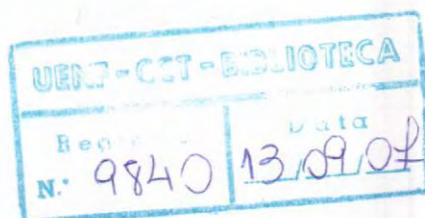


CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *Tabernaemontana Salzmannii*
(APOCYNACEAE)

Priscilla Dias Games



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ



01616160009840 - CCT
Constituintes químicos de Tab
547.72 G192c MON

547.72
G192c
MON

SETEMBRO DE 2005

547.72
G192c
MON

CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *Tabernaemontana salzmannii*
(APOCYNACEAE)

Priscilla Dias Games

“Monografia apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Graduado em Licenciatura em Química”.

Orientador: Prof. Dr. Ivo José Curcino Vieira

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

SETEMBRO DE 2005

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Química de Produtos Naturais, no Centro de Ciências e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, sob orientação do Prof. Dr. Ivo José Curcino Vieira.

Financiamento: CNPq / PIBIC

Games, P.D., Alcalóides Indólicos
de *Tabernaemontana salzmannii*
(Apocynaceae).
Campos dos Goytacazes, CCT-UENF, 2005.
Total de Páginas: 50
Monografia: Licenciatura em Química
Palavras chaves: Apocynaceae, Alcalóides
indólicos, *Tabernaemontana salzmannii*

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
SETEMBRO DE 2005

"Ninguém é tão grande que não possa aprender, nem tão pequeno que não possa ensinar".

(Autor desconhecido)

Dedico este trabalho aos meus pais José e Selma, a minha irmã Patrícia, ao meu namorado Marcos Alexandre e aos meus amigos.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ouvir às minhas preces quando mais precisava.

Aos meus pais, que me esperavam aos finais de semana com carinho e compreensão e pelo telefone incentivava e dava força para não desistir.

A minha irmã, querida, Patrícia, que desde 2003 ficou mais próxima e compreendeu os meus problemas do dia-a-dia.

Ao grande amor da minha vida, Marcos Alexandre, que soube me escutar, esperar e me apoiar em todos os dias desses cinco anos de UENF. E que nunca desistiu de me incentivar.

A minha avó Zezé, que com certeza é um exemplo de força de coragem.

As minhas amigas de república (Érica, Lidiane, Ju e Patrícia) que juntas conseguimos superar todos os problemas.

As amigas da UENF: Ju, Vinícius, Viviane, Diego, Débora e Marcelo e em especial a Lara que me ajudou muito durante todo o curso não só nos estudos, como na atenção e incentivo em todos os momentos.

Aos colegas que nesta Universidade conquistei.

Ao meu orientador e professor Ivo José Curcino Vieira pelos ensinamentos prestados e compreensão das minhas escolhas e objetivos.

Aos professores Leda, Carlos e Glauco que se destacaram pela humanidade na relação aluno-professor.

Ao meu chefe e colega de trabalho Hélio Gama que soube compreender a importância deste trabalho!

Obrigada a todos!

SUMÁRIO

Lista de Símbolos	i
Lista de Figuras	iii
Lista de Tabelas	vi
Resumo	Vii
Abstract	viii
1 – INTRODUÇÃO	01
2 - REVISÃO DE LITERATURA	04
2.1 – A Família Apocynaceae	04
2.2 – Alcalóides Indólicos	06
2.3 – Taxonomia	08
2.4 – O Gênero <i>Tabernaemontana</i>	09
2.5 - Considerações etnofarmacológicas	10
2.6 - Estudos Fitoquímicos	11
3 – OBJETIVOS	13
4 - METODOLOGIA	14
4.1 - Coleta do material vegetal e classificação botânica	14
4.2 - Secagem do material	14
4.3 - Extração do material com solventes	14
4.4 - Isolamento e purificação das substâncias orgânicas por técnicas cromatográficas	14
4.5 - Avaliação do grau de pureza das substâncias isoladas	15
4.6 - Identificação das substâncias isoladas	15

4.7 - Elucidação estrutural das substâncias isoladas	15
5 - PARTE EXPERIMENTAL	16
5.1 – Descrição resumida do isolamento e purificação dos constituintes químicos isolados do extrato de diclorometano (45,0 g) das cascas das raízes de <i>Tabernaemonta salzmannii</i>	16
5.2 - Descrição detalhada do isolamento e purificação dos constituintes químicos isolados do extrato de diclorometano (45 g) das cascas das raízes de <i>Tabernaemontana Salzmannii</i> .	20
6 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
7 – CONCLUSÃO	47
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E NOMENCLATURA

- CDCl_3 – clorofórmio deuterado
EM – espectrometria de massas
HMBC – “heteronuclear multiple-bond connectivity”
HMQC – “heteronuclear multiple-quantum coherence”
MHz – Megahertz
RMN ^1H – ressonância magnética nuclear
RMN ^{13}C – ressonância magnética nuclear de carbono-13
UV – ultravioleta
IV – infravermelho
SNC – Sistema Nervoso Central
CCDA- Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CCDP – Cromatografia em Camada Preparativa
 m/z – relação massa/carga
 $\text{MeOH-}d^4$ – metanol deuterado
 J – constante de acoplamento
sl – singleto largo
t – tripleto
m – multipletto
d – dubleto
APT – “attached proton test”
Hz – Hertz
Glu – glucose
COSY – “correlation spectroscopy”
CG/EM – cromatógrafo de gás/ espectrometria de massas
 v/v – volume por volume
q - quadrupletto
ddd – duplo, duplo dubleto
dl – dubleto largo
dt – duplo dubleto

s – singleto

dd – duplo dubleto

tl – tripleto largo

ql – quadrupleto largo

δ – deslocamento químico em partes por milhão

LISTA DE FIGURAS

iii

Figura 1	Vimblastina	4
Figura 2	Vincristina	4
Figura 3	Reserpina	4
Figura 4	Colchicina	4
Figura 5	Vincosano	8
Figura 6	Vallesiachotamo	8
Figura 7	Corinanteano	8
Figura 8	Estrichinano	8
Figura 9	Aspidospermatano	8
Figura 10	Plumerano	8
Figura 11	Eburnano	8
Figura 12	Ibogano	8
Figura 13	Tacamano	8
Figura 14	Ibogaina	11
Figura 15	Ibogamina	11
Figura 16	Coronaridina	11
Figura 17	Voacangina	11
Figura 18	Isovoacangina	11
Figura 19	Voacristina	11
Figura 20	Vobasina	11
Figura 21	Perivina	11
Figura 22	Fluxograma do fracionamento do extrato em diclorometano	16
Figura 23	Fluxograma do fracionamento da fração AD-13	17
Figura 24	Fluxograma do fracionamento da fração AD-6	18
Figura 25	Fluxograma do fracionamento da fração AD-3	19
Figura 26	Coronaridina	25
Figura 27	Espectro de RMN ¹ H (400MHz) em CDCl ₃ do alcalóide 1	26
Figura 28	Ampliação da região de δ_H 0,7 – 2,1 do espectro de RMN ¹ H	27

	(400 MHz) em CDCl_3 do alcalóide 1.	
Figura 29	Ampliação da região de δ_{H} 2,5 – 3,8 do espectro de RMN ^1H (400 MHz) em CDCl_3 do alcalóide 1.	28
Figura 30	Ampliação da região de δ_{H} 7,0 – 8,0 do espectro de RMN ^1H (400 MHz) em CDCl_3 do alcalóide 1.	29
Figura 31	Espectro de RMN ^{13}C (100MHz) em CDCl_3 do alcalóide 1	30
Figura 32	(19S)Heyneanina	31
Figura 33	Espectro de RMN ^1H (400 MHz) em CDCl_3 do alcalóide 2.	32
Figura 34	Ampliação da região de δ_{H} 7,4 – 8,0 do espectro de RMN ^1H (400 MHz) em CDCl_3 do alcalóide 2.	33
Figura 35	Ampliação da região de δ_{H} 7,0 – 7,3 do espectro de RMN ^1H (400 MHz) em CDCl_3 do alcalóide 2.	34
Figura 36	Ampliação da região de δ_{H} 3,4 – 4,2 do espectro de RMN ^1H (400 MHz) em CDCl_3 do alcalóide 2.	35
Figura 37	Ampliação da região de δ_{H} 2,5 – 3,3 do espectro de RMN ^1H (400 MHz) em CDCl_3 do alcalóide 2.	36
Figura 38	Ampliação da região de δ_{H} 2,6 – 3,5 do espectro de RMN ^1H (400 MHz) em CDCl_3 do alcalóide 2.	37
Figura 39	Ampliação da região de δ_{H} 0,7 – 2,1 do espectro de RMN ^1H (400 MHz) em CDCl_3 do alcalóide 2.	38
Figura 40	Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz) em CDCl_3 do alcalóide 2.	39
Figura 41	3-O-acetil- β -amirina	40
Figura 42	3-O-acetil- α -amirina	40
Figura 43	Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz) em CDCl_3 da mistura	42
Figura 44	Ampliação da região de δ_{C} 20,0 – 60,0 do espectro de RMN ^{13}C em CDCl_3 da mistura.	43
Figura 45	Espectro de RMN ^1H (400 MHz) em CDCl_3 da mistura.	44
Figura 46	Ampliação da região de δ_{H} 4,5 – 5,2 do espectro de RMN ^1H (400 MHz) em CDCl_3 da mistura.	45

Figura 47 Ampliação da região de δ_H 0,6–2,3 do espectro de RMN 1H (400 MHz) em $CDCl_3$ da mistura 46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Fracionamento cromatográfico do extrato de diclorometano das cascas das raízes de <i>Tabernaemontana salzmannii</i> .	20
Tabela 2	Análise da fração AD -13	21
Tabela 3	Estudo cromatográfico das frações coletadas	21
Tabela 4	Análise da fração AD-13-4-2	22
Tabela 5	Fracionamento cromatográfico da fração AD-6	22
Tabela 6	Análise da fração AD6-2	23
Tabela 7	Fracionamento cromatográfico da fração AD-3	23
Tabela 8	Fracionamento cromatográfico da fração AD-3-2	24
Tabela 9	Dados de RMN ¹ H (400 MHz) e ¹³ C (100 MHz) para o alcalóide (1) e coronaridina, em CDCl ₃ . Os deslocamentos químicos (δ) estão ppm e as constantes de acoplamento (J , entre parênteses) estão em Hz.	25
Tabela 10	Dados de RMN ¹ H (400 MHz) e ¹³ C (100 MHz) para o alcalóide (2) e (19S)-heyneanina, em CDCl ₃ . Os deslocamentos químicos (δ) estão ppm e as constantes de acoplamento (J , entre parênteses) estão em Hz.	31
Tabela 11	Dados de RMN ¹ H (400 MHz) e RMN ¹³ C (100 MHz) da mistura dos triterpenos 3 e 4, em CDCl ₃ , e comparação com os dados de RMN ¹³ C da literatura para os acetatos da β -amirina (3a) e α -amirina (4a) . Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm, e as constantes de acoplamento (J) em Hz (entre parênteses).	40

RESUMO

GAMES, Priscilla Dias; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, setembro de 2005; Alcalóides indólicos de *Tabernaemontana salzmannii*, Prof. Orientador Ivo José Curcino Vieira.

O gênero *Tabernaemontana* tem sido alvo de estudos fitoquímicos em todo o mundo, isso devido aos vários alcalóides indólicos e monoterpênicos isolados de várias espécies do gênero. E sendo de grande importância por seus usos medicinais. Este trabalho teve como objetivo analisar a composição química das cascas das raízes de *Tabernaemontana salzmannii*, coletada no município de Linhares, Espírito Santo, em junho de 1999. Do extrato diclorometano foram isolados os alcalóides: coronaridina e (19S)-heyneanina; e uma mistura dos acetatos dos triterpenos, α -amirina e β -amirina. A determinação estrutural dessas substâncias foi efetuada com base em dados espectroscópicos de RMN ^1H e ^{13}C .

ABSTRACT

GAMES, Priscilla Dias; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, setembro de 2005; Alcalóides indólicos de *Tabernaemontana salzmannii*; Prof. Orientador Ivo José Curcino Vieira.

Tabernaemontana genus has been objective of phytochemicals studies all the World, because the several monoterpenic indole alkaloids isolates of the genus. It's very important because it used medicinal. This work had this objective to analyze the chemical composition of the roots of the bark from *Tabernaemontana salzmannii* collected in Linhares, Espírito Santo state, at June, 1999. From dichloromethane were isolated the alkaloids coronaridine and (19S) heyneanine, and a mixture of triterpenes acetates α -amyrin and β -amyrin. These structural determination of compounds were carried on spectroscopic data.

1. INTRODUÇÃO

A espécie humana se aproveita de uma fração muito pequena das plantas com as quais sempre conviveu e que a antecedem o planeta terra. O reino vegetal ainda permanece como uma grande incógnita cujos mistérios começam a serem desvendados.

A humanidade, ao longo do tempo selecionou apenas cerca de 300 plantas para a alimentação e, de um pouco mais de uma centena, obteve princípios ativos puros para o tratamento de doenças. Estes números são bem modestos quando se está diante de um universo de aproximadamente 250.000 espécies de plantas superiores (Pinto, 2002).

Destas centenas de espécies vegetais, mais de 100.000 substâncias naturais tiveram suas estruturas elucidadas, através de estudos e da investigação da composição química do seu metabolismo secundário (Ahond, 1978).

Os metabólitos secundários produzidos por plantas, tiveram um papel fundamental no desenvolvimento da química orgânica sintética moderna. Historicamente, o desenvolvimento da química orgânica ocorreu paralelamente ao estudo de plantas, principalmente a partir do século XIX, quando foram registrados os primeiros estudos sobre plantas, como base científica. Isso resultou no isolamento de alguns princípios ativos de plantas, já então conhecidas como medicinais. Desses estudos foram obtidas algumas substâncias que se consagram como princípios ativos eficazes, e que até hoje, ainda são muito empregados no tratamento de doenças (Montanari, 2001).

O Brasil, com a grandeza de seu litoral, de sua flora e, sendo o detentor da maior floresta equatorial e tropical úmida do planeta, não pode abdicar de sua vocação para os produtos naturais (Pinto, 2002).

Os constituintes químicos bioproduzidos pelo metabolismo secundário (especializado) de organismos vivos têm despertado interesse de instituições públicas e empresas privadas, principalmente as indústrias farmacêuticas, instaladas nos países desenvolvidos. Intensifica-se a

procura de fontes de novos medicamentos para utilização direta, bem como de matéria-prima adequada para preparação semi-sintética de produtos úteis e de novos modelos para síntese total de substâncias com atividade biológica (Balandrin, 1993).

Nos últimos quinze anos, a maneira de se pesquisar novos compostos biologicamente ativos sofreu grandes mudanças, principalmente devido aos avanços tecnológicos. A indústria farmacêutica tem um papel importante no desenvolvimento de novos métodos que podem propiciar de forma mais rápida, o surgimento de novos medicamentos no mercado.

Um dos mais importantes fatores para sucesso no descobrimento de um fármaco novo é a diversidade química dos compostos a serem selecionados, cujas fontes podem ser: compostos sintéticos, produtos naturais ou química combinatória. Entre estas possibilidades, os produtos naturais são considerados como uma das maiores fontes de diversidade química.

A avaliação biológica foi uma das mais significantes mudanças na área de produtos naturais nos últimos anos. O entendimento dos mecanismos da doença, acompanhado do aumento de testes com receptores e enzimas disponíveis, permitiram o desenvolvimento de sistemas eficientes e rápidos de bioensaios (Trevisan, 2003).

Muitos dos metabólitos secundários isolados de angiospermas, não se têm qualquer avaliação com relação ao seu potencial farmacológico (Montanari, 2001). A descoberta de biosubstâncias abundantes merece também atenção especial, mesmo nos casos de bioprodutos já descritos na literatura. Modificações estruturais seletivas de bioprodutos abundantes através de reações químicas podem conduzir a substâncias biologicamente ativas e com outras propriedades práticas (Dewick, 1986).

Apesar de constituir uma das principais fontes de recurso naturais, os estudos sobre a química de compostos secundários das espécies que compõem a flora brasileira ainda são insuficientes. Nos últimos anos, a preocupação com a manutenção da biodiversidade no planeta levou as autoridades

governamentais a voltar a sua atenção para a manutenção dos refúgios naturais que se encontram ameaçados.

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

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

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

No gênero *Tabernaemontana*, pertencente à família Apocynaceae, algumas espécies foram largamente estudadas, tendo assim sua composição química bastante definida, além da realização de diversos testes biológicos (Hesse, 1981).

Porém, algumas espécies do gênero *Tabernaemontana*, principalmente às espécies nativas da Mata Atlântica, dentre elas a espécie *Tabernaemontana salzmannii*, ainda não teve sua constituição química estudada.

