

UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO - UNAERP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ESTUDO BIOSINTÉTICO E OBTENÇÃO DE ALCALOIDES
FLUORADOS ANÁLOGOS EM *Tabernaemontana catharinensis* A. DC.**

Candidato: Bruno Musquiari

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Aparecida Lopes

Ribeirão Preto – SP

Fevereiro – 2020

**ESTUDO BIOSINTÉTICO E OBTENÇÃO DE ALCALOIDES
FLUORADOS ANÁLOGOS EM *Tabernaemontana catharinensis* A. DC.**

Mestrando: Bruno Musquiari

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.
Orientadora: Profa. Dra. Adriana Aparecida Lopes.

Ribeirão Preto – SP

Fevereiro – 2020

Ficha catalográfica preparada pelo Centro de Processamento
Técnico da Biblioteca Central da UNAERP
- Universidade de Ribeirão Preto -

M988e Musquiari, Bruno, 1994-
Estudo biossintético e obtenção de alcaloides fluorados
análogos em *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. / Bruno
Musquiari. - - Ribeirão Preto, 2020.
101 f.: il.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Adriana Aparecida Lopes.

Dissertação (mestrado) - Universidade de Ribeirão Preto,
UNAERP, Biotecnologia. Ribeirão Preto, 2020.

1. *Tabernaemontana catharinensis*2. Alzheimer. 3. Alcaloides
fluorados. I. Título.

CDD 660.6

BRUNO MUSQUIARI

**ESTUDO BIOSINTÉTICO E OBTENÇÃO DE ALCALOIDES FLUORADOS
ANÁLOGOS EM TABERNAEMONTANA CATHARINENSIS A. DC**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde

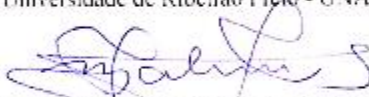
Data da defesa: 28 de fevereiro de 2020

Resultado: Aprovado

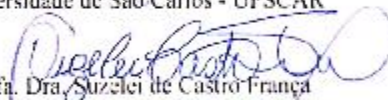
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dra. Adriana Aparecida Lopes
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP



Prof. Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva
Universidade de São Carlos - UFSCAR



Prof. Dra. Suzeli de Castro França
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP

**RIBEIRÃO PRETO
2020**

AGRADECIMENTOS

Aos meu pais Sergio e Nina, bem como ao meu irmão, por todo amor, carinho e apoio que me fizeram chegar até aqui;

À Universidade de Ribeirão Preto pela oportunidade de realização deste projeto de mestrado;

À professora Dra. Adriana Aparecida Lopes pela orientação, paciência e ensinamentos durante todos o período de realização desta dissertação;

Aos professores membros da banca examinadora que gentilmente aceitaram o convite para avaliação desta dissertação;

À professora Dra. Ana Maria Soares Pereira pela coorientação e ensinamentos durante este período;

À professora Dra. Bianca Waleria Bertoni pelas discussões e análises estatísticas;

Ao Dr. Eduardo José Crevelin do Departamento de Química - FFCLRP - USP pelas análises e discussões durante esta dissertação;

À Dra. Juliana Rodrigues e Dr. Nivaldo Borallo do Instituto “Júlio de Mesquita Filho” da UNESP de Araraquara;

A todos os amigos e funcionários da Unidade de Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto pela amizade e ajuda nesta dissertação;

Ao CNPQ e a CAPES pela bolsa concedida.

“Somewhere, something incredible is waiting to be known.”

(Carl Sagan)

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	III
LISTA DE FIGURAS	IV
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
RESUMO	X
ABSTRACT	XI
1.INTRODUÇÃO	1
2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1 Plantas medicinais.....	2
2.2 O Gênero <i>Tabernaemontana</i>	7
2.3 Atividade neurológica dos alcaloides do tipo-iboga de <i>T. catharinensis</i> A. DC.	9
2.4 Biossíntese dos alcaloides tipo-iboga em <i>Tabernaemontana</i>	10
2.5 Biossíntese dirigida pelo precursor (BDP)	15
3. JUSTIFICATIVA	17
4. HIPÓTESE	17
5. OBJETIVOS	18
5.1 Objetivo geral.....	18
5.2 Objetivos específicos.....	18
6. MATERIAL E MÉTODOS	19
6.1 Micropropagação das plântulas de <i>T. catharinensis</i> A. DC.	19
6.2 Indução dos callus a partir das raízes de plântulas de <i>T. catharinensis</i> A. DC. ..	19
6.3 Cultivo de raízes adventícias <i>in vitro</i> a partir das raízes de plântulas de <i>T. catharinensis</i> A. DC.....	19
6.4 Experimentos de marcação isotópica utilizando as plântulas de <i>T. catharinensis</i> A. DC.	19
6.5 Experimentos de biossíntese dirigida pelo precursor em raízes adventícias de <i>T. catharinensis</i> A. DC.	20
6.6 Experimentos de biossíntese dirigida pelo precursor em plântulas de <i>Tabernaemontana catharinensis</i> A. DC.....	21
6.7 Condições cromatográficas para as análises das vias biossintéticas por CLUE-MS/QTOF dos experimentos de marcação isotópica	21

6.8 Condições cromatográficas para as análises em CLUE-DAD-MS dos extratos oriundos dos experimentos de BDP (raízes adventícias e plântulas de <i>T. catharinensis</i> A. DC.).....	22
6.9 Isolamento dos alcaloides fluorados análogos de <i>T. catharinensis</i> A. DC.....	22
7. RESULTADOS	24
7.1 Indução de callus a partir de raízes de <i>Tabernaemontana catharinensis</i> A. DC.	24
7.2 Avaliação da rota biossintética envolvida na formação dos alcaloides indólicos de <i>T. catharinensis</i> A. DC.....	24
7.3 Experimentos de biossíntese dirigida pelo precursor em raízes adventícias de <i>T. catharinensis</i> A. DC.	37
7.4 Experimentos de biossíntese dirigida pelo precursor em plântulas de <i>T. catharinensis</i> A. DC.	38
7.5 Isolamento dos alcaloides fluorados análogos de <i>T. catharinensis</i> A. DC.....	42
7.5.1. Isolamento dos alcaloides fluorados análogos em raízes adventícias de <i>T. catharinensis</i> A. DC.	42
8. CONCLUSÕES	49
9.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
ANEXOS	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise estatística dos experimentos de marcação isotópica utilizando 2-¹³C-triptofano e 3-¹³C-piruvato de sódio na parte aérea das plântulas de *T. catharinensis* A. DC.

Tabela 2. Análise estatística dos experimentos de marcação isotópica utilizando 2-¹³C-triptofano e 3-¹³C-piruvato de sódio nas raízes de *T. catharinensis* A. DC.

Tabela 3. Análise estatística dos experimentos de marcação isotópica utilizando 1-¹³C-gliceraldeído e 2-¹³C-acetato na parte aérea das plântulas de *T. catharinensis* A. DC.

Tabela 4. Análise estatística dos experimentos de marcação isotópica utilizando 1-¹³C-gliceraldeído e 2-¹³C-acetato nas raízes de *T. catharinensis* A. DC.

Tabela 5. Possíveis alcaloides fluorados em raízes adventícias de *T. catharinensis* A.DC.

Tabela 6. Possíveis alcaloides fluorados na parte aérea e em raízes de plântulas de *T. catharinensis* A.DC.

Tabela 7. Possíveis alcaloides fluorados encontrados somente nas raízes provenientes de plântulas de *T. catharinensis* A.DC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Pequenas moléculas aprovadas como medicamentos de 1981 e 2014.

Figura 2. Porcentagem de alcaloides presentes entre as pequenas moléculas aprovadas como medicamentos de 1981 e 2014.

Figura 3. Alcaloides coniina e atropina utilizados por Sócrates e Cleópatra.

Figura 4. Alcaloides farmacologicamente importantes isolados de produtos naturais utilizados na medicina atual.

Figura 5. Estrutura química dos fármacos mais vendidos no mundo nos últimos anos oriundos de produtos naturais.

Figura 6. Alcaloides monoterpênicos indólicos do gênero *Tabernaemontana* e suas respectivas massas moleculares (MM).

Figura 7. Alcaloides utilizados como inibidores da AChE no tratamento de Alzheimer.

Figura 8. A biossíntese dos terpenos via MVA e MEP.

Figura 9. Biossíntese dos alcaloides do tipo-iboga em *C. roseus*

Figura 10. Biogênese dos alcaloides tipo iboga em *T. catharinensis* A. DC.

Figura 11. Estrutura química de camptotecina e seus análogos.

Figura 12. Callus de raízes adventícias de *T. catharinensis* A. DC.

Figura 13. Experimento de marcação isotópica utilizando plântulas de *T. catharinensis* A. DC.

Figura 14. Alcaloides observados em CLUE-MS/QTOF alta resolução após experimentos de marcação isotópica.

Figura 15. Biossíntese de voacangina e 3-oxo-coronaridina após incorporação com 2-¹³C-triptofano, 3-¹³C-piruvato, 1-¹³C-gliceraldeído e 2-¹³C-acetato de sódio em *T. catharinensis* A. DC.

Figura 16. Raízes adventícias de *T. catharinensis*.

Figura 17. Fracionamento do extrato bruto oriundo dos experimentos de BDP das raízes adventícias (BDPTC).

Figura 18. Espectro de RMN de ¹H da 6-fluor-triptamina simulado pelo programa ChemDraw Profissional 15.0.106.

Figura 19. Espectro de RMN de ¹H da amostra BDPTC0 (600 MHz, MeOD).

Figura 20. Ampliação dos sinais do espectro de RMN de ^1H da amostra BDPTC0 (600 MHz, MeOD).

Figura 21. Ampliação dos sinais do espectro de RMN de ^1H da amostra BDPTC0 (600 MHz, MeOD).

Figura 22. Ampliação dos sinais do espectro de RMN de ^1H da amostra BDPTC0 (600 MHz, MeOD).

Figura 23. Espectro de RMN de ^1H da amostra BDPTC5 (600 MHz, MeOD).

Figura 24. Ampliação dos sinais do espectro de RMN de ^1H da amostra BDPTC5 (600 MHz, MeOD).

Figura 25. Ampliação dos sinais do espectro de RMN de ^1H da amostra BDPTC5 (600 MHz, MeOD).

Figura 26. Mapa de contorno de gHMBC da amostra BDPTC5 (600 MHz, MeOD).

Figura 27. Mapa de contorno de gHMBC da amostra BDPTC5 (600 MHz, MeOD).

Figura 28. Cromatograma de massas em alta resolução - parte aérea das plântulas de *T. catharinensis* (m/z 311.2122 e isótopos) - experimento controle.

Figura 29. Cromatograma de massas em alta resolução - parte aérea das plântulas de *T. catharinensis* (m/z 311.2122 e isótopos) - experimento $2\text{-}^{13}\text{C}$ -triptofano.

Figura 30. Cromatograma de massas em alta resolução - parte aérea das plântulas de *T. catharinensis* (m/z 311.2122 e isótopos) - experimento $3\text{-}^{13}\text{C}$ -piruvato de sódio.

Figura 31. Cromatograma do extrato oriundo de raízes adventícias. Íon 297 $[\text{M}+\text{H}]^+$ referente aos alcaloides naturais: voafilina e 19(S)-hidroxiibogamina.

Figura 32. Cromatograma do extrato oriundo de raízes adventícias. Íon 315 $[\text{M}+\text{H}]^+$ referente aos alcaloides análogos: voafilina e 19(S)-hidroxiibogamina fluorados.

Figura 33. Cromatograma do extrato oriundo de raízes adventícias. Íon 313 $[\text{M}+\text{H}]^+$ referente ao alcaloide natural: voafinina.

Figura 34. Cromatograma do extrato oriundo de raízes adventícias. Íon 331 $[\text{M}+\text{H}]^+$ referente ao alcaloide análogo: voafinina fluorada.

Figura 35. Cromatograma do extrato oriundo de raízes adventícias. Íon 369 $[\text{M}+\text{H}]^+$ referente aos alcaloides naturais: voacangina e isovoacangina.

Figura 36. Cromatograma do extrato oriundo de raízes adventícias. Íon 357 $[\text{M}+\text{H}]^+$ referente ao alcaloide análogo: coronaridina fluorada.

Figura 37. Cromatograma do extrato oriundo de raízes adventícias. Íon 411 [M+H]⁺ referente ao alcaloide natural: 12-metoxi-n-metil-voacholatina.

Figura 38. Cromatograma do extrato oriundo de raízes adventícias. Íon 430 [M+H]⁺ referente ao alcaloide análogo: 12-metoxi-n-metil-voacholatina fluorada.

Figura 39. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 339 [M+H]⁺ referente ao alcaloide natural: coronaridina.

Figura 40. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 369 [M+H]⁺ referente ao alcaloide natural: voacangina.

Figura 41. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 357 [M+H]⁺ referente ao alcaloide análogo: coronaridina fluorada.

Figura 42. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 355 [M+H]⁺ referente aos alcaloides naturais: hidroxindolenina coronaridina, heyneanina, pseudoindoxil coronaridina e catarinensina.

Figura 43. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 385 [M+H]⁺ referente aos alcaloides naturais: hidroxindolenina voacangina, voacristina e rupicolina.

Figura 44. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 373 [M+H]⁺ referente aos alcaloides análogos: hidroxindolenina coronaridina, heyneanina, pseudoindoxil coronaridina e catarinensina fluorados.

Figura 45. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 281 [M+H]⁺ referente ao alcaloide natural: ibogamina.

Figura 46. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 297 [M+H]⁺ referente ao alcaloide natural: noribogaina.

Figura 47. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 311 [M+H]⁺ referente ao alcaloide natural: ibogaina.

Figura 48. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 299 [M+H]⁺ referente ao alcaloide análogo: ibogamina fluorada.

Figura 49. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 371 [M+H]⁺ referente ao alcaloide natural: hidroxindolenina 3-hidroxycoronaridina.

Figura 50. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 401 [M+H]⁺ referente aos alcaloides naturais: hidroxindolenina voacristina e montanina.

Figura 51. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 389 [M+H]⁺ referente aos alcaloides análogos: hidroxindolenina 3-hidroxicoronaridina e montanina fluorados.

Figura 52. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 353 [M+H]⁺ referente aos alcaloides naturais: 3-oxo-coronaridina e vobasina.

Figura 53. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 371 [M+H]⁺ referente aos alcaloides análogos: 3-oxo-coronaridina e vobasina fluorados.

Figura 54. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 367 [M+H]⁺ referente ao alcaloide natural: voacholatina.

Figura 55. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 385 [M+H]⁺ referente ao alcaloide análogo: voacholatina fluorada.

Figura 56. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 412 [M+H]⁺ referente ao alcaloide natural: 12-metoxi-n-metil-voachalotina.

Figura 57. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 430 [M+H]⁺ referente ao alcaloide análogo: 12-metoxi-n-metil-voachalotina fluorada.

Figura 58. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 313 [M+H]⁺ referente ao alcaloide natural: voafinina.

Figura 59. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 331 [M+H]⁺ referente ao alcaloide análogo: voafinina fluorada.

Figura 60. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 325 [M+H]⁺ referente aos alcaloides naturais: tubotaiwina e 16-epi-affinina.

Figura 61. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 343 [M+H]⁺ referente aos alcaloides análogos: tubotaiwina e 16-epi-affinina fluorada.

Figura 62. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 369 [M+H]⁺ referente ao alcaloide natural: isovoacangina.

Figura 63. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 387 [M+H]⁺ referente ao alcaloide análogo: isovoacangina fluorada.

Figura 64. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 311 [M+H]⁺ referente ao alcaloide natural: tabernantina.

Figura 65. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 329 [M+H]⁺ referente ao alcaloide análogo: tabernantina fluorada.

Figura 66. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 337 [M+H]⁺ referente ao alcaloide natural: catarantina.

Figura 67. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 355 [M+H]⁺ referente ao alcaloide análogo: catarantina fluorada.

Figura 68. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 297 [M+H]⁺ referente ao alcaloide natural: 19(S)-hydroxiibogamina.

Figura 69. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 315 [M+H]⁺ referente ao alcaloide análogo: 19(S)-hydroxiibogamina fluorada.

Figura 70. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 309 [M+H]⁺ referente ao alcaloide natural: affinisina.

Figura 71. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 327 [M+H]⁺ referente ao alcaloide análogo: affinisina fluorada.

LISTA DE ABREVIATURAS

2,4-D - Ácido 2,4-diclofenoxiacético

AChE - Acetilcolinesterase

APCI - Ionização química por pressão atmosférica

BDP - Biossíntese dirigida pelo precursor

CCD – Cromatografia em camada delgada

CLUE - Cromatografia líquida de ultra-performance

DAD - Diode array detector

DMAPP - Pirofosfato de dimetilalila

ESI - Ionização por eletronebulização

IBA - Ácido indol-3-butírico

IPP - Pirofosfato de isopentenila

m/z - Razão massa/carga

MEP - Via da triose-piruvato ou via do metileritritol fosfato (MEP)

MM - Massa molecular

MS - Meio de cultura Murashige and Skoog

MVA - Via do mevalonato

WP - Meio de cultura Woody plant

RESUMO

O gênero *Tabernaemontana* pertencente à família Apocynaceae possui plantas que são usadas para fins medicinais desde a antiguidade, sendo utilizadas como: antioxidante, inibição enzimática, antitumoral e citotóxica, anti-inflamatória, antinociceptiva, neurofarmacológica, cardiovascular, antiprotozoária, antimicrobiana, antibacteriana, antifúngica e antiviral. A ação farmacológica está relacionada a biossíntese de alcaloides do “tipo-iboga” que são encontrados nas mesmas. A espécie *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. possui alguns alcaloides do tipo-iboga que apresentam atividade anticolinesterásica na mesma ordem de grandeza do fármaco de origem natural que é utilizado na clínica atualmente (galantamina). Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo realizar experimentos de biossíntese dirigida pelo precursor (BDP) em raízes adventícias e plântulas de *T. catharinensis* A. DC. a fim de se produzir novos alcaloides análogos aos naturais. Toda nova diversidade química pode gerar nova diversidade biológica. Assim, gerar novos análogos dos alcaloides do tipo-iboga possivelmente pode potencializar a atividade anticolinesterásica destes. Os resultados obtidos por biossíntese dirigida pelo precursor mostraram a biossíntese de doze possíveis novos alcaloides não-naturais (sendo três deles encontrados somente nas raízes das plântulas), os quais podem ser mais promissores do que os alcaloides do tipo-iboga naturais. Após fracionamento cromatográfico dos extratos foi possível verificar por RMN 1D e 2D a presença de dois possíveis análogos fluorados dos alcaloides do tipo-iboga. Os estudos de marcação isotópica são uma ferramenta importante no estudo de biossíntese, pois uma vez que é elucidada a via operante pode-se prever quais são as enzimas envolvidas e então é possível manipulá-las para aumentar a produção do composto de interesse, bem como gerar novas moléculas. Neste trabalho foi confirmado a participação das rotas metabólicas do triptofano (via do chiquimato), e da secologanina [via do mevalonato (MVA) e triose-piruvato (MEP) concomitantemente] na produção dos alcaloides tipo-iboga em *T. catharinensis* A. DC., e estas vias foram confirmadas por marcação isotópica pela primeira vez na literatura.

ABSTRACT

The genus *Tabernaemontana*, belonging to the Apocynaceae family, have been used for medicinal purposes since antiquity, being used as: antioxidant, enzymatic inhibition, antitumor and cytotoxic, anti-inflammatory, antinociceptive, neuropharmacological, cardiovascular, antiprotozoal, antimicrobial, antibacterial and antifungal agents. The pharmacological activity is related to the biosynthesis of “iboga-type” alkaloids that are found in them. The species *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. has some iboga-type alkaloids that have anticholinesterase activity in the same order of magnitude as the drug of natural origin that is currently used in the clinic (galantamine). In this context, the present work aimed to carry out precursor-directed biosynthesis (BDP) experiments on adventitious roots and seedlings of *T. catharinensis* A. DC. in order to produce new alkaloids analogues to natural ones. Any new chemical diversity can generate new biological diversity. Thus, generating new analogs of iboga-type alkaloids may enhance their anticholinesterase activity. The results obtained by precursor-directed biosynthesis showed the formation of twelve possible new unnatural alkaloids (three of those are found only in the roots of the seedlings), which may be more promising than the natural iboga-type alkaloids. After chromatographic fractionation of the extracts, it was possible to verify by 1D and 2D NMR the presence of two possible fluoro analogues of the iboga-type alkaloids. Isotopic labeling studies are an important tool in the study of biosynthesis, since once the operant pathway is elucidated, it is possible to predict which enzymes are involved and then it is possible to manipulate them to increase the production of the compound of interest, as well as generate new molecules. In this project was observed the operation of the metabolic routes of tryptophan (shikimate pathway), and of secologanine [mevalonate (MVA) and triose-pyruvate (MEP) concomitantly] in the production of iboga-like alkaloids in *T. catharinensis* A. DC., and these pathways were confirmed by isotopic ^{13}C -experiments for the first time in the literature.

1.INTRODUÇÃO

Os produtos naturais e seus derivados continuam sendo a fonte de inspiração para a descoberta de novos fármacos. De todos os medicamentos aprovados entre 1981 e 2014, mais da metade foram desenvolvidos tendo como base as estruturas químicas de produtos naturais (NEWMAN e CRAGG, 2016). Em geral, os alcaloides se destacam, pois apresentam uma estrutura molecular única e complexa e são uma excelente fonte de produtos naturais promissores para o tratamento de diversas doenças (MOLINSKI, 2014).

O gênero *Tabernaemontana* possui plantas que têm sido usadas na medicina tradicional e popular desde a antiguidade, e os alcaloides dessas plantas, apresentam diversas atividades biológicas, incluindo: antioxidante, inibição enzimática, antitumoral e citotóxica, anti-inflamatória, antinociceptiva, neurofarmacológica, cardiovascular, antiprotozoária, antimicrobiana, antibacteriana, antifúngica e antiviral (SILVEIRA et al., 2017). A espécie *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. produz entre outros os alcaloides indólicos coronaridina, voacangine, hidroxindolenina e rupicolina, que são alcaloides monoterpênicos indólicos do tipo-iboga que apresentam atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase (AChE) na mesma concentração (0,01 mM) dos dois inibidores de AChE atualmente utilizados na terapia da doença de Alzheimer; a galantamina e a fisostigmina (ANDRADE et al., 2005).

Contudo, estes alcaloides são produzidos em baixas quantidades pela planta, assim compreender as vias biossintéticas é o primeiro passo para permitir que no futuro as abordagens de engenharia metabólica conduzam a biossíntese das moléculas de interesse em maior escala. Além disso, por meio de estratégias de modificação molecular como a “biossíntese dirigida pelo precursor” pode ser uma ferramenta para gerar novos análogos com uma melhor eficácia biológica do que o próprio alcaloide natural.

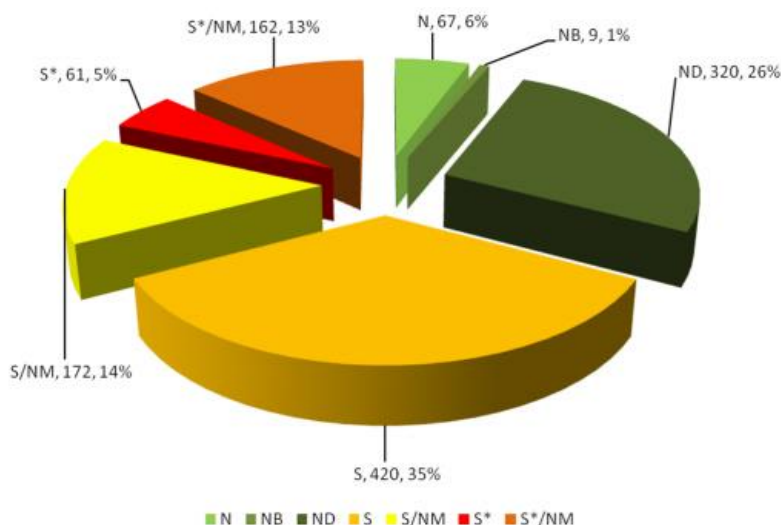
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Plantas medicinais

O uso de plantas medicinais e seus derivados tem sido explorado pelos humanos por milhares de anos. Grandes avanços terapêuticos foram feitos ao se estudar estas plantas de uso popular, nas quais os primeiros compostos bioativos foram isolados, inclusive os “*alcaloides*”, que são metabolitos secundários produzidos pelas plantas, e que apresentam algumas funções como defender a planta de microorganismos, herbívoros, vírus e ações alelopáticas (HAMBURGER e HOSTETTMAN, 1991; PHILLIPSON, 2001).

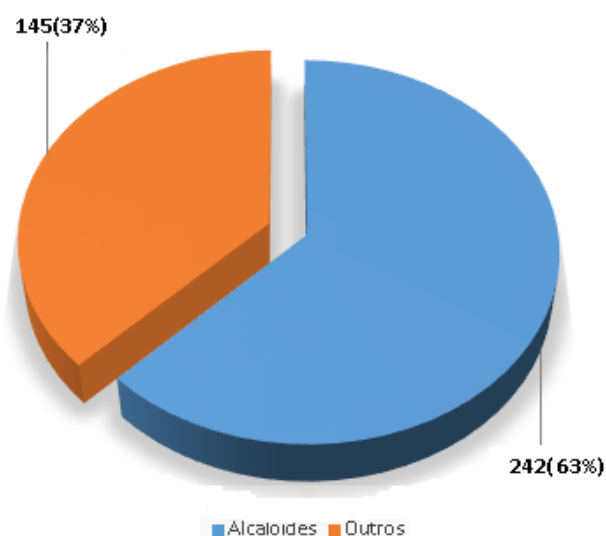
Durante o período entre 1981 e 2014 foram aprovadas 1211 pequenas moléculas como medicamentos, dos quais 387 (32%) são o próprio produto natural inalterado (N) e derivado de produto natural (ND) representado na Figura 1 (NEWMAN e CRAGG, 2016).

Figura 1. Pequenas moléculas aprovadas como medicamentos de 1981 e 2014. (B: Macromolécula biológica, N: Produto natural inalterado, NB: Droga botânica (mistura definida), ND: Derivado de produto natural, S: Droga sintética, S*: Droga sintética baseado em produto natural e NM: Mimico de produto natural).



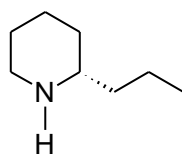
Destes 387 fármacos pode-se ressaltar ainda a importância da classe dos alcaloides e seus derivados, já que estes equivalem a uma parcela de 63% (Figura 2).

Figura 2. Porcentagem de alcaloides presentes entre as pequenas moléculas aprovadas como medicamentos de 1981 e 2014.

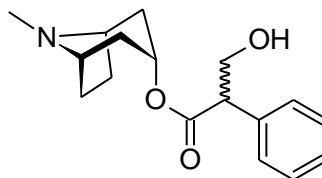


Os alcaloides são compostos que contêm nitrogênio em sua estrutura, na sua grande maioria encontrados em plantas, mas também ocorrem em microrganismos e animais, sendo que mais de 27 mil alcaloides já foram identificados e 21 mil deles isolados de plantas (DEWICK, 2009). O uso de alcaloides como medicamentos e até mesmo venenos pode ser traçados desde o início da civilização, alguns exemplos famosos como a morte de Sócrates pelo consumo da planta *Conium maculatum* que contém coniina. É descrito também que Cleópatra utilizava extratos de *Hyoscyamus muticus* a qual continha atropina para dilatar suas pupilas e assim parecer mais sedutora, e que continua sendo utilizado com o mesmo propósito em colírios para exames oculares (KUTCHAN, 1995).

Figura 3. Alcaloides coniina e atropina utilizados por Sócrates e Cleópatra.



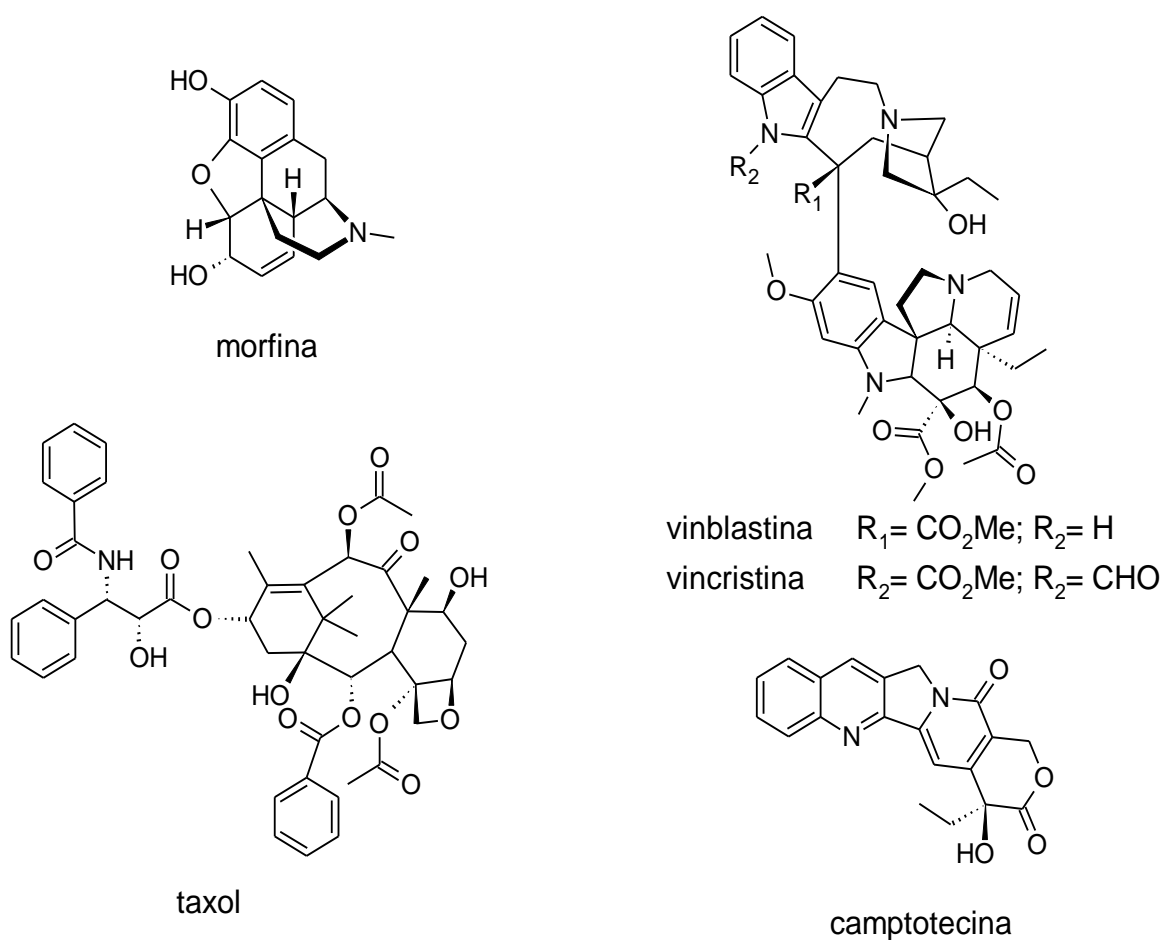
coniina



atropina

Um dos alcaloides usados na medicina mais popularmente conhecidos é a morfina, isolada de *Papaver somniferum*, a qual é utilizada pelo seu alto poder analgésico para aliviar dores severas. Um outro exemplo são os alcaloides monoterpênicos indólicos vimblastina e vincristina, isolados de *Catharanthus roseus*, ainda usados hoje em terapias para tratamento de câncer, bem como derivados da camptotecina (*Camptotheca acuminata*) e do taxol (*Taxus brevifolia*).

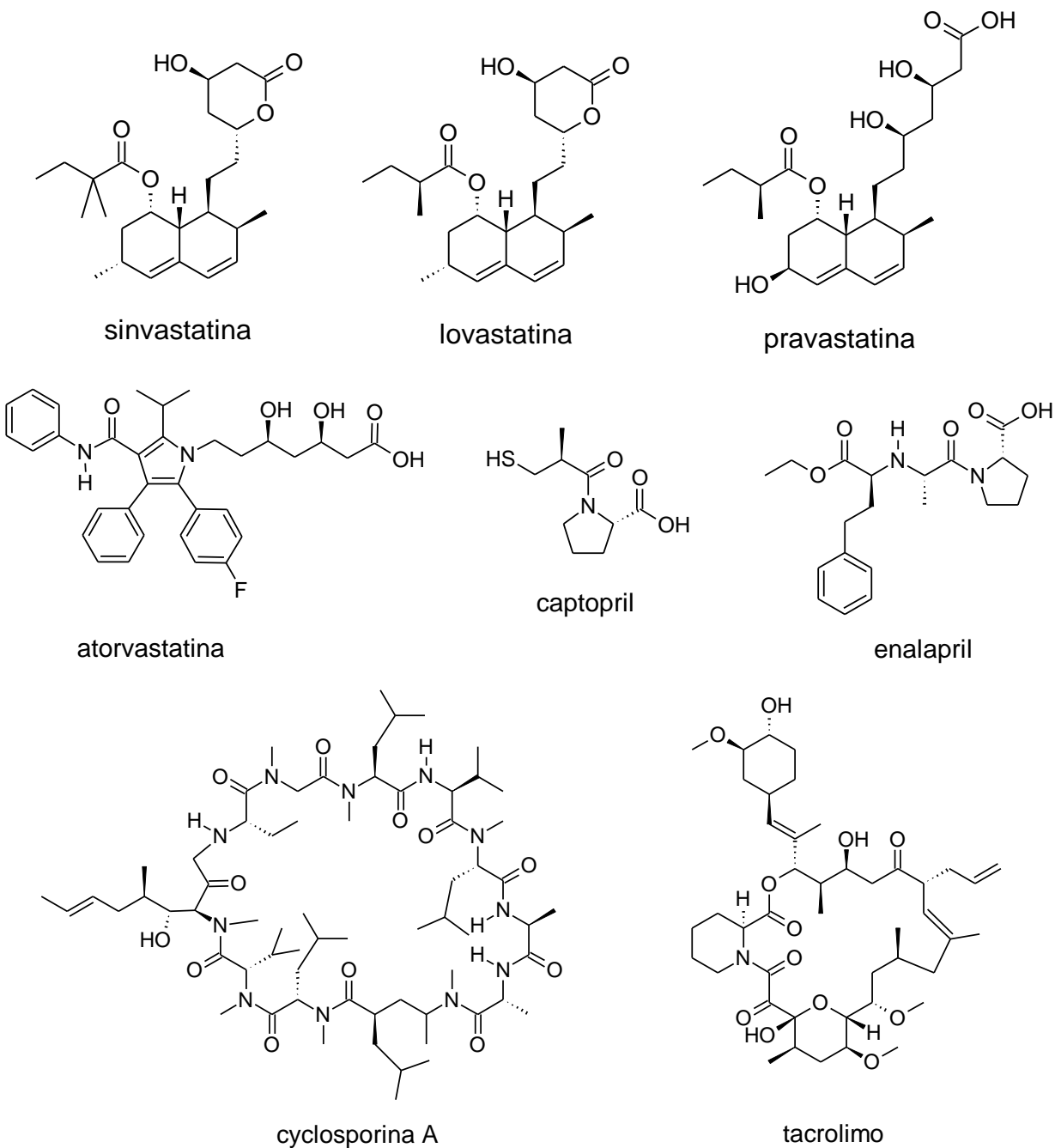
Figura 4. Alcaloides farmacologicamente importantes isolados de produtos naturais utilizados na medicina atual.



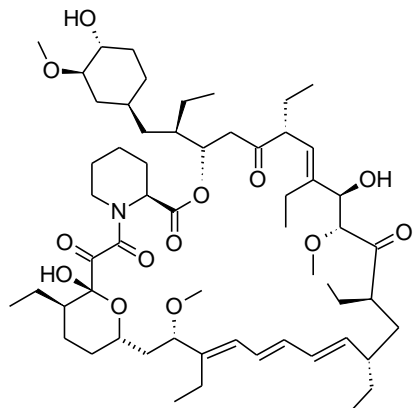
Aproximadamente um terço dos fármacos mais vendidos no mundo são oriundos de produtos naturais e seus análogos. Alguns exemplos isolados de planta, microrganismos e animais podem ser citados como os anti-colinesterásticos sinvastatina, lovastatina, pravastatina e atorvastatina; os agentes anti-hipertensivos como captopril e enalapril; os imunossuppressores ciclosporina A, tacolimo (FK506) e rapamicina; os

anticancerígenos docetaxel, taxol e camptotecina citados acima; e os antibióticos e antifúngicos penicilina, eritromicina, claritromicina e anfotericina B (Figura 5, CALIXTO, J. B. 2019).

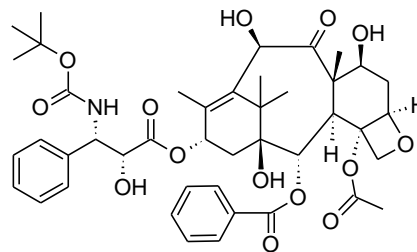
Figura 5. Estrutura química dos fármacos mais vendidos no mundo nos últimos anos oriundos de produtos naturais.



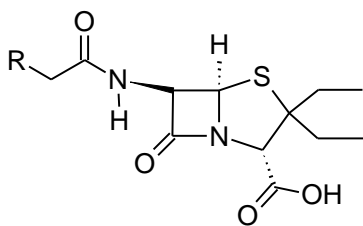
Continuação da Figura 5.



