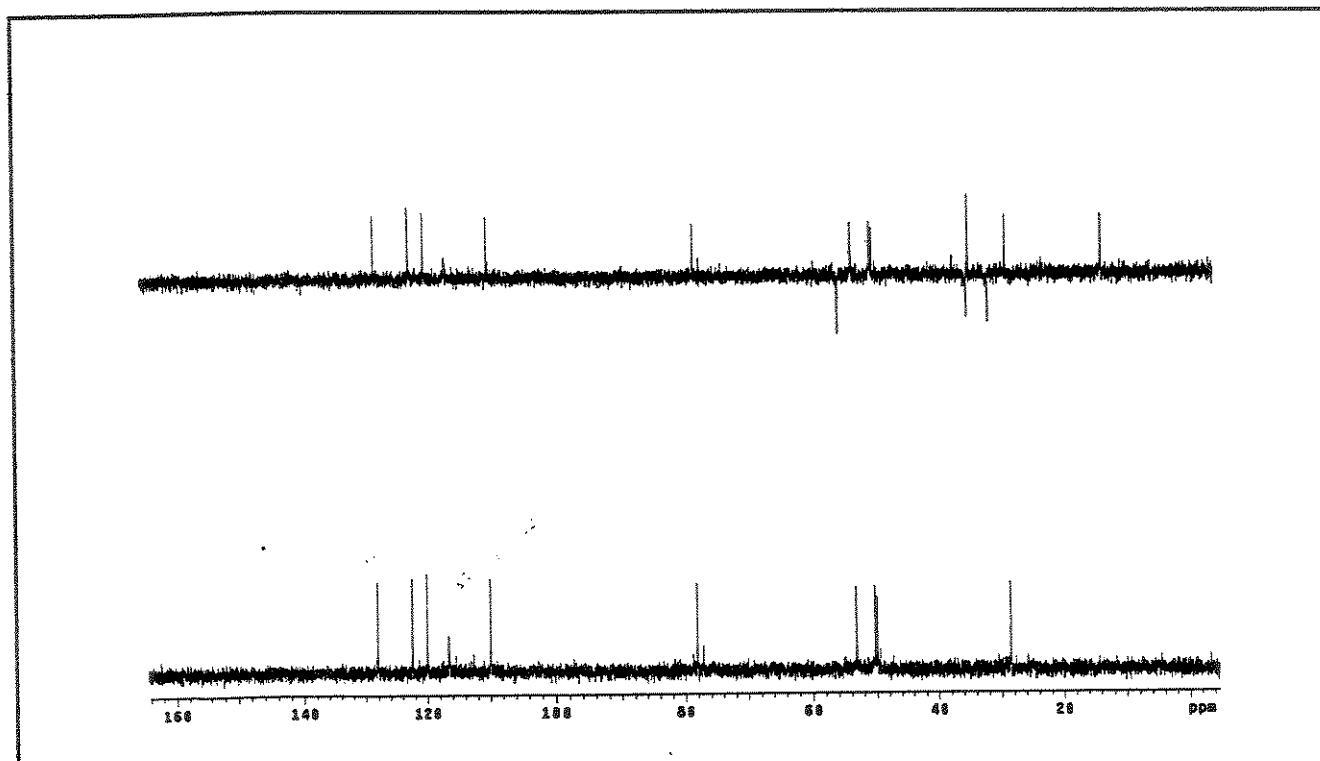
E 48: Experimento COSY para 10-metoxi-sarpagan-17-ol (**8**)



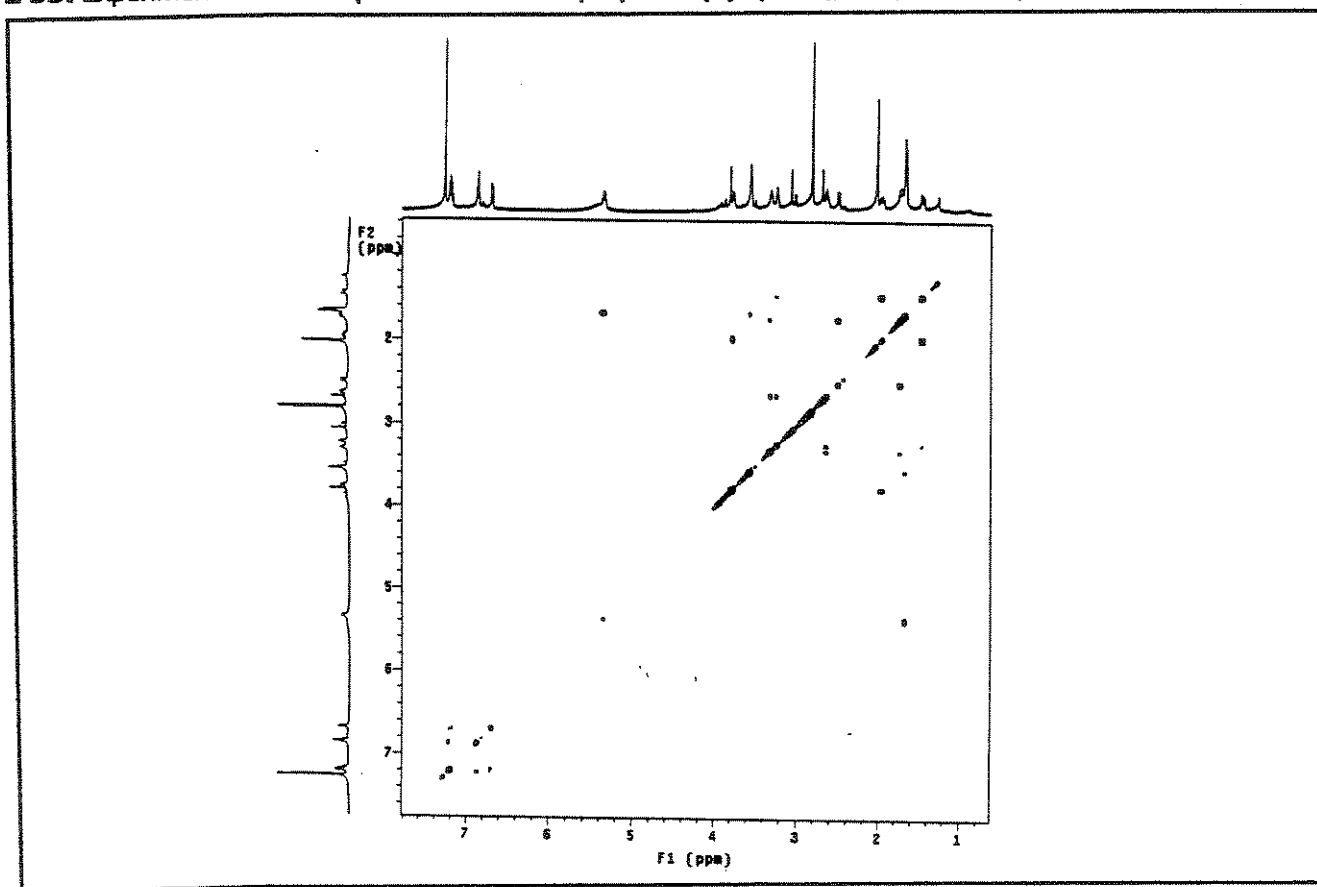
E 49: Experimento HSQC para 10-metoxi-sarpagan-17-ol (8)



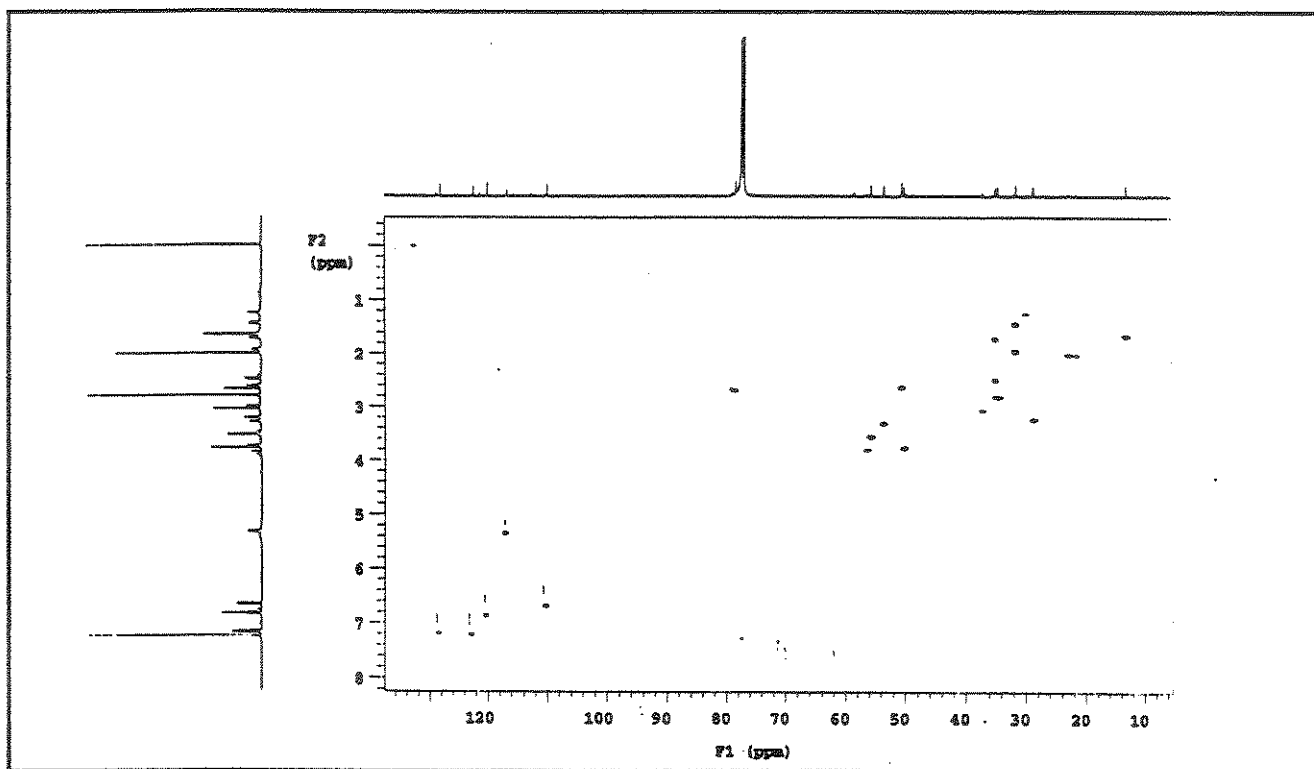
E 50: Espectro de Massas Alta Resolução (70 eV) para 12-demetoxy-purpelina (9)



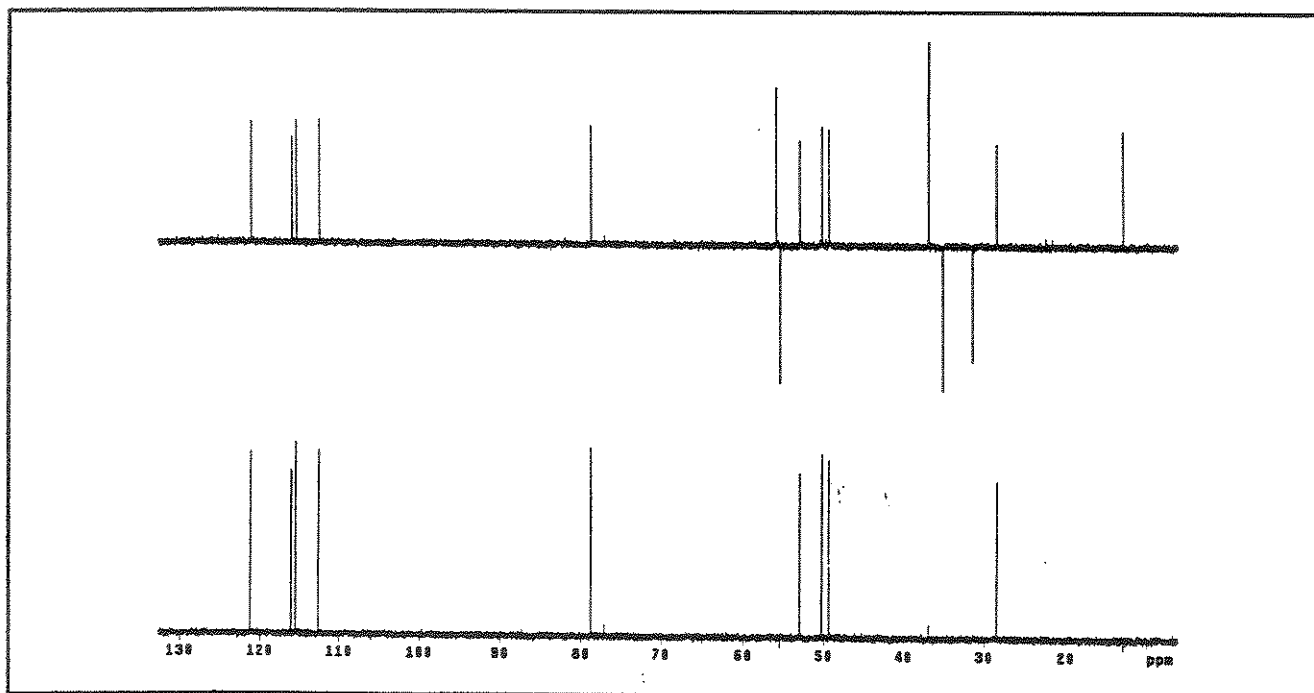
E 53: Experimento de DEPT para 12-demetoxi-purpelina (9) (CDCl_3/TMS ; 125 MHz)



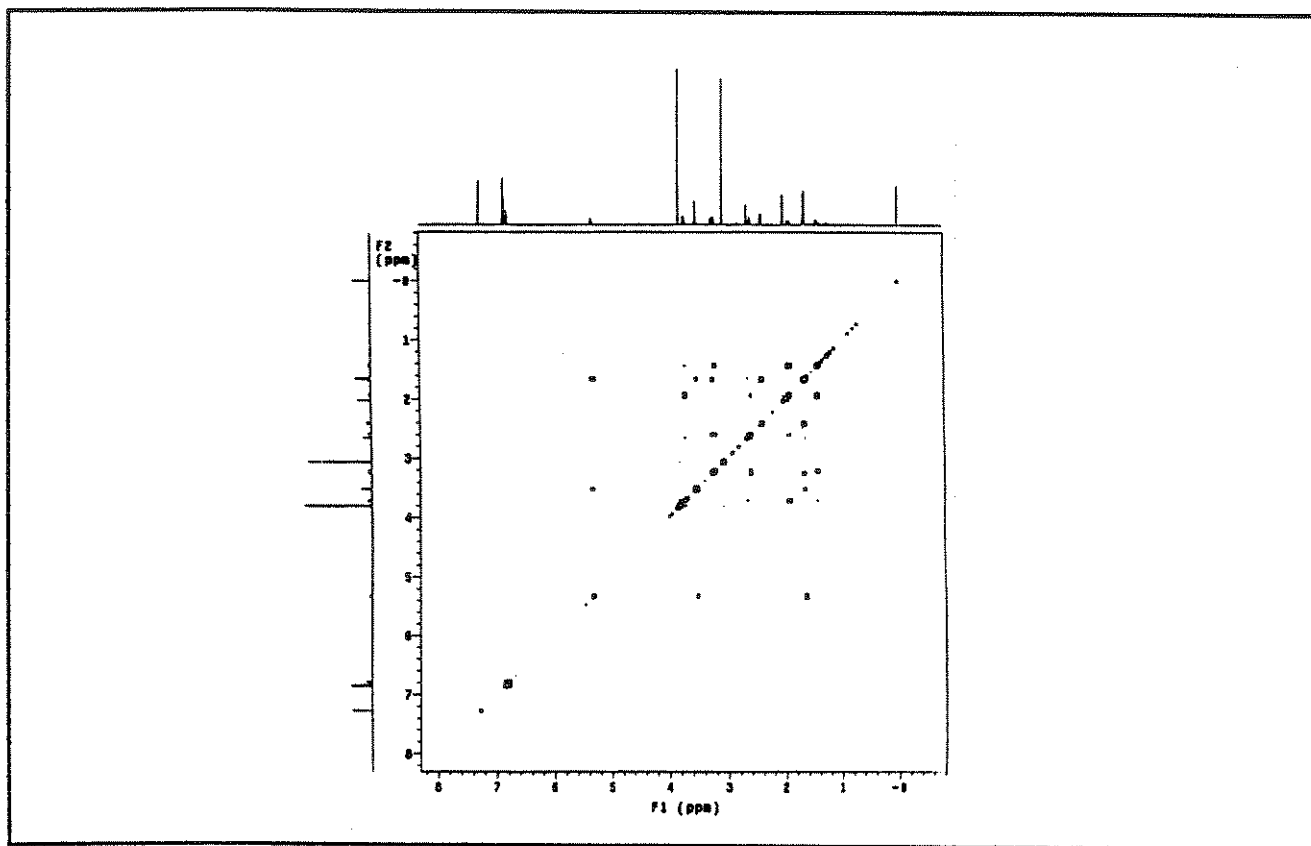
E 54: Experimento COSY para 12-demetoxi-purpelina (9)



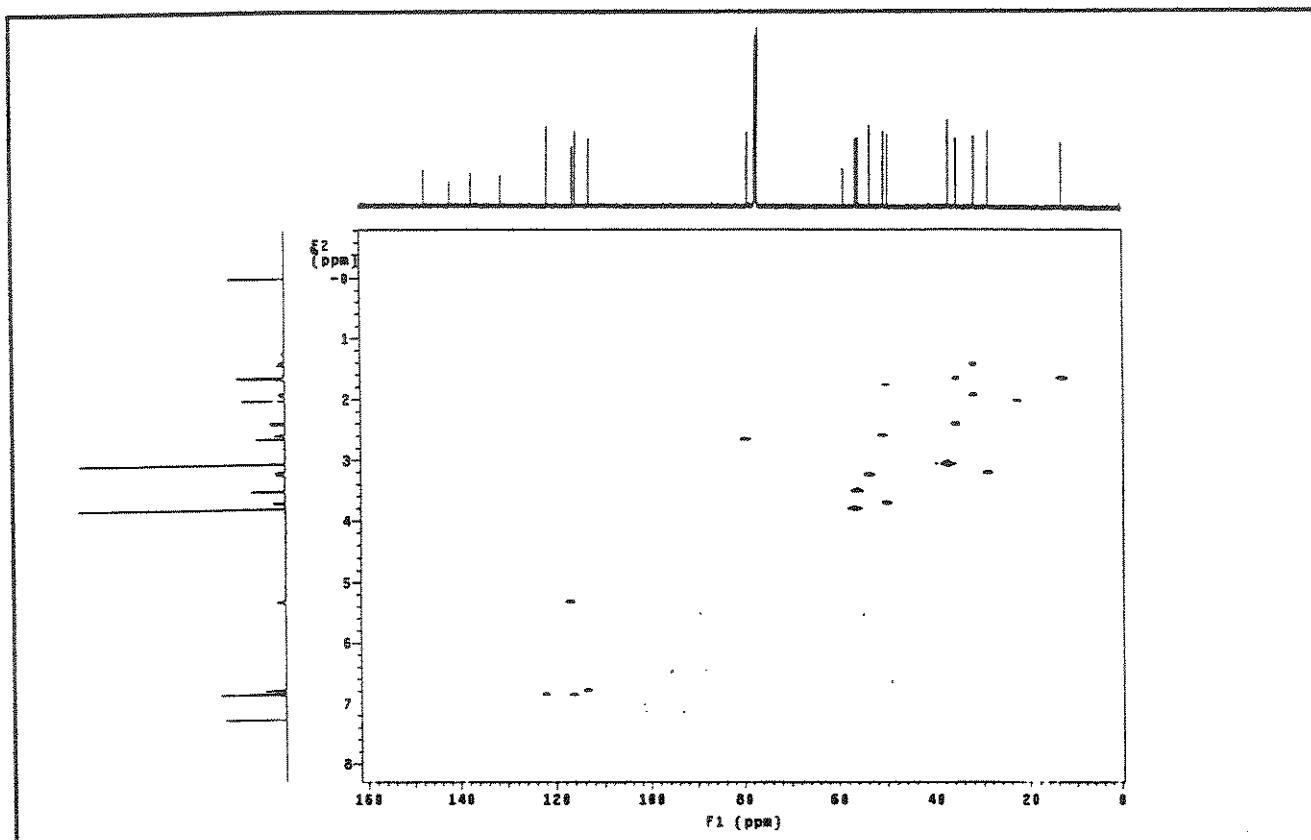
E 55: Experimento HSQC para 12-demetoxi-purpelina (**9**)