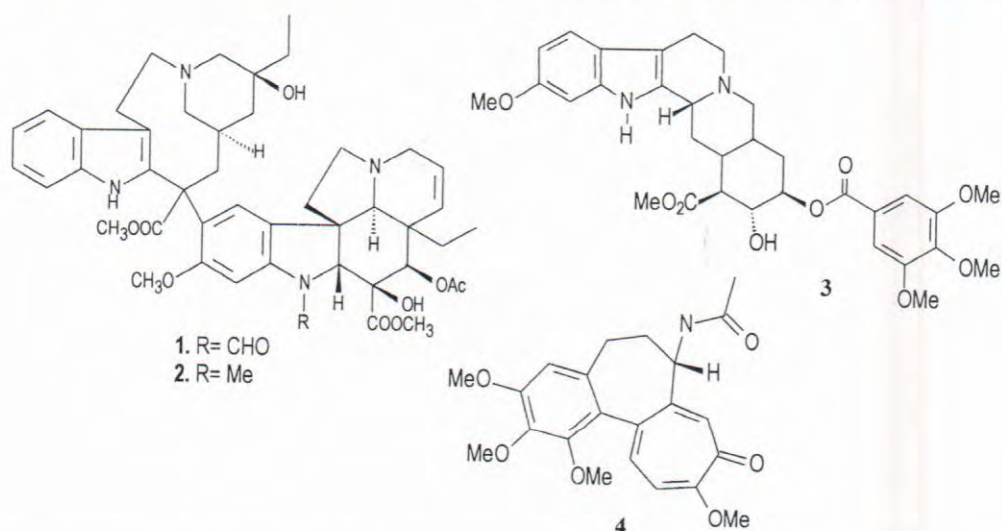
2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A Família Apocynaceae

A família Apocynaceae compreende cerca de 300 gêneros e 2.000 espécies tropicais e subtropicais. No Brasil ocorrem cerca de 376 espécies subordinadas a 41 gêneros habitando diversas formações (Moreira, 2004).

As Apocynaceae são permanentes à ordem Gentianiales, classe Dicotyledoneae, subclasse Asteridade, divisão Angiosperma (Mabberley, 1997).

Muitas plantas desta família são usadas, desde tempos antigos, na medicina popular, em rituais mágico-religiosos, ou como veneno para flechas (*Tabernanthe iboga* – rituais místicos; *Tabernaemontana grassa* – anestésico local e veneno para flechas; entre outras) (Medeiros, 2003).



Na medicina moderna, substâncias extraídas de Apocynaceae são de uso corrente, citando a título de exemplo: a vimblastina (1) e vincristina (2) produzidos pela vinca (*Catharanthus roseus*), utilizadas na quimioterapia antineoplásica, reserpina (3) (*Rauvolfia serpentina*) usada correntemente como droga anti-hipertensiva e tranqüilizante. (Schmeller, 1998).

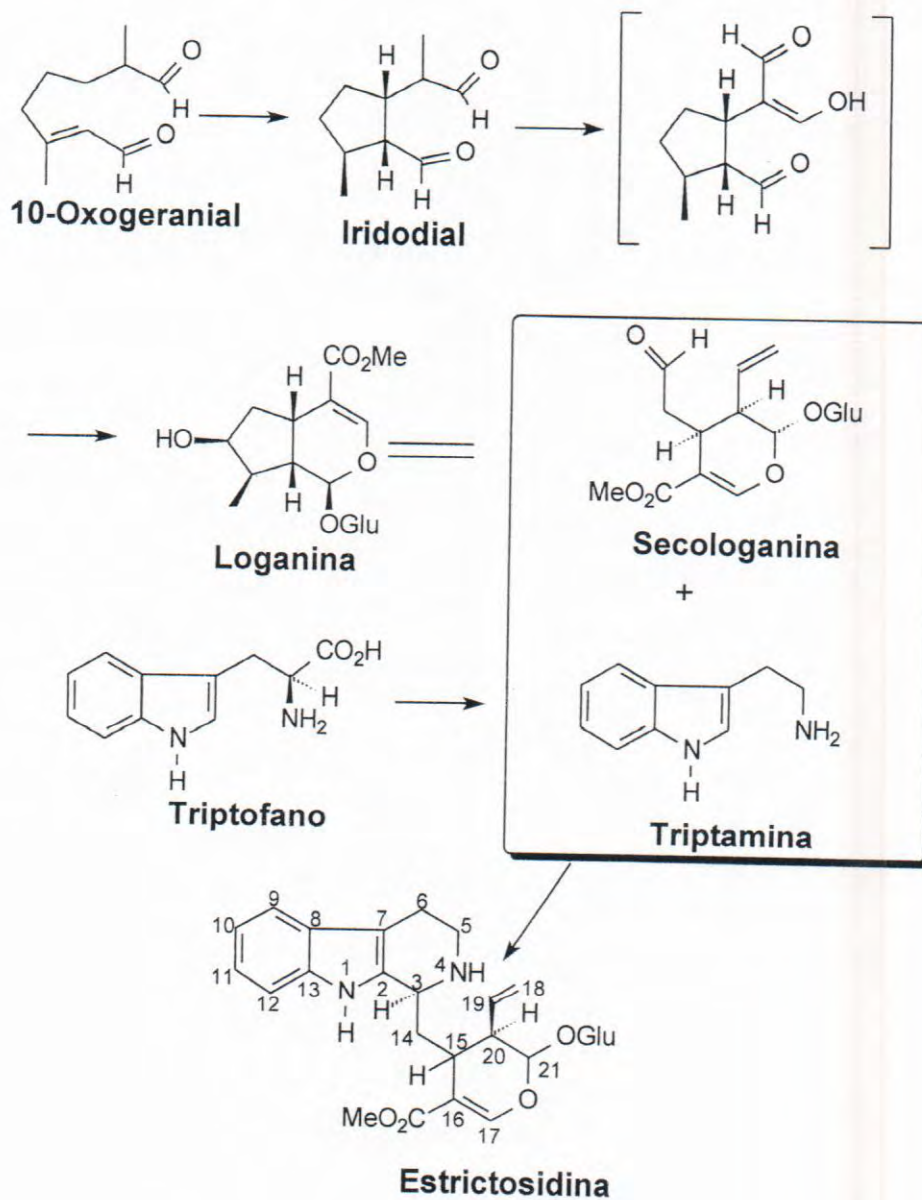
A ação desses compostos se dá de forma semelhante à da colchicina (4), um alcalóide extraído do açafrão do Prado (*Colchicum autumnale*). A exposição da célula em divisão a esses alcalóides causa o desaparecimento do fuso mitótico e, como o rompimento temporário dos

microtúbulos do fuso mata preferencialmente células que se dividem de forma anormal, essas drogas antimitóticas são amplamente utilizadas no tratamento do câncer (Albert, 1997).

Algumas substâncias anteriormente citadas são alcalóides do tipo indólicos monoterpênicos, e são estes os responsáveis pelas atividades farmacológicas das plantas desta família. Pela sua importância, estes alcalóides e as plantas que os contêm, têm sido objeto de estudos fitoquímicos, biossintéticos, etnofarmacológicos, farmacológicos, farmacognósticos, quimiotaxonômicos e biotecnológico, além de servirem como modelo para síntese de compostos biologicamente ativos (Danieli, 1986).

2.2. ALCALÓIDES INDÓLICOS

2.2.1. Considerações Biossintéticas



Esquema 1: Esquema de formação da Estrictosidina

Dentre as várias classes de alcalóides indólicos, os monoterpênicos apresentam uma grande variedade estrutural. Uma característica interessante deste grupo de alcalóides é a origem

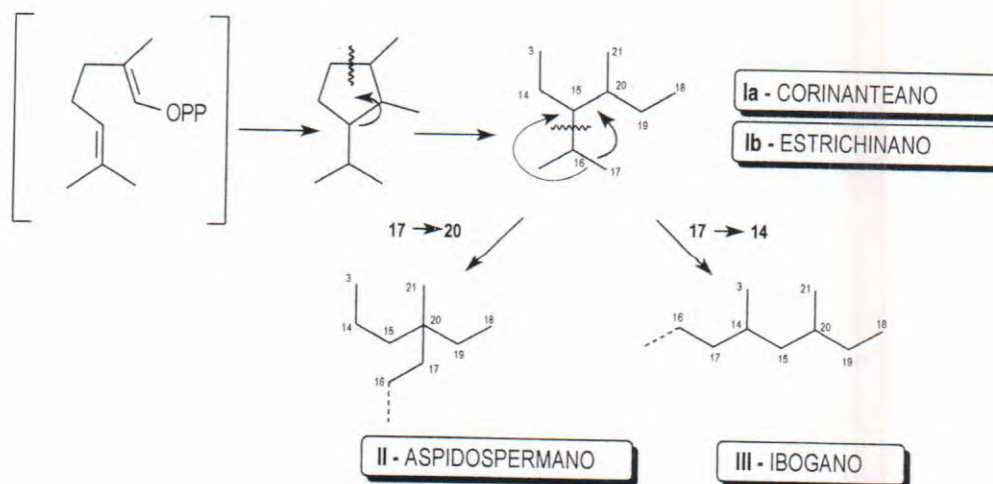
biossintética comum: todos eles têm o mesmo precursor, a estrictosidina, que é um alcalóide glicosilado formado pela condensação de uma molécula de triptamina (advinda do triptofano por uma reação de descarboxilação) com um aldeído monoterpênico denominado secologanina (**Esquema 1**).

Rearranjos na parte terpenoídica da estrictosidina leva a formação de diferentes classes, apresentados no **Esquema 2**. Baseado na biogênese é possível classificar estes alcalóides em diferentes classes:

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

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

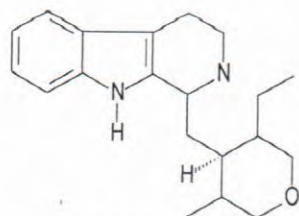
Classe III – Alcalóides com rearranjo nos carbonos C-17 → C-14 da unidade monoterpênica (esqueleto ibogano) (Bruneton, 1995).



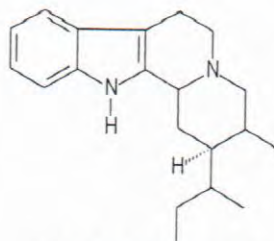
Esquema 2: Rearranjos na cadeia terpenoídica

Estas classes são subdivididas em nove tipos principais: vincosano, vallesiachotamano, corinanteano, estrichinano, aspidospermatano, plumerano, eburnano, ibogano e tacamano, e seus

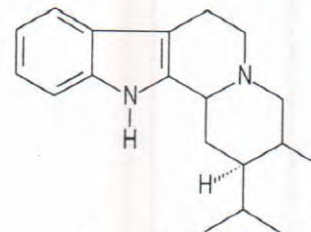
subtipos, dependendo das características de seus esqueletos. Muitas das etapas e mecanismos que levam a formação destes esqueletos são conhecidos (Medeiros, 2003).



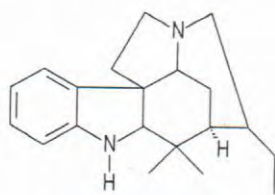
vincosano (5)



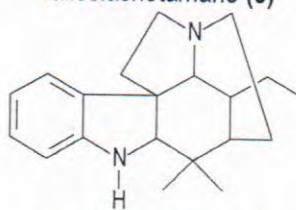
vallesiachotamano (6)



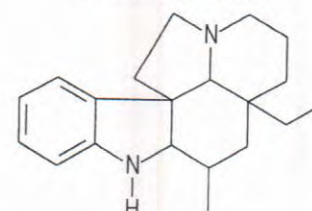
Ccrinanteano (7)



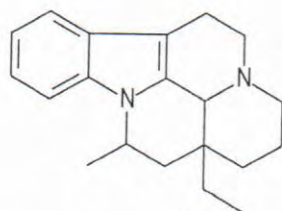
estrichinano(8)



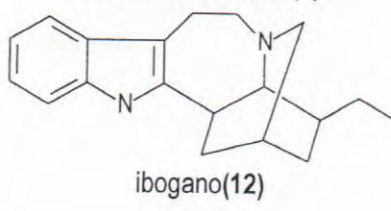
aspidospermatano (9)



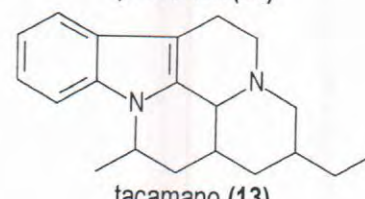
plumerano(10)



eburnano(11)



ibogano(12)



tacamano (13)

2.3. TAXONOMIA

A família Apocynaceae, juntamente com as famílias Rubiaceae e Loganiaceae, produzem alcalóides indólicos monoterpênicos, sendo que a família Apocynaceae contém a maioria dos alcalóides isolados e comercializados (Bruneton, 1995). Os botânicos classificam esta família em três subfamílias: Plumerioidae, Cerberoidae e Echitoidae. Alcalóides têm sido isolados de espécies de todas essas subfamílias, mas alcalóides indólicos têm sido encontrados somente em Plumerioidae. Esta subfamília é dividida em sete tribos, e destas, quatro produzem alcalóides indólicos, são elas, Carisseae, Tabernaemontaneae, Alstonieae (Plumerieae) e Rauolfieae. Todos os gêneros destas tribos produzem alcalóides da classe I, as Rauolfieae produzem principalmente esqueletos do tipo

corinanteano e seus derivados (heteroioimbanos, ioimbanos), aspisdospermanos (classe II) são encontrados nas espécies das tribos Plumerieae, Carisseae e Tabernaemontanae. O esqueleto ibogano (classe III), com poucas exceções (*Catharanthus*, entre outros), são encontrados na tribo Tabernaemontanae (Bruneton, 1995; Danieli, 1986).

Em termos evolutivos, das três famílias anteriormente citadas, Apocynaceae é considerada a mais evoluída, sendo Loganiaceae o ancestral comum das outras duas, o que é corroborado pela complexidade dos alcalóides indólicos encontrados. Somente em Apocynaceae encontramos alcalóides indólicos monoterpênicos das classes II e III (Bruneton, 1995).

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

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

Em publicações Leeuwenberg tem revisto estes gêneros, e por características morfológicas reagrupa várias espécies do gênero *Peschiera* e *Ervatamia*, como *Tabernaemontana*, sendo usado aqui neste trabalho. O estudo fitoquímico de espécies destes gêneros contribuiu para diferenciá-los, principalmente na composição química dos seus alcalóides encontrados nestas plantas (Leeuwenberg, 1994).

2.4. O GÊNERO *TABERNAEMONTANA*

O gênero *Tabernaemontana* tem cerca de 100 espécies, sendo 27 encontradas no Brasil, e faz parte do estudo fitoquímico do grupo de trabalho do Setor de Química de Produtos Naturais da

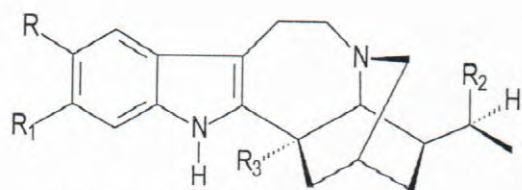
Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF) coordenado pelos professores Ivo José Curcino Vieira e Raimundo Braz-Filho. O estudo em questão foi iniciado com a espécie *Tabernaemontana laeta* (*Peschiera laeta*), *Tabernaemontana hystrix* e agora com *Tabernaemontana salzmannii*, classificada e identificada pelo Prof. A. J. M. Leeuwenberg da Wageningen Agricultural University – Holanda, onde sua exsicata encontra-se depositada.

A espécie em questão é endêmica da região Sudeste do Brasil, e nas regiões Norte e Noroeste fluminense é conhecida como “esperta” ou “guaraná”, sendo considerada uma planta venenosa para animais, e produz um látex que é utilizado popularmente para eliminar bernes em bovinos.

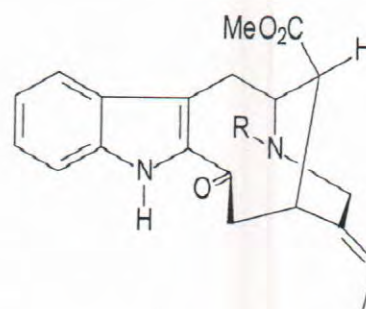
2.5. CONSIDERAÇÕES ETNOFARMACOLÓGICAS

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

Vários alcalóides indólicos isolados desta espécie têm sido investigados farmacologicamente (ibogaina(14) , ibogamina(15), coronaridina(16), voacangina(17), isovoacangina(18), voacristina(19) e vobasina(20)) apresentam atividade estimulante do SNC. A decocção de folhas tem uso popular como anestésico local em procedimentos ortopédicos, sendo que dois destes alcalóides a vobasina(20) e perivina(21) são os responsáveis por estes efeitos, onde a perivina possui uma atividade anestésica duas vezes maior que a cocaína (Neuwinger, 1998).



