

1. INTRODUÇÃO

A biodiversidade é definida como a variedade e variabilidade existentes entre organismos vivos e as complexidades nas quais eles ocorrem. Uma de suas principais características é a distribuição de forma desigual dos seus componentes em um determinado espaço geográfico (GUERRA & NODARI, 2004). Esses componentes podem fornecer uma ampla gama de produtos de importância econômica. Dentre eles estão os fitoterápicos e os fármacos que são oriundos de recursos vegetais.

Alguns países como Brasil, México, Equador, Colômbia, Peru, China, Índia, Malásia, Indonésia, Madagascar, Zaire e Austrália são considerados países detentores de megadiversidade (GUERRA & NODARI, 2004). Porém, devido a fatores externos, especialmente a ação antrópica, esta diversidade encontra-se ameaçada. Estima-se que até o ano de 2015 podem desaparecer entre 4 e 8% de todas as espécies vivas (GUERRA & NODARI, 2004). Algumas estratégias tem sido adotadas no intuito de diminuir a perda de informações biogenéticas através da degradação ambiental. Uma delas seria adotar uma postura no sentido de aumentar as pesquisas a fim de produzir um grande acervo científico através da obtenção de matéria-prima. Sendo o Brasil um país detentor de grande diversidade biológica, a comunidade científica tem sido muito estimulada para a produção desse acervo científico.

Centenas de espécies vegetais foram estudadas através da investigação da composição química do seu metabolismo secundário e mais de 100.000 substâncias naturais tiveram suas estruturas elucidadas. Este importante acervo científico, resultante de atividades de pesquisa desenvolvidas em instituições e empresas nacionais e estrangeiras, representa uma pequena percentagem do conhecimento do quimismo adotado pelos vegetais quando avaliado em comparação com o número de espécies existentes na superfície terrestre e nos meios aquáticos (CADWICK & MARSH, 1990; BUCKINGHAM, 1993).

A quantidade e diversidade de espécies que habitam o solo brasileiro

caracterizam uma condição de destaque no cenário mundial. Todos os processos químicos da vida (nascimento, crescimento, reprodução, envelhecimento e morte) representam manifestações de biotransformações químicas. Os constituintes químicos bioproduzidos pelo metabolismo secundário (especializado) de organismos vivos têm despertado interesse de instituições públicas e empresas privadas, principalmente as indústrias farmacêuticas, instaladas nos países desenvolvidos. Intensifica-se a procura de fontes de novos medicamentos para utilização direta bem como de matéria prima adequada para preparação semi-sintética de produtos úteis, e de novos modelos para síntese total de produtos com atividade biológica.

O desenvolvimento tecnológico tem contribuído decisivamente para este progresso, proporcionando a fabricação de equipamentos capazes de viabilizar a descoberta de moléculas encontradas em pequenas concentrações, que antes permaneceram praticamente desconhecidas porque escapavam pelas limitações das técnicas e metodologias usadas (COLEGATE & MOLYNEUX, 1993).

O isolamento e a identificação de novas moléculas bioproduzidas pelo metabolismo secundário e a avaliação biológica das substâncias tem proporcionado a descoberta de produtos naturais bioativos, tais como: antibióticos, reguladores de crescimento vegetal, herbicidas, antivirais, antitumorais, imunoestimulantes, antimaláricos, amebicidas, inseticidas, moluscicidas, ictiotóxicos, etc. (DEWICK, 1997).

A descoberta de substâncias abundantes merece também atenção especial, mesmo nos casos de bioprodutos já descritos na literatura. Modificações estruturais seletivas de bioprodutos abundantes através de reações químicas realizadas no laboratório (*in vitro*) podem conduzir a substâncias biologicamente ativas e com outras propriedades práticas (DIXON & LAMB, 1990).

O isolamento e a determinação estrutural de substâncias bioorgânicas advindas do metabolismo secundário de organismos vivos assumem também importância fundamental para o desenvolvimento de outras atividades científicas e tecnológicas.

O conhecimento da composição química de espécies vegetais também tem papel fundamental no progresso de ciências correlatas, tais como a fisiologia, sistemática química, evolução química e ecologia química. Além disso, contribui para a implantação e o fortalecimento da interface entre a pesquisa básica e aplicada, permitindo (*e.g.*) a manipulação racional de rotas biogenéticas e a produção

controlada de metabólitos secundários selecionados com base em critérios práticos, científicos e tecnológicos (biotecnologia) (DIXON & LAMB, 1990; BALANDRIN & KINGHORN, 1993).

Assim, o isolamento e a elucidação estrutural de substâncias naturais representam a etapa inicial importante e decisiva para a descoberta de compostos bioativos, permitindo posteriormente o desenvolvimento de trabalhos sintéticos e tecnológicos para a produção de substâncias a nível comercial e a manipulação de rotas metabólicas específicas (TORSSELL, 1997; GEISSMAN & CROUT, 1969).

Nos últimos anos, a busca pelo aprimoramento das estratégias de identificação, aplicação e bioprodução de metabólitos secundários estimulou o aparecimento de atividades transdisciplinares, envolvendo pesquisadores na área de Química de Produtos Naturais (Fitoquímica), genética, farmacologia e biologia, promovendo pesquisas nos campos da sistemática química, evolução química, ecologia química, atividade biológica, biossíntese e mais recentemente, a biotecnologia.

Embora a flora brasileira constitua uma das principais fontes de recursos naturais, os estudos sobre a química de compostos secundários das espécies que a compõem ainda são insuficientes. Nos últimos anos, a preocupação com a manutenção da biodiversidade no planeta levou as autoridades governamentais a voltar a sua atenção para a manutenção dos refúgios naturais que se encontram ameaçados.

Atenção especial tem sido destinada às áreas naturais em perigo de extinção em decorrência da ação antrópica. Entre elas a **Mata Atlântica**, merece destaque, reconhecida no cenário mundial como uma das principais fontes de diversidade genética a ser protegida e cujos recursos devem ser investigados, procurando-se como meta o equilíbrio entre a proteção à natureza e o desenvolvimento. Este ecossistema recobre a maior parte do estado do Rio de Janeiro onde a vegetação remanescente é alvo de investigações em diferentes áreas da ciência.

A vegetação de **Mata Atlântica** localizada na região norte e noroeste fluminense compreende um dos principais refúgios de vida silvestre, abrigando espécies vegetais e animais em extinção. A preocupação com o uso racional de fontes naturais requer o conhecimento prévio de organismos e seu habitat para adequação de métodos a serem utilizados em programas de manejo ecológico e de

melhoramento.

Tendo em vista o potencial que a flora regional apresenta como fonte de informações para a ciência e de recursos naturais de grande importância para a humanidade, os estudos sobre a química de metabólitos secundários para a sua exploração racional constituem elemento importante para a geração de conhecimento.

Uma importante classe de metabólitos secundários são os alcalóides, compostos nitrogenados farmacologicamente ativos e são encontrados predominantemente nas Angiospermas (HENRIQUES et al., 2004).

Os alcalóides são encontrados em aproximadamente 14,2% dos gêneros de plantas superiores (CORDELL et al., 2001), em representantes de todos os grupos vegetais, porém sua maior ocorrência é verificada nas Angiospermas.

A família Apocynaceae é caracterizada por ser rica em alcalóides e possui grande número de espécies distribuídas na região, principalmente espécies do gênero *Tabernaemontana* que compreende aproximadamente 100 espécies distribuídas por toda a região tropical assim como também a região subtropical do mundo (BEEK, 1984).

Algumas espécies do gênero *Tabernaemontana* foram largamente estudadas tendo, assim, sua composição química bastante definida, além da realização de diversos testes biológicos (HESSE, 1981). Entretanto, algumas espécies desse gênero, principalmente as espécies nativas da Mata Atlântica, tiveram sua constituição química pouco estudada, dentre elas a espécie *Tabernaemontana hystrix*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Diante do exposto este trabalho tem como objetivos:

- I. Estudo fitoquímico do extrato em metanol das cascas das raízes de *Tabernaemontana hystrix*.
- II. Realizar ensaios biológicos com extrato bruto e ou substâncias, sempre que possível.

2.2 Objetivos específicos

- I. Aprendizado de técnicas cromatográficas clássicas no isolamento de compostos bioproduzidos pelo metabolismo secundário de espécies vegetais.
- II. Aprendizado de técnicas espectroscópicas na identificação de compostos bioproduzidos pelo metabolismo secundário de espécies vegetais.

3 REVISÃO DE LITERATURA

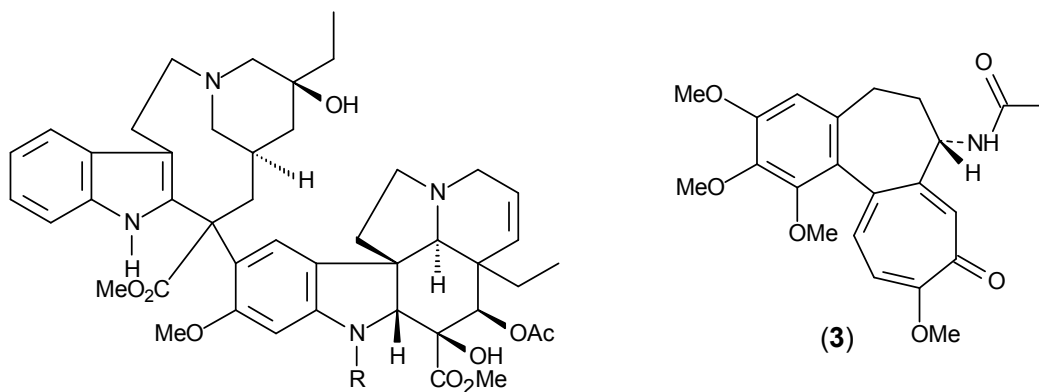
3.1 A Família Apocynaceae

A família Apocynaceae pertence a ordem Gentianiales, classe Dicotyledoneae, subclasse asteridae, divisão Angiospermae. Esta é constituída de 163 gêneros e aproximadamente 1850 espécies, muitas destas encontradas no Brasil (MABBERLEY, 1997).

Muitas plantas desta família são usadas, desde tempos antigos, na medicina popular, em rituais mágico-religiosos, ou como veneno para flechas (*Tabernanthe iboga* – rituais místicos; *Tabernaemontana crassa* – anestésico local e veneno para flechas; entre outras) (NEUWINGER, 1998).

Na medicina moderna, substâncias extraídas de Apocynaceae são de uso corrente, citando a título de exemplo: a vimblastina (**1**) e vincristina (**2**) produzidas pela Vinca (*Catharanthus roseus*), possuem acentuada ação antitumoral.

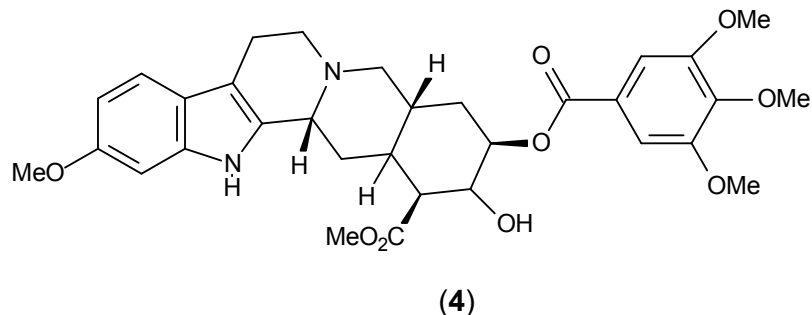
A ação desses compostos se dá de forma semelhante à da colchicina (**3**), um alcalóide extraído do açafrão (*Colchicum autumnale*).



(1) (R=CHO) e (2) (R=CH₃)

A exposição da célula em divisão a esses alcalóides causa o desaparecimento do fuso mitótico e, como o rompimento temporário dos microtúbulos do fuso mata preferencialmente células que se dividem de forma

anormal, essas drogas antimitóticas são amplamente utilizadas no tratamento do câncer (ALBERTS, 1997). A reserpina (**4**) isolada de *Rauvolfia serpentina* é usada correntemente como droga antihipertensiva e tranqüilizante (SCHMELLER, 1998).



Algumas substâncias acima citadas são alcalóides do tipo indólicos monoterpênicos, e são estes os responsáveis pelas atividades farmacológicas das plantas desta família. Pela sua importância, estes alcalóides e as plantas que os contêm, têm sido objeto de estudos fitoquímicos, biossintéticos, etnofarmacológicos, farmacológicos, farmacognósticos, quimiotaxonômicos e de cultivo de células vegetais visando a produção em escala industrial destas substâncias com interesse econômico, além de servirem como modelo para síntese de compostos biologicamente ativos. Dada a relevância destes alcalóides, considerações sobre alguns dos aspectos citados são feitas, dando ênfase à fitoquímica do gênero *Tabernaemontana*, principalmente das espécies brasileiras (MEDEIROS, 2003).

3.2 Alcalóides

Alcalóides são compostos que geralmente contêm nitrogênio em um anel de estrutura variável. Eles têm interesse especial por causa de sua atividade fisiológica ou psicológica em seres humanos e outros animais e também devido à possibilidade de exercer funções de proteção nas plantas (SALIISBURY & ROSS, 1991; OLIVEIRA & MARTINS, 1998).

Os alcalóides são encontrados em mais de 4000 espécies de plantas, sendo mais freqüentes em Dicotiledônias do que em Monocotiledôneas e Gimnospermas. Podem ocorrer em diferentes partes do vegetal, como raiz (*Symphitum* spp.), folhas (*Passiflora incarnata*, *Agerantum conyzoides* e *Phyllanthus* spp.), casca do fruto (*Punica granatum*) e em sementes (*Lupinus albus*). O primeiro alcalóide isolado foi a morfina (**5 – Figura 1**), em 1805, do ópio (*Papaver somniferum*), porém sua

identificação estrutural só aconteceu em 1923. Outros alcalóides, bastante conhecidos, incluem a nicotina (**6 – Figura 1**), presentes em variedades de fumos (*Nicotiana tabacum*), cuja biossíntese se dá nas raízes da plantas, com armazenamento nas folhas para onde é translocado; a cocaína (**7 – Figura 1**), presente em folhas de *Erythroxylon coca*; a cafeína (**8 – Figura 1**), encontrado em sementes de café e folhas de chá; a mescalina (**9 – Figura 1**), um alucinógeno da espécie de cacto *Lophophora williamsii* e a passiflorina (conhecida como harmano) (**10 – Figura 1**), que é extraído das folhas de maracujá (*Passiflora incarnata*) (NEUWINGER, 1998).

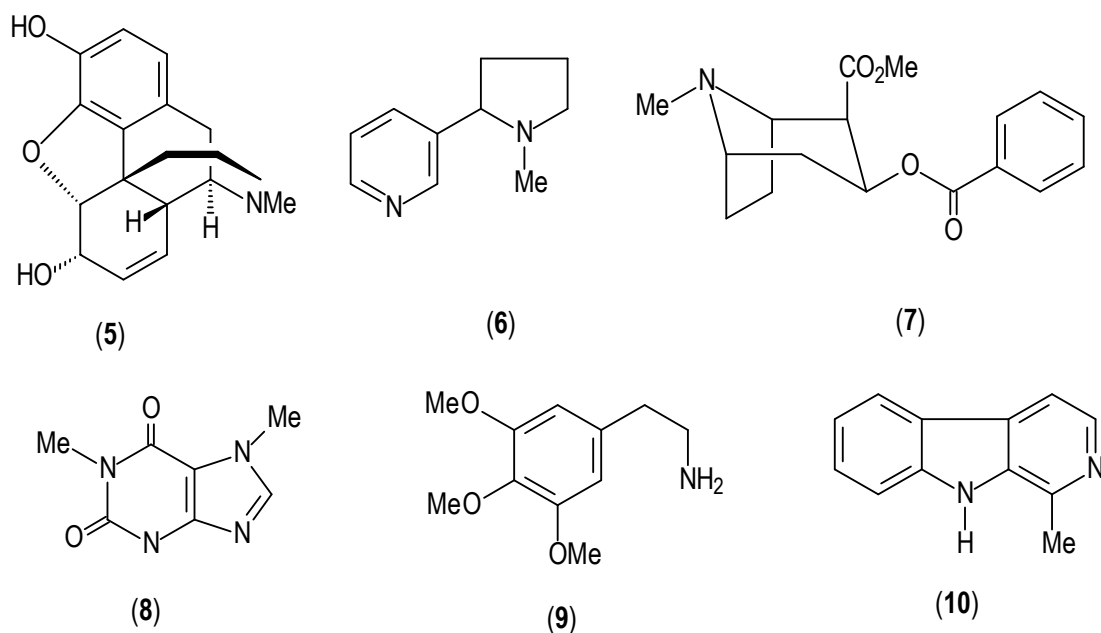


Figura 1: Estruturas dos alcalóides mais conhecidos

3.3 Considerações Biossintéticas

A maioria dos alcalóides é derivada do metabolismo dos aminoácidos alifáticos (ornitina e lisina) e dos aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano). O triptofano é um aminoácido aromático que contém um sistema de anel indólico, tendo sua origem da rota do chiquimato via ácido antranílico. Os alcalóides indólicos são formados por rearranjos dos precursores indólicos dando origem ao anel quinolínico, e esse sim é o precursor dos alcalóides indólicos.

Dentre as várias classes de alcalóides indólicos, os monoterpênicos apresentam uma grande variedade estrutural. Uma característica interessante deste grupo de alcalóides é a origem biossintética comum (**Figura 2**): todos eles têm o mesmo precursor, a estrictosidina, 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 (BRUNETON, 1995).

