

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Frederico Luiz Reis

**INVESTIGAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE
Tabernaemontana catharinensis A. DC. (APOCYNACEAE) E SUAS
POTENCIAIS ATIVIDADES ANTIMICROBIANAS**

Santa Maria, RS

2018

Frederico Luiz Reis

INVESTIGAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. (APOCYNACEAE) E SUAS POTENCIAIS ATIVIDADES ANTIMICROBIANAS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Química.**

Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Mostardeiro

Santa Maria, RS
2018

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo autor.

Reis, Frederico Luiz
INVESTIGAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE
Tabernaemontana catharinensis A. DC. (APOCYNACEAE) E
SUAS POTENCIAIS ATIVIDADES ANTIMICROBIANAS / Frederico
Luiz Reis.- 2018.
144 p.; 30 cm

Orientador: Marco Aurelio Mostardeiro
Coorientador: Ademir Farias Morel
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Química, RS, 2018

1. Tabernaemontana catharinensis 2. Alcaloide indólico
3. Atividade antimicrobiana I. Mostardeiro, Marco
Aurelio II. Farias Morel, Ademir III. Título.


Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Frederico Luiz Reis


**INVESTIGAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE
Tabernaemontana catharinensis A. DC.– (APOCYNACEAE) E SUAS
POTENCIAIS ATIVIDADES ANTIMICROBIANAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química.

Aprovado em 17 de julho de 2018:



Marco Aurelio Mostardeiro, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Ionara Irion Dalcol, Dra. (UFSM)



Vinicius Ilha, Dr. (UNIVATES)

Santa Maria, RS
2018.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Marco Aurelio Mostardeiro, meu agradecimento pela orientação, amizade e essencial contribuição na minha formação. Minha sincera gratidão!

Aos professores, Dr. Ionara Irion Dalcol, Dr.º Vinicius Ilha e Dr.º Ademir Farias Morel, pelo auxílio para a melhoria deste trabalho como membros da banca examinadora.

Aos meus pais, Glaci e Rubi por acreditarem em mim ao longo desta etapa. Meu eterno reconhecimento e admiração.

Aos meus irmãos, Jennifer e Filipe pelo apoio, carinho e paciência.

A um grande amigo em especial, Adriano F., o mais sincero agradecimento por todos os conselhos, ensinamentos, conhecimento compartilhado, orientação e principalmente pela paciência.

Em especial, Adriana, Gabriele, Sabrina, Denise que sempre se dispuseram a ajudar quando necessário. Obrigado pelo carinho e amizade.

Aos meus amigos de faculdade Josiéli, Adriano, Roberto, que sempre me apoiaram e incentivaram nos momentos difíceis.

Aos demais colegas do NPPN, obrigado pela colaboração, respeito e contribuições.

A coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Aos demais que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

RESUMO

INVESTIGAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. – (APOCYNACEAE) E SUAS POTENCIAIS ATIVIDADES ANTIMICROBIANAS

AUTOR: Frederico Luiz Reis

ORIENTADOR: Dr. Marco Aurélio Mostardeiro

A investigação fitoquímica dos extratos brutos hexânico e metanólico e suas frações, oriundas da casca do caule de *Tabernaemontana catharinensis* (Apocynaceae, conhecida popularmente como cobrina), levou ao isolamento de nove alcaloides indólicos monoterpênicos, voachalotina, affinisina, 16-epiaffinisina, voacangina, voacristina, vinpocetina, voacangina hidroxindolenina, 12-metoxi-N₄-metil voachalotina e 12-metoxi-N₄-metil-5-epi voachalotina. O alcaloide vinpocetina e 12-metoxi-N₄-metil-5-epi voachalotina são isolados pela primeira vez na família Apocynaceae. Através de uma reação de metilação de affinisina foi obtido o derivado N₄-metil affinisina. Os extratos, frações e compostos isolados apresentaram atividade antibacteriana (Gram-positivas e Gram-negativas) e antifúngica efetivas, contra as cepas testadas. O potencial inibitório dos pares de diastereoisômeros, de esqueleto corinanteano, affinisina, 16-epiaffinisina e 12-metoxi-N₄-metil-5-epivoachalotina, 12-metoxi-N₄-metil voachalotina, apresentaram valores de CIM ($1,56 \mu\text{g.mL}^{-1}$) menores que o padrão fluconazol (CIM $3,12 \mu\text{g.mL}^{-1}$), frente a cepas de fungos. A metilação do composto affinisina potencializou a inibição frente a alguns micro-organismos. Os alcaloides de esqueleto ibogano, Voacangina, Voacristina apresentaram melhores potenciais inibitórios frente a bactérias, apresentando CIM de 3,12; 12,5 e $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ frente aos micro-organismos *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* e *Salmonella typhimurium*, respectivamente, sendo igual ou próximo ao padrão cloranfenicol. A importância da estereoquímica em relação à efetividade da CIM, o que é visível nas atividades apresentadas neste trabalho. Dessa forma, o estudo fitoquímico e das atividades farmacológicas dos compostos identificados da casca do caule de *T.catharinensis* amplia os conhecimentos alusivos à quimiotaxonomia, bem como justifica seu uso antifúngico na medicina popular.

Palavra chave: *Tabernaemontana catharinensis*. Alcaloide indólico. Vinpocetina. Atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

RESEARCH OF SECONDARY METABOLITES OF *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. - (APOCYNACEAE) AND ITS POTENTIAL ANTIMICROBIAL ACTIVITIES

AUTHOR: Frederico Luiz Reis

ADVISOR: Dr. Marco Aurélio Mostardeiro

The phytochemical investigation of hexane and methanolic crude extracts and their fractions from the bark of the stem of *Tabernaemontana catharinensis* (Apocynaceae, commonly known as *cobrina*) led to the isolation of nine monoterpene indole alkaloids, voachalotin, affinisine, 16-epiaffinisine, voacangin, voacristin, vinpocetine, voacangine hydroxylindolenine, 12-methoxy-N4-methyl voachalotine and 12-methoxy-N4-methyl-5-epiquachalotine. The alkaloid vinpocetine and 12-methoxy-N4-methyl-5-epi voachalotin are isolated for the first time in the family Apocynaceae. A N-methyl affinisine derivative was obtained through an affinisine methylation reaction. The extracts, fractions and isolated compounds showed antibacterial activity (Gram-positive and Gram-negative) and effective antifungal, against the tested strains. The inhibitory potential of the pairs of diastereoisomers, corinantean skeleton, affinisine, 16-epiaffinisina and 12-methoxy-N4-methyl-5-epivoachalotine, 12-methoxy-N4-methyl voachalotine presented MIC values ($1.56 \mu\text{g.mL}^{-1}$) lower than the fluconazole standard (MIC $3.12 \mu\text{g.mL}^{-1}$) compared to fungal strains. The methylation of the affinisine compound potentiated the inhibition against some microorganisms. The ibogan skeletal alkaloids, Voacangina, and Voacristina presented better inhibitory potentials against bacteria, presenting MIC of 3.12; 12.5 and $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ against the microorganisms *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* and *Salmonella typhimurium*, respectively, being equal to or close to the chloramphenicol standard. The importance of stereochemistry in relation to the effectiveness of the MIC, which is visible in the activities presented in this paper. Thus, the phytochemical study and the pharmacological activities of the identified compounds of the stem bark of *T.catharinensis* broaden the knowledge alluding to chemotaxonomy, as well as justifying its antifungal use in folk medicine.

Keyword: *Tabernaemontana catharinensis*. indole alkaloid. Vinpocetine. Antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fotos da árvore (A), flores (B) e frutos (C) de <i>T. catharinensis</i>	22
Figura 2 – Processo biossintético para formação da strictosidina	26
Figura 3 – Classificação dos rearranjos da cadeia terpênica de strictosidina	27
Figura 4 – Principais subclasses dos alcaloides monoterpênicos.....	28
Figura 5 – Esquema biossintético do alcaloide coronaridina	29
Figura 6 – Espectro de RMN de ¹ H de Voachalotina em CDCl ₃ a 400 MHz.	52
Figura 7 – Espectro de RMN HSQC de Voachalotina em CDCl ₃ a 400 MHz.....	53
Figura 8– Expansão do espectro de RMN HSQC de Voachalotina em CDCl ₃ a 400 MHz	53
Figura 9 – Espectro de RMN COSY de Voachalotina em CDCl ₃ a 400 MHz.....	54
Figura 10– Expansão espectro de RMN COSY de Voachalotina em CDCl ₃ a 400 MHz.	55
Figura 11 – Espectro de RMN de ¹³ C de Voachalotina em CDCl ₃ a 100 MHz.....	56
Figura 12 – Espectro de RMN HMBC de Voachalotina em CDCl ₃ a 400 MHz.	56
Figura 13 – Difração de raio-X de Voachalotina.	58
Figura 14 – Espectro de RMN de ¹ H de Affinisina em CDCl ₃ a 400 MHz.	62
Figura 15 – Espectro de RMN HSQC de Affinisina em CDCl ₃ a 400 MHz.	63
Figura 16 – Expansão de espectro de RMN HSQC de Affinisina em CDCl ₃ a 400 MHz.....	63
Figura 17 – Espectro de RMN COSY de Affinisina em CDCl ₃ a 400 MHz.	64
Figura 18 – Expansão do espectro de RMN COSY de Affinisina em CDCl ₃ a 400 MHz.	65
Figura 19 – Espectro de RMN de ¹³ C de Affinisina em CDCl ₃ a 100 MHz	66
Figura 20 – Espectro de RMN HMBC de Affinisina em CDCl ₃ a 400 MHz.	66
Figura 21 – Expansão do espectro de RMN HMBC de Affinisina em CDCl ₃ a 400 MHz.	67
Figura 22 – Expansão do espectro de RMN HMBC de Affinisina em CDCl ₃ a 400 MHz.	67
Figura 23– Espectro de RMN NOESY 1D, irradiação H-3, para 22.	71
Figura 24 - Espectro de RMN NOESY 1D, irradiação H-16, para 22.....	71
Figura 25 – Espectro de RMN de ¹ H de Epiffinisina em CDCl ₃ a 400 MHz.	72
Figura 26 – Espectro de RMN HSQC de Epiaffinisina em CDCl ₃ a 400 MHz.	73
Figura 27 – Sobreposição dos espectros de ¹ H dos alcalóides 23 e 22	74

Figura 28 – Espectro de ^{13}C para Epiaffinisina, em CDCl_3 a 100 MHz.	75
Figura 29 – Espectro de RMN 2D COSY, para Epiaffinisina, em CDCl_3	76
Figura 30 - Expansão do espectro de RMN 2D COSY, para Epiaffinisina, em CDCl_3	76
Figura 31– Espectro de RMN NOESY 1D, irradiação H-3, para 23	79
Figura 32 - Espectro de RMN NOESY 1D, irradiação H-16, para 23	79
Figura 33 – Espectro de RMN de ^1H de Voacangina em CDCl_3 a 400 MHz.	81
Figura 34 – Espectro de RMN HSQC de Voacangina em CDCl_3 a 400 MHz.	81
Figura 35 – Espectro de RMN de ^{13}C de Voacangina em CDCl_3 a 100 MHz.	82
Figura 36 – Espectro de RMN COSY de Voacangina em CDCl_3 a 400 MHz.	83
Figura 37 – Expansão de espectro de RMN COSY de Voacangina em CDCl_3 a 400 MHz.	83
Figura 38– Difração de raio- X de Voacangina.	84
Figura 39 – Espectro de RMN de ^1H de Voacristina em CDCl_3 a 400 MHz.	87
Figura 40 – Espectro de RMN ^{13}C de Voacristina em CDCl_3 a 100 MHz.	88
Figura 41 – Espectro de RMN DEPT 135 de Voacristina em CDCl_3 a 100 MHz.	88
Figura 42 – Espectro de RMN de ^1H de Vinpocetina em CDCl_3 a 400 MHz.	91
Figura 43 – Espectro de RMN HSQC de Vinpocetina em CDCl_3 a 400 MHz.	91
Figura 44 – Espectro de RMN ^{13}C de Vinpocetina em CDCl_3 a 100 MHz.	92
Figura 45 – Espectro de RMN HMBC de Vinpocetina em CDCl_3 a 400 MHz.	93
Figura 46 – Expansão do espectro de RMN HMBC de Vinpocetina em CDCl_3 a 400 MHz.	93
Figura 47 – Expansão do espectro de RMN HMBC de Vinpocetina em CDCl_3 a 400 MHz.	94
Figura 48 – Espectro de RMN COSY de Vinpocetina em CDCl_3 a 400 MHz.	96
Figura 49 – Expansão espectro de RMN COSY de Vinpocetina em CDCl_3 a 400 MHz.	96
Figura 50 - Espectro de RMN NOESY 1D, irradiação H-3, para 26.	97
Figura 51 – Difração de raio-x de 26	97
Figura 52 – Espectro de RMN de ^1H de Voacangina hidrox-indolenina em CDCl_3 a 400 MHz.	99
Figura 53 – Espectro de RMN HSQC de Voacangina hidrox-indolenina em CDCl_3 a 400 MHz.	100

Figura 54 – Expansão do espectro de RMN HSQC de Voacangina hidroxí-indolenina em CDCl_3 a 400 MHz.....	100
Figura 55 – Espectro de RMN ^{13}C para Voacangina hidroxí-indolenina em CDCl_3 à 100 MHz.	101
Figura 56 – Espectro de RMN DEPT 135 de Voacangina hidroxí-indolenina em CDCl_3 à 100MHz.....	102
Figura 57 – Espectro de RMN COSY para Voacangina hidroxí-indolenina em CDCl_3 à 400 MHz.	102
Figura 58 – Espectro de RMN HMBC para Voacangina hidroxí-indolenina em CDCl_3 à 400 MHz.	103
Figura 59 – Expansão do espectro de RMN HMBC para Voacangina hidroxí-indolenina em CDCl_3 à 400 MHz.	103
Figura 60 – Espectro de RMN de ^1H de 12-Metoxi- N_4 -metil-voachalotina em CDCl_3 a 400 MHz.	107
Figura 61 – Espectro de RMN HSQC de 12-Metoxi- N_4 -metil-voachalotina em CDCl_3 a 400 MHz.....	107
Figura 62 – Expansão do espectro de RMN HSQC de 12-Metoxi- N_4 -metil-voachalotina em CDCl_3 a 400 MHz.	108
Figura 63 – Espectro de RMN ^{13}C de 12-Metoxi- N_4 -metil-5-Epivoachalotina em CDCl_3 a 100 MHz.	109
Figura 64 – Espectro de 2D COSY para 12-Metoxi- N_4 -metil-voachalotina em CDCl_3	110
Figura 65 - Espectro de RMN HMBC para 12-Metoxi- N_4 -metil-voachalotina em CDCl_3 à 400 MHz.....	110
Figura 66– Espectro de RMN NOESY 1D, irradiação H-3, para 28.	113
Figura 67– Espectro de RMN de ^1H de 12-Metoxi- N_4 -metil-5-epivoachalotina em CDCl_3 a 400 MHz.	115
Figura 68– Espectro de RMN HSQC de 12-Metoxi- N_4 -metil-5-epivoachalotina em CDCl_3	115
Figura 69 – Expansão do espectro de RMN HSQC de 12-Metoxi- N_4 -metil-5-epivoachalotina em CDCl_3 a 400 MHz.....	116

Figura 70 - Espectro de RMN ^{13}C de 12-Metoxi- N_4 -metil-5- epivoachalotina em CDCl_3 a 100 MHz	117
Figura 71 – Espectro de 2D COSY para 12-Metoxi- N_4 -metil-5-epivoachalotina em CDCl_3 à 400 MHz.....	117
Figura 72– Espectro de HMBC para 12-Metoxi- N_4 -metil-5-epivoachalotina em CDCl_3 à 400 MHz.	118
Figura 73 – Expansão do espectro de HMBC para 12-Metoxi- N_4 -metil-5-epivoachalotina em CDCl_3 à 400 MHz.	119
Figura 74– Espectro de RMN NOESY 1D, irradiação H-3, para 29.....	122
Figura 75– Espectro de RMN NOESY 1D, irradiação H-5, para 29.....	122
Figura 76 – Espectro de RMN ^1H para N_4 - Metil affinisina, em $\text{DMSO}-d_6$, à 400 MHz.....	123
Figura 77 – Espectro de RMN ^{13}C para N_4 - Metil affinisina, em $\text{DMSO}-d_6$, à 400 MHz.	124
Figura 78 – CG/MS-EM de A15.....	142
Figura 79 – CG/MS-EM de FN7	143
Figura 80 - CG/MS-EM de B08.....	144

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Micro-organismos indicadores utilizados na atividade antimicrobiana	41
Tabela 2 – Rendimento do EBM e frações ácida, neutra e básica de <i>Tabernaemontana catharinensis</i>	43
Tabela 3 – Rendimento dos extratos brutos de <i>Tabernaemontana catharinensis</i>	43
Tabela 4 – Estruturas, nomenclatura e localização dos compostos no trabalho.	49
Tabela 5 – Dados espectrais RMN 2D heteronuclear HSQC e HMBC de voachalotina.	57
Tabela 6 – Dados de RMN de ^1H da voachalotina em CDCl_3 , 400 MHz	59
Tabela 7 – Dados de RMN de ^{13}C da voachalotina em CDCl_3 , 100 MHz.....	60
Tabela 8 – Dados espectrais de RMN 2D heteronuclear HSQC e HMBC de Affinisina.	68
Tabela 9 – Dados de RMN de ^1H de Affinisina em CDCl_3 , 400 MHz.	69
Tabela 10 - Dados de RMN de ^{13}C de Affinisina em CDCl_3 , 100 MHz.....	70
Tabela 11 – Dados de RMN de ^1H de Epiaffinisina em CDCl_3 , 400 MHz.....	77
Tabela 12 – Dados de RMN de ^{13}C de Epiaffinisina em CDCl_3 , 100 MHz.....	78
Tabela 13 – Dados de RMN de ^{13}C (100 MHz), ^1H (400 MHz), de Voacangina em CDCl_3 , em comparação com dados da literatura.	85
Tabela 14 – Dados de RMN ^{13}C (100 MHz), ^1H (400 MHz) de Voacristina em CDCl_3 , em comparação com dados da literatura.	89
Tabela 15 – Dados espectrais de RMN 2D heteronuclear HSQC e HMBC de Vinpocetina.	94
Tabela 16 - Continuação da Tabela 15	95
Tabela 17 – Dados espectrais de RMN 2D heteronuclear HSQC e HMBC de Voacangina hidroxí-indolenina.....	104
Tabela 18 – Dados de RMN ^{13}C (100 MHz), ^1H (400 MHz) de Voacangina hidroxí-indolenina em CDCl_3 , em comparação com dados da literatura.	105
Tabela 19 – Dados espectrais de RMN 2D Heteronuclear HSQC e HMBC de 12-Metoxi- N_4 -metil-voachalotina.	111
Tabela 20 – Dados de RMN ^{13}C (100 MHz), ^1H (400 MHz) de 12-Metoxi- N_4 -metil-voachalotina em CDCl_3 , em comparação com dados da literatura.	112
Tabela 21 - Dados espectrais de RMN 2D Heteronuclear HSQC e HMBC para 12-Metoxi- N_4 -metil-5-epivoachalotina.....	119

Tabela 22 - Continuação Tabela 21	120
Tabela 23 – Dados de RMN ^{13}C (100 MHz), ^1H (400 MHz) de 12-Metoxi- N_4 -metil-5-epivoachalotina em CDCl_3 , e dados da literatura.	120
Tabela 24 - Continuação Tabela 23	121
Tabela 25 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C para N_4 - Metil affinisina.	125
Tabela 26 – CIM e CLM dos extratos e frações de <i>T. catharinensis</i> frente à bactérias.	127
Tabela 27 – CLM e CIM dos extratos e frações de <i>T. catharinensis</i> frente à fungos.....	128
Tabela 28 – CIM e CLM dos compostos puros isolados de <i>T. catharinensis</i> frente a bactérias.	131
Tabela 29 - CLM e CIM dos compostos puros isolados de <i>T. catharinensis</i> frente a Fungos.....	132

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Esquema de extração a quente.....	35
Esquema 2 – Esquema de extração à frio.	36
Esquema 3 – Fracionamento ácido-base-neutro	37
Esquema 4 – Reação de N-metilação do alcaloide affinisina	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

δ	Deslocamento químico
J	Constante de acoplamento
λ	Comprimento de onda
μg	Micrograma
μL	Microlitro
ATCC	American Type Culture Collection
AcOEt	Acetato de etila
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
CC	Cromatografia em Coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CIM	Concentração Inibitória mínima
CLM	Concentração Letal Mínima
COSY	Correlated Spectroscopy
^{13}C	Carbono 13
d	Dupleto
dd	Duplo Dupleto
ddd	Duplo duplo dupleto
DEPT	Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer
dt	Duplo triplete
EBM	Extrato Bruto Metanólico
EBH	Extrato Bruto Hexânico
EBC	Extrato Bruto Clorofórmio
EBAEC	Extrato Bruto Acetato de Etila
EtOH	Etanol
FAA	Fração Aquosa Ácida
FAEA	Fração Acetato de Etila Ácida
FAEB	Fração Acetato de Etila Básica
FAEN	Fração Acetato de Etila Neutra
FDA	Food and Drugs Administration
HSQC	Heteronuclear Single - Quantum Correlation
^1H	Hidrogênio
mL	Mililitro
m	Multiplete
MeOH	Metanol
MHz	Mega Hertz
mg	Miligramas

nm	Nanômetro
NPPN	Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
Pág.	Página
Ppm	Partes por milhão
PF	Ponto de Fusão
q	Quarteto
qt	Quarteto de Tripleto
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
Rf	Fator de Retenção
s	Simpleto
ssp.	Especiês
TMS	Tetrametilsilano
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
UV	Ultravioleta
t	Tripleto

Sumário

1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GERAL.....	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3. REVISÃO DA LITERATURA	21
3.1 A PLANTA	21
3.1.1 A família Apocynaceae	21
3.1.2 O gênero <i>Tabernaemontana</i>	21
3.1.3 A espécie <i>Tabernaemontana Catharinensis A. DC</i>	22
3.2 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	23
3.2.1 Alcaloides	23
3.2.1.1 Biossíntese dos Alcaloides	25
3.3 ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS.....	29
3.3.1 Atividade antimicrobiana	32
4. PARTE EXPERIMENTAL	33
4.1 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	33
4.1.1 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG/EM)	33
4.1.2 Cromatografia em coluna (CC)	33
4.1.3 Cromatografia em camada delgada (CCD)	33
4.1.4 Cromatografia em placa preparativa (CCDP)	33
4.2 REAGENTES E SOLVENTES UTILIZADOS.....	33
4.3 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ¹ H E ¹³ C	34
4.4 ANÁLISES POR ESPECTRÔMETRIA DE DIFRAÇÃO DE RAIOS-X.....	34
4.5 ANÁLISES POR ESPECTROFOTOMETRIA	34
4.6 PONTO DE FUSÃO	34
4.7 POLARÍMETRO.....	35
4.8 MATERIAL VEGETAL	35
4.9 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS.....	35
4.10 OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES ÁCIDO, BASE E NEUTRA A PARTIR DO EBM	36
4.11 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS DAS FRAÇÕES OBTIDAS.....	37
4.11.1 Extrato Bruto Hexânico (EBH)	38

4.11.2	Fração acetato de etila ácida (FAEA)	38
4.11.3	Fração acetato de etila neutra (FAEN).....	39
4.11.4	Fração acetato de etila básica (FAEB).....	39
4.12	N-METILAÇÃO DO ALCALOIDE AFFINISINA	40
4.13	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	40
4.13.1	Microorganismos e padrões utilizados	40
4.13.2	Meios de cultura	41
4.13.3	Manutenção dos microrganismos indicadores.....	41
4.13.4	Determinação da CIM e CLM.....	41
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1	RENDIMENTOS DOS EXTRATOS E FRAÇÕES	43
5.2	CARACTERIZAÇÃO DOS METABÓLITOS ISOLADOS DE <i>TABERNAEMONTANA CATHARINENSIS</i>	44
5.2.1	Discussões dos metabólitos isolados de <i>T. catharinensis</i>	51
5.2.1.1	<i>VOACHALOTINA (21)</i>	51
5.2.1.2	<i>AFFINISINA (22)</i>	61
5.2.1.3	<i>16-EPIAFFINISINA (23)</i>	72
5.2.1.4	<i>VOACANGINA(24)</i>	80
5.2.1.5	<i>VOACRISTINA (25)</i>	86
5.2.1.6	<i>VINPOCETINA (ETIL APOVINCAMINA) (26)</i>	90
5.2.1.7	<i>VOACANGINA HIDROXI-INDOLENINA (27)</i>	98
5.2.1.8	<i>12-METOXI-N₄-METIL-VOACHALOTINA (28)</i>	106
5.2.1.9	<i>12-METOXI-N₄-METIL-5-EPIVOACHALOTINA (29)</i>	114
5.2.1.10	<i>N₄-METIL-AFFINISINA (30)</i>	123
5.2	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	126
6.	CONCLUSÃO	133
7.	REFERÊNCIAS	135
8.	APÊNDICE A- Cromatogramas e espectros de Massa (CG/MS- EM)	142

1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais fazem parte da vida do homem desde seus primórdios como restaurador de saúde (SIMÕES, 2004). Antes de 1900, 80% dos medicamentos eram de origem natural, extraídos de raízes, cascas, folhas, frutos e outras partes das plantas (MCCHESENEY, 2007). Até 2010, as drogas de origem natural inseridas no mercado aproximavam-se de 48,6 %, enquanto que anticancerígenos e anti-infecciosos totalizavam dois terços derivados de produtos naturais (NEWMAN, 2012).

Nas últimas décadas, houve avanços significativos na descoberta de substâncias que apresentam atividade farmacológica de várias espécies vegetais, que contribuem para o desenvolvimento de novos fármacos (HARVEY, 2015).

No passado a fitoterapia, uso de plantas medicinais para o tratamento de enfermidades, era mais adotada pela população carente, devido à fácil disponibilidade e baixos custos. Atualmente seu uso como fonte de medicamentos é predominante em países em desenvolvimento como solução alternativa para problemas de saúde, estando bem estabelecidas em algumas culturas, como na Ásia, América Latina e África (DUARTE, 2006).

Apesar da existência de relatos antigos sobre a utilização de vegetais como alternativa terapêutica, esse conhecimento baseava-se no empirismo, ou seja, no conhecimento prático do seu uso como medicamentos. Somente no início do século passado os recursos provenientes dos produtos naturais passaram a ser estudados como instrumentos científicos, os princípios ativos começaram a ser identificados e utilizados na medicina tradicional (SIMÕES, 2004).

O Brasil possui a maior biodiversidade vegetal do planeta, contando com mais de 55 mil espécies catalogadas. Devido a esta imensa diversidade de espécies, ainda pouco estudada, desperta o interesse para o estudo de produtos naturais (CARNEIRO, 2014). Certas substâncias isoladas, ou fármacos aos quais baseiam-se, movimentam um mercado de bilhões de dólares, como a Vimblastina e a Vincristina, isoladas de *Catharanthus roseus* (PINTO, 2002). Os alcaloides Vimblastina e Vincristina contribuíram para alcançar avanços decisivos no tratamento de dois tipos de câncer, o mal de Hodgking, câncer no sistema linfático e a leucemia linfática, câncer de sangue e da medula óssea (CATRO, 2001).

Embora a flora brasileira constitua uma das principais fontes de recursos naturais, os estudos de substâncias naturais ainda são insuficientes. Dispomos de um imenso acervo natural de vegetais nos ambientes aquáticos e terrestres, um potencial químico “adormecido”

de uma magnitude desproporcional ao esforço relativamente pequeno das pesquisas desenvolvidas para o seu conhecimento e utilização (BRAZ-FILHO, 2010).

As substâncias químicas sintetizadas pelos vegetais são produtos de inúmeras reações químicas derivadas do seu metabolismo, o qual é dividido em primário e secundário. O metabolismo primário abrange processos metabólicos que desempenham papel essencial para a sobrevivência do vegetal, como por exemplo a fotossíntese, a respiração e o transporte de solutos, onde atuam principalmente aminoácidos, carboidratos e nucleotídeos. O metabolismo secundário está relacionado com a herbivoria, ataque de patógenos, estresses abióticos, como mudança de temperatura, exposição à radiação ultravioleta, níveis de luz, sendo constituídos principalmente por alcaloides, saponinas, terpenos e flavonóides (SIMÕES, 2004; WATEMAN, 2002).

O conhecimento pela medicina popular, etnofarmacologia, fornece dados importantes para novos estudos com plantas medicinais, pois estimula a investigação pelos metabólitos secundários responsáveis pelo seu uso popular.

Nesse contexto, o grupo do Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais (NPPN), coordenado pelo professor Dr. Ademir Farias Morel, vem contribuindo, não somente para a fitoquímica clássica (isolamento e determinação estrutural), mas também para a realização de trabalhos que envolvem atividade biológica de plantas que apresentam algum tipo de uso na medicina popular.

Dentre as espécies estudadas pelo grupo selecionou-se a espécie *Tabernaemontana catharinensis*, pertencente à família Apocinaceae, conhecida popularmente como cobrina, foquilha. Pesquisas com extratos de *T. catharinensis* mostraram uma série de efeitos biológicos, entre eles a atividade antioxidante (PEREIRA, 2005) e a capacidade de inibir a enzima acetilcolinesterase (ANDRADE, 2005), a presença de alcaloides indólicos monoterpênicos identificados como responsáveis pela atividade anticolinesterásica em várias espécies de *Tabernaemontana* (VIEIRA, 2008).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve por objetivo realizar o estudo químico e antimicrobiano das cascas do caule da espécie *Tabernaemontana catharinensis*, pertencente à família Apocynaceae, nativa do Rio Grande do Sul.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a extração com as cascas do caule da espécie *T. catharinensis*, coletada no interior de Salvador das Missões –RS.
- Isolar e identificar metabólitos secundários.
- Realizar atividades antimicrobianas *in vitro* dos extratos e metabólitos isolados.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 A PLANTA

3.1.1 A família Apocynaceae

A família Apocynaceae reúne aproximadamente 424 gêneros e 3700 espécies. É uma das grandes famílias do grupo das angiospermas (ENDRESS, 2000; MABBERLEY, 1997; SIMÕES, 2010; SOUZA, 2005). No Brasil estão catalogados 80 gêneros da qual fazem parte pelo menos 850 espécies, sendo 33 endêmicas do Brasil (MOREIRA, 2007; SOUZA, 2005).

As plantas pertencentes à família Apocynaceae tem como característica principal a presença do látex, estípulas geralmente ausentes, estiletos unidos no ápice formando uma cabeça ampliada, flores com prefloração contorta, e por frutos usualmente bifoliculares com sementes comosas (MOREIRA, 2007; RAPINI, 2000).

Esta família também se caracteriza por apresentar um extraordinário arranjo de metabólitos secundários, como alcaloides, flavonóides, terpenos e esteróis, com propriedades farmacológicas (NEUWIGER, 1998; NOGUEIRA, 2004; PEREIRA, 1999).

3.1.2 O gênero *Tabernaemontana*

As espécies do gênero *Tabernaemontana* foram largamente estudadas tendo sua composição química bastante definida, além da realização de diversos testes biológicos (HESSE, 1981). Os principais metabólitos secundários encontrados neste gênero são alcaloides indólicos e bis-indólicos, terpenos, esteróis e compostos fenólicos (VAN BEEK, 1984).

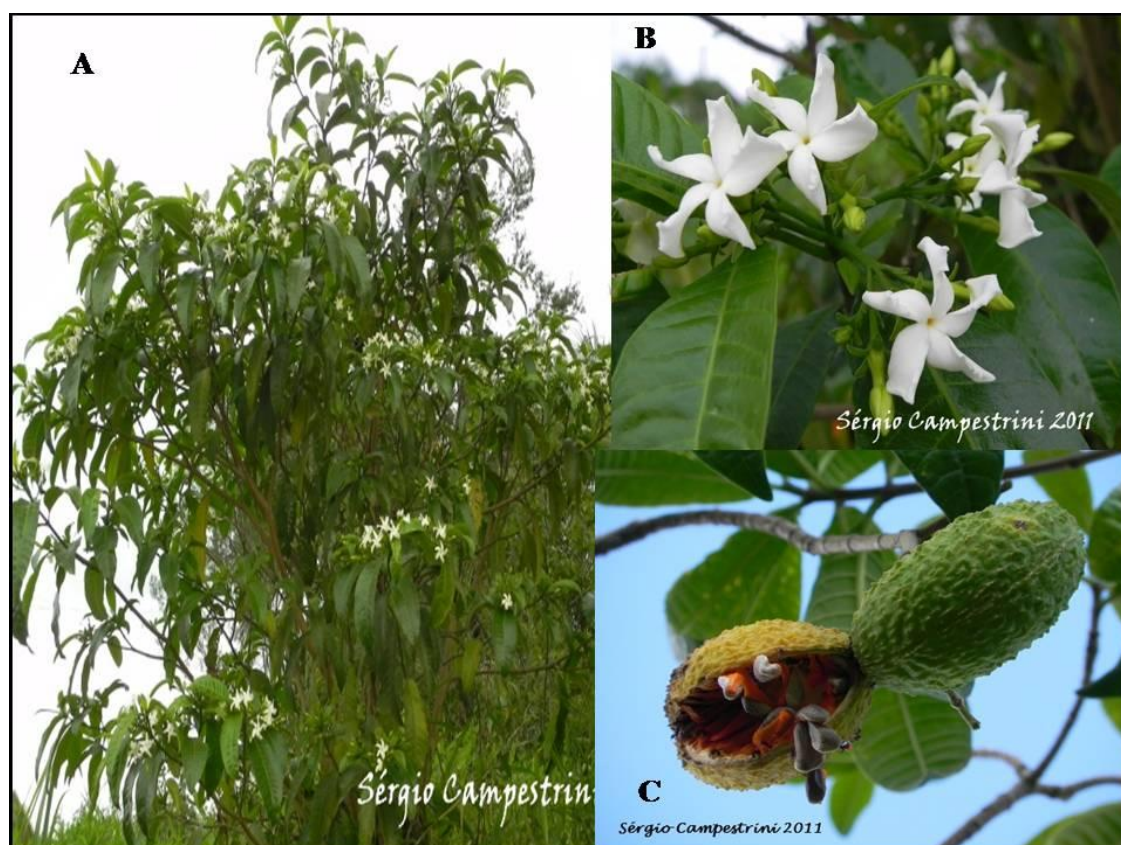
Os alcaloides têm sido os responsáveis por inúmeras atividades biológicas, como atividade antitumoral e anti-hipertensiva (PEREIRA, 2006); atividade antimicrobiana (PERERA, 1985; MUÑOZ, 1994; STEENKAMP, 2007), efeito cardiovascular (TAESOTIKUL, 1998), atividade antileishmania (MUÑOZ, 1994), anti-acetilcolinesterásica (INGKANINAN, 2006; ANDRADE, 2005; VIEIRA, 2008) atividade antiofídica (BATINA, 1997; VERONESE, 2005), antioxidante (PEREIRA, 2005), analgésica e anti-inflamatória (HENRIQUES, 1996).

3.1.3 A espécie *Tabernaemontana Catharinensis* A. DC

A espécie *T. Catharinensis* é conhecida popularmente como cobrina, leiteiro-de-vaca, e foquilha no Rio Grande do Sul. Tem como sinonímia *Peschiera Catharinensis* ADC. Esta espécie também já foi denominada de *T. affinis*, *T. australis*, *P. australis*, *T. hilariana*, *T. hydrida*, *T. acummiata*, *P. albidiflorae* *T. salicifolia* (LEEUEMBERG, 1994).

T. catharinesis é descrita como uma planta arbustiva de 0,8 a 6 m de altura, com ramos glabros, folhas estreito-lanceoladas a lanceoladas. Inflorescência terminal, cimóide corimbiforme com 5 a 6 flores. As flores com 1 cm de comprimento, albas e glabras. Frutos bifolculares, com sementes comosas (Figura 1). Esta espécie é encontrada na Bolívia, Paraguai, Argentina, Uruguai e nas regiões nordeste, centro-oeste, sudeste e sul do Brasil (MATOZINHOS E KONNO, 2011).

Figura1 – Fotos da árvore (A), flores (B) e frutos (C) de *T. catharinensis*



Fonte: Flora digital. http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=5248

Na medicina popular, *T. catharinensis* é utilizada como vermífugo, antídoto para picada de cobras, bem como para eliminar verrugas (RATES, 1993). Os estudos

farmacológicos sobre os extratos bruto têm demonstrado a sua efetiva ação antitumoral, anti-inflamatória, anticancerígena, antioxidante e analgésica (RATES, 1993).

3.2 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

A família Apocynaceae é muito conhecida pela presença de uma ampla diversidade de metabólitos secundários. Dentre eles, destacam-se os alcalóides, compostos fenólicos, terpenos, e esteróis (VAN BEEK, 1984).

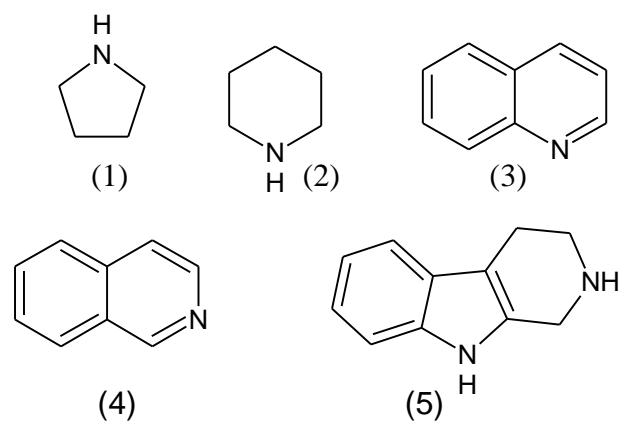
Muitos desses compostos possuem atividades biológicas comprovadas, de grande importância farmacológica (PEREIRA, 2005; ANDRADE, 2005; VIEIRA, 2008) despertando o interesse cada vez maior na investigação fitoquímica dessa família.

3.2.1 Alcaloides

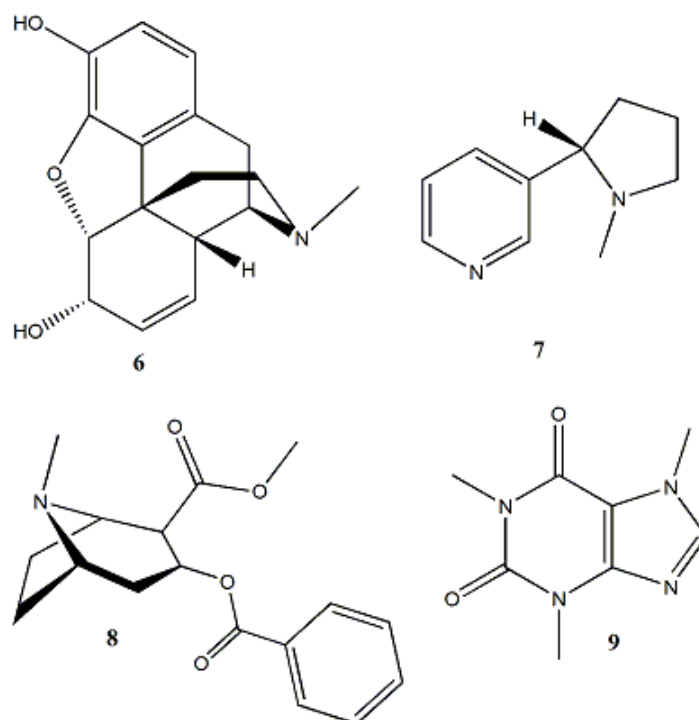
Alcaloides são compostos orgânicos nitrogenados com caráter alcalino, que possuem na sua maioria propriedades farmacológicas ativas. Podem ser encontrados em todas as partes do vegetal, principalmente, nos tecidos com crescimento ativo, células epidérmicas, bainhas vasculares e vasos lactíferos (SIMÕES, 2004).

Nas plantas os alcalóides atuam como agentes venenosos, protegendo-as de insetos e herbívoros, auxiliam na detoxificação da planta, são substâncias de reservas, capazes de fornecer nitrogênio ou outros elementos necessários a planta (SIMÕES, 2004).

Os alcalóides são constituídos por um ou mais átomos de nitrogênio, estando presentes tipicamente como aminas primárias, secundárias ou terciárias. O grau de basicidade varia muito, dependendo da estrutura do composto e dos demais grupos funcionais presentes. Os alcalóides são classificados de acordo com a natureza de parte da estrutura, a qual contém o nitrogênio, como por exemplo, pirrolidínicos (1), piperidínicos (2), quinolínicos (3), isoquinolínicos (4), indólicos (5), entre outros. A complexidade estrutural desses compostos rapidamente expande o número de subdivisões (DEWICK, 1997).



Em 1805 foi isolado o primeiro alcalóide, do ópio (*Papaver somniferum*) a morfina (6). Em 1848, no Rio de Janeiro, o farmacêutico Ezequiel Correia dos Santos isolou o alcalóide pereirina, das cascas do pau-pereira (*Geissospermum laeve*) (PINTO, 2002). Entre outros alcalóides conhecidos, destacam-se a nicotina (7), presente nas folhas do fumo (*Nicotiana tabacum*) e a cocaína (8), presente nas folhas da coca (*Erythroxylon coca*), a cafeína (9), presente nas sementes do café (NEUWINGER, 1998).



3.2.1.1 Biossíntese dos Alcaloides

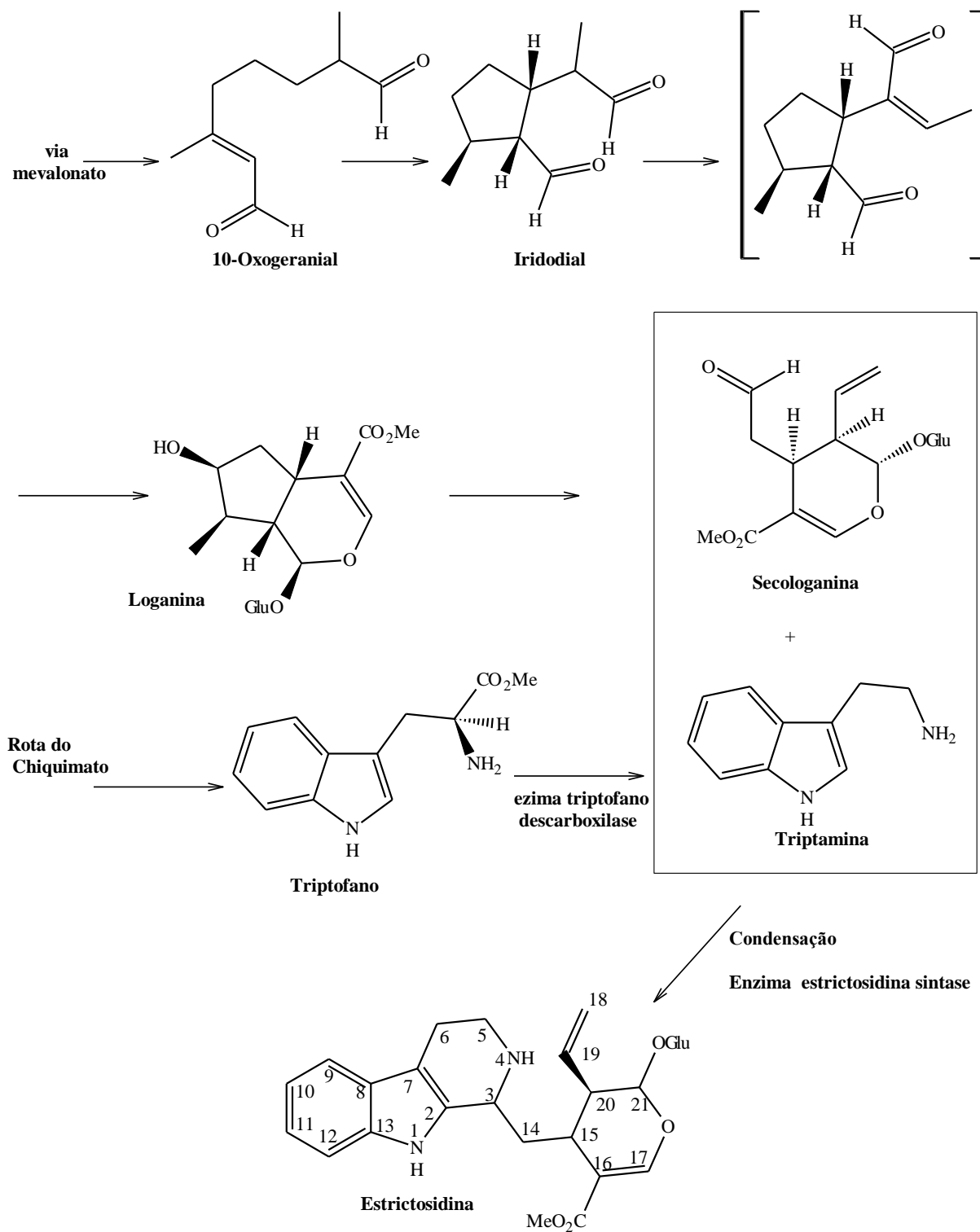
Os alcaloides são biossintetizados a partir do metabolismo dos aminoácidos alifáticos (ornitina e lisina) e dos aminoácidos aromáticos (fenilalanina e tirosina). São também incorporadas outras unidades provenientes da rota do chiquimato, ou da rota do fosfato desoxixilulose (CORDEL, 1981).

Os alcaloides indólicos monoterpênicos, majoritários em *Tabernaemontana*, possuem a mesma rota biossintética, sendo que todos são derivados de rearranjos do precursor estrictosidina (BRUNETON, 1995; HERBERT, 2001). Na figura 2, observa-se o processo biossintético para formação da estrictosidina.

Através da rota do chiquimato via ácido antranílico obtem-se o triptofano, que é convertido em triptamina pela enzima triptofano descarboxilase (WINK, 2010; DEWICK, 1997; CORDEL, 1981). Secologanina é formada a partir do monoterpene geraniol obtido pela via de mevalonato (DEWICK, 1999; SIMÕES, 2004).

A estrictosidina é um alcaloide glicosilado formado pela condensação de uma molécula de triptamina, com secologanina, sendo catalisada pela enzima estrictosidina sintase (BRUNETON, 1995; DAGNINO, 1994). Quando ocorre a eliminação da glicose e os rearranjos, leva a formação de classes distintas de alcaloides (VAN BEEK, 1984; BRUNETON, 1995).

Figura 2 – Processo biossintético para formação da estrictosidina



Fonte: Adaptado de BRUNETON, 1995.

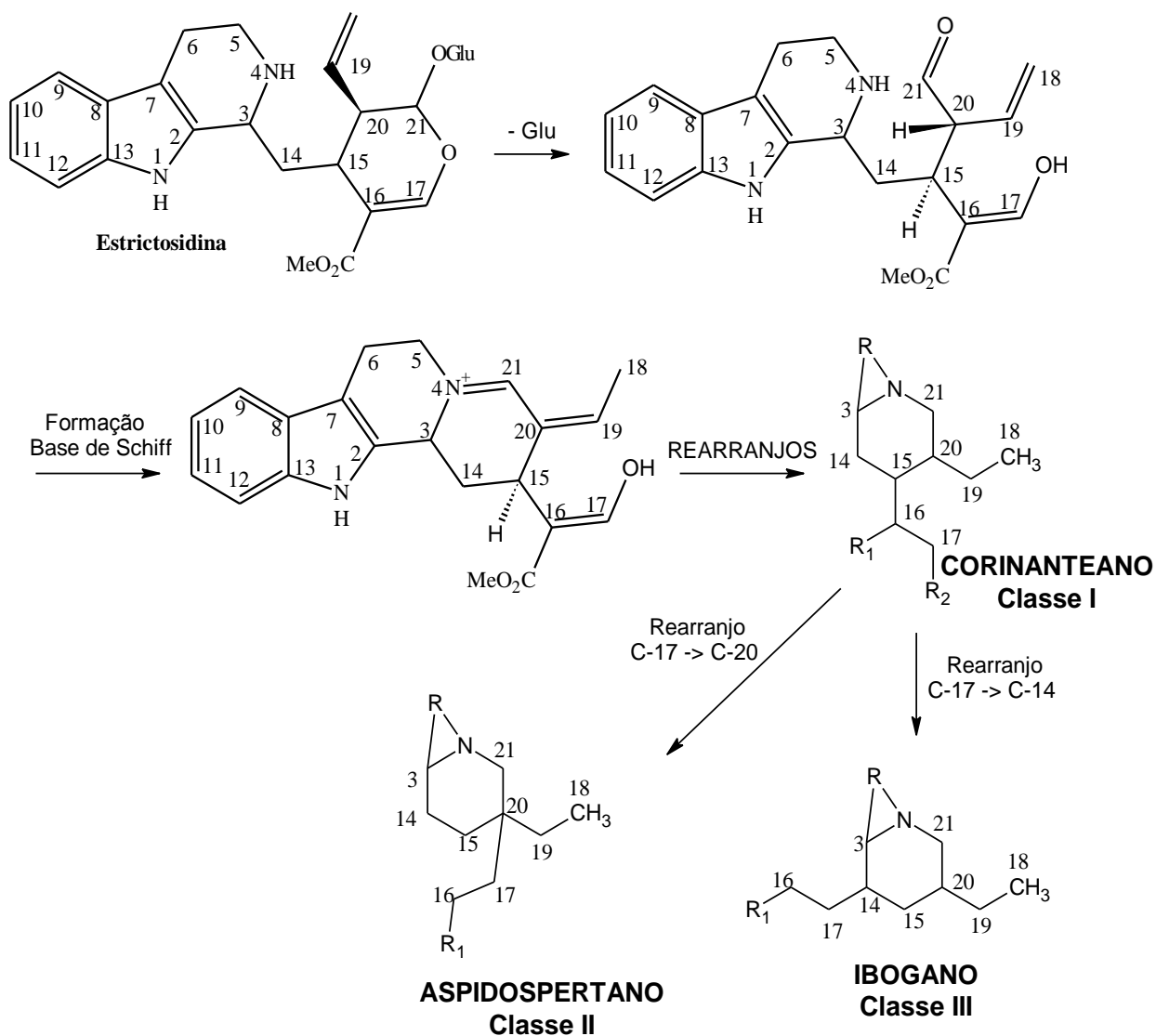
Baseado na biogênese é possível classificar estes alcalóides em três classes (Figura 3), (BRUNETON, 1995):

Classe I – unidade monoterpêica não sofre rearranjos (esqueleto corinanteano e estriquinano);

Classe II – Unidade monoterpêica sofre rearranjo em C-17 e C-20 (esqueleto aspidospermano);

Classe III – Unidade monoterpêica sofre rearranjo em C-17 e C-14 (esqueleto ibogano);

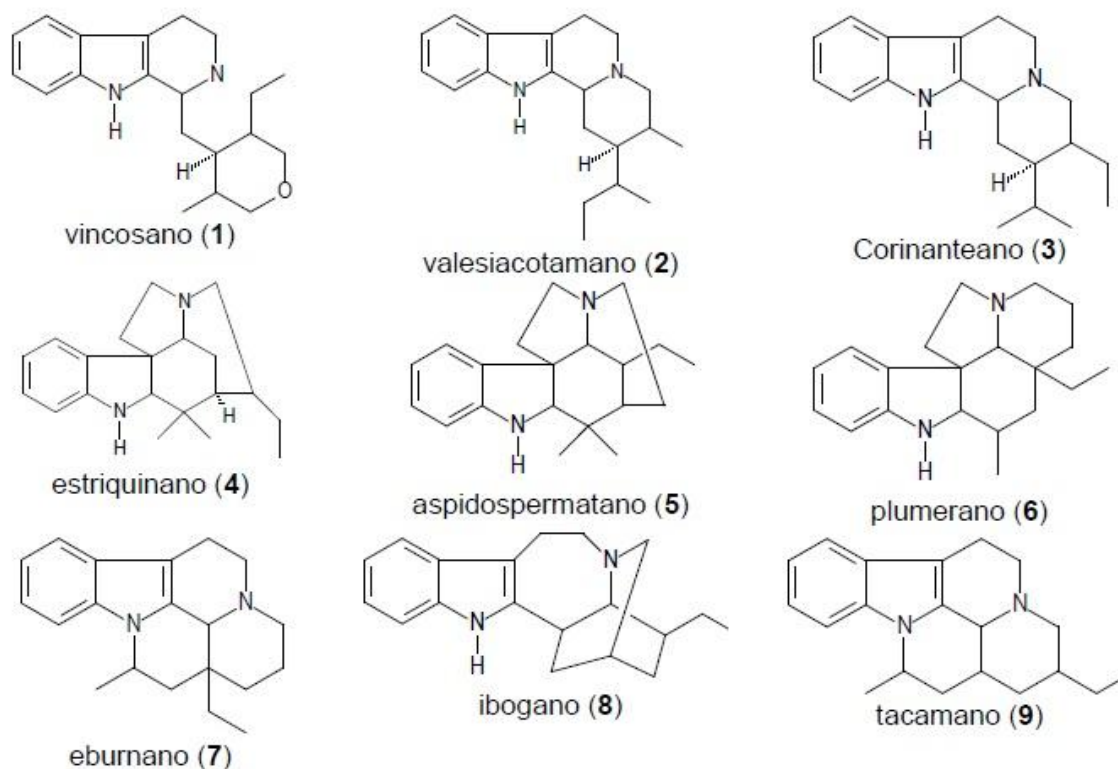
Figura 3 – Classificação dos rearranjos da cadeia terpêica de strictosidina



Fonte: adaptado de BRUNETON, 1995.