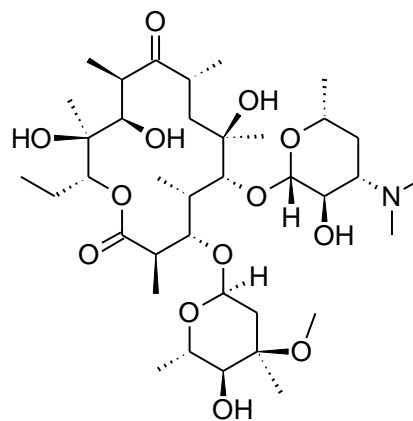
rapamicina



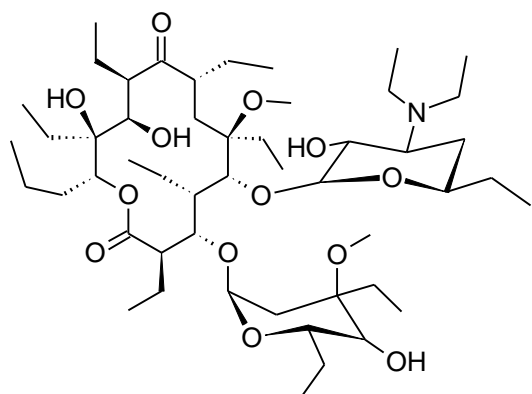
docetaxel



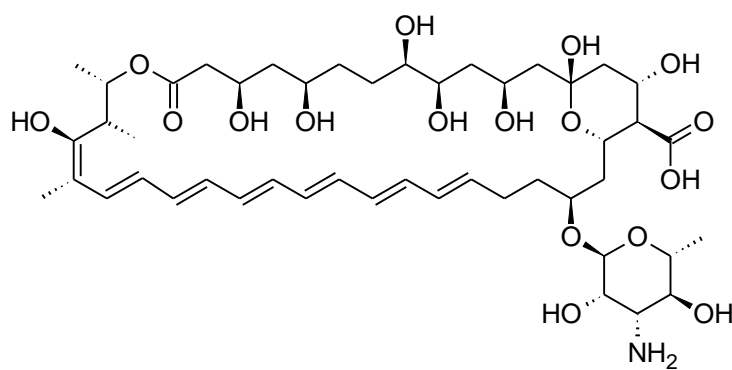
penicilina



eritromicina



claritromicina

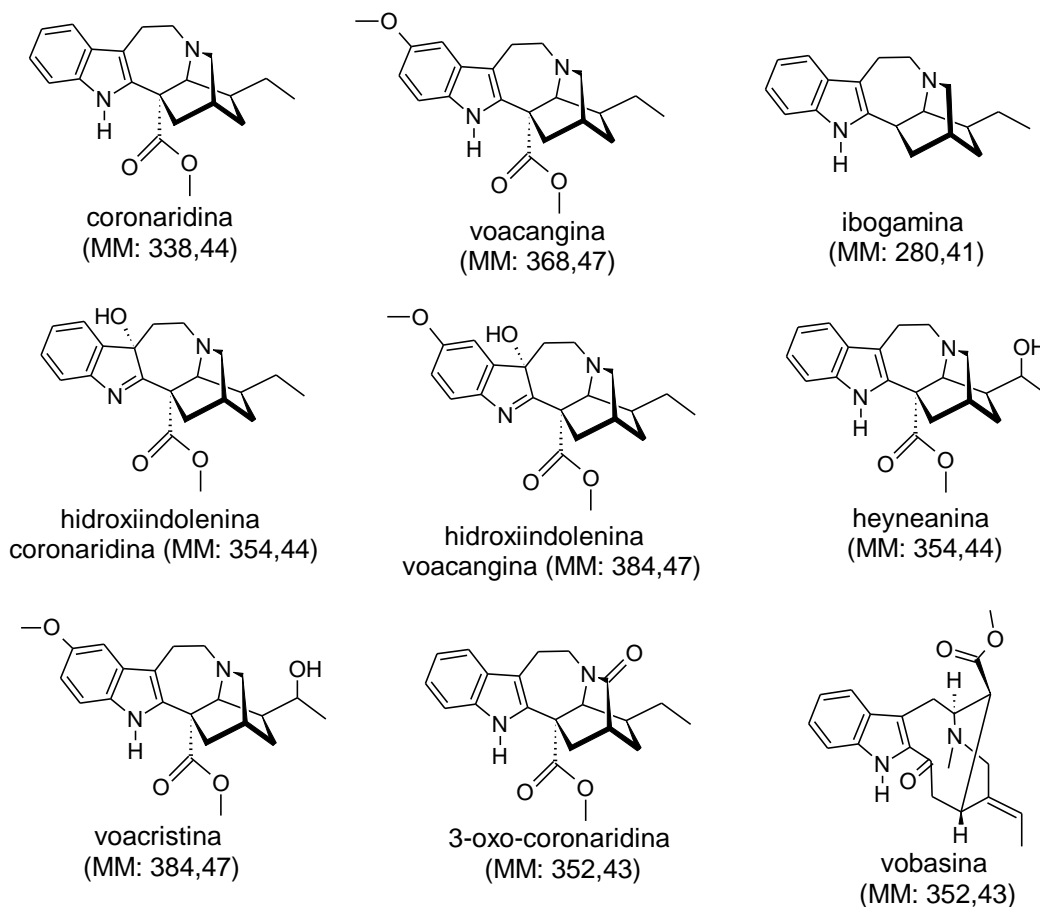


anfotericina B

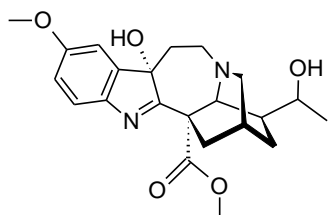
2.2 O Gênero *Tabernaemontana*

Pertencente à família Apocynaceae o gênero *Tabernaemontana* geralmente se apresenta como árvores que produzem látex e arbustos floridos. Cerca de 100 espécies desse gênero foram descritas ao redor do mundo nas regiões tropicais e subtropicais, incluindo África, Ásia, Oceania e nas Américas, sendo a classe iboga um importante marcador que contempla compostos valiosos como: ibogamina, voacangina e coronaridina. Um total de 73 alcaloides de 30 espécies de *Tabernaemontana* coletadas no Brasil foram isoladas e identificadas, sendo a maioria deles de *T. catharinensis* A. DC. (SIMÕES et al., 2010). Na figura 6 estão apresentadas as estruturas químicas dos alcaloides descritos na literatura relacionados ao gênero *Tabernaemontana* (PEREIRA et.al, 2008; CARDOSO et.al, 1998; KAM & ANURADHA, 1995; NICOLA et.al, 2013)

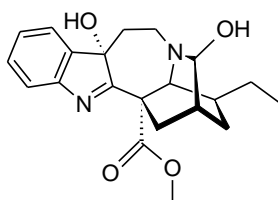
Figura 6. Alcaloides monoterpênicos indólicos do gênero *Tabernaemontana* e suas respectivas massas moleculares (MM).



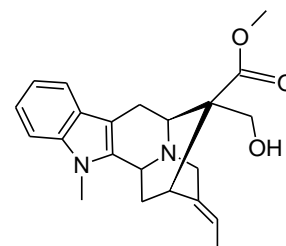
Continuação da Figura 6.



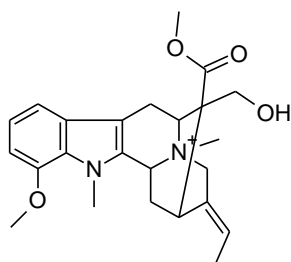
hidroxiindolenina
voacristina (MM: 400,47)



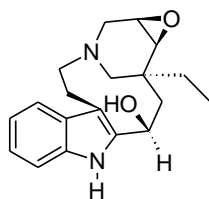
hidroxiindolenina
3-hidroxicononaridina (MM: 370,44)



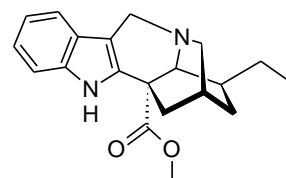
voacholatina
(MM: 366,45)



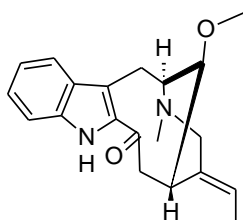
12-metoxi-n-metil-voach
olatina (MM: 411,51)



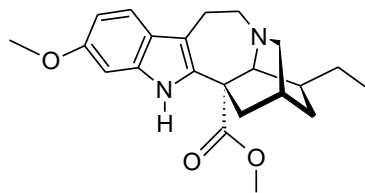
voafinina
(MM: 312,41)



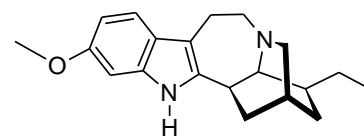
tubotaiwina
(MM: 324,42)



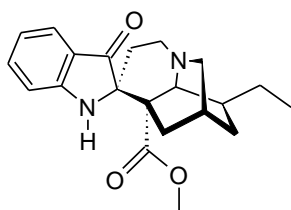
16-epi-affnina
(MM: 324,42)



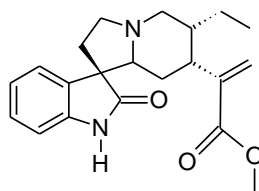
isovoacangina
(MM: 368,47)



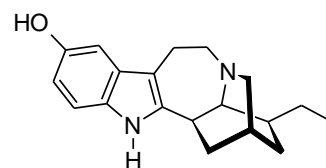
tabernantina
(MM: 310,43)



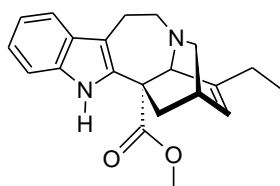
pseudoindoxil
coronaridina (MM: 354,44)



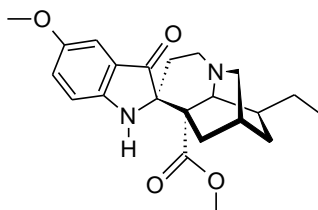
catarinensina
(MM: 354, 44)



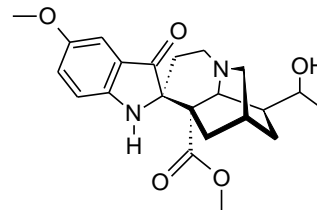
noribogaina
(MM: 296,41)



catarantina
(MM: 336,43)

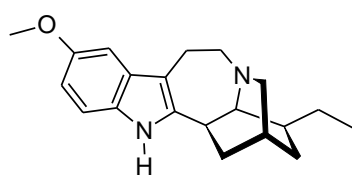


rupicolina
(MM: 384,47)

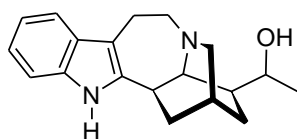


montanina
(MM: 400,47)

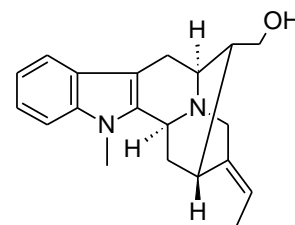
Continuação da Figura 6.



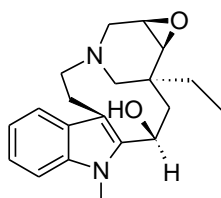
ibogaina
(MM: 310,43)



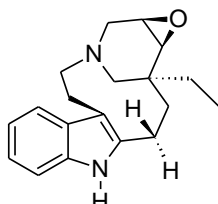
19(S)-hidroxiibogamina
(MM: 296,41)



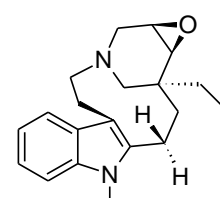
affinisina
(MM: 308,42)



N1-metilvoafinina
(MM: 326,43)



voafinina
(MM: 296,41)



N1-metilvoafinina
(MM: 310,43)

2.3 Atividade neurológica dos alcaloides do tipo-iboga de *T. catharinensis*

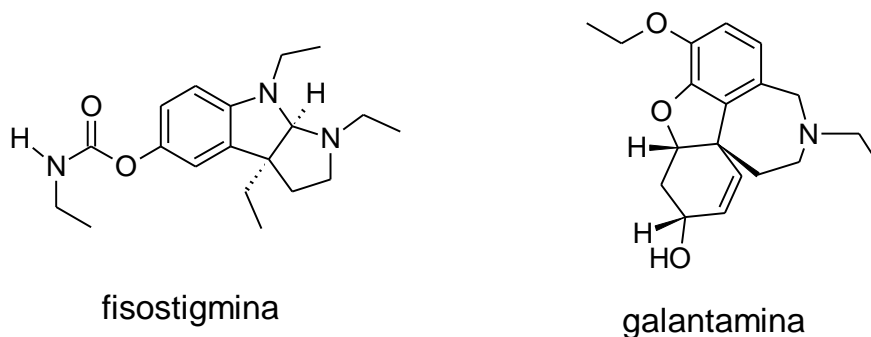
A. DC.

O Centro de Avaliação e Pesquisa de Medicamentos (FDA) aprovou em 2017 um total de 46 novos medicamentos, sendo esta a maior aprovação de fármacos desde o ano de 1996 quando 59 novas moléculas foram aprovadas. As áreas terapêuticas com mais aprovações foram a oncologia (23%), doenças infecciosas (17%) e em terceiro lugar a área da neurologia (13%) (MULLARD, A. 2017). Assim, os inibidores da acetilcolinesterase (AChE) tem grande importância pois podem atuar no combate a doenças que envolvem a neurotransmissão de acetilcolina. Na clínica o uso destes compostos tem se mostrado cada vez mais valiosos (SINGH et.al, 2013), sendo considerada como umas das estratégias no tratamento da doença de Alzheimer (MUKHERJEE et.al, 2007).

Os alcaloides do tipo-iboga encontrados no gênero *Tabernaemontana* possuem grande potencial como inibidores da AChE, podendo ser compostos interessantes no estudo de interações bioquímicas envolvendo as colinesterases (VIEIRA et.al, 2008). Um exemplo são os alcaloides indólicos: coronaridina, voacangine, hidroxindolenina

voacangina e rupicolina que exibiram uma ação anticolinesterásica na mesma concentração dos compostos utilizados como referencias; a fisostigmina e a galantamina (0,01 mM) (ANDRADE et.al, 2005). Os extratos e frações de *T. catharinensis* A. DC., especialmente aqueles que continham a molécula 12-metoxi-metil-voachalotina, apresentaram um IC₅₀ entre 2,1 e 2,5 µg.mL⁻¹ (MARINHO et.al, 2016).

Figura 7. Alcaloides utilizados como inibidores da AChE no tratamento de Alzheimer.



Diversos centros de pesquisa ao redor do mundo buscam a cura do Alzheimer e apesar disso ainda há lacunas na validação de alvos e mecanismos de ação dos medicamentos (PERAKSLIS et.al, 2018). Durante anos o tratamento foi baseado na proteína beta-amilóide, contudo estudos recentes mostram novos possíveis alvos de ação, como o sistema glutamatérgico (CONWAY, 2020) e até mesmo bactérias do intestino podem ter um papel essencial no tratamento do Alzheimer (JIANG et.al 2017).

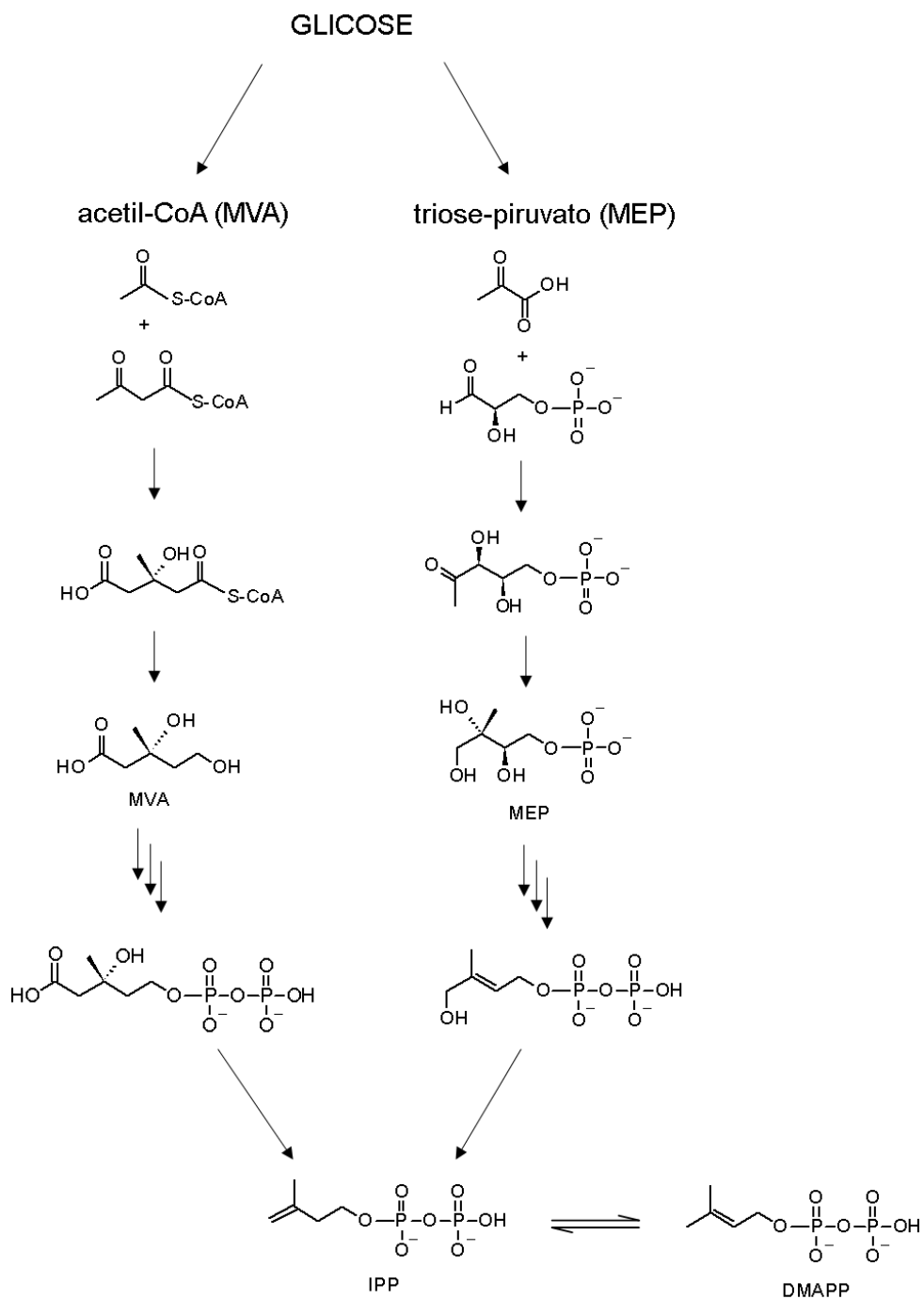
2.4 Biossíntese dos alcaloides tipo-iboga em *Tabernaemontana*

Na literatura há poucas evidências sobre as vias biossintéticas operantes dos alcaloides do tipo-iboga. Os pesquisadores Yamasaki e Leete em 1964 comprovaram a participação do triptofano (via do chiquimato) na formação dos alcaloides tipo-iboga em *Tabernanthe iboga*, porém a porção terpenoídica (secologanina - um monoterpene iridóide), a qual pode ocorrer pela via do mevalonato (MVA), via da triose-piruvato (MEP) ou comitantemente por ambas as vias, ainda não foi identificada. A biossíntese dos terpenóides tem como precursor-chave as unidades de pirofosfato de isopentenila (IPP) e o seu isômero, pirofosfato de dimetilalila (DMAPP) (Figura 8). Inicialmente o ácido

mevalônico era conhecido como o único precursor responsável pela biossíntese universal que levava à formação das unidades de IPP (ADAM et al., 1998) e a posterior foi verificado que outra via também estava envolvida na formação de compostos terpenóides, denominada de via alternativa (via independente do mevalonato) ou via 2-C-metil- D-eritritol-4-fosfato (triose/piruvato) (ROHMER et al., 1993; 1996). Assim, as unidades de IPP podem ser formadas por meio de duas vias biossintéticas: a via do mevalonato (MVA), que envolve condensações de unidades de acetil-CoA, e a via da triose piruvato (MEP), que envolve a condensação de gliceraldeído-3-fosfato e piruvato (ROHMER et al., 1993; 1996; ADAM et al., 1998). A investigação da biossíntese que leva à formação das unidades de IPP é feita através de incorporação de $1\text{-}^{13}\text{C}$ -D-glicose. Dependendo da via de metabolização envolvida, a marcação dos carbonos das unidades isoprênicas será diferenciada, se forem os C-2, C- 4 e C-5 será mevalonato (MVA) e se forem os carbonos C-1 e C-5 será triose-piruvato (MEP). Ambas as vias podem ocorrer concomitantemente, então todos os carbonos estarão enriquecidos, exceto C-3. O primeiro estudo que mostrou a atuação das duas rotas MVA e MEP foi realizado com os sesquiterpenos das flores da camomila, *Matricaria recutita* (Asteraceae) (ADAM et al., 1998), além disso, outros exemplos de biossíntese mista são a do 4-nerolidilcatecol, um potente antioxidante utilizado na indústria cosmética e obtido de *Potomorphe umbellata* (BERGAMO et al., 2005) e do ácido gaudichaudiânico isolado de *Piper gaudichaudianum*, um potente antifúngico contra fungos do gênero *Cladosporium* (LOPES et al., 2007). Os estudos de marcação isotópica são de grande importância, uma vez que permitem a determinação da via operante, além de predizerem as principais organelas ou compartimentos envolvidos na biossíntese dos metabólitos considerados. As principais vias isoprênicas em plantas, do mevalonato (MVA) e da triose-piruvato (MEP), estão compartimentalizadas no citosol e plastídio, respectivamente (FRANK & GROLL, 2017).

Em 2018 foi publicado por Farrow e colaboradores que por meio dos dados obtidos do transcriptoma de *Tabernanthe iboga* foi possível identificar e caracterizar as enzimas envolvidas (P450; oxidase e OMT; O-metil-transferase) na via biossintética de ibogaina, bem como os seus precursores voacangina e coronaridina (Figura 9) (FARROW et al., 2018).

Figura 8. A biossíntese dos terpenos via MVA e MEP.



Ainda em 2018 foi publicado na renomada *Science* que a deidrosecodina é o precursor de catarantina e tabersonina em *Catharanthus roseus* por meio de ação de duas enzimas que catalisam ciclicações de Diels-Alder (tabersonina sintase-TS e catarantina sintase-CS) (CAPUTI et al., 2018; Figura 9). Além disso, foi verificado

recentemente que deidrosecodina é o intermediário de coronaridina em *T. iboga* (Figura 9) (FARROW et al., 2019). Os alcaloides do tipo-iboga de *T. catharinensis* alvo deste projeto de pesquisa podem ser oriundos de *ent*-catharantina, assim a deidrosecodina, que é precursor de catharantina e tabersonina, pode ser o mesmo precursor para os alcaloides de *T. catharinensis* (Figura 10). A proposta em detalhes para a biogênese dos alcaloides em *T. catharinensis* A. DC. é mostrada na figura 10, onde são esperadas a participação da via do chiquimato, da via do MEP, e do intermediário *ent*-catharantina.

Figura 9. Biossíntese dos alcaloides do tipo-iboga em *C. roseus* (em azul descrito por CAPUTI et al., 2018) e em *T. iboga* (em vermelho descrito por FARROW et al., 2018; em verde descrito por FARROW et al., 2019).

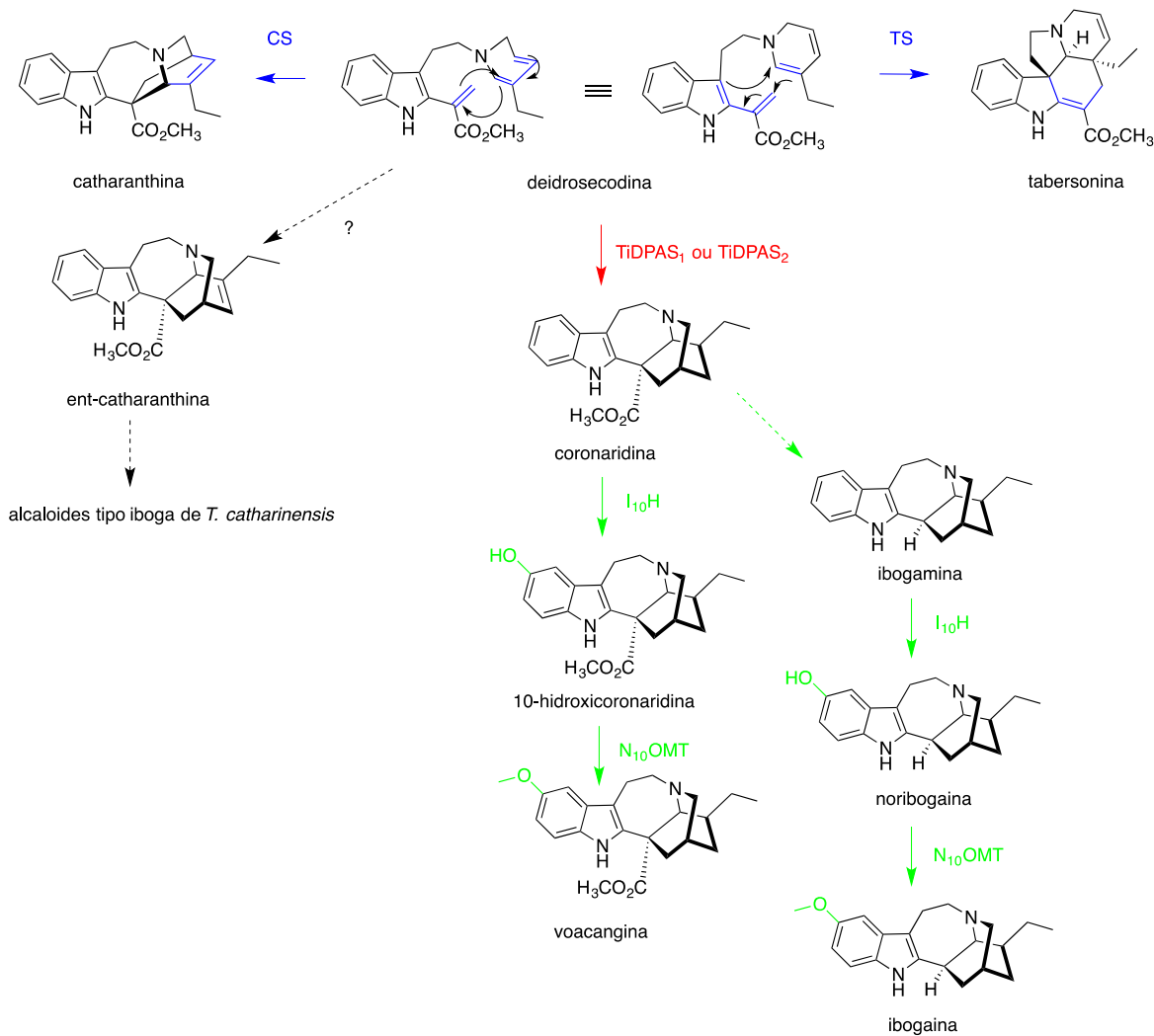
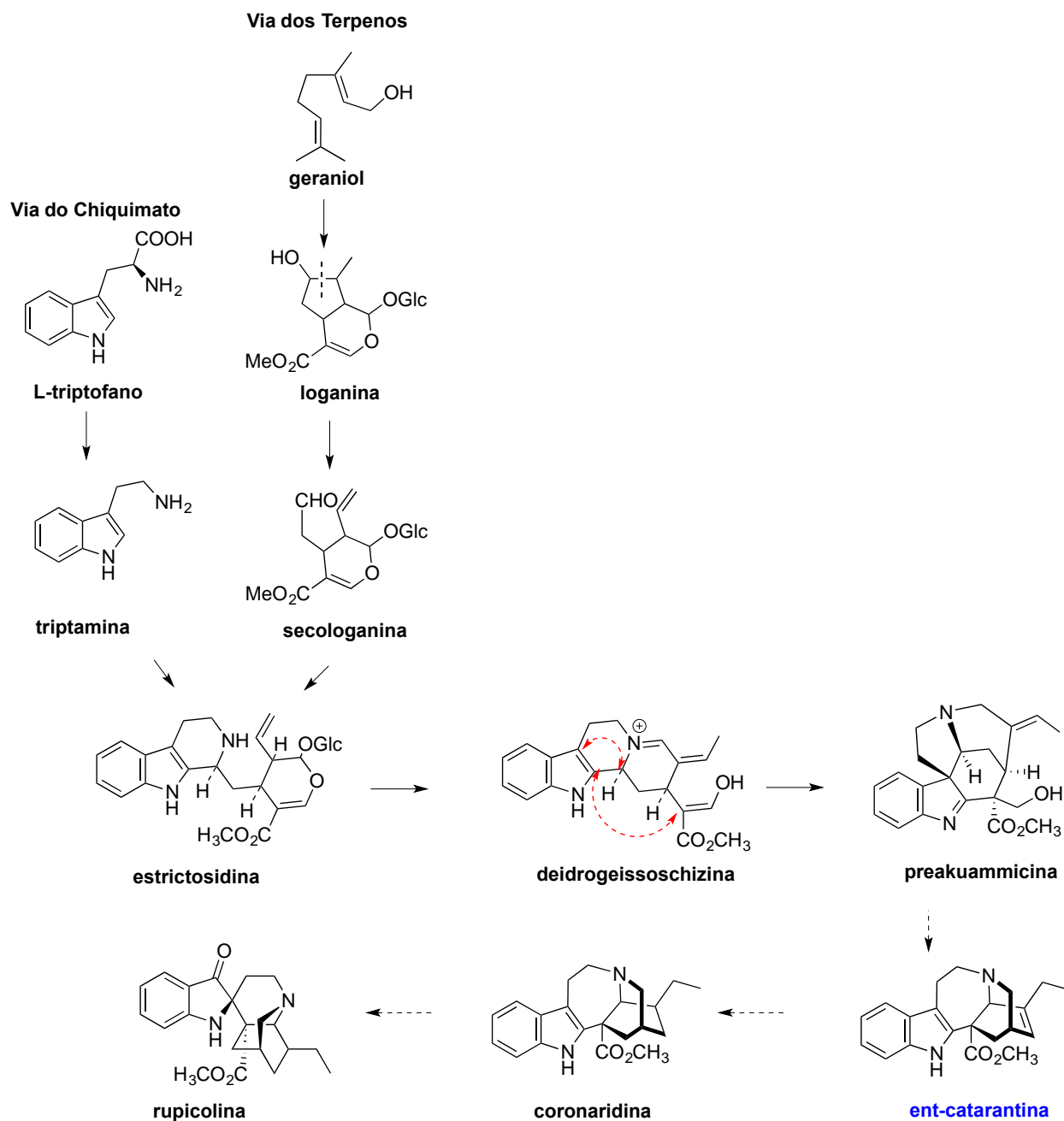


Figura 10. Biogênese dos alcaloides tipo iboga em *T. catharinensis* A. DC. (*adaptado de DEWICK, 2009; TATSIS et al., 2017; FARROW et al., 2018 e 2019). As setas tracejadas indicam proposta biogenética.



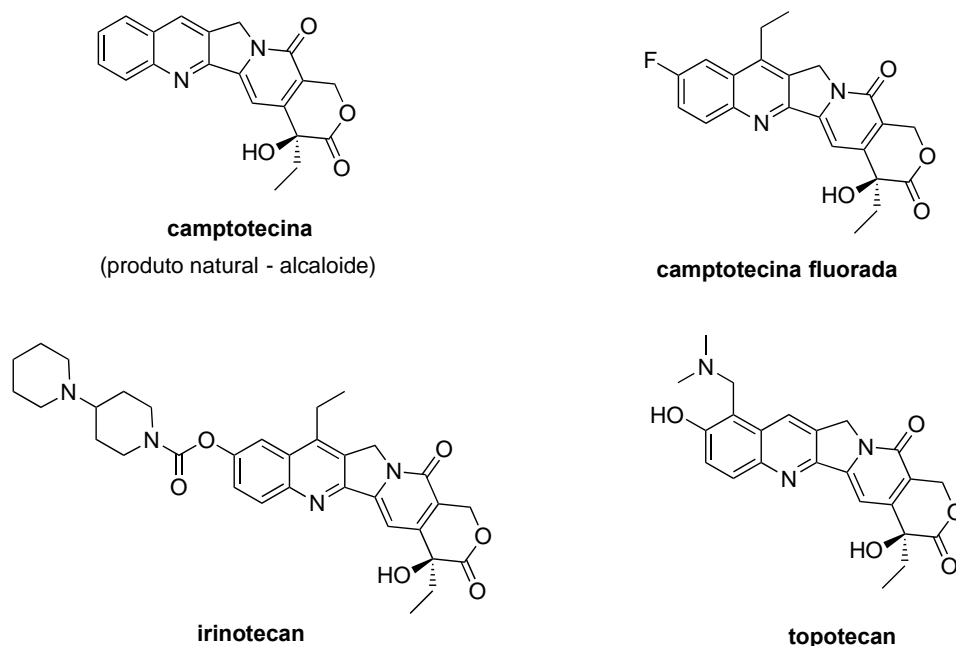
Este tipo de estudo sobre a biossíntese de alcaloides é de grande importância, pois uma vez conhecendo as enzimas envolvidas na rota é possível manipulá-las para aumentar a produção do composto de interesse bem como a produção de novas

moléculas. Recentemente Caputi e colaboradores (CAPUTI et al., 2018) identificaram os genes que codificam 32 enzimas operantes na rota metabólica para a síntese total do alcaloide vimblastina, o qual é fármaco utilizado no tratamento de câncer ainda nos dias atuais. Com essa descoberta é possível agora planejar a síntese deste fármaco a partir de produção heteróloga (utilizando microrganismos) em larga escala desse composto valioso e de alto valor agregado.

2.5 Biossíntese dirigida pelo precursor (BDP)

Inúmeras estratégias de modificação molecular dos produtos naturais podem gerar novos análogos, e uma vez gerado uma nova molécula esta pode apresentar uma melhor eficácia farmacológica. É interessante observar que alguns análogos especialmente os fluorados, apresentam maior atividade biológica quando comparado ao seu correspondente não-fluorado. Pode-se citar alguns exemplos como a fludrocortisona, que foi o primeiro glucocorticoide fluorado ativo; exibe 10 vezes mais potência do que outros derivados da cortisona. Alguns anos depois, descobriram-se outros potentes produtos farmacêuticos fluorados, tais como as estatinas (lipitor, crestor, vytorin, zetia / ezetimibe), antiinflamatórios (propionato de fluticasona, celebrex), antiácidos (prevacid), antidepressivos (lexapro), neurolépticos (risperdal) e antibióticos (levaquin) (O'HAGAN, 2010; WANG et al., 2013). O análogo de fluor-vimblastina exibe uma atividade antitumoral notável ($IC_{50} = 300 \text{ pM}$), sendo 30 vezes mais ativa do que a vimblastina ($IC_{50} = 10 \text{ nM}$) para certos tipos de tumores (SEARS & BORGER, 2015). Um outro exemplo é o análogo fluorado da camptotecina ($IC_{50}=67 \text{ nM}$) que mostrou ser mais eficaz contra células tumorais (KB-Vin) multirresistentes comparado a irinotecan ($IC_{50} > 20.000 \text{ nM}$) e topotecan ($IC_{50}= 287 \text{ nM}$) (Figura 11; YANG, C-J. et al., 2017). Aproximadamente 20% de todos os fármacos do mercado apresentam pelo menos um átomo de flúor (YANG, C-J. et al., 2017). Por esta razão, a “biossíntese dirigida pelo precursor” (BDP) e outras estratégias de engenharia metabólica vem sendo aplicadas em plantas medicinais com sucesso para produzir derivados de produtos naturais. Os experimentos de BDP são atrativos, eficientes e um método de fácil manuseio, na qual potencializa a abordagem de um derivado valioso de produto natural.

Figura 11. Estrutura química de camptotecina e seus análogos.



A abordagem BDP é representada através da adição de um precursor análogo biossintético, na qual o organismo é capaz de incorporar tais processos enzimáticos para obter a produção de metabólitos modificados. Estes são levados em suas células intactas para serem usadas na cascata biossintética. Deste modo, a definição da biossíntese dirigida pelo precursor é a derivação de um metabólito secundário através da suplementação de um precursor biossintético análogo no crescimento dos organismos produzidos (THIERICKE & ROHR 1993). Estratégias de modificação metabólica produzem moléculas “artificiais” que apresenta enorme sucesso em organismos microbianos, e a literatura apresenta alguns exemplos interessantes. No entanto, há poucos relatos dessa abordagem em plantas, e as estratégias de modificação metabólica geram produtos complexos, de vias complexas ainda não amplamente explorados (RUNGUPHAN, et al., 2009). Existem inúmeros exemplos de experimentos de BDP utilizando microorganismos, porém os exemplos com plantas são escassos. Experimentos de BPD utilizando tecidos de *C. roseus* demonstraram que com

sua própria maquinaria enzimática e capaz de produzir novas substâncias, em *C. roseus* foi demonstrado que é possível produzir intermediários análogos fluorados de alcaloides monoterpênicos indólicos (MCCOY & O'CONNOR, 2006; BERNHARD et al., 2007). Recentemente, estudos realizados na Unidade de Biotecnologia da UNAERP mostraram com sucesso a biossíntese de análogos fluorados e metilados dos alcaloides oxindólicos utilizando as plântulas de *Uncaria guianensis* (LOPES et al., 2019). Experimentos de BDP são de grande importância uma vez que essa abordagem é muito recente utilizando plantas, e o sucesso da incorporação dos precursores “não-naturais”, na rota biossintética de um determinado produto natural, levará a formação de um análogo que pode ser mais promissor que o próprio produto natural.

3. JUSTIFICATIVA

Atualmente há uma demanda por novos protótipos de fármacos para o tratamento de doenças neurológicas. Neste trabalho é proposto uma modificação estrutural dos alcaloides tipo-iboga de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC., os quais são promissores contra o Alzheimer. Além disso, compreender as rotas biossintéticas para a produção destes alcaloides traz informações importantes para modular suas vias operantes aumentando sua síntese na planta.

4. HIPÓTESE

A biossíntese dirigida pelo precursor é uma técnica eficiente para a produção de novos alcaloides não-naturais em *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. que podem ser mais promissores que o próprio produto natural. Estudos de marcação isotópica seriam capazes de confirmar as rotas biossintéticas operantes na via dos alcaloides tipo-iboga em *Tabernaemontana catharinensis* A. DC.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Identificar as vias operantes na formação dos alcaloides do tipo-iboga em *T. catharinensis* A. DC. por meio de experimentos de marcação isotópica e a obtenção de análogos fluorados destes alcaloides utilizando experimentos de biossíntese dirigida pelo precursor.

