

CONSTITUINTES QUIMICOS DE *Tabernaemontana catharinensis*
(APOCYNACEAE)

MILENA DOS SANTOS GONÇALVES

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
FEVEREIRO - 2011

CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *Tabernaemontana catharinensis*
(APOCYNACEAE)

MILENA DOS SANTOS GONÇALVES

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Ivo José Curcino Vieira

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
FEVEREIRO – 2011

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCTA / UENF 022/2011

Gonçalves, Milena dos Santos

Constituintes químicos de *Tabernaemontana catharinensis* (APOCYNACEAE) / Milena dos Santos Gonçalves. – 2011.
246 f.

Orientador: Ivo Jose Curcino Vieira

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2011.

Bibliografia: f. 237 – 246.

1. *Tabernaemontana catharinensis* 2. Alcalóides indólicos monoterpênicos 3. Apocynaceae I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD – 583.93

CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *Tabernaemontana catharinensis*
(APOCYNACEAE)

MILENA DOS SANTOS GONÇALVES

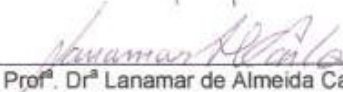
Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Aprovada em 14 de Fevereiro de 2011

Comissão Examinadora:



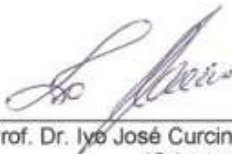
Prof.ª Dr.ª Maria Raquel Garcia Vega – U.E.N.F.



Prof.ª Dr.ª Lanamar de Almeida Carlos – U.F.S.J.



Prof.ª Dr.ª Daniela Barros de Oliveira – U.E.N.F.



Prof. Dr. Ivo José Curcino Vieira – U.E.N.F.
(Orientador)

Aos meus pais, **Paulo e Maria Helena**, e às minhas irmãs, **Paula e Pauline**, um agradecimento especial: por tudo que vocês representam na minha vida, pelo apoio e incentivo constantes para a realização dos meus sonhos. Pela orientação e ensinamentos de vida, que têm sido essenciais para guiar-me ao longo dessa caminhada.

Dedico também a **Ivo**, mais do que um companheiro de horas de estudo, acompanhou criticamente todos os passos do trabalho. Seu exemplo de caráter, de conduta, de transparência, assim como toda a sabedoria transmitida de um verdadeiro Mestre foi essencial durante toda a orientação deste trabalho.

A todos vocês, só tenho a dizer **MUITO OBRIGADA!**

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas oportunidades de crescimento cedidas a cada dia, por seres o colo que me consola nos momentos mais difíceis e por seres o meu apoio para chegar até aqui;

À minha família que sempre foi o meu apoio emocional, em especial a minha avó, Arlete;

Ao Prof. Dr. Raimundo Braz Filho pelas contribuições na realização deste trabalho;

Aos colegas do laboratório de Ciências Químicas (Química de Produtos Naturais) – U.E.N.F.: Lara, Heloísa, Jéssica, Jú, Virginia, Elaine, Marina, Wagner, Marcelo e Vinicius pelos ensinamentos transmitidos e pelo convívio harmonioso;

Aos professores do programa de pós-graduação do CCT e CCTA - U.E.N.F - pelos ensinamentos das disciplinas ministradas que em muito contribuíram para minha formação acadêmica;

A UENF/FAPERJ pela oportunidade de bolsa de estudo concedida para realização deste trabalho;

Aos professores Danilo Oliveira, Gilda Leitão, Suzana Leitão e Newton Castro da U.F.R.J. pela realização do teste de inibição da enzima acetilcolinesterase;

Às professoras Raquel Garcia, Daniela Barros e Lanamar Carlos pela indispensável contribuição para a finalização deste trabalho;

Ao Departamento de Química da U.F.R.R.J. pela realização nas análises de ressonância magnética nuclear e de massas;

A todos aqueles, com certeza devo estar me esquecendo de alguém, que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

Lista de Figuras	viii
Lista de Esquemas	xvi
Lista de Tabelas	xviii
Lista de Abreviaturas e Símbolos	xx
Resumo	xxii
Abstract	xxiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	5
3. REVISÃO DE LITERATURA	7
3.1 A Família Apocynaceae	7
3.2 O Gênero <i>Tabernaemontana</i>	9
3.2.1 Alcalóides	10
3.2.1.1 Considerações Biossintéticas dos Alcalóides	11
3.3 A espécie <i>Tabernaemontana catharinensis</i>	15

3.4 Atividade Antiacetilcolinesterásica (Doença de Alzheimer)	17
3.5 Substâncias Isoladas da espécie <i>T. catharinensis</i>	23
4. MATERIAL E MOTODOLOGIA	28
4.1 Material	28
4.1.1 Equipamentos	28
4.1.2 Solventes e Reagentes	29
4.2 Metodologia	30
4.2.1 Coleta da espécie vegetal e classificação botânica	30
4.2.2 Secagem e moagem	30
4.2.3 Preparo dos extratos	30
4.2.4 Descrição experimental do isolamento dos constituintes químicos das cascas das raízes da espécie <i>Tabernaemontana catharinensis</i>	31
4.2.4.1 Análise do extrato em metanol (63,2587g)	31
4.2.4.1.1 Análise cromatográfica da Fração MCR-4 (2,7097g)	32
4.2.4.1.2 Análise cromatográfica da Fração MCR4-3 (0,4601g)	33
4.2.4.1.3 Análise cromatográfica da Fração MCR4-4 (0,2054g)	33
4.2.4.1.4 Análise cromatográfica da Fração MCR11 (8,5236g)	34
4.2.5 Descrição experimental do isolamento dos constituintes químicos das sementes da espécie <i>Tabernaemontana catharinensis</i> .	34
4.2.5.1 Análise cromatográfica do extrato em hexano (12,3584g)	34
4.2.5.1.1 Análise cromatográfica da fração H3 (1,4775g)	35
4.2.5.2 Análise do extrato das sementes em diclorometano referente à fase orgânica da partição com diclorometano (0,930g)	35
4.2.5.2.1 - Análise cromatográfica da Fração S2 (0,3004g)	36
4.2.5.3 Análise do extrato das sementes em diclorometano referente ao precipitado da extração ácido-base (3,6582g)	36
4.2.6 Descrição experimental do isolamento dos constituintes químicos das folhas da espécie <i>Tabernaemontana catharinensis</i>	37

4.2.6.1 Análise do extrato em diclorometano referente à fase orgânica da partição em diclorometano (2,9612g)	37
4.2.6.1.1 Análise cromatográfica da Fração ABF2 (0,2565g)	38
4.2.6.1.2 Análise cromatográfica da Fração ABF3 (0,4715g)	38
4.2.7 Preparo das amostras para o teste biológico de inibição da enzima acetilcolinesterase (método quantitativo de Ellman modificado)	38
4.2.7.1 Preparo das amostras na microplaca de 96 poços e leitura da absorbância	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1 Substâncias Isoladas.	40
5.2 Determinação Estrutural das Substâncias Isoladas	43
5.2.1. Alcalóides Indólicos Monoterpênicos	43
5.2.1.1 Substância 1	44
5.2.1.2 Substância 2	69
5.2.1.3 Substâncias 3 e 4	89
5.2.1.4 Substância 5	119
5.2.1.5 Substância 6	145
5.2.1.6 Substâncias 7, 8 e 9	164
5.2.1.7 Substância 10	197
5.2.1.8 Substâncias 11, 12 e 13	205
5.2.1.9 Substâncias 14, 15, 16, 17, 18 e 19	217
5.3 Teste biológico de inibição de enzima acetilcolinesterase	233
6. CONCLUSÃO	235
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	237

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de formação do alcalóide Estrictosidina	12
Figura 2: Rearranjos da cadeia terpenoídica da estrictosidina	13
Figura 3: Esqueletos básicos dos alcalóides indólicos monoterpênicos	14
Figura 4: Fotografia da espécie <i>Tabernaemontana catharinensis</i>	15
Figura 5: Fotografia das flores de <i>Tabernaemontana catharinensis</i>	16
Figura 6: Fotografia dos frutos de <i>Tabernaemontana catharinensis</i>	16
Figura 7: Alcalóides indólicos monoterpênicos isolados de <i>T. catharinensis</i>	24
Figura 8: Triterpenos isolados de <i>T. catharinensis</i>	26
Figura 9: Esteróides isolados de <i>T. catharinensis</i>	27
Figura 10: Espectro na região do infravermelho do alcalóide 1 .	51
Figura 11: Espectro na região do ultravioleta do alcalóide 1 .	52
Figura 12: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, em CDCl_3) do alcalóide 1 .	53
Figura 13: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da expansão entre δ_{H} 5,0 a 9,0 do alcalóide 1 .	54

Figura 14: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da expansão entre δ_{H} 7,0 a 8,0 do alcalóide 1 .	55
Figura 15: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da expansão entre δ_{H} 2,5 a 4,0 do alcalóide 1	56
Figura 16: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da expansão entre δ_{H} 0,5 a 2,0 do alcalóide 1	57
Figura 17: Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) do alcalóide 1	58
Figura 18: Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) da expansão entre δ_{C} 10,0 a 135,0 do alcalóide 1 .	59
Figura 19: Mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY (400 MHz, CDCl_3) do alcalóide 1	60
Figura 20: Ampliação (região 0,0 a 4,0 ppm) do Mapa de Correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY do alcalóide 1 .	61
Figura 21: Ampliação (região 5,5 a 8,5 ppm) do Mapa de Correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY do alcalóide 1	62
Figura 22: Mapa de Correlação heteronuclear HSQC do alcalóide 1 .	63
Figura 23: Ampliação (região 10,0 a 70,0 ppm) do Mapa de Correlação heteronuclear HSQC do alcalóide 1 .	64
Figura 24: Mapa de Correlação heteronuclear HMBC do alcalóide 1	65
Figura 25: Ampliação (região 10,0 a 60,0 ppm) do Mapa de Correlação heteronuclear HMBC do alcalóide 1	66
Figura 26: Ampliação (região 100,0 a 180,0 ppm) do Mapa de Correlação heteronuclear HMBC do alcalóide 1	67
Figura 27: Espectro de massas do alcalóide 1 .	68
Figura 28: Espectro na região do infravermelho do alcalóide 2 .	75
Figura 29: Espectro na região do ultravioleta do alcalóide 2	76
Figura 30: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do alcalóide 2 .	77
Figura 31: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da expansão entre δ_{H} 1,1 a 4,4 do alcalóide 2 .	78
Figura 32: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da expansão entre δ_{H} 4,6 a 7,6 do alcalóide 2 .	79
Figura 33: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do alcalóide 2	80

Figura 34: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da expansão entre δ_{C} 47,0 a 66,0 do alcalóide 2	81
Figura 35: Mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY (400 MHz, CDCl_3) do alcalóide 2	82
Figura 36: Mapa de correlação heteronuclear HMQC do alcalóide 2 .	83
Figura 37: Ampliação (região 1,0 a 6,0 ppm) do Mapa de Correlação heteronuclear HMQC do alcalóide 2 .	84
Figura 38: Ampliação (região 3,0 a 7,0 ppm) do Mapa de Correlação heteronuclear HMQC do alcalóide 2 .	85
Figura 39: Mapa de correlação heteronuclear HMBC do alcalóide 2	86
Figura 40: Ampliação (região 2,0 a 5,0 ppm) do Mapa de Correlação heteronuclear HMBC do alcalóide 2 .	87
Figura 41: Ampliação (região 2,0 a 7,0 ppm) do Mapa de Correlação heteronuclear HMBC do alcalóide 2 .	88
Figura 42: Espectro na região do infravermelho da mistura dos alcalóides 3 e 4 .	99
Figura 43: Espectro na região do ultravioleta da misturas dos alcalóides 3 e 4 .	100
Figura 44: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da mistura dos alcalóides 3 e 4 .	101
Figura 45: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) com expansão entre δ_{H} 1,4 a 2,2 da mistura dos alcalóides 3 e 4 .	102
Figura 46: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) com expansão entre δ_{H} 2,5 a 3,5 da mistura dos alcalóides 3 e 4 .	103
Figura 47: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) com expansão entre δ_{H} 3,7 a 4,2 da mistura dos alcalóides 3 e 4	104
Figura 48: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) com expansão entre δ_{H} 6,7 a 7,8 da mistura dos alcalóides 3 e 4 .	105
Figura 49: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da mistura dos alcalóides 3 e 4 .	106
Figura 50: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) com expansão entre δ_{C} 51,0 a 71,0 da mistura dos alcalóides 3 e 4 .	107
Figura 51: Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) da mistura dos	108

alcalóides **3** e **4**.

Figura 52: Mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY (400 MHz, CDCl_3) da mistura dos alcalóides **3** e **4**. 109

Figura 53: Ampliação (região 6,0 a 8,0 ppm) do Mapa de Correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY da mistura dos alcalóides **3** e **4**. 110

Figura 54: Ampliação (região 1,0 a 4,5 ppm) do Mapa de Correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY da mistura dos alcalóides **3** e **4**. 111

Figura 55: Mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H -NOESY (400 MHz, CDCl_3) da mistura dos alcalóides **3** e **4**. 112

Figura 56: Mapa de correlação heteronuclear HSQC (400 MHz, CDCl_3) da mistura dos alcalóides **3** e **4**. 113

Figura 57: Ampliação (região 1,0 a 4,0 ppm) do Mapa de Correlação heteronuclear HSQC da mistura dos alcalóides **3** e **4**. 114

Figura 58: Ampliação (região 5,5 a 7,5 ppm) do Mapa de Correlação heteronuclear HSQC da mistura dos alcalóides **3** e **4**. 115

Figura 59: Mapa de correlação heteronuclear HMBC (400 MHz, CDCl_3) da mistura dos alcalóides **3** e **4**. 116

Figura 60: Ampliação (região 0,0 a 4,0 ppm) do Mapa de Correlação heteronuclear HMBC da mistura dos alcalóides **3** e **4**. 117

Figura 61: Espectro de massas da mistura de alcalóides **3** e **4**. 118

Figura 62: Espectro na região do infravermelho do alcalóide **5**. 126

Figura 63: Espectro na região do ultravioleta do alcalóide **5**. 127

Figura 64: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do alcalóide **5**. 128

Figura 65: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) com expansão entre δ_{H} 0,8 e 1,7 do alcalóide **5**. 129

Figura 66: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) com expansão entre δ_{H} 2,6 e 3,3 do alcalóide **5**. 130

Figura 67: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) com expansão entre δ_{H} 3,5 e 3,9 do alcalóide **5**. 131

Figura 68: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) com expansão entre δ_{H} 4,2 e 5,4 do alcalóide **5**. 132

Figura 69: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) com expansão entre δ_{H} 7,1 e 7,8 do alcalóide **5**. 133

Figura 70: Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) do alcalóide 5 .	134
Figura 71: Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) com expansão entre δ_{C} 105,0 e 180,0 do alcalóide 5 .	135
Figura 72: Espectro de RMN ^{13}C -APT (400 MHz, CDCl_3) do alcalóide 5 .	136
Figura 73: Mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY (400 MHz, CDCl_3) do alcalóide 5 .	137
Figura 74: Ampliação (região 0,0 a 6,0 ppm) do Mapa de Correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY do alcalóide 5 .	138
Figura 75: Mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H -NOESY (400 MHz, CDCl_3) do alcalóide 5 .	139
Figura 76: Mapa de correlação heteronuclear HSQC (400 MHz, CDCl_3) do alcalóide 5 .	140
Figura 77: Ampliação (região 1,0 a 5,0 ppm) do Mapa de Correlação heteronuclear HSQC do alcalóide 5 .	141
Figura 78: Ampliação (região 5,0 a 8,0 ppm) do Mapa de Correlação heteronuclear HSQC do alcalóide 5 .	142
Figura 79: Mapa de correlação heteronuclear HMBC (400 MHz, CDCl_3) do alcalóide 5 .	143
Figura 80: Espectro de massas do alcalóide 5 .	144
Figura 81: Espectro na região do infravermelho do alcalóide 6 .	150
Figura 82: Espectro na região do ultravioleta do alcalóide 6 .	151
Figura 83: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do alcalóide 6 .	152
Figura 84: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) com expansão entre δ_{H} 0,8 e 2,1 do alcalóide 6 .	153
Figura 85: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) com expansão entre δ_{H} 2,4 e 4,2 do alcalóide 6 .	154
Figura 86: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) com expansão entre δ_{H} 6,8 e 7,3 do alcalóide 6 .	155
Figura 87: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) com expansão entre δ_{H} 7,4 e 7,7 do alcalóide 6 .	156
Figura 88: Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) do alcalóide 6 .	157

Figura 89: Mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY (400 MHz, CDCl_3) do alcalóide 6 .	158
Figura 90: Ampliação (região 0,0 a 6,0 ppm) do Mapa de Correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY do alcalóide 6 .	159
Figura 91: Mapa de correlação heteronuclear HMQC (400 MHz, CDCl_3) do alcalóide 6 .	160
Figura 92: Mapa de correlação heteronuclear HMBC (400 MHz, CDCl_3) do alcalóide 6 .	161
Figura 93: Ampliação (região 1,0 a 4,0 ppm) do Mapa de Correlação heteronuclear HMBC do alcalóide 6 .	162
Figura 94: Ampliação (região 1,0 a 8,0 ppm) do Mapa de Correlação heteronuclear HMBC do alcalóide 6 .	163
Figura 95: CG/EM da mistura dos alcalóides 7 e 8 .	171
Figura 96: Espectro de massas da lignana siringaresinol (9) presente em 0,66% na mistura contendo os dois alcalóides 7 e 8 .	174
Figura 97: Espectro na região do infravermelho da mistura dos alcalóides 7 e 8 e da lignana 9 .	175
Figura 98: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da mistura dos alcalóides 7 e 8 e da lignana 9 .	176
Figura 99: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da expansão entre δ_{H} 0,6 a 2,0 da mistura dos alcalóides 7 e 8 e da lignana 9 .	177
Figura 100: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da expansão entre δ_{H} 2,5 a 3,9 da mistura dos alcalóides 7 e 8 e da lignana 9 .	178
Figura 101: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da expansão entre δ_{H} 4,4 a 7,3 da mistura dos alcalóides 7 e 8 e da lignana 9 .	179
Figura 102: Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) da mistura dos alcalóides 7 e 8 e da lignana 9 .	180
Figura 103: Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) com expansão entre δ_{C} 0,0 e 150,0 da mistura dos alcalóides 7 e 8 e da lignana 9 .	181
Figura 104: Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) com expansão entre δ_{C} 109,0 e 180,0 da mistura dos alcalóides 7 e 8 e da lignana 9 .	182
Figura 105: Espectro de RMN ^{13}C -APT (400 MHz, CDCl_3) da mistura dos alcalóides 7 e 8 e da lignana 9 .	183
Figura 106: Espectro de RMN ^{13}C -APT (400 MHz, CDCl_3) com expansão	184

entre δ_C 10,0 e 55,0 da mistura dos alcalóides **7** e **8** e da lignana **9**.

Figura 107: Espectro de RMN ^{13}C -APT (400 MHz, CDCl_3) com expansão entre δ_C 10,0 e 72,0 da mistura dos alcalóides **7** e **8** e da lignana **9**. 185

Figura 108: Espectro de RMN ^{13}C -APT (400 MHz, CDCl_3) com expansão entre δ_C 85,0 e 125,0 da mistura dos alcalóides **7** e **8** e da lignana **9**. 186

Figura 109: Espectro de RMN ^{13}C -APT (400 MHz, CDCl_3) com expansão entre δ_C 70,0 e 147,0 da mistura dos alcalóides **7** e **8** e da lignana **9**. 187

Figura 110: Mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY (400 MHz, CDCl_3) da mistura dos alcalóides **7** e **8** e da lignana **9**. 188

Figura 111: Ampliação (região 0,0 a 5,0 ppm) do Mapa de Correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY da mistura dos alcalóides **7** e **8** e da lignana **9**. 189

Figura 112: Ampliação (região 6,2 a 8,6 ppm) do Mapa de Correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY da mistura dos alcalóides **7** e **8** e da lignana **9**. 190

Figura 113: Mapa de correlação heteronuclear HSQC (400 MHz, CDCl_3) da mistura dos alcalóides **7** e **8** e da lignana **9**. 191

Figura 114: Mapa de correlação heteronuclear HMBC (400 MHz, CDCl_3) da mistura dos alcalóides **7** e **8** e da lignana **9**. 192

Figura 115: Ampliação (região 0,0 a 2,8 ppm) do Mapa de Correlação heteronuclear HMBC da mistura dos alcalóides **7** e **8** e da lignana **9**. 193

Figura 116: Ampliação (região 0,0 a 4,0 ppm) do Mapa de Correlação heteronuclear HMBC da mistura dos alcalóides **7** e **8** e da lignana **9**. 194

Figura 117: Ampliação (região 2,0 a 5,0 ppm) do Mapa de Correlação heteronuclear HMBC da mistura dos alcalóides **7** e **8** e da lignana **9**. 195

Figura 118: Ampliação (região 5,4 a 7,9 ppm) do Mapa de Correlação heteronuclear HMBC da mistura dos alcalóides **7** e **8** e da lignana **9**. 196

Figura 119: Espectro na região do infravermelho do fenilpropanóide **10**. 200

Figura 120: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do fenilpropanóide **10**. 201

Figura 121: Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) do fenilpropanóide **10**. 202

Figura 122: Espectro de RMN ^{13}C -APT (400 MHz, CDCl_3) do fenilpropanóide **10**. 203

Figura 123: Espectro de massas do fenilpropanóide 10 .	204
Figura 124: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da mistura dos triterpenos 11 , 12 e 13 .	211
Figura 125: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da expansão entre δ_{H} 3,0 a 3,4 da mistura dos triterpenos 11 , 12 e 13 .	212
Figura 126: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da expansão entre δ_{H} 5,0 a 5,3 da mistura dos triterpenos 11 , 12 e 13 .	213
Figura 127: Espectro de RMN ^{13}C -APT (400 MHz, CDCl_3) da mistura dos triterpenos 11 , 12 e 13 .	214
Figura 128: Espectro de RMN ^{13}C -APT (400 MHz, CDCl_3) da expansão entre δ_{C} 12,0 a 36,3 da mistura dos triterpenos 11 , 12 e 13 .	215
Figura 129: Espectro de RMN ^{13}C -APT (400 MHz, CDCl_3) da expansão entre δ_{C} 36,3 a 60,0 da mistura dos triterpenos 11 , 12 e 13 .	216
Figura 130: Cromatograma da mistura de esteróides 14 , 15 e 16 .	220
Figura 131: Cromatograma da mistura de esteróides 17 , 18 e 18 .	222
Figura 132: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da mistura dos esteróides 14 , 15 e 16 .	226
Figura 133: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da expansão entre δ_{H} 2,0 a 3,6 da mistura dos esteróides 14 , 15 e 16 .	227
Figura 134: Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) da mistura dos esteróides 14 , 15 e 16 .	228
Figura 135: Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) da expansão entre δ_{C} 0,0 a 60,0 da mistura dos esteróides 14 , 15 e 16 .	229
Figura 136: Espectro de RMN ^{13}C -APT (400 MHz, CDCl_3) da mistura dos esteróides 14 , 15 e 16 .	230
Figura 137: Espectro de RMN ^{13}C -APT (400 MHz, CDCl_3) da expansão entre δ_{C} 10,0 a 80,0 da mistura dos esteróides 14 , 15 e 16 .	231
Figura 138: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da mistura dos esteróides 17 , 18 e 19 .	232
Figura 139: Curva de inibição da acetilcolinesterase pela amostra 2 .	234

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Seqüência de reações para detecção de atividade acetilcolinesterásica de substâncias naturais pelo método de Ellman.	22
Esquema 2: Representação do preparo da microplaca.	39
Esquema 3: Interpretação mecanística dos principais fragmentos no espectro de massas do alcalóide 1 .	50
Esquema 4: Interpretação mecanística dos principais fragmentos no espectro de massas da mistura contendo os alcalóides 3 e 4 .	98
Esquema 5: Interpretação mecanística dos principais fragmentos no espectro de massas do alcalóide 5 .	125
Esquema 6: Interpretação mecanística dos principais fragmentos no espectro de massas da mistura contendo os alcalóides 7 e 8 .	172
Esquema 7: Interpretação mecanística dos principais fragmentos no espectro de massas da lignana siringaresinol (9).	174
Esquema 8: Interpretação mecanística dos principais fragmentos no espectro de massas da α -amirina (11); Tempo de retenção 27,0 (34,23%).	209
Esquema 9: Interpretação mecanística dos principais fragmentos no espectro de massas da β -amirina (12); Tempo de retenção 25,6 (19,24 %).	209

Esquema 10: Interpretação mecanística dos principais fragmentos no espectro de massas do lupeol (13); Tempo de retenção 29,1 (7,89 %).	210
Esquema 11: Interpretação mecanística dos principais fragmentos no espectro de massas da β -sitosterol (14); Tempo de retenção 31,7 (37,66 %).	220
Esquema 12: Interpretação mecanística dos principais fragmentos no espectro de massas do campesterol (15); Tempo de retenção 29,5 (29,37%).	221
Esquema 13: Interpretação mecanística dos principais fragmentos no espectro de massas do stigmasterol (16); Tempo de retenção 30,1 (30,55%).	221
Esquema 14: Interpretação mecanística dos principais fragmentos no espectro de massas da sitostenona (17); Tempo de retenção 28,6 (30,88 %).	223
Esquema 15: Interpretação mecanística dos principais fragmentos no espectro de massas do campestenona (18); Tempo de retenção 26,1 (26,63%).	224
Esquema 16: Interpretação mecanística dos principais fragmentos no espectro de massas do stigmastenona (19); Tempo de retenção 26,7 (16,82%).	225

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estudo cromatográfico da fração MCR.	32
Tabela 2: Estudo cromatográfico da fração MCR-4.	33
Tabela 3: Estudo cromatográfico da fração MCR4-3.	33
Tabela 4: Estudo cromatográfico da fração MCR11.	34
Tabela 5: Estudo cromatográfico da fração H.	35
Tabela 6: Estudo cromatográfico da fração H3.	35
Tabela 7: Estudo cromatográfico da fração S.	36
Tabela 8: Estudo cromatográfico da fração S2.	36
Tabela 9: Estudo cromatográfico da fração SPD.	37
Tabela 10: Estudo cromatográfico da fração ABF.	37
Tabela 11. Dados espectrais de RMN ^1H (400 MHz) e RMN ^{13}C (100 MHz) do alcalóide 1 , incluindo os resultados dos experimentos bidimensionais HSQC e HMBC, em CDCl_3 . Os valores dos deslocamentos químicos δ_{H} e δ_{C} estão em ppm e as constantes de acoplamento J estão em Hz.	49
Tabela 12: Dados espectrais de RMN ^1H (400 MHz) e RMN ^{13}C (100	73

MHz) do alcalóide **2**, incluindo os resultados dos experimentos bidimensionais HSQC e HMBC, em comparação com dados de literatura para a 12-metoxi-*N*_b-voachalotina em CDCl₃. Os valores dos deslocamentos químicos δ_H e δ_C estão em ppm e as constantes de acoplamento *J* estão em Hz.

Tabela 13: Dados espectrais de RMN ¹H (400 MHz) e RMN ¹³C (100 MHz) da mistura dos alcalóides **3** e **4**, incluindo os resultados dos experimentos bidimensionais HSQC e HMBC, em CDCl₃. Os valores dos deslocamentos químicos δ_H e δ_C estão em ppm e as constantes de acoplamento *J* estão em Hz. 96

Tabela 14: Dados espectrais de RMN ¹H (400 MHz) e RMN ¹³C (100 MHz) do alcalóide **5**, incluindo os resultados dos experimentos bidimensionais HSQC e HMBC, em comparação com dados de literatura para a voachalotina em CDCl₃. Os valores dos deslocamentos químicos δ_H e δ_C estão em ppm e as constantes de acoplamento *J* estão em Hz. 123

Tabela 15: Dados de RMN ¹H (400 MHz), ¹³C (100 MHz) do alcalóide **6**, em CDCl₃ em comparação com dados de literatura para a ibogamina em CDCl₃. Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm e a constante de acoplamento (*J*) estão em Hz. 149

Tabela 16: Dados espectrais de RMN ¹H (400 MHz) e RMN ¹³C (100 MHz) da mistura dos alcalóides **7** e **8**, incluindo os resultados dos experimentos bidimensionais HSQC e HMBC, em CDCl₃. Os valores dos deslocamentos químicos δ_H e δ_C estão em ppm e as constantes de acoplamento *J* estão em Hz. 169

Tabela 17: Dados espectrais de RMN ¹H (400 MHz) e RMN ¹³C (100 MHz) da lignana siringaresinol (**9**) presente em 0,66% na mistura contendo os dois alcalóides **7** e **8**, incluindo os resultados dos experimentos bidimensionais HSQC e HMBC, em CDCl₃. Os valores dos deslocamentos químicos δ_H e δ_C estão em ppm e as constantes de acoplamento *J* estão em Hz. 173

Tabela 18: Dados espectrais de RMN ¹H (400 MHz) e RMN ¹³C (100 MHz) do fenilpropanóide **10**, em CDCl₃. Os valores dos deslocamentos químicos δ_H e δ_C estão em ppm e as constantes de acoplamento *J* estão em Hz. 199

Tabela 19: Dados de RMN ¹³C (100 MHz) dos triterpenos **11**, **12** e **13** e das substâncias α -amirina, β -amirina, e lupeol, em CDCl₃. Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm. 207

Tabela 20: Dados de RMN ¹³C (100 MHz) dos esteróides **14**, **15** e **16** e das substâncias β -sitosterol, campesterol e estigmasterol, em CDCl₃. Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm. 219

Tabela 21: Ensaio em microplaca do alcalóide **2** pelo método de Ellman modificado. 233

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AChE	Enzima acetilcolinesterase
APT	“Attached Proton Test”
ATCI	Iodeto de Acetilcolina
λ	Comprimento de onda
δ	Deslocamento químico
CDCl_3	Clorofórmio Deuterado
GC/EM	Cromatografia de gás acoplada à espectrometria de massas
COSY	“Correlation Spectroscopy”
cm^{-1}	Centímetro recíproco
d	Dupleto
dd	Duplodupleto
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
HMBC	“Heteronuclear Multiple Bond Connectivity”

HMQC	“Heteronuclear Multiple Quantum Coherence”
Hz	Hertz
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento medida em Hz
m	Multiplete
mg	Miligrama
<i>m/z</i>	relação massa/carga
ppm	Parte por milhão
PENDANT Testing	Polarization Enhancement that is Nurtured During Attached Nucleus Testing
q	Quaduplete
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
s	Simpleto
t	Triplete
UV	Ultravioleta
v/v	volume por volume

RESUMO

GONÇALVES, Milena dos Santos. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Fevereiro de 2011. Constituintes Químicos de *Tabernaemontana catharinensis* (APOCYNACEAE). Professor Orientador: Ivo José Curcino Vieira.

Da espécie *Tabernaemontana catharinensis* foram isoladas 19 substâncias, sendo elas: oito alcalóides: coronaridina, 12-metoxi-*N*_b-voachalotina, isovoacristina, voacristina, voachalotina, ibogamina, 3-oxoisovoacangina e 3-oxovoacangina; seis esteróides: β -sitosterol, estigmasterol, campesterol, sitostenona, campestenona e estigmastenona; tres triterpenos: α e β -amirina e lupeol, 1 fenilpropanoide: éster do ácido coniferílico e uma lignana: siringaresinol. As substâncias foram identificadas através dos espectros de 1D e 2D RMN, massas e comparações com dados da literatura. Os alcalóides coronaridina e 12-metoxi-*N*_b-voachalotina foram submetidos ao teste biológico de inibição da enzima acetilcolinesterase. Porém, apenas o segundo apresentou um bom resultado com valor de inibição de enzima acetilcolinesterase de 50,5% e um CI_{50} de $2,33 \cdot 10^{-1} \mu M$. A constituição química da espécie coletada no Cerrado apresentou-se igual à espécie coletada na Mata Atlântica, com exceção do fenilpropanóide e da lignana isolados pela primeira vez no gênero *Tabernaemontana*.

ABSTRACT

GONÇALVES, Milena dos Santos. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. February, 2011. Chemical Constituents from *Tabernaemontana catharinensis* (APOCYNACEAE). Professor Advisor: Ivo José Curcino Vieira.

From *Tabernaemontana catharinensis* were isolated nineteen compounds. eight alkaloids: coronaridine, 12-methoxy-*N*_b-voachalotine, isovoacristine, voacristine, voachalotine, ibogamine, 3-oxo-isovoacangine and 3-oxo-oxovoacangine; six steroids: β -sitosterol, stigmasterol, campesterol, sitostenone, campestenone and estigmastenone; three triterpenes: α -amyrin, β -amyrin and lupeol, one phenylpropanoid: acid coniferilic ester and one lignan: syringaresinol. The compounds were identified through 1D and 2D NMR, mass spectra and comparison with literature data. The alkaloids coronaridine and 12-methoxy-*N*_b-voachalotine were submitted to biological test of acetylcholinesterase inhibition. However, only 12-methoxy-*N*_b-voachalotine showed a satisfactory result with value of 50.5% and an IC₅₀ of $2,33.10^{-1}$ μ M acetylcholinesterase inhibition. The chemical composition of specie collected in the Cerrado showed equal to the species collected in the Atlantic Forest, with the exception of phenylpropanoid and lignan.

1. INTRODUÇÃO

O isolamento e o estudo de substâncias naturais tem sido uma preocupação central das ciências químicas e biológicas por mais de 200 anos. Neste contexto a química de produtos naturais volta-se a investigação sobre a biossíntese dos metabólitos secundários e é estudada pelos químicos orgânicos. As substâncias biossintetizadas por este metabolismo são características de grupos taxonômicos, tais como família e gênero (Braz-Filho, 1994).

Os metabólitos secundários aumentam a probabilidade de sobrevivência de uma espécie, pois são responsáveis por diversas atividades biológicas, tais como, antimicrobianos, antifúngicos para proteger as plantas de agentes patogênicos, podendo também apresentar atividades antigerminativas ou tóxicas para outras plantas, como as fitoalexinas.

A química de produtos naturais tem sua fundamental importância para o desenvolvimento da sociedade. Estima-se que 80% da população de países subdesenvolvidos e em desenvolvimento são quase completamente dependentes da medicina popular, utilizando plantas para suas necessidades de saúde (Braz-Filho, 2010).

Embora a flora brasileira constitua uma das principais fontes de recursos naturais, os estudos sobre a química de substâncias secundárias das espécies

que a compõem ainda são insuficientes. Segundo Braz-Filho (2010), dispomos de um imenso acervo natural de vegetais nos ambientes aquáticos e terrestres; um potencial químico “adormecido”, de uma magnitude desproporcional ao esforço relativamente pequeno das pesquisas desenvolvidas para seu conhecimento e utilização.

A biodiversidade das florestas tropicais serve também como foco para descoberta de novas plantas. A interação entre plantas tropicais e seus predadores naturais pode ser usada como suporte para descoberta de substâncias ativas e, como consequência, orientar as investigações farmacológicas. A química do metabolismo secundário assume importância especial pela bioprodução de diversas substâncias orgânicas destinadas à manutenção e sobrevivência humana, além de sua importância na competição química existente na vida dos meios ambientes naturais e artificiais produzidos pela atuação dos seres humanos (Braz-Filho, 2010).

Nos últimos anos, a preocupação com a manutenção da biodiversidade no planeta levou as autoridades governamentais a voltar sua atenção para a manutenção dos refúgios naturais que se encontram ameaçados, tais como, Mata Atlântica e Cerrado.

Segundo Klink e Machado, o Cerrado é o nome regional dado às savanas brasileiras. É a segunda maior formação vegetal brasileira depois da Amazônia, e savana tropical mais rica do mundo em biodiversidade. Localiza-se principalmente no Planalto Central do Brasil, ocupando 24% de todo território nacional, pouco mais de 2 milhões de Km². Além disso, o bioma Cerrado é favorecido pela presença de diferentes paisagens e de três das maiores bacias hidrográficas da América do Sul. Concentra nada menos que um terço da biodiversidade nacional e 5% da fauna e flora mundiais (Klink e Machado, 2005).

Tais diferenças podem ocorrer na bioprodução dos metabólitos secundários, pois estes apresentam uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante, portanto, sua biossíntese é freqüentemente afetada por condições ambientais (Gobbo-Neto, 2007).

Dentre os principais fatores que podem alterar a taxa de produção de metabólitos secundários, pode-se citar a sazonalidade, ritmo circadiano e

desenvolvimento. A época em que uma espécie é coletada é um dos fatores de maior importância, uma vez que, às vezes, a natureza dos constituintes ativos não é constante durante todo o ano.

Outro fator relevante é a temperatura. Apesar de cada espécie ter se adaptado em seu habitat, as plantas são capazes de existir em uma considerável faixa de temperatura. A faixa em que ocorrem as variações anuais, mensais e diárias na temperatura é um dos fatores que exerce maior influência em seu desenvolvimento, afetando, com isso, a produção de metabólitos secundários.

Além destes, há também o fator relacionado à disponibilidade hídrica. Fatores fisiológicos críticos, como fotossíntese, mobilização de reservas, expansão foliar e crescimento, podem sofrer alterações por estresse hídrico e, como consequência, levar a alterações no metabolismo secundário (Gobbo-Neto, 2007).

Acrescentando-se a estes, há outros fatores como radiação ultravioleta, nutrientes, poluição atmosférica, altitude, ataque de patógenos, entre outros, que podem influenciar na bioprodução dos metabólitos secundários.