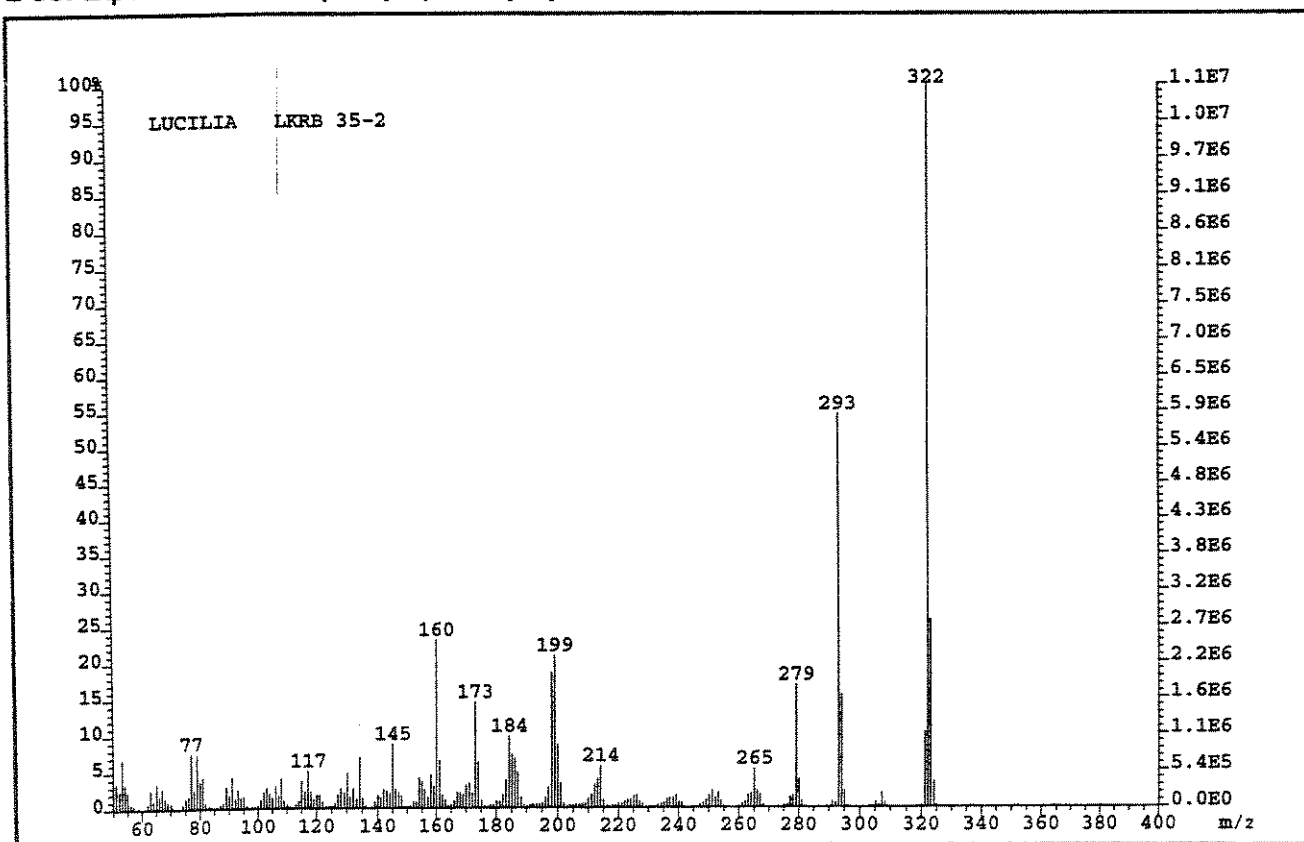
E 58: Experimento de DEPT para purpelina (**10**) (CDCl₃/TMS; 75 MHz)



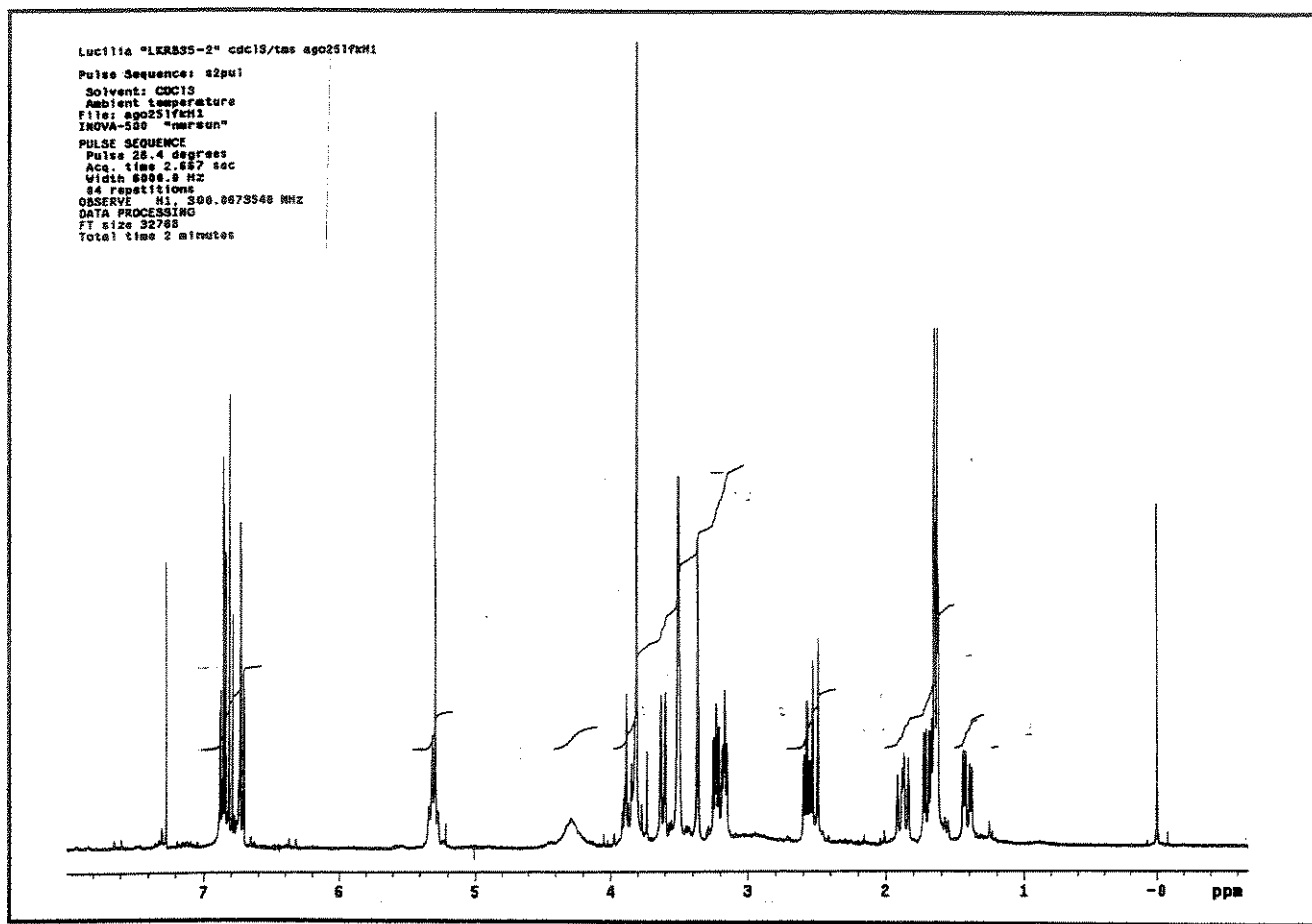
E 59: Experimento COSY para purpelina (**10**)



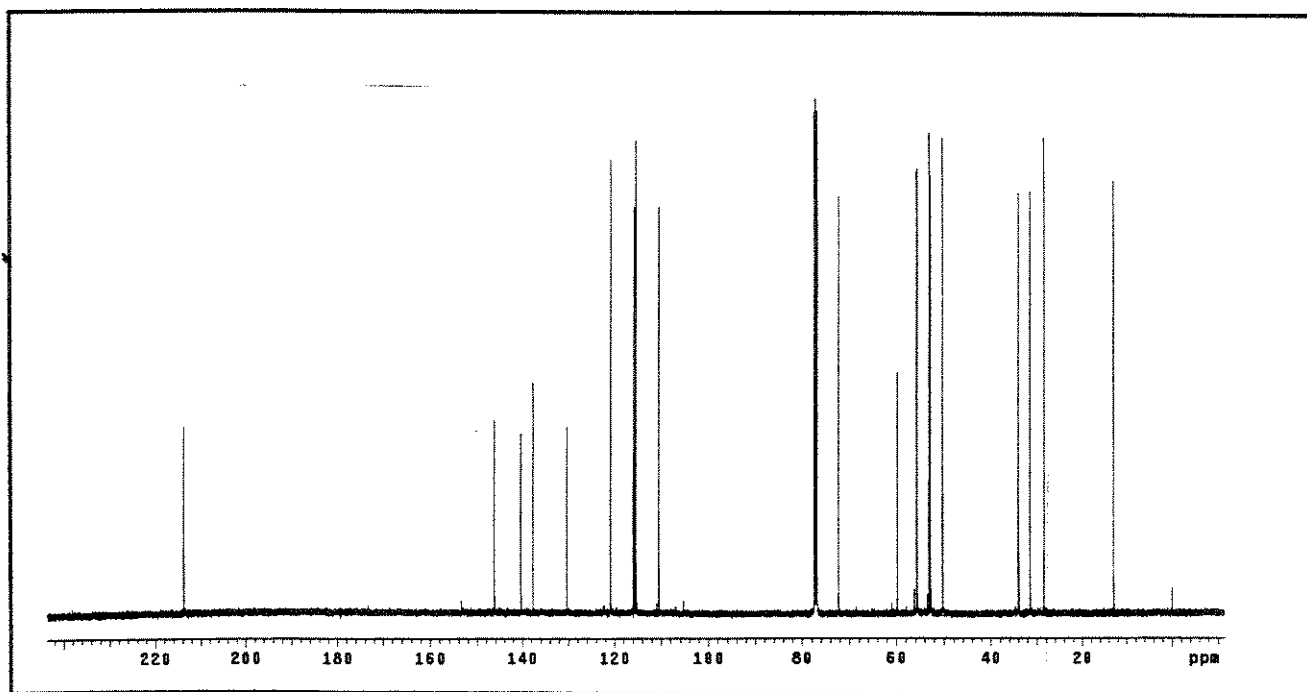
E 60: Experimento HMBC para purpelina (10)



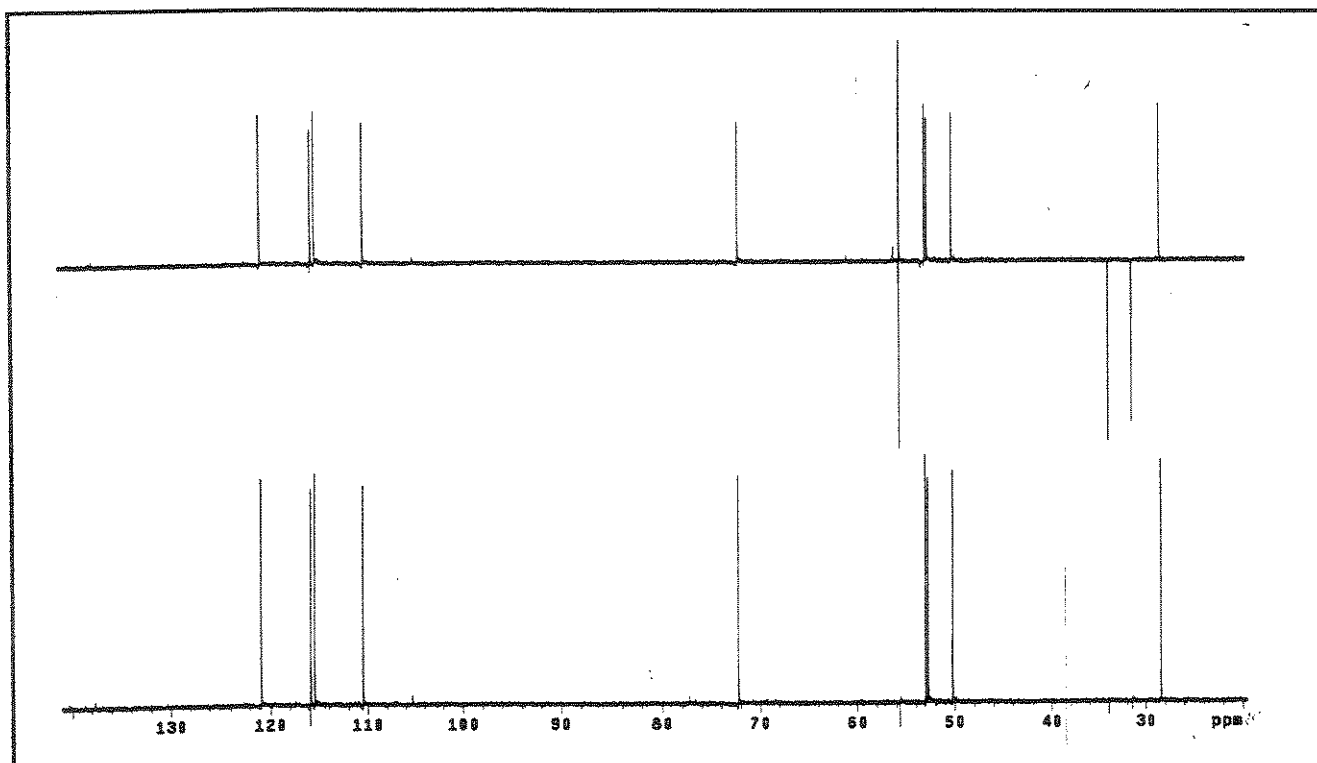
E 61: Espectro de Massas (70 eV) para norpurpurina (11)



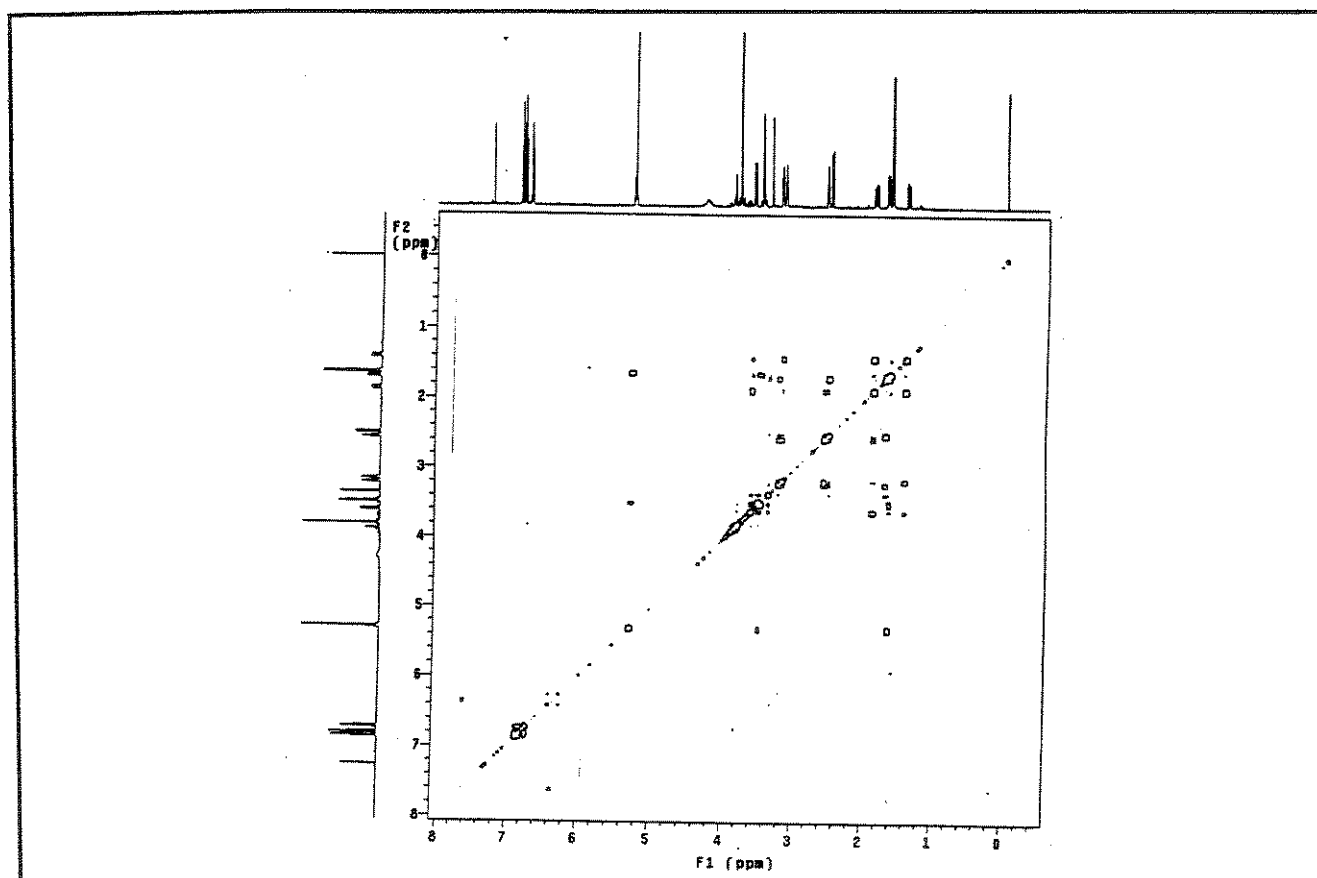
E 62 Espectro de RMN ^1H de norpurpelina (**11**) (CDCl_3/TMS ; 300MHz)



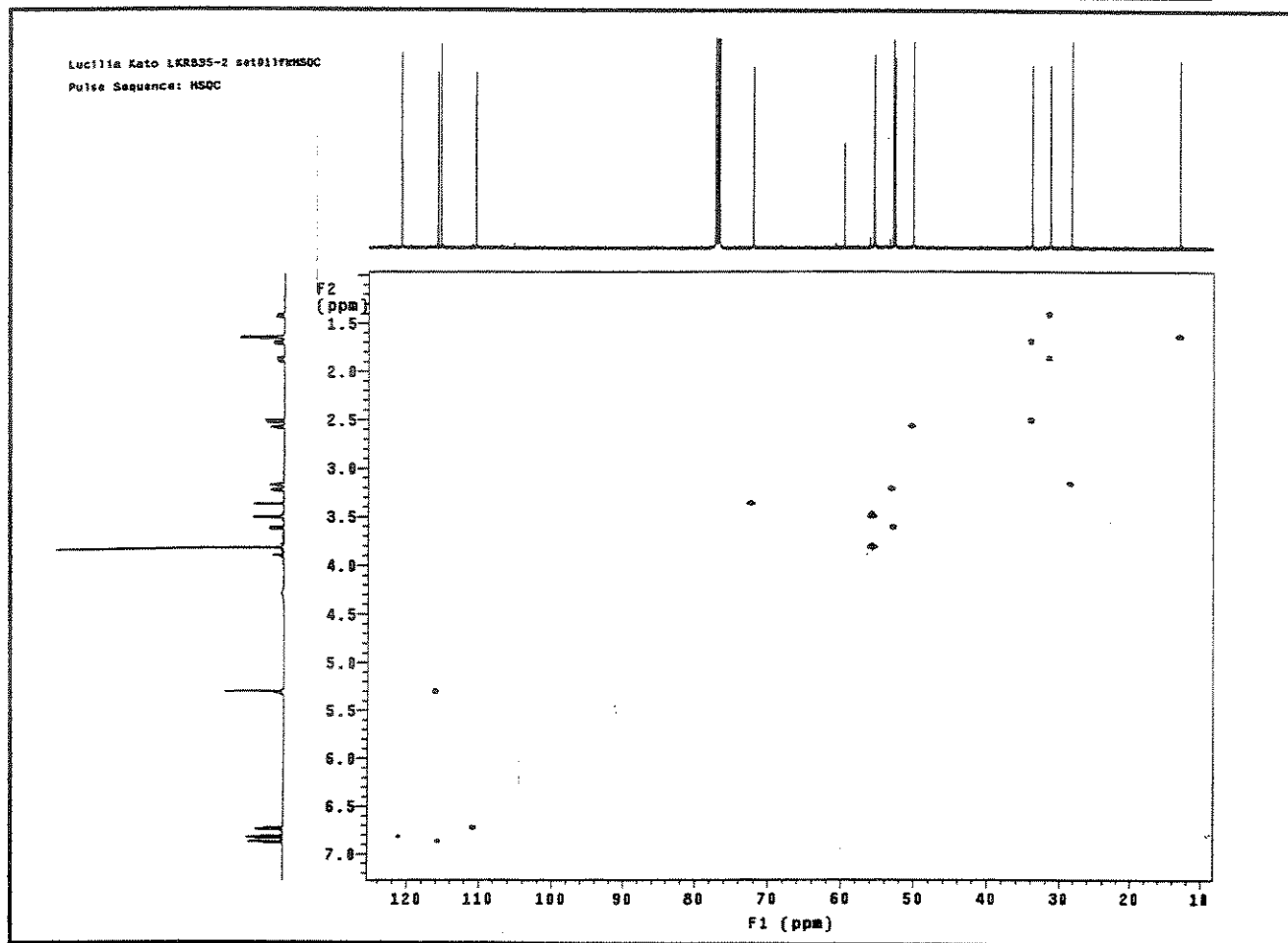
E 63: Espectro de RMN ^{13}C de norpurpelina (**11**) (CDCl_3/TMS ; 75 MHz)



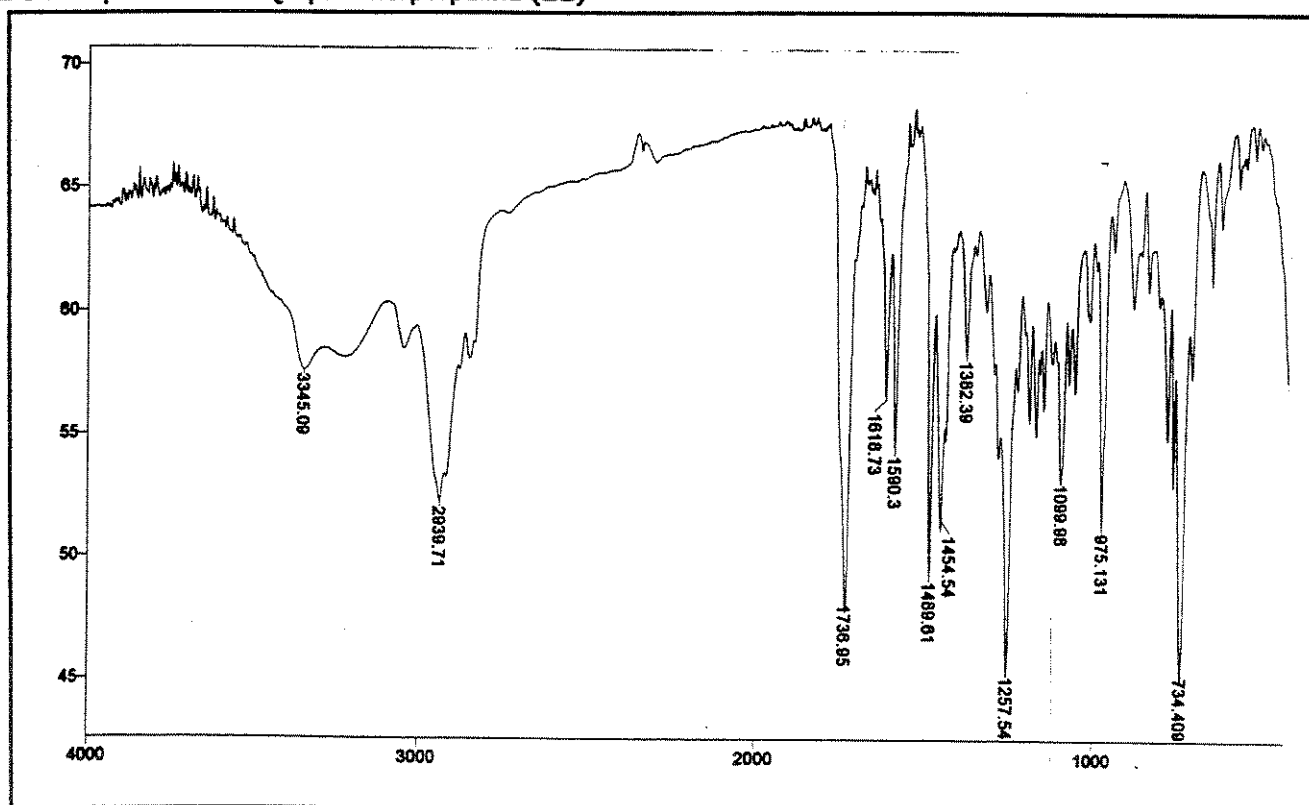
E 64: Experimento de DEPT para norpurpelina (**11**) (CDCl_3/TMS ; 75 MHz)