- 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 e perivina (21) R = H

As cascas e raízes de *Tabernaemontana caribosa* tem sido usadas em veneno de flechas e de dardos na Tailândia e Malásia (Neuwinger, 1998), e somente recentemente tem sido investigada fitoquimicamente e farmacologicamente. Outras espécies do gênero tem sido relatadas por seus usos medicinais (Medeiros, 2003).

2.6. ESTUDOS FITOQUÍMICOS

Pelas razões expostas anteriormente, o gênero *Tabernaemontana*, com revisões da sua química, taxonomia, etnobotânica e farmacologia do gênero, sendo descritos até o ano de 1984 mais de 250 alcalóides (Danieli, 1986).

Dos nove tipos de esqueletos, nenhum alcalóide do tipo vincosano foi encontrado em *Tabernaemontana*, poucas substâncias dos tipos vallesiachotamano, estrichinano, aspidospermatano, eburnano e tacamano têm sido isoladas. A maioria dos compostos isolados pertence aos esqueletos plumerano, corinanteano e ibogano, este último é encontrado em todas as espécies de *Tabernaemontana*, sendo característicos deste gênero (Medeiros, 2003).

Em uma revisão botânica, Leeuwenberg reagrupa outros gêneros dentro de *Tabernaemontana*, totalizando 99 espécies, das quais 27 são encontradas no Brasil, e destas, 6 são

endêmicas, incluindo uma nova espécie (*Tabernaemontana cumata* Leeuwenberg). A presença de aproximadamente $\frac{1}{4}$ das espécies do gênero no Brasil, aliado a um número relativamente pequeno de estudos fitoquímicos, demonstra a **necessidade** de aprofundar os estudos fitoquímicos das espécies brasileiras deste gênero (Danieli, 1986).

3. OBJETIVOS

Como objetivos principais para a realização deste trabalho têm-se:

1. O estudo fitoquímico do extrato em diclorometano das cascas das raízes de *Tabernaemontana salzmannii*.
2. O aprendizado de técnicas de isolamento e de identificação de substâncias naturais produzidas pelo metabolismo secundário de plantas.
3. Ampliação dos dados químicos do gênero *Tabernaemontana*, especialmente da espécie *Tabernaemontana salzmannii*.

4. METODOLOGIA

4.1. Coleta do material vegetal e classificação botânica:

O material vegetal de estudo constitui-se das cascas das raízes de *Tabernaemontana salzmannii*, coletada em Linhares, Espírito Santo, na reserva florestal da Companhia Vale do Rio Doce, no mês de junho de 1999.

4.2. Secagem do material:

A secagem do material foi feita ao ar livre logo após a coleta, para evitar a presença de fungos. O material após seco foi convertido em pó usando moinho de martelos.

4.3. Extração do material com solventes:

A extração foi feita a frio (maceração), a solução obtida foi destilada a pressão reduzida em evaporador rotativo. O extrato bruto foi fracionado por partição em solventes orgânicos por extrações sucessivas com solventes de polaridade crescente.

4.4. Isolamento e purificação das substâncias orgânicas por técnicas cromatográficas:

Foram utilizadas cromatografia em coluna a pressão normal e cromatografia em camada delgada preparativa.

4.5. Identificação das substâncias isoladas:

Para identificar as substâncias isoladas, foram utilizados métodos espectrométricos de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C .

4.6. Análises cromatográficas:

As análises de cromatografia em coluna foram realizadas utilizando-se sílica gel Merck Darmstadt 60 (0,063 – 0,200 mm).

As análises de cromatografia em camada delgada utilizada em cromatofolhas com sílica gel 60 F₂₅₄ Merck. As substâncias foram visualizadas por irradiação com lâmpada ultravioleta (Aldrich) a 254 nm e 365 nm e/ou pulverizadas com os seguintes reagentes cromatogênicos:

- a) Dragendorff (solução de nitrato básico de bismuto II em ácido acético diluído com iodeto de potássio).
- b) H_2SO_4 conc./Vanilina, seguido de aquecimento.

4.7. Análises espectrométricas:

As análises espectrométricas foram realizadas em aparelhos do Laboratório de Ciências Químicas da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono – 13 foram obtidos num espectrômetro Jeol (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C). O solvente utilizado foi clorofórmio deuterado (CDCl_3), usando como frequência interna o tetrametilsilano (TMS). Os deslocamentos químicos (δ) foram obtidos em parte por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz).

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 – Descrição resumida do isolamento e purificação dos constituintes químicos isolados do extrato em diclorometano (45,0 g) das cascas das raízes de *Tabernaemontana salzmannii*

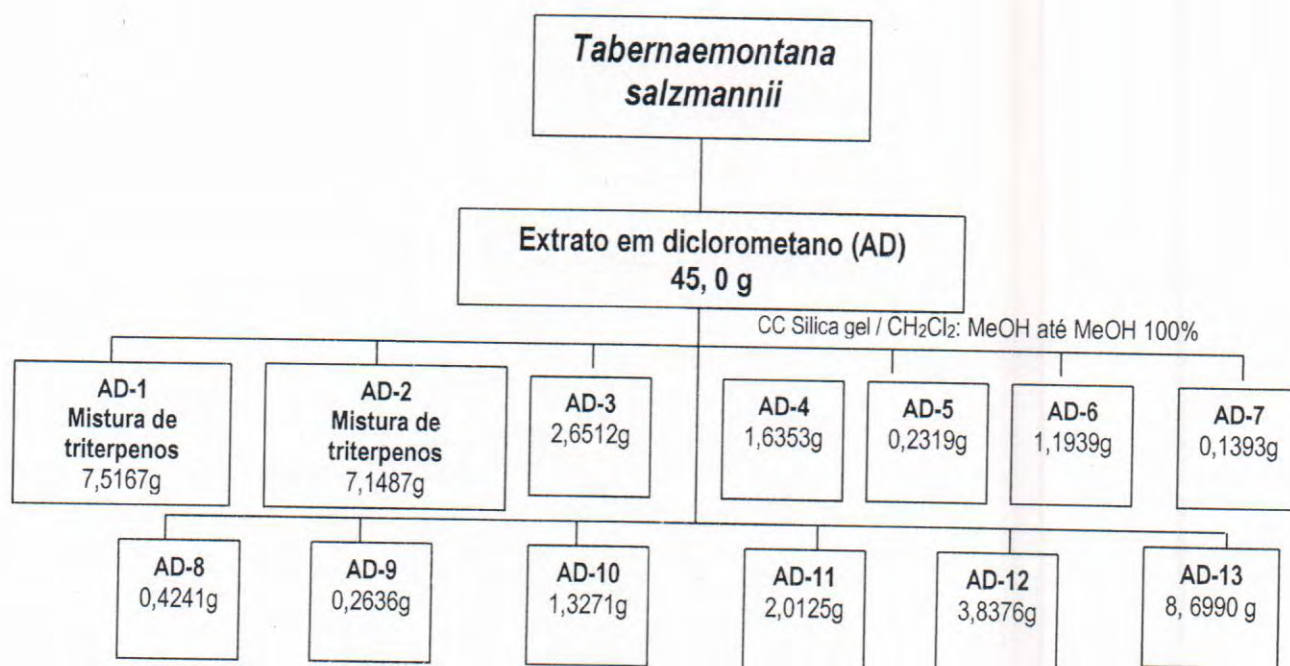


FIGURA 22: Fluxograma do fracionamento do extrato em diclorometano.

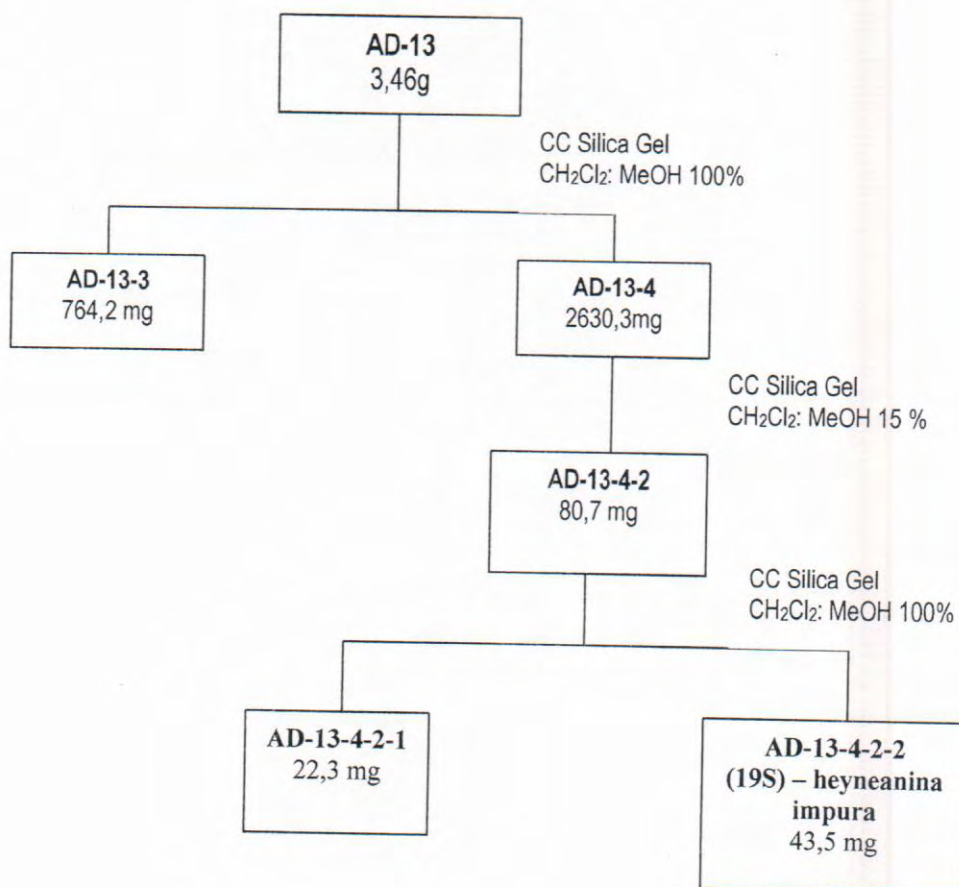


FIGURA 23: Fluxograma do fracionamento da fração AD-13

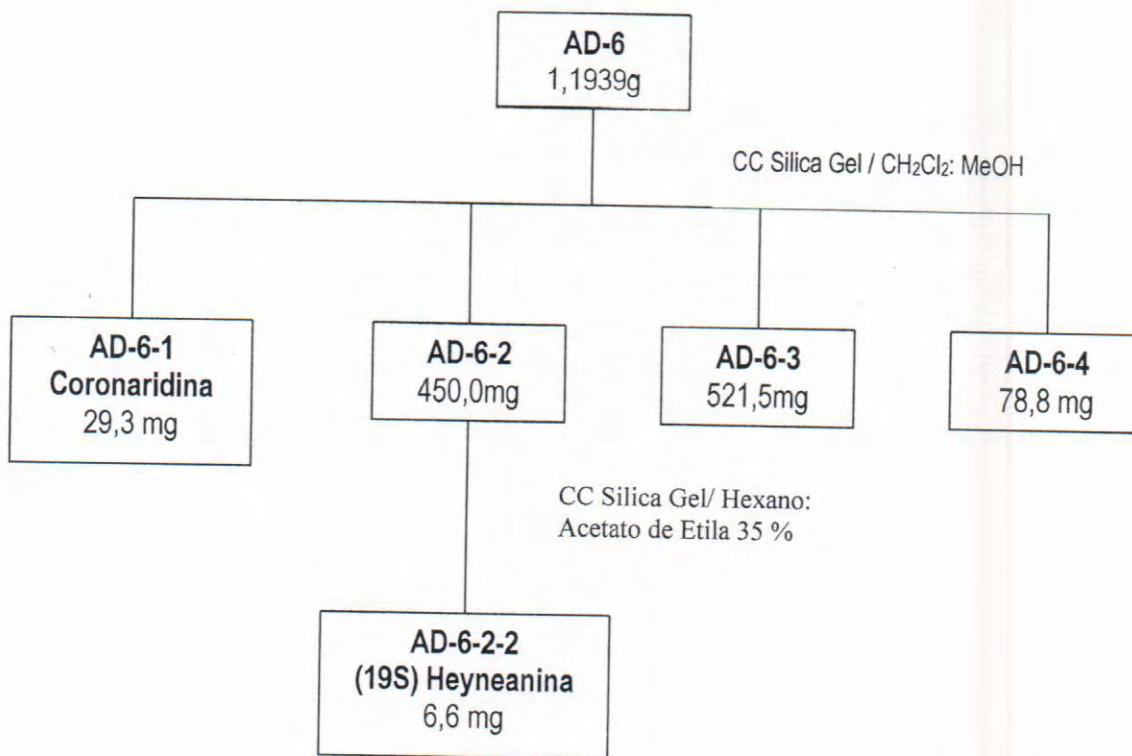


FIGURA 24: Fluxograma do fracionamento da fração AD-6.

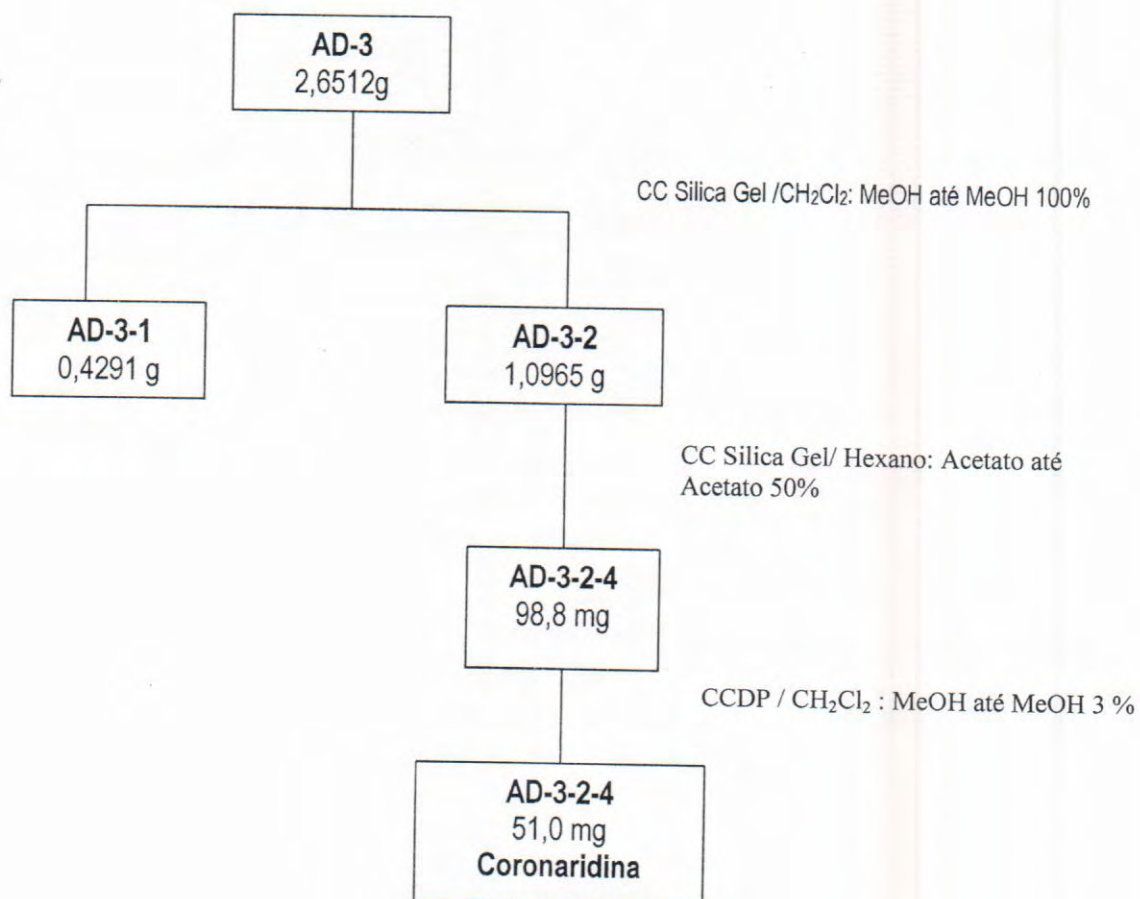


FIGURA 25: Fluxograma do fracionamento da fração AD-3

5.2. Descrição detalhada do isolamento e purificação dos constituintes químicos isolados do extrato em diclorometano (45 g) das cascas das raízes de *Tabernaemontana salzmannii*.

O extrato em diclorometano (45,0 g) foi submetido a uma cromatografia em coluna com sílica gel e eluída com diclorometano/metanol com gradiente de polaridade até MeOH puro, originando 49 frações que após análise em CCDA foram reunidas em 16 novas frações. Os dados encontram-se na Tabela 1:

TABELA 1. Fracionamento cromatográfico do extrato de diclorometano das cascas das raízes de *Tabernaemontana salzmannii*.