Estas classes são subdivididas em nove subclasses principais, dependendo das características de seus esqueletos: vincosano (1), valesiacotamano (2), corinanteano (3), estriquinano (4), aspidoespermatano (5), plumerano (6), eburnano (7), ibogano (8) e tacamano (9) (Figura 4), (DANIELI & PALMISANO, 1986).

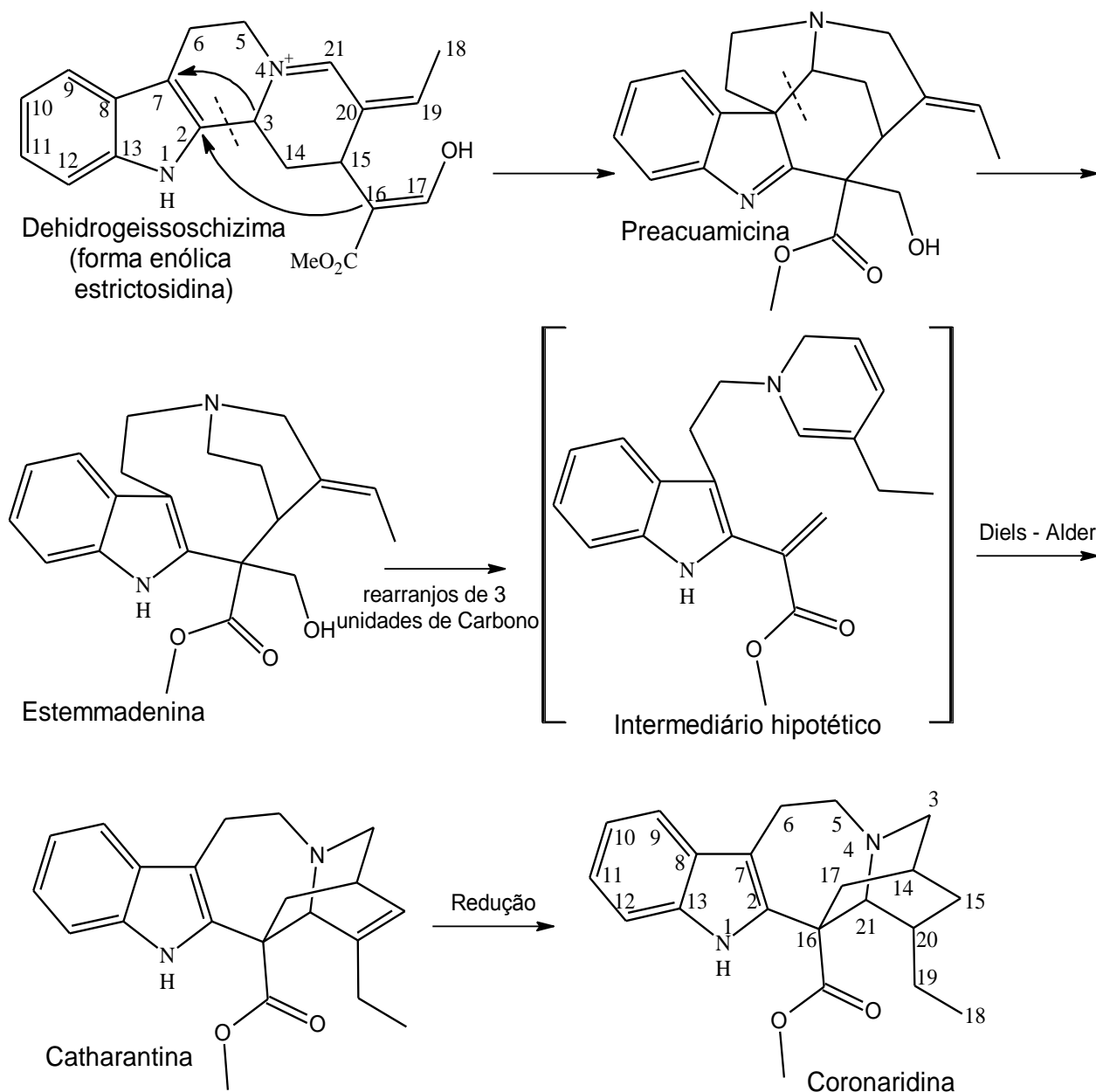
Figura 4 – Principais subclasses dos alcaloides monoterpênicos



Fonte: Adaptado de DANIELI & PALMISANO, 1986.

Os rearranjos estruturais envolvidos na conversão do esqueleto do tipo Corinanteano (Classe I) para os esqueletos Aspidoespermatano (Classe II) e Ibogano (Classe III) são bastante complexos e estão esquematizados de forma resumida, representando alguns alcaloides intermediários precoces na biossíntese do alcaloide Ibogano Coronaridina, figura 5 (DEWICK, 1997).

Figura 5 – Esquema biossintético do alcaloide coronaridina

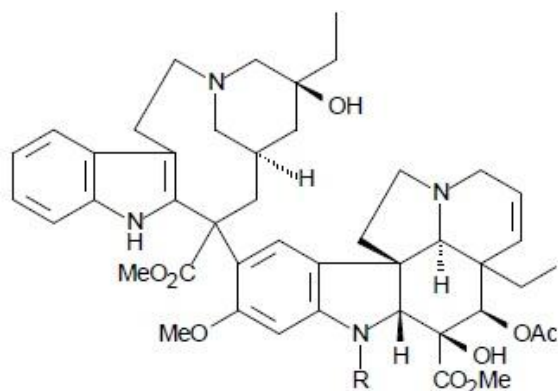


Fonte: Adaptado de DEWICK, 1997.

3.3 ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS

Na medicina moderna, substâncias extraídas de espécies de Apocynaceae são de uso corrente. Como por exemplo, vimblastina (**10**) e vincristina (**11**), produzidos pela *Vinca minor* (*Catharanthus roseus*), possuem acentuada ação antimetabólica. Quando expostos as células cancerígenas, a ação destes alcaloides causa o desaparecimento do fuso mitótico e, com o rompimento temporário dos microtúbulos do fuso, matam preferencialmente as células que se dividem de forma anormal. Essas drogas antimetabólicas são amplamente utilizadas no

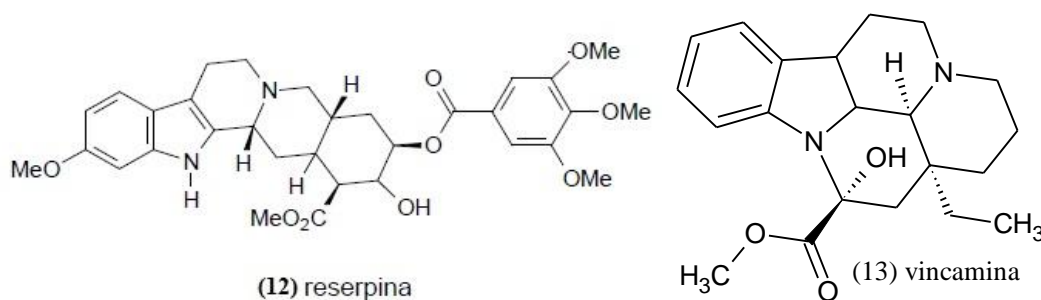
tratamento de câncer (ALBERTS, 1997), do tipo doença de Hodgkin e leucemia aguda (RAPINI, 2000).



(10) vimblastina: (R=CHO)

(11) vincristina: (R=CH₃)

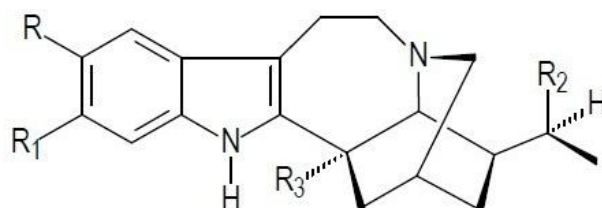
O alcaloide reserpina (12) (*Rauvolfia serpentina*) é usado como droga anti-hipertensiva e tranquilizante (SCHMELLER, 1998), enquanto que a vincamina (13) (*Catharanthus roseus*) aumenta o fluxo sanguíneo no cérebro (RAPINI, 2000; PEREIRA, 2003).



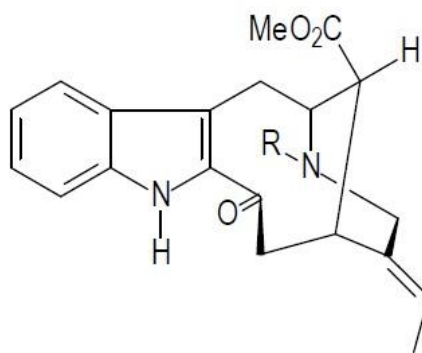
(12) reserpina

(13) vincamina

Vários alcalóides indólicos isolados de *Tabernaemontana* têm sido investigados farmacologicamente: ibogaina (14), ibogamina (15), coronaridina (16), voacangina (17), isovoacangina (18), voacristina (19), vobasina (20) apresentam atividade estimulante do Sistema Nervoso Central (ANDRADE, 2005; VIEIRA, 2008).



- ibogaina (14) R = MeO, R₁ = R₂ = R₃ = H
 ibogamina (15) R = R₁ = R₂ = R₃ = H
 coronaridina (16) R = R₁ = R₂ = H, R₃ = CO₂Me
 voacangina (17) R = MeO, R₁ = R₂ = H, R₃ = CO₂Me
 isovoacangina (18) R₁ = MeO, R = R₂ = H, R₃ = CO₂Me
 voacristina (19) R = MeO, R₂ = OH, R₁ = H, R₃ = CO₂Me



vobasina (20) R = Me

Os extratos de *T. catharinensis* foram testados em relação a suas atividades antimicrobianas frente a bactérias Gram-positivas e Gram negativas, onde foram obtidos resultados eficazes contra os micro-organismos *S.aureus*, *Micrococcus sp.*, *E. faecalis*, *B. subtilis*; *P. mirabilis*, *Aeromonas sp.*, *S. cerevisiae*, *C. neoformans* e *A. fumigatus*, respectivamente (CATRELL, 2001; PALLANT, 2012; BOLIGON, 2015).

Alguns alcaloides isolados de *T. catharinensis* possuem forte atividade antibacteriana já relatada, dentre eles destacam-se a conoduramina, coronaridina, voacamina, ibogamina e voacangina (VAN BEEK, 1984; RASTOGI, 1998; PEREIRA, 2008).

Estudos anteriores com extratos da casca do caule e da raiz de *T. catharinensis* relataram a capacidade de inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) (NICOLA, 2013). São relatadas atividades de inibição enzimática seletiva e reversível da AChE (CHATTIKORN, 2007). Esses resultados corroboram pesquisas anteriores que mencionaram o potencial anticolinesterásico dos alcaloides indólicos encontrados em *T. catharinensis* e a possibilidade do uso destes compostos para estudos envolvendo o tratamento de doenças neurodegenerativas (ANDRADE, 2005; VIEIRA, 2008).

3.3.1 Atividade antimicrobiana

Devido ao aparecimento de novos agentes infecciosos e aumento da resistência dos micro-organismos aos antibióticos, faz-se necessário a pesquisa por novos compostos com atividades antimicrobianas (DUARTE, 2006; VALGAS, 2007; OSTROSKY, 2008).

Os processos infecciosos, causados por micro-organismos, destacam-se no panorama de doenças oportunistas (ARAUJO, 2004). Como exemplo, a bactéria *Staphylococcus aureus*, patógeno responsável pelas infecções em ferimentos, é um dos mais comuns em infecções hospitalares (PONZI, 2010). Outro patógeno responsável por infecções em indivíduos imunocomprometidos é o gênero *Candida* (DUARTE, 2006).

Tendo em vista a necessidade de encontrar novos compostos com ação antimicrobiana para a cura dessas infecções, busca-se através do isolamento de metabólitos secundários de plantas, constituintes químicos que possuam atividades farmacológicas ativas.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

4.1.1 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG/EM)

Os espectros de massas de baixa resolução (EM) foram obtidos em um espectrômetro utilizando ionização por impacto de elétrons (EI) à 70 eV (Departamento de Química – Universidade Federal de Santa Maria).

4.1.2 Cromatografia em coluna (CC)

Para as análises em cromatografia em coluna utilizou-se sílica tipo gel F60 240-400 mesh (SILICYCLER), para fase estacionária, em colunas de diferentes diâmetros internos, e para fase móvel utilizou-se sistemas gradientes de solventes.

4.1.3 Cromatografia em camada delgada (CCD)

A técnica de cromatografia em camada delgada foi realizada em cromatoplasmas de folhas de alumínio (SILICYCLER) como suporte e sílica gel F60 com 0,25 mm de espessura, como fase estacionária.

As cromatoplasmas foram reveladas através do uso da lâmpada ultravioleta ($\lambda = 240$ e 400 nm (Spectroline), reativo de Dragendorff para a revelação de alcalóides. Borrifamento com solução EtOH/H₂SO₄ a 5%, seguida de tratamento térmico foi usada para revelação dos demais metabólitos.

4.1.4 Cromatografia em placa preparativa (CCDP)

As placas cromatográficas preparativas foram confeccionadas em lâminas de vidro (20 cm X 20 cm), recobertas de sílica gel 60 UV 254 nm (Macherey - Nagel) e ativadas em forno a 100 °C, por 24 horas.

4.2 REAGENTES E SOLVENTES UTILIZADOS

Os reagentes e solventes (Vetec, Synth e Neon) utilizados eram de qualidade PA e, aqueles de grau comercial foram secos e purificados por técnicas específicas de destilação. As secagens foram realizadas mediante uso de óxido de cálcio (CaO), refluxo e destilação.

4.3 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^1H E ^{13}C

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais (COSY, HSQC, DEPT 135°) foram obtidos de um Espectrômetro Bruker Avance 400 III, operando a 399,97 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , do departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria.

Para a preparação das amostras, utilizou-se quantidades entre 3-20 mg de amostra em 0,5 mL de solventes deuterados em tubos de 5 mm, a saber: clorofórmio (CDCl_3); metanol (CD_3OH) e dimetilsulfóxido (DMSO-d_6). Os deslocamentos químicos (δ) foram registrados em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) foram calculadas em Hertz (Hz). Para a calibração dos espectros ^1H e ^{13}C utilizou-se como referencia interna o TMS (δ 0,00 ppm), CDCl_3 (δ 77,00 ppm), CD_3OH (δ 49,05 ppm) e DMSO-d_6 (δ 39,5 ppm).

Os espectros 1D e 2D Homonuclear (^1H - ^1H COSY-45) e 2D Heteronuclear (^1H - ^{13}C HSQC) e (^1H - ^{13}C HMBC) foram realizados conforme os parâmetros de aquisição fornecidos pelo aparelho e plotados pelo software TOPSPIN-NMR 3.2 da Bruker.

4.4 ANÁLISES POR ESPECTRÔMETRIA DE DIFRAÇÃO DE RAIOS-X

Os dados das medidas cristalográficas foram obtidos em difratômetro Bruker X8 Kappa-Apex II CCD de propriedade do departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria, UFSM. As estruturas foram resolvidas com auxílio do programa SHELXS-2013 e suas representações gráficas cristalinas foram realizadas através do uso dos programas DIAMOND e ORTEP.

4.5 ANÁLISES POR ESPECTROFOTOMETRIA

Para as leituras de microplacas empregadas na avaliação das atividades biológicas utilizou-se espectrofotômetro SpectraMax M2 e SoftMax Pro 5.4.1 (Molecular Devices Inc., USA), operando em 620 nm e 25 °C para os testes antimicrobianos.

4.6 PONTO DE FUSÃO

Para a determinação do ponto de fusão (PF.) das substâncias, foi utilizado um aparelho MQAPF-301 Digital da Micro-Química.

4.7 POLARÍMETRO

Para a determinação da rotação ótica ($[\alpha]_D$) das substâncias, foi utilizado um aparelho polarímetro automático Rudolph Research Analytical Autopol I.

4.8 MATERIAL VEGETAL

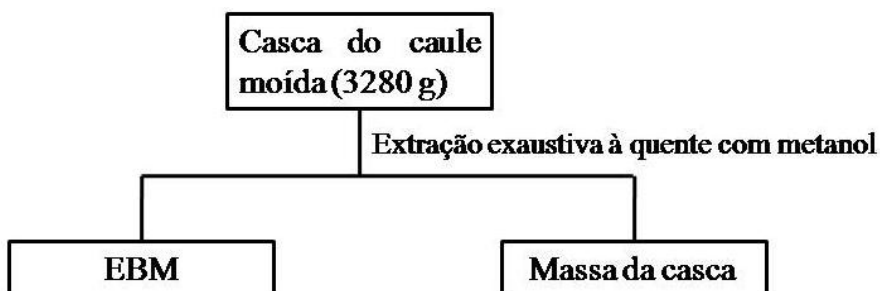
As cascas do caule de *Tabernaemontana catharinensis* foram coletadas no mês de dezembro de 2016, no interior do município de Salvador das Missões (28° 07' 35" S; 54° 50' 07" W). A identificação botânica desta espécie foi realizada pelo professor Dr. Renato Zachia, do departamento de Biologia da UFSM, a qual consta em uma exsicata no Herbário da Universidade Federal de Santa Maria sob o número de registro SMDB 16567.

4.9 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS

As cascas do caule (10 Kg) foram secas por uma semana em estufa de ar circulante a 50 °C, e moídas a fino grão (4,280 Kg) em moinho Willey.

Para a extração à quente (Esquema 1), utilizou-se 3,280 Kg do material vegetal seco e moído. A extração foi realizada em balão de fundo redondo de 5 L, acoplado um condensador, contendo o material vegetal seco e moído imerso em quantidade suficiente de metanol (3 L). O processo de extração procedeu em ciclos de 6 h/dia durante 30 dias, rendendo um resíduo escuro e viscoso (586,3 g), denominado extrato bruto metanólico (EBM). Ao final de cada ciclo de extração, o material era filtrado, e rotavaporado, o solvente era reutilizado para a extração.

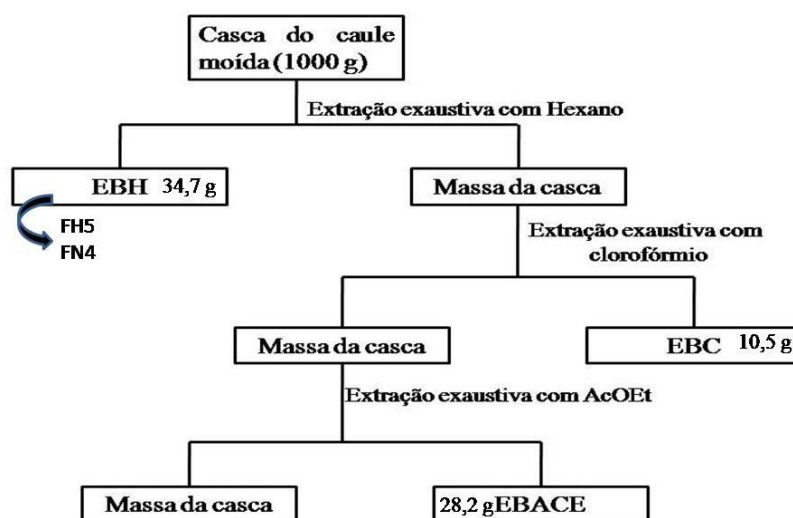
Esquema 1 – Esquema de extração a quente



Para a extração à frio (Esquema 2), utilizou-se 1 Kg do material vegetal seco e moído, sendo este colocado em um balão de fundo redondo de 5 L, imerso em solvente. A extração

exaustiva se deu em ordem crescente de polaridade dos solventes determinados, hexano, clorofórmio e acetato de etila, respectivamente. Desta forma, foi realizada a extração com cada um dos solventes, filtrando o material, e rotaevaporando o solvente, obtendo-se os extratos brutos hexano (EBH) (34,7 g), clorofórmio (EBC) (10,5 g) e acetato de etila (EBACE) (28,2 g).

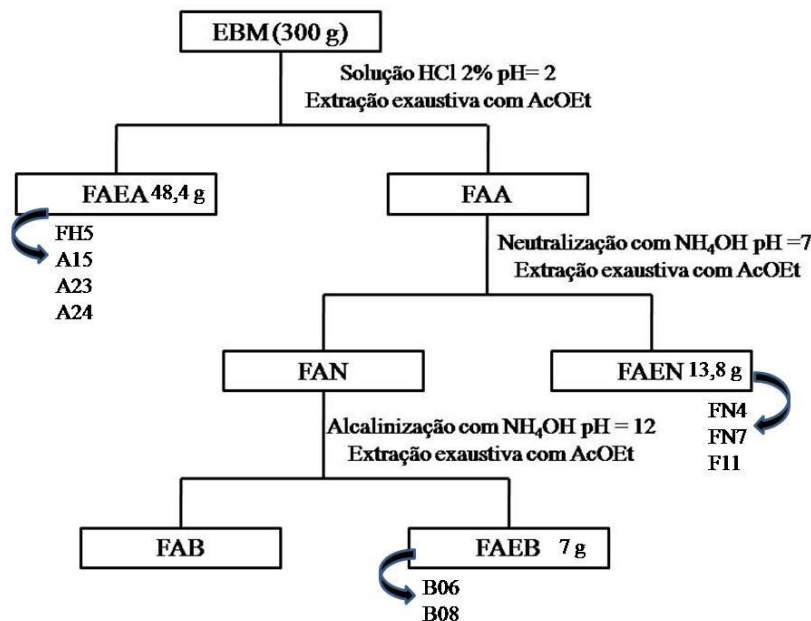
Esquema 2 – Esquema de extração à frio.



4.10 OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES ÁCIDO, BASE E NEUTRA A PARTIR DO EBM

O extrato bruto metanólico de *T. Catharinensis* foi dividido em duas partes, onde 300 g se destinaram ao sistema de extração ácido-base (Esquema 3) e o restante foi reservado para análises posteriores. Tal fracionamento foi realizado com a finalidade de se verificar a presença de alcaloides, utilizando como base a metodologia descrita por Guida (2003).

Esquema 3 – Fracionamento ácido-base-neutro



No fracionamento ácido-base, o EBM foi solubilizado em solução de ácido clorídrico (HCl) 2% e transferido para um funil de extração, o pH foi corrigido para próximo de 2, utilizando solução 3 mol/L de HCl. Em seguida, o extrato bruto aquoso ácido foi tratado com acetato de etila (AcOEt), gerando duas frações: aquosa ácida (FAA) e acetato de etila ácida (FAEA).

A fração aquosa remanescente (FAA) foi neutralizada com solução de hidróxido de amônio (NH₄OH) até pH 7 e extraída exhaustivamente com AcOEt, gerando duas frações: aquosa neutra (FAN) e AcOEt neutra (FAEN). A FAN foi alcalinizada com solução de NH₄OH até pH 12 e extraída exhaustivamente com AcOEt, obtendo-se a fração AcOEt básica (FAEB).

Após cada extração, efetuou-se a evaporação do solvente em evaporador rotatório para obtenção das frações secas AcOEt ácida (FAEA), neutra (FAEN) e básica (FAEB), as quais foram analisadas por coluna cromatográfica. Através de CCD, foi comprovada a presença de alcaloides em todas as frações, frente ao reativo de Dragendorff.

4.11 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS DAS FRAÇÕES OBTIDAS

De cada fração obtida dos extratos, o solvente foi removido e o respectivo resíduo seco foi retomado em clorofórmio e/ou metanol para análises em cromatografia em camada delgada (CCD). Os respectivos sistemas de eluentes se constituíam de gradientes de misturas de solventes a fim de se obter o melhor sistema de isolamento dos compostos e determinação de seus respectivos fatores de retenção (R_fs). As manchas das cromatoplasmas foram reveladas

em lâmpada ultravioleta (UV) de 254 nm e 365 nm para visualização de substâncias fluorescentes, com aplicação de reativo de Dragendorff para a identificação da presença de alcalóides. Solução EtOH/H₂SO₄ a 5%, seguida de tratamento térmico, foi o método utilizado para revelação dos demais metabólitos.

Após a realização das atividades antimicrobianas iniciais, foram trabalhados os extrato e as frações que apresentaram os melhores potenciais de inibição frente a fungos e bactérias testados: EBH, FAEA, FAEN e FAEB.

4.11.1 Extrato Bruto Hexânico (EBH)

O extrato bruto hexânico (4 g) foi cromatografada em coluna, empregando sílica gel F60 (Silicycle) 240-400 mesh como fase estacionária e mistura de hexano/acetato de etila num gradiente crescente de polaridade, como fase móvel. Foram coletadas frações e seus solventes removidos em evaporador rotatório. Cada fração foi analisada individualmente por CCD e reunidas conforme suas similaridades. A maioria das frações mostrou ser composta por misturas. Essas frações foram submetidas a novos processos de purificação, através de cromatografias em colunas ou placas preparativas.

O sistema de eluente usado nas CCs foi o mesmo utilizado no acompanhamento das CCDs. Quando necessário, um novo sistema de eluentes foi proposto para as análises em CCDs.

Desta forma conseguiu-se isolar dois alcaloides FH5 (**24**) e FN4 (**25**), com sistemas de eluentes a 85:15 e 80:20 (hexano:acetato de etila) respectivamente. Os alcaloides serão descritos posteriormente.

4.11.2 Fração acetato de etila ácida (FAEA)

A fração acetato de etila ácida (4 g) foi cromatografada em coluna, empregando sílica gel F60 (Silicycle) 240-400 mesh como fase estacionária e mistura de acetato de etila/metanol num gradiente crescente de polaridade, como fase móvel. Foram coletadas frações e seus solventes removidos em evaporador rotatório. Cada fração foi analisada individualmente por CCD e reunidas conforme suas similaridades. A grande parte das frações mostrou ser composta por misturas. Essas frações foram submetidas a novos processos de purificação, através de cromatografias em colunas ou placas preparativas.

O sistema de eluente usado nas CCs foi o mesmo utilizado no acompanhamento das CCDs. Quando necessário, um novo sistema de eluentes foi proposto para as análises em CCDs.

Desta forma conseguiu-se isolar quatro alcaloides FH5 (**24**), A15 (**26**), A23 (**27**) e A24 (**28**) com sistemas de eluentes a 85:15, 80:20, 70:30 e 60:40 (acetato de etila: metanol) respectivamente. Os alcaloides serão descritos posteriormente.

4.11.3 Fração acetato de etila neutra (FAEN)

A fração acetato de etila neutra (4 g) foi cromatografada em coluna, empregando sílica gel F60 (Silicycle) 240-400 mesh como fase estacionária e mistura de clorofórmio/metanol num gradiente crescente de polaridade, como fase móvel. Foram coletadas frações e seus solventes removidos em evaporador rotatório. Cada fração foi analisada individualmente por CCD e reunidas conforme suas similaridades. A grande parte das frações mostrou ser composta por misturas. Essas frações foram submetidas a novos processos de purificação, através de cromatografias em colunas ou placas preparativas.

O sistema de eluente usado nas CCs foi o mesmo utilizado no acompanhamento das CCDs. Quando necessário, um novo sistema de eluentes foi proposto para as análises em CCDs.

Desta forma conseguiu-se isolar três alcaloides FN4 (**25**), FN7 (**22**) e F11 (**21**) com sistemas de eluentes a 90:10, 90:10 e 85:15 (clorofórmio: metanol) respectivamente. Os alcaloides serão descritos posteriormente.

4.11.4 Fração acetato de etila básica (FAEB)

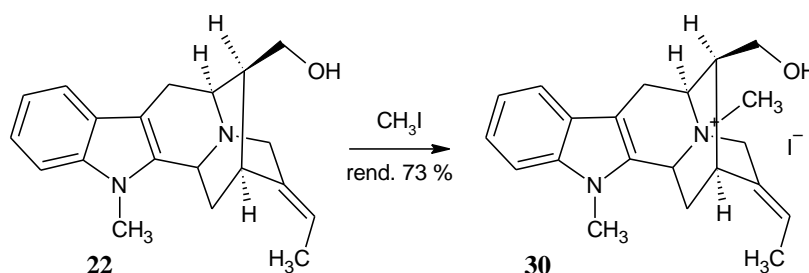
A fração acetato de etila básica (4 g) foi cromatografada em coluna, empregando sílica gel F60 (Silicycle) 240-400 mesh como fase estacionária e mistura de clorofórmio/metanol num gradiente crescente de polaridade, como fase móvel. Foram coletadas frações e seus solventes removidos em evaporador rotatório. As frações foram analisadas individualmente por CCD e reunidas conforme suas similaridades. A grande parte das frações mostrou ser composta por misturas. Essas frações foram submetidas a novos processos de purificação, através de cromatografias em colunas ou placas preparativas.

O sistema de eluente usado nas CCs foi o mesmo utilizado no acompanhamento das CCDs. Quando necessário, um novo sistema de eluentes foi proposto para as análises em CCDs.

Desta forma conseguiu-se isolar os alcaloides B06 (**29**) e B08 (**23**) com sistemas de eluentes a 80:15 e 80:20 (clorofórmio: metanol), respectivamente. Os alcaloides serão descritos posteriormente.

4.12 N-METILAÇÃO DO ALCALOIDE AFFINISINA

Esquema 4 – Reação de N-metilação do alcaloide affinisina



Em um balão de fundo redondo foi adicionado o alcaloide affinisina (**22**) (0,09 mmol/ 30 mg) e acetona 5 mL. O sistema foi submetido à agitação magnética para solubilização total de **22**, após foram adicionados 0,18 mmol de iodeto de metila (CH_3I). A reação foi acompanhada por CCD, e mantida sob agitação suave até o consumo total do material de partida (30 min). Após o solvente foi rotavaporado, seco em bomba de vácuo e submetido à análises de RMN, confirmando a formação de **30**.

4.13 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A atividade antimicrobiana foi realizada pelo método de microdiluição em caldo e a análise das placas de 96 poços foi realizada por espectrofotometria, no comprimento de onda de 620nm. Os resultados são expressos em função da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração letal mínima (CLM), os ensaios microbiológicos foram realizados na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

4.13.1 Microrganismos e padrões utilizados

Para os ensaios microbiológicos, utilizaram-se cepas padrão da American Type Culture Collection (ATCC), constituídas de microrganismos gram-positivos, gram-negativos e fungos, conforme a Tabela 1. Como antibióticos-padrões foram utilizados Cloranfenicol para bactérias e Fluconazol para fungos, preparados conforme as normas da FDA (Food and Drug Administration, 1991).

Tabela 1 – Micro-organismos indicadores utilizados na atividade antimicrobiana

Microorganismos (ATCC)		
Gram-negativos	Gram-positivos	Fungos
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (27853)	<i>Bacillus cereus</i> (11778)	<i>Candida albicans</i> (44373)
<i>Shigella flexneri</i> (12022)	<i>Enterococcus</i> (6589)	<i>Candida parapslosis</i> (22018)
<i>Morganella morganii</i> (25829)	<i>Staphylococcus aureus</i> (25923)	<i>Candida krusei</i> (6258)
<i>Escherichia coli</i> (25922)	<i>Enterobacter aerogenes</i> (13048)	<i>Candida tropicalis</i> (750)
<i>Shigella sonnei</i> (25931)	<i>Bacillus subtilis</i> (19659)	<i>Cryptococcus neoformans</i> (28952)
<i>Salmonella enthricha</i> serovar typhimurium (14028)		<i>Cryptococcus gatti</i> (56990)
<i>Salmonella enteritidis</i> (13076)	<i>Enterococcus faecalis</i> (19433)	<i>Candida dubliniensis</i> (MYA- 577)
<i>Klebsiella pneumonia</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Candida glabrata</i> (2001)
<i>Salmonella enteritidis</i>		<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (26010)

4.13.2 Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados foram o Caldo de caseína de soja (5g de cloreto de sódio, 2,5 g de dextrose, 2,5 g de fosfato dibásico de potássio, 17g de peptona de caseína, 3g de peptona de soja e 1L de água destilada) para bactérias e o Caldo Sabouraud dextrosado (40 g de dextrose, 5 g de peptona de carne, 5 g de peptona de caseína e 1L de água destilada) para os fungos.

4.13.3 Manutenção dos microrganismos indicadores

As cepas dos microrganismos indicadores foram armazenadas em tubos de ensaio inclinado contendo 5 - 8 mL de ágar nutriente para bactérias ou ágar sabouraud para fungos em geladeira. Os repiques foram realizados de 24 a 48 horas antes de cada análise.

4.13.4 Determinação da CIM e CLM

A efetividade antimicrobiana de uma substância é frequentemente descrita em termos de sua concentração inibitória mínima (CIM), a menor concentração da substância que tem a capacidade de inibir totalmente o crescimento de um microrganismo selecionado.

Os ensaios de microdiluição em caldo foram realizados em placas de cultura estéreis de 96 micropoços, utilizando-se a técnica modificada do NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Nesta técnica, cada poço foi inoculado com os

microrganismos na concentração de 1×10^6 células viáveis e posteriormente, as amostras a serem testadas foram adicionadas no primeiro poço seguindo-se a diluição em série das mesmas, de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$. As placas foram incubadas por 24 horas a $35\text{-}37^\circ\text{C}$ para os ensaios antibacterianos e por 48 horas a $25\text{-}27^\circ\text{C}$, para os antifúngicos. Após o período de incubação, foi realizada a leitura das placas por meio do uso de fluorímetro, em 620 nm para a verificação da CIM ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

Os testes foram realizados em triplicata, sendo realizada a análise dos padrões (Cloranfenicol e Fluconazol) simultaneamente.

As culturas dos microrganismos que não apresentaram crescimento ou foram inibidas no método CIM, foram inoculadas novamente utilizando-se $10 \mu\text{L}$ de cada uma das soluções presentes nos poços do teste anterior e $90 \mu\text{L}$ de um novo meio de cultura líquido apropriado para cada classe de microrganismo. A concentração Letal Mínima (CLM) é considerada a menor concentração de substância capaz de aniquilar 99,9% das unidades formadoras de colônia (UFC).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção serão apresentados os resultados e a discussão do estudo fitoquímico realizado com os extratos, frações e metabólitos isolados da casca do caule da espécie *Tabernaemontana catharinensis*, bem como a avaliação das atividades biológicas dos mesmos. As estruturas químicas dos metabólitos isolados foram estabelecidas com base na interpretação de dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais, difração de Raio-X, comparação com dados da literatura.

5.1 RENDIMENTOS DOS EXTRATOS E FRAÇÕES

Os rendimentos obtidos do extrato bruto metanólico (EBM) e dos fracionamentos ácido, base e neutro, em relação ao EBM utilizado no fracionamento (300g) e à planta moída, estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 – Rendimento do EBM e frações ácida, neutra e básica de *Tabernaemontana catharinensis*.

Frações	Quantidades obtidas (g)	% em relação ao extrato bruto	% em relação à planta moída
EBM	586,3	-	17,87
FAEA	48,4	16,13	1,47
FAEN	13,8	4,6	0,42
FAEB	7,0	2,33	0,21

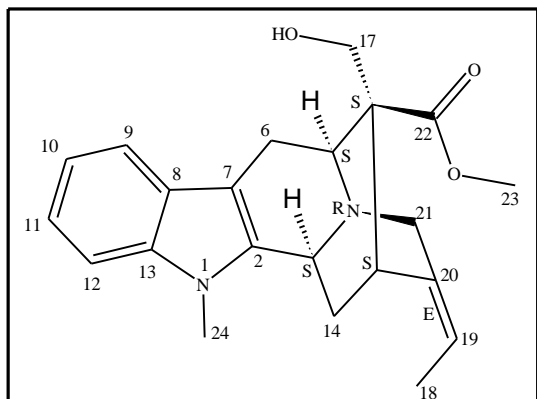
Rendimentos obtidos dos extratos brutos, em relação à planta moída, estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 – Rendimento dos extratos brutos de *Tabernaemontana catharinensis*.

Frações	Quantidades Obtidas (g)	% em relação à planta moída
EBH	34,7	3,47
EBC	10,5	1,05
EBACE	28,2	2,82

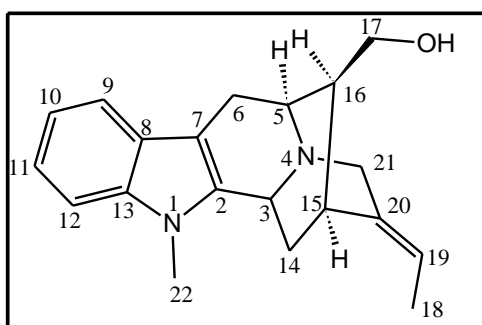
5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS METABÓLITOS ISOLADOS DE *Tabernaemontana catharinensis*

Voachalotina (21): 355 mg, sólido cristalino amarelo, PF: 186- 188 °C, $[\alpha]_D = -2,9^\circ$ (c 0,8, CHCl_3 , 25°C), [Lit. $[\alpha]_D = -2,6^\circ$ (c 0,8; CHCl_3 , 25°C) (ZHOU, 2006)].



RMN ^1H a 400 MHz, CDCl_3 : δ 7,38 (1H, dt, $J = 7,9; 0,8$ Hz, H-9), 7,20 (1H, dt, $J = 8,1; 0,8$ Hz, H-12), 7,10 (1H, ddd, $J = 8,2; 7,1; 1,2$ Hz, H-11), 7,00 (1H, ddd, $J = 7,9; 7,1; 1,0$ Hz, H-10), 5,2 (1H, qt, $J = 7,0; 2,0$ Hz, H-19), 4,16 (1H, d, $J = 6,4$ Hz, H-5), 4,03 (1H, dd, $J = 10,6; 3,4$ Hz, H-3), 3,63 (3H, s, H-23), 3,54 (1H, m, H-17), 3,57 (1H, m, H-21), 3,52 (3H, s, H-24), 3,51 (1H, m, H-21'), 3,45 (1H, m, H-17'), 3,11 (1H, t, $J = 3,0$ Hz, H-15), 2,99 (1H, dd, $J = 16,5; 6,4$ Hz, H-6), 2,84 (1H, dd, $J = 16,3; 0,81$ Hz, H-6'), 2,12 (1H, s, -OH), 1,87 (1H, ddd, $J = 14,9; 7,9; 2,6$ Hz, H-14), 1,67 (1H, ddd, $J = 14,9; 7,9; 3,6$ Hz, H-14'), 1,52 (3H, dt, $J = 6,9; 1,9$ Hz, H-18). RMN de ^{13}C a 100 MHz, em CDCl_3 : δ 176,4 (C-22), 138,4 (C-13), 137,2 (C-2), 136,3 (C-20), 126,1 (C-8), 121,0 (C-11), 118,9 (C-10), 118,3 (C-9), 116,1 (C-19), 108,7 (C-12), 104,9 (C-7), 63,1 (C-17), 55,9 (C-21), 53,6 (C-5), 53,3 (C-16), 52,1 (C-23), 47,9 (C-3), 30,3 (C-15), 29,2 (C-24), 28,3 (C-14), 22,3 (C-6), 12,7 (C-18).

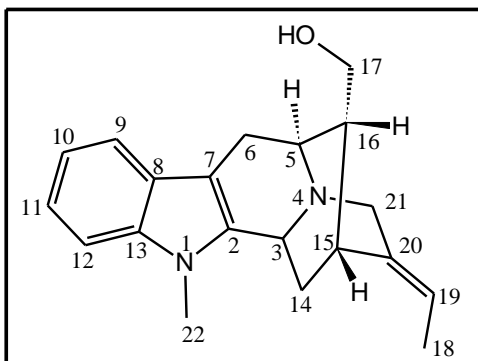
Affinisina (22): 300 mg, sólido castanho, PF: 189-191 °C; $[\alpha]_D = -33^\circ$ (c 0,08, MeOH, 25°C), [LIT.: PF: 191-193°C (ACHENBACH, 1966)]; CG-MS/EM: 308 m/z.



RMN ^1H a 400 MHz, CDCl_3 : δ 7,38 (1H, d, $J = 7,8$ Hz, H-9), 7,26 (1H, d, $J = 8,3$ Hz, H-12), 7,17 (1H, ddd, $J = 8,1; 7,5; 1,2$ Hz, H-11), 7,06 (1H, ddd, $J = 7,8; 7,0; 0,9$ Hz, H-10), 5,33 (1H, qt, $J = 6,7; 1,8$ Hz, H-19), 4,20 (1H, dd, $J = 10,0; 1,7$ Hz, H-3), 3,61 (1H, m, H-21'), 3,57 (3H, s, H-22), 3,49 (1H, m, H-21), 3,42 (2H, m, H-17), 3,04 (1H, dd, $J = 15,5; 5,1$ Hz, H-6'), 2,76 (1H, t, $J = 6,4$ Hz, H-5), 2,69 (1H, s, H-15), 2,61 (1H, d, $J = 15,4$ Hz, H-6), 2,08 (1H, t, $J = 11,5$ Hz, H-14'), 1,73 (1H, q, $J = 7,1$ Hz, H-16), 1,5 (1H, dt, $J = 6,7; 1,9$ Hz, H-18), 1,56 (1H, m, H-14). RMN de ^{13}C a 100 MHz, em CDCl_3 : δ 138,8 (C-2), 137,2 (C-13), 134,7 (C-20), 127,1 (C-8), 120,9 (C-11), 118,8 (C-10), 118,1

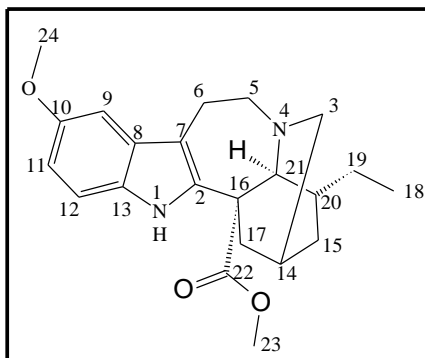
(C-9), 117,0 (C-19), 108,7 (C-12), 103,4 (C-7), 64,7 (C-17), 55,8 (C-21), 54,5 (C-5), 49,3 (C-3), 44,0 (C-16), 32,5 (C-14), 29,2 (C-22), 27,2 (C-15), 26,8 (C-6) 12,7 (C-18).

16-Epiaffinisina (23): 5,6 mg, sólido amarelo claro, PF:180-182 °C; $[\alpha]_D = -18,4^\circ$ (c 0,8, MeOH, 25°C), Lit. $[\alpha]_D = -14,04^\circ$ (c 0,5; MeOH, 25°C) (YU, 2003)]. CG-MS/EM: 308 m/z.



RMN ^1H a 400 MHz, CDCl_3 : δ 7,45 (1H, dt, $J = 7,7$; 1,0 Hz, H-9), 7,28 (1H, dt, $J = 8,0$; 1,0 Hz, H-12), 7,17 (1H, ddd, $J = 9,2$; 8,1; 1,2 Hz, H-11), 7,07 (1H, ddd, $J = 8,8$; 7,7; 1,0 Hz, H-10), 5,41 (1H, qt, $J = 7,0$; 2,0 Hz, H-19), 4,20 (1H, dd, $J = 9,8$; 2,4 Hz, H-3), 3,63 (3H, s, H-22) 3,60 (2H, m, H-21), 3,55 (1H, m, H-17'), 3,49 (1H, dd, $J = 10,6$; 8,3 Hz, H-17), 3,05 (1H, dd, $J = 15,3$; 4,8 Hz, H-6'), 2,82 (1H, m, H-15), 2,79 (1H, d, $J = 6,2$ Hz, H-5), 2,62 (1H, dd, $J = 15,3$; 1,2 Hz, H-6), 2,07 (1H, ddd, $J = 12,2$; 10,2; 2,3 Hz, H-14'), 1,80 (1H, m, H-16), 1,68 (1H, m, H-14), 1,60 (1H, dt, $J = 7,0$; 1,9 Hz, H-18). RMN de ^{13}C a 100 MHz, em CDCl_3 : δ 139,6 (C-2), 137,3 (C-13), 136,2 (C-20), 127,4 (C-8), 120,8 (C-11), 118,8 (C-10), 118,0 (C-9), 116,5 (C-19), 108,7 (C-12), 103,6 (C-7), 65,1 (C-17), 56,3 (C-21), 54,2 (C-5), 49,4 (C-3), 44,3 (C-16), 33,0 (C-14), 29,3 (C-22), 27,6 (C-15), 27,0 (C-6) 12,7 (C-18).

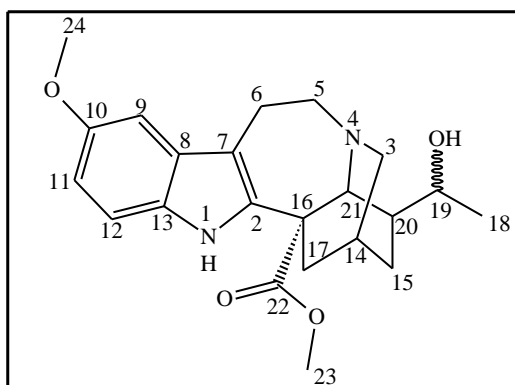
Voacangina (24): 120 mg, sólido amarelo cristalino, PF:125-127 °C[Lit: PF: 128-130 (SANTOS, 2009)]; $[\alpha]_D = -23,9^\circ$ (c 0,1; CHCl_3 , 25°C), [Lit. $[\alpha]_D = -23,8^\circ$ (c 1,8; CHCl_3 , 25°C) (GOWER, 1986)]



RMN ^1H a 400 MHz, CDCl_3 : δ 7,74 (1H, s, N-H), 7,12 (1H, dd, $J = 8,7$; 0,4 Hz, H-12), 6,92 (1H, d, $J = 2,4$ Hz, H-9), 6,79 (1H, dd, $J = 8,6$; 2,4 Hz, H-11), 3,83 (3H, s, H-24), 3,70 (3H, s, H-23), 3,54 (1H, s, H-21) 3,38 (1H, m, H-5'), 3,19 (1H, m, H-5), 3,15 (1H, m, H-6'), 2,97 (1H, m, H-6), 2,91 (1H, m, H-3'), 2,80 (1H, dt, $J = 10,0$; 6,9 Hz, H-3), 2,58 (1H, dd, $J = 11,6$; 0,9 Hz, H-17'), 1,90 (1H, dd, $J = 4,2$; 2,9 Hz, H-17), 1,86 (1H, m, H-14), 1,72 (1H, m, H-15'), 1,57 (1H, m, H-19'), 1,43 (1H, m, H-19), 1,26 (1H, m, H-20), 1,12 (1H, m, H-15), 0,89 (3H, t, $J = 7,4$ Hz, H-18). RMN de ^{13}C a 100 MHz, em CDCl_3 : δ 175,7 (C-22),

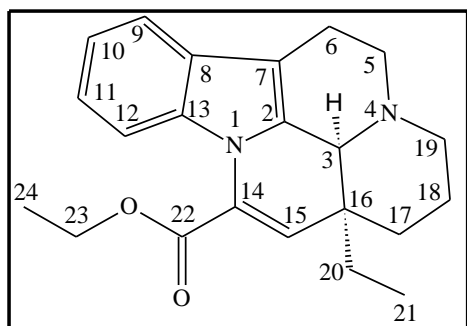
154,0 (C-10), 137,6 (C-2), 130,6 (C-13), 129,2 (C-8), 111,8 (C-11), 111,0 (C-12), 110,1 (C-7), 100,9 (C-9), 57,4 (C-21), 56,0 (C-24), 55,2 (C-16), 53,1 (C-5), 52,5 (C-23), 51,6 (C-3), 39,1 (C-20), 36,5 (C-17), 32,0 (C-15), 27,4 (C-14) 26,8 (C-19), 22,2 (C-6), 11,6 (C-18).

Voacristina (25): 13 mg, sólido amarelo, PF:122-124 °C, [Lit: PF: 119.1- 121.1 °C (LEMOS, 1996)]



RMN ^1H a 400 MHz, CDCl_3 : δ 7,71 (1H, s, N-H), 7,08 (1H, dd, $J = 8,7; 0,5$ Hz, H-12), 6,84 (1H, d, $J = 2,4$ Hz, H-9), 6,75 (1H, dd, $J = 8,74; 2,46$ Hz, H-11), 4,09 (1H, m, H-19), 3,79 (1H, m, H-5'), 3,77 (3H, s, H-24) 3,66 (3H, s, H-23), 3,41 (1H, s, H-21), 3,12- 2,90 (4H, m, H-3', H-5, H6, H-6'), 2,74 (1H, dt, $J = 10,5; 1,7$ Hz, H-3), 2,52 (1H, dt, $J = 15,7; 1,9$ Hz, H-17'), 1,97-1,80 (3H, m, H-14, H-17, H-15'), 1,48 (1H, m, H-15), 1,39 (1H, m, H-20), 1,03 (3H, d, $J = 6,42$ Hz, H-18). RMN de ^{13}C a 100 MHz, em CDCl_3 : δ 174,8 (C-22), 154,1 (C-10), 136,5 (C-2), 130,5 (C-13), 128,8 (C-8), 112,3 (C-12), 111,3 (C-11), 109,5 (C-7), 100,6 (C-9), 71,3 (C-19), 59,0 (C-24), 56,0 (C-23), 54,0 (C-16), 53,0 (C-21), 52,3 (C-5), 51,2 (C-3), 39,4 (C-20), 36,9 (C-17), 26,6 (C-14) 22,8 (C-15), 21,5 (C-6), 20,3 (C-18).

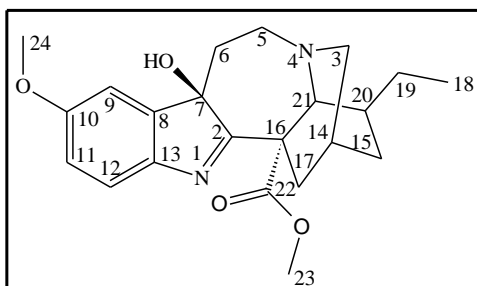
Vinpocetina (Etil apovincamina) (26): 20mg, sólido amarelo, PF: 201-203 °C; $[\alpha]_D = 127,6^\circ$ (c 0,14, CHCl_3 , 25°C); Lit. [PF: 204-206 °C, (SÁPI, 1990)]. CG-MS/EM: 350 m/z;



RMN ^1H a 400 MHz, CDCl_3 : δ 7,45 (1H, dd, $J = 6,8; 1,9$ Hz, H-9), 7,23 (1H, dd, $J = 7,6; 1,4$ Hz, H-12), 7,15 (1H, m, H-11), 7,11 (1H, m, H-10), 6,10 (1H, s, H-15), 4,41 (2H, m, H-23'; H-23), 4,19 (1H, s, H-3), 3,34 (1H, dd, $J = 13,9; 6,0$; Hz, H-5'), 3,24 (1H, m, H-5), 3,02 (1H, m, H-6'), 2,61 (2H, dd, $J = 8,90; 2,78$ Hz, H-19), 2,49 (1H, ddd, $J = 16,1; 4,8; 2,3$ Hz, H-6), 1,91 (2H, m, H-20), 1,69 (1H, m, H-18'), 1,50 (1H, dt, $J = 16,4; 2,8$ Hz, H-17'), 1,38 (3H, t, $J = 7,2$ Hz, H-24), 1,38 (1H, m, H-18), 1,08 (3H, t, $J = 7,6$ Hz, H-21), 1,03 (1H, m, H-17). RMN de ^{13}C a 100 MHz, em CDCl_3 : δ 163,5 (C-22), 134,0

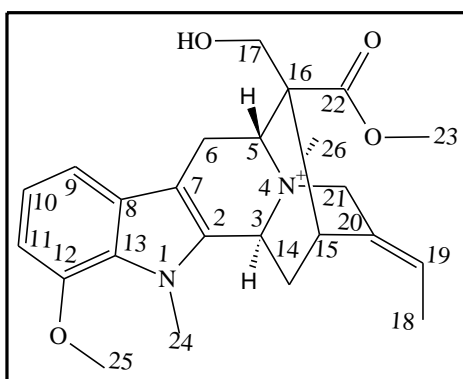
(C-13), 131,0 (C-2), 129,0 (C-8), 128,4 (C-14), 127,9 (C-15), 121,7 (C-11), 120,1 (C-10), 118,1 (C-9), 112,5 (C-12), 108,6 (C-7), 61,7 (C-23), 55,7 (C-3), 51,4 (C-5), 44,9 (C-19), 37,7 (C-16), 28,7 (C-17), 27,3 (C-20), 20,3 (C-18), 16,3 (C-6), 14,1 (C-24), 8,7 (C-21).

Voacangina hidroxindolenina (27): 2,8 mg, sólido amarelo, PF: 135-137 °C; $[\alpha]_D = -24,3^\circ$ (c 0,04; CHCl_3 , 25°C). [Lit. PF: 129-132 °C; $[\alpha]_D = -23,1^\circ$ (c 1,2; CHCl_3 , 25°C) (GOWER, 1986)].



RMN ^1H a 400 MHz, CDCl_3 : δ 7,35 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-12), 6,90 (1H, d, $J = 2,5$ Hz, H-9), 6,80 (1H, dd, $J = 8,3; 2,5$ Hz, H-11), 3,81 (3H, s, H-24), 3,77 (1H, s, H-21), 3,70 (3H, s, H-23), 3,59 (1H, s, OH) 3,49 (1H, ddd, $J = 15,3; 14,9; 3,7$ Hz H-5'), 2,96 (1H, ddd, $J = 14,8; 14,7; 4,5$ Hz, H-5), 2,73 (2H, d, $J = 1,7$ Hz, H-3), 2,70 (1H, d, $J = 14,5$ Hz, H-17'), 2,48 (1H, dd, $J = 13,7; 4,5$ Hz, H-17), 1,92 (3H, m, H-6; H-14), 1,77 (1H, m, H-15'), 1,43 (3H, m, H-19; H-20), 1,10 (1H, m, H-15), 0,86 (3H, t, $J = 6,8$ Hz, H-18). RMN de ^{13}C a 100 MHz, em CDCl_3 : δ 186,8 (C-2), 173,8 (C-22), 159,1 (C-10), 144,8 (C-13), 144,4 (C-8), 121,3 (C-12), 113,7 (C-11), 107,9 (C-9), 88,3 (C-7), 58,6 (C-16), 58,5 (C-21), 55,7 (C-24), 53,1 (C-23), 49,1 (C-5), 48,6 (C-3), 37,6 (C-20), 34,5 (C-17), 34,2 (C-6), 32,1 (C-15) 27,0 (C-14), 26,5 (C-19), 11,5 (C-18).