5.2 Objetivos específicos

- Micropropagação da espécie *T. catharinensis* A. DC. para obtenção de inúmeros clones;
- Indução de callus a partir das raízes de *T. catharinensis* A. DC.;
- Estudos de marcação isotópica (2-¹³C-triptofano, 3-¹³C-piruvato de sódio, 1-¹³C-gliceraldeído e 2-¹³C-acetato) a fim de se confirmar as rotas biossintéticas operantes na via dos alcaloides iboga em plântulas de *T. catharinensis* A. DC.;
- Experimentos de biossíntese dirigida pelo precursor em raízes adventícias de *Tabernaemontana catharinensis* através da suplementação de 6-fluor-triptamina;
- Experimentos de biossíntese dirigida pelo precursor em plântulas de *Tabernaemontana catharinensis* através da suplementação de 5-fluor-triptamina.
- Análise por CLUE-MS/QTOF dos experimentos de marcação isotópica a fim de confirmar a incorporação dos precursores de ¹³C.
- Análise por CLUE-DAD-MS a fim de confirmar a biossíntese dos alcaloides indólicos análogos fluorados;
- Isolamento e identificação estrutural dos análogos por técnicas espectroscópicas e espectrométricas (RMN 1D, 2D e MS).

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Micropropagação das plântulas de *T. catharinensis* A. DC.

As plântulas de *T. catharinensis* A. DC. foram geradas por meio de sementes utilizando meio basal MS contendo 30 g.L⁻¹ de sacarose, 3 g.L⁻¹ de gellex e pH ajustado para 6,0 ± 0,05. Todos os experimentos envolvendo micropropagação do material vegetal foram realizados sob supervisão da colaboradora Prof. Dra. Ana Maria Soares Pereira da Unidade de Biotecnologia da UNAERP.

6.2 Indução dos callus a partir das raízes de plântulas de *T. catharinensis* A. DC.

As raízes de *T. catharinensis* A. DC. oriundas de plântulas foram inoculadas inteiras e com cortes longitudinais em 3 diferentes meios para a indução de callus.

- MS + 30 g.L⁻¹ de sacarose + 1,0 mg.L⁻¹ de 2,4D + 1,0 mg.L⁻¹ de cinetina;
- MS + 30 g.L⁻¹ de sacarose + 2,0 mg.L⁻¹ de 2,4D + 0,2 mg.L⁻¹ de cinetina;
- MS + 30 g.L⁻¹ de sacarose + 2,0 mg.L⁻¹ de ANA + 0,2 mg.L⁻¹ de BAP.

6.3 Cultivo de raízes adventícias *in vitro* a partir das raízes de plântulas de *T. catharinensis* A. DC.

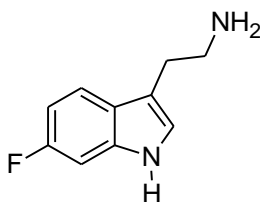
A partir das sementes germinadas foram obtidas as raízes adventícias de *T. catharinensis*, onde a parte aérea foi micropropagada e a raiz transferida para um meio de cultura basal MS líquido contendo 20 g.L⁻¹ de sacarose, 2,5 g.L⁻¹ de IBA e pH ajustado para 6,0 ± 0,05.

6.4 Experimentos de marcação isotópica utilizando as plântulas de *T. catharinensis* A. DC.

As plântulas de *T. catharinensis* A. DC. com cerca de 3 meses (~4cm de altura; n= 5) foram transferidas para meio MS basal líquido suplementado com os precursores: 1-¹³C-gliceraldeído (50 mM), 2-¹³C-acetato (30 mM), 3-¹³C-piruvato de sódio (10 mM) e 2-¹³C-triptofano (10 mM). Os precursores foram solubilizados em H₂O ultrapura e adicionados no meio de cultura Wood Plant (WP) com 20 g.L⁻¹ de glicose, 2,0 mg.L⁻¹ de IBA, pH ajustado para 6,0 ± 0,05 (previamente autoclavado) por meio de um filtro estéril. As plântulas após a transferência foram mantidas à 25°C ± 2°C durante 30 dias (55-60% de umidade relativa com um fotoperíodo de 16 horas luz e 8 horas escuro).

6.5 Experimentos de biossíntese dirigida pelo precursor em raízes adventícias de *T. catharinensis* A. DC.

O análogo 6-fluor-triptamina foi solubilizado em 1 mL de H₂O ultrapura (3 mM), filtrado através de um filtro estéril de 0,2 µm e adicionado ao meio WP com 2% (p/v) de glicose, 2,0 mg.L⁻¹ de IBA, pH ajustado para 6,0 ± 0,05.

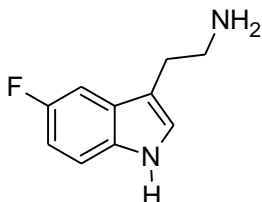


6-fluor-triptamina

As raízes adventícias (n=10) de um mês foram transferidas para o meio WP descrito no item 6.5 bem como foram preparadas cinco raízes como o controle; sem o análogo fluorado, e mantidas a 25°C ± 2°C durante 15 dias (55-60% de umidade relativa com um fotoperíodo de 16 horas luz e 8 horas escuro). Após a incubação, as raízes adventícias de *T. catharinensis* A. DC. foram extraídas com metanol a fim de se obter os extratos brutos (TC: controle; BDPTC: experimento de BDP).

6.6 Experimentos de biossíntese dirigida pelo precursor em plântulas de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC.

O análogo 5-fluor-triptamina foi solubilizado em 1 mL de H₂O ultrapura (3 mM), filtrado através de um filtro estéril de 0,2 µm e adicionado ao meio WP com 20 g.L⁻¹ de glicose, 2,0 mg.L⁻¹ de IBA, pH ajustado para 6,0 ± 0,05.



5-fluor-triptamina

As plântulas *in vitro* com três meses (n= 40) foram transferidas para o meio WP descrito acima bem como foram preparadas cinco raízes como o controle; sem o análogo fluorado e mantidas a 25°C ± 2°C durante 30 dias (55-60% de umidade relativa com um fotoperíodo de 16 horas luz e 8 horas escuro). Após a incubação, as plântulas de *T. catharinensis* foram extraídas com metanol; separadas em parte aérea (TCA: controle, TCFA: experimento de BDP) e raízes (TCR: controle; TCFR: experimento de BDP) a fim de se obter os extratos brutos.

6.7 Condições cromatográficas para as análises das vias biossintéticas por CLUE-MS/QTOF dos experimentos de marcação isotópica

As amostras injetadas no sistema CLUE-MS/MS 3200 QTRAP®, em modo positivo de análise na qual as amostras foram solubilizadas em ACN/H₂O na proporção de 70:30: a concentração dos extratos de raízes com aproximadamente 1,0 mg.mL⁻¹ e da parte aérea com 0,5 mg.L⁻¹. A condição cromatográfica foi (A:B; A-H₂O ultrapura + 0,1% de ácido fórmico; B-ACN + 0,1% de ácido fórmico); de 0-8 min iniciando a (95:5) até (0:100); 8-13 min (0:100); 13-13,5 min iniciando a (0:100) até (95:5) e de 13,5-18 min (95:5), volume de injeção: 0,5 µL (raiz) e 0,1 µL (parte aérea), e as amostras foram

analisadas em triplicata. As análises foram realizadas no Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Câmpus de Araraquara) sob a supervisão da Dra. Juliana Rodrigues.

6.8 Condições cromatográficas para as análises em CLUE-DAD-MS dos extratos oriundos dos experimentos de BDP (raízes adventícias e plântulas de *T. catharinensis* A. DC.)

As análises foram realizadas em um sistema ACQUITY UPLC H-Class (Waters Corporation) de cromatografia líquida de ultra-performance (CLUE) acoplado aos detectores de arranjo de diodos (DAD) e ao espectrômetro de massas Xevo TQ-S tandem quadrupole (Waters Corporation, Milford, MA), operando com uma fonte de ionização por eletrospray (ESI-MS) em modo positivo de análise. Um volume de 5 μ L na concentração de 100 μ g.mL⁻¹ de amostra foi injetada em uma coluna Gemini 5u C18 110A (250 mm x 4,6 mm, 5 μ). A condição cromatográfica utilizada foi de: (A:B; A-H₂O ultrapura + 0,1% de ácido fórmico; B-ACN + 0,1% de ácido fórmico); de 0-28 min iniciando a (95:5) até (0:100); 28-31 min (0:100); e de 31-35 min (95:5). O fluxo da fase móvel foi de 0,6 mL.min⁻¹ e os compostos foram monitorados em λ =313 e 280 nm. Os parâmetros de operação utilizados na fonte Z-spray foram: voltagem do capilar = 3,20 kV, voltagem do cone = 40 V, temperatura da fonte Z-spray= 150 °C, temperatura do gás de dessolvatação = 350 °C, fluxo do gás de dessolvatação = 8000 L.h⁻¹. A faixa de massas usada no modo de análise full-scan foi de 100 a 600 Da. As análises foram realizadas no Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto (FFCLRP-USP) sob a supervisão do Dr. Eduardo J. Crevelin.

6.9 Isolamento dos alcaloides fluorados análogos de *T. catharinensis* A. DC.

As análises em CLAE preparativo foram realizadas utilizando o cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu, acoplado a bombas de modelo LC-6AD Shimadzu, com controlador de sistema CBM-20A Shimadzu, degaseificador DGU-20A, detector de

arranjo de diodos UV/VIS SPD-M20A Shimadzu, injetor automático SIL-10AF Shimadzu e software Class VP. Para o isolamento dos alcaloides naturais e possíveis análogos fluorados foi utilizada a mesma coluna analítica e a mesma condição cromatográfica descritas no item 6.8. O extratos brutos oriundos dos experimentos de BDP e seus respectivos controles foram solubilizado em metanol (20 mg de extrato/mL) e o volume de 20 μ L foi injetado contendo cerca de 2 mg de extrato por injeção, fluxo de 1,0 mL.min⁻¹ e a detecção em $\lambda=313$ e 280 nm. As análises em CLAE preparativo do extrato bruto oriundo do experimento de BDP com raízes adventícias (BDPTC: 66 mg) resultou no isolamento de 9 picos: BDPTC0 (3 mg) , BDPTC1 (0,5 mg), BDPTC2 (0,3 mg), BDPTC3 (0,3 mg), BDPTC4 (0,4 mg), BDPTC5 (0,5 mg), BDPTC6 (0,4 mg), BDPTC7 (0,4 mg), BDPTC8 (0,2 mg) , BDPTC9 (0,3 mg). Os extratos brutos oriundos dos experimentos de BDP em plântulas da parte aérea (TCFA: 115 mg) e seu respectivo controle (TCA: 17 mg), bem como das raízes (TCR: 16 mg) e seu respectivo controle (TCFR: 27 mg), foram fracionados primeiramente em CCD preparativa utilizando cromatoplasacas de silicagel 60 (20x20cm) e fase móvel diclorometano:metanol (85:15) e separados em duas frações para cada extrato; TCA1 (3,8 mg) e TCA2 (6,7 mg); TCFA1 (19,6 mg) e TCFA2 (18,1 mg); TCR1 (3,2 mg) e TCR2 (3,1 mg); TCFR1 (3,5 mg) e TCFR2 (4,6 mg). Após a CCD preparativa as amostras foram injetadas na mesma coluna analítica e a mesma condição cromatográfica descritas no item 6.8. Os extratos da parte área (TCFA1 e TCFA2) foram re-submetidos a CLAE preparativa resultando em 8 picos: TCAF1-0 (0,5 mg), TCAF1-1 (0,4 mg), TCAF1-2 (0,3 mg), TCAF1-3 (0,3 mg), TCAF1-4A (0,5 mg), TCAF1-4B (0,5 mg), TCAF2-0 (0,2 mg); TCAF2-1 (0,3 mg). A identificação das substâncias foram realizadas por RMN 1D e 2D no IQ-UNESP-Araraquara-SP utilizando Espectrômetro Bruker Avance III 600MHz e utilizando o solvente MeOD e CDCl₃ como solvente de referência.

7. RESULTADOS

7.1 Indução de callus a partir de raízes de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC.

O meio testado mais eficiente na indução de callus a partir de raízes adventícias de *T. catharinensis* foi MS + 30g.L⁻¹ de sacarose + 2,0mg.L⁻¹ de 2,4D + 0,2mg.L⁻¹ de cinetina (Figura 12), onde os callus se desenvolveram com cerca de 1 mês após incubação, porém novos estudos em relação a manutenção e crescimento dos mesmos são necessários já que apresentaram resistência no desenvolvimento.

Figura 12. Callus de raízes adventícias de *T. catharinensis* A. DC.



7.2 Avaliação da rota biossintética envolvida na formação dos alcaloides indólicos de *T. catharinensis* A. DC.

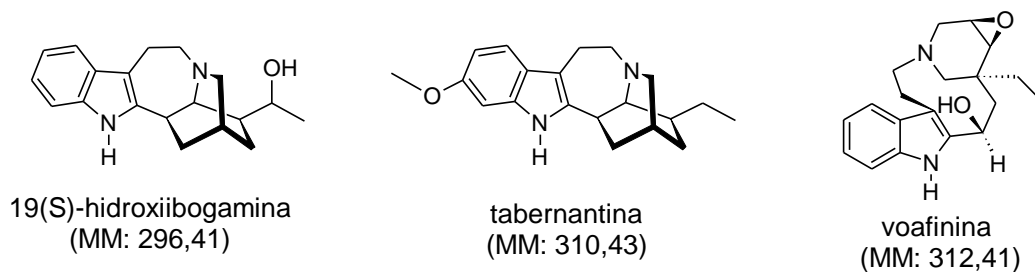
Após a obtenção dos extratos brutos oriundos dos experimentos de marcação isotópica (Figura 13), estes foram submetidos as análises em CLUE-MS/QTOF em alta resolução e mostraram que os precursores 2-¹³C-triptofano, 3-¹³C-piruvato, 1-¹³C-

gliceraldeído e 2-¹³C-acetato de sódio foram incorporados na biossíntese dos alcaloides do tipo-iboga. Observou-se incorporação tanto na parte aérea bem como nas raízes das plântulas (Tabelas 1-4). Os alcaloides do tipo-iboga 19(S)-hidroxibogamina (MM: 296); tabernantina (MM: 310); voafinina (MM: 312); hidroxindolenina voacangina ou rupicolina (MM: 384); 3-oxo-coronaridina (MM: 352); voachalotina (MM: 366); voacangina (MM: 368) e 12-metoxi-4-metilvoachalotina (MM: 410) foram marcados com todos os ¹³C-precusores incubados (Figura 14).

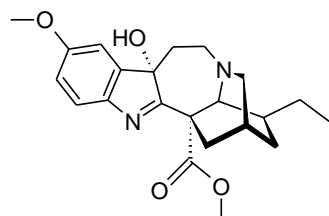
Figura 13. Experimento de marcação isotópica utilizando plântulas de *T. catharinensis* A. DC.



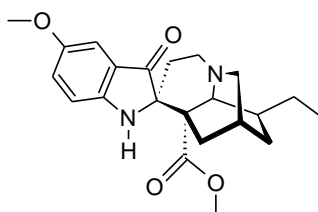
Figura 14. Alcaloides observados em CLUE-MS/QTOF alta resolução após experimentos de marcação isotópica.



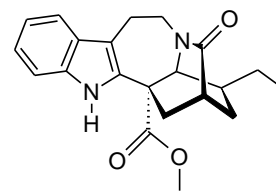
Continuação da Figura 14.



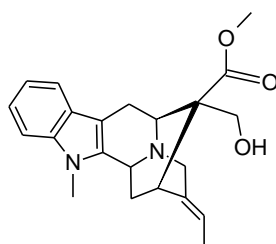
hidroxiindolenina
voacangina (MM: 384,47)



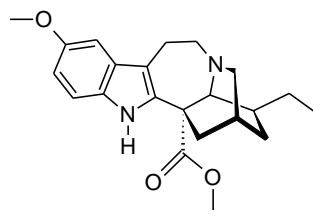
rupicolina
(MM: 384,47)



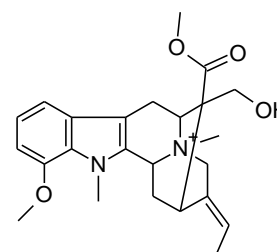
3-oxo-coronaridina
(MM: 352,43)



voacholatina
(MM: 366,45)



voacangina
(MM: 368,47)



12-metoxi-n-metil-voacholatina
(MM: 411,51)

Durante a incorporação, a cada ^{13}C adicionado, esperava-se um M+1 adicionado. Assim, para o 2- ^{13}C -triptofano é esperado M+1; para o 3- ^{13}C -piruvato e o 1- ^{13}C -gliceraldeído é esperado o M+2; e para o 2- ^{13}C -acetato de sódio é esperado o M+6 (Figura 15). O cálculo foi baseado na razão entre o íon molecular (M) e seus isótopos M+1, M+2 e M+3. Nas figuras 28-30 em anexo se encontram cromatogramas de massa em alta resolução, os quais exemplificam como os valores que foram selecionados para compor as tabelas 1-4. Os valores das tabelas representam a razão entre a intensidade de um íon molecular e seu correspondente isótopo (M+1, M+2 ou M+3), tanto na amostra controle quanto na amostra após a incorporação com ^{13}C -precursor. Por exemplo, o cálculo para o íon m/z 311 é feita entre a razão de seu íon molecular e seus correspondentes isótopos M+1 (m/z 312) e M+2 (m/z 313) na amostra controle, e compara-se com o mesmo cálculo do íon m/z 311 após a incorporação com ^{13}C -precursor. Quanto menor o valor da razão (menor diferença entre o M e seu isótopo correspondente M+1, M+2 ou M+3), maior é o enriquecimento de ^{13}C , confirmando-se assim a incorporação do precursor marcado com ^{13}C .

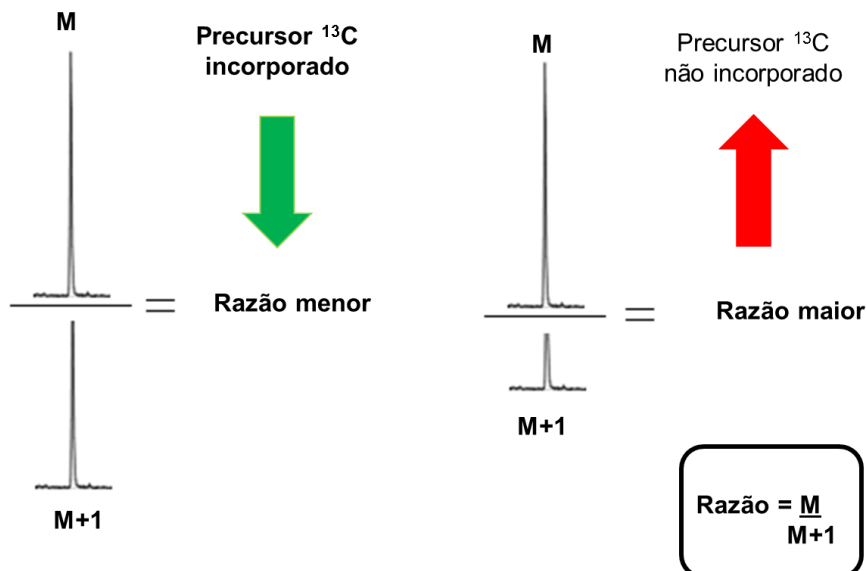


Tabela 1. Análise estatística dos experimentos de marcação isotópica utilizando 2-¹³C-triptofano e 3-¹³C-piruvato de sódio na parte aérea das plântulas de *T. catharinensis* A. DC.

<i>m/z</i>		TR	PY	C	CV (%)
313	M+1	3.07a	4.47b	4.65c	0.6
	M+2		36.01b	39.54c	1.13
353	M+1	2.74a	3.78b	4.19c	0.82
	M+2		17.95b	19.44c	4.06
367	M+1	2.87a	3.75b	4.07c	0.78
	M+2		23.60b	26.73c	2.02
369	M+1	3.35a	3.75b	4.14c	3.75
	M+2		25.13b	29.92c	1.79
411	M+1	3.37a	3.45b	3.82c	0.35
	M+2		20.94b	25.38c	1.21

(*m/z*: massa molecular do composto, M+1: composto marcado em 1 posição, M+2: composto marcado em 2 posições TR: 2-¹³C-triptofano, PY: 3-¹³C-piruvato de sódio, C: controle, CV: coeficiente de variação). Teste Scott-Knott (1974) $n=0,05$.

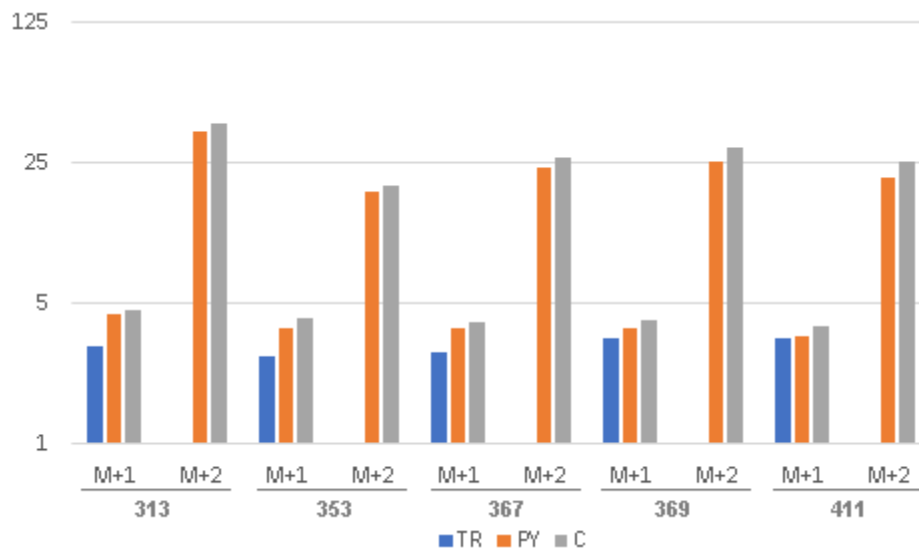


Tabela 2. Análise estatística dos experimentos de marcação isotópica utilizando 2-¹³C-triptofano e 3-¹³C-piruvato de sódio nas raízes de *T. catharinensis* A. DC.

<i>m/z</i>		TR	PY	C	CV (%)
297	M+1	3.93a	4.41b	4.59c	0.43
	M+2		37.85b	41.74c	1.36
311	M+1	3.74a	4.40b	4.45b	4.2
	M+2		37.39b	37.72b	2.35
313	M+1	3.94a	4.52b	4.65c	0.8
	M+2		36.32b	39.70c	2.48
313	M+1	3.94a	4.51b	4.67c	1.4
	M+2		34.83b	39.18c	2.37
385	M+1	3.42a	4.12b	4.17b	1
	M+2		25.46b	25.79b	4.64

(*m/z*: massa molecular do composto, M+1:composto marcado em 1 posição, M+2: composto marcado em 2 posições TR: 2-¹³C-triptofano, PY: 3-¹³C-piruvato de sódio, C: controle, CV: coeficiente de variação). Teste Scott-Knott (1974) $n=0,05$.

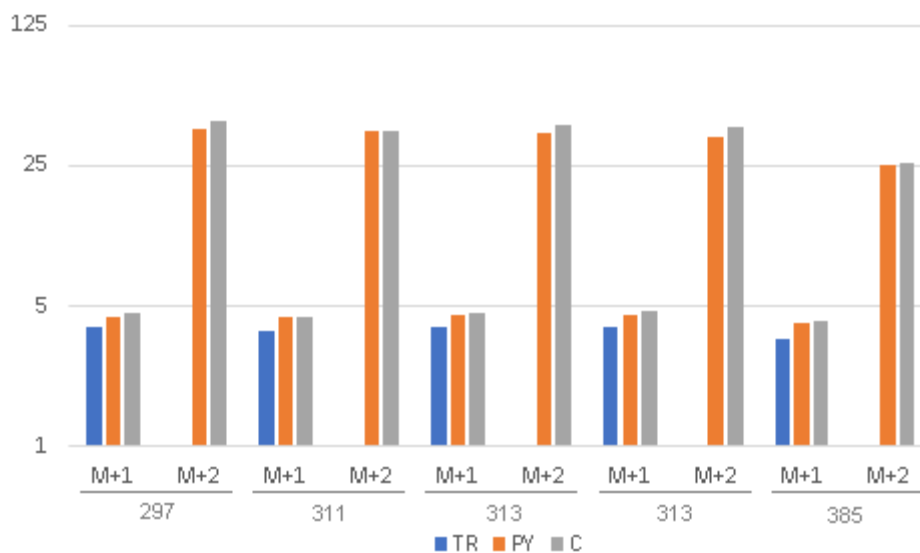


Tabela 3. Análise estatística dos experimentos de marcação isotópica utilizando $1\text{-}^{13}\text{C}$ -gliceraldeído e $2\text{-}^{13}\text{C}$ -acetato na parte aérea das plântulas de *T. catharinensis* A. DC.

<i>m/z</i>		GLI	ACT	C	CV (%)
313	M+1	3.48a	3.98b	4.24c	0.6
	M+2	15.76a	26.2b	32.73c	2.33
	M+3		248.41b	364.93c	3.63
313	M+1	3.22a	3.77b	4.47c	3.82
	M+2	12.34a	22.03b	34.51c	0.9
	M+3		184.23b	383.29c	5.28
385	M+1	3.75a	3.96b	4.06c	0.62
	M+2	22.31a	24.93b	25.19b	0.91
	M+3		181.42b	198.66b	5.75
297	M+1	3.20a	3.75b	4.48c	3.81
	M+2	12.72a	22.05b	33.58c	1.55
	M+3		187.93b	450.07c	3.98
385	M+1	3.74a	3.79b	3.84c	0.57
	M+2	17.6a	18.54b	21.39c	1.89
	M+3		194.15b	200.91b	3.34
311	M+1	4.15a	4.18a	4.19a	0.52
	M+2	27.67a	29.15b	32.07c	1.23
	M+3		321.91b	377.87c	1.92
265	M+1	2.54a	3.38b	4.44c	0.27
	M+2	7.92a	19.66b	37.33c	0.62
	M+3		80.52b	276.54c	3.19

(m/z : massa molecular do composto, M+1: composto marcado em 1 posição, M+2: composto marcado em 2 posições, M+3: composto marcado em 3 posições, GLI: 1- ^{13}C -gliceraldeído, ACT: 2- ^{13}C -acetato de sódio, C: controle, CV: coeficiente de variação).
 Teste Scott-Knott (1974) $n=0,05$.

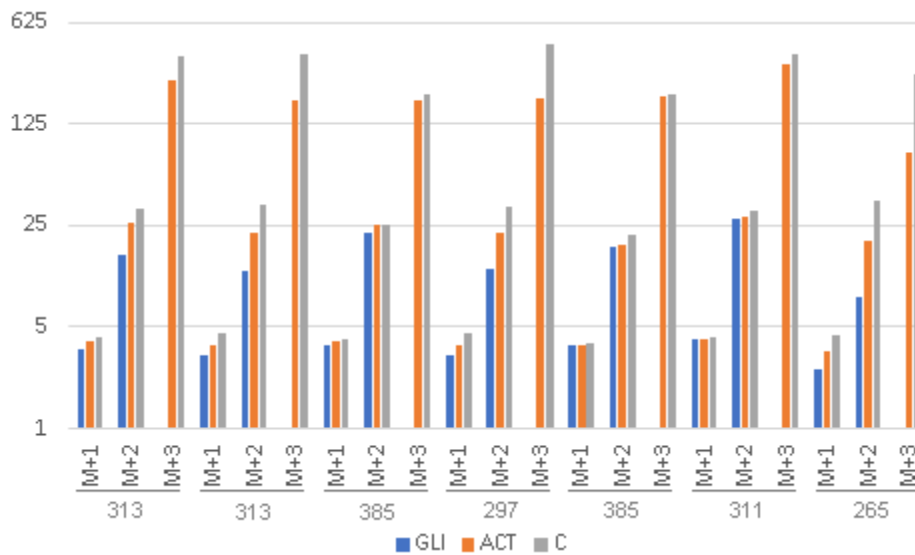


Tabela 4. Análise estatística dos experimentos de marcação isotópica utilizando 1-¹³C-gliceraldeído e 2-¹³C-acetato nas raízes de *T. catharinensis* A. DC.

<i>m/z</i>		GLI	ACT	C	CV (%)
313	M+1	4.11a	4.39b	4.55c	0.28
	M+2	22.58a	32.54b	35.85c	0.89
	M+3		351.87b	441.71c	3.5
313	M+1	3.04a	4.25b	4.30c	0.29
	M+2	8.37a	28.14b	29.03c	1.68
	M+3		264.59b	310.25c	5.2
353	M+1	3.77a	3.82b	3.91c	0.31
	M+2	15.57a	17.60b	19.84c	1.06
	M+3	61.93a	110.45b	133.98c	2.43
411	M+1	3.01a	3.06a	3.53b	0.88
	M+2	19.40a	19.87b	23.06c	0.87
	M+3		123.06b	150.75c	2.2

(*m/z*: massa molecular do composto, M+1:composto marcado em 1 posição, M+2: composto marcado em 2 posições, M+3: composto marcado em 3 posições, GLI: 1-¹³C-gliceraldeído, ACT: 2-¹³C-acetato de sódio, C: controle, CV: coeficiente de variação). Teste Scott-Knott (1974) n=0,05.

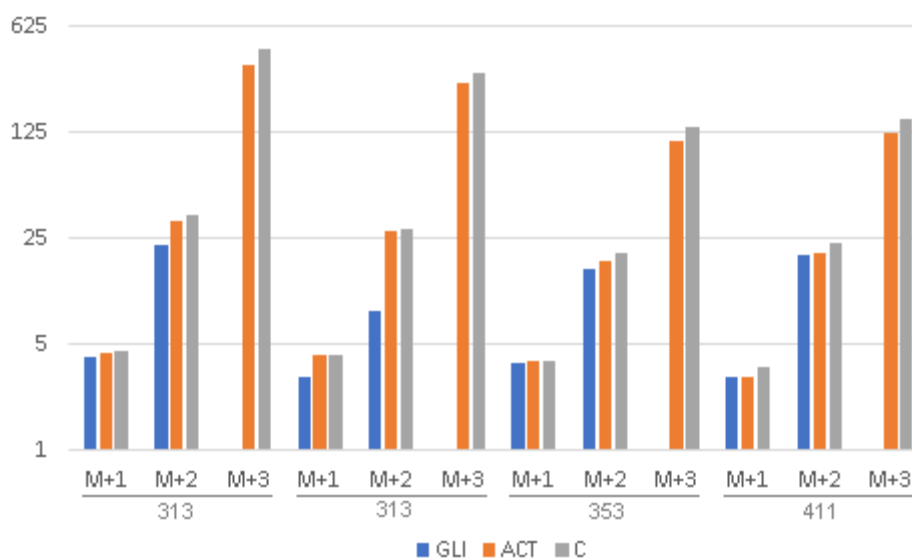
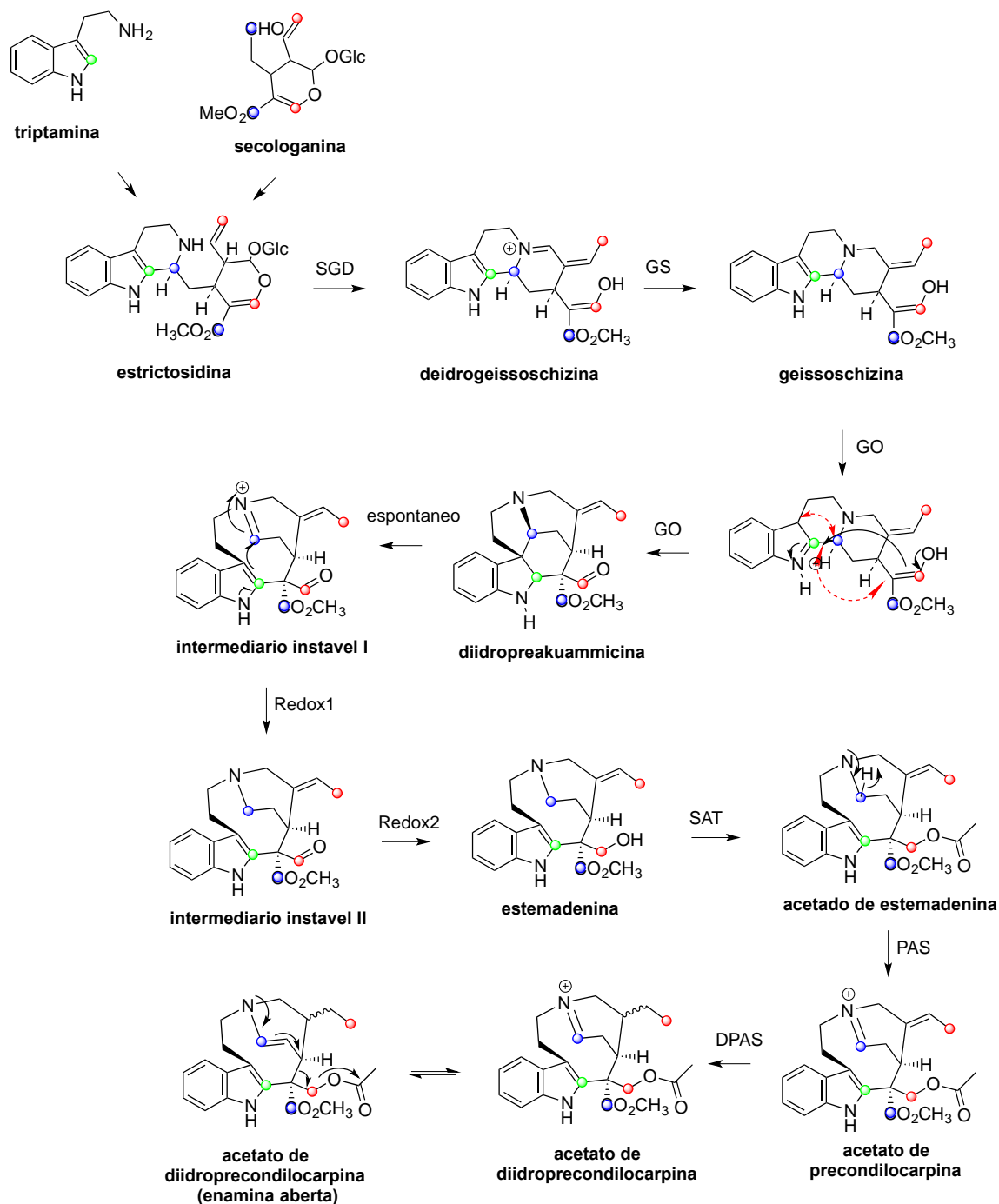
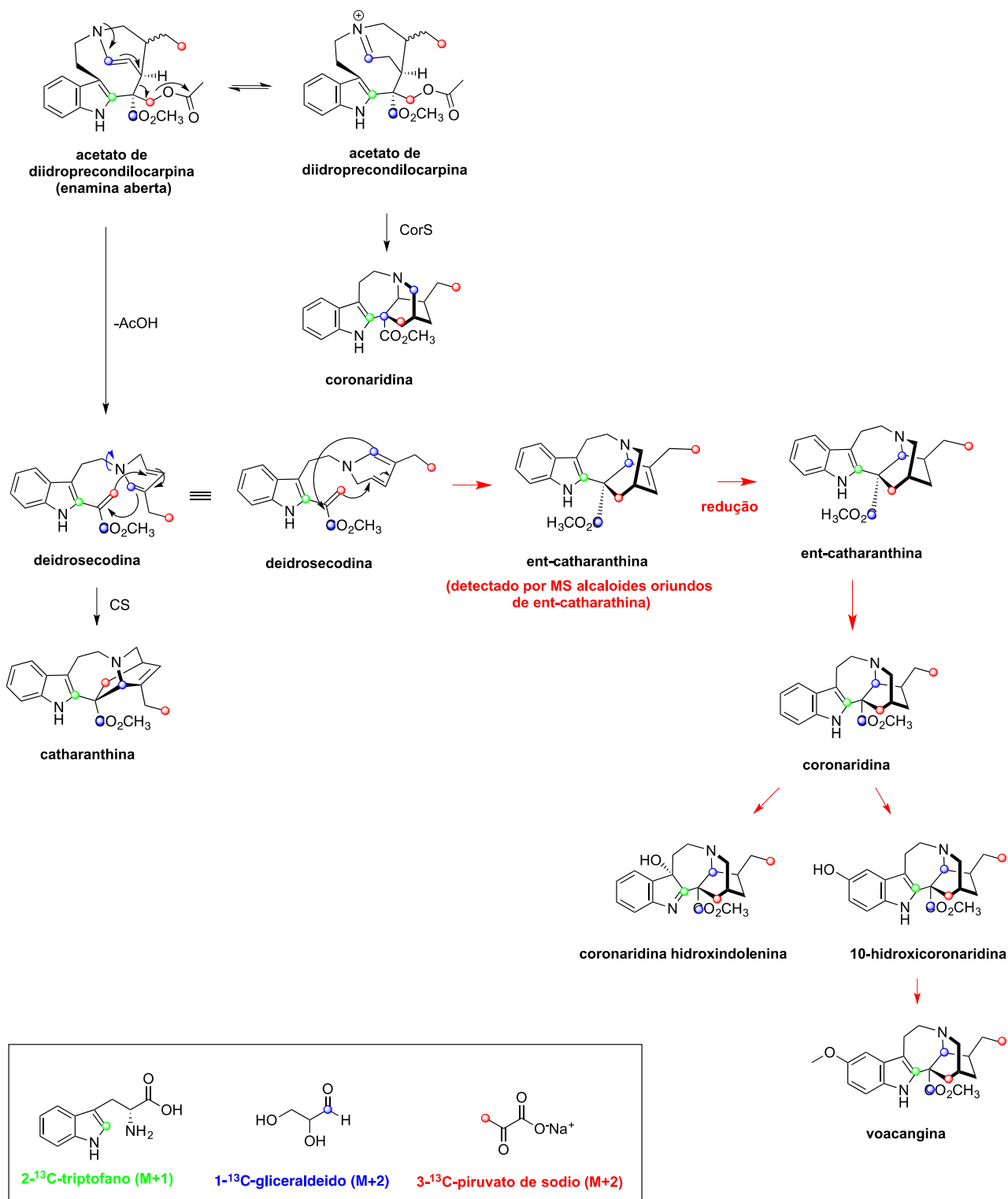


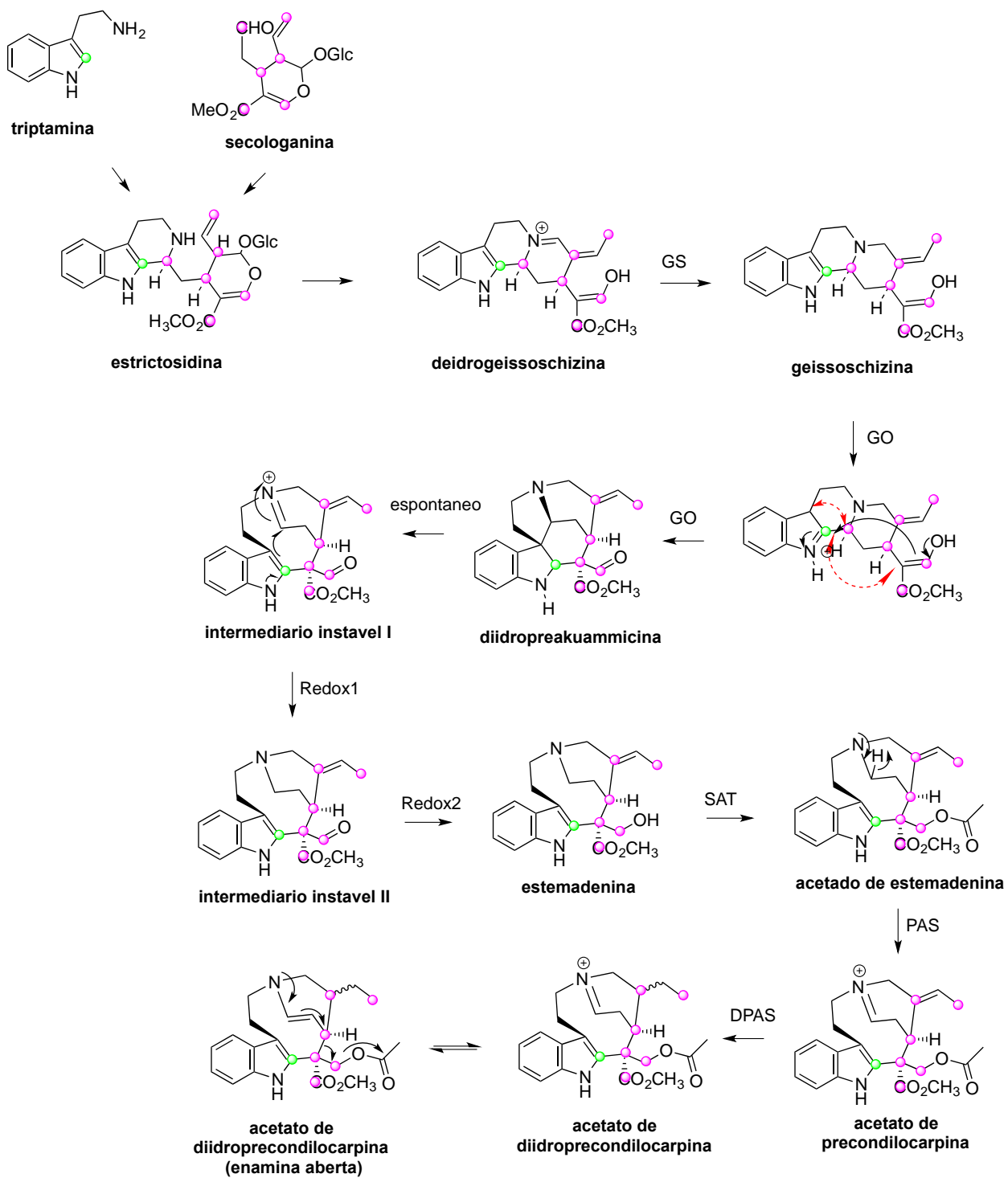
Figura 15. Biossíntese de voacangina e 3-oxo-coronaridina após incorporação com 2-¹³C-triptofano, 3-¹³C-piruvato, 1-¹³C-gliceraldeído e 2-¹³C-acetato de sódio em *T. catharinensis* A. DC.