Frações	Código	Quantidade (g)	Substância
1	AD - 1	7,5167	*
2	AD - 2	7,1487	*
3	AD - 3	2,6512	
4 a 10	AD - 4	1,6353	*
11 a 13	AD - 5	0,2319	*
14 a 18	AD - 6	1,1939	
19	AD - 7	0,1393	*
20 a 25	AD - 8	0,4241	*
26 a 27	AD - 9	0,2636	*
28 a 31	AD - 10	1,3271	*
32 a 33	AD - 11	2,0125	*
34 a 38	AD - 12	3,8376	*
39 a 49	AD - 13	8,6990	

* Frações não trabalhadas.

Isolamento dos constituintes químicos da fração AD-13 (8,6990 g):

Parte da fração AD - 13 (3,46 g) foi submetida a um fracionamento por cromatografia em coluna com sílica gel e eluída com diclorometano:metanol com gradiente de polaridade até MeOH

puro, obtendo-se 98 frações, que posteriormente, foram reunidas por similaridade em CCDA, onde apenas as frações citadas na Tabela 2 foram de interesse.

TABELA 2: Análise da fração AD -13:

Código	Quantidade (mg)	Substância
AD - 13 - 3	764,2	
AD - 13 - 4	2630,3	

A fração AD-13-4 com maior peso, foi submetida a uma cromatografia em coluna com sílica gel utilizando como eluente diclorometano:metanol com gradiente de polaridade até metanol puro, onde foram coletadas 47 frações, que através de CCDA foram reunidas em 11 novas frações. Os dados se encontram na Tabela 3.

TABELA 3: Estudo cromatográfico das frações coletadas:

Frações	Código	Quantidade (mg)	Substância
2	AD - 13 - 4 - 1	59,20	
11 a 13	AD - 13 - 4 - 2	80,70	
14 a 16	AD - 13 - 4 - 3	384,3	*
17 a 20	AD - 13 - 4 - 4	210,6	*
21 a 29	AD - 13 - 4 - 5	52,20	*
30 a 32	AD - 13 - 4 - 6	41,60	*
33	AD - 13 - 4 - 7	65,00	*
34 a 35	AD - 13 - 4 - 8	38,70	*
36 a 42	AD - 13 - 4 - 9	179,3	*
43 a 46	AD - 13 - 4 - 10	760,2	*
47	AD - 13 - 4 - 11	27,6	*

* Frações não trabalhadas.

A fração AD-13-4-2 foi submetida a uma cromatografia em coluna com sílica gel sendo utilizado como eluente diclorometano: metanol com gradiente de polaridade até metanol 15%, onde

frações que através de CCDA foram reunidas em 11 novas frações. A Tabela 6 mostra o estudo cromatográfico das frações coletadas.

TABELA 6. Análise da fração AD6-2.

Frações	Código	Quantidade	Substância
1	AD6-2-1	7,7	*
2	AD6-2-2	6,6	(19S)Heyneanina
3-4	AD6-2-3	26	
5	AD6-2-4	3,1	*
6-7	AD6-2-5	110,5	*
8	AD6-2-6	81,9	*
9-10	AD6-2-7	13,9	*
11-12	AD6-2-8	4	*
13	AD6-2-9	18,4	*
14	AD6-2-10	3,2	*
15	descartado	----	
16	AD6-2-11	81,4	*

* Frações não trabalhadas.

Isolamento dos constituintes químicos da fração AD-3 (2,6512g)

A fração AD-3 foi submetida a um fracionamento por cromatografia em coluna de sílica gel e eluída com diclorometano:metanol com gradiente de polaridade até MeOH puro, obtendo-se 22 frações, que foram reunidas em CCDA, resultando em 2 novas frações. Os dados encontram-se resumidos na Tabela 7.

TABELA 7: Fracionamento cromatográfico da fração AD-3

Frações	Código	Quantidade (g)	Substância
3 a 4	AD-3-1	0,4291	
5 a 6	AD-3-2	1,0965	

* Frações não trabalhadas.

A fração AD-3-2 (1,0965 g) foi submetida a uma cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano:acetato de etila 50%. Foram coletadas 49 frações que posteriormente foram reunidas em 16 novas frações, mostrado na Tabela 8:

TABELA 8: Fracionamento cromatográfico da fração AD-3-2

Frações	Código	Quantidade (mg)		Substância
1 a 2	AD-3-2-1	40,0	*	
3 a 13	AD-3-2-2	33,4	*	
14 a 17	AD-3-2-3	100,3	*	
18 a 24	AD-3-2-4	98,8		Coronaridina
25	AD-3-2-5	52,0	*	
26 a 30	AD-3-2-6	99,2	*	
31	AD-3-2-7	17,3	*	
32	AD-3-2-8	32,4	*	
33	AD-3-2-9	58,2	*	
34 a 36	AD-3-2-10	153,5	*	
37	AD-3-2-11	75,0	*	
38	AD-3-2-12	13,7	*	
39	AD-3-2-13	20,6	*	
40	AD-3-2-14	23,9	*	
41	AD-3-2-15	44,5	*	
42 a 49	AD-3-2-16	90,7	*	

* Frações não trabalhadas.

A fração AD-3-2-4 foi submetida à coluna camada delgada preparativa (CCDP) eluída com CH₂Cl₂:MeOH (97:3) fornecendo 51,0 mg da substância Coronaridina.

6 - RESULTADOS OBTIDOS:

Alcalóide 1 (Coronaridina)

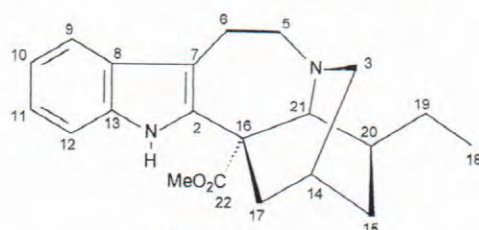


Figura 26

Tabela 9: Dados de RMN ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) para o alcalóide (1) e coronaridina, em CDCl_3 . Os deslocamentos químicos (δ) estão ppm e as constantes de acoplamento (J , entre parênteses) estão em Hz. (Shamma, 1979 ; Medeiros, 2003)

	1		Coronaridina
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
C			
2	135,47	-	136,5
7	110,25	-	110,3
8	128,77	-	128,8
13	136,56	-	135,6
16	55,06	-	55,1
22	175,70	-	175,9
CH			
9	118,39	7,47 (d, 7,7)	118,3
10	119,17	7,08 (t, 7,0)	119,0
11	121,87	7,14 (t, 7,0)	121,8
12	110,32	7,23 (d, 7,7)	110,3
14	27,34	1,88 (m)	27,2
20	39,09	1,33 (m)	38,9
21	57,43	3,56 (sl)	57,2
CH₂			
3	53,13	2,90 (m, H-3b); 2,80 (d, $J=8,4$, H-3a)	53,1
5	51,60	3,40 (m, H-5b); 3,19 (m, H-5a)	51,5
6	22,05	3,18 (m, H-6b); 3,00 (m, H-6a)	22,2
15	32,01	1,73 (m, H-15b); 1,14 (m, H-15a)	32,0
17	36,46	2,58 (d, $J=11,4$, H-17b) 1,90 (m, H-17a)	36,3
19	26,72	1,57 (dq, $J=7,0$ e $7,0$, H-19b) 1,45 (dq, $J=7,0$ e $7,0$, H-19a)	26,6
CH₃			
18	11,61	0,90 (t, 7,3)	11,6
MeO-22	52,51	3,70 (s)	52,4
HN-1	-	7,91 (s)	-

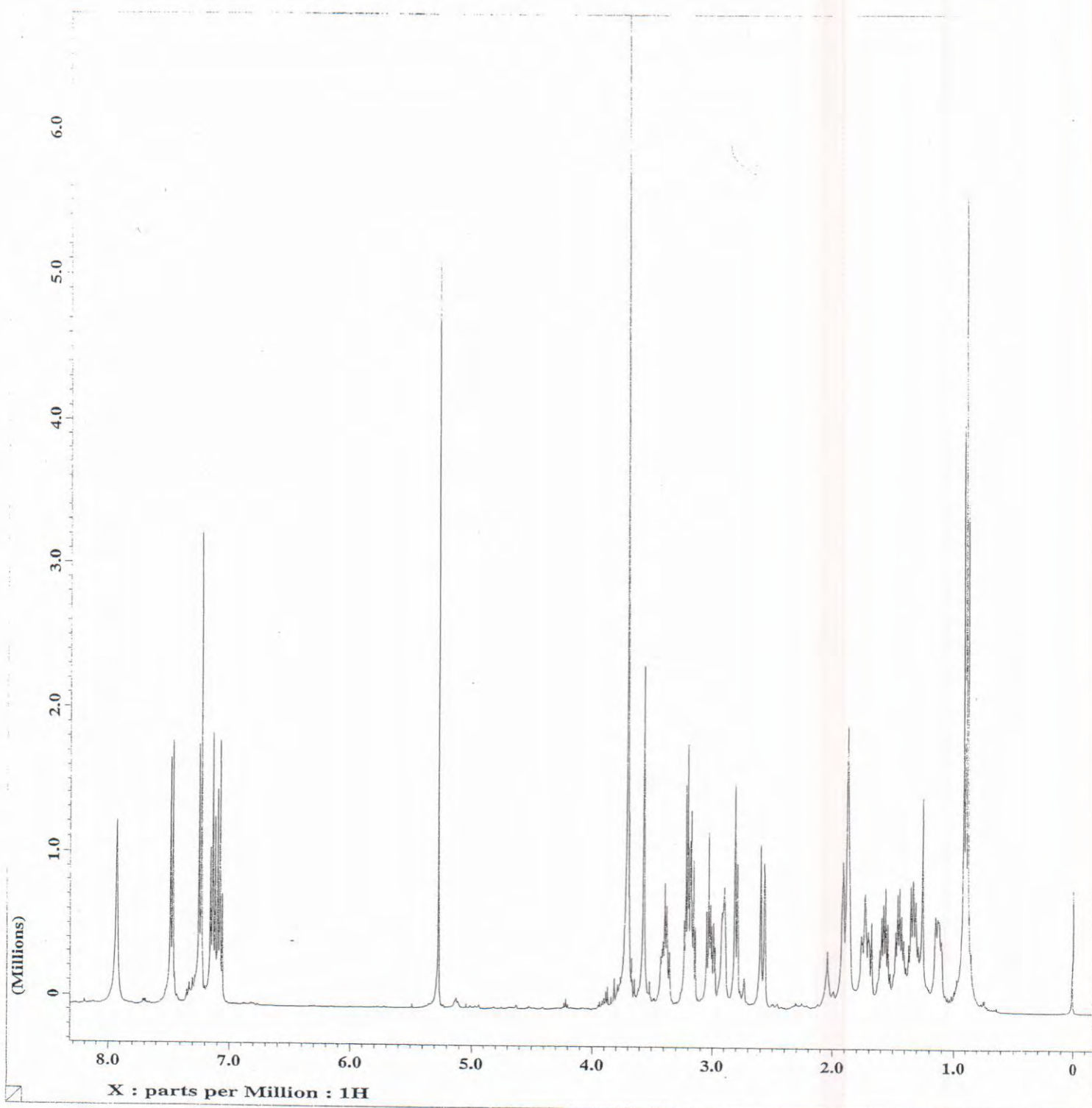


FIGURA 27: Espectro de RMN ^1H (400 MHz) em CDCl_3 do alcalóide 1.

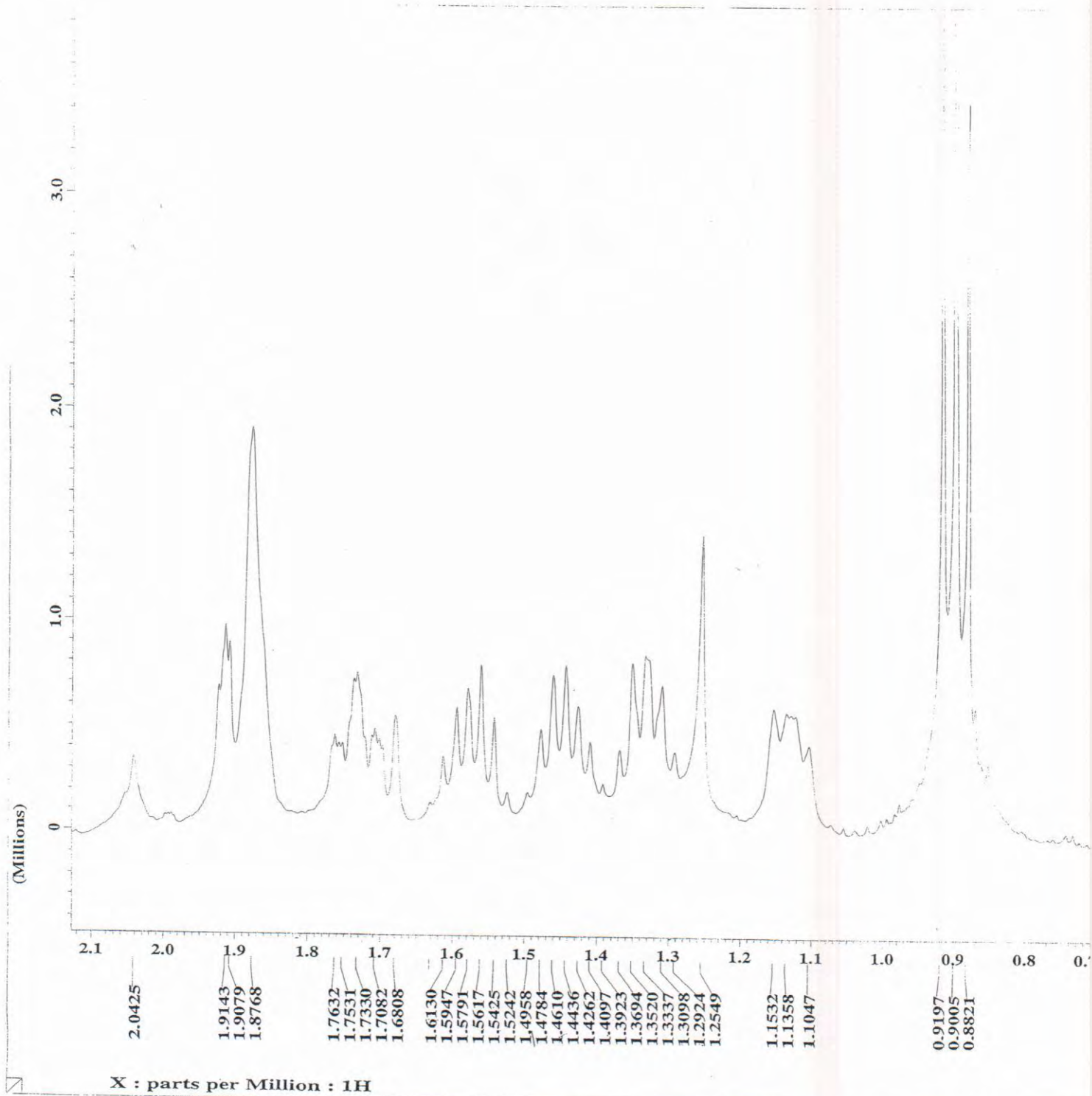


FIGURA 28: Ampliação da região de δ_H 0,7 – 2,1 do espectro de RMN 1H (400 MHz) em $CDCl_3$ do alcalóide 1.