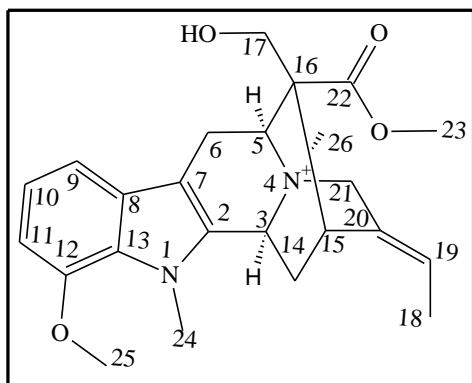
12-Metoxi-N₄-metil-voachalotina (28): 16,7 mg, sólido amarelo, $[\alpha]_D = -64, 5^\circ$ (c 0,8; CHCl_3 , 25°C), [Lit. $[\alpha]_D = -65,6^\circ$ (c 6,7; CHCl_3 , 25°C) (GOWER, 1986)]



RMN ^1H a 400 MHz, CDCl_3 : δ 7,04 (2H, m, H-10, H-9), 6,69 (1H, dd, $J = 6,5; 2,0$ Hz, H-11), 6,20 (1H, d, $J = 10,7$ Hz, H-3), 5,41 (1H, qt, $J = 6,8; 1,8$ Hz, H-19), 5,31 (1H, d, $J = 15,9$ Hz, H-21'), 4,75 (1H, d, $J = 6,6$ Hz, H-5), 3,97 (3H, s, H-24) 3,93 (3H, s, H-25), 3,90 (1H, m, H-21), 3,78 (3H, s, H-23), 3,73 (1H, m, H-17'), 3,69 (1H, m, H-6'), 3,60 (1H, m, H-17), 3,23 (3H, s, H-26), 3,16 (1H, m, H-15), 3,12 (1H, m, H-6), 2,58 (1H, m, H-14'), 1,77 (1H, dt, $J = 17,4; 3,5$ Hz, H-14), 1,60 (3H, dt, $J = 6,9; 1,8$ Hz, H-18). RMN de ^{13}C a 100 MHz, em CDCl_3 : δ 172,8 (C-22), 148,0 (C-12), 132,7 (C-2), 127,6 (C-13), 126,6 (C-8), 126,3 (C-20), 120,7 (C-10), 120,1

(C-19), 111,2 (C-9), 103,9 (C-11), 100,7 (C-7), 64,4 (C-5), 64,4 (C-21), 63,0 (C-17), 56,8 (C-3), 55,5 (C-25), 55,2 (C-16), 53,4 (C-23), 49,3 (C-26) 33,6 (C-24), 29,8 (C-15), 28,0 (C-14), 19,4 (C-6), 12,4 (C-18).

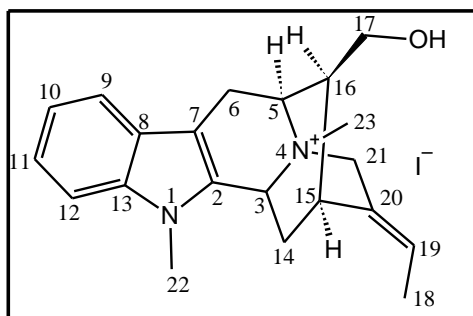
12-Metoxi-N₄-metil-5- epivoachalotina (29): 5,7 mg, sólido amarelo escuro, $[\alpha]_D = -105^\circ$ (c 0,08; MeOH, 25°C), [Lit. $[\alpha]_D = -102,7^\circ$ (c 0,22; MeOH, 25°C) (ZHOU, 2006)]



RMN ¹H a 400 MHz, CDCl₃: δ 7,0 (2H, m, H-10, H-9), 6,67 (1H, dd, $J = 6,6; 1,20$ Hz, H-11), 6,0 (1H, d, $J = 10,4$ Hz, H-3), 5,35 (1H, q, $J = 7,0$ Hz, H-19), 5,11 (1H, d, $J = 16,4$ Hz, H-21'), 4,71 (1H, d, $J = 6,3$ Hz, H-5), 3,92 (3H, s, H-24) 3,91 (3H, s, H-25), 3,87 (1H, d, $J = 16,2$ Hz, H-21), 3,74 (3H, s, H-23), 3,69 (2H, m, H-17', H-6'), 3,47 (1H, d, $J = 11$ Hz, H-17), 3,13 (3H, s, H-26), 3,09

(1H, t, $J = 2$ Hz, H-15), 3,04 (1H, dd, $J = 17,8; 7,0$ Hz, H-6), 2,45 (1H, t, $J = 11,70$ Hz, H-14'), 1,67 (1H, dt, $J = 13,4; 2,5$ Hz, H-14), 1,56 (3H, d, $J = 7,0$ Hz, H-18). RMN de ¹³C a 100 MHz, em CDCl₃: δ 173,0 (C-22), 147,9 (C-12), 132,7 (C-2), 127,5 (C-13), 126,7 (C-8), 126,7 (C-20), 120,7 (C-10), 119,7 (C-19), 111,5 (C-9), 104,0 (C-11), 101,1 (C-7), 64,5 (C-5), 64,4 (C-21), 62,7 (C-17), 56,9 (C-3), 55,6 (C-25), 55,3 (C-16), 53,0 (C-23), 49,1 (C-26) 33,1 (C-24), 29,7 (C-15), 28,1 (C-14), 19,3 (C-6), 12,3 (C-18).

N₄-Metil Affinisina (30): 30 mg, sólido castanho.



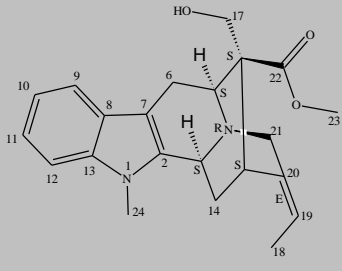
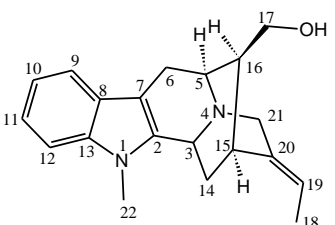
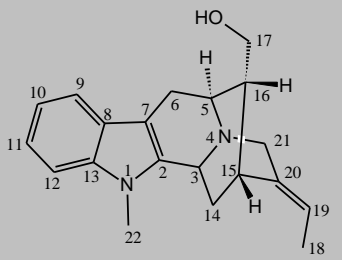
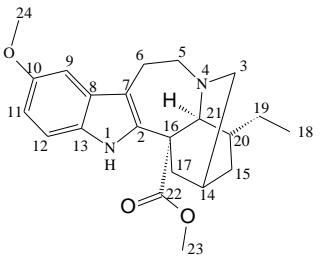
RMN ¹H a 400 MHz, DMSO-d₆: δ 7,53 (1H, dt, $J = 8,6; 1,0$ Hz, H-9), 7,50 (1H, dt, $J = 8,7; 1,0$ Hz, H-12), 7,23 (1H, ddd, $J = 8,2; 7,1; 1,0$ Hz, H-11), 7,10 (1H, ddd, $J = 8,2; 7,0; 1,0$ Hz, H-10), 5,56 (1H, qt, $J = 7,0; 2,0$ Hz, H-19), 5,24 (1H, d, $J = 10,2$ Hz, H-3), 4,41 (1H, dt, $J = 16,8; 2,5$ Hz, H-17'), 4,29 (1H, dt, $J = 16,8; 1,5$ Hz, H-17),

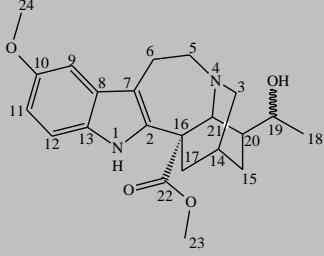
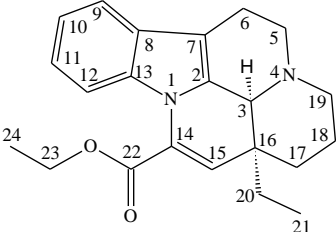
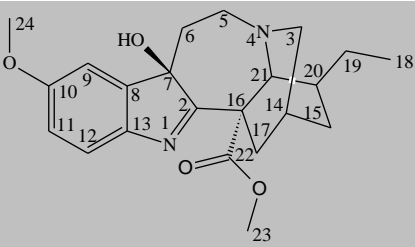
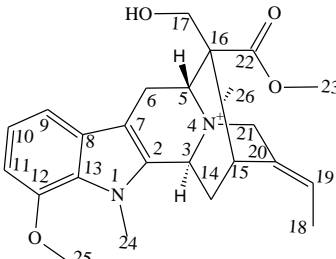
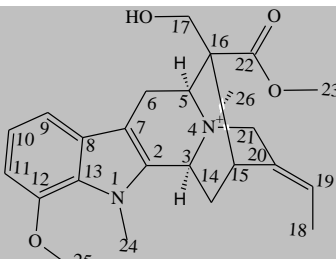
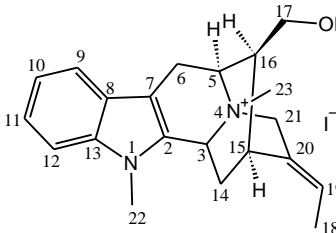
3,67 (3H, s, H-22), 3,64 (1H, q, $J = 6,6$ Hz, H-5), 3,40 (2H, d, $J = 7,5$ Hz, H-21), 3,22 (1H, dd, $J = 17,0; 4,5$ Hz, H-6'), 3,04 (1H, m, H-6), 3,03 (3H, s, H-23), 3,0 (1H, m, H-15), 2,45 (1H, ddd, $J = 12,3; 10,2; 1,8$ Hz, H-14'), 2,00 (2H, m, H-14'; H-16), 1,64 (1H, dt, $J = 7,0; 2,0$ Hz, H-18). RMN de ¹³C a 100 MHz, em DMSO-d₆: δ 138,2 (C-2), 133,5 (C-13), 128,8 (C-20), 126,1 (C-8), 122,5 (C-11), 119,9 (C-10), 119,8 (C-19), 118,9 (C-

9), 110,3(C-12), 100,8 (C-7), 64,8 (C-5), 64,5 (C-17), 62,9 (C-21), 59,4 (C-3), 47,6 (C-23), 43,8 (C-16), 31,46 (C-14), 30,0 (C-22), 25,9 (C-15), 24,3 (C-6) 12,8 (C-18).

Na tabela abaixo (Tabela 4) apresenta a estrutura dos compostos isolados, a nomenclatura usual e IUPAC dos mesmos, além da localização no texto do isolamento, da identificação e das atividades desses compostos.

Tabela 4 – Estruturas, nomenclatura e localização dos compostos no trabalho.

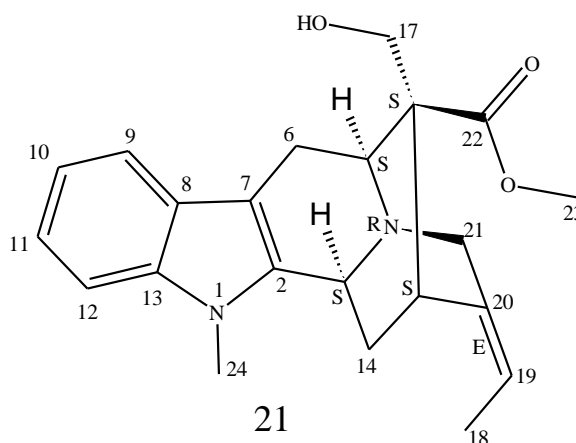
Estrutura	Nomenclatura/ cód.	Localização (Pág.)
	<p>Voachalotina (Sarpagana -1- metil-16 metil éster, 17- hidroxi, (3-S;5-S;15-S;16-S;4N-R;19-E)) CÓD: 21</p>	<p><u>FAEN</u> Isolamento: 39 Caracterização: 44 Identificação: 51 Atividade microbiológica CIM/CLM Bactérias: 131 CIM/CLM Fungos: 132</p>
	<p>Affinisina (5-S*; 15-S*; 16-S*) CÓD: 22</p>	<p><u>FAEN</u> Isolamento: 39 Caracterização: 44 Identificação: 61 Atividade microbiológica CIM/CLM Bactérias: 131 CIM/CLM Fungos: 132</p>
	<p>16-Epiaffinisina (5-S*; 15-R*; 16-R*) CÓD: 23</p>	<p><u>FAEB</u> Isolamento: 39 Caracterização: 45 Identificação: 72 Atividade microbiológica CIM/CLM Bactérias: 131 CIM/CLM Fungos: 132</p>
	<p>Voacangina (Ibogamina, 10-metoxi 16-metil éster) (14-R; 16-S;20-S;21-R;4N-S) CÓD: 24</p>	<p><u>EBH e FAEA</u> Isolamento: 38 Caracterização: 45 Identificação: 80 Atividade microbiológica CIM/CLM Bactérias: 131 CIM/CLM Fungos: 132</p>

	<p>Voacristina</p> <p>(Ibogamina, 10-metoxi 16-metil éster 19-hidroxi)</p> <p>CÓD: 25</p>	<p><u>FAEN</u></p> <p>Isolamento: 39</p> <p>Caracterização: 46</p> <p>Identificação: 86</p> <p>Atividade microbiológica</p> <p>CIM/CLM Bactérias: 131</p> <p>CIM/CLM Fungos: 132</p>
	<p>Vinpocetina</p> <p>(Etil apovincamina)</p> <p>(3-S; 16-S; N₄-R)</p> <p>CÓD: 26</p>	<p><u>FAEA</u></p> <p>Isolamento: 38</p> <p>Caracterização: 46</p> <p>Identificação: 90</p> <p>Atividade microbiológica</p> <p>CIM/CLM Bactérias: 131</p> <p>CIM/CLM Fungos: 132</p>
	<p>Voacangina</p> <p>hidroxi-indolenina</p> <p>CÓD: 27</p>	<p><u>FAEA</u></p> <p>Isolamento: 38</p> <p>Caracterização: 47</p> <p>Identificação: 98</p> <p>Atividade microbiológica</p> <p>CIM/CLM Bactérias: 131</p> <p>CIM/CLM Fungos: 132</p>
	<p>12-Metoxi-N₄-metilvoachalotina</p> <p>(3-S*; 5-R*; N₄-R*)</p> <p>CÓD: 28</p>	<p><u>FAEA</u></p> <p>Isolamento: 38</p> <p>Caracterização: 47</p> <p>Identificação: 106</p> <p>Atividade microbiológica</p> <p>CIM/CLM Bactérias: 131</p> <p>CIM/CLM Fungos: 132</p>
	<p>12- Metoxi- N₄- metil 5-epivoachalotina</p> <p>(3-S*; 5-S*; N₄-R*)</p> <p>CÓD: 29</p>	<p><u>FAEB</u></p> <p>Isolamento: 39</p> <p>Caracterização: 48</p> <p>Identificação: 114</p> <p>Atividade microbiológica</p> <p>CIM/CLM Bactérias: 131</p> <p>CIM/CLM Fungos: 132</p>
	<p>N₄-Metil Affinisina</p> <p>CÓD: 30</p>	<p><u>Reação de N-metilação de FN7</u></p> <p>Reação: 40</p> <p>Caracterização: 48</p> <p>Identificação: 123</p> <p>Atividade microbiológica</p> <p>CIM/CLM Bactérias: 131</p> <p>CIM/CLM Fungos: 132</p>

5.2.1 Discussões dos metabólitos isolados de *T. catharinensis*

5.2.1.1 VOACHALOTINA (21)

O alcalóide de esqueleto corinanteano, voachalotina (21), foi isolado na forma de cristais amarelados, da FAEN, 85: 15 (clorofórmio: metanol) a partir do EBM das cascas de *T. catharinensis* conforme descrito na Parte Experimental (pag. 36), sendo identificado após análises de técnicas de RMN uni e bidimensionais de ^1H e ^{13}C , medidas de raios-X e comparação com dados da literatura.

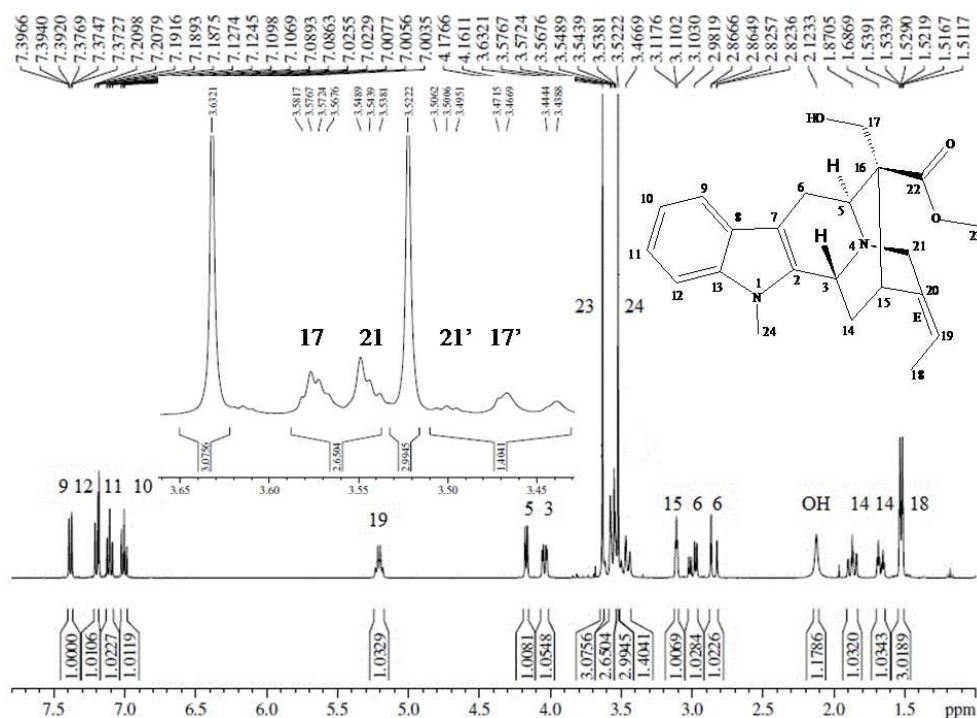


Através da análise do espectro de ^1H (Figura 6) pode-se observar dois simpletos em δ 3,63 e δ 3,52 ppm, atribuídos aos hidrogênios das metilas 23 e 24 respectivamente. Os sinais em δ 7,38; δ 7,20; δ 7,10; δ 7,00 ppm, com área relativa a um hidrogênio cada, correspondem aos H-9, H-12, H-11 e H-10 respectivamente, característicos de um anel benzênico de um núcleo indólico sem substituintes (CORDEL, 1981)

A presença de uma metila (H-18) ligada a um átomo de carbono sp^2 pode ser reconhecida pelo sinal com multiplicidade de duplo tripleto em δ 1,52 ppm (3H, $J = 6,9$; 1,9 Hz), já em δ 5,20 ppm (1H, $J = 6,9$; 2,0 Hz) um quarteto de tripleto que correspondem ao hidrogênio vinílico (H-19).

Os sinais em δ 4,16 (1H, d, $J = 6,4$ Hz), δ 4,03 (1H, dd, $J = 10,6$; 3,4 Hz) e δ 3,11 (1H, t, $J = 3,0$ Hz) foram atribuídos aos hidrogênios H-5, H-3 e H-15 respectivamente. O simpleto largo em δ 2,12 ppm, integrado para um hidrogênio é atribuído ao álcool primário.

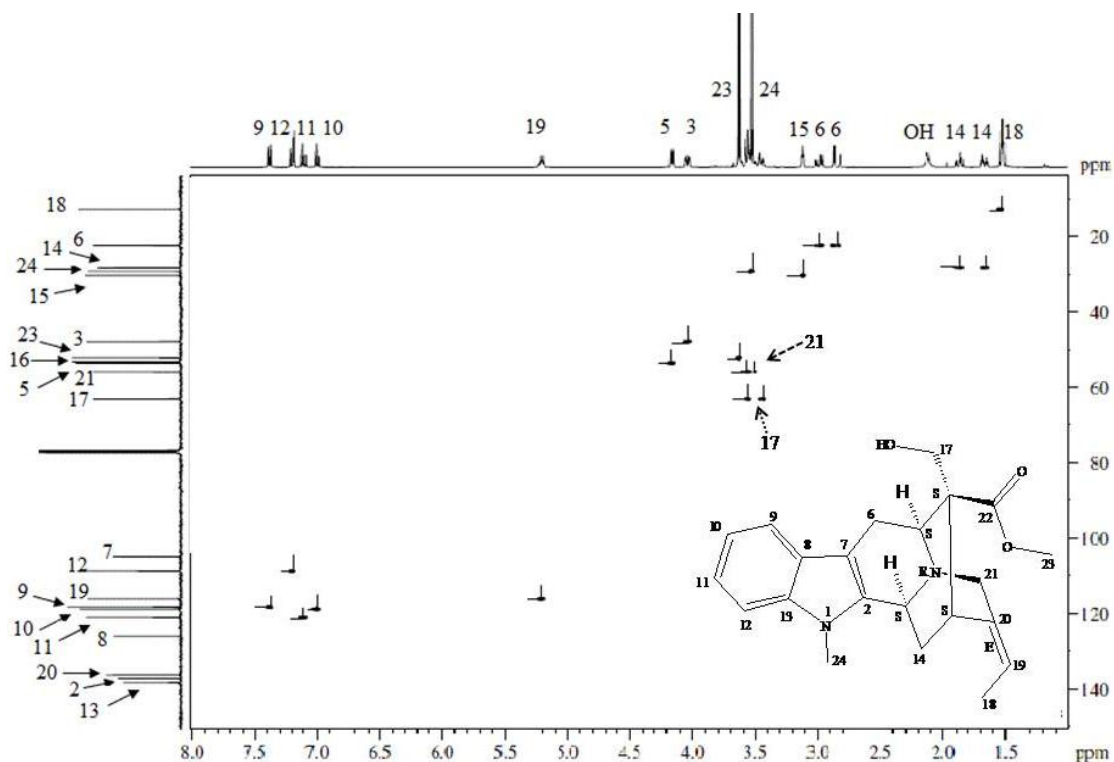
Figura 6 – Espectro de RMN de ^1H de Voachalotina em CDCl_3 a 400 MHz.



Fonte: Lab.RMN-UFSM, 2018

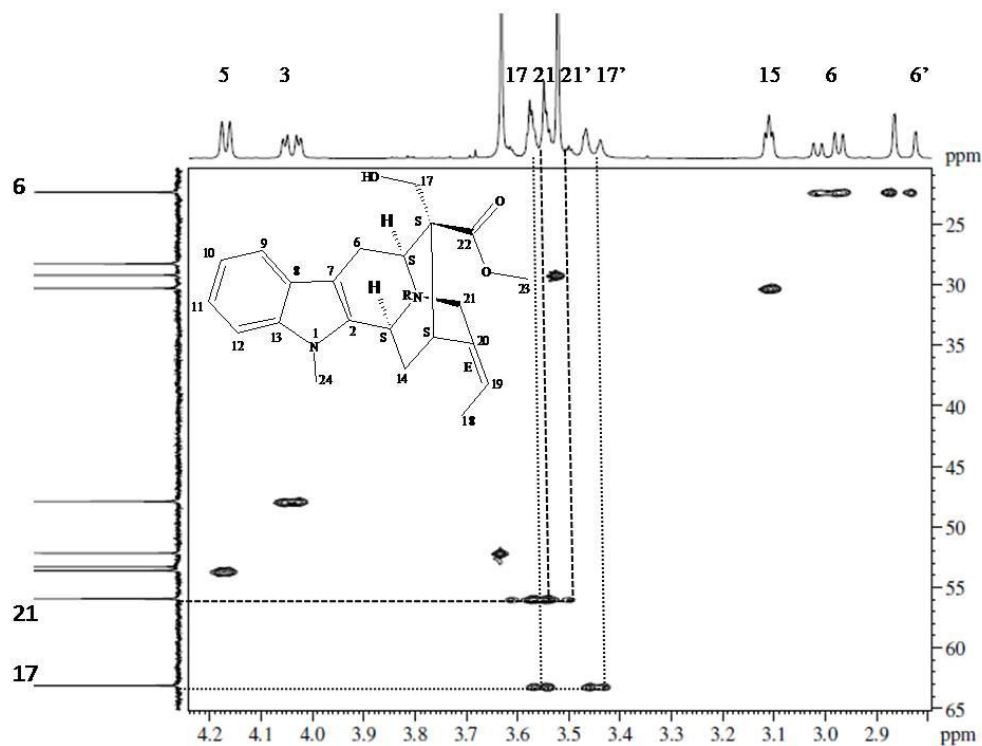
Através da análise do espectro HSQC (Figura 7) torna-se possível a identificação das correlações entre carbono e hidrogênio existentes na estrutura. Na expansão do espectro de HSQC (Figura 8), é visível a atribuição dos hidrogênios diastereotópicos e seus respectivos carbonos. Desta forma atribuiu-se os sinais δ 3,54 ppm (1H, m), δ 3,57 ppm (1H, m), δ 3,51 ppm (1H, m), δ 3,45 ppm (1H, m), δ 2,99 ppm (1H, dd, $J = 16,5; 6,4$ Hz) e δ 2,84 ppm (1H, dd, $J = 16,5; 0,8$ Hz) aos hidrogênios H-17, H-21, H-21', H-17', H-6; H-6' respectivamente.

Figura 7 – Espectro de RMN HSQC de Voachalotina em CDCl_3 a 400 MHz



Fonte: Lab.RMN-UFSM, 2018

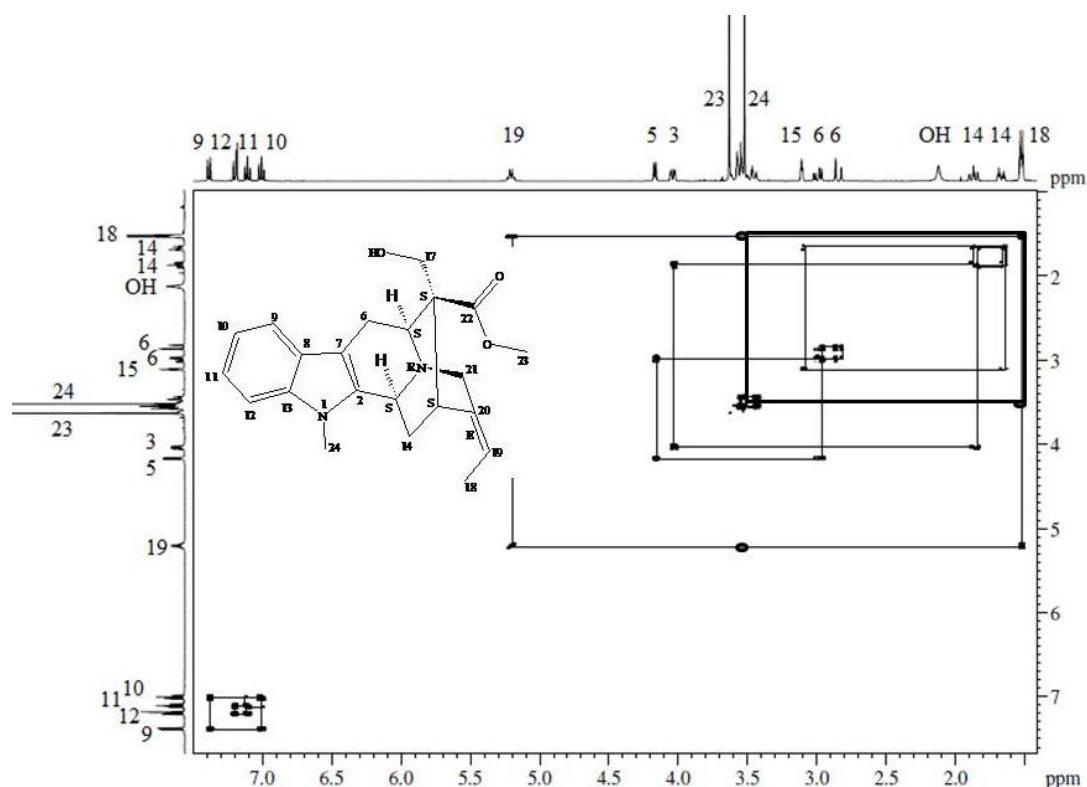
Figura 8– Expansão do espectro de RMN HSQC de Voachalotina em CDCl_3 a 400 MHz



Fonte: Lab. RMN-UFSM, 2018.

No espectro de COSY observou-se as correlações entre os hidrogênios, conforme descreve a figura 9. É possível observar os acoplamentos a longa distância dos H-18 e H-19 com os hidrogênios H-21 e H-21'. O H-18 possui a multiplicidade duplo triplete, que é justificado pelos acoplamentos com o H-19 ($J= 6,96$ Hz) e H-21 ($J= 1,90$ Hz). Enquanto que o H-19 possui a multiplicidade quarteto de triplete, justificado pelo acoplamento com o H-18 ($J= 7,0$ Hz) e H-21 ($J= 2,0$ Hz).

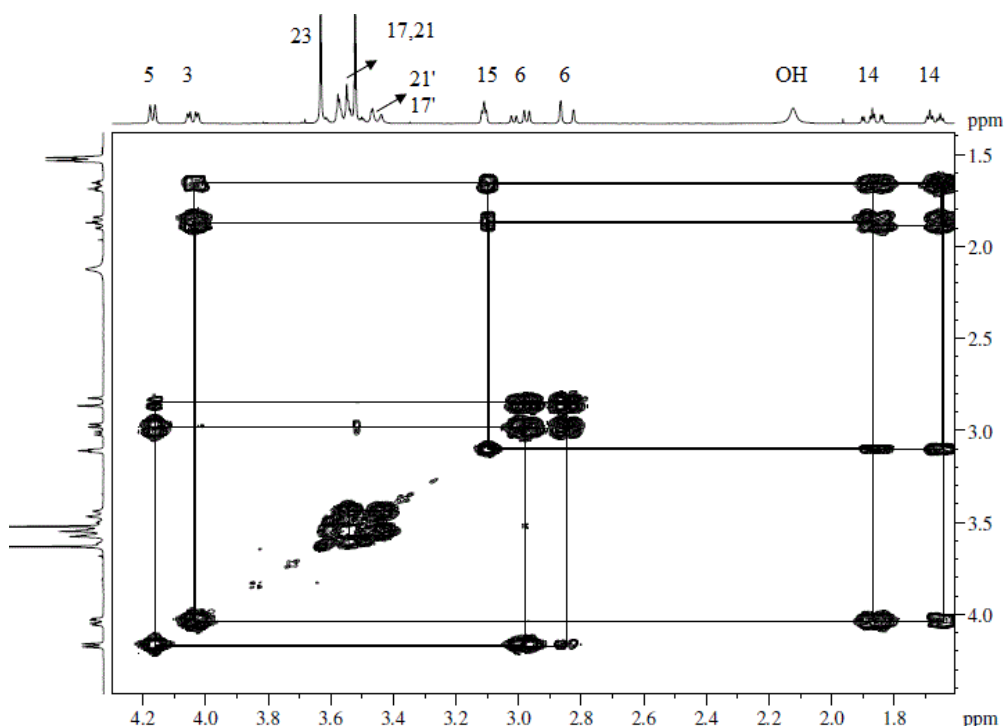
Figura 9 – Espectro de RMN COSY de Voachalotina em CDCl_3 a 400 MHz.



Fonte: Lab.RMN-UFSM, 2018

Na expansão do espectro de COSY (Figura 10) observam-se as correlações de sistemas de spins isolados, dos hidrogênios H-5 acoplando com os hidrogênios H-6, H-6' e o acoplamento dos hidrogênios H-14, H14' com os hidrogênios H-3 e H-15.

Figura 10– Expansão espectro de RMN COSY de Voachalotina em CDCl₃ a 400 MHz.



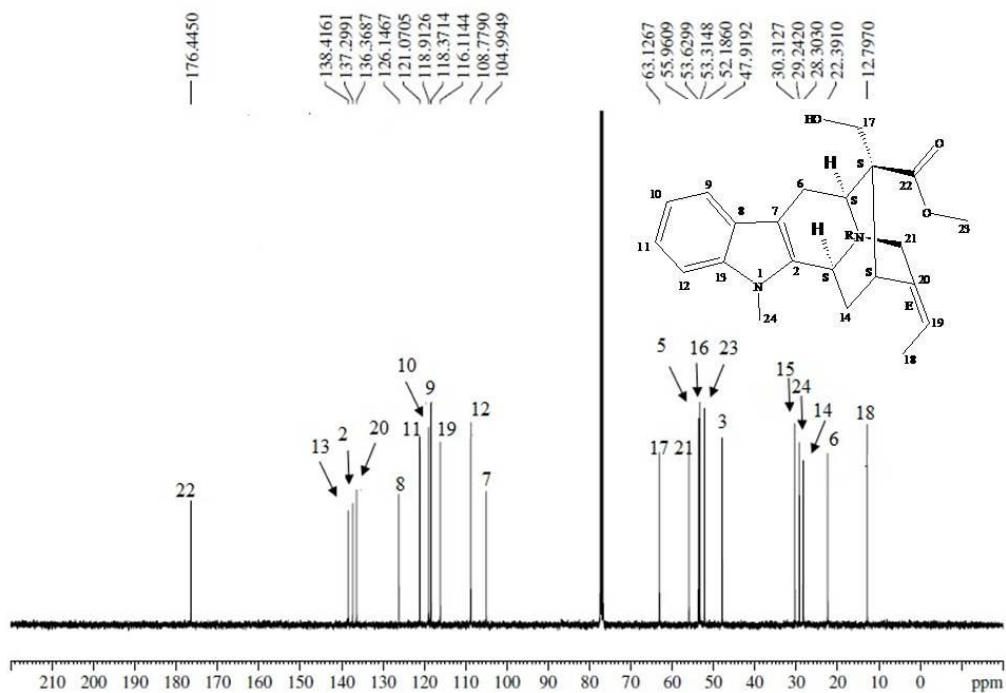
Fonte: Lab. RMN-UFSM, 2018.

O espectro de RMN ¹³C da voachalotina (Figura 11) exibiu sinal em δ 176,4 ppm, referente o carbono carbonílico C-22 característico de ésteres. Os carbonos metínicos aromáticos, C-11, C-10, C-9, C-12, apresentam sinais em δ 121,0, δ 118,9, δ 118,3 e δ 108,7 ppm, respectivamente. Os sinais em δ 138,4, δ 137,2, δ 126,1 e δ 104,9 ppm correspondem aos carbonos desidrogenados C-13, C-2, C-8 e C-7.

Os sinais em δ 136,3 e δ 116,1 ppm correspondem aos carbonos sp² da dupla ligação exocíclica, C-20 e C-19 sendo o primeiro deles desidrogenado. Já o sinal observado em δ 63,1 ppm corresponde ao carbono metilênico C-17. Os carbonos das metilas C-23, C-24 e C-18 têm os sinais em δ 52,1 ppm, δ 29,2 ppm e δ 12,7 ppm, respectivamente.

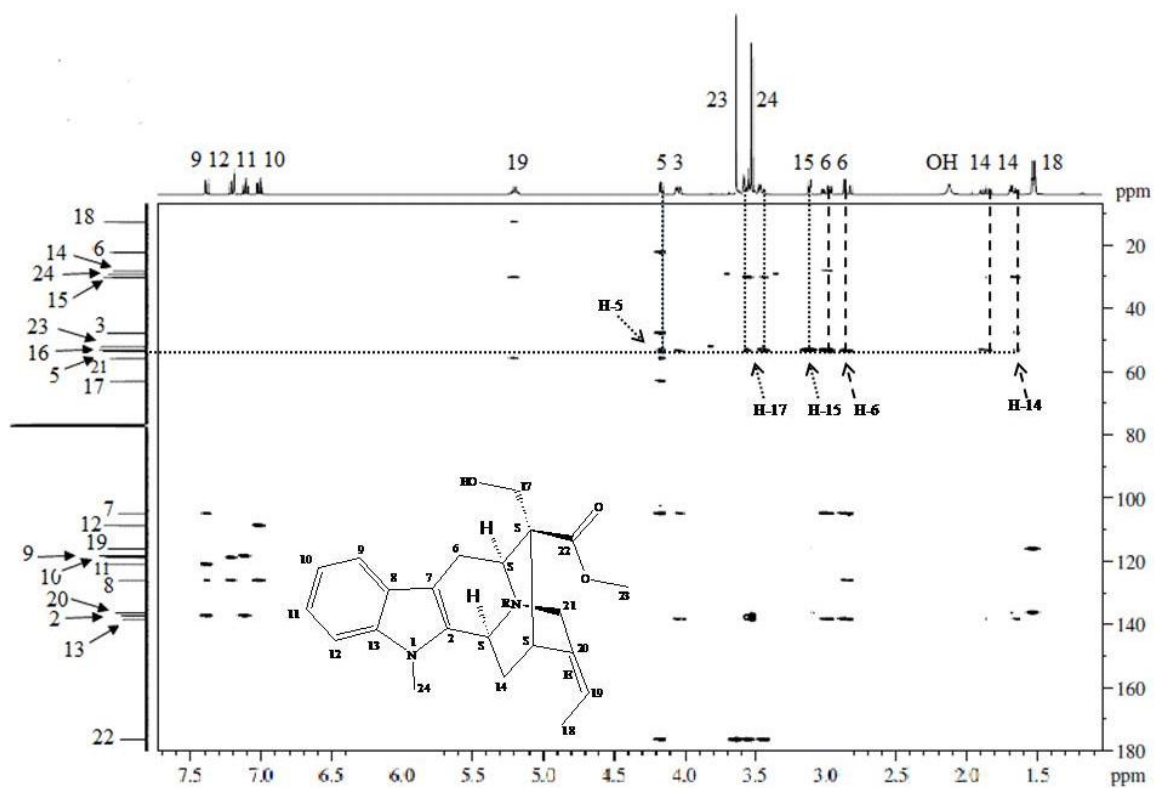
Analisando o espectro HMBC (Figura 12) torna-se possível a identificação dos carbonos desidrogenados, através das correlações de ²J_{HC} e ³J_{HC} entre carbono e hidrogênio. Desta forma a identificação do C-16, foi realizada através das correlações ²J_{HC}: H-5; H-17 e H-15 e ³J_{HC}: H-6 e H-14. As correlações estão descritas na Tabela 5, bem como a descrição das correlações de HSQC.

Figura 11 – Espectro de RMN de ^{13}C de Voachalotina em CDCl_3 a 100 MHz.



Fonte: Lab. RMN-UFSM, 2018

Figura 12 – Espectro de RMN HMBC de Voachalotina em CDCl_3 a 400 MHz.



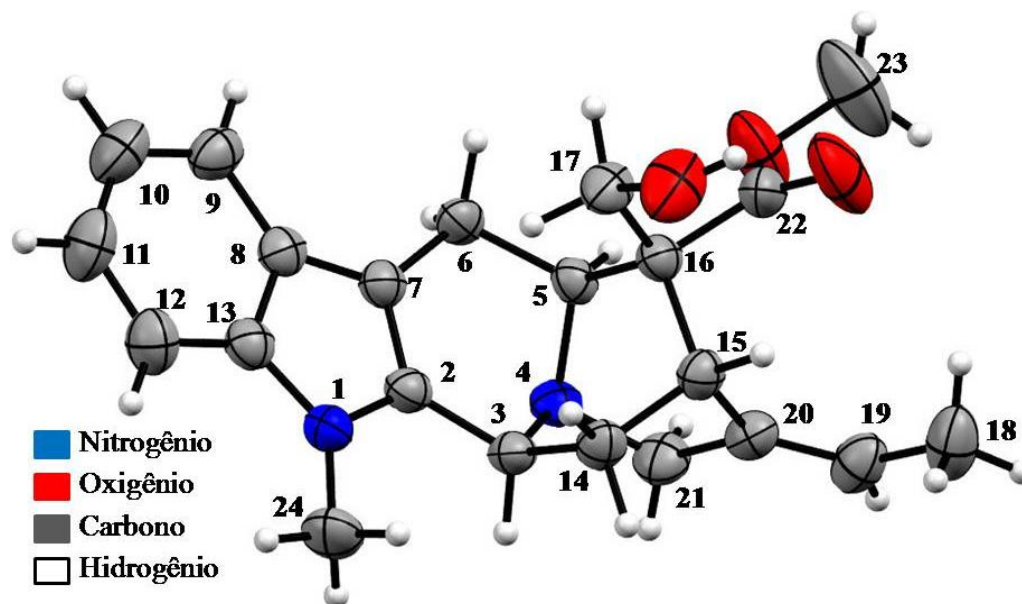
Fonte: Lab. RMN-UFSM, 2018

Tabela 5 – Dados espectrais RMN 2D heteronuclear HSQC e HMBC de voachalotina.

Posição	HSQC		HMBC	
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	$^2J_{HC}$	$^3J_{HC}$
2	137,29	-	-	H-24
3	47,91	4,03		
5	53,62	4,16		
6	22,39	2,99		
6'	22,39	2,84		
7	104,99	-	H-6; H-6'	H-9; H-5; H-3
8	126,14	-	H-9	H-12; H10
9	118,37	7,38		
10	118,90	7,00		
11	121,07	7,10		
12	108,77	7,20		
13	138,41	-	-	H-24
14	28,30	1,87		
14'	28,30	1,67		
15	30,31	3,11		
16	53,31	-	H-5; H-17; H-17'; H-15	H-6; H-6'; H-14; H-14'
17	63,12	3,54		
17'	63,12	3,45		
18	12,79	1,52		
19	116,11	5,20		
20	136,36	-	-	; H-14; H-14'; H-18
21	55,96	3,57		
21'	55,96	3,51		
22	176,44	-	-	H-17; H-17'; H-23; H-5
23	52,18	3,63		
24	29,24	3,52		

Através da difração de raio-X (Figura 13) fica confirmada a configuração absoluta, sendo que a dupla ligação (C-20 – C-19) está na conformação E e os centros quirais tem configuração C3-S, C5-S, C15-S, C16-S e N4-R.

Figura 13 – Difração de raio-X de Voachalotina.



Fonte: Lab. Difração raio-X, UFSM.

Nas Tabelas 6 e 7 são descritos os deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C de **21**, bem como os dados encontrados na literatura (GONÇALVES, 2011).

Tabela 6 – Dados de RMN de ^1H da voachalotina em CDCl_3 , 400 MHz.

Posição	δ_{H} (ppm)	δ_{H}^* (ppm)
3	4,03 (dd, $J = 10,6; 3,4$ Hz)	4,22 (dd, $J = 9,9; 4,1$ Hz)
5	4,16 (d, $J = 6,4$ Hz)	4,33 (d, $J = 6,0$ Hz)
6	2,99 (dd, $J = 16,4; 6,4$ Hz)	3,15 (dd, $J = 15,6; 6,3$ Hz)
6	2,84 (dd, $J = 16,4; 0,8$ Hz)	2,99 (d, $J = 15,6$ Hz)
9	7,38 (dt, $J = 7,9; 0,8$ Hz)	7,50 (d, $J = 7,6$ Hz)
10	7,00(ddd, $J = 7,9; 7,1; 1,0$ Hz)	7,11 (d, $J = 7,9; 1,4$ Hz)
11	7,10(ddd, $J = 8,2; 7,1; 1,2; \text{ Hz}$)	7,21 (d, $J = 8,3; 1,1$ Hz)
12	7,20 (dt, $J = 8,1; 0,8$ Hz)	7,30 (d, $J = 8,3$ Hz)
14	1,87 (ddd, $J = 14,8; 7,9; 2,6$ Hz)	2,02 (ddd, $J = 12,6; 9,7; 2,6$ Hz)
14'	1,67 (td, $J = 14,8; 3,8$ Hz)	1,83 (td, $J = 12,6; 3,6$ Hz)
15	3,11 (t, $J = 3,0$ Hz)	3,25 (t, $J = 3,0$ Hz)
17	3,54 (m)	3,71 (d, $J = 11,7$ Hz)
17	3,45 (m)	3,62 (d, $J = 11,7$ Hz)
18	1,52 (dt, $J = 6,9; 1,9$ Hz)	1,63 (d, $J = 7,9$ Hz)
19	5,20(qt, $J = 7,; 2, \text{ Hz}$)	5,34 (tq, $J = 6,6; 2,0$ Hz)
21	3,57 (m)	3,60 (2H, m)
21	3,51 (m)	
23	3,63 (s)	3,76 (s)
24	3,52 (s)	3,64 (s)

δ_{H}^* (CDCl_3 , 400 MHz) conforme GONÇALVES, 2011.

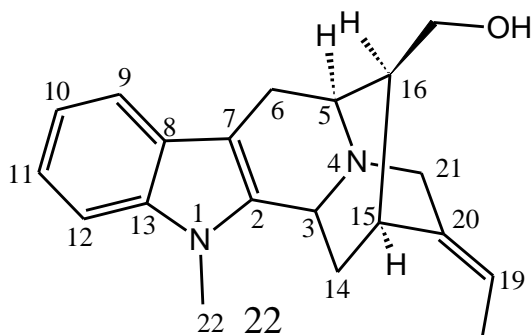
Tabela 7 – Dados de RMN de ^{13}C da voachalotina em CDCl_3 , 100 MHz

Posição	δ_{C} (ppm)	δ_{C}^* (ppm)
2	137,2	137,4
3	47,9	48,0
5	53,6	53,8
6	22,3	22,3
7	104,9	105,0
8	126,1	126,0
9	118,3	118,3
10	118,9	119,0
11	121,0	121,2
12	108,7	108,9
13	138,4	138,0
14	28,3	28,4
15	30,3	29,9
16	53,3	53,4
17	63,1	63,1
18	12,7	12,9
19	116,1	116,5
20	136,3	137,5
21	55,9	54,0
22	176,4	176,4
23	52,1	52,3
24	29,2	30,3

δ_{C}^* (CDCl_3 , 100 MHz) conforme GONÇALVES, 2011.

5.2.1.2 AFFINISINA (22)

O alcalóide de esqueleto corinanteano, affinisina (**22**), foi isolado na forma de um sólido castanho, da FAEN 90: 10 (clorofórmio: metanol) a partir do EBM das cascas de *T. catharinensis* conforme descrito na Parte Experimental (pag. 36), sendo identificado após análises de técnicas de RMN uni e bidimensionais de ^1H e ^{13}C , e comparação com dados da literatura.

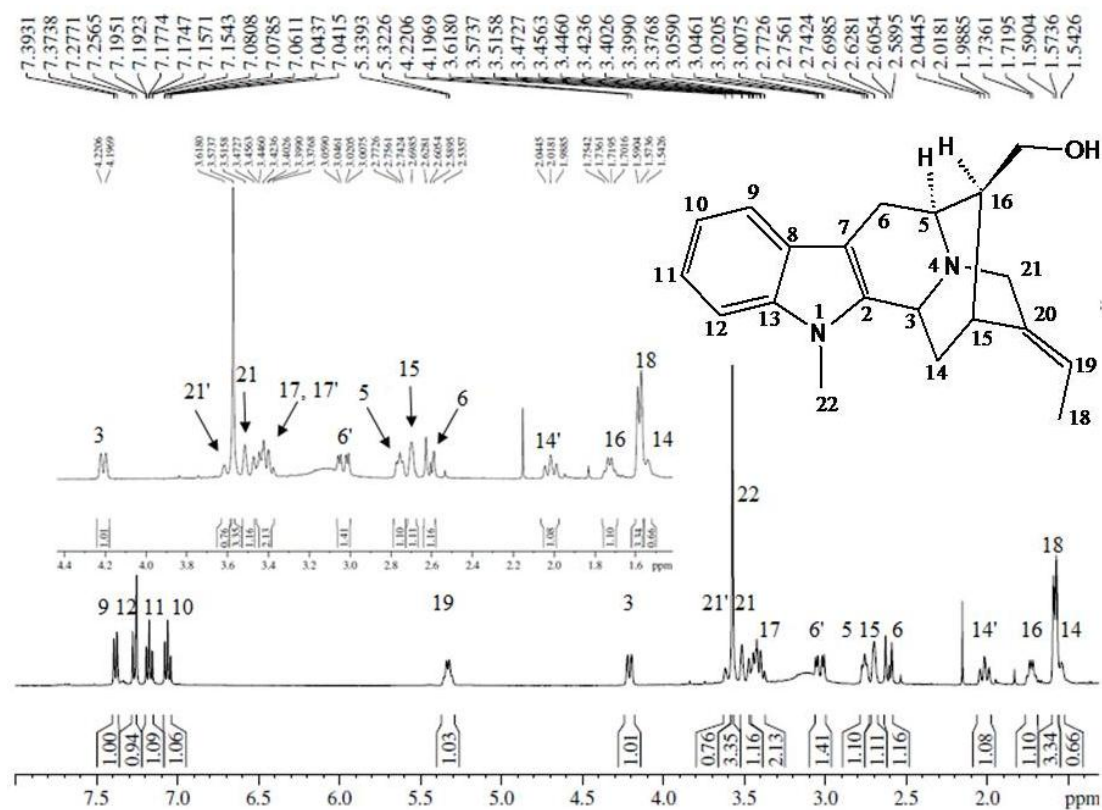


Através da análise do espectro de ^1H (Figura 14), pode-se observar a semelhança com o alcaloide **21**. Neste, observa-se apenas a presença de um simpleto em δ 3,57 ppm, atribuído à metila 22.

A presença de uma metila ligada a um átomo de carbono sp^2 pode ser reconhecida pelo sinal duplo tripleto em δ 1,58 ppm (3H, $J = 6,75; 1,90$ Hz) e pelo sinal quarteto de tripleto a δ 5,33 ppm (1H, $J = 6,78; 1,80$ Hz), correspondem aos H-18 e H-19 respectivamente.

Para os sinais a δ 4,20 (1H, dd, $J = 10,02; 1,73$ Hz), δ 2,76 (1H, t, $J = 6,49$ Hz), δ 2,69 (1H, s,) e δ 1,73 (1H, q, $J = 7,18$ Hz) foram atribuídos aos hidrogênios metínicos H-3, H-5, H-15 e H-16 respectivamente.

Figura 14 – Espectro de RMN de ^1H de Affinisina em CDCl_3 a 400 MHz.

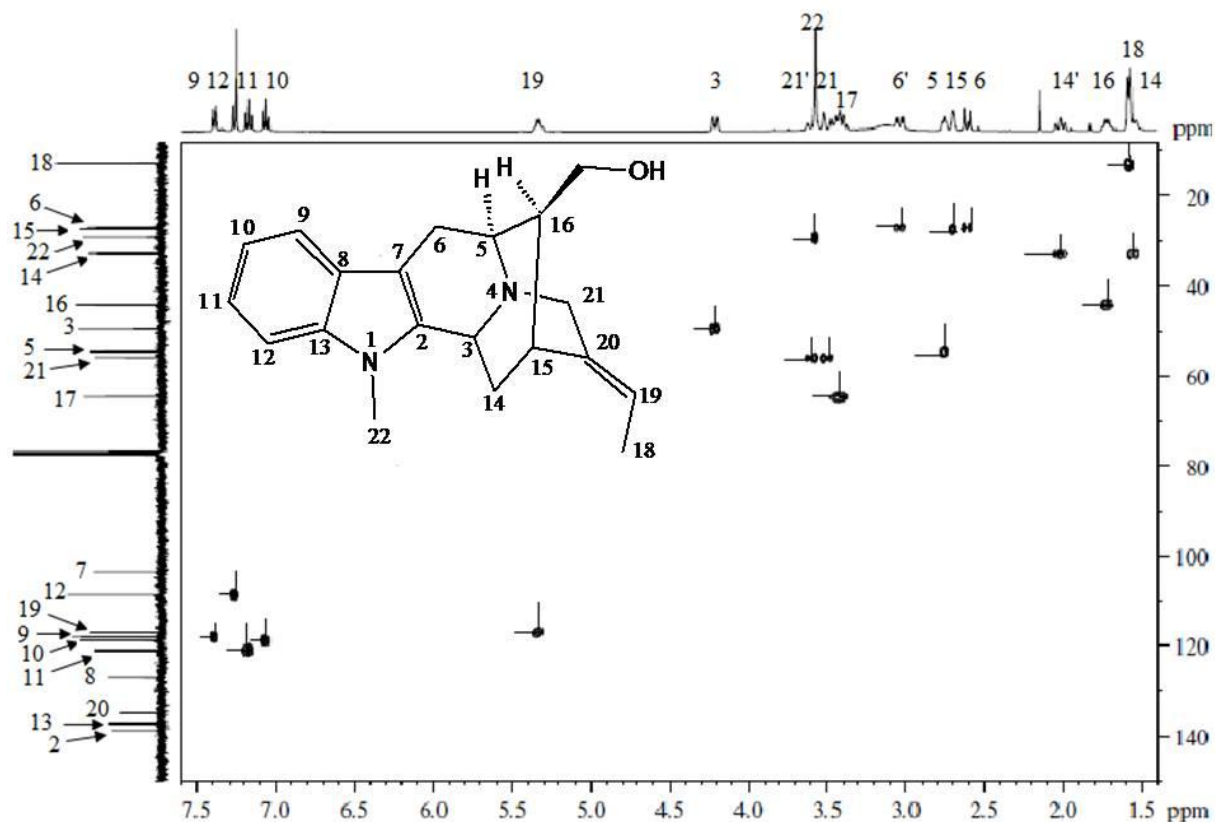


Fonte: Lab.RMN-UFSM, 2018

Através da análise do espectro HSQC (Figura 15, e expansão Figura16) foi possível a identificação das correlações entre carbonos e hidrogênios existentes na estrutura. Desta forma atribuíram-se os sinais a δ 3,61 ppm (1H, m), δ 3,49 ppm (1H, m) e δ 3,42 ppm (2H, m) aos hidrogênios H-21', H-21 e H-17 respectivamente.