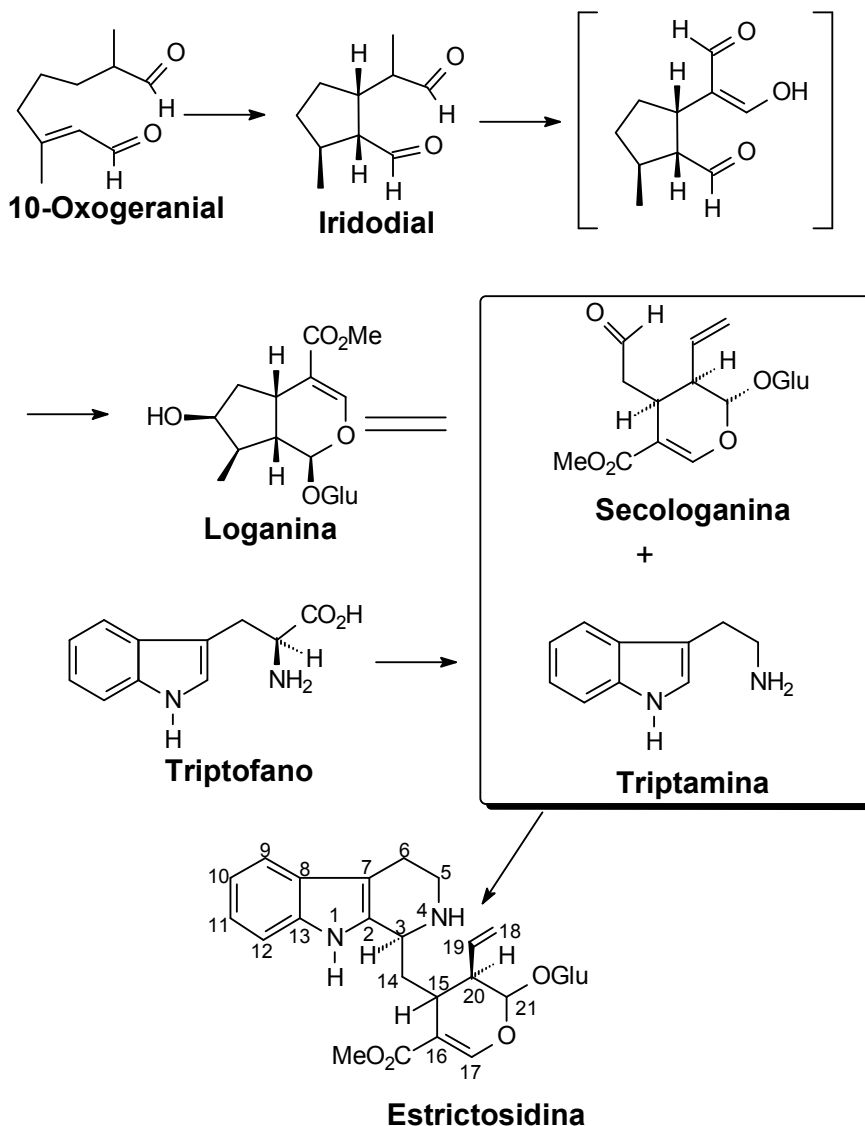


Figura 2: Esquema de formação da Estrictosidina

Rearranjos na parte terpenoídica da estrictosidina leva a formação de diferentes classes, apresentados na **Figura 3** (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 estriquinano);

Classe II – Alcalóides com rearranjo nos carbonos C-17→ C-20 da unidade monoterpnoídica (esqueleto aspidoespermano);

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

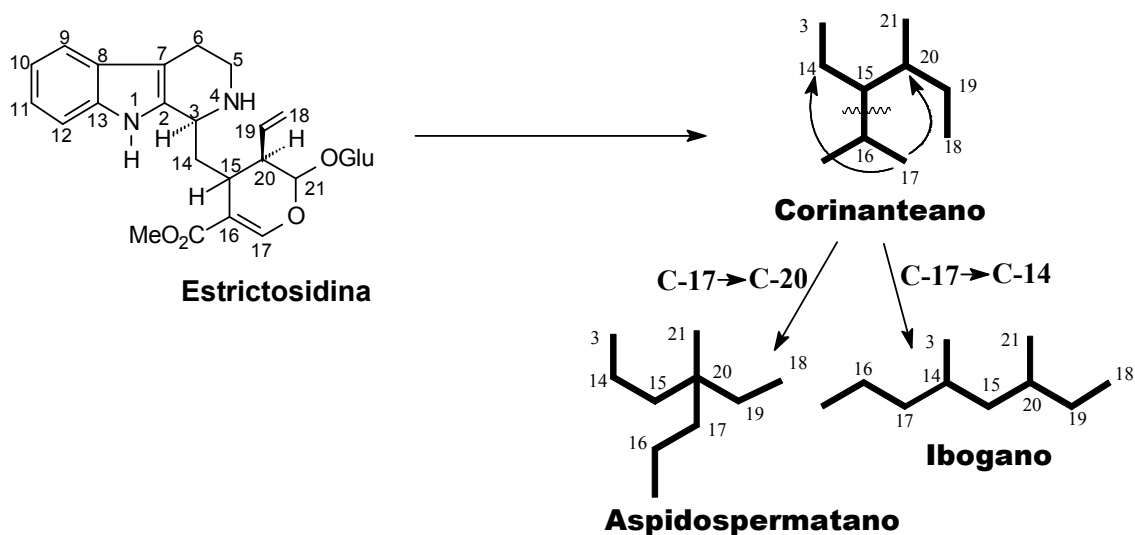


Figura 3: Rearranjos na cadeia terpenoídica

Estas classes são subdivididas em nove tipos principais: vincosano (**11**), vallesiachotamano (**12**), corinanteano (**13**), estriquinano (**14**), aspidoespermatano (**15**), plumerano (**16**), eburnano (**17**), ibogano (**18**) e tacamano (**19**) (**Figura 4**), e seus sub-tipos, dependendo das características de seus esqueletos. Muitas das etapas e mecanismos que levam a formação destes esqueletos são conhecidos.

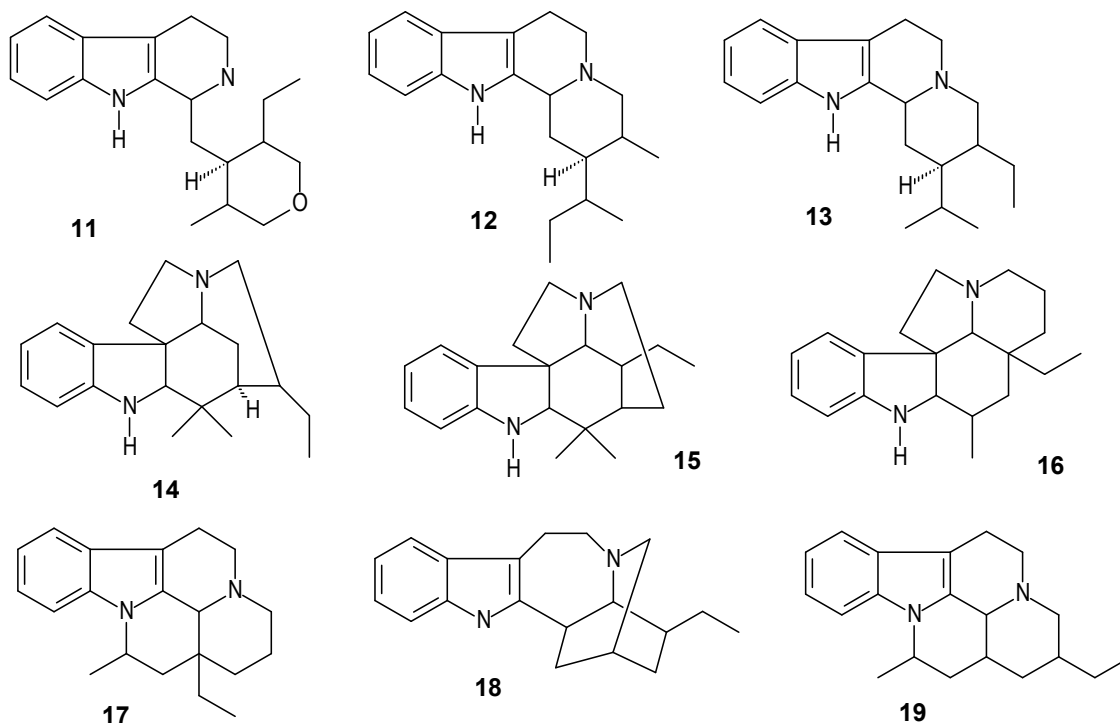


Figura 4: Esqueletos básicos dos alcalóides indólicos monoterpênicos

3.4 Taxonomia

Plantas da família Apocynaceae, juntamente com as famílias Rubiaceae e Loganiaceae, bioproduzem alcalóides indólicos monoterpênicos, sendo que a maioria das espécies que contém os alcalóides isolados e comercializados pertence a família Apocynaceae (BRUNETON, 1995). Botânicos classificam esta família em três subfamílias: Plumerioidae, Cerberoidae e Echitoidae.

Alcalóides têm sido isolados de espécies de todas essas subfamílias, mas alcalóides indólicos têm sido encontrados somente em Plumerioidae. Esta subfamília é dividida em sete tribos, e destas, quatro bioproduzem alcalóides indólicos, são elas, Carisseae, Tabernaemontanae, Alstonieae (Plumerieae) e Rauwolfieae. Todos os gêneros destas tribos bioproduzem alcalóides da classe I, as Rauwolfieae bioproduzem principalmente esqueletos do tipo corinanteanos e seus derivados (heteroioimbanos, ioimbanos), aspidospermanos (classe II) são encontrados nas espécies das tribos Plumerieae, Carisseae e Tabernaemontanae. O esqueleto ibogano (classe III), com poucas exceções (*Catharanthus*, entre outros), são encontrados na tribo Tabernaemontanae (BRUNETON, 1995; DANIELI & PALMISANO, 1986).

Em termos evolutivos, das três famílias acima citadas, Apocynaceae é

considerada a mais evoluída, sendo Loganiaceae o ancestral comum das outras duas, o que é corroborado pela complexidade dos alcalóides indólicos encontrados. Somente em Apocynaceae encontramos alcalóides indólicos monoterpênicos das classes II e III (BRUNETON, 1995).

As quatro tribos acima citadas são suficientemente diferenciadas morfológicamente, porém os limites de gênero e nomenclatura da tribo Tabernaemontaneae têm sido confusas, sendo objeto de discussões por mais de um século (DANIELI & PALMISANO, 1986).

Com relação ao gênero *Tabernaemontana*, por muitos anos este nome, tem sido restrito a espécies encontradas nas Antilhas, América Central e Noroeste da América do Sul, enquanto que espécies encontradas no Brasil são classificadas como pertencentes ao gênero *Peschiera* A. DC. Espécies do Sul da Ásia e Austrália são agrupadas como *Ervatamia* (DANIELI & PALMISANO, 1986).

Em 1994, Leeuwenberg publicou revisão destes gêneros, e por características morfológicas reagrupa várias espécies do gênero *Peschiera* e *Ervatamia*, como *Tabernaemontana*, sendo usado aqui esta classificação. O estudo fitoquímico de espécies destes gêneros tem contribuído para diferenciá-los, principalmente na composição química dos alcalóides encontrados nestas plantas.

3.5 O Gênero *Tabernaemontana*

O gênero *Tabernaemontana* tem cerca de 100 espécies, sendo 27 encontradas no Brasil. O screening químico de espécies desse gênero normalmente tem detectado uma grande quantidade de alcalóides como sendo uma importante classe de metabólitos secundários bioproduzidos por essas plantas (BEEK, 1984). Algumas espécies do gênero despertaram o interesse do grupo de trabalho do Setor de Química de Produtos Naturais da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) coordenado pelo professor Ivo José Curcino Vieira e faz parte das pesquisas do LCQUI. Este estudo em questão foi iniciado com a espécie *Tabernaemontana laeta* (*Peschiera laeta*) e *Tabernaemontana hystrix* (*Peschiera fuchsiaefolia*), classificada e identificada pela Prof^a. Luisa Sumiko da Unicamp - Campinas, onde sua exsicata encontra-se depositada.

3.6 A Espécie *Tabernaemontana hystrix*

A espécie em questão é encontrada na região Sudeste do Brasil (**Figura 5**), sendo que até o início deste trabalho contava com apenas uma investigação fitoquímica publicada com o sinônimo de *Peschiera fuchsiaefolia* (BRAGA et al., 1984; BRAGA & REIS, 1987). Esta espécie é conhecida nas regiões Norte e Noroeste fluminense como “gancheira”, “leiteiro” e “esperta”, sendo considerada uma planta venenosa para animais.



Figura 5: Distribuição da espécie *Tabernaemontana hystrix* no Brasil

Fonte: LEEUWENBERG, 1994.

As fotografias das flores e folhas da espécie *Tabernaemontana hystrix* são apresentadas na **Figura 6**.



a) Galho em floração



b) Flores

Figura 6: Fotografias da espécie *Tabernaemontana hystrix*

Apresenta-se sob a forma de arbusto ou árvore pequena de 1-7 m de altura. Ramos pálidos à marrom escuro, lenticelados; râmulos cilíndricos, glabros. Folhas pecioladas, de 2-10 mm de comprimento; Inflorescência levemente pedunculada, com 2-5 x 2-5 cm de comprimento, e 3-15 flores, bastante frouxa. Flores vistosas, abertas durante o dia. Sépalas verdes pálido, conadas na base, 3-5 x 1,2-2 mm. Corola branca ou amarela, com 11-16 mm de comprimento no botão. Cerca de 70-100 óvulos em cada carpelo. Frutos com 2 mericarpos separados, mericarpos amarelos, obliquamente elipsóides, 20-45 x 10-25 x 10-15 mm, recurvados, arredondados no ápice; com paredes mais espessas. Sementes pretas ou marrons, obliquamente elipsóides, cerca de 8-10 x 4-5 x 3-3,5 mm (LEEUEWENBERG, 1994).

3.7 Considerações etnofarmacológicas

Espécies do gênero *Tabernaemontana* têm sido utilizadas na África, como veneno de flechas e na medicina popular. Por exemplo, *Tabernaemontana crassa* faz parte de um preparado para veneno de flechas no Sudoeste da Costa do Marfim. O extrato do caule é usado na medicina tradicional para acalmar “ataques epilépticos e insanidade mentais” (NEUWINGER, 1998).

Vários alcalóides indólicos isolados desta espécie têm sido investigados farmacologicamente: ibogaina (**20**), ibogamina (**21**), coronaridina (**22**), voacangina (**23**), isovoacangina (**24**), voacristina (**25**) e vobasina (**26**) apresentam atividade estimulante do SNC. A decocção de folhas tem uso popular como anestésico local em procedimentos ortopédicos, sendo que dois destes alcalóides a vobasina (**26**) e perivina (**27**) são os responsáveis por estes efeitos, onde a perivina (**27**) (**Figura 7**) possui uma atividade anestésica duas vezes maior que a cocaína (NEUWINGER, 1998).

As cascas e raízes de *Tabernaemontana carimbosa* tem sido usadas em veneno de flechas e de dardos na Tailândia e Malásia, e somente recentemente tem sido investigada fitoquimicamente e farmacologicamente. Outras espécies do gênero tem sido relatadas por seus usos medicinais (NEUWINGER, 1998).

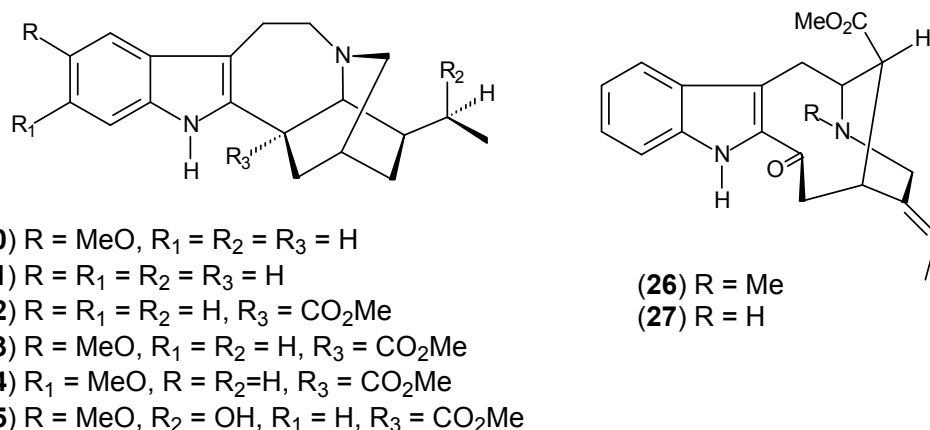


Figura 7: Alcalóides indólicos isolados da *Tabernaemontana crassa*

3.8 Estudos Fitoquímicos

Pelas razões expostas acima, o gênero *Tabernaemontana* tem sido alvo de estudos fitoquímicos em todo o mundo, com revisões da sua química, taxonomia, etnobotânica e farmacologia do gênero, sendo descritos até o ano de 1984 mais de 250 alcalóides (DANIELI & PALMISANO, 1986).

Dos nove tipos de esqueletos, nenhum alcalóide do tipo vincosano (11) foi encontrado em *Tabernaemontana*, poucas substâncias dos tipos vallesiachotamano (12), estriquinano (14), aspidospermatano (15), eburnano (17) e tacamano (19) têm sido isoladas. A maioria dos compostos isolada pertence aos esqueletos plumerano (16), corinanteano (13) e ibogano (18) (Figura 4), este último é encontrado em todas as espécies de *Tabernaemontana*, sendo característicos deste gênero (Citado por Medeiros, 2003).

Na última revisão botânica, Leeuwenberg reagrupa outros gêneros dentro de *Tabernaemontana*, totalizando 99 espécies, das quais 27 são encontradas no Brasil, e destas, seis são endêmicas, incluindo uma nova espécie (*Tabernaemontana cumata* Leeuwenberg) (LEEUWENBERG, 1994).

A investigação fitoquímica das cascas do caule da espécie em questão com o sinônimo *Peschiera fuchsiaefolia* foi investigada pelo grupo de pesquisa da Unicamp e apresentou a identificação de 14 alcalóides: (BRAGA et al., 1984; BRAGA & REIS, 1987) 12-metoxi-4-metilvoachalotina (28), 12-metoxi-4-metilvoachalotina etil éster (29), fuchsiaefolina (30), normacusina (31), affinisina (32), voachalotina (33), 4-metilaffinisina (34), 4-metilvoachalotina (35), voacangina (36), ibogaína (37), vobasinol (38), perivina (39), 16-epiaffinisina (40), voacanginahidroxiindolenina (41), e 6 alcalóides *bis*-indólicos: voacamina (42),

decarbometoxivoacamina (43), demetilvoacamina (44), voacamidina (45), dihidrovoacamina (46), e demetildihidrovoacamina (47) (Figura 8).

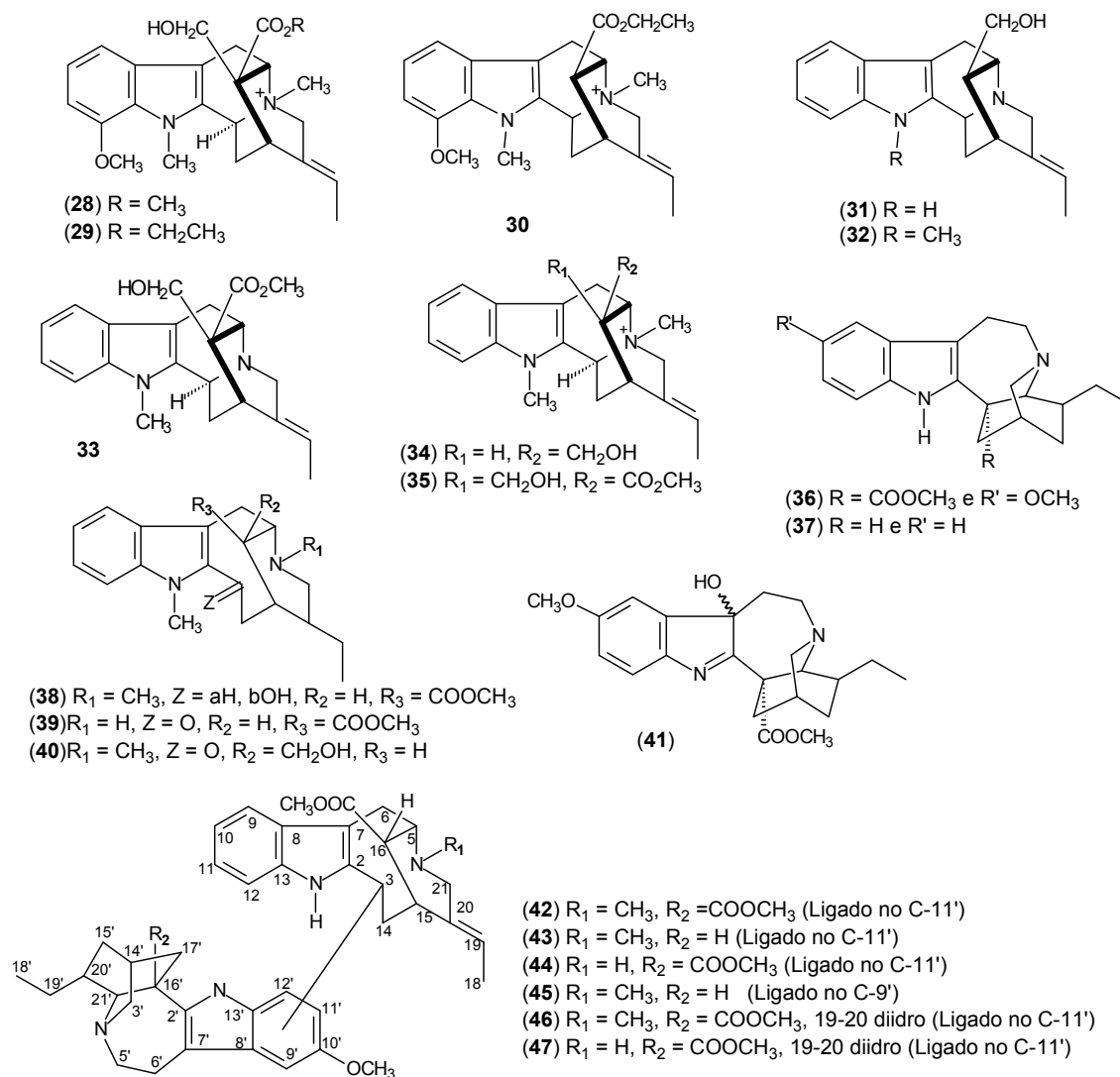


Figura 8: Alcalóides indólicos isolados de *Peschiera fuchsiaefolia*

A presença de aproximadamente ¼ das espécies do gênero no Brasil, aliado a um número relativamente pequeno de estudos fitoquímicos, demonstra a necessidade de aprofundar os estudos fitoquímicos das espécies brasileiras deste gênero (DANIELI & PALMISANO, 1986).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material

- Acetato de etila P.A.
- Alumina
- Clorofórmio deuterado
- Colunas cromatográficas de tamanhos variados confeccionadas no LCQUI-CCT-UENF
- Cromatofolhas de alumínio com sílica gel 60 F₂₅₄
- Diclorometano P.A.
- Espectrômetro de massas acoplado ao cromatógrafo gasoso do modelo CG/MS-QP-5050, marca SHIMADZU, utilizando impacto de elétrons (IE) a 70 eV.
- Espectrômetro de Ressonância Magnética da marca Brüker, modelo DRX-500 (500 MHz para ¹H e 125 MHz para ¹³C)
- Espectrômetro de Ressonância Magnética da marca Jeol, modelo Elipse (400 MHz para ¹H e 100 MHz para ¹³C)
- Evaporador rotativo Büchi modelo R-114
- Frascos de vidro
- Hexano P.A.
- Lâmpada ultravioleta (Aldrich) a 254 nm e 365 nm
- Metanol deuterado
- Metanol P.A.
- Moinho de martelos, da marca Tecnal
- Polarímetro da marca OROT 589 nm com lâmpada de Na/Hal
- 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 (Dragendorff)
- Solução de Vanilina a 2% em ácido sulfúrico concentrado

4.2 Coleta do material vegetal e identificação botânica

As cascas das raízes e folhas da espécie *Tabernaemontana hystrix* foi coletada em agosto de 2002, no município de Varre e Sai (RJ).