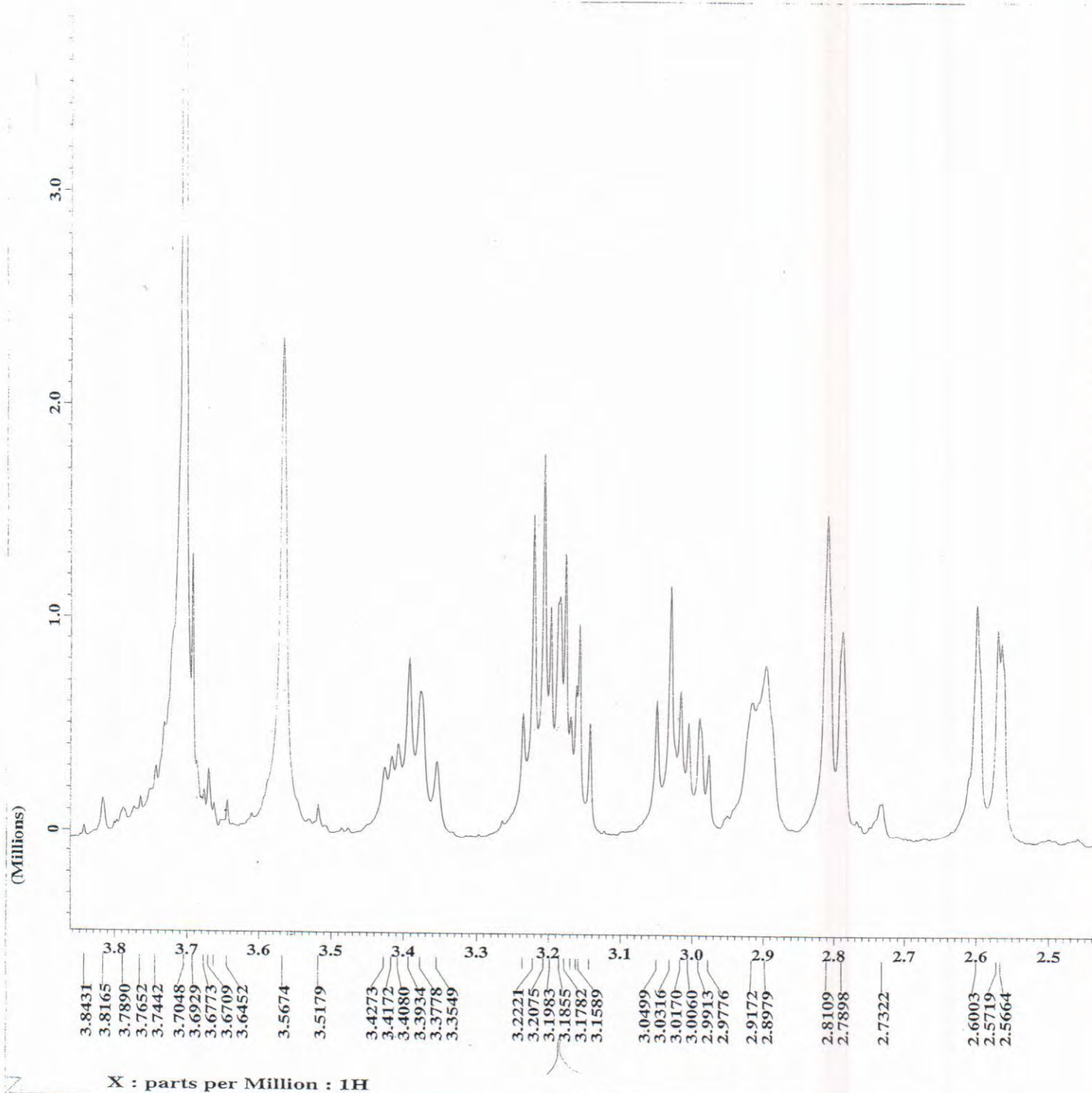


Figura 29: Ampliação da região de δ_H 2,5 – 3,8 do espectro de RMN 1H (400 MHz) em $CDCl_3$ do alcalóide 1.

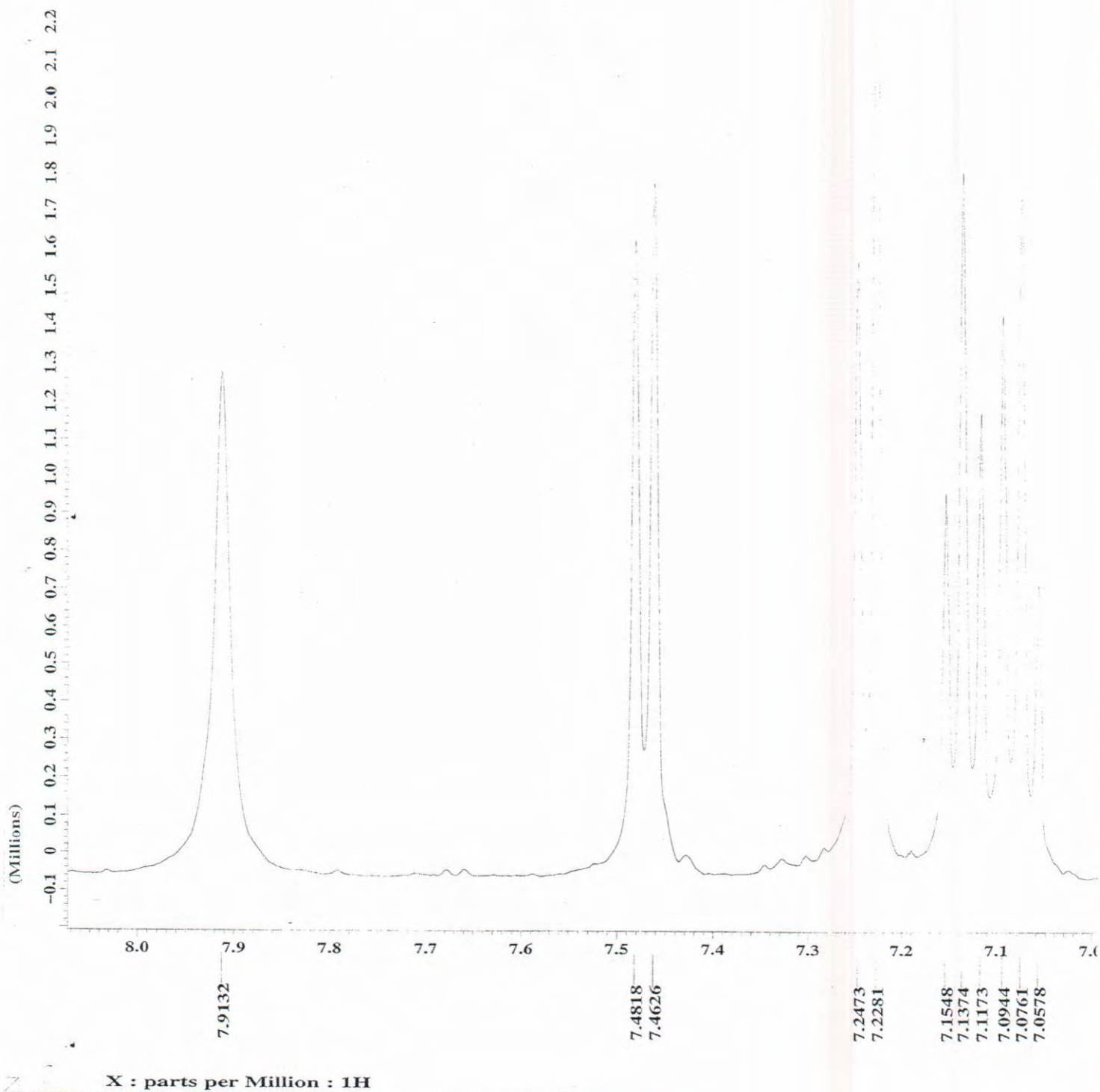


Figura 30: Ampliação da região de δ_H 7,0 – 8,0 do espectro de RMN 1H (400 MHz) em $CDCl_3$ do alcalóide 1.

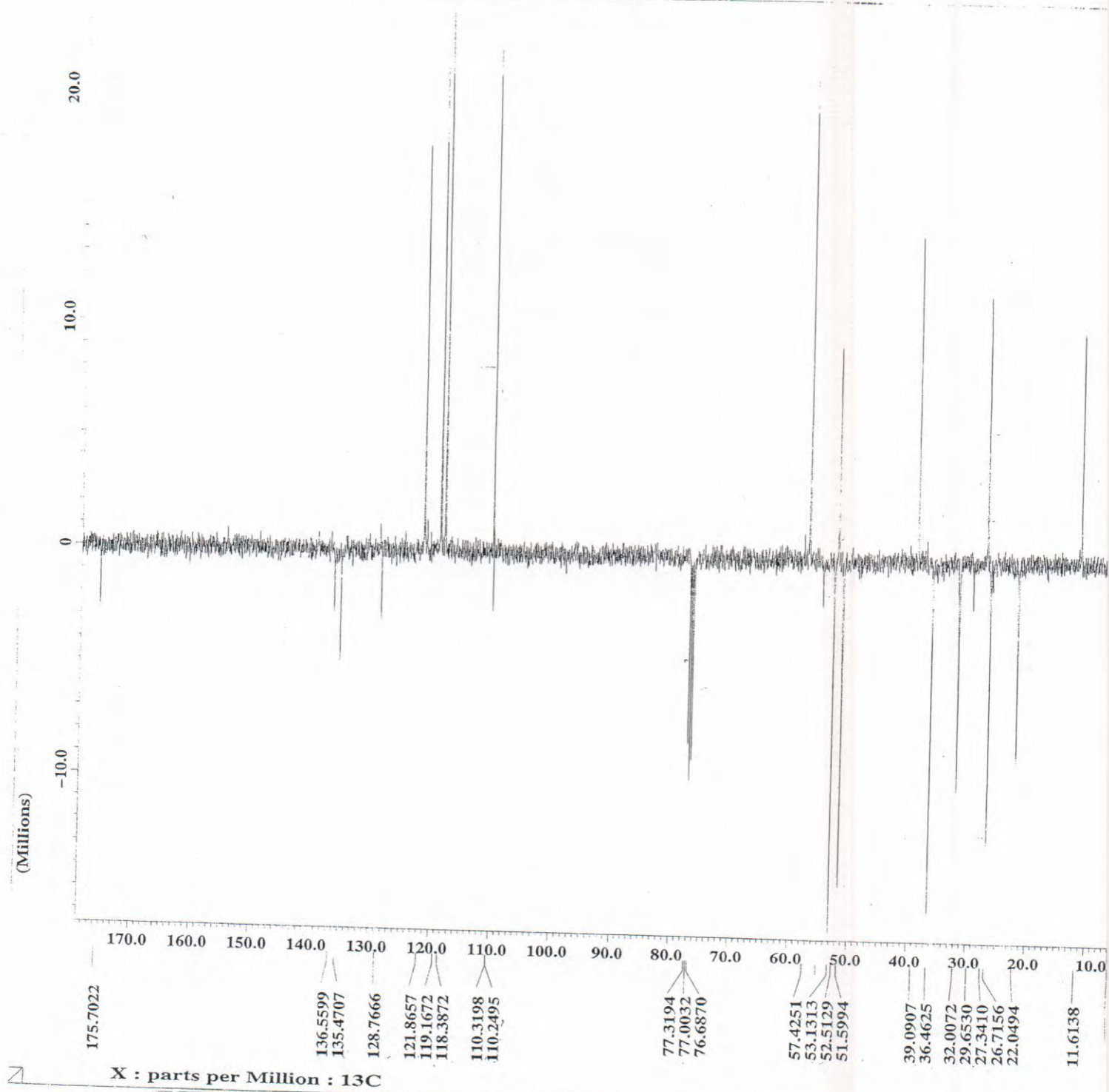


Figura 31: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz) em CDCl_3 do alcalóide 1.

Alcalóide 2

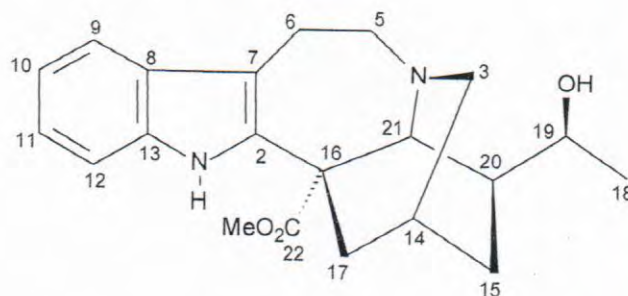


Figura 32

Tabela 10: Dados de RMN ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) para o alcalóide (2) e (19S)-heyneanina, em CDCl_3 . Os deslocamentos químicos (δ) estão ppm e as constantes de acoplamento (J , entre parênteses) estão em Hz. (Shamma, 1979 ; Medeiros, 2003)

	1		(19S)-heyneanina
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
C			
2	135,69	-	136,5
7	109,77	-	110,7
8	128,44	-	129,5
13	135,48	-	136,3
16	54,03	-	56,8
22	174,89	-	175,7
CH			
9	118,41	7,47 (d, 8,0)	119,3
10	119,43	7,08 (dt, 8,0 e 1,0)	119,3
11	122,25	7,16 (dt, 8,0 e 1,0)	123,2
12	110,44	7,24 (d, 8,0)	111,4
14	26,73	2,00 (m)	26,7
19	71,32	4,17 (dq, 6,2 e 1,4)	72,3
20	39,49	1,46 (m)	39,5
21	59,76	3,85 (sl)	59,7
CH₂			
3	51,14	2,98 (m, H-3b); 2,80 (d, $J=8,4$, H-3a)	52,1
5	52,18	3,46 (m, H-5b); 3,14 (m, H-5a)	51,1
6	21,44	3,17 (m, H-6b); 3,10 (m, H-6a)	21,3
15	22,88	1,90 (m, H-15b); 1,56 (m, H-15a)	22,9
17	36,94	2,60 (dl, $J=11,4$, H-17b) 1,96 (m, H-17a)	36,8
CH₃			
18	20,32	1,10 (d, 6,2)	20,2
MeO-22	52,94	3,73 (s)	52,8
HN-1	-	7,89 (s)	-

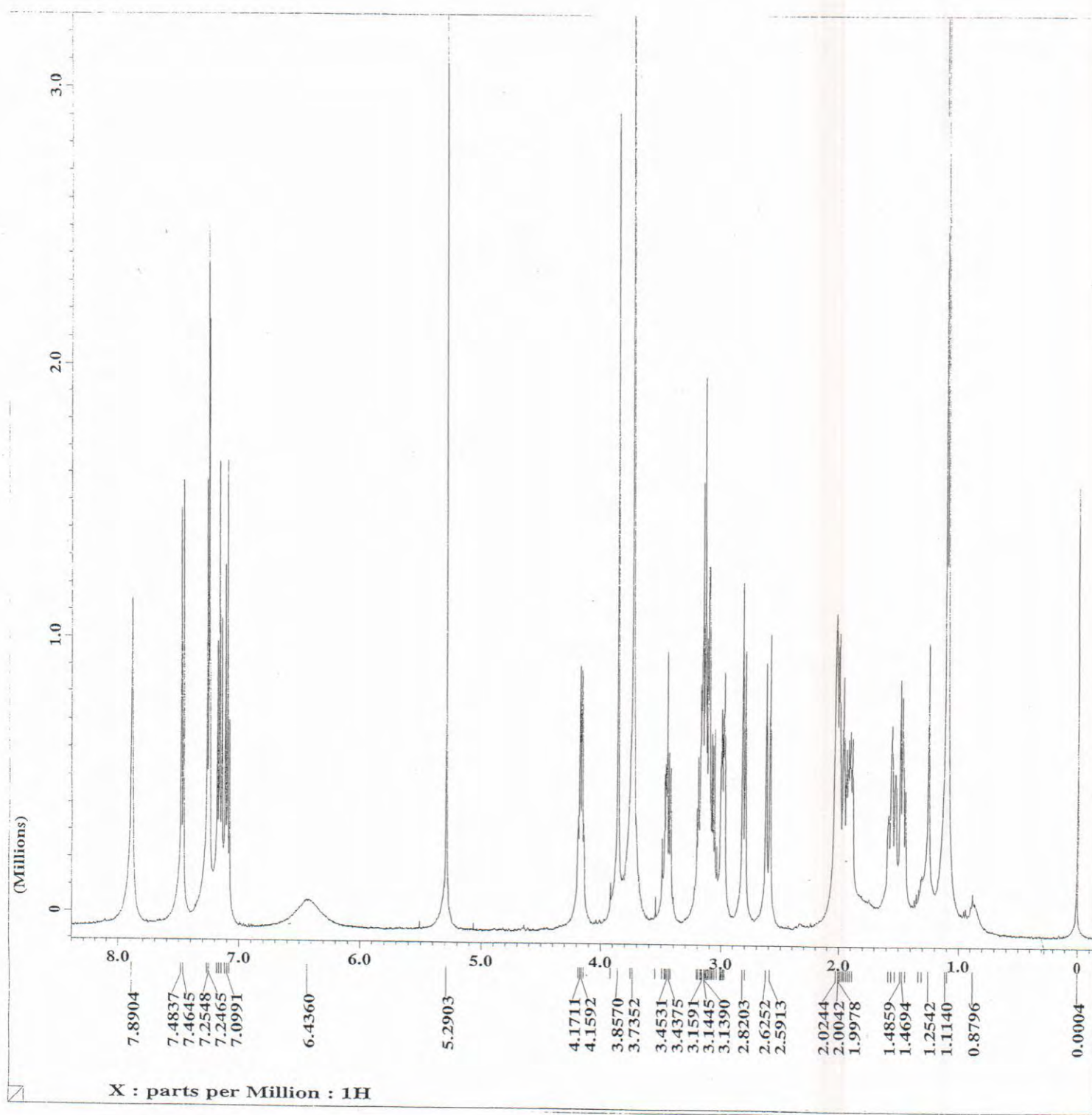


FIGURA 33: Espectro de RMN ^1H (400 MHz) em CDCl_3 do alcalóide 2.