O presente trabalho propõe o estudo fitoquímico da espécie *Tabernaemontana catharinensis* da família Apocynaceae, a qual já teve sua constituição química e atividade biológica bastante investigada, porém a maioria dos trabalhos com esta espécie é com indivíduos coletados em regiões da Mata Atlântica, sendo que também não existem relatos na literatura sobre o estudo químico das sementes desta espécie. Diante desta constatação, o trabalho também propõe o estudo fitoquímico das sementes de *T. catharinensis*, uma vez que muitos dos alcalóides de espécies de Apocynaceae são acumulados em sementes (Oliveira, 2008; Medeiros, 2003). Na família Apocynaceae os alcalóides estão representados na sua maioria por esqueletos indólicos monoterpênicos, os quais apresentam diversas atividades biológicas, citando como exemplo a atividade antiacetilcolinesterásica, cujo teste biológico de inibição da enzima acetilcolinesterase com o objetivo de buscar por inibidores desta enzima também está incluído neste trabalho.

Será realizado também o estudo fitoquímico com as cascas das raízes e folhas com o objetivo de aumentar o conhecimento da química desta espécie, verificando possíveis diferenças na constituição química da espécie *T.*

catharinensis coletada no bioma Cerrado com os trabalhos sobre esta espécie coletada no bioma Mata Atlântica.

2. OBJETIVOS

O trabalho proposto tem como objetivos:

- isolar, identificar (através de métodos fitoquímicos clássicos) e caracterizar (através de métodos espectrométricos e cromatográficos) substâncias do metabolismo secundário, das sementes, cascas das raízes e folhas de *Tabernaemontana catharinensis*, família Apocynaceae, coletada na região do Cerrado;
- realizar o teste biológico de inibição da enzima acetilcolinesterase;
- o aprendizado de técnicas cromatográficas clássicas de isolamento e purificação de substâncias orgânicas bioproduzidas pelo metabolismo secundário de espécies vegetais;
- o aprendizado de técnicas espectroscópicas utilizadas na identificação de substâncias bioproduzidas pelo metabolismo secundário de espécies vegetais;
- verificar possíveis diferenças no perfil químico ou diversidade estrutural das substâncias isoladas da espécie *T. catharinensis*, coletada no Cerrado, com dados de literatura existentes de substâncias já identificadas

desta espécie coletada na Mata Atlântica.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 A Família Apocynaceae

A família Apocynaceae está entre as que apresentam o maior número de espécies do mundo vegetal, com uma diversificação notável de plantas. Pertence à ordem Gentianiales, classe Dicotyledoneae, subclasse Asteridae, divisão Angiospermae (Mabberley, 1997).

Esta família está representada em quase todos os continentes (menos Antártida), em regiões tropicais e temperadas, desde o nível do mar até as montanhas mais altas, preferindo solos secos, com mais de 300 gêneros e cerca de 2000 espécies tropicais e subtropicais. No Brasil, são encontradas aproximadamente 380 espécies dentro de 41 gêneros (Moreira et al., 2004).

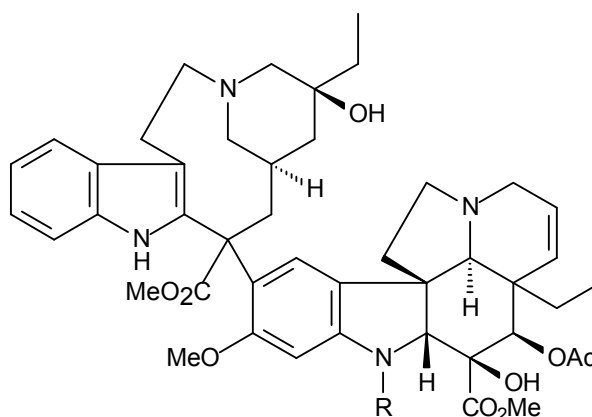
As plantas pertencentes à família Apocynaceae caracterizam-se pela presença de látex, estípulas geralmente ausentes (exceto o gineceu), estiletes unidos no ápice formando uma cabeça ampliada e por frutos usualmente bifoliculares com sementes geralmente comosas (Rapini, 2000).

Substâncias isoladas de espécies da família Apocynaceae foram usadas durante séculos na medicina popular, fazendo parte de rituais religiosos e

também como veneno para flechas (*Tabernanthe iboga* – rituais místicos; *Tabernaemontana crassa* – anestésico local e veneno para flechas; entre outras) (Neuwiger, 1998).

Várias espécies do gênero *Tabernaemontana*, pertencente à família Apocynaceae foram largamente estudadas tendo sua composição química bastante definida, além da realização de diversos testes biológicos (Hesse, 1981). Esta família é muito conhecida por fornecer um grande número de alcalóides e, em sua maioria, do tipo indólico monoterpênico, e estes são responsáveis por uma gama enorme de atividades farmacológicas. A título de exemplo, pode-se citar os alcalóides vimblastina e a vincristina produzidos por *Catharanthus roseus*, conhecida popularmente como “boa-noite” ou “maria-sem-vergonha”, utilizados como quimioterápicos na medicina alopática (Chiang et al, 2004; Vieira et al, 2008; Figueiredo et al., 2010). Os alcalóides vimblastina e a vincristina contribuíram para alcançar avanços decisivos na cura de dois dos mais mortíferos tipos de câncer, o mal de Hodgking, que afeta principalmente jovens e adultos, e a leucemia linfática aguda, tida como uma verdadeira sentença de morte para crianças (Longa, 2002).

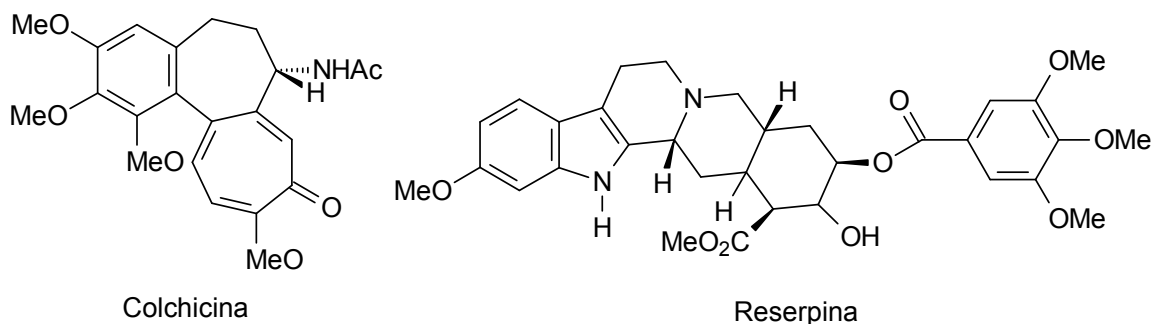
Durante séculos, esta espécie foi usada para tratar a diabetes na Europa. No Hawaii, a planta era fervida para fazer uma pomada com funções hemostáticas. Na China, era utilizada como remédio diurético e contra a tosse (Simpson, 1986).



R=CHO: Vimblastina

R=CH₃: Vincristina

Outros exemplos são a colchicina extraída do açafrão (*Colchicum autumnale*), assim como a reserpina extraída de *Rauvolfia serpentina*, são comumente usadas como drogas anti-hipertensiva e tranqüilizante, respectivamente (Schmeller, 1998).



São inúmeros os usos econômicos das espécies pertencentes à família Apocynaceae, os quais pode-se destacar, fonte de fibras para cordas e fios utilizados em artesanato, ramos fortes e flexíveis usados como vara de pescar, madeira para a construção civil, produção de móveis, para ferramentas (peroba), borracha e goma de mascar são produzidas a partir do látex, além de serem cultivadas e comercializadas como plantas ornamentais (Rapini, 2000).

3.2 O Gênero *Tabernaemontana*

Segundo Lim (2009), o gênero *Tabernaemontana* possui cerca de 110 espécies sendo 27 brasileiras. Destas, *T. laeta*, *T. histryx* e *T. salzmännii* fazem parte do estudo fitoquímico do grupo de pesquisa do Setor de Química de Produtos Naturais da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), coordenado pelos professores Ivo José Curcino Vieira e Raimundo Braz-Filho. O estudo, em questão, volta-se à espécie *T. catharinensis*.

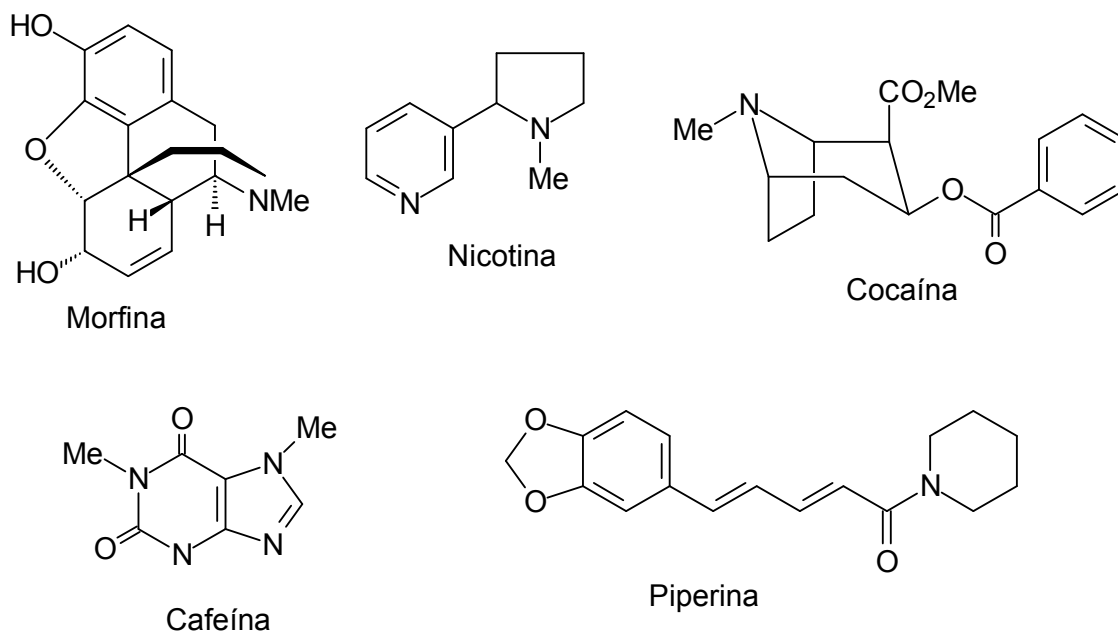
Entre as espécies desse gênero que já foram notificadas, 44 ocorrem na América. As espécies identificadas no Brasil pertencem à seção *Peschiera* e

Bonafousia. T. catharinensis é a única espécie conhecida da Argentina e Paraguai, ocorrendo também no Brasil e na Bolívia (Leeuwenberg, 1994).

3.2.1 Alcalóides

Alcalóides são bases orgânicas nitrogenadas encontradas principalmente em plantas, mas também, em menor quantidade em microorganismos e animais. Um ou mais átomos de nitrogênio estão presentes, tipicamente como aminas primárias, secundárias ou terciárias. No entanto, o grau de basicidade varia muito, dependendo da estrutura da molécula do alcalóide, além da presença e localização de outros grupos funcionais. De fato, alguns alcalóides são essencialmente neutros, geralmente, são classificados de acordo com a natureza de parte da estrutura, a qual contém o nitrogênio, como por exemplo, pirrolidínicos, piperidínicos, quinolínicos, isoquinolínicos, indólicos, entre outros. A complexidade estrutural de alguns desses exemplos rapidamente expande o número de subdivisões (Dewick, 1997).

Historicamente, em 1806, Friedrich Wilhelm Serturmer, farmacêutico alemão, consegue identificar um alcalóide farmacologicamente ativo, a qual recebeu o nome de morfina (da papoula, *Papaver somniferum*) em homenagem ao Deus grego do sono: Morfeu, com propriedades sedativas. A partir de então, novas descobertas foram acontecendo, destacando-se a piperina (da pimenta-do-reino, *Piper nigrum*), a cafeína (do café, *Coffea arabica*), a cocaína (da *Erythroxylon coca*), assim como a nicotina (*Nicotinia tabaccum*), dentre outros, como pode ser estruturalmente representado a seguir. Os alcalóides são encontrados em mais de 4000 espécies de plantas, sendo mais freqüentes em dicotiledôneas do que em monocotiledôneas e gimnospermas. Podem ocorrer em diferentes partes do vegetal, como raiz (*Symphitum* spp.), folhas (*Passiflora* sp., *Agerantum conyzoides* e *Phyllanthus* spp.), casca do fruto (*Punica granatum*) e em sementes (*Lupinus albus*) (Santos, 2009).



3.2.1.1 Considerações Biossintéticas dos Alcalóides

A biossíntese dos alcalóides inclui sempre, pelo menos, um ácido aminado. São também incorporadas outras unidades provenientes do acetato, do chiquimato, ou da via do fosfato desoxixilulose. Relativamente, poucos precursores de aminoácidos são realmente envolvidos na biossíntese de alcalóides, sendo os principais ornitina, lisina, ácido nicotínico, tirosina, triptofano, ácido antranílico e histidina (Dewick, 2007)

O triptofano é um aminoácido aromático que contém um sistema de anel indólico, tendo sua origem na rota do chiquimato via ácido antranílico. Ele age como precursor de um vasto número de alcalóides indólicos, mas também há provas definidas de que as principais reações de rearranjo podem converter o sistema de anel indol em um anel quinolina, aumentando assim, ainda mais, a capacidade deste aminoácido de agir como precursor de diversas classes de alcalóides (Dewick, 1997).

Dentre as várias classes de alcalóides, os indólicos monoterpênicos apresentam uma grande variedade estrutural. Uma característica interessante desta classe de alcalóides é a origem biossintética comum (**Figura 1, pág 12**). Todos eles têm o mesmo precursor, a strictosidina, que é um glicosídeo formado pela condensação de uma molécula de triptamina (advinda do triptofano por uma

reação de descarboxilação) com um aldeído monoterpênico denominado secologanina, através da reação de Mannich (Bruneton, 1995). Esta reação é catalisada pela enzima strictosidina sintase.

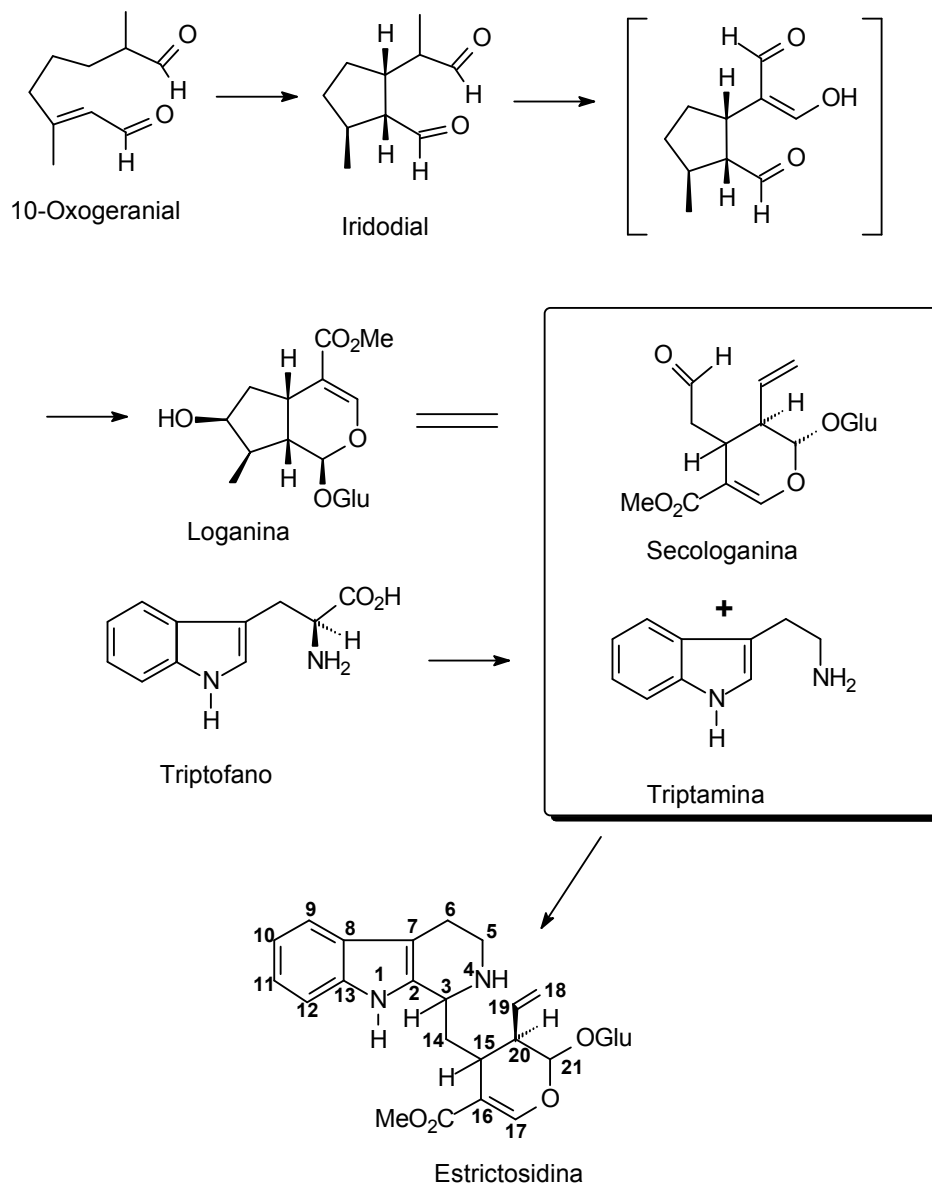


Figura 1: Esquema de formação do alcalóide Estrictosidina.

Rearranjos na parte terpenoídica da estrictosidina leva a formação de diferentes classes de alcalóides, apresentados na **Figura 2** (Bruneton, 1995). Baseado na biogênese é possível classificar estes alcalóides em diferentes classes:

Classe I – Alcalóides em que a unidade monoterpênica não sofreu rearranjos (esqueletos **corinanteano** e **estrichinano**);

Classe II – Alcalóides com rearranjo nos carbonos C-17→C-20 da unidade monoterpênica (esqueleto **aspidospermano**);

Classe III – Alcalóides com rearranjo nos carbonos C-17→C-14 da unidade monoterpênica (esqueleto **ibogano**).

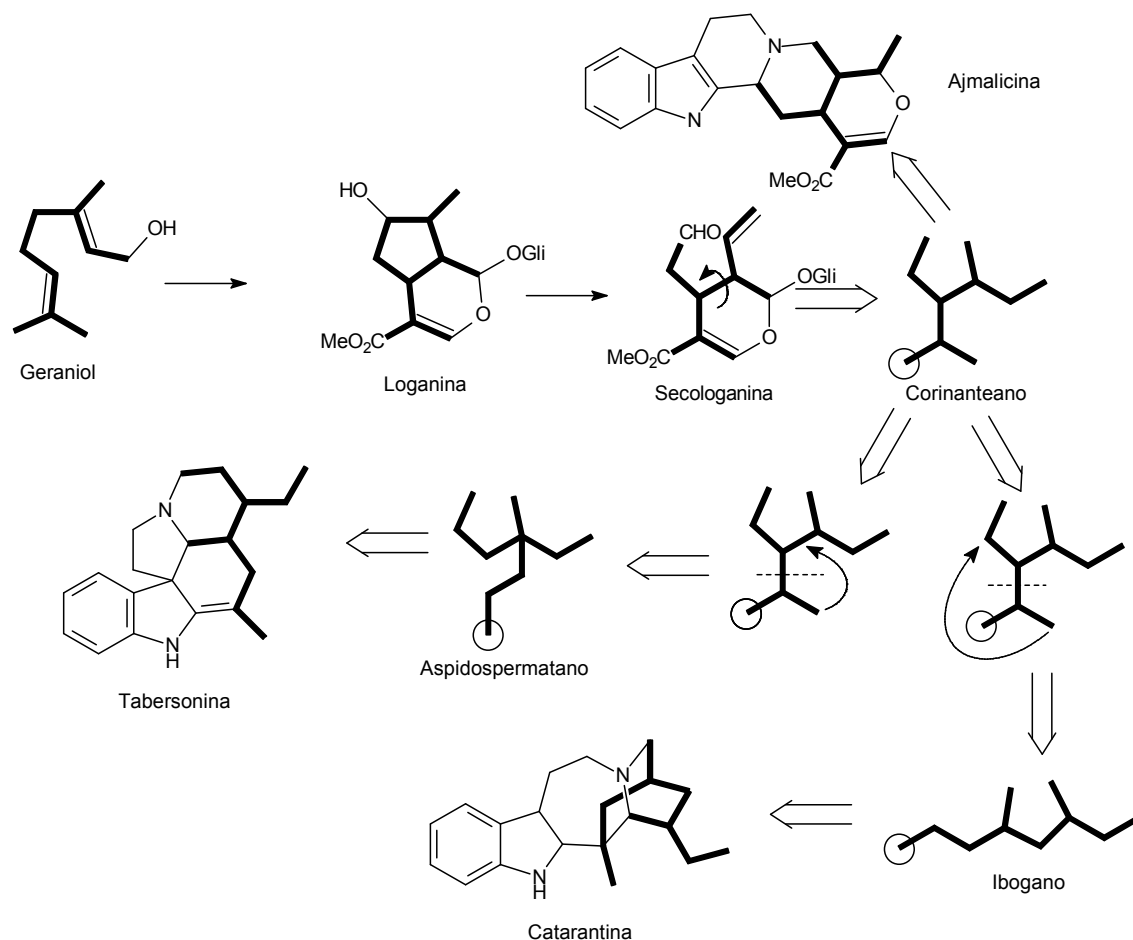


Figura 2: Rearranjos da cadeia terpenoídica da estrictosidina.

Estas três classes são subdivididas em nove tipos principais: vincosano, vallesiachotamano, corinanteano, estrichinano, aspodospermatano, plumerano, eburnano, ibogano e tacamano (**Figura 3**), e seus subtipos, dependendo das características de seus esqueletos. Muitas das etapas e mecanismos que levam a formação destes esqueletos são parcialmente conhecidas, uma vez que muitas enzimas envolvidas neste processo ainda não foram isoladas e caracterizadas (Danieli e Palmisano, 1986).

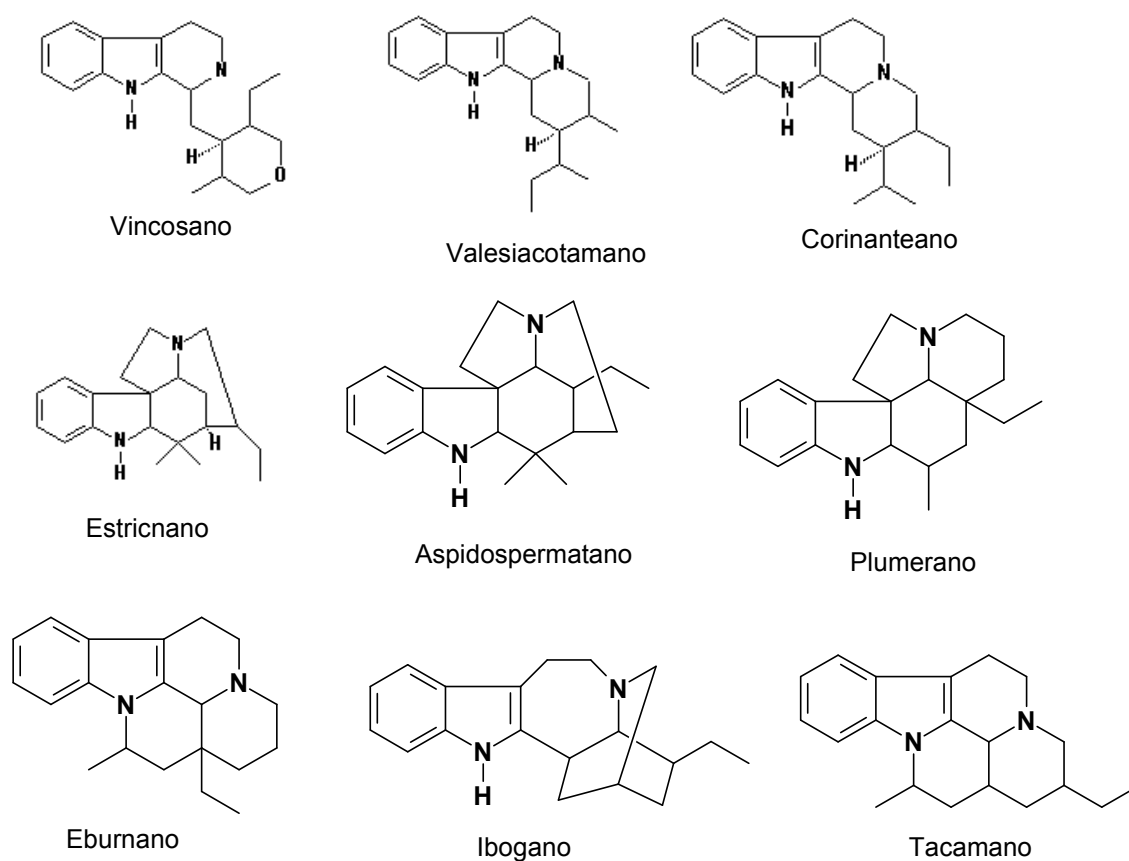


Figura 3: Esqueletos básicos dos alcalóides indólicos monoterpênicos.

3.3 A Espécie *Tabernaemontana catharinensis*

Conhecida popularmente como “leiteiro de vaca”, *Tabernaemontana catharinensis* (syn. *Peschiera catharinensis* A. DC.) é uma espécie pertencente à família Apocynaceae rica em alcalóides indólicos. Segundo Leeuwenberg (1994), esta espécie também é conhecida como *T. affinis*, *T. australis*, *P. australis*, *T. hilariana*, *T. hybrida*, *T. acuminata*, *T. salicifolia* e *P. albidiflora*.

Espécies de *Tabernaemontana* são bem conhecidas pela bioprodução de triterpenos (Zhu et al, 1990) e alcalóides indólicos principalmente os monoterpênicos. Estes alcalóides do tipo indólicos monoterpênicos são responsáveis pela maioria das atividades farmacológicas relacionadas com o gênero, das quais pode-se destacar: antileishmaniose; antibacteriana; antitumoral; hipoglicemiantes, analgésicos, antiacetilcolinesterase, entre outros (Van Beek et al, 1988; Vieira et al, 2008; Figueiredo, 2005). As fotografias dessa espécie em estudo encontram-se nas **Figuras 4, 5 e 6**, a seguir.



Figura 4: Fotografia da espécie *Tabernaemontana catharinensis*.



Figura 5: Fotografia das flores de *Tabernaemontana catharinensis*.



Figura 6: Fotografia dos frutos de *Tabernaemontana catharinensis*.

Na medicina popular, esta espécie é usada como antídoto para picada de cobras, para aliviar dor de dente, também como vermífugo e para eliminar

verrugas (Rates et al, 1993). Os estudos farmacológicos sobre os extratos brutos de *T. catharinensis* têm demonstrado a sua efetiva ação antitumoral, antiinflamatória, antileishmania, anticâncer, antioxidante e analgésica (Rates et al, 1993).

3.4 Atividade Antiacetilcolinesterásica (Doença de Alzheimer)

Os alcalóides continuam sendo focos de pesquisa para novos protótipos de inibidores da acetilcolinesterase, sendo o grupo de substâncias mais amplamente estudado. Uma revisão realizada em 2006 por Barbosa-Filho e colaboradores consultou 175 referências e foram levantadas 309 plantas e 260 substâncias isoladas. Dentre os compostos testados que foram isolados e identificados, 139 pertenciam à classe dos alcalóides. Como a maioria dos inibidores de acetilcolinesterase apresenta nitrogênio em suas estruturas, a elevada atividade dos extratos parece estar relacionada com o seu rico conteúdo de alcalóides.

A família Apocynaceae pode ser considerada uma das mais importantes fontes vegetais de constituintes químicos com utilidade terapêutica na medicina moderna. O gênero *Tabernaemontana* apresenta o maior número de estudos realizados com relação ao potencial anticolinesterásico (Seidl, 2010).

Vieira e colaboradores (2008) avaliaram o potencial anticolinesterásico de frações e treze alcalóides obtidos de *T. laeta* e *T. hytrix* e confirmaram a atividade para alguns dos alcalóides avaliados. Outras espécies da família Apocynaceae também apresentam estudos com relação ao potencial anticolinesterásico. Estudos de triagem também foram realizados com diferentes tipos de alcalóides indólicos. Cardoso e colaboradores (2004) avaliaram o potencial anticolinesterásico e antioxidante de nove alcalóides indólicos glicosilados da espécie *Chimarrhis turbinata* (Rubiaceae) onde os alcalóides turbinatina e desoxicordifolina apresentaram atividade anticolinesterásica moderada. Orhan e colaboradores (2007) avaliaram a atividade anticolinesterásica de vários alcalóides dentre eles os alcalóides do tipo indólico; ioimbina e vincamina.

Portanto, os alcalóides indólicos do tipo monoterpênicos vem se tornando fontes de estudos e pesquisas contra doenças neurodegenerativas como, por exemplo, a doença de Alzheimer.

A doença de Alzheimer é a causa mais comum de demência em pessoas acima de 65 anos, afetando cerca de 10% das pessoas acima desta faixa etária e 50% das pessoas acima de 85 anos. É esperado um aumento ainda maior do número de pacientes com a doença com a melhoria da expectativa de vida e conseqüente aumento do número da população idosa. Segundo a Organização Mundial de Saúde, estima-se que 34 milhões irão apresentar algum sintoma da doença de Alzheimer em 2025 o que a torna um dos problemas de saúde pública mais alarmante nesse século (Seidl, 2010).

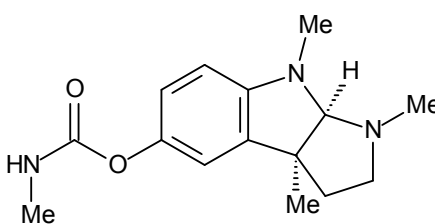
Esta doença foi descrita primeiramente pelo médico patologista alemão Aloïs Alzheimer em 1907. É uma doença mental complexa, multifatorial, heterogênea e irreversível, caracterizada pela perda gradual de memória, alterações no comportamento e na personalidade e também pelo declínio das habilidades intelectuais (Seidl, 2010). Sintomas estes que se devem ao fato de uma grande diminuição da acetilcolina na sinapse nervosa.

A acetilcolina é um neurotransmissor liberado pelo terminal nervoso, quando o corpo necessita de estímulos específicos como, por exemplo, uma contração muscular ou um relaxamento. O terminal nervoso libera a acetilcolina na fenda sináptica que, posteriormente, se liga a proteínas de membranas especiais, chamadas de receptores, ativando-as. Após esta ativação, ocorre a resposta que, dependendo do receptor ativado, pode ser uma excitação ou inibição. Assim que ativa o receptor a acetilcolina rapidamente se desliga dele, e a acetilcolinesterase aproveita para “quebrá-la” em colina e acetato Di (Giovanni et al., 2008).

Estudos vêm tentando mostrar que a doença de Alzheimer está relacionada à diminuição da liberação desses neurotransmissores e, como conseqüência, a comunicação entre um neurônio e outro fica extremamente prejudicada. Portanto, como a enzima acetilcolinesterase (AChE) é responsável pela diminuição da acetilcolina (neurotransmissor cerebral) na sinapse nervosa, causando a perda de neurônios colinérgicos, os quais são responsáveis pelas funções cognitivas; sugere-se que uma elevação no nível da acetilcolina poderia ser útil para melhorar a sintomatologia da doença de Alzheimer como perda de memória e dificuldade de aprendizagem. Com isso, a intensa investigação para o descobrimento de inibidores de AChE e respostas positivas do tratamento estão

contribuindo para o surgimento dos anticolinesterásicos no mercado, tais como, tacrina, donepezila, galantamina e rivastigmina (Orhan et al., 2006).

A tacrina, (Cognex®) foi a primeira droga aprovada pela US Food and Drug Administration (FDA) para o tratamento dos níveis leve a moderado da doença de Alzheimer em 1993. A tacrina é uma aminoacridina ativa e um inibidor reversível de AChE. Possui ação farmacológica adicional em níveis monoamina e canais iônicos e é quase tão potente quanto a fisostigmina, com 50% de inibição da AChE na concentração de 10^{-7} μ M (Orhan et al., 2006; Seidl, 2010).

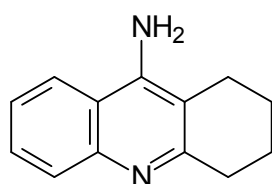


Fisostigmina

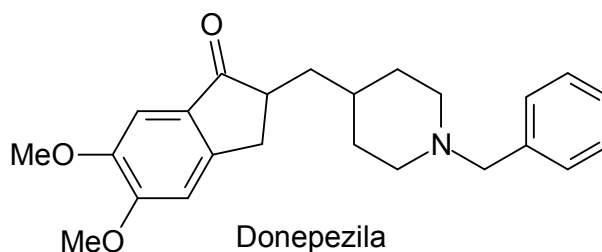
O cloridrato de donepezila (Aricept®), outra droga com uma atividade anticolinesterásica potente e seletiva, foi aprovado pelo FDA em 1996 e tornou-se o inibidor de AChE mais prescrito. O donepezila é uma piperidina inibidora reversível de AChE. A droga é geralmente bem tolerada, apresentando alguns efeitos colaterais colinérgicos como náuseas, vômito, constipação, diarreia, tontura e interrupção do sono (Orhan et al., 2006; Seidl, 2010).

A galantamina é uma das mais novas drogas anticolinesterásicas no mercado. Foi primeiramente isolada de espécies de *Galanthus nivalis* (Amaryllidaceae), posteriormente também extraída de outras espécies desta família como *Narcissus* sp. e *Leucojum* sp. Em 1996 foi lançada no mercado com o nome comercial de Nivalin® para o tratamento da doença de Alzheimer e, posteriormente, re-nomeada para comercialização como Reminyl®. Possui um modo particular de ação sendo um inibidor reversível de AChE. Apresenta alguns efeitos colaterais como náuseas, vômito e anorexia o que limita o seu uso em altas doses (Orhan et al., 2006; Seidl, 2010).

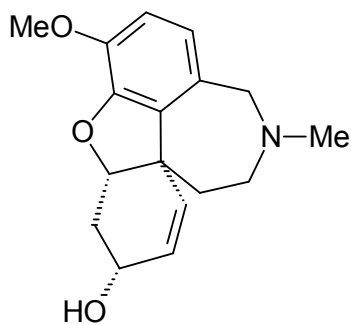
O tartarato de rivastigmina, (Exelon®) é um derivado de carbamatos inibidor pseudo-irreversível da AChE. A droga foi aprovada pelo FDA para o tratamento sintomático dos níveis leve e moderado da doença de Alzheimer em abril de 2000 (Orhan et al., 2006; Seidl, 2010).



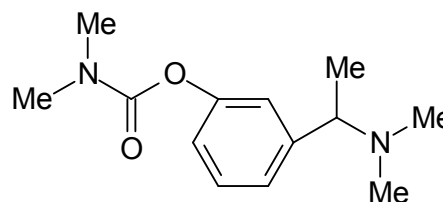
Tacrina



Donepezila



Galantamina



Rivastigmina

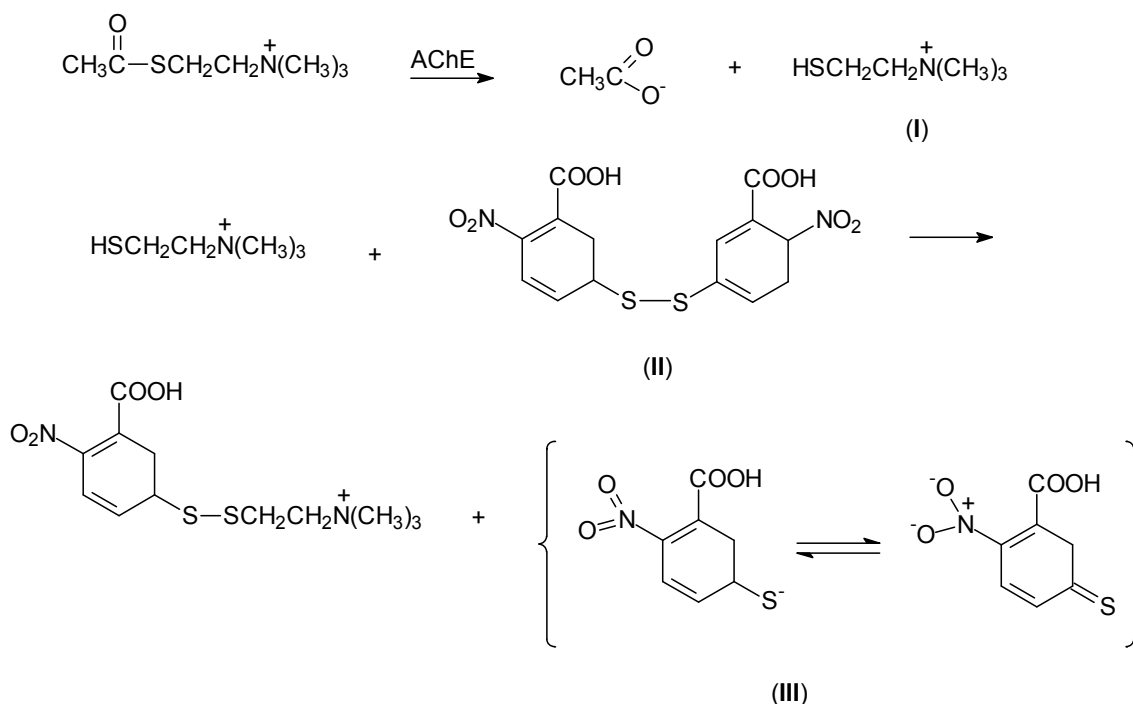
A diversidade estrutural dos anticolinesterásicos já conhecidos e a possibilidade de explorar modos de ação diferentes estimularam estudos fitoquímicos com diversas espécies de plantas e microorganismos com base no uso popular ou dados etnobotânicos. A pesquisa de drogas inibidoras de AChE com ação prolongada, com maior potência e com menores riscos de efeitos colaterais, ainda permanece o foco de diversos pesquisadores (Howes e Houghton, 2003; Khalid et al., 2004).