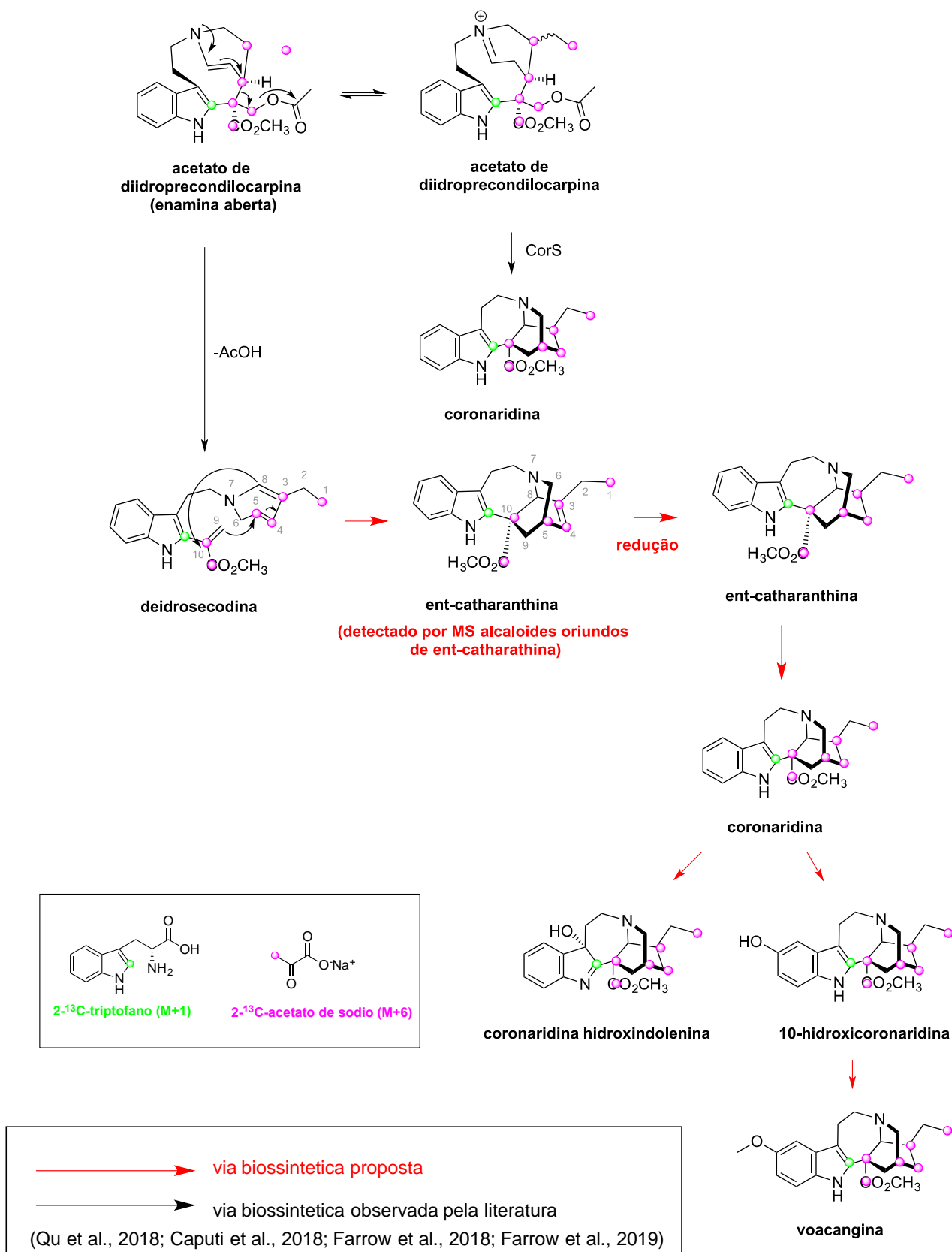
Continuação da Figura 15.



Continuação da Figura 15.



Continuação da Figura 15.



A planta *T. catharinensis* A. DC. é uma Apocinaceae e pertence a mesma família de *Catharanthus roseus* cuja biossíntese de vimblastina é oriunda de chiquimato (triptofano) e exclusivamente do MEP (secologanina) (DEWICK, P. M. 2009). A biossíntese ocorre por meio da condensação de triptamina e secolocanina, levando a formação do principal intermediário dos alcaloides; a strictosidina. Nos dados obtidos para *T. catharinensis* observou-se uma biossíntese mista para formação de secologanina, que é oriunda de MVA e MEP concomitantemente (Figura 15). Não há na literatura estudos de marcação isotópica utilizando ^{13}C na investigação das vias operantes dos alcaloides do tipo-iboga. Sendo assim, estes resultados são os primeiros dados relatados e além disso para análise da incorporação foi utilizada a técnica de espectrometria de massas em alta resolução, uma abordagem recente, uma vez que a maioria dos experimentos de marcação isotópica são analisados por ressonância magnética nuclear de ^{13}C . Infelizmente utilizando a técnica de espectrometria de massas, não é possível identificar em que posição ocorreu a incorporação de ^{13}C , porém é possível verificar de maneira inequívoca, e em curto espaço de tempo, se o precursor incubado pertence a rota biossintética investigada.

Como mencionado na introdução, as enzimas e etapas biossintéticas dos alcaloides do tipo-iboga de *Tabernanthe iboga* vem sendo elucidada por técnicas moleculares (QU et al., 2018, FARROW et al., 2018 e 2019). Recentemente foi verificado que o alcaloide coronaridina foi formado a partir de acetato de precondilocarpina por meio da ação enzimática de CorS. Esta enzima é homologa à CS (71,9% de homologia com Catharanthina sintase), e que catalisa reações de ciclização de Diels-Alder (CAPUTI et al., 2018). Neste trabalho estamos propondo um mecanismo adicional a partir de deidrosecundina, cuja a reação leva à ent-catharanthina. Este mecanismo foi proposto uma vez que foram detectados alguns análogos fluorados derivados diretamente de ent-catharanthina, ou seja, cuja a estrutura química não é reduzida. Em conjunto com o grupo da prof. Sarah O'Connor (Max Planck Institute Chemical Ecology) um trabalho de transcriptoma está em andamento a fim de se comparar se os genes de *T. catharinensis* (que codificam as enzimas presentes) são similares ou distintos de *T. iboga*.

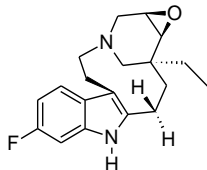
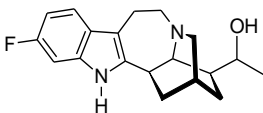
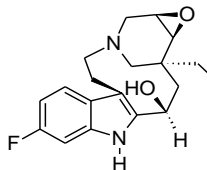
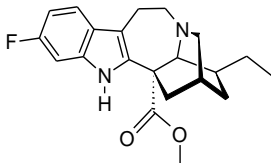
7.3 Experimentos de biossíntese dirigida pelo precursor em raízes adventícias de *T. catharinensis* A. DC.

É importante ressaltar que durante os experimentos de BDP as raízes adventícias se desenvolveram normalmente, sem nenhuma mudança fisiológica visível, mostrando que o precursor 6-fluor-triptamina não foi um precursor tóxico para o vegetal. Após o período de incubação foi preparado um extrato metanólico das raízes adventícias de *T. catharinensis* A. DC., e este extrato foi submetido à análise por CLUE-DAD-MS. As extrações dos íons correspondentes aos novos alcaloides fluorados, cujas massas moleculares coincidem com as massas moleculares de alcaloides análogos fluorados de *T. catharinensis* A.DC., mostraram a formação de 3 possíveis alcaloides análogos fluorados (Tabela 5).

Figura 16. Raízes adventícias de *T. catharinensis*.



Tabela 5. Possíveis alcaloides fluorados produzidos em raízes adventícias de *T. catharinensis* A.DC.

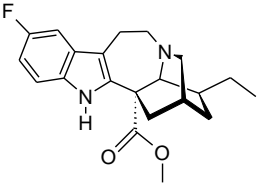
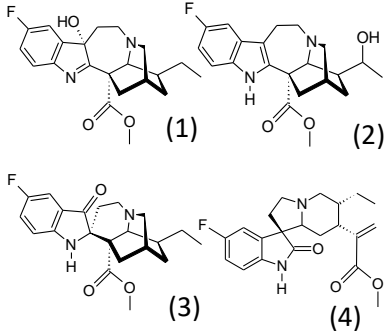
nome	m/z	estrutura química	cromatograma (anexo)
voafilina fluorada	314		Figura 32
19(S)-hidroxiibogamina fluorada	314		Figura 32
voafinina fluorada	330		Figura 34
coronaridina fluorada	356		Figura 36

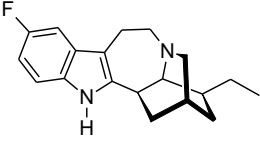
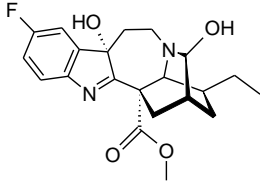
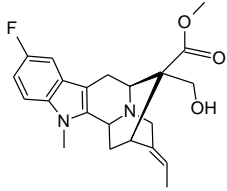
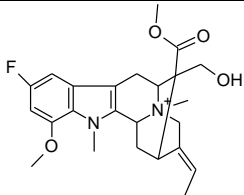
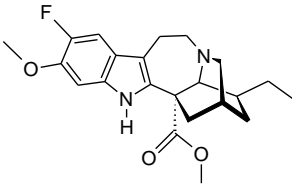
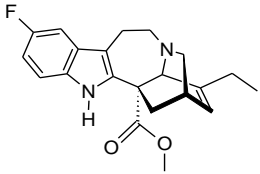
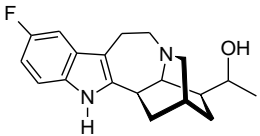
7.4 Experimentos de biossíntese dirigida pelo precursor em plântulas de *T. catharinensis* A. DC.

Após a o experimento com a suplementação de 5-flúor-triptamina no meio de cultura de plântulas de *T. catharinensis* A. DC. as mesmas foram divididas em parte aérea e raízes, sendo assim analisadas separadamente. É importante ressaltar que as plântulas se desenvolveram normalmente, sem nenhuma mudança fisiológica visível, mostrando que o precursor 5-fluor-triptamina não foi um precursor tóxico para o vegetal.

Estudos de BDP anteriores realizados com a espécie *Uncaria guianensis* mostrou que houve produção de análogos dos alcaloides oxindólicos fluorados quando utilizou-se o precursor na concentração de 1 mM (LOPES et al., 2019). Estudos utilizando a espécie *Uncaria tomentosa* mostrou que o precursor fluorado na concentração de 5 e 10 mM são tóxicos ao vegetal (*dados ainda não publicados*). Sendo assim, optou-se por realizar os experimentos de BDP em *T. catharinensis* A. DC. com o precursor 5-fluor-triptamina na concentração de 3 mM. Um aumento na concentração do precursor pode aumentar sua biodisponibilidade, e dessa forma aumentar a probabilidade da biossíntese dos análogos fluorados em maior concentração. Após o período de incubação, foi preparado um extrato metanólico das partes aéreas e raízes, e estes extratos foram submetido à análise por CLUE-DAD-MS. Na parte aérea foi possível observar a formação de 9 possíveis novos alcaloides do tipo-iboga os quais coincidem com a massa molecular de alcaloides análogos fluorados de *T. catharinensis* A.DC. (Tabela 6).

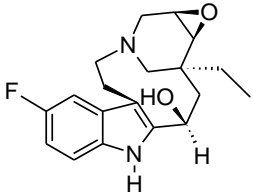
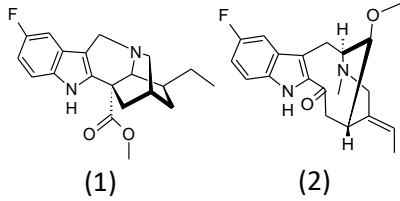
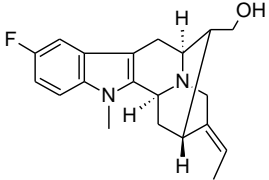
Tabela 6. Possíveis alcaloides fluorados na parte aéreas das plântulas de *T. catharinensis* A.DC.

nome	m/z	estrutura química	cromatograma (anexo)
coronaridina fluorada	356		Figura 41
hidroxiindolenina coronaridina fluorada (1) heyneanina fluorada (2) pseudoindoxil coronaridina fluorada (3) catarinensina fluorada (4)	372		Figura 44

ibogamina fluorada	298		Figura 48
hidroxindolenina 3-hidroxicoronaridina fluorada	388		Figura 51
voacholatina fluorada	384		Figura 55
12-metoxi-n-metil-voachalotina fluorada	429		Figura 57
isovoacangina fluorada	386		Figura 63
catarantina fluorada	354		Figura 67
19(S)-hidroxibogamina fluorada	314		Figura 69

Além disso foram encontrados outros 3 possíveis novos compostos localizados apenas nas raízes (Tabela 7).

Tabela 7. Possíveis alcaloides fluorados encontrados somente nas raízes provenientes de plântulas de *T. catharinensis* A.DC.

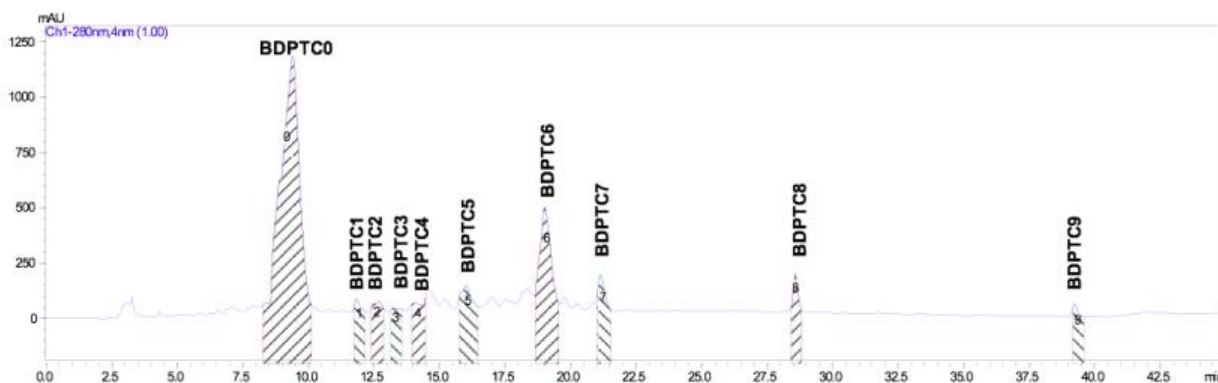
nome	m/z	estrutura química	cromatograma (anexo)
voafinina fluorada	330		Figura 59
tubotaiwina fluorada (1) 16-epi-affinina fluorada (2)	342		Figura 61
afinisina fluorada	326		Figura 71

7.5 Isolamento dos alcaloides fluorados análogos de *T. catharinensis* A. DC.

7.5.1. Isolamento dos alcaloides fluorados análogos em raízes adventícias de *T. catharinensis* A. DC.

Após a obtenção dos dados de CLUE-DAD-MS que indicaram a biossíntese de novos alcaloides do tipo-iboga fluorados, iniciou-se um fracionamento cromatográfico do extrato das raízes adventícias (BDPT). Para tanto, o extrato BDPT foi diretamente fracionado em CLAE preparativo levando ao isolamento de 9 picos: BDPTC0, BDPTC1, BDPTC2, BDPTC3, BDPTC4, BDPTC5, BDPTC6, BDPTC7, BDPTC8, BDPTC9 (Figura 17). Após isolamento, estes picos foram submetidos à experimento de RMN de ^1H .

Figura 17. Fracionamento do extrato bruto oriundo dos experimentos de BDP das raízes adventícias (BDPTC).



Apenas as amostras BDPTC0 e BDPTC5 apresentaram espectros com boa resolução espectral. Inicialmente esperava-se que a amostra BDPTC0 seria o precursor 6-fluor-triptamina, pois foi isolado em maior quantidade quando comparado a massa obtida das demais amostras (item 6.9). Em uma simulação do espectro de RMN de ^1H da 6-fluor-triptamina utilizando o programa ChemDraw Professional 15.0.106 é possível notar os sinais característicos na região de hidrogênios aromáticos em δH 7,58 m e δH 6,89 dd, além dos hidrogênios metilênicos em δH 2,71 t e 2,92 t (Figura 18). Observa-se uma sobreposição de sinais referentes ao hidrogênio aromático em δH 7,58 m e o sinal em

δ H 7,47 m que é referente a ligação dupla presente no núcleo indol. O espectro de RMN de 1 H da amostra BDPTC0 mostrou sinais característicos na região de hidrogênios aromáticos; δ H 7,32 dd (J= 9,0; 5,0 Hz); 7,24 ddd (J= 11,6; 9,8 e 2,5 Hz); e 6,89 ddd (J= 9,0; 2,5 Hz), cujos deslocamentos químicos são compatíveis com anel indólico fluorado do precursor 6-fluor-triptamina (BRANCO et al., 2015; LOPES et al., 2019). É importante ressaltar que ao integrar os grupos metilênicos da cadeia lateral observou-se uma diferença significativa no valor da integral dos sinais de hidrogênios aromáticos, o que pode indicar a presença de um análogo fluorado do tipo-iboga formado. Esta evidência pode ser confirmada pela presença de sinais na região δ H 3,0-4,0 que são referentes ao arcabouço terpenoídico oriundo de secologanina. Assim esta amostra encontra-se em mistura com o precursor 6-fluor-triptamina. Quando há a presença de um átomo de flúor na molécula, este átomo acopla com os hidrogênios vizinhos, assim as constantes de acoplamentos J H-F são importantes evidências na elucidação destas estruturas (BRANCO et al., 2015).

Figura 18. Espectro de RMN de 1 H da 6-fluor-triptamina simulado pelo programa ChemDraw Professional 15.0.106.

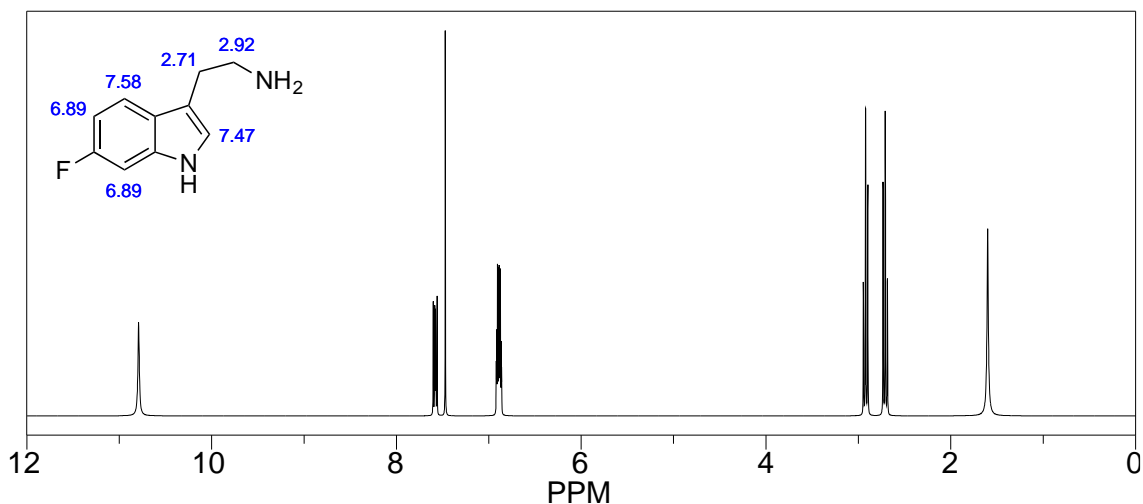


Figura 19. Espectro de RMN de ^1H da amostra BDPTC0 (600 MHz, MeOD).

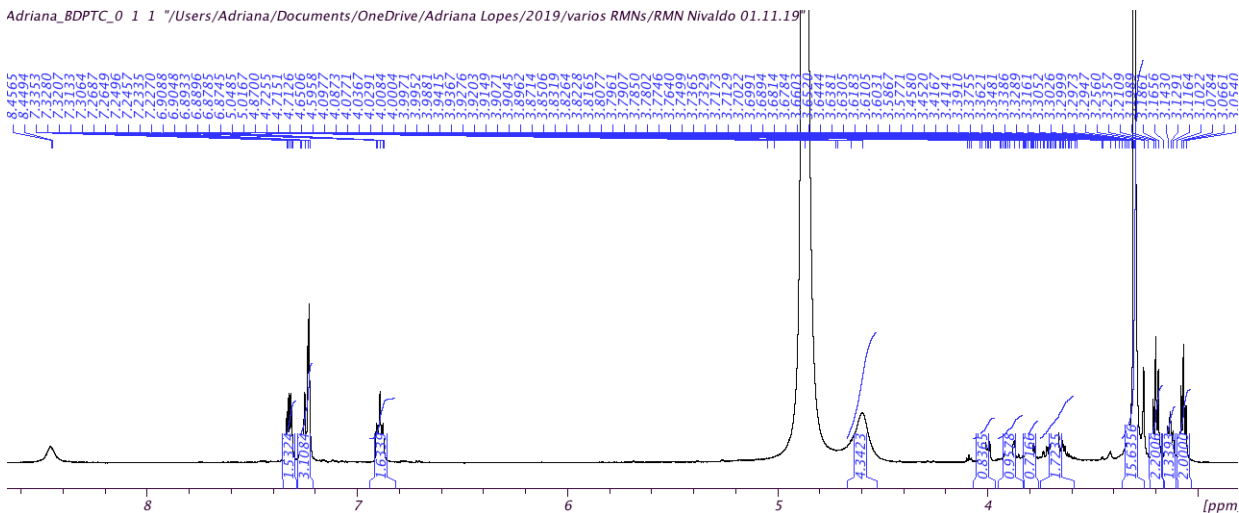


Figura 20. Ampliação dos sinais do espectro de RMN de ^1H da amostra BDPTC0 (600 MHz, MeOD).

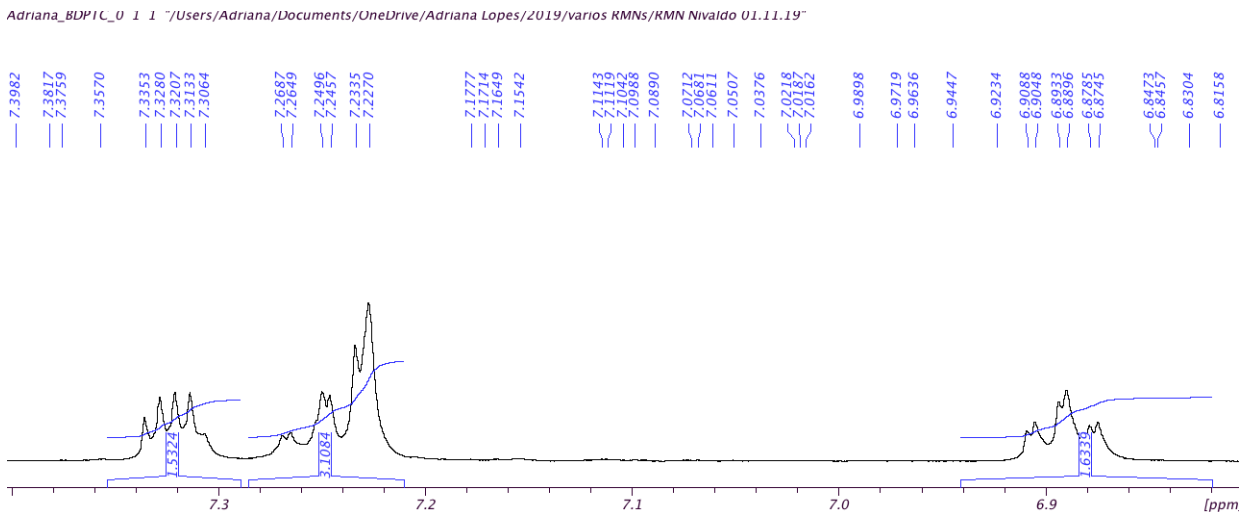


Figura 21. Ampliação dos sinais do espectro de RMN de ^1H da amostra BDPTC0 (600 MHz, MeOD).

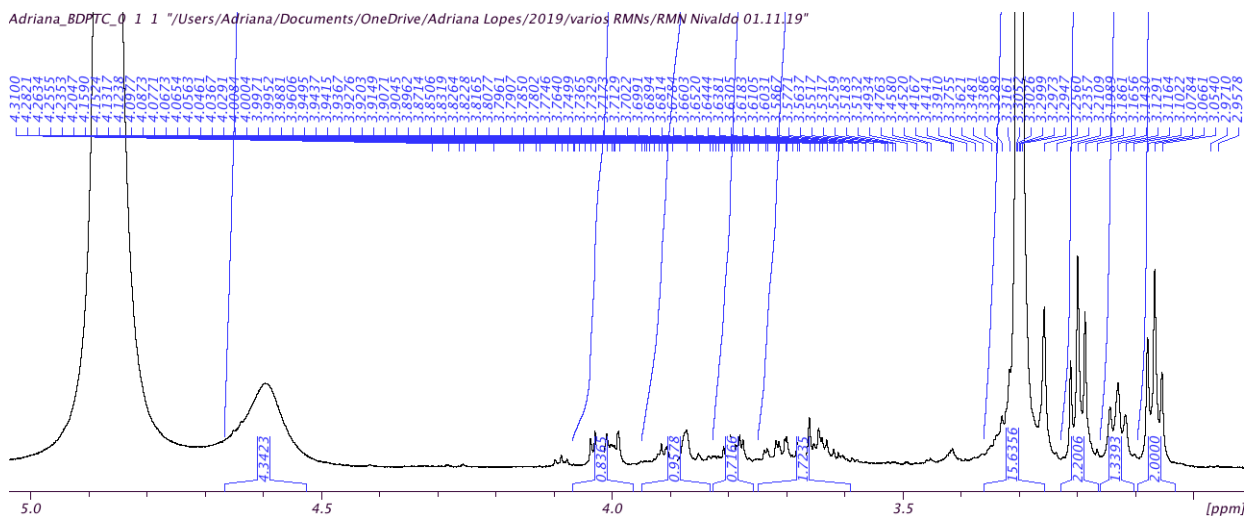
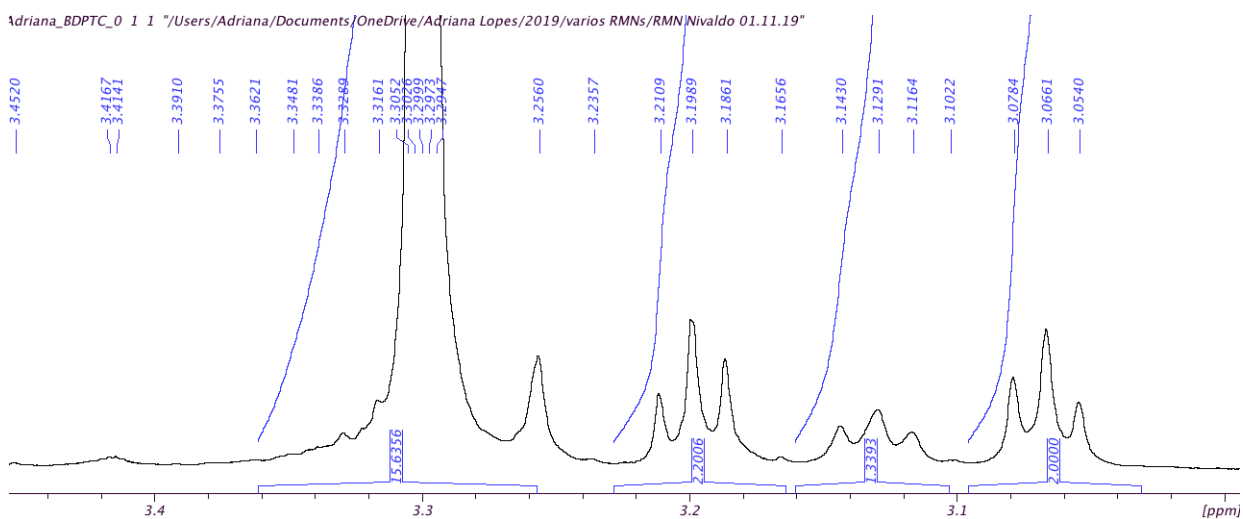


Figura 22. Ampliação dos sinais do espectro de RMN de ^1H da amostra BDPTC0 (600 MHz, MeOD).



O espectro de RMN de ^1H da amostra BDPTC5 mostrou sinais característicos na região de hidrogênios aromáticos; δH 7,27 dd ($J = 9,0; 4,7$ Hz; 1H); 7,18 dd ($J = 10,0; 2,4$

Hz; 1H) e 6,85 dd (J= 9,0; 2,4 Hz; 1H) correlacionados com seus respectivos carbonos pelos mapas de contorno gHMQC; δ_C 111,2 ppm, δ_C 102,1 ppm, δ_C 6,85 ppm (Figura 26). O espectro de RMN de ^1H (Figura 23) mostra que os sinais apresentam multiplicidade, o que é característico quando o composto apresenta flúor em sua estrutura química. O mapa de correlação gHMQC (Figura 26) indicou que a amostra BDPTC5 é um análogo fluorado dos alcaloides do tipo-iboga, uma vez que observou-se apenas 3 hidrogênios aromáticos que correlacionam com seus respectivos carbonos, indicando que a quarta posição no anel indol esta ocupada por um átomo de flúor. Não foi possível obter experimentos de gHMBC (Figura 27) com boa qualidade espectral, novos experimentos serão executados incluindo a obtenção de espectros de massas em alta resolução para a determinação estrutural.

Figura 23. Espectro de RMN de ^1H da amostra BDPTC5 (600 MHz, MeOD).

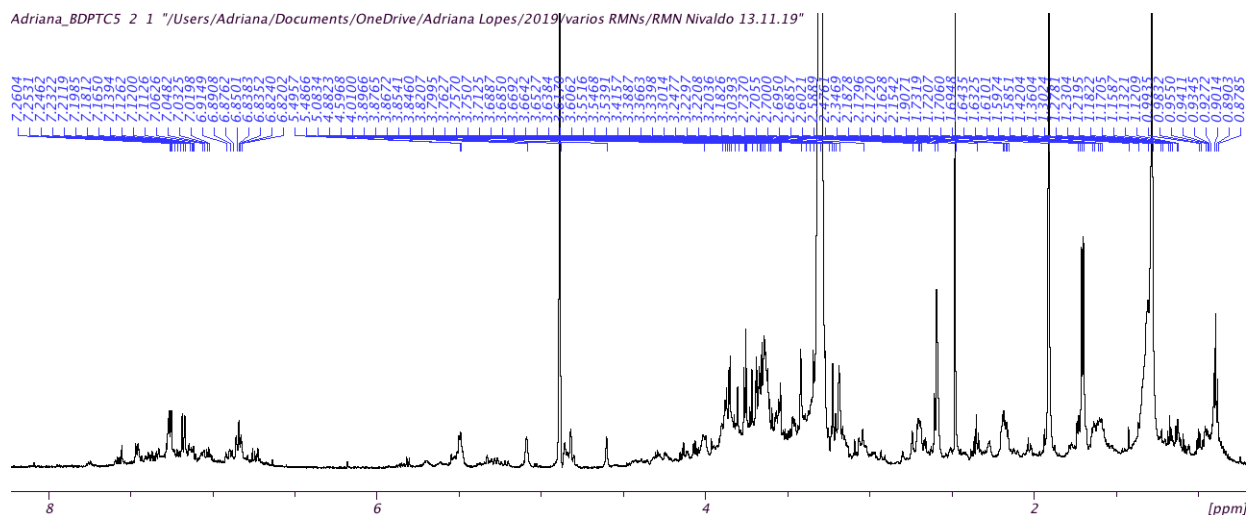


Figura 24. Ampliação dos sinais do espectro de RMN de ^1H da amostra BDPTC5 (600 MHz, MeOD).

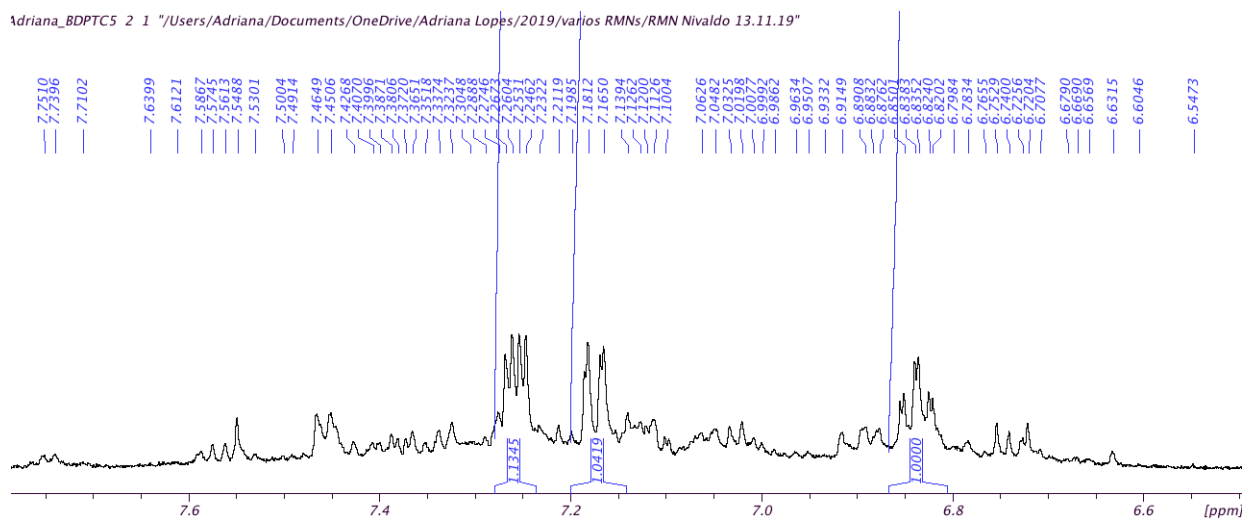


Figura 25. Ampliação dos sinais do espectro de RMN de ^1H da amostra BDPTC5 (600 MHz, MeOD).