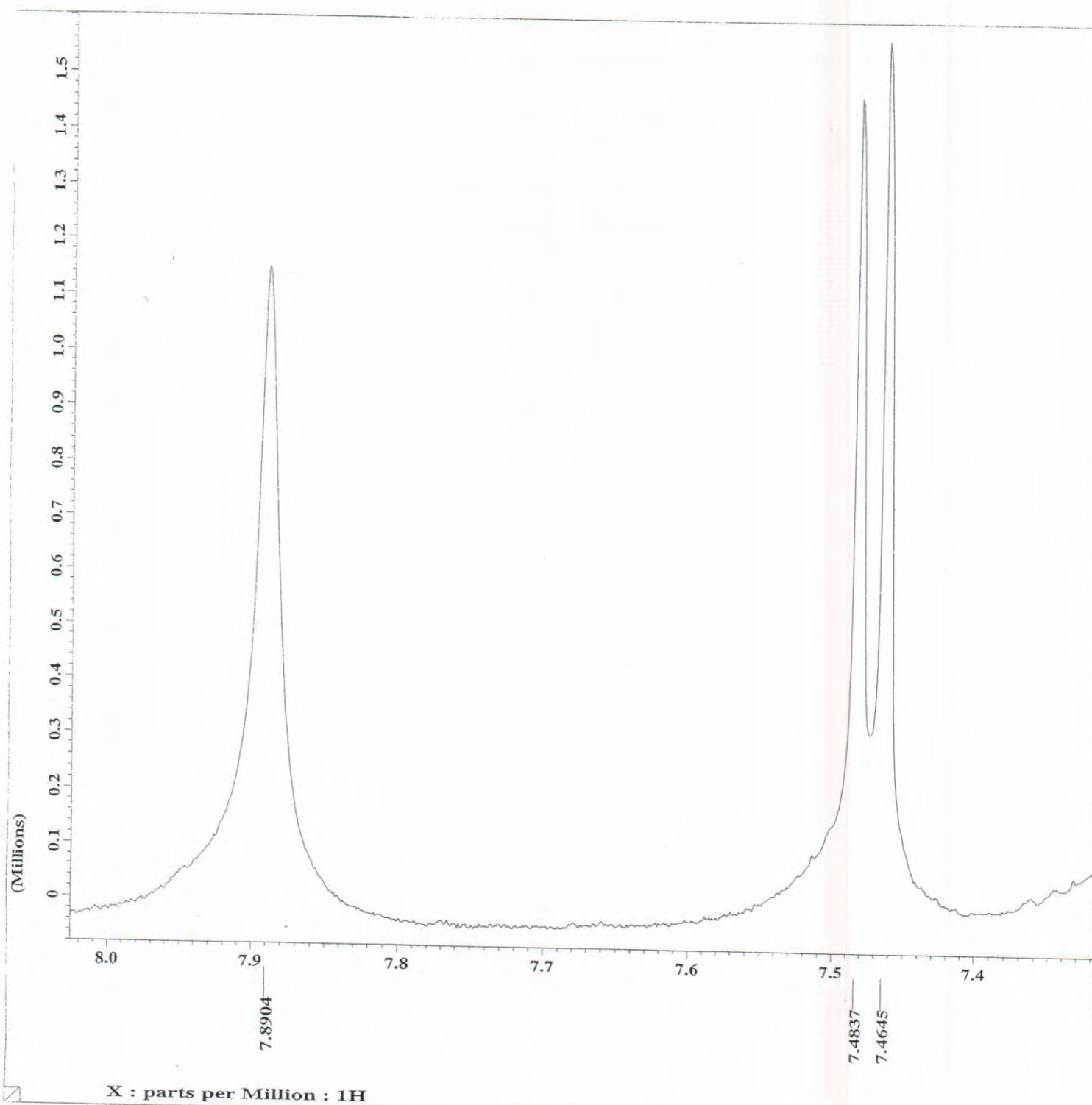


FIGURA 34: Ampliação da região de δ_H 7,4 – 8,0 do espectro de RMN 1H (400 MHz) em $CDCl_3$ do alcalóide 2.

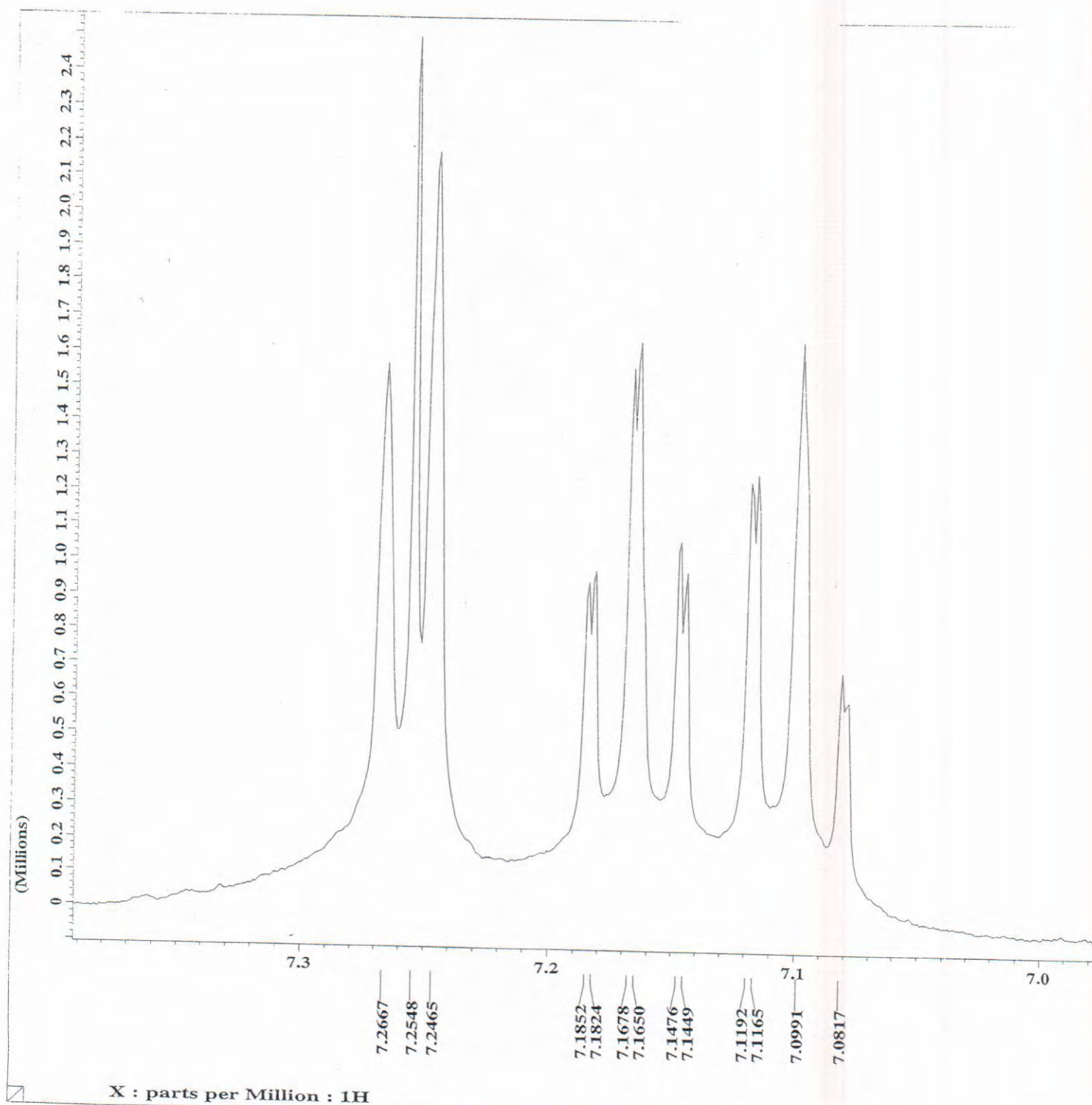


FIGURA 35: Ampliação da região de δ_H 7,0 – 7,3 do espectro de RMN 1H (400 MHz) em $CDCl_3$ do alcalóide 2.

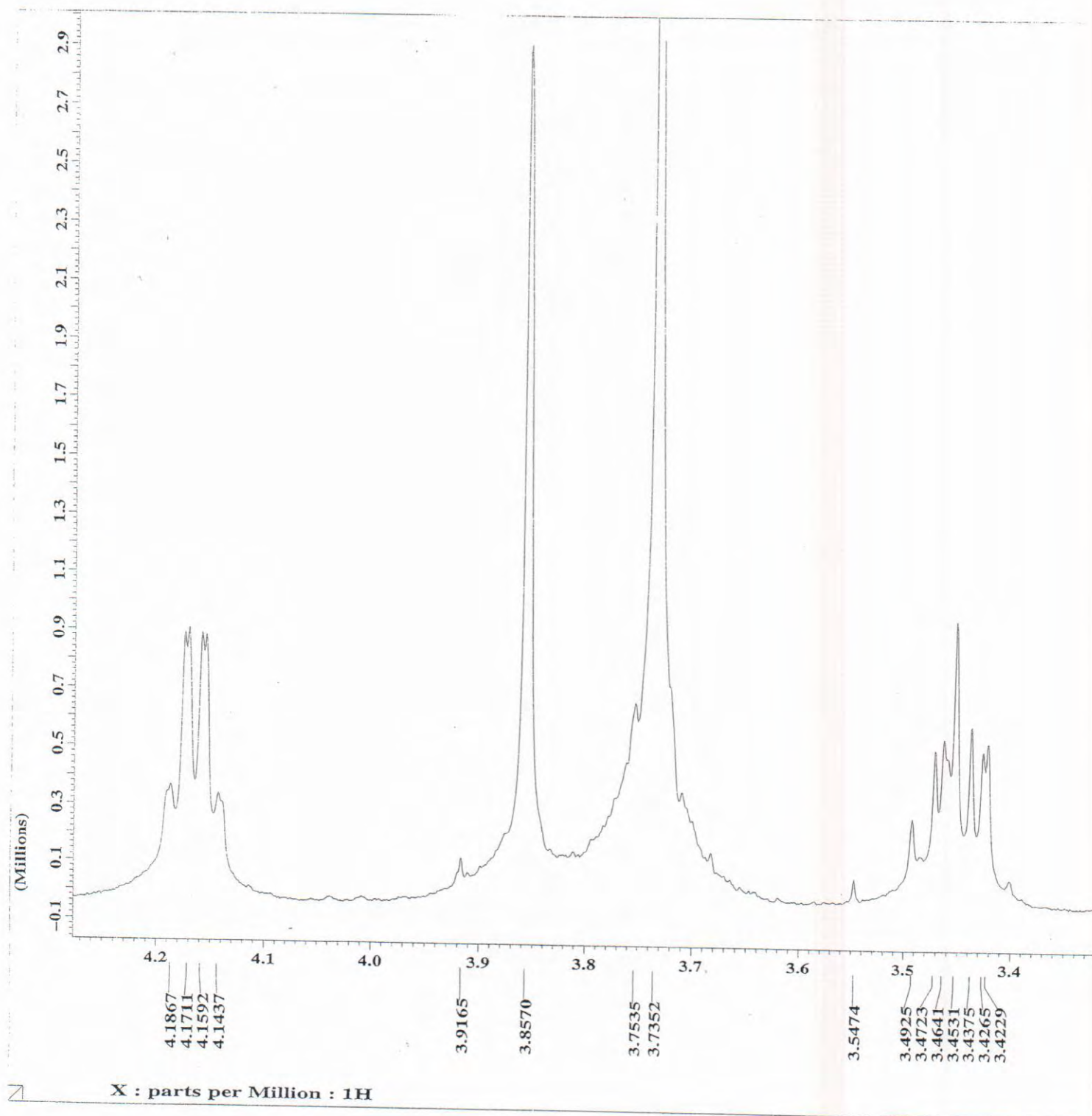


FIGURA 36: Ampliação da região de δ_H 3,4 – 4,2 do espectro de RMN 1H (400 MHz) em $CDCl_3$ do alcalóide 2.

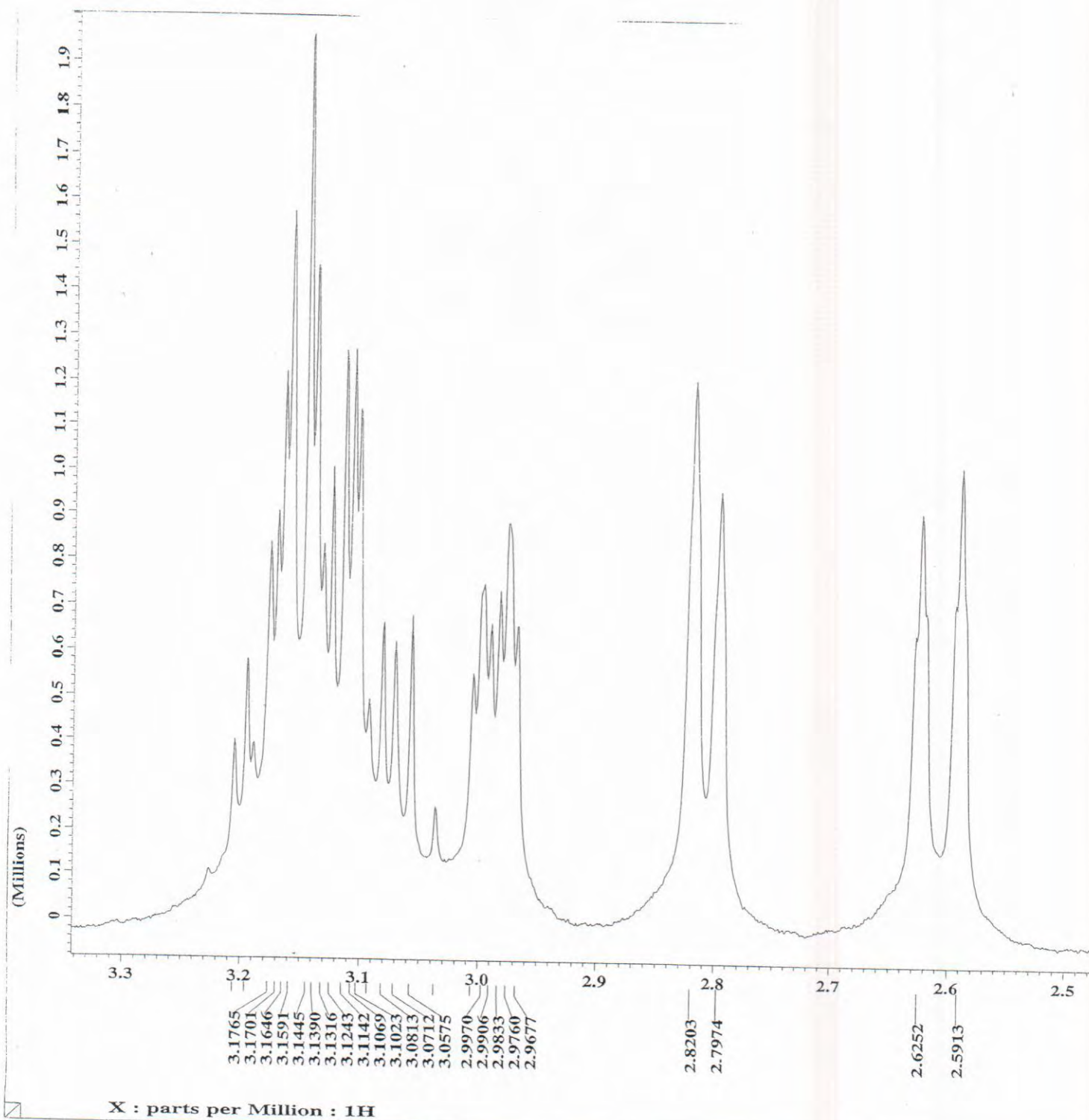


FIGURA 37: Ampliação da região de δ_{H} 2,5 – 3,3 do espectro de RMN ^1H (400 MHz) em CDCl_3 do alcalóide 2.