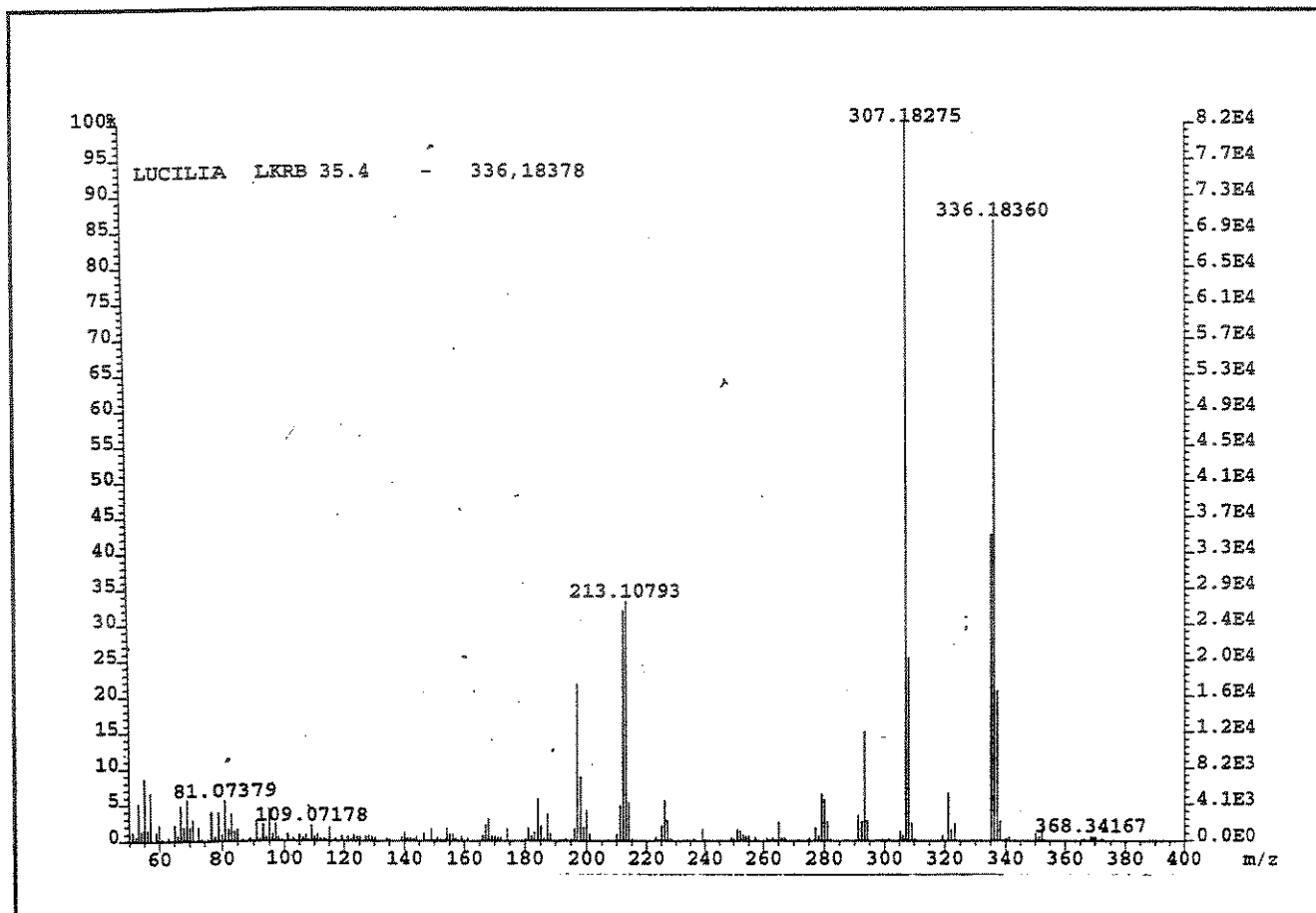
E 65: Experimento COSY para norpurpelina (**11**)



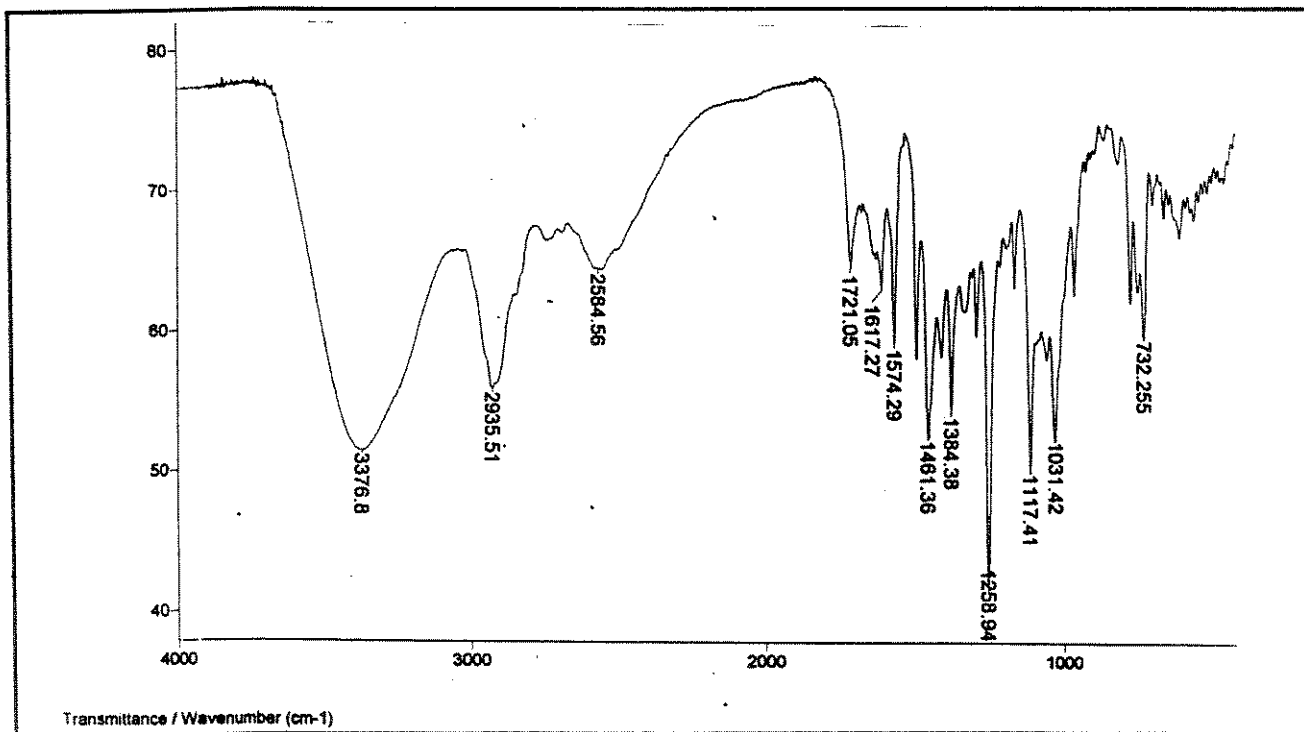
E 66: Experimento HSQC para norpurpeline (11)



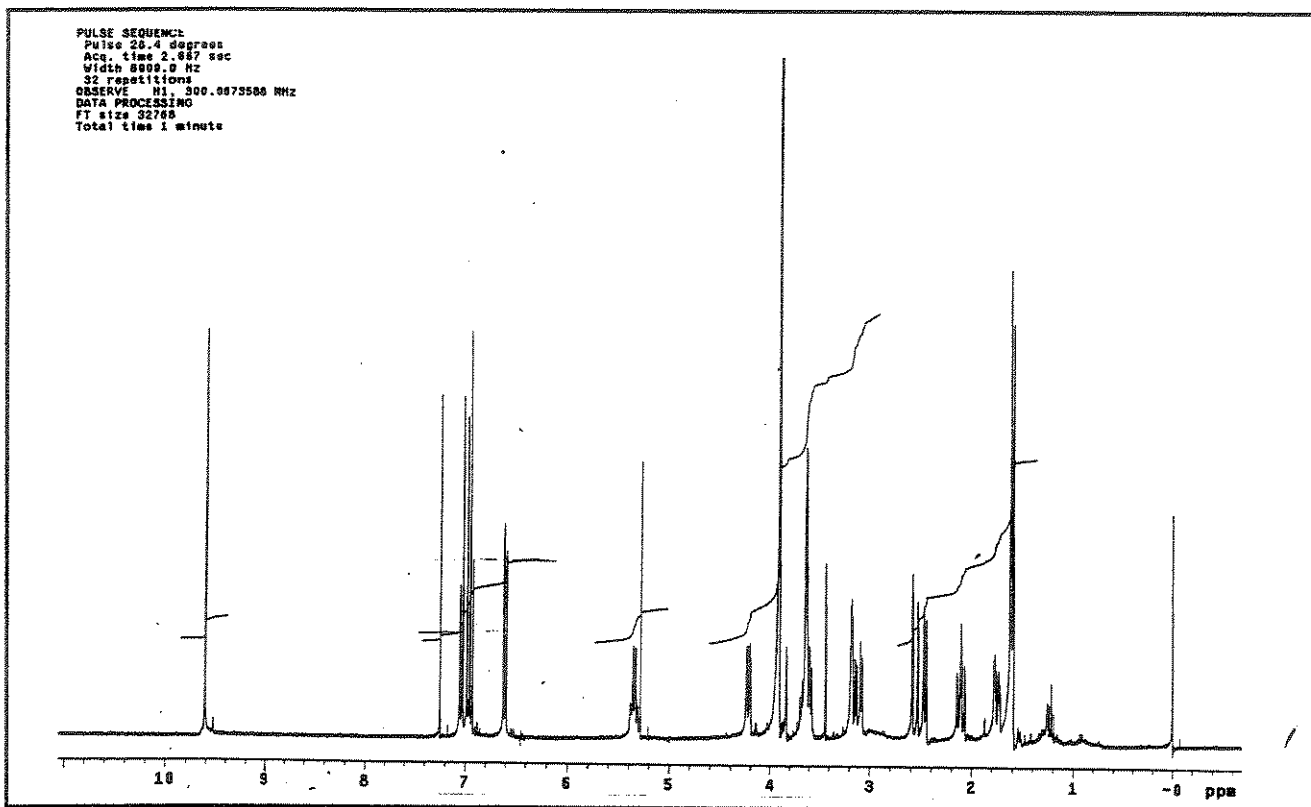
E 67: Espectro de I. V. para norpurpeline (11)



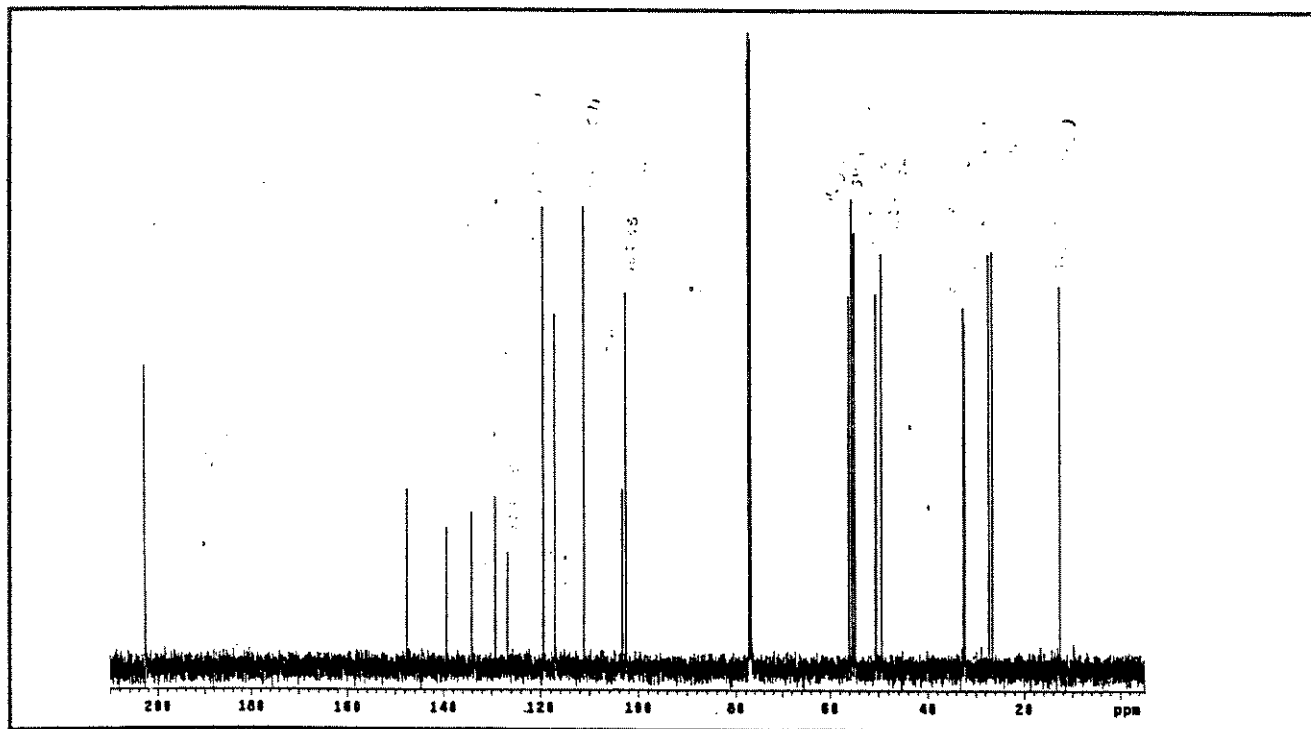
E 68: Espectro de Massas Alta Resolução (70eV) para 12-metoxi-N-metil-velosimina (**12**)



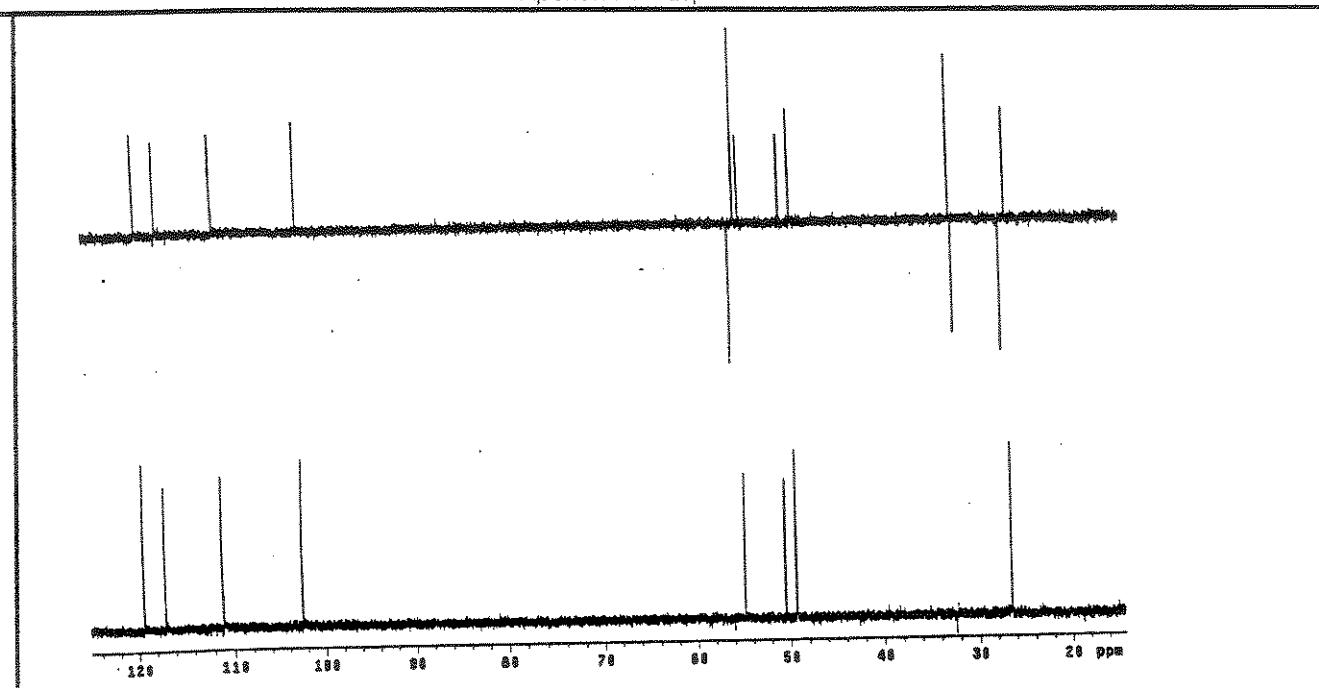
E 69: Espectro de I. V. para 12-metoxi- N-metil-velosimina (**12**) (Filme de CH₂Cl₂)



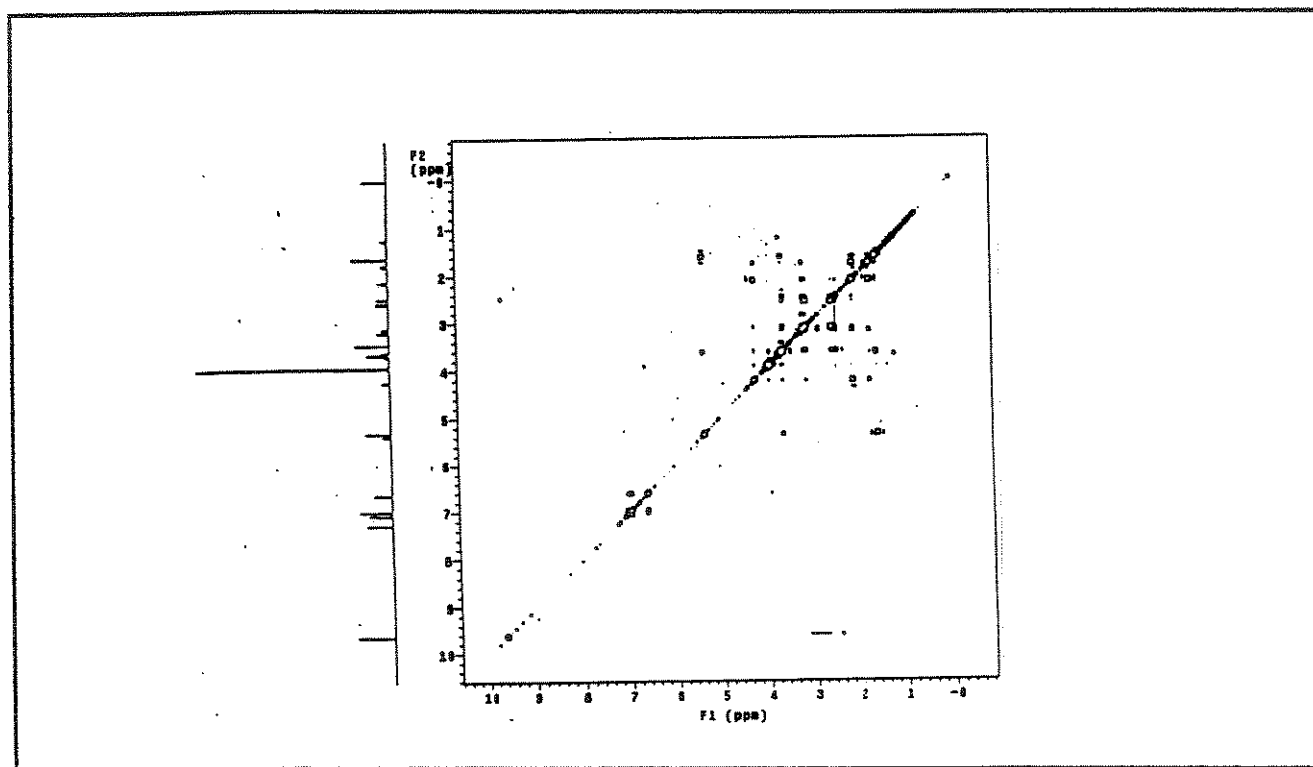
E 70 Espectro de RMN ^1H de 12-metoxi-N-metil-velosimina (**12**) (CDCl_3/TMS ; 300MHz)