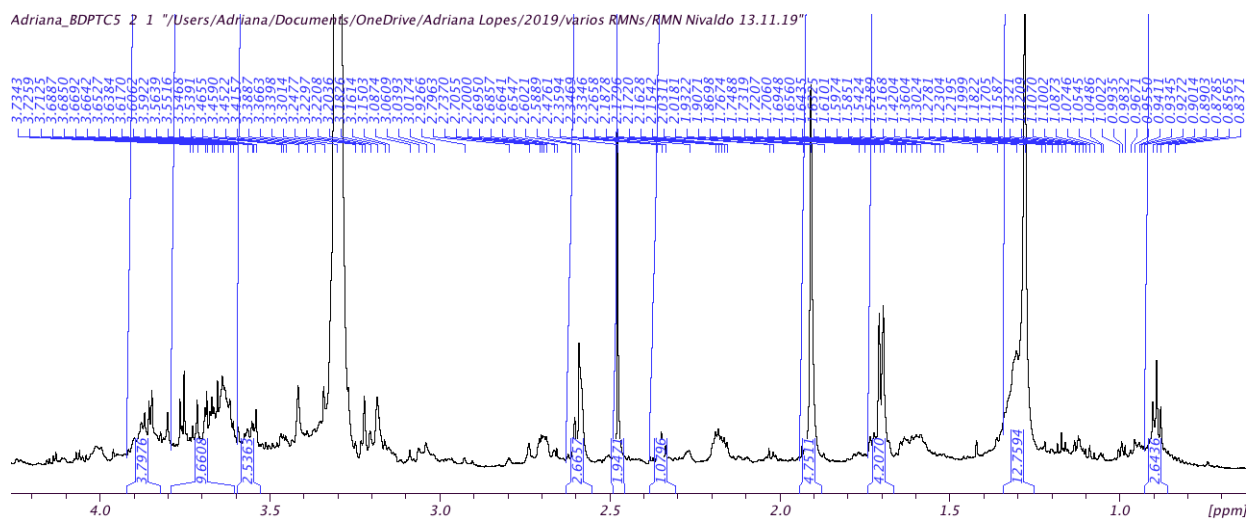


Figura 26. Mapa de contorno de gHMQC da amostra BDPTC5 (600 MHz, MeOD).

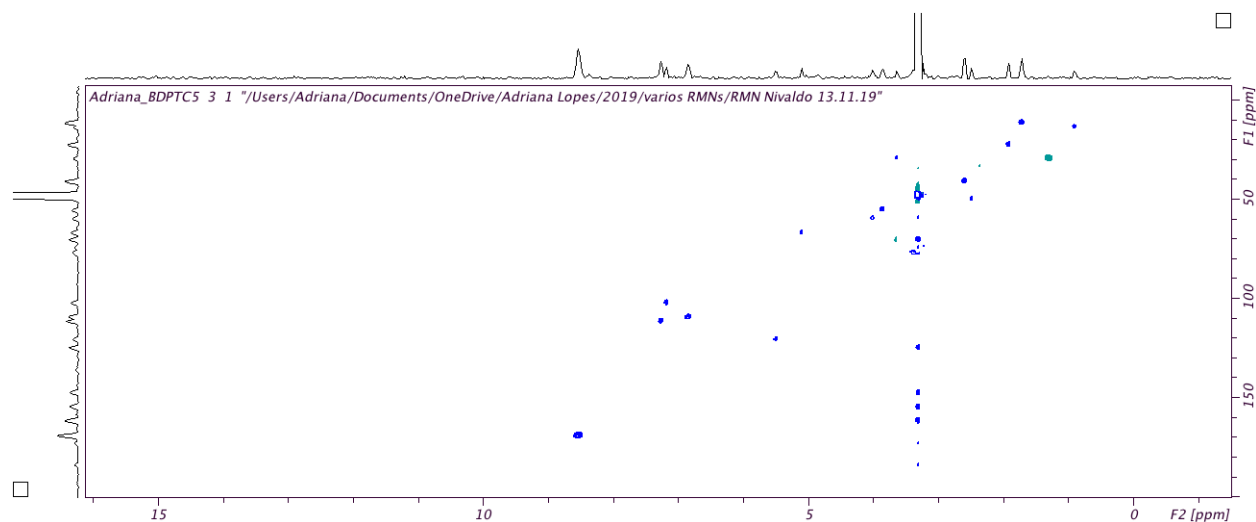
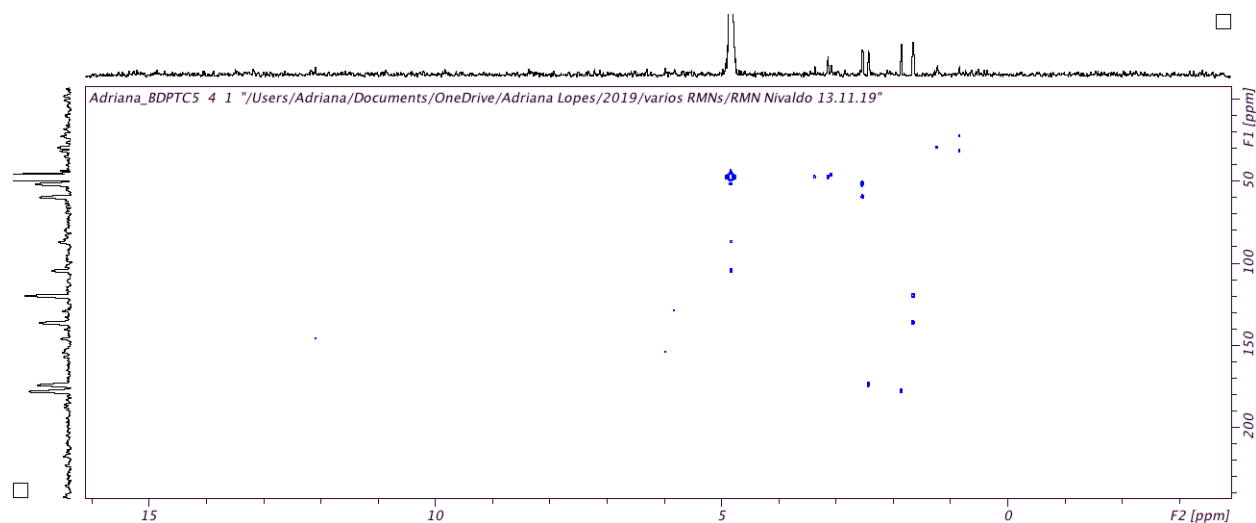


Figura 27. Mapa de contorno de gHMBC da amostra BDPTC5 (600 MHz, MeOD).



7.5.2. Isolamento dos alcaloides fluorados análogos em plântulas de *T. catharinensis* A. DC.

As amostras TCAF1-0 (0,5 mg), TCAF1-1 (0,4 mg), TCAF1-2 (0,3 mg), TCAF1-3 (0,3 mg), TCAF1-4A (0,5 mg), TCAF1-4B (0,5 mg), TCAF2-0 (0,2 mg); TCAF2-1 (0,3 mg) foram submetidas aos experimentos de RMN de ^1H e não apresentaram boa resolução espectral.

8. CONCLUSÕES

O experimento de biossíntese dirigida pelo precursor (BDP) conduzido em raízes adventícias de *T. catharinensis* A. DC. possibilitou a formação de três possíveis novos alcaloides fluorados não-naturais. No experimento de BDP realizado em plântulas foi detectado a formação de doze possíveis novos alcaloides não-naturais, sendo três deles encontrados somente nas raízes das plântulas. Após fracionamento cromatográfico dos extratos foi possível verificar a presença de dois possíveis análogos fluorados dos alcaloides do tipo-iboga. Em suma, a BDP é uma poderosa ferramenta de modificação molecular para a geração de novos alcaloides em *T. catharinensis* A. DC., as quais podem possuir uma atividade anticolinesterásica mais potente do que os próprios alcaloides do tipo-iboga naturais. Esta estratégia de modificação molecular desperta o interesse para pesquisas futuras, bem como o de indústrias farmacêuticas, uma vez que estas novas moléculas podem ser patenteáveis.

Neste trabalho confirmou-se a participação da via do chiquimato, e a via do mevalonato (MVA) e triose-piruvato (MEP) concomitantemente, na produção dos alcaloides tipo-iboga em *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. uma vez que houve a incorporação de todos os precursores marcados ($2\text{-}^{13}\text{C}$ -triptofano, $3\text{-}^{13}\text{C}$ -piruvato, $1\text{-}^{13}\text{C}$ -gliceraldeído e $2\text{-}^{13}\text{C}$ -acetato). É a primeira vez na literatura que estas vias foram confirmadas por marcação isotópica no gênero *Tabernaemontana*. É também pela primeira vez na literatura evidenciado a participação da via do mevalonato na biossíntese de secologanina - e conseqüentemente dos alcaloides do tipo-iboga - em espécie de Apocinaceae.

9.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM, K.; ZAPP, J. Biosynthesis of the isoprene units of chamomile sesquiterpenes. **Phytochemistry**, v. 48, n. 6, p. 953–959, 1998.

ANDRADE, M. T.; LIMA, J. A.; PINTO, A. C.; REZENDE, C. M.; CARVALHO, M. P.; & EPIFANIO, R. A. Indole alkaloids from *Tabernaemontana australis* (Müell. Arg) Miers that inhibit acetylcholinesterase enzyme. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 13(12), p. 4092–4095, 2005.

BERGAMO, D. C. B., et al. Biosynthetic origins of the isoprene units of 4-nerolidylcatechol in *Pothomorphe 50mbellate*. **Journal Brazilian Chemical Soc.** v. 16, p. 1406–1409, 2005.

BERNHARDT, P.; MCCOY, E.; & O'CONNOR, S. E. Rapid Identification of Enzyme Variants for Reengineered Alkaloid Biosynthesis in Periwinkle. **Chemistry & Biology**, 14(8), p. 888–897, 2007.

BRANCO, F. S. C., SILVA, B. V., DO RIO, G. F., SANTANA, M. J., JUNIOR, L. H. K. Q., PINTO, A. C., BOECHAT, N., LIAO, L. L. Ressonância magnética nuclear de substâncias organofluoradas: um desafio no ensino de espectroscopia. **Química Nova**, 38, 9, p. 1237–1246, 2015.

CALIXTO, J. B.; The role of natural products in modern drug discovery. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 91 (suppl. 3), p. e20190105, 2019.

CAPUTI, L.; FRANKE, J.; FARROW, S. C.; CHUNG, K.; PAYNE, R. M. E.; NGUYEN, T.; DANG, T.T.; CARQUEIJEIRO, I. S. T.; KOUDOUNAS, K.; BERNONVILLE T. D.; AMEYAW, B.; JONES, D. M.; VIEIRA, I. J. C.; COURDAVAULT, V.; O'CONNOR, S. E.. Missing enzymes in the biosynthesis of the anticancer drug vinblastine in Madagascar periwinkle. American Association for the Advancement of Science (AAAS). **Science**, p.1–9, 2018.

CARDOSO, C.A.L.; VILEGAS, W.; HONDA, N.K. Qualitative determination of indole alkaloids, triterpenoids and steroids of *Tabernaemontana hilariana*. **Journal of Chromatography A**, 808: p. 264–268, 1998.

CONWAY, M. E. Alzheimer's disease: targeting the glutamatergic system. **Biogerontology**, 2020.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. 3. Ed Chichester: John Wiley & Sons. p. 311, 2009.

FARROW, S. C.; KAMILEEN, M. O.; CAPUTI, L.; BUSSEY, K.; MUNDY, J. E. A.; MCATEE, R. C.; STEPHENSON, C. R. J.; O'CONNOR, S. E. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 141, n. 33, p. 12979–12983, 2019.

FARROW, S. C.; KAMILEEN, M. O.; MEADES, J.; AMEYAW, B.; XIAO, X. Y.; O'CONNOR, S. E., **J. Biol. Chem.** V. 293, n. 36, p. 13821–13833, 2018.

FRANK, A. & GROLL, M. The Methylerythritol Phosphate Pathway to Isoprenoids. **Chem. Rev.** v. 117, p. 5675–5703, 2017.

HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**. Elsevier BV, v. 30, n. 12, p. 3864–3874, 1991.

JIANG, C., LI, G., HUANG, P., LIU, Z., & ZHAO, B. The Gut Microbiota and Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, 58(1), p. 1–15, 2017.

KAM, T.-S. & ANURADHA, S. Voafinine and N1-Methylvoafinine, Novel Aspidosperma Alkaloids from *Tabernaemontana*. **Natural Product Letters**, 7(3), p. 191–195, 1995.

KUTCHAN, T. M. Alkaloid Biosynthesis -The Basis for Metabolic Engineering of Medicinal Plants. **The Plant Cell**, Munich, v. 7, p.1059–1070, 1995.

LOPES, A. A.; BALDOQUI, D. C.; LÓPEZ, S. N.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. DA S. & FURLAN, M. Biosynthetic origins of the isoprene units of gaudichaudianic acid in *Piper gaudichaudianum* (Piperaceae). **Phytochemistry**, 68(15), p. 2053–2058, 2007.

LOPES, A. A.; CHIOCA, B.; MUSQUIARI, B.; CREVELIN, E. J.; FRANCA, S. C.; DA SILVA, M. F. DAS G.; PEREIRA, A. M. S. Unnatural spirocyclic oxindole alkaloids biosynthesis in *Uncaria guianensis*. **Scientific Reports**, v. 9, 11349, 1–8, 2019.

LOPES, A. A.; PINA, E. S.; NADER, T. T.; DA COSTA, F. B.; PEREIRA, A. M. S.; PUPO, M. T. Biosynthesis of (-)-ent-kaurenoic acid in *Smallanthus sonchifolius* and its effect against microbial biofilms. **Phytochemistry Letters**, v. 18, p. 162–167, 2016.

LOPES, A. A.; PUPO, M. T. Biosynthesis of Aphidicolin Proceeds via the Mevalonate Pathway in the Endophytic Fungus *Nigrospora sphaerica*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 1, p. 80–85, 2011.

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

MCCOY, E. & O'CONNOR, S. E. Directed Biosynthesis of Alkaloid Analogs in the Medicinal Plant *Catharanthus roseus*. **Journal of the American Chemical Society**, 128(44), 14276–14277, 2006.

MOLINSKI, T. F. (Ed.). All Natural: The Renaissance of Natural Products Chemistry. **Organic Letters**, 16(15), 3849–3855, 2014.

MUKHERJEE, P. K.; KUMAR, V.; MAL, M. & HOUGHTON, P. J. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. **Phytomedicine**, 14(4), 289–300, 2007.

MULLARD, A. 2017 FDA drug approvals. **Nature Reviews Drug Discovery** v. 17, p. 81–85, 2018.

NEWMAN, D. J., & CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, 79(3), 629–661, 2016.

NICOLA, C.; SALVADOR, M.; ESCALONA, A. G.; MOURA, S., & ECHEVERRIGARAY, S. Chemical Constituents Antioxidant and Anticholinesterasic Activity of *Tabernaemontana catharinensis*. **The Scientific World Journal**, 2013, 1–10, 2013.

O'HAGAN, D. Fluorine in health care Organofluorine containing blockbuster drugs, **Journal of Fluorine Chemistry**, vol. 131, no. 11, pp. 1071–1081, 2010.

PERAKSLIS, E., RIORDAN, H., FRIEDHOFF, L., NABULSI, A., & PICH, E. M. A call for a global “bigger” data approach to Alzheimer disease. **Nature Reviews Drug Discovery**, p. 1–2, 2018.

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. **Química Nova**, 31(1): p. 20–24, 2008.

PHILLIPSON, J.D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 56, n. 3, p.237–243, 2001.

PINA, E. S.; SILVA, D. B.; TEIXEIRA, S. P.; COPPEDE, J. S.; FURLAN, M.; FRANCA, S. C.; LOPES, N. P.; PEREIRA, A. M. S.; LOPES, A. A. Mevalonate-derived quinonemethide triterpenoid from in vitro roots of *Peritassa laevigata* and their localization in root tissue by MALDI imaging. **Scientific Reports**, v. 6, 2016.

QU, Y., EASSON, M. E. A. M., SIMIONESCU, R., HAJICEK, J., THAMM, A. M. K., SALIMA, V., DE LUCA, V. Solution of the multistep pathway for assembly of corynanthean, strychnos, iboga, and aspidosperma monoterpenoid indole alkaloids from 19*E*-geissoschizine. **PNAS**, 115, 12, 3180–3185, 2018.

ROHMER, M., et al. Glyceraldehyde 3-phosphate and pyruvate as precursors of isoprenic units in an alternative non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 118, p. 2564–2466, 1996.

ROHMER, M., et al. Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. **Biochemical Journal**, v. 295, n. 2, p. 517–524, 1993.

RUNGUPHAN, W. & O'CONNOR, S. E. Metabolic reprogramming of periwinkle plant culture. **Nat. Chem. Biol.** N. 5, v. 3, p. 151–153, 2009.

SCOTT, A. J. & KNOTT, M. A Cluster Analysis Method for Grouping Means in the Analysis of Variance. **Biometrics**, 30(3), 507, 1974.

SEARS, J. E. & BOGER, D. L. Total Synthesis of Vinblastine, Related Natural Products, and Key Analogues and Development of Inspired Methodology Suitable for the Systematic Study of Their Structure–Function Properties. **Accounts of Chemical Research**, 48(3), 653–662, 2015.

SIMÕES, O. A.; ENDRESS E. M.; CONTI E. Systematics and character evolution of *Tabernaemontanae* (Apocynaceae, Rauvolfioideae) based on molecular and morphological evidence. **Molecular Phylogenetics and Biogeography**, v. 59, n. 3, p. 772–790, 2010.

SINGH, M.; KAUR, M.; KUKREJA, H.; CHUGH, R.; SILAKARI, O. & SINGH, D. Acetylcholinesterase inhibitors as Alzheimer therapy: From nerve toxins to neuroprotection. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 70, 165–188, 2013.

TATSIS, E. C.; CARQUEIJEIRO, I.; DUGÉ DE BERNONVILLE, T., FRANKE, J., DANG, T.-T. T., OUDIN, A., LANOUE A., LAFONTAINE, F., STAVRINIDES, A. K., CLASTRE, M., COURDAVAULT, V., O'CONNOR, S. E. A three enzyme system to generate the Strychnos alkaloid scaffold from a central biosynthetic intermediate. **Nature Communications**, 8(1), 2017.

THIERICKE, R. & ROHR, J. Biological Variation of Microbial Metabolites by Precursor-directed Biosynthesis. **Natural Product Reports** v. 10, p. 265–289, 1993.

VIEIRA, I. J. C.; MEDEIROS, W. L. B.; MONNERAT, C. S.; SOUZA, J. J.; MATHIAS, L.; BRAZ-FILHO, R.; EPIFANIO, R. D. A. Two fast screening methods (GC-MS and TLC-ChEI assay) for rapid evaluation of potential anticholinesterasic indole alkaloids in complex mixtures. **Anais Da Academia Brasileira de Ciências**, 80(3), 419–426, 2008.

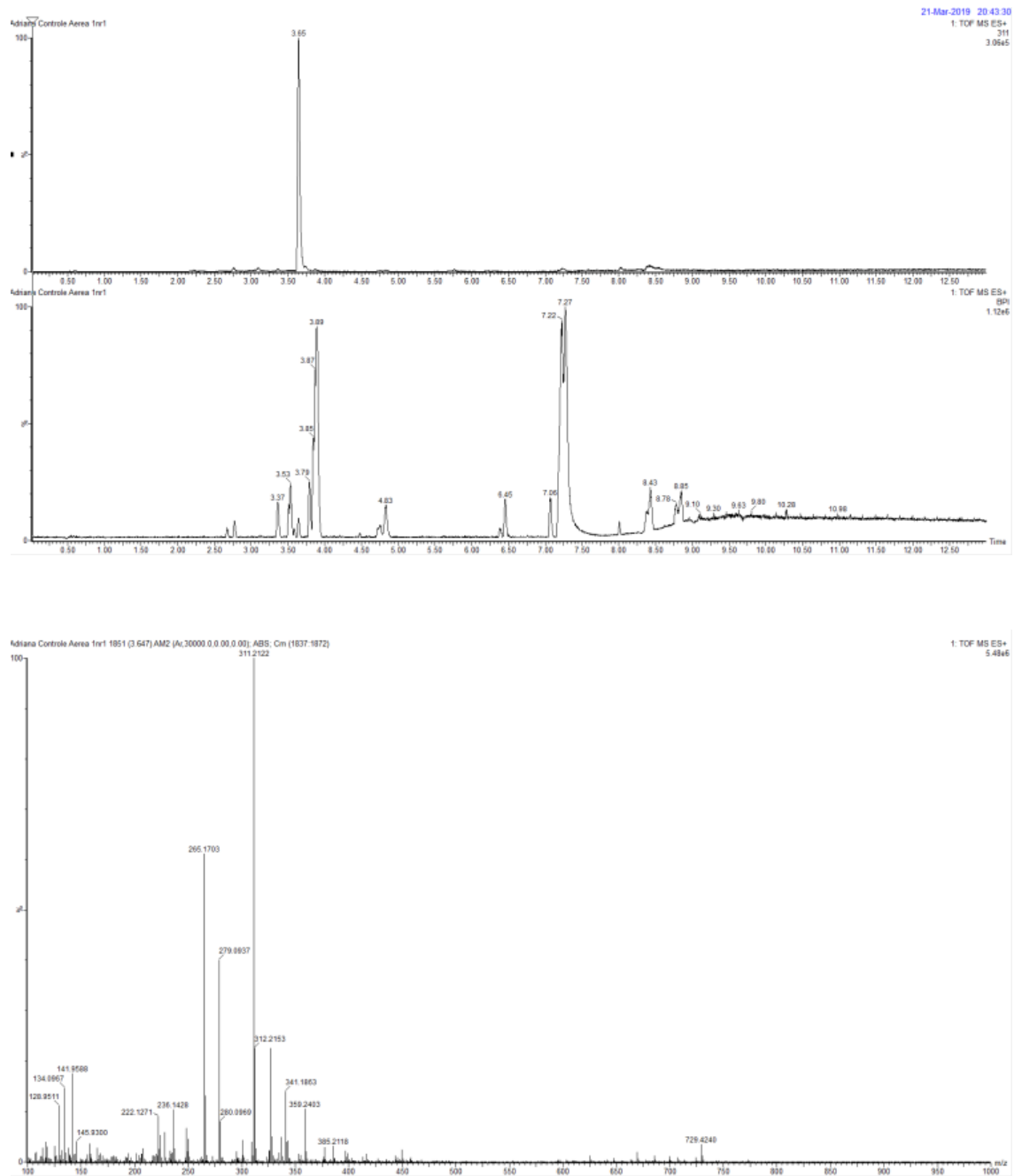
WANG, J.; SÁNCHEZ-ROSELLÓ, M.; ACEÑA, J. L.; DEL POZO, C.; SOROCHINSKY, A. E.; FUSTERO, S.; SOLOSHONOK, V. A.; LIU, H. Fluorine in Pharmaceutical Industry: Fluorine-Containing Drugs Introduced to the Market in the Last Decade (2001-2011). **Chemical Reviews**, 114(4), 2432–2506, 2013.

YAMASAKI, M. & LEETE, E. Biosynthesis of the Iboga alkaloids: The incorporation of tryptophan-3-C¹⁴ into Ibogaine. **Tetrahedron Letters**, 5(23), 1499–1501, 1964.

YANG, C-J.; GOTO, M.; HSU, P-H.; ZHANG, X-S.; YANG, Q-R.; LIU, Y-Q.; WANG, M-J.; MORRIS-NATSCHKE, S. L.; SHANG, X-F.; LEE, K-H. Design, semisynthesis and potent cytotoxic activity of novel 10-fluorocamptothecin derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** v. 27, p. 4694–4697, 2017.

ANEXOS

Figura 28. Cromatograma de massas em alta resolução - parte aérea das plântulas de *T. catharinensis* (m/z 311.2122 e isótopos) - experimento controle.



Continuação da Figura 28.

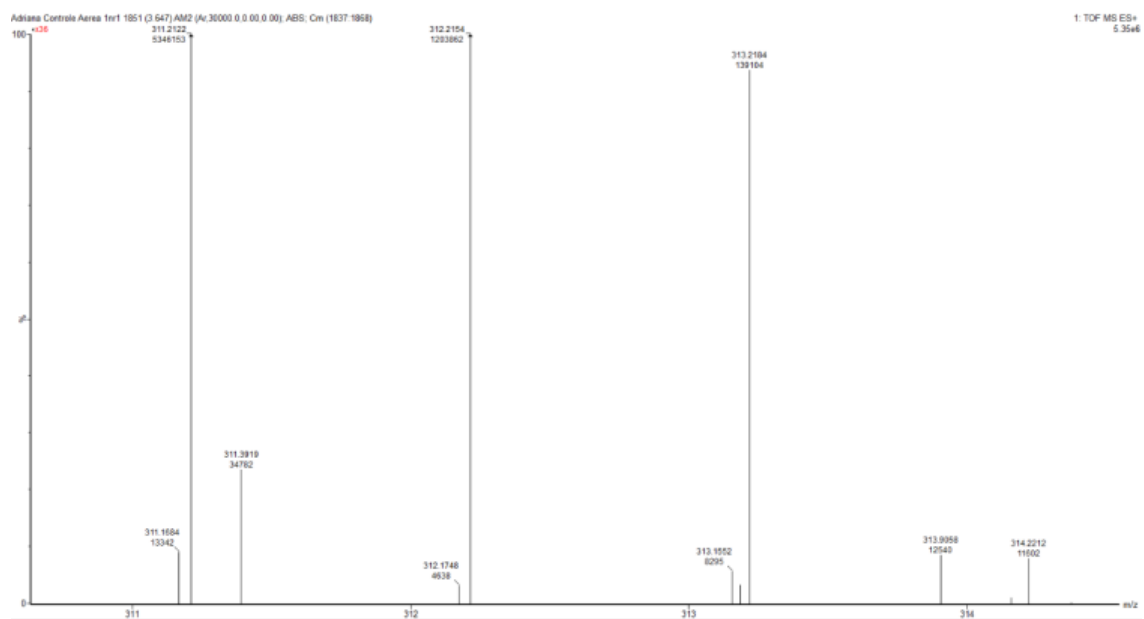
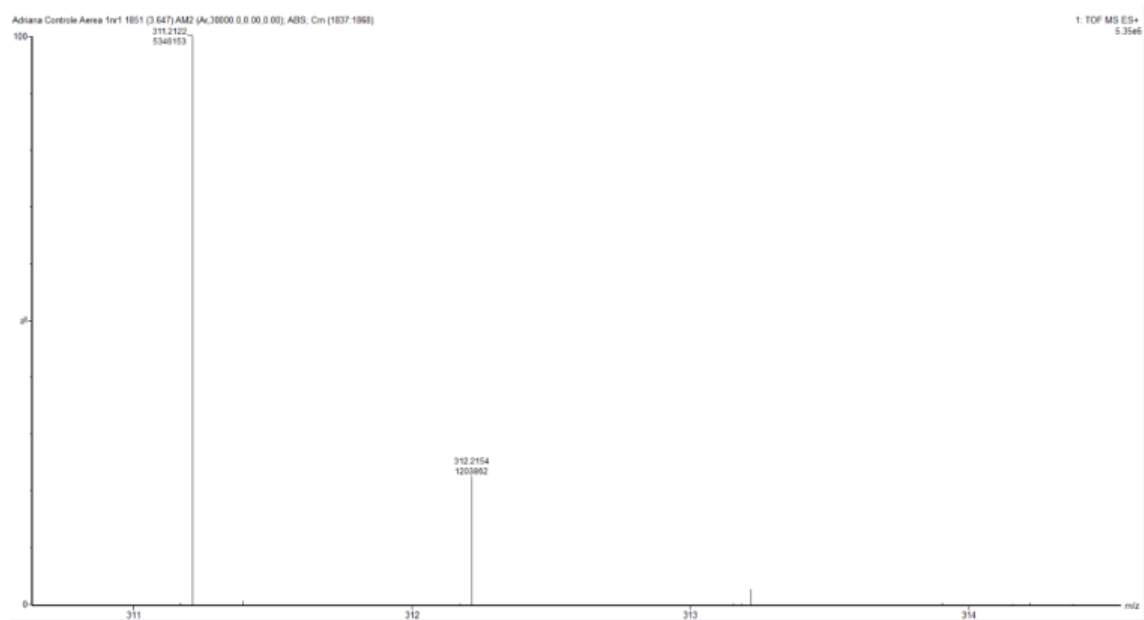
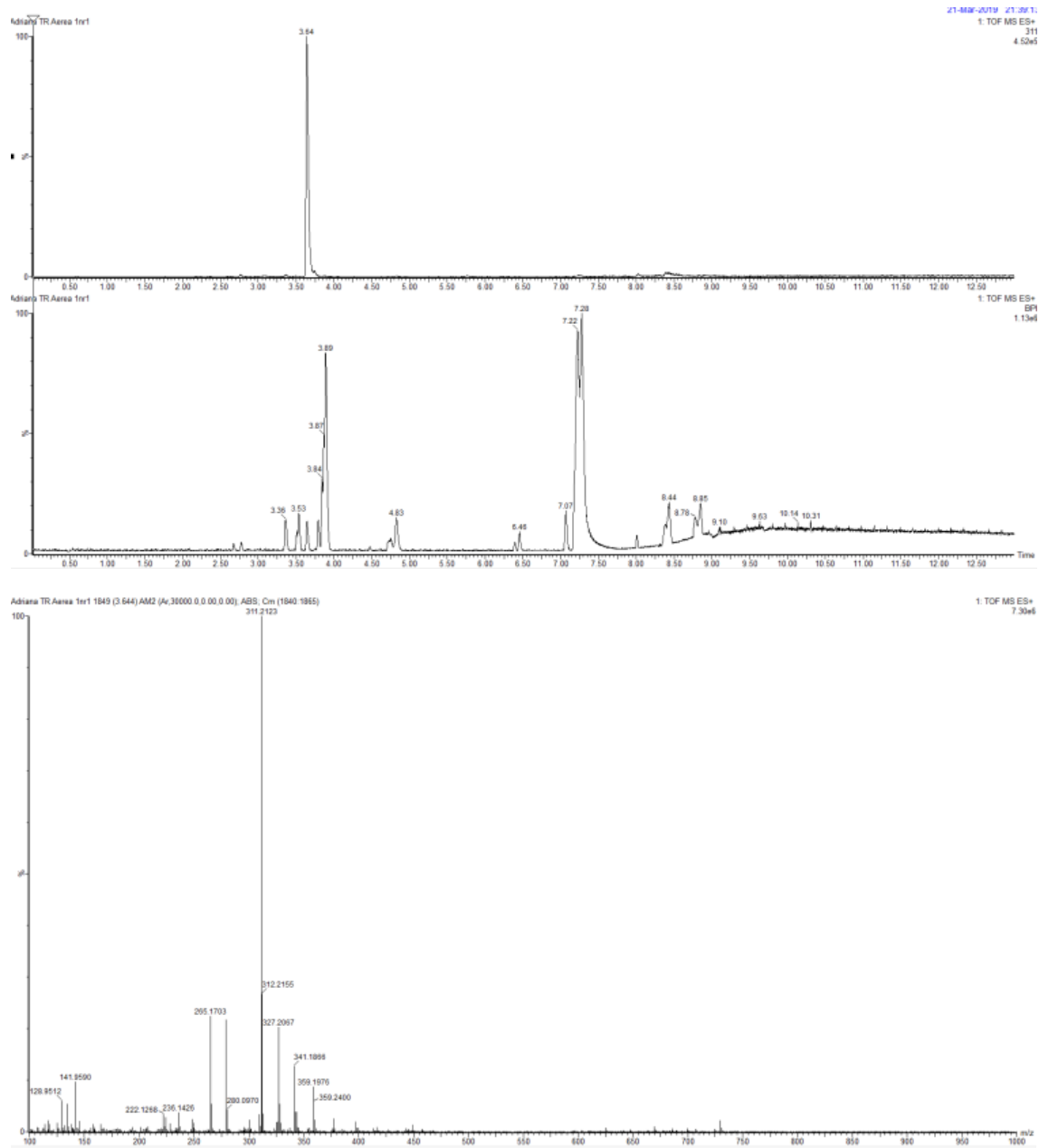


Figura 29. Cromatograma de massas em alta resolução - parte aérea das plântulas de *T. catharinensis* (m/z 311.2122 e isótopos) - experimento 2-¹³C-triptofano.



Continuação da Figura 29.

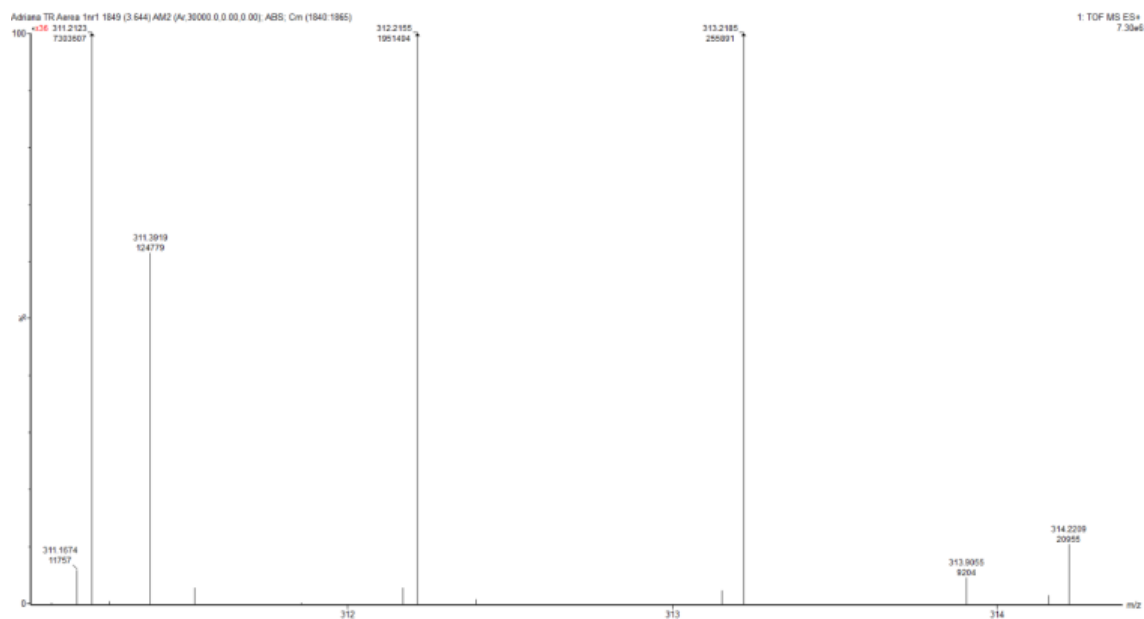
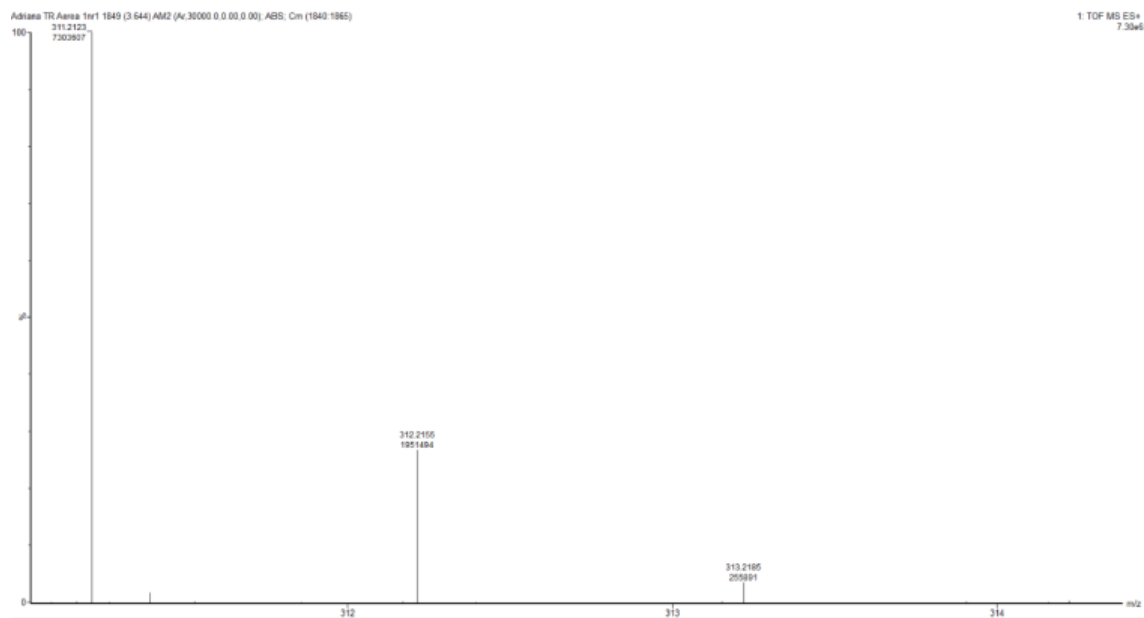
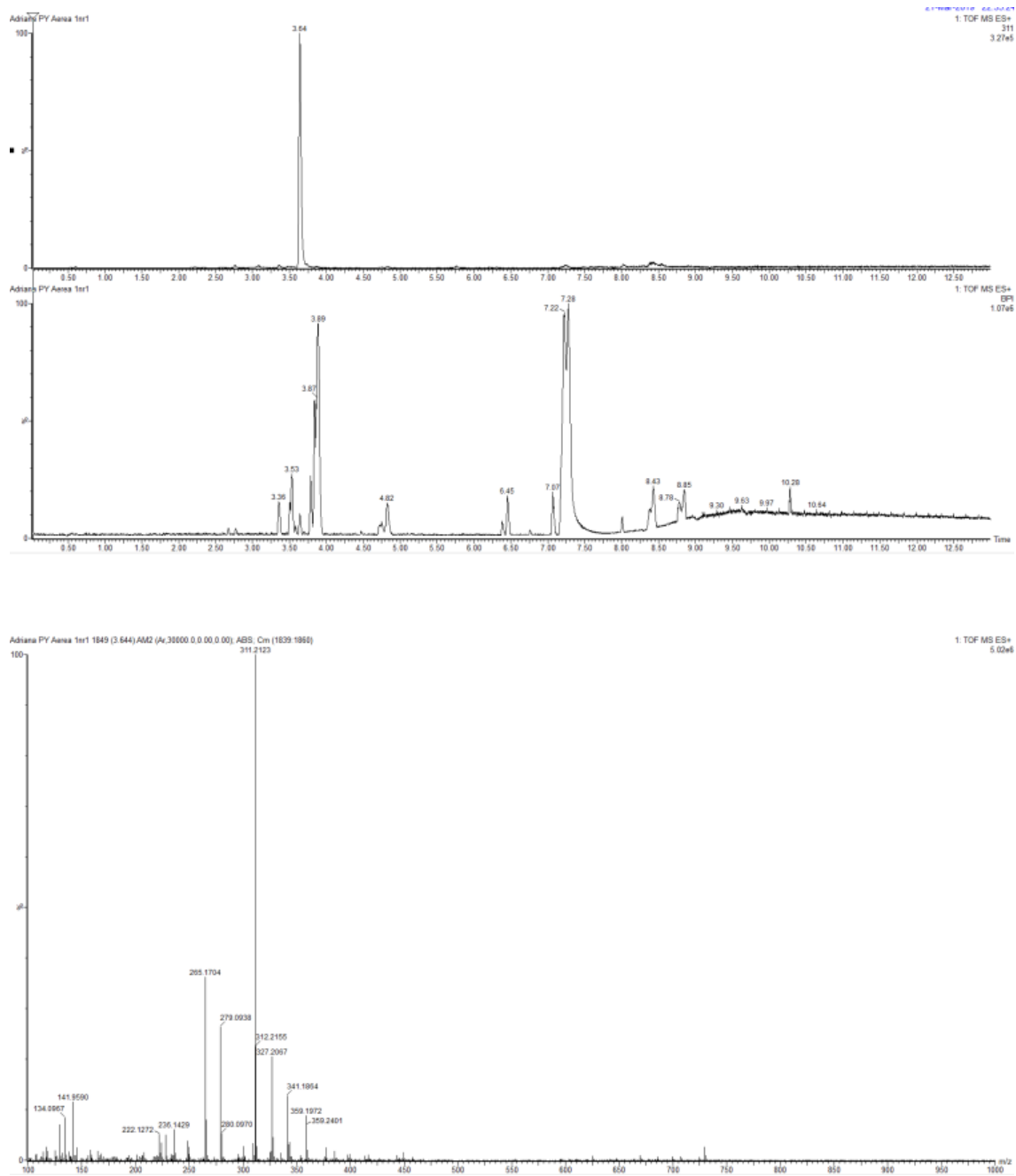


Figura 30. Cromatograma de massas em alta resolução - parte aérea das plântulas de *T. catharinensis* (m/z 311.2122 e isótopos) - experimento 3- ^{13}C -piruvato de sódio.