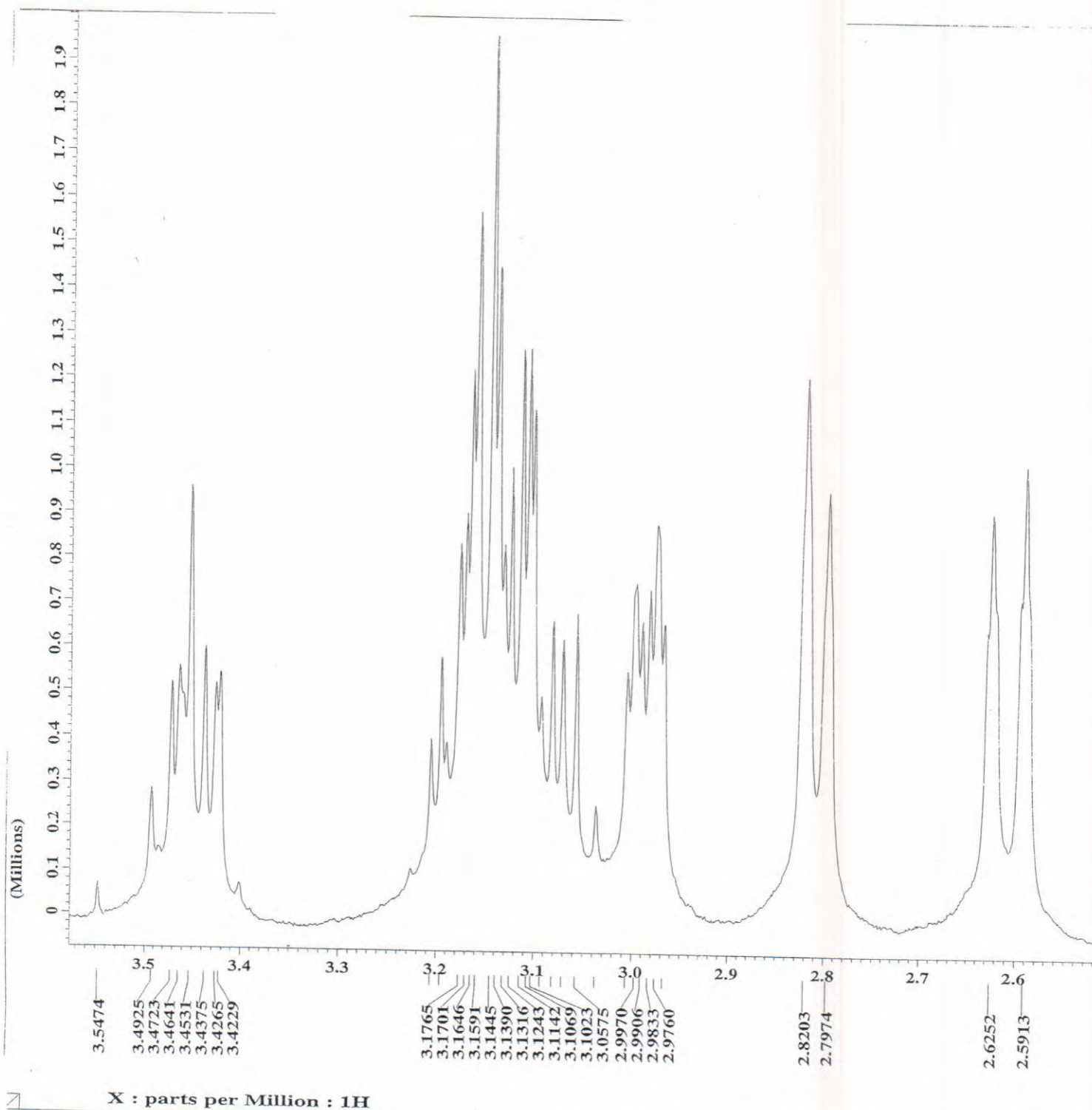


FIGURA 38: Ampliação da região de δ_H 2,6 – 3,5 do espectro de RMN 1H (400 MHz) em $CDCl_3$ do alcalóide 2.

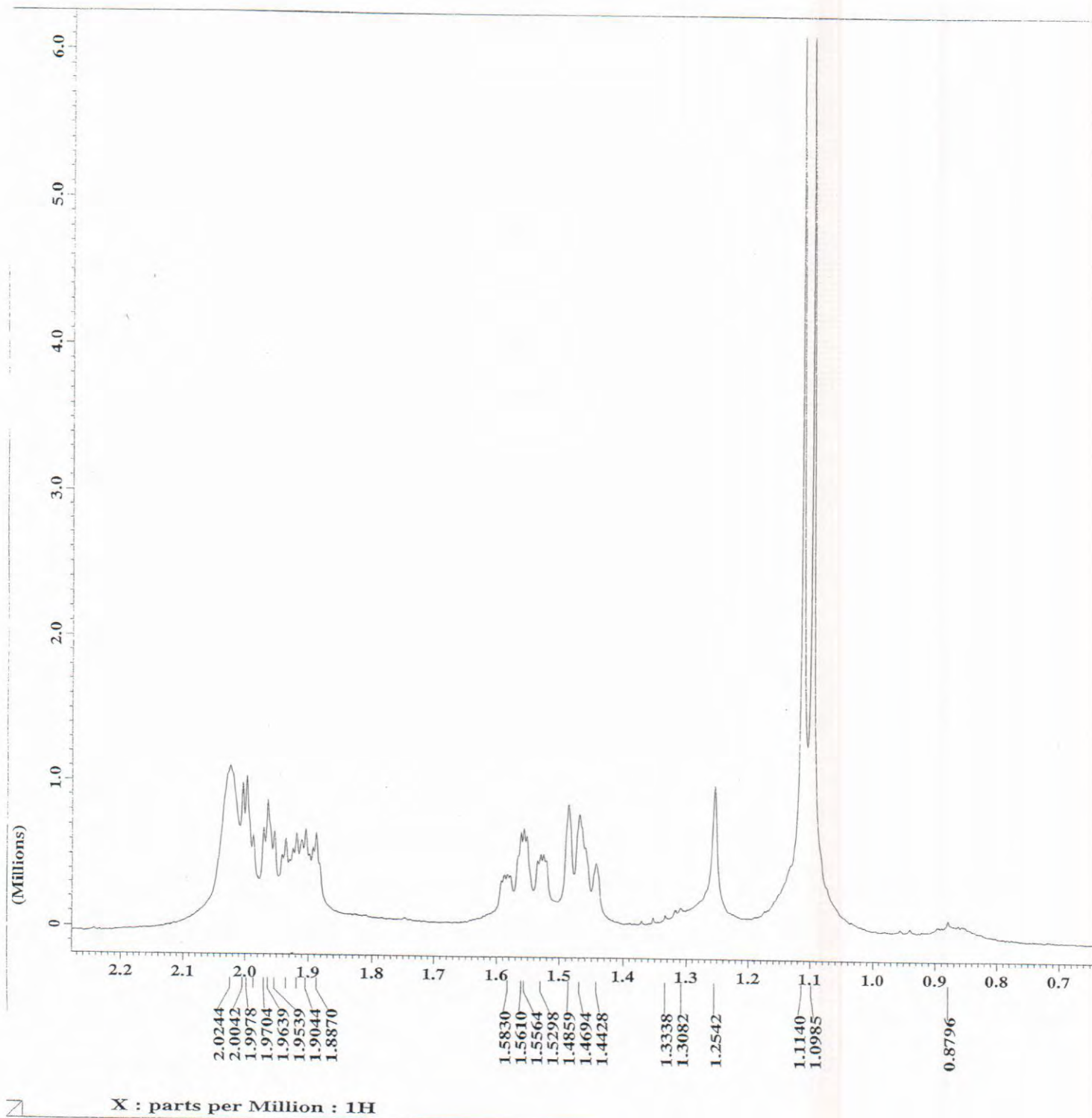


FIGURA 39: Ampliação da região de δ_H 0,7 – 2,1 do espectro de RMN 1H (400 MHz) em $CDCl_3$ do alcalóide 2.

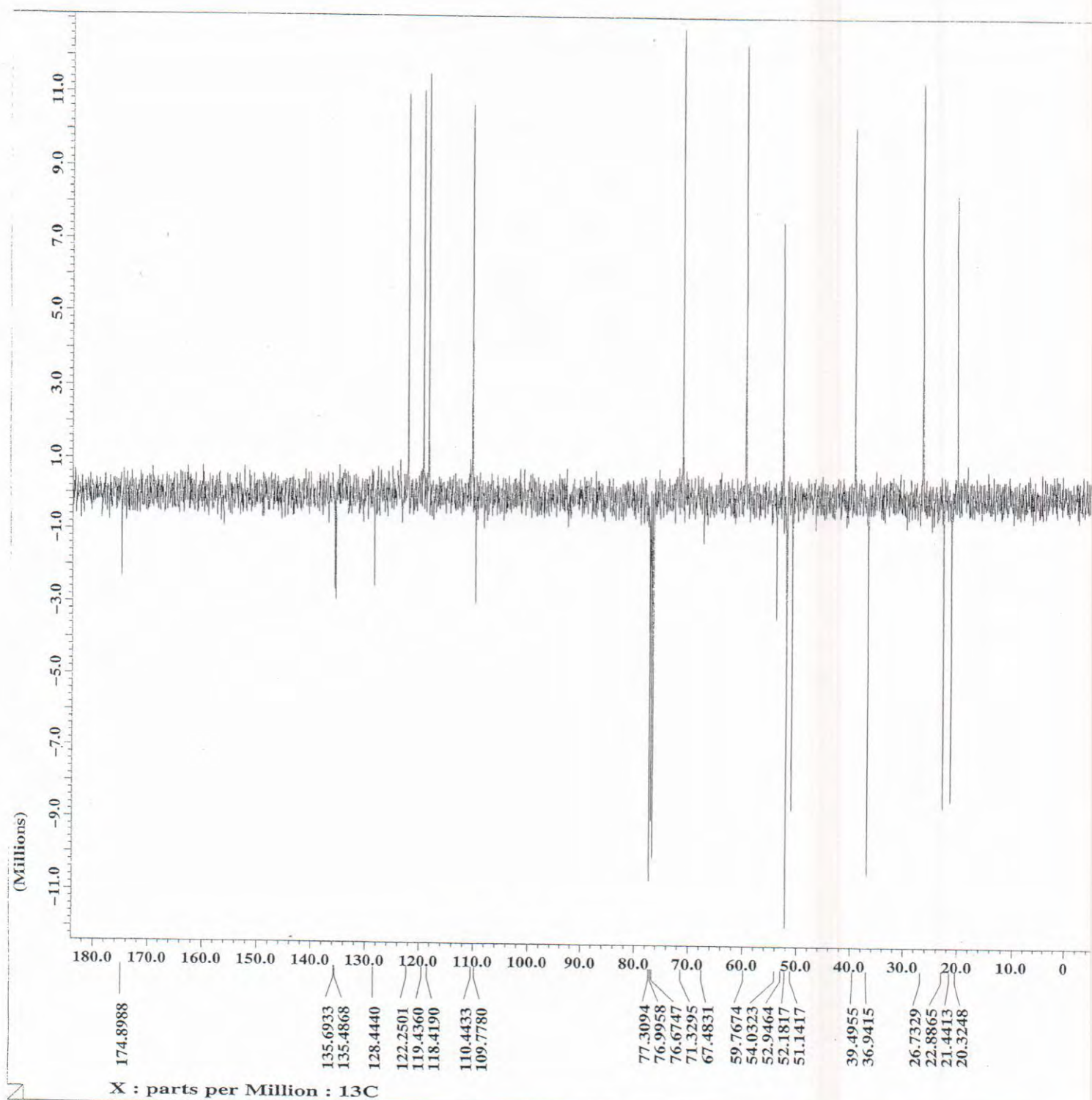
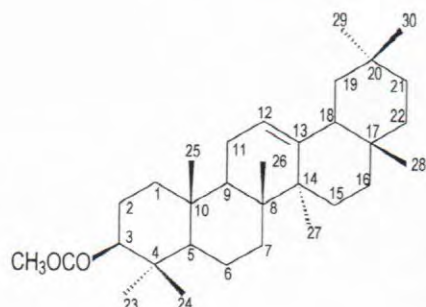
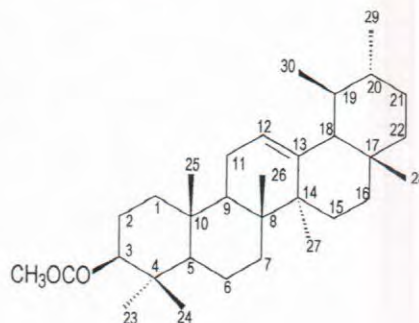


Figura 40: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz) em CDCl_3 do alcalóide 2.

Mistura dos triterpenos 3 e 4



3-O-acetil- β -amirina
Figura 41

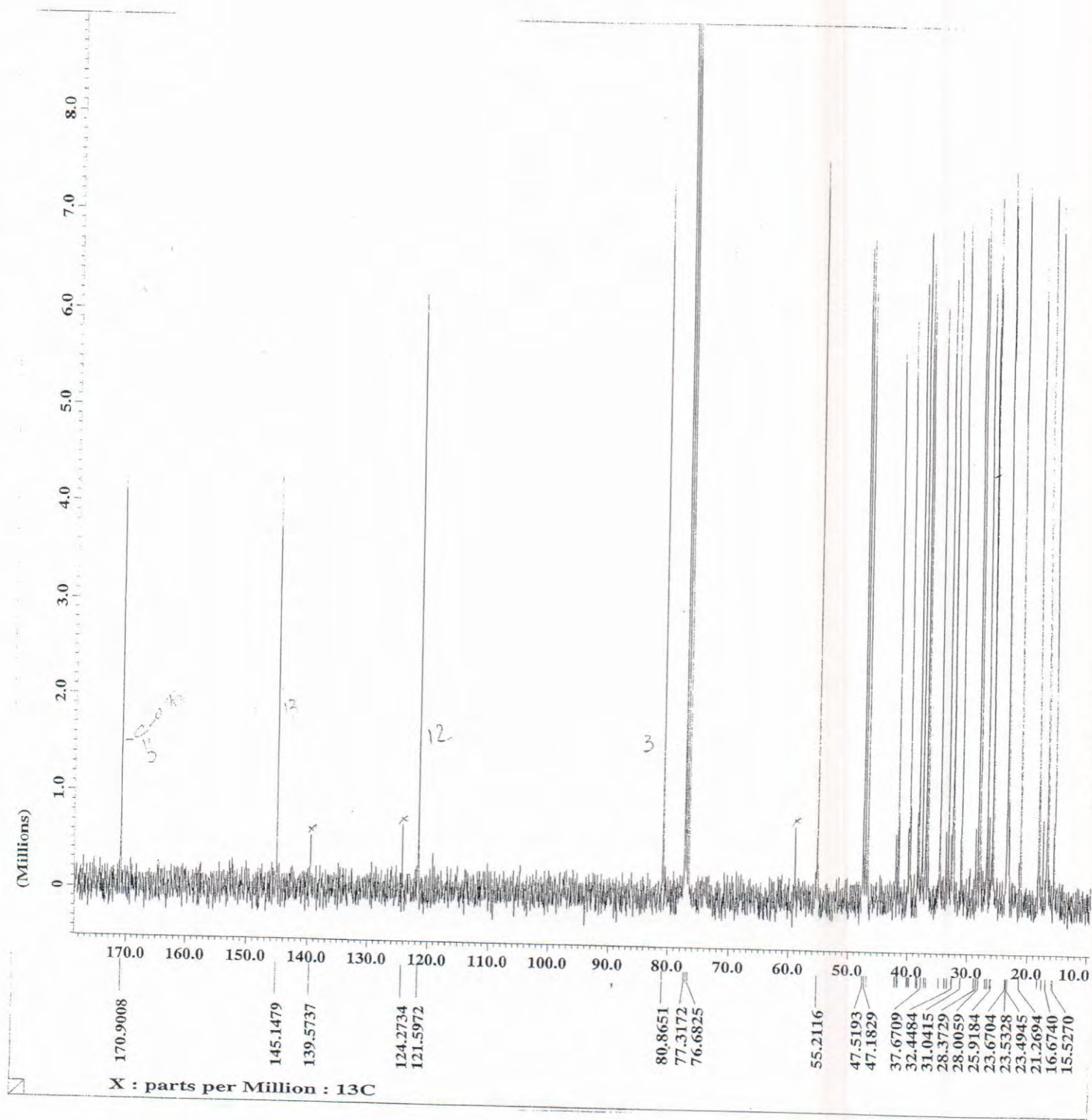


3-O-acetil- α -amirina
Figura 42

Tabela 11: Dados de RMN ^1H (400 MHz) e RMN ^{13}C (100 MHz) da mistura dos triterpenos 3 e 4, em CDCl_3 , e comparação com os dados de RMN ^{13}C da literatura para os acetatos da β -amirina (3a) e α -amirina (4a). Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm, e as constantes de acoplamento (J) em Hz (entre parênteses). (AHMAD, 1994)

C	3		4	3a	4a
	δ_c	δ_H	δ_c	δ_c	δ_c
1	38,23		38,30	38,2	38,4
2	23,67		23,67	23,6	23,6
3	80,87	4,50 (H-3 α , t, 8,8)	80,87	80,7	80,7
4	37,67	-	37,67	37,6	37,6
5	55,21		55,21	55,3	55,3
6	18,23		18,23	18,3	18,3
7	32,55		32,55	32,6	32,8
8	39,77	-	40,00	39,7	40,1
9	47,51		47,51	47,6	47,6
10	36,80	-	36,80	36,8	36,8
11	23,53		17,48	23,4	17,5
12	121,60	5,18 (H-12, t, 3,6)	124,27	121,5	124,1
13	145,15	-	139,57	144,9	139,4
14	41,66	-	41,50	41,7	42,1
15	28,37		28,70	28,3	28,7
16	26,56		26,67	26,2	26,7
17	32,55	-	33,70	32,5	33,8
18	47,18		59,02	47,2	59,0
19	46,75		39,58	46,8	39,7
20	31,04	-	39,58	31,1	39,7
21	34,70		31,04	34,8	31,3
22	37,11		42,03	37,1	41,5
23	28,00	0,87 (s)	28,00	28,1	28,1
24	16,77	0,87 (s)	16,77	16,8	16,8
25	15,71	0,96 (s)	15,71	15,7	15,7
26	16,67	0,97 (s)	16,77	16,8	16,8
27	26,88	1,13 (s)	23,30	26,0	23,2