Nesse sentido, a biodiversidade brasileira possui um grande arsenal de substâncias ainda para serem descobertas que podem contribuir para a solução deste problema (Viegas et al., 2004). Cerca de 50% das drogas introduzidas no mercado durante os últimos 20 anos são derivadas diretamente ou indiretamente de moléculas pequenas de origem natural (Newman e Cragg, 2007). O potencial

terapêutico das plantas medicinais brasileiras também foi demonstrado com sucesso no campo da doença de Alzheimer (Barbosa-Filho et al., 2006).

Nos últimos anos, vários métodos para a determinação da atividade anticolinesterásica foram descritos. Além dos métodos colorimétricos que utilizam o reagente de Ellman (Ellman et al., 1961) ou o reagente sal Fast Blue B (Marston et al., 2002) pode-se citar também ensaios fluorimétricos utilizando substratos fluorogênicos (Rhee et al., 2001), detecção potenciométrica ou eletroquímica (Kaneda et al., 1985). Entretanto, a maioria dos estudos realizados para determinar a atividade anticolinesterásica de extratos vegetais, frações e substâncias isoladas utiliza a combinação das duas técnicas baseadas do método colorimétrico de Ellman (Seidl, 2010).

Em 1961, Ellman e colaboradores descreveram um método fotométrico para a determinação da atividade anticolinesterásica (Ellman et al., 1961). O método se baseia na medição da taxa de produção de tiocolina à medida que a acetiltiocolina é hidrolisada pela acetilcolinesterase. Isto ocorre pela continuação da reação da tiocolina (I) com reagente de Ellman (II) (DTNB), produzindo o ânion amarelo (III) como mostrado no **Esquema 1**, a seguir. A taxa da produção da substância colorida III é realizada em espectrofotômetro UV/VIS em 412 ou 405nm.



Esquema 1: Seqüência de reações para detecção de atividade acetilcolinesterásica de substancias naturais pelo método de Ellman.

Rhee e colaboradores adaptaram para microescala a metodologia espectrofotométrica descrita por Ellman e colaboradores (1961) realizando o monitoramento da produção da substância colorida em placas de 96 poços utilizando um leitor de microplaca. Essa adaptação contribuiu para a maior automação do sistema e possibilitou a análise mais rápida de um número ainda maior de amostras em volumes muito menores. O ensaio em microplaca é mais sensível do que o ensaio bioautográfico em CCD, já que seu método de detecção permite a identificação de inibidores em concentrações muito menores do que o teste em CCD (Di Giovanni et al., 2008; Rhee et al., 2001).

Portanto, o método escolhido, neste trabalho, para a determinação da atividade anticolinesterásica foi o método quantitativo de Ellman modificado (1961). Este método, além de colorimétrico, é capaz de quantificar a inibição da enzima acetilcolinesterase a partir das velocidades de reação ($V_{\text{máx}}$), em um espectrofotômetro de microplacas de 96 poços.

3.5 Substâncias Isoladas da espécie *T. catharinensis*.

Na literatura encontra-se registrado, até o presente momento, nesta espécie, 28 alcalóides indólicos monoterpênicos (**Figuras 7**), 16 triterpenos (**Figura 8**) e 03 esteróides (**Figura 9**) e suas estruturas são mostradas a seguir (Cardoso et al, 1998; Pereira et al, 2008; Lemos et al, 1996; Cardoso et al, 1999; Danieli et al, 1986).

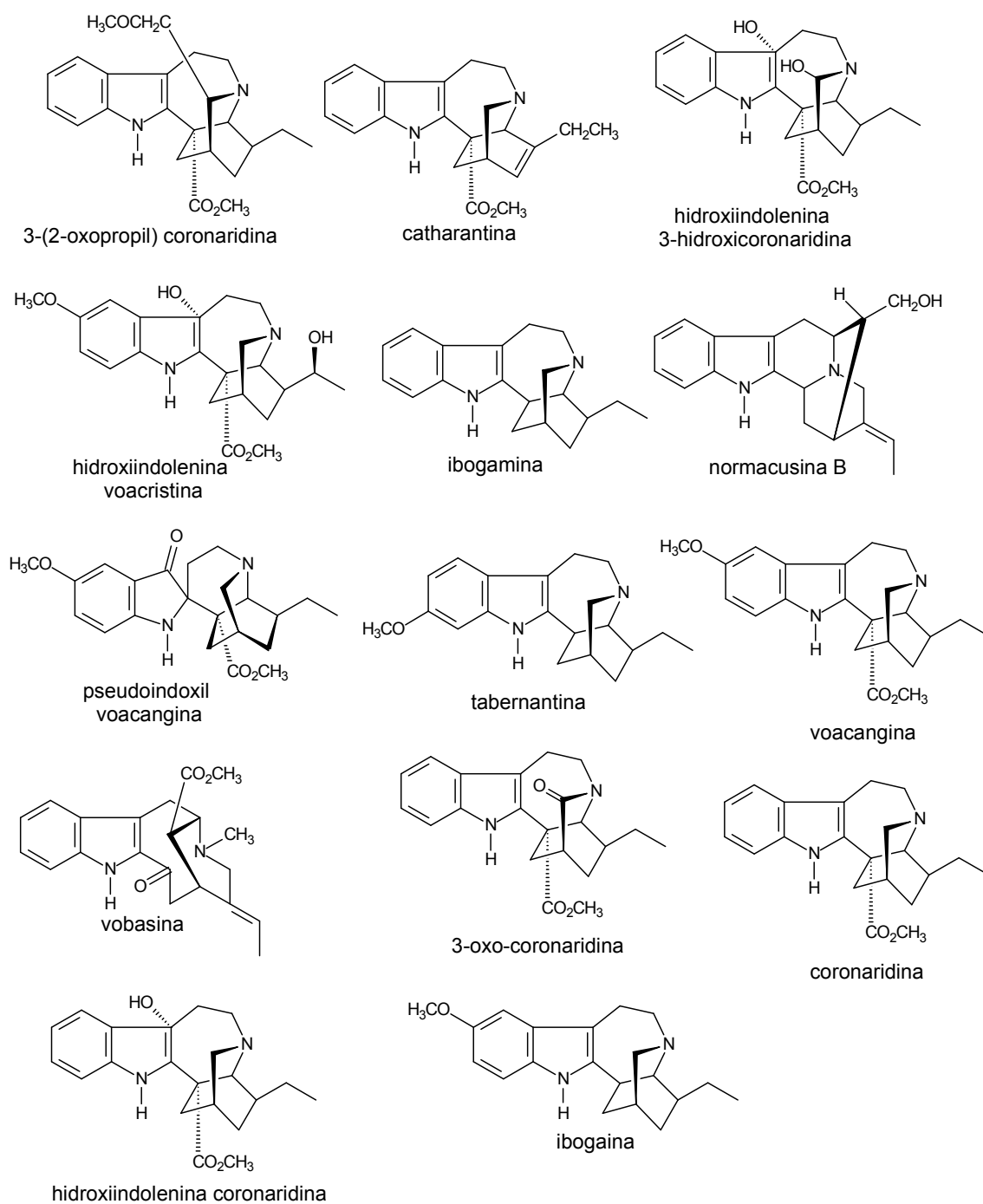
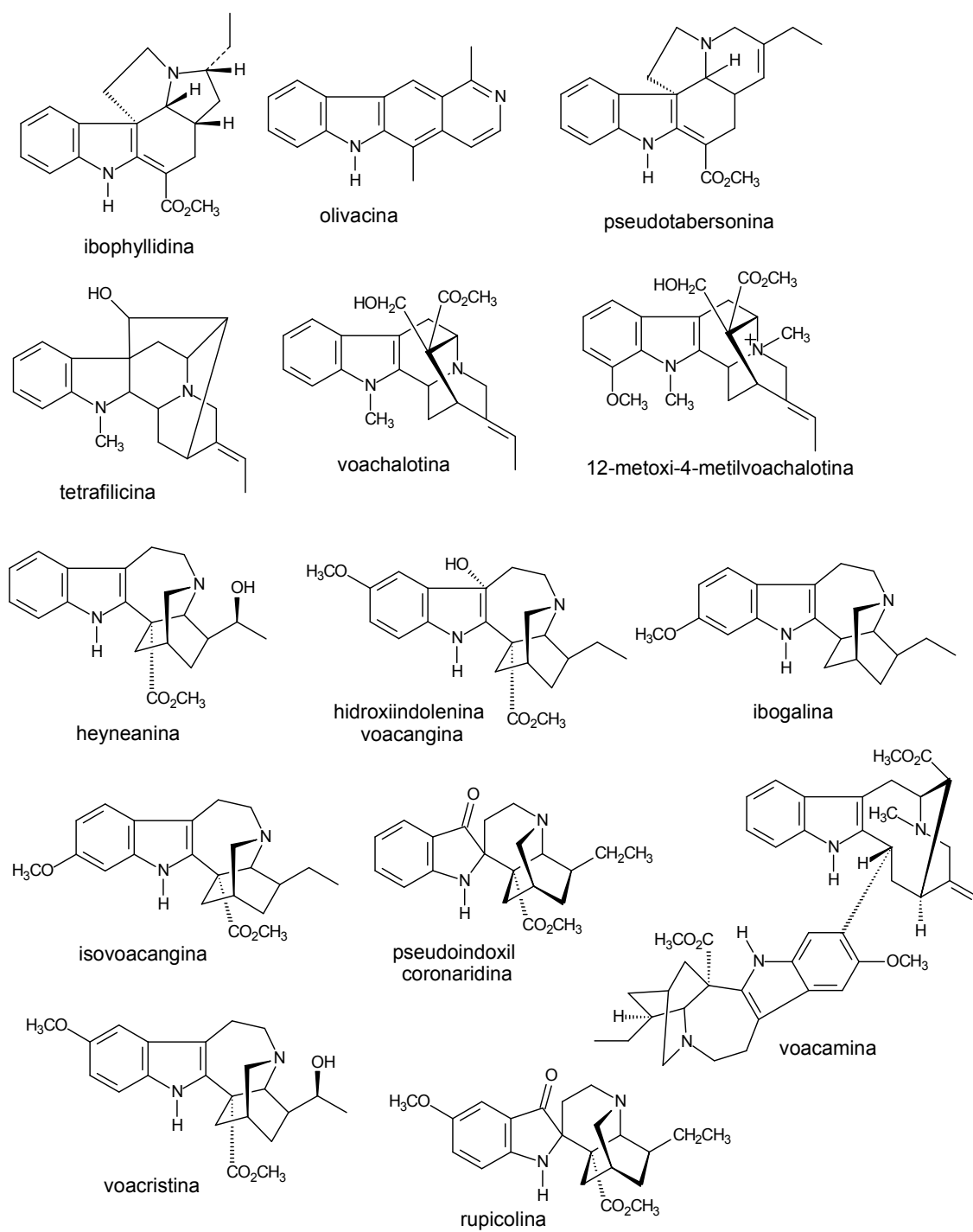


Figura 7: Alcalóides indólicos monoterpênicos isolados de *T. catharinensis*.

Continuação da **Figura 7**

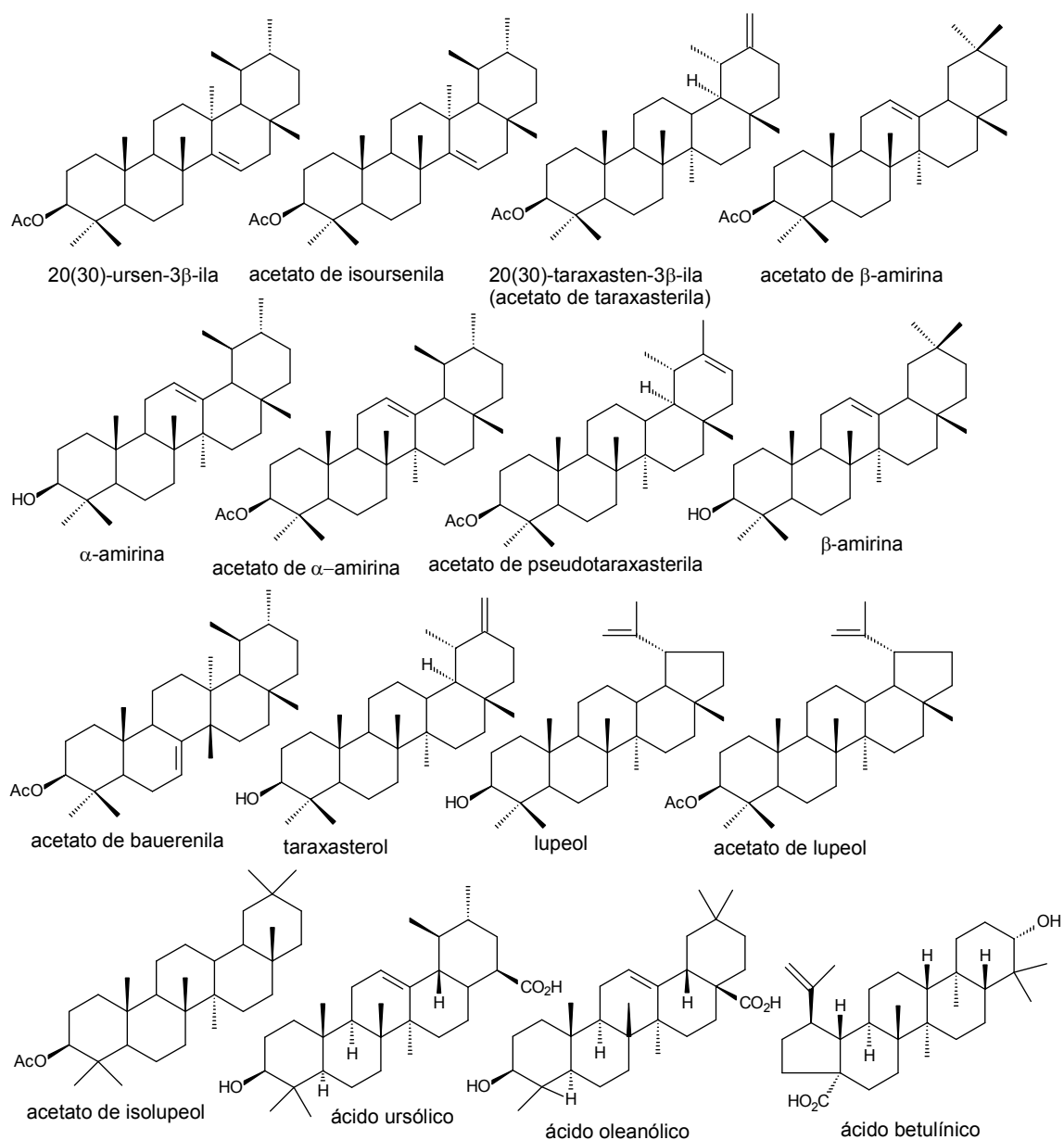


Figura 8: Triterpenos aislados de *T. catharinensis*.

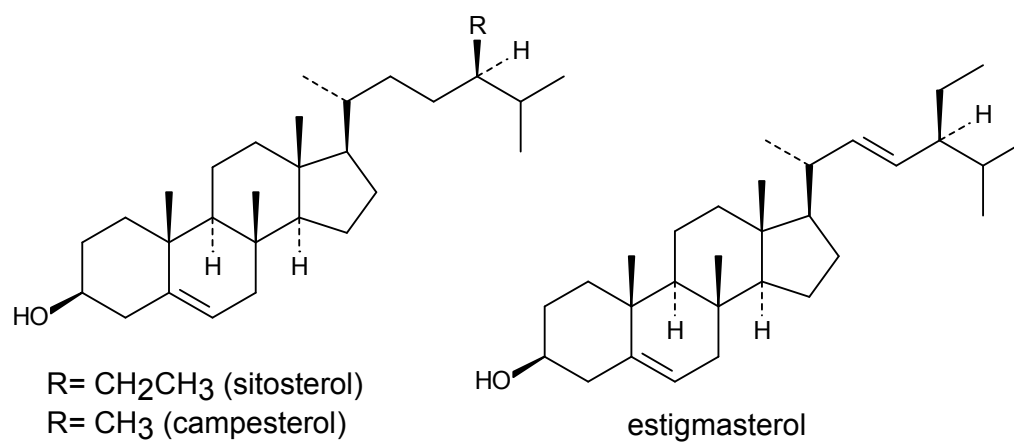


Figura 9: Esteróides aislados de *T. catharinensis*.

4. MATERIAL E METODOLOGIA

4.1 Material

4.1.1 Equipamentos

- As cromatofolhas foram reveladas através de irradiação com luz na região do ultravioleta em comprimento de onda 254 e 365 nm e/ou com reveladores cromogênicos (Reagente de Dragendorff e solução de vanilina a 2% em ácido sulfúrico concentrado);
- A concentração do extrato foi efetuada sob pressão reduzida em evaporador rotativo, FISATOM 802;
- Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram registrados em espectrômetros: marca Jeol, modelo ECLIPSE, operando a uma frequência de 400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C e marca BRUKER, modelo DPX-500, operando a uma frequência de 500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C . O solvente utilizado para todas as análises foi CDCl_3 ;
- Os espectros na região do ultravioleta foram registrados no espectrofotômetro modelo UV-1800 e software UV-PROBE da marca SHIMADZU;

- Espectrômetro de massas acoplado ao cromatógrafo gasoso do modelo CG/EM-QP-5050, marca SHIMADZU, utilizando impacto de elétrons a 70 eV;
- O material vegetal foi reduzido a pó através de moinho de martelos, da marca TECNAL;
- Os espectros na região do infravermelho foram registrados no espectrofotômetro Infravermelho, modelo IR AFFINITY, marca SHIMADZU;
- Para realização do teste biológico de inibição da enzima acetilcolinesterase foi utilizado o espectrofotômetro de microplacas de 96 poços SPECTRA MAX 250. Programa utilizado SOFTMAX 4.0

4.1.2 Solventes e Reagentes

- Acetato de etila P. A.;
- Metanol P. A.;
- Hexano P. A.;
- Diclorometano P. A.;
- Éter de Petróleo P. A.;
- Clorofórmio deuterado;
- Cromatofolhas de alumínio com sílica gel 60 F₂₅₄;
- Sílica gel MERCK DARMSTADT 60 (0,063-0,200 mm);
- Solução de nitrato básico de bismuto II em ácido acético diluído com iodeto de potássio (Reagente de Dragendorff) (MERCK, 1972);
- Solução de Vanilina a 2% em ácido sulfúrico concentrado;
- Tampão "A" - *tris*-HCL 0,05M (50mM) pH 8,0 em H₂O deionizada;
- Tampão "B" - 0,1% de albumina de soro bovino em solução Tampão "A";
- Tampão "C" (*tris*-HCL 0,05M, pH 7,0, com 200 mM MgCl₂.6H₂O);
- Enzima acetilcolinesterase de peixe elétrico (Tipo VI-S, 500U da SIGMA (St. Louis, MO, USA: product nº 3389) 358 U/mg de sólido / 497 U/mg de proteína) na concentração de 0,226U/mL em solução Tampão "B";
- Substrato iodeto de acetilticolina (ATCI) da SIGMA (A 5751) a 10 mM;

- Reagente colorimétrico ácido 5,5-ditio-*bis*-2-nitrobenzóico (DTNB) da SIGMA (D 8130) a 5mM;
- Fisostigmina (eserina) da FLUKA N° 45710, na concentração de 0,1mg/mL.

4.2 Metodologia

4.2.1 Coleta da espécie vegetal e classificação botânica

O material vegetal de estudo constituído das folhas, sementes e cascas das raízes de *Tabernaemontana catharinensis* foi coletado pelo Professor Dr. Ivo J. Curcino Vieira, na Fazenda Santo Antônio, Triângulo Mineiro, município de Araguari-MG, e classificado botanicamente pela professora Dr. Luiza S. Kinoshita (UNICAMP). Sua exsicata encontra-se depositada no Herbário da UNICAMP-SP sob o código UEC 117862.

4.2.2 Secagem e moagem

O material vegetal da espécie *Tabernaemontana catharinensis* constituído de casca das raízes, sementes e folhas foi seco ao ar livre logo após a coleta e moído em moinho de martelos, fornecendo os seguintes pesos de material seco: casca das raízes (2,8 Kg), sementes (0,9 Kg) e folhas (1,3 Kg).

4.2.3 Preparo dos extratos

A extração dos componentes da casca das raízes foi feita à temperatura ambiente, sucessivamente, utilizando-se metanol como solvente e, posterior, destilação a pressão reduzida em evaporador rotativo fornecendo o extrato bruto com peso 130,4592 g.

Quanto à extração dos componentes das folhas, foi realizada uma extração ácido/base, utilizando ácido fosfórico (4% v/v) e hidróxido de amônio como solventes. Este extrato posteriormente foi particionado em diclorometano, fornecendo o extrato com peso de 2,9612 g.

Já a extração dos componentes das sementes foi feita, primeiramente, à temperatura ambiente, sucessivamente, utilizando hexano como solvente e, posterior destilação a pressão reduzida em evaporador rotativo fornecendo o extrato bruto com peso de 12,3584 g. Um segundo extrato foi feito através de extração ácido/base, utilizando ácido fosfórico (4% v/v) e hidróxido de amônio como solventes. Este extrato posteriormente foi particionado em diclorometano, fornecendo o extrato com peso de 0,930g. Do precipitado da extração ácido/base das sementes foi feita uma nova extração utilizando diclorometano como solvente e obtendo um terceiro extrato com peso de 3,6582 g.

Os extratos foram submetidos aos procedimentos cromatográficos descritos a seguir.

Várias frações desses extratos (assinaladas com *) não foram trabalhadas, pois em sua grande maioria se mostraram semelhantes às frações vizinhas e outras se mostraram cromatograficamente difíceis de separação.

4.2.4 Descrição experimental do isolamento dos constituintes químicos das cascas das raízes da espécie *Tabernaemontana catharinensis*

4.2.4.1 Análise do extrato em metanol (63,2587 g)

Inicialmente parte do extrato em metanol (MCR) (63,2587 g) foi submetido à cromatografia em coluna com gel de sílica, e eluída com diclorometano:metanol em concentração crescente de polaridade até 50% (v/v) de metanol, obtendo-se 16 frações. A **Tabela 1**, a seguir, mostra o procedimento cromatográfico das frações.

Tabela 1: Estudo cromatográfico da fração MCR.

Fração	Código	Quantidade(g)	Substâncias
1	MCR-1	2,1176	
2	MCR-2*	5,7544	11 a 13 e 14 a 19 (impuras)
3	MCR-3*	6,5845	11 a 13 e 14 a 19 (impuras)
4	MCR-4	2,7097	11 a 13 e 14 a 19 (impuras)
5	MCR-5*	1,0936	11 a 13 e 14 a 19 (impuras)
6	MCR-6*	0,2145	11 a 13 e 14 a 19 (impuras)
7	MCR-7*	0,1135	
8	MCR-8*	6,2485	
9	MCR-9*	10,6881	
10	MCR-10*	13,5701	2 (impura)
11	MCR-11	21,8015	2 (impura)
12	MCR-12*	6,8984	2 (impura)
13	MCR-13*	2,7669	
14	MCR-14*	4,2571	
15	MCR-15*	1,1867	
16	MCR-16*	0,6783	

* Frações não trabalhadas

4.2.4.1.1 Análise cromatográfica da Fração MCR-4 (2,7097g)

A fração MCR-4 foi submetida a uma cromatografia em coluna com gel de sílica, e eluída com hexano:acetato de etila, em concentração crescente de polaridade até 100% (v/v) de acetato de etila, obtendo-se 8 frações. A **Tabela 2**, a seguir mostra o procedimento cromatográfico da fração.

Tabela 2: Estudo cromatográfico da fração MCR-4.

Fração	Código	Quantidade(g)	Substâncias
1	MCR4-1*	0,1087	
2	MCR4-2*	0,5102	11 a 13 (impuras)
3	MCR4-3	0,4601	11 a 13 (impuras)
4	MCR4-4	0,2054	11 a 13 e 14 a 19 (impuras)
5	MCR4-5*	0,1204	11 a 13 e 14 a 19 (impuras)
6	MCR4-6*	0,1242	11 a 13 e 14 a 19 (impuras)
7	MCR4-7*	0,1037	
8	MCR4-8*	0,6252	

* Frações não trabalhadas

4.2.4.1.2 Análise cromatográfica da Fração MCR4-3 (0,4601g)

A fração MCR4-3 foi submetida a uma cromatografia em coluna com gel de sílica, e eluída com hexano:acetato de etila com gradiente crescente de polaridade até 15% (v/v) de acetato de etila, obtendo-se 3 frações. A **Tabela 3** mostra o procedimento cromatográfico da fração.

Tabela 3: Estudo cromatográfico da fração MCR4-3.

Fração	Código	Quantidade(g)	Substâncias
1	MCR4-3-1	0,0064	11,12 e 13
2	MCR4-3-2*	0,0117	
3	MCR4-3-3*	0,2802	

* Frações não trabalhadas

4.2.4.1.3 Análise cromatográfica da Fração MCR4-4 (0,2054g)

A fração MCR4-4 foi submetida a uma cromatografia em camada delgada preparativa (placa coberta com gel de sílica com 1 mm de espessura), utilizando como eluente, hexano:acetato de etila 10% (v/v), obtendo-se o isolamento da mistura das substâncias **14, 15 e 16** (0,0131 g) e da mistura das substâncias **17, 18 e 19** (0,0082 g).

4.2.4.1.4 Análise cromatográfica da Fração MCR11 (8,5236g)

Uma parte da fração MCR11 foi submetida a uma cromatografia em coluna com gel de sílica, e eluída com diclorometano:metanol em concentração crescente de polaridade até metanol 100% (v/v), obtendo-se 8 frações. A **Tabela 4** mostra o procedimento cromatográfico da fração.

Tabela 4: Estudo cromatográfico da fração MCR11.

Frações	Código	Quantidade (g)	Substância
1	MCR11-6-1*	0,0519	
2	MCR11-6-2*	0,0606	
3	MCR11-6-3*	0,2156	2 (impura)
4	MCR11-6-4	1,3662	2
5	MCR11-6-5*	0,6302	2 (impura)
6	MCR11-6-6*	0,8397	2 (impura)
7	MCR11-6-7*	2,3615	2 (impura)
8	MCR11-6-8*	0,0173	

* Frações não trabalhadas

4.2.5 Descrição experimental do isolamento dos constituintes químicos das sementes da espécie *Tabernaemontana catharinensis*

4.2.5.1 Análise cromatográfica do extrato em hexano (12,3584 g)

Inicialmente, o extrato em hexano (H) (12,3584 g) foi submetido à cromatografia em coluna com gel de sílica, e eluída com hexano:acetato de etila em concentração crescente de polaridade até 100% (v/v) de acetato de etila, obtendo-se 7 frações. A **Tabela 5**, a seguir, mostra o procedimento cromatográfico das frações.

Tabela 5: Estudo cromatográfico da fração H.

Fração	Código	Quantidade(g)	Substância
1	H1*	0,0116	1 (impura)
2	H2*	0,1485	1 (impura)
3	H3	1,4775	1 (impura)
4	H4*	0,6211	1 (impura)
5	H5*	2,6719	1 (impura)
6	H6*	0,3134	1 (impura)
7	H7*	0,4321	1 (impura)

* Frações não trabalhadas

4.2.5.1.1 Análise cromatográfica da fração H3 (1,4775g)

A fração H3-5-3 foi submetida a uma cromatografia em coluna com gel de sílica, e eluída com hexano:acetato de etila, em concentração crescente de polaridade até 100% (v/v) de acetato de etila. Obtiveram-se 4 frações. A **Tabela 6** mostra o procedimento cromatográfico da fração.

Tabela 6: Estudo cromatográfico da fração H3.

Fração	Código	Quantidade(g)	Substância
1	H3-1	0,0712	1
2	H3-2*	0,2152	1 (impura)
3	H3-3*	0,5419	
4	H3-4*	0,1257	

* Frações não trabalhadas

4.2.5.2 Análise do extrato das sementes em diclorometano referente à fase orgânica da partição com diclorometano (0,930g)

Inicialmente parte do extrato em diclorometano (S) (0,930g) foi submetido à cromatografia em coluna com gel de sílica, e eluída com diclorometano:metanol em concentração crescente de polaridade até 20% (v/v) de metanol, obtendo 4 frações. A **Tabela 7** mostra o procedimento cromatográfico das frações.

Tabela 7: Estudo cromatográfico da fração S.

Fração	Código	Quantidade(g)	Substância
1	S1*	0,0075	10 (impura)
2	S2	0,3004	
3	S3*	0,2116	
4	S4*	0,2421	

* Frações não trabalhadas

4.2.5.2.1 Análise cromatográfica da Fração S2 (0,3004g)

A fração S2 foi submetida a uma cromatografia em coluna com gel de sílica, e eluída com diclorometano:metanol, em concentração crescente de polaridade até 15% (v/v) de metanol. Obtiveram-se 2 frações. A **Tabela 8** mostra o procedimento cromatográfico da fração.

Tabela 8: Estudo cromatográfico da fração S2.

Frações	Código	Quantidade(g)	Substância
1	S2-1	0,0097	10
2	S2-2	0,0993	10 (impura)

4.2.5.3 Análise do extrato das sementes em diclorometano referente ao precipitado da extração ácido/base (3,6582 g)

Inicialmente, o extrato em diclorometano (SPD) (3,6582 g) foi submetido à cromatografia em coluna com gel de sílica, e eluída com diclorometano:metanol em concentração crescente de polaridade até 50% (v/v) de metanol, obtendo 9 frações. A **Tabela 9**, a seguir mostra o procedimento cromatográfico das frações.

Tabela 9: Estudo cromatográfico da fração SPD.

Frações	Código	Quantidade(g)	Substância
1	SPD-1*	0,1595	
2	SPD-2*	0,2152	
3	SPD-3*	0,0140	
4	SPD-4*	0,0384	
5	SPD-5*	0,0127	
6	SPD-6*	0,6654	
7	SPD-7*	0,2255	
8	SPD-8*	0,3428	6 (impura)
9	SPD-9	0,9143	6

* Frações não trabalhadas

4.2.6 Descrição experimental do isolamento dos constituintes químicos das folhas da espécie *Tabernaemontana catharinensis*

4.2.6.1 Análise do extrato em diclorometano referente à fase orgânica da partição em diclorometano (2,9612g)

Inicialmente, o extrato em diclorometano (ABF) (2,9612g) foi submetido à cromatografia em coluna com gel de sílica, e eluída com diclorometano:metanol em concentração crescente de polaridade até 15% (v/v) de metanol, obtendo-se 5 frações. A **Tabela 10** mostra o procedimento cromatográfico das frações.

Tabela 10: Estudo cromatográfico da fração ABF.

Fração	Código	Quantidade(g)	Substâncias
1	ABF1*	0,077	
2	ABF2	0,2565	7, 8 e 9 (impuras)
3	ABF3	0,2337	3, 4 e 5 (impuras)
4	ABF4*	0,4715	3, 4 e 5 (impuras)
5	ABF5*	1,1916	

* Frações não trabalhadas

4.2.6.1.1 Análise cromatográfica da Fração ABF2 (0,2565g)

A fração ABF2 foi submetida a uma cromatografia em camada delgada preparativa utilizando como eluente, diclorometano:metanol 1% (v/v), obtendo-se a mistura das substâncias **7**, **8** e **9** (0,0082 g)

4.2.6.1.2 Análise cromatográfica da Fração ABF3 (0,4715g)

A fração ABF3 foi submetida a uma cromatografia em camada delgada preparativa utilizando como eluente diclorometano:metanol 1% (v/v), obtendo-se a mistura das substâncias **3** e **4** (0,0233 g) e a substância **5** (0,0164 g).

4.2.7 Preparo das amostras para o teste biológico de inibição da enzima acetilcolinesterase (método quantitativo de Ellman modificado)

O teste de inibição da enzima acetilcolinesterase foi realizado na Faculdade de Farmácia da UFRJ.

O teste foi realizado apenas com dois alcalóides (**1** e **2**) dos oito isolados, pois estes se encontram majoritariamente na espécie em estudo, a *T. catharinensis*. Para realização do teste, foram preparadas soluções na concentração 1mg/mL em EtOH 10% de cada substância analisada.

4.2.7.1 Preparo das amostras na microplaca de 96 poços e leitura da absorbância

O experimento foi realizado em triplicata. A placa, onde é realizado este tipo de teste, não deve ser utilizada por inteiro, pois não haveria tempo de aplicar as amostras em todos os poços sem que a enzima já reagisse em grandes proporções nos primeiros poços aplicados (**Esquema 2, pág. 39**).

As amostras foram preparadas, na microplaca, na seguinte seqüência:

- Adição 5 µL da enzima a 0,226 U/mL em tampão B;
- 10 µL de DTNB 5 mM em tampão C (250 µM de DTNB e 5 mM de MgCl₂ por poço);
- 20 µL da amostra teste (diluição de 1:10);
- 155 µL do tampão B puro;

- 10 μL de ATCI 10 mM em água deionizada (substrato) (500 μM de ATCI por poço).

Observação: o volume total de cada poço é de 200 μL .

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
B	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
C	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
D												
E												
F												
G												
H												

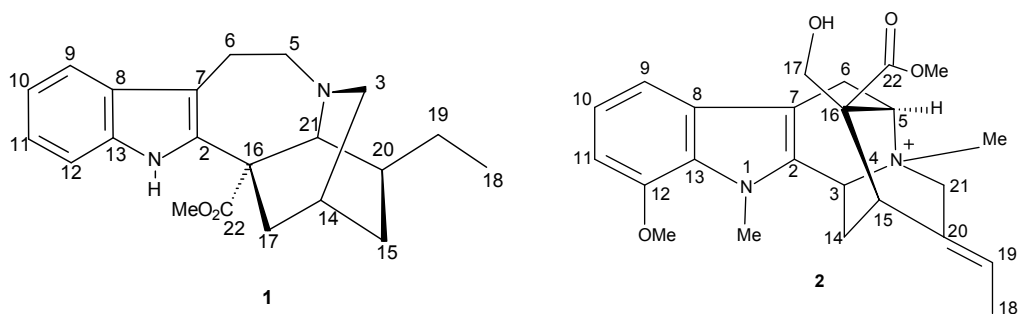
Esquema 2: Representação do preparo das amostras na microplaca.

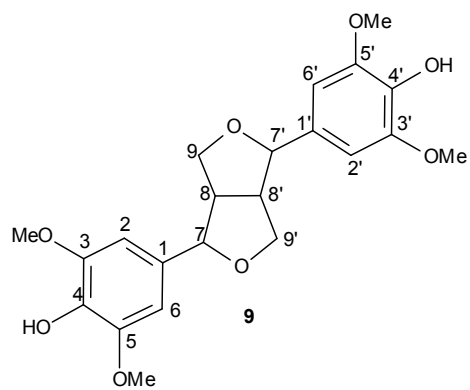
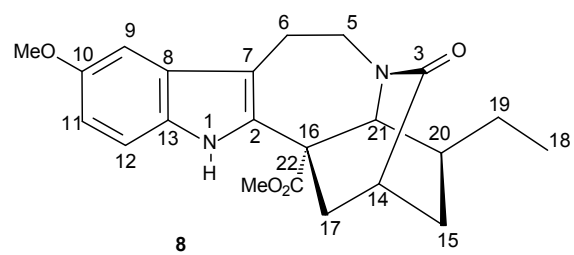
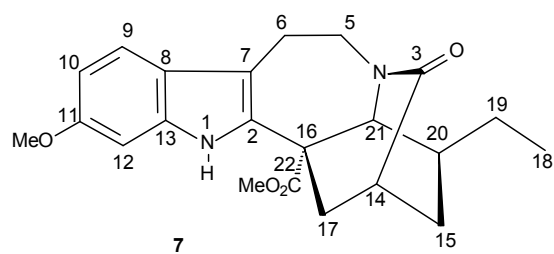
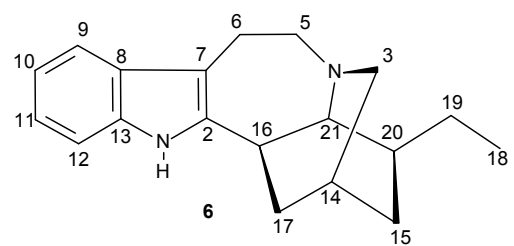
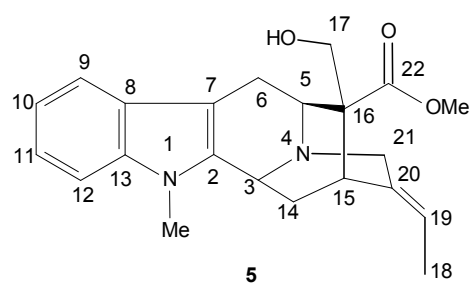
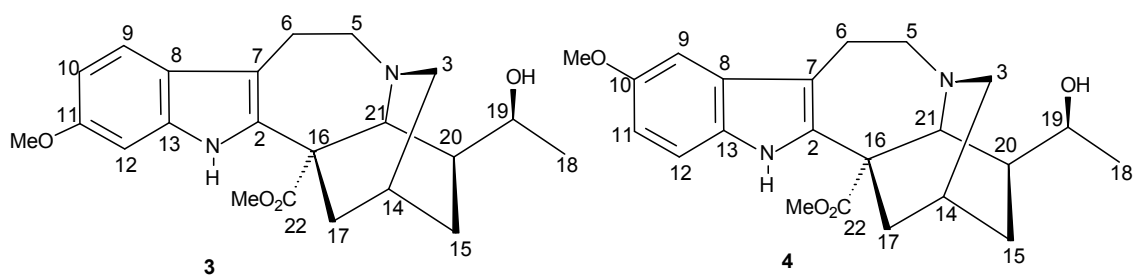
Para a leitura da microplaca foi utilizado o aparelho de espectrofotômetro, ajustado para leitura de absorbância a 412 nm e medida a cada 13 s durante 5 min (equivalentes a 22 leituras). Programa-se também, agitação antes e entre as leituras.