Continuação da Figura 30.

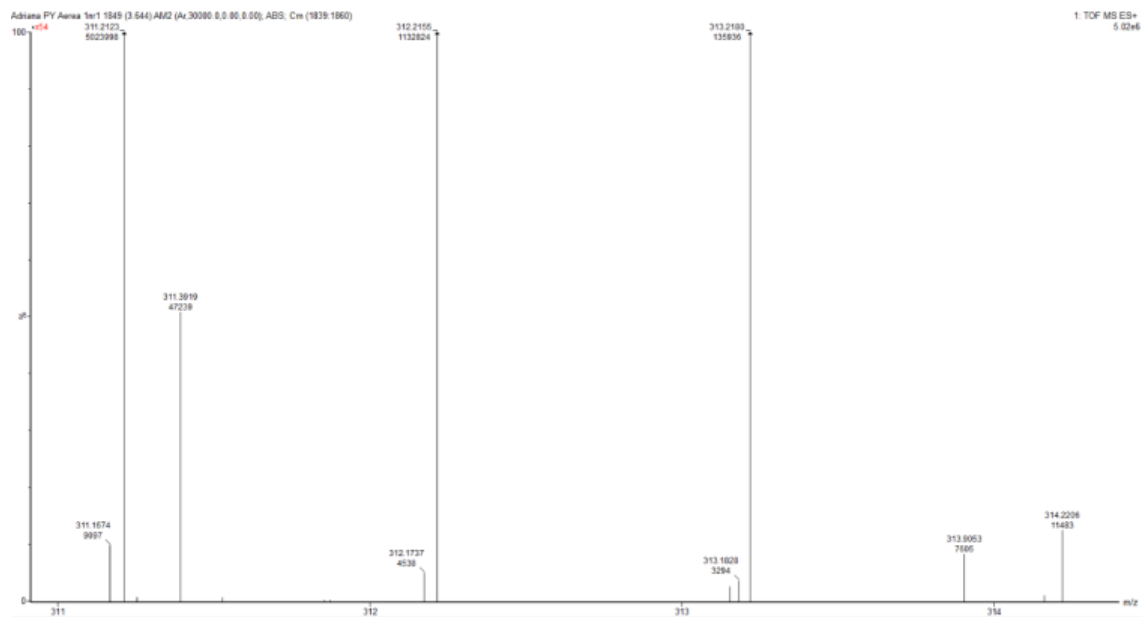
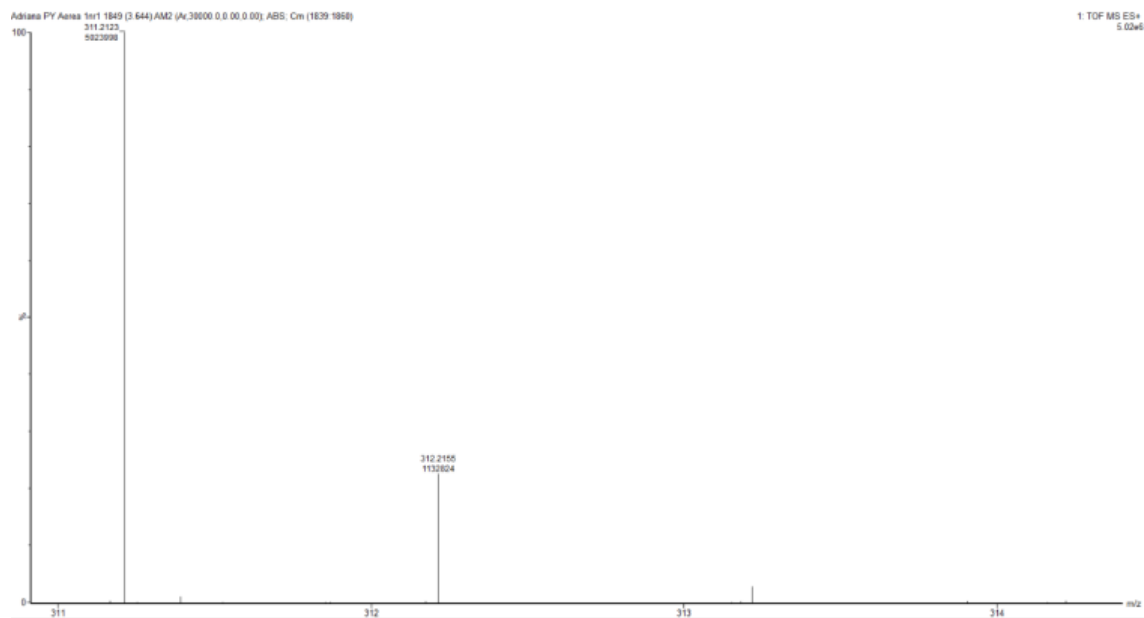


Figura 31. Cromatograma do extrato oriundo de raízes adventícias. Íon 297 [M+H]⁺ referente aos alcaloides naturais: voafilina e 19(S)-hidroxiibogamina.

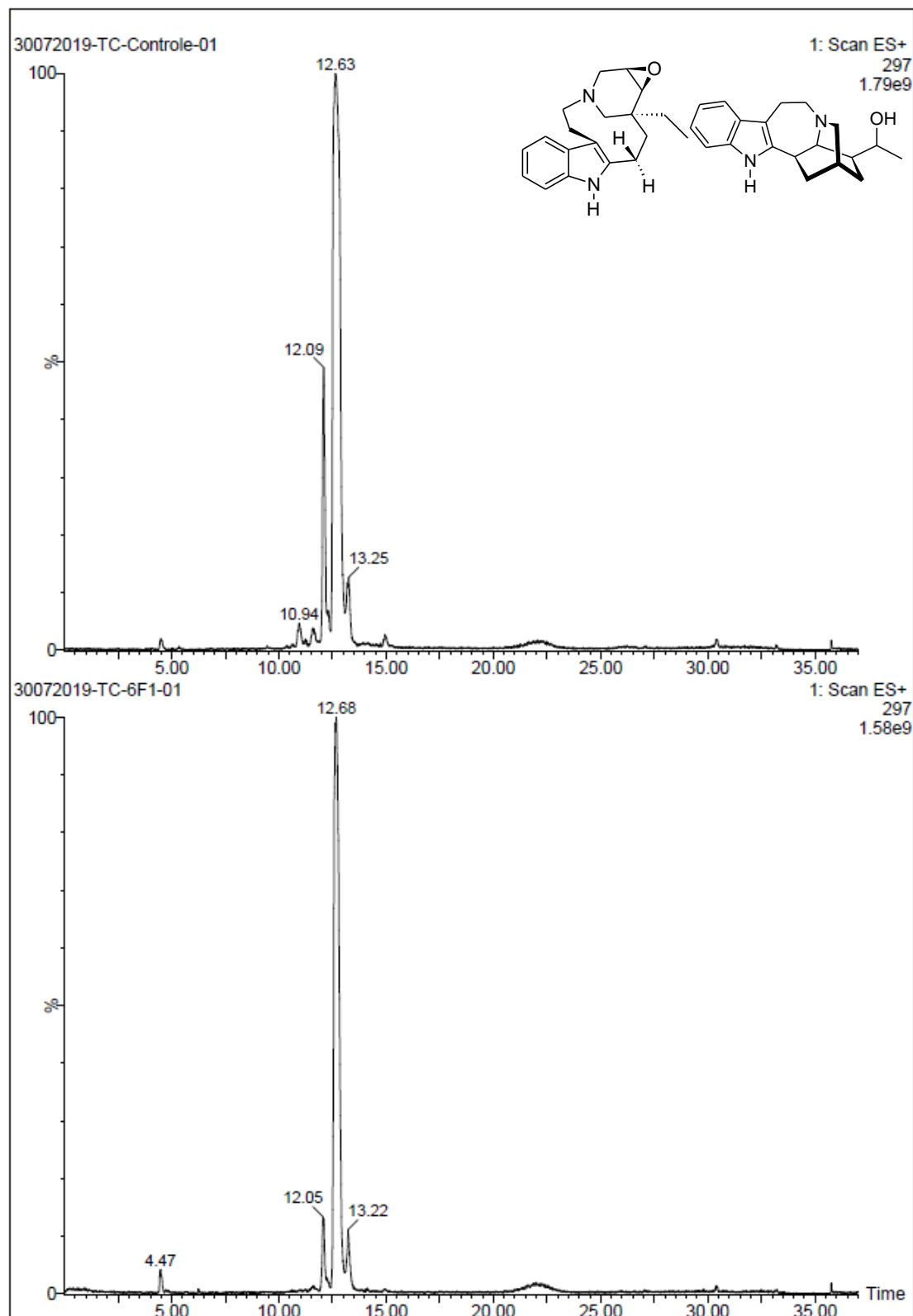


Figura 32. Cromatograma do extrato oriundo de raízes adventícias. Íon 315 [M+H]⁺ referente aos alcaloides análogos: voafilina e 19(S)-hidroxiibogamina fluorados.

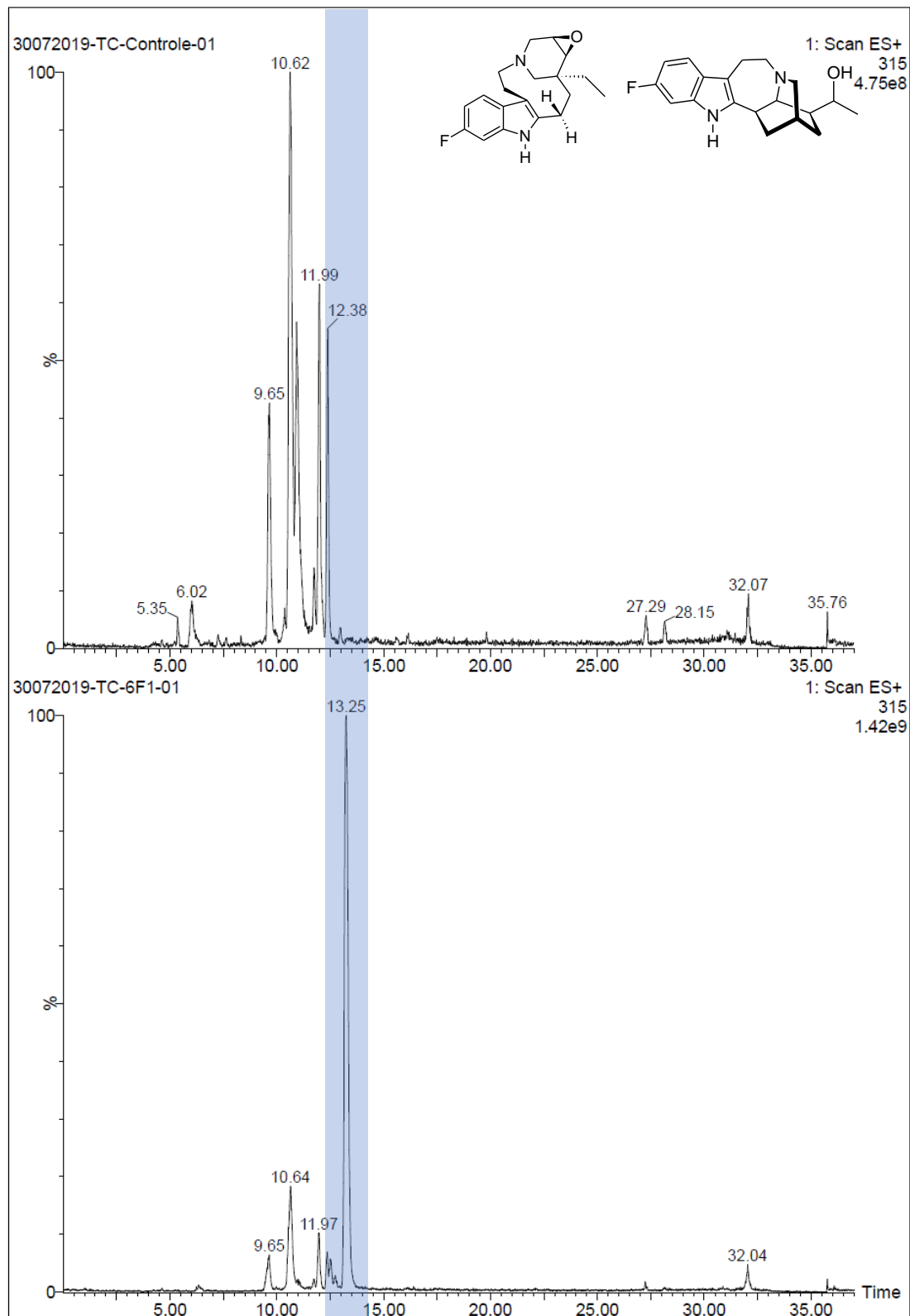


Figura 33. Cromatograma do extrato oriundo de raízes adventícias. Íon 313 [M+H]⁺ referente ao alcaloide natural: voafinina.

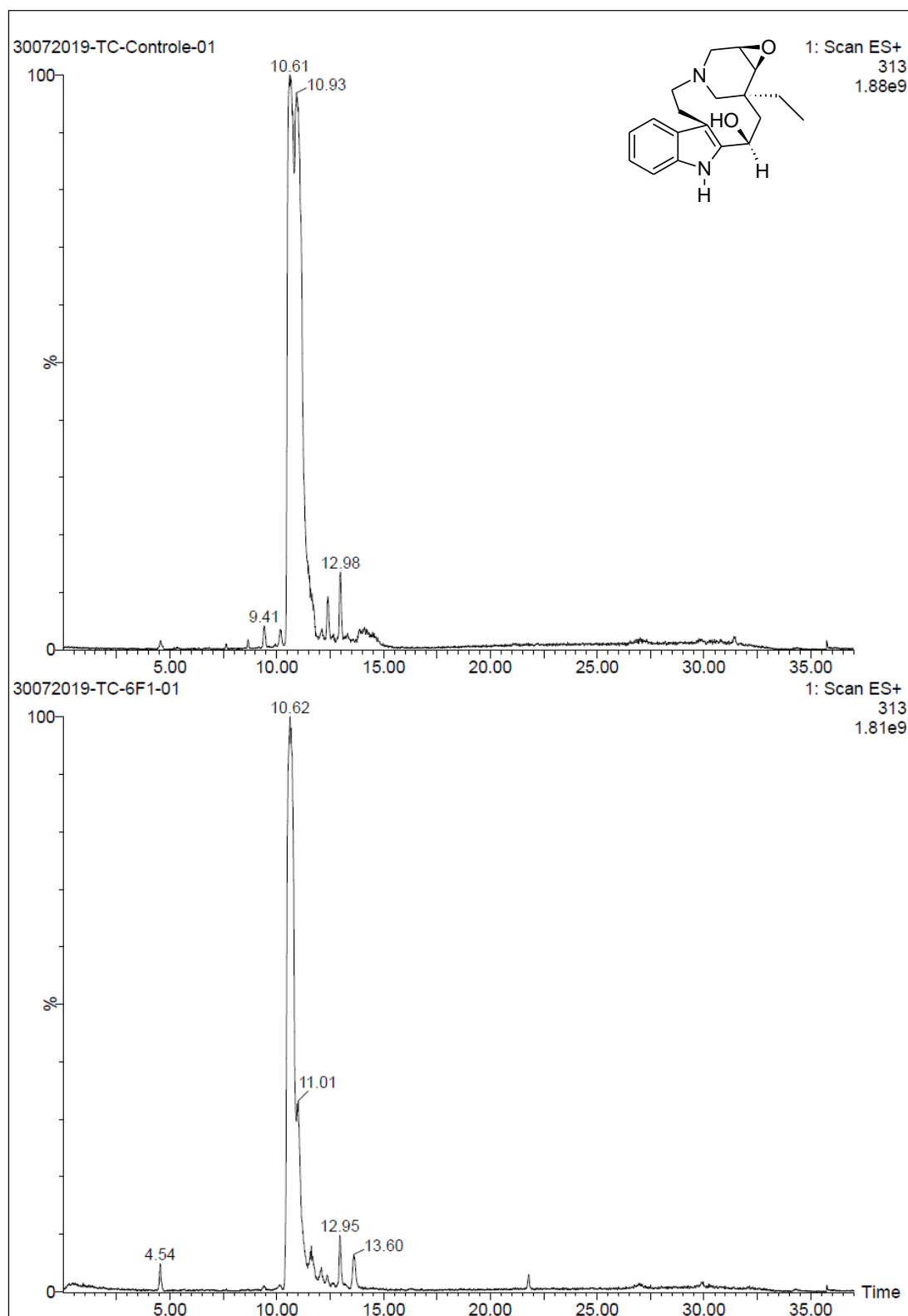


Figura 34. Cromatograma do extrato oriundo de raízes adventícias. Íon 331 [M+H]⁺ referente ao alcaloide análogo: voafinina fluorada.

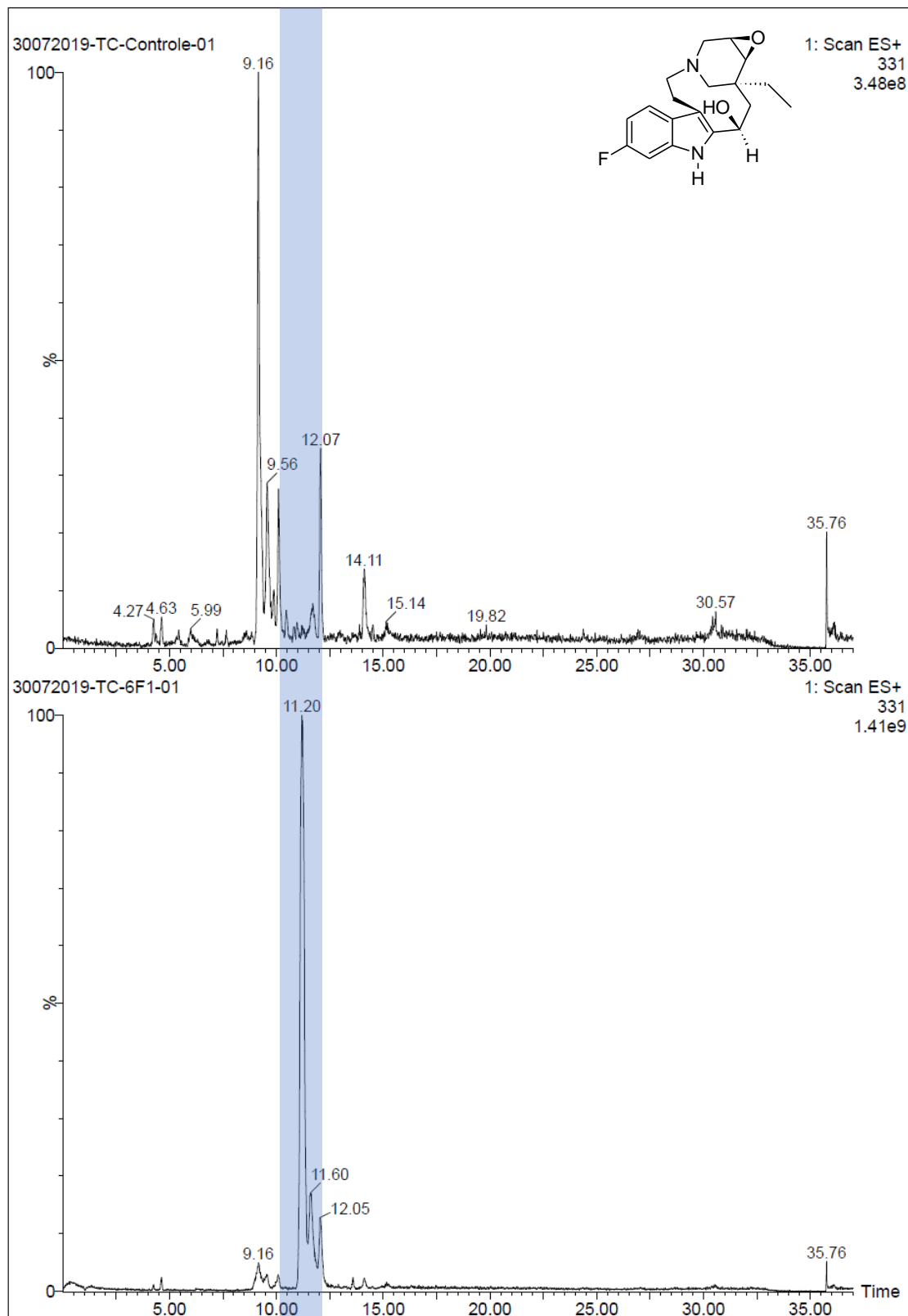


Figura 35. Cromatograma do extrato oriundo de raízes adventícias. Íon 369 [M+H]⁺ referente aos alcaloides naturais: voacangina e isovoacangina.

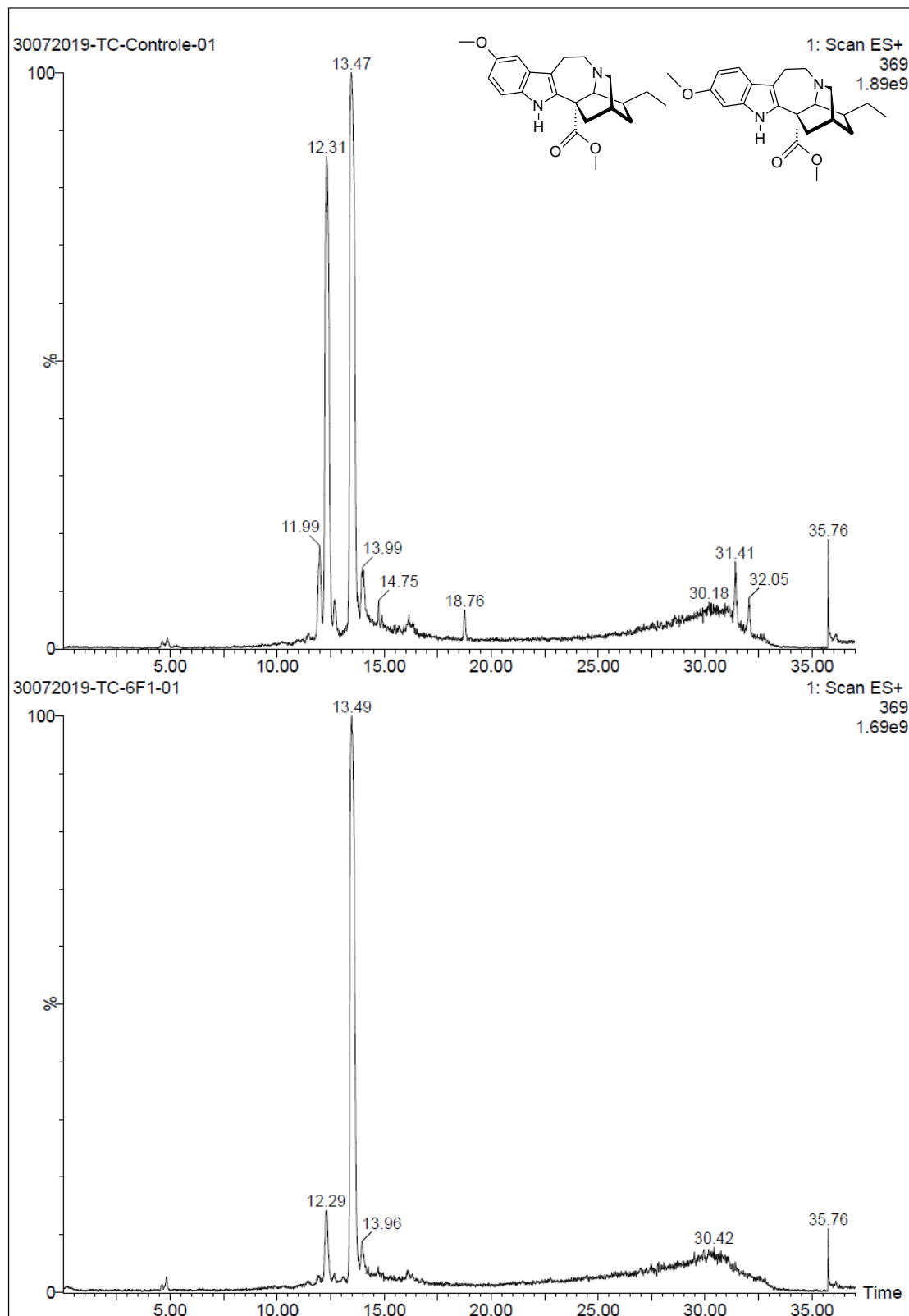


Figura 36. Cromatograma do extrato oriundo de raízes adventícias. Íon 357 [M+H]⁺ referente ao alcaloide análogo: coronaridina fluorada.

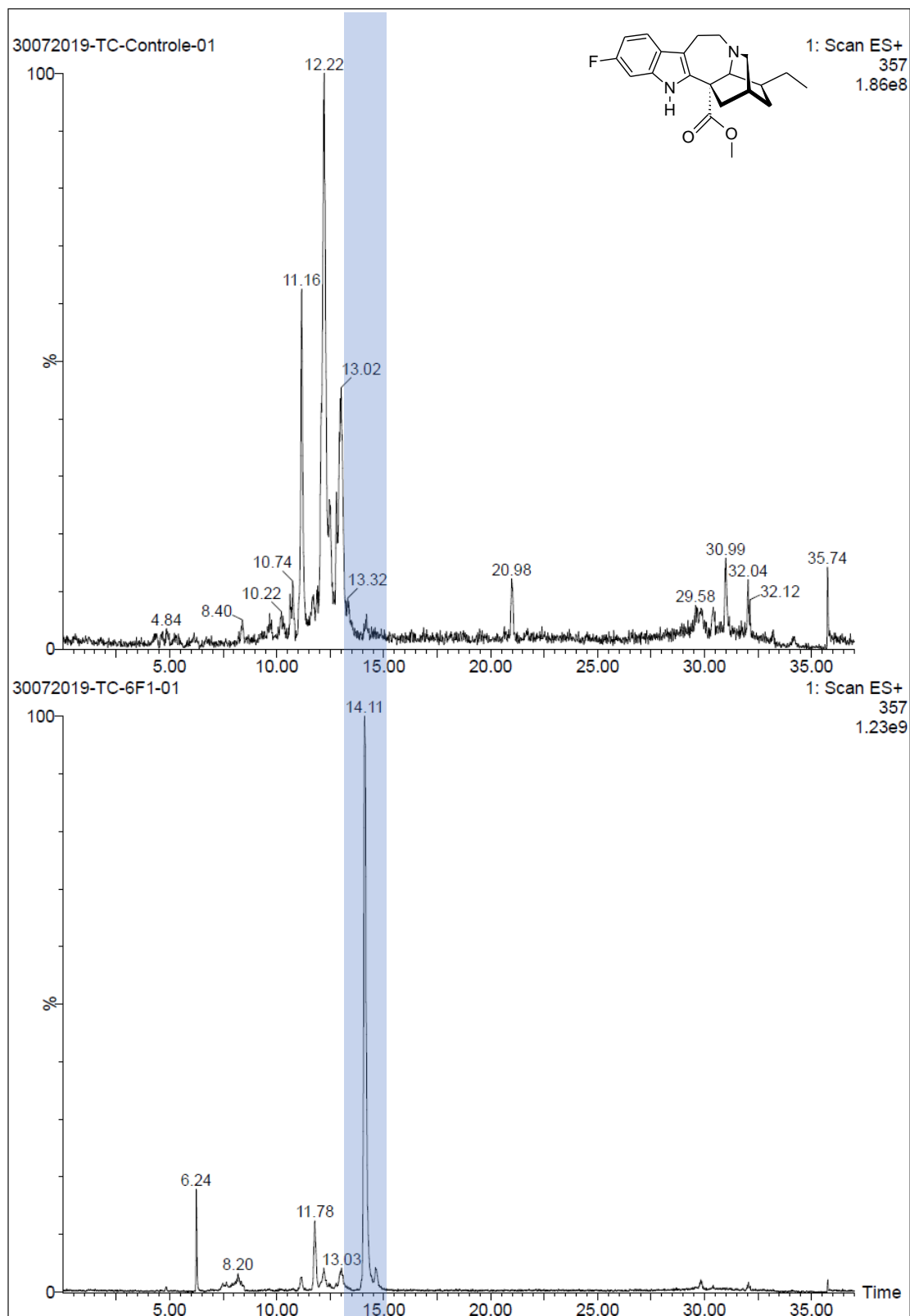


Figura 37. Cromatograma do extrato oriundo de raízes adventícias. Íon 411 [M+H]⁺ referente ao alcaloide natural: 12-metoxi-n-metil-voacholatina.

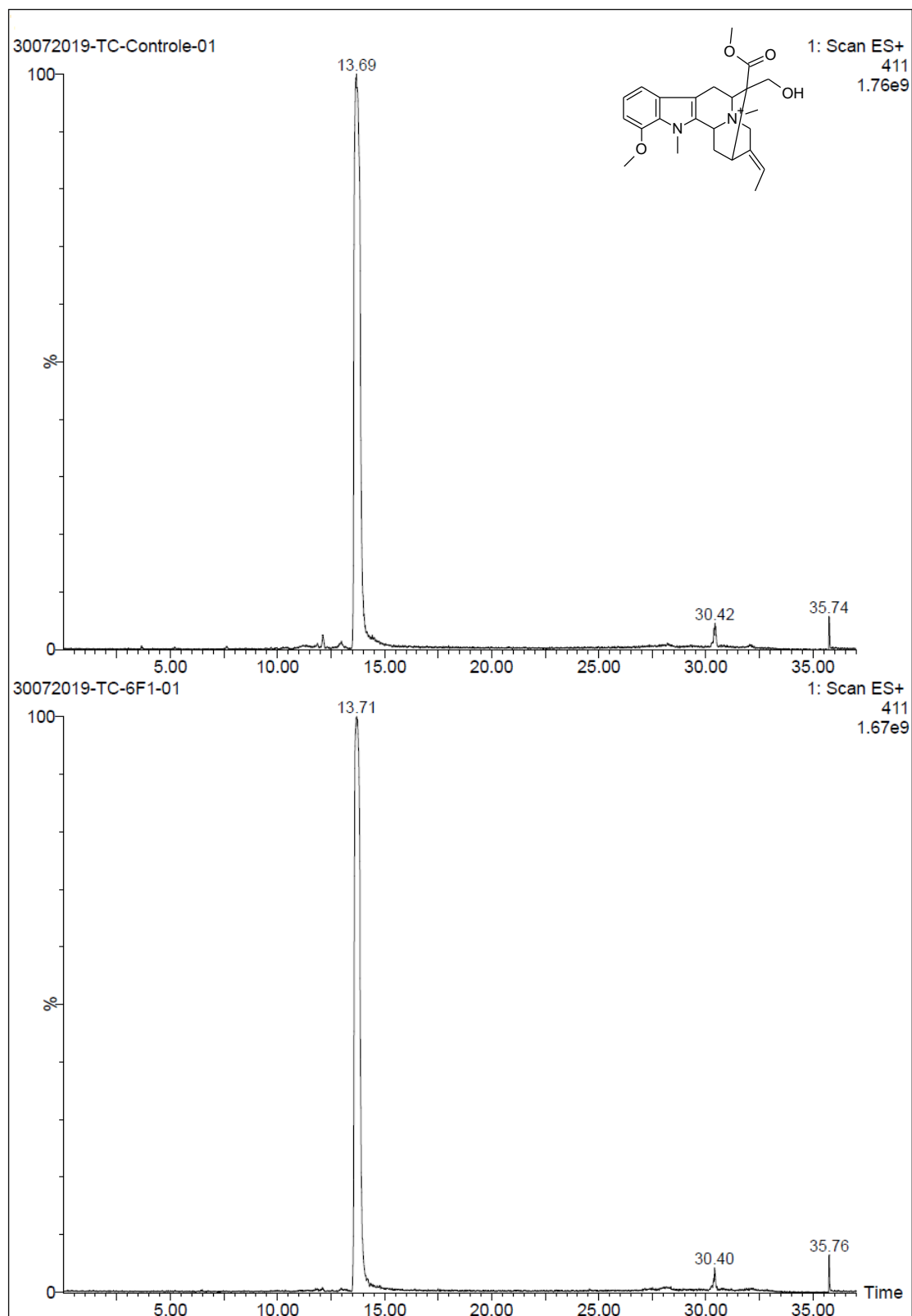


Figura 38. Cromatograma do extrato oriundo de raízes adventícias. Íon 430 [M+H]⁺ referente ao alcaloide análogo: 12-metoxi-n-metil-voacholatina fluorada.

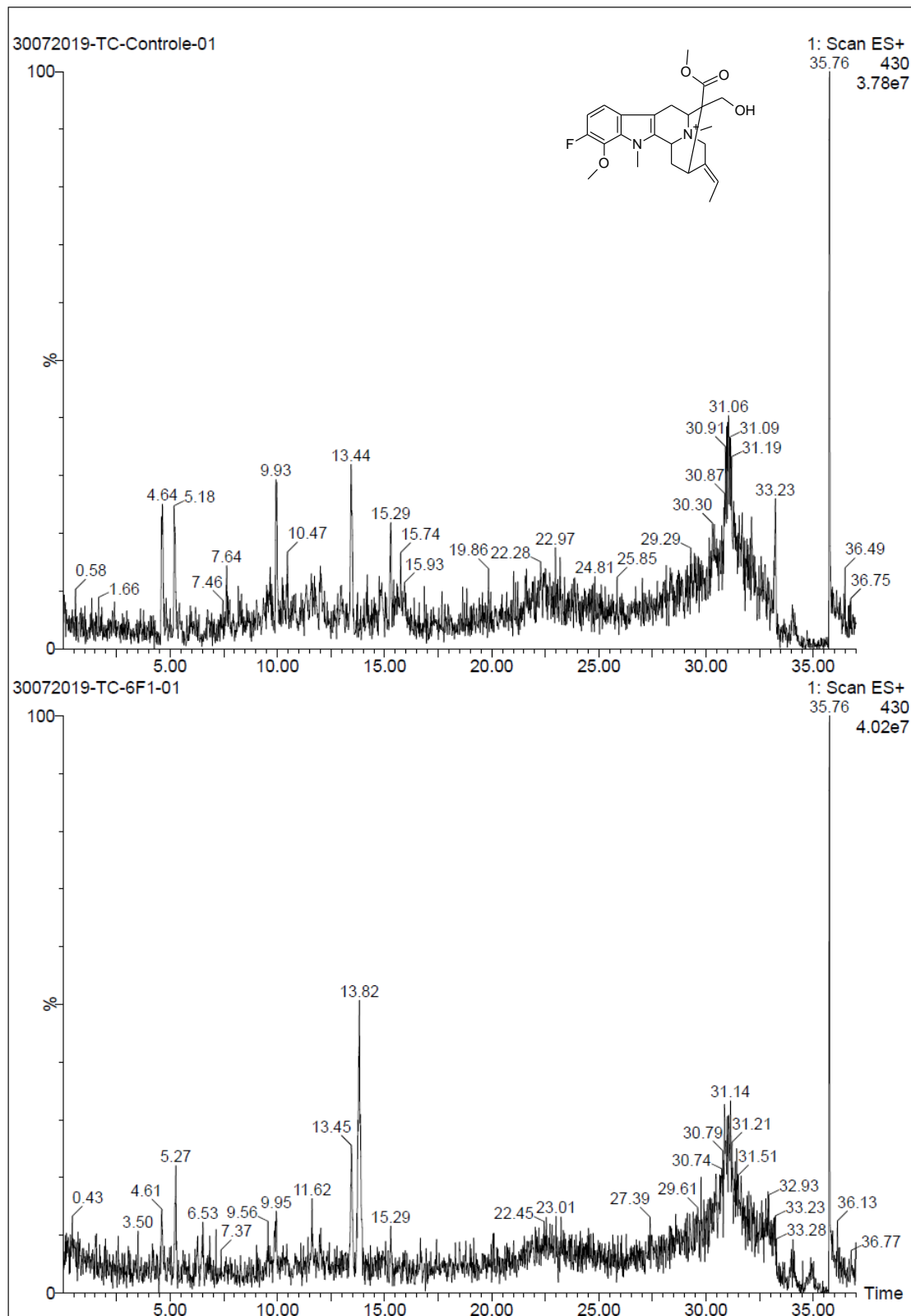


Figura 39. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 339 [M+H]⁺ referente ao alcaloide natural: coronaridina.