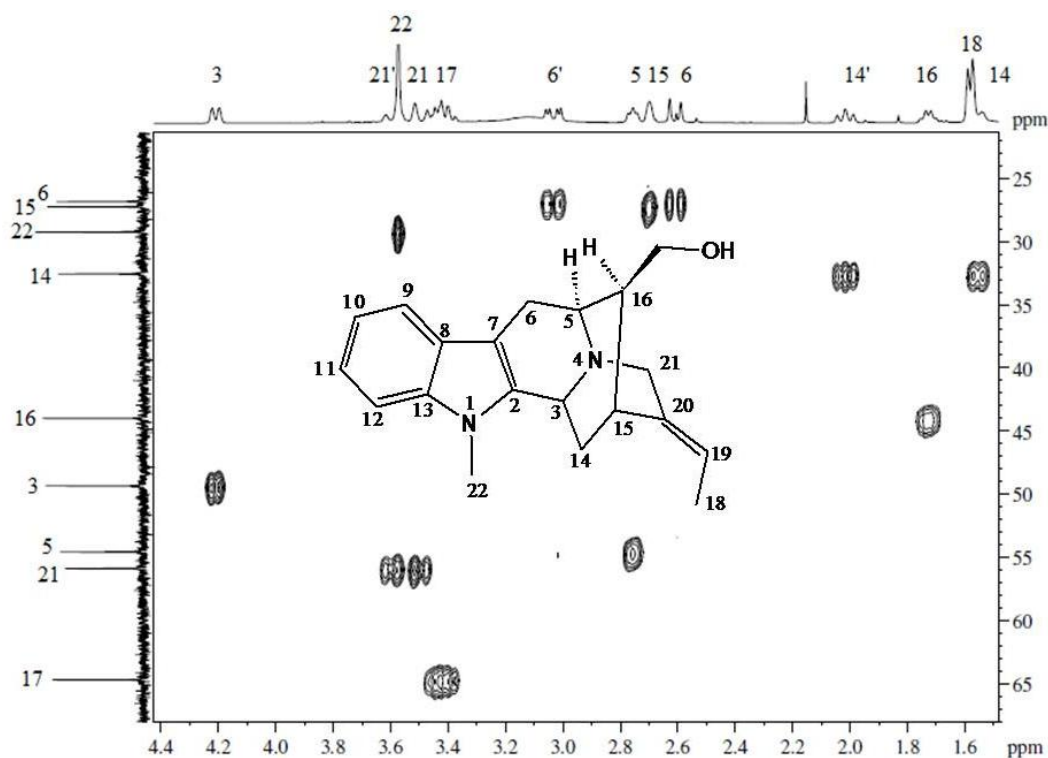
Os sinais dos hidrogênios H-6', H-6, H-14' e H-14 foram observados a δ 3,04 ppm (1H, dd, $J = 15,5; 5,19$ Hz), δ 2,61 ppm (1H, d, $J = 15,5$ Hz), δ 2,08 ppm (1H, t, $J = 11,5$ Hz) e δ 1,56 ppm (1H, m), respectivamente.

Figura 15 – Espectro de RMN HSQC de Affinisina em CDCl_3 a 400 MHz.



Fonte: Lab.RMN-UFSM, 2018

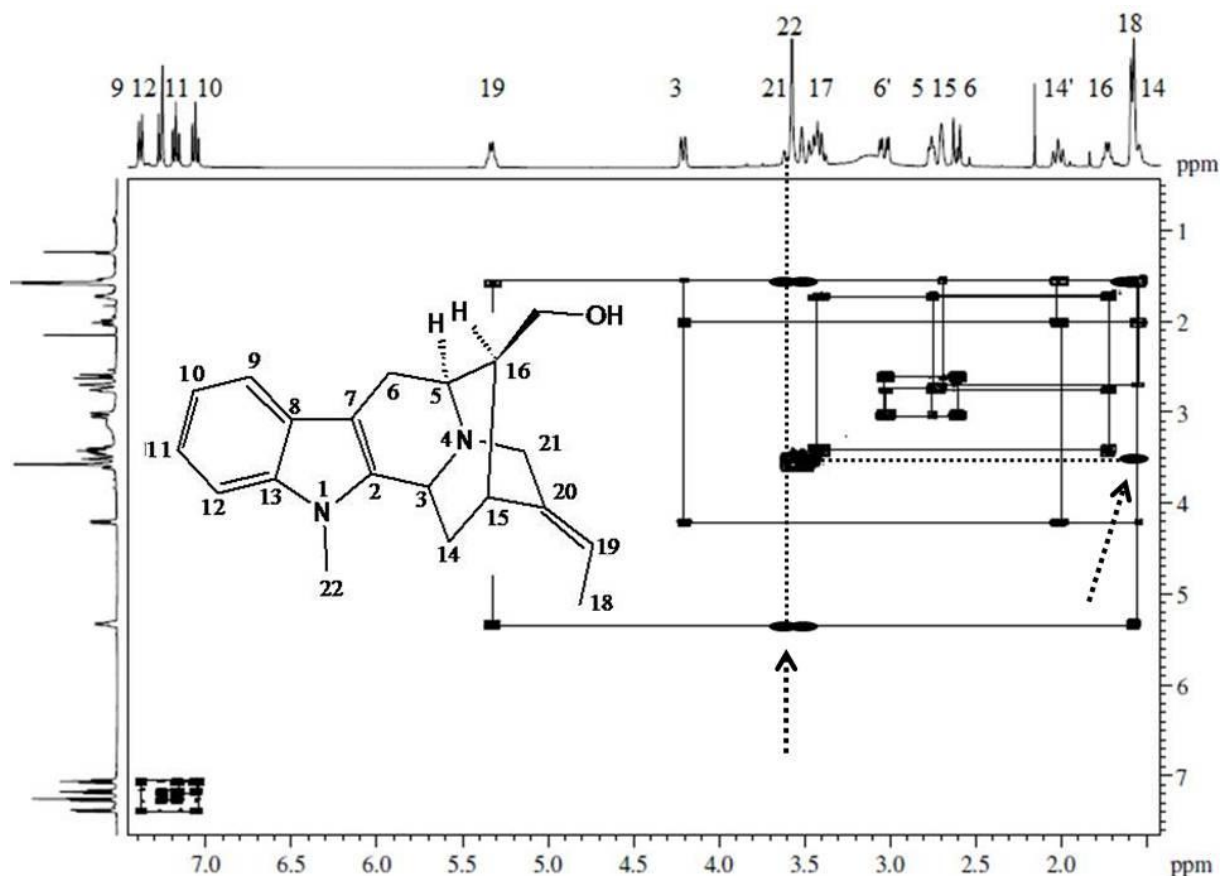
Figura 16 – Expansão de espectro de RMN HSQC de Affinisina em CDCl_3 a 400 MHz.



Fonte: Lab.RMN-UFSM, 2018.

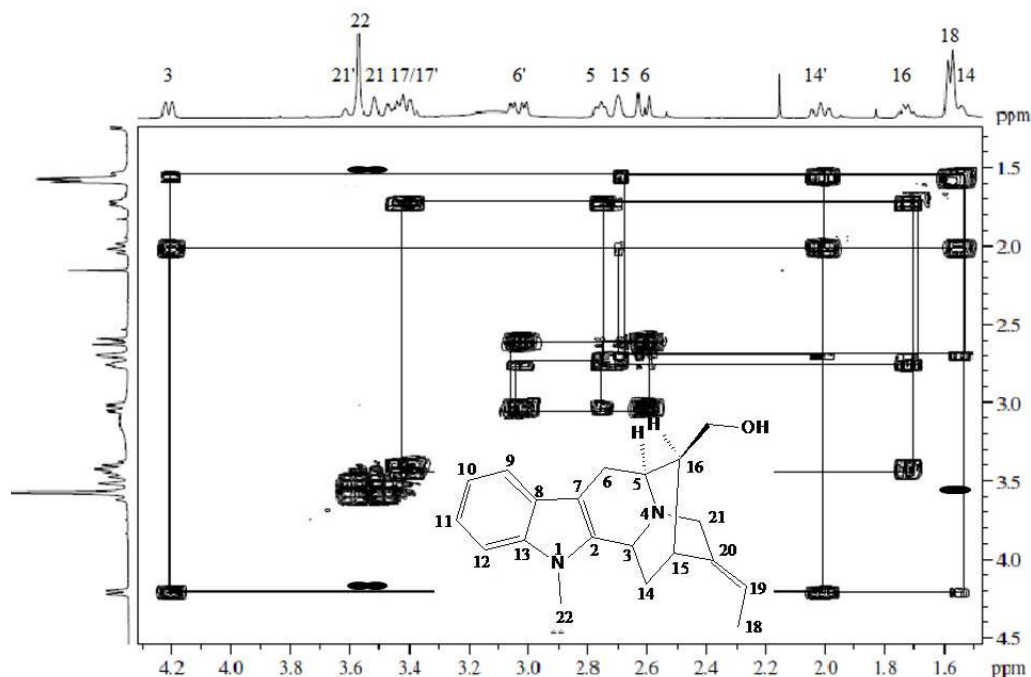
No espectro 2D COSY pode-se observar os sistemas de spins, conforme descreve a Figura 17, e sua expansão (Figura 18). Também é possível observar os acoplamentos a longa distância do H-19 com os hidrogênios H-21 ($J= 1,80$ Hz), bem como os acoplamentos do H-18 com os hidrogênios H-21 ($J= 1,90$ Hz) e H-19 ($J= 6,75$ Hz) (Figura 16).

Figura 17 – Espectro de RMN COSY de Affinisina em CDCl_3 a 400 MHz.



Fonte: Lab.RMN-UFSM, 2018

Figura 18 – Expansão do espectro de RMN COSY de Affinisina em CDCl_3 a 400 MHz.



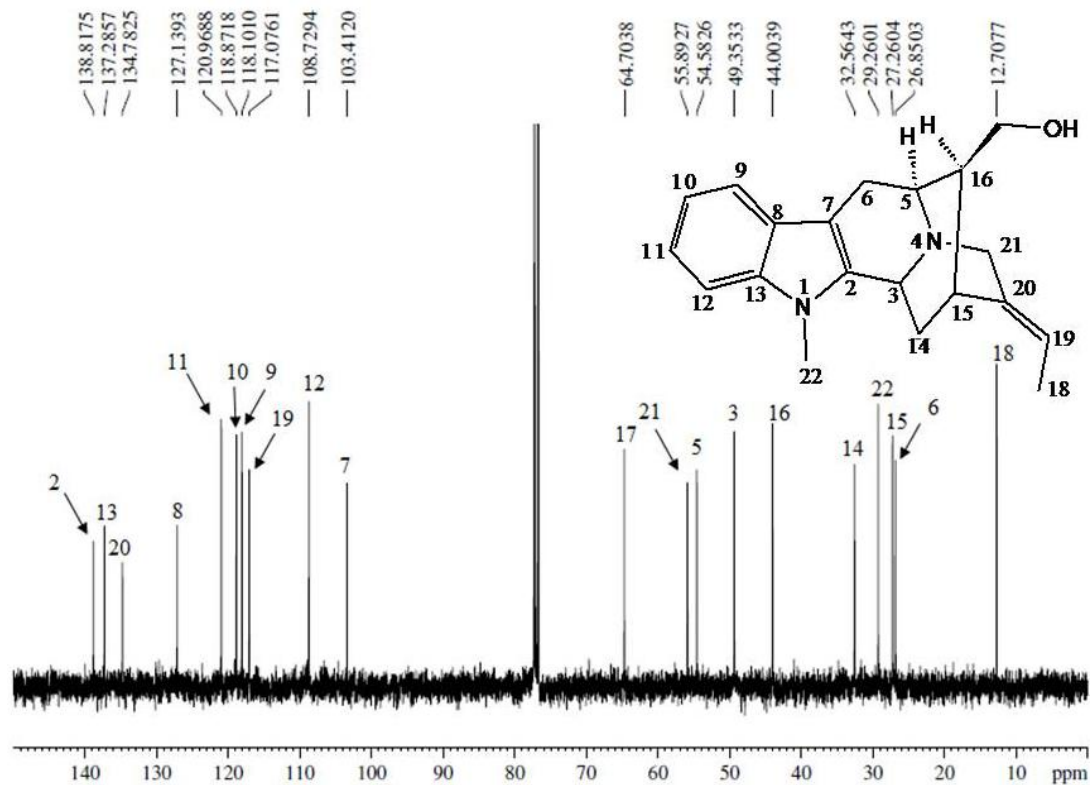
Fonte: Lab. RMN-UFSM, 2018.

O espectro de RMN ^{13}C da affinisina (Figura 19) apresentou um sinal em δ 64,7 ppm, referente ao C-17 ligado a uma hidroxila. Os carbonos metínicos, C-9, C-10, C-11, C-12, os sinais aparecem em δ 118,1 ppm, δ 118,8 ppm, δ 120,9 ppm e δ 108,7 ppm, respectivamente. Os sinais em δ 138,8 ppm, δ 103,4 ppm, δ 127,1 ppm e δ 137,2 ppm correspondem aos carbonos desidrogenados C-2, C-7, C-8 e C-13.

Os sinais em δ 134,7 ppm e δ 117,0 ppm correspondem aos carbonos sp^2 da dupla ligação exocíclica, C-20 e C-19 sendo o primeiro deles desidrogenado. Para as metilas C-22 e C-18, os sinais aparecem em δ 29,2 ppm e δ 12,7 ppm, respectivamente.

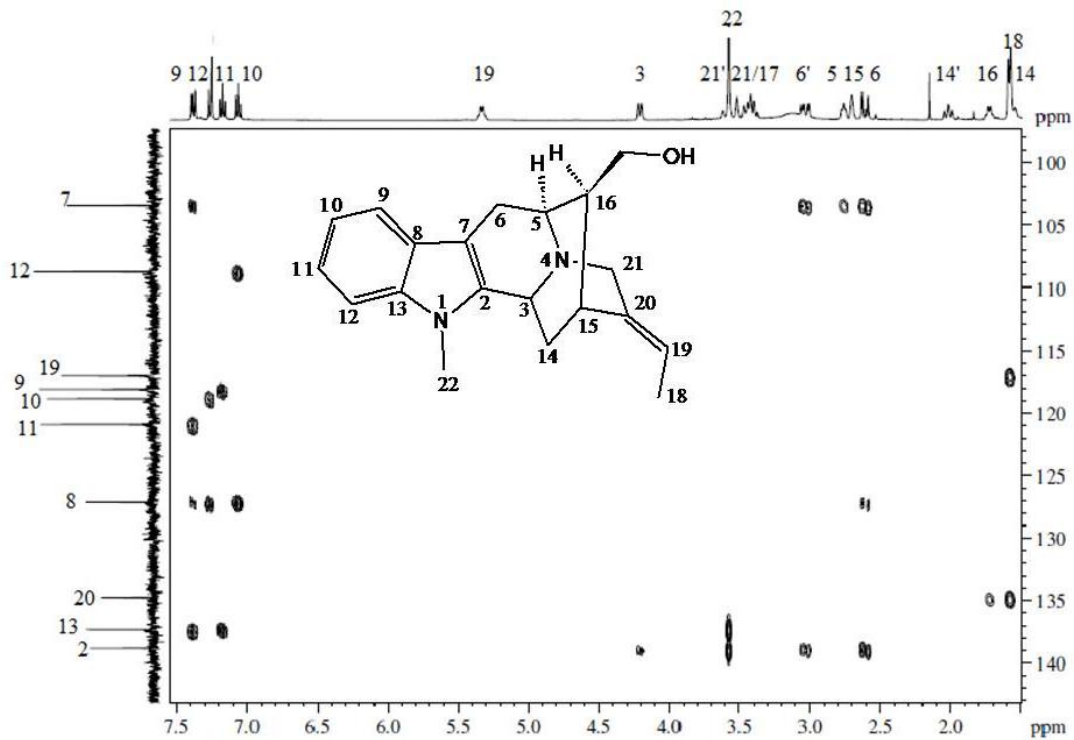
A análise do espectro HMBC (Figura 20, e expansões Figuras 21 e 22) torna possível a identificação dos carbonos desidrogenados, através das correlações de $^2J_{\text{HC}}$ e $^3J_{\text{HC}}$ entre carbono e hidrogênio. Estas relações estão descritas na Tabela 8, bem como a descrição das correlações de HSQC.

Figura 19 – Espectro de RMN de ^{13}C de Affinisina em CDCl_3 a 100 MHz.



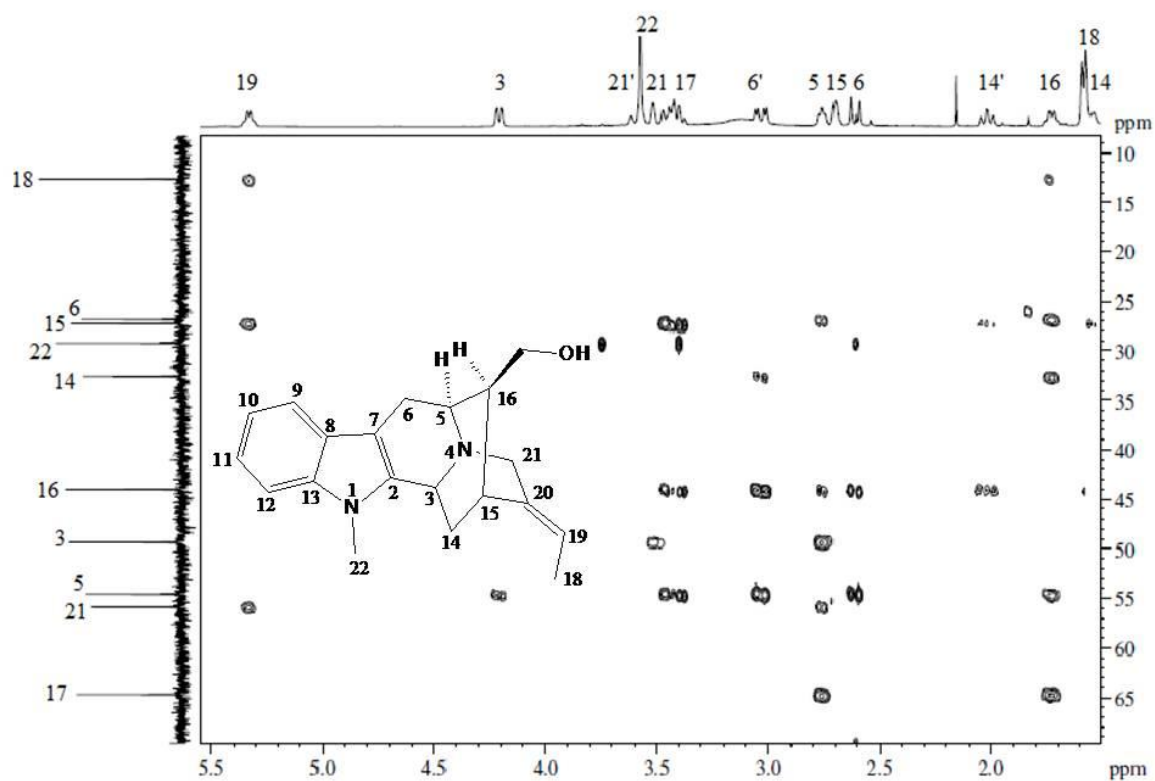
Fonte: Lab.RMN-UFSM, 2018

Figura 20 – Espectro de RMN HMBC de Affinisina em CDCl_3 a 400 MHz.



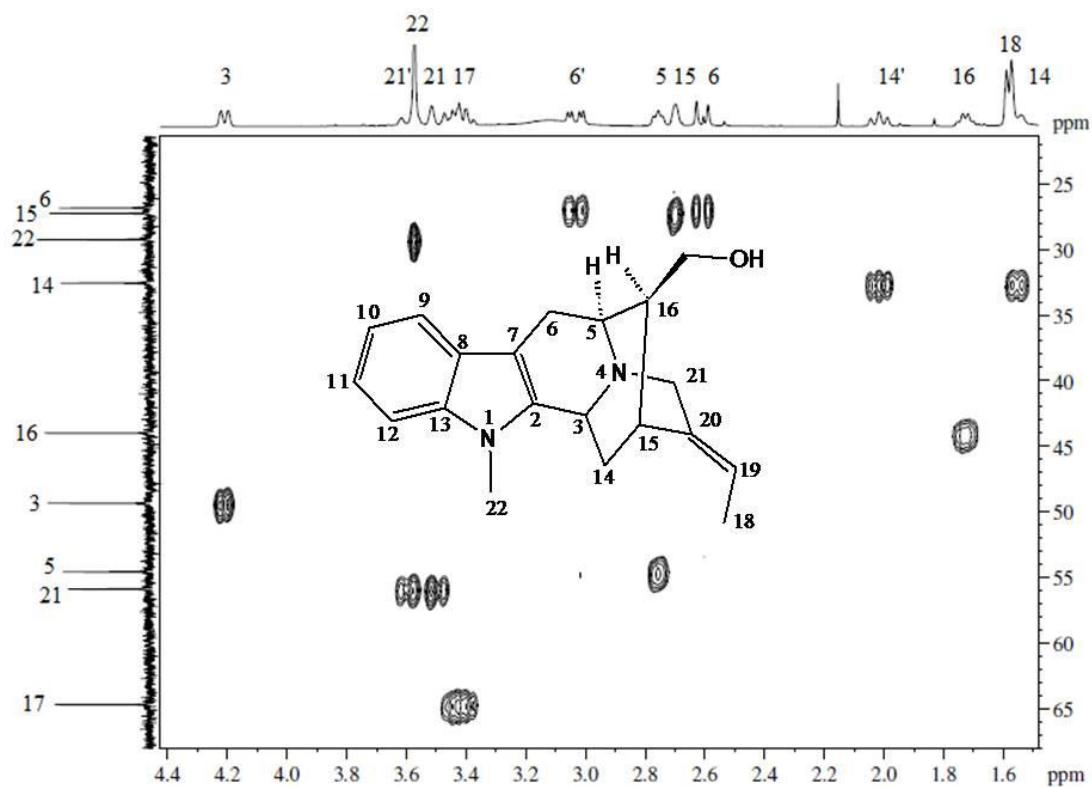
Fonte: Lab.RMN-UFSM, 2018

Figura 21 – Expansão do espectro de RMN HMBC de Affinisina em CDCl_3 a 400 MHz.



Fonte: Lab.RMN-UFSM, 2018

Figura 22 – Expansão do espectro de RMN HMBC de Affinisina em CDCl_3 a 400 MHz.



Fonte: Lab.RMN-UFSM, 2018.

Tabela 8 – Dados espectrais de RMN 2D heteronuclear HSQC e HMBC de Affinisina.

Posição	HSQC		HMBC	
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	$^2J_{HC}$	$^3J_{HC}$
2	138,8	-	H-3; H-22	H-6'; H-6; H-14'; H-14
3	49,3	4,20		
5	54,5	2,76		
6'	26,8	3,04		
6	26,8	2,61		
7	103,4	-	H-6; H-6'	H-9; H-5; H-3
8	127,1	-	H-9	H-12; H10; H-6'; H-6
9	118,1	7,38		
10	118,8	7,06		
11	120,9	7,17		
12	108,7	7,26		
13	137,2	-	-	H-9; H-11; H-22
14'	32,5	2,08		
14	32,5	1,56		
15	27,2	2,69		
16	44,0	1,73	H-5; H-17; H-17'; H-15	H-6; H-6'; H-14; H-14'
17	64,7	3,42		
18	12,7	1,58		
19	117,0	5,33		
20	134,7	-	H-21'; H-21; H-15	H-14; H-14'; H-16; H-18
21'	55,8	3,61		
21	55,8	3,49		
22	29,2	3,57		

Nas Tabelas 9 e 10 são descritos os deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C de **22**, assim como os dados utilizados encontrados na literatura (SANTOS, 2009).

Tabela 9 – Dados de RMN de ^1H de Affinisina em CDCl_3 , 400 MHz.

Posição	δ_{H} (ppm)	δ_{H}^* (ppm)
3	4,20 (dd, $J = 10,0; 1,7$ Hz)	4,29 (dl, $J = 8,3$ Hz)
5	2,76 (t, $J = 6,4$ Hz)	2,75 (m)
6'	3,04 (dd, $J = 15,5; 5,1$ Hz)	3,03 (m)
6	2,61 (d, $J = 15,5$ Hz)	2,75 (m)
9	7,38 (d, $J = 7,8$)	7,43 (d, $J = 7,7$ Hz)
10	7,06(ddd, $J = 7,8; 7,0; 0,9$ Hz)	7,03 (m)
11	7,17(ddd, $J = 8,1; 7,5; 1,2$; Hz)	7,14 (m)
12	7,26 (d, $J = 8,3$ Hz)	7,33 (d, $J = 8,2$ Hz)
14'	2,08 (t, $J = 11,57$ Hz)	2,18 (m)
14	1,56 (m)	1,70 (m)
15	2,69 (s)	2,67 (m)
16	1,73 (m)	1,82 (m)
17	3,42 (2H,m)	3,41 (2H, m)
18	1,58 (dt, $J = 6,7; 1,9$ Hz)	1,57 (d, $J = 6,8$ Hz)
19	5,33 (qt, $J = 6,7; 1,8$ Hz)	5,48 (q, $J = 6,8$ Hz)
21'	3,61 (m)	3,65 (m)
21	3,49 (m)	3,53 (m)
22	3,57 (3H, s)	3,67 (3H, s)

δ_{H}^* (CDCl_3 , 500 MHz) conforme SANTOS, 2009.

Tabela 10 - Dados de RMN de ^{13}C de Affinisina em CDCl_3 , 100 MHz.

Posição	δ_{C} (ppm)	δ_{C}^* (ppm)
2	138,8	140,5
3	49,3	50,6
5	54,5	56,3
6	26,8	27,9
7	103,4	104,1
8	127,1	125,8
9	118,1	118,9
10	118,8	120,0
11	120,9	122,2
12	108,7	109,9
13	137,2	139,1
14	32,5	33,9
15	27,2	28,6
16	44,0	45,7
17	64,7	65,7
18	12,7	13,2
19	117,0	118,3
20	134,7	136,2
21	55,8	56,9
22	29,2	29,1

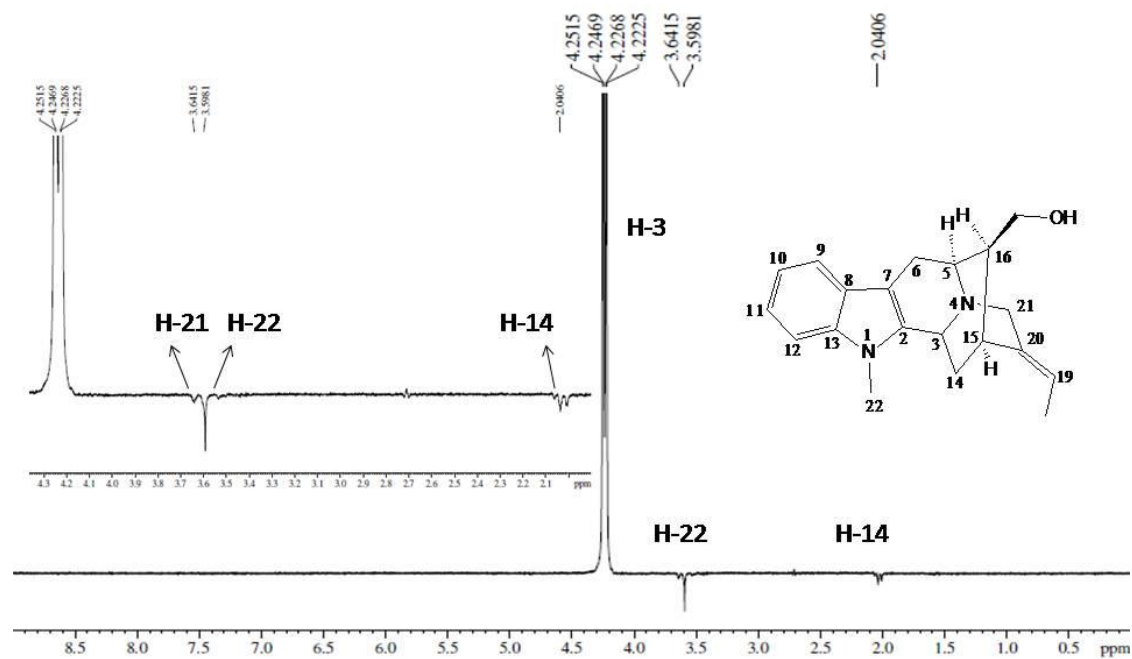
δ_{C}^* (CDCl_3 , 125 MHz) conforme SANTOS, 2009.

A estereoquímica relativa do alcaloide **22** foi definida a partir do método de ressonância magnética nuclear NOESY 1D. Esse método consiste na irradiação do sinal de um hidrogênio específico. Quando aplicado o programa de pulso, os sinais de hidrogênios que mantêm correlação espacial a ele são identificados na fase negativa do espectro de NOESY 1D.

Fazendo o uso deste método, foram definidos três centros quirais na estrutura, baseando-se nos hidrogênios H-3 e H-16. No espectro de NOESY 1D H-3 (Figura 23) pode-se observar correlações espaciais apenas com os H-21, H-22 e H-14, e não com o H-5, enquanto que o H-16 (Figura 24) apresenta correlações espaciais com os hidrogênios H-5, H-6 e H-15.

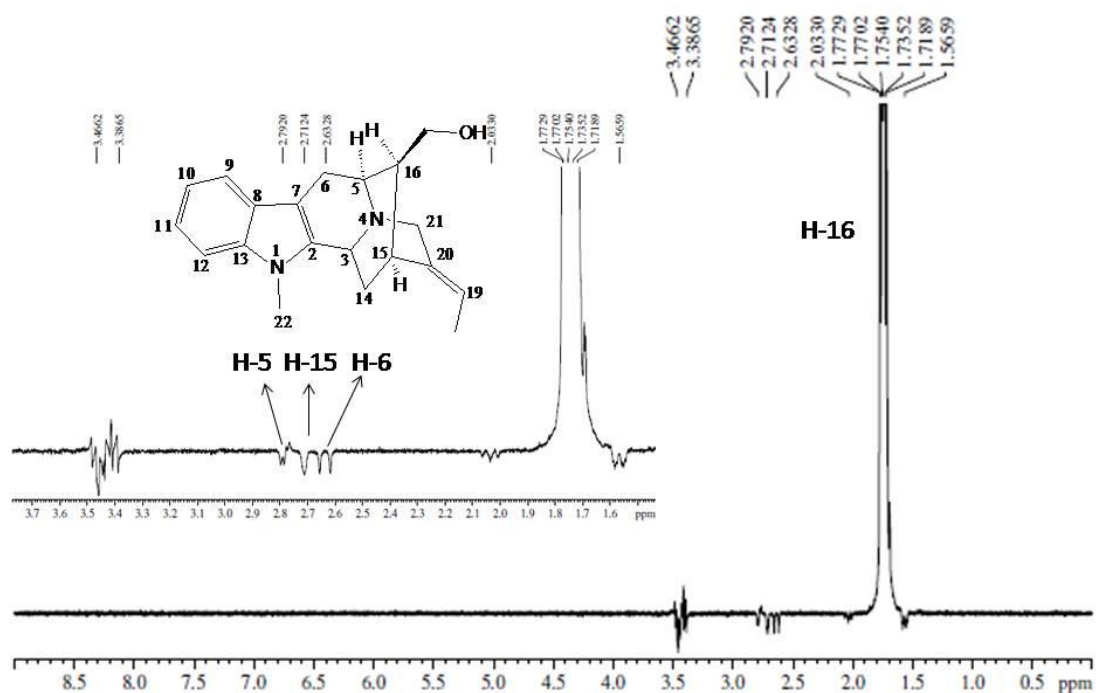
Desta forma foi possível definir a estereoquímica relativa dos centros quirais C-5(S*), C-15(S*) e C-16(S*) para o alcaloide **22**, visto que os hidrogênios H-16, H-15 e H-5 possuem correlação espacial entre si.

Figura 23– Espectro de RMN NOESY 1D, irradiação H-3, para **22**.



Fonte: Lab.RMN-UFSM, 2018.

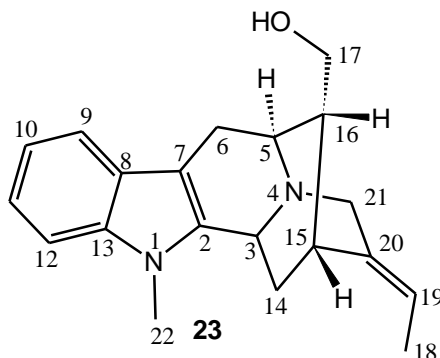
Figura 24 - Espectro de RMN NOESY 1D, irradiação H-16, para **22**.



Fonte: Lab. RMN-UFSM, 2018.

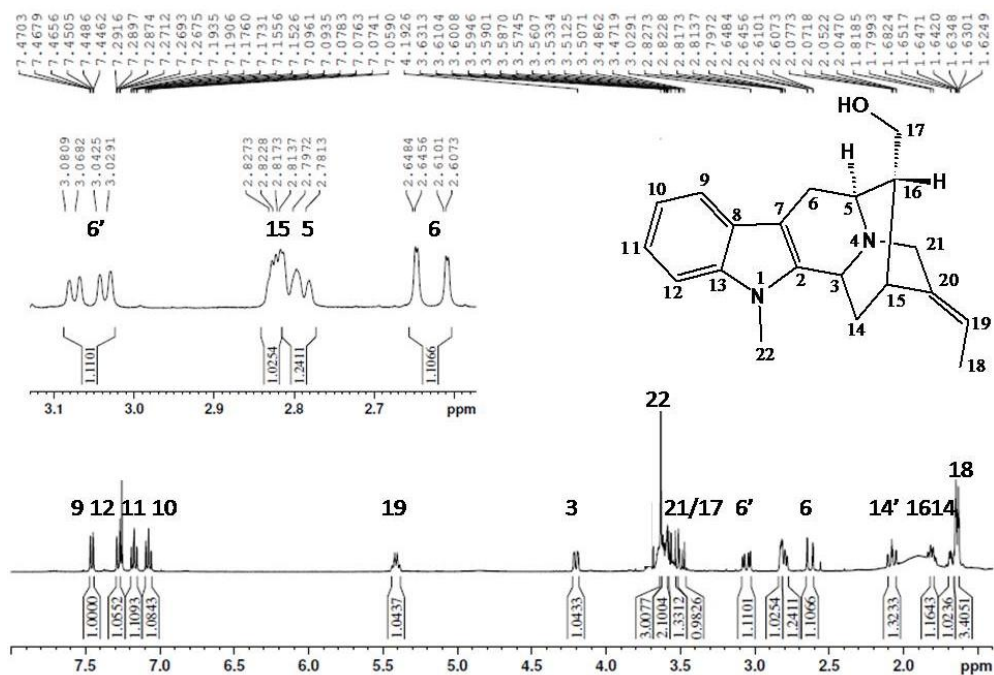
5.2.1.3 16-EPIAFFINISINA (23)

O alcalóide de esqueleto corinanteano, 16-epiaffinisina (23) foi isolado na forma de um sólido amarelo claro, da FAEB 80:20 (clorofórmio: metanol) a partir do EBM das cascas de *T. catharinensis*, conforme descrito na Parte Experimental (pag. 37), sendo identificado após análises de técnicas de RMN uni e bidimensionais de ^1H e ^{13}C , e comparação com dados da literatura.



Através da análise do espectro de ^1H (Figura 25), pode-se observar a semelhança com o alcaloide **22**. Nesse observa-se uma pequena diferença nos deslocamentos químicos e multiplicidades dos hidrogênios H-5, H-15 e H-16, com deslocamentos correspondentes δ 2,79 (1H, dd, $J = 6,20; 1,0$ Hz), δ 2,82 (1H, m), δ 1,80 (1H, m).

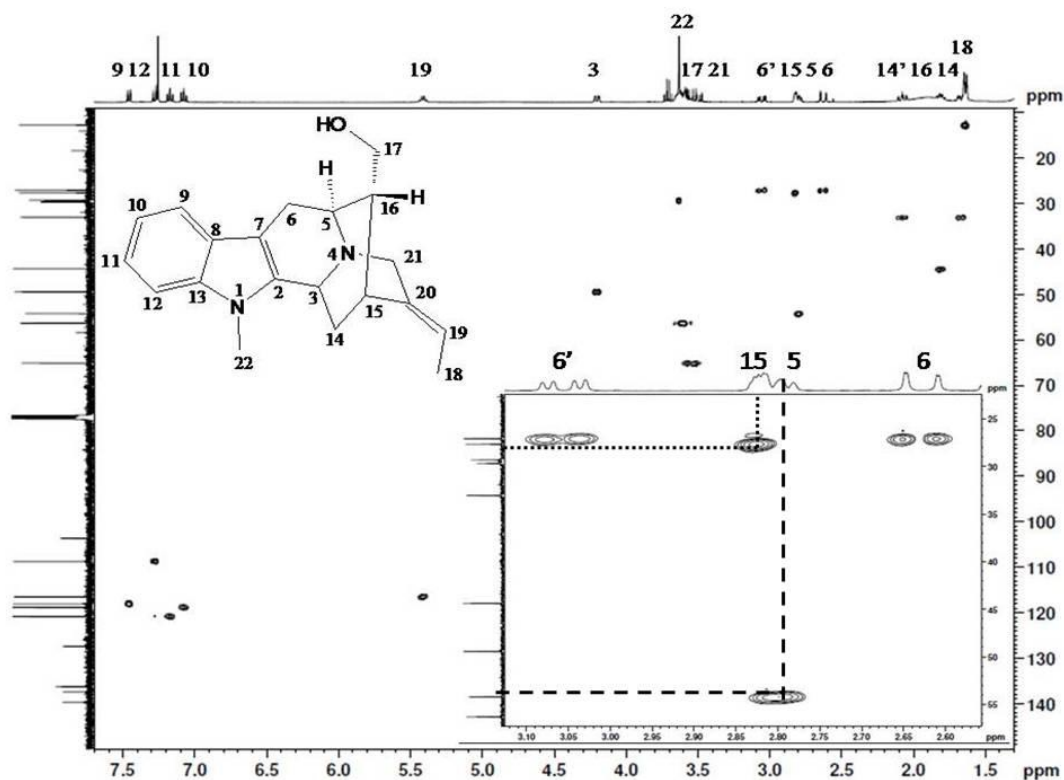
Figura 25 – Espectro de RMN de ^1H de Epiaffinisina em CDCl_3 a 400 MHz.



Fonte: Lab. RMN- UFSM, 2018.

Quando analisado o espectro heteronuclear HSQC (figura 26), torna-se evidente que o H-15 está em campo mais desblindado, enquanto que o H-5 está em campo mais blindado. Este comportamento não é observado no alcalóide **22**, visto que o H-15 (δ 2,69) está em campo mais blindado e o H-5 (δ 2,76) em campo mais desblindado.

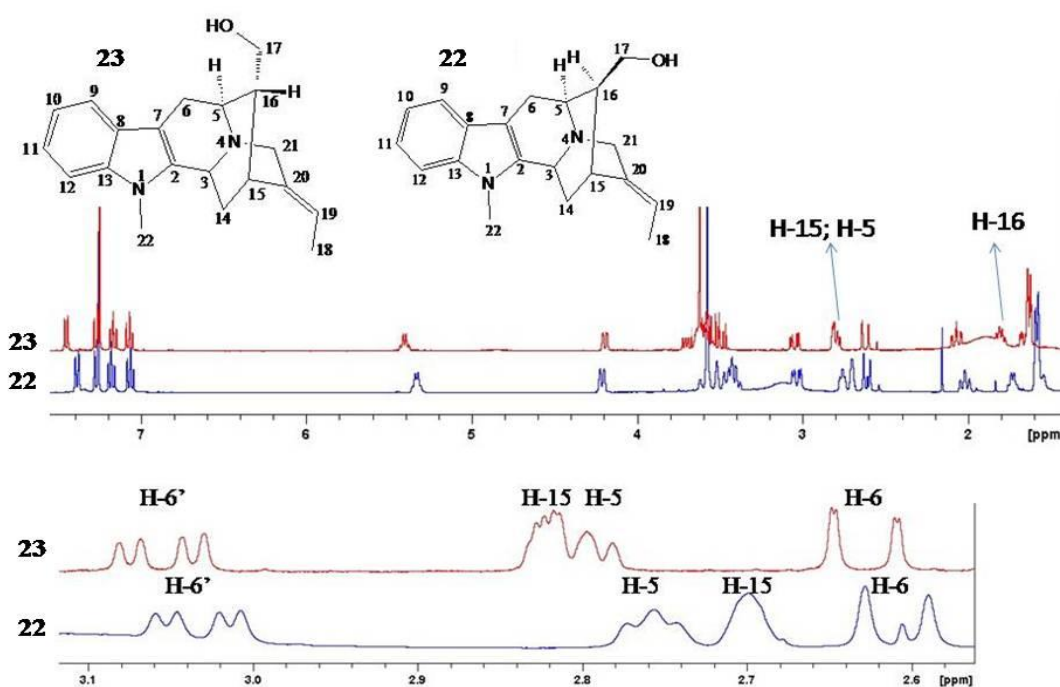
Figura 26 – Espectro de RMN HSQC de Epiaffinisa em CDCl_3 a 400 MHz.



Fonte: Lab. RMN-UFSM, 2018.

Através da sobreposição dos espectros de ^1H dos alcalóides **22** e **23** (Figura 27) essa diferença torna-se nítida.

Figura 27 – Sobreposição dos espectros de ^1H dos alcalóides **23** e **22**

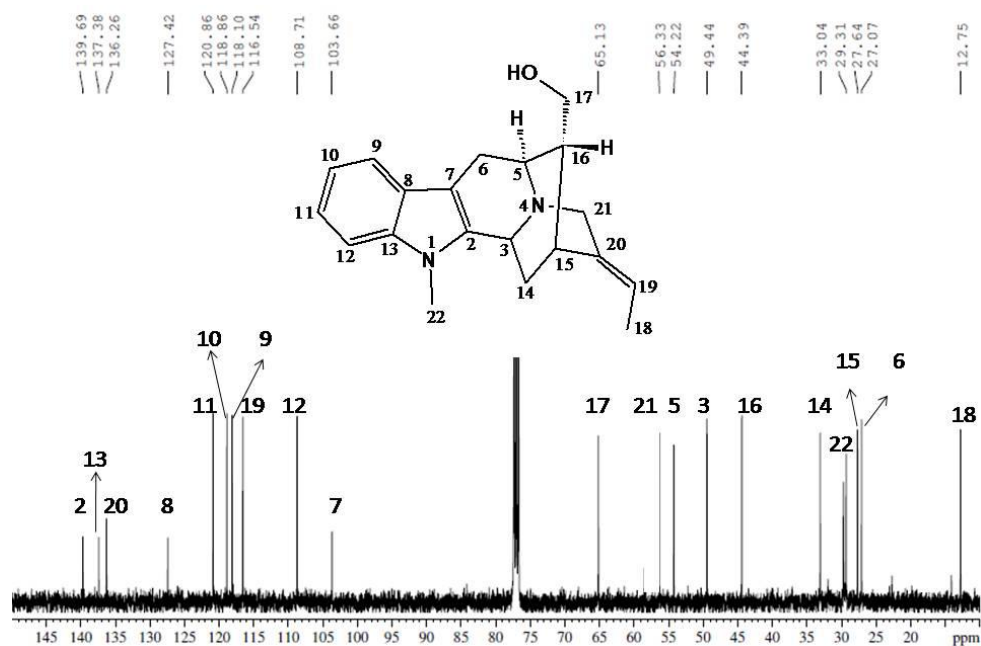


Fonte: Lab. RMN-UFSM, 2018.

Comparando com dados da literatura, concluiu-se que o alcaloide **23** se trata de um diastereoisômero do alcalóide affinisina (**22**), sendo este o alcalóide 16-epiaffinisina (**23**), já relatado em trabalhos anteriores (YU, 2003; ZACOLER, 2005).

Na figura 28 é apresentado o espectro de ^{13}C do alcaloide 16-epiaffinisina (**23**). Nele se observa a presença do sinal em δ 65,1 ppm, referente ao C-17, ligado a uma hidroxila. Os sinais em δ 136,2 ppm e δ 116,5 ppm correspondem aos carbonos sp^2 da dupla ligação exocíclica, C-20 e C-19 sendo o primeiro deles desidrogenado. As metilas C-22 e C-18, apresentam os sinais em δ 29,31 ppm e δ 12,75 ppm, respectivamente.

Figura 28 – Espectro de ^{13}C para Epiaffinisina, em CDCl_3 a 100 MHz.

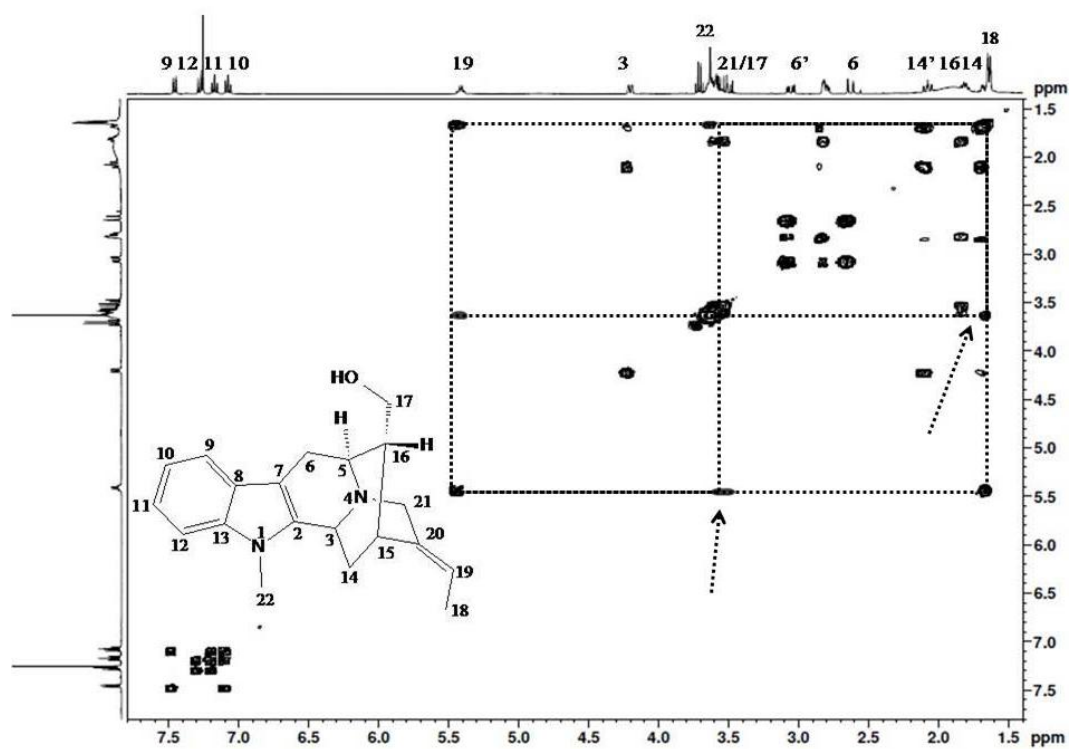


Fonte: Lab. RMN-UFSM, 2018.

No espectro homonuclear 2D COSY é possível observar as principais correlações entre H-H, as quais estão apresentadas nas Figuras 29 e 30.

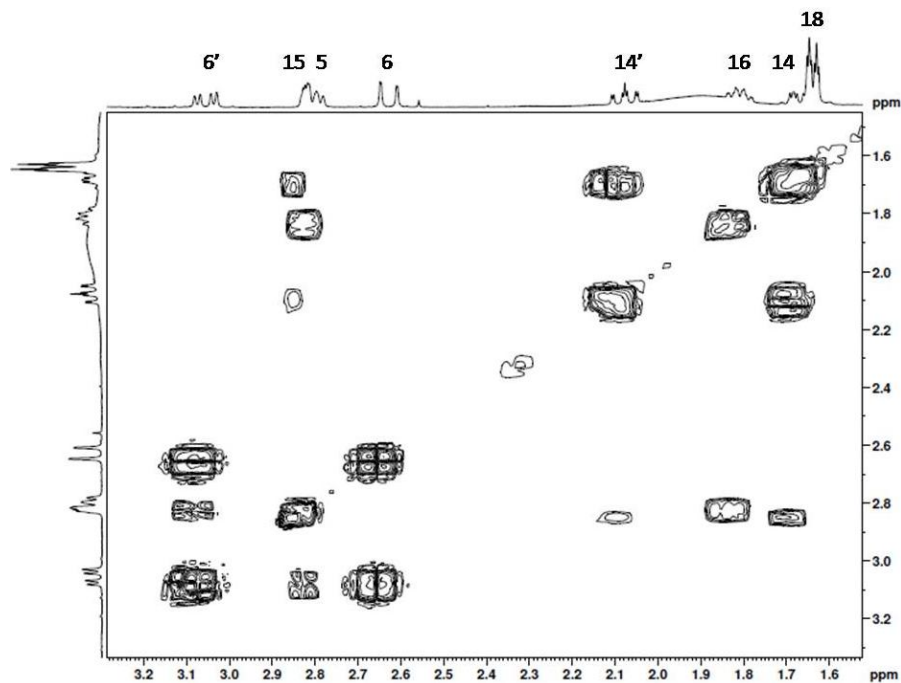
É possível observar os acoplamentos do H-18 com o H-19 e H-21, assim como os acoplamentos do H-19 com o H-21 e H-18. Os acoplamentos entre o H-3 e os hidrogênios diastereotópicos, H-14 e H-14'. Não há o acoplamento do H-15 com o H-16.

Figura 29 – Espectro de RMN 2D COSY, para Epiiaffinisina, em CDCl_3 .



Fonte: Lab. RMN-UFSM, 2018

Figura 30 - Expansão do espectro de RMN 2D COSY, para Epiiaffinisina, em CDCl_3



Fonte: Lab. RMN-UFSM, 2018.

Nas Tabelas 11 e 12 estão descritos os deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C de **23**, bem como os dados utilizados como base da literatura (ZACOLER, 2005).

Tabela 11 – Dados de RMN de ^1H de Epiaffinisina em CDCl_3 , 400 MHz.

Posição	δ_{H} (ppm)	δ_{H}^* (ppm)
3	4,20 (dd, $J = 9,8; 2,4$ Hz)	4,21 (dd, $J = 9,9; 2,7$ Hz)
5	2,79 (dd, $J = 6,2; 1,0$ Hz)	2,79(dd, $J = 6,0; 1,2$ Hz)
6'	3,05 (dd, $J = 15,3; 4,0$ Hz)	3,06 (dd, $J = 15,6; 4,8$ Hz)
6	2,62 (dd, $J = 15,3; 1,2$ Hz)	2,63(dd, $J = 15,6; 1,2$ Hz)
9	7,45 (dt, $J = 7,7; 1,0$ Hz)	7,48 (bd, $J = 7,5$ Hz)
10	7,07(ddd, $J = 7,8; 7,7; 1,0$ Hz)	7,09(ddd, $J = 8,4; 7,5; 1,2$ Hz)
11	7,17(ddd, $J = 9,2; 8,1; 1,2; \text{ Hz}$)	7,18 (ddd, $J = 8,4; 8,1; 1,2$ Hz)
12	7,28 (dt, $J = 8,0; 1,0$ Hz)	7,29 (bd, $J = 8,1$ Hz)
14'	2,07 (ddd, $J = 12,2; 10,2; 2,3$ Hz)	2,08(ddd, $J = 11,4; 10,2; 2,4$ Hz,)
14	1,68 (m)	1,67 (m)
15	2,82 (m)	2,83 (m)
16	1,80 (m)	1,81 (m)
17'	3,55 (m)	3,60 (dd, $J = 10,5; 8,1$ Hz)
17	3,49 (dd, $J = 10,6; 8,3$ Hz)	3,52 (dd, $J = 10,5; 8,4$ Hz)
18	1,60 (3H,dt, $J = 7,0; 1,9$ Hz)	1,65 (3H,dd, $J = 6,9; 2,1$ Hz)
19	5,41 (qt, $J = 7,0; 2,0$ Hz)	5,42 (bq, $J = 6,9$ Hz)
21'	3,60(2H,m)	3,62 (2H,m)
22	3,63 (3H, s)	3,64 (3H, s)

δ_{H}^* (CDCl_3 , 300 MHz) conforme ZACOLER, 2005.

Tabela 12 – Dados de RMN de ^{13}C de Epiiaffinisina em CDCl_3 , 100 MHz.