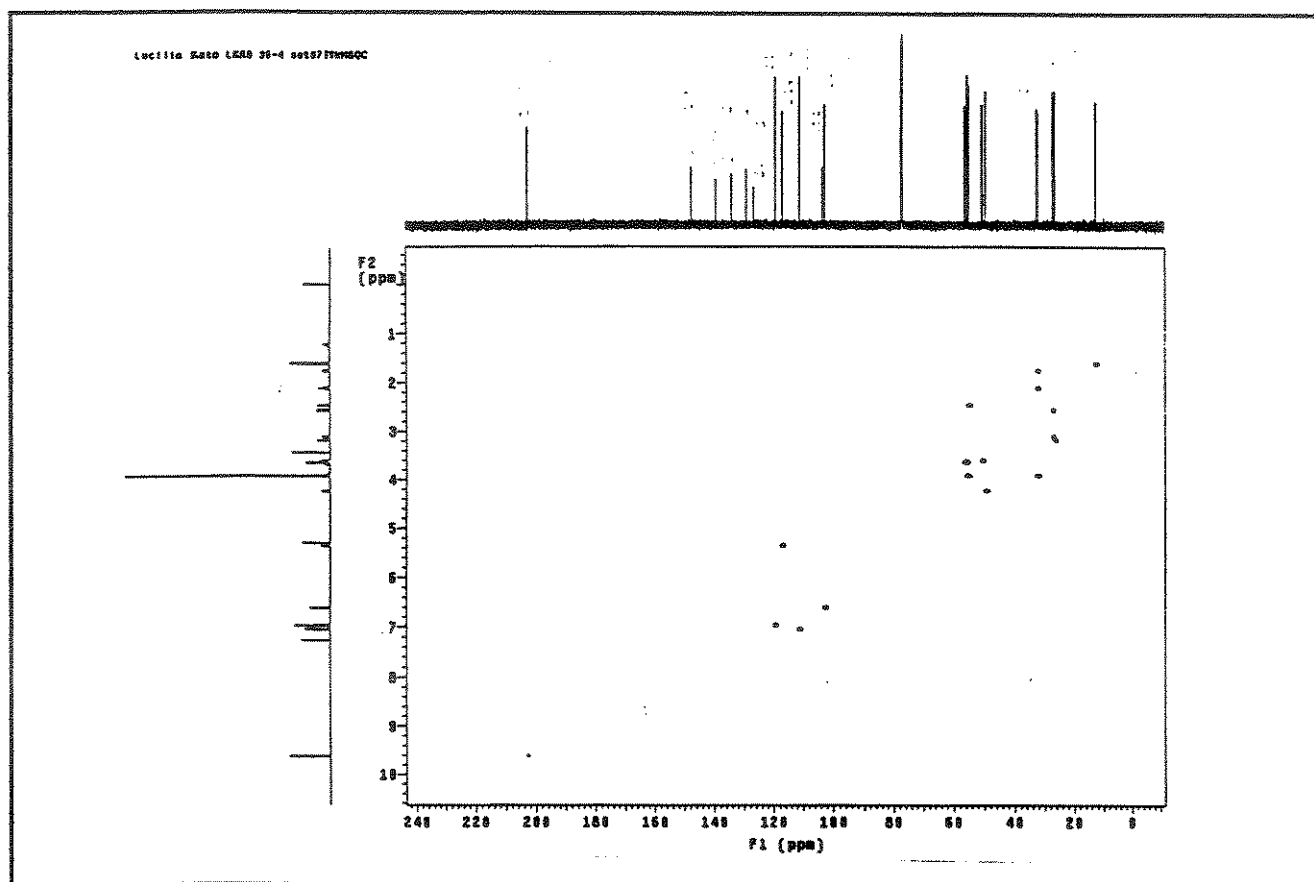
E 71: Espectro de RMN ^{13}C de 12-metoxi-N-metil-velosimina (**12**) (CDCl_3/TMS ; 125 MHz)



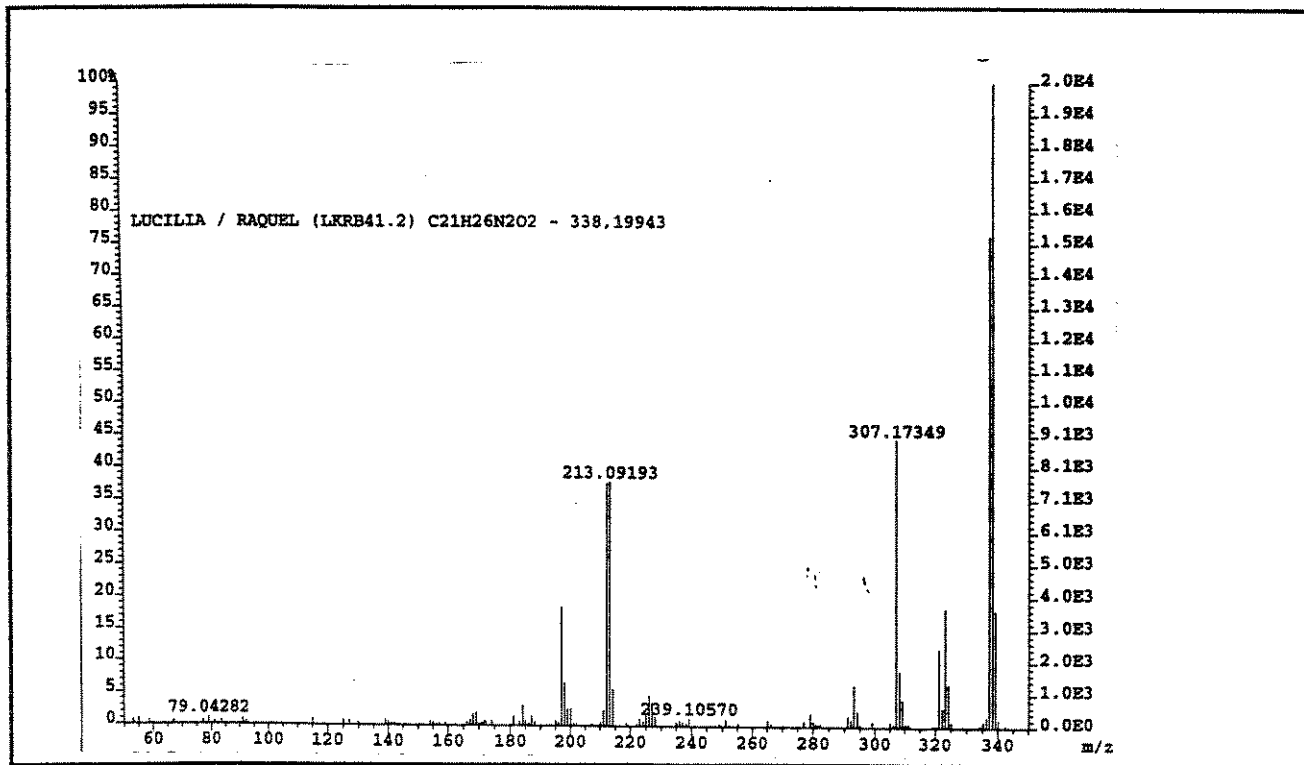
E 72: Experimento de DEPT para 12-metoxi-N-metil-velosimina (**12**) (CDCl_3/TMS ; 125 MHz)



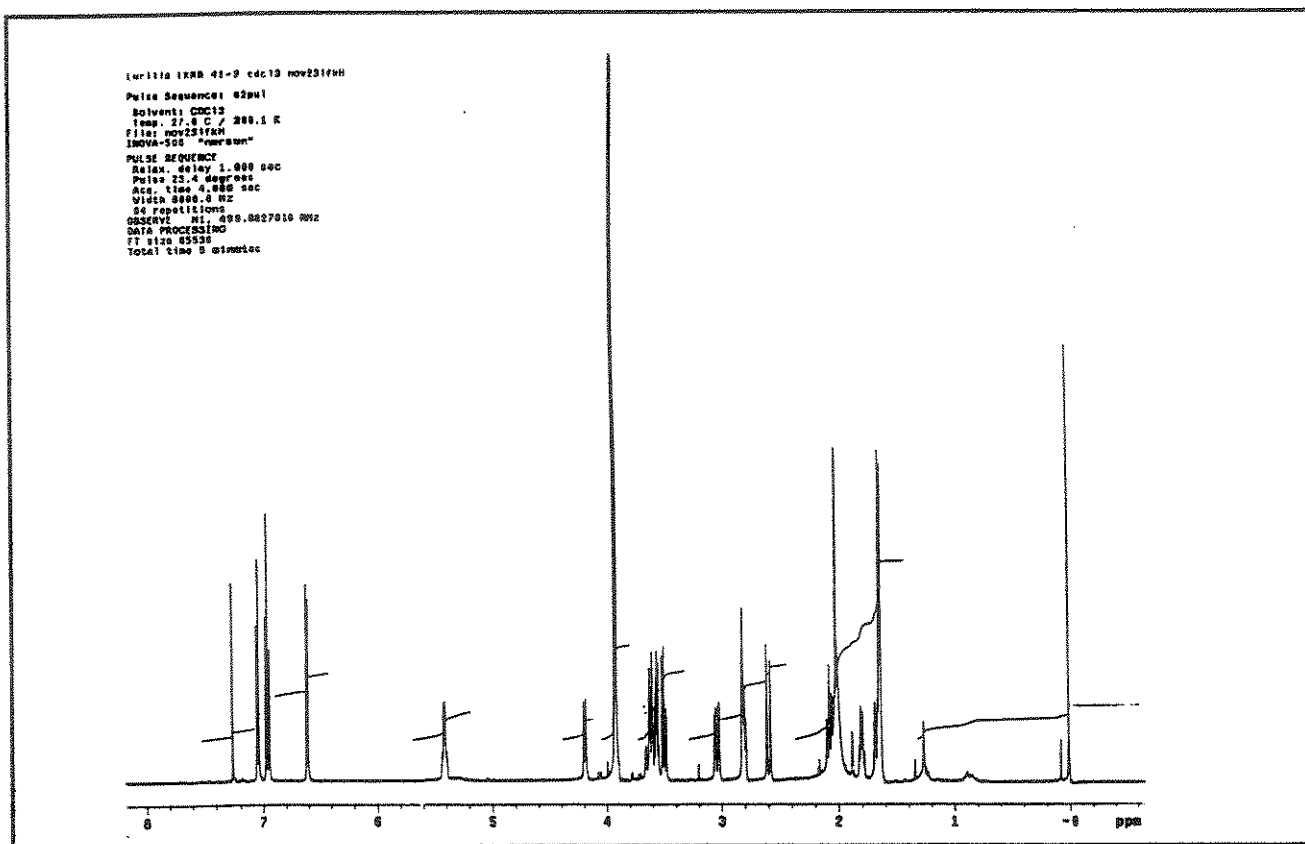
E 73: Espectro COSY para 12-metoxi-N-metil-velosimina (**12**)



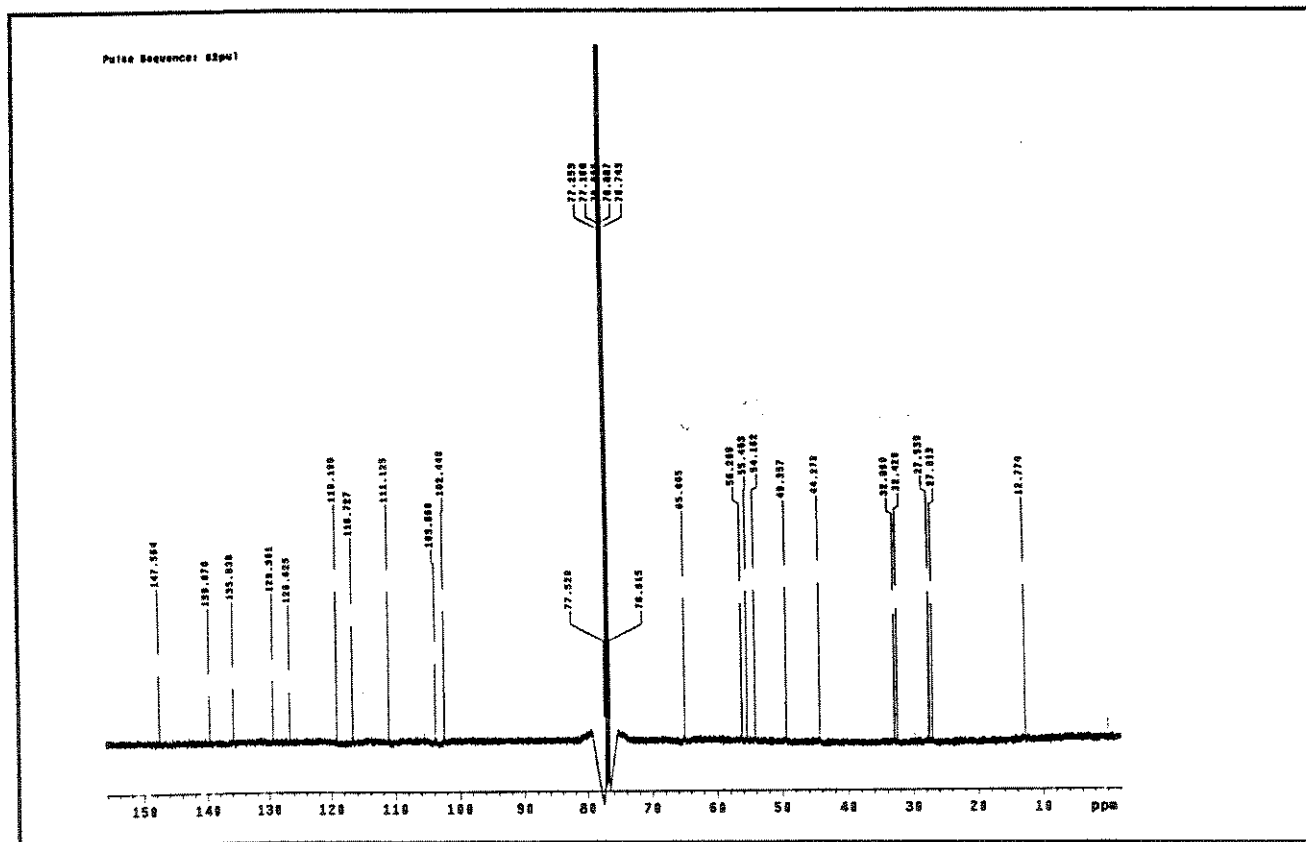
E 74: Experimento HSQC para 12-metoxi-N-metil-velosimina (**12**)



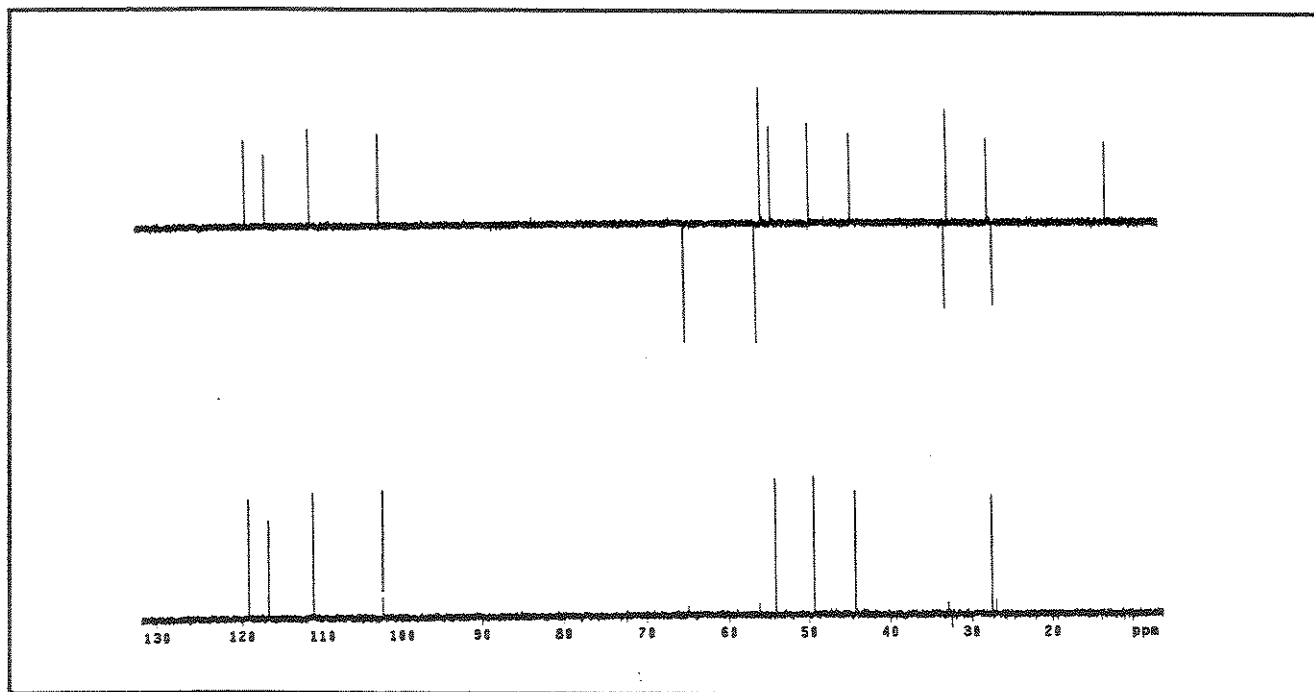
E 75: Espectro de Massas Alta Resolução (70 eV) para 12-metoxi-afinisina (**13**)



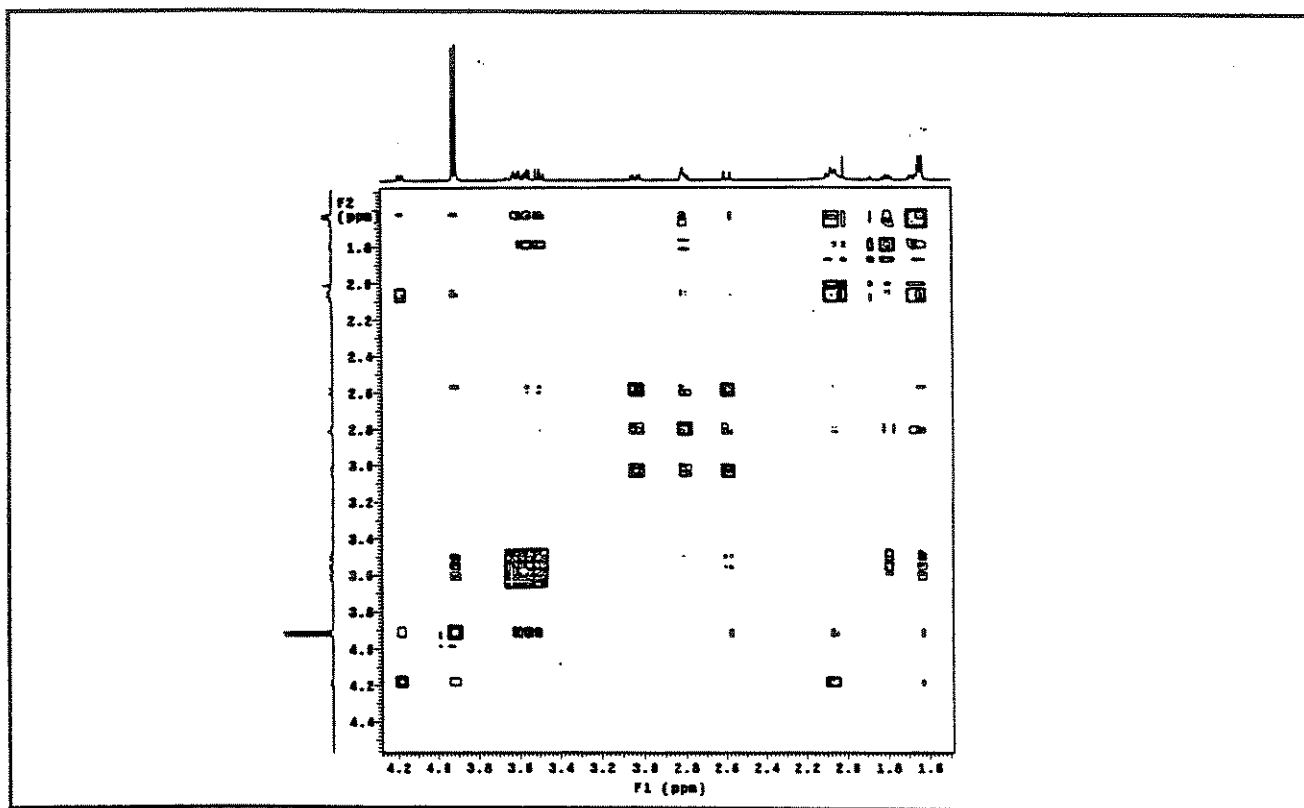
E 76 Espectro de RMN ^1H de 12-metoxi-afinisina (**13**) (CDCl_3/TMS ; 500 MHz)



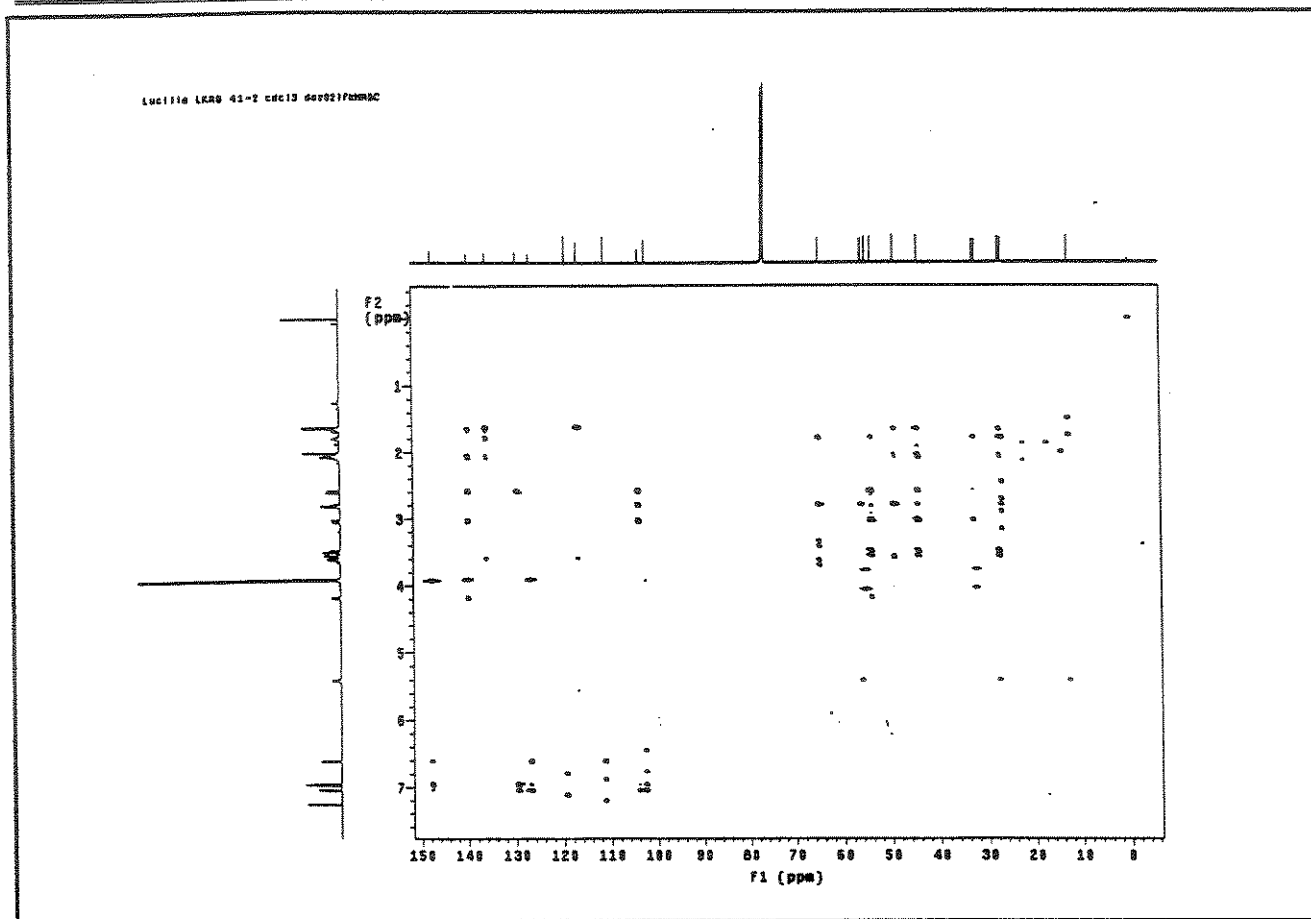
E 77: Espectro de RMN ^{13}C de 12-metoxi-afinisina (**13**) (CDCl_3/TMS ; 125 MHz)