A identificação botânica foi realizada pela botânica Prof^a. Luíza Sumiko Kinoshita da Universidade de Campinas, Campinas-SP. A exsicata do espécime encontra-se depositada no herbário da Universidade de Campinas-UNICAMP.

4.3 Preparação dos extratos brutos

As cascas das raízes de *Tabernaemontana hystrix* foram secas ao ar livre para evitar a presença de fungos.

O material seco foi moído, pesado e extraído por maceração (três vezes cada solvente) usando, sucessivamente, ordem crescente de polaridade os seguintes solventes orgânicos: hexano, diclorometano e metanol. As frações orgânicas evaporadas sob pressão reduzida fornecendo os extratos brutos. A quantidade de material colhido e suas respectivas extrações estão descritas na **Tabela 01**.

Tabela 01: Quantidade de extratos (g) obtidos:

Espécie botânica	Parte Botânica	Peso do material (g)	Solventes	Peso dos extratos (g)
<i>T. hystrix</i>	Cascas das Raízes	920,0	a	17,4
			b	17,8
			c	43,6

a - Hexano

b - Diclorometano

c - Metanol

4.4 Extrato bruto em metanol das cascas das raízes de *Tabernaemontana hystrix*

Inicialmente parte do extrato em metanol (23 g) das cascas das raízes de *T. hystrix* foi submetido a uma cromatografia em coluna, usando como eluente diclorometano puro, com gradiente de polaridade até diclorometano:metanol (1:1), sendo coletadas 66 frações, que posteriormente foram reunidas em 11 novas frações, através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica. O estudo cromatográfico das frações está na **Tabela 02**.

Tabela 02: Estudo cromatográfico das frações coletadas

Frações Reunidas	Código	Quantidade (g)	Observação	Composição
1-5	BM1	0,295	**	Ausência de alcalóides
6-13	BM2	0,120	*	Mistura complexa
14-16	BM3	0,050	*	Mistura complexa
17-23	BM4	0,140	*	Mistura complexa
24-27	BM5	0,949	Item 4.4.2	52 + impurezas
28-31	BM6	1,230	*	Mistura complexa
32-37	BM7	2,75	*	
38-41	BM8	1,586	Item 4.4.3	50 + impurezas
42-50	BM9	1,273	Item 4.4.1	Mistura 48 + 49 + 51
51-55	BM10	4,326	Item 4.4.4	50 + 53 + impurezas
56-66	BM11	8,432	*	Mistura complexa

* frações não trabalhadas por serem misturas complexas semelhantes a outras frações

** fração não trabalhada por não apresentarem alcalóides.

4.4.1 Análise cromatográfica da fração BM9 (1,273 g)

A fração BM9 foi submetida a um fracionamento por cromatografia em coluna com sílica gel, e eluída com diclorometano/metanol com gradiente de polaridade até metanol 50%, originando 27 frações que através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica, foram reunidas em 09 novas frações. A **Tabela 03** mostra o estudo cromatográfico das frações coletadas.

Tabela 03: Estudo cromatográfico da fração BM9

Frações Reunidas	Código	Quantidade (g)	Observação	Composição
1-3	BM9-1	0,070	*	Mistura complexa
4	BM9-2	0,059	Item 4.4.1.1	48 + impurezas
5-8	BM9-3	0,127	*	Mistura complexa
9-10	BM9-4	0,496	*	Mistura complexa
11-12	BM9-5	0,184	Item 4.4.1.2	49 + 51 + impurezas
13-14	BM9-6	0,335	*	Mistura complexa
15-27	BM9-7		a	

* frações não trabalhadas por serem misturas complexas semelhantes a outras frações

a – fração não trabalhada por não apresentar alcalóides

4.4.1.1 Análise cromatográfica da fração BM9-2 (59,0 mg)

A fração BM9-2 foi submetida a uma cromatografia em coluna com alumina sendo utilizado como eluente diclorometano puro com gradiente de polaridade até metanol 50%, onde foram coletadas 62 frações que, através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica, foram reunidas em 07 novas frações. A **Tabela 04** mostra o estudo cromatográfico das frações coletadas.

Tabela 04: Estudo cromatográfico da fração BM9-2

Frações reunidas	Código	Quantidade (mg)	Observação	Composição
1-7	BM9-2-1	2,5	*	
8-21	BM9-2-2	2,3	*	
22-33	BM9-2-3	1,5	*	
34-38	BM9-2-4	10,1	a	48 + impurezas
39-43	BM9-2-5	26,1		48
44-51	BM9-2-6	7,5	a	48 + impurezas
52-62	BM9-2-7	3,1	*	

* frações não trabalhadas por não apresentarem alcalóides

a- frações reunidas após análise de cromatografia em camada delgada analítica

4.4.1.2 Análise cromatográfica da fração BM9-5 (184,0 mg)

A fração BM9-5 foi submetida a uma cromatografia em coluna com alumina sendo utilizado como eluente diclorometano puro com gradiente de polaridade até Metanol 40%, onde foram coletadas 66 frações que, através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica, foram reunidas em 7 novas frações. A **Tabela 05** mostra o estudo cromatográfico das frações coletadas.

Tabela 05: Estudo cromatográfico da fração BM9-5

Frações reunidas	Código	Quantidade (mg)	Observação	Composição
1-8	BM9-5-1	23,1	*	49+ impurezas
9-12	BM9-5-2	73,0		49
13-15	BM9-5-3	0,3	*	
16-19	BM9-5-4	1,1	*	
20	BM9-5-5	1,9	*	
21-33	BM9-5-6	16,7	Item 4.4.1.2.1	51 + impurezas
34-35	BM9-5-7	3,9	*	

* amostras não trabalhadas por não apresentarem alcalóides

4.4.1.2.1 Análise cromatográfica da fração BM9-5-6 (16,7 mg)

Inicialmente a fração BM9-5-6 foi submetida a uma cromatografia em coluna com alumina sendo utilizado como eluente diclorometano puro com gradiente de polaridade até diclorometano:metanol (9:1, v/v), onde foram coletadas 12 frações que, através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica, foram reunidas em 02 novas frações. A **Tabela 06** mostra o estudo cromatográfico das frações coletadas.

Tabela 06: Estudo cromatográfico da fração BM9-5-6

Frações reunidas	Código	Quantidade (mg)	Observação	Composição
1-4	BM9-5-6-1	3,2	*	51 + impurezas
5-12	BM9-5-6-2	10,7		

* fração não trabalhada por ser mistura complexa semelhante a outra fração

4.4.2 Análise cromatográfica da fração BM5 (949,0 mg)

Inicialmente a fração BM5 foi submetida a uma cromatografia em coluna com sílica gel sendo utilizado como eluente hexano puro com gradiente de polaridade até hexano:acetato de etila (1:4, v/v), onde foram coletadas 51 frações que, através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica, foram reunidas em 06 novas frações. A **Tabela 07** mostra o estudo cromatográfico das frações coletadas.

Tabela 07: Estudo cromatográfico da fração BM5

Frações reunidas	Código	Quantidade (mg)	Observação	Composição
1-7	BM5-1	66,3	*	Mistura complexa
8-10	BM5-2	9,0	*	Mistura complexa
11-24	BM5-3	92,6	*	Mistura complexa
25-33	BM5-4	175,4	*	52 + impurezas
34-39	BM5-5	32,1		52
40-51	BM5-6	36,0	*	Mistura complexa

* frações não trabalhadas por serem misturas complexas semelhantes a outras frações

4.4.3 Análise cromatográfica da fração BM8 (1,586 g)

Inicialmente a fração BM8 foi submetida a uma cromatografia em coluna com sílica gel sendo utilizado como eluente diclorometano puro com gradiente de polaridade até diclorometano:metanol (3:2, v/v), onde foram coletadas 74 frações que, através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica, foram reunidas em 04 novas frações. A **Tabela 08** mostra o estudo cromatográfico das frações coletadas.

Tabela 08: Estudo cromatográfico da fração BM8

Frações reunidas	Código	Quantidade (mg)	Observação	Composição
1-12	BM8-1	15,9	*	Mistura complexa
13-37	BM8-2	812,5	*	Mistura complexa
38-65	BM8-3	696,5	Item 4.4.3.1	50 + impurezas
66-74	BM8-4	37,9	*	Mistura complexa

* frações não trabalhadas por serem misturas complexas semelhantes a outras frações

4.4.3.1 Análise cromatográfica da fração BM8-3 (695,5 mg)

Inicialmente a fração BM8-3 foi submetida a um fracionamento por cromatografia em coluna com sílica gel sendo utilizado como eluente diclorometano puro com gradiente de polaridade até diclorometano:metanol (1:1, v/v), onde foram coletadas 40 frações que, através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica, foram reunidas em 04 novas frações. A **Tabela 09** mostra o estudo cromatográfico das frações coletadas.

Tabela 09: Estudo cromatográfico da fração BM8-3

Frações reunidas	Código	Quantidade (mg)	Observação	Composição
1-7	BM8-3-1	222,3	*	50+ impurezas
8-15	BM8-3-2	296,6	*	50 + impurezas
16-19	BM8-3-3	51,4		50
20-40	BM8-3-4	100,2	*	50 + impurezas

* frações não trabalhadas por serem misturas complexas semelhantes a outras frações

4.4.4 Análise cromatográfica da fração BM10 (4,32 g)

Inicialmente a fração BM10 foi submetida a uma cromatografia em coluna com sílica gel sendo utilizado como eluente diclorometano puro com gradiente de polaridade até diclorometano:metanol (1:1, v/v), onde foram coletadas 69 frações que, através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica, foram reunidas em 07 novas frações. A **Tabela 10** mostra o estudo cromatográfico das frações coletadas.

Tabela 10: Estudo cromatográfico da fração BM10

Frações reunidas	Código	Quantidade (mg)	Observação	Composição
1-23	BM-10-1	16,6	*	Mistura complexa
24-28	BM-10-2	7,3	*	Mistura complexa
29	BM-10-3	4,9	*	Mistura complexa
30-39	BM-10-4	54,3	Item 4.4.4.2	52 + impurezas
40-44	BM-10-5	410,0	Item 4.4.4.1	50 + impurezas
45-67	BM-10-6	3338,3	*	Mistura complexa
68-69	BM-10-7	93,2	*	Mistura complexa

* frações não trabalhadas por serem misturas complexas semelhantes a outras frações

4.4.4.1. Análise cromatográfica da fração BM10-5 (410,0 mg)

Inicialmente a fração BM10-5 foi submetida a uma cromatografia em coluna com sílica gel sendo utilizado como eluente diclorometano:metanol (97:3, v/v) com gradiente de polaridade até diclorometano:metanol (1:1, v/v), onde foram coletadas 40 frações que, através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica, foram reunidas em 05 novas frações. A **Tabela 11** mostra o estudo cromatográfico das frações coletadas.

Tabela 11: Estudo cromatográfico da fração BM10-5

Frações reunidas	Código	Quantidade (mg)	Observação	Composição
1-14	BM10-5-1	18,0	*	Mistura complexa
15-20	BM10-5-2	127,2	*	Mistura complexa
21-27	BM10-5-3	182,9	Item 4.4.4.1.1	50 + impurezas
28-30	BM10-5-4	19,4	*	Mistura complexa
31-40	BM10-5-5	17,9	*	Mistura complexa

* frações não trabalhadas por serem misturas complexas semelhantes a outras frações

4.4.4.1.1 Análise cromatográfica da fração BM10-5-3 (180,0 mg)

Inicialmente a fração BM10-5-3 foi submetida a uma cromatografia em camada delgada preparativa com sílica gel, eluída por duas vezes com sistema de solventes diclorometano:metanol (23:2), fornecendo 04 novas frações. A **Tabela 12** mostra o estudo cromatográfico das frações coletadas.

Tabela 12: Estudo cromatográfico da fração BM10-5-3

Frações reunidas	Código	Quantidade (mg)	Observação	Composição
1	BM10-5-3-1	-	a	
2	BM10-5-3-2	-	a	
3	BM10-5-3-3	7,6	*	50 + impureza
4	BM10-5-3-4	22,8		50

* fração não trabalhada por ser mistura complexa semelhante a outra fração

a- amostras não trabalhadas por não apresentarem alcalóides.

As frações BM10-5-3-4 e BM8-3-3, após análise do RMN, foram reunidas e identificadas com o código BM12.

4.4.4.2 Análise cromatográfica da fração BM10-4 (54,3 mg)

Inicialmente a fração BM10-4 foi submetida a uma cromatografia em coluna com sílica gel sendo utilizado como eluente diclorometano:metanol (49:1, v/v) com

gradiente de polaridade até diclorometano:metanol (4:1, v/v), onde foram coletadas 45 frações que, através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica, foram reunidas em 02 novas frações. A **Tabela 13** mostra o estudo cromatográfico das frações coletadas.

Tabela 13: Estudo cromatográfico da fração BM10-4

Frações reunidas	Código	Quantidade (mg)	Observação	Composição
1-9	BM-10-4-1	11,9	*	Mistura complexa
10-45	BM-10-4-2	32,8	Item 4.4.4.2.1	53 + impurezas

* fração não trabalhada por ser mistura complexa semelhante a outra fração

4.4.4.2.1 Análise cromatográfica da fração BM10-4-2 (20,7 mg)

Parte da fração BM10-4-2 (20,7 mg) foi submetida a uma cromatografia em camada delgada preparativa com sílica gel sendo utilizado como eluente diclorometano:metanol (97:3, v/v), fornecendo a substância **53** (7,9 mg).

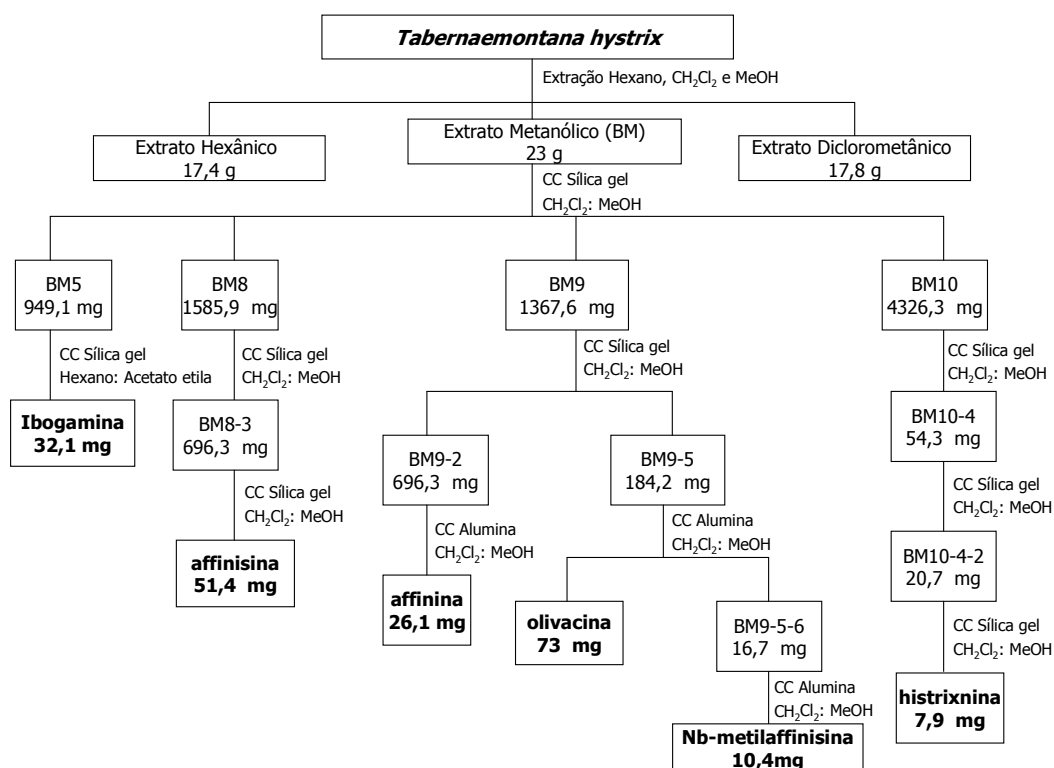
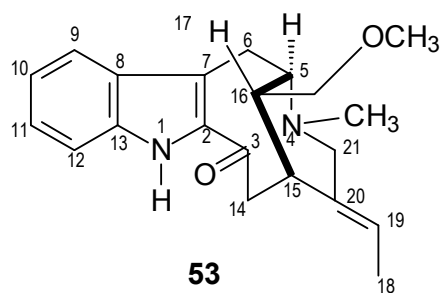
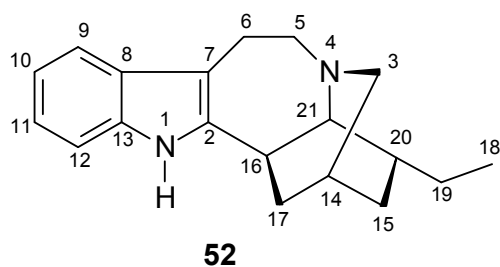
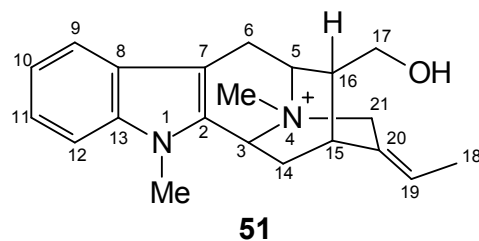
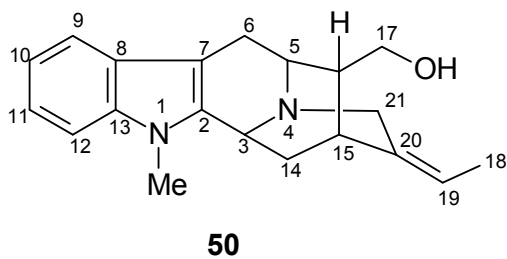
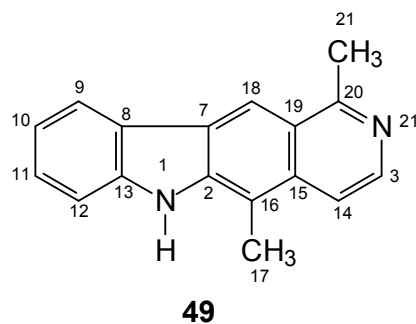
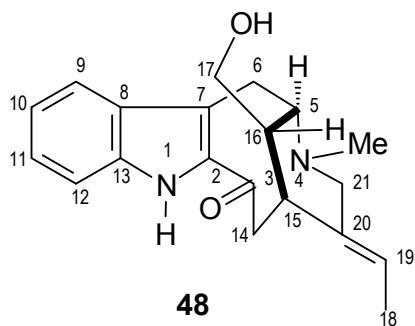


Figura 9: Estudo cromatográfico do extrato metanólico de *T. hystrix*

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Substâncias isoladas de *Tabernaemontana hystrix*

O estudo fitoquímico do extrato em metanol das cascas das raízes de *T. hystrix* permitiu o isolamento e a identificação de seis alcalóides indólicos monoterpênicos, dos quais, quatro com esqueleto corinanteano; dois do sub-tipo vobasina (**48** e **53**) e dois do sub-tipo sarpagina (**50** e **51**); um alcalóide com esqueleto plumerano (**49**) e um com esqueleto ibogano do sub-tipo coronaridina (**52**). A substância (**53**) pelo melhor do nosso conhecimento encontra-se inédita na literatura.