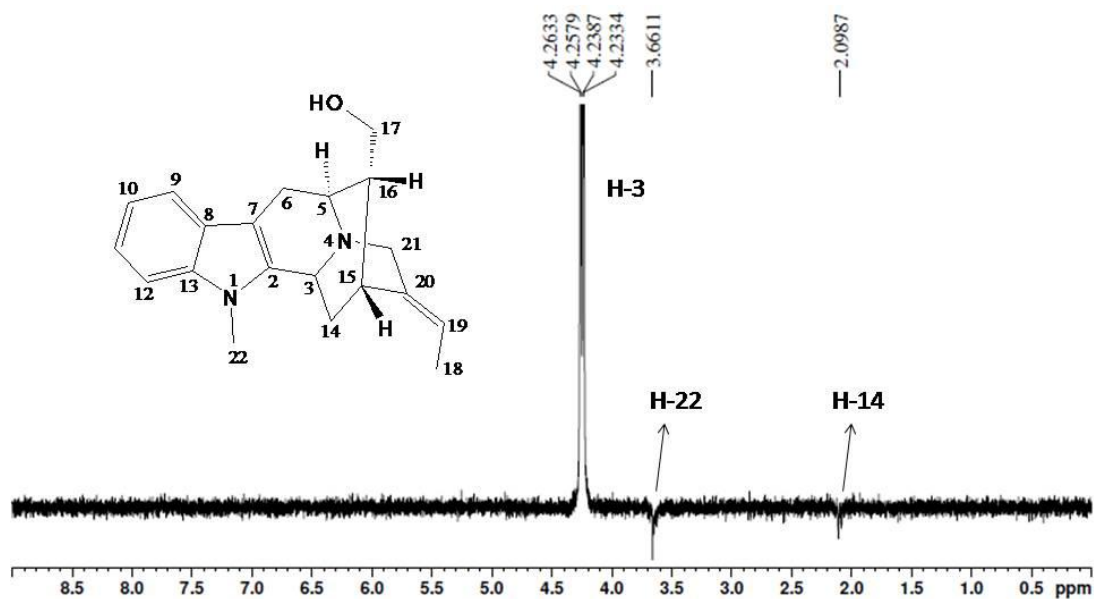
Posição	δ_{C} (ppm)	δ_{C}^* (ppm)
2	139,6	139,8
3	49,4	49,4
5	54,2	54,1
6	27,0	27,0
7	103,6	103,7
8	127,4	127,5
9	118,0	118,2
10	118,8	118,9
11	120,8	120,9
12	108,7	108,8
13	137,3	137,4
14	33,0	32,9
15	27,6	27,5
16	44,3	44,3
17	65,1	65,1
18	12,7	12,7
19	116,5	116,6
20	136,2	136,4
21	56,3	56,4
22	29,3	29,2

δ_{C}^* (CDCl_3 , 75,5 MHz) conforme ZACOLER, 2005.

Fazendo uso do método de RMN NOESY 1D, foi possível definir três centros quirais da estrutura, baseando-se nos hidrogênios H-3 e H-16. No espectro de NOESY 1D para H-3 (Figura 31), pode-se observar as correlações espaciais com os hidrogênios H-22 e H-14, enquanto que para o H-16 (Figura 32) observam-se correlações espaciais com os hidrogênios H-6 e H-15.

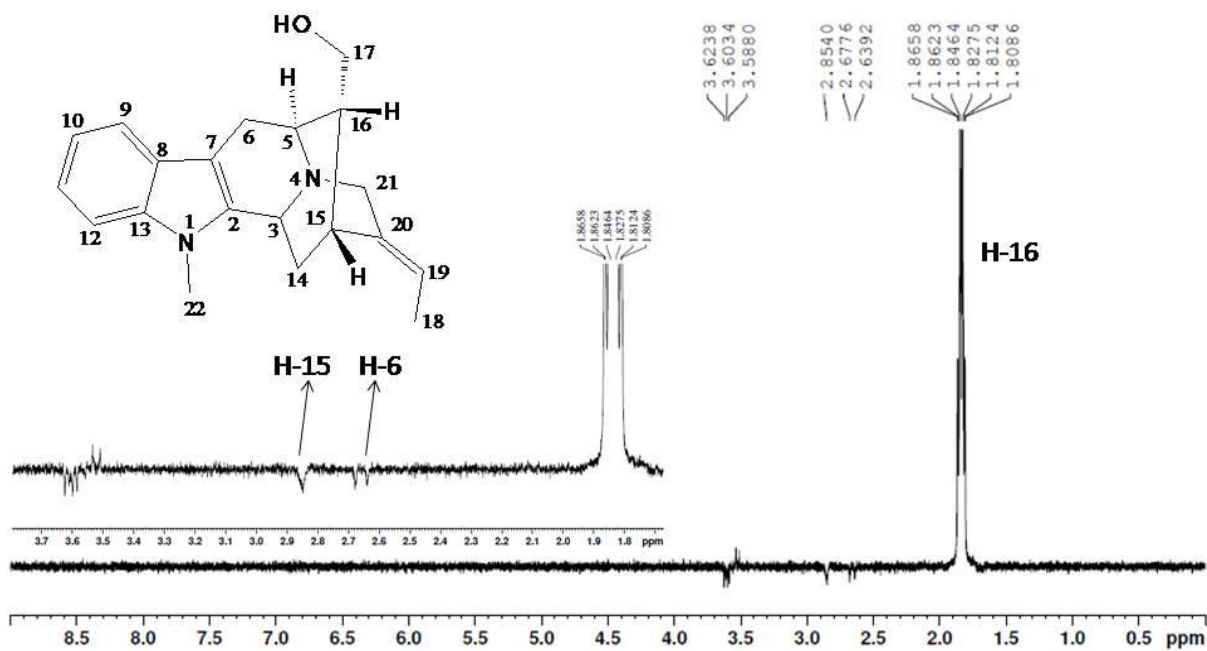
Desta forma foi possível definir a estereoquímica relativa dos centros quirais C-5(S^*), C-15(R^*) e C-16(R^*) para o alcalóide **23**, visto que os hidrogênios H-16 e H-15 possuem correlação espacial entre si.

Figura 31– Espectro de RMN NOESY 1D, irradiação H-3, para 23



Fonte: Lab. RMN-UFSM, 2018.

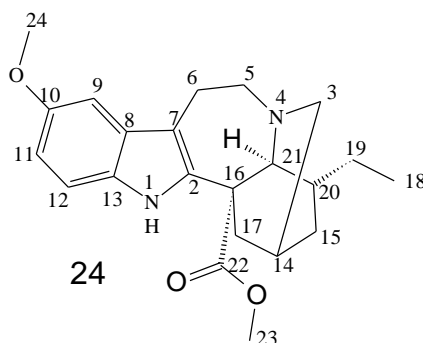
Figura 32 - Espectro de RMN NOESY 1D, irradiação H-16, para 23



Fonte: Lab. RMN-UFSM, 2018.

5.2.1.4 VOACANGINA(24)

O alcalóide de esqueleto ibogano, voacangina (**24**), foi isolado na forma de cristais amarelados, do EBH e da FAEA 15:85 (Acetato de etila: hexano) das cascas do caule de *T. catharinensis*, como descrito na Parte Experimental (pag. 35 e 36), sendo identificado após análises de técnicas de RMN uni e bidimensionais de ^1H e ^{13}C , medidas de raios-X e comparação com dados da literatura.

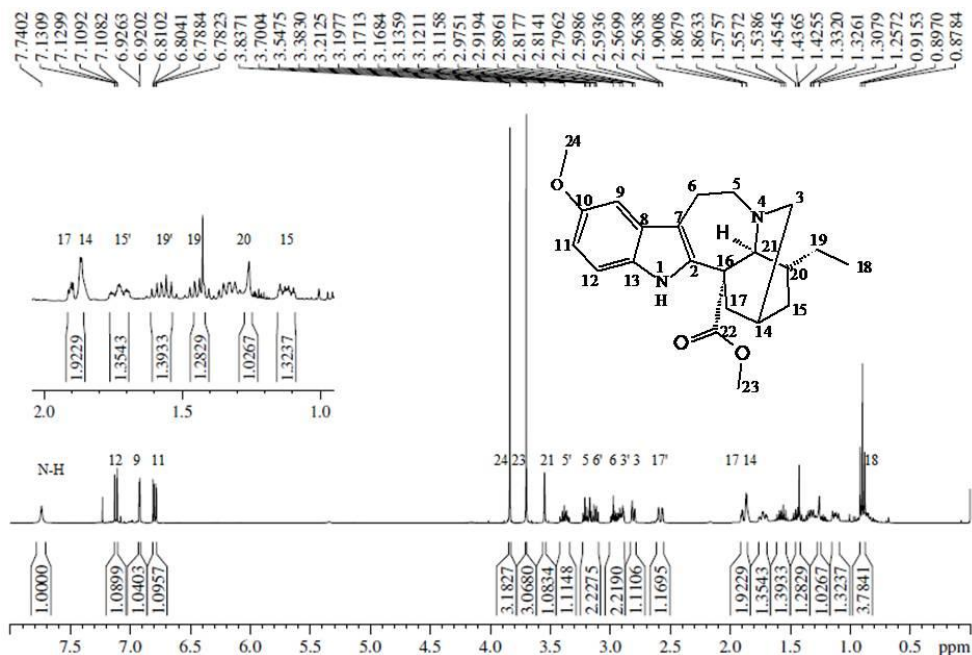


Através da análise do espectro de ^1H (Figura 33), pode-se observar três simpletos em δ 3,83, δ 3,70, δ 3,54 ppm, onde dois deles são integrados para três hidrogênios, atribuídos às metilas H-24 e H-23 e o outro integrado para um hidrogênio, atribuído ao H-21, respectivamente.

Os sinais em δ 7,12, δ 6,92 e δ 6,79 ppm, integrado para um hidrogênio cada, correspondem H-12, H-9 e H-11 respectivamente, característicos de um anel benzênico de um núcleo indólico substituído na posição orto do anel.

O sinal simpleto em δ 7,74 ppm, integrado para um hidrogênio é característico de hidrogênio ligado ao átomo de nitrogênio do pirrol que compõe o núcleo principal do alcalóide. O sinal tripleto em δ 0,89 ppm é atribuído a metila H-18.

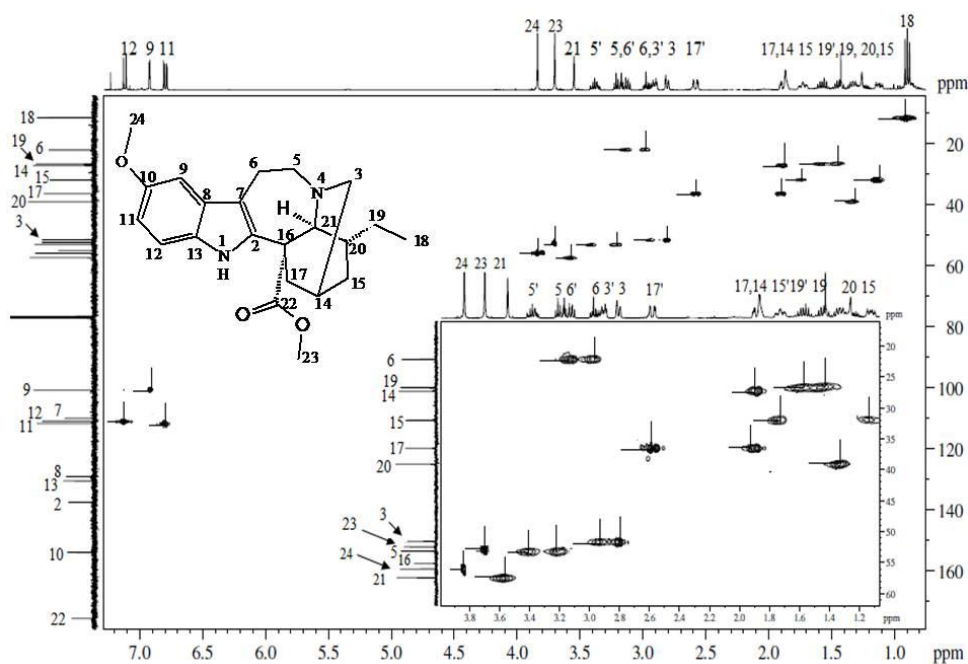
Figura 33 – Espectro de RMN de ^1H de Voacangina em CDCl_3 a 400 MHz.



Fonte: Lab.RMN-UFSM, 2018

Através da análise do espectro HSQC (Figura 34) torna-se possível a identificação das correlações entre carbono e hidrogênio existentes na estrutura. Os dados de correlação carbono-hidrogênio estão apresentados na tabela 13.

Figura 34 – Espectro de RMN HSQC de Voacangina em CDCl_3 a 400 MHz.

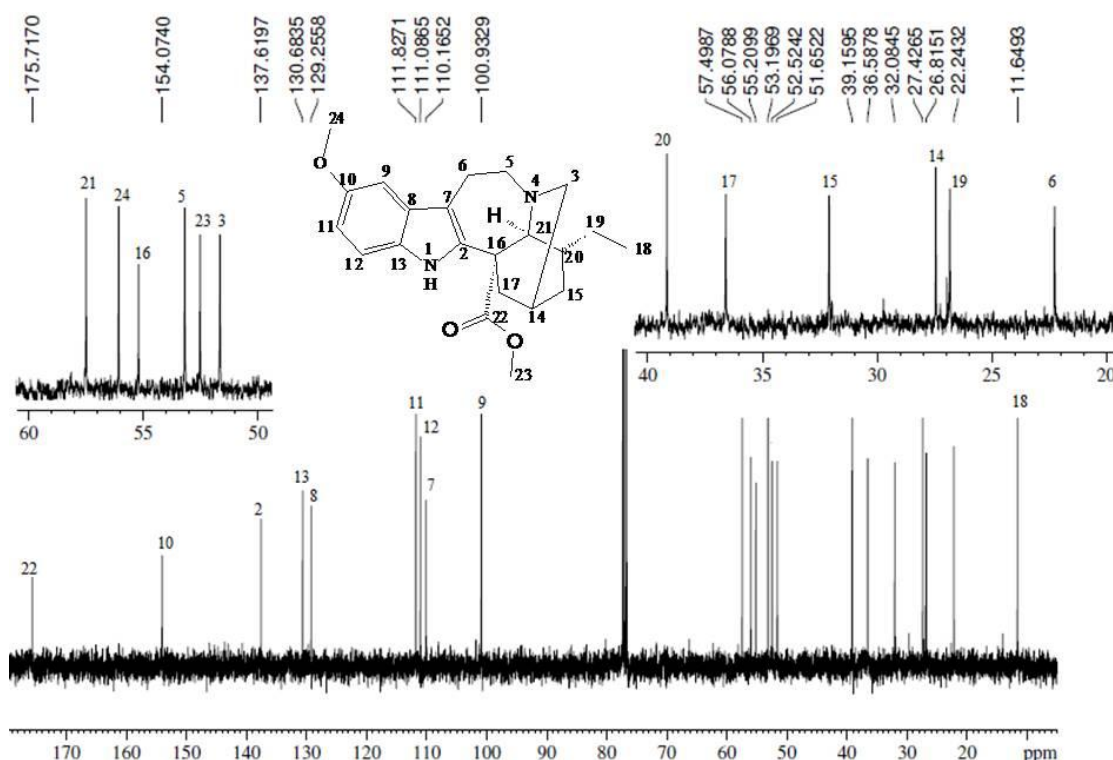


Fonte: Lab.RMN-UFSM, 2018.

O espectro de RMN ^{13}C para voacangina (Figura 35) apresentou sinal em δ 175,7 ppm, referente à carbonila C-22. Para os carbonos metínicos, C-11, C-12, C-9, os sinais aparecem em δ 111,8 ppm, δ 111,0 ppm e δ 100,9 ppm, respectivamente. Os sinais em δ 154,0 ppm, δ 137,6 ppm, δ 130,6 ppm, δ 129,2 ppm e δ 110,1 ppm correspondem aos carbonos desidrogenados C-10, C-2, C-13, C-8 e C-7.

Os sinais das metilas C-24, C-23 e C-18, correspondem a δ 56,0 ppm, δ 52,5 ppm e δ 11,6 ppm, respectivamente.

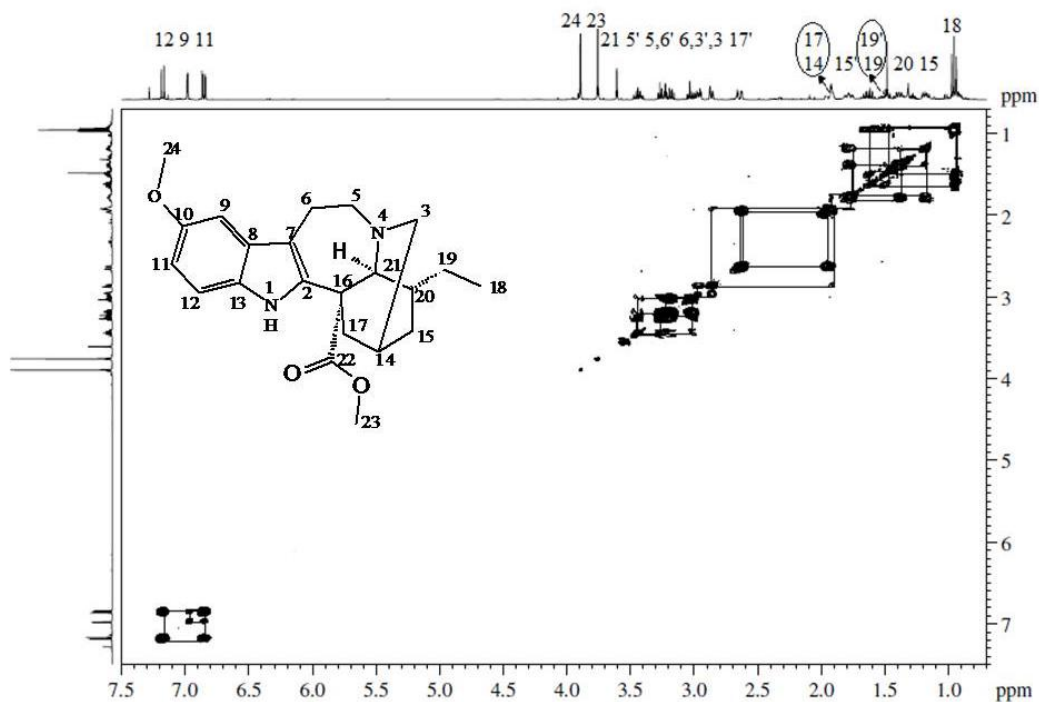
Figura 35 – Espectro de RMN de ^{13}C de Voacangina em CDCl_3 a 100 MHz.



Fonte: Lab.RMN-UFSM, 2018

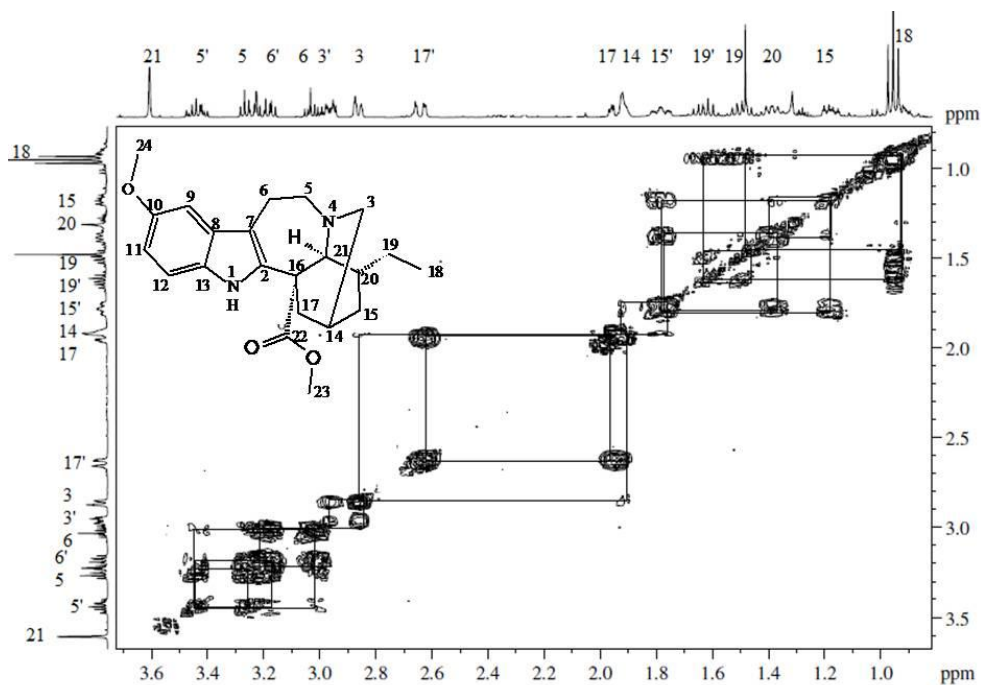
No espectro 2D COSY puderam-se observar as correlações dos hidrogênios, conforme descreve a figura 36, e sua expansão (Figura 37).

Figura 36 – Espectro de RMN COSY de Voacangina em CDCl_3 a 400 MHz



Fonte: Lab.RMN-UFSM, 2018

Figura 37 – Expansão de espectro de RMN COSY de Voacangina em CDCl_3 a 400 MHz

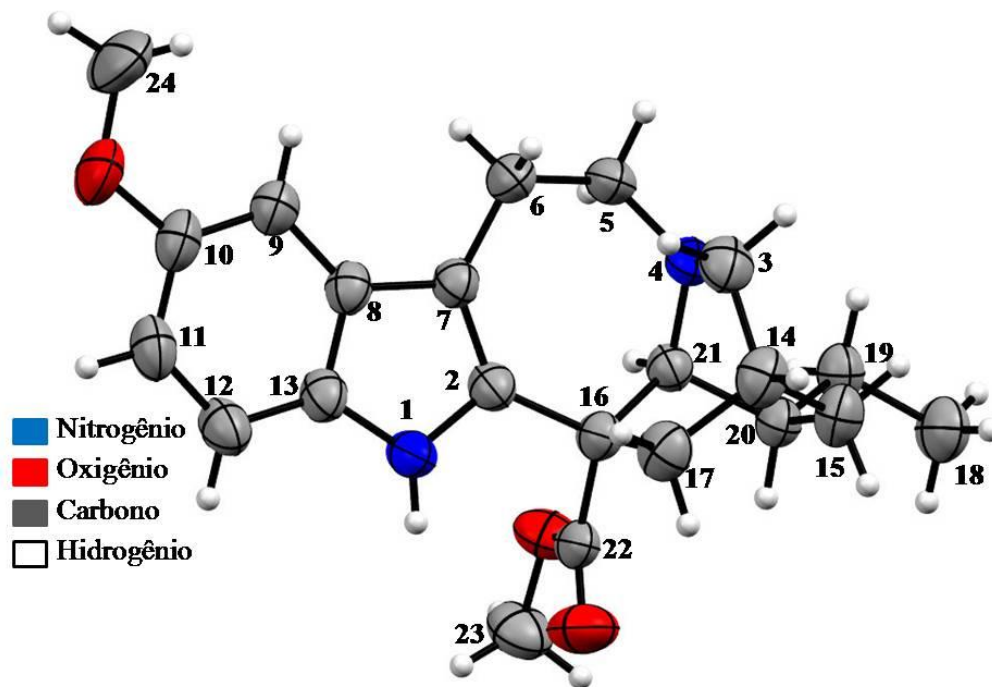


Fonte: Lab.RMN-UFSM, 2018.

Analisando o espectro de COSY, é possível observar o acoplamento do H-14 com o H-3. O H-3 apresenta a multiplicidade duplo triplete, oriunda do acoplamento com a vizinhança, H-3' ($J = 10,93$ Hz) e H-14.

Através da difração de raio-X (Figura 38) fica confirmada a configuração absoluta, com os centros quirais apresentando configuração C14- R, C16-S, C20-S, C21-R e N4-S.

Figura 38– Difração de raio- X de Voacangina.



Fonte: Lab. Difração raio- X, UFSM.

Na Tabela 13 são descritos os deslocamentos químicos de ^1H , ^{13}C , levando em consideração as correlações do espectro de HSQC de **24**, bem como os dados comparativos da literatura (SANTOS, 2009), para ^{13}C e ^1H .

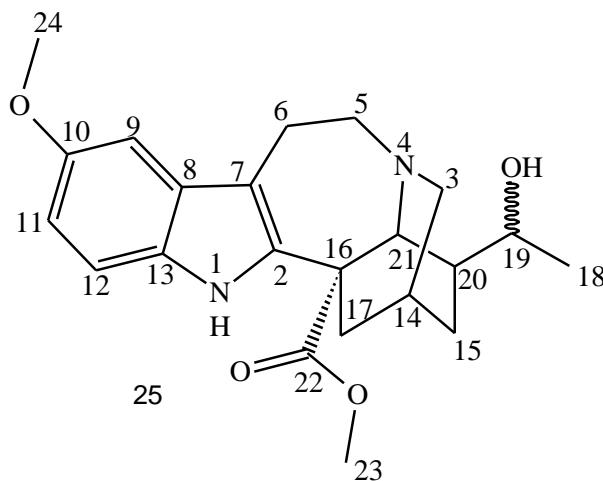
Tabela 13 – Dados de RMN de ^{13}C (100 MHz), ^1H (400 MHz), de Voacangina em CDCl_3 , em comparação com dados da literatura.

Posição	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C}^* (ppm)	δ_{H}^* (ppm)
2	137,6	-	137,7	-
3'	51,6	2,91(m)	51,8	2,93(m)
3		2,80(dt, $J= 10,9;6,9$ Hz)		2,82 (dl, $J= 8,7$ Hz)
5'	53,1	3,38(m)	53,3	3,39(m)
5		3,19(m)		3,24(m)
6'	22,2	3,15(m)	22,3	3,15(m)
6		2,97(m)		3,00(m)
7	110,1	-	110,3	-
8	129,2	-	129,4	-
9	100,9	6,92(d, $J=2,4$ Hz)	101,0	6,94(d, $J= 2,2$ Hz)
10	154,0	-	154,2	-
11	111,8	6,79(dd, $J= 8,6; 2,4$ Hz)	112,0	6,82(dd, $J= 8,7; 2,2$ Hz)
12	111,0	7,12(dd, $J= 8,7; 0,4$ Hz)	111,2	7,14(d, $J= 8,7$ Hz)
13	130,6	-	130,8	-
14	27,4	1,86(m)	27,5	1,92(m)
15'	32,0	1,72(m)	32,2	1,75(m)
15		1,12(m)		1,13(m)
16	55,2	-	55,3	-
17'	36,5	2,58(dd, $J= 11,6; 0,9$ Hz)	36,7	2,60(d, $J= 1,40$ Hz)
17		1,90(dd, $J= 4,2; 2,9$ Hz)		2,58(d, $J= 2,5$ Hz)
18	11,6	0,89(t, $J= 7,4$ Hz)	11,8	0,91(t, $J= 7,4$ Hz)
19'	26,8	1,57(m)	26,9	1,58(m)
19		1,43(m)		1,46(m)
20	39,1	1,26(m)	39,3	1,34(m)
21	57,4	3,54(s)	57,7	3,57(sl)
22	175,7	-	175,8	-
23	52,5	3,70(s)	52,7	3,72(s)
24	56,0	3,83(s)	56,2	3,86(s)

δ_{C}^* (CDCl_3 , 125 MHz), δ_{H}^* (CDCl_3 , 500 MHz) conforme SANTOS, 2009.

5.2.1.5 VOACRISTINA (25)

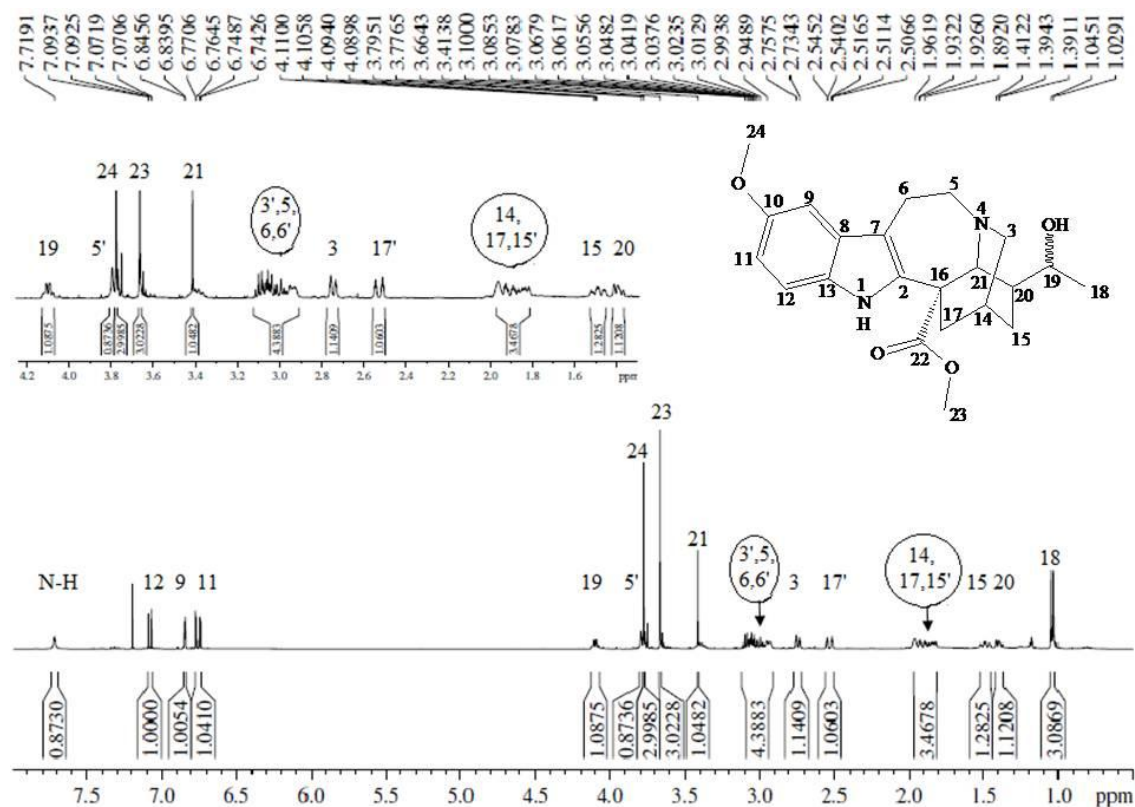
O alcaloide de esqueleto ibogano, voacristina (**25**), foi isolado na forma de um sólido amarelado, do EBH e FAEN 80: 20 (hexano: acetato de etila), das cascas do caule de *T. catharinensis*, conforme descrito na Parte Experimental (pag. 35 e 36), sendo identificado após análises de técnicas de RMN de ^1H e ^{13}C , e comparação com dados da literatura.



Através da análise do espectro de RMN ^1H (Figura 39), pode-se observar a semelhança com o alcaloide **24**. Os dois simpletos em δ 3,7 e δ 3,6 ppm, atribuídos às metoxilas H-24 e H-23 respectivamente.

A metila H-18 é atribuído o sinal δ 1,03 (3H, d, $J= 6,4$ Hz). O sinal δ 4,09 (1H, m) é atribuído ao hidrogênio H-19, devido ao efeito de desblindagem causado pela hidroxila. O simpleto presente em δ 3,41 (1H, s) é atribuído ao H-21.

Figura 39 – Espectro de RMN de ^1H de Voacristina em CDCl_3 a 400 MHz.



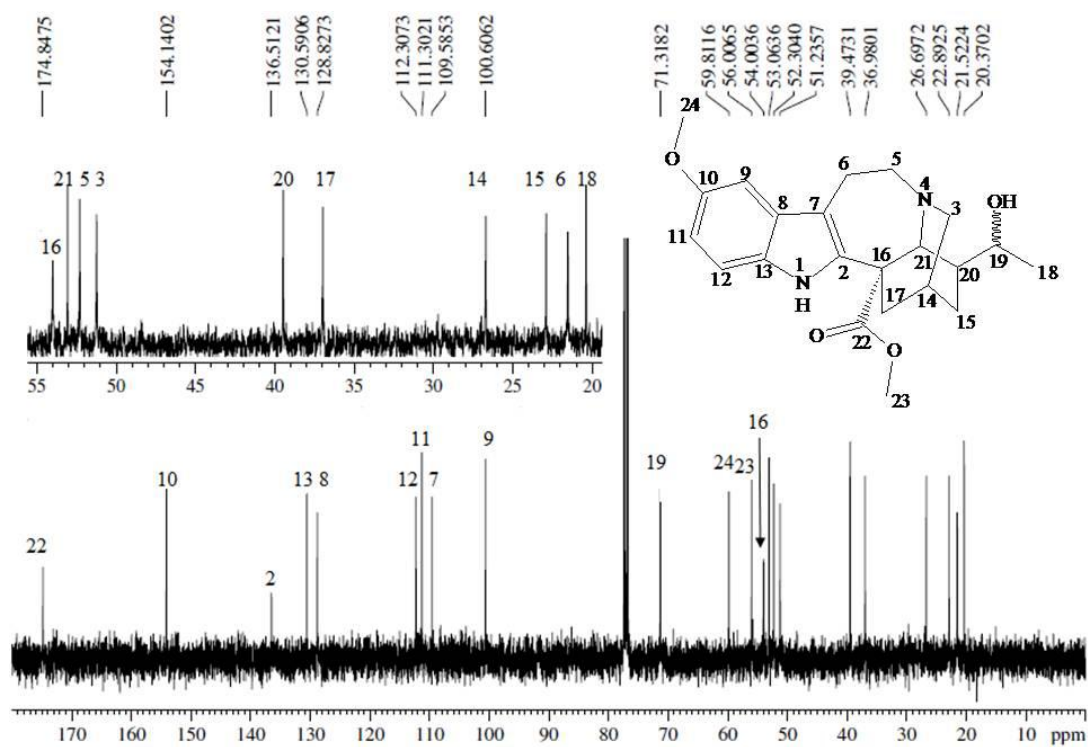
Fonte: Lab.RMN-UFSM, 2018

O espectro de RMN ^{13}C para Voacristina (Figura 40) apresenta sinal em δ 174,8 ppm, referente à carbonila C-22. Os sinais dos carbonos metínicos, C-12, C-11, C-9, aparecem em δ 112,3 ppm, δ 111,3 ppm e δ 100,6 ppm, respectivamente. Os sinais em δ 154,1 ppm, δ 136,5 ppm, δ 130,5 ppm, δ 128,8 ppm e δ 109,5 ppm correspondem aos carbonos desidrogenados C-10, C-2, C-13, C-8 e C-7.

As metilas C-24, C-23 e C-18 foram atribuídos os sinais δ 59,0 ppm, δ 56,0 ppm e δ 20,3 ppm. O sinal em δ 71,3 ppm é atribuído ao C-19.

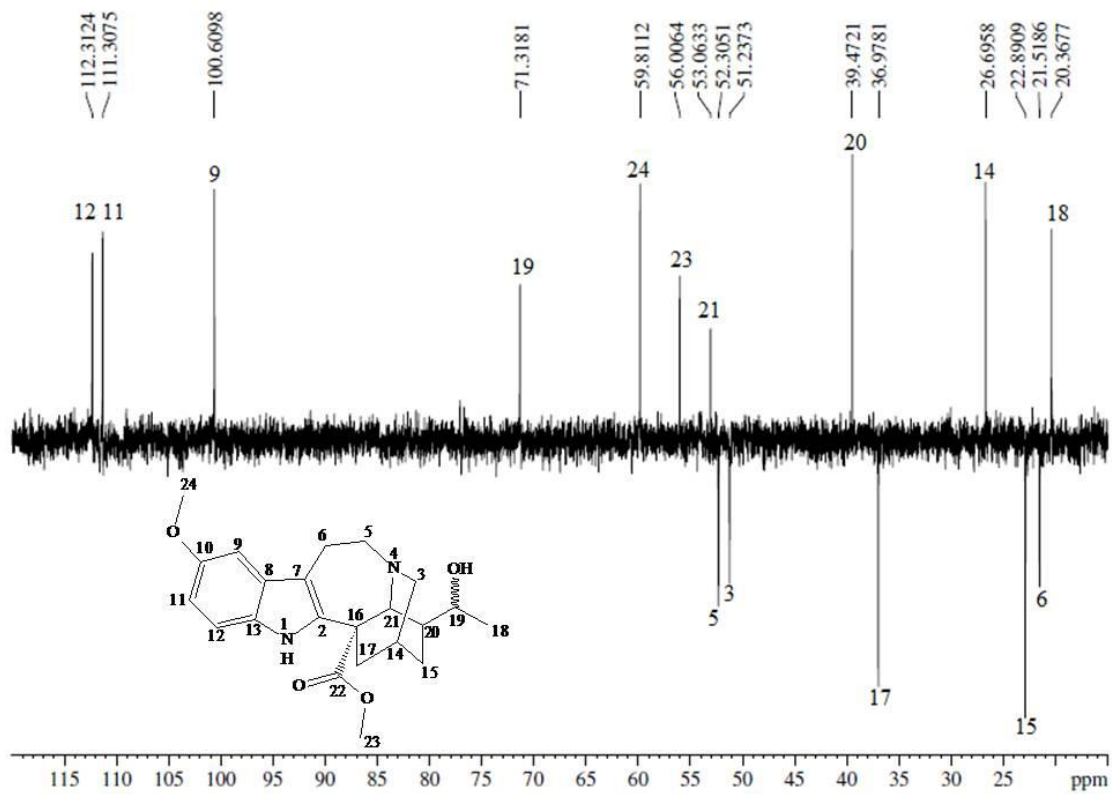
Através do espectro de DEPT 135, Figura 41, visualiza-se a presença de cinco carbonos metilênicos, C-5, C-3, C-17, C-15 e C-6.

Figura 40 – Espectro de RMN¹³C de Voacristina em CDCl₃ a 100 MHz.



Fonte: Lab.RMN-UFSM, 2018

Figura 41 – Espectro de RMN DEPT 135 de Voacristina em CDCl₃ a 100 MHz.



Fonte: Lab.RMN-UFSM, 2018.

Na Tabela 14 são descritos os deslocamentos químicos de ^1H , ^{13}C , de **25**, bem como os da literatura (SANTOS, 2009), para ^{13}C e ^1H .

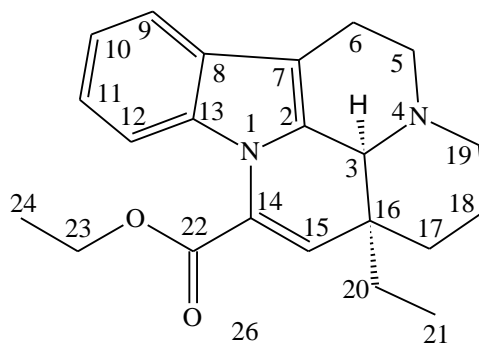
Tabela 14 – Dados de RMN ^{13}C (100 MHz), ^1H (400 MHz) de Voacristina em CDCl_3 , em comparação com dados da literatura.

Posição	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C^*} (ppm)	δ_{H^*} (ppm)
2	136,5	-	136,6	-
3'	51,2	3,12-2,9(m)	51,2	3,20-3,00(m)
3		2,74(dt, $J= 10,5;1,7$ Hz)		2,83 (d, $J=9,1$ Hz)
5'	52,3	3,79(m)	52,5	3,75(m)
5		3,12-2,9(m)		3,20-3,00(m)
6	21,5	3,12-2,9(m)	21,7	3,20-3,00(m)
7	109,5	-	109,7	-
8	128,8	-	129,1	-
9	100,6	6,84(d, $J=2,4$ Hz)	101,0	6,92(s)
10	154,1	-	154,4	-
11	111,3	6,75(dd, $J= 8,7; 2,4$ Hz)	111,5	6,83(dl, $J= 8,7$ Hz)
12	112,3	7,08(dd, $J= 8,7; 0,5$ Hz)	112,6	7,15(d, $J= 8,7$ Hz)
13	130,5	-	130,8	-
14	26,6	1,97-1,8(m)	27,1	2,02(m)
15'	22,8	1,97-1,8(m)	28,7	1,80(m)
15		1,48(m)		1,80(m)
16	54,0	-	53,9	-
17'	36,9	2,52(dt, $J= 15,7;1,9$ Hz)	36,8	2,75(d, $J= 9,7$ Hz)
17		1,97-1,80 (m)		2,00(m)
18	20,3	1,03(d, $J= 6,4$ Hz)	22,4	1,28(d, $J= 6,2$ Hz)
19	71,3	4,09(m)	70,7	3,91(m)
20	39,4	1,39(m)	40,4	1,43(t, $J=8,6$ Hz)
21	53,0	3,41(s)	54,5	4,14(sl)
22	174,8	-	174,9	-
23	56,0	3,66(s)	53,00	3,73(s)
24	59,0	3,77(s)	56,2	3,85(s)

* δ_{C} (CDCl_3 , 125 MHz), δ_{H} (CDCl_3 , 500 MHz) conforme SANTOS, A., 2009.

5.2.1.6 VINPOCETINA (ETIL APOVINCAMINA) (26)

O alcalóide vinpocetina (**26**), é inédito como produto natural, porém sua estrutura já é relatada na literatura, sendo produto sintético. Foi isolado na forma de um sólido cristalino amarelo, 80:20 (acetato de etila: metanol) da FAEA a partir do EBM das cascas de *T. catharinensis*, conforme descrito na Parte Experimental (pag. 36), sendo identificado após análises de técnicas de RMN uni e bidimensionais de ^1H e ^{13}C , medidas de Raio -X.



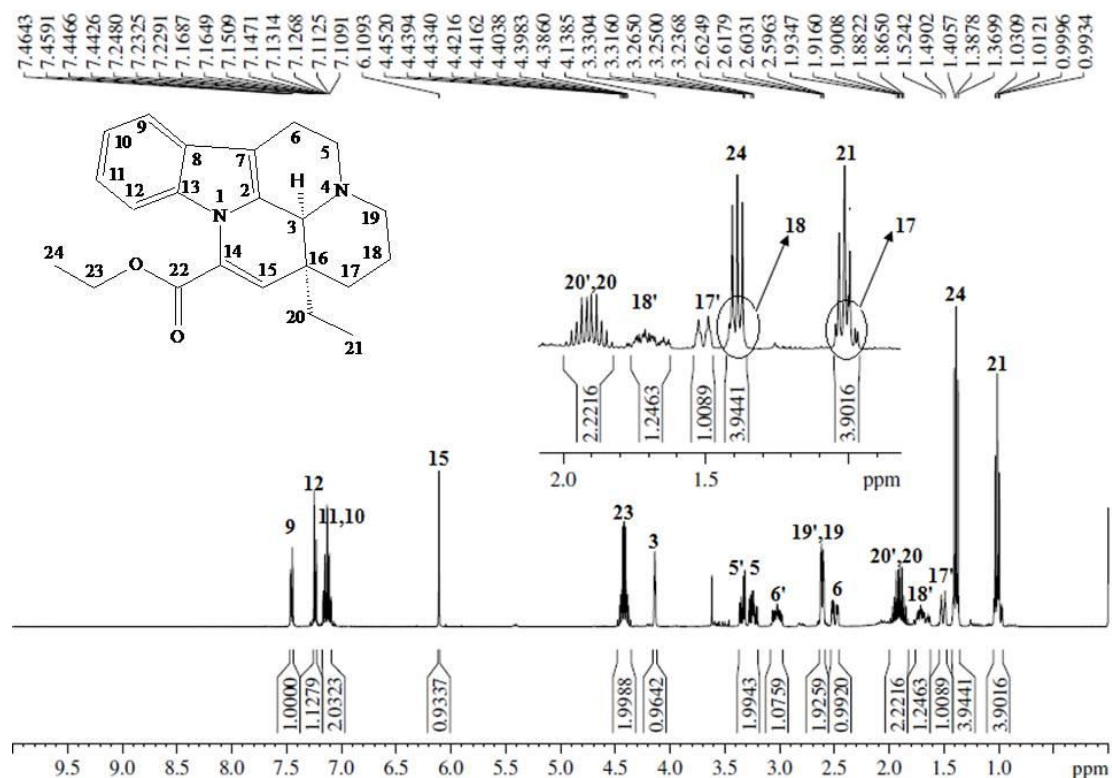
Este alcaloide apresenta esqueleto da classe eburnano (DANIELI & PALMISANO, 1986). Alcaloides desta classe, muito semelhantes a este, já foram identificados na família Apocynaceae como, por exemplo, apovincamina (*Vinca minor*) e Vincamina (*Catharanthus roseus*).

Na literatura, este é apresentado como produto sintético, derivado do alcaloide Apovincamina (NEMES, 2008). Possui inúmeros estudos relacionados com atividades cardiovasculares (CZIBULA, 1992) e disfunção cerebral (BALESTRERI, 1987).

Através da análise do espectro de RMN ^1H (Figura 42), observam-se dois simpletos a δ 6,10 ppm e δ 4,19 ppm, ambos integrados para um hidrogênio e atribuídos aos H-15 e H-3 respectivamente. Também a presença de dois tripletos integrados para três hidrogênios cada, que possuem deslocamentos químicos δ 1,38 ($J= 7,24$ Hz) e δ 1,00 ($J= 7,68$ Hz) são atribuídos aos H-24 e H-21, respectivamente. E o sinal observado em δ 4,41 ppm (2H, m) é atribuído aos hidrogênios metilênicos H-23.

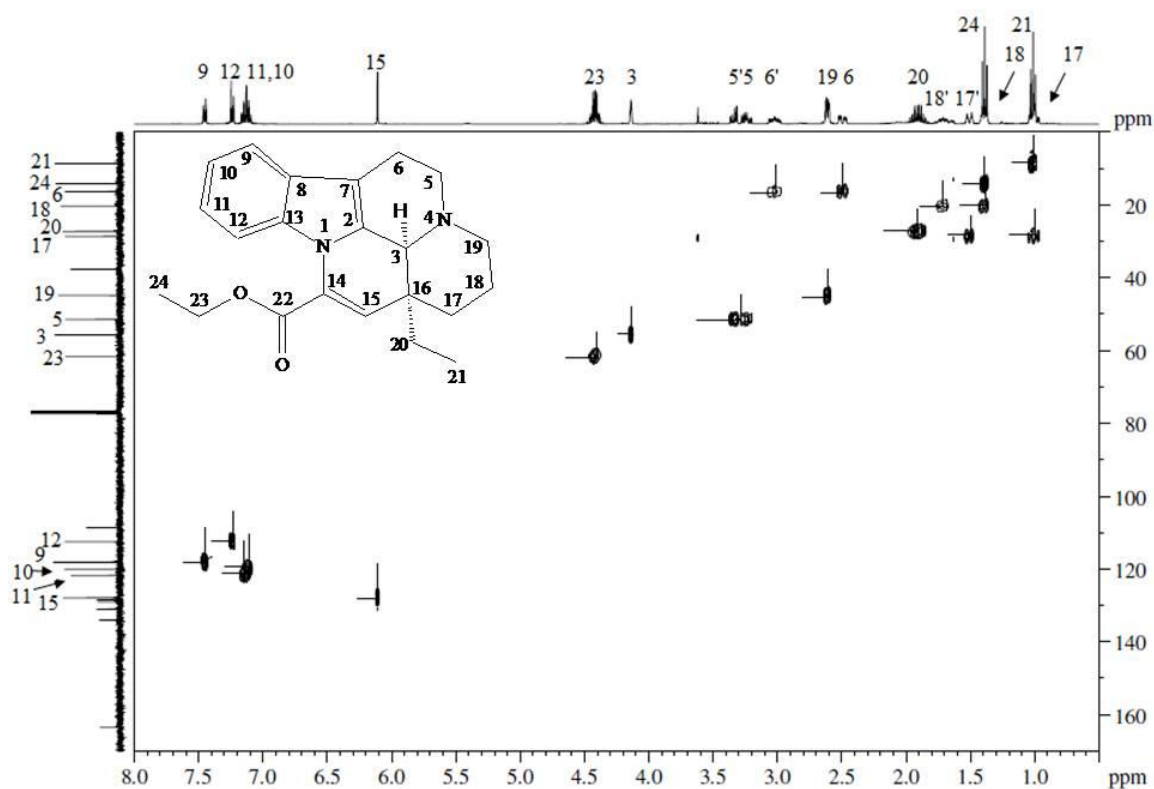
Os sinais em δ 7,45, δ 7,23, δ 7,15 e δ 7,11 ppm, integrado para um hidrogênio cada, correspondem aos H-9, H-12, H-11 e H-10 respectivamente, caracterizando um anel benzênico de um núcleo indólico sem substituintes.

Figura 42 – Espectro de RMN de ^1H de Vinpocetina em CDCl_3 a 400 MHz.



Fonte: Lab.RMN-UFSM, 2018

Figura 43 – Espectro de RMN HSQC de Vinpocetina em CDCl_3 a 400 MHz.

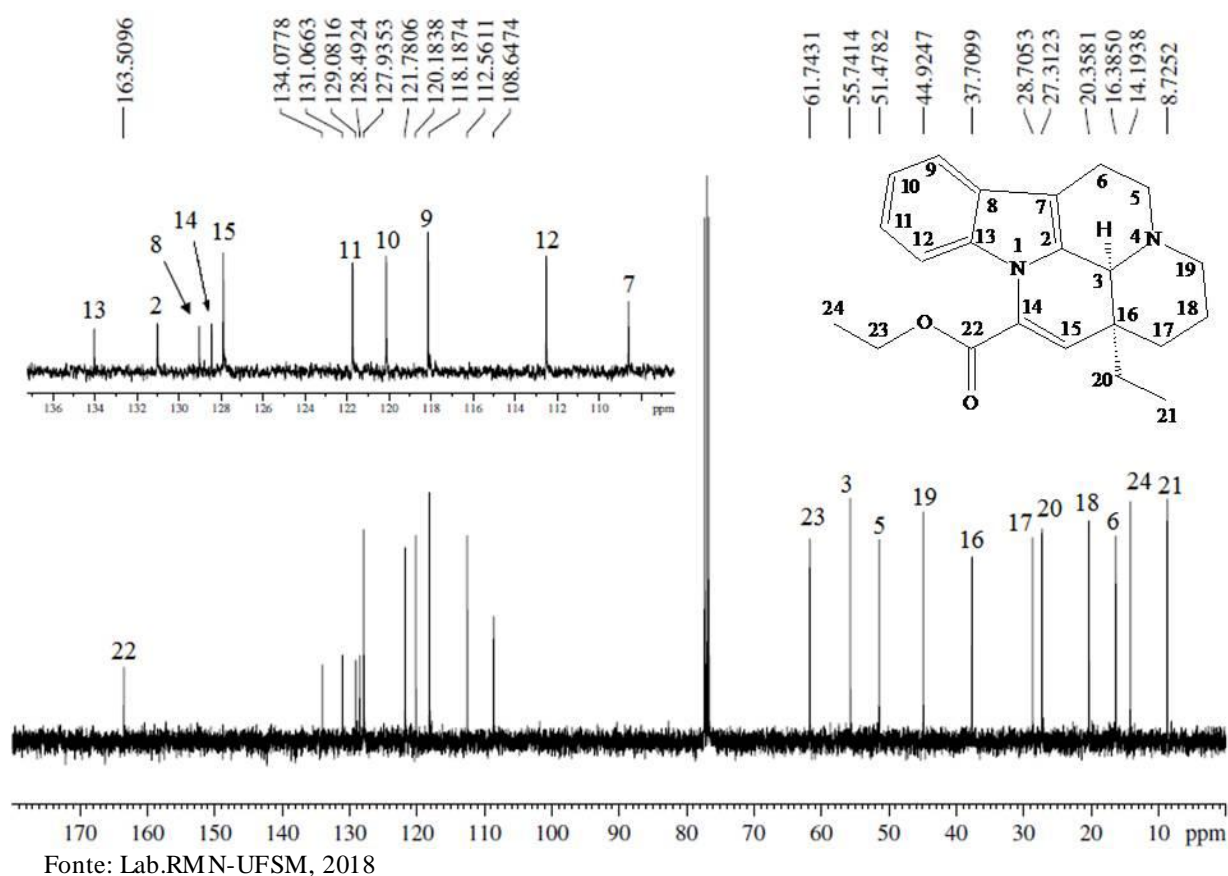


Fonte: Lab.RMN-UFSM, 2018

Analisando o espectro de HSQC (Figura 43), é possível identificar as correlações de H-C. Nota-se a presença de sete carbonos metilênicos, dois carbonos metílicos. Estas correlações estão apresentadas na Tabela 15.

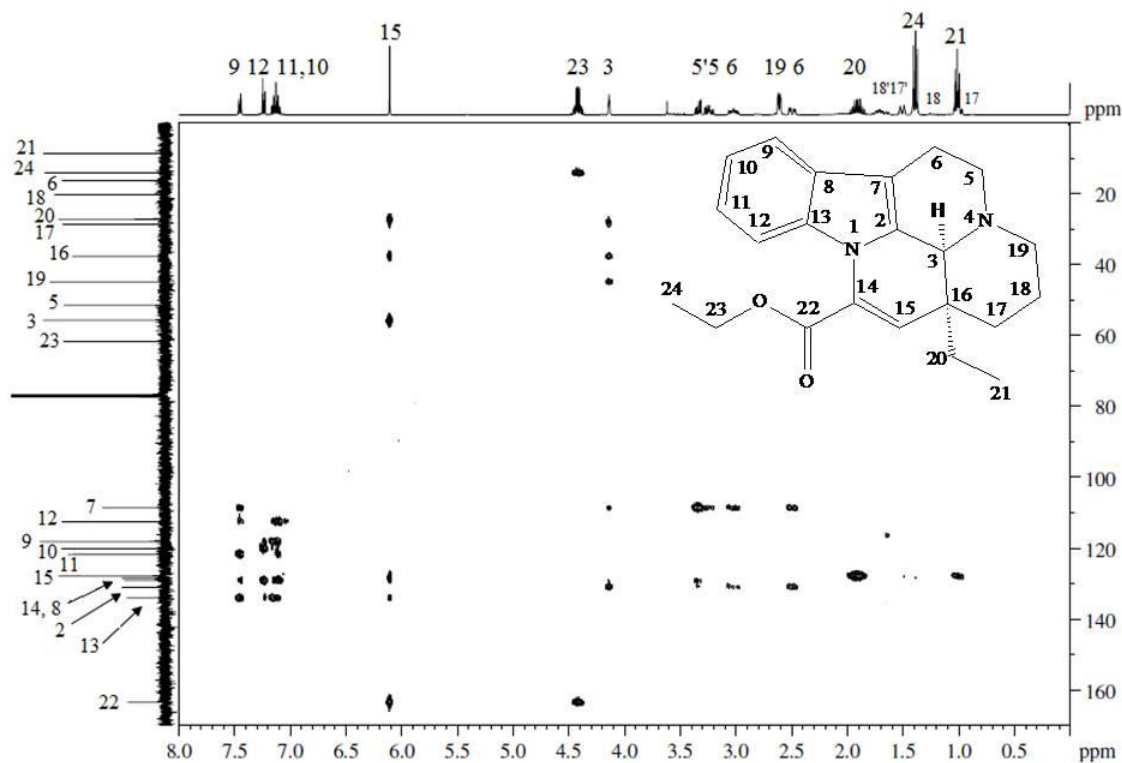
O espectro de RMN ^{13}C para **26** (Figura 44) apresentou sinal em δ 163,5 ppm, referente à carbonila do ester C-22. Para os carbonos metínicos, C-11, C-10, C-9, C-12, os sinais correspondentes são em δ 121,7 ppm, δ 120,1 ppm e δ 118,1 ppm, δ 112,5 ppm, respectivamente. Os sinais em δ 127,9 ppm, δ 61,7 ppm, δ 55,7 ppm, δ 14,1 ppm e δ 8,7 ppm correspondem aos carbonos C-15, C-23, C-3, C-24 e C-21.