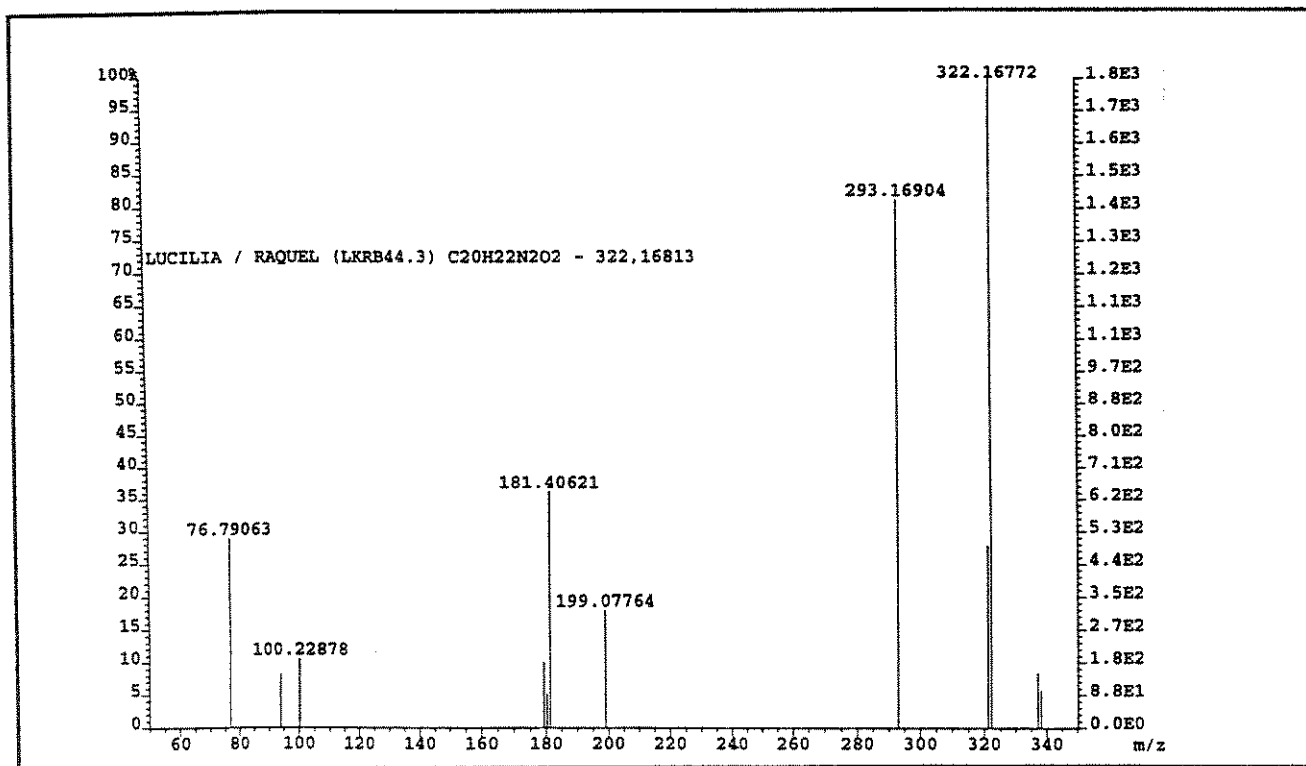
E 78: Experimento de DEPT para 12-metoxi-afinisina (**13**) (CDCl_3/TMS ; 125 MHz)



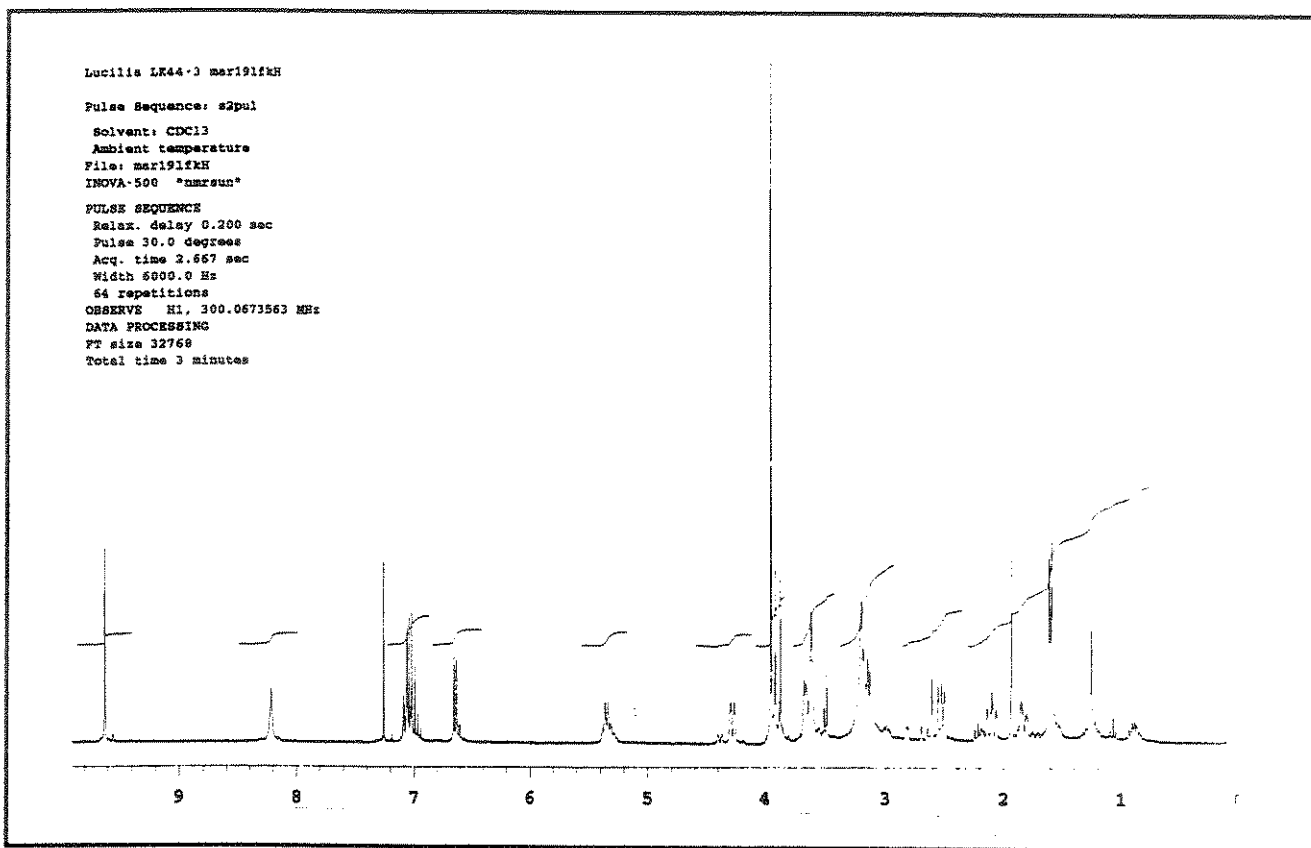
E 79: Experimento COSY para 12-metoxi-afinisina (**13**)



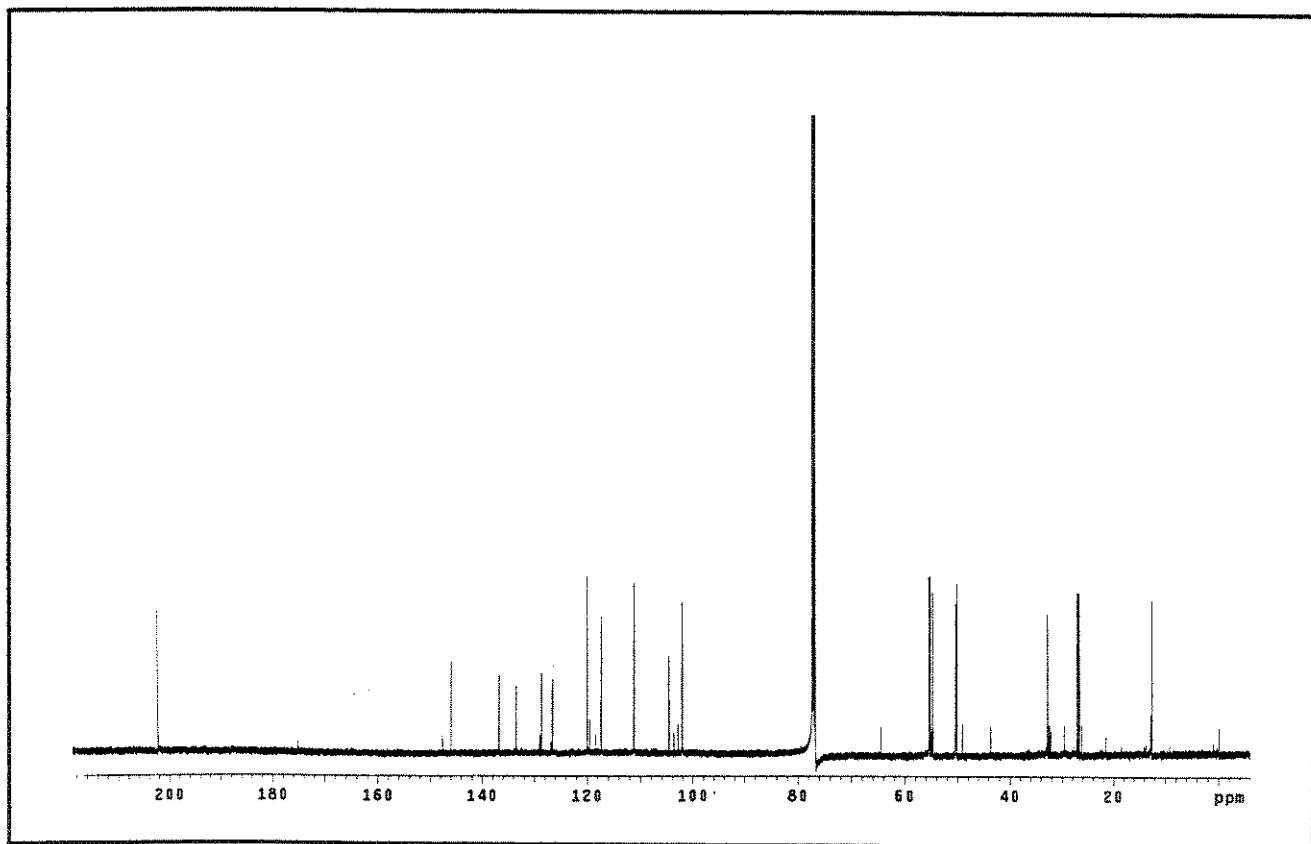
E 80: Experimento HMBC para 12-metoxi-afinisina (**13**)



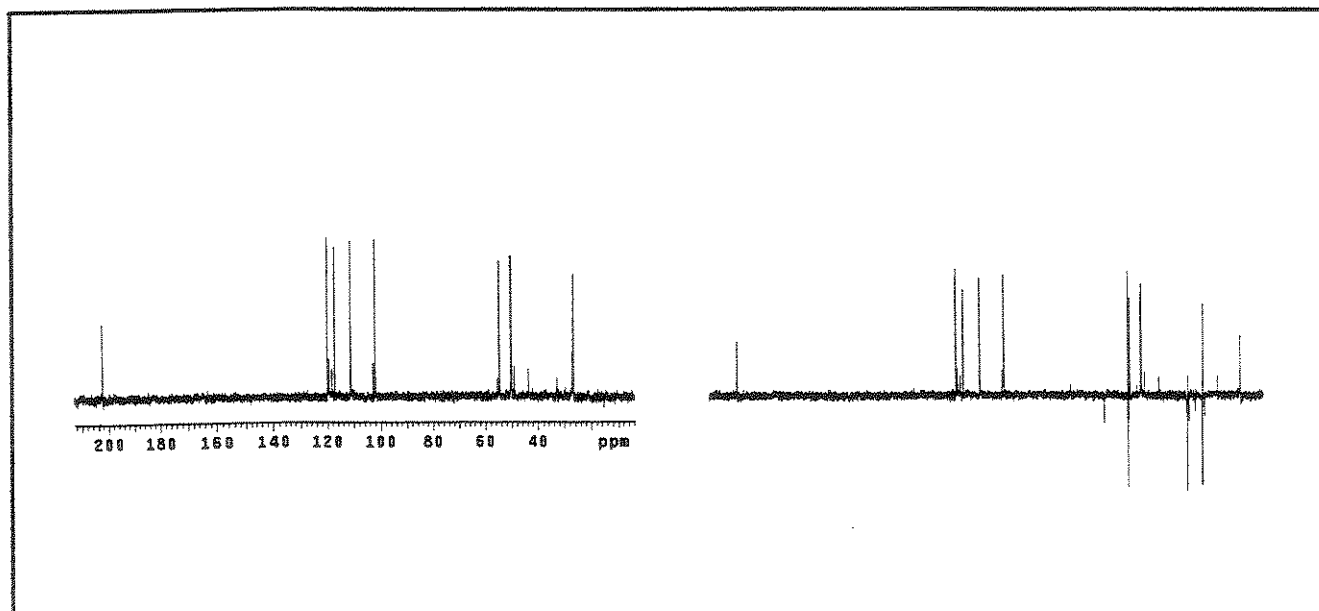
E 81: Espectro de Massas Alta Resolução (70 eV) para 12-metoxi-velosimina (**14**)



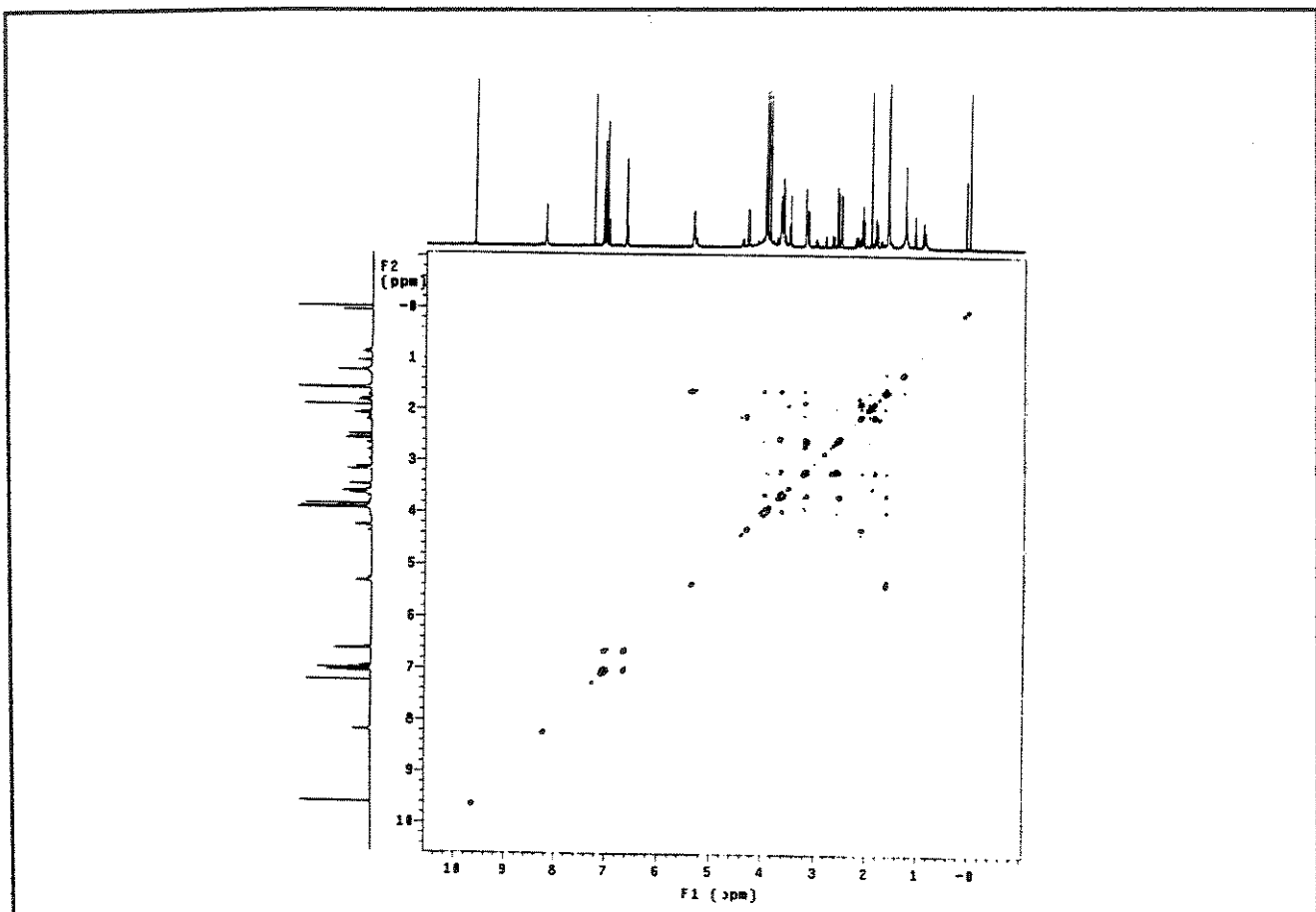
E 82 Espectro de RMN ^1H de 12-metoxi-velosimina (**14**) (CDCl_3/TMS ; 300 MHz)



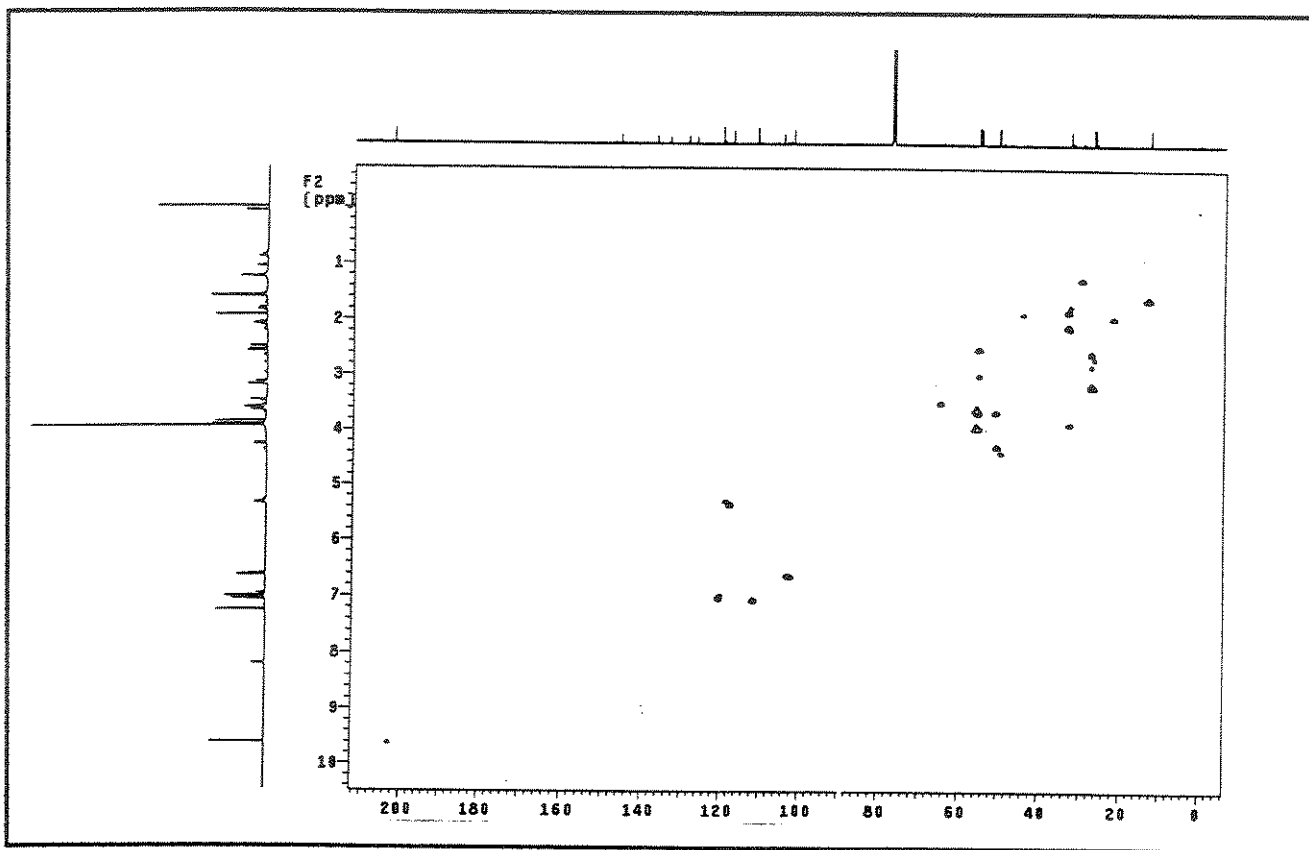
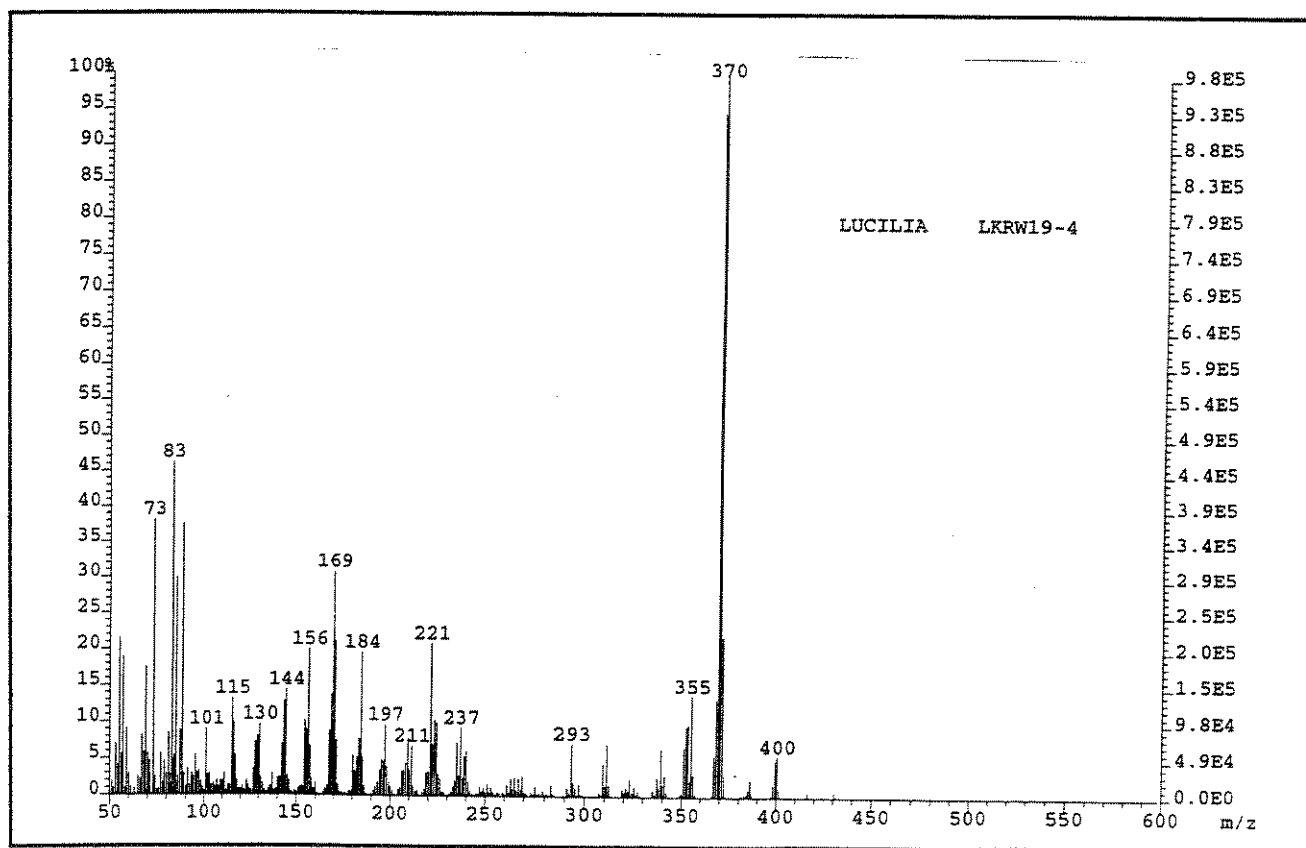
E 83: Espectro de RMN ^{13}C de 12-metoxi-velosimina (**14**) (CDCl_3/TMS ; 75 MHz)