5.2 Determinação estrutural

5.2.1 Alcalóides indólicos monoterpênicos

Na determinação estrutural dos alcalóides indólicos presentes na espécie em estudo, considerou-se algumas informações biossintéticas, quimiossistemática e cromogênicas que forneceram indicações do esqueleto carbônico das substâncias isoladas.

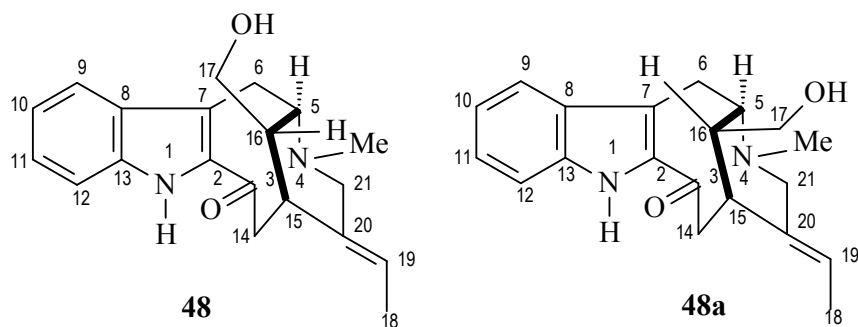
Segundo Bruneton (1995), todos os esqueletos dos alcalóides indólicos monoterpênicos são derivados da strictosidina e os alcalóides diferenciam-se por rearranjos na cadeia terpênic.

Outro fator que favoreceu a identificação estrutural baseou-se nas informações quimiossistemáticas, uma vez que a maioria das substâncias isoladas no gênero *Tabernaemontana* pertence aos esqueletos do tipo plumerano, corinanteano (principalmente do sub-tipo vobasina), ibogano (principalmente do sub-tipo coronaridina) sendo este majoritário e característico do gênero (DANIELI & PALMISANO, 1986).

Deve-se considerar também o fato de que os alcalóides formam precipitado com o reagente de Dragendorff, que aponta uma provável presença de alcalóides quando estes formam precipitados de cor marrom-alaranjado (HARBORNE, 1998).

A análise desses fatores permite juntamente com as análises espectroscópicas (RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensional, e espectrometria de massas) definir a estrutura da substância isolada. A elucidação estrutural pode ser auxiliada pela comparação com dados da literatura que confirmam a estrutura analisada ou, quando se trata de substâncias inéditas, indicam seu esqueleto básico.

5.2.2 Substância 48



A substância **48** foi isolada como um sólido amorfo, apresentando teste positivo para alcalóides com reagente de Dragendorff.

A análise do espectro RMN ^{13}C (APT, **Figuras 10 e 11, p. 32 e 33, Tabela 14, p. 30**) permitiu identificar a presença de vinte átomos de carbono, sendo dois metílicos (um N-Me e o outro ligado a um átomo de carbono sp^2), quatro metilênicos (sendo, um carbinólico, um α -carbonílico e um ligado a um átomo de nitrogênio), oito metínicos (cinco átomos de carbono sp^2 , um átomo de carbono sp^3 ligado a um átomo de nitrogênio e dois sp^3) e seis átomos de carbono quaternários (**Tabela 14, p. 30**).

Esses dados, em conjunto com os dados do espectro de massas (**Figura 12 p. 34, Esquema 1, p. 31**), o qual apresentou o pico do íon molecular em m/z 324 Daltons, permitiram propor a fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_2$ para o alcalóide **48**.

O espectro de RMN ^1H (**Figuras 13 a 16, p. 35 a 38, Tabela 14, p. 30**) apresenta quatro sinais relativos a hidrogênios aromáticos acoplando entre si, mostrado no espectro de ^1H - ^1H -COSY (**Figuras 17 e 18, p. 39 e 40**) a δ_{H} 7,68 (1H, dl, $J = 8,1$ Hz); 7,09 (1H, ddd, $J = 8,3; 8,1$ e $1,1$ Hz); 7,28 (1H, ddd, $J = 8,3; 8,3; 1,1$ Hz); 7,40 (1H, dl, $J = 8,3$ Hz) característicos de um núcleo indólico livre de substituintes (AZOUG et al, 1995) confirmado através das correlações heteronucleares HMQC (**Figuras 19 a 21, p. 41 a 43, Tabela 14, p. 30**) onde se observam as correlações a $^1J_{\text{CH}}$ entre CH-9 (δ_{C} 121,64)/H-9 (δ_{H} 7,68); CH-10 (δ_{C} 121,11)/H-10 (δ_{H} 7,09); CH-11 (δ_{C} 127,44)/H-11 (δ_{H} 7,28) e CH-12 (δ_{C} 113,40)/H-12 (δ_{H} 7,40). A presença do núcleo indólico livre de substituintes foi também confirmada pelas correlações heteronucleares a longa distância (HMBC **Figuras 22 a 25, p. 44 a 47, Tabela 14, p. 30**) onde se observam as correlações $^3J_{\text{CH}}$ entre CH-9 (δ_{C} 121,64)/H-11 (δ_{H} 7,28); CH-10 (δ_{C} 121,11)/ H-12 (δ_{H} 7,40); CH-11 (δ_{C} 127,44)/ H-9 (δ_{H} 7,68) e CH-12 (δ_{C} 113,40)/ H-10 (δ_{H} 7,09), corroborado ainda pelo fragmento

$m/z= 263$ daltons apresentado no espectro de massas (**Figura 12, p. 34, Esquema 1, p. 31**). As demais correlações estão descritas na **Tabela 14**.

A presença de um grupo metila ligado a um átomo de carbono sp^2 apresentada no espectro de RMN 1H (**Figura 16, p. 38, Tabela 14, p. 30**) pode ser reconhecida pelo sinal duplo duplete a δ_H 1,65 relativo a três hidrogênios com $J= 6,7$ Hz, e pelo quadrupeto largo a δ_H 5,49 relativo a um hidrogênio com $J= 6,7$ Hz, referentes aos hidrogênios 3H-18 e H-19, respectivamente. A confirmação da dupla ligação e do grupo metila a ela ligada foi corroborada ainda através das correlações a longa distância (HMBC, **Figuras 22 a 25, p. 44 a 47**) onde se observam as correlações $^2J_{CH}$ entre CH₃-18 (δ_C 12,20)/H-19 (δ_H 5,49); CH-19 (δ_C 122,50)/3H-18 (δ_H 1,65) e pelas correlações a $^3J_{CH}$ entre C-20 (δ_C 136,32)/3H-18 (δ_H 1,65) (BRAGA et al., 1984).

A presença de um grupo carbonila α,β -insaturado na posição 3 foi confirmada pelo sinal em δ_C 191,00 apresentado no espectro de RMN ^{13}C (APT, **Figura 10, p. 32**), e corroborado pela correlação heteronuclear a longa distância (HMBC, **Figura 22 a 25, p. 44 a 47, Tabela 14, p. 30**) onde se observa a correlação $^2J_{CH}$ C-3 (δ_C 191,00)/2H-14 (δ_H 3,25 e 2,45).

A presença de um grupo metila ligado ao átomo de N-4 foi confirmada pelo sinal singleto integrando para três hidrogênios em δ_H 2,41 apresentado no espectro de RMN 1H (**Figura 16, p. 38, Tabela 14, p. 30**), e pelo sinal em δ_C 42,30 referente ao grupo CH₃-N-4 apresentado no espectro de RMN ^{13}C (**Figura 10, p. 32, Tabela 14, p. 30**). A presença deste grupo foi confirmada ainda pelas correlações heteronucleares a longa distância (HMBC, **Figura 22 a 25, p. 44 a 47**) onde se observam as correlações $^3J_{CH}$ CH-5 (δ_C 56,97)/MeN-4 (δ_H 2,41) e CH₂-21 (δ_C 53,27)/MeN-4 (δ_H 2,41), e pela correlação $^2J_{CH}$ MeN-4 (δ_C 42,30)/H-5 (δ_H 3,06).

A presença de um sinal em δ_C 65,61 apresentado no espectro de RMN ^{13}C (APT, **Figura 10, p. 32, Tabela 14, p. 30**), característico de um carbono carbinólico (BRAGA et al., 1986) e, de um sinal duplete integrando para dois hidrogênios em δ_H 3,41 com $J= 6,2$ Hz apresentado no espectro de RMN 1H (**Figura 15, p. 37, Tabela 14, p. 30**), confirmam a presença deste carbono metilênico carbinólico CH₂-17.

A presença deste carbono metilênico carbinólico CH₂-17 foi confirmada ainda pelas correlações heteronucleares a longa distância (HMBC, **Figura 22 a 25, p. 44 a**

47, Tabela 14, p. 30) onde se observam as correlações $^3J_{\text{CH}} \text{CH}_2\text{-17}$ ($\delta_{\text{C}} 65,61$)/H-15 ($\delta_{\text{H}} 3,04$) e pela correlação $^2J_{\text{CH}} \text{CH}_2\text{-17}$ ($\delta_{\text{C}} 65,61$)/H-16 ($\delta_{\text{H}} 1,89$).

A presença de um fragmento em $m/z= 306$ no espectro de massas (**Figura 12, p. 34, Esquema 1, p. 31**) mostra a perda de um molécula de H_2O , corroborando a existência de um grupo hidroxila ligado ao átomo de carbono $\text{CH}_2\text{-17}$.

A atribuição do restante dos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio metilênicos e metínicos da cadeia alifática (**Tabela 14, p. 30**) foi feita com base nos parâmetros conhecidos para deslocamentos químicos de hidrogênio (FRIEBOLIM, 1993; SILVERSTEIN, 1991; BREITMAIER, 1987).

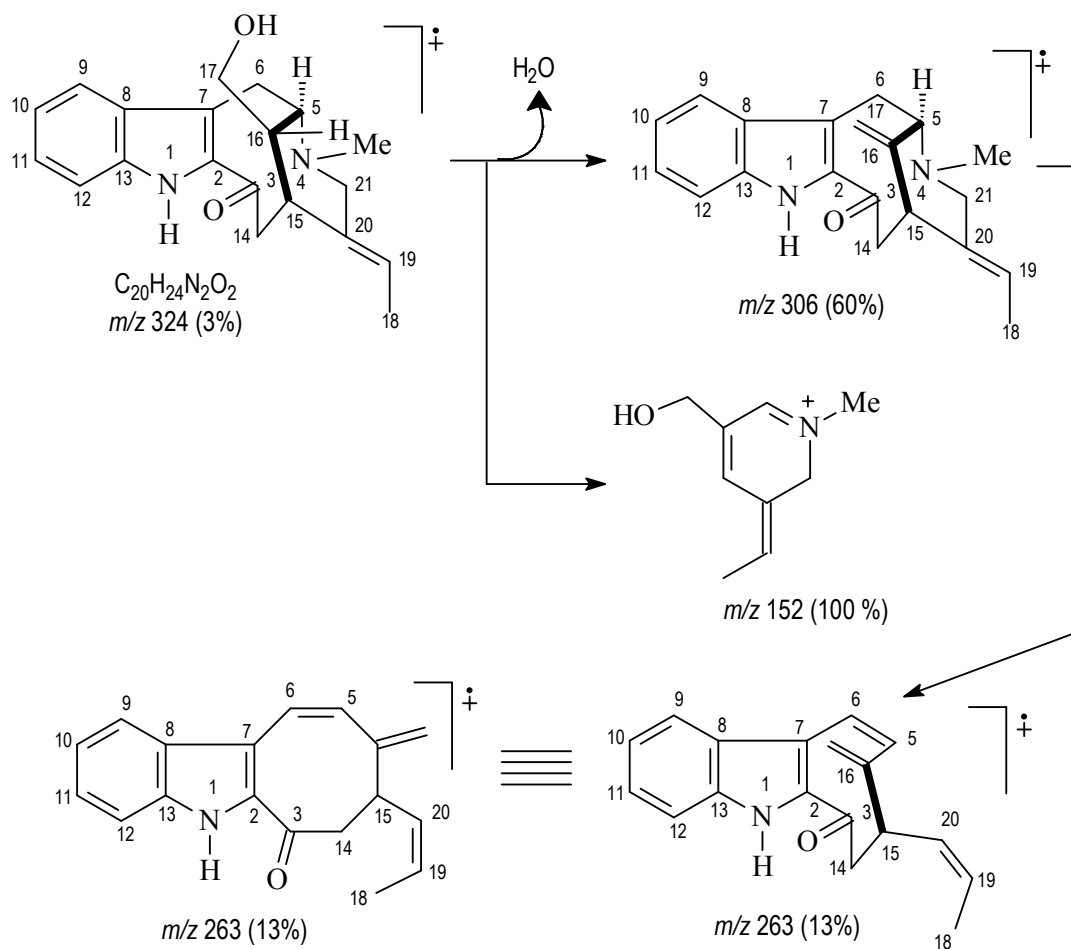
O conjunto destes dados permitiu definir um esqueleto do tipo sarpagina (BRAGA et al., 1984) e propor a estrutura **48** para o alcalóide isolado. Prova final desta estrutura veio da comparação dos dados de RMN ^{13}C (APT, **Tabela 14, p. 30**) com dados da literatura para o alcalóide epiaffinina (**48a**) (BRAGA et al., 1984).

A estereoquímica relativa do átomo de carbono C-16 proposta para **48** foi feita com base na comparação com valores do deslocamento químico do carbono C-16 encontrado na literatura para a epiaffinina com $\delta_{\text{C}} \sim 38,50$, isolada das espécies do *Peschiera fuchsiaefolia* (BRAGA et al., 1984), *P. catharinensis* (ARAUJO et al., 1984) e *Hunteria zeylanica* (LAVAUD et al., 1982; ARAMBEWELA and KHUONG-HUU, 1981) enquanto que para o alcalóide **48** foi encontrado um valor de $\delta_{\text{C}} 41,27$, mostrando que este possui estereoquímica diferente.

O conjunto desses dados em corroboração com uma comparação dos dados de RMN ^{13}C da literatura (BRAGA et al., 1984) permitiu propor a estrutura da affinina para o alcalóide **48**.

Tabela 14. Dados de RMN ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) para affinina (**48**) e epiaffinina (**48a**), (BRAGA et al., 1984) em $\text{MeOH-}d_4$ (**48**) e CDCl_3 (**48a**), e as correlações observadas no espectro de HMQC e HMBC da affinina (**48**). Os deslocamentos químicos (δ) estão ppm e as constantes de acoplamento (J , entre parêntesis) estão em Hz.

	48				48a
	HMQC		HMBC		δ_{C}
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	
C					
2	136,80	-	2H-6	2H-14	135,0
3	191,00	-	2H-14		191,4
7	122,20	-	2H-6		121,3
8	129,60	-		2H-6; H-10; H-12	128,4
13	138,60	-		H-9; H-11	135,6
20	136,32	-	H-15; 2H-21	2H-14; H-16; 3H-18	136,9
CH					
5	56,97	3,06 (tl, 8,3)	2H-6; H-16	MeN-4; H-15; 2H-21	56,6
9	121,64	7,68 (dl, 8,1)		H-11	120,8
10	121,11	7,09 (ddd, 8,3; 8,1; 1,1)		H-12	120,7
11	127,44	7,28 (ddd, 8,3; 8,3; 1,1)		H-9	126,7
12	113,40	7,40 (dl, 8,3)		H-10	112,6
15	31,29	3,04 (tl, 8,3)	2H-14; H-16	H-5; 2H-17; H-19	29,8
16	41,27	1,89 (t, 6,7)	H-15	2H-6; H-14a	38,6
19	122,50	5,49 (ql, 6,7)	3H-18	H-15; 2H-21	120,4
CH₂					
6	20,60	3,34 (m) 3,29 (m)		H-16	19,4
14	44,30	3,25 (dd, 12,6, 9,7) 2,45 (dd, 12,6, 6,7)	H-15	H-16	43,6
17	65,61	3,41 (d, 6,2)	H-16	H-15	62,5
21	53,27	3,50 (tl, 13,7) 2,83 (d, 13,7)		MeN-4; H-15	52,2
CH₃					
18	12,20	1,65 (dd, 6,7, 1,9)	H-19	H-5	12,1
MeN-4	42,30	2,41 (s)			41,9
H-N	-	9,15 (sl)			-



Esquema 1: Interpretação mecanística dos principais fragmentos no espectro de massas da affinin (48).

Figura 10: Espectro de RMN ^{13}C (APT) a 100 MHz em $\text{MeOH-}d_4$ para o alcalóide **48**.

Figura 11: Ampliação da região entre δ_C 113,0-141,0 do espectro de RMN ^{13}C (APT) a 100 MHz em $\text{MeOH-}d_4$ do alcalóide **48**.

Figura 12: Espectro de massas (Inserção Direta) do alcalóide **48**.

Figura 13: Espectro de RMN ^1H (400 MHz) em $\text{MeOH-}d_4$ do alcalóide **48**.

Figura 14: Ampliação da região entre δ_H 7,0-7,8 do espectro de RMN 1H (400 MHz) em MeOH- d_4 do alcalóide **48**.

Figura 15: Ampliação da região entre δ_{H} 3,1-3,6 do espectro de RMN ^1H (400 MHz) em $\text{MeOH-}d_4$ do alcalóide **48**.

Figura 16: Ampliação da região entre δ_{H} 1,5-3,2 do espectro de RMN ^1H (400 MHz) em $\text{MeOH-}d_4$ do alcalóide **48**.

Figura 17: Mapa de correlação do espectro de ^1H - ^1H -COSY em $\text{MeOH-}d_4$ para o alcalóide **48**.

Figura 18: Ampliação do mapa de correlação do espectro de ^1H - ^1H -COSY em $\text{MeOH-}d_4$ para o alcalóide **48**.

Figura 19: Mapa de correlação do espectro de HMQC em MeOH- d_4 para o alcalóide 48.