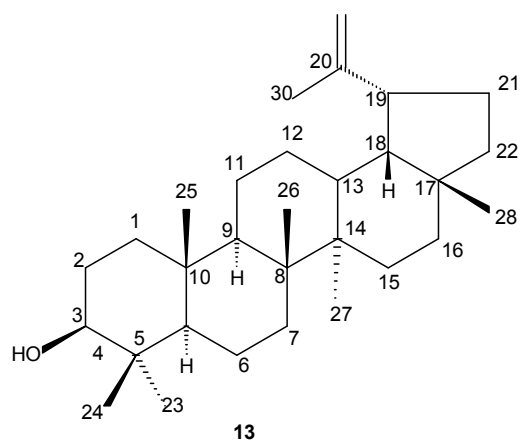
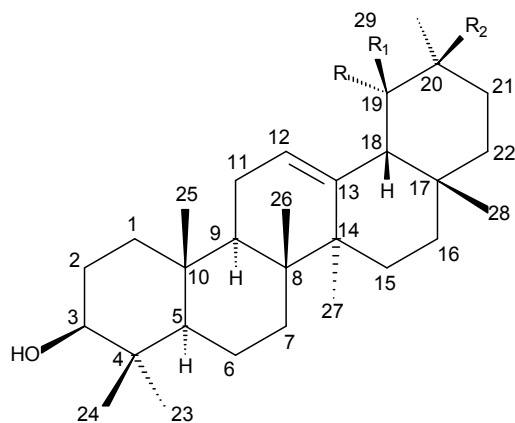
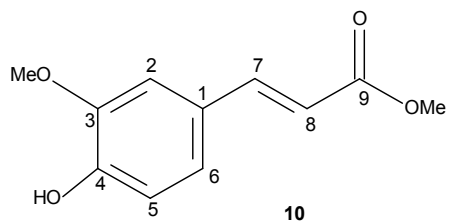
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Substâncias Isoladas

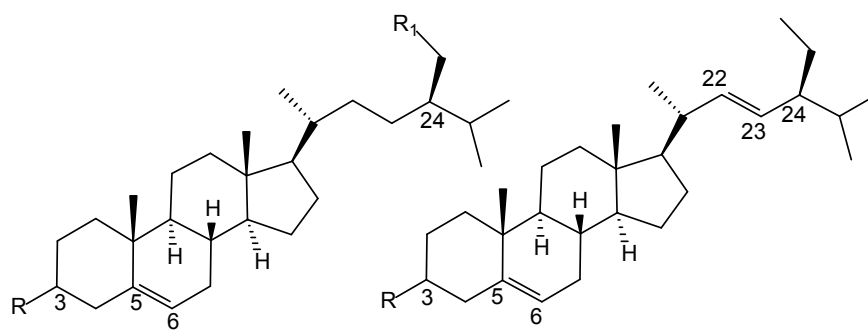
O estudo da espécie *Tabernaemontana catharinensis* levou ao isolamento e identificação de 19 substâncias, sendo os alcalóides: coronaridina (**1**), 12-metoxi-*N_b*-voachalotina (**2**), isovoacristina (**3**), voacristina (**4**), voachalotina (**5**), ibogamina (**6**), 3-oxoisovoacangina (**7**) e 3-oxovoacangina (**8**); os esteróides: β -sitosterol (**14**), campesterol (**15**), estigmasterol (**16**), sitostenona (**17**), campestenona (**18**) e estigmastenona (**19**); os triterpenos: α -amirina (**11**), β -amirina (**12**) e lupeol (**13**), o fenilpropanoide: éster do ácido coniferílico (**10**) e a lignana: siringaresinol (**9**).







- 11** $R_1 = \text{Me}$, $R_2 = \text{H}$
12 $R = R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{Me}$



- 14.** R : bOH ; R_1 : Me
15. R : bOH ; R_1 : H
17. R : $=\text{O}$; R_1 : Me
18. R : $=\text{O}$; R_1 : H

- 16.** R : bOH
19. R : $=\text{O}$

5.2 Determinação Estrutural das Substâncias Isoladas

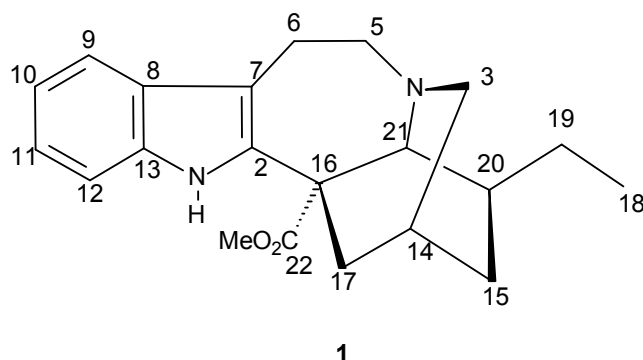
5.2.1. Alcalóides Indólicos Monoterpênicos

Para a determinação estrutural dos alcalóides indólicos monoterpênicos isolados de *Tabernaemontana catharinensis* neste trabalho foram consideradas informações sobre as esteroquímicas de alguns alcalóides, observadas através da biossíntese destes (Dewick, 1997), e também dados de análises cromatográficas sobre esta classe de substâncias que forneceram indícios sobre os esqueletos carbônicos das substâncias isoladas nesta espécie (Harborne, 1998).

Baseando-se em métodos colorimétricos, utilizados como reagentes reveladores específicos para substâncias nitrogenadas, como por exemplo, o reagente de Dragendorff, aliado à técnica de extração ácido/base, pôde-se inferir a presença de alcalóides nos extratos brutos (Harborne, 1998). O reagente de Dragendorff utilizado na detecção de alcalóides fornece um precipitado vermelho-alaranjado com extratos ou substâncias, indicando assim a presença de alcalóides (Harborne, 1998).

Como dito anteriormente todos os esqueletos dos alcalóides indólicos monoterpênicos são derivados do alcalóide strictosidina e a maioria destes contém um grupo carbometoxila (Danieli e Palmisano, 1986, Van Beek et al. 1988). Uma característica importante no gênero *Tabernaemontana*, é que a maioria dos alcalóides isolados pertence à subclasse com esqueletos do tipo plumerano, corinanteano (principalmente do subtipo vobasina), ibogano (principalmente do subtipo coronaridina) sendo este majoritário e característico no gênero. Estas informações são de grande valia na identificação dos alcalóides de *Tabernaemontana catharinensis* realizadas neste trabalho.

5.2.1.1 Substância 1



A substância **1** foi isolada do extrato bruto em hexano das sementes dos frutos verdes de *T. catharinensis*, apresentando-se como um óleo amarelo-claro, a qual apresentou teste positivo para alcalóides quando submetida à análise de cromatografia em camada fina, utilizando como revelador cromogênico o reagente de Dragendorff (Harborne, 1998).

O espectro na região do infravermelho da substância **1** (**Figura 10, pág. 51**) apresenta absorções a 3387 (N-H), 1732 (C=O de éster) e a 1641 e 748 cm^{-1} (anel benzênico), sugerindo a presença de um anel aromático dissustituído, um grupo N-H e uma função éster (Lambert et al., 1987; Verpoorte, 1986)

O espectro na região do ultravioleta da substância **1** (**Figura 11, pág. 52**) apresenta três bandas em λ_{max} em 230 nm ($\log \varepsilon$ 4,3), λ_{max} em 285 nm ($\log \varepsilon$ 3,9), λ_{max} em 292 nm ($\log \varepsilon$ 3,8), respectivamente, característico de grupo cromóforo do tipo indol (Verpoorte, 1986).

A análise do espectro de RMN ^{13}C -APT (**Figura 17, pág. 58; Tabela 11, pág. 49**) do alcalóide **1** permitiu reconhecer a presença de vinte e um átomos de carbono, sendo dois metílicos (sendo um ligado a um oxigênio, característico de grupo metílico de éster), seis metilênicos (todos sp^3 , sendo dois ligados a um

átomo de nitrogênio), sete metínicos (sendo quatro sp^2 característicos de carbonos aromáticos, três sp^3 , sendo um ligado a um átomo de nitrogênio) e seis quaternários (sendo um sp^3 , cinco sp^2 , dos quais um característico de carbono carbonílico) (Bretmaier e Voelter, 1987; Friebohn, 1993).

Esses dados, em conjunto com os dados do espectro de CG/EM (**Figura 27, pág. 68**), o qual apresentou o pico do íon molecular em m/z 338 (100%) Daltons, permitiram propor a fórmula molecular $C_{21}H_{26}N_2O_2$ para o alcalóide **1**, caracterizando um Índice de Deficiência de Hidrogênio (IDH) igual a 10.

O espectro de massas (**Figura 27, pág. 68**) apresenta também fragmentos em m/z 253 (18%) e 214 (10%) que caracterizam a presença de um núcleo indólico, e um fragmento em m/z 323 (45%) (**Esquema 3, pág. 50**) característico da parte alifática não substituída de um alcalóide indólico com esqueleto tipo ibogano (Verpoorte, 1986).

O espectro de RMN 1H do alcalóide **1** (**Figuras 12 a 16, págs. 53 a 57; Tabela 11, pág. 49**) apresentou sinais (δ_H) correspondentes a grupos metila (CH_3), metoxila de grupo carbometoxila (Me-O), hidrogênios aromáticos, grupos metilênicos (CH_2), grupos metínicos (CH) e um hidrogênio ligado a nitrogênio referente a grupamento amina (Friebohn, 1993).

O espectro de RMN 1H do alcalóide **1** (**Figura 13 e 14, págs. 54 e 55; Tabela 11, pág. 49**) apresenta quatro sinais relativos a hidrogênios aromáticos acoplando entre si em δ_H 7,51 (1H, d, $J = 8,2$ Hz; H-9); 7,18 (1H, t, $J = 8,2$ Hz; H-11); 7,12 (1H, t, $J = 8,2$ Hz; H-10); 7,28 (1H, d, $J = 8,2$ Hz; H-12) característicos do anel A benzênico de um núcleo indólico livre de substituintes (Lounasmaa e Tolvanen, 1986), antes sugerido pelo espectro na região do ultravioleta. Este grupo foi confirmado através das correlações heteronucleares dos átomos de carbono metínicos, apresentadas no mapa de correlação HSQC (**Figura 22, pág.**

63), através das correlações a $^1J_{CH}$ entre CH-9 (δ_C 118,4)/H-9 (δ_H 7,51), CH-10 (δ_C 119,3)/H-10 (δ_H 7,12), CH-11 (δ_C 122,0)/H-11 (δ_H 7,18), CH-12 (δ_C 110,4)/H-12 (δ_H 7,28), que juntamente com a presença de um sinal singlete largo a δ_H 7,88, apresentado no espectro de RMN 1H (**Figura 14, pág. 55**), referente a um hidrogênio de um grupo N-H, confirma a presença de um núcleo indólico livre de substituintes (Azoug et al., 1995)

As correlações homonucleares apresentadas no mapa de correlação 1H - 1H -COSY (**Figura 19, pág. 60**) reforçam a proposta da presença do anel A benzênico dissustituído de um núcleo indólico.

A presença do núcleo indólico livre de substituintes foi corroborada pelas correlações heteronucleares à longa distância apresentadas no mapa de correlação HMBC (**Figura 24, pág. 65**) através das correlações $^3J_{CH}$ entre CH-9 (δ_C 118,4)/H-11 (δ_H 7,51), CH-10 (δ_C 119,3)/H-12 (δ_H 7,12), CH-11 (δ_C 122,0)/H-9 (δ_H 7,18), CH-12 (δ_C 110,4)/H-10 (δ_H 7,28), C-2 (δ_C 136,6)/2H-6 (δ_H 3,23 e 3,05) e C-13 (δ_C 135,5)/H-9 (δ_H 7,51)/H-11 (δ_H 7,18), as demais correlações estão descritas na **Tabela 11, pág. 49**.

A presença de um grupo carbometoxila ligado ao carbono C-16 comum no esqueleto para alcalóides indólicos monoterpênicos (Dewick, 1997; Zenk, 1980), foi confirmada pela presença de um simpleto integrando para três hidrogênios em δ_H 3,75, relativo ao grupo MeO-22 (δ_C 52,6), juntamente com um sinal referente a um carbono carbonílico em δ_C 175,5 ambos apresentados no mapa de correlação HSQC (**Figura 22, pág. 63**). A localização deste grupo foi apoiada nos aspectos biossintéticos para os alcalóides indólicos monoterpênicos (Dewick, 1997; Zenk, 1980), e também corroborada pelas correlações heteronucleares à longa distância

apresentadas no mapa de correlação HMBC (**Figura 24, pág. 65**) através da correlação $^3J_{CH}$ entre C-22 (δ_C 175,5)/O-Me-22 (δ_H 3,75).

A presença de quatro sinais multipletos no espectro de RMN 1H (**Figura 15, pág. 56**) referentes aos dois grupos metilênicos do núcleo indólico acoplando entre si, 2H-5 [(δ_H 3,25, m, H-5a) e (δ_H 3,42, m, H-5b)] α a um átomo de nitrogênio, com 2H-6 [(δ_H 3,23, m, H-6a) e (δ_H 3,05, H-6b)], juntamente com os fragmentos com $m/z= 253$ e $m/z= 214$ (**Esquema 3, pág. 50**) confirmam a proposta de um núcleo indólico livre de substituintes, e um grupo carbometoxila ligado ao átomo de carbono C-16, comum para os alcalóides indólicos monoterpênicos (Budzikiewicz et al., 1964; Rastogi et al., 1980).

A presença de dois sinais duplodupletos largos no espectro de RMN 1H (**Figura 15, pág. 56**) foi inferida aos hidrogênios ligados ao átomo de carbono C-3 ligado ao átomo de nitrogênio em δ_H 2,94 (H-3a) e 2,84 (H-3b), e um sinal triplo integrando para três hidrogênios em δ_H 0,94 com $J= 7,4$ Hz, relativo a um grupo metila apresentado no espectro de RMN 1H (**Figura 16, pág. 57**), onde sua presença está corroborada pelo fragmento $m/z= 323$ no espectro de massas (**Figura 27, pág. 68**), indicando a perda de 15 u.m.a., corroboram com a indicação da unidade monoterpênica do alcalóide (**Esquema 3, pág. 50**). (Budzikiewicz et al., 1964)

A atribuição dos deslocamentos químicos dos hidrogênios metilênicos e metínicos restantes da cadeia alifática (**Tabela 11, pág. 49**), foi feita com base nos parâmetros conhecidos para deslocamentos químicos de hidrogênio. As correlações observadas no mapa de correlação HSQC (**Tabela 11, pág. 49**; **Figura 22, pág. 63**) e confirmadas pelo mapa de correlação HMBC (**Figura 24, pág. 65**) através das correlações a $^3J_{CH}$ entre CH₂-17 (δ_C 36,7)/H-3b (δ_H 2,84),

CH₂-5 (δ_C 52,2)/H-3b (δ_H 2,84)/H-21 (δ_H 3,60), CH₂-3 (δ_C 51,6)/H-17a (δ_H 2,60)/H-21 (δ_H 3,60), CH-20 (δ_C 39,2)/3H-18 (δ_H 0,94), confirmam os deslocamentos químicos propostos para alguns dos hidrogênios metilênicos e metínicos da cadeia alifática. As demais correlações observadas no mapa de correlação HMBC estão descritas na **Tabela 11, pág. 49**.

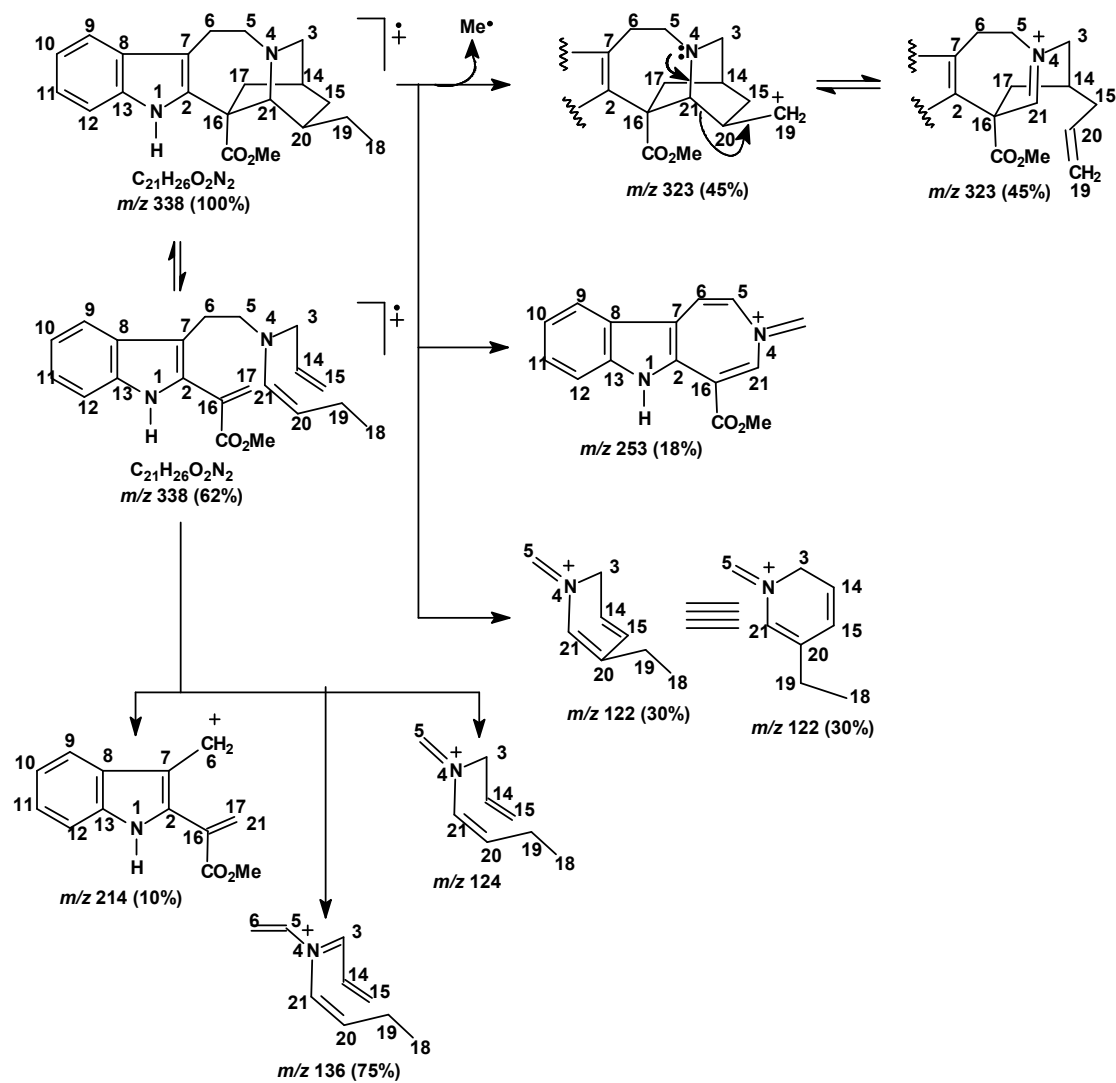
O conjunto destes dados permitiu definir um esqueleto ibogano e propor a estrutura **1** para o alcalóide isolado. Prova final desta estrutura veio da comparação dos dados de RMN ¹H e ¹³C-APT (**Figuras 12 e 17, págs. 53 e 58; Tabela 11, pág. 49**) com dados da literatura para o alcalóide coronaridina (**1**), anteriormente isolada de *T. catharinensis* e *T. laeta* (Lounasmaa e Tolvanen, 1986; Medeiros, 2003).

A estereoquímica relativa dos átomos de carbono estereogênicos proposta para a coronaridina (**1**) foi feita com base em dados biogenéticos, visto que todos os alcalóides com esqueleto do tipo ibogano isolados de espécies do gênero *Tabernaemontana* apresentam as configurações dos carbonos estereogênicos como apresentadas em **1** (Danieli e Palmisano, 1986).

A coronaridina (**1**) é um dos alcalóides mais abundantes na família Apocynaceae, possuindo diversas atividades biológicas, tais como, ação no sistema nervoso central, propriedades anticolinesterásica (Andrade et al. 2005), ação contraceptiva (Meyer et al., 1973) e antimalárica (Lemos et al., 1996).

Tabela 11: Dados espectrais de RMN ^1H (400 MHz) e RMN ^{13}C (100 MHz) do alcalóide **1**, incluindo os resultados dos experimentos bidimensionais HSQC e HMBC, em CDCl_3 . Os valores dos deslocamentos químicos δ_{H} e δ_{C} estão em ppm e as constantes de acoplamento J estão em Hz.

1				
HSQC			HMBC	
C	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
2	136,6	-		
7	110,5	-		2H-6
8	128,8	-		2H-5, H-9
13	135,5	-		2H-6, H-10, H-12
16	53,2	-		H-9, H-11
22	175,5	-		H-17a, MeO-22
CH				
9	118,4	7,51 (d, 8,2)		H-11
10	119,3	7,12 (t, 8,2)		H-12
11	122,0	7,18 (t, 8,2)		H-9
12	110,4	7,28 (d, 8,2)		H-10
14	27,5	1,93 (sl)	H-3b	
20	39,2	1,36 (m)		3H-18
21	57,6	3,60 (sl)		H-5b
CH₂				
3	51,6	2,94 (dl, 7,2) 2,84 (dl, 7,2)		H-17a, H-21
5	53,2	3,25 (m), 3,42 (m)	H-6b	
6	22,2	3,23 (m), 3,05 (m)		
15	32,2	1,76 (m), 1,17 (m)		H-3b
17	36,7	2,60 (dl, 13,7) 1,94 (dl, 13,7)		H-3b
19	26,7	1,60 (m), 1,48 (m)	3H-18	
CH₃				
18	11,8	0,94 (t, 7,4)		
MeO-22	52,6	3,75 (s)		
HN-1	-	7,88 (sl)		



Esquema 3: Interpretação mecanística dos principais fragmentos no espectro de massas do alcalóide 1.

Figura 10: Espectro na região do infravermelho do alcalóide **1**.

Figura 11: Espectro na região do ultravioleta do alcalóide **1**.

Figura 12: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, em CDCl_3) do alcalóide **1**.

Figura 13: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da expansão entre δ_{H} 5,0 a 9,0 do alcalóide **1**.

Figura 14: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da expansão entre δ_{H} 7,0 a 8,0 do alcalóide **1**.

Figura 15: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da expansão entre δ_{H} 2,5 a 4,0 do alcalóide **1**.

Figura 16: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da expansão entre δ_{H} 0,5 a 2,0 do alcalóide **1**.

Figura 17: Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) do alcalóide **1**.

Figura 18: Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) da expansão entre δ_{C} 10,0 a 135,0 do alcalóide **1**.

Figura 19: Mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY (400 MHz, CDCl_3) do alcalóide **1**.

Figura 20: Ampliação (região 0,0 a 4,0 ppm) do Mapa de Correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY do alcalóide **1**.

Figura 21: Ampliação (região 5,5 a 8,5 ppm) do Mapa de Correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY do alcalóide **1**.

Figura 22: Mapa de Correlação heteronuclear HSQC do alcalóide **1**.

Figura 23: Ampliação (região 10,0 a 70,0 ppm) do Mapa de Correlação heteronuclear HSQC do alcalóide **1**.

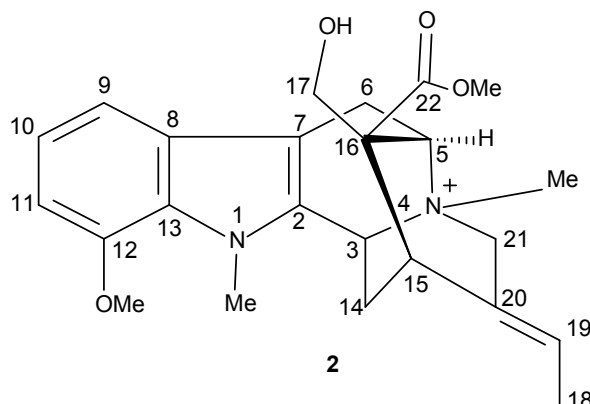
Figura 24: Mapa de Correlação heteronuclear HMBC do alcalóide **1**.

Figura 25: Ampliação (região 10,0 a 60,0 ppm) do Mapa de Correlação heteronuclear HMBC do alcalóide **1**.

Figura 26: Ampliação (região 100,0 a 180,0 ppm) do Mapa de Correlação heteronuclear HMBC do alcalóide **1**.

Figura 27: Espectro de massas do alcalóide 1.

5.2.1.2 Substância 2



A substância **2** foi isolada do extrato em metanol das cascas das raízes de *T. catharinensis*, apresentando-se como um óleo castanho, a qual apresentou teste positivo para alcalóides quando submetida à análise de cromatografia em camada fina, utilizando como revelador cromogênico o reagente de Dragendorff (Harborne, 1998).

O espectro na região do infravermelho da substância **2** (**Figura 28, pág. 75**) apresenta absorções a 3385 (O-H), 2951 (N-CH₃) 1734 (C=O de éster) e a 1639 e 732 cm⁻¹ (anel benzênico), sugerindo a presença de um anel aromático trissubstituído, um grupo N-CH₃ e uma função éster (Lambert et al., 1987; Verpoorte, 1986).

O espectro na região do ultravioleta da substância **2** (**Figura 29, pág. 76**) apresenta três bandas em λ_{max} em 233,5 nm (log ϵ 4,7), λ_{max} em 273,5 nm (log ϵ 4,1), λ_{max} em 295,5 nm (log ϵ 4,0), respectivamente, característico de grupo cromóforo do tipo indol (Verpoorte, 1986).

A análise do espectro de RMN ¹³C (**Figura 33, pág. 80; Tabela 12, pág. 73**) do alcalóide **2** permitiu reconhecer a presença de vinte e quatro átomos de carbono, sendo cinco metílicos (dois ligados a um oxigênio, um característico de grupo metílico de éster e outro de grupo metoxila ligado a anel aromático, e outro ligado a átomo de carbono sp², outros dois ligados a um átomo de nitrogênio), carbonos metilênicos (todos sp³, sendo um ligado a um átomo de nitrogênio e um carbinólico), metínicos (sendo quatro sp², dos quais três característicos de carbonos aromáticos) e quaternários (sendo sete sp², dos quais um característico

de carbono carbonílico de éster em δ_C 172,8) (Bretmaier e Voelter, 1987; Friebolin, 1993).

Esses dados permitiram postular a fórmula molecular $C_{24}H_{31}N_2O_4$ para o alcalóide **2**.

O espectro de RMN 1H do alcalóide **2** mostrou-se semelhante ao alcalóide **5** (voachalotina) (**Figuras 30 à 32, págs. 77 à 79; Tabela 12, pág. 73**) apresentando sinais (δ_H) correspondentes a grupos metila (CH_3), dois grupos metoxila, hidrogênios aromáticos, grupos metilênicos (CH_2), grupos metínicos (CH) e dois grupos metila ligado a nitrogênio referente a grupamento N-metila (Friebolin, 1993).

O espectro de RMN 1H (**Figura 32, pág. 79**) apresenta três sinais de hidrogênios aromáticos acoplando entre si em δ_H 7,27 (1H, d, 7,0 Hz; H-9), 7,25 (1H, t, 7,0 Hz; H-10) e 6,93 (1H, d, 7,0 Hz; H-11) característicos do anel A benzênico de um núcleo indólico com substituinte (Lounasma e Tolvanen, 1986; Souza, 2006) antes sugerido pelo espectro na região do ultravioleta. No espectro de RMN 1H (**Figura 30, pág. 77**) observou-se um simpleto em δ_H 4,18, característicos de metoxila ligada a anel benzênico, correspondente ao sinal em δ_C 55,3 no espectro de RMN ^{13}C , sugerindo então a presença de um grupo metoxila ligado ao anel A.

O mapa de correlação HMQC (**Figura 36, pág. 83**) permitiu confirmar a presença deste grupo através da correlação, OCH_3 -12 (δ_C 55,3)/ 3H - OCH_3 -12 (δ_H 4,18, $^1J_{CH}$), corroborada ainda com a correlação, C-12 (δ_C 147,6)/ 3H - OCH_3 -12 (δ_H 4,18, $^3J_{CH}$), observada no mapa de correlação HMBC (**Figura 39, pág. 86; Tabela 12, pág. 73**), confirmando a presença e a localização de um grupo metoxila no anel A, ligado ao átomo de carbono C-12.

O modo de substituição do anel benzênico foi confirmado através das correlações heteronucleares dos átomos de carbono metínicos, apresentadas no mapa de correlação HMQC (**Figura 36, pág. 83**), através das correlações a $^1J_{CH}$ entre CH-9 (δ_C 111,7)/H-9 (δ_H 7,27), CH-10 (δ_C 120,9)/H-10 (δ_H 7,25), CH-11 (δ_C 103,1)/H-11 (δ_H 6,93), que juntamente com a presença de um sinal simpleto em δ_H 4,18 correlacionando com o sinal em δ_C 32,9, referente a um grupo CH_3 de um grupo N- CH_3 , confirma a presença de um núcleo indólico substituído com um grupo metoxila na posição 12, e com um grupo metila ligado ao átomo de

nitrogênio-1 (Lounasmaa e Tolvanen, 1986; Azoug et. al., 1995; Braga & Reis, 1987; Gower et al., 1986; Pereira et al., 2008).

As correlações homonucleares apresentadas no mapa de correlação ^1H - ^1H -COSY (**Figura 35, pág. 82**) reforçam a proposta da presença do anel A benzênico trissubstituído de um núcleo indólico.

A presença do núcleo indólico substituído foi corroborada pelas correlações heteronucleares à longa distância apresentadas no mapa de correlação HMBC (**Figura 39, pág. 86**) através das correlações $^3J_{\text{CH}}$ entre CH-9 (δ_{C} 111,7)/H-11 (δ_{H} 6,93), CH-11 (δ_{C} 103,1)/H-9 (δ_{H} 7,27), C-12 (δ_{C} 147,6)/H-10 (δ_{H} 7,25)/OMe-12 (δ_{H} 4,18) e C-13 (δ_{C} 126,9)/H-9 (δ_{H} 7,27)/H-11 (δ_{H} 6,93)/N-Me-1 (δ_{H} 4,18), as demais correlações estão descritas na **Tabela 12, pág. 73**.

A presença de um grupo carbometoxila ligado ao carbono C-16 comum no esqueleto para alcalóides indólicos monoterpênicos (Dewick, 1997; Zenk, 1980; Braga e Reis, 1987; Gower et al., 1986), foi confirmada pela presença de um simpleto integrando para três hidrogênios em δ_{H} 3,99, relativo ao grupo MeO-22 (δ_{C} 52,3), juntamente com um sinal referente a um carbono carbonílico em δ_{C} 176,4 ambos apresentados no mapa de correlação HMQC (**Figura 37, pág. 84**). A localização deste grupo foi apoiada nos aspectos biossintéticos para os alcalóides indólicos monoterpênicos (Dewick, 1997; Zenk, 1980; Braga e Reis, 1987), e também corroborada pelas correlações heteronucleares à longa distância apresentadas no mapa de correlação HMBC (**Figura 40, pág. 87**) através da correlação $^3J_{\text{CH}}$ entre C-22 (δ_{C} 172,8)/MeO-22 (δ_{H} 3,99).

A presença de um grupo metila ligado a um átomo de carbono sp^2 pode ser reconhecida pelo sinal duplete a δ_{H} 1,82 (3H, d, $J = 6,4$ Hz) e pelo quaduplete em δ_{H} 5,60 (1H, $J = 6,4$ Hz), referentes aos hidrogênios 3H-18 e H-19, respectivamente. A presença da ligação dupla, e do grupo metila ligado a esta, foi corroborada ainda através da correlação à longa distância a $^3J_{\text{CH}}$ entre C-20 (δ_{C} 127,6)/3H-18 (δ_{H} 1,82), observada no mapa de correlação HMBC (**Figura 39, pág. 86; Tabela 12, pág. 73**) (Braga e Reis, 1987).

A presença de um carbono metilênico carbinólico na posição 17 (Azoug et al, 1995; Braga & Reis, 1987, Souza, 2006 e Medeiros, 2003) foi confirmada através do mapa de correlação HMQC (**Figura 38, pág. 85; Tabela 12, pág. 73**) onde se observa a correlação a $^1J_{\text{CH}}$ entre CH₂-17 (δ_{C} 62,2)/2H-17 (δ_{H} 3,78 e 3,13). As demais correlações estão descritas na **Tabela 12, pág. 73**.

A atribuição dos deslocamentos químicos dos hidrogênios metilênicos e metínicos restantes da cadeia alifática (**Tabela 12, pág. 73**), foi feita com base nos parâmetros conhecidos para deslocamentos químicos de hidrogênio. As correlações observadas no mapa de correlação HMQC (**Tabela 12, pág. 73; Figura 36, pág. 83**) e confirmadas pelo mapa de correlação HMBC (**Figura 39, pág. 86**) confirmam os deslocamentos químicos propostos para alguns dos hidrogênios metilênicos e metínicos da cadeia alifática. As demais correlações observadas no mapa de correlação HMBC estão descritas na **Tabela 12, pág. 73**.

A presença de um sinal simples no espectro de RMN ^1H (**Figura 31, pág. 78; Tabela 12, pág. 73**) em δ_{H} 3,35 sugeriu a presença de mais um grupo N-Me, agora ligado ao átomo de nitrogênio 4. A localização do grupo N-Me no átomo de nitrogênio 4 foi confirmada pelas correlações apresentadas no mapa de correlação HMBC (**Figura 39, pág. 86**) através das correlações a $^3J_{\text{CH}}$ entre os carbonos CH-3 (δ_{C} 56,5), CH-5 (δ_{C} 64,2) com um sinal em δ_{H} 3,35, referente aos hidrogênios do grupo N-Me-4.

O conjunto desses dados permitiu definir um esqueleto do tipo sapargina (Braga & Reis, 1987) e propor a estrutura para o alcalóide **2** isolado. A prova final dessa estrutura adveio da comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C (**Figuras 30 e 33, págs. 77 e 80; Tabela 12, pág. 73**) com os da literatura para o alcalóide 12-metoxi-*N*_b-voachalotina isolado de *T. catharinensis*, *Peschiera fuchsiaefolia* e *P. campestris* (Braga e Reis, 1987; Gower et al., 1986; Pereira et al., 2008).

Tabela 12: Dados espectrais de RMN ^1H (400 MHz) e RMN ^{13}C (100 MHz) do alcaloide **2**, incluindo os resultados dos experimentos bidimensionais HSQC e HMBC, em comparação com dados de literatura para a 12-metoxi-*N*_b-voachalotina em CDCl_3 . Os valores dos deslocamentos químicos δ_{H} e δ_{C} estão em ppm e as constantes de acoplamento J estão em Hz.

2					
C	HMQC		HMBC		δ_{C} literatura
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	
2	132,4	-		H-6a	132,3
7	101,4	-	2H-6	H-5; H-9	102,3
8	126,9	-		H-10	127,2
12	147,6	-		H-10; MeO-12	148,3
13	126,9	-		H-9; H-11; MeN-1	128,0
16	55,0	-	H-5; H-15		55,0
20	127,6	-		3H-18	127,6
22	172,8	-		H-5; 2H-17; MeO-22	173,2
CH					
3	56,5	6,28 (dl, 11,1)		MeN-4	58,4
5	64,2	4,96 (d, 6,4)		MeN-4	64,9
9	111,7	7,27 (d, 7,0)		H-11	111,6
10	120,9	7,25 (t, 7,0)			120,9
11	103,1	6,93 (d, 7,0)		H-9	104,2
15	29,4	3,31		H-19	30,1
19	119,9	5,60 (q, 6,4)	3H-18		120,0
CH₂					
6	19,0	3,96 (m), 3,30 (m)	H-5		19,1
14	27,7	2,40 (m), 1,86 (m)			28,4
17	62,2	3,78 (m), 3,13 (m)			62,9
21	64,0	5,31 (dl, 15,8), 3,90 (m)		MeN-4	64,8
CH₃					
18	12,1	1,82 (d, 6,4)			11,8

MEN-1	32,9	4,18 (s)	32,2
MEN-4	48,7	3,35 (s)	49,1
MEO-12	55,3	4,18 (s)	56,0
MEO-22	52,8	3,99 (s)	53,2

Figura 28: Espectro na região do infravermelho do alcalóide **2**.

Figura 29: Espectro na região do ultravioleta do alcalóide **2**.

Figura 30: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do alcalóide **2**.

Figura 31: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da expansão entre δ_{H} 1,1 a 4,4 do alcalóide **2**.

Figura 32: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da expansão entre δ_{H} 4,6 a 7,6 do alcalóide **2**.

Figura 33: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do alcalóide **2**.

Figura 34: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da expansão entre δ_{C} 47,0 a 66,0 do alcalóide **2**.

Figura 35: Mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY (400 MHz, CDCl_3) do alcalóide **2**.

Figura 36: Mapa de correlação heteronuclear HMQC do alcalóide **2**.

Figura 37: Ampliação (região 1,0 a 6,0 ppm) do Mapa de Correlação heteronuclear HMQC do alcalóide **2**.

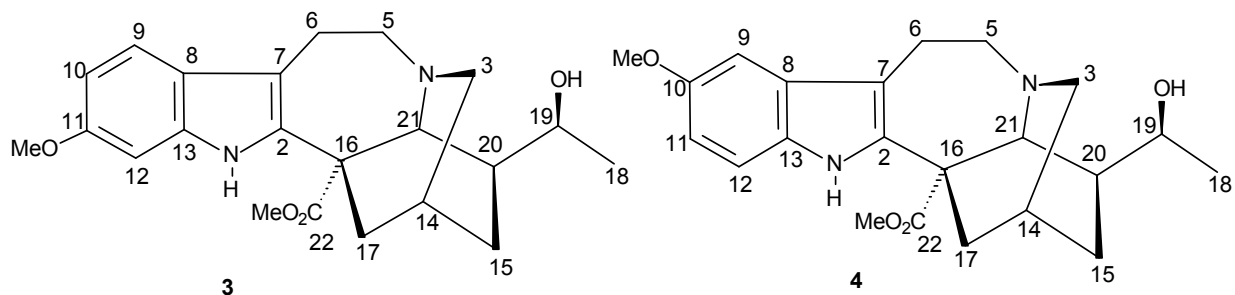
Figura 38: Ampliação (região 3,0 a 7,0 ppm) do Mapa de Correlação heteronuclear HMQC do alcalóide **2**.