28	28,00	0,83 (s)	28,37	27,0	28,1
29	33,31	0,87 (s)	33,31	33,4	23,2
30	23,67	0,87 (s)	23,49	23,6	21,4
CH ₃ (OAc)	21,27	2,05 (s)	21,38	21,2	21,2
C=O (OAc)	170,90	-	170,90	170,4	170,4

FIGURA 43: Espectro de RMN ^{13}C (100MHz) em CDCl_3 da mistura

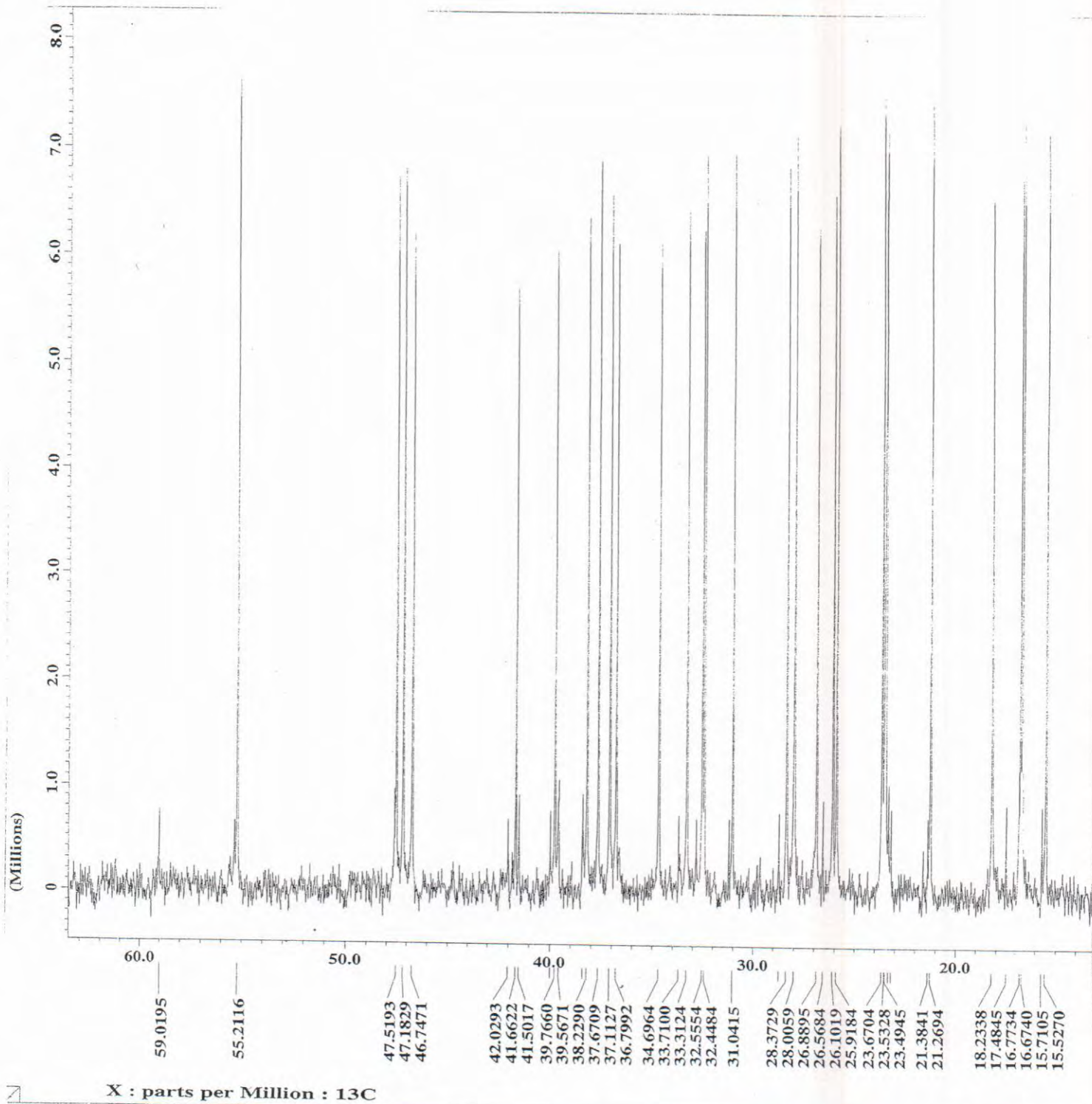


FIGURA 44: Ampliação da região de δ_{C} 20,0 – 60,0 do espectro de RMN ^{13}C) em CDCl_3 da mistura.

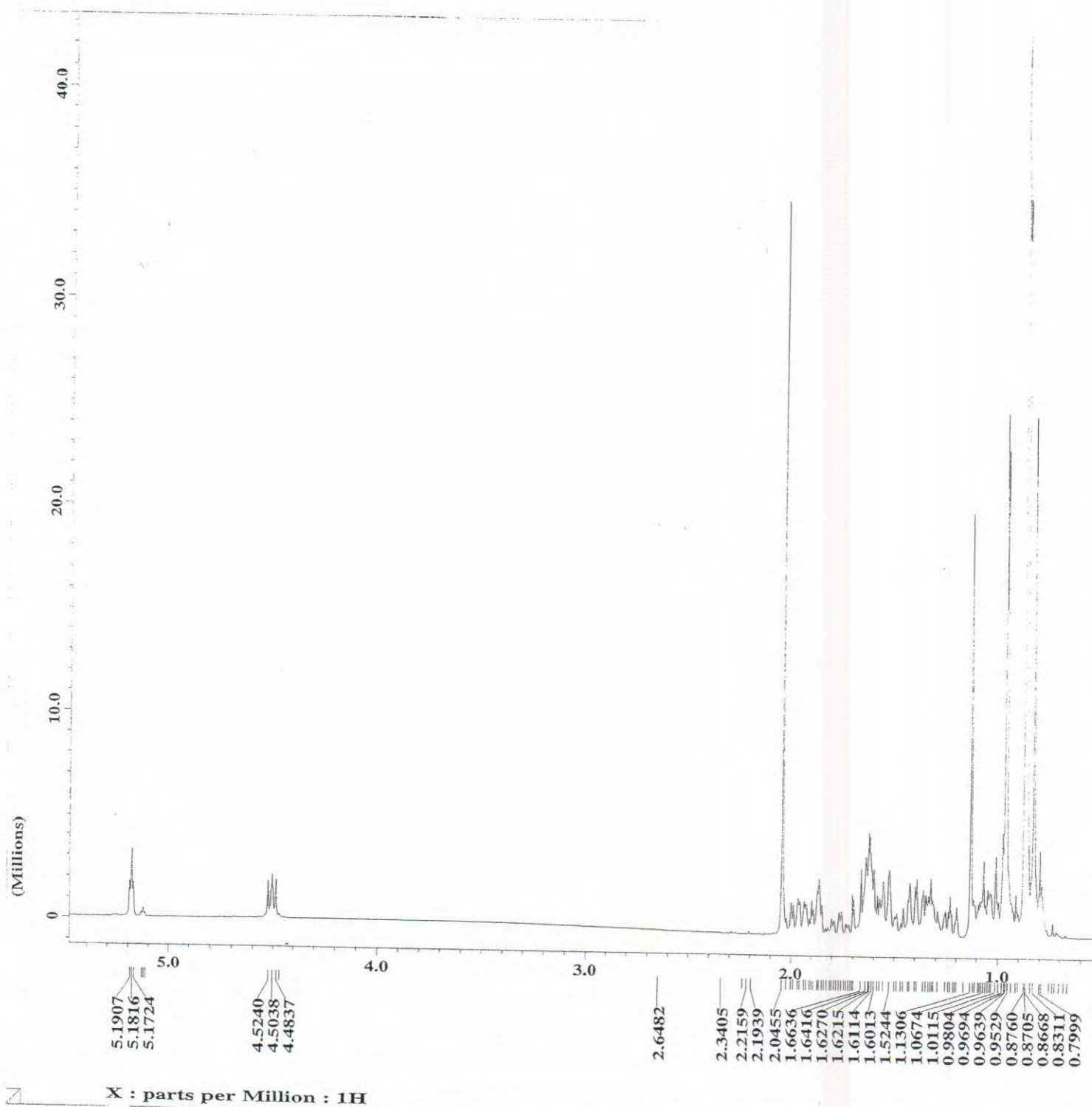


FIGURA 45: Espectro de RMN ^1H (400 MHz) em CDCl_3 da mistura.

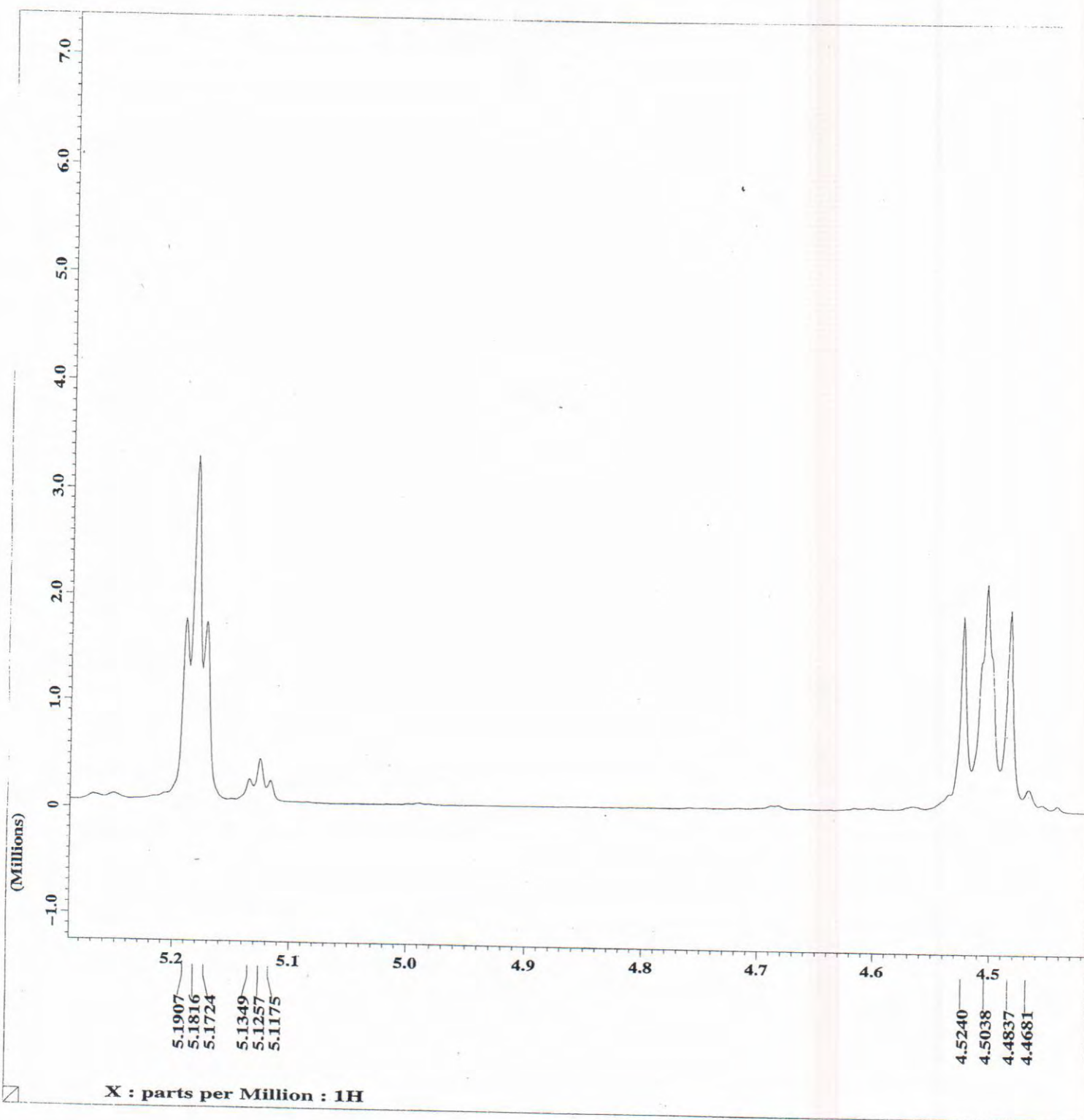


FIGURA 46: Ampliação da região de δ_H 4,5 – 5,2 do espectro de RMN 1H (400 MHz) em $CDCl_3$ da mistura.

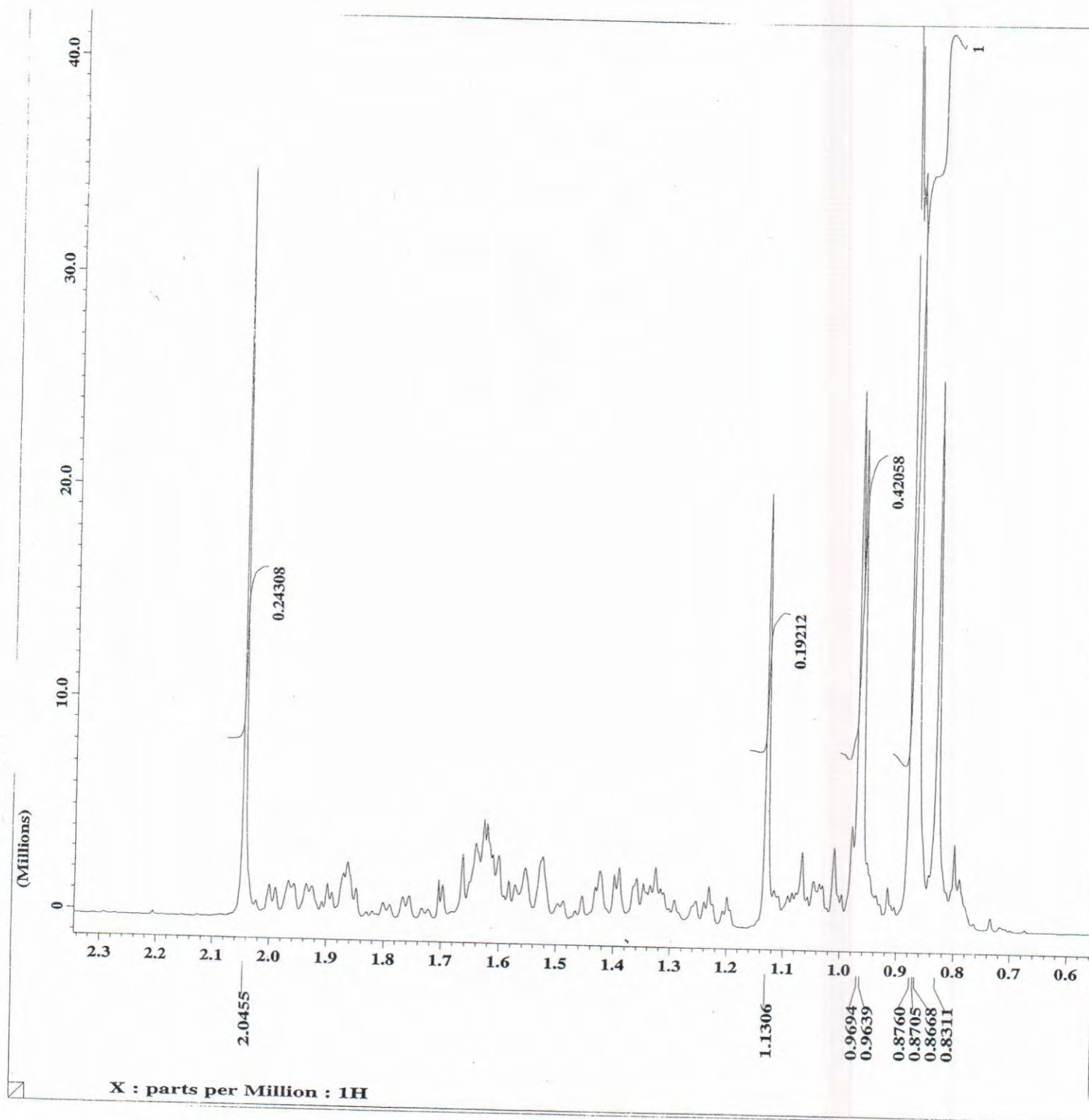


FIGURA 47: Ampliação da região de δ_{H} 0,6– 2,3 do espectro de RMN ^1H (400 MHz) em CDCl_3 da mistura.

7. CONCLUSÃO

O trabalho realizado atingiu o principal objetivo que foi o aprendizado de técnicas cromatográficas e espectroscópicas clássicas. Resultando no isolamento de dois alcalóides indólicos monoterpênicos e uma mistura de triterpenos do extrato em diclorometano da casca da raiz de *Tabernaemontana salzmannii*.

Pode-se concluir que grande parte do extrato de diclorometano era constituída da mistura dos triterpenos α -amirina e β -amirina e do alcalóide 19S-heyneanina.

É observado que este trabalho ainda não foi concluído, sabendo que faltam frações à serem estudadas.