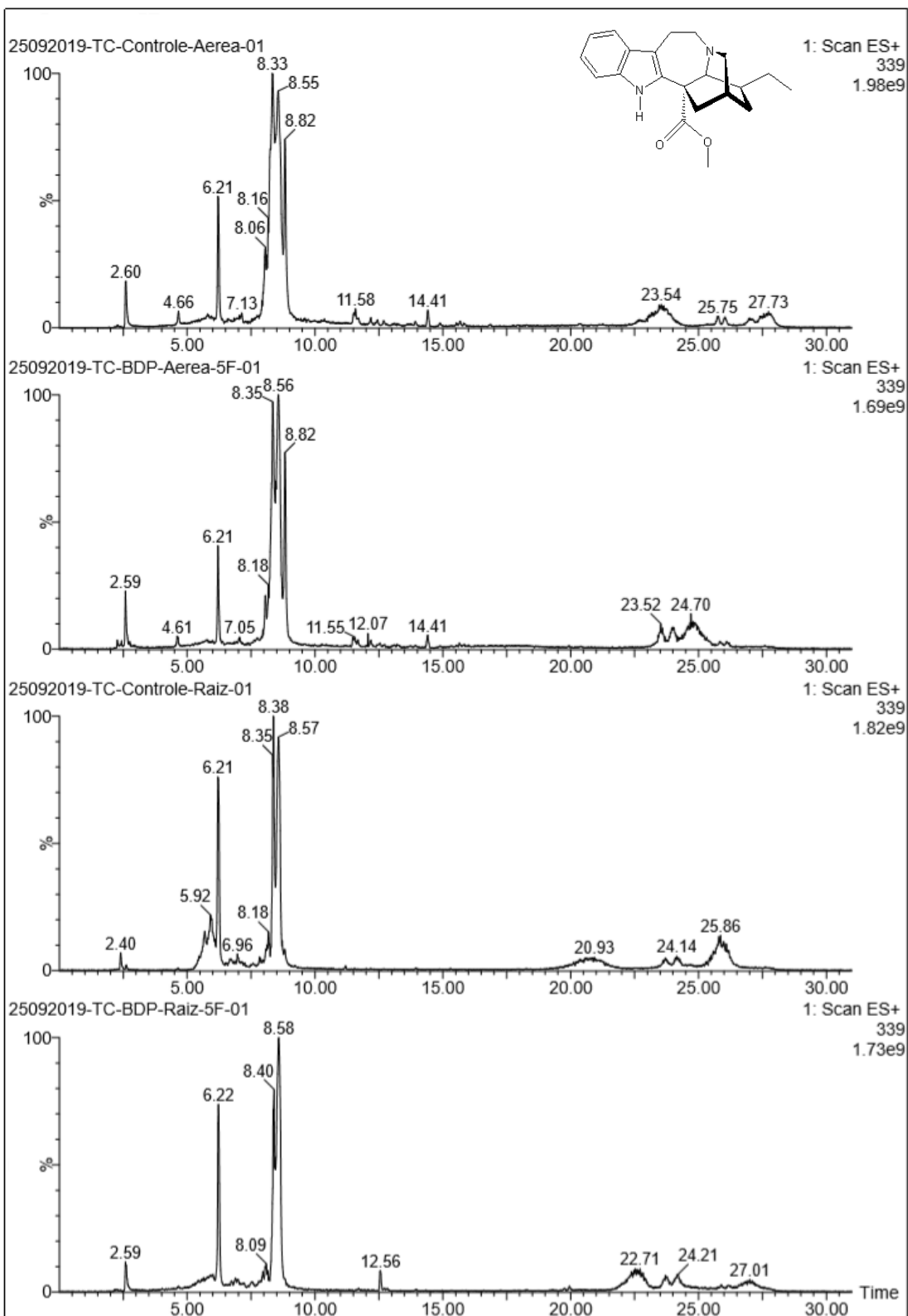


Figura 40. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 369 [M+H]⁺ referente ao alcaloide natural: voacangina.

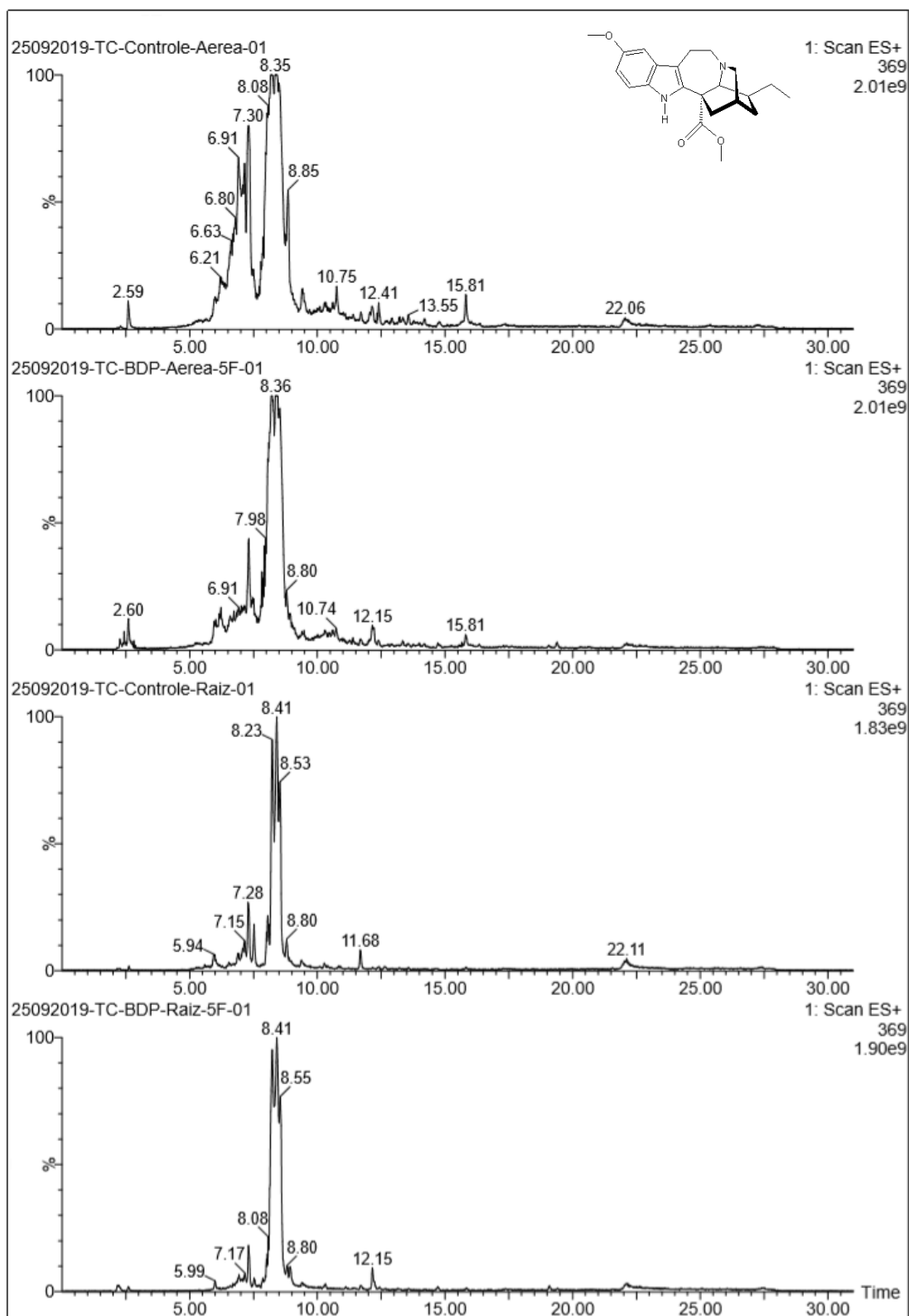


Figura 41. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 357 [M+H]⁺ referente ao alcaloide análogo: coronaridina fluorada.

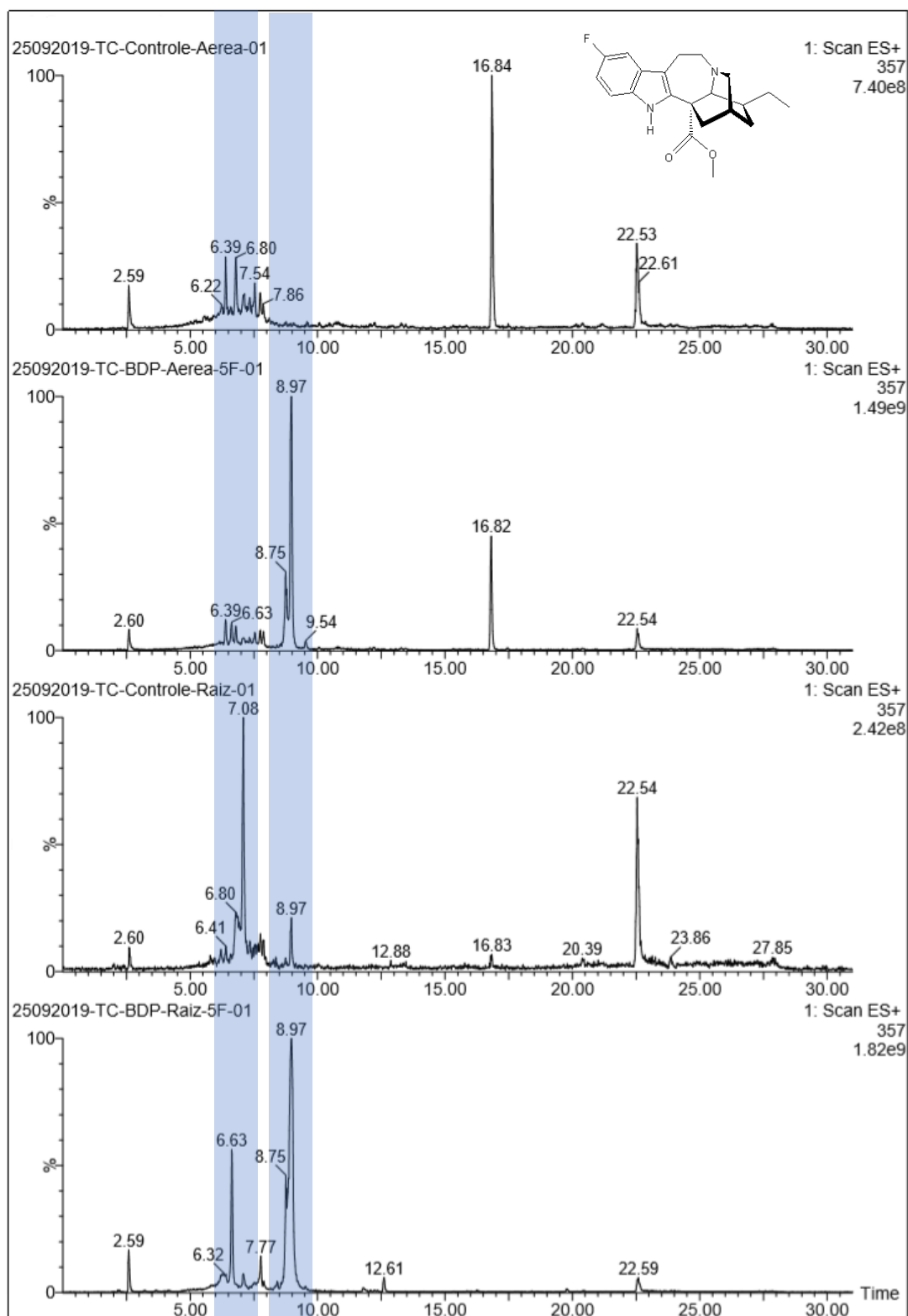


Figura 42. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 355 [M+H]⁺ referente aos alcaloides naturais: hidroxindolenina coronaridina, heyneanina, pseudoindoxil coronaridina e catarinensina.

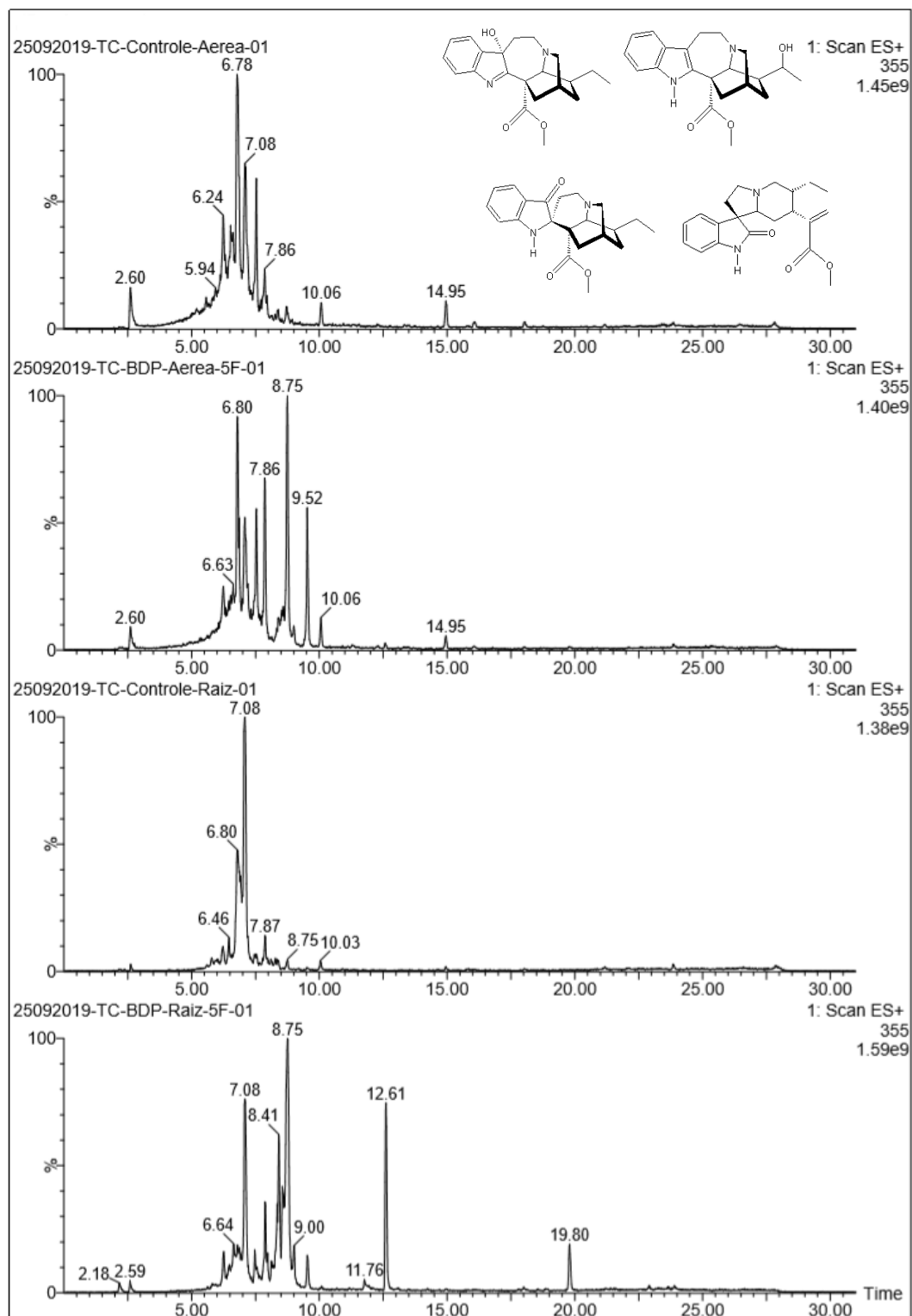


Figura 43. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 385 $[M+H]^+$ referente aos alcaloides naturais: hidroxiindolenina voacangina, voacristina e rupicolina.

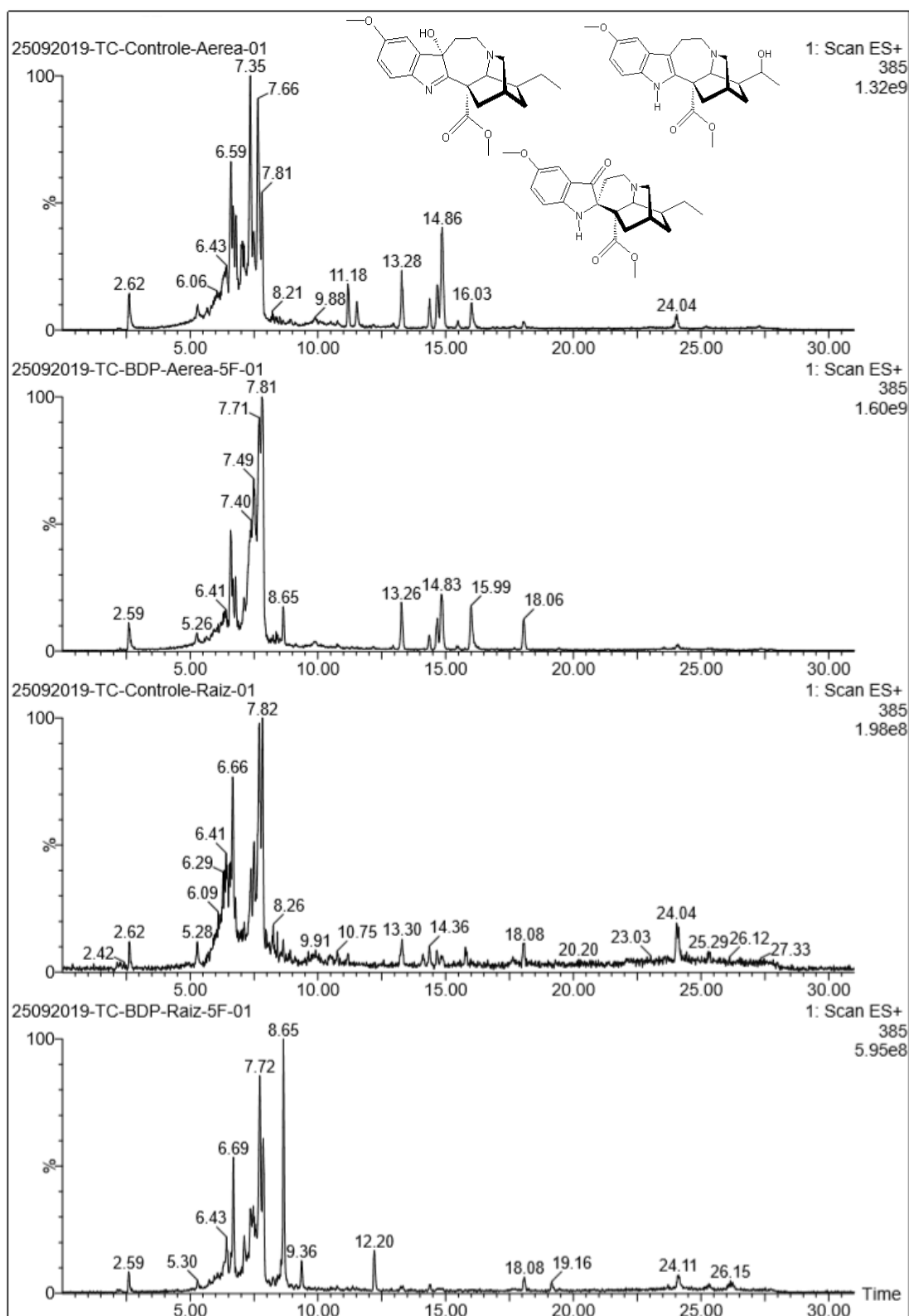


Figura 44. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 373 $[M+H]^+$ referente aos alcaloides análogos: hidroxindolenina coronaridina, heyneanina, pseudoindoxil coronaridina e catarinensina fluorados.

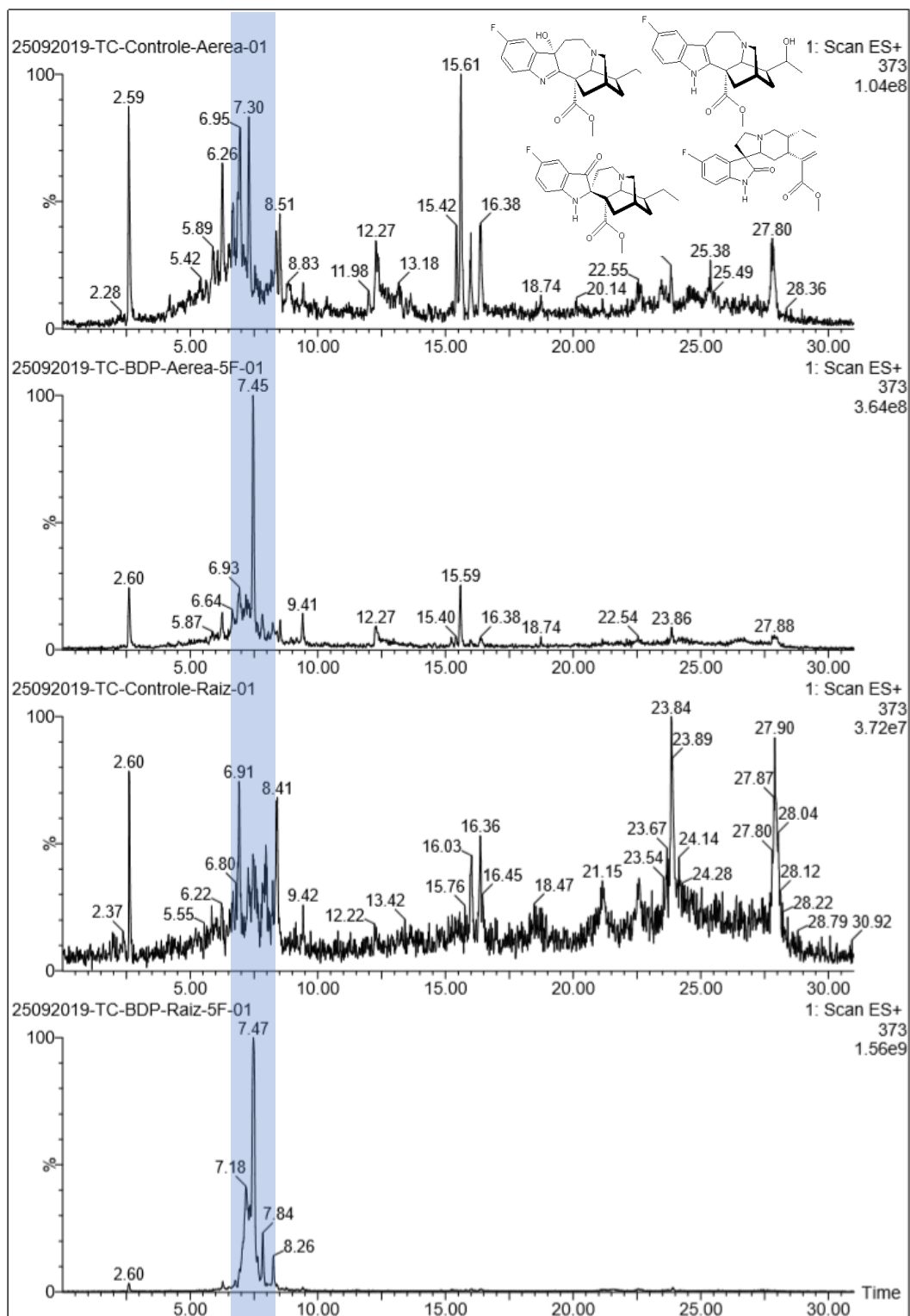


Figura 45. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 281 [M+H]⁺ referente ao alcaloide natural: ibogamina.

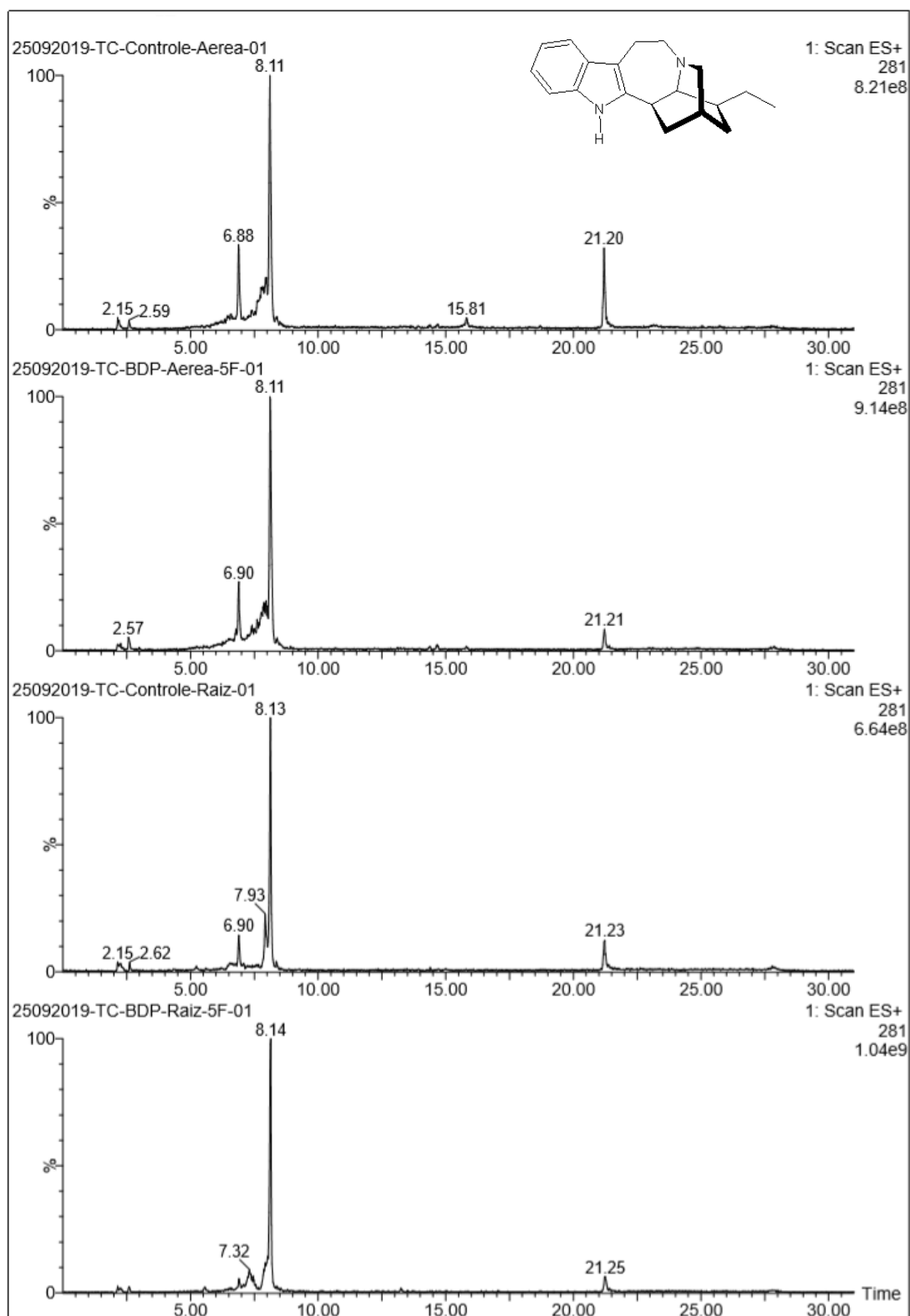


Figura 46. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 297 [M+H]⁺ referente ao alcaloide natural: noribogaina.

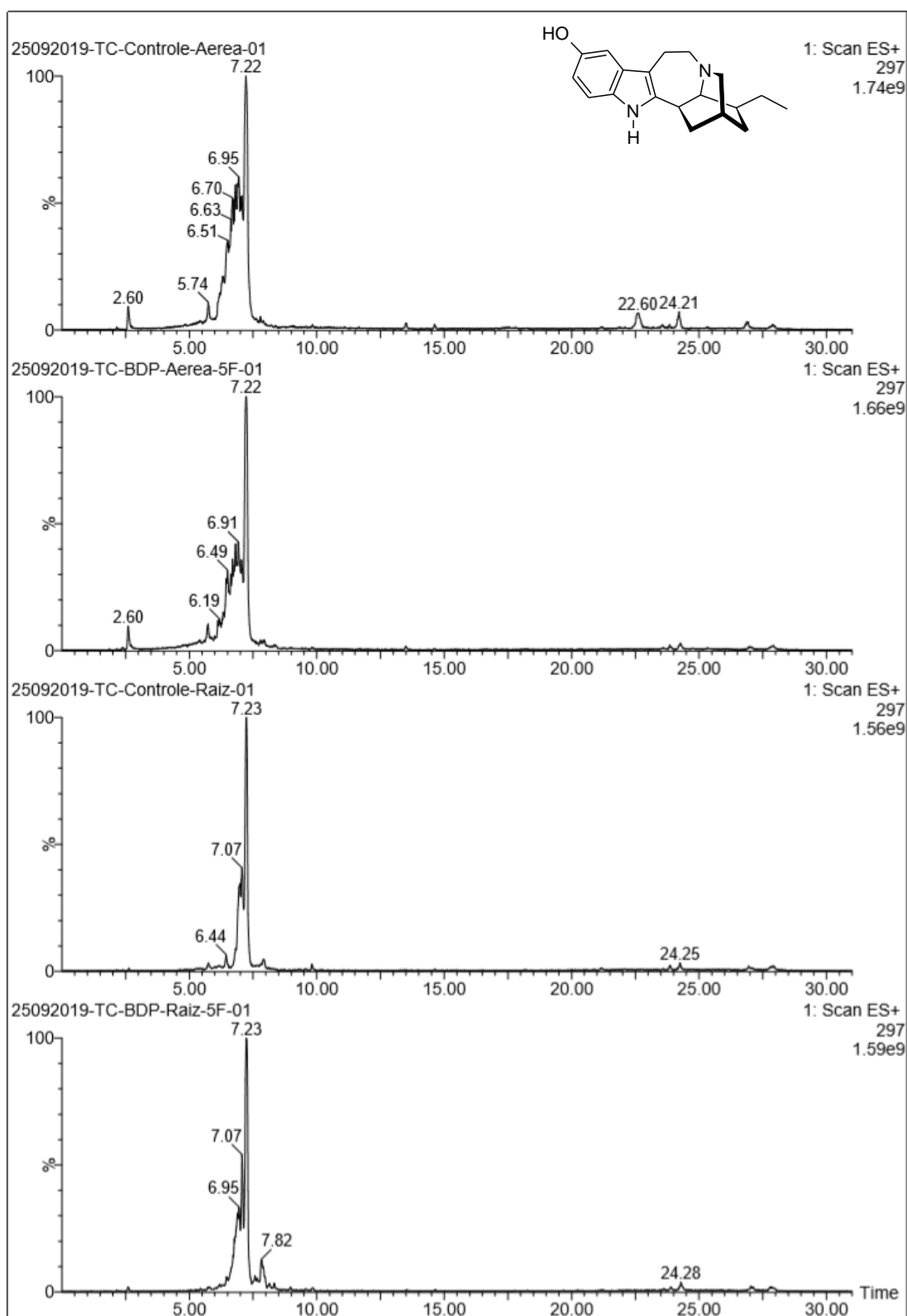


Figura 47. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 311 [M+H]⁺ referente ao alcaloide natural: ibogaina.

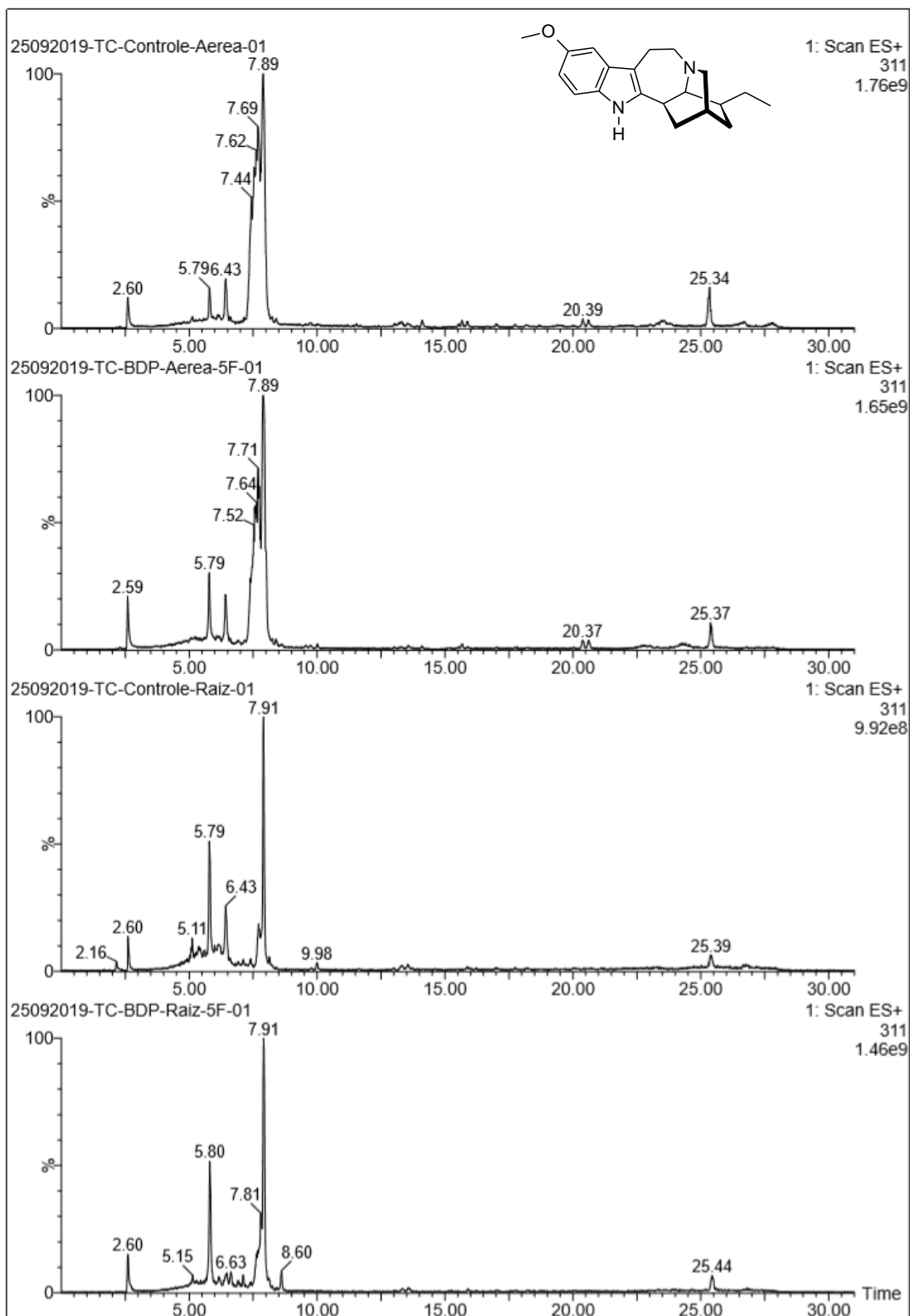


Figura 48. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 299 [M+H]⁺ referente ao alcaloide análogo: ibogamina fluorada.

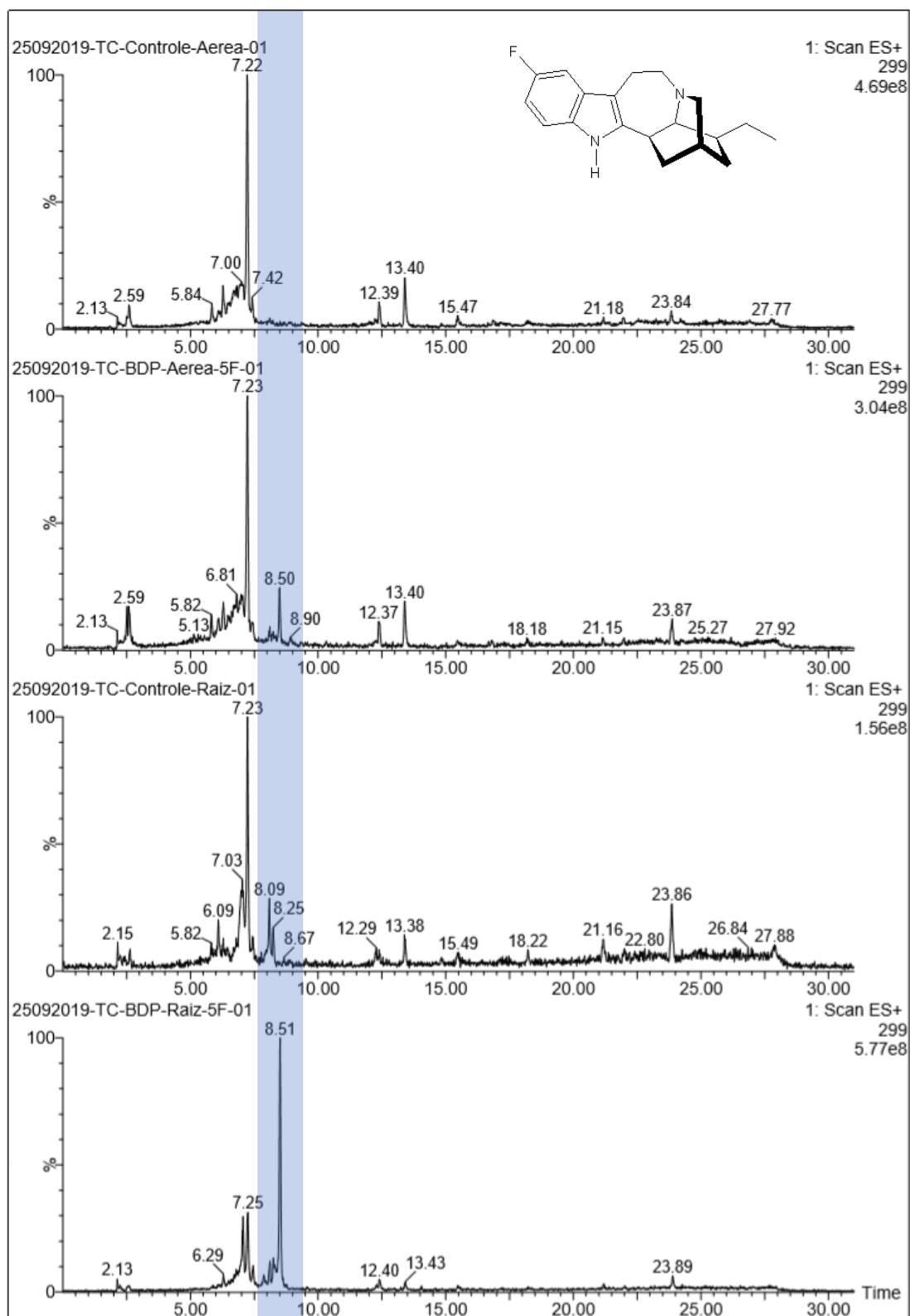


Figura 49. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 371 [M+H]⁺ referente ao alcaloide natural: hidroxindolenina 3-hidroxicoronaridina.