Figura 39: Mapa de correlação heteronuclear HMBC do alcalóide **2**.

Figura 40: Ampliação (região 2,0 a 5,0 ppm) do Mapa de Correlação heteronuclear HMBC do alcalóide **2**.

Figura 41: Ampliação (região 2,0 a 7,0 ppm) do Mapa de Correlação heteronuclear HMBC do alcalóide **2**.

5.2.1.3 Substâncias 3 e 4



A mistura contendo as substâncias **3** e **4** foi isolada do extrato ácido/base das folhas de *T. catharinensis*, apresentando-se como um óleo castanho, a qual apresentou teste positivo para alcalóides quando submetida à análise de cromatografia em camada fina, utilizando como revelador cromogênico o reagente de Dragendorff (Harborne, 1998).

O espectro na região do infravermelho da mistura das substâncias **3** e **4** (**Figura 42, pág. 99**) apresenta absorções a 3421 (N-H), 1726 (C=O de éster) e a 1629 cm^{-1} (anel benzênico), sugerindo a presença de um anel aromático trissubstituído, um grupo N-H e uma função éster (Lambert, 1987; Verpoorte, 1986).

O espectro na região do ultravioleta das substâncias **3** e **4** (**Figura 43, pág. 100**) apresenta quatro bandas em λ_{max} em 222,5 nm ($\log \varepsilon$ 4,1), λ_{max} em 233,5 nm ($\log \varepsilon$ 4,7), λ_{max} em 284 nm ($\log \varepsilon$ 4,2), respectivamente, característico de grupo cromóforo do tipo indol com a presença de um grupo metoxila ligado ao anel benzênico (Verpoorte, 1986)

A análise do espectro de RMN ^{13}C (**Figura 49, pág. 106; Tabela 13, pág. 96**) e RMN ^{13}C -APT (**Figura 51, pág. 108; Tabela 13, pág. 96**) da mistura contendo os alcalóides **3** e **4** permitiu reconhecer a presença de átomos de carbono metílicos (sendo dois ligados a um oxigênio, característicos de grupo

metílico de éster e de grupo metoxila ligado a anel aromático), metilênicos (sendo dois ligados a um átomo de nitrogênio), metínicos (sendo três sp^2 característicos de carbonos aromáticos, um sp^3 ligado a um átomo de nitrogênio e um característico de carbono carbinólico em (δ_C 71,3) e quaternários (sendo um sp^3 , seis sp^2 , dos quais um característico de carbono carbonílico em δ_C 175,0) (Bretmaier e Voelter, 1987; Friebohn, 1993) .

Esses dados, em conjunto com os dados do espectro de CG/EM (**Figura 61, pág. 118**), o qual apresentou dois picos no cromatograma com tempos de retenção 20,6 min. (22,2%) e 20,9 min. (56,6%), ambos com a ausência do íon molecular, mas apresentando o pico em m/z 366 (66,7%) Daltons, indicando a perda de 18 unidades de massa, o que permitiram propor a fórmula molecular $C_{22}H_{28}N_2O_4$ para a mistura dos alcalóides **3** e **4**.

O espectro de massas para a mistura dos alcalóides **3** e **4** (**Figuras 61, pág. 118**) apresenta também fragmentos em m/z 244 (4,2%) para o alcalóide **4** e 146 (25%) para o alcalóide **3**, que caracterizam a presença de um núcleo indólico com a presença de 31 unidades de massa a mais do que o alcalóide **1**, relativo à presença de um grupo metoxila (**Esquema 4, pág. 98**) (Verpoorte, 1986).

O espectro de RMN 1H da mistura dos alcalóides **3** e **4** (**Figuras 44 a 48, págs. 101 a 105; Tabela 13, pág. 96**) apresentaram sinais (δ_H) correspondentes a grupos metila (CH_3), metoxilas de grupo carbometoxila e metoxila ligada a anel aromático (Me-O), hidrogênios aromáticos, grupos metilênicos (CH_2), grupos metínicos (CH), hidrogênio ligado a nitrogênio referente a grupamento amina e um hidrogênio ligado a um carbono carbinólico (Friebohn, 1993).

O espectro de RMN 1H da mistura dos alcalóides **3** e **4** (**Figura 48, pág. 105; Tabela 13, pág. 96**) apresenta três sinais relativos a hidrogênios aromáticos formando um sistema do tipo ABX. Alcalóide **3**: δ_H 7,35 (1H, d, $J = 9,7$ Hz; H-9);

6,79 (1H, dd, $J = 8,9$ e $3,1$ Hz; H-10); 6,78 (1H, d, $J = 8,9$ Hz; H-12); Alcalóide **4**: δ_H 6,94 (1H, d, $J = 3,1$ Hz; H-9); 6,85 (1H, dd, $J = 8,9$ e $3,1$ Hz; H-11); 7,17 (1H, d, $J = 8,9$ Hz; H-12), ambos característicos do anel A benzênico de um núcleo indólico com substituinte (Lounasmaa e Tolvanen, 1986; Medeiros, 2003) antes sugerido pelo espectro na região do ultravioleta (**Figura 43** **pág. 99**). Este grupo foi confirmado através das correlações heteronucleares dos átomos de carbono metínicos, apresentadas no mapa de correlação HSQC (**Figura 56**, **pág. 112**), através das correlações a $^1J_{CH}$. Alcalóide **3**: CH-9 (δ_C 119,1)/H-9 (δ_H 7,35), CH-10 (δ_C 109,2)/H-10 (δ_H 6,79) e CH-12 (δ_C 94,3)/H-12 (δ_H 6,78) e para o alcalóide **4**: CH-9 (δ_C 110,7)/H-9 (δ_H 6,94), CH-11 (δ_C 112,3)/H-11 (δ_H 6,85) e CH-12 (δ_C 111,1)/H-12 (δ_H 7,17), que juntamente com a presença de dois sinais simpletos no espectro de RMN 1H (**Figura 47**, **pág. 104**) em δ_H 3,85 (**3**) e 3,87 (**4**) relativos grupos metoxila ligados a anel aromático, e adicionado a esta informação a presença de sinal simpleto largo em δ_H 7,88 referente a um hidrogênio de um grupo N-H para ambos os alcalóides contidos na mistura, confirma a presença de um núcleo indólico com a presença de um grupo metoxila (Lounasmaa e Tolvanen, 1986; Medeiros, 2003).

As correlações homonucleares apresentadas no mapa de correlação 1H - 1H -COSY (**Figura 52**, **pág. 109**) reforçam a proposta da presença do anel A benzênico trissubstituído de um núcleo indólico.

A presença do núcleo indólico com um grupo metoxila foi corroborada pelas correlações heteronucleares à longa distância apresentadas no mapa de correlação HMBC (**Figura 59**, **pág. 116**) através das correlações $^3J_{CH}$. Alcalóide **3**: CH-10 (δ_C 109,2)/H-12 (δ_H 6,78), C-11 (δ_C 156,9)/H-9 (δ_H 7,35)/OMe-11 (δ_H 3,85),

C-13 (δ_C 136,3)/H-9 (δ_H 7,35); Alcalóide **4**: C-10 (δ_C 154,3)/H-12 (δ_H 7,17)/OMe-10 (δ_H 3,87), descritas na **Tabela 13, pág. 96**.

A presença de um grupo carbometoxila, para ambos os alcalóides **3** e **4**, ligado ao carbono C-16 comum no esqueleto para alcalóides indólicos monoterpênicos (Dewick, 1997; Zenk, 1980), foi confirmada pela presença de um simpleto integrando para três hidrogênios em δ_H 3,76, relativo ao grupo MeO-22 (δ_C 53,0), juntamente com um sinal referente a um carbono carbonílico em δ_C 175,0 ambos apresentados no mapa de correlação HSQC (**Figura 56, pág. 113**). A localização deste grupo foi apoiada nos aspectos biossintéticos para os alcalóides indólicos monoterpênicos (Dewick, 1997; Zenk, 1980), e também corroborada pelas correlações heteronucleares à longa distância apresentadas no mapa de correlação HMBC (**Figura 59, pág. 116**) através da correlação $^3J_{CH}$ entre C-22 (δ_C 175,0)/O-Me-22 (δ_H 3,76).

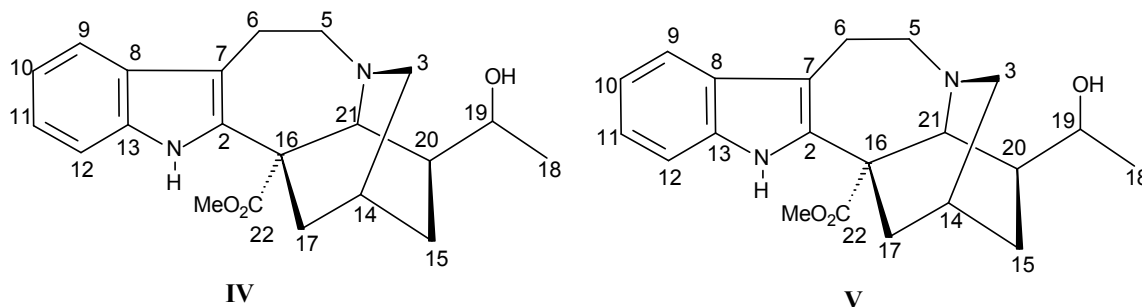
A presença de quatro sinais multipletos no espectro de RMN 1H (**Figura 44, pág. 101**) referentes aos dois grupos metilênicos do núcleo indólico acoplando entre si, 2H-5 [(δ_H 3,48, m, H-5a) e (δ_H 3,17, m, H-5b)] α a um átomo de nitrogênio, com 2H-6 (δ_H 3,17-3,12, m, H-6a e H-6b), juntamente com o fragmento com m/z = 336 (**Esquema 4, pág. 98**) confirmam a proposta de um núcleo indólico com presença de um grupo metoxila, e um grupo carbometoxila ligado ao átomo de carbono C-16, comum para os alcalóides indólicos monoterpênicos (Budzikiewicz et al., 1964).

A presença de dois sinais duplodupletos largos no espectro de RMN 1H (**Figura 46, pág. 103**) foi inferida aos hidrogênios ligados ao átomo de carbono C-3 ligado ao átomo de nitrogênio em δ_H 3,04 (H-3a) e 2,84 (H-3b), e um sinal duplo integrando para três hidrogênios em δ_H 1,13 com J = 6,4 Hz, relativo a um grupo

metila apresentado no espectro de RMN ^1H (**Figura 44, pág. 101**), juntamente com um sinal duploquaduplete em δ_{H} 4,19 com $J = 6,4$ Hz, característico de um hidrogênio carbinólico, corroboram com a indicação da unidade monoterpênica do alcalóide com a presença de um grupo hidroxila ligado ao átomo de carbono CH-19 (Medeiros, 2003).

A atribuição dos deslocamentos químicos dos hidrogênios metilênicos e metínicos restantes da cadeia alifática (**Tabela 13, pág. 96**), foi feita com base nos parâmetros conhecidos para deslocamentos químicos de hidrogênio (Medeiros, 2003). As correlações observadas no mapa de correlação HSQC estão descritas na **Tabela 13, pág. 96**.

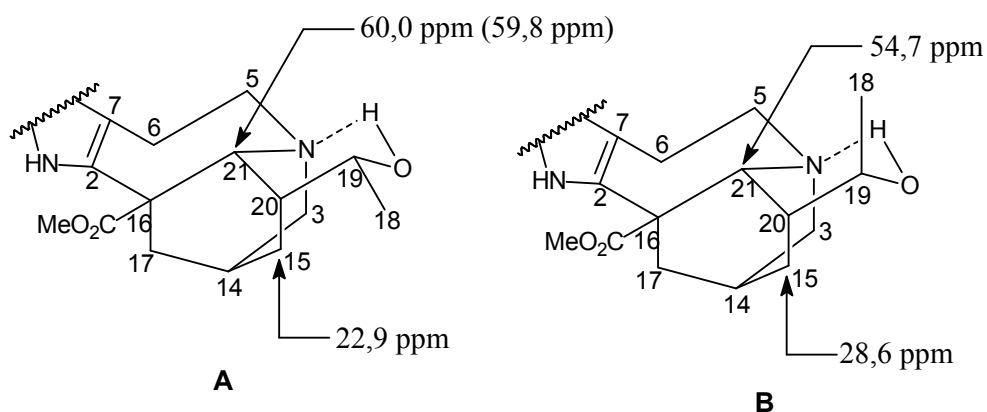
A configuração relativa do CH-19 (19S) foi estabelecida com base na análise dos espectros de RMN ^1H a 400 MHz (**Figura 44, pág. 101**) e RMN ^{13}C a 100 MHz (**Figura 49, pág. 106**), envolvendo também a comparação com dados da literatura para o alcalóide modelo heyneanina (**IV**) e seu epímero, (19R)-epiheyneanina (**V**), os quais possuem um grupo hidroxila ligado ao átomo de carbono CH-19 (Medeiros, 2003), semelhante à mistura dos alcalóides **3** e **4**.



A ligação de hidrogênio formada entre o grupo hidroxila, ligada no átomo de carbono C-19 e o átomo de nitrogênio N-4 torna o grupo hidroxietila com uma conformação mais rígida (estruturas parciais **A** e **B**), causando diferenças nos

deslocamentos químicos tanto dos átomos de hidrogênio e carbono dos grupos CH₃–18 e CH-19 de **A** e **B**. A literatura registra valores de δ_H 1,11 (3H–18) e 4,12 (H–19) para **A** e δ_H 1,27 (3H–18) e 3,92 (H–19) para **B** (Lemos et al., 1996), corroborando para as propostas estruturais **3** e **4** para os alcalóides isolados em mistura de *Tabernaemontana catharinensis*.

Além disso, os valores dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono CH₂–15 (δ_C 22,9) e CH–21 (δ_C 59,7) registrados na literatura para **A** (Figueiredo, 2005) são diferentes daqueles relatados para **B**: δ_H 28,6 (CH₂–15) 54,7 (CH–21) (Lemos et al., 1996). Estas diferenças são explicadas pelo efeito γ de proteção do grupo metila (CH₃–8) sobre o carbono CH₂–15 em **I** (estrutura parcial **A**) e sobre o carbono CH-21 em **B**. Nos alcalóides **3** e **4** o grupo metila CH₃–18 protege o CH₂–15 em 5,7 ppm [$\Delta\delta_C = 28,6$ (**B**) – 22,9 (**A**) = 5,7 ppm], tendo o carbono CH–21, que não sofre esta proteção, δ_C 60,0. Em **B** ocorre o inverso; o grupo metila CH₃–18 protege o CH-21 em 5,3 ppm [$\Delta\delta_C = 60,0$ (**A**) – 54,7 (**B**) = 5,3 ppm], e neste caso o CH₂–15 em δ_C 28,6 não sofre o efeito de proteção γ de proteção do grupo metila CH₃–18.



As demais estereoquímicas foram definidas com base nas correlações apresentadas no mapa de correlação ^1H - ^1H -NOESY (**Figura 55, pág. 112**)

O conjunto destes dados permitiu definir um esqueleto ibogano e propor as estruturas **3** e **4** para os alcalóides isolados em mistura. Prova final desta estrutura veio da comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C -APT (**Figuras 44 e 51, págs. 101 e 108; Tabela 13, pág. 96**) com dados da literatura para os alcalóides isovoacristina (**3**) e voacristina (**4**), anteriormente isolados de *T. catharinensis*, *T. salzmännii* *T. laeta* (Pereira et al., 2008; Medeiros, 2003; Figueiredo, 2005).

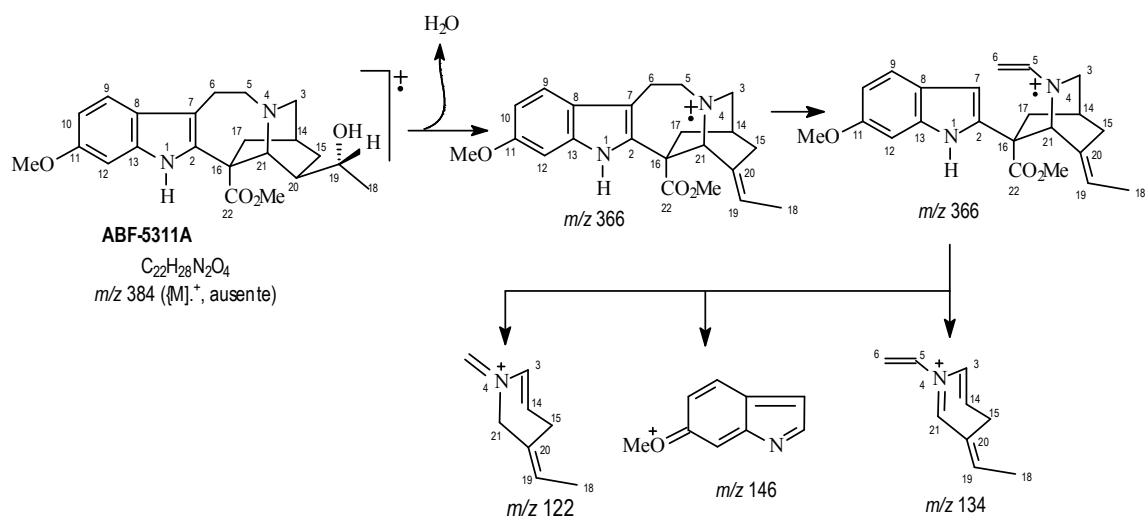
A isovoacristina apresenta inibição no crescimento de células de câncer do ovário (Chaturvedula et al., 2003).

Tabela 13: Dados espectrais de RMN ^1H (400 MHz) e RMN ^{13}C (100 MHz) da mistura dos alcalóides **3** e **4**, incluindo os resultados dos experimentos bidimensionais HSQC e HMBC, em CDCl_3 . Os valores dos deslocamentos químicos δ_{H} e δ_{C} estão em ppm e as constantes de acoplamento J estão em Hz.

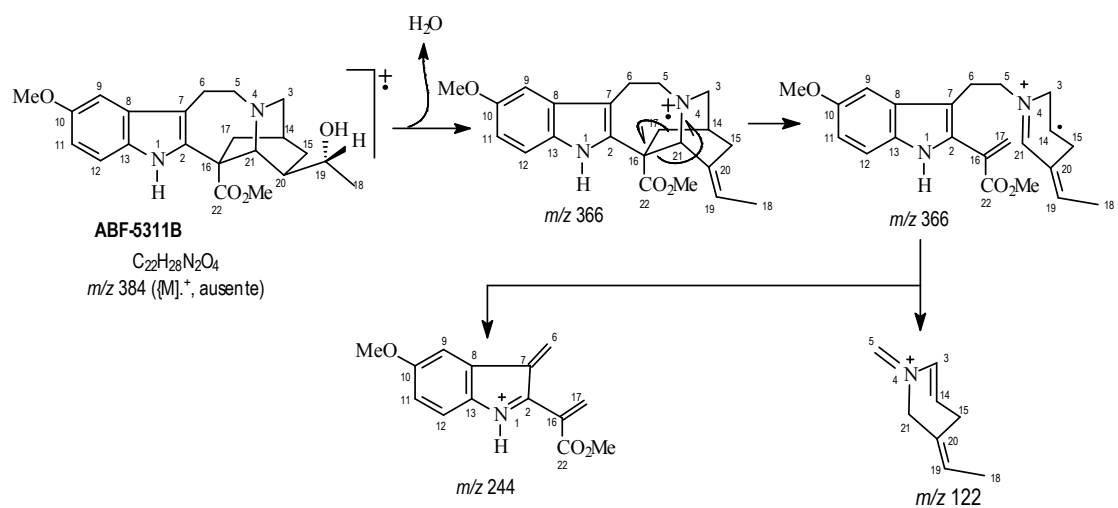
3					4	
HSQC			HMBC			
C	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}
2	134,1	-			136,3	-
7	109,7	-			109,7	-
8	122,8	-			129,0	-
10	-		-		154,3	-
11	156,9	-		H-9; MeO-11	-	-
13	136,3	-		H-9	130,1	-
16	52,3	-			52,3	-
22	175,0	-		MeO-22	175,0	
C						
H						
9	119,1	7,35 (d, 9,7)			110,7	6,94 (d, 3,1)
10	109,2	6,79		H-12	-	-
11	-	-	-	-	112,3	6,85 (dd, 8,9; 3,1)
12	94,5	6,78			111,1	7,17 (d, 8,9)
14	26,7	2,06 (m)			26,7	2,06 (m)
19	71,3	4,19 (dq, 6,4)	3H-18		71,3	4,19 (dq, 6,4)
20	39,6	1,49 (m)		3H-18	39,6	1,49 (m)
21	60,0	3,87			59,8	3,87
CH₂						
3	51,1	3,04 (m)			51,1	3,04 (m)
		2,84 (d, 9,7)				2,84 (d, 9,7)
5	52,3	3,48 (m)			52,3	3,48 (m)
		3,17 (m)				3,17 (m)
6	21,4	3,17-3,12 (m)			21,4	3,17-3,12 (m)
15	22,9	1,93 (m)			22,9	1,93 (m)
		1,58 (m)				1,58 (m)
17	36,9	2,60 (m)			36,9	2,60 (m)
		2,05 (m)				2,05 (m)

CH₃				
18	20,4	1,13 (d, 6,4)	20,4	1,13 (d, 6,4)
MeO-10	-	-	56,1	3,87 (s)
MeO-11	55,8	3,85 (s)	-	-
MeO-22	53,0	3,76 (s)	53,0	3,76 (s)
HN-1	-	7,72 (sl)	-	7,72 (sl)

Tempo de retenção 20, 9 min. (56.58 %)



Tempo de retenção 20,6 min. (22.18 %)



Esquema 4: Interpretação mecanística dos principais fragmentos no espectro de massas da mistura contendo os alcalóides **3** e **4**.

Figura 42: Espectro na região do infravermelho da mistura dos alcalóides **3** e **4**.

Figura 43: Espectro na região do ultravioleta da misturas dos alcalóides **3** e **4**.

Figura 44: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da mistura dos alcalóides **3** e **4**.

Figura 45: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) com expansão entre δ_{H} 1,4 a 2,2 da mistura dos alcalóides **3** e **4**.

Figura 46: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) com expansão entre δ_{H} 2,5 a 3,5 da mistura dos alcalóides **3** e **4**.

Figura 47: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) com expansão entre δ_{H} 3,7 a 4,2 da mistura dos alcalóides **3** e **4**.

Figura 48: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) com expansão entre δ_{H} 6,7 a 7,8 da mistura dos alcalóides **3** e **4**.

Figura 49: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da mistura dos alcalóides **3** e **4**.

Figura 50: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) com expansão entre δ_{C} 51,0 a 71,0 da mistura dos alcalóides **3** e **4**.

Figura 51: Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) da mistura dos alcalóides **3** e **4**.

Figura 52: Mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY (400 MHz, CDCl_3) da mistura dos alcalóides **3** e **4**.

Figura 53: Ampliação (região 6,0 a 8,0 ppm) do Mapa de Correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY da mistura dos alcalóides **3** e **4**.

Figura 54: Ampliação (região 1,0 a 4,5 ppm) do Mapa de Correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY da mistura dos alcalóides **3** e **4**.

Figura 55: Mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H -NOESY (400 MHz, CDCl_3) da mistura dos alcalóides **3** e **4**.

Figura 56: Mapa de correlação heteronuclear HSQC (400 MHz, CDCl₃) da mistura dos alcalóides **3** e **4**.

Figura 57: Ampliação (região 1,0 a 4,0 ppm) do Mapa de Correlação heteronuclear HSQC da mistura dos alcalóides **3** e **4**.

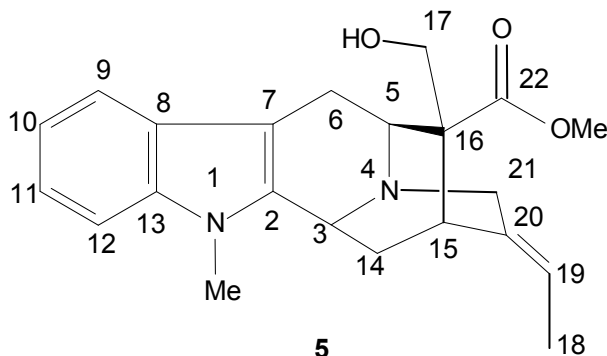
Figura 58: Ampliação (região 5,5 a 7,5 ppm) do Mapa de Correlação heteronuclear HSQC da mistura dos alcalóides **3** e **4**.

Figura 59: Mapa de correlação heteronuclear HMBC (400 MHz, CDCl_3) da mistura dos alcalóides **3** e **4**.

Figura 60: Ampliação (região 0,0 a 4,0 ppm) do Mapa de Correlação heteronuclear HMBC da mistura dos alcalóides **3** e **4**.

Figura 61: Espectro de massas da mistura de alcalóides **3** e **4**.

5.2.1.4 Substância 5



A substância **5** foi isolada do extrato ácido/base das folhas de *T. catharinensis*, apresentando-se como um óleo castanho, a qual apresentou teste positivo para alcalóides quando submetida à análise de cromatografia em camada fina, utilizando como revelador cromogênico o reagente de Dragendorff (Harborne, 1998).

O espectro na região do infravermelho da substância **5** (**Figura 62, pág. 126**) apresenta absorções a 3383 (O-H), 2850 (N-CH₃) 1728 (C=O de éster) e a 1643 e 744 cm⁻¹ (anel benzênico), sugerindo a presença de um anel aromático dissustituído, um grupo N-CH₃ e uma função éster (Lambert et al., 1987; Verpoorte, 1986).

O espectro na região do ultravioleta da substância **5** (**Figura 63, pág. 127**) apresenta três bandas em $\lambda_{\max}$ 261,5 nm (log ϵ 3,7), em $\lambda_{\max}$ 293,5 nm (log ϵ 3,9), em $\lambda_{\max}$ 438,5 nm (log ϵ 4,5), respectivamente, característico de grupo cromóforo do tipo indol (Verpoorte, 1986).

A análise do espectro de RMN ¹³C-APT (**Figura 72, pág. 136; Tabela 14, pág. 123**) do alcalóide **5** permitiu reconhecer a presença de vinte e dois átomos de carbono, sendo três metílicos (um ligado a um oxigênio, característico de grupo metílico de éster, um ligado a átomo de carbono sp² e outro ligado a um átomo de nitrogênio), quatro metilênicos (todos sp³, sendo dois ligados a um átomo de nitrogênio e carbinólico), oito metínicos (sendo cinco sp², dos quais quatro característicos de carbonos aromáticos, três sp³, sendo dois ligados a um átomo de nitrogênio) e sete quaternários (sendo um sp³, seis sp², dos quais um característico de carbono carbonílico de éster em δ_C 176,4) (Bretmaier e Voelter, 1987; Friebolin, 1993)

Esses dados, em conjunto com os dados do espectro de CG/EM (**Figura 80, pág. 144**), o qual apresentou o pico do íon molecular em m/z 366 (83,3%) Daltons, permitiram propor a fórmula molecular $C_{22}H_{26}N_2O_3$ para o alcalóide **5**.

O espectro de massas (**Figura 80, pág. 144**) apresenta também fragmentos em m/z 183 (100%) e 182 (70,8%) que caracterizam a presença de um núcleo indólico, e os fragmentos em m/z 351 (16,7%), 335 (58,3%) e 307 (20,8%) (**Esquema 5, pág. 125**) característico da parte alifática não substituída de um alcalóide indólico com esqueleto tipo ibogano (Verpoorte, 1986).

O espectro de RMN 1H do alcalóide **5** (**Figuras 64 a 69, págs. 128 a 133; Tabela 14, pág. 123**) apresentou sinais (δ_H) correspondentes a grupos metila (CH_3), metoxila de grupo carbometoxila (Me-O), hidrogênios aromáticos, grupos metilênicos (CH_2), grupos metínicos (CH) e um grupo metila ligado a nitrogênio referente a grupamento amina (Friebolin, 1993).

O espectro de RMN 1H do alcalóide **5** (**Figura 69, pág. 133; Tabela 14, pág. 123**) apresenta quatro sinais relativos a hidrogênios aromáticos acoplando entre si em δ_H 7,50 (1H, dl, $J = 7,6$ Hz; H-9); 7,21 (1H, dt, $J = 8,3$ e $1,1$ Hz; H-11); 7,11 (1H, dt, $J = 7,9$ e $1,4$ Hz; H-10); 7,30 (1H, dl, $J = 8,3$ Hz; H-12) característicos do anel A benzênico de um núcleo indólico livre de substituintes (Lounasmaa e Tolvanen, 1986), antes sugerido pelo espectro na região do ultravioleta. Este grupo foi confirmado através das correlações heteronucleares dos átomos de carbono metínicos, apresentadas no mapa de correlação HSQC (**Figura 76, pág. 140**), através das correlações a $^1J_{CH}$ entre CH-9 (δ_C 118,3)/H-9 (δ_H 7,50), CH-10 (δ_C 119,0)/H-10 (δ_H 7,11), CH-11 (δ_C 121,2)/H-11 (δ_H 7,21), CH-12 (δ_C 108,9)/H-12 (δ_H 7,30), que juntamente com a presença de um sinal simpleto em δ_H 3,64 correlacionando com o sinal em δ_C 30,3, referente a um CH_3 de um grupo N- CH_3 , confirma a presença de um núcleo indólico livre de substituintes com um grupo metila ligado ao átomo de nitrogênio-1 (Lounasmaa e Tolvanen, 1986; Azoug et al., 1995)

As correlações homonucleares apresentadas no mapa de correlação 1H - 1H -COSY (**Figura 73, pág. 137**) reforçam a proposta da presença do anel A benzênico dissustituído de um núcleo indólico.

A presença do núcleo indólico livre de substituintes foi corroborada pelas correlações heteronucleares à longa distância apresentadas no mapa de correlação HMBC (**Figura 79, pág. 143**) através das correlações $^3J_{CH}$ entre CH-9

(δ_C 118,3)/H-11 (δ_H 7,21), CH-10 (δ_C 119,0)/H-12 (δ_H 7,30), CH-11 (δ_C 121,2)/H-9 (δ_H 7,50), CH-12 (δ_C 118,9)/H-10 (δ_H 7,1), C-2 (δ_C 137,4)/N-Me (δ_H 3,64) e C-13 (δ_C 138,0)/H-9 (δ_H 7,50)/N-Me (δ_H 3,64) as demais correlações estão descritas na **Tabela 14, pág. 123**.

A presença de um grupo carbometoxila ligado ao carbono C-16 comum no esqueleto para alcalóides indólicos monoterpênicos (Dewick, 1997; Zenk, 1980) foi confirmada pela presença de um simpleto integrando para três hidrogênios em δ_H 3,76, relativo ao grupo MeO-22 (δ_C 52,3), juntamente com um sinal referente a um carbono carbonílico em δ_C 176,4 ambos apresentados no mapa de correlação HSQC (**Figura 76, pág. 140**). A localização deste grupo foi apoiada nos aspectos biossintéticos para os alcalóides indólicos monoterpênicos (Dewick, 1997; Zenk, 1980), e também corroborada pelas correlações heteronucleares à longa distância apresentadas no mapa de correlação HMBC (**Figura 79, pág. 143**) através da correlação $^3J_{CH}$ entre C-22 (δ_C 176,4)/ MeO-22 (δ_H 3,76) (Braga e Reis, 1987).

A presença de um grupo metila ligado a um átomo de carbono sp^2 pode ser reconhecida pelo sinal duplete a δ_H 1,63 (3H, d, J = 7,9 Hz) e pelo triplo quaduplete a δ_H 5,34 (1H, J = 6,6 e 2,0 Hz), referentes aos hidrogênios 3H-18 e H-19, respectivamente. A presença da ligação dupla, e do grupo metila ligado a esta, foi corroborada ainda através da correlação à longa distância a $^3J_{CH}$ entre C-20 (δ_C 137,5)/3H-18 (δ_H 1,63), observada no mapa de correlação HMBC (**Figura 79, pág. 143; Tabela 14, pág. 123**) (Braga e Reis, 1987).

A presença de um carbono metilênico carbinólico na posição 17 (Azoug et al., 1995; Braga e Reis, 1987) foi confirmada através do mapa de correlação HSQC (**Figura 76, pág. 140; Tabela 14, pág. 123**) onde se observa a correlação a $^1J_{CH}$ entre CH₂-17 (δ_C 63,1)/2H-17 (δ_H 3,71 e 3,62). As demais correlações estão descritas na **Tabela 14, pág. 123**.

A atribuição dos deslocamentos químicos dos hidrogênios metilênicos e metínicos restantes da cadeia alifática (**Tabela 14, pág. 123**), foi feita com base nos parâmetros conhecidos para deslocamentos químicos de hidrogênio. As correlações observadas no mapa de correlação HSQC (**Tabela 14, pág. 123; Figura 76, pág. 140**) e confirmadas pelo mapa de correlação HMBC (**Figura 79, pág. 143**) confirmam os deslocamentos químicos propostos para alguns dos hidrogênios metilênicos e metínicos da cadeia alifática. As demais correlações

observadas no mapa de correlação HMBC estão descritas na **Tabela 14, pág. 123**.

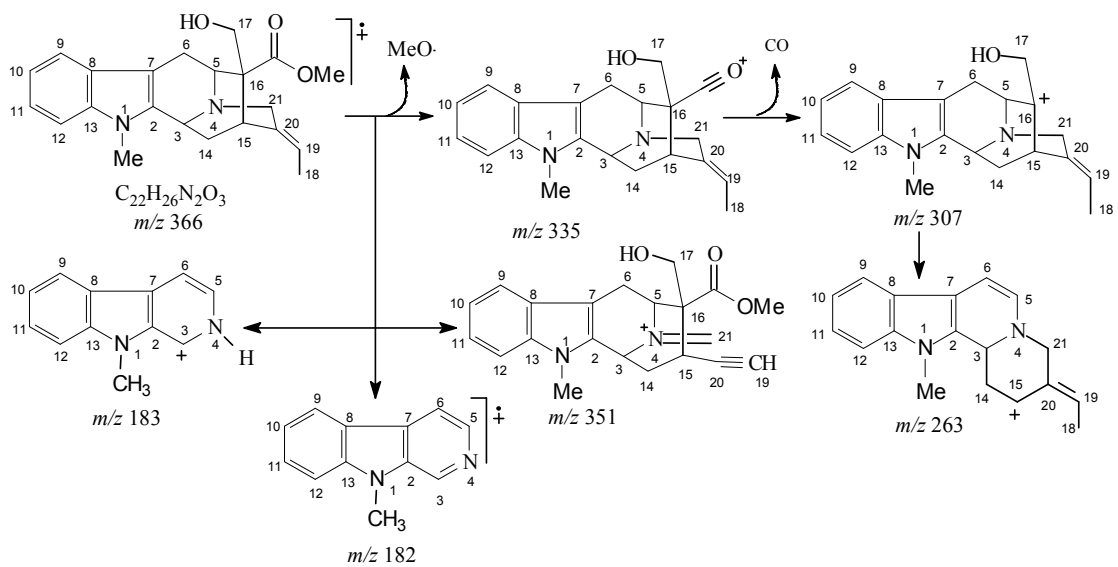
O conjunto desses dados permitiu definir um esqueleto do tipo sapargina (Braga e Reis, 1987) e propor a estrutura para o alcalóide **5** isolado. A prova final dessa estrutura adveio da comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C -APT (**Figuras 64 e 72, págs. 128 e 136; Tabela 14, pág. 123**) com os da literatura para o alcalóide voachalotina (Lounasmaa e Tolvanen, 1986; Braga e Reis, 1987).

A estereoquímica relativa dos átomos de carbono estereogênicos proposta para a voachalotina (**5**) foi feita com base nas correlações observadas no mapa de correlação ^1H - ^1H -NOESY (**Figura 75, pág. 139**), e em dados biogenéticos, visto que todos os alcalóides com esqueleto do tipo ibogano isolados de espécies do gênero *Tabernaemontana* apresentam as configurações dos carbonos estereogênicos como apresentadas em **5** (Danieli e Palmisano, 1986).

Tabela 14: Dados espectrais de RMN ^1H (400 MHz) e RMN ^{13}C (100 MHz) do alcalóide **5**, incluindo os resultados dos experimentos bidimensionais HSQC e HMBC, em comparação com dados de literatura para a voachalotina (**5a**) em CDCl_3 . Os valores dos deslocamentos químicos δ_{H} e δ_{C} estão em ppm e as constantes de acoplamento J estão em Hz.

5					5a
HSQC			HMBC		
C	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}
2	137,4	-		MeN-1	136,9
7	105,0	-	2H-6		104,8
8	126,0	-		H-10	125,9
13	138,0	-		H-9; MeN-1	138,1
16	53,4				53,2
20	137,5	-		3H-18	136,2
22	176,4			MeO-22	176,0
CH					
3	48,0	4,22 (dd, 9,9; 4,1)		H-5	47,7
5	53,8	4,33 (d, 6,0)	H-6a	2H-21	53,5
9	118,3	7,50 (d, 7,6)		H-11	118,0
10	119,0	7,11 (dt, 7,6; 1,4)		H-12	118,6
11	121,2	7,21 (td, 8,3; 1,8)		H-9	120,7
12	108,9	7,30 (td, 8,3)		H-10	108,5
15	29,9	3,25 (tl, 3,0)			30,2
19	116,5	5,34 (tq, 6,6; 2,0)	3H-18		115,7
CH₂					
6	22,3	3,15 (dd, 15,6; 6,3) 2,99 (dl, 15,6)			22,2
14	28,4	2,02 (ddd, 12,6; 9,7, 2,6) 1,83 (td, 12,6; 3,6)			28,2
17	63,1	3,71 (dl, 11,7) 3,62 (d, 11,7)			62,9
21	54,0	3,60 (m)			55,7

CH₃			
18	12,9	1,63 (td, 7,9)	12,7
MeN-1	30,3	3,64 (s)	29,1
MeO-22	52,3	3,76 (s)	51,9



Esquema 5: Interpretação mecanística dos principais fragmentos no espectro de massas do alcalóide **5**.