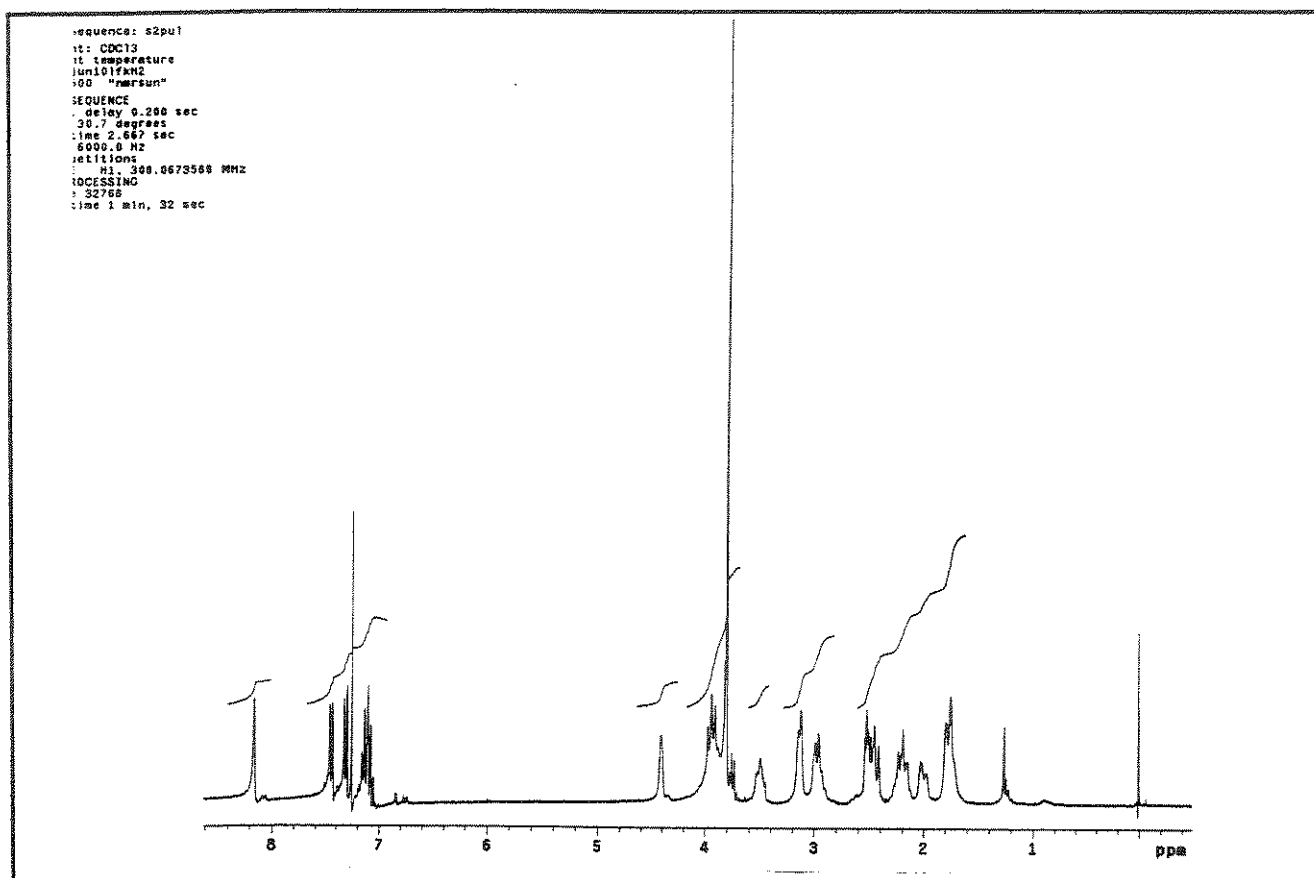


E 84: Experimento de DEPT para 12-metoxi-velosimina (**14**) (CDCl₃/TMS; 75 MHz)

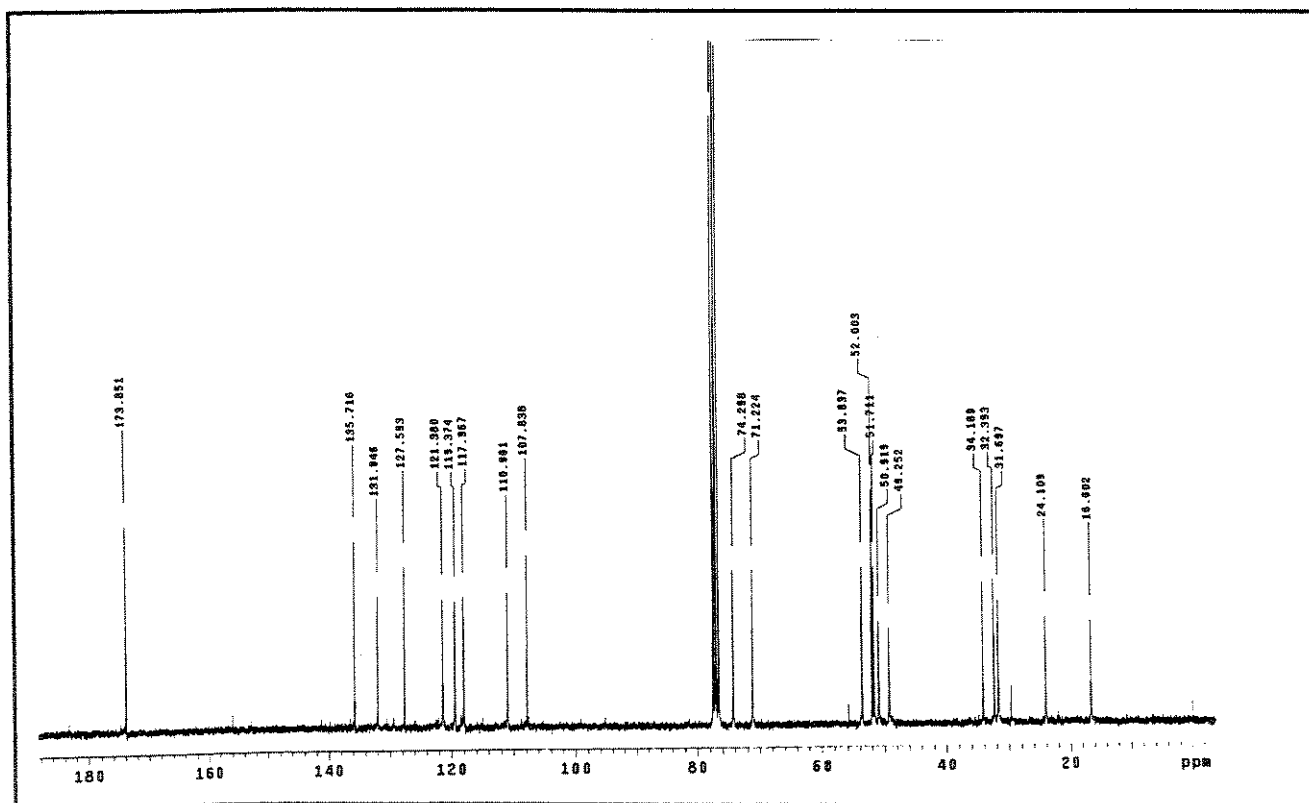


E 85: Experimento COSY para 12-metoxi-velosimina (**14**)

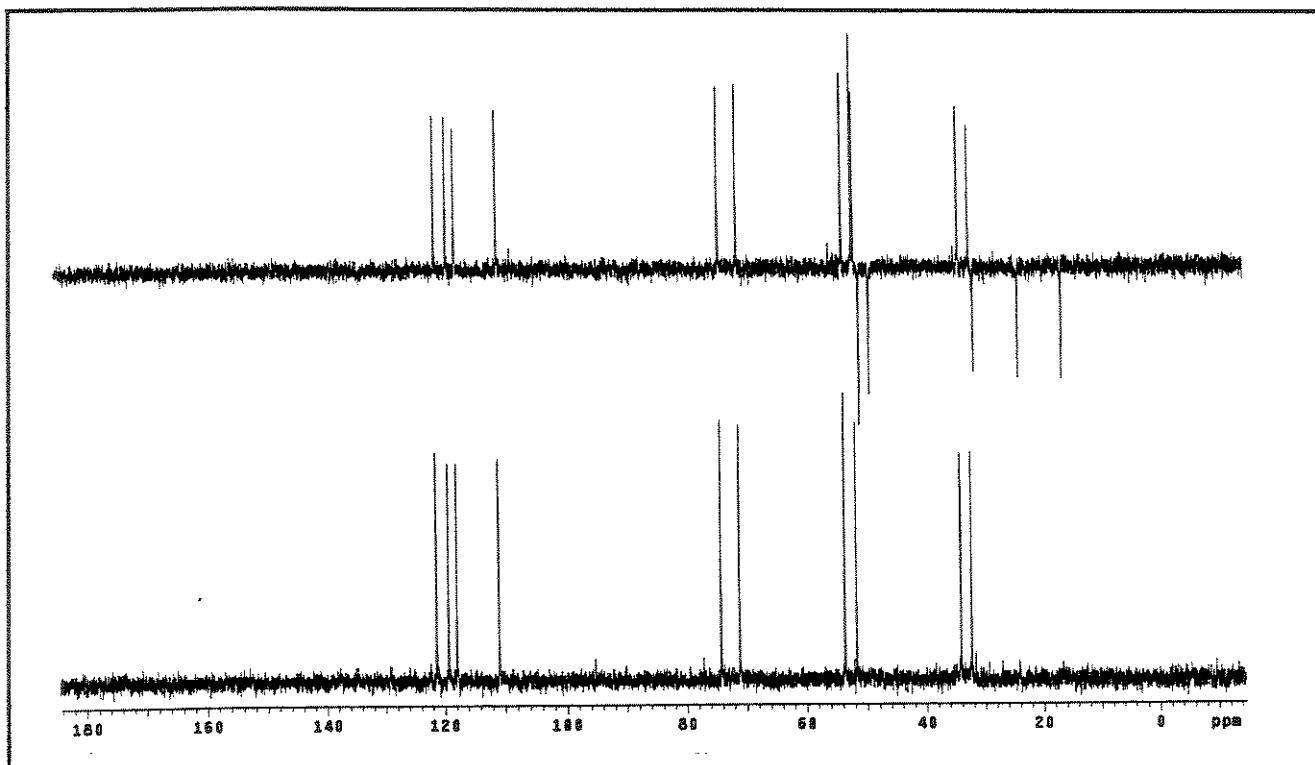
**E 86:** Experimento HSQC para 12-metoxi-velosimina (**14**)**E 87:** Espectro de Massas (70 eV) para 18-hidroxi-yohimbina (**15**)



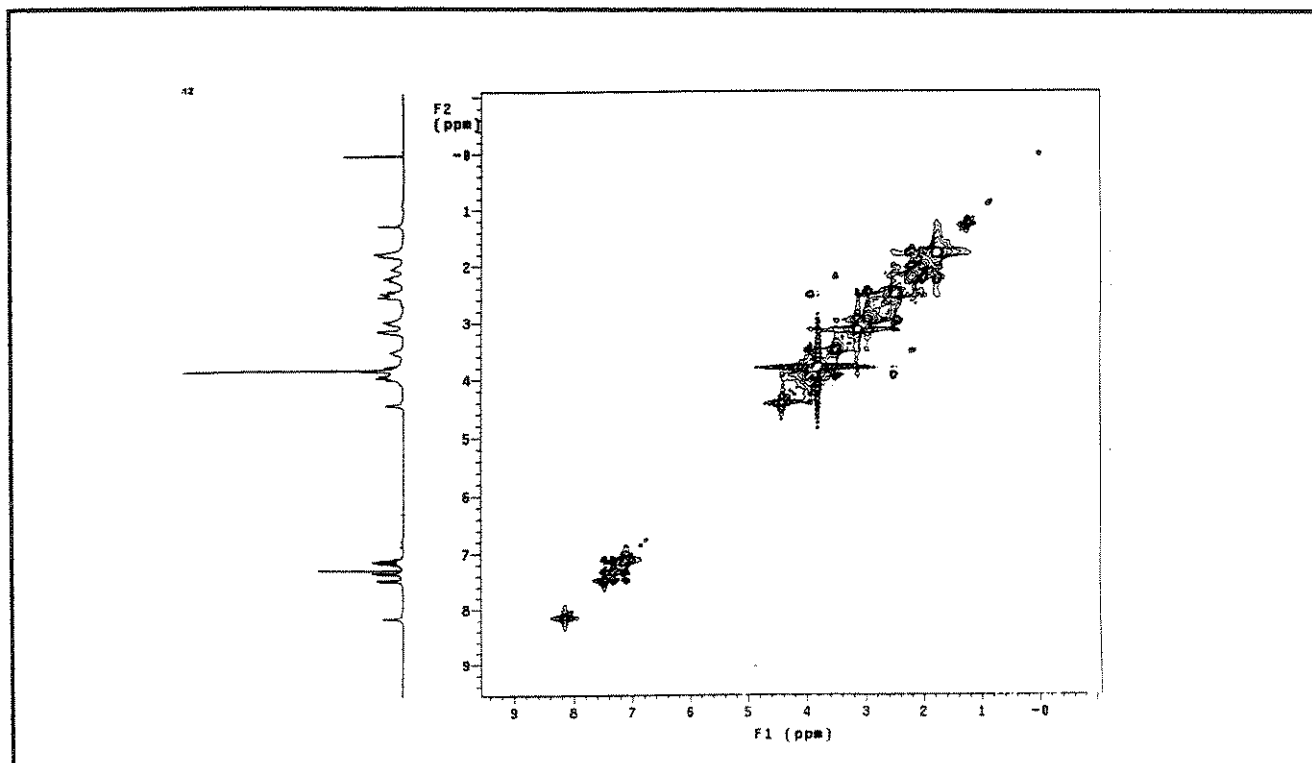
E 88 Espectro de RMN ^1H de 18-hidroxi-yohimbina (**15**) (CDCl_3/TMS ; 300 MHz)



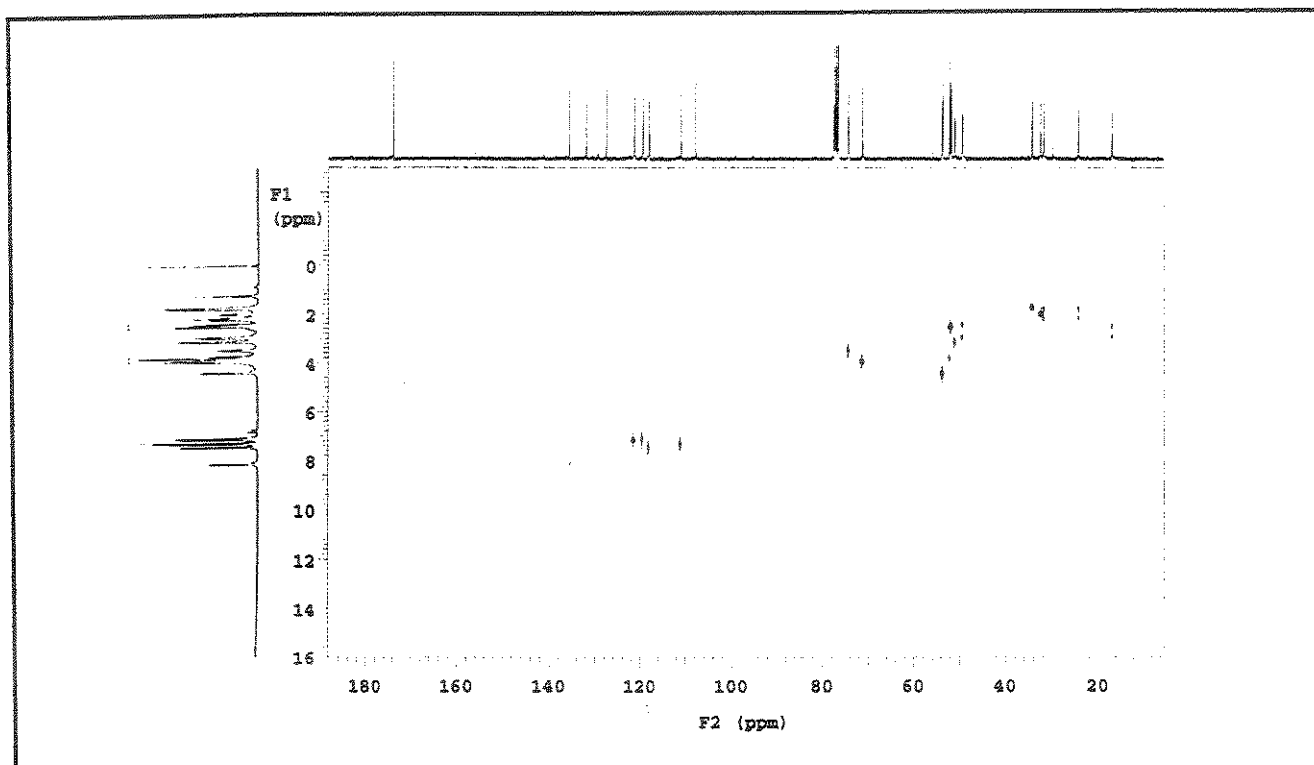
E 89: Espectro de RMN ^{13}C de 18-hidroxi-yohimbina (**15**) (CDCl_3/TMS ; 75 MHz)