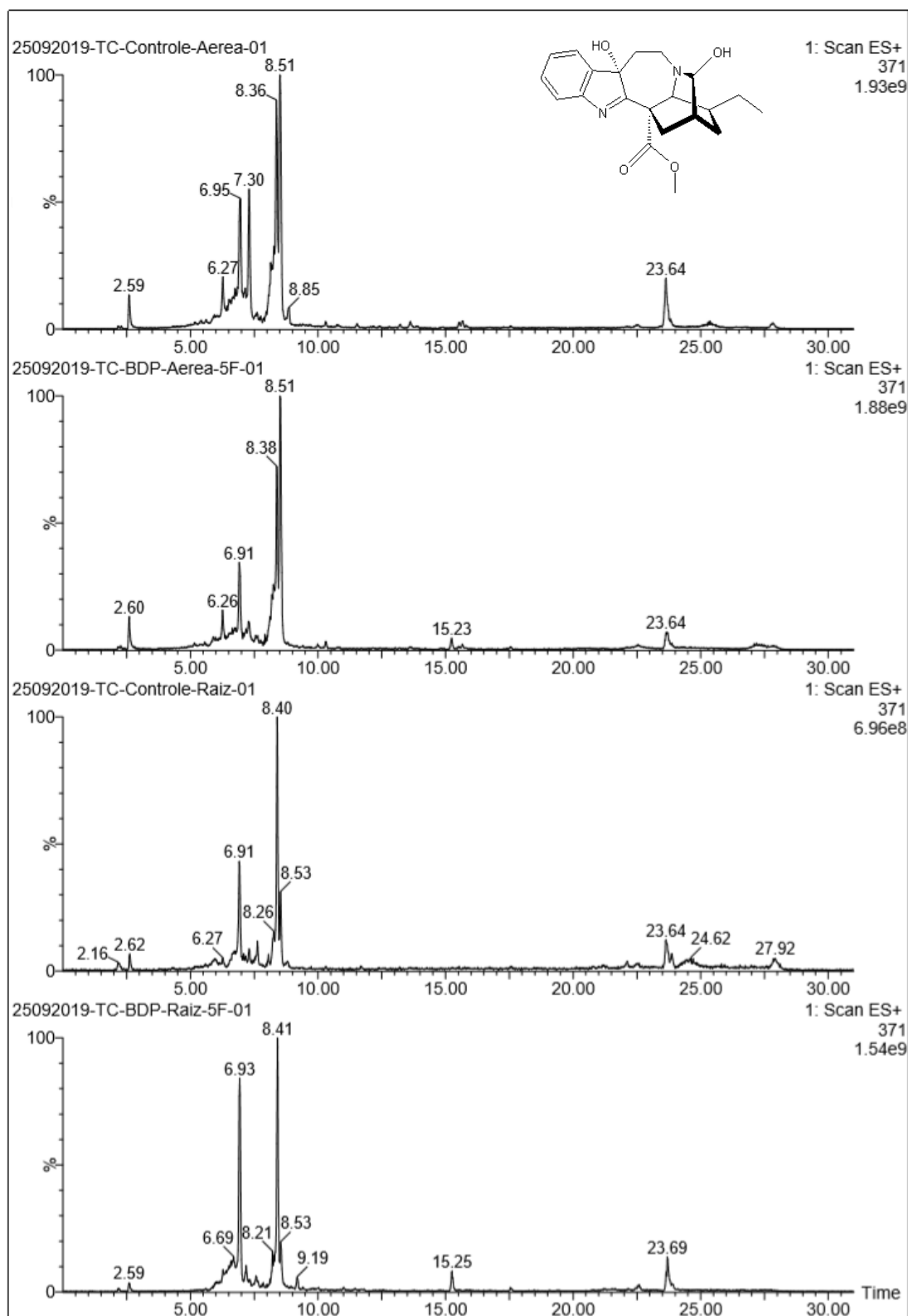


Figura 50. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 401 [M+H]⁺ referente aos alcaloides naturais: hidroxiindolenina voacristina e montanina.

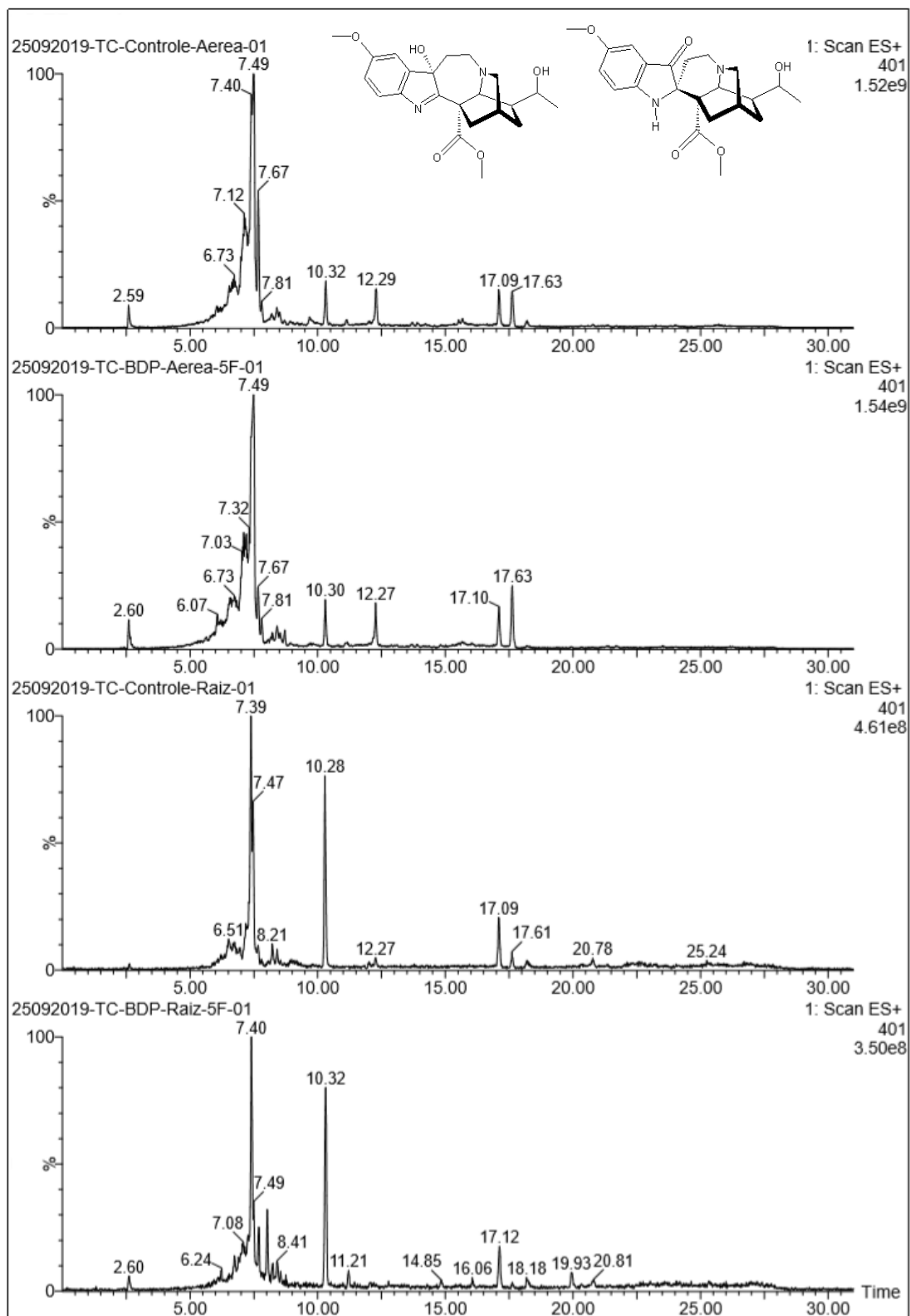


Figura 51. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 389 $[M+H]^+$ referente aos alcaloides análogos: hidroxindolenina 3-hidroxicoronaridina e montanina fluorados.

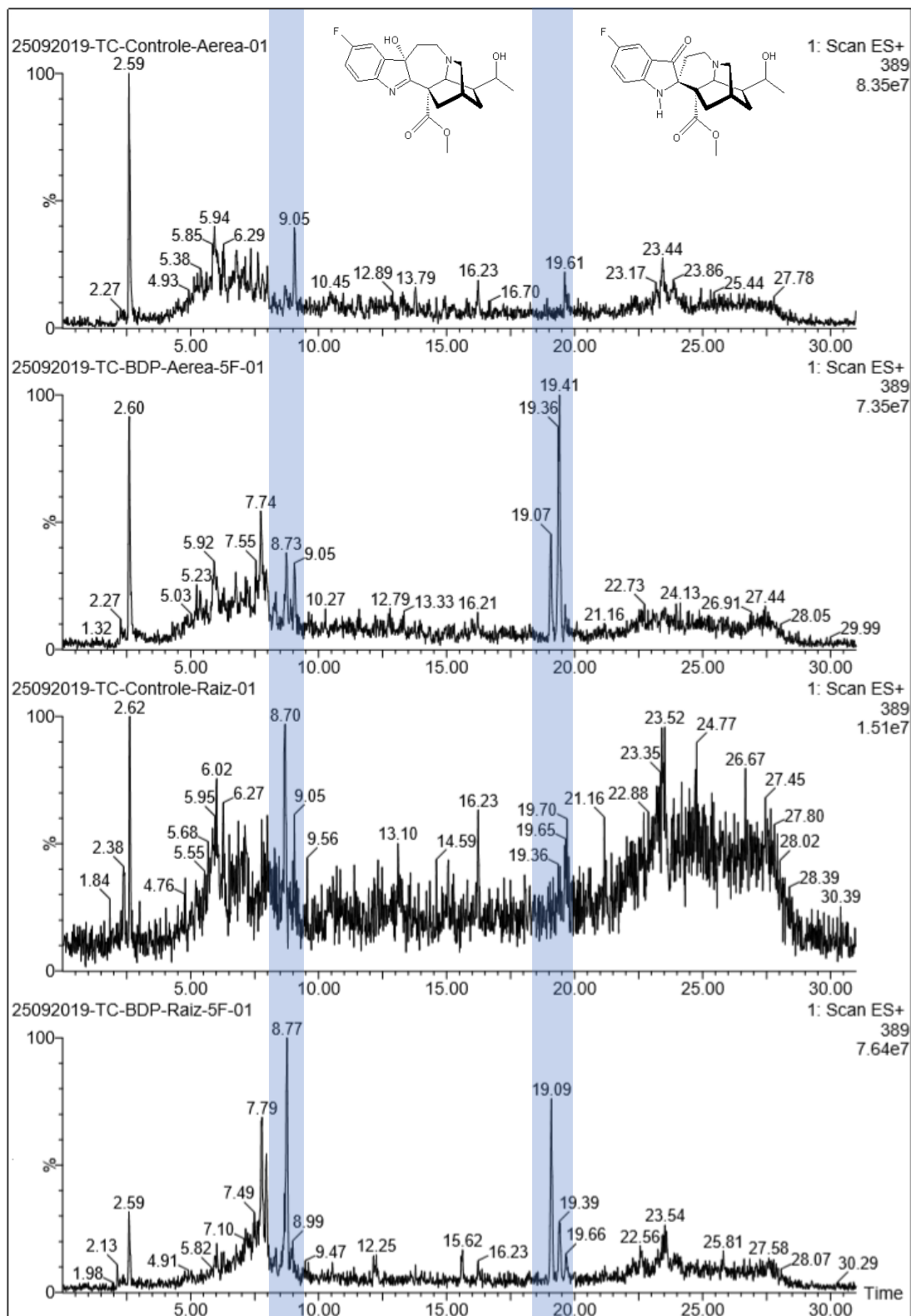


Figura 52. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 353 [M+H]⁺ referente aos alcaloides naturais: 3-oxo-coronaridina e vobasina.

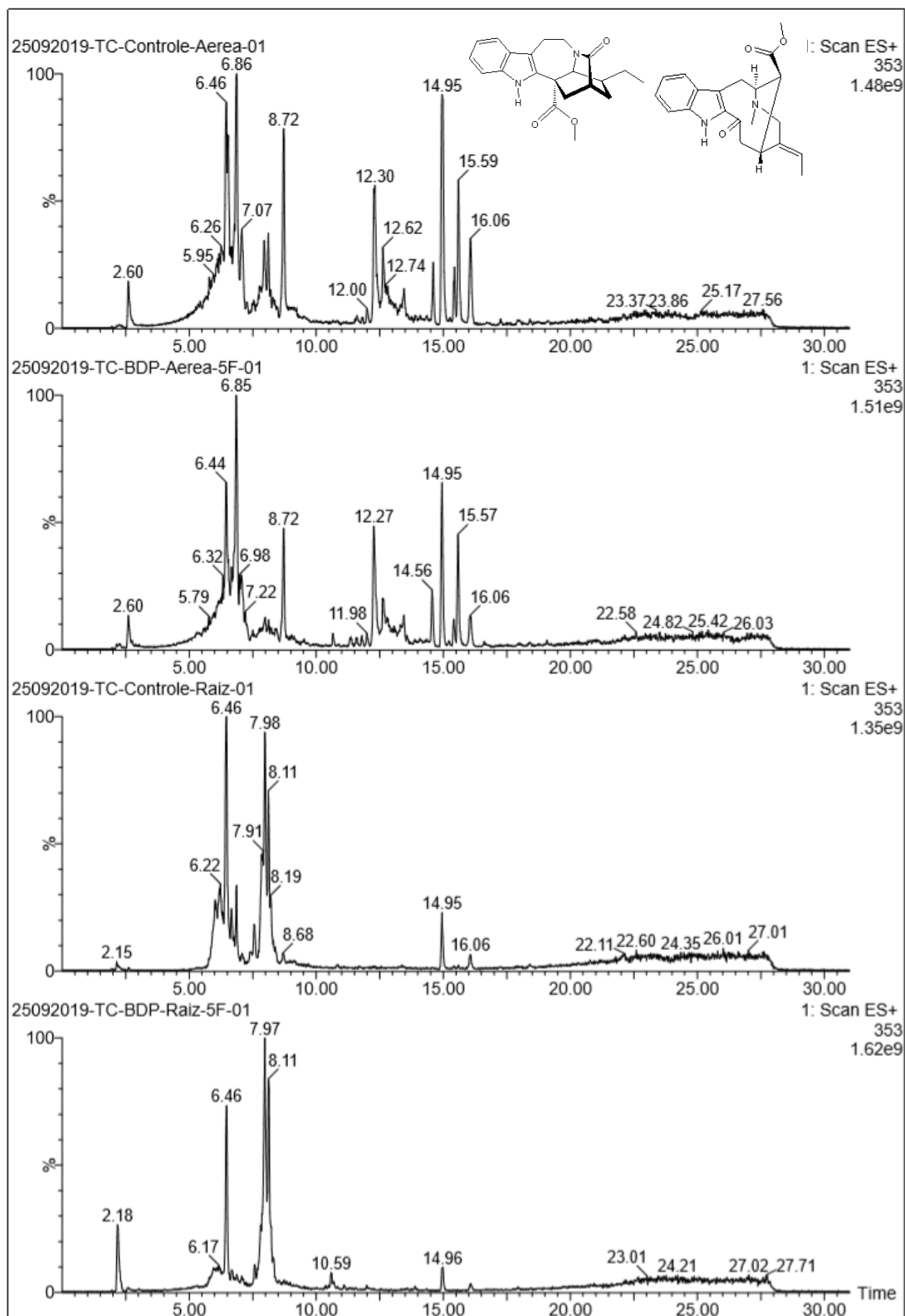


Figura 53. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 371 $[M+H]^+$ referente aos alcaloides análogos: 3-oxo-coronaridina e vobasina fluorados.

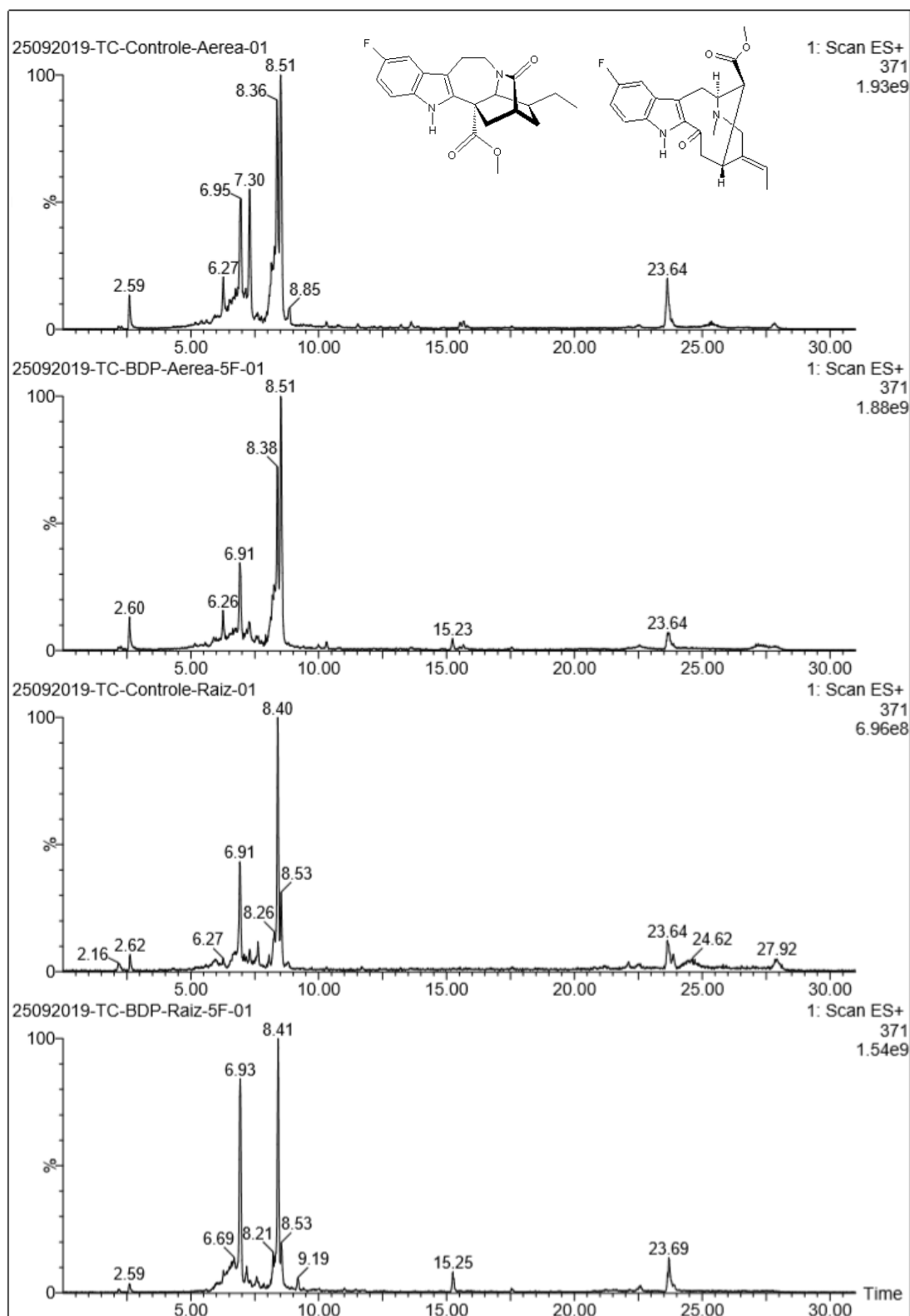


Figura 54. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 367 [M+H]⁺ referente ao alcaloide natural: voacholatina.

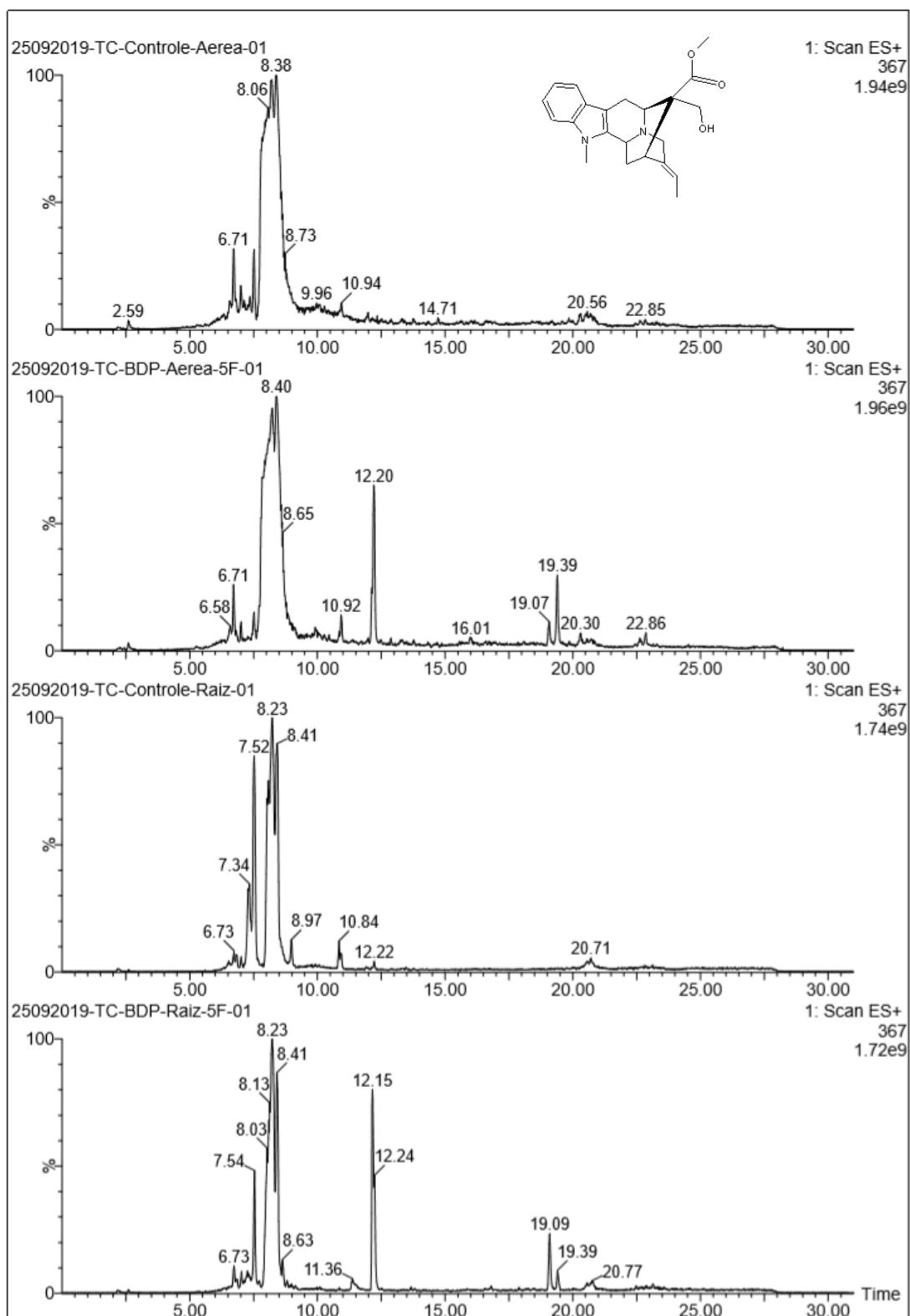


Figura 55. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 385 [M+H]⁺ referente ao alcaloide análogo: voacholatina fluorada.

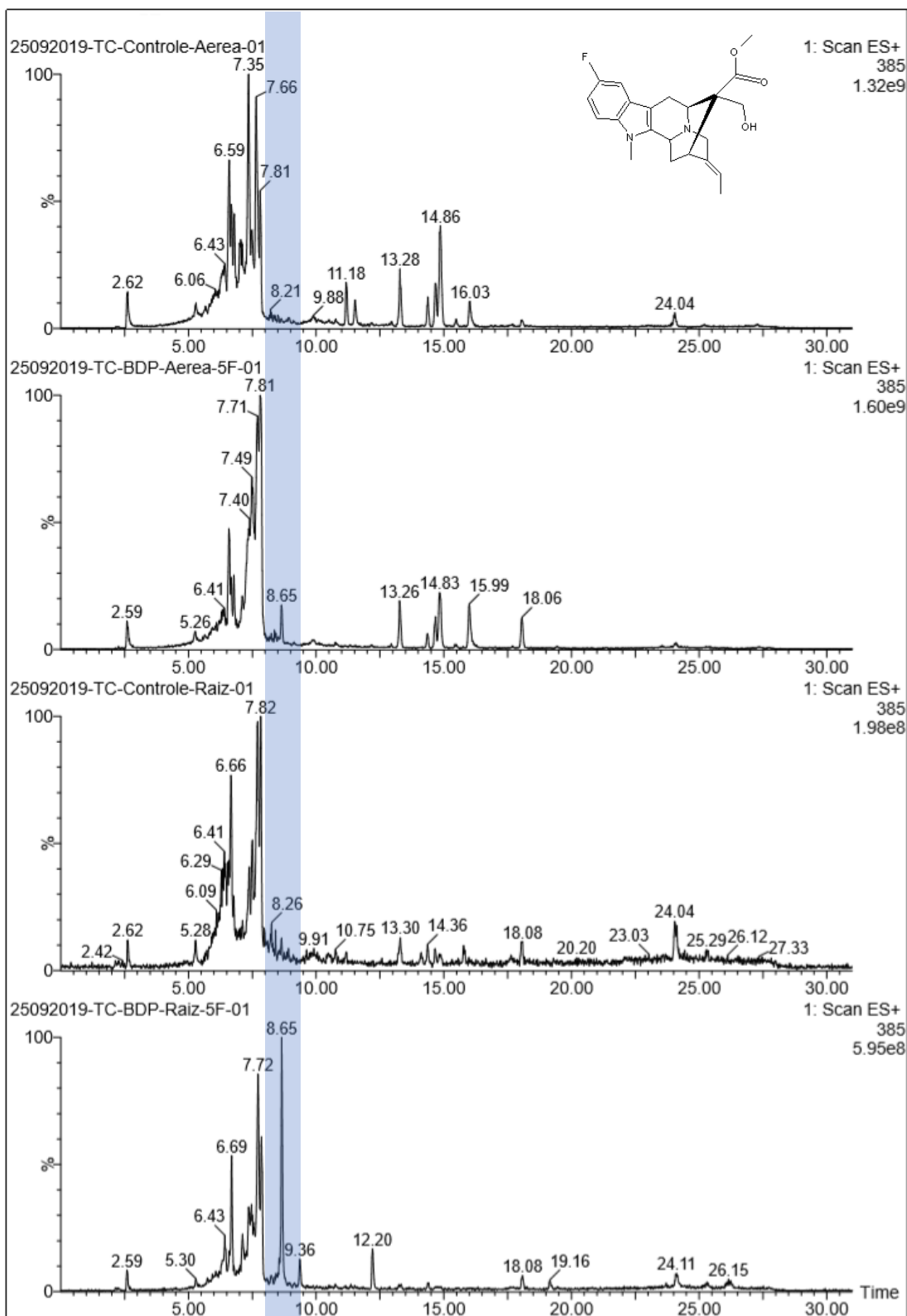


Figura 56. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 412 [M+H]⁺ referente ao alcaloide natural: 12-metoxi-n-metil-voachalotina.

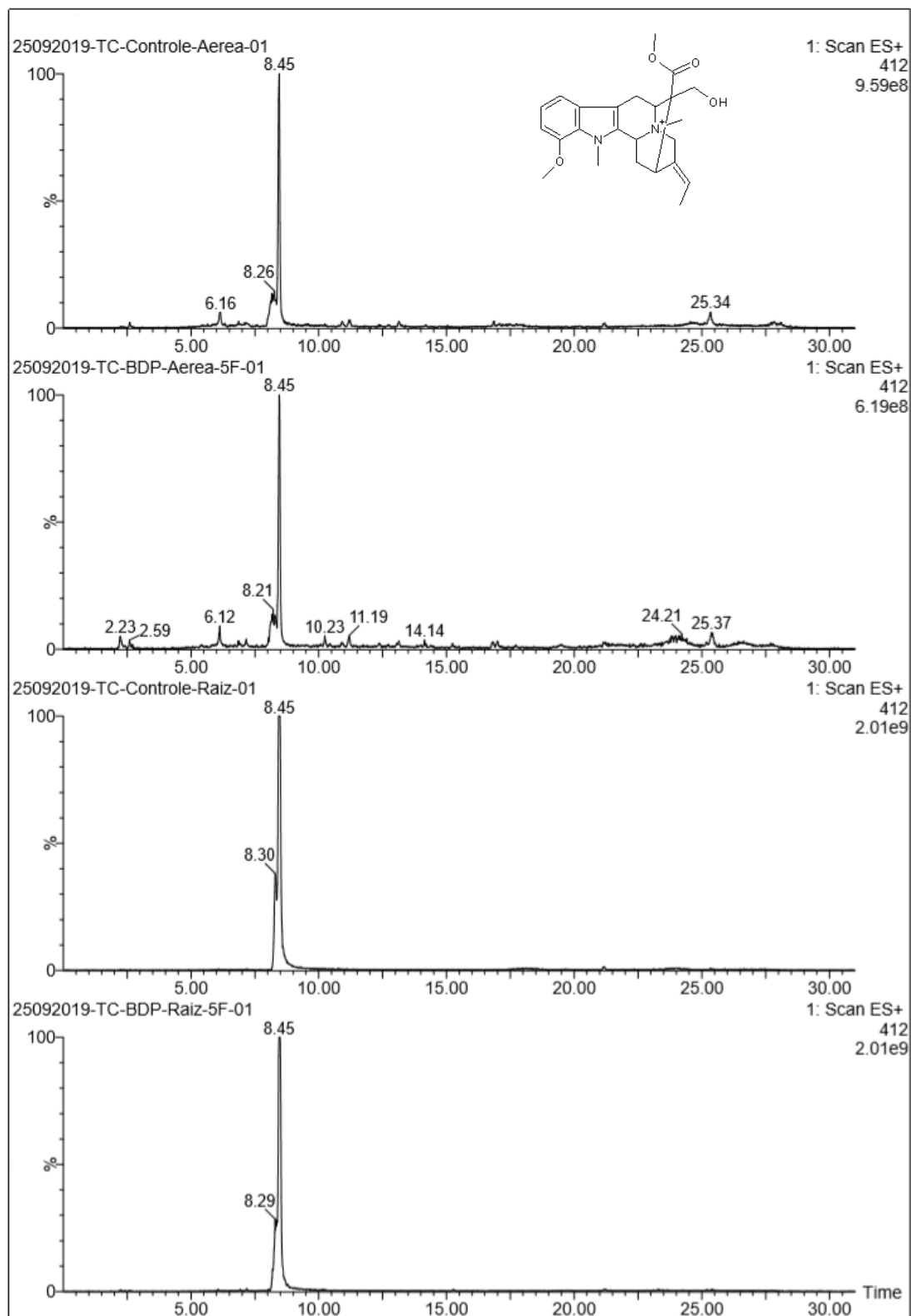


Figura 57. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 430 $[M+H]^+$ referente ao alcaloide análogo: 12-metoxi-n-metil-voachalotina fluorada.

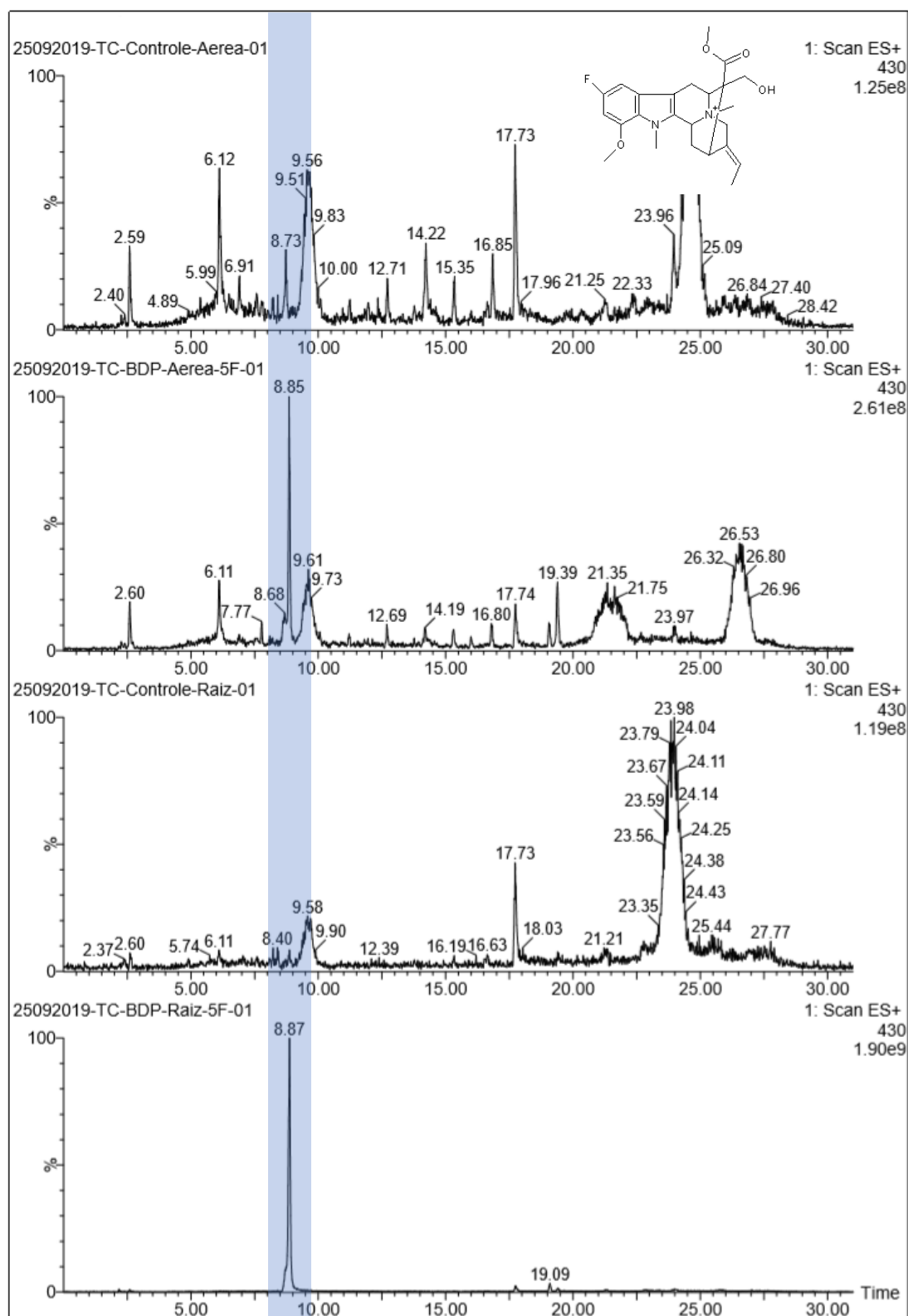


Figura 58. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 313 [M+H]⁺ referente ao alcaloide natural: voafinina.

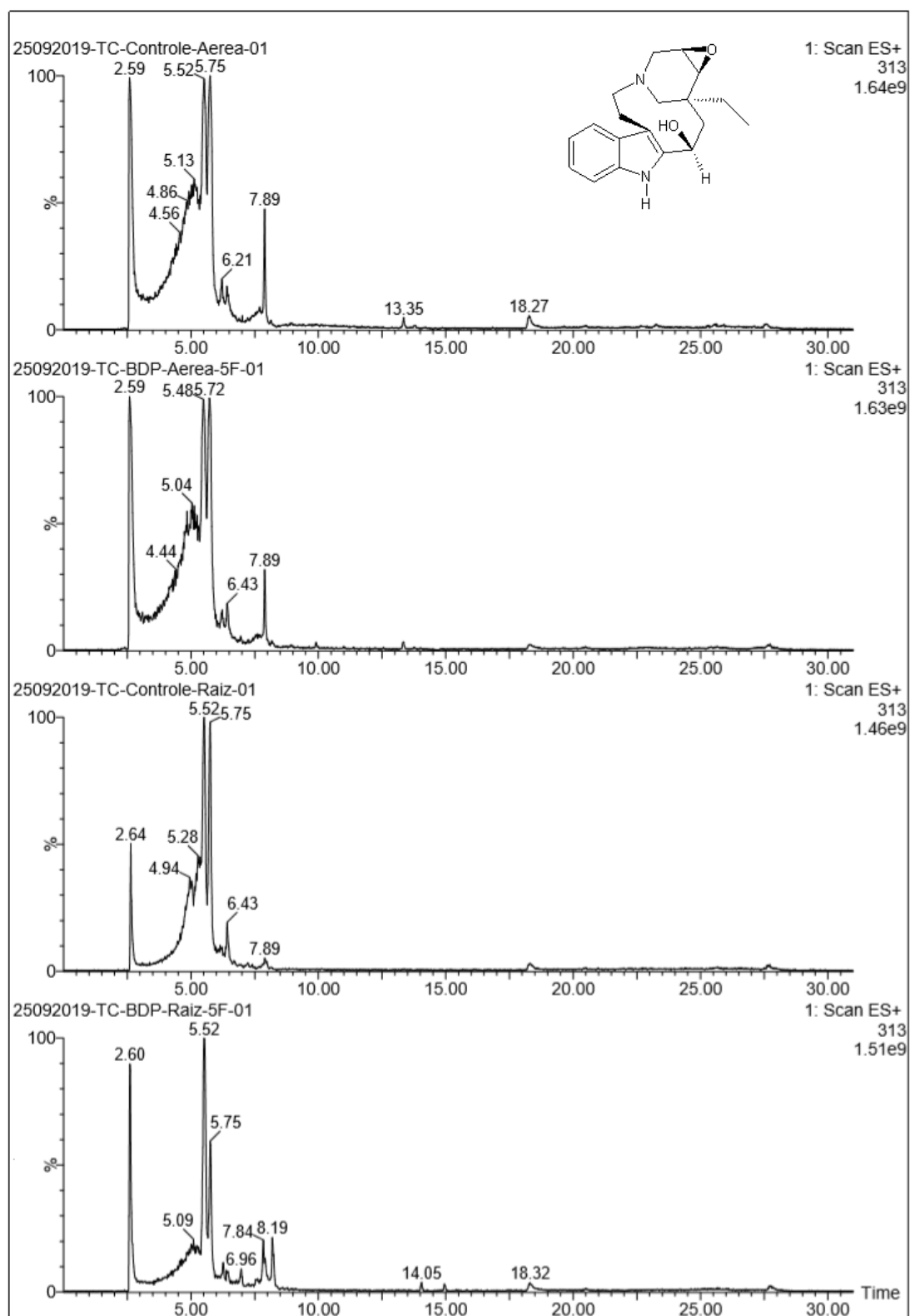


Figura 59. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 331 [M+H]⁺ referente ao alcaloide análogo: voafinina fluorada.