Figura 62: Espectro na região do infravermelho do alcalóide **5**.

Figura 63: Espectro na região do ultravioleta do alcalóide **5**.

Figura 64: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do alcalóide **5**.

Figura 65: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) com expansão entre δ_{H} 0,8 e 1,7 do alcalóide **5**.

Figura 66: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) com expansão entre δ_{H} 2,6 e 3,3 do alcalóide **5**.

Figura 67: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) com expansão entre δ_{H} 3,5 e 3,9 do alcalóide **5**.

Figura 68: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) com expansão entre δ_{H} 4,2 e 5,4 do alcalóide **5**.

Figura 69: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) com expansão entre δ_{H} 7,1 e 7,8 do alcalóide **5**.

Figura 70: Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) do alcalóide **5**.

Figura 71: Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) com expansão entre δ_{C} 105,0 e 180,0 do alcalóide **5**.

Figura 72: Espectro de RMN ^{13}C -APT (400 MHz, CDCl_3) do alcalóide **5**.

Figura 73: Mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY (400 MHz, CDCl_3) do alcalóide **5**.

Figura 74: Ampliação (região 0,0 a 6,0 ppm) do Mapa de Correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY do alcalóide **5**.

Figura 75: Mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H -NOESY (400 MHz, CDCl_3) do alcalóide **5**.

Figura 76: Mapa de correlação heteronuclear HSQC (400 MHz, CDCl_3) do alcalóide **5**.

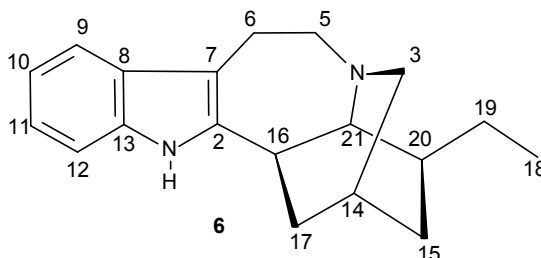
Figura 77: Ampliação (região 1,0 a 5,0 ppm) do Mapa de Correlação heteronuclear HSQC do alcalóide **5**.

Figura 78: Ampliação (região 5,0 a 8,0 ppm) do Mapa de Correlação heteronuclear HSQC do alcalóide **5**.

Figura 79: Mapa de correlação heteronuclear HMBC (400 MHz, CDCl_3) do alcalóide **5**.

Figura 80: Espectro de massas do alcalóide **5**.

5.2.1.5 Substância 6



A substância **6** foi isolada do extrato em diclorometano do precipitado da extração ácido-base das sementes dos frutos verdes de *T. catharinensis*, como um sólido castanho-claro, a qual apresentou teste positivo para alcalóides quando submetida à análise de cromatografia em camada fina, utilizando como revelador cromogênico o reagente de Dragendorff (Harborne, 1998).

O espectro na região do infravermelho do alcalóide **6** (**Figura 81, pág. 150**) apresenta absorções a 3385 (N-H) e a 1643 e 744 cm^{-1} (anel benzênico), sugerindo a presença de um anel aromático dissustituído, um grupo N-H e uma função éster (Lambert et al., 1987; Verpoorte, 1986).

O espectro na região do ultravioleta do alcalóide **6** (**Figura 82, pág. 151**) apresenta três bandas em λ_{max} em 234 nm ($\log \varepsilon$ 4,6), λ_{max} em 278 nm ($\log \varepsilon$ 4,2), λ_{max} em 298 nm ($\log \varepsilon$ 4,2), respectivamente, característico de grupo cromóforo do tipo indol livre de substituintes no anel benzênico (Verpoorte, 1986)

A análise do espectro de RMN ^{13}C (**Figura 88, pág. 157; Tabela 15, pág. 149**) do alcalóide (**6**) permitiu reconhecer a presença de dezenove átomos de carbono, sendo um metílico, seis metilênicos (todos sp^3 , sendo dois ligados a um átomo de nitrogênio), oito metínicos (sendo quatro sp^2 , característicos de carbonos aromáticos, e quatro sp^3 , sendo que um está ligado a um átomo de nitrogênio) e quatro quaternários (todos sp^2) (Lounasmaa e Tolvanen, 1986; Shamma, 1979).

O espectro de RMN ^1H do alcalóide **6** (**Figuras 83 à 87, págs. 152 à 156; Tabela 15, pág. 149**) apresentou sinais (δ_{H}) correspondentes a grupo metila (CH_3), quatro hidrogênios aromáticos, outros grupos metínicos (CH), grupos metilênicos (CH_2) e um átomo de hidrogênio em δ_{H} 7,71, ligado a nitrogênio, referente a grupamento amina (Lounasmaa e Tolvanen, 1986; Shamma, 1979).

O espectro de RMN ^1H do alcalóide (**6**) (**Figura 83**, **pág. 152**; **Tabela 15**, **pág. 149**) apresenta quatro sinais relativos a hidrogênios aromáticos acoplando entre si a δ_{H} 7,47 (dl, $J = 8,8$ Hz; H-9); 7,10 (dt; $J = 8,8$ e $1,2$ Hz, H-10); 7,10 (dt; $J = 8,8$ e $1,2$ Hz, H-11); 7,25 (dl, $J = 8,8$ Hz; H-12) característicos do anel A (benzênico) de um núcleo indólico livre de substituintes (Azoug et al., 1995; Lounasmaa e Tolvanen, 1986), anteriormente identificado no espectro na região do ultravioleta.

As correlações homonucleares apresentadas no mapa de correlação ^1H - ^1H -COSY (**Figura 89**, **pág. 158**) reforçam a proposta da presença do anel A benzênico de um núcleo indólico livre de substituintes.

O anel benzênico livre de substituintes foi confirmado através das correlações heteronucleares dos átomos de carbono metínicos, apresentadas no mapa de correlação HMQC (**Figura 91**, **pág. 160**), através das correlações a $^1J_{\text{CH}}$ entre CH-9 (δ_{C} 117,9)/H-9 (δ_{H} 7,47), CH-10 (δ_{C} 119,1)/H-10 (δ_{H} 7,10), CH-11 (δ_{C} 121,0)/H-11 (δ_{H} 7,10), CH-12 (δ_{C} 110,1)/H-12 (δ_{H} 7,25), que juntamente com a presença de um sinal singleto largo a δ_{H} 7,71, apresentado no espectro de RMN ^1H (**Figura 86**, **pág. 155**), referente a um hidrogênio de um grupo N-H, confirma a presença de um núcleo indólico livre de substituintes (Azoug, 1995).

A presença do núcleo indólico livre de substituintes foi corroborada pelas correlações heteronucleares à longa distância apresentadas no mapa de correlação HMBC (**Figura 92**, **pág. 161**) através das correlações $^3J_{\text{CH}}$ entre CH-9 (δ_{C} 117,9)/H-11 (δ_{H} 7,10), CH-10 (δ_{C} 119,2)/H-12 (δ_{H} 7,25), CH-11 (δ_{C} 121,0)/H-9 (δ_{H} 7,47), CH-12 (δ_{C} 110,2)/H-10 (δ_{H} 7,10), C-2 (δ_{C} 141,5)/2H-6 (δ_{H} 3,19 e 2,68) e C-13 (δ_{C} 134,7)/H-9 (δ_{H} 7,47)/H-11 (δ_{H} 7,10) as demais correlações estão descritas na **Tabela 15**, **pág. 149**.

No alcalóide **6**, nota-se a ausência nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (**Figuras 83** e **88**, **págs. 152** e **157**) dos sinais referentes ao grupo carbometoxila ligado ao átomo de carbono C-16, comum no esqueleto para alcalóides indólicos monoterpênicos, e apresentados nos outros alcalóides isolados aqui neste trabalho (Zenk, 1980). Confirmado também pela ausência do sinal referente ao grupo carbonila no espectro na região do infravermelho (**Figura 81**, **pág. 150**).

A presença de quatro sinais multipletos relativos aos dois grupos metilênicos do núcleo indólico, 2H-5 [(δ_H 3,39, m, H-5a) e (δ_H 3,16, m, H-5b)] α ao átomo de nitrogênio, com 2H-6 [(δ_H 3,19, m, H-6a) e (δ_H 2,68, H-6b)] corroboram na confirmação da proposta de um núcleo indólico livre de substituintes.

A presença de um sinal triplete integrando para três hidrogênios em δ_H 0,91 com $J = 7,0$ Hz relativo a um grupo metila apresentado no espectro de RMN 1H (**Figura 84, pág. 153; Tabela 15, pág. 149**), sugere a presença de um grupo etila livre de oxidação na cadeia lateral da porção terpênica do alcalóide **6** (Lounasmaa e Tolvanen, 1986; Shamma, 1979).

A presença de dois sinais multipletos no espectro de RMN 1H (**Figura 85, pág. 154**) foi inferida aos hidrogênios ligados ao átomo de carbono C-3 ligado ao átomo de nitrogênio em δ_H 3,14 (H-3a) e 3,03 (H-3b), e um sinal triplo integrando para três hidrogênios em δ_H 0,91 com $J = 7,0$ Hz, relativo a um grupo metila apresentado no espectro de RMN 1H (**Figura 84, pág. 153**).

A atribuição dos deslocamentos químicos dos hidrogênios metilênicos e metínicos restantes da cadeia alifática (**Tabela 15, pág. 149**), foi feita com base nos parâmetros conhecidos para deslocamentos químicos de hidrogênio. As correlações observadas no mapa de correlação HMQC (**Tabela 15, pág. 149; Figura 91, pág. 160**) e confirmadas pelo mapa de correlação HMBC (**Figura 92, pág. 161**) através das correlações a $^3J_{CH}$ entre CH₂-17 (δ_C 34,0)/H-3b (δ_H 3,03), CH₂-5 (δ_C 49,9)/H-21 (δ_H 2,90), CH₂-3 (δ_C 54,3)/H-21 (δ_H 2,90), CH-20 (δ_C 41,08)/3H-18 (δ_H 0,91), confirmam os deslocamentos químicos propostos para alguns dos hidrogênios metilênicos e metínicos da cadeia alifática. As demais correlações observadas no mapa de correlação HMBC estão descritas na **Tabela 15, pág. 149**.

O conjunto desses dados permite classificar o alcalóide **6** com um esqueleto pertencente da classe ibogano, definindo-o como sendo a ibogamina. A prova final desta proposta adveio da comparação dos dados espectroscópicos do alcalóide **6** com os dados de literatura para a ibogamina (Souza, 2006).

A estereoquímica relativa dos átomos de carbono estereogênicos proposta para **6** foi feita com base em dados biogenéticos, visto que todos os alcalóides com esqueleto do tipo ibogano isolados de espécies do gênero

Tabernaemontana apresentam as configurações dos carbonos estereogênicos como apresentadas em **6** (Danieli e Palmisano, 1986).

Tabela 15: Dados de RMN ^1H (400 MHz), ^{13}C (100 MHz) do alcalóide **6**, em CDCl_3 em comparação com dados de literatura para a ibogamina (**6a**) em CDCl_3 . Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm e a constante de acoplamento (J) estão em Hz.

6					6a
HMQC			HMBC		
C	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}
2	141,5	-		2H-6	141,8
7	109,0	-		2H-5; H-9	109,2
8	129,6	-		H-10; H-12	129,7
13	134,7	-		H-9; H-11	134,7
CH					
9	117,9	7,47 (dd)		H-11	117,9
10	119,2	7,11 (dt)		H-12	119,1
11	121,0	7,09 (dt)		H-9	120,9
12	110,2	7,24 (dd)		H-10	110,1
14	26,3		H-3b		26,3
16	41,0				41,2
20	41,8	1,60 (m)		3H-18	41,8
21	57,0	2,90 (sl)			57,3
CH₂					
3	54,3	3,14 (m); 3,03 (m)		H-21	54,1
5	49,9	3,39 (m); 3,16 (m)	H-6b	H-21	49,8
6	20,5	3,19 (m); 2,68 (m)			20,5
15	31,8	1,27 (m)		H-3b	31,9
17	34,0	1,56 (m)		H-3b	34,0
19	27,7	2,05 (m); 1,64 (m)			27,7
CH₃					
18	11,9	0,9 (t)			11,8
NH-1	-	7,71 (sl)			-

Figura 81: Espectro na região do infravermelho do alcalóide **6**.

Figura 82: Espectro na região do ultravioleta do alcalóide **6**.

Figura 83: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do alcalóide **6**.

Figura 84: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) com expansão entre δ_{H} 0,8 e 2,1 do alcalóide **6**.

Figura 85: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) com expansão entre δ_{H} 2,4 e 4,2 do alcalóide **6**.

Figura 86: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) com expansão entre δ_{H} 6,8 e 7,3 do alcalóide **6**.

Figura 87: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) com expansão entre δ_{H} 7,4 e 7,7 do alcalóide **6**.

Figura 88: Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) do alcalóide **6**.

Figura 89: Mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY (400 MHz, CDCl_3) do alcalóide **6**.

Figura 90: Ampliação (região 0,0 a 6,0 ppm) do Mapa de Correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY do alcalóide **6**.

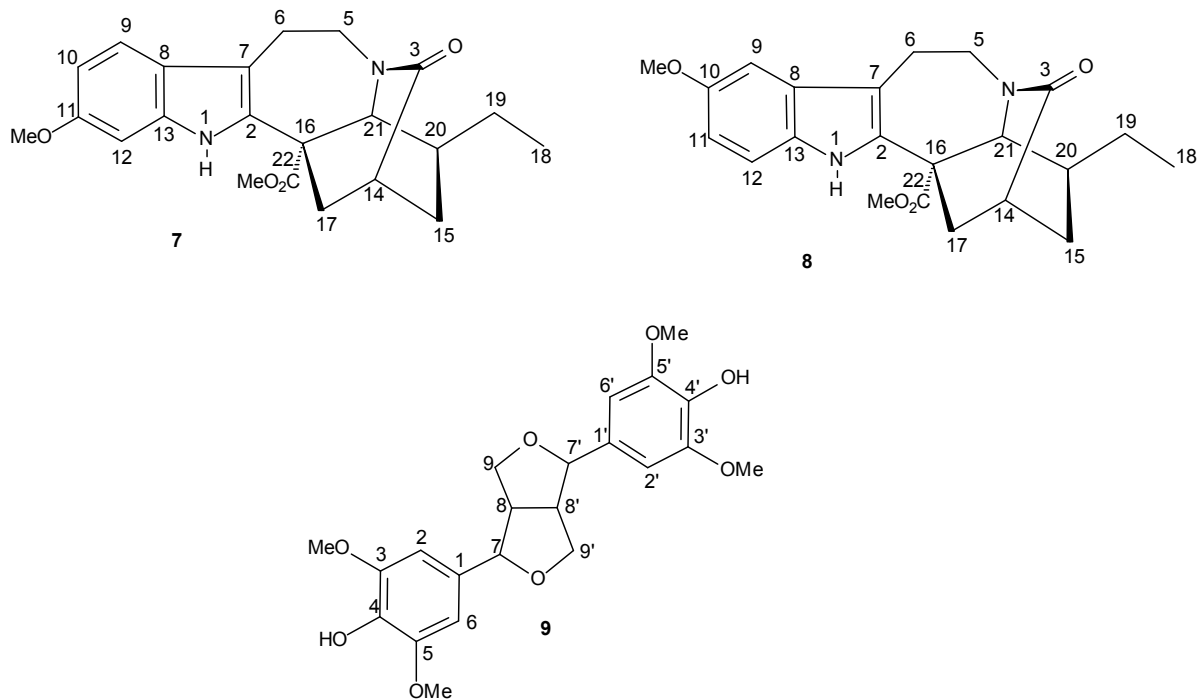
Figura 91: Mapa de correlação heteronuclear HMQC (400 MHz, CDCl_3) do alcalóide **6**.

Figura 92: Mapa de correlação heteronuclear HMBC (400 MHz, CDCl_3) do alcalóide **6**.

Figura 93: Ampliação (região 1,0 a 4,0 ppm) do Mapa de Correlação heteronuclear HMBC do alcalóide **6**.

Figura 94: Ampliação (região 1,0 a 8,0 ppm) do Mapa de Correlação heteronuclear HMBC do alcalóide **6**.

5.2.1.6 Substâncias 7, 8 e 9



A mistura contendo as substâncias **7**, **8** e **9** foi isolada do extrato ácido/base das folhas de *T. catharinensis*, apresentando-se como um óleo castanho, a qual apresentou teste positivo para alcalóides quando submetida à análise de cromatografia em camada fina, utilizando como revelador cromogênico o reagente de Dragendorff (Harborne, 1998).

O espectro na região do infravermelho da mistura das substâncias **7**, **8** e **9** (**Figura 97, pág. 175**) apresenta absorções a 3375 (N-H), 1723 (C=O de éster) e a 1656 e 734 cm^{-1} (anel benzênico), sugerindo a presença de um anel aromático trissubstituído, um grupo N-H e uma função éster (Lambert et al., 1985; Verpoorte, 1986).

A análise do espectro de RMN ^{13}C (**Figura 102, pág. 180; Tabela 16, pág. 169**) e RMN ^{13}C -APT (**Figura 105, pág. 183; Tabela 16, pág. 169**) da mistura contendo os alcalóides **7** e **8** permitiu reconhecer a presença de átomos de carbono metílicos (sendo dois ligados a um oxigênio, característicos de grupo metílico de éster e de grupo metoxila ligado a anel aromático), metilênicos (sendo um ligado a um átomo de nitrogênio), metínicos (sendo três sp^2 característicos de carbonos aromáticos, um sp^3 ligado a um átomo de nitrogênio) e quaternários (sendo um sp^3 , sete sp^2 , dos quais dois característicos de carbonos carbonílicos em δ_{C} 172,9 e 176,0) (Bretmaier e Voelter, 1987; Friebolin, 1993).

Esses dados, em conjunto com os dados do espectro de CG/EM (**Figura 95, pág. 171**), o qual apresentou dois picos no cromatograma com tempos de retenção 26,028 min. (18,5%) e 26,552 min. (34,2%), ambos com a presença do íon molecular em m/z 382 (63,2 % e 78,9%) Daltons, o que permitiram propor a fórmula molecular $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_4$ para a mistura dos alcalóides **7** e **8**.

O espectro de massas para a mistura dos alcalóides **7** e **8** (**Figura 95, pág. 171**) apresenta um fragmento em m/z 227 (42,1% e 52,6%), que caracteriza a presença de um núcleo indólico (**Esquema 6, pág. 172**) (Verpoorte, 1986).

O espectro de RMN ^1H da mistura dos alcalóides **7** e **8** (**Figuras 98 à 101, págs. 176 à 179; Tabela 16, pág. 169**) apresentaram sinais (δ_{H}) correspondentes a grupos metila (CH_3), metoxilas de grupo carbometoxila e metoxila ligada a anel aromático (Me-O), hidrogênios aromáticos, grupos metilênicos (CH_2), grupos metínicos (CH), hidrogênio ligado a nitrogênio referente a grupamento amina (Friebolin, 1993).

O espectro de RMN ^1H da mistura dos alcalóides **7** e **8** (**Figura 98, pág. 176; Tabela 16, pág. 169**) apresenta três sinais relativos a hidrogênios aromáticos formando um sistema do tipo ABX. Alcalóide **7**: δ_{H} 7,33 (1H, d, $J = 9,0$

H-9); 6,75 (1H, d, $J = 9,0$ Hz; H-10); 6,78 (1H, d, $J = 9,0$ Hz; H-12); Alcalóide **8**: δ_H 6,93 (1H, d, $J = 2,3$ Hz; H-9); 6,83 (1H, dd, $J = 9,0$ e $2,3$ Hz; H-11); 7,16 (1H, d, $J = 9,0$ Hz; H-12), ambos característicos do anel A benzênico de um núcleo indólico com substituinte (Lounasmaa e Tolvanen, 1986; Medeiros, 2003). Este grupo foi confirmado através das correlações heteronucleares dos átomos de carbono metínicos, apresentadas no mapa de correlação HSQC (**Figura 113, pág. 191**), através das correlações a $^1J_{CH}$. Alcalóide **7**: CH-9 (δ_C 119,2)/H-9 (δ_H 7,33), CH-10 (δ_C 109,7)/H-10 (δ_H 6,75) e CH-12 (δ_C 94,5)/H-12 (δ_H 6,78) e para o alcalóide **8**: CH-9 (δ_C 100,6)/H-9 (δ_H 6,93), CH-11 (δ_C 112,7)/H-11 (δ_H 6,83) e CH-12 (δ_C 111,6)/H-12 (δ_H 7,16), que juntamente com a presença de dois sinais simples no espectro de RMN 1H (**Figura 98, pág. 176**) em δ_H 3,84 (**7**) e 3,88 (**8**) relativos grupos metoxila ligados a anel aromático, e adicionado a esta informação a presença de sinal simples em δ_H 7,85 referente a um hidrogênio de um grupo N-H para ambos os alcalóides contidos na mistura, confirma a presença de um núcleo indólico com a presença de um grupo metoxila (Lounasmaa e Tolvanen, 1986; Medeiros, 2003).

As correlações homonucleares apresentadas no mapa de correlação 1H - 1H -COSY (**Figura 110, pág. 188**) reforçam a proposta da presença do anel A benzênico trissubstituído de um núcleo indólico.

A presença do núcleo indólico com um grupo metoxila foi corroborada pelas correlações heteronucleares à longa distância apresentadas no mapa de correlação HMBC (**Figura 114, pág. 192**) através das correlações $^3J_{CH}$. Alcalóide **7**: C-7 (δ_C 109,0)/H-9 (δ_H 7,33), C-11 (δ_C 156,0)/H-9 (δ_H 7,33)/OMe-11 (δ_H 3,84), C-13 (δ_C 135,0)/H-9 (δ_H 7,33); Alcalóide **8**: C-10 (δ_C 154,0)/H-12 (δ_H 7,16)/OMe-10 (δ_H 3,88), descritas na **Tabela 16, pág. 169**.

A presença de um grupo carbometoxila, para ambos os alcalóides **7** e **8**, ligado ao carbono C-16 comum no esqueleto para alcalóides indólicos monoterpênicos (Dewick, 199; Zenk, 1980), foi confirmada pela presença de um simpleto integrando para três hidrogênios em δ_H 3,75, relativo ao grupo MeO-22 (δ_C 53,0), juntamente com um sinal referente a um carbono carbonílico em δ_C 172,9 ambos apresentados no mapa de correlação HSQC (**Figura 113, pág. 191**). A localização deste grupo foi apoiada nos aspectos biossintéticos para os alcalóides indólicos monoterpênicos (Dewick, 1997; Zenk, 1980), e também corroborada pelas correlações heteronucleares à longa distância apresentadas no mapa de correlação HMBC (**Figura 114, pág. 192**) através da correlação $^3J_{CH}$ entre C-22 (δ_C 172,9)/O-Me-22 (δ_H 3,75).

A presença de quatro sinais multipletos no espectro de RMN 1H (**Figura 117, pág. 195**) referentes aos dois grupos metilênicos do núcleo indólico acoplando entre si, 2H-5 [(δ_H 4,49, m, H-5a) e (δ_H 3,25, m, H-5b)] α a um átomo de nitrogênio, com 2H-6 (δ_H 3,25, m, H-6a e H-6b), confirmam a proposta de um núcleo indólico com presença de um grupo metoxila, e um grupo carbometoxila ligado ao átomo de carbono C-16, comum para os alcalóides indólicos monoterpênicos (Budzikiewicz et al., 1964).

A ausência de dois sinais duplodupletos largos no espectro de RMN 1H (**Figura 98, pág. 176**) relativos aos hidrogênios ligados ao átomo de carbono C-3 e modificação no deslocamento químico do H-14, em relação ao alcalóide coronaridina (**1**), aliado à presença do pico em m/z 352 Daltons no espectro de massas (**Figura 96, pág. 174**), bem como a análise dos espectros de RMN ^{13}C (**Figura 102, pág. 180**), HSQC (**Figura 113, pág. 191**) e HMBC (**Figura 114, pág. 192**) (*vide infra*) levou à proposta estrutural para os alcalóides **7** e **8** contidos na mistura, com a presença de uma carbonila no átomo de carbono C-3.

A posição da carbonila a δ_C 176,0 no átomo de carbono C-3, formando uma lactama com N-4, foi confirmada pela suas correlações heteronucleares apresentadas no mapa de correlação HMBC (**Figura 114, pág. 192**) com os hidrogênios H-14 (δ_H 2,60) e H-21 (δ_H 4,49).

A atribuição dos deslocamentos químicos dos hidrogênios metilênicos e metínicos restantes da cadeia alifática (**Tabela 16, pág. 169**), foi feita com base nos parâmetros conhecidos para deslocamentos químicos de hidrogênio (Medeiros, 2003). As correlações observadas no mapa de correlação HSQC estão descritas na **Tabela 16, pág. 169**.

O conjunto destes dados permitiu definir um esqueleto ibogano e propor as estruturas **7** e **8** para os alcalóides isolados contidos na mistura. Prova final desta estrutura veio da comparação dos dados de RMN 1H e ^{13}C -APT (**Figuras 98 e 105, págs. 176 e 183; Tabela 16, pág. 169**) com dados da literatura para os alcalóides 3-oxoisovoacangina (**7**) e 3-oxovoacangina (**8**), anteriormente isolados de *Tabernaemontana fuchsiaefolia* e *T. laeta* (Zocoler et al., 2005; Medeiros, 2003).

Tabela 16: Dados espectrais de RMN ^1H (400 MHz) e RMN ^{13}C (100 MHz) da mistura dos alcalóides **7** e **8**, incluindo os resultados dos experimentos bidimensionais HSQC e HMBC, em CDCl_3 . Os valores dos deslocamentos químicos δ_{H} e δ_{C} estão em ppm e as constantes de acoplamento J estão em Hz.

7					8	
	HSQC		HMBC		HSQC	
C	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}
2	136,0	-			136,0	-
3	176,0		H-14	H-21	176,0	
7	109,5	-		H-9	109,5	-
8		-				-
10	-	-	-	-	154	-
11	156,5	-		H-9; MeO-11	-	-
13	135,0	-		H-9	130,0	-
16	56,7	-			56,7	-
22	172,9	-		H-17a; MeO-22	172,9	
CH						
9	119,2				100,1	6,93 (d, 2,3)
10	109,7	6,75 (dd, 9,0 e 2,3)			-	-
11	-	-	-	-	112,7	6,83 (dd, 9,0 e 2,3)
12	94,5	6,78 (d, 2,3)			111,6	7,16 (d, 9,0)
14	38,4	2,60 (m)			38,4	2,60 (m)
20	35,6	1,75 (m)	H-21	3H-18	35,6	1,75 (m)
21	56,1	4,49 (m)			56,1	4,49 (m)
CH₂						
5	42,7	4,49 (m) 3,25 (m)			42,7	4,49 (m) 3,25 (m)
6	21,2	3,25 (m)			21,2	3,25 (m)
15	31,0	2,02 (m) 1,25 (m)		H-21	31,0	2,02 (m) 1,25 (m)
17	36,1	2,60 (m) 2,15 (m)		H-21	36,1	2,60 (m) 2,15 (m)
19	27,6	1,58 (m) 1,46 (m)			27,6	1,58 (m) 1,46 (m)

CH₃						
18	11,1	1,00 (d, 7,0)			11,1	1,00 (d, 7,0)
MeO-10	-	-	-	-	56,1	3,88 (s)
MeO-11	55,7	3,84 (s)			-	-
MeO-22	53,0	3,75 (s)			53,0	3,75 (s)
HN-1	-	7,87 (sl)			-	7,89 (sl)

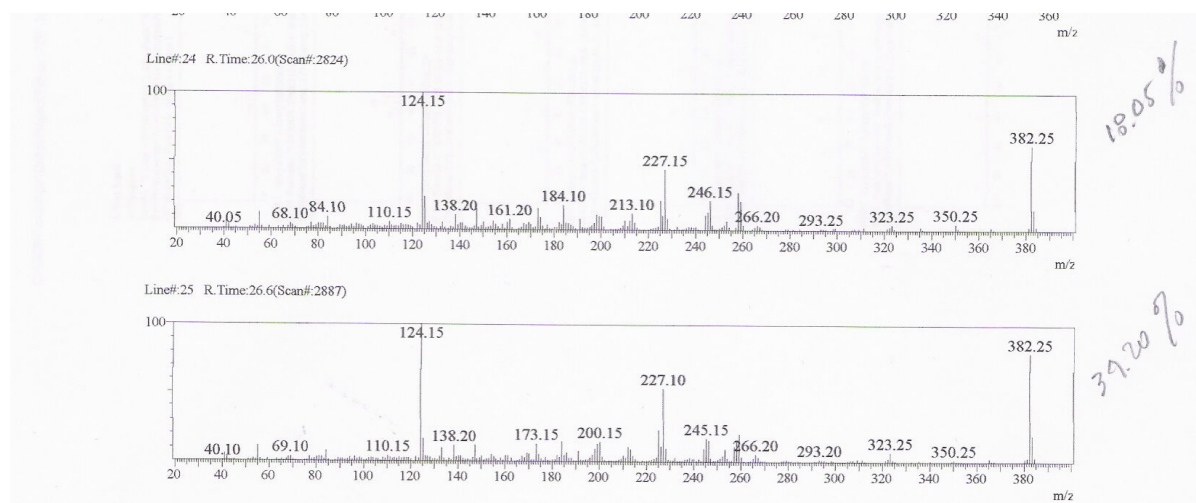
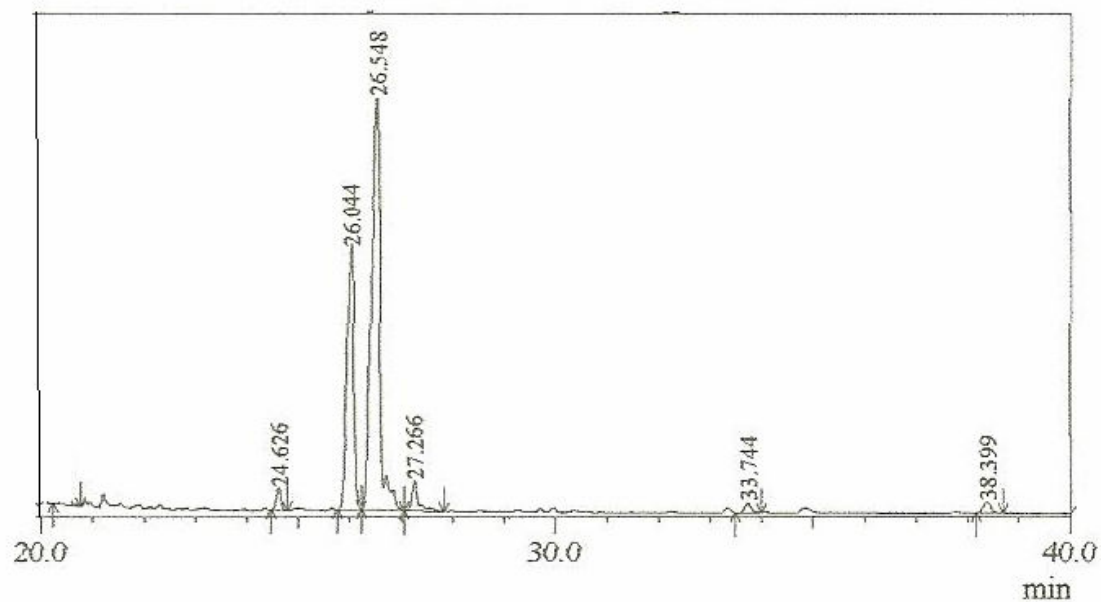
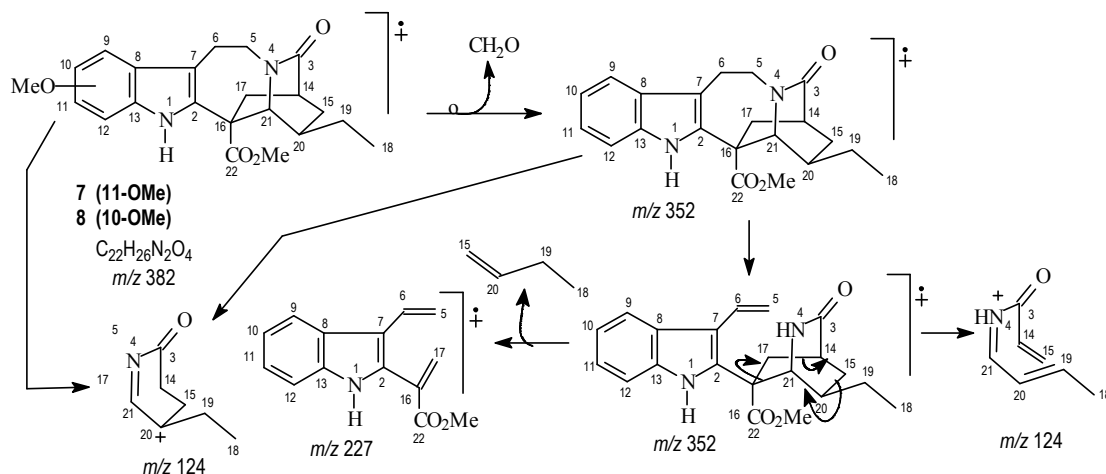
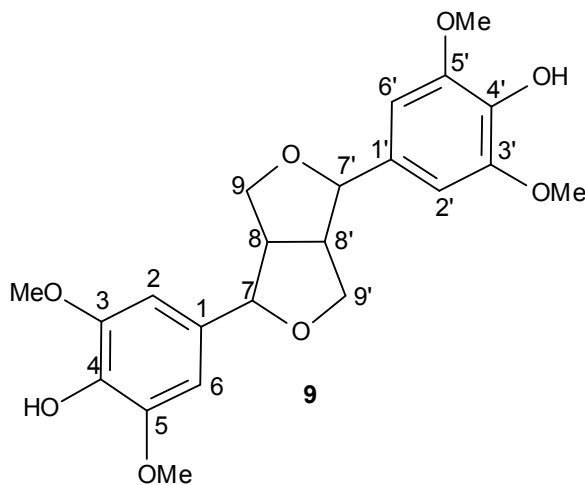


Figura 95: CG/EM da mistura dos alcalóides 7 e 8.



Esquema 6: Interpretação mecanística dos principais fragmentos no espectro de massas da mistura contendo os alcalóides **7** e **8**.

Os dados de RMN 1H , ^{13}C e massas, permitiram ainda a identificação da lignana siringaresinol (**9**) presente em 0,66% na mistura contendo os dois alcalóides **7** e **8**. A lignana siringaresinol (**9**) foi isolada anteriormente de *Allamanda neriifolia* (Abe e Yamauchi, 1988).



Os dados de RMN 1H e ^{13}C (**Figuras 98 e 102, págs. 174 e 178**), juntamente com experimentos bidimensionais 1H - 1H -COSY, HSQC e HMBC (**Figuras 110, 113 e 114, págs. 186, 189 e 190**) estão descritos na **Tabela 17** a seguir.

Tabela 17: Dados espectrais de RMN ^1H (400 MHz) e RMN ^{13}C (100 MHz) da lignana siringaresinol (**9**) presente em 0,66% na mistura contendo os dois alcalóides **7** e **8**, incluindo os resultados dos experimentos bidimensionais HSQC e HMBC, em CDCl_3 . Os valores dos deslocamentos químicos δ_{H} e δ_{C} estão em ppm e as constantes de acoplamento J estão em Hz.