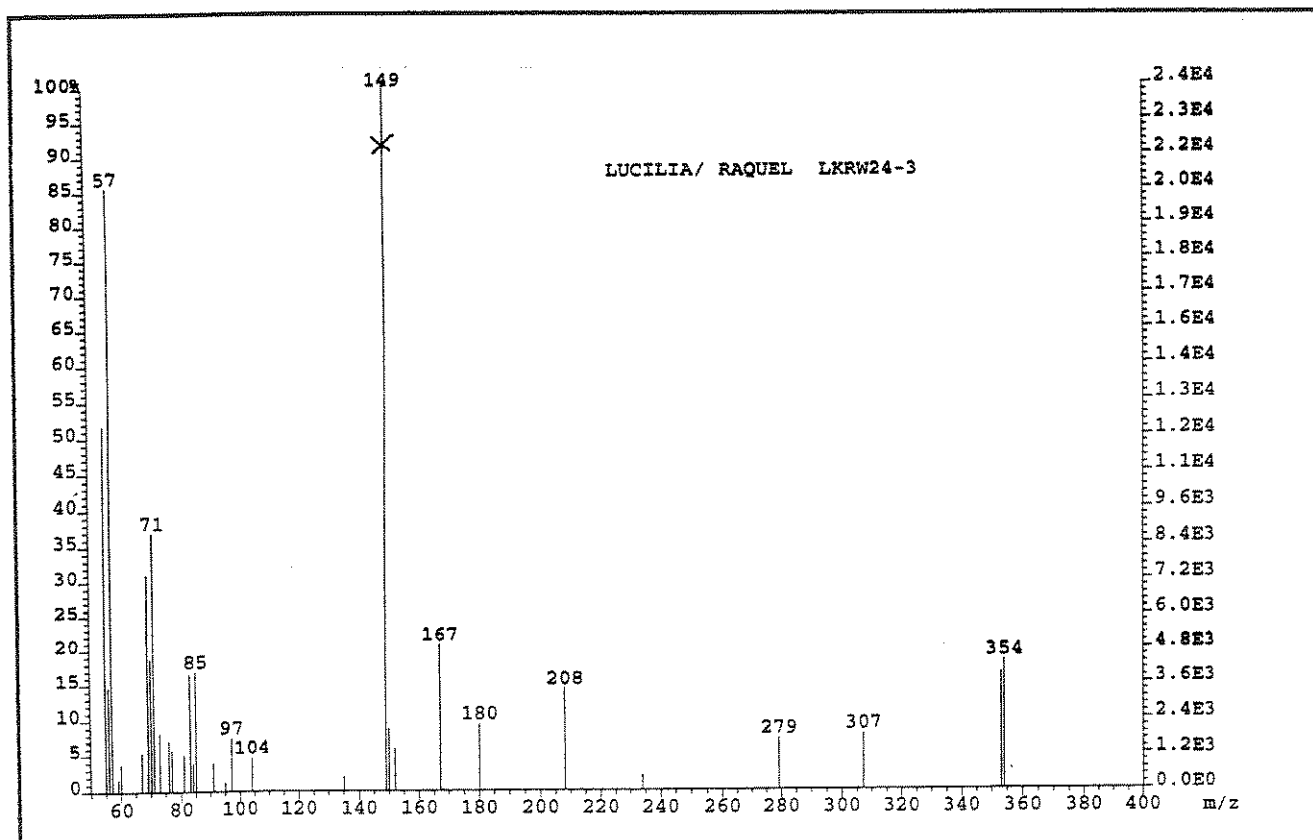
E 90: Experimento de DEPT para 18-hidroxi-yohimbina (**15**) (CDCl_3/TMS ; 75 MHz)



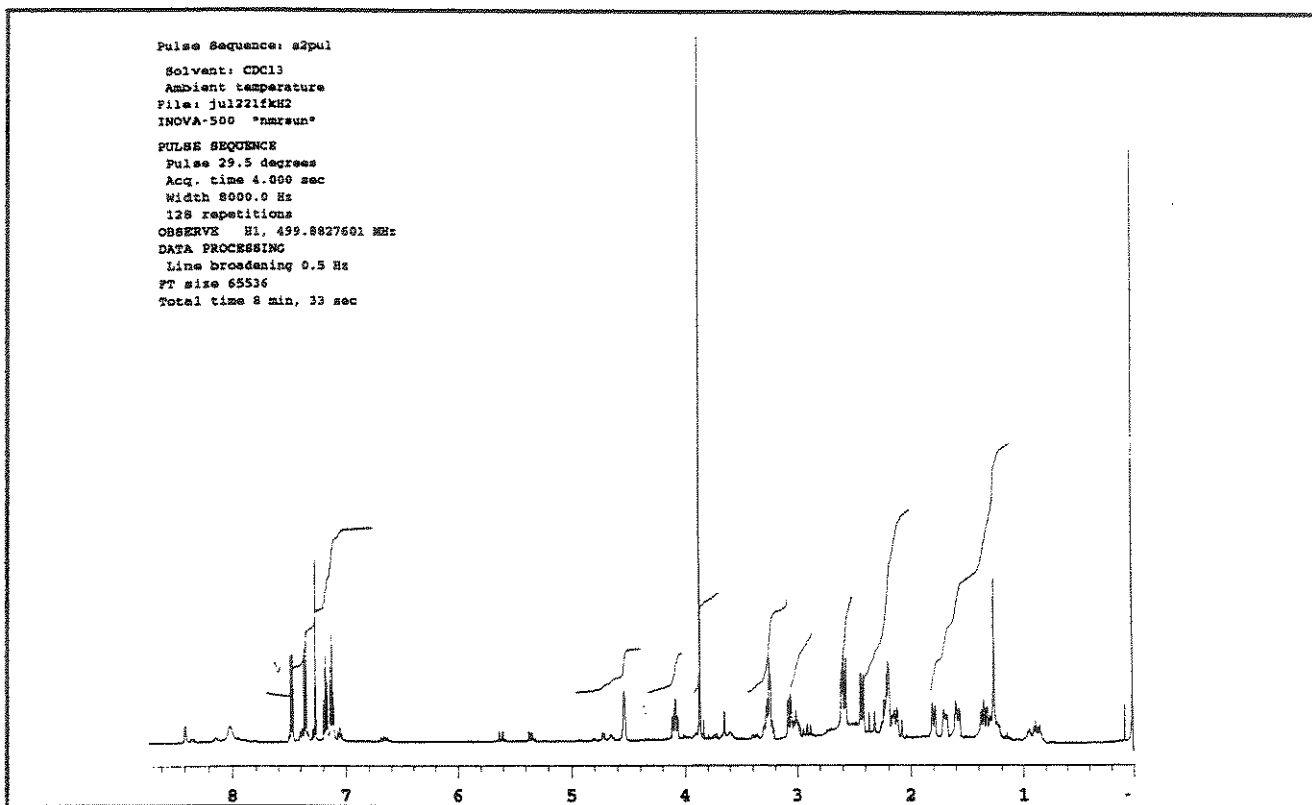
E 91: Experimento COSY para 18-hidroxi-yohimbina (**15**)



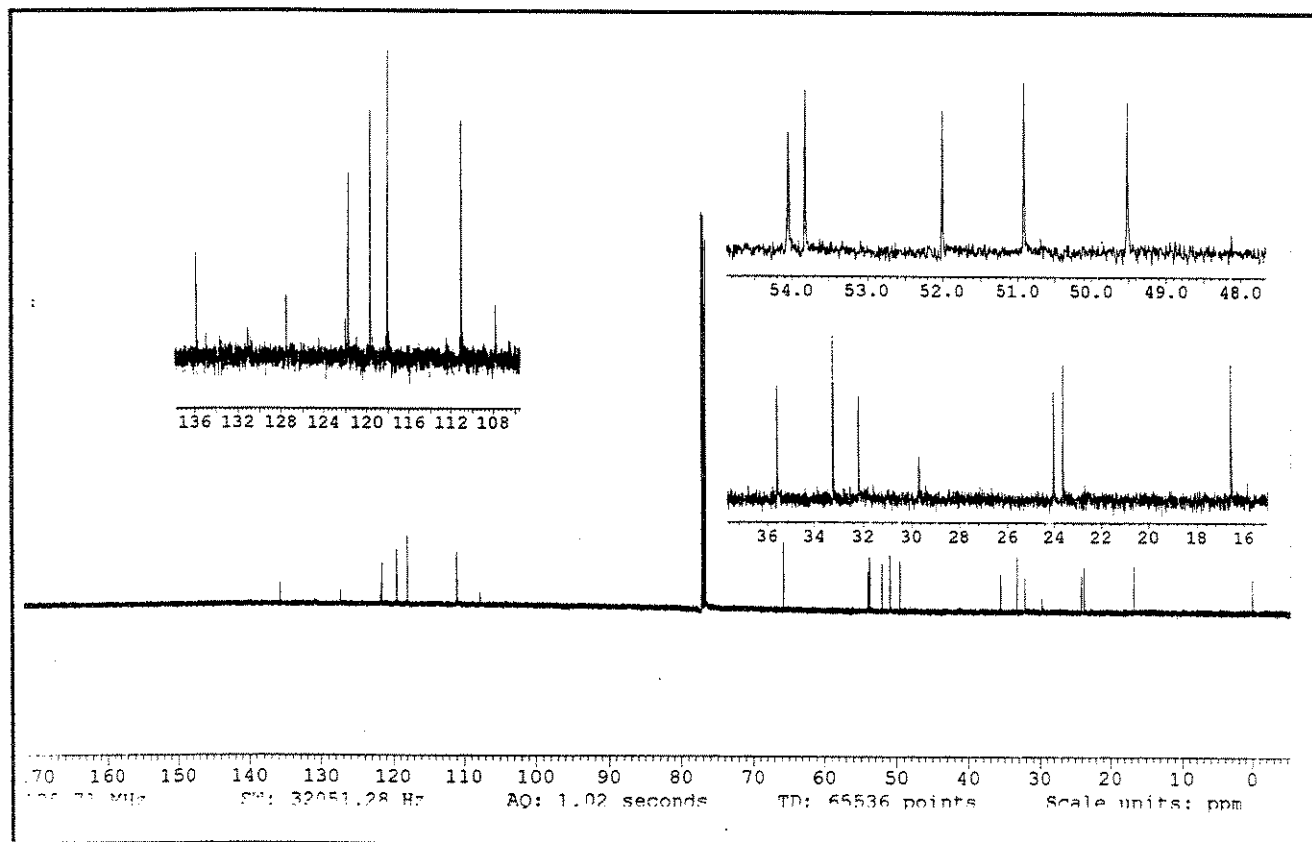
E 92: Experimento HETCOR para 18-hidroxi-yohimbina (15)



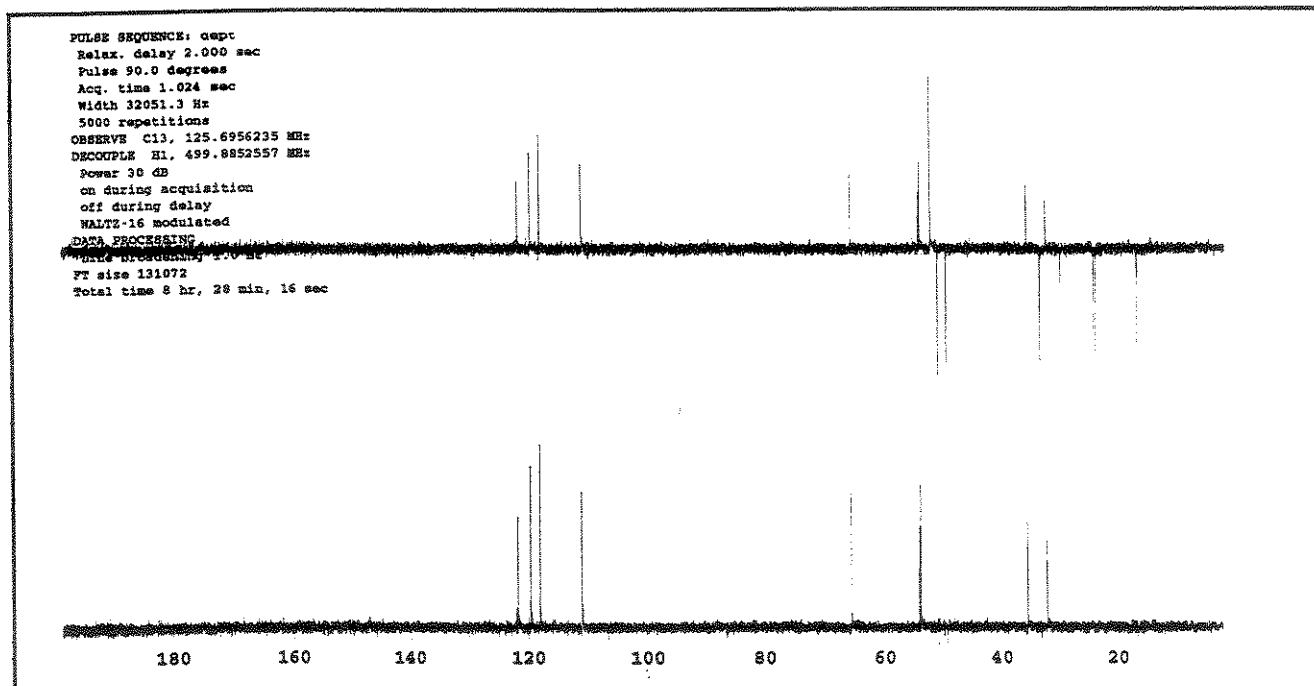
E 93: Espectro de Massas (70 eV) para 3- α -epi-yohimbina (16)



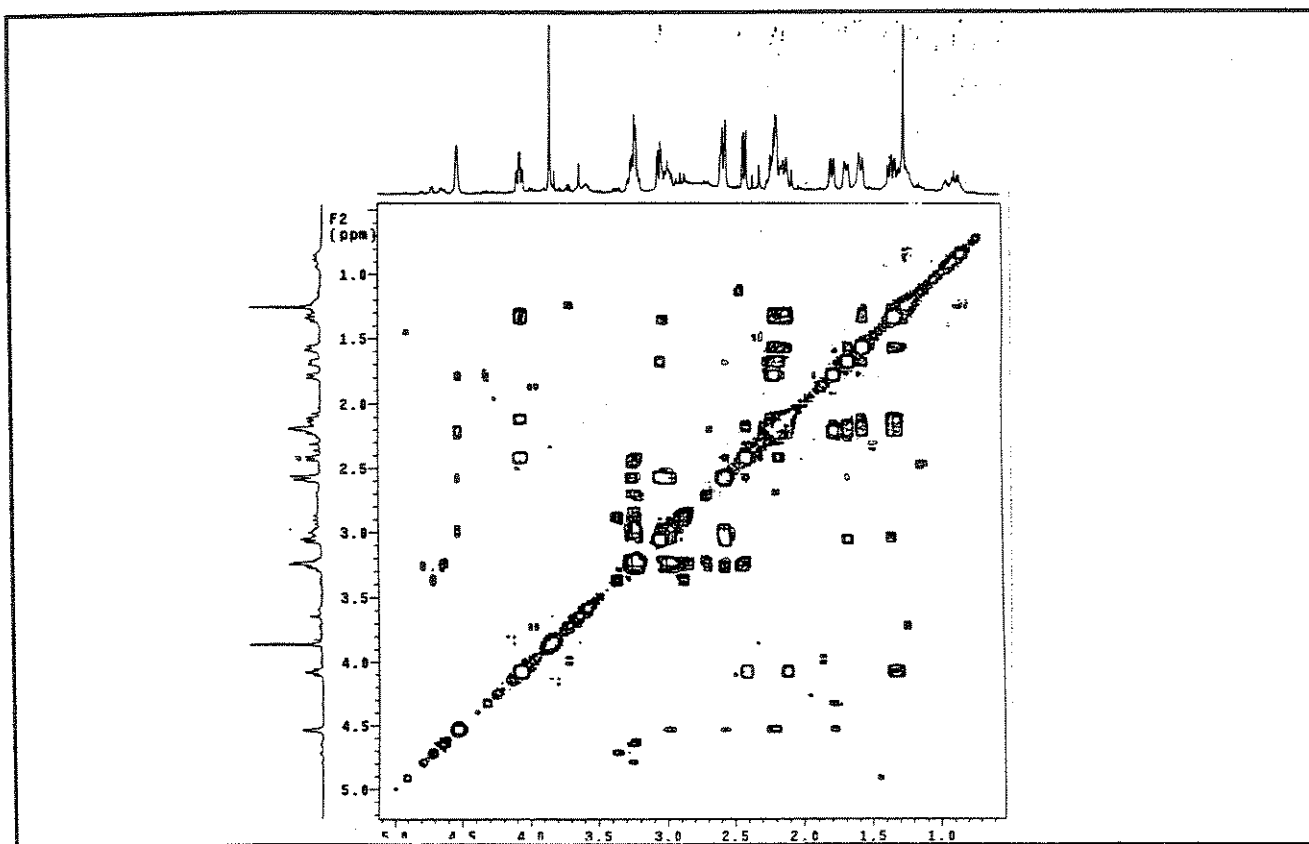
E 94 Espectro de RMN ¹H de 3-α-epi-yohimbina (**16**) (CDCl₃/TMS; 500MHz)



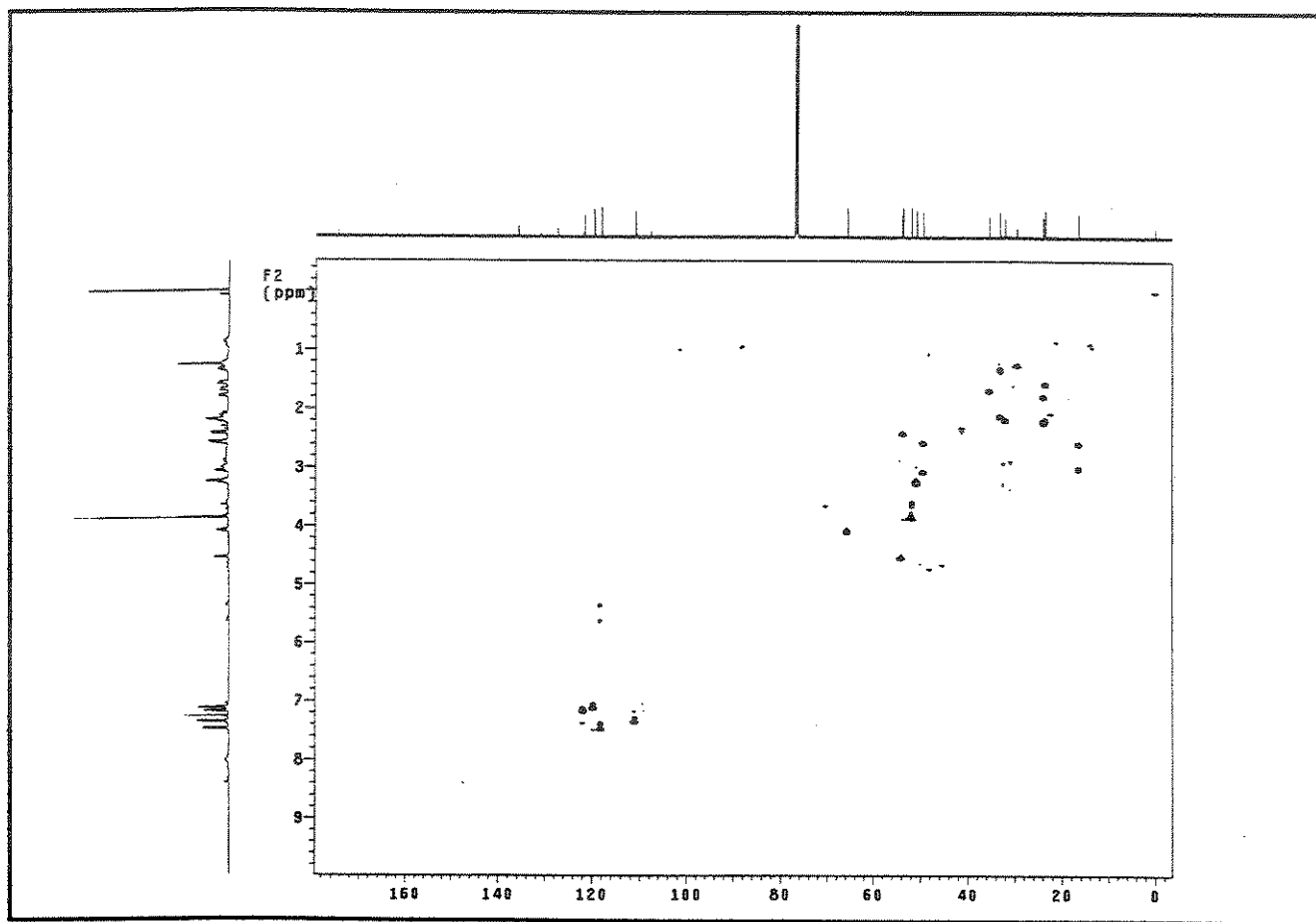
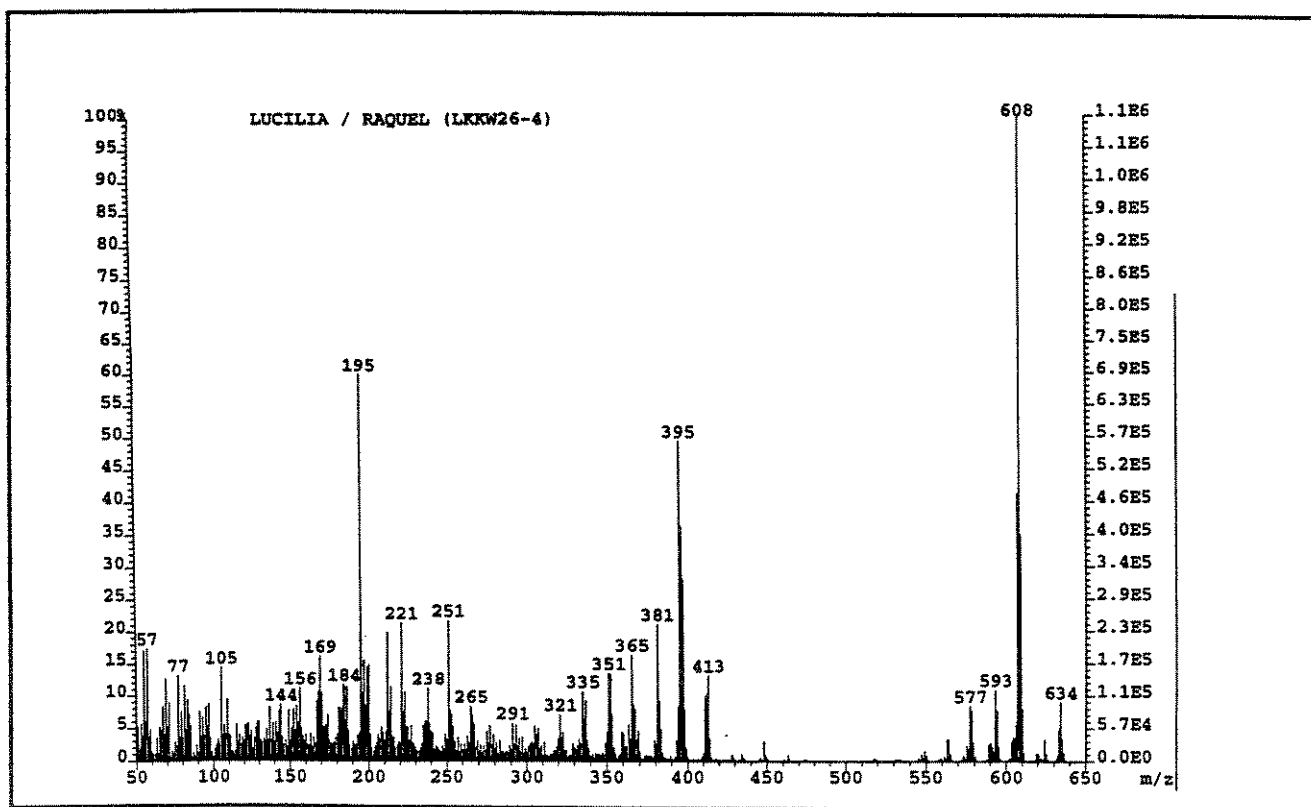
E 95: Espectro de RMN ¹³C de 3-α-epi-yohimbina (**16**) (CDCl₃/TMS; 125 MHz)