Figura 20: Ampliação do mapa de correlação do espectro de HMQC em MeOH- d_4 para o alcalóide **48**.

Figura 21: Ampliação do mapa de correlação do espectro de HMQC em MeOH- d_4 para o alcalóide **48**.

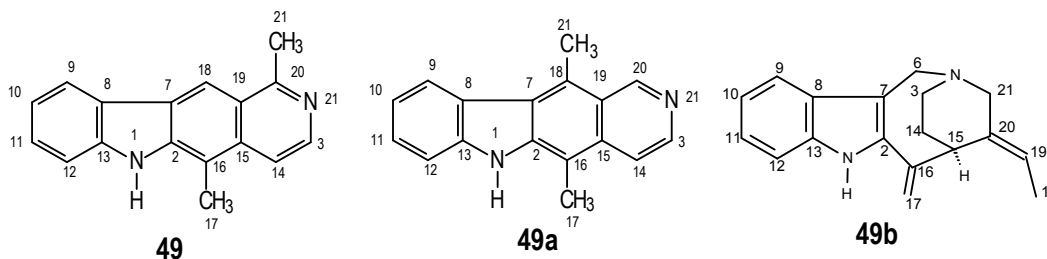
Figura 22: Mapa de correlação do espectro de HMBC em MeOH- d_4 para o alcalóide 48.

Figura 23: Ampliação do mapa de correlação do espectro de HMBC em MeOH- d_4 para o alcalóide **48**.

Figura 24: Ampliação do mapa de correlação do espectro de HMBC em MeOH- d_4 para o alcalóide **48**.

Figura 25: Ampliação do mapa de correlação do espectro de HMBC em MeOH- d_4 para o alcalóide **48**.

5.2.3 Substância 49



A substância **49** foi isolada como um sólido amarelo claro, amorfo, revelando teste positivo para alcalóides com reagente de Dragendorff.

A análise dos dados de RMN ^{13}C (**Figuras 26 e 27, p. 51 e 52, Tabela 15, p. 50**) mostrou que o alcalóide **49** apresenta 17 átomos de carbono, sendo dois metílicos ligados a carbonos sp^2 , sete metínicos (todos sp^2) e oito átomos de carbono quaternário (todos sp^2).

Esses dados, em conjunto com os dados do espectro de massas (**Figura 28 p. 53**), o qual apresentou o pico do íon molecular em m/z 246 Daltons, permitiram propor a fórmula molecular $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{N}_2$ para o alcalóide **2**.

O espectro de RMN ^1H (**Figuras 29 e 30, p. 54 e 55, Tabela 15, p. 50**) apresenta quatro sinais relativos a hidrogênios do núcleo benzênico acoplando entre si, mostrado no espectro de ^1H - ^1H -COSY (**Figura 31, p. 56**) em δ_{H} 8,28 (1H, d, $J=7,7$ Hz; H-8), δ_{H} 7,13 (m; H-10), δ_{H} 7,53 (m; H-11), δ_{H} 7,53 (m; H-12), característico de um núcleo indólico livre de substituintes no anel A (AZOUG et al. 1995) confirmado pelas correlações heteronucleares (HSQC) (**Figuras 32 e 33, p. 57 e 58, Tabela 15, p. 50**) onde se observam as correlações $^1J_{\text{CH}}$ entre CH-9 (δ_{C} 122,63)/H-9 (δ_{H} 8,28), CH-10 (δ_{C} 121,39)/H-10 (δ_{H} 7,13), CH-11 (δ_{C} 129,79)/H-11 (δ_{H} 7,53) e CH-12 (δ_{C} 112,33)/H-12 (δ_{H} 7,53).

A presença do núcleo indólico livre de substituintes foi corroborada pelas correlações heteronucleares a longa distância (HMBC) (**Figuras 34 a 36, p. 59 a 61, Tabela 15, p. 50**) onde se observam as correlações $^3J_{\text{CH}}$ entre CH-11 (δ_{C} 129,79)/H-9 (δ_{H} 8,28); CH-12 (δ_{C} 112,33)/H-10 (δ_{H} 7,13); C-2 (δ_{C} 144,28)/H-9 (δ_{H} 8,28); C-7 (δ_{C} 128,37)/H-9 (δ_{H} 8,28) e C-8 (δ_{C} 124,07)/H-10 (δ_{H} 7,13).

A presença de dois singletos integrando para três hidrogênios cada um apresentados no espectro de RMN ^1H (**Figura 29, p. 54, Tabela 15, p. 50**), em δ_{H} 2,81 e δ_{H} 3,13 referentes aos hidrogênios de dois grupos metila, apresentando

correlações no espectro de HSQC (**Figuras 33 e 33, p. 57 e 58, Tabela 15, p. 50**) $^1J_{CH}$ CH₃-21 (δ_C 20,82)/H-21 (δ_H 3,13) e CH₃-17 (δ_C 12,56)/H-17 (δ_H 2,81).

A presença dos dois grupos metila e suas localizações na molécula, foi corroborada pelas correlações heteronucleares a longa distância (HMBC) (**Figuras 34 a 36, p. 59 a 61, Tabela 15, p. 50**) onde se observam as correlações dos carbonos quaternários a $^2J_{CH}$ entre C-16 (δ_C 113,30)/3H-17 (δ_H 2,81); C-20 (δ_C 159,38)/3H-21 (δ_H 3,13) e a $^3J_{CH}$ entre C-2 (δ_C 144,28)/3H-17 (δ_H 2,81); C-15 (δ_C 133,80)/3H-17 (δ_H 2,81) e C-19 (δ_C 124,63)/3H-21 (δ_H 3,13).

A presença de dois sinais dubletos no anel D do alcalóide **49**, apresentados no espectro de RMN 1H (**Figura 30, p. 55, Tabela 15, p. 50**) acoplando entre si, relativos aos hidrogênios H-3 em δ_H 8,12 e H-14 em δ_H 8,13, ambos com $J = 6,5$ Hz no espectro de 1H - 1H -COSY (**Figura 31, p. 56**), e um sinal simples em relativo a um hidrogênio em δ_H 8,91 no anel C, confirmam o restante da molécula (AZOUG et al, 1995). As demais correlações estão listadas na **Tabela 15, p. 50**.

O conjunto de dados do alcalóide **49** em questão permitiu definir um esqueleto semelhante ao alcalóide ellipticina (**49a**) (LOUNASMAA, 1986) um alcalóide derivado biossinteticamente da stemmadenina (**49b**) (DEWICK, 1997) já isolado de *Tabernaemontana laeta* (MEDEIROS, 2003).

A confirmação da estrutura do alcalóide (**49**) como sendo a olivacina (**49**) (Me-21 ligada no C-20) e não a ellipticina (**49a**) (Me-21 ligada no C-18) foi feita com base no valor do deslocamento químico do sinal simples referente ao H-18 em δ_H 8,91 (**49**), enquanto que na ellipticina (**49a**) o H-20 encontra-se em δ_H 9,62 (LOUNASMAA, 1986; AZOUG et al., 1995).

As correlações a longa distância apresentadas no espectro de HMBC (**Figuras 34 a 36, p. 59 a 61, Tabela 15, p. 50**) como já mostrado anteriormente confirmam a posição dos dois grupos metila, e a prova final adveio da comparação dos dados de RMN 1H com os da literatura para a olivacina (AZOUG et al., 1995).

A olivacina (**49**) apresenta atividade antitumoral, inibindo a síntese de DNA, RNA e proteínas provavelmente por intercalação na dupla hélice do DNA e por ligação com ácidos nucleicos (SCHRIPSEMA et al., 2004).

Tabela 15. Dados de RMN ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) para olivacina (**49**) e ellipticina (**49a**), (AZOUG, 1995) em $\text{MeOH-}d_4$, e as correlações observadas no espectro de HSQC e HMBC da olivacina (**49**). Os deslocamentos químicos (δ) estão ppm e as constantes de acoplamento (J , entre parêntesis) estão em Hz.

	49			49a
	HSQC		HMBC	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
C				
2	144,28	-		H-9; 3H-17
7	128,37	-		H-9
8	124,07	-		H-10; H-18
13	144,44	-		H-9
15	133,80	-		H-3; H-18; 3H-17
16	113,30	-	3H-17	H-14
19	122,63	-		H-14; 3H-21
20	159,38	-	3H-21	H-3; H-18
CH				
3	134,69	8,12 (d, 6,5)		8,18 (d, 7,6)
9	122,63	8,28 (d, 7,7)		8,22 (d, 7,6)
10	121,39	7,13 (dt, 7,7 e 1,4)		7,30 (ddd, 7,6; 5,1 e 3,2)
11	129,79	7,53 (m)		H-9 7,52(m)
12	112,33	7,53 (m)		H-10 7,52 (m)
14	118,07	8,13 (d, 6,5)	H-3	7,80 (d, 6,3)
18	117,50	8,91 (s)		8,70 (s)
CH₃				
17	12,56	2,81 (s)		3,20 (s)
21	20,82	3,13 (s)		2,90 (s)

Figura 26: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz) em $\text{MeOH-}d_4$ para o alcalóide **49**.

Figura 27: Ampliação da região entre δ_C 110-160 do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz) em $\text{MeOH-}d_4$ do alcalóide **49**.

Figura 28: Espectro de massas (Inserção direta) do alcalóide **49**.

Figura 29: Espectro de RMN ^1H (500 MHz) em $\text{MeOH-}d_4$ do alcalóide **49**.

Figura 30: Ampliação da região entre δ_{H} 7,2-8,8 do espectro de RMN ^1H (500 MHz) em $\text{MeOH-}d_4$ do alcalóide **49**.

Figura 31: Mapa de correlação do espectro de ^1H - ^1H -COSY em $\text{MeOH-}d_4$ para o alcalóide **49**.

Figura 32: Mapa de correlação do espectro de HSQC em MeOH- d_4 para o alcalóide **49**.

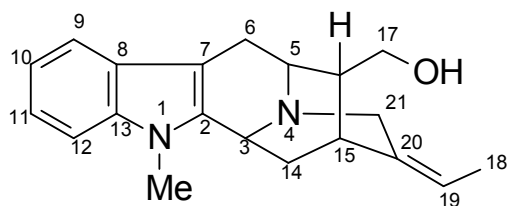
Figura 33: Ampliação do mapa de correlação do espectro de HSQC em MeOH- d_4 para o alcalóide **49**.

Figura 34: Mapa de correlação do espectro de HMBC em MeOH- d_4 para o alcalóide **49**.

Figura 35: Ampliação do mapa de correlação do espectro de HMBC em MeOH- d_4 para o alcalóide **49**.

Figura 36: Ampliação do mapa de correlação do espectro de HMBC em MeOH- d_4 para o alcalóide **49**.

5.2.4 Substância 50



A substância **50** foi isolada como um sólido amorfo, revelando um teste positivo para alcalóides com reagente de Dragendorff.

A análise dos dados de RMN ^{13}C (APT, **Figura 37**, p. 66, **Tabela 16**, p. 65) mostrou que o alcalóide (**50**) apresenta 20 átomos de carbono, sendo dois metílicos (um N-Me e um outro ligado a carbono sp^2), quatro metilênicos (sp^3 , sendo um carbinólico), 9 metínicos (cinco sp^2 , dois sp^3 ligados a um átomo de nitrogênio e dois sp^3) e 5 carbonos quaternários (todos sp^2) (**Tabela 16**, p. 65).

Esses dados, em conjunto com os dados do espectro de massas (**Figura 38**, p. 67, **Esquema 2**, p. 64), o qual apresentou o pico do íon molecular em m/z 308 Daltons, permitiram propor a fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}$ para o alcalóide (**50**).

O espectro de RMN ^1H (**Figuras 39 a 42**, p. 68 a 71, **Tabela 16**, p. 65) apresenta quatro sinais relativos a hidrogênios aromáticos acoplando entre si (^1H - ^1H -COSY, **Figura 43**, p. 72) a δ_{H} 7,51 (d, $J = 7,8$ Hz; H-9), 7,10 (dt, $J = 7,8$ e 1,0 Hz; H-10), 7,24 (dt, $J = 8,3$ e 1,0 Hz; H-11) e 7,43 (d, $J = 8,3$ Hz; H-12) característicos de um núcleo indólico, indicando que o anel A encontra-se livre de substituintes (LOUNASMAA, 1986; AZOUG, 1995), confirmado através das correlações heteronuclear (HMQC, **Figuras 44 a 46**, p. 73 a 75, **Tabela 16**, p. 65) onde se observam as correlações a $^1J_{\text{CH}}$ entre CH-9 (δ_{C} 121,41)/H-9 (δ_{H} 7,51), CH-10 (δ_{C} 126,77)/H-10 (δ_{H} 7,10), CH-11 (δ_{C} 123,80)/H-11 (δ_{H} 7,24), C-12 (δ_{C} 110,62)/H-12 (δ_{H} 7,43). A presença de um singlete a δ_{H} 3,70 referente a três hidrogênios de um grupo Me-N, confirmado pela correlação $^1J_{\text{CH}}$ $\text{CH}_3\text{-N-1}$ (δ_{C} 30,00)/MeN-1 (δ_{H} 3,70) confirma a existência de um núcleo indólico livre de substituintes com a presença de um grupo N-Metil (AZOUG, 1995).

A presença do núcleo indólico com um grupo N-Metil foi também corroborada pelas correlações correlações heteronuclear a longa distância (HMBC) (**Figuras 47 a 50**, p. 76 a 79, **Tabela 16**, p. 65) onde se observam as correlações a $^3J_{\text{CH}}$ entre CH-9 (δ_{C} 121,41)/H-11 (δ_{H} 7,24), CH-10 (δ_{C} 126,77)/H-12 (δ_{H} 7,43), CH-11 (δ_{C} 123,80)/H-9 (δ_{H} 7,51), C-12 (δ_{C} 110,62)/H-10 (δ_{H} 7,10), C-2 (δ_{C} 132,74)/MeN-1 (δ_{H} 3,70) e C-13

(δ_C 139,66)/MeN-1 (δ_H 3,70), as demais correlações estão descritas na **Tabela 16, p. 65**.

Os fragmentos $m/z=$ 197 (20%), 182 (100%), 181 (40%) e 168 (59%) apresentados no espectro de massas (**Figura 38, p. 67, Esquema 2, p. 64**) corroboram para confirmação do núcleo indólico com a presença do grupo metila ligado no nitrogênio-1.

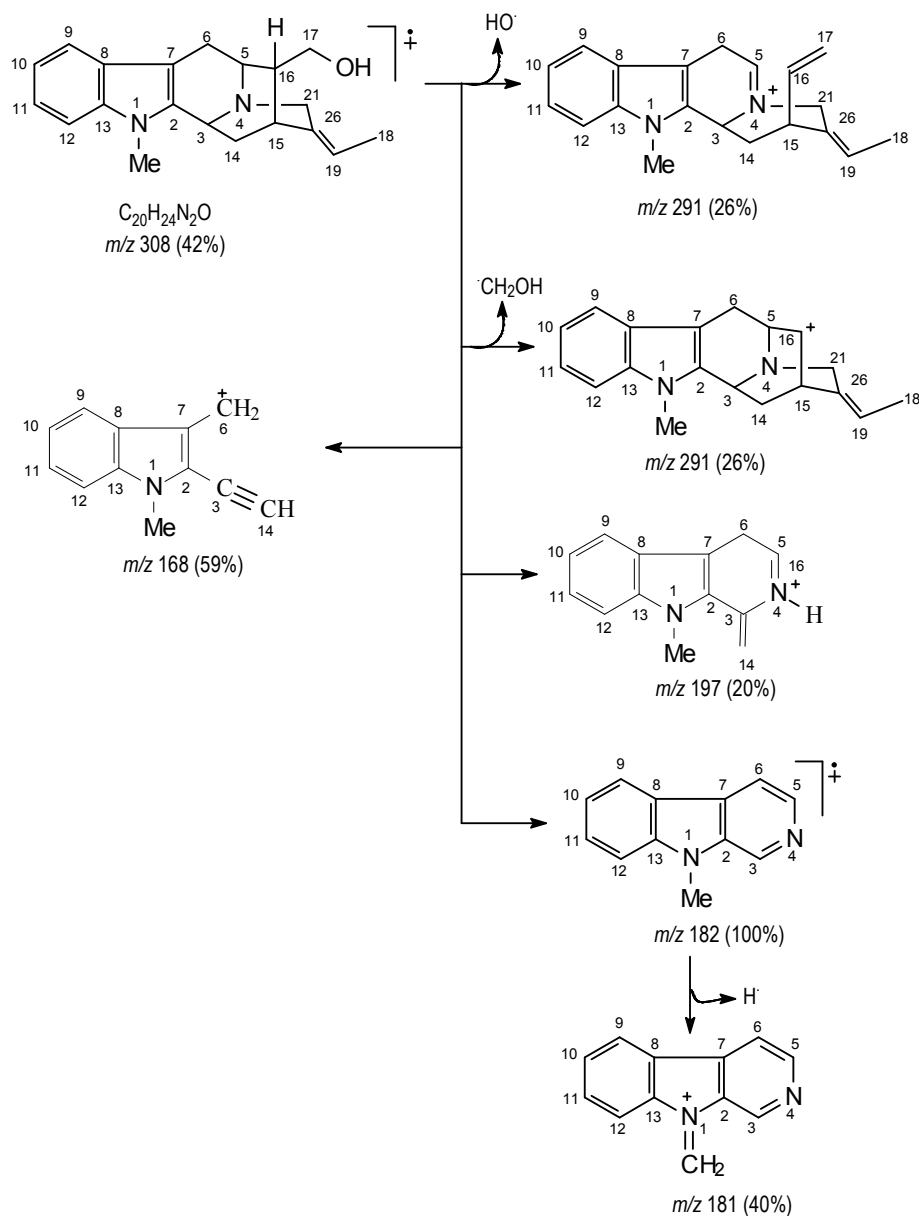
A presença de um grupo metila ligado a um átomo de carbono sp^2 pode ser reconhecida pelo sinal duplete a δ_H 1,70 (3H, d, $J=$ 6,7 Hz) e pelo quadruplete a δ_H 5,64 (1H, $J=$ 6,7 Hz), referentes aos hidrogênios 3H-18 e H-19, respectivamente. A presença da ligação dupla, e do grupo metila ligado a esta, foi corroborada ainda através das correlações a longa distância (HMBC, **Figuras 47 a 50, p. 76 a 79, Tabela 16, p. 65**) onde se observam as correlações a $^2J_{CH}$ entre CH₃-18 (δ_C 12,99)/H-19 (δ_H 5,64), CH-19 (δ_C 122,24)/3H-18 (δ_H 1,70), e pela correlação a $^3J_{CH}$ entre C-20 (δ_C 128,83)/3H-18 (δ_H 1,70) (BRAGA & REIS, 1987).

A presença de um carbono metilênico carbinólico na posição 17, (AZOUG, 1995; BRAGA & REIS, 1987) foi confirmada através da correlação heteronuclear (HMQC, **Figuras 44 a 46, p. 73 a 75, Tabela 16, p. 65**) onde se observa a correlação a $^1J_{CH}$ entre CH₂-17 (δ_C 63,75)/2H-17 (δ_H 3,53), e pela correlação a longa distância (HMBC, **Figuras 47 a 50, p. 76 a 79, Tabela 16, p. 65**) entre 2H-17 (δ_H 3,53) e N-CH-5 (δ_C 66,56). As demais correlações estão descritas na **Tabela 16, p. 65**.

A atribuição dos deslocamentos químicos dos hidrogênios metilênicos e metínicos restantes da cadeia alifática (**Tabela 16, p. 65**) foi feita com base nos parâmetros conhecidos para deslocamentos químicos de hidrogênio (FRIEBOLIM, 1993; SILVERSTEIN, 1991; BREITMAIER, 1987; PIHLAJA, 1984).