9				
	HSQC		HMBC	
C	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
1/1'	132,1	-		
3/3'	-	-	-	-
3/3'/5/5'	147,2		H-2/H-6/H-2'/H-6'	MeO-3/MeO-5/MeO-3/MeO-5'
4/4'	134,4	-		H-2/H-6/H-2'/H-6'
CH				
2/2'	102,8	6,61 (s)		
5/5'	-	-	-	-
6/6'	102,8	6,61 (s)		
7/7'	86,6	4,75 (d, 5.6)		H-2/H-6/H-2'/H-6'; 2H-9/2H-9'
8/8'	54,1	3.15 (m)		
CH₂				
9/9'	71,8	4,81; 3,98		
CH₃				
(MeO) ₄ -3/3'	-	-	-	-
(MeO) ₄ -3/3'/5/5'	56,7	3,90 (s)		
(HO) ₂ -4/4'				

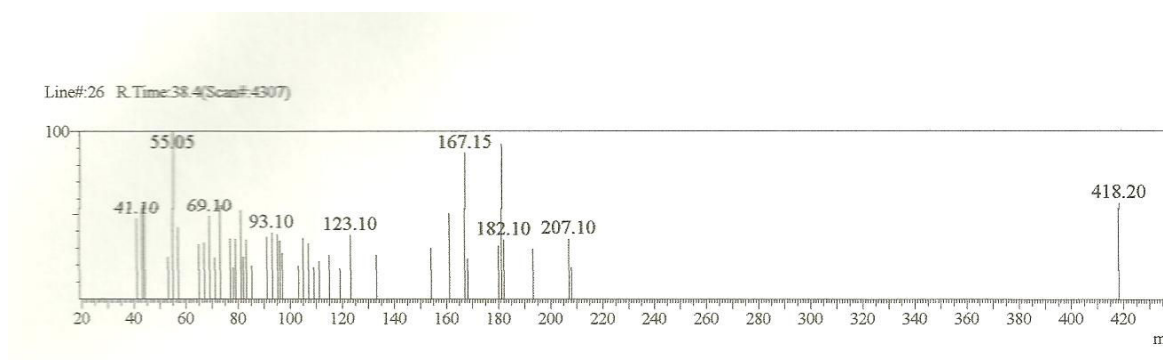
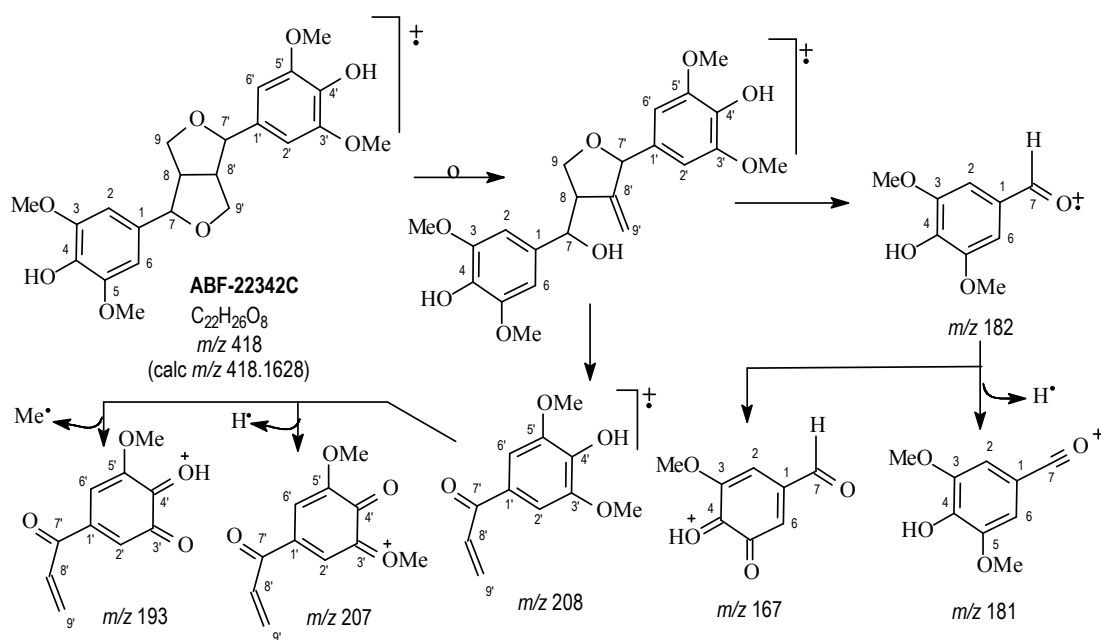


Figura 96: Espectro de massas da lignana siringaresinol (**9**) presente em 0,66% na mistura contendo os dois alcalóides **7** e **8**.



Esquema 7: Interpretação mecanística dos principais fragmentos no espectro de massas da lignana siringaresinol (**9**).

Figura 97: Espectro na região do infravermelho da mistura dos alcalóides **7** e **8** e da lignana **9**.

Figura 98: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da mistura dos alcalóides **7** e **8** e da lignana **9**.

Figura 99: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da expansão entre δ_{H} 0,6 a 2,0 da mistura dos alcalóides **7** e **8** e da lignana **9**.

Figura 100: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da expansão entre δ_{H} 2,5 a 3,9 da mistura dos alcalóides **7** e **8** e da lignana **9**.

Figura 101: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da expansão entre δ_{H} 4,4 a 7,3 da mistura dos alcalóides **7** e **8** e da lignana **9**.

Figura 102: Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) da mistura dos alcalóides **7** e **8** e da lignana **9**.

Figura 103: Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) com expansão entre δ_{C} 0,0 e 150,0 da mistura dos alcalóides **7** e **8** e da lignana **9**.

Figura 104: Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) com expansão entre δ_{C} 109,0 e 180,0 da mistura dos alcalóides **7** e **8** e da lignana **9**.

Figura 105: Espectro de RMN ^{13}C -APT (400 MHz, CDCl_3) da mistura dos alcalóides **7** e **8** e da lignana **9**.

Figura 106: Espectro de RMN ^{13}C -APT (400 MHz, CDCl_3) com expansão entre δ_{C} 10,0 e 55,0 da mistura dos alcalóides **7** e **8** e da lignana **9**.

Figura 107: Espectro de RMN ^{13}C -APT (400 MHz, CDCl_3) com expansão entre δ_{C} 10,0 e 72,0 da mistura dos alcalóides **7** e **8** e da lignana **9**.

Figura 108: Espectro de RMN ^{13}C -APT (400 MHz, CDCl_3) com expansão entre δ_{C} 85,0 e 125,0 da mistura dos alcalóides **7** e **8** e da lignana **9**.

Figura 109: Espectro de RMN ^{13}C -APT (400 MHz, CDCl_3) com expansão entre δ_{C} 70,0 e 147,0 da mistura dos alcalóides **7** e **8** e da lignana **9**

Figura 110: Mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY (400 MHz, CDCl_3) da mistura dos alcalóides **7** e **8** e da lignana **9**.

Figura 111: Ampliação (região 0,0 a 5,0 ppm) do Mapa de Correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY da mistura dos alcalóides **7** e **8** e da lignana **9**.

Figura 112: Ampliação (região 6,2 a 8,6 ppm) do Mapa de Correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY da mistura dos alcalóides **7** e **8** e da lignana **9**.

Figura 113: Mapa de correlação heteronuclear HSQC (400 MHz, CDCl₃) da mistura dos alcalóides **7** e **8** e da lignana **9**.

Figura 114: Mapa de correlação heteronuclear HMBC (400 MHz, CDCl_3) da mistura dos alcalóides **7** e **8** e da lignana **9**.

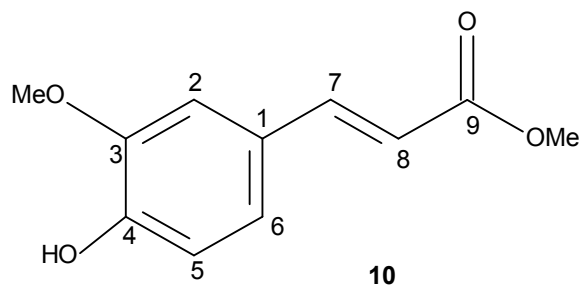
Figura 115: Ampliação (região 0,0 a 2,8 ppm) do Mapa de Correlação heteronuclear HMBC da mistura dos alcalóides **7** e **8** e da lignana **9**.

Figura 116: Ampliação (região 0,0 a 4,0 ppm) do Mapa de Correlação heteronuclear HMBC da mistura dos alcalóides **7** e **8** e da lignana **9**.

Figura 117: Ampliação (região 2,0 a 5,0 ppm) do Mapa de Correlação heteronuclear HMBC da mistura dos alcalóides **7** e **8** e da lignana **9**.

Figura 118: Ampliação (região 5,4 a 7,9 ppm) do Mapa de Correlação heteronuclear HMBC da mistura dos alcalóides **7** e **8** e da lignana **9**.

5.2.1.7 Substância 10



O fenilpropanóide **10** foi isolado da extração ácido/base das sementes extrato em MeOH das cascas das raízes de *T. catharinensis*, apresentando-se como um sólido amorfo.

O espectro na região do infravermelho da substância **10** (**Figura 119, pág. 200**) apresenta absorções a 3443 (O-H), 2920 (N-CH₃) 1728 (C=O de éster) e a 1639 cm⁻¹ (anel benzênico), sugerindo a presença de um anel aromático trissubstituído e uma função éster (Silverstein et al., 1991).

A análise do espectro de RMN ¹³C (**Figura 121, pág. 202; Tabela 18, pág. 199**) do fenilpropanóide **10** permitiu reconhecer a presença de onze átomos de carbono, sendo dois metílicos ligados a oxigênio, um característico de grupo metílico de éster e outro de grupo metoxila ligado a anel aromático, cinco átomos de carbono metínicos, sendo todos sp² e quatro carbonos quaternários, dos quais um característico de carbono carbonílico de éster em δ_C 167,7 (Bretmaier e Voelter, 1987)

Esses dados, em conjunto com os dados do espectro de CG/EM (**Figura 123, pág. 204**), o qual apresentou o pico do íon molecular em m/z 208 (100%) Daltons, permitiram propor a fórmula molecular C₁₁H₁₂O₄ para o fenilpropanóide **10**.

O espectro de RMN ¹H do fenilpropanóide **10** (**Figura 120, pág. 201; Tabela 18, pág. 199**) apresenta sinais (δ_H) correspondentes a grupos metoxila (O-CH₃), hidrogênios aromáticos, grupos metínicos (CH) (Pouchert, 1983).

O espectro de RMN ¹H (**Figura 120, pág. 201**) apresenta dois sinais característicos de hidrogênios de uma ligação dupla com geometria *trans* em δ_H 7,65 (1H, d, J = 15,6 Hz; H-7), 6,31 (1H, d, J = 15,6 Hz; H-8) conjugada com um anel aromático, e com um grupo carbometoxila, comprovado pelo sinal no

espectro de RMN ^{13}C (**Figura 121, pág. 202**) em δ_{C} 167,7, característico de um sistema carbonílico α,β -insaturado de um grupo éster.

A presença do grupo éster foi corroborada pelo sinal simpleto integrando para três hidrogênios em δ_{H} 3,93 no espectro de RMN ^1H (**Figura 120, pág. 201**) característico de grupo metoxila de éster, e confirmado pelo sinal no espectro de RMN ^{13}C (**Figura 121, pág. 202**) em δ_{C} 52,3 referente ao carbono do grupo metoxila.

O modelo 1,3,4-trissubstituído para o anel aromático foi estabelecido com base na multiplicidade dos sinais dos hidrogênios aromáticos apresentados no espectro de RMN ^1H (**Figura 120, pág. 201**) em δ_{H} 7,06 (1H, s, H-2), 6,94 (1H, d, $J= 8,7$ Hz, H-5) e 7,09 (1H, d, $J= 8,7$ Hz, H-6).

O simpleto largo em δ_{H} 5,87, integrando para um hidrogênio foi atribuído ao hidrogênio do grupo hidroxila, e o outro simpleto restante em δ_{H} 3,96, integrando para três hidrogênios, ambos no espectro de RMN ^1H (**Figura 120, pág. 201**), caracterizando o grupo metoxila, onde ambos encontram-se ligados em um anel benzênico, conduzindo assim ao fenilpropanóide **10**.

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram comparados com sistemas semelhantes na literatura (Pouchert, 1983).

O conjunto desses dados permitiu definir um esqueleto do tipo $\text{C}_6\text{-C}_3$ e propor a estrutura para o fenilpropanóide **10** isolado. A prova final dessa estrutura adveio da comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C (**Tabela 18, pág. 199**) com os da literatura para o fenilpropanóide (Pouchert, 1983).

Pelo melhor do conhecimento, esta é a primeira vez de um relato do isolamento de um fenilpropanóide no gênero *Tabernaemontana*.

Tabela 18: Dados espectrais de RMN ^1H (400 MHz) e RMN ^{13}C (100 MHz) do fenilpropanóide **10**, em CDCl_3 . Os valores dos deslocamentos químicos δ_{H} e δ_{C} estão em ppm e as constantes de acoplamento J estão em Hz.

10		
C	δ_{C}	δ_{H}
1	127,1	-
3	146,8	-
4	148,1	-
9	167,7	-
CH		
2	115,11	7,06 (s)
5	115,19	6,94 (d, 8,7)
6	123,44	7,09 (d, 8,7)
7	145,02	7,65 (d, 15,6)
8	109,80	6,31 (d, 15,6)
CH₃		
MeO	56,04	3,96 (s)
MeO-9	52,25	3,83 (s)
HO-3	-	5,87 (sl)

Figura 119: Espectro na região do infravermelho do fenilpropanóide **10**.

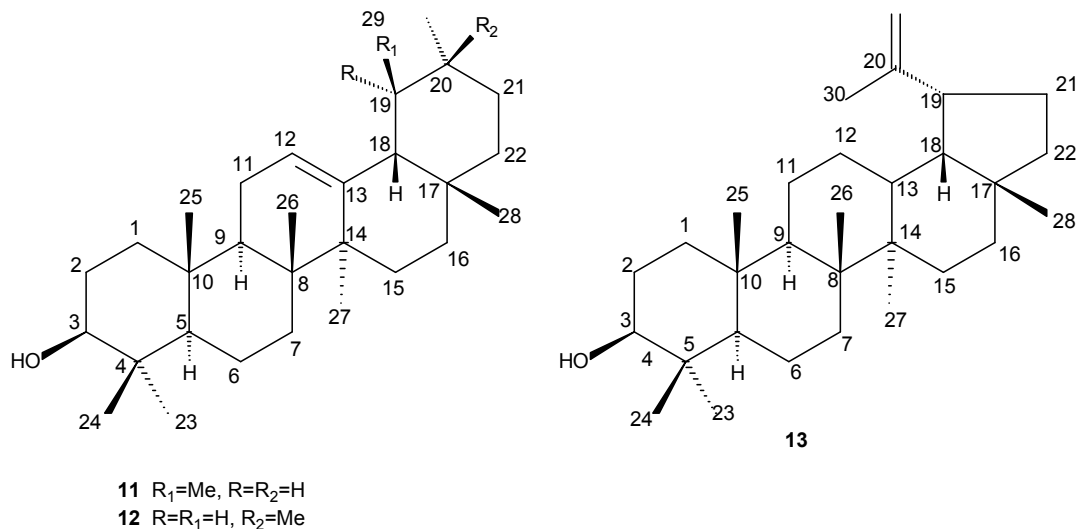
Figura 120: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do fenilpropanóide **10**.

Figura 121: Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) do fenilpropanóide **10**.

Figura 122: Espectro de RMN ^{13}C -APT (400 MHz, CDCl_3) do fenilpropanóide **10**.

Figura 123: Espectro de massas do fenilpropanóide **10**.

5.2.1.8 Substâncias 11, 12 e 13



Os triterpenos **11**, **12** e **13** foram isolados do extrato metanólico das cascas das raízes de *Tabernaemontana catharinensis*, e obtidos como uma mistura que se apresentava como única mancha em CCF utilizando vários eluentes.

Análise dos espectros de RMN 1H (**Figura 124**, **pág. 211**) e RMN ^{13}C -APT (**Figura 127**, **pág. 214**), juntamente com a comparação dos dados de RMN ^{13}C (**Tabela 19**, **pág. 207**) com os da literatura para as substâncias modelos α -amirina, β -amirina, e lupeol (Medeiros, 2003; Olea e Roque, 1990; Ahmad e Rahman, 1994) permitiram identificar os constituintes da mistura como a α e β -amirina (**11** e **12**) e lupeol (**13**).

O espectro de RMN 1H (**Figura 124**, **pág. 211**), revela vários sinais protegidos entre δ_H 0,8 e 1,4 correspondentes a grupos metílicos. O singlete multiplete em δ_H 3,24 corresponde ao hidrogênio H-3, sugerindo que os grupamentos hidroxila da mistura **11**, **12** e **13** estejam ligados aos C-3 na posição β (coerentes com o sinal a δ_C 79,4 no espectro de RMN ^{13}C , comum aos três triterpenos da mistura). Os tripletos largos em δ_H 5,20 e 5,15 correspondem aos hidrogênios olefínicos H-12 (**11** e **12**), e os dois singletos largos em δ_H 4,71 e 4,62 correspondem aos hidrogênios olefínicos H-29a e H-29b (**13**).

Os espectros de RMN ^{13}C -APT (**Figura 127**, **pág. 214**; **Tabela 19**, **pág. 207**) revelaram a presença de sinais olefínicos metínicos atribuídos ao CH-12 (δ_C

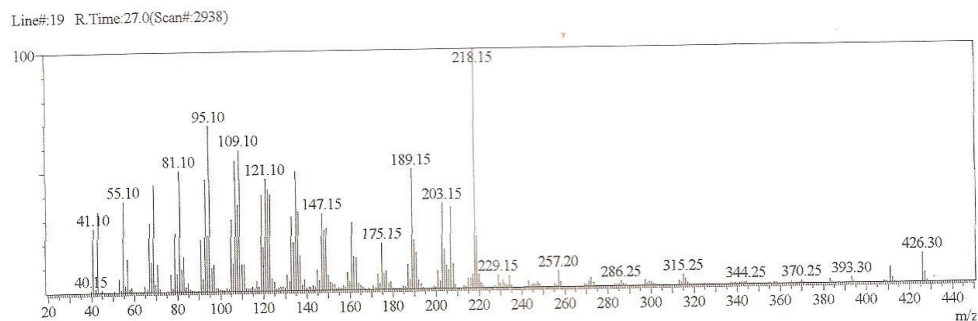
124,4 em **11** e 121,6 em **12**) e um sinal olefínico metilênico a C-29 (δ_C 109,3 em **13**).

Estas atribuições feitas juntamente com a comparação com os dados de RMN ^{13}C para as substâncias modelos α -amirina, β -amirina, e lupeol (Medeiros, 2003; Olea e Roque, 1990; Ahmad e Rahman, 1994), juntamente com espectro de CG/EM (**Esquemas 8, 9 e 10, págs. 209, 209 e 210**), o qual foi de fundamental importância para permitir confirmar as estruturas dos triterpenos conhecidos **11, 12 e 13**, que são comumente encontrados em plantas.

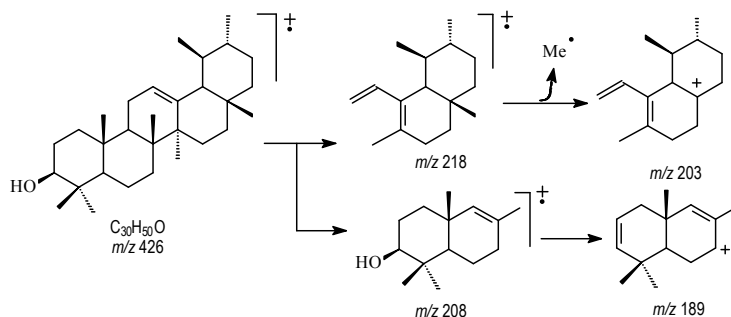
Tabela 19: Dados de RMN ^{13}C (100 MHz) dos triterpenos **11**, **12** e **13** e das substâncias α -amirina, β -amirina, e lupeol, em CDCl_3 . Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm.

	α -amirina	11	β -amirina	12	lupeol	13
C	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c
4	38,7	38,8	38,8	38,8	38,8	38,8
8	40,0		38,7		40,7	
10	36,9		37,6		37,1	37,2
13	139,3	140,0	145,1	145,3	-	
14	42,0	42,2	41,8	42,2	42,7	
17	33,7		32,5		42,9	42,9
20	36,9	36,7	31,1	31,3	150,8	
CH						
3	78,8	79,4	79,0	79,4	78,9	79,4
5	55,2	55,2	55,3	55,3	55,2	55,2
9	47,4	47,3	47,7		50,3	50,4
12	124,3	124,6	121,8	121,8	-	-
13	-		-		38,0	38,1
18	58,9	59,1	47,3	47,3	48,9	48,8
19	39,6	39,7	-		47,9	48,0
20	39,6	39,7	-		-	
CH₂						
1	38,7	38,6	38,7	38,6	38,6	38,6
2	27,2	27,4	27,3	27,4	27,3	27,4
6	18,3		18,5		18,2	
7	32,9	32,7	32,8	32,7	34,2	34,4
11	17,4		23,6		20,9	20,9
12	-	-	-	-	25,0	
15	28,7/26,7	26,6	26,2	26,2	27,4	27,4
16	26,6		27,0	27,1	35,5	
19	-		46,9	46,6	-	
21	31,2		34,8	34,7	29,8	29,7
22	41,5	41,5	37,2	37,2	39,9	40,0
29	-		-		109,3	109,3

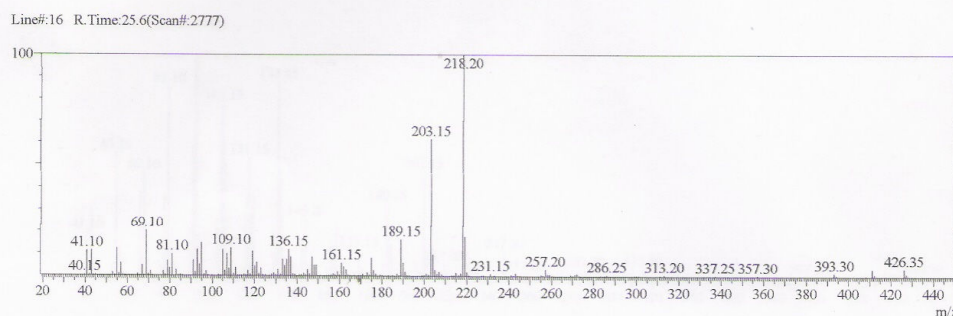
CH₃						
23	28,1	28,2	28,2	28,2	27,9	28,0
24	15,6	15,6	15,5	15,5	15,3	15,4
25	15,6	15,6	15,6	15,6	16,1	16,1
26	16,8	16,9	16,9	16,9	15,9	
27	23,3	23,3	26,0		14,5	
28	28,1	28,1	28,0	28,0	17,9	18,0
29	23,3	23,3	33,3	33,3	-	
30	21,3	21,4	23,7	23,7	19,2	19,3



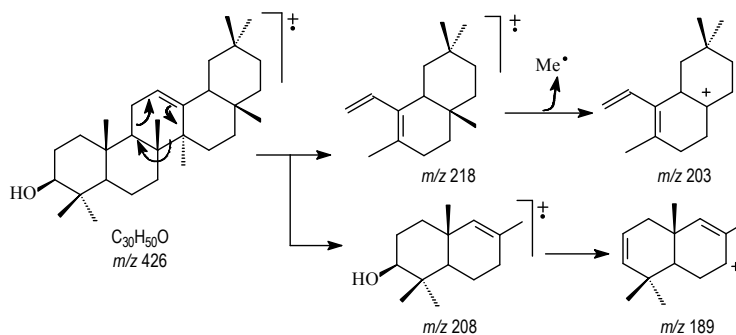
34,23%



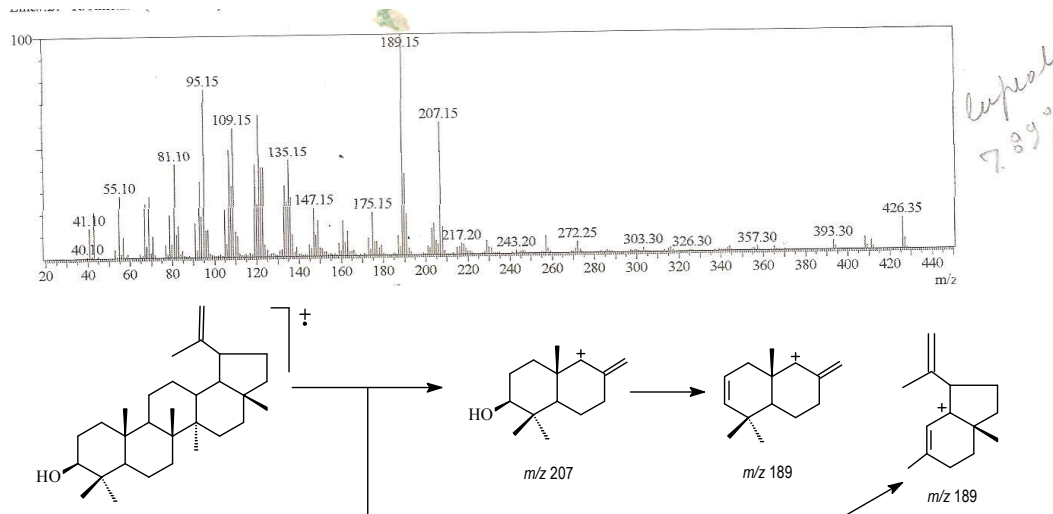
Esquema 8: Interpretação mecanística dos principais fragmentos no espectro de massas da α -amirina (11); Tempo de retenção 27,0 (34,23%).



19,24%



Esquema 9: Interpretação mecanística dos principais fragmentos no espectro de massas da β -amirina (12); Tempo de retenção 25,6 (19,24 %).



Esquema 10: Interpretação mecanística dos principais fragmentos no espectro de massas do lupeol (13); Tempo de retenção 29,1 (7,89 %).

Figura 124: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da mistura dos triterpenos **11**, **12** e **13**.

Figura 125: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da expansão entre δ_{H} 3,0 a 3,4 da mistura dos triterpenos **11**, **12** e **13**.

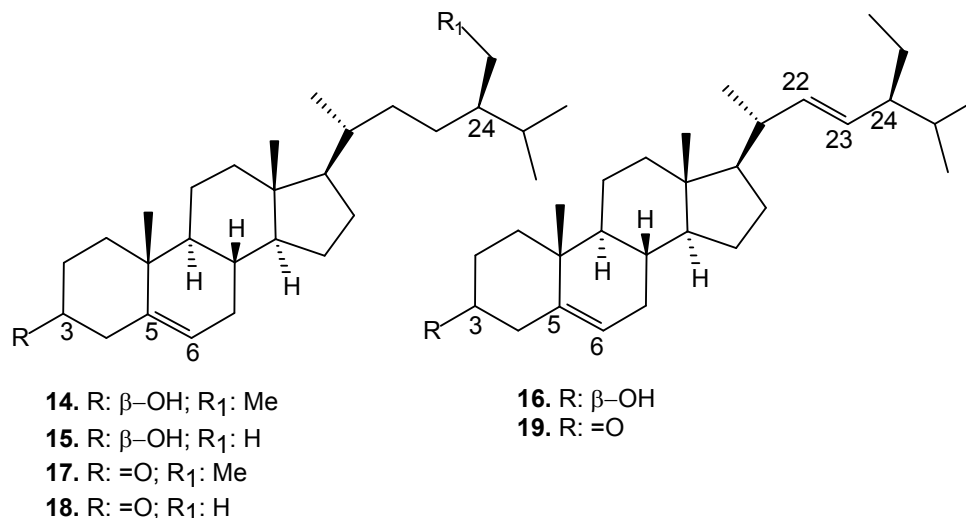
Figura 126: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da expansão entre δ_{H} 5,0 a 5,3 da mistura dos triterpenos **11**, **12** e **13**.

Figura 127: Espectro de RMN ^{13}C -APT (400 MHz, CDCl_3) da mistura dos triterpenos **11**, **12** e **13**.

Figura 128: Espectro de RMN ^{13}C -APT (400 MHz, CDCl_3) da expansão entre δ_{C} 12,0 a 36,3 da mistura dos triterpenos **11**, **12** e **13**.

Figura 129: Espectro de RMN ^{13}C -APT (400 MHz, CDCl_3) da expansão entre δ_{C} 36,3 a 60,0 da mistura dos triterpenos **11**, **12** e **13**.

5.2.1.9 Substâncias 14, 15, 16, 17, 18 e 19



Os esteróides **14**, **15**, **16**, **17**, **18** e **19** foram isolados do extrato metanólico das cascas das raízes de *Tabernaemontana catharinensis*, sendo que as duas frações distintas contendo a mistura dos esteróides **14**, **15** e **16**, e a outra fração contendo a mistura dos esteróides **17**, **18** e **19** ambas se apresentavam como única mancha em CCF utilizando vários eluentes.

Os esteróides são freqüentemente encontrados no reino vegetal, sendo que os mais comuns desta classe de substâncias são o β -sitosterol (**14**), campesterol (**15**) e o estigmasterol (**16**).

No entanto, quase sempre estas substâncias ocorrem em misturas devido às suas semelhanças estruturais dificultando suas separações, por isso na maioria das vezes, suas identificações são feitas em misturas, principalmente através de CG/EM e RMN ^{13}C .

A análise dos espectros de RMN ^1H (**Figura 132**, **pág. 226**) da mistura dos esteróides **14**, **15** e **16** apresentou um duplete de linhas largas em δ_{H} 5,37, relativo ao hidrogênio H-6; um septeto em δ_{H} 3,55 relativo ao hidrogênio H-3 e ainda um grande acúmulo de sinais intensos na região de δ_{H} 2,34 a 0,70 do espectro, relativos aos vários grupos de hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos dos esqueletos esteroidais.

Através da análise do espectro de RMN ^1H (**Figura 132**, **pág. 226**) da mistura, pode-se ainda confirmar a presença do estigmasterol (**16**) notado pelas

absorções dos hidrogênios vinílicos da cadeia lateral em δ_H 5,04 (dd, $J = 15,9$ e $7,2$ Hz, H-22) e 5,18 (dd, $J = 15,9$ e $7,2$ Hz, H-23).

A distinção entre o β -sitosterol (**14**), campesterol (**15**) (Vieira, 1995) e o estigmasterol (**16**), pode ainda ser confirmada pelos sinais no espectro de RMN ^{13}C (**Figura 134, pág. 228**) em δ_C 121,7 e 141,1 (C-6 e C-5) presentes nos três esteróides, e δ_C 129,2 e 138,2 (C-23 e C-22), presentes apenas no estigmasterol (**16**).

Os dados fornecidos pelos espectros de RMN 1H e RMN ^{13}C , permitiram uma completa atribuição dos sinais de cada esteróide com bastante coerência, além de comparação com os dados relatados na literatura para os dois esteróides (Breitmeier et al., 1987), o que colaborou para a confirmação das propostas estruturais apresentadas.

A confirmação final dos esteróides foi feita através da análise de CG/EM (**Esquemas 11, 12 e 13, págs. 220, 221 e 221; Figura 130, pág. 220**).

Tabela 20: Dados de RMN ^{13}C (100 MHz) dos esteróides **14**, **15** e **16** e das substâncias β -sitosterol, campesterol e estigmasterol, em CDCl_3 . Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm.

	β -sitosterol	14	campesterol	15	estigmasterol	16
C	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}
1	37,3	37,1	37,3	32,1	37,3	32,1
2	31,9	31,4	31,9	31,4	31,9	31,4
3	71,8	71,1	71,8	71,1	71,8	71,1
4	42,2	42,5	42,2	42,5	42,2	42,5
5	104,7	141,0	140,7	141,0	140,7	141,0
6	121,7	122,1	121,7	122,1	121,7	122,1
7	33,9	33,9	33,9	33,9	33,9	33,9
8	31,9		31,9		31,9	
9	50,1	50,0	50,1	50,0	50,1	50,0
10	36,1	36,0	36,1	36,0	36,1	36,0
11	21,2	21,4	21,2	21,4	21,1	21,4
12	39,8	39,6	39,8	39,6	39,8	39,6
13	42,3	42,5	42,3	42,5	42,3	42,5
14	56,8	56,9	56,8	56,9	56,8	56,9
15	24,3	24,3	24,3	24,3	24,3	24,3
16	28,9	28,6	28,9	28,6	28,9	28,6
17	56,0	56,4	56,0	56,4	56,0	56,4
18	12,3		12,3		12,3	
19	19,4	19,3	19,4	19,3	19,4	19,3
20	39,8	39,7	37,3	39,7	39,8	39,7
21	18,8		14,1		20,5	
22	32,0		32,0		138,3	138,2
23	26,0	26,1	31,6		129,3	129,3
24	45,8	45,8	45,8	45,8	51,2	51,8
25	29,0		31,9		31,9	
26	19,8	19,8	21,2	21,4	21,2	21,4
27	19,8	19,8	20,2		19,8	19,8
28	23,0	23,3	18,2		25,4	25,5
29	11,8	11,8	-	-	11,9	11,8

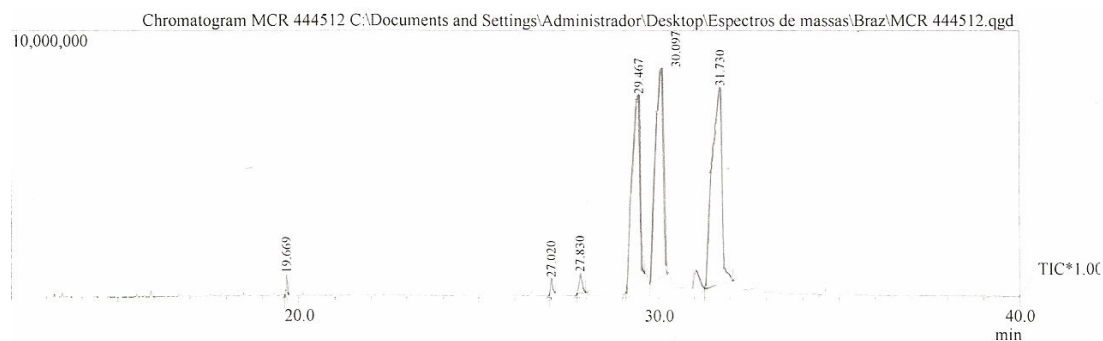
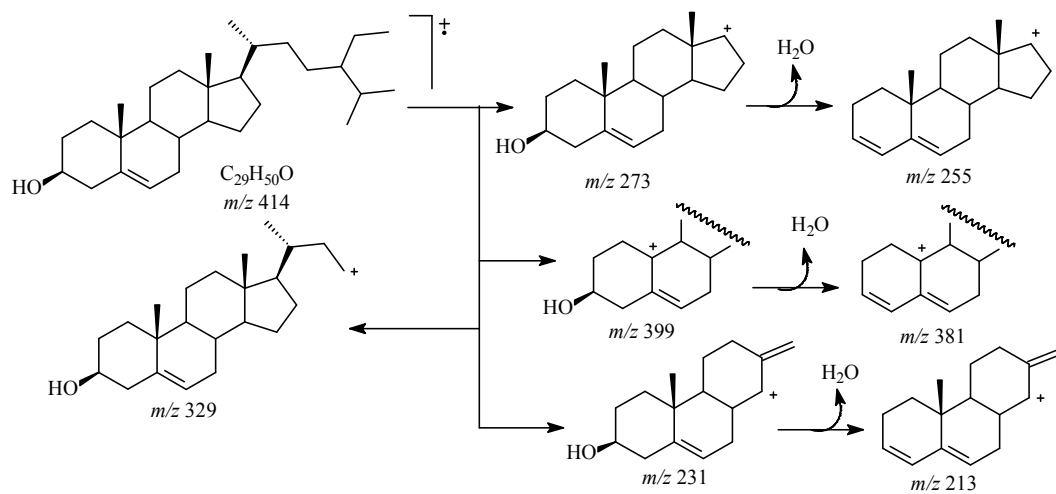
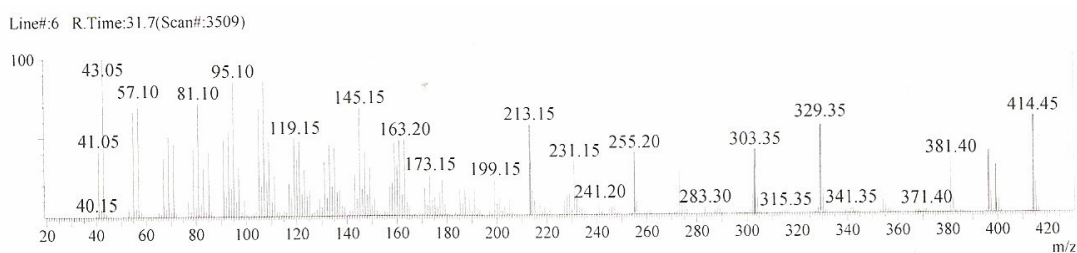
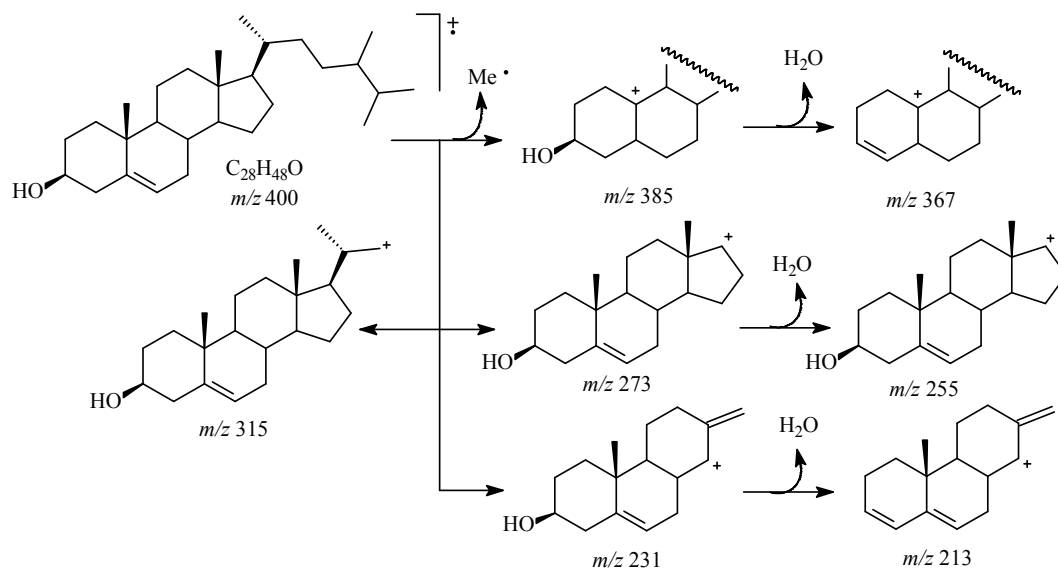
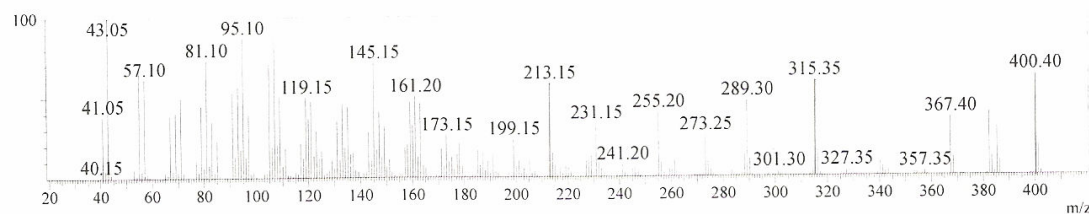


Figura 130: Cromatograma da mistura de esteróides **14**, **15** e **16**.