Figura 44 – Espectro de RMN ^{13}C de Vinpocetina em CDCl_3 a 100 MHz.



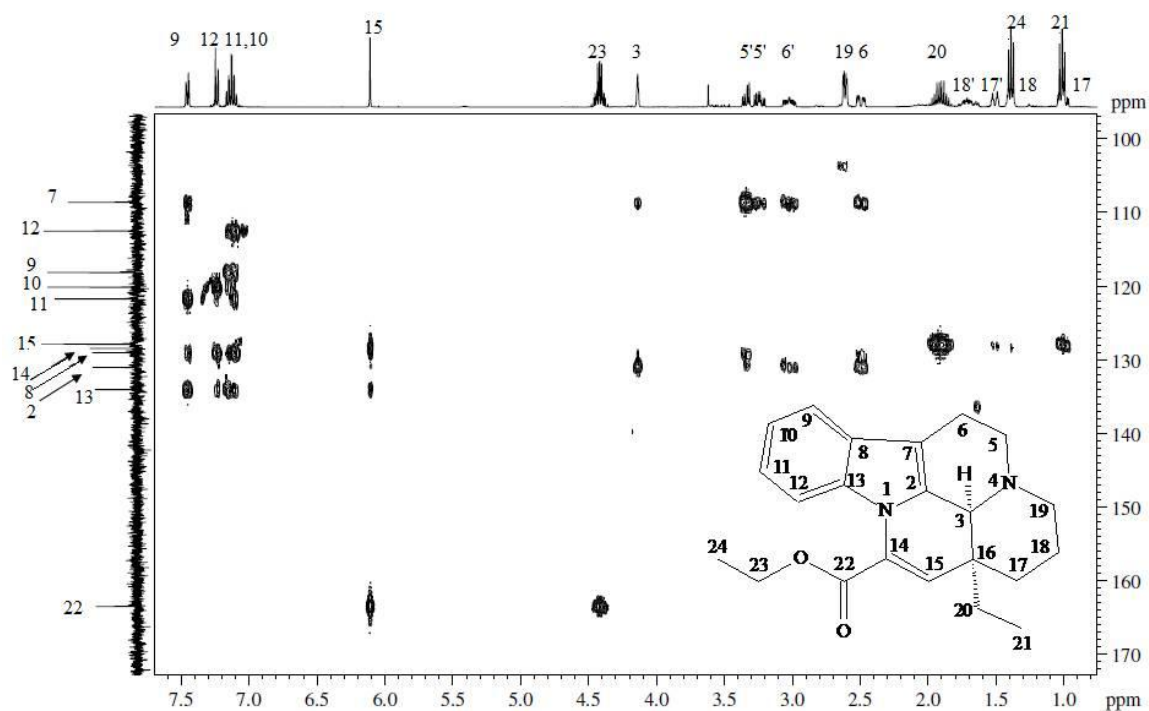
Os sinais em δ 134,0 ppm, δ 131,0 ppm, δ 129,0 ppm, δ 128,4 ppm e δ 108,6 ppm, δ 37,7 ppm correspondem aos carbonos desidrogenados C-13, C-2, C-8, C-14, C-7 e C-16 os quais foram estabelecidos após análise do espectro de HMBC (Figuras 45, 46 e 47), estas correlações estão representadas na Tabela 15.

Figura 45 – Espectro de RMN HMBC de Vinpocetina em CDCl_3 a 400 MHz.

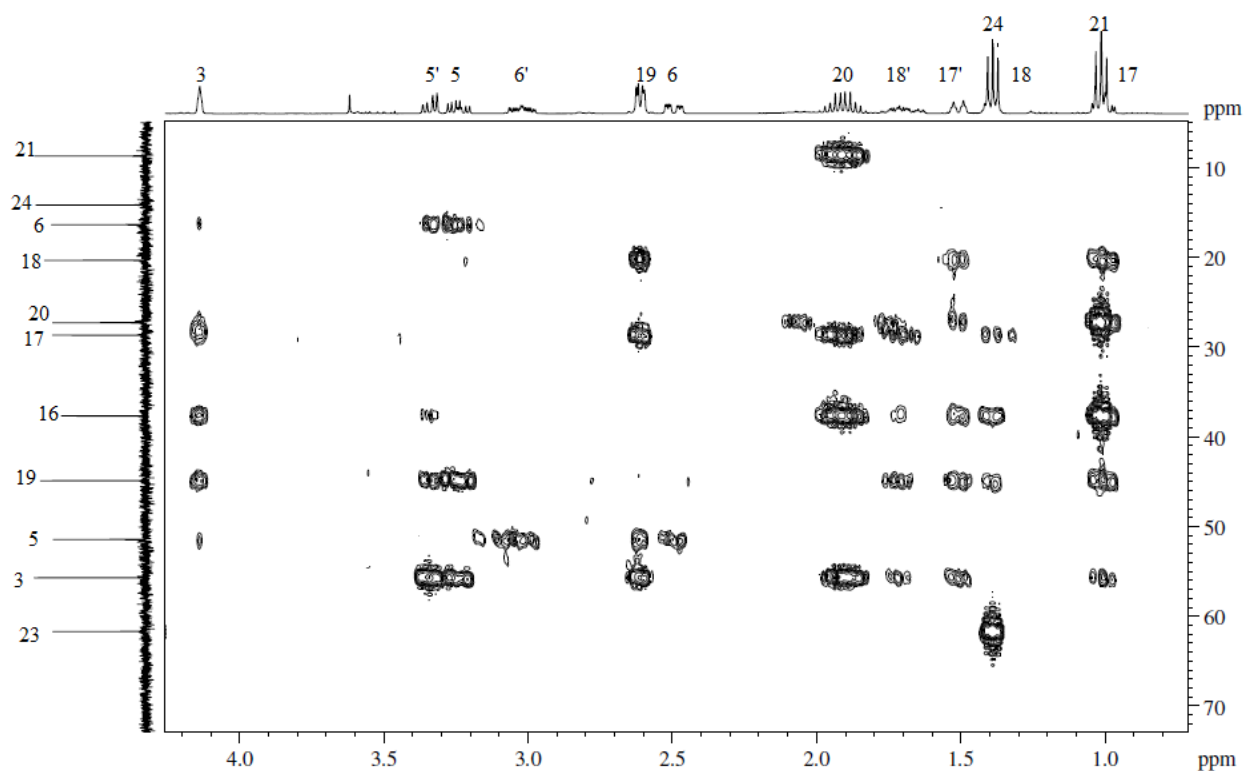


Fonte: Lab.RMN-UFSM, 2018

Figura 46 – Expansão do espectro de RMN HMBC de Vinpocetina em CDCl_3 a 400 MHz.



Fonte: Lab.RMN-UFSM, 2018

Figura 47 – Expansão do espectro de RMN HMBC de Vinpocetina em CDCl_3 a 400 MHz.

Fonte: Lab.RMN-UFSM, 2018

Na Tabela 15 são descritos os dados espectrais de deslocamentos químicos de ^1H , ^{13}C , assim como as correlações do espectro de HSQC e HMBC de **26**.

Tabela 15 – Dados espectrais de RMN 2D heteronuclear HSQC e HMBC de Vinpocetina.

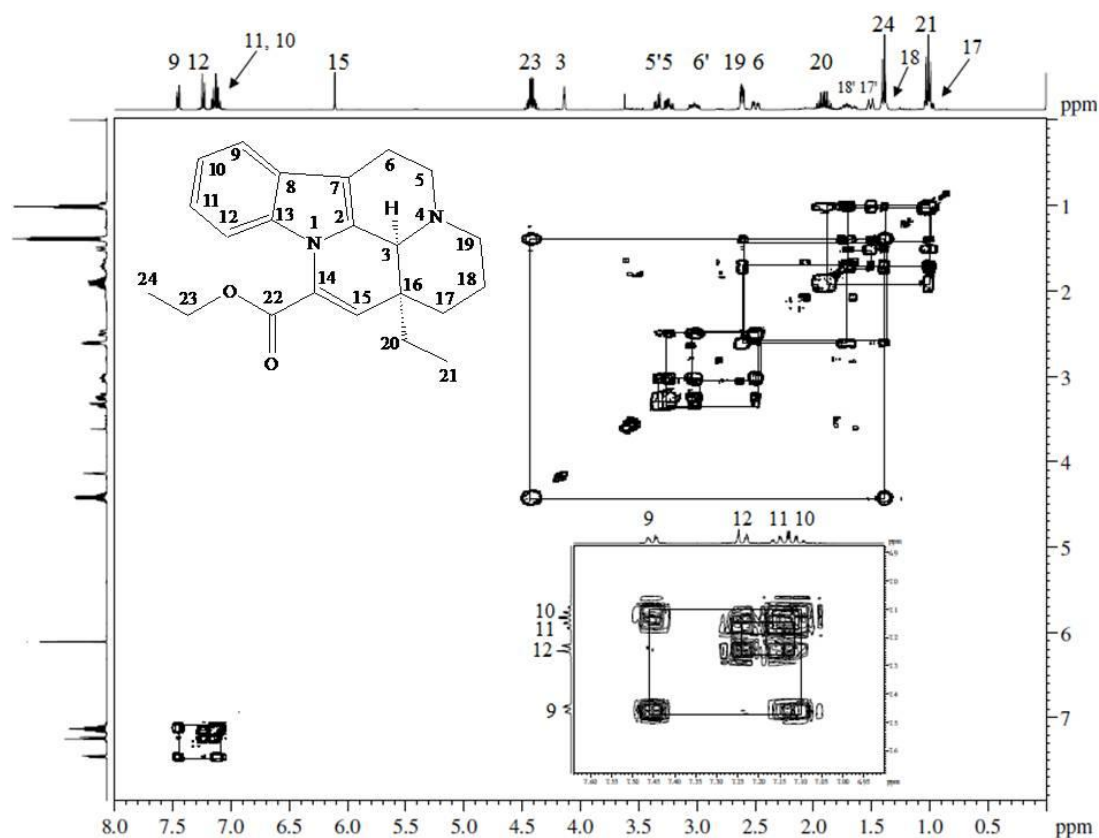
Posição	HSQC		HMBC	
	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	$^2J_{\text{HC}}$	$^3J_{\text{HC}}$
2	131,0	-	H-3	H-6'; H-6
3	55,7	4,19	-	H-15; H-5; H-5'; H-19; H-20; H-17'; H-17
5	51,4	3,34; 3,24	H-6'; H-6	H-19
6	16,3	3,02; 2,49	H-5'; H-5	-
7	108,6	-	H-6; H-6'	H-9; H-5'; H-5; H-3; H-17'; H-17
8	129,0	-	H-9	H-12; H10
9	118,1	7,45	H-10	H-11
10	120,1	7,11	-	H-12

Tabela 16 - Continuação da Tabela 15

Posição	HSQC		HMBC	
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	$^2J_{HC}$	$^3J_{HC}$
11	121,7	7,15	-	H-9
12	112,5	7,23	-	H-10
13	134,0	-	H-12	H-9; H-11
14	128,4	-	H-15	-
15	127,9	6,10	-	H-20; H-17'; H-17
16	37,7	-	H-15; H-3; H-17; H-20	H-18; H-18'; H-21
17	28,7	1,50; 1,03	H-18'; H-18	H-15; H-3; H-19; H-20
18	20,3	1,69; 1,38	H-19; H-17'; H-17	-
19	44,9	2,61	H-18'; H-18	H-3; H-5'; H-5; H-17'; H-17
20	27,3	1,91	H-21	H-15; H-17'; H-17
21	8,7	1,008	H-20	-
22	163,5	-	-	H-15; H-23
23	61,7	4,41	H-24	-
24	14,1	1,38	H-23	-

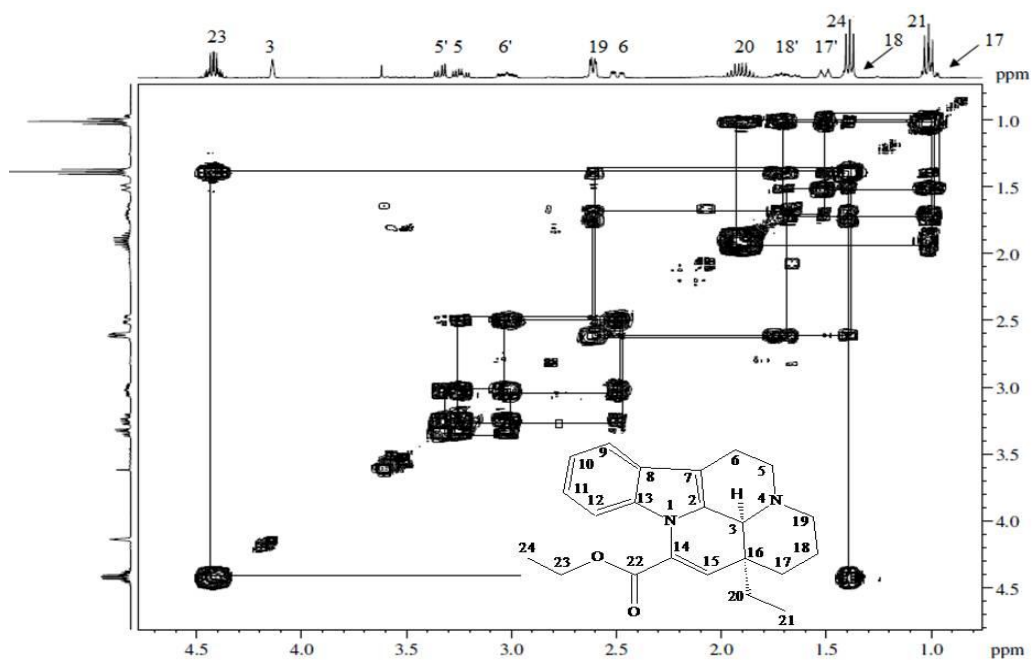
Analisando o espectro 2D COSY, observaram-se as correlações de H-H, as quais estão representadas na figura 48 e na expansão, Figura 49. Nota-se os sistemas de spins isolados dos hidrogênios H-24 – H-23; H-21 – H-20; H-5 – H-6; H-19 – H-18 – H-17, Além do sistema de spins da região aromática, H-9 – H-10 – H-11 – H-12.

Figura 48 – Espectro de RMN COSY de Vinpocetina em CDCl_3 a 400 MHz



Fonte: Lab.RMN-UFSM, 2018

Figura 49 – Expansão espectro de RMN COSY de Vinpocetina em CDCl_3 a 400 MHz



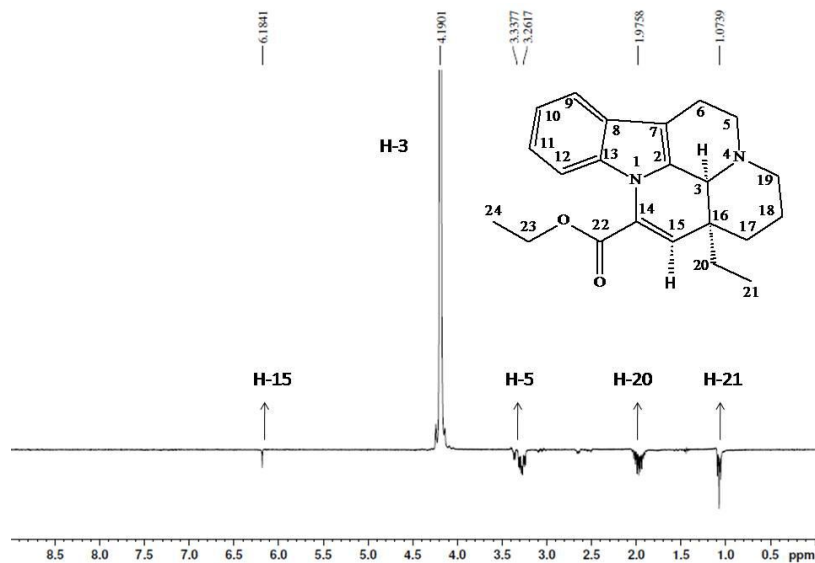
Fonte: Lab.RMN-UFSM, 2018.

Fazendo uso do método de RMN NOESY 1D, foi possível definir três centros quirais da estrutura, baseando-se no hidrogênio H-3. No espectro de NOESY 1D para H-

3 (Figura 50) pode-se observar as correlações espaciais com os hidrogênios H-5, H-15, H-20 e H-21.

Desta forma foi possível definir a estereoquímica relativa dos centros quirais C-3, C-15 e C-16 para o alcalóide **26**, visto que os hidrogênios H-3, H-15 e H-20 possuem correlação espacial entre si.

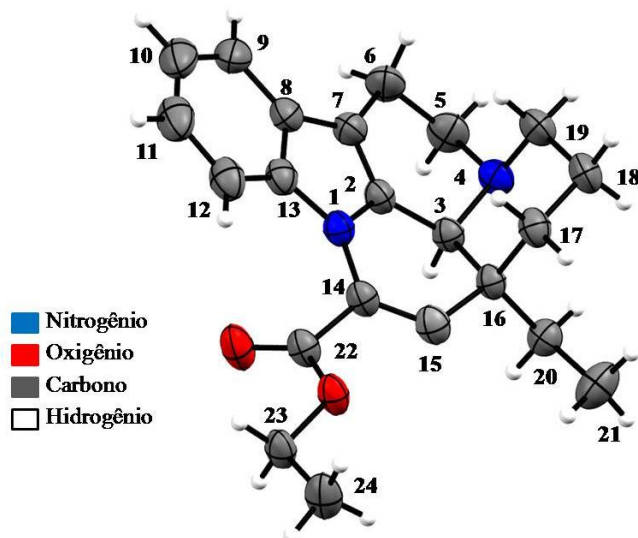
Figura 50 - Espectro de RMN NOESY 1D, irradiação H-3, para **26**.



Fonte: Lab. RMN-UFSM, 2018.

Através da difração de raio-X (Figura 51), confirma-se a estereoquímica absoluta, sendo os centros quirais C3-S e C16-S, N4-R.

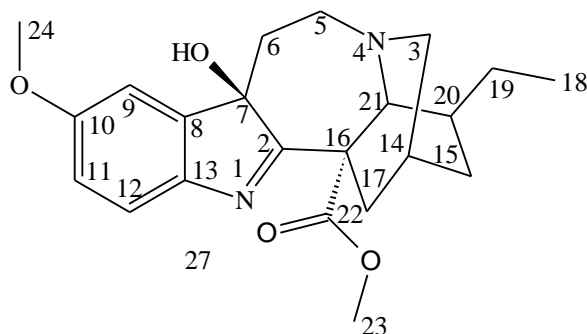
Figura 51 – Difração de raio-x de **26**



Fonte: Lab. Difração de Raio-X UFSM, 2018.

5.2.1.7 VOACANGINA HIDROXI-INDOLENINA (27)

O alcalóide voacangina hidroxindolenina (**27**), foi isolado na forma de um sólido amarelo claro, 70: 30 (acetato de etila: metanol) da FAEA a partir do EBM das cascas de *T. catharinensis*, conforme descrito na Parte Experimental (pag. 36), sendo identificado após análises por técnicas de RMN uni e bidimensionais e comparação com dados da literatura.

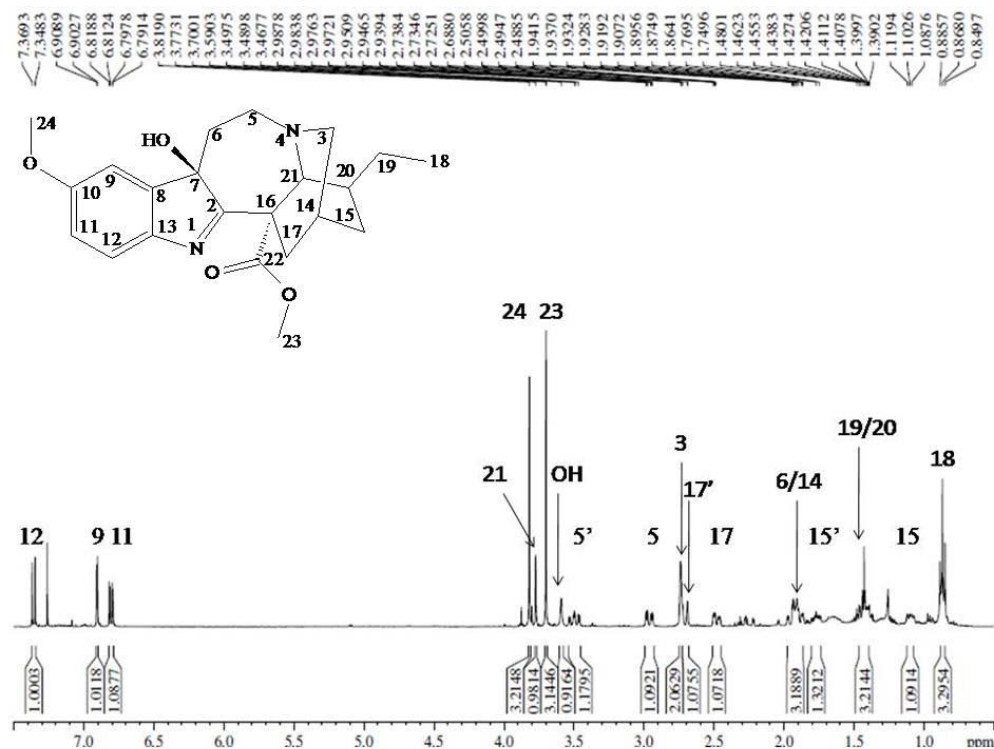


Através da análise do espectro de ^1H (Figura 52), observa-se a presença de quatro simples, δ 3,81, δ 3,77, δ 3,70 e δ 3,59 ppm, atribuídos para H-24, H-21, H-23 e O-H, respectivamente. Os sinais em δ 7,35, δ 6,90 e δ 6,80 ppm, integrado para um hidrogênio cada, correspondem aos H-12, H-9, H-11 respectivamente, característico de um anel benzênico de um núcleo indólico com substituinte na posição C-10. Nota-se a ausência do simpleto característico de N-H indólico, bem como a ausência do simpleto de N-CH₃ caso estivesse metilado nesta posição.

A presença de uma metila ligada a um átomo de carbono sp^3 pode ser reconhecida pelo sinal tripleto em δ 0,86 ppm (3H, $J = 6,80$ Hz), atribuído ao H-18.

Para os sinais observados em δ 3,49 (1H, ddd, $J = 15,36; 14,94; 3,74$ Hz), δ 2,96 (1H, ddd, $J = 14,8; 14,7; 4,5$ Hz), δ 2,73 (2H, d, $J = 1,75$ Hz), δ 2,70 (1H, d, $J = 14,5$ Hz) e δ 2,48 (1H, dd, $J = 13,7; 4,5$ Hz) foram atribuídos aos hidrogênios H-5', H-5, H-3, H-17' e H-17 respectivamente.

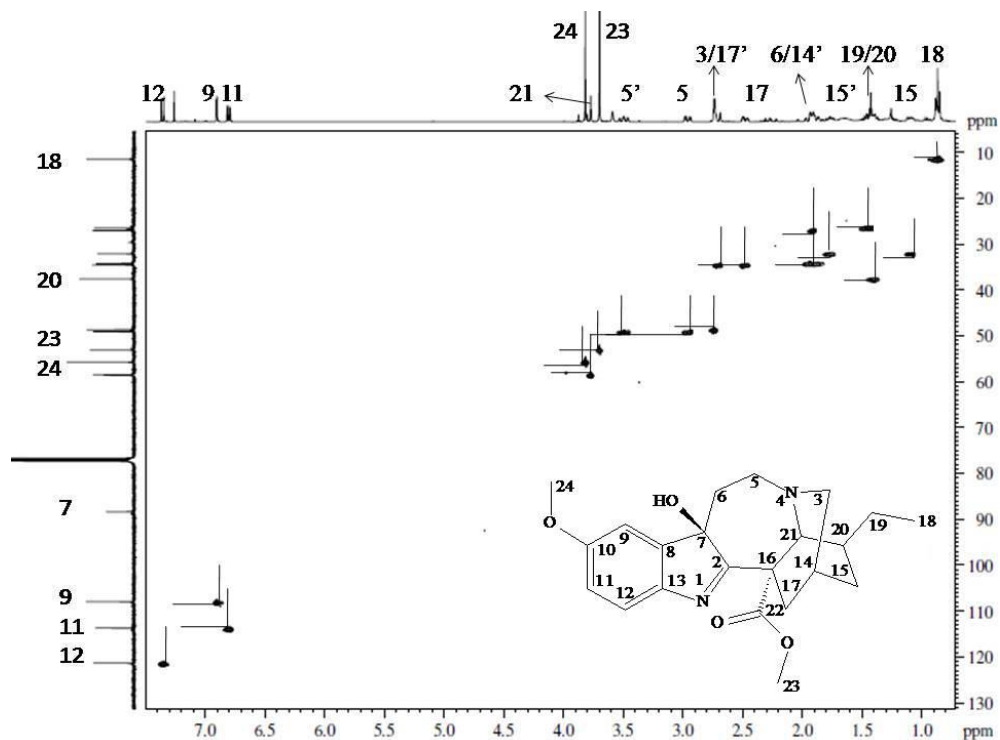
Figura 52 – Espectro de RMN de ^1H de Voacangina hidroxi-indolenina em CDCl_3 a 400 MHz.



Fonte: Lab.RMN-UFSM, 2018

Através da análise do espectro HSQC (Figura 53, e expansão Figura 54) foi possível a identificação das correlações entre carbono e hidrogênio existentes na estrutura. Desta forma atribuiu-se os sinais δ 1,92 ppm (3H, m), δ 1,77 ppm (1H, m), δ 1,43 ppm (3H, m) e δ 1,10 ppm (1H, m) aos hidrogênios H-6, H-14, H-15', H-19, H-20 e H-15 respectivamente.

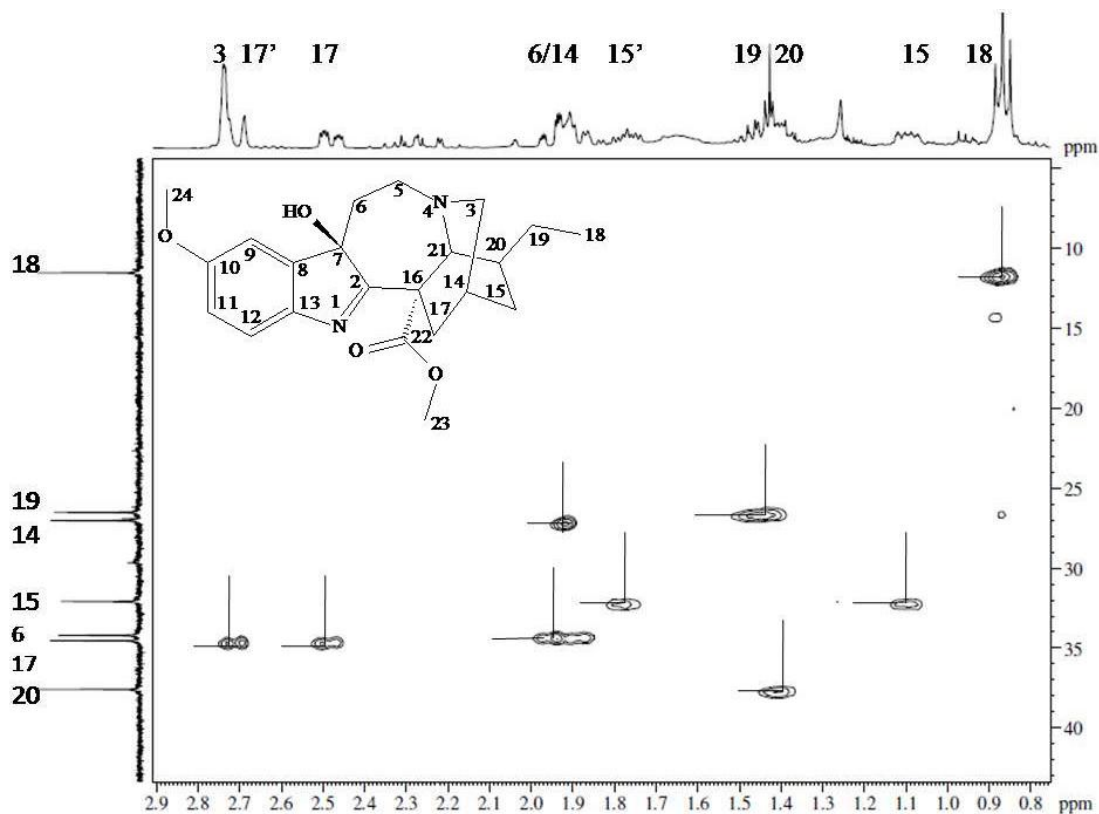
Figura 53 – Espectro de RMN HSQC de Voacangina hidro xi-indolenina em CDCl_3 a 400 MHz.



Fonte: Lab.RMN-UFSM, 2018

Figura 54 – Expansão do espectro de RMN HSQC de Voacangina hidro xi-indolenina em CDCl_3 a 400 MHz

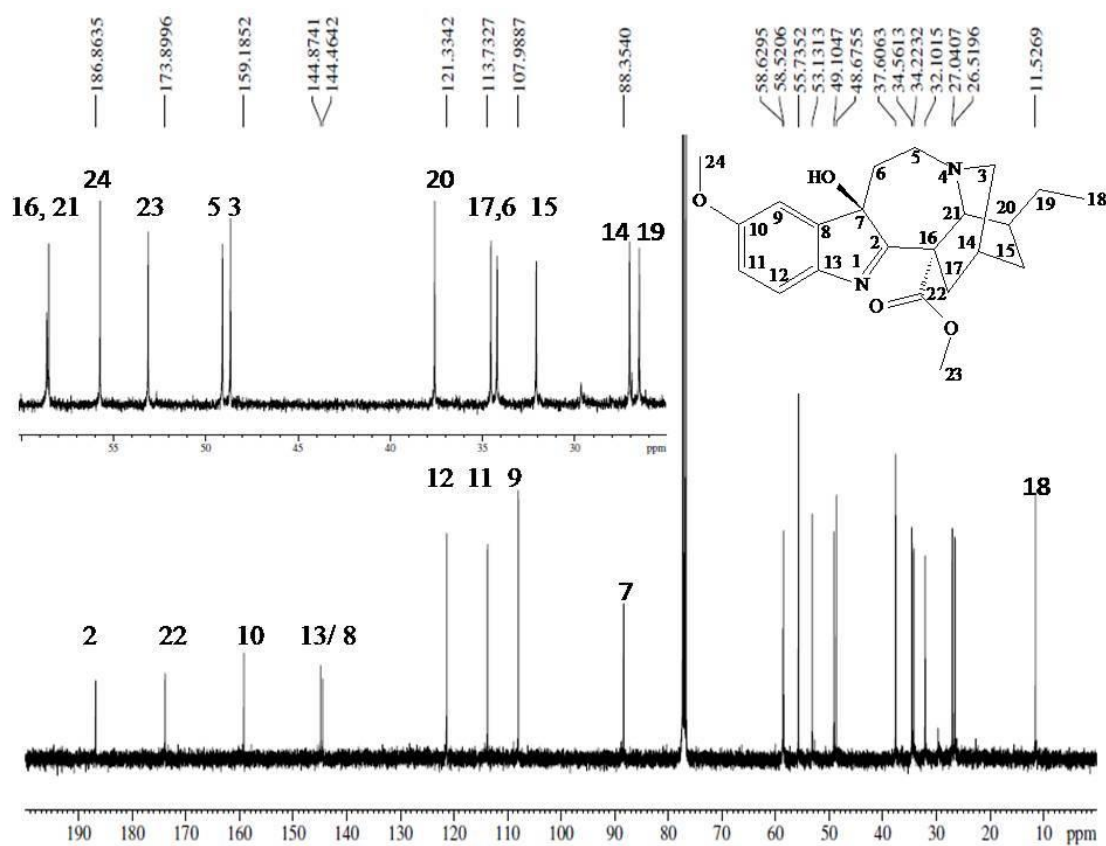
Fonte: Lab.RMN-UFSM, 2018



O espectro de RMN ^{13}C para Voacangina hidroxindolenina (Figura 55) apresentou sinais em δ 186,8, δ 159,1, δ 144,8, δ 144,4, δ 88,3 ppm, referente aos carbonos desidrogenados C-2, C-10, C-13, C-8, C-7. Para os carbonos metínicos, C-12, C-11, C-9, os sinais correspondentes são δ 121,3 ppm, δ 113,7 ppm e δ 107,9 ppm, respectivamente. O sinal em δ 173,8 ppm, corresponde à carbonila C-22.

Para as metilas C-24, C-23 e C-18, os sinais correspondentes são em δ 55,7 ppm, δ 53,1 ppm e δ 11,5 ppm, respectivamente.

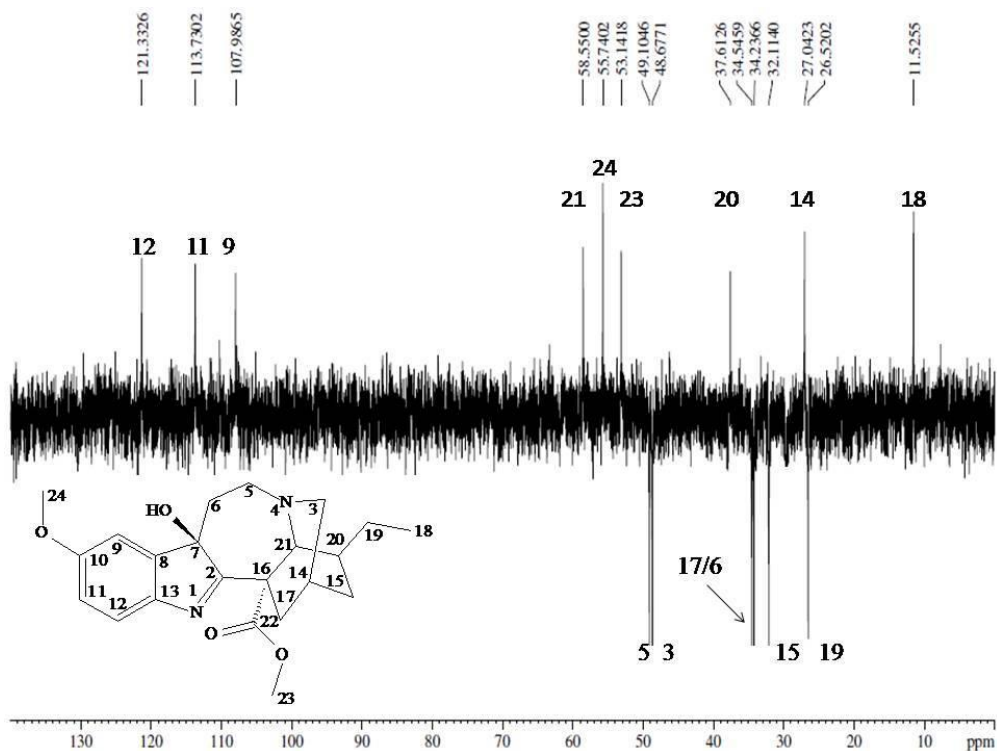
Figura 55 – Espectro de RMN ^{13}C para Voacangina hidroxindolenina em CDCl_3 à 100 MHz.



Fonte: Lab.RMN-UFSM, 2018

Através do espectro DEPT 135 (figura 56), é possível identificar os carbonos metínicos C-21, C-14 que correspondem aos sinais δ 58,5 e δ 27,0 ppm.

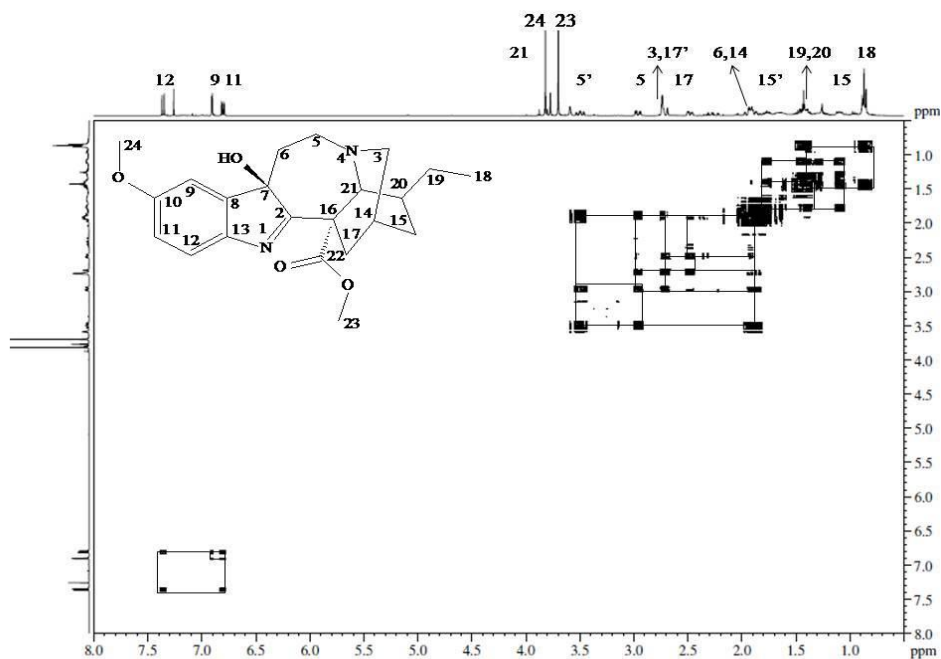
Figura 56 – Espectro de RMN DEPT 135 de Voacangina hidroxi-indolenina em CDCl_3 à 100MHz.



Fonte: Lab.RMN-UFSM, 2018

No espectro 2D COSY puderam-se observar as correlações dos hidrogênios, conforme descreve a figura 57.

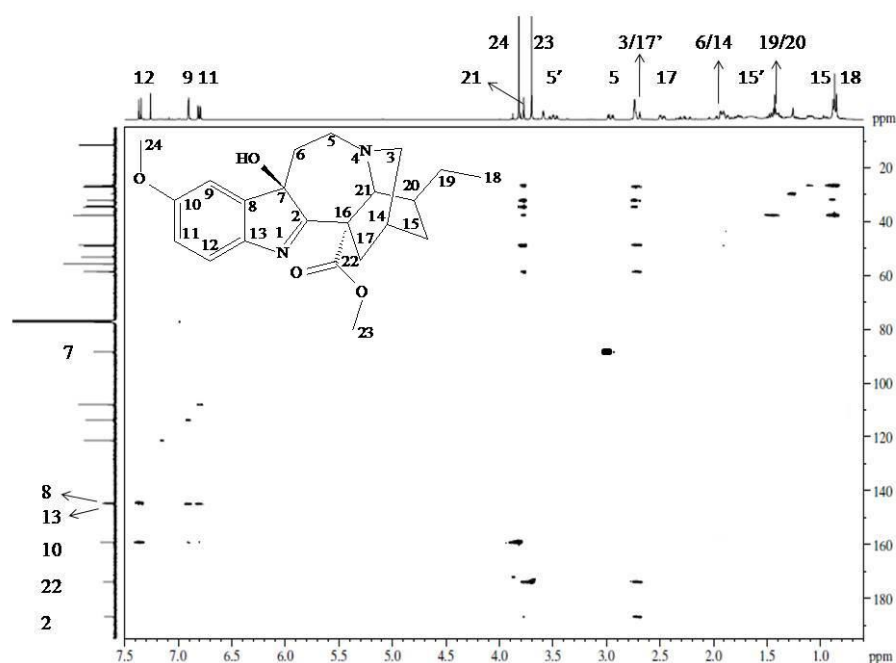
Figura 57 – Espectro de RMN COSY para Voacangina hidroxi-indolenina em CDCl_3 à 400 MHz.



Fonte: Lab.RMN-UFSM, 2018.

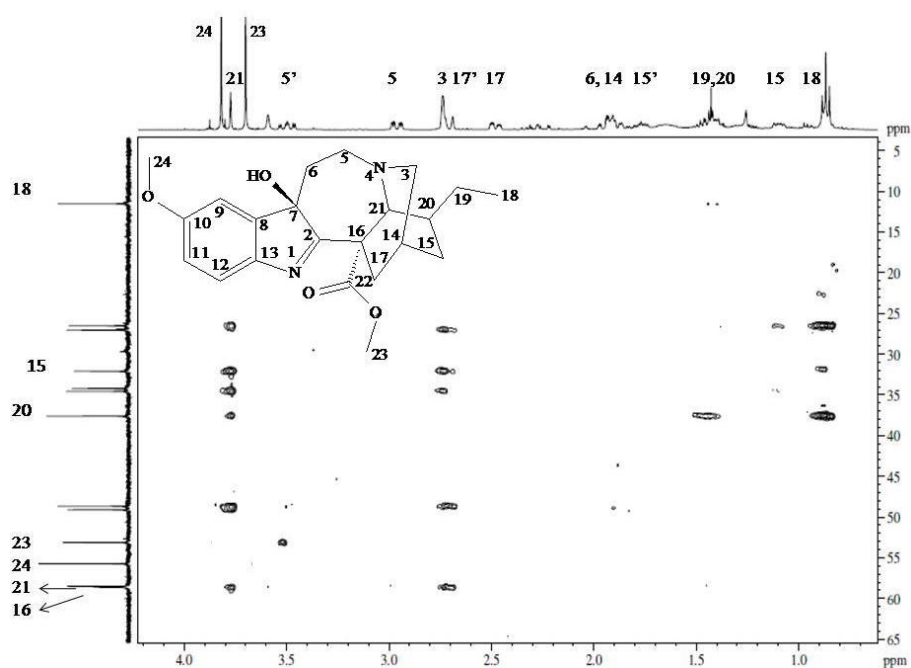
Analisando o espectro de HMBC (Figuras 58 e expansão Figura 59), é possível observar as principais correlações de longa distância C-H, levando em consideração as correlações $^2J_{\text{HC}}$ e $^3J_{\text{HC}}$. Estas correlações estão representadas na Tabela 17, bem como as correlações de HSQC.

Figura 58 – Espectro de RMN HMBC para Voacangina hidroxi-indolenina em CDCl_3 à 400 MHz.



Fonte: Lab.RMN-UFSM, 2018

Figura 59 – Expansão do espectro de RMN HMBC para Voacangina hidroxi-indolenina em CDCl_3 à 400 MHz.



Fonte: Lab.RMN-UFSM, 2018.

Tabela 17 – Dados espectrais de RMN 2D heteronuclear HSQC e HMBC de Voacangina hidroxindolenina.

Posição	HSQC		HMBC	
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	$^2J_{HC}$	$^3J_{HC}$
2	186,8	-	-	H-21; H-17'
3	48,6	2,73	-	H-21; H-17'
5	49,1	3,49/ 2,96	-	H-21
6	34,2	1,92	-	-
7	88,3	-	-	H-5
8	144,4	-	-	H-12
9	107,9	6,90	-	H-11
10	159,1	-	H-9; H-11	H-12; H-24
11	113,7	6,80	-	H-9
12	121,3	7,35	-	-
13	144,8	-	-	H-9; H-11
14	27,0	1,92	H-3	-
15	32,1	1,77/ 1,10	-	H-3
16	58,6	-	H-17'; H-21	-
17	34,5	2,70/ 2,48	-	H-21; H-3
18	11,5	0,86	-	-
19	26,5	1,43	H-18	H-21; H-15
20	37,6	1,43	H-21; H-19	H-18
21	58,5	3,77	-	-
22	173,8	-	-	H-17'; H-23
23	53,1	3,70	-	-
24	55,7	3,81	-	-

Na Tabela 18 são descritos os deslocamentos químicos de 1H , ^{13}C , de **27**, bem como os dados comparativos da literatura (MADINAVEITIA, 1998), para ^{13}C e 1H .

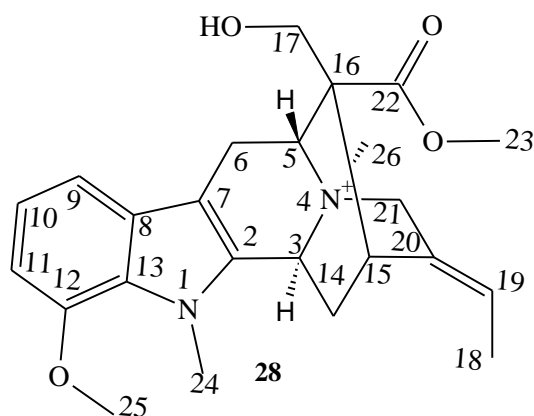
Tabela 18 – Dados de RMN ^{13}C (100 MHz), ^1H (400 MHz) de Voacangina hidroxil-indolenina em CDCl_3 , em comparação com dados da literatura.

Posição	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C^*} (ppm)	δ_{H^*} (ppm)
2	186,8	-	186,8	-
3	48,6	2,73(2H,d, $J=1,7$ Hz)	48,60	2,77 (2H, s)
5'	49,1	3,49(ddd, $J=15,3; 14,9; 3,7$ Hz)	49,1	3,53(ddd, $J=15,0; 15,0; 3,3$ Hz)
5		2,96(ddd, $J=14,8; 14,7; 4,5$ Hz)		3,00(dd, $J=14,7; 4,5$ Hz)
6	34,2	1,92(2H,m)	34,2	1,98(dt, $J=13,3; 1,5$ Hz) 1,90(ddd, $J=14,0; 14,0; 4,5$ Hz)
7	88,3	-	88,3	-
8	144,4	-	144,4	-
9	107,9	6,90(d, $J=2,5$ Hz)	107,9	6,94(d, $J=2,50$ Hz)
10	159,1	-	159,1	-
11	113,7	6,80(dd, $J= 8,3; 2,5$ Hz)	113,7	6,84(dd, $J= 8,4; 2,5$ Hz)
12	121,3	7,35(d, $J= 8,4$ Hz)	121,3	7,40(d, $J= 8,4$ Hz)
13	144,8	-	144,8	-
14	27,0	1,92(m)	27,0	1,95(m)
15'	32,1	1,77(m)	32,0	1,80(m)
15		1,10(m)		1,13(m)
16	58,6	-	58,5	-
17'	34,5	2,70(d, $J= 14,5$ Hz)	34,5	2,74(d, $J=14,1$ Hz)
17		2,48(dd, $J= 13,7; 4,5$ Hz)		2,51(dt, $J=13,7; 2,9$ Hz)
18	11,5	0,86(t, $J= 6,80$ Hz)	11,5	0,90(t, $J= 6,8$ Hz)
19	26,5	1,43 (2H,m)	26,5	1,47(2H,m)
20	37,6	1,43(m)	37,5	1,47(m)
21	58,5	3,77(s)	58,5	3,64(s)
22	173,8	-	173,8	-
23	53,1	3,70(s)	53,1	3,74(s)
24	55,7	3,81(s)	55,7	3,85(s)

* δ_{C} , (CDCl_3 , 125 MHz), δ_{H} (CDCl_3 , 500 MHz) conforme MADINA VEITIA, 1998.

5.2.1.8 12-METOXI-N₄-METIL-VOACHALOTINA (28)

O alcalóide 12-metoxi-N₄-metil-voachalotina (**28**), foi isolado na forma de um sólido amarelo, da FAEA, 60:40 (acetato de etila: metanol) a partir do EBM das cascas de *T. catharinensis*, conforme descrito na Parte Experimental (pag. 36), sendo identificado após análises por técnicas de RMN uni e bidimensionais e comparação com dados da literatura.

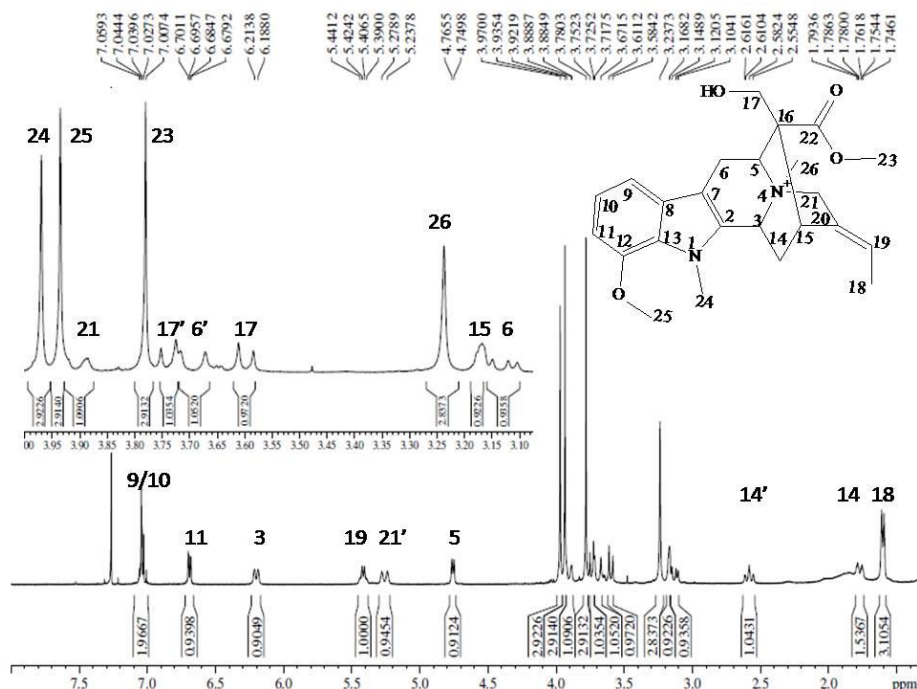


Através da análise do espectro de RMN¹H (Figura 60), pode-se observar a semelhança com o alcaloide **21**. Neste, observa-se a presença de dois simpletos adicionais em δ 3,93 e δ 3,23 ppm, atribuídos as metilas 25 e 26, respectivamente. Os sinais em δ 7,04 e δ 6,69 ppm, correspondem H-9, H-10 e H-11 respectivamente.

A presença de uma metila ligada a um átomo de carbono sp² pode ser reconhecida pelo sinal duplo tripleto em δ 1,60 ppm (3H, dt, $J = 6,9; 1,8$ Hz) e pelo sinal quarteto de tripleto a δ 5,41 ppm (1H, qt, $J = 6,8; 1,8$ Hz), correspondem aos H-18 e H-19 respectivamente.

Para os sinais δ 6,20 (1H, d, $J = 10,7$ Hz), δ 5,26 (1H, d, $J = 15,9$ Hz), δ 4,75 (1H, s, $J = 6,6$ Hz) foram atribuídos aos hidrogênios H-3, H-21', H-5 respectivamente.

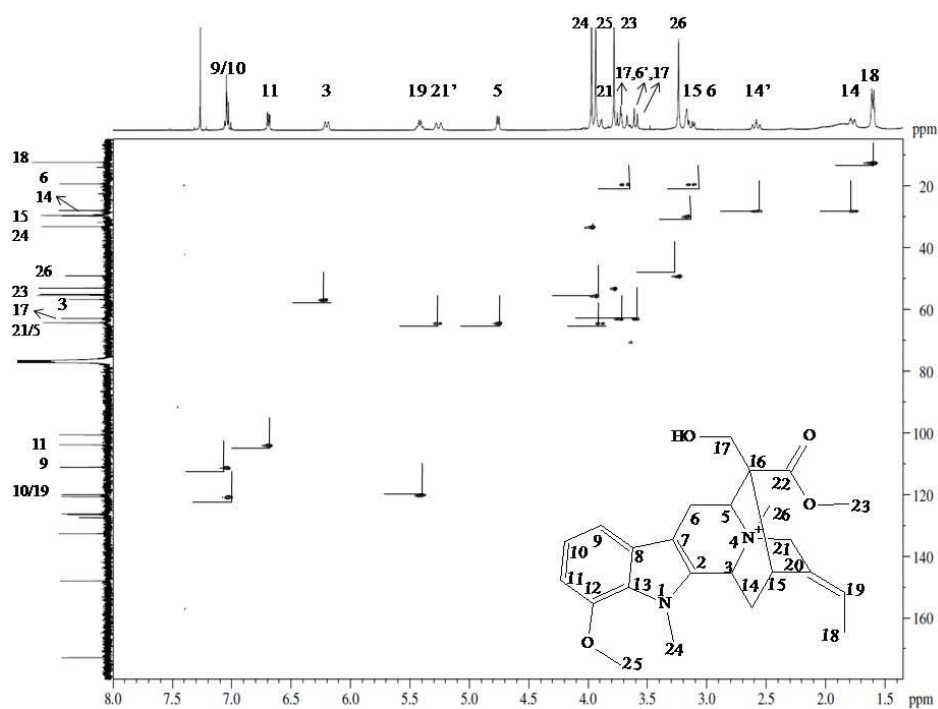
Figura 60 – Espectro de RMN de ^1H de 12-Metoxi- N_4 -metil-voachalotina em CDCl_3 a 400 MHz.