O conjunto desses dados permitiu definir um esqueleto do sub-tipo sarpagina (BRAGA & REIS, 1987) e propor a estrutura para o alcalóide (**50**) isolado. A prova final dessa estrutura adveio da comparação dos dados de RMN 1H e ^{13}C com os da literatura para o alcalóide affinisina (LOUNASMAA, 1986; BRAGA & REIS, 1987) (**Tabela 16, p. 65**).

A estereoquímica relativa dos átomos de carbono quirais proposta para o alcalóide (**50**) foi feita com base em dados biogénéticos (DANIELI & PALMISANO, 1986), e comparações com dados de literatura de alcalóides com esqueleto do sub-tipo sarpagina (LOUNASMAA, 1986; AZOUG, 1995; BRAGA & REIS, 1987).



Esquema 2: Interpretação mecanística dos principais fragmentos no espectro de massas da afinisina (**50**).

Tabela 16: Dados de RMN ^1H (400 MHz), ^{13}C (100 MHz) observados no espectro de HMQC e constantes de acoplamento a longa distância dos átomos de hidrogênio e carbono-13 observados no espectro de HMBC do alcalóide (**50**), em MeOH- d_4 em comparação com dados de literatura para a affinisina em CDCl_3 . Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm e as constantes de acoplamento (J entre parêntesis) estão em Hz.

	HMQC		HMBC		Affinisina
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}
C					
2	133,74	-	H3	MeN-1; 2H-6; 2H-14	135,6
7	101,75	-	2H-6	H-3; H-5; H-9	103,4
8	127,24	-		H-6b; H-10; H-12	127,1
13	139,66	-		MeN-1; H-9; H-11	139,3
20	128,83	-	H-15; 2H-21	2H-14; 3H-18	137,0
CH					
3	61,24	5,13 (d, 10,2)	H-14a	H-5; H-15; H-21b	49,5
5	66,56	3,53 (m)	H6a; H-16	2H-17; H-21a	54,4
9	121,41	7,51 (d, 7,8)		H-11	117,9
10	126,77	7,10 (dt, 7,8 e 1,0)		H-12	118,5
11	123,80	7,24 (dt, 8,3 e 1,0)		H-9	120,6
12	110,62	7,43 (d, 8,3)		H-10	108,4
15	27,10	3,05 (m)	2H-14	H-3; H-5; H-19; H-21b	27,3
16	45,06	2,08 (m)		H-14 ^a	44,1
19	122,24	5,64 (q, 6,7)	3H-18	H-15; 2H-21	116,2
CH₂					
6	25,22	3,20 (m); 3,05 (m)	H-5	H-16	27,1
14	32,56	2,55(t, 10,2) 2,03 (m)	H-3; H-15	H-16	32,7
17	63,75	3,53 (m)		H-5	64,7
21	66,06	4,43 (dl, 15,6) 4,24 (dl, 15,6)		H-3; H-15; H-19	56,0
CH₃					
18	12,99	1,70 (d, 6,7)	H-19		12,6
MeN-1	30,00	3,70 (s)			29,2

Figura 37: Espectro de RMN ^{13}C (APT) a 100 MHz em $\text{MeOH-}d_4$ para o alcalóide **50**.

Figura 38: Espectro de massas (Inserção direta) do alcalóide **50**.

Figura 39: Espectro de RMN ^1H (400 MHz) em $\text{MeOH-}d_4$ para o alcalóide **50**.

Figura 40: Ampliação da região entre δ_{H} 6,9-7,6 do espectro de RMN ^1H (400 MHz) em $\text{MeOH-}d_4$ do alcalóide **50**.

Figura 41: Ampliação da região entre δ_H 4,0-6,0 do espectro de RMN 1H (400 MHz) em MeOH- d_4 do alcalóide **50**.

Figura 42: Ampliação da região entre δ_{H} 1,4-3,9 do espectro de RMN ^1H (400 MHz) em $\text{MeOH-}d_4$ do alcalóide **50**.

Figura 43: Mapa de correlação do espectro de ^1H - ^1H -COSY em $\text{MeOH-}d_4$ para o alcalóide **50**.

Figura 44: Mapa de correlação do espectro de HMQC em MeOH- d_4 para o alcalóide 50.

Figura 45: Ampliação do mapa de correlação do espectro de HMQC em MeOH- d_4 para o alcalóide **50**.

Figura 46: Ampliação do mapa de correlação do espectro de HMQC em MeOH- d_4 para o alcalóide **50**.

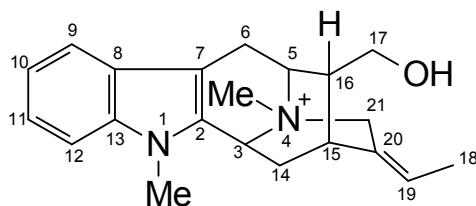
Figura 47: Mapa de correlação do espectro de HMBC em MeOH- d_4 para o alcalóide **50**.

Figura 48: Ampliação do mapa de correlação do espectro de HMBC em MeOH- d_4 para o alcalóide **50**.

Figura 49: Ampliação do mapa de correlação do espectro de HMBC em MeOH- d_4 para o alcalóide **50**.

Figura 50: Ampliação do mapa de correlação do espectro de HMBC em MeOH- d_4 para o alcalóide **50**.

5.2.5 Substância 51



A substância **51** foi isolada como óleo viscoso de cor castanha, apresentando teste positivo para alcalóides com reagente Dragendorff.

A análise dos espectros de RMN ^{13}C (APT, **Figuras 51 a 53, p. 84 a 86, Tabela 17, p. 82**) mostrou que o alcalóide (**51**) apresenta vinte e um átomos de carbono, sendo três metílicos (dois N-Me e um ligado a átomo de carbono sp^2), quatro metilênicos (sendo um carbinólico), nove metínicos (cinco sp^2 e dois ligados a átomo de nitrogênio) e cinco átomos de carbono quaternário (todos sp^2).

Esses dados, em conjunto com os dados do espectro de massas (**Figura 54, p. 87, Esquema 3, p. 83**), o qual apresentou o pico do íon molecular em m/z 323 Daltons, permitiram propor a fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}$ para o alcalóide (**51**), sugerindo este ser um sal quaternário de amônio, pois, possui massa ímpar, e ainda o alcalóide (**51**) apresenta uma diferença de 15 unidades de massa em relação ao alcalóide affinisina (**50**).

O espectro de RMN ^1H (**Figuras 55 e 56, p. 88 e 89, Tabela 17, p. 82**) apresenta quatro sinais de hidrogênio aromáticos a δ_{H} 7,48 (d, $J= 8,0$ Hz; H-9), δ_{H} 7,16 (t, $J= 8,0$ Hz; H-10), δ_{H} 7,29 (t, $J= 8,0$ Hz; H-11) e δ_{H} 7,34 (1H, d, $J= 8,0$ Hz; H-12) acoplado entre si, e a presença de um sinal singleto em δ_{H} 3,73 referente a um grupo MeN-1, indicam a presença de um anel indólico com um grupo N-metil, livre de substituintes, corroborada pela presença de um fragmento $m/z= 183$ apresentado no espectro de massas (**Figura 54, p. 87, Esquema 3, p. 83**) (AZOUG, 1995, BRAGA et al., 1984; LOUSNASMSA, 1986).

A presença do núcleo indólico com um grupo N-Metil foi confirmada pelas correlações heteronuclear a longa distância (HMBC, **Figuras 57 a 60, p. 91 a 94, Tabela 17, p. 82**) onde se observam as correlações a $^3J_{\text{CH}}$ entre CH-9 (δ_{C} 118,71)/H-11 (δ_{H} 7,29), CH-10 (δ_{C} 120,94)/H-12 (δ_{H} 7,34), CH-11 (δ_{C} 122,92)/H-9 (δ_{H} 7,48), C-12 (δ_{C} 109,52)/H-10 (δ_{H} 7,16), C-2 (δ_{C} 132,72)/MeN-1 (δ_{H} 3,73) e C-13 (δ_{C} 138,00)/MeN-1 (δ_{H} 3,73), as demais correlações estão descritas na **Tabela 17, p. 82**.

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 (d, $J= 6,2$ Hz) e pelo multiplete em δ_H 5,58, 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 a longa distância (HMBC, **Figuras 57 a 60, p. 90 a 93, Tabela 17, p. 82**) $^3J_{CH}$ entre C-20 (δ_C 127,25)/3H-18 (δ_H 1,63) (BRAGA & REIS, 1987, MEDEIROS et al., 2001).

A presença de um carbono metilênico carbinólico na posição 17 em δ_C 63,50, (AZOUG, 1995; BRAGA & REIS, 1987) foi confirmada através da correlação heteronuclear a longa distância (HMBC, **Figuras 57 a 60, p. 90 a 93, Tabela 17, p. 82**) entre CH-5 (δ_C 65,83) com um hidrogênio carbinólico Ha-17 (δ_H 3,60).

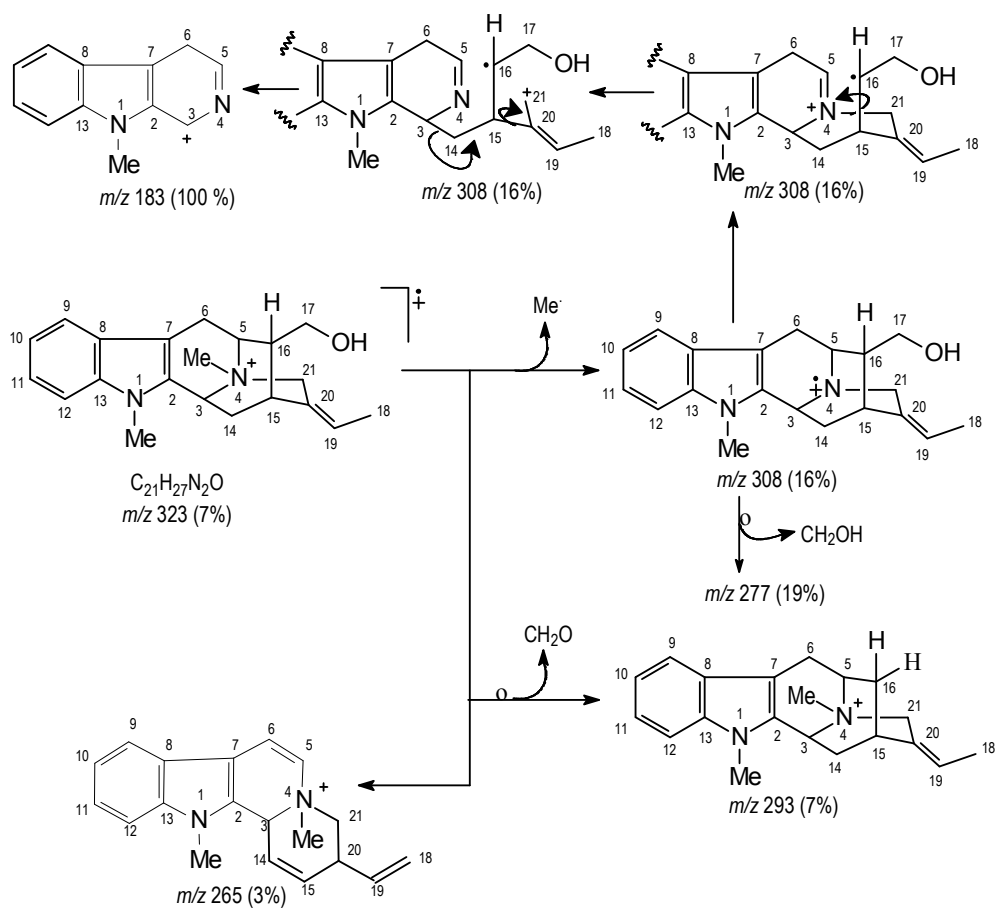
A análise do espectro de correlações heteronucleares distância (HMBC, **Figuras 57 a 60, p. 90 a 93, Tabela 17, p. 82**), permitiu confirmar a presença do segundo grupo MeN na posição 4 através das correlações a longa distância $^3J_{CH}$ entre CH-3 (δ_C 59,25)/MeN-4 (δ_H 3,30) e CH-5 (δ_C 65,83)/MeN-4 (δ_H 3,30).

O restante das atribuições dos deslocamentos químicos dos hidrogênios metilênicos e metínicos restantes da cadeia alifática (**Tabela 17, p. 82**) foi feita com base nos dados obtidos nos experimentos bidimensionais (HMBC).

Pode-se então propor a estrutura da N_b -metilaffinisina para o alcalóide (**51**) diferindo então do alcalóide affinisina (**50**) de 15 daltons como dito anteriormente, e a prova final da proposta foi feita através de comparação com dados de literatura para a N_b -metilaffinisina isolada de *Peschiera fuchsiaefolia* (BRAGA & REIS, 1987).

Tabela 17: Dados de RMN ^1H (400 MHz), ^{13}C (APT, 100 MHz) e constantes de acoplamento a longa distância dos átomos de hidrogênio e carbono-13 observados no espectro de HMBC do alcalóide (**51**), em comparação com dados de literatura para a N_b -metilaffinisina, em CDCl_3 . Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm e as constantes de acoplamento (J entre parêntesis) estão em Hz.

	APT		HMBC		N_b -metilaffinisina
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}
C					
2	132,72	-	H-3	MeN-1; H-6b	125,3
7	100,41	-	H-6b	H-9	100,0
8	125,03	-		H-10; H-12	126,6
13	138,00	-		MeN-1; H-9; H-11	137,6
20	127,25	-		H-14a; 3H-18	132,0
CH					
3	59,25	5,83 (d, 8,4)		MeN-4	59,2
5	65,83	3,97 (m)		H-17a; MeN-4	65,4
9	118,71	7,48 (d, 8,0)		H-11	118,1
10	120,94	7,16 (t, 8,0)		H-12	119,7
11	122,92	7,29 (t, 8,0)		H-9	120,6
12	109,52	7,34 (d, 8,0)		H-10	109,1
15	26,14	2,86 (s)			25,6
16	47,71	2,64 (m)			43,2
19	120,24	5,58 (m)	3H-18		122,4
CH₂					
6	26,39	3,28 (m); 3,20 (m)			24,3
14	32,20	2,17 (m); 1,96 (m)			31,2
17	63,50	3,68 (m); 3,60 (m)			62,7
21	64,94	4,95 (dl, 15,4) 4,41 (dl, 15,4)		MeN-4	64,5
CH₃					
18	12,82	1,63 (d, 6,2)			12,3
MeN-1	30,13	3,73 (s)			29,4
MeN-4	43,47	3,30 (s)			47,1



Esquema 3: Interpretação mecanística dos principais fragmentos no espectro de massas da N_6 -metilaffinisina (51).

Figura 51: Espectro de RMN ^{13}C (APT) a 100 MHz em CDCl_3 para o alcalóide **51**.

Figura 52: Ampliação da região entre δ_C 100-140 do espectro de RMN ^{13}C (APT) a 100 MHz em CDCl_3 para o alcalóide **51**.

Figura 53: Ampliação da região entre δ_C 10-70 do espectro de RMN ^{13}C (APT) a 100 MHz em CDCl_3 para o alcalóide **51**.

Figura 54: Espectro de massas (Inserção direta) do alcalóide **51**.

Figura 55: Espectro de RMN ^1H (400 MHz) em CDCl_3 para o alcalóide **51**.

Figura 56: Ampliação da região entre δ_H 7,0-7,7 do espectro de RMN 1H (400 MHz) em $CDCl_3$ para o alcalóide **51**.

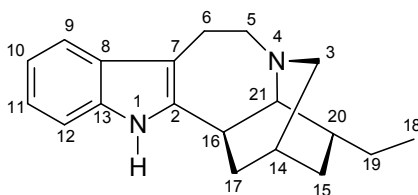
Figura 57: Mapa de correlação do espectro de HMBC em CDCl_3 para o alcalóide **51**.

Figura 58: Ampliação do mapa de correlação do espectro de HMBC em CDCl_3 para o alcalóide **51**.

Figura 59: Ampliação do mapa de correlação do espectro de HMBC em CDCl_3 para o alcalóide **51**.

Figura 60: Ampliação do mapa de correlação do espectro de HMBC em CDCl_3 para o alcalóide **51**.

5.2.6 Substância 52



A substância (**52**) foi isolada como um sólido amorfo, revelando teste positivo para alcalóides com reagente de Drangendorff.

A análise do espectro de RMN ^{13}C (APT, **Figuras 61 a 63, p. 98 a 100, Tabela 18, p. 96**) do alcalóide (**52**) permitiu reconhecer a presença de vinte átomos de carbono, sendo um metílico, seis metilênicos (todos sp^3 , e dois ligados a um heteroátomo), oito metínicos (quatro sp^2 aromáticos, e quatro sp^3 , sendo dois ligados a um heteroátomo) e quatro não hydrogenados (todos sp^2) (LOUNASMAA, 1986; SHAMMA, 1979).

Esses dados, em conjunto com os dados do espectro de massas (**Figura 64 p. 101, Esquema 4, p. 97**), o qual apresentou o pico do íon molecular em m/z 280 Daltons, permitiram propor a fórmula molecular $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_2$ para o alcalóide (**52**), caracterizando um Índice de Deficiência de Hidrogênio (IDH) igual a 9.

O espectro de RMN ^1H do alcalóide (**52**) (**Figuras 65 a 70, p. 102 a 107, Tabela 18, p. 96**) apresentou sinais (δ_{H}) correspondentes a grupo metila, hidrogênios aromáticos, grupos metínicos, grupos metilênicos e hidrogênio ligado a nitrogênio referente a grupamento amina (LOUNASMAA, 1986; SHAMMA, 1979).

O espectro de RMN ^1H do alcalóide (**52**) (**Figuras 66 e 67, p. 103 e 104, Tabela 18, p. 96**) apresenta quatro sinais relativos a hidrogênios aromáticos a δ_{H} 7,44 (d, $J = 7,0$ Hz; H-9); 7,07 (m; H-10); 7,10 (m; H-11); 7,24 (d, $J = 7,7$ Hz; H-12) característicos do anel A (benzênico) de um núcleo indólico livre de substituintes (AZOUG, 1995; LOUNASMAA, 1986), confirmado através das correlações heteronucleares HMQC (**Figuras 71 a 74, p. 108 a 111, Tabela 18, p. 96**) onde se observam as correlações a $^1J_{\text{CH}}$ entre CH-9 (δ_{C} 117,84)/H-9 (δ_{H} 7,44); CH-10 (δ_{C} 119,08)/H-10 (δ_{H} 7,07); CH-11 (δ_{C} 121,00)/H-11 (δ_{H} 7,10) e CH-12 (δ_{C} 110,16)/H-12 (δ_{H} 7,24).

A presença do núcleo indólico livre de substituintes foi também confirmada pelas correlações heteronucleares a longa distância (HMBC, **Figuras 75 a 78, p. 112 a 115, Tabela 18, p. 96**) onde se observam as correlações $^3J_{\text{CH}}$ entre CH-9 (δ_{C} 117,84)/H-11 (δ_{H} 7,10); CH-10 (δ_{C} 119,08)/H-12 (δ_{H} 7,24); CH-11 (δ_{C} 121,00)/H-9 (δ_{H}

7,44) e CH-12 (δ_C 110,16)/H-10 (δ_H 7,07) e com HN-1 (δ_H 8,03), corroborado ainda pelos fragmentos $m/z = 168$ e 156 u.m.a. apresentado no espectro de massas (**Figura 64, p. 101, Esquema 4, p. 97**).

No alcalóide (**52**) nota-se a ausência de um grupo carbometoxi ligado ao carbono C-16 comum no esqueleto para alcalóides indólicos monoterpênicos (ZENK, 1980).