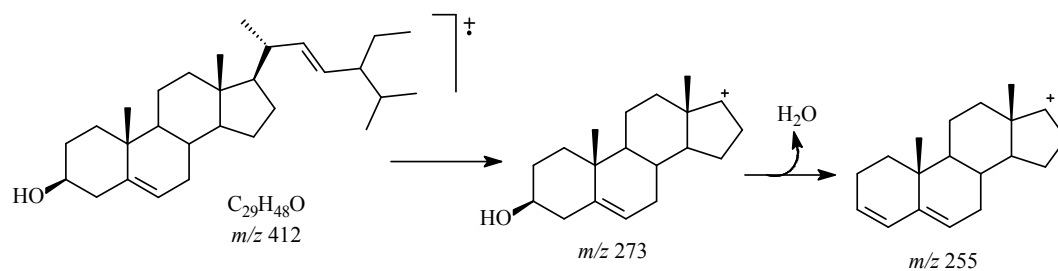
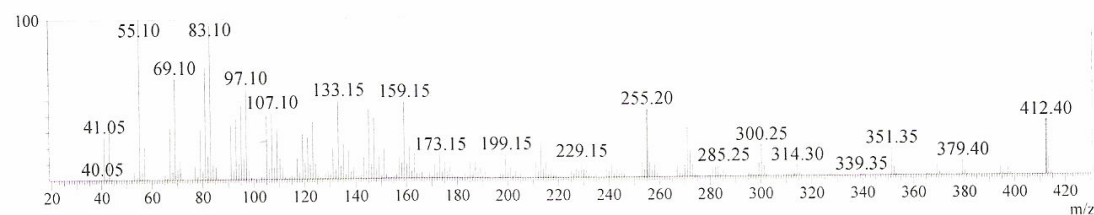
Esquema 11: Interpretação mecânica dos principais fragmentos no espectro de massas da β -sitosterol (**14**); Tempo de retenção 31,7 (37,66 %).

Line#:4 R.Time:29.5(Scan#:3237)



Esquema 12: Interpretação mecanística dos principais fragmentos no espectro de massas do campesterol (**15**); Tempo de retenção 29,5 (29,37%).

Line#:5 R.Time:30.1(Scan#:3313)



Esquema 13: Interpretação mecanística dos principais fragmentos no espectro de massas do stigmasterol (**16**); Tempo de retenção 30,1 (30,55%).

O espectro de RMN ^1H (**Figura 138, pág. 232**) da outra mistura contendo os esteróides sitostenona (**17**), campestenona (**18**) e estigmastenona (**19**) mostrou a ausência do sinal septeto em torno de δ_{H} 3,55 relativo ao hidrogênio H-3, mostrando agora um sinal múltiplo em δ_{H} 32,42 relativo aos hidrogênios 2H-2, característicos de hidrogênios α -carbonílicos (Vieira, 1995). A prova final da confirmação dos esteróides sitostenona (**17**), campestenona (**18**) e estigmastenona (**19**) contidos na mistura foi através do CG/EM (**Figura 131, pág. 222; Esquemas 14, 15 e 16 , págs. 223, 224 e 225**) descritos a seguir.

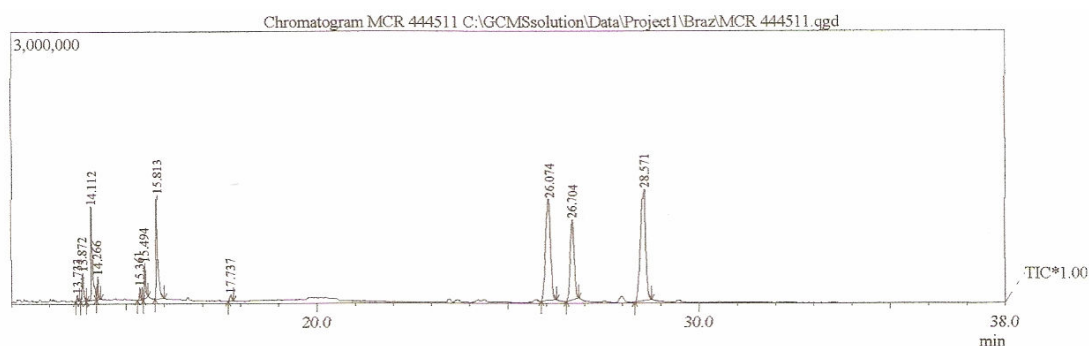
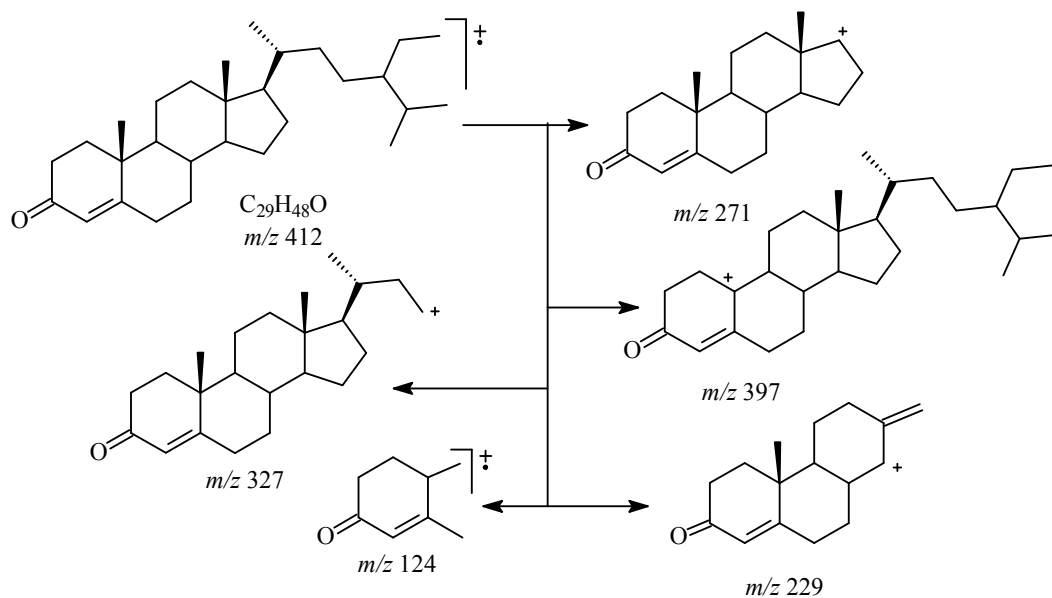
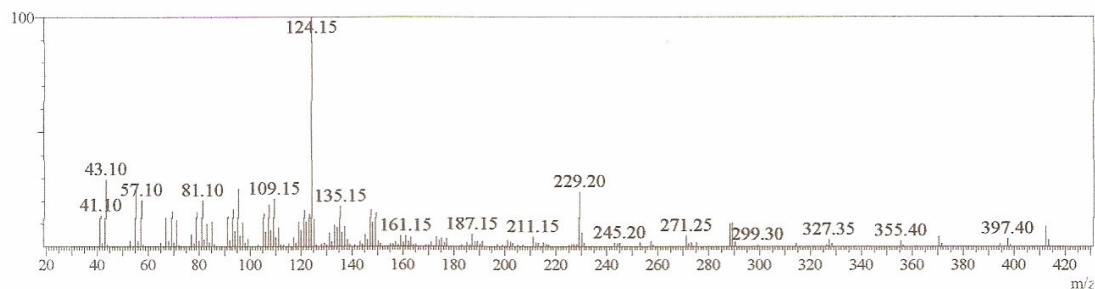


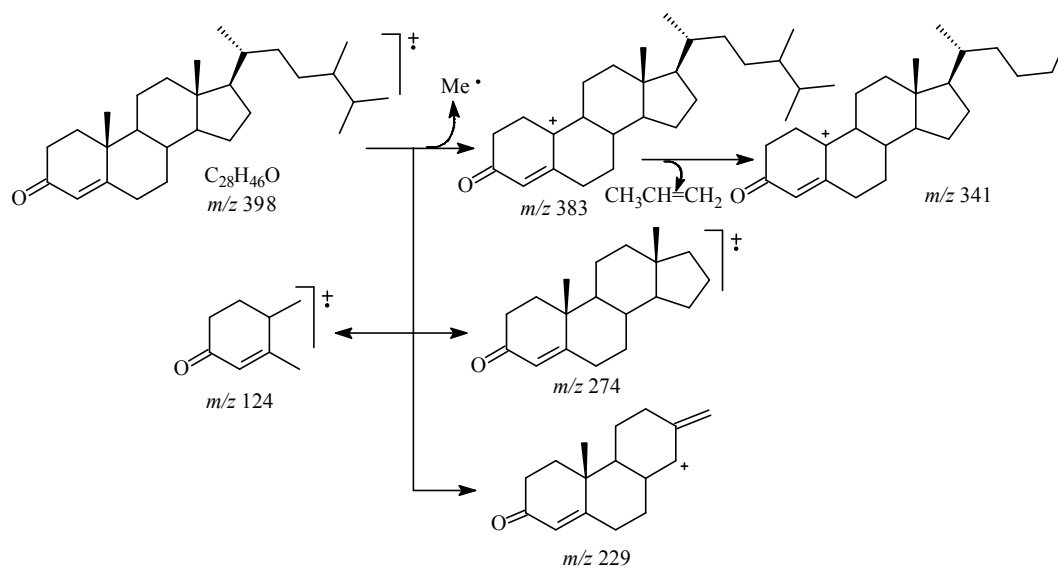
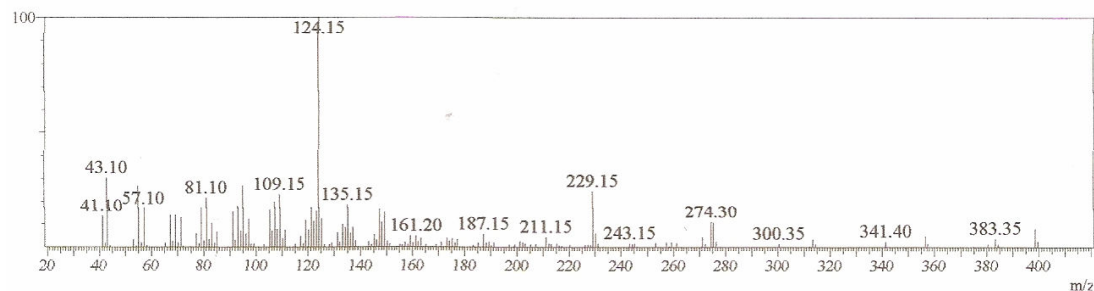
Figura 131: Cromatograma da mistura dos esteróides **17**, **18** e **19**.

Line#:11 R.Time:28.6(Scan#:3129)



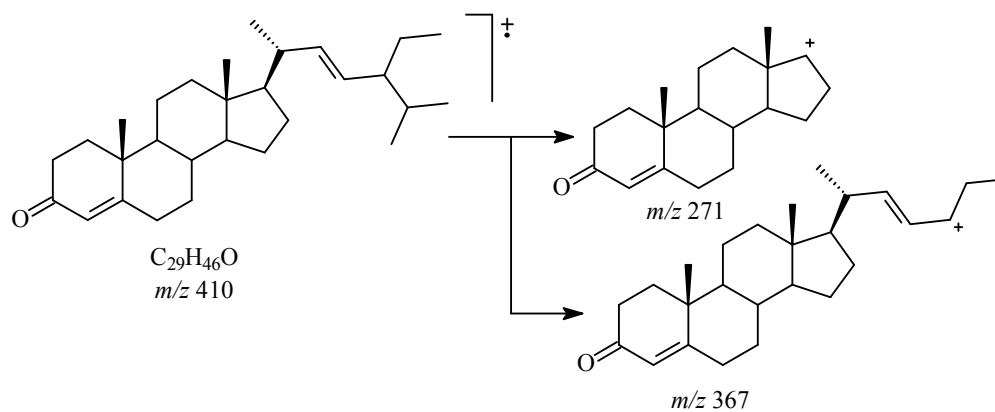
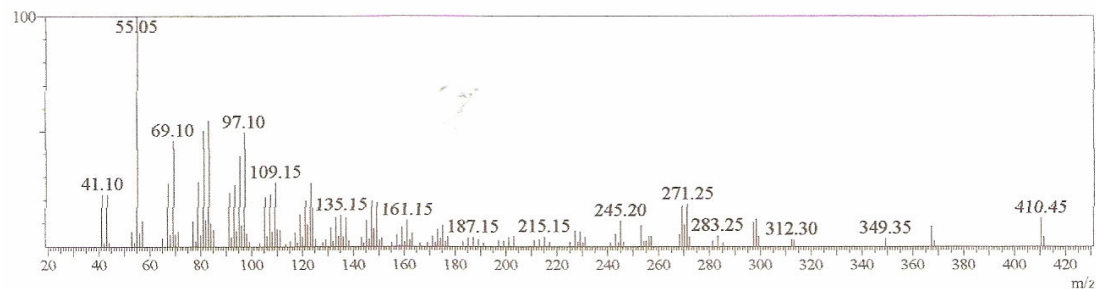
Esquema 14: Interpretação mecanística dos principais fragmentos no espectro de massas da sitostenona (**17**); Tempo de retenção 28,6 (30,88 %).

Line#:9 R.Time:26.1(Scan#:2830)



Esquema 15: Interpretação mecanística dos principais fragmentos no espectro de massas do campestenona (**18**); Tempo de retenção 26,1 (26,63%).

Line#:10 R.Time:26.7(Scan#:2905)



Esquema 16: Interpretação mecanística dos principais fragmentos no espectro de massas do stigmasterona (**19**); Tempo de retenção 26,7 (16,82%).

Figura 132: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da mistura dos esteróides **14**, **15** e **16**.

Figura 133: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da expansão entre δ_{H} 2,0 a 3,6 da mistura dos esteróides **14**, **15** e **16**.

Figura 134: Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) da mistura dos esteróides 14, 15 e 16.

Figura 135: Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) da expansão entre δ_{C} 0,0 a 60,0 da mistura dos esteróides **14**, **15** e **16**.

Figura 136: Espectro de RMN ^{13}C -APT (400 MHz, CDCl_3) da mistura dos esteróides **14**, **15** e **16**.

Figura 137: Espectro de RMN ^{13}C -APT (400 MHz, CDCl_3) da expansão entre δ_{C} 10,0 a 80,0 da mistura dos esteróides **14**, **15** e **16**.

Figura 138: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da mistura dos esteróides **17**, **18** e **19**.

5.3 Teste biológico de inibição de enzima acetilcolinesterase

Os resultados do ensaio em microplaca da amostra **2** pelo método de Ellman modificado encontram-se apresentados na **Tabela 21**, a seguir.

Tabela 21: Ensaio em microplaca da amostra **2** pelo método de Ellman modificado

Massa da amostra (mg)	Poços	Valor de Absorbância	Média	Desvio Padrão
1,01	A7	41,558	41,403	0,816
	B7	40,519		
	C7	42,130		

Os valores médios de absorbância para o controle negativo e positivo (fisostigmina) foram, respectivamente, $126,364 \pm 10,311$ e $1,368 \pm 0,364$, correspondendo a 0 e 100% de inibição.

O valor médio da absorbância de 41,403 equivale ao valor da inibição efetiva da enzima pela amostra **2** de 50,49%.

Para a construção da curva de calibração (**Figura 139, pág. 234**), a amostra **2** foi diluída nas concentrações: 2,0; 0,5; 0,250; 0,125; 0,0625 e 0,0313 mg/mL (**Anexo 1**). A partir das concentrações foi obtida a curva plotando a % de inibição efetiva *versus* o logaritmo da concentração do inibidor presentes nas soluções do ensaio. Foram também utilizados, para construção desta curva, o controle negativo, o padrão fisostigmina e o etanol 10%.

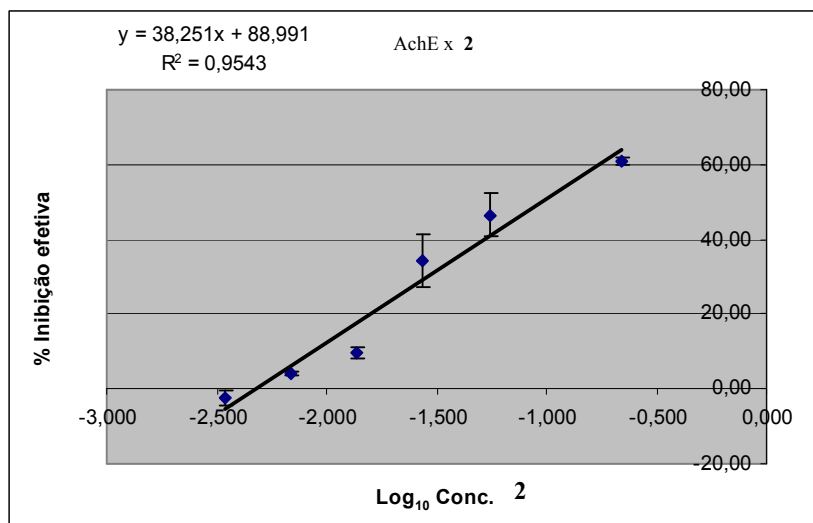


Figura 139: Curva de inibição da acetilcolinesterase pela amostra 2

O valor de CI_{50} (concentração da amostra capaz de inibir 50% da atividade da enzima) obtido para o alcalóide 12-metóxi-*N*_b-voachalotina foi de $2,33 \times 10^{-1} \mu\text{M}$, podendo ser considerado significativo por caracterizar uma droga potente, uma vez que este valor se encontra inferior ao intervalo de valores de CI_{50} encontrado na literatura para a galantamina (0,39 a $1,5 \mu\text{M}$), uma substância de origem natural utilizada para o tratamento da doença de Alzheimer (Seidl, 2010).

Em comparação com o padrão, fisostigmina, a capacidade inibitória ainda é muito baixa, mas os resultados são válidos devido à busca de novos fármacos que apresentem menores efeitos adversos e maior tempo de meia-vida. Uma droga, para ser utilizada como fármaco inibidor da acetilcolinesterase, precisa ter uma atividade inibitória menor que 100%, ser reversível, apresentar o mínimo de efeitos colaterais possíveis, além de uma biodisponibilidade razoável (Mukherjee et al., 2007; Schulz, 2003; Melzer, 1998).

Ainda são necessários testes complementares, comparando-se as atividades da amostra 2 com as drogas atualmente em uso, em uma mesma bateria de testes, para que se possa fazer afirmações sobre a efetividade desta substância.

6. CONCLUSÃO

O estudo fitoquímico das sementes, folhas e casca das raízes da espécie *T. catharinensis* permitiu isolar e identificar dezenove substâncias, sendo oito alcalóides, seis esteróides, três triterpenos, um fenilpropanóide e uma lignana.

A química da espécie coletada no Cerrado não apresentou diferenças da espécie coletada na Mata Atlântica (mesmo sem o conhecimento da idade das espécies), com exceção do fenilpropanóide e da lignana que, apesar de facilmente encontrados no reino vegetal, foram pela primeira vez identificados no gênero *Tabernaemontana*. Assim como os alcalóides 3-oxoisovoacangina e 3-oxovoacangina foram isolados pela primeira vez na espécie *T. catharinensis* até o presente momento.

O resultado do teste, apesar de preliminar, apresentou-se promissor para o alcalóide 12-metoxi-*N*_b-voachalotina. O valor de IC₅₀ igual a $2,33 \times 10^{-1}$ μM que, quando comparado aos valores de IC₅₀ dos princípios ativos de fármacos já existentes no mercado, não se encontra a quem, apresentando, inclusive, a mesma ordem de grandeza e estimulando, com isso, a busca por mais alcalóides

que sejam promissores, ou por modificações químicas que possam potencializar a atividade anticolinesterásica desses alcalóides.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe, F. and Yamauchi, T (1988) 9 α -hydroxypinoresinol, 9 α -hydroxymedioresinol and related lignans from *Allamanda neriifolia*. *Phytochemistry*, 27: 575.

Ahmad, V.U.; Rahman, A.U. (1994) *Handbook of Natural Products Data (Pentacyclic and Triterpenoids)*, Vol. 2, Elsevier – Amsterdam.

Andrade, M.T.; Lima, J.A.; Pinto, A.C.; Rezende, C.M.; Carvalho, M.P.; Epifânio, R.A. (2005) Indole alkaloids from *Tabernaemontana australis* (Müell. Arg) Miers that inhibit acetylcholinesterase enzyme. *Bioorg. Med. Chem.*, 13: p.4092-4095.

Azoug, M.; Loukaci, A.; Nuzillard, J. M.; Moreti, C.; Hanrot, M.Z.; Oliver, L.L.M. (1995) Alkaloids from stem bark and leaves of *Peschiera buchtieni*. *Phytochemistry*, 39: p.1223-1228.

Barbosa-Filho, J.M.; Medeiros, K.C.P.; Batista, L.M.; Athayde-Filho, P.F.; Silva, M.S.; Cunha, EVLd; Almeida, J.R.G.S.; Quintans-Júnior, L.J. (2006). Natural Products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. *Rev Bras Farmacogn*, 16: p. 258-285.

Braga, R.M.; Reis, F.A.M. (1987) Quaternary Alkaloids from *Peschiera fuchsiaefolia*. *Phytochemistry*, 26, p.833-836.

Braz-Filho, R. (1994) Química de Produtos Naturais: Importância, Interdisciplinaridade, Dificuldades e Perspectivas. A Peregrinação de um Pacatubano. *Quím. Nova*, 17(5): p.405-445.

Braz-Filho, R. (2010). Contribuição da Fitoquímica para o Desenvolvimento de um País Emergente. *Quím. Nova*, 33 (1): p. 229.

Breitmaier, E.; Voelter, W. (1987) Carbon-13 NMR Spectroscopy: High-Resolution Methods and Applications in Organic Chemistry and Biochemistry. 3 ed. Weinheim, VCH – Germany, p. 363-364.

Bruneton, J. (1995) *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants*, intercept Limited, England, p. 815-861.

Budzikiewicz, H.; Djerassi, C.; Williams, D. (1964) *Structure Elucidations of Natural Products*, vol. 1: Alkaloids. Holden-Day, inc., San Francisco – USA, p. 60-68.

Cardoso, C.A.L.; Vilegas, W.; Honda, N.K. (1998) Qualitative determination of indole alkaloids, triterpenoids and steroids of *Tabernaemontana hilariana*. *J. Chromatogr. A*, 808: p.264-268.

Cardoso, C.A.L.; Vilegas, W. (1999) Droplet Counter-current Chromatography of Indole Alkaloids from *Tabernaemontana hilariana*. *Phytochem. Anal.*, 10: p.60-63.

Cardoso, C.L.; Castro-Gamboa, I.; Silva, D.H.S.; Furlan, M.; Epifanio, R.D.; Pinto, A.D.; de Rezende, C.M.; Lima, J.A.; Bolzani, V.D. (2004). Indole glucoalkaloids from *Chimarrhis turbinata* and their evaluation as antioxidant agents and acetylcholinesterase inhibitors. *J. Nat. Prod.*, 67: 1882-1885.

Chaturvedula, V.S.P.; Shannon, S.; Schilling, J.K.; Kingston, D.G.I. (2003) New Cytotoxic Indole Alkaloid from *Tabernaemontana calcarea* from the Madagascar Rainforest. *J. Nat. Prod.*, 66: 528-531.

Chiang, L.C.; Cheng, H.Y.; Liu, M.C.; Chiang, W.; Lin, C.C. (2004) *In vitro* evaluation of antileukemic activity of 17 commonly used fruits and vegetables in Taiwan. *Lebensmittel-Wissenschaft und – Technologie*, 37: p.539-544.

Danieli, B.; Palmisano, G. (1986) *Alkaloids from Tabernaemontana*. In: Brossi, A. (edit) *The Alkaloids*, New York, Academic Press, 27: p. 1-130.

Dewick, P. M. (1997) *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*, Paul M. Dewick. Ed. Wiley, 2 ed, p. 5-6.

Di Giovanni, S.; Borloz, A.; Urbain, A.; Marston, A.; Hostettmann, K.; Carrupt, P.A.; Reist, M. (2008) *In vitro* screening assays to identify natural or synthetic acetylcholinesterase inhibitors: thin layer chromatography versus microplate methods. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 33: 109-119.

Ellman, G.L.; Courtney, K.D.; Andres, V.; Featherstone, R.M. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 7: 88-95.

Figueiredo, E.R. (2005) *Alcalóides Indólicos de Tabernaemontana salzmannii*. (Mestrado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes-RJ. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. UENF, p.218.

Figueiredo, E.R.; Vieira I.J.C.; Souza J J.; Braz-Filho R.; Mathias L.; Kanashiro M.M.; Côrtes F.H. (2010) Isolamento, identificação e avaliação da atividade antileucêmica de alcalóides indólicos monoterpênicos de *Tabernaemontana salzmannii* (A. DC.) Miers; *Rev. Bras. Farmacogn.*, 20(1): p. 75-81.

Friebolin; H. (1993) *Basic One- and Two-Dimensional NMR Spectroscopy*. 2 ed. Weinheim, VCH – Germany, Translated by Jack K. Beconsall, p. 139-146.

Fumagali, E.; Gonçalves, R.A.C.; Machado, M.F.P.S.; Vidoti, G.J.; Oliveira, A.J.B. (2008) Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. *Rev. Bras. farmacogn.* vol.18 n.4.

Gobbo-Neto, L.; Lopes, N.P.(2007). Plantas Medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quím. Nova*, 30(2): p. 374-381.

Gottlieb, O. R.; Braz-Filho, R.; Craveiro, A. A.; Alencar, J. W. (1967). *Introducción a la Espectrometría de Masa de Sustancias Orgánicas*. Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos - Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico, Washington - D.C.

Gower, Adriana E.; Pereira, Benedito da S.; Marsaioli, Anita J. (1986) Indole alkaloids from *Peschiera campestris*. *Phytochemistry*, 25(12): 2908-10.

Kaneda, N.; Noro, Y.; Nagatsu, T. (1985) Highly sensitive assay for acetylcholinesterase activity by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr. A*, 344: 93-100.

Harborne J.B. (1988). *Introduction to Ecological Biochemistry*. London: Academic Press.

Harborne J.B. (1998). *Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. 3 ed. Chapman and Hall, London, p. 301.

Hesse, M. (1981) *The taxonomic position of some genera in the Loganiaceae, Apocynaceae, and Rubiaceae, related families, which contain indole alkaloids*. Alkaloid Chemistry. Translated from the German Edition by I. Ralph C. University of Tasmania. A Wiley-Interscience publication, p. 1-26.

Howes, M.J.; Houghton, P.J. (2003) Plants used in Chinese and Indian traditional medicine for improvement of memory and cognitive function. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 75: 513 – 527.

Khalid, A.; Zaheer-ul-Haq; Ghayur, M.N.; Feroz, F.; Atta-ur-Rahman; Gilani, A.H.; Choudhary, M.I. (2004) Cholinesterase inhibitory and spasmolytic potential of steroidal alkaloids. *J. Steroid. Biochem.*, 92: 477–484.

Klink, C.A.; Machado, R.B. (2005) A conservação do Cerrado Brasileiro. *Megadiversidade*, vol. 1, n. 1.

Lambert, J.B.; Shyrvell, H.F.; Lightner, D.; Cooks, R.G. (1987) *Introduction to Organic Spectroscopy*. Macmillan Publishing Company, New York.

Leeuwenberg, A.J.M. (1994) *A Revision of Tabernaemontana* II. The new World Species and Stemmadenia. Lock, J.M. Ed.; The Trustees of The Royal Botanic Gardens Kew, p.441.

Lemos, T.L.G.; Andrade, C.H.S.; Guimarães, A.M.; Wolter-Filho, W.; Braz-Filho, R. (1996) 19-Epivoacristine, an Iboga Alkaloid Isolated from *Peschiera affinis*. *J. Braz. Chem. Soc.*, 7(2): p.123-126.

Lim, K.; Thomas, N. F., Abdullah, Z.; Kam, T. (2009) Seco-tabersonine alkaloids from *Tabernaemontana corymbosa*. *Phytochemistry*, 70: p.424–429.

Longa, C.M.O. (2002) *Ocorrência, patogenicidade e controle alternativo de Rhizoctonia solani kühn em boa-noite (Catharanthus roseus G. DON.) pelo uso de Trichoderma spp. e composto orgânico*. Dissertação de Mestrado - Salvador – BA, Universidade Federal da Bahia – UFB.

Lounasmaa, M.; Tolvanen, A. (1986) ¹H NMR Data of Monoterpenoid Indole Alkaloids. *Heterocycles*, 24 (11): p. 3229-3281.

Mabberley, D.J. (1997) *The plant-book – a portable dictionary of the vascular plants*. 2 Ed. Cambridge: University Press – UK, p.771.

Marston, A.; Kissling, J.; Hostettmann, K. (2002) A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants.

Phytochem. Anal., 13: 51-54.

Medeiros, W.B. (2003). *Estudo Fitoquímico de Tabernaemontana laeta Mart. (Apocynaceae)* – Tese de Doutorado – Seropédica – RJ, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ.

Melzer, D. (1998) New drug treatment for Alzheimer's diseases: lessons for healthcare policy. *BMJ*, 316: p. 762-764.

Meyer, W.E.; Coppola, J.A.; Goldman, L. (1973) Alkaloids studies. VIII: isolation and characterization of alkaloids of *Tabernaemontana heyneana* wall and antifertility properties of coronaridine. *J. Pharm. Science*, 62:1199.

Montanari, C.A.; Bolzani, V.S. (2001) Planejamento racional de fármacos baseados em produtos naturais. *Quim. Nova*, 24: p.105-111.

Moreira, F.F.; Mendonça, C.B.F.; Pereira, J.F.; Esteves, V.G. (2004) Polianotaxonomia de espécies de Apocynaceae ocorrentes na Restinga de Carapebus. *Acta Bot. Bras.*, 18. Carapebus, RJ, Brasil.

Mukherjee, P.K.; Kumar, V.; Mal, M.; Houghton, P.J. (2007) acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine*, 14: p. 289-300.

Nakanishi, K. (1990). *One-dimensional and Two-dimensional NMR Spectroscopy by Modern Pulse Techniques*. University Science Books, Califórnia.

Neuwinger, H.D. (1998) Alkaloids in arrow poisons. In: Roberts, M.F. & Wink, M. (edit) *Alkaloids: Biochemistry, Ecology and Medicinal Applications*. New York, Plenum Press.

Newman, D.J. and Cragg, G.M. (2007) Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J. Nat. Prod.*, 70: 461-477.

Olea, R.S.G; Roque, N.F. (1990) Análise de Misturas de Triterpenos por RMN de ^{13}C . *Quím. Nova*, 13: p. 278.

Orhan, G.; Orhan, I.; Sener, B. (2006) Recent developments in natural and synthetic drug research for Alzheimer's disease. *Lett. Drug. Design. Discov.*, 3: 268-274.

Orhan, I.; Naz, Q.; Kartal, M.; Tosun, F.; Sener, B.; Choudhary, M.I. (2007) *In vitro* anticholinesterase activity of various alkaloids. *Z. Naturforsch. C.*, 62: 684-688.

Oliveira, V.B. (2008) *Alcalóides Indólicos de Aspidosperma spruceanum* (APOCYNACEAE). Tese de Doutorado - Campos dos Goytacazes - RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF.

Pereira, P.S.; França, S.C.; Oliveira, P.V.A.; Breves, C.M.S.; Pereira, S.I.V.; Sampaio, S.V.; Nomizo, A.; Dias, D.A. (2008) Chemical constituents from *tabernaemontana catharinensis* root bark: a brief nmr review of indole alkaloids and *in vitro* cytotoxicity - *Quim. Nova*, 31(1): p.20-24.

Pihlaja, K.; Kleinpeter, E. (1994) *Carbon-13 NMR Chemical Shifts in Structural and Stereochemical Analysis*. Weinheim, VCH.

Pouchert, L. J. (1983) *The Aldrich Chemical Library of NMR Spectra*, 2^a Ed. Aldrich Company, INC. Milwaukee, Wisconsin, p. 1058.

Rapini, A. (2000) *Sistemática: estudos em Asclepiadoideae (Apocynaceae) da Cadeia do Espinhaço de Minas Gerais*. Tese de Doutorado – São Paulo – SP, Universidade de São Paulo – USP.

Rastogi, K.; Kapil, R.S., Popli, S.P. (1980) New Alkaloid from *Tabernaemontana divaricata*. *Phytochemistry*, 19:1209-1212.

Rates, S.M.K.; Schapoval, E.E.S.; Souza, I.A.; Henriques, A.T. (1993). Chemical constituents and pharmacological activities of *Peschiera australis* *Int. J. Pharmacogn.*, 31: p.288-294.

Rhee, I.K.; Van de Meent, M.; Ingkaninan, K.; Verpoorte, R. (2001). Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *J. Chromatogr. A*, 915: 217-223.

Sanders, J.K.M.; Hunter, B.K. (1993) *Modern NMR Spectroscopy: A Guide for Chemists*. 2 ed. Oxford: Oxford University Press.

Santos, R.A. (2009) *Estratégias Terapêuticas no Tratamento da Dor Crônica: Uma Genealogia da Clínica da Dor*. Dissertação de Mestrado – Rio de Janeiro – RJ, Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ.

Schmeller, T. and Wink, M. (1998) Utilization of alkaloids in modern medicine. In: ROBERTS, M. F. & WINK, M. (edit) *Alkaloids: Biochemistry, Ecology and Medicinal Applications*. New York, Plenum Press.

Schulz, V. (2003) Ginkgo extract or cholinesterase inhibitors in patients with dementia: what clinical trial and guidelines fail to consider. *Phytomedicine*, 10: p. 74-79.

Seidl, C. (2010) *Pesquisa de Substâncias Naturais Inibidoras da Acetilcolinesterase*. Dissertação de Mestrado – Curitiba – PR, Universidade Federal do Paraná – UFP.

Shamma, M.; Hindenlang, D.M. (1979) *Carbon-13 NMR Shift Assignments of Amines and Alkaloids*, Plenum Press, New York.

Souza, J.J. (2006) *Constituintes Químicos das cascas das raízes de Tabernaemontana hystrix (Apocynaceae)* - Mestrado em Ciências Naturais –

Campos dos Goytacazes-RJ. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. UENF, 1: p.96.

Silverstein, R.M., Bassler, G.C., Morrill, T.C. (1991) *Spectrometric Identification of Organic Compounds* (5th Ed). John Wiley, New York.

Simpson, B.B. and Molly, C.O. (1986) *Economic Botany: Plants in Our World*. New York, McGraw-Hill Publishing Co.

Sizdak, G. (1996) *Mass Spectrometry for Biotechnology*. New York: Academic Press.

Van Beek, T.A.; Van Gessel, M.A.J.T. (1988) In *Alkaloids: chemical and biological perspectives*; Pelletier, S. W., Ed: Wiley and Sons: New York, Vol. 6.

Verpoorte, R. (1986) Methods for the Structure Elucidation of Alkaloids, *J. Nat. Prod.*, 49(1): p. 1-25.

Viegas, C.; Bolzani, V.D.; Furlan, M.; Furlan, M.; Fraga, C.A.M.; Barreiro, E.J. (2004) Natural products as candidates for useful drugs in the treatment of Alzheimer's disease. *Quim. Nova*, 27: 655-660.

Vieira, I.J.C. (2003) *Caracterização e Bioprodução de Alcalóides Indólicos de Apocynaceas da Mata Atlântica*. (Projeto aprovado pela FAPERJ).

Vieira, I.J.C. (1995) *Uma contribuição à química da família Simaroubaceae* – Tese de Doutorado – São Carlos – SP. Universidade Federal de São Carlos. UFSCar.

Vieira, I.J.C.; Medeiros W.L.B.; Monnerat, C.S.; Souza, J.J.; Mathias, L.; Braz-Filho, R.; Pinto, A.C.; Sousa, P.M.; Rezende, C.M.; Epifanio, R.A. (2008) Two fast screening methods (GC-MS and TLC-ChEI assay) for rapid evaluation of potential anticholinesterasic indole alkaloids in complex mixtures. *An. Acad. Bras. Ciênc.*, 80(3): p.419-426.

Zenk, P. (1980) *The Biosynthesis of Heteroyimbini-type Alkaloids*. In: Stockigt, J. *Indole and Biogenetically related Alkaloids* Academia. Press London New York, Toronto, Sydney, San Francisco, p. 115-141.

Zhu, J.P.; Guggisberg, A.; Kalt-Hadamowski, M.; Hesse, M. (1990) *Pl. Syst. Evol.*, 172, 13.

Zocoler, M.A.; Oliveira, A.J.B.; Sarragiotto, M.H.; Grzesiuk, V.L.; Vidotti, G.J. (2005) Qualitative determination of indole alkaloids of *Tabernaemontana fuchsiaefolia* (Apocynaceae). *J. Braz. Chem. Soc.*, 16(6B): 1372-1377.

ANEXO 1

2	Data do ensaio: 29/01/2010								
	Controle	EtOH	Eserina	2 (mg/mL)					
		10%	0,1 mg/mL	0,22	0,055	0,0275	0,01375	0,006875	0,0034
V1	115,143	113,429	8,909	40,675	58,805	62,156	100,494	111,351	117,247
V2	113,870	108,416	4,961	39,455	49,636	77,247	98,156	110,935	121,403
V3	119,455	111,532	3,221	41,688	62,935	74,779	101,584	111,922	117,766
Média (mDO/min)	116,156	111,126	5,697	40,606	57,125	71,394	100,078	111,403	118,805
Desvio-Padrão	2,927	2,531	2,915	1,118	6,807	8,095	1,751	0,496	2,265
DP %	2,520	2,179	2,509	0,963	5,860	6,969	1,508	0,427	1,950
% ATIVIDADE	100,00	95,67	4,90	34,96	49,18	61,46	86,16	95,91	102,28
% INIBIÇÃO	0,000	4,331	95,095	65,042	50,820	38,536	13,842	4,092	-2,281
Log10da Concentração				-0,658	-1,260	-1,561	-1,862	-2,163	-2,464
% Inibição efetiva			95,10	60,71	46,49	34,21	9,51	4,09	-2,28