Fonte: Lab.RMN-UFSM, 2018

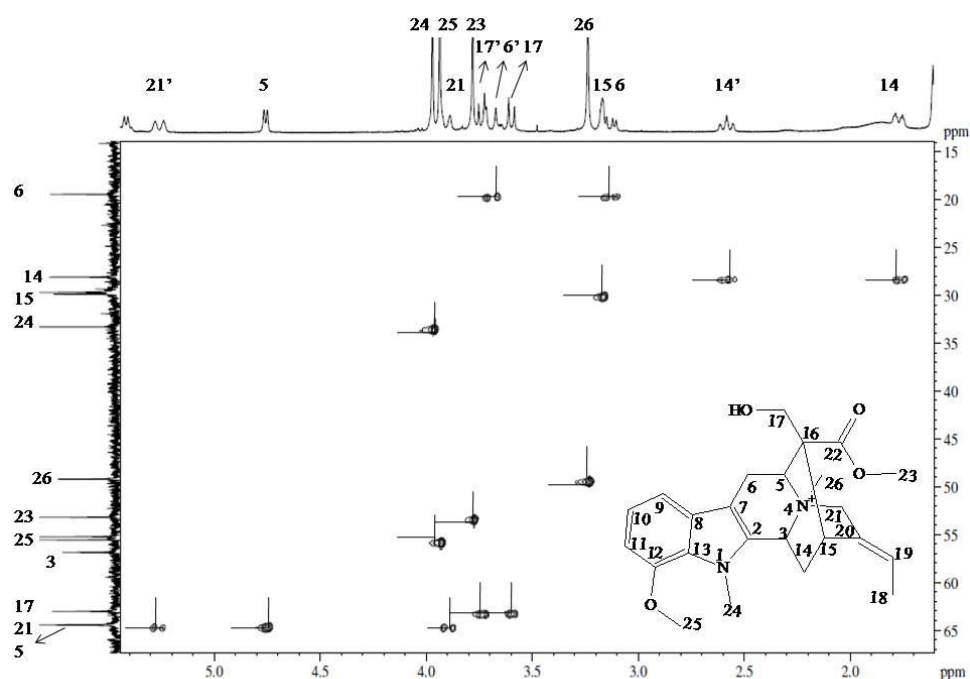
Analisando o espectro de HSQC (Figura 61, e expansão Figura 62), é possível identificar as correlações de H-C. Nota-se a presença de seis carbonos metínicos, quatro carbonos metilênicos, cinco carbonos metílicos. Estas correlações estão apresentadas na Tabela 19.

Figura 61 – Espectro de RMN HSQC de 12-Metoxi- N_4 -metil-voachalotina em CDCl_3 a 400 MHz



Fonte: Lab. RMN-UFSM, 2018.

Figura 62 – Expansão do espectro de RMN HSQC de 12-Metoxi-N₄-metil-voachalotina em CDCl₃ a 400 MHz.

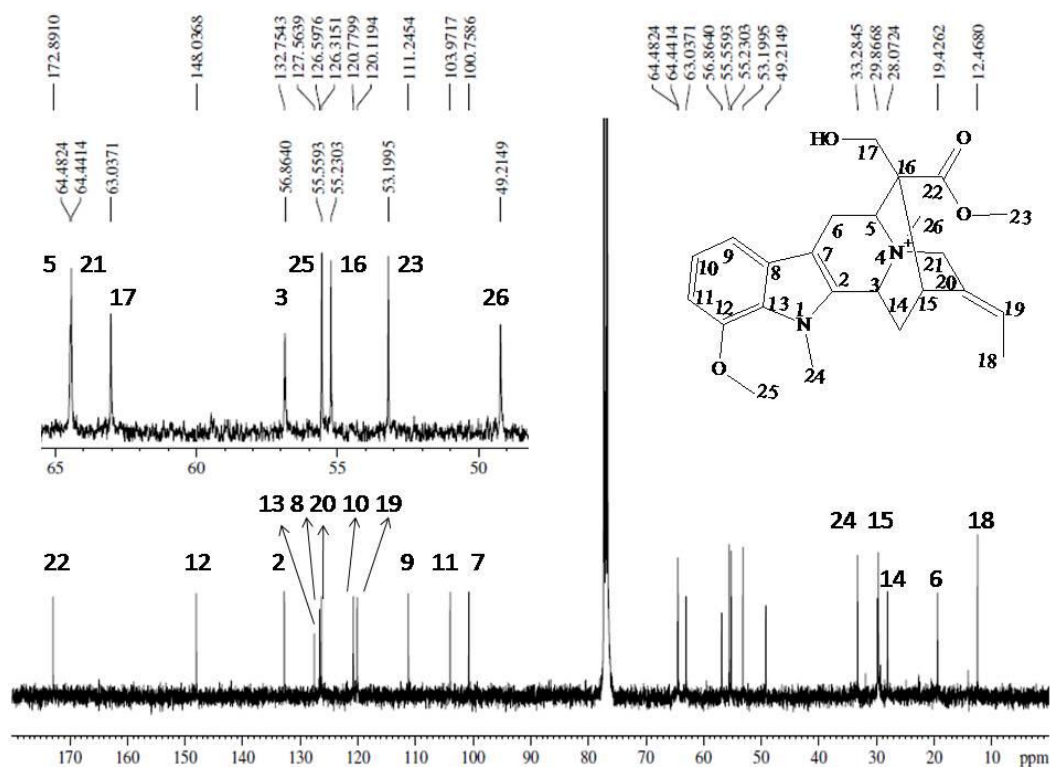


Fonte: Lab.RMN-UFSM, 2018

O espectro de RMN ¹³C de **28** (Figura 63) apresentou sinais em δ 172,9, δ 148,3, δ 132,7, δ 127,6, δ 126,6, δ 126,3, δ 100,7, e δ 55,2 ppm referentes aos carbonos desprotonados C-22, C-12, C-2, C-13, C-8, C-20, C-7 e C-16. Para os carbonos metínicos, C-10, C-19, C-9, C-11, C-5, C-3, C-15 os sinais correspondentes são δ 120,7, δ 120,1, δ 111,2, δ 103,9, δ 64,4, δ 53,1 e δ 29,8 ppm, respectivamente.

Para as metilas C-25, C-23, C-26, C-24 e C-18, os sinais correspondentes são em δ 55,5 ppm, δ 53,4 ppm, δ 49,3 ppm, δ 33,6 ppm e δ 12,4 ppm, respectivamente.

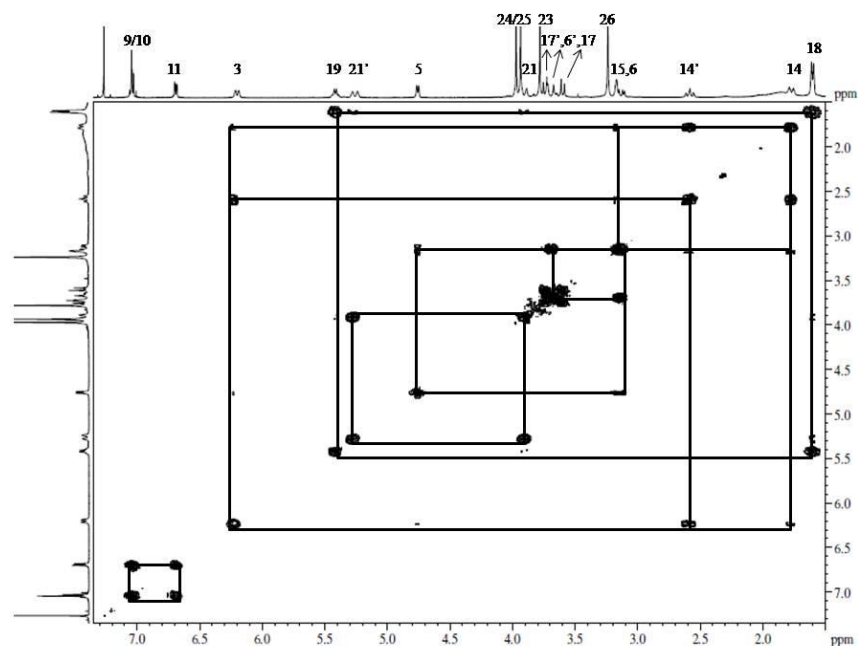
Figura 63 – Espectro de RMN ^{13}C de 12-Metoxi-N₄-metil-5-Epivoachalotina em CDCl_3 a 100 MHz.



Fonte: Lab.RMN-UFSM, 2018

Através da análise do espectro 2D COSY (Figura 64) é possível observar as correlações H-H presentes na estrutura. Dentre os sistemas de spins da estrutura, podem ser observados os acoplamentos a longa distância da dupla ligação exocíclica, H-19 – H-21 e H-18. O acoplamento do H-18 com os hidrogênios H-19 e H-21. Nota-se também um acoplamento a longa distância do H-3 com H-5.

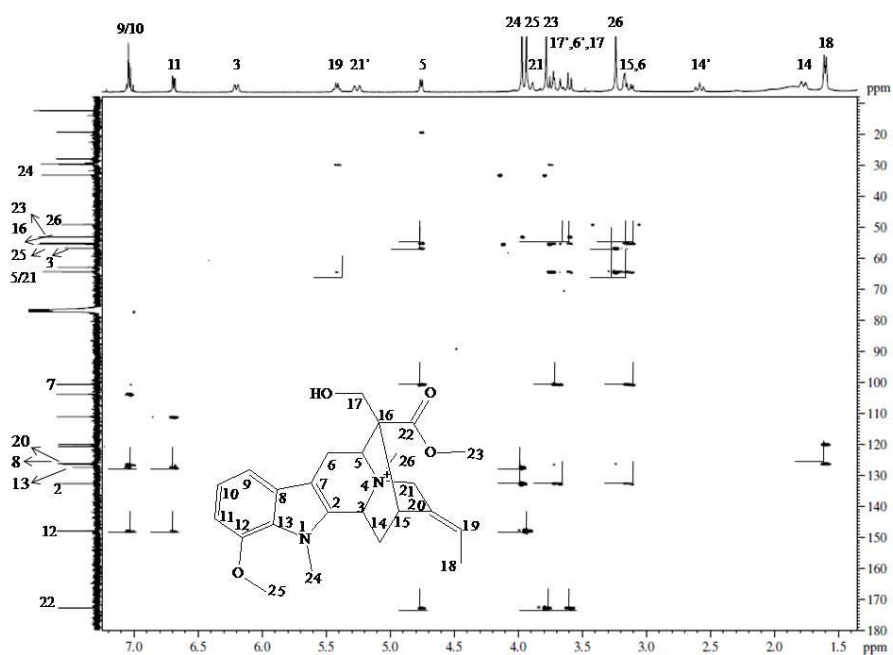
Figura 64 – Espectro de 2D COSY para 12-Metoxi-N₄-metil-voachalotina em CDCl₃



Fonte: Lab.RMN-UFSM, 2018.

Analisando o espectro de HMBC (Figura 65), é possível observar as principais correlações de longa distância C-H, levando em consideração as correlações $^2J_{HC}$ e $^3J_{HC}$. Estas correlações estão representadas na Tabela 19.

Figura 65 - Espectro de RMN HMBC para 12-Metoxi-N₄-metil-voachalotina em CDCl₃ à 400 MHz



Fonte: Lab. RMN-UFSM, 2018.

Tabela 19 – Dados espectrais de RMN 2D Heteronuclear HSQC e HMBC de 12-Metoxi-N₄-metilvoachalotina.

Posição	HSQC		HMBC	
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	$^2J_{HC}$	$^3J_{HC}$
2	132,7	-	-	H-24; H-6'; H-6
3	56,8	6,20	-	H-5; H-26
5	64,4	4,75	-	H-26
6	19,4	3,69/ 3,12	H-5	-
7	100,7	-	H-6'; H-6	H-5
8	126,6	-	H-9	H-10
9	111,2	7,04	-	H-11
10	120,7	7,04	-	-
11	103,9	6,69	H-10	H-9
12	148,0	-	H-11	H-10; H-25
13	127,6	-	-	H-9; H-11; H-24
14	28,0	2,58/ 1,77	-	-
15	29,8	3,16	-	H-19
16	55,2	-	H-5; H-15; H-17	H-6'; H-6
17	63,0	3,73/ 3,60	-	-
18	12,4	1,60	-	-
19	120,1	5,41	H-18	-
20	126,3	-	-	H-18
21	64,4	5,26/ 3,90	-	H-19; H-26; H-15
22	172,8	-	-	H-17; H-23; H-5
23	53,4	3,78	-	-
24	33,6	3,97	-	-
25	55,5	3,93	-	-
26	49,3	3,23	-	-

Na Tabela 20 são descritos os deslocamentos químicos de 1H , ^{13}C , de **28**, bem como os dados comparativos da literatura (GONÇALVES, 2011), para ^{13}C e 1H .

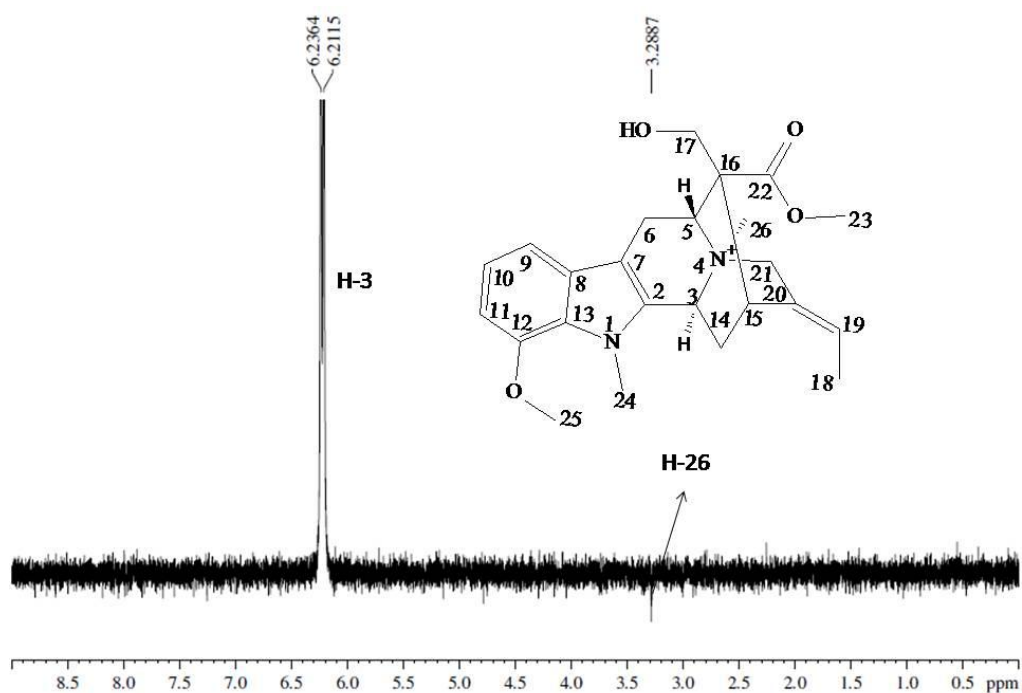
Tabela 20 – Dados de RMN ^{13}C (100 MHz), ^1H (400 MHz) de 12-Metoxi- N_4 -metil-voachalotina em CDCl_3 , em comparação com dados da literatura.

Posição	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C^*} (ppm)	δ_{H^*} (ppm)
2	132,7	-	132,4	-
3	56,8	6,20 (1H,d, $J=10,7$ Hz)	56,5	6,28 (1H,d, $J=11,1$ Hz)
5	64,4	4,75 (1H,d, $J=6,6$ Hz)	64,2	4,96 (1H,d, $J=6,4$ Hz)
6'	19,4	3,69 (1H,m)	19,0	3,96 (1H, m)
6	19,4	3,12 (1H,m)	19,0	3,30 (1H, m)
7	100,7	-	101,4	-
8	126,6	-	126,9	-
9	111,2	7,04(1H,m)	111,7	7,27 (1H,d, $J=7,0$ Hz)
10	120,7	7,04(1H,m)	1120,9	7,25 (1H, t, $J= 7,0$ Hz)
11	103,9	6,69(1H,dd, $J=6,5; 2,0$ Hz)	103,1	6,93(d, $J= 7,0$ Hz)
12	148,0	-	147,6	-
13	127,6	-	126,9	-
14'	28,0	2,58(1H, m)	27,7	2,40 (1H,m)
14	28,0	1,77(1H,dt, $J=17,4;3,5$ Hz)	27,7	1,86(1H,m)
15	29,8	3,16 (1H,m)	29,4	3,31(1H,m)
16	55,2	-	55,0	-
17'	63,0	3,73 (1H,m)	62,2	3,78(1H,m)
17	63,0	3,60 (1H,m)	62,2	3,13(1H,m)
18	12,4	1,60(3H,dt, $J= 6,9;1,8$ Hz)	12,1	1,82(3H,d, $J= 6,4$ Hz)
19	120,1	5,41 (1H,qt, $J=6,8; 1,8$ Hz)	119,9	5,60 (1H,q, $J=6,4$ Hz)
20	126,3	-	127,6	-
21'	64,4	5,26 (1H,d, $J= 15,9$ Hz)	64,0	5,31 (1H,d, $J= 15,8$ Hz)
21	64,4	3,90 (1H,m)	64,0	3,90 (1H,m)
22	172,8	-	172,8	-
23	53,4	3,78 (3H,s)	52,8	3,99 (3H,s)
24	33,6	3,97(3H,s)	32,9	4,18 (3H,s)
25	55,5	3,93 (3H,s)	55,3	4,18 (3H,s)
26	49,3	3,23 (3H,s)	48,7	3,35 (3H,s)

* δ_{C} (CDCl_3 , 100 MHz), δ_{H} (CDCl_3 , 400 MHz) conforme GONÇALVES, 2011.

Fazendo uso do método de RMN NOESY 1D, foi possível definir três centros quirais da estrutura, baseando-se no hidrogênio H-3. No espectro de NOESY 1D para H-3 (Figura 66) pode-se observar apenas a correlação espacial com os hidrogênios H-26. Desta forma foi possível definir a estereoquímica relativa dos centros quirais C-3(S^{*}), C-5(R^{*}) e N-4(R^{*}) para o alcalóide **28**, visto que os hidrogênios H-3 e H-26 possuem correlação espacial entre si.

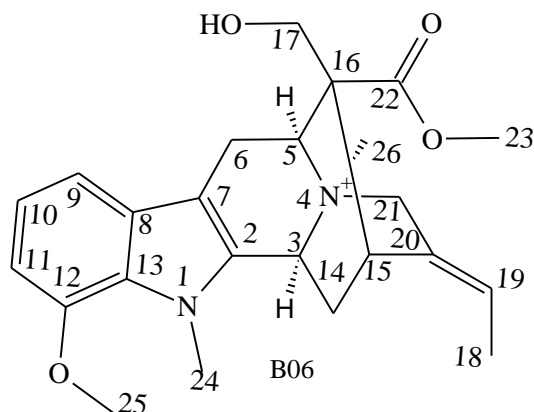
Figura 66– Espectro de RMN NOESY 1D, irradiação H-3, para **28**.



Fonte: Lab. RMN-UFSM, 2018.

5.2.1.9 12-METOXI-N₄-METIL-5-EPIVOACHALOTINA (29)

O alcalóide 12-metoxi-N₄-metil-5-epivoachalotina (**29**), foi isolado na forma de um sólido amarelo escuro, da FAEB, 85:15 (clorofórmio: metanol) a partir do EBM das cascas de *T. catharinensis*, conforme descrito na Parte Experimental (pag. 37), sendo identificado após análises por técnicas de RMN uni e bidimensionais e comparação com dados da literatura.

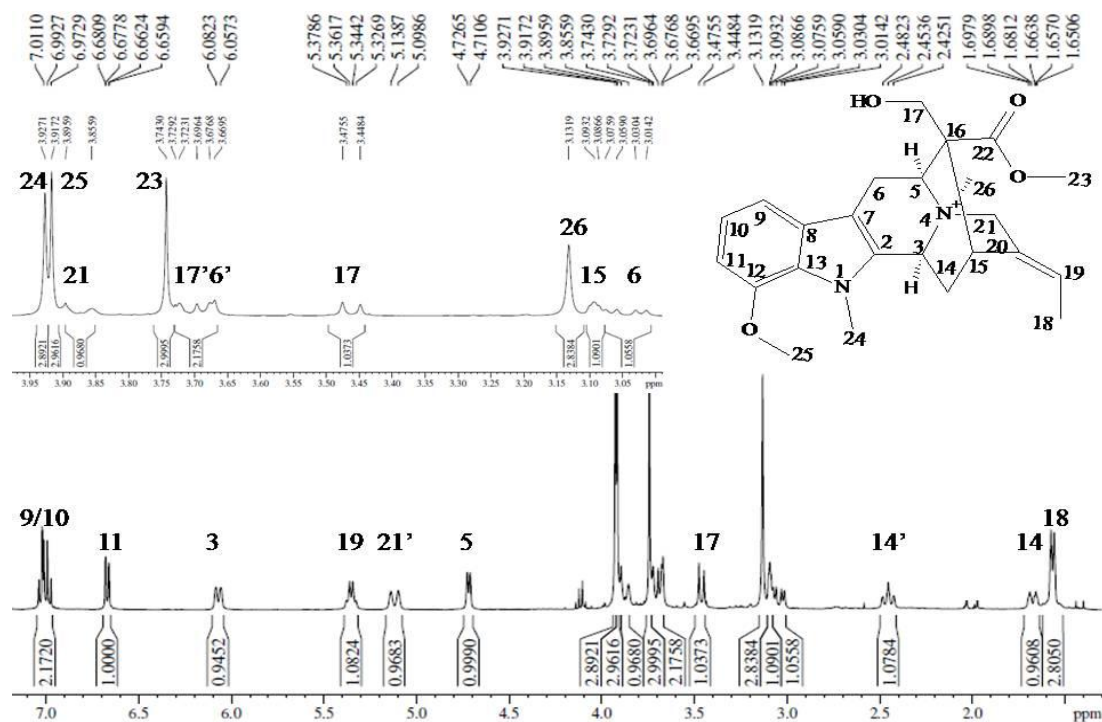


Através da análise do espectro de RMN¹H (Figura 67), nota-se a semelhança com o alcaloide **28**. Neste, observa-se uma diferença nos deslocamentos químicos de alguns hidrogênios. Os que mais diferem nos deslocamentos, são os hidrogênios H-3 (δ 6,0), H-21' (δ 5,11), H-26 (δ 3,13), H-15 (δ 3,09) e H-14' (δ 2,45).

A diferença destes deslocamentos químicos sugere tratar-se de um diastereoisômero do alcaloide **28**.

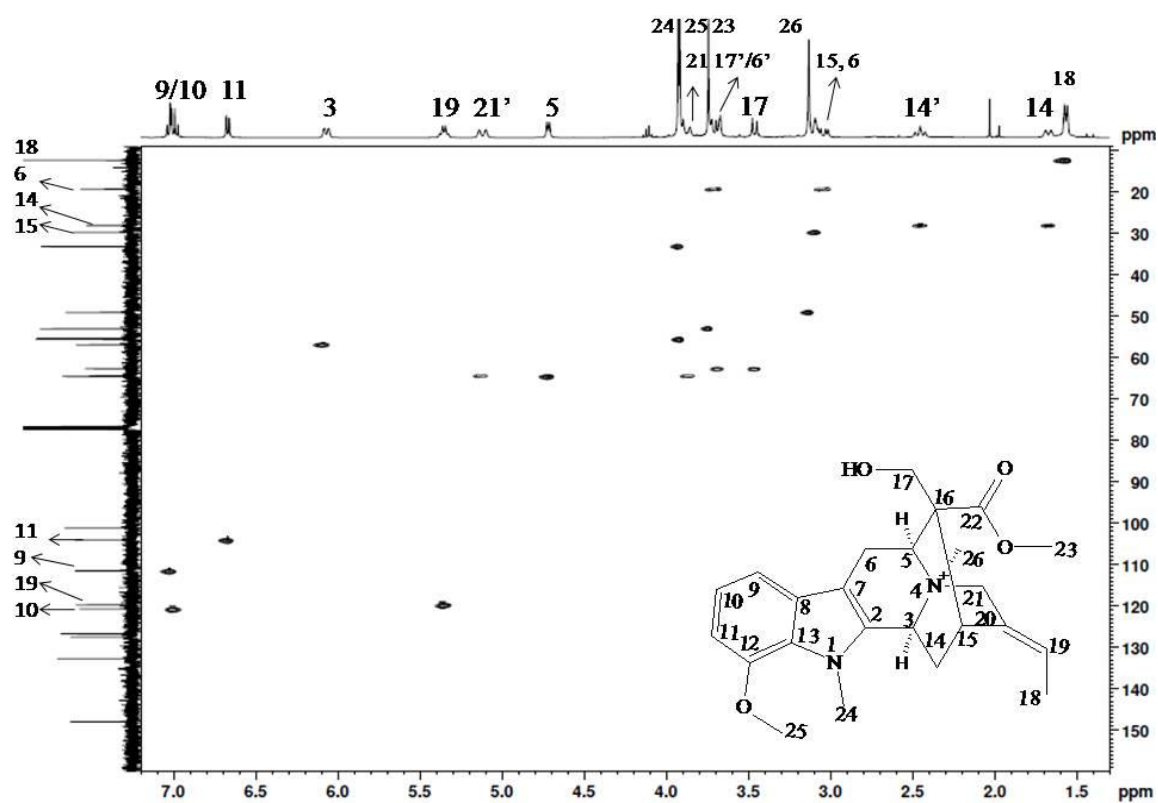
Analisando o espectro de HSQC (Figura 68, e expansão Figura 69), é possível identificar as correlações de H-C. Nota-se a presença de seis carbonos metínicos, quatro carbonos metilênicos, cinco carbonos metílicos. Estas correlações estão apresentadas na Tabela 21.

Figura 67– Espectro de RMN de ^1H de 12-Metoxi- N_4 -metil-5-epivoachalotina em CDCl_3 a 400 MHz.



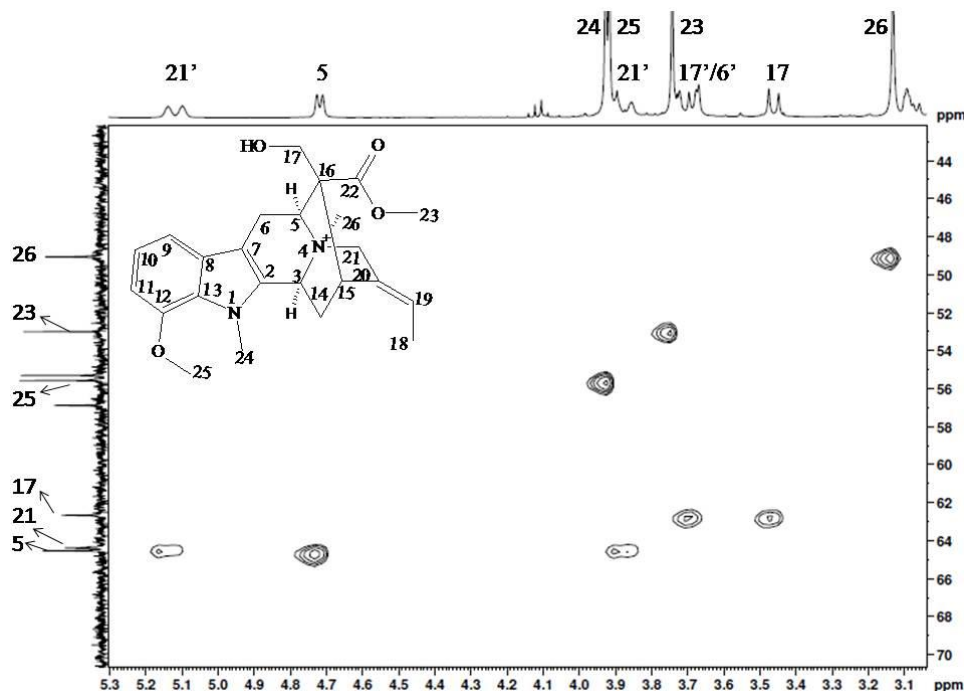
Fonte: Lab.RMN-UFSM, 2018.

Figura 68– Espectro de RMN HSQC de 12-Metoxi- N_4 -metil-5-epivoachalotina em CDCl_3



Fonte: Lab.RMN-UFSM, 2018.

Figura 69 – Expansão do espectro de RMN HSQC de 12-Metoxi-N₄-metil-5- epivoachalotina em CDCl₃ a 400 MHz



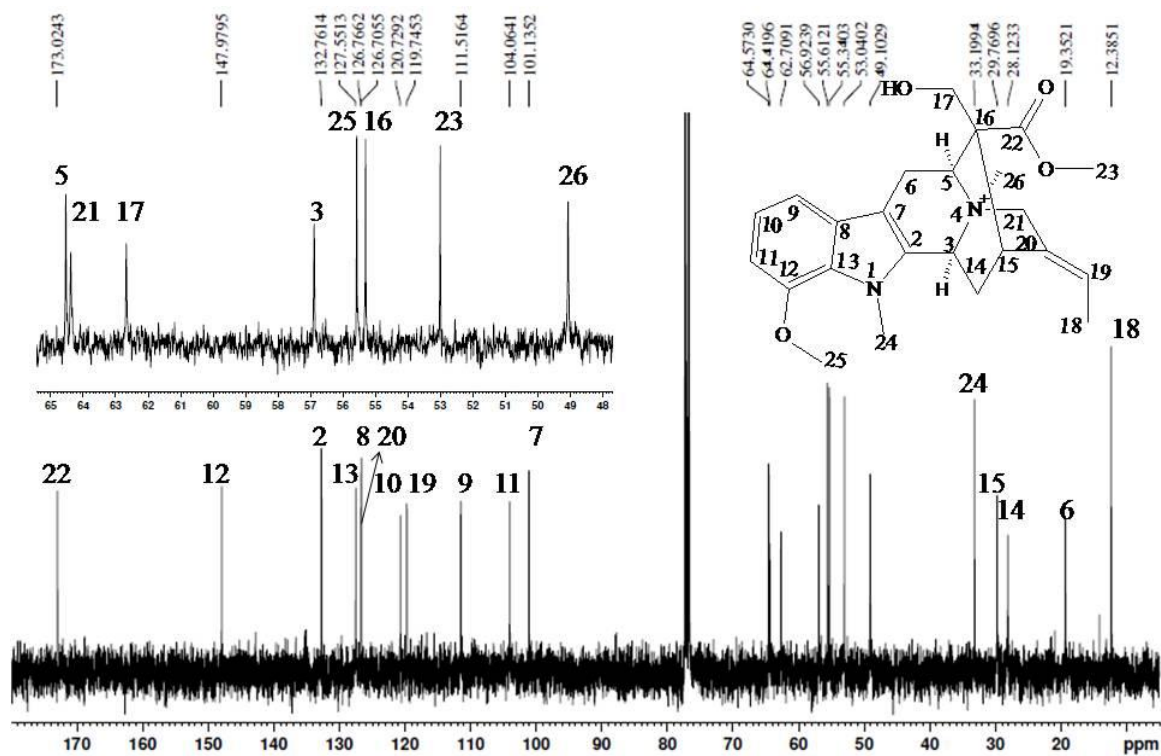
Fonte: Lab.RMN-UFSM, 2018.

O espectro de RMN ¹³C de **29** (Figura 70) apresentou sinais em δ 172,0, 147,9, 132,7, 127,5, 126,7, 126,7, 101,1 e 55,3 ppm referentes aos carbonos desidrogenados C-22, C-12, C-2, C-13, C-8, C-20, C-7 e C-16. Para os carbonos metínicos, C-10, C-19, C-9, C-11, C-5, C-3, C-15 os sinais correspondentes são δ 120,7, 119,7, 111,5, 104,0, 64,5, 56,9 e 29,7 ppm, respectivamente.

Para as metilas C-25, C-23, C-26, C-24 e C-18, os sinais correspondentes são em δ 55,6, 53,0, 49,1, 33,1 e 12,3 ppm, respectivamente.

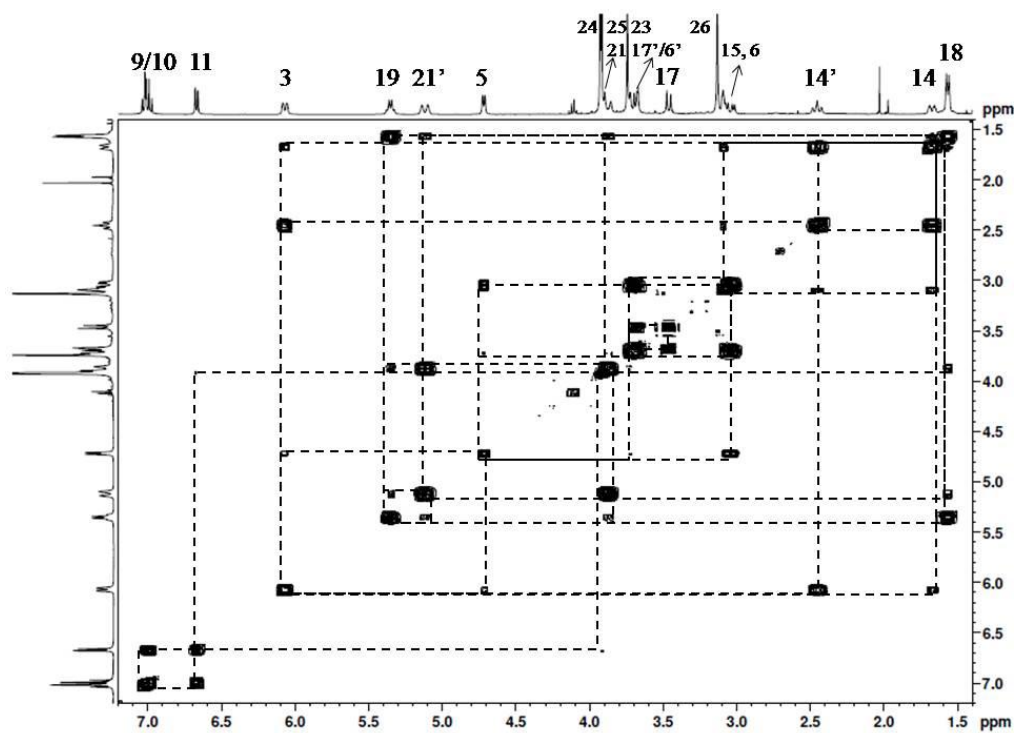
Através da análise do espectro 2D COSY (Figura 71) é possível observar as correlações H-H presentes na estrutura. Dentre os sistemas de spins da estrutura, podem ser observados os acoplamentos a longa distância da olefina, H-19 – H-21 e H-18. O H-18 acoplado com os H-19 e H-21. Nota-se também um acoplamento a longa distância do H-3 com H-5, além do acoplamento do H-11 com H-25.

Figura 70 - Espectro de RMN ^{13}C de 12-Metoxi-N₄-metil-5-epivoachalotina em CDCl_3 a 100 MHz.



Fonte: Lab. RMN-UFSM, 2018.

Figura 71 - Espectro de 2D COSY para 12-Metoxi-N₄-metil-5-epivoachalotina em CDCl_3 à 400 MHz.

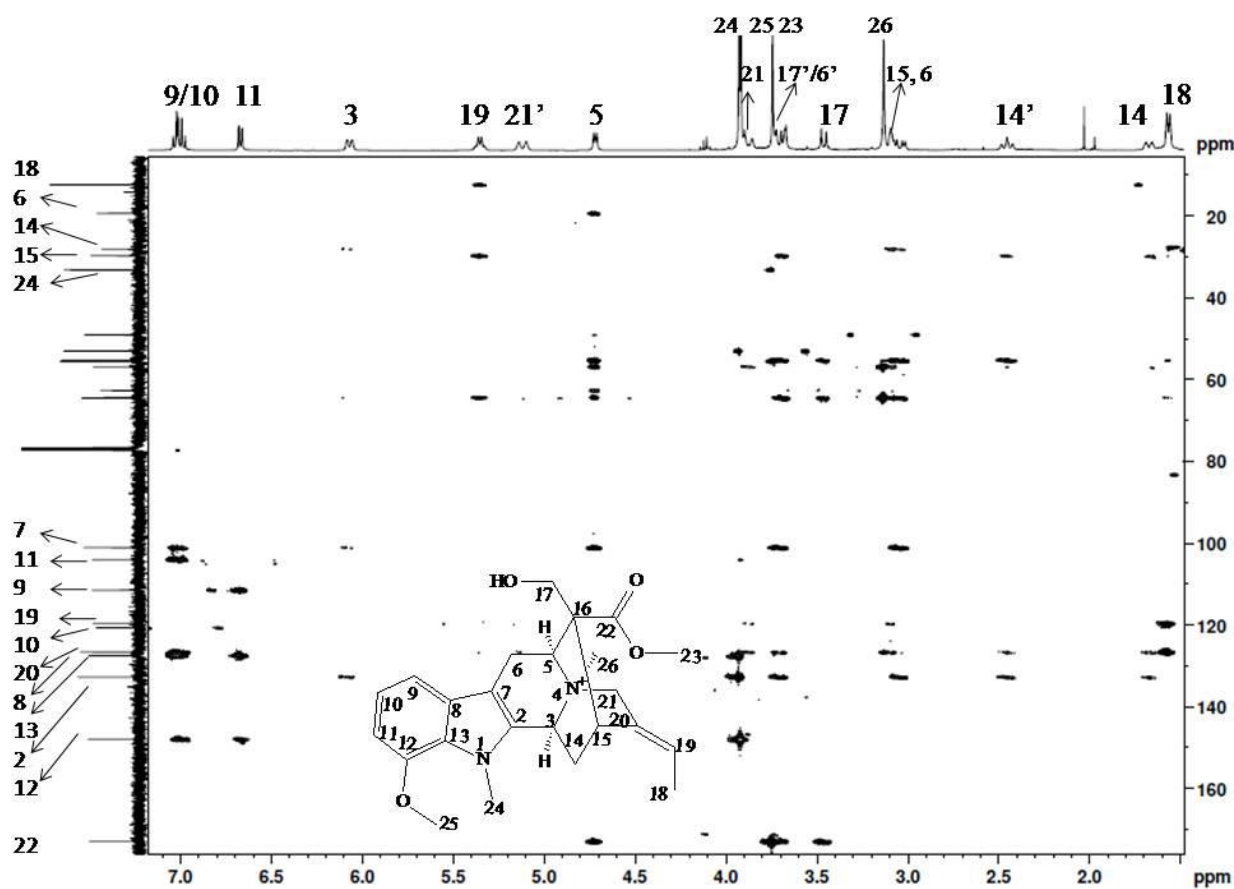


Fonte: Lab. RMN-UFSM, 2018.

Analisando o espectro de HMBC (Figura 72 e expansão Figura 73), é possível observar as principais correlações de longa distância C-H, levando em consideração as correlações $^2J_{\text{HC}}$ e $^3J_{\text{HC}}$. Estas correlações estão representadas na Tabela 21.

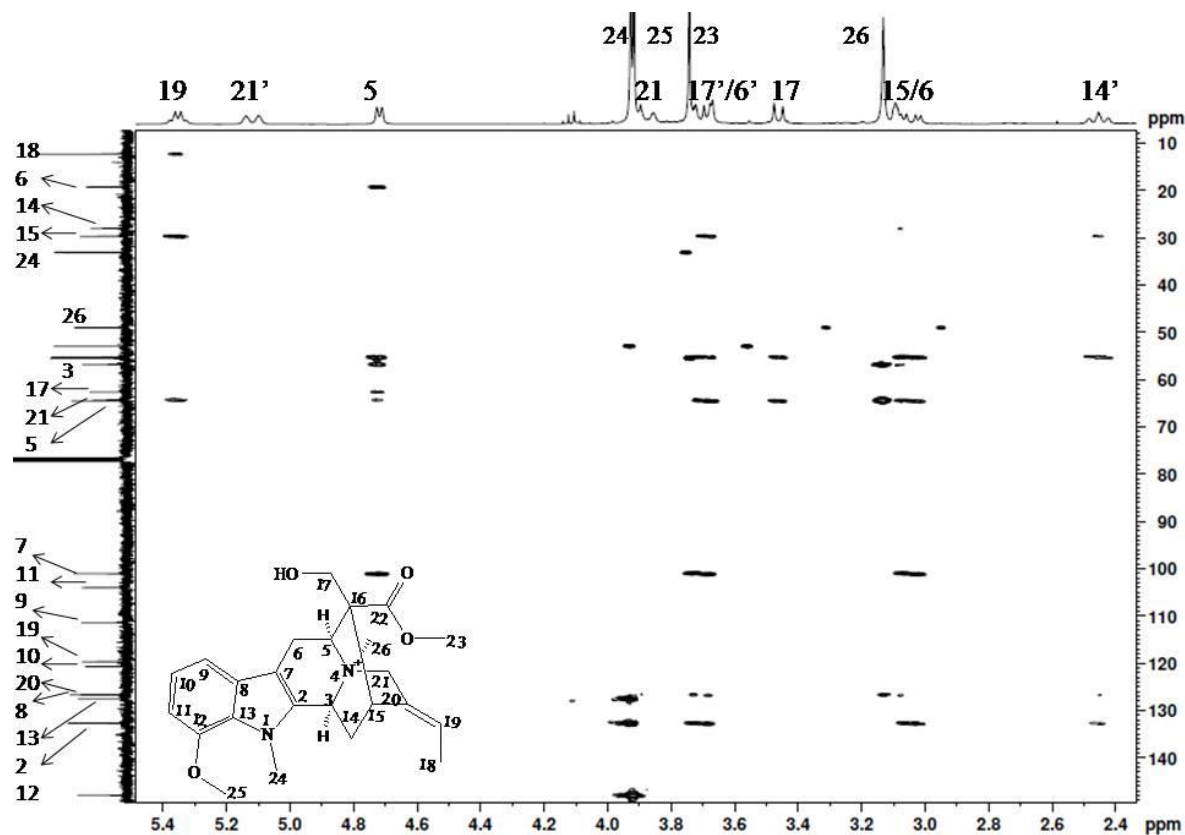
A posição da metila 26 foi definida após análise do espectro HMBC. São observados apenas acoplamentos de $^3J_{\text{HC}}$ com as posições C-3 e C-5. A posição da metoxila foi definida pelo único acoplamento de $^3J_{\text{HC}}$ com a posição C-12.

Figura 72– Espectro de HMBC para 12-Metoxi-N₄-metil-5-epivoachalotina em CDCl₃ à 400 MHz.



Fonte: Lab. RMN-UFSM, 2018

Figura 73 – Expansão do espectro de HMBC para 12-Metoxi-N₄-metil-5-epivoachalotina em CDCl₃ à 400 MHz.



Fonte: Lab. RMN-UFSM, 2018.

Tabela 21 - Dados espectrais de RMN 2D Heteronuclear HSQC e HMBC para 12-Metoxi-N₄-metil-5-epivoachalotina.

Posição	HSQC		HMBC	
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	$^2J_{HC}$	$^3J_{HC}$
2	132,7	-	H-3	H-24; H-6'; H-6
3	56,9	6,00	-	H-5; H-26; H-21
5	64,5	4,71	-	H-26; H-17; H-3
6	19,3	3,69/ 3,04	H-5	-
7	101,1	-	H-6'; H-6	H-5; H-9; H-3
8	126,7	-	-	H-6
9	111,5	7,0	-	H-11
10	120,7	7,0	-	-
11	104,0	6,67	H-10	H-9

Tabela 22 - Continuação Tabela 21

Posição	HSQC		HMBC	
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	$^2J_{HC}$	$^3J_{HC}$
12	147,9	-	H-11	H-10; H-25
13	127,5	-	-	H-9; H-11;
14	28,1	2,45/ 1,67	H-3	-
15	29,7	3,09	-	H-19; H-17
16	55,3	-	H-5; H-17	H-6'; H-6
17	62,7	3,69/ 3,47	-	H-5
18	12,3	1,56	H-19	-
19	119,7	5,41	H-18	-
20	126,0	-	-	H-18
21	64,4	5,11/ 3,87	-	H-3; H-19; H-5
22	173,0	-	-	H-17; H-23; H-5
23	53,0	3,74	-	-
24	33,1	3,92	-	-
25	55,6	3,91	-	-
26	49,1	3,13	-	-

Na Tabela 23 são descritos os deslocamentos químicos de 1H , ^{13}C , de **29**, bem como os dados comparativos da literatura (GONÇALVES, 2011), para ^{13}C e 1H .

Tabela 23 – Dados de RMN ^{13}C (100 MHz), 1H (400 MHz) de 12-Metoxi-N₄-metil-5-epivoachalotina em CDCl₃, e dados da literatura.

Posição	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	δ_{C^*} (ppm)	δ_{H^*} (ppm)
2	132,7	-	132,4	-
3	56,9	6,0 (1H,d, $J=10,4$ Hz)	56,5	6,28 (1H,d, $J=11,1$ Hz)
5	64,5	4,71 (1H,d, $J=6,3$ Hz)	64,2	4,96 (1H,d, $J=6,4$ Hz)
6'	19,3	3,69 (1H, m)	19,0	3,96 (1H, m)
6	19,3	3,04 (1H, dd, $J=17,8;7,0$ Hz)	19,0	3,30 (1H, m)
7	101,1	-	101,4	-

* δ_C (CDCl₃, 100 MHz), δ_H (CDCl₃, 400 MHz) conforme GONÇALVES, 2011.

Tabela 24 - Continuação Tabela 23

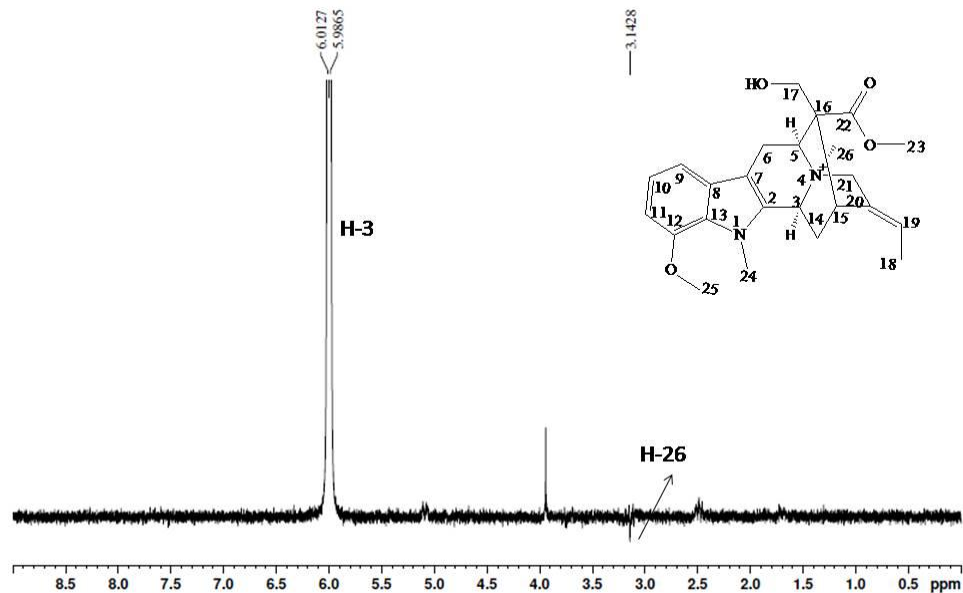
Posição	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	δ_C^* (ppm)	δ_H^* (ppm)
8	126,7	-	126,9	-
9	111,5	7,0(1H,m)	111,7	7,27 (1H,d, $J=7,0$ Hz)
10	120,7	7,0(1H,m)	120,9	7,25 (1H, t, $J=7,0$ Hz)
11	104,0	6,67(1H,dd, $J=6,6;1,2$ Hz)	103,1	6,93(d, $J=7,0$ Hz)
12	147,9	-	147,6	-
13	127,5	-	126,9	-
14'	28,1	2,45(1H,t, $J=11,7$ Hz)	27,7	2,40 (1H,m)
14	28,1	1,67(1H,dt, $J=13,4; 2,5$ Hz)	27,7	1,86(1H,m)
15	29,8	3,09 (1H,t, $J=2,0$ Hz)	29,4	3,31(1H,m)
16	55,3	-	55,0	-
17'	62,7	3,69 (1H,m)	62,2	3,78(1H,m)
17	62,7	3,47 (1H,d, $J=11$ Hz)	62,2	3,13(1H,m)
18	12,3	1,56 (3H,d, $J=7,0$ Hz)	12,1	1,82(3H,d, $J=6,4$ Hz)
19	119,7	5,35 (1H,q, $J=7,0$ Hz)	119,9	5,60 (1H,q, $J=6,4$ Hz)
20	126,7	-	127,6	-
21'	64,4	5,11 (1H,d, $J=16,4$ Hz)	64,0	5,31 (1H,d, $J=15,8$ Hz)
21	64,4	3,87 (1H,d, $J=16,2$ Hz)	64,0	3,90 (1H,m)
22	173,0	-	172,8	-
23	53,0	3,74 (3H,s)	52,8	3,99 (3H,s)
24	33,1	3,92(3H,s)	32,9	4,18 (3H,s)
25	55,6	3,91 (3H,s)	55,3	4,18 (3H,s)
26	49,1	3,13 (3H,s)	48,7	3,35 (3H,s)

* δ_C (CDCl₃, 100 MHz), δ_H (CDCl₃, 400 MHz) conforme GONÇALVES, 2011.

Fazendo uso do método de RMN NOESY 1D, foi possível definir três centros quirais da estrutura, baseando-se no hidrogênio H-3 e H-5. No espectro de NOESY 1D para H-3 (Figura 74) pode-se observar apenas a correlação espacial com os hidrogênios H-26, o mesmo ocorre com o espectro de H-5 (Figura 75). Desta forma foi possível definir a estereoquímica relativa dos centros quirais C-3(S^{*}), C-5(S^{*}) e

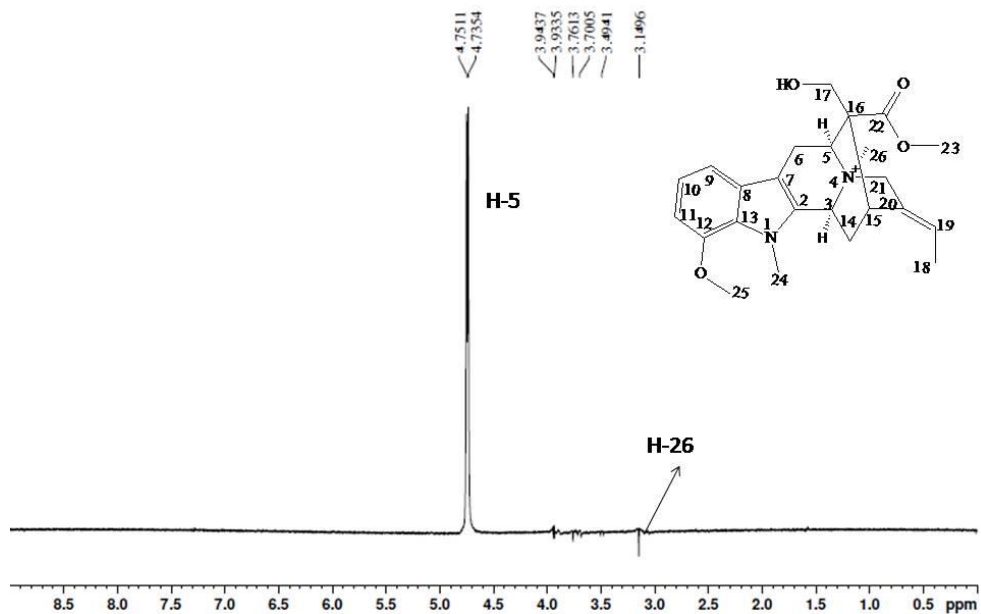
N-4(R^{*}) para o alcalóide **29**, visto que os hidrogênios H-3, H-5 e H-26 possuem correlação espacial entre si.

Figura 74– Espectro de RMN NOESY 1D, irradiação H-3, para 29.



Fonte: Lab. RMN-UFSM, 2018

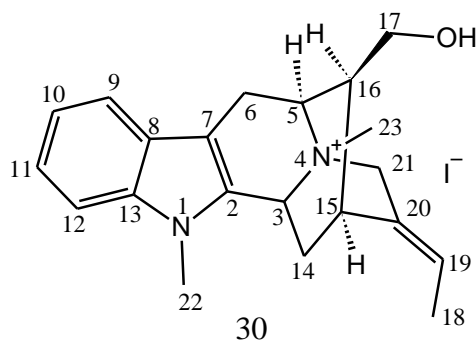
Figura 75– Espectro de RMN NOESY 1D, irradiação H-5, para 29



Fonte: Lab. RMN-UFSM, 2018.