A presença de três sinais multipletos relativos aos dois grupos metilênicos do núcleo indólico acoplado entre si, 2H-5 [(δ_H 3,41, m, H-5b) e (δ_H 3,20, m, H-5a)] α ao átomo de nitrogênio, com 2H-6 [(δ_H 3,20, m, H-6b) e (δ_H 2,75, H-6a)], juntamente com os fragmentos com $m/z = 168$ (**Figura 64, p. 101, Esquema 4, p. 97**) corroboram na confirmação da proposta de um núcleo indólico livre de substituintes.

A presença dos dois grupos metilênicos do núcleo indólico acoplado entre si foi confirmada pelas correlações heteronuclear a longa distância observadas no espectro de HMBC (**Tabela 18, p. 96, Figuras 75 a 78, p. 112 a 115**) entre $^3J_{CH}$ entre C-2 (δ_C 141,27)/H-6b (δ_H 3,20); C-7 (δ_C 108,86)/2H-5 (δ_H 3,41 e 3,20); C-8 (δ_C 129,46)/H-6b (δ_H 3,20) e a $^2J_{CH}$ entre C-7 (δ_C 108,86)/2H-6 (δ_H 3,20 e 2,75).

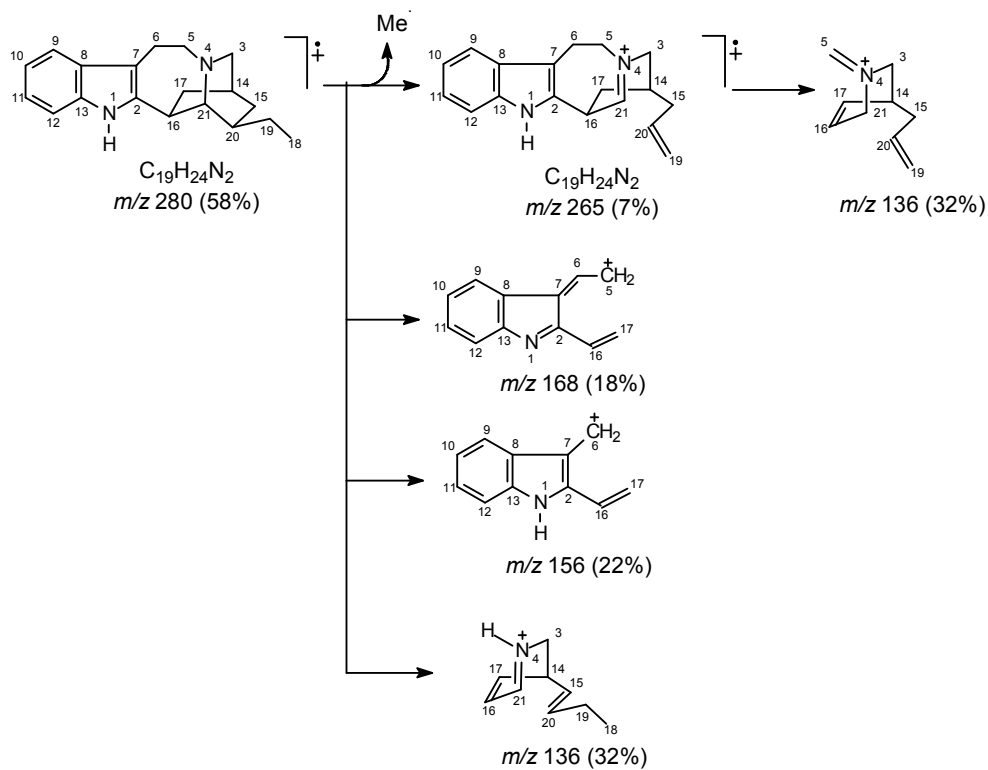
A presença de um sinal tripleto integrando para três hidrogênios em δ_H 0,88 com $J = 7,0$ Hz relativo a um grupo metila apresentado no espectro de RMN 1H (**Figura 70, p. 107, Tabela 18, p. 96**), confirmado pelas correlações heteronuclear a longa distância observadas no espectro de HMBC (**Tabela 18, p. 96, Figuras 75 a 78, p. 112 a 115**) entre $^3J_{CH}$ entre CH-20 (δ_C 41,77)/3H-18 (δ_H 0,88) e a $^2J_{CH}$ entre CH₂-19 (δ_C 27,51)/3H-18 (δ_H 0,88), confirmam a presença de um grupo etila livre de oxidação na cadeia lateral da porção terpênicica do alcalóide (**52**) (LOUNASMAA, 1986; SHAMMA, 1979).

O conjunto desses dados permite classificar o alcalóide (**52**) com um esqueleto pertencente da classe ibogano, definindo o alcalóide (**52**) como sendo a ibogamina. A prova final desta proposta adveio da comparação dos dados espectroscópicos do alcalóide (**52**) com os dados de literatura para a ibogamina (LOUNASMAA, 1986; SHAMMA, 1979).

A estereoquímica relativa dos átomos de carbono estereogênicos proposta para (**52**) 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 (**52**) (DANIELI & PALMISANO, 1986).

Tabela 18: Dados de RMN ^1H (400 MHz), ^{13}C (100 MHz) observados no espectro de HMQC e constantes de acoplamento a longa distância dos átomos de hidrogênio e carbono-13 observados no espectro de HMBC do alcalóide (**52**), em CDCl_3 em comparação com dados de literatura para a ibogamina em CDCl_3 . Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm e as constantes de acoplamento (J entre parentesis) estão em Hz.

	HMQC		HMBC		Ibogamina
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}
C					
2	141,27	-		H-6b; H-21	141,9
7	108,86	-	2H-6	2H-5; H-9; HN-1	109,7
8	129,46	-	H-9	HN-1; H-6b; H-10; H-12	129,8
13	134,71	-		H-9; H-11	134,2
CH					
9	117,84	7,44 (d, 7,0)		H-11	117,5
10	119,08	7,07 (m)	H-11	H-12	118,8
11	121,00	7,10 (m)		H-9	120,6
12	110,16	7,24 (d, 7,7)		HN-1; H-10	110,2
14	26,11	1,87 (m)			26,9
16	40,70	3,01 (m)		H-20	33,7
20	41,77	1,56 (m)	H-21	3H-18	41,6
21	57,80	2,94 (sl)		2H-3; 2H-5	57,0
CH₂					
3	49,75	3,12 (m); 3,01 (m)		2H-5; H-21	54,5
5	54,34	3,41 (m); 3,20 (m)		H-5b; H-17a; H-21	49,3
6	20,12	3,20 (m); 2,75 (m)			20,0
15	31,65	1,85 (m); 1,25 (m)	H-20	H-3b; 2H-17; H-21	31,4
17	33,87	2,05 (m); 1,59 (m)		2H-3; H-21	34,7
19	27,51	2,04 (m); 1,60 (m)	3H-18		28,2
CH₃					
18	11,89	0,88 (t, 7,0)			11,9



Esquema 4: Interpretação mecânica dos principais fragmentos no espectro de massas da ibogamina (**52**).

Figura 61: Espectro de RMN ^{13}C (APT) a 100 MHz em CDCl_3 do alcalóide **52**.

Figura 62: Ampliação da região entre δ_C 110,0-140,0 do espectro de RMN ^{13}C (APT) a 100 MHz em CDCl_3 do alcalóide **52**.

Figura 63: Ampliação da região entre δ_C 10,0-60,0 do espectro de RMN ^{13}C (APT) a 100 MHz em CDCl_3 do alcalóide **52**.

Figura 64: Espectro de massas (Inserção direta) do alcalóide **52**.

Figura 65: Espectro de RMN ^1H (400 MHz) em CDCl_3 do alcalóide **52**.

Figura 66: Ampliação da região entre δ_H 7,4-8,0 do espectro de RMN 1H (400 MHz) em $CDCl_3$ do alcalóide **52**.

Figura 67: Ampliação da região entre δ_H 7,0-7,3 do espectro de RMN 1H (400 MHz) em $CDCl_3$ do alcalóide **52**.

Figura 68: Ampliação da região entre δ_H 3,5-4,6 do espectro de RMN 1H (400 MHz) em $CDCl_3$ do alcalóide **52**.

Figura 69: Ampliação da região entre δ_H 2,6-3,5 do espectro de RMN 1H (400 MHz) em $CDCl_3$ do alcalóide **52**.

Figura 70: Ampliação da região entre δ_H 0,6-2,4 do espectro de RMN 1H (400 MHz) em $CDCl_3$ do alcalóide **52**.

Figura 71: Mapa de correlação do espectro de HMQC em CDCl_3 para o alcalóide **52**.

Figura 72: Ampliação do mapa de correlação do espectro de HMQC em CDCl_3 para o alcalóide **52**.

Figura 73: Ampliação do mapa de correlação do espectro de HMQC em CDCl_3 para o alcalóide **52**.

Figura 74: Mapa de correlação do espectro de HMBC em CDCl_3 para o alcalóide **52**.

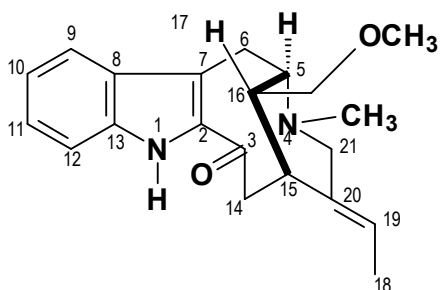
Figura 75: Ampliação do mapa de correlação do espectro de HMBC em CDCl_3 para o alcalóide **52**.

Figura 76: Ampliação do mapa de correlação do espectro de HMBC em CDCl_3 para o alcalóide **52**.

Figura 77: Ampliação do mapa de correlação do espectro de HMBC em CDCl_3 para o alcalóide **52**.

Figura 78: Ampliação do mapa de correlação do espectro de HMBC em CDCl_3 para o alcalóide **52**.

5.2.7 Substância 53



A substância (**53**) foi isolada como um sólido amorfo, revelando um teste positivo para alcalóides com reagente de Dragendorff.

A análise do espectro RMN ^{13}C (APT, **Figuras 79 a 81, p. 121 a 123, Tabela 19, p. 119**) permitiu identificar a presença de vinte e um átomos de carbono, sendo três metílicos (um OMe, um N-Me e o outro ligado a um átomo de carbono sp^2), quatro metilênicos (sendo, um ligado a um átomo de oxigênio, um α -carbonílico e um ligado a um átomo de nitrogênio), oito metínicos (cinco átomos de carbono sp^2 , um átomo de carbono sp^3 ligado a um átomo de nitrogênio e dois sp^3) e seis átomos de carbono não hidrogenados (todos sp^2) (**Tabela 19, p. 119**).

Esses dados, em conjunto com os dados do espectro de massas apresentou pico do íon molecular em m/z 338 Daltons que em conjunto com o espectro de RMN ^1H e ^{13}C -APT possibilitou propor a fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_2$ (grau de insaturação 10) para o alcalóide **53**, compatível com o esqueleto do tipo corinanteano.

O espectro de RMN ^1H (**Figuras 82 a 90, p. 124 a 132, Tabela 19, p. 119**) apresenta quatro sinais relativos a hidrogênios aromáticos acoplando entre si (**Figuras 83 a 85, p. 124 a 132**) a δ_{H} 7,70 (d, $J= 8,1$ Hz, H-9); 7,16 (dd, $J= 8,4$ e 8,1 Hz, H-10); 7,36 (dd, $J= 8,4$ e 8,4 Hz, H-11); 7,49 (dl, $J= 8,4$ Hz) característicos de um núcleo indólico livre de substituintes (AZOUG, 1995; LOUNASMAA, 1986) confirmado através das correlações heteronucleares HMQC (**Figuras 91 a 93, p. 133 a 135, Tabela 19, p. 119**) onde se observam as correlações a $^1J_{\text{CH}}$ entre CH-9 (δ_{C} 120,48)/H-9 (δ_{H} 7,70); CH-10 (δ_{C} 120,64)/H-10 (δ_{H} 7,16); CH-11 (δ_{C} 126,81)/H-11 (δ_{H} 7,36) e CH-12 (δ_{C} 112,19)/H-12 (δ_{H} 7,49). A presença do núcleo indólico livre de substituintes foi também confirmada pelas correlações heteronucleares a longa distância (HMBC, **Figuras 94 a 98, p. 136 a 140, Tabela 19, p. 119**) onde se observam as correlações $^3J_{\text{CH}}$ entre CH-9 (δ_{C} 120,48)/H-11 (δ_{H} 7,36); CH-10 (δ_{C} 120,64)/H-12 (δ_{H} 7,49); CH-11 (δ_{C} 126,81)/H-9 (δ_{H} 7,70) e CH-12 (δ_{C} 112,19)/H-10

(δ_H 7,16), corroborado ainda pelo fragmento $m/z= 158$ daltons apresentado no espectro de massas (**Figura 99, p. 141, Esquema 5, p. 120**). As demais correlações estão descritas na **Tabela 19**.

A presença de um grupo metila ligado a um átomo de carbono sp^2 apresentada no espectro de RMN 1H (**Figuras 86 e 88, p. 128 e 130, Tabela 19, p. 119**) pode ser reconhecida pelo sinal duploduplete a δ_H 1,70 relativo a três hidrogênios com $J= 7,0$ e $2,2$ Hz, e pelo quadruplete a δ_H 5,49 relativo a um hidrogênio com $J= 7,0$ Hz, referentes aos hidrogênios 3H-18 e H-19, respectivamente. A confirmação da dupla ligação e do grupo metila a ela ligada foi corroborada ainda através das correlações a longa distância (HMBC, **Figuras 94 a 98, p. 136 a 140**) onde se observam as correlações $^2J_{CH}$ entre CH_3 -18 (δ_C 12,10)/H-19 (δ_H 5,49); CH-19 (δ_C 121,31)/3H-18 (δ_H 1,70) e pelas correlações a $^3J_{CH}$ entre C-20 (δ_C 134,71)/3H-18 (δ_H 1,70) (BRAGA et al., 1984).

A presença de um grupo carbonila α,β -insaturado na posição 3 foi confirmada pelo sinal em δ_C 191,50 apresentado no espectro de RMN ^{13}C (APT, **Figura 79, p. 121**), e corroborado pela correlação heteronuclear a longa distância (HMBC, **Figura 94 a 98, p. 136 a 140, Tabela 19, p. 119**) onde observa-se a correlação $^2J_{CH}$ C-3 (δ_C 191,50)/H-14b (δ_H 3,33), e pela correlação a $^3J_{CH}$ entre C-3 (δ_C 191,50)/H-15 (δ_H 3,07).

A presença de um grupo metila ligado ao átomo de N-4 foi confirmada pelo sinal singleto integrando para três hidrogênios em δ_H 2,57 apresentado no espectro de RMN 1H (**Figura 88, p. 130, Tabela 19, p. 119**), e pelo sinal em δ_C 41,81 referente ao grupo CH_3 -N-4 apresentado no espectro de RMN ^{13}C -APT (**Figura 81, p. 123, Tabela 19, p. 119**). A presença deste grupo foi confirmada ainda pelas correlações heteronuclear a longa distância (HMBC, **Figura 94 a 98, p. 136 a 140**) onde observa-se as correlações $^3J_{CH}$ CH-5 (δ_C 56,93)/MeN-4 (δ_H 2,57) e CH_2 -21 (δ_C 52,04)/MeN-4 (δ_H 2,57).

A presença de um sinal em δ_C 67,44 apresentado no espectro de RMN ^{13}C (APT, **Figura 81, p. 123, Tabela 19, p. 119**), característico de carbono ligado a um átomo de oxigênio (MEDEIROS, 2003; BRAGA et al., 1986) e, de dois sinais duploduplete integrando para um hidrogênio cada em δ_H 3,62 e 3,59 ambos com $J= 8,0$ e $2,2$ Hz apresentado no espectro de RMN 1H (**Figura 87, p. 129, Tabela 19, p.**

119), confirmam a presença de um carbono metilênico CH₂-17 ligado a um grupo OMe.

A presença do grupo OMe ligado ao carbono CH₂-17 pode ser confirmada pela presença do sinal em δ_C 50,74 no espectro de RMN ¹³C-APT (**Figura 81, p. 123, Tabela 19, p. 119**), e pelo sinal simples integrando para três hidrogênios no espectro de RMN ¹H (**Figura 88, p. 130, Tabela 19, p. 119**) em δ_H 3,47.

A presença deste carbono metilênico CH₂-17 ligado a um grupo OMe foi confirmada ainda pelas correlações heteronuclear a longa distância (HMBC, **Figura 94 a 98, p. 136 a 140, Tabela 19, p. 119**) onde observa-se as correlações ³J_{CH} CH₂-17 (δ_C 67,44)/H-15 (δ_H 3,07) e H-5 (δ_H 3,31).

A presença de um fragmento em *m/z*= 306 (100%) no espectro de massas (**Figura 99, p. 141, Esquema 5, p. 120**) mostra a perda de um molécula de MeOH, corroborando na confirmação da presença de um grupo metoxila ligado ao átomo de carbono CH₂-17.

A atribuição do restante dos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio metilênicos e metínicos da cadeia alifática (**Tabela 19, p. 119**) foi feita com base nos parâmetros conhecidos para deslocamentos químicos de hidrogênio (FRIEBOLIM, 1993; SILVERSTEIN, 1991; BREITMAIER, 1987).

O conjunto destes dados permitiu definir um esqueleto do sub-tipo sarpagina (BRAGA et al., 1984) e propor a estrutura (**53**) para o alcalóide isolado. Prova final desta estrutura veio da comparação dos dados de RMN ¹³C (APT, **Tabela 19, p. 119**) com dados da para o alcalóide affinina (**48**) aqui já descrito, onde nota-se a presença de um grupo hidroxila ligado no carbono CH₂-17, enquanto que no alcalóide (**53**) a presença de um grupo metoxila.

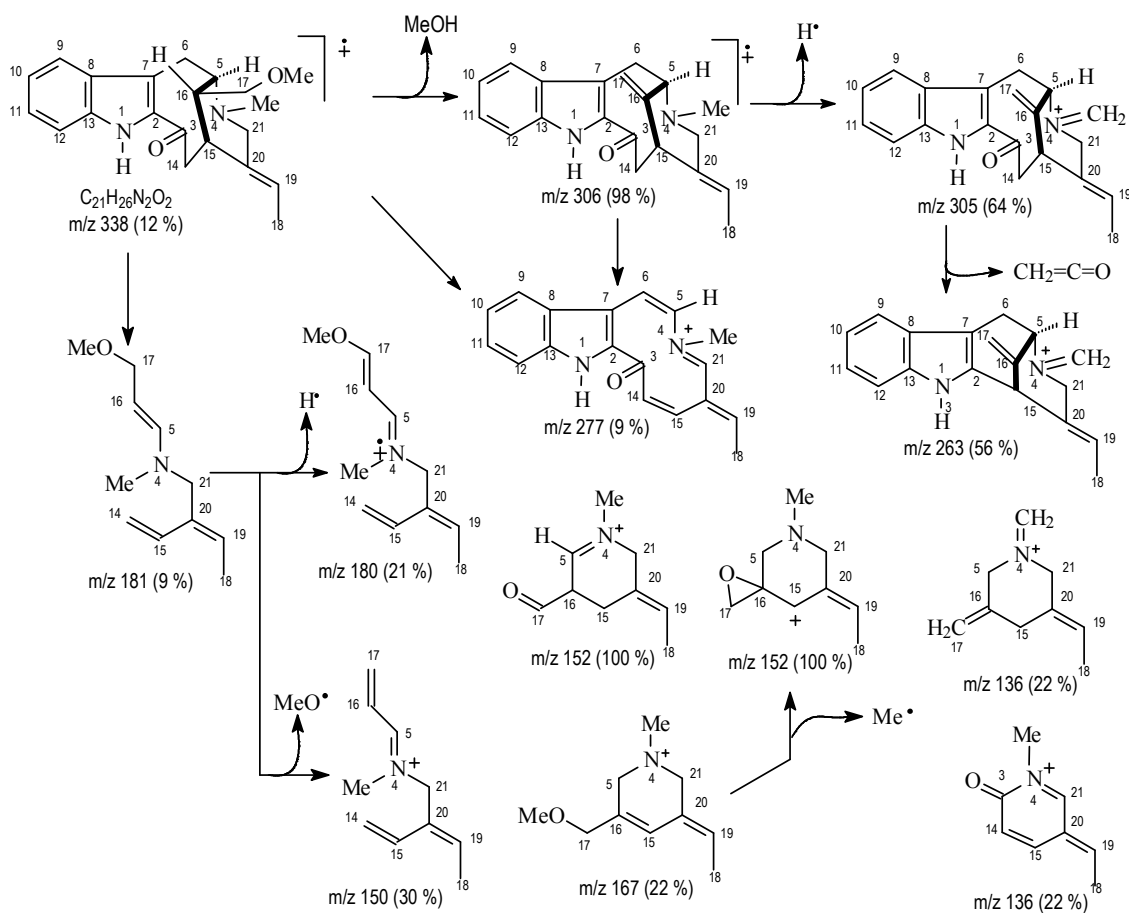
Até o presente momento o alcalóide (**53**) encontra-se inédito na literatura e ao qual deu-se o nome de histrixnina.