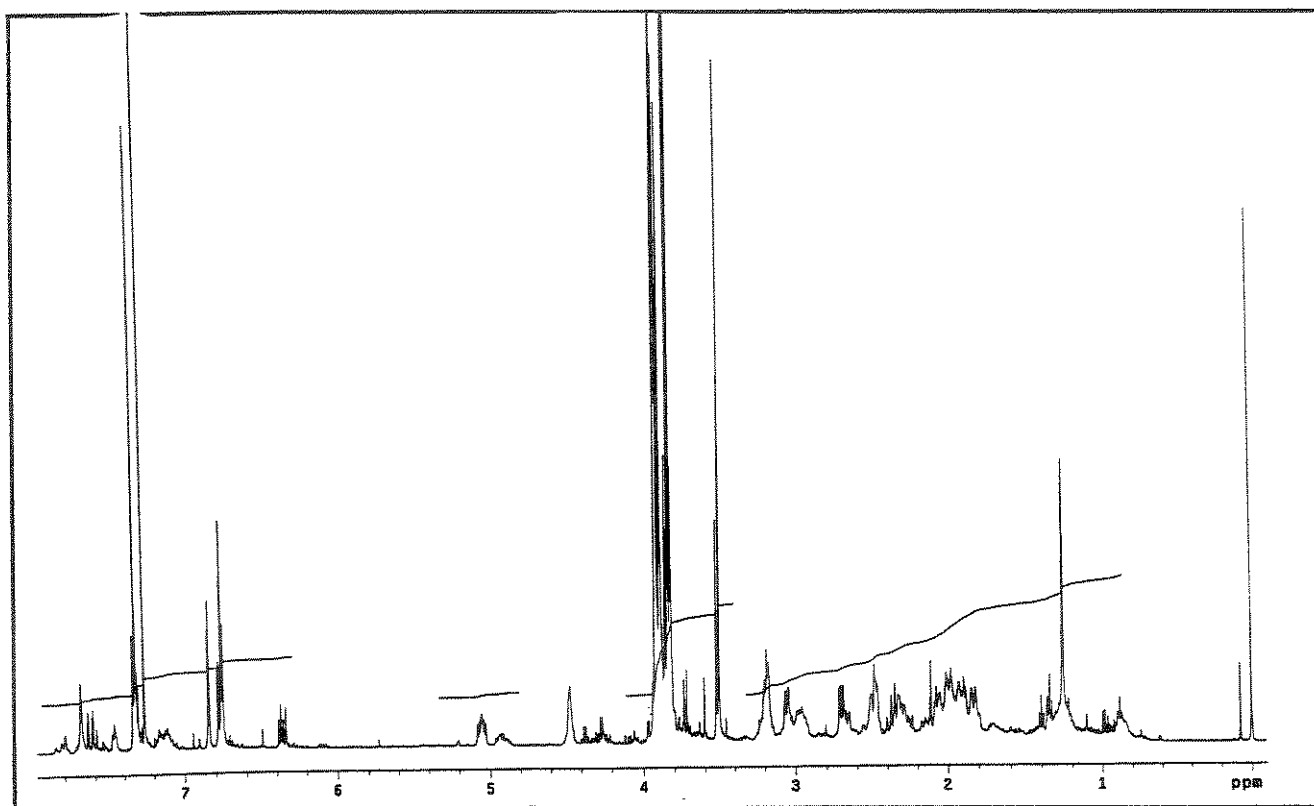


E 96: Experimento de DEPT para 3- α -epi-yohimbina (**16**) (CDCl_3/TMS ; 125 MHz)

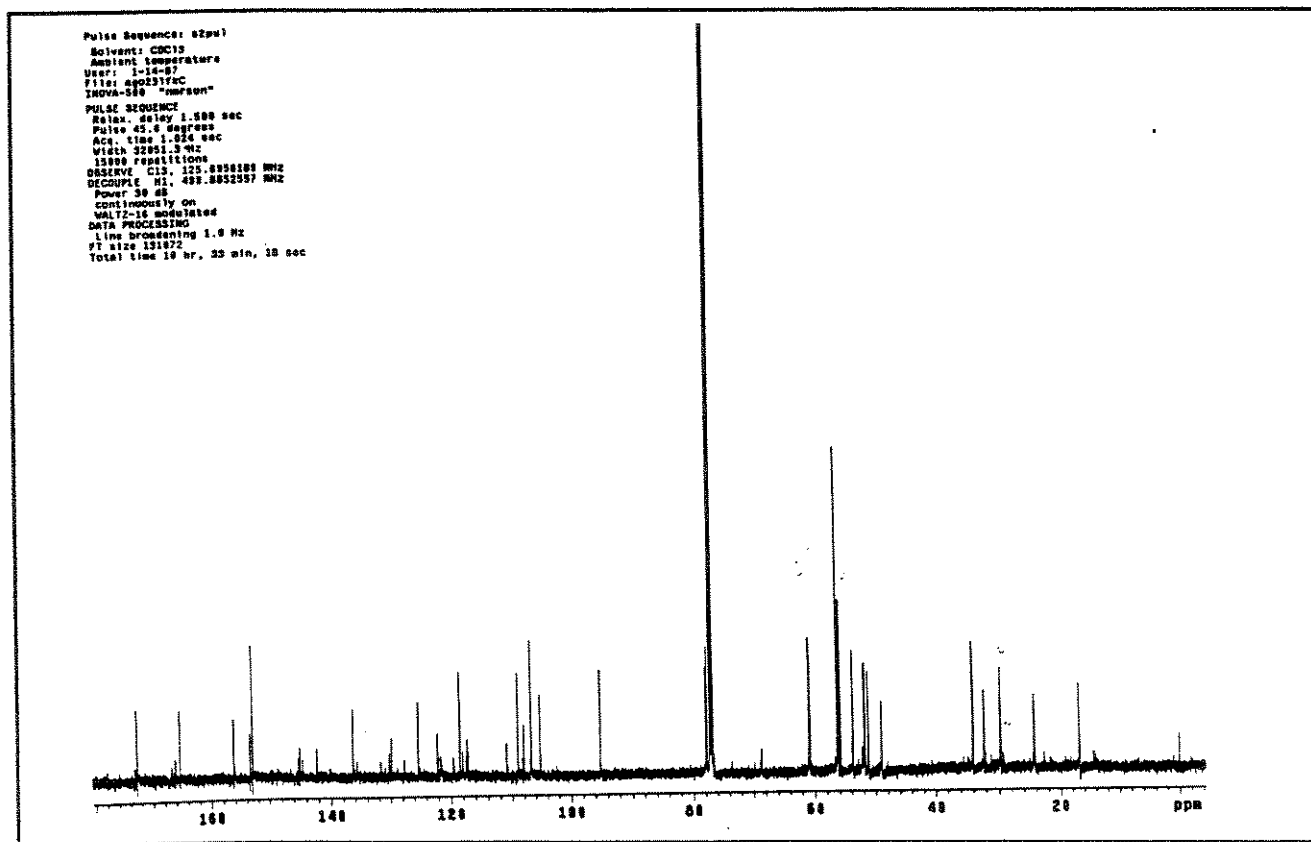


E 97: Experimento COSY para 3- α -epi-yohimbina (**16**)

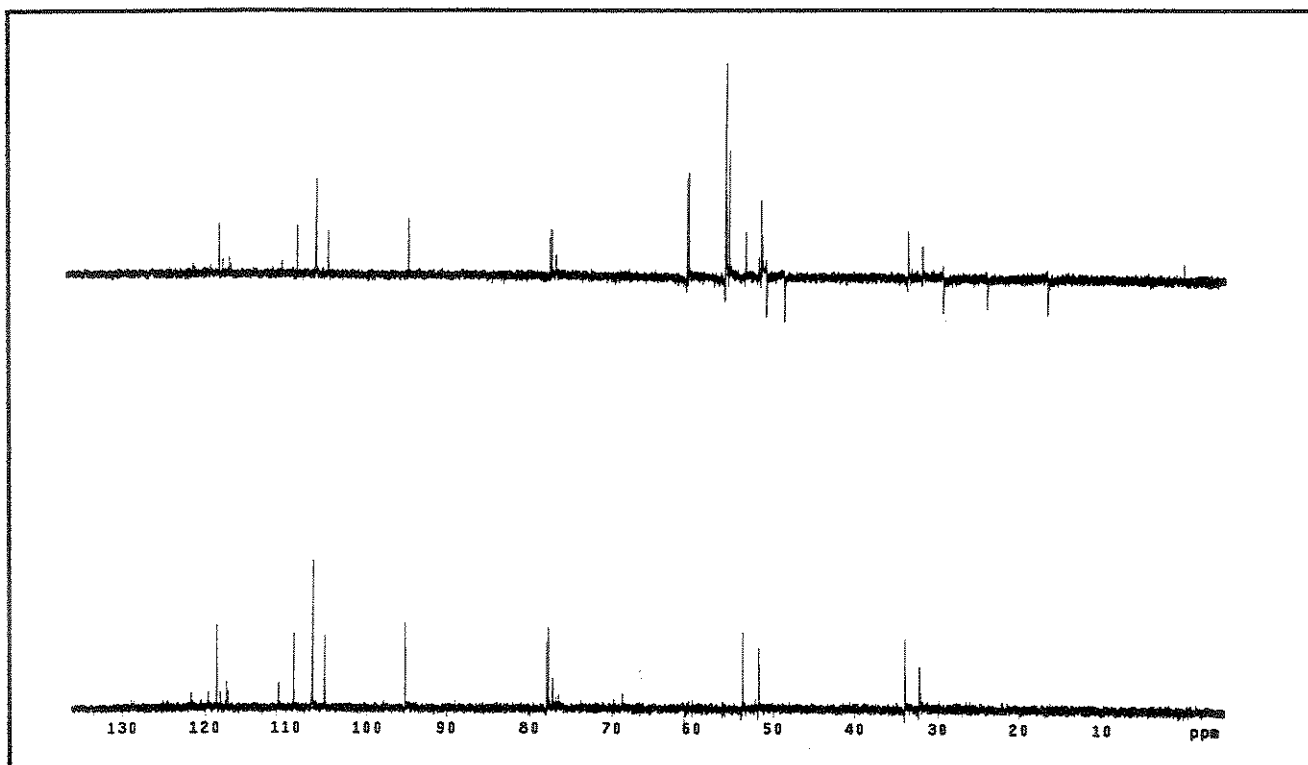
**E 98:** Experimento HSQC para 3- α -epi-yohimbina (**16**)**E 99:** Espectro de Massas (70 eV) para reserpina (**17**)



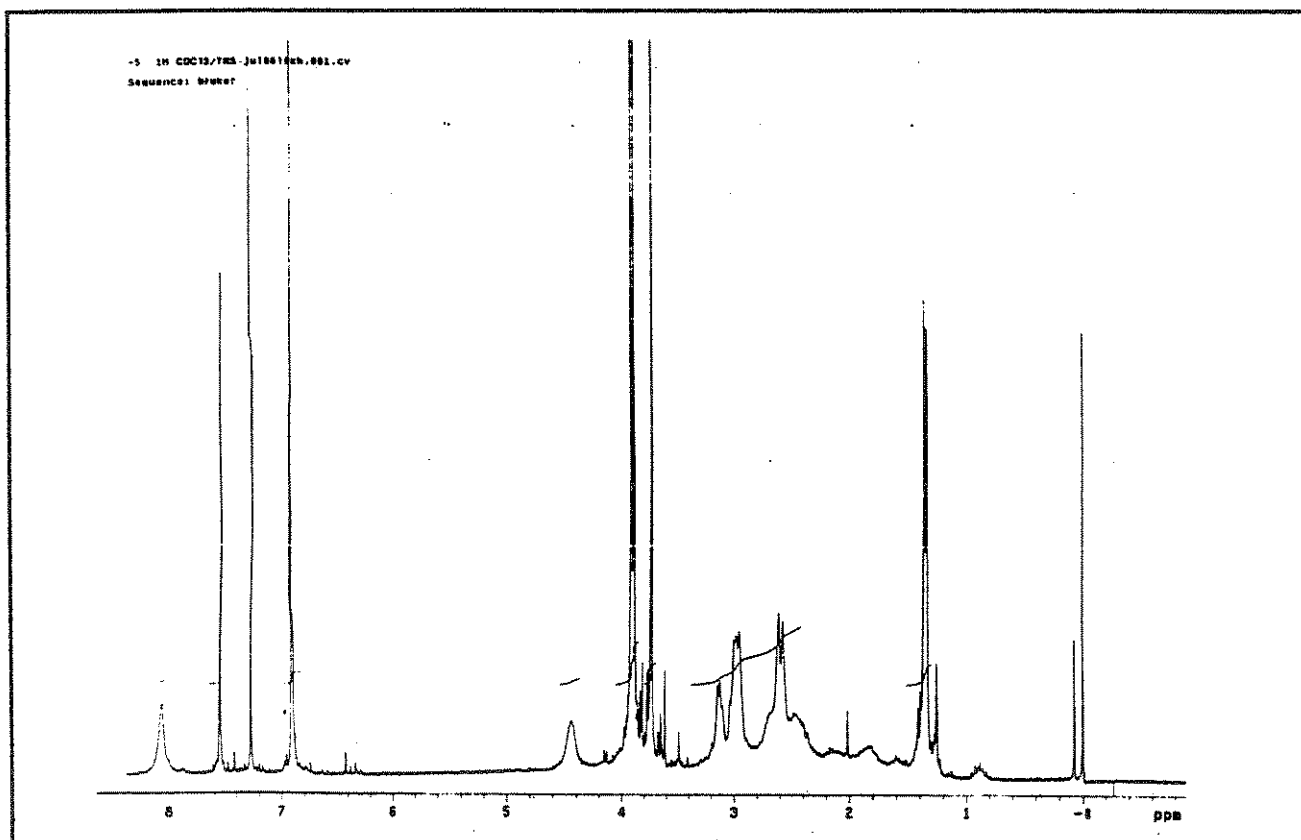
E 100 Espectro de RMN ^1H de reserpina (**17**) (CDCl_3/TMS ; 500MHz)



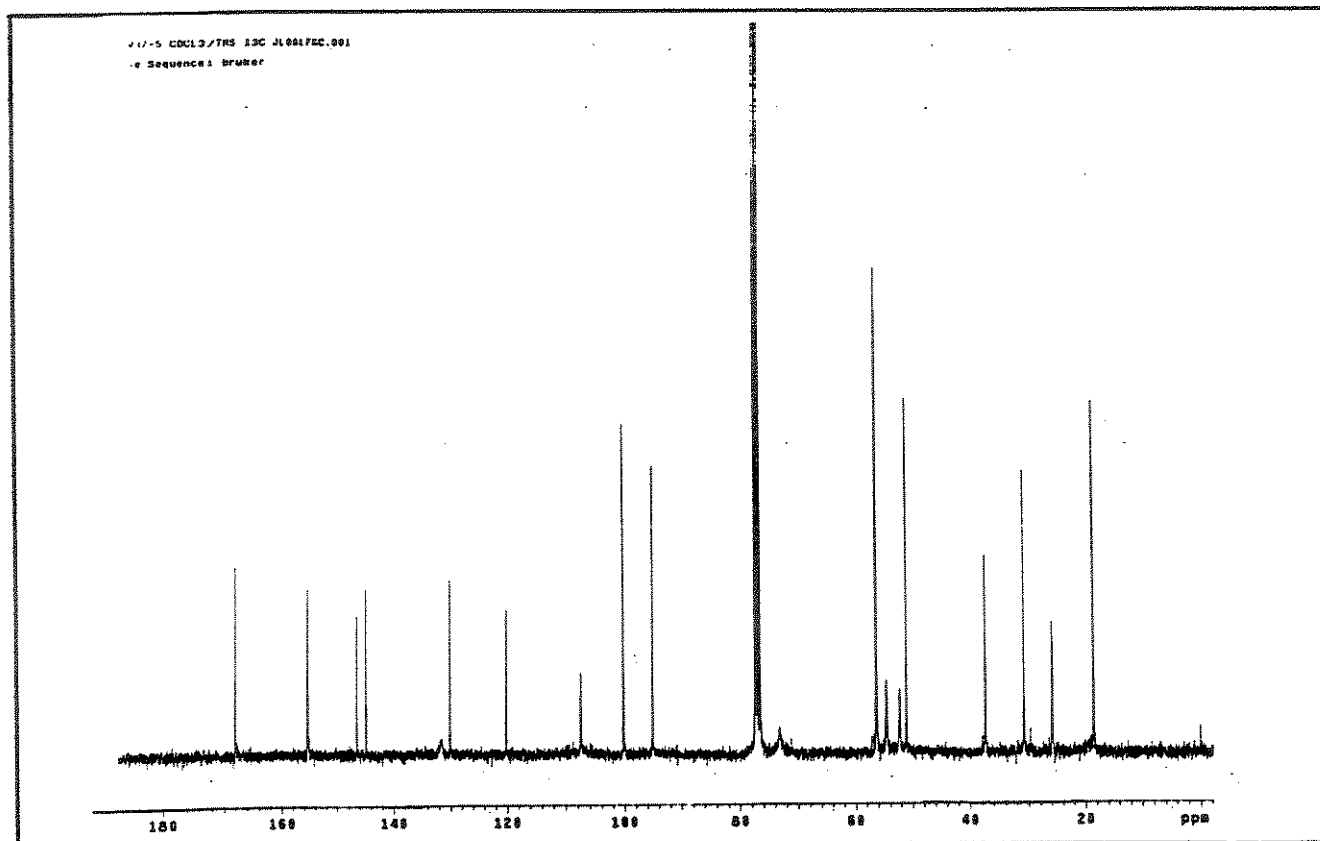
E 101: Espectro de RMN ^{13}C de reserpina (**17**) (CDCl_3/TMS ; 125 MHz)



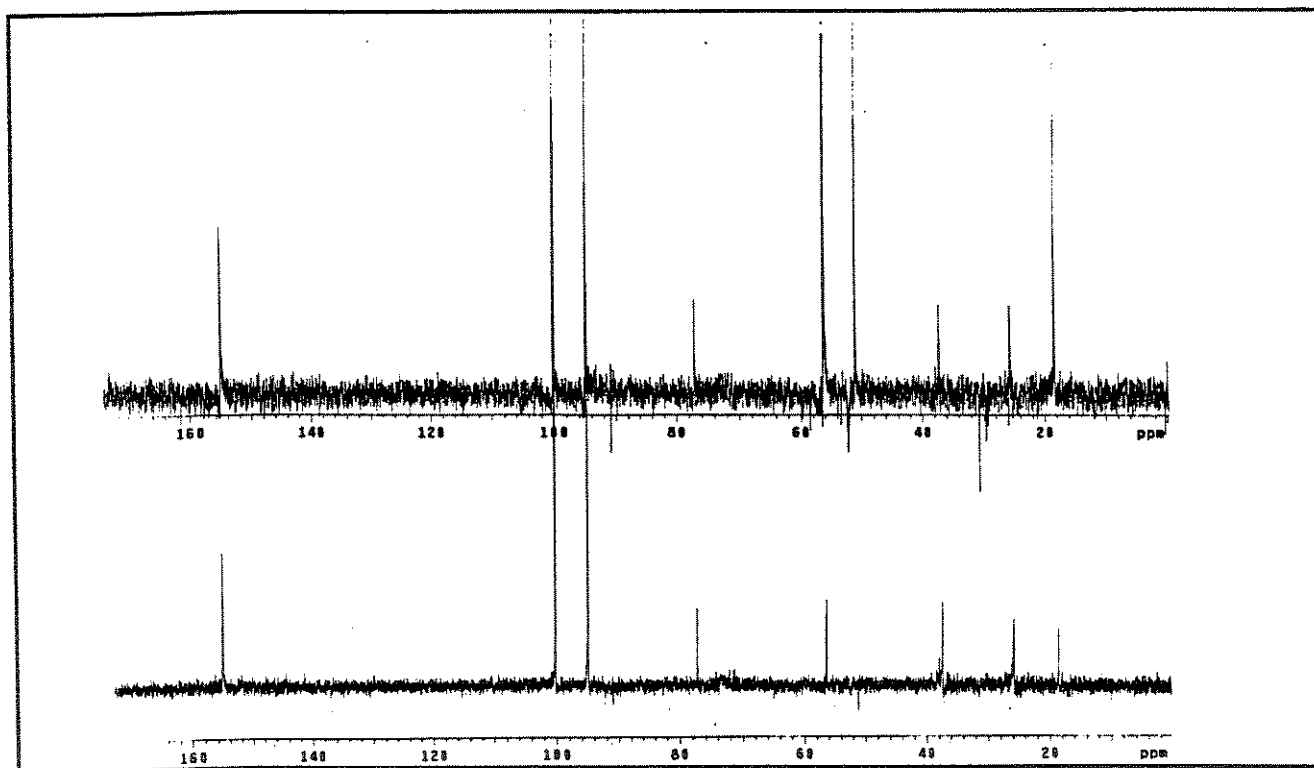
E 102: Experimento de DEPT para reserpina (**17**) (CDCl_3/TMS ; 125 MHz)



E 103 Espectro de RMN ^1H de reserpilina (**18**) (CDCl_3/TMS ; 300MHz)



E 104: Espectro de RMN ^{13}C de reserpilina (**18**) (CDCl_3/TMS ; 75 MHz)



E 105: Experimento de DEPT para reserpilina (**18**) (CDCl_3/TMS ; 75 MHz)