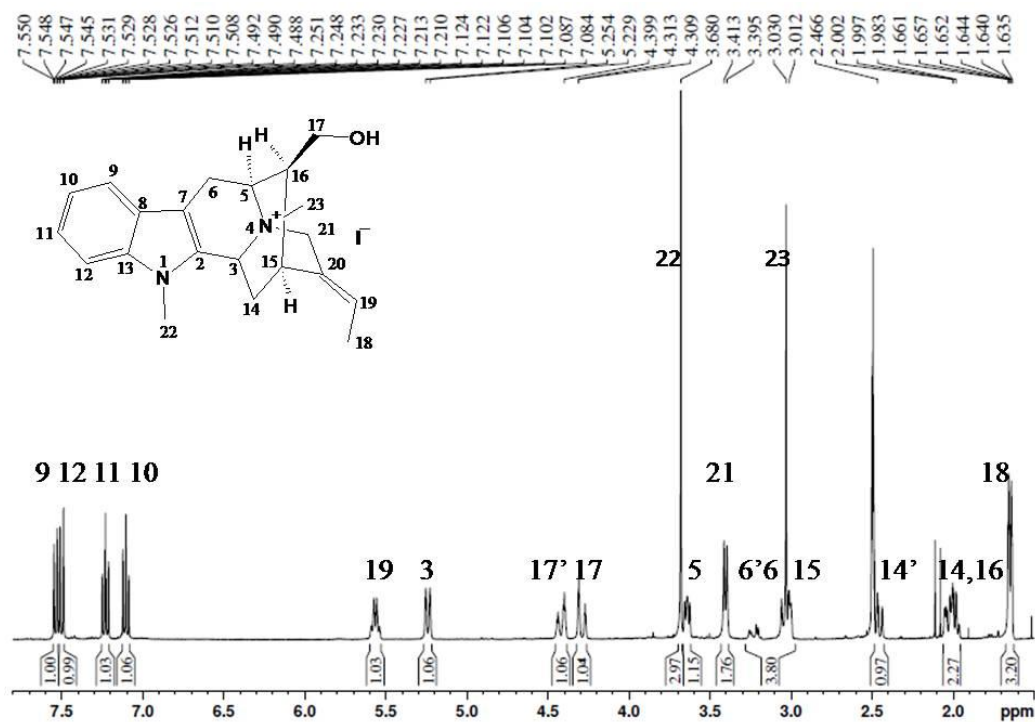
5.2.1.10 *N*₄-METIL-AFFINISINA (30)

Este alcaloide é derivado da affinisina, através da reação de N-metilação descrita na Parte Experimental (pag. 37).



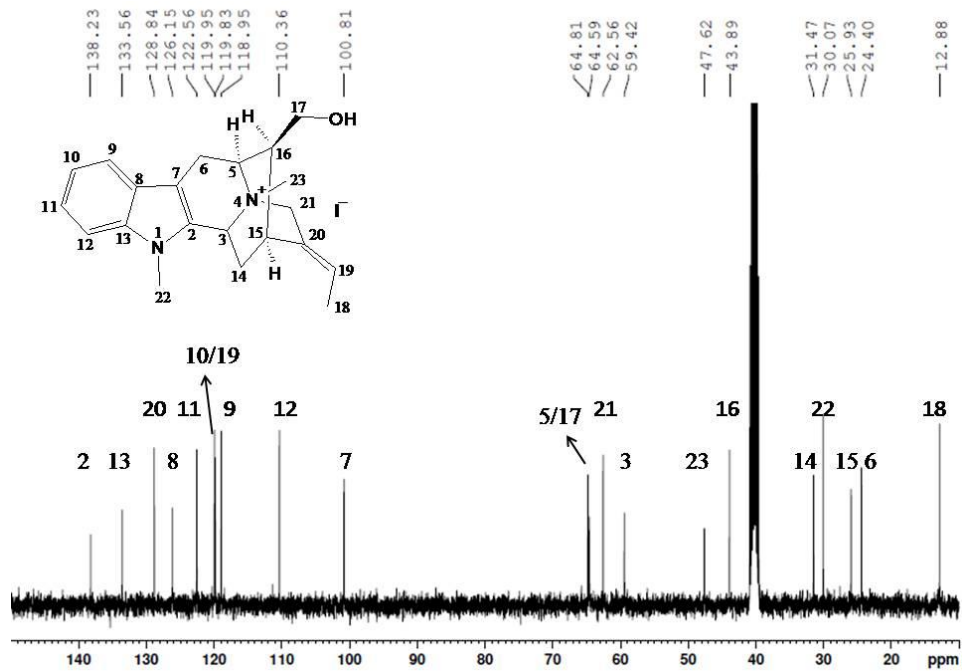
Analisando o espectro de RMN ¹H, figura 76, é possível observar algumas mudanças nos deslocamentos químicos de alguns hidrogênios. A confirmação da metilação é realizada pela observação de um simpleto em δ 3,03 ppm (H-23), assim como no espectro de RMN ¹³C, figura 77, observa-se o deslocamento químico δ 47,6 ppm (C-23).

Figura 76 – Espectro de RMN ¹H para *N*₄- Metil affinisina, em DMSO-*d*₆, à 400 MHz.



Fonte: Lab. RMN-UFSM, 2018.

Figura 77 – Espectro de RMN ^{13}C para N_4 -Metil affinisina, em $\text{DMSO-}d_6$, à 400 MHz.



Fonte: Lab. RMN-UFSM, 2018.

Na Tabela 25 são descritos os deslocamentos químicos de ^1H , ^{13}C , de **30**.

Tabela 25 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C para N_4 -Metil affinisina.

Posição	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)
2	138,2	-
3	59,4	5,24 (1H,d, $J=10,2$ Hz)
5	64,8	3,64 (1H,q, $J=6,6$ Hz)
6'	24,3	3,22(1H, dd, $J=17,0$; 4,5 Hz)
6	24,3	3,04 (1H, m)
7	100,8	-
8	126,1	-
9	118,9	7,04(1H, dt, $J=8,6$; 1,0 Hz)
10	119,9	7,10(1H,ddd, $J=8,2$; 7,0; 1,0 Hz)
11	122,5	7,23(1H,dd, $J=8,7$;7,1; 1,0 Hz)
12	110,3	7,50(1H, dt, $J=8,7$; 1,0 Hz)
13	133,5	-
14'	31,4	2,45(1H,ddd, $J=12,3$;10,2;1,8 Hz)
14	31,4	2,00(1H,m)
15	25,9	3,00 (1H,m)
16	43,8	2,00(1H,m)
17'	64,5	4,41 (1H, dt, $J=16,8$; 2,5 Hz)
17	64,5	4,29 (1H, dt, $J=16,8$; 1,5 Hz)
18	12,8	1,64(3H,dt, $J= 7,0$; 2,0 Hz)
19	119,8	5,56 (1H,qt, $J=7,0$; 2,0 Hz)
20	128,8	-
21	62,9	3,20 (2H,d, $J= 7,5$ Hz)
22	30,0	3,67 (3H,s)
23	47,6	3,03(3H,s)

5.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Na Tabela 26, são apresentados os valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração letal mínima (CLM) dos extratos e frações de *T. catharinensis* frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Todas as amostras testadas demonstraram algum potencial antimicrobiano, com valores de CIM variando entre 62,5- 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O EBM e FAEN foram as mais ativas, inibindo o crescimento das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas testadas.

Os extratos e frações EBC, EBACE, EBM, FAEA e FAEN apresentaram potenciais de inibição até três vezes menor que o padrão ampicilina, para as bactérias *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella enterica* serovar typhimurium, *Morganella morganii*.

Bacillus subtilis foi o microorganismo mais resistente frente aos extratos brutos e frações de *T. catharinensis*.

Na Tabela 27, são apresentados os valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração letal mínima (CLM) dos extratos e frações de *T. catharinensis* frente a fungos.

Todos os extratos e frações testados demonstraram atividade contra fungos. Foram constatados valores de CLM de 125-250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para os fungos *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gatti*.

Para o microorganismo *Candida krusei* foram observados os melhores valores de CIM (1,56-31,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Observa-se que em alguns casos, a atividade é duas vezes menor que a do padrão utilizado (CIM 3,12 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

A FAEB apresentou os melhores potenciais de inibição, com valores de CIM próximos ou ainda melhores que o padrão fluconazol, com valores variando entre 1,56 - 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Tabela 26 – CIM e CLM dos extratos e frações de *T. catharinensis* frente à bactérias.

Microorganismos	(CIM/CLM $\mu\text{g/mL}$)																	
	EBH		EBC		EBACE		EBM		FAEA		FAEN		FAEB		Ampicilina		Cloranfenicol	
	CIM/CLM		CIM/CLM		CIM/CLM		CIM/CLM		CIM/CLM		CIM/CLM		CIM/CLM		CIM/CLM		CIM/CLM	
Gram-positivos																		
<i>Staphylococcus aureus</i>	250	-	250	-	250	-	250	-	250	-	125	250	250	>500	200	>200	1,56	6,25
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	-	-	500	-	-	-	125	-	250	>500	100	>200	6,25	50
<i>Bacillus cereus</i>	500	-	500	-	500	-	500	-	500	-	125	-	500	>500	200	>200	3,12	12,5
<i>Enterococcus spp.</i>	250	-	250	-	125	-	125	-	250	-	62,5	-	-	-	-	-	3,12	12,5
<i>Enterococcus faecalis</i>	>500	-	>500	-	>500	-	500	-	>500	-	62,5	-	500	>500	1,56	12,5	3,12	12,5
<i>Enterobacter aerogenes</i>	250	500	250	500	125	500	125	-	250	-	62,5	250	250	>500	200	>200	1,56	12,5
Gram-negativos																		
<i>Escherichia coli</i>	250	-	125	-	250	-	125	-	250	-	250	-	500	>500	200	>200	3,12	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>500	-	500	-	500	-	125	-	500	-	62,5	-	250	>500	50	>200	3,12	12,5
<i>Proteus mirabilis</i>	500	-	500	-	500	-	500	-	500	-	250	-	500	>500	25	200	6,25	25
<i>Shigella sonnei</i>	500	500	500	500	500	500	250	500	500	500	125	500	125	500	25	200	3,12	50
<i>Salmonella entérica serovar typhimurium</i>	250	-	125	-	250	-	125	-	500	-	62,5	-	125	>500	200	>200	3,12	12,5
<i>Morganella morganii</i>	500	-	125	500	125	-	125	-	125	500	62,5	-	250	>500	200	>200	6,25	50
<i>Shigella flexneri</i>	500	-	250	-	250	-	125	-	500	-	125	-	250	>500	12,5	200	1,56	3,12
<i>Salmonella enteritidis</i>	500	-	500	-	250	-	500	-	>500	-	250	-	500	>500	3,12	100	1,56	12,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	250	500	250	-	250	500	250	500	250	-	125	500	250	500	100	>200	6,25	200

(-) Não apresentou inibição.

Tabela 27 – CLM e CIM dos extratos e frações de *T. catharinensis* frente à fungos.

Microorganismos	Amostras CIM\CLM 50 ($\mu\text{g}\text{mL}$)															
	EBH		EBC		EBACE		EBM		FAEA		FAEN		FAEB		Fluconazol	
	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM
<i>Candida albicans</i>	250	500	250	500	250	-	250	-	250	500	250	500	12,5	200	1,56	>200
<i>Candida tropicalis</i>	500	500	500	-	500	-	250	-	500	-	250	-	125	>200	100	200
<i>Candida krusei</i>	7,8	-	31,2	-	7,8	-	15,6	-	250	-	31,2	-	1,56	>200	3,12	100
<i>Candida parapslosis</i>	250	500	250	500	125	500	250	500	250	500	125	500	125	>100	1,56	12,5
<i>Cryptococcus neoformans</i>	125	250	125	250	125	250	125	250	125	250	125	125	62,5	500	1,56	12,5
<i>Cryptococcus gatti</i>	125	250	125	250	125	250	125	250	125	250	125	125	62,5	125	1,56	50
<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	500	-	500	-	500	-	500	-	500	-	500	-	125	>500	3,12	50
<i>Candida dublienses</i>	500	-	250	500	500	500	250	-	500	500	250	-	62,5	>500	6,25	>200
<i>Candida glabrata</i>	500	-	500	500	500	500	250	-	500	-	250	-	31,2	>500	50	>200

(-) Não apresentou inibição.

As atividades antimicrobianas relatadas neste trabalho corroboram com estudos já realizados para os extratos de *Tabernaemontana*, onde já haviam sido mencionadas atividades com valores de CIM próximo aos padrões utilizados (MARINHO, 2016) para alguns fungos e bactérias.

A partir dessa análise pode-se concluir que os extratos brutos e frações da espécie em estudo apresentam atividade antimicrobiana, principalmente frente a fungos. Após essa constatação fez-se o ensaio com os metabólitos isolados da planta *T. catharinensis*, sendo os resultados apresentados nas tabelas 28 e 29.

Na tabela 28 são apresentados os dados de CIM e CLM dos compostos puros frente a cepas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Os metabólitos testados apresentaram inibição dos micro-organismos. O composto voacangina (**24**), apresentou melhores resultados de CIM ($3,12- 25 \mu\text{g.mL}^{-1}$) para as bactérias *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* e *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. O micro-organismo *Shigella sonnei* foi mais suscetível frente aos compostos **26**, **30** e **23**, com CIMs de 1,56; 6,25 e $12,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

O composto voacristina (**25**) apresentou melhores potenciais (CIM = $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e CLM = $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$) contra a cepa de *Enterococcus spp.*

No entanto, os compostos Voachalotina (**21**) e Affinisina (**22**) apresentaram melhores resultados de inibição frente a cepas de bactérias Gram-negativas. Com valores de $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para os microorganismos *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella sonnei*, *Morganella morganii* e *Shigella flexneri*.

Na Tabela 29 estão relatados os resultados de CLM e CIM dos compostos puros frente a cepas de fungos. Observa-se que todos os metabólitos testados apresentaram inibição dos microorganismos.

O composto **28** tem CLM de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ sendo quatro vezes mais ativo que o padrão ($200 \mu\text{g.mL}^{-1}$), o diastereoisômero **29** não apresenta tal potencial frente à cepa de *Candida tropicalis*. Ambos apresentam CIM ($1,56 \mu\text{g.mL}^{-1}$), 16 vezes menor que o padrão ($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$) frente ao micro-organismo *Candida krusei*. Frente ao micro-organismo *Cryptococcus neoformans*, **29** apresentou potencial de inibição (CIM $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$) melhor que **28** (CIM $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$), porém **28** possui CLM $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo mais próxima do padrão que **29** ($200 \mu\text{g.mL}^{-1}$). A diferença de atividade entre o par de diastereoisômeros é imensa frente ao microorganismo *Candida glabrata*, **29** ($3,12 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e **28** ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

O alcaloide **21** é semelhante estruturalmente aos compostos **28** e **29**, porem seu potencial de inibição não é tão pronunciado.

Para o par de diastereoisômeros **22**e **23** a diferença no potencial de inibição é notável. Frente ao micro-organismo *Candida krusei* o composto **23** apresenta CIM de $1,56 \mu\text{g.mL}^{-1}$, enquanto que **22** apresenta CIM ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

A metilação do composto **22**, potencializou sua atividade inibitória, frente aos micro-organismos *Candida krusei* (CIM $1,56 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e *Candida dublienses* (CIM $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

Os alcalóides **24**e **25** apresentaram bons resultados de inibição, sendo que para alguns microorganismos atingiram CIM e CLM igual ou muito próximo ao padrão.

A análise das atividades antimicrobianas corrobora com trabalhos anteriores, onde são propostas que a influência do esqueleto do alcaloide influenciará no mecanismo de ação do potencial inibitório (VAN BEEK, 1984; RASTOGI, 1998; PEREIRA, 2008). Tal característica é visível neste trabalho, alcaloides de esqueleto ibogano (**24**, **25**) possuem melhores CIM/CLM frente a bactérias, enquanto que alcaloides de esqueleto corinanteano (**22**; **23**; **28**; **29**) possuem melhores CIM/CLM frente a cepas de fungos.

A importância da estereoquímica em relação à efetividade do potencial inibitório, o que é visível nas atividades apresentadas.

Tabela 28 – CIM e CLM dos compostos puros isolados de *T. catharinensis* frente a bactérias.

Microrganismos	(CIM/CLM µg/mL)																			
	26		21		29		22		23		30		24		25		Ampicilina		Cloranfenicol	
	CIM/CLM	CIM/CLM	CIM/CLM	CIM/CLM	CIM/CLM	CIM/CLM	CIM/CLM	CIM/CLM	CIM/CLM	CIM/CLM	CIM/CLM	CIM/CLM	CIM/CLM	CIM/CLM	CIM/CLM	CIM/CLM	CIM/CLM	CIM/CLM	CIM/CLM	CIM/CLM
Gram-positivos																				
<i>Staphylococcus aureus</i>	100	>200	50	-	100	>200	50	-	100	>200	100	>200	50	-	100	-	200	>200	1,56	6,25
<i>Bacillus subtilis</i>	100	>200	100	200	100	>200	100	200	100	>200	100	>200	100	200	100	200	100	>200	6,25	50
<i>Bacillus cereus</i>	200	>200	50	-	200	>200	100	-	200	>200	200	>200	12,5	-	100	-	200	>200	3,12	12,5
<i>Enterococcus spp.</i>	-	-	50	100	-	-	50	50	-	-	-	-	50	100	25	50	-	-	3,12	12,5
<i>Enterococcus faecalis</i>	200	>200	200	-	200	>200	200	-	50	>200	50	>200	>200	-	100	-	1,56	12,5	3,12	12,5
<i>Enterobacter aerogenes</i>	100	>200	100	-	100	>200	100	200	100	>200	50	>200	100	200	100	200	200	>200	1,56	12,5
Gram-negativos																				
<i>Escherichia coli</i>	200	>200	100	-	200	>200	100	-	200	>200	200	>200	100	-	100	-	200	>200	3,12	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	200	>200	50	-	100	>200	25	-	100	>200	100	>200	3,12	-	25	-	50	>200	3,12	12,5
<i>Proteus mirabilis</i>	200	>200	200	-	200	>200	200	-	200	>200	200	>200	200	-	100	-	25	200	6,25	25
<i>Shigella sonnei</i>	1,56	>200	25	-	50	200	100	-	12,5	>200	6,25	>200	50	-	100	-	25	200	1,56	3,12
<i>Salmonella entérica</i> serovar typhimurium	50	>200	50	-	100	>200	50	-	100	>200	50	>200	25	-	50	-	200	>200	3,12	12,5
<i>Morganella morganii</i>	100	>200	25	-	100	>200	50	-	50	>200	50	>200	50	-	100	-	200	>200	6,25	50
<i>Shigella flexneri</i>	100	>200	25	-	100	>200	100	-	100	>200	100	>200	50	-	100	-	12,5	200	1,56	3,12
<i>Salmonel laenteritidis</i>	200	>200	200	-	200	>200	100	-	200	>200	200	>200	200	-	100	-	3,12	100	1,56	12,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1,56	200	100	-	50	>200	50	-	50	>200	25	>200	50	-	50	200	100	>200	6,25	200

(-) Não apresentou inibição na concentração testada.

Tabela 29 - CLM e CIM dos compostos puros isolados de *T. catharinensis* frente a Fungos.

Microorganismos	Amostras CIM\CLM 50 ($\mu\text{g}\backslash\text{mL}$)																			
	26		21		28		29		22		23		30		24		25		Fluconazol	
	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM
<i>Candida albicans</i>	-	-	100	-	50	>200	50	>200	100	100	50	>200	25	200	100	-	100	200	25	100
<i>Candida tropicalis</i>	100	200	50	-	50	50	100	>200	50	-	100	>200	50	>200	50	-	50	200	50	200
<i>Candida krusei</i>	100	>200	25	200	1,56	200	1,56	>200	100	200	1,56	200	1,56	>200	50	200	25	200	3,12	200
<i>Candida parapslosis</i>	200	>200	100	200	50	200	50	>200	100	200	100	>200	50	>200	100	-	100	-	1,56	25
<i>Cryptococcus neoformans</i>	50	200	50	50	50	50	25	200	50	100	50	100	50	50	50	50	50	-	3,12	12,5
<i>Cryptococcus gatti</i>	50	50	25	100	50	100	50	100	25	50	50	100	25	50	25	100	25	50	3,12	25
<i>Sacharomyces cerevisae</i>	200	>200	100	-	100	>200	100	>200	100	200	100	>200	100	>200	100	-	100	200	1,56	25
<i>Candida dublienses</i>	6,25	>200	100	200	50	>200	25	>200	100	-	100	>200	50	>200	100	200	100	-	3,12	12,5
<i>Candida glabrata</i>	1,56	50	200	200	100	200	3,12	200	200	200	100	200	50	200	200	200	200	200	3,12	200

(-) Não apresentou inibição na concentração testada.

6. CONCLUSÃO

A investigação fitoquímica das cascas do caule da espécie *Tabernaemontana catharinensis*, pertencente à família Apocynaceae, resultou no isolamento de nove alcaloides: voachalotina, affinisina, voacangina, voacristina, vinpocetina, voacangina hidroxí-indolenina, 12-metoxi-N₄-metil-voachalotina, 16-epiaffinisina, 12-metoxi-N₄-metil-5-epivoachalotina. Os alcaloides vinpocetina, 12-metoxi-N₄-metil-5-epivoachalotina são relatados pela primeira vez na família Apocynaceae.

A reação de derivatização do alcaloide affinisina, para obtenção do sal, N₄-metil affinisina, potencializou as atividades antimicrobianas para os micro-organismos *Candida glabrata*, *Candida dubliensis*, *Candida parapsolis*, *Candida krusei* e *Candida albicans*, fungos; *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter aerogenes*, *Shigella sonnei*, *Klebsiella pneumoniae*, bactérias.

O extrato EBM e a fração FAEN foram as que mais se mostraram ativas frente a cepas de Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Enquanto que para as cepas de fungos, todos os extratos e frações apresentaram atividade, porém destaca-se a FAEB que apresentou CIM com valores iguais e até mesmo melhores que o padrão. Dentre as melhores inibições estão os micro-organismos *Candida krusei*, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gatti*.

Das substâncias isoladas, os micro-organismos com maior inibição foram às bactérias Gram-negativas. Destacam-se os compostos Voacangina (24) e Voacristina (25) que mostraram mesma atividade que o padrão, com CIM, para o micro-organismo *Pseudomonas aeruginosa*, e CLM igual ao padrão para o microorganismo *Klebsiella pneumoniae*, respectivamente. O composto Vinpocetina (26) apresentou potencial inibitório frente aos microorganismos *Shigella sonnei* (CIM 1,56 µg. mL⁻¹) e *Klebsiella pneumoniae* (CIM 1,56 µg.mL⁻¹).

Todas as substâncias mostraram-se ativas frente a cepas de fungos. Destacam-se os pares de diastereoisômeros, 12-Metoxi-N₄-metil-voachalotina (28) e 12-Metoxi-N₄-metil-5-epivoachalotina (29), Affinisina (22), 16- Epiaffinisina (23) que apresentaram potencial de inibição até 16 vezes menor que o padrão fluconazol.

Os microorganismos *Candida krusei*, *Candida tropilais*, *Candida glabrata* e *Cryptococcus gatti* foram mais suscetíveis aos metabólitos isolados testados, apresentando CIM de 1,56 a 100 µg.mL⁻¹.

A influência da estereoquímica do coposto para a efetividade do potencial de inibição do micro-organismo, que foi possível observar nos pares de diastereoisômeros affinisina, 16-epiaffinisina e 12-metoxi-N₄-metil-voachalotina, 12-metoxi-N₄-metil-5-epivoachalotina.

O estudo fitoquímico e das atividades antimicrobianas justificam seu uso na etnofarmacologia, visto que os extratos, frações e compostos isolados possuem grandes potências inibitórias para fungos e bactérias.

7. REFERÊNCIAS

ACHENBACH, H.; Voachalotin und affinisin, nebenalkaloide in tabehnaemontana fuchsiaefolia. **Tetrahedron Letters** v..37, p. 4405-4407, 1966.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. *Biologia molecular da célula*. 3.ed. Porto Alegre: **Artes Médicas**, p. 1294, 1997.

ANDRADE, M. T.; LIMA, J. A; PINTO, A. C; REZENDE, C. M.; CARVALHO, M.P; EPIFANIO, R.A. Indole alkaloids from *Tabernaemontanaaustralis* (Muell.Arg) Miersthat Inhibit acetylcholinesterase enzyme. **Bioorg. Med. Chem.** v.13 p. 4092-4095, 2005.

ARAÚJO, J. C. et al. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microorganismos potencialmete causadores de infecções oportunistas. **Revista de Patologia Tropical**, v. 33, p. 55- 64, 2004

BALESTRERI, R.; FONTANA, L.; ASTENGO, F. A Double-Blind Placebo Controlled Evaluation of the Safet and Efficacy of Vinpocetine in the treatrnent of Patients with Chronic Vascular Senile Cerebral Dysfunction. **J.Am.Geriatr.Soc** v.35, p.425-430, 1987.

BATINA, M.F.C.; GIGLIO, J.R.; SAMPAIO, S.V. Methodological care in the evaluation of LD50 and of the neutralization of the lethal effect of *Crotalusdurissus terrificus* venom by the plant *Peschiera fuchsiaefolia*. **J. Venom AnimToxins** v.3, p. 22-31, 1997.

BOLIGON, A.A; PIANA, M.; KUBIÇA, T.F. et all. HPLC analysis and antimicrobial, antimycobacterial and antiviral activities of *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. **J. of applied biomedicine.** v.13, p. 7-18, 2015.

BRAZ-FILHO, R. Contribuicao da Fitoquimica para o Desenvolvimento de umPaís Emergente. **Químca Nova**, v. 33, Supl. 1, p. 229, 2010.

BRUNETON, J. *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants*, interceptLimited, **England**, p. 815-861, 1995.

CARNEIRO, F.M.; SILVA, M.J.P.; BORGES, L.L; ALBERNAZ,L.C; COSTA, J.D.P.Tendeências dos estudos com plantas medicinais no Brasil. **Revista Sapiência:sociedade, saberes e práticas educacionais**, v.3, n.2, p. 44-75, 2014.

CASTILHO, E. R. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de surfactantes sobre *Candida albicans*. VIII Encontro Latino Americano de Pós-Graduação. Universidade Federal do Paraíba, 2000.

CASTRO, H. G.; FERREIRA, F. A.; SILVA, D. J. H.; MOSQUIM, P. R. Contribuição ao estudo das plantas medicinais: metabólitos secundários. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2001.

CANTRELL, C.L.; FRANZBLAU, S.G.; FISCHER, N.H. Antimycobacterial plant terpenoids. **Planta Med.** v67, p.685–694, 2001.

CHATTIPAKORN, S.; PONGPANPARADORN, A.; PRATCHAYASAKUL, W.; PONGCHADACHA, A.; INGKANINAN, K.; CHATTIPAKORN, N.; *Tabernaemontana divaricata* extract inhibits neuronal acetylcholinesterase activity in rats, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, no. 1, p. 61–68, 2007.

CORDEL, G.A. **Alkaloids derived from tryptophan. In introduction to alkaloids a biogenetic approach.** First Ed. Wiley, New York. 1981.

CZIBULA, L.; NEMES, A.; VISKY, G.; FARKAS, M.; SZOMBATHELYI, Z.; KIRPATI, E.; SOHAR, P.; KESSEL, M.; KREIDL, J. Syntheses and Cardiovascular Activity of Stereoisomers and Derivatives of Eburnane Alkaloids. **Liebigs. Ann. Chem.** p.221 -229, 1993.

DAGNINO, D.; SCHRIPSEMA, J.; VERPOORTE, R. Terpenoid indole alkaloid biotransformation capacity of suspension cultures of *Tabernaemontana divaricata* **Phytochem** v. 35, p. 671-676, 1994.

DANIELI, B.; PALMISANO, G. **Alkaloids from *Tabernaemontana*.** In: BROSSI, A. (edit) *The Alkaloids*, New York, Academic Press. v.27; p. 1-130, 1986.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach.** Ed. Wiley, 2 ed, p. 346-375, 1997.

DEWICK, P. M. The biosynthesis of C5–C25 terpenoid compounds. **Nat. Prod. Rep.** v.16, p. 97-130, 1999

DI GIOVANNI, S.; BORLOZ, A.; URBAIN, A.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K.; CARRUPT, P.A.; REIST, M. In vitro screening assays to identify natural or synthetic acetylcholinesterase inhibitors: thin layer chromatography versus microplate methods. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 33, p.109-119, 2008.

DUARTE, M. C. T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. **Multiciência: Construindo a História dos Produtos Naturais**, Campinas, SP, 2006.

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

FLORA DIGITAL DO RIO GRANDE DO SUL, SÉRGIO CAMPESTRINI, 2011, disponível em: <http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=5248> .Acesso em: 23 Abril. 2018.

FOOD AND DRUGS ADMINISTRATION: Code of Federal Regulations, Cap. 21, p.300, 1991.

GONÇALVES, M. et. al. Application of preparative high-speed counter-current chromatography for the separation of two alkaloids from the roots of *Tabernaemontana catharinensis* (apocynaceae). **Molecules**.v.16 p. 7480, 2011.

GOWER, A. E.; PEREIRA, B. D. S.; MARSAIOLI, A.J. Indole alkaloids from *Peschiera campestris*, **Phytochemistry** v. 25, p. 2908–2910, 1986.

GUIDA, A.; DE BATTISTA, G.; BARGARDI, S. Actividad antibacteriana de alcalóides de *Tabernaemontana catharinensis* A.D.C. **Ars Pharm.** v.44, p.167-173, 2003.

HENRIQUES, A.T.; MELO, A.A.; MOUNO, P.R.; ENE, L.L.; HENRIQUES, J.A.; SCHAPOVAL, E.E. *Ervatamia coronária* chemical constituents and some pharmacological activities **J. Ethnopharmacol** v.50, p.19-25, 1996.

HERBERT, R.B. The biosynthesis of plant alkaloids and nitrogenous microbial metabolites **Nat. Prod. Rep.**, v. 18, p. 50–65, 2001.

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

INGKANINAN, K.; CHANGWIJIT, K.; SUWANBORIRUX, K., Vobasinyl-iboga bisindole alkaloids, potent acetylcholinesterase inhibitors from *Tabernaemontana divaricata* root. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 58(6) p.847-852, 2006.

LEEUWENBERG, A.J.M. **A revision of Tabernaemontana: The New World species and Stemmadenia**. V.2 Kew Royal Botanic Gardens, 1994.

LEMOS, T. ANDRADE, C. et. al. 19-Epivoacristine, na iboga alkaloid isolated from *Peschiera affinis*. **J. Braz. Chem. Soc.** V.7, p. 123-126, 1996.

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

MADINAVEITIA, A.; FUENTE, G.; GONZÁLEZ, A. The Absolute Configuration at C(7) of Voacangine Hydroxyindolenine. **Helvetica Chimica Acta** v. 81 p. 1645, 1998.

MARINHO, F. F.; SIMÕES, A. O.; BARCELLOS, T.; MOURA, S. Brazilian *Tabernaemontana* genus: Indole alkaloids and phytochemical activities. **Fitoterapia** v.114 p. 127–137, 2016.

MATOZINHOS, C.N.; KONNO, T.U.P. Diversidade taxonômica de Apocynaceae na Serra Negra, MG, Brasil. **Hoehnea** v.38, 2011.

MCCHESENEY, D. J.; VENKATARAMAN, K. S.; HENRI, J. T. Plant natural products: Back to the future or into extinction?. **Phytochemistry**, v. 68. p. 2015-2022, 2007.

MOREIRA, F.F.; MENDONÇA, C.B.F.; PEREIRA, J.F.; ESTEVES, V.G. Polianotaxonomia de espécies de Apocynaceae ocorrentes na Restinga de Carapebus. **Acta Bot. Bras.** v.18. Carapebus, RJ, Brasil, 2007.

MUÑOZ, V.; MORETTI, C.; SAUVAIN, M.; CARON, C.; PORZEL, A.; MASSIOT, G.; et. al, Isolation of Bis-Indole Alkaloids with Antileishmanial and Anti-bacterial Activities from *Perschiera van heurkii* (Syn. *Tabernaemontana van heurkii*). **Planta medica**. v.60(5) p.455-459, 1994.

NEMES, A.; CZIBULA, L.; GREINER, I. Synthesis of metabolites of cis and trans apovincamine derivatives. **ARKIVOC** v.3 p. 154-166, 2008.

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

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of new Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**. v. 75. p. 311-335, 2012.

NICOLA, C.; SALVADOR, M.; GOWER, A. E.; MOURA, S.; ECHEVERRIGARA, S.; Chemical Constituents Antioxidant and Anticholinesterasic Activity of *Tabernaemontana catharinensis*. **The Scientific World Journal**. v. 2013, p. 10, 2013.

NOGUEIRA, P.C.L.; ANDRADE, M. dos S.; SAMPAIO, T.S.; RIBEIRO, A.S.; MORAES, V.R.S.; MACHADO, S.M.F.; ALVES, P.B.; OLIVA, G., Estudo fitoquímico e avaliação farmacológica de plantas da família Apocynaceae e Guttifera do estado do Sergipe. II Seminário de Pesquisa FAP – SE. Aracajú, p. 1-3, 2004.

OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira De Farmacologia**, v. 18, p. 301- 307, 2008.

PALLANT, C.A.; CROMARTY, A.D.; STEENKAMP, V. Effect of an alkaloidal fraction of *Tabernaemontana elegans* (Stapf.) on selected micro-organisms. **J. Ethnopharmacol.** v.140, p.398–404, 2012.

PEREIRA, C.; AGOSTINHO, P.; MOREIRA, P.I.; DUARTE, A.I.; SANTOS, M.S.; OLIVEIRA, C.R. Estratégias de Neuroproteção – Efeito da Vimopocetina em Modelos in vitro de Stresse Oxidativo. **Acta Medica Portuguesa**, 16, 401-406, 2003.

PEREIRA, C.G.; LEAL, P. F.; SATO, D. N.; MEIRELES, A. A. Antioxidant and antimycobacterial activities of *Tabernaemontana catharinensis* extracts obtained by supercritical CO₂ + cosolvent. **J. Med. Food**. v. 8 p. 533-538, 2005.

- PERERA, P.; SANDBERG, F.; VAN BEEK T.A.; VERPOORTE, R.; Alkaloids of stem and rootbark of *Tabernaemontana dichotoma*. **Phytochemistry**; v.24(9) p. 2097-104, 1985.
- PEREIRA, P.S.; DIAS, D.A.; FRANÇA, S.C.; SAMPAIO, S.V. Indole alkaloids from *Tabernaemontana catharinensis* A.D.C. **Acta Horticult** v.501 p.171, 1999.
- PEREIRA, P.S.; FRANÇA, S.C.; OLIVEIRA, P.V.A.; BREVES, C.M.S.; PEREIRA, S.I.V.; SAMPAIO, S.V.; NOMIZO, A.; DIAS, D.A.; Chemical constituents from *Tabernaemontana catharinensis* root bark: a brief NMR review of indole alkaloids and in vitro cytotoxicity. **Quim. Nova** v.31 (1), p.20–24, 2008.
- PINTO, A. C. et al. Produtos Naturais: atualidade, desafios e perspectivas, **Química Nova**, v.25, Supl.1, p. 45-61, 2002.
- PONZI, E. A. C. et al. Atividade antimicrobiana do extrato de *Momordica charantia* L. **Ver. Cir. Traumatol. Buco-Mxilo-fac.**, v. 10, p. 89-94, 2010.
- RAPINI, A. Sistemática: Estudos em Asclepiadoideae (Apocynaceae) da cadeia do espinhaço de Minas Gerais. Tese de Doutorado. São Paulo –SP, Universidade de São Paulo – USP. p. 29-31, 2000.
- RASTOGI, N.; ABAUL, J.; GOH, K.S.; DEVALLOIS, A.; PHILOGEÉNE, E., BOURGEOIS, P.; Antimycobacterial activity of chemically defined natural substances from the Caribbean flora in Guadeloupe. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** v.20, p.267–273, 1998.
- RATES, S.M.K.; SCHAPOVAL, E.E.S.; SOUZA, I.A.; HENRIQUES, A.T. Chemical constituents and pharmacological activities of *Peschiera australis* **Int. J. Pharmacogn.**, v.31 p.288-294, 1993
- RUTTOH, E. K.; TARUS, P. K.; BII, C. C.; MACHOCHO A. K.; et al. Antibacterial activity of *tabernaemontana stapfiana* britten (apocynaceae) extracts. **Afr. J. Trad. CAM.** v. 6, p.186 – 194, 2009.
- SANTOS, A. et. al., Alcaloides iboga de *Peschiera affinis* (apocynaceae) – atribuição inequívoca dos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio e carbono. Atividade antioxidante. **Química Nova** v. 32 p. 1834, 2009.
- SÁPI, J. et al., Synthesis of 16-Deethyl-vincamines, 16-Deethyl-apovincamines, and Their 10-Bromo Derivatives. **Liebigs Ann. Chem.** p.1133 - 11 36, 1990.
- 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.
- SIMÕES, A.O.; ENDRESS, H. E.; CONTI, E. Systematic and character evolution of *Tabernaemontaneae* based on molecular and morphological evidence. **Taxon** v.59 p. 772-790, 2010.

SIMÕES, C.M.O.; SIMÕES, C.M.O., SCHENKE, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.O. *Farmacognosia: da planta ao Medicamento*, 5° Ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ editora da UFSC, 2004.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática : Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiosperma da flora brasileira baseado em APG II**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA São Paulo, 2005.

SPITZER, V.; RATES, S.M.K.; HENRIQUES, A.T.; MARX, F., The fatty-acid composition of the seed oil of *Peschiera australis* (apocynaceae). **FettWissenschaft Technologie-Fat Science Technology** v. 97 p. 334–335, 1995.

STEENKAMP, V.; FERNANDS, A.C.; VAN RENSBURG, C.E.J. Screening of venda medicinal plants for antifungal activity against *Candida albicans*, *Candidakrusei*, *Cryptococcus neoformans* isolated from South African AIDS patients. **S.Afr J. Bot** v.9, p. 256-258, 2007.

SUFFREDINI, I.B.; BACCHI, E.M.; SAKUDA, T.M.K.; OHARA, M.T.; YOUNES, R.N.; VARELLA, A.D., Antibacterial activity of apocynaceae extracts and MIC of *Tabernaemontana angulata* stem organic extract, **Rev. Bras. Cienc. Farm.** v.38, p.89–94, 2002.

TAESOTIKUL, T.; PANTHONG, A.; KANJANAPOTHI, D.; VERPOORTE, R.; SCHEFFER, J. Cardiovascular activity of the crude alkaloidal fraction from *Tabernaemontana pandacaqui* in the rat. **Journal of Ethnopharmacology**.v.59(3) p.131-137, 1998.

VALGAS, C. et al. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.369-380, 2007.

VAN BEEK, T.A.; VERPOORTE, R.; BAERHEIM SVENDSEN, A.; LEEUWENBERG, A.J.M.; BISSET, N.G. *Tabernaemontana* L.: A review of its taxonomy, phytochemistry, ethnobotany and pharmacology. **J Ethnopharmacol** v.10 p. 01-156, 1984.

VERONESE, E.L.G.; ESMERALDINO, L.E.; TROMBONE, A.P.F.; SANTANA, A.E.; BECHARA, G.H.; KETTELHUT, I.; CINTRA, A.C.; GIGLIO, J.R.; SAMPAIO, S.V. Inhibition of the myotoxic activity of *Bothrops jararacussu* venom and its two major myotoxins BthTX-I and BthTX-II, by the aqueous extract of *Tabernaemontanacatharinensis* A.DC. **Phytomed** v.12, p. 123-130, 2005.

VIEIRA, I.J.C.; MEDEIROS, W.L.B.; MONNERAT, C.S. Two fast screening methods (GC-MS and TLC-ChEI assay) for rapid evaluation of potential anticholinesterasic alkaloids in complex mixtures. **An Acad Bras Ciênc.** v.80, p. 3, 2008.

WINK, M. **Annual plant review: Biochemistry of Plant Secondary Metabolism**. V. 40, Second Edition, Blackwell Publishing L., 2010.

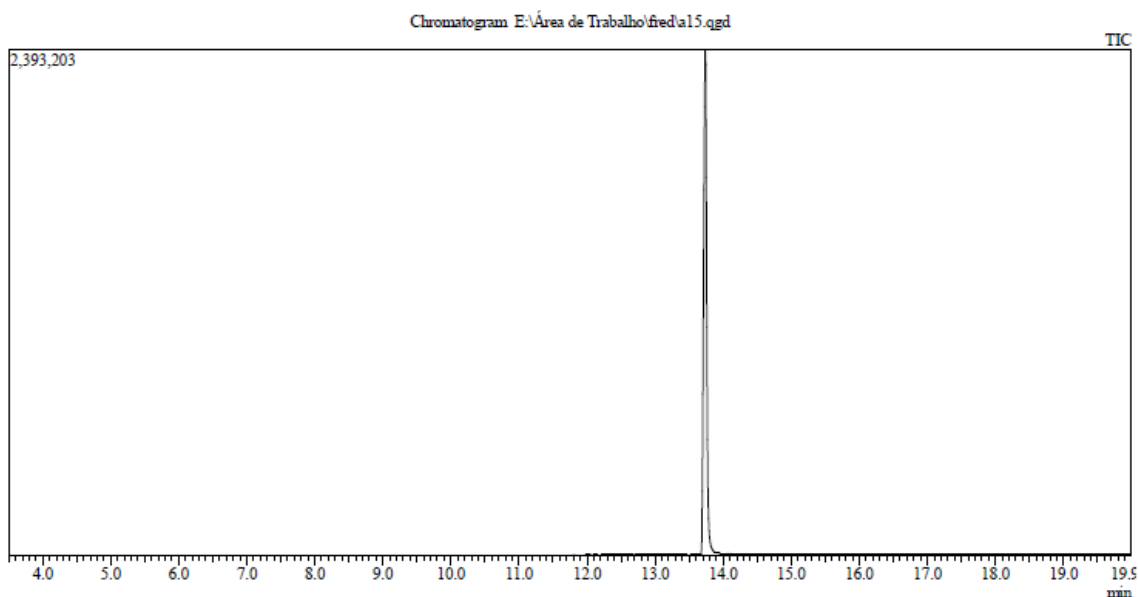
YU, J. WANG, T.; WEARING, X. Z.; MA, J.; COOK, J.M. Enantiospecific Total Synthesis of (-)-(E)16-Epiaffinisine, (+)-(E)16-Epinormacusine B, and (+)-Dehydro-16-epiaffinisine as well as the Stereocontrolled Total Synthesis of Alkaloid G. **J. Org. Chem.** v.68, p.5852-5859, 2003.

ZACOLER, M.A; OLIVEIRA, A. J. B; SARRAGIOTTO, M.H.; GRZESIUK, V.L; VIDOTTI, G.J. Qualitative Determination of Indole Alkaloids of *Tabernaemontana fuchsiaefolia* (Apocynaceae) **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 16, p. 1372-1377, 2005.

ZHOU, H.; LIAO, X.; YIN, W.; MA, J.; COOK, J.M.; General Approach for the Synthesis of 12-Methoxy-Substituted Sarpagine Indole Alkaloids Including (-)-12-Methoxy-Nb-methylvoachalotine, (+)-12-Methoxy-Na-methylvellosimine, (+)-12-Methoxyaffinisine, and (-)-Fuchsiaefoline. **J. Org. Chem.**, v.71, p.251-259, 2006.

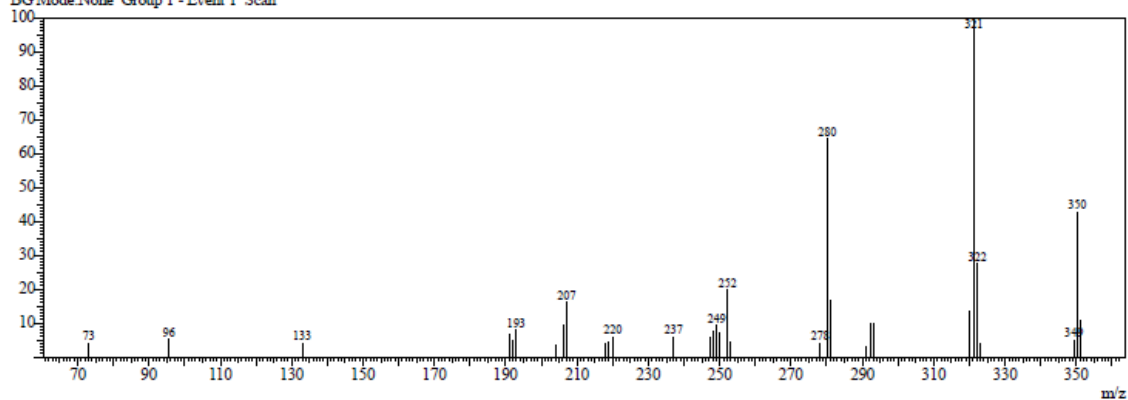
8. APÊNCIDE A- Cromatogramas e espectros de Massa (CG/MS- EM)

Figura 78 – CG/MS-EM de A15



Spectrum

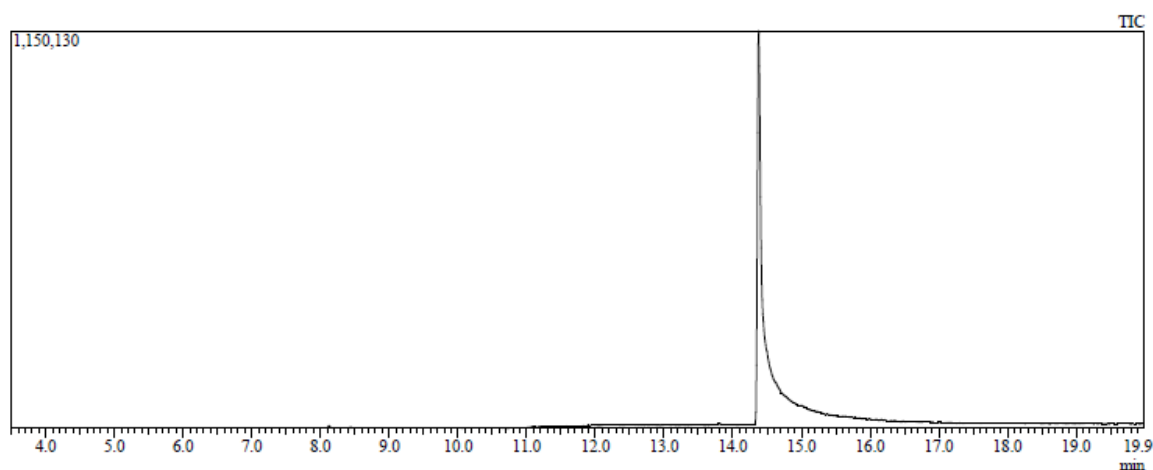
Line#:1 R.Time:13.733(Scan#:1229)
 MassPeaks:32
 RawMode:Averaged 13.383-14.267(1187-1293) BasePeak:321(27564)
 BGMode:None Group 1 - Event 1 Scan



Mass Table
 Line#:1 R.Time:13.733(Scan#:1229)
 MassPeaks:32
 RawMode:Averaged 13.383-14.267(1187-1293) BasePeak:321(27564)
 BGMode:None Group 1 - Event 1 Scan

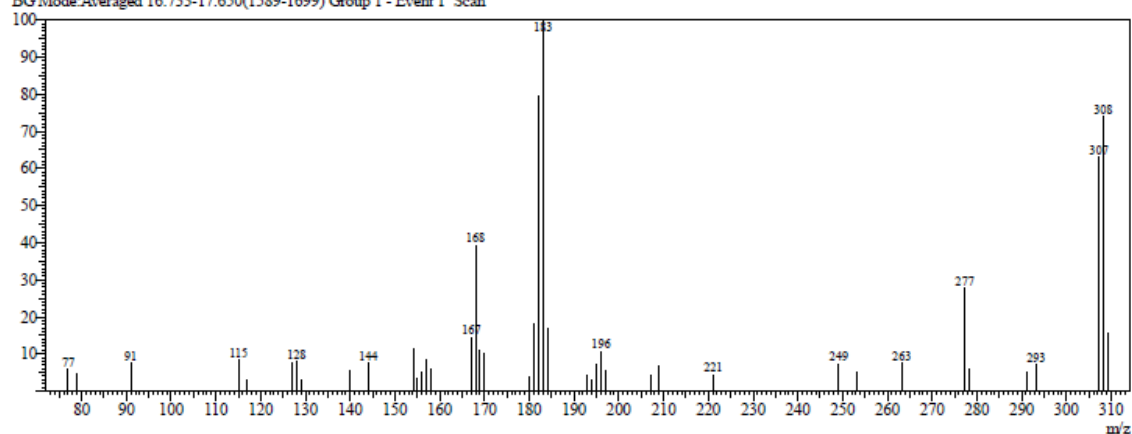
#	m/z	Abs. Int.	Rel. Int.	#	m/z	Abs. Int.	Rel. Int.	#	m/z	Abs. Int.	Rel. Int.
1	73.05	1102	4.00	12	220.05	1610	5.84	23	291.15	879	3.19
2	95.60	1421	5.16	13	237.05	1609	5.84	24	292.15	2726	9.89
3	132.95	1111	4.03	14	247.10	1570	5.70	25	293.15	2745	9.96
4	191.00	1860	6.75	15	248.10	2073	7.52	26	320.20	3700	13.42
5	192.00	1328	4.82	16	249.15	2579	9.36	27	321.20	27564	100.00
6	193.00	2210	8.02	17	250.10	1988	7.21	28	322.20	7553	27.40
7	204.00	940	3.41	18	252.10	5417	19.65	29	323.20	1065	3.86
8	206.05	2623	9.52	19	253.10	1174	4.26	30	349.25	1348	4.89
9	207.00	4420	16.04	20	278.15	1126	4.09	31	350.20	11727	42.54
10	218.00	1107	4.02	21	280.15	17681	64.15	32	351.20	2921	10.60
11	219.00	1177	4.27	22	281.15	4578	16.61				

Figura 79 – CG/MS-EM de FN7



Spectrum

Line#:1 R.Time:14.383(Scan#:1307)
 MassPeaks:42
 RawMode:Averaged 14.075-14.800(1270-1357) BasePeak:183(20931)
 BG Mode:Averaged 16.733-17.650(1589-1699) Group 1 - Event 1 Scan



Mass Table

Line#:1 R.Time:14.383(Scan#:1307)

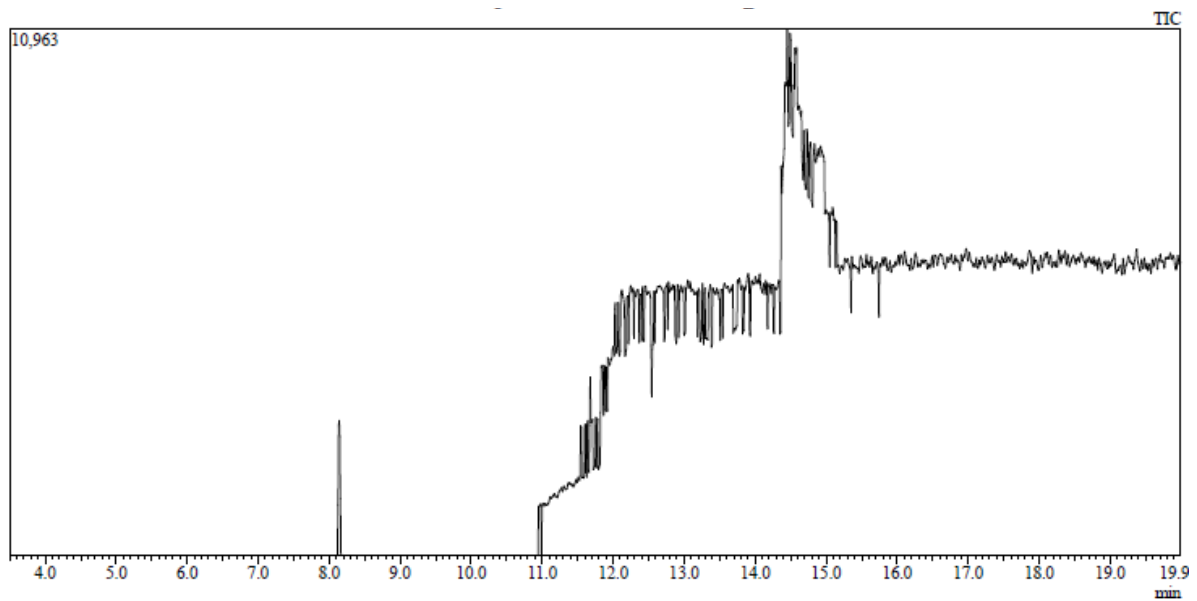
MassPeaks:42

RawMode:Averaged 14.075-14.800(1270-1357) BasePeak:183(20931)

BG Mode:Averaged 16.733-17.650(1589-1699) Group 1 - Event 1 Scan

#	m/z	Abs. Int.	Rel. Int.	#	m/z	Abs. Int.	Rel. Int.	#	m/z	Abs. Int.	Rel. Int.
1	77.00	1208	5.77	15	158.05	1187	5.67	29	197.05	1170	5.59
2	79.05	956	4.57	16	167.05	3031	14.48	30	207.00	902	4.31
3	91.00	1545	7.38	17	168.00	8232	39.33	31	209.10	1451	6.93
4	115.00	1727	8.25	18	169.00	2324	11.10	32	221.10	923	4.41
5	117.00	669	3.20	19	170.05	2114	10.10	33	249.15	1536	7.34
6	127.00	1547	7.39	20	180.05	781	3.73	34	253.10	1011	4.83
7	128.00	1650	7.88	21	181.05	3805	18.18	35	263.20	1588	7.59
8	129.00	667	3.19	22	182.05	16610	79.36	36	277.25	5832	27.86
9	140.00	1162	5.55	23	183.05	20931	100.00	37	278.20	1188	5.68
10	144.05	1550	7.41	24	184.05	3500	16.72	38	291.25	1095	5.23
11	154.05	2369	11.32	25	193.05	874	4.18	39	293.25	1498	7.16
12	155.00	735	3.51	26	194.05	651	3.11	40	307.25	13180	62.97
13	156.05	1015	4.85	27	195.05	1496	7.15	41	308.25	15507	74.09
14	157.05	1799	8.59	28	196.05	2248	10.74	42	309.25	3225	15.41

Figura 80 - CG/MS-EM de B08



Spectrum

Line#:1 R. Time:14.450(Scan#:1315)
MassPeaks:8
RawMode:Averaged 14.442-14.517(1314-1323) BasePeak:207(2674)
BGMode:None Group 1 - Event 1 Scan