A estereoquímica relativa do átomo de carbono C-16 proposta para histrixnina (**53**) foi feita com base na comparação com valores do deslocamento químico do carbono C-16 encontrado na literatura para a epiaffinina com $\delta_C \sim 38,50$, isolada das espécies do *Peschiera fuchsiaefolia* ref, *P. catharinensis* (ARAUJO et al., 1984) e *Hunteria zeylanica* (LAVAUD et al., 1982; ARAMBEWELA and KHUONG-HUU, 1981), mostrando o alcalóide histrixnina (**53**) que possui um valor de δ_C 38,02, para o carbono C-16, possui a mesma estereoquímica.

Desse modo, o um novo alcalóide com esqueleto do tipo corinanteano isolado foi isolado e caracterizado com o nome de histrixnina.

Tabela 19: Dados de RMN ^1H (400 MHz), ^{13}C (100 MHz) observados no espectro de HMQC e constantes de acoplamento a longa distância dos átomos de hidrogênio e carbono-13 observados no espectro de HMBC do alcalóide histrixnina (**53**), em CDCl_3 em comparação com dados de literatura para o alcalóide (**48**) em CDCl_3 . Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm e as constantes de acoplamento (J entre parêntesis) estão em Hz.

	53				48	
	HMQC		HMBC		δ_{C}	δ_{H}
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}
C						
2	135,43	-		2H-6; H-14a	136,80	-
3	191,50	-	H-14b		194,00	-
7	120,36	-	H-6	HN-1; H-9	122,00	-
8	128,30	-		H-6; H-10; H-12	129,60	-
13	136,41	-		H-9; H-11	138,60	-
20	134,71	-	2H-21	3H-18	136,32	-
CH						
5	56,93	3,31 (dl, 8,4)		Me-4; H-15; 2H-17; H-21b	56,97	3,06 (t, 8,3)
9	120,48	7,70 (d, 8,1)		H-11	121,64	7,68 (d, 8,1)
10	120,64	7,16 (t, 8,4, 8,1)		H-12	121,11	7,09 (dt, 8,1)
11	126,81	7,36 (dd, 8,1, 8,4)		H-9	127,44	7,28 (dt, 8,3)
12	112,19	7,49 (dl, 8,4)		H-10	113,40	7,40 (d, 8,3)
15	31,60	3,07 (tl, 8,8)	2H-14	2H-17; H-19; H-21b	31,29	3,04 (tl, 10,5)
16	38,02	1,97 (m)	H-5; H-15	2H-6; 2H-14	41,27	1,89 (t, 6,7)
19	121,31	5,49 (ql, 7,0)	3H-18	2H-21	122,50	5,49 (ql, 6,7)
CH₂						
6	19,34	3,48 (m)	H-5		20,60	3,34 (m) 3,29 (m)
14	43,50	3,33 (m) 2,67 (dd, 12,8, 7,7)	H-15		44,30	3,25 (dd, 12,6, 9,7) 2,45 (dd, 12,6, 6,7)
17	67,44	3,62 (dd, 8,0, 2,2) 3,59 (dd, 8,0, 2,2)		H-5; H-15	65,61	3,41 (d, 6,2)
21	52,04	3,70 (dl, 13,9) 3,04 (d, 13,9)		MeN-4; H-5; H-15; H-19	53,27	3,50 (tl, 13,7) 2,83 (d, 13,7)
CH₃						
18	12,10	1,70 (dd, 7,0, 2,2)	H-19		12,20	1,65 (dd, 6,7, 1,9)
MeN	41,81	2,57 (s)			42,30	2,41 (s)
MeO	50,74	3,47 (s)			-	-
H-N ₁	-	9,32 (sl)			-	9,15 (sl)



Esquema 5: Interpretação mecânica dos principais fragmentos no espectro de massas da histrixnina (**53**).

Figura 79: Espectro de RMN ^{13}C (APT) a 100 MHz em CDCl_3 do alcalóide **53**.

Figura 80: Ampliação da região entre δ_C 113,0-137,0 do espectro de RMN ^{13}C (APT) a 100 MHz em CDCl_3 do alcalóide **53**.

Figura 81: Ampliação da região entre δ_C 10,0-67,0 do espectro de RMN ^{13}C (APT) a 100 MHz em CDCl_3 do alcalóide **53**.

Figura 82: Espectro de RMN ^1H (400 MHz) em CDCl_3 do alcalóide **53**.

Figura 83: Ampliação da região entre δ_H 7,6-9,5 do espectro de RMN 1H (400 MHz) em $CDCl_3$ do alcalóide **53**.

Figura 84: Ampliação da região entre δ_{H} 7,32-7,47 do espectro de RMN ^1H (400 MHz) em CDCl_3 do alcalóide **53**.

Figura 85: Ampliação da região entre δ_{H} 7,14-7,28 do espectro de RMN ^1H (400 MHz) em CDCl_3 do alcalóide **53**.

Figura 86: Ampliação da região entre δ_{H} 5,1-5,7 do espectro de RMN ^1H (400 MHz) em CDCl_3 do alcalóide **53**.

Figura 87: Ampliação da região entre δ_{H} 3,58-3,63 do espectro de RMN ^1H (400 MHz) em CDCl_3 do alcalóide **53**.

Figura 88: Ampliação da região entre δ_H 0,9-3,4 do espectro de RMN 1H (400 MHz) em $CDCl_3$ do alcalóide **53**.

Figura 89: Ampliação da região entre δ_{H} 2,62-2,74 do espectro de RMN ^1H (400 MHz) em CDCl_3 do alcalóide **53**.

Figura 90: Ampliação da região entre δ_H 1,63-1,8 do espectro de RMN 1H (400 MHz) em $CDCl_3$ do alcalóide **53**.

Figura 91: Mapa de correlação do espectro de HMQC em CDCl_3 para o alcalóide **53**.

Figura 92: Ampliação do mapa de correlação do espectro de HMQC em CDCl_3 para o alcalóide **53**.

Figura 93: Ampliação do mapa de correlação do espectro de HMQC em CDCl_3 para o alcalóide **53**.

Figura 94: Mapa de correlação do espectro de HMBC em CDCl_3 para o alcalóide **53**.

Figura 95: Ampliação do mapa de correlação do espectro de HMBC em CDCl_3 para o alcalóide **53**.

Figura 96: Ampliação do mapa de correlação do espectro de HMBC em CDCl_3 para o alcalóide **53**.

Figura 97: Ampliação do mapa de correlação do espectro de HMBC em CDCl_3 para o alcalóide **53**.

Figura 98: Ampliação do mapa de correlação do espectro de HMBC em CDCl_3 para o alcalóide **53**.

Figura 99: Espectro de massas (Inserção direta) do alcalóide **53**.

5.3. Dados físicos das substâncias isoladas

5.3.1 Affinina

Sólido castanho amorfo

Ponto de fusão: 176-191°C

IV (KBr) cm^{-1} : 3309, 2941, 1635, 1575, 1440, 1334, 1257, 1060, 746

RMN ^1H (400 MHz, $\text{MeOH-}d_4$): Tabela 14, p. 30

RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{MeOH-}d_4$): Tabela 14, p. 30

EM m/z (Int. rel): 324 (3), 306 (60), 263 (13), 152 (100)

5.3.2 Olivacina

Sólido amarelo claro amorfo

$[\alpha]_D^{20} = + 85,7$ (MeOH, 7×10^{-5} g/mL)

RMN ^1H (500 MHz, $\text{MeOH-}d_4$): Tabela 15, p. 50

RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{MeOH-}d_4$): Tabela 15, p. 50

EM m/z (Int. rel): 246 (100), 245 (35), 229 (15), 204 (16), 123 (15)

5.3.3 Affinisina

Sólido amorfo

Ponto de fusão: 248-254°C

$[\alpha]_D^{20} = + 4,36$ (MeOH, $5,04 \times 10^{-3}$ g/mL)

IV (KBr) cm^{-1} : 3361, 1452, 1384, 1325, 1253, 746

RMN ^1H (400 MHz, $\text{MeOH-}d_4$): Tabela 16, p. 65

RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{MeOH-}d_4$): Tabela 16, p. 65

EM m/z (Int. rel): 308 (42), 291 (26), 197 (20), 182 (100), 181 (41), 168 (59)

5.3.4 N_b -Metilaffinisina

Óleo castanho viscoso

$[\alpha]_D^{20} = - 5,26$ (MeOH, $3,8 \times 10^{-4}$ g/mL)

IV (KBr) cm^{-1} : 3404, 2923, 1452, 1379, 1058, 746

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): Tabela 17, p. 82

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): Tabela 17, p. 82

EM m/z (Int. rel): 323 (7), 308 (16), 293 (7), 265 (3), 183 (100)

5.3.5 Ibogamina

Sólido amorfo

Ponto de fusão: 94-99°C

$[\alpha]_D^{20} = -37,5$ (MeOH, $1,6 \times 10^{-4}$ g/mL)

IV (KBr) cm^{-1} : 3271, 2918, 1652, 1460, 1334, 744

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): Tabela 18, p. 96

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): Tabela 18, p. 96

EM m/z (Int. rel): 280 (58), 265 (7), 168 (18), 156 (22), 136 (32)

5.3.6 Histrixnina

Sólido castanho amorfo

$[\alpha]_D^{20} = -100$ (MeOH, $1,32 \times 10^{-3}$ g/mL)

IV (KBr) cm^{-1} : 3336, 1637, 1456, 1334, 1149, 746

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): Tabela 19, p. 119

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): Tabela 19, p. 119

EM m/z (Int. rel): 338 (12), 306 (98), 305 (64), 277 (9), 263 (56), 181 (9), 180 (21), 167 (22), 152 (100), 150 (30), 136 (22)

6. CONCLUSÕES

O estudo fitoquímico do extrato em metanol das cascas das raízes de *Tabernaemontana hystrix* permitiu o isolamento e a identificação de seis alcalóides indólicos monoterpênicos: affinina, affinisina, N₆-metilaffinisina, ibogamina, olivacina e histrixina.

Os alcalóides indólicos isolados possuem atividades farmacológicas variadas, destacando-se entre estes a olivacina que tem acentuada atividade antitumoral, inibindo a síntese de DNA, RNA e proteínas provavelmente por intercalação na dupla hélice do DNA e por ligação com ácidos nucleicos (SCHRIPEMA et al., 2004).

Na determinação estrutural destas substâncias foram utilizados métodos espectroscópicos de análise principalmente RMN, incluindo experimentos bidimensionais (¹H-¹H-COSY, HMQC e HMBC) o que permitiu ampliar os dados espectroscópicos da literatura.

A similaridade dos alcalóides isolados com outras espécies do gênero *Tabernaemontana* aponta uma relação quimiotaxonômica entre estas espécies e está de acordo com sua classificação com bases morfológicas.

Em relação a estudos fitoquímicos anteriores em *Tabernaemontana hystrix* publicados com a sinônimia de *Peschiera fuchsiaefolia*, foram isolados da casca do caule 15 alcalóides: 12-metoxi-4-metilvoachalotina (**28**), 12-metoxi-4-metilvoachalotina etil éster (**29**), fuchsiaefolina (**30**), normacusina (**31**), affinisina (**32**), voachalotina (**33**), 4-metilaffinisina (**34**), 4-metilvoachalotina (**35**), voacangina (**36**), ibogaína (**37**), vobasinol (**38**), perivina (**39**), 16-epiaffinina (**40**), voacanginahidroxiindolenina (**41**), e 6 alcalóides bis-indólicos: voacamina bis-indol (**42**), decarbometoxivoacamina (**43**), demetilvoacamina (**44**), voacamidina (**45**), dihidrovoacamina (**46**), e demetildihidrovoacamina (**47**) (Figura 8), nossos resultados são parcialmente coincidentes, o que pode ser justificado, pela época ou local da coleta.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.B. et al., *Biologia molecular da célula*. 3.ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. 1294 p.

ARAMBEWELA, L.S.R. and KHOUNG-HUU, F. (1981) Indole alkaloids from *Hunteria zeylanica*. *Phytochemistry* 20: 349.

ARAUJO, A.R. et al. (1984) Catharinensine, an oxindole alkaloid from *P. catharinensis*, *Phytochemistry* 33: 2359.

AZOUG, M.; LOUKACI, A.; RICHARD, B.; NUZILLARD, J.; MORETI, C.; HANROT, M.Z.; MEN-OLIVER, L. (1995) Alkaloids from stem bark and leaves of *Peschiera buchtieni*, *Phytochemistry* 39 (5): 1223-1228.

BALANDRIN, M.F.; KINGHORN D.A. *Plant-Derived Natural Products in Drug Discovery and Development in Human Medicinal Agents from Plants* (A.D. Kinghorn e M.F. Balandrin, editors), American Chemical Society-ACS Symposium Series 534, Washington-DC, 1993. p 2-12.

BEEK, T.A. et al. (1984) *Tabernaemontana* L. (Apocynaceae): A review of its taxonomy, phytochemistry, ethnobotany and pharmacology, *Journal of Ethnopharmacology* 10: 1.

BRAGA, R. M. et al. (1984) ¹³C NMR Analysis of alkaloids from *Peschiera fuchsiaefolia*, *Phytochemistry* 23: 175.

BRAGA, R. M.; e REIS, F. A. M. (1987) Quarternary alkaloids from *Peschiera fuchsiaefolia*, *Phytochemistry* 26: 833.

BREITMAIER, E.; VOELTER, W. *Carbon-13 NMR Spectroscopy: High-Resolution Methods and Applications in Organic Chemistry and Biochemistry*. 3 ed. VCH, Weinheim, 1987.

- BRUNETON, J. (traduzido por C. K. Hatton), *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants*, intercept Limited, England, **1995**.
- BUDZIKIEWICZ, H.; et al., *Mass Spectrometry of Organic Compounds*. San Francisco: Holden-Day. **1967**.
- BUCKINGHAM, J. (Ed.), *Dictionary of Natural Products*. London: Chapman & Hall, **1993**.
- CADWICK, D. and MARSH, J. (Ed.), *Bioactive compounds from plants*, New York: John Wiley, **1990**.
- COLEGATE, S.M. and MOLYNEUX, R.J. *Bioactive Natural Products: Detection, Isolation and Structural Determination*, London: CRC Press, **1993**.
- CORDELL, G.A. et al., (2001) The potential of alkaloids in drug Discovery, *Phytoterapy Research*, 15: 183.
- DANIELI, B. & PALMISANO, G., *Alkaloids from Tabernaemontana*. In: BROSSI, A. (edit) *The Alkaloids*, vol. 27, p. 1-130. New York, Academic Press, **1986**.
- DEWICK, Paul M., *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*, Paul M. Dewick p. cm. p. 5-6; **1997**.
- DIXON R.A. and LAMB, C.J., *Secondary Prodruts from Tissue Culture* (V.V. Charlowood, M.J.C. Rhodes, editors). Oxford: Oxford Science Publications, **1990**.
- FRIEBOLIN, H., *Basic One- and Two-Dimensional NMR Spectroscopy*. 2 ed. VCH, Weinheim, **1993**.
- GEISSMAN, T.A. and CROUT, D.H.G., *Organic Chemistry of secondary Plant Metabolism*, San Francisco: Freeman, Cooper & Company, **1969**.
- GUERRA, M.P.; NODARI, R.O., Biodiversidade: Aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C. M. O. e col. (org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5 ed. rev. amp. Editora da UFSC, p.13-28, **2004**.

GOTTLIEB, O.R. et al., *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., **1967**.

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

HENRIQUES, et al., Alcalóides: Generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C.M.O. e col. (org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5ed. rev. amp. Editora da UFSC, p.765-791, **2004**.

HESSE, Manfred., *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, **1981**. p. 1-26.

LAMBERT, J.B. et al., *Introduction to Organic Spectroscopy*. Macmillan Publishing Company, New York, **1987**.

LAVAUD et al. Alkaloids of *Hunteria zeylanica*. **1982**. *Phytochemistry*, 21, 445.

LEEUWENBERG, A.J.M., *A Revision of Tabernaemontana*. Vol. 2 The New Word Species and *Stemmadenia*. UK, Royal Botanic Garden Kew, **1994**.

LOUNASMAA, M. and TOLVANEN A., (**1986**) ¹H NMR data of monoterpenoid indole Alkaloids, *Heterocycles*, 24: 3229-3281.

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

MEDEIROS, W.B.L.; VIERA, I.J.C.; MATHIAS, L.; BRAZ-FILHO, R.; SCHRIPSEMA, J. (**2001**) A New Natural Quaternary Indole Alkaloid Isolated from *Tabernaemontana laeta* Mart. (Apocynaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 12 (3): 368-372.

MEDEIROS, W.B.L., Constituintes Químicos de *Tabernaemontana laeta* Mart. (Apocynaceae). *Tese de Doutorado*. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. **2003**.

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

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

OLIVEIRA, L.O., MARTINS, E.R., *O desafio das plantas medicinais brasileiras: I – O caso da poaia*. Campos dos Goytacazes: UENF, **1998**. 73p.

PIHLAJA, K.; KLEINPETER, E. *Carbon-13 NMR Chemical Shifts in Structural and Stereochemical Analysis*. VCH, Weinheim, **1994**.

SALISBURY, F.B., ROSS, C.W., *Plant Physiology*. California: Wadsworth Publishing Company, **1991**. 682p.

SANDERS, J.K.M.; HUNTER, B.K., *Modern NMR Spectroscopy: A Guide for Chemists*. 2 ed. Oxford University Press, Oxford, **1993**.

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

SCHRIPSEMA, J; DAGNINO, D.; GOSMANN, G. Alcalóides Indólicos. In: SIMÕES, C. M. O. e col. (org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5ed. rev. amp. Editora da UFSC, p.819-846, **2004**.

SHAMMA, M. and HINDENLONG, D.M., *Carbon-13 NMR Shift Assignments of Amines and Alkaloids*, New York, **1979**. Plenum Press.

SILVERSTEIN, R.M.; et al., *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. 5 ed. New York: John Wiley, **1991**.

SIUZDAK, G., *Mass Spectrometry for Biotechnology*. Academic Press, New York, **1996**.

TORSSELL, K.B.G., *Natural Products Chemistry: A mechanistic, biosynthetic and ecological approach*. 2 ed. Sweden: Kristianstads Boktryckeri AB, **1997**.

ZENK, P., The Biosynthesis of Heteroyoimbine-type Alkaloids. In: Stockigt, J. *Indole and Biogenetically Related Alkaloids Academic. Press-London New York, Toronto, Sydney, San Francisco, 1980*, p. 115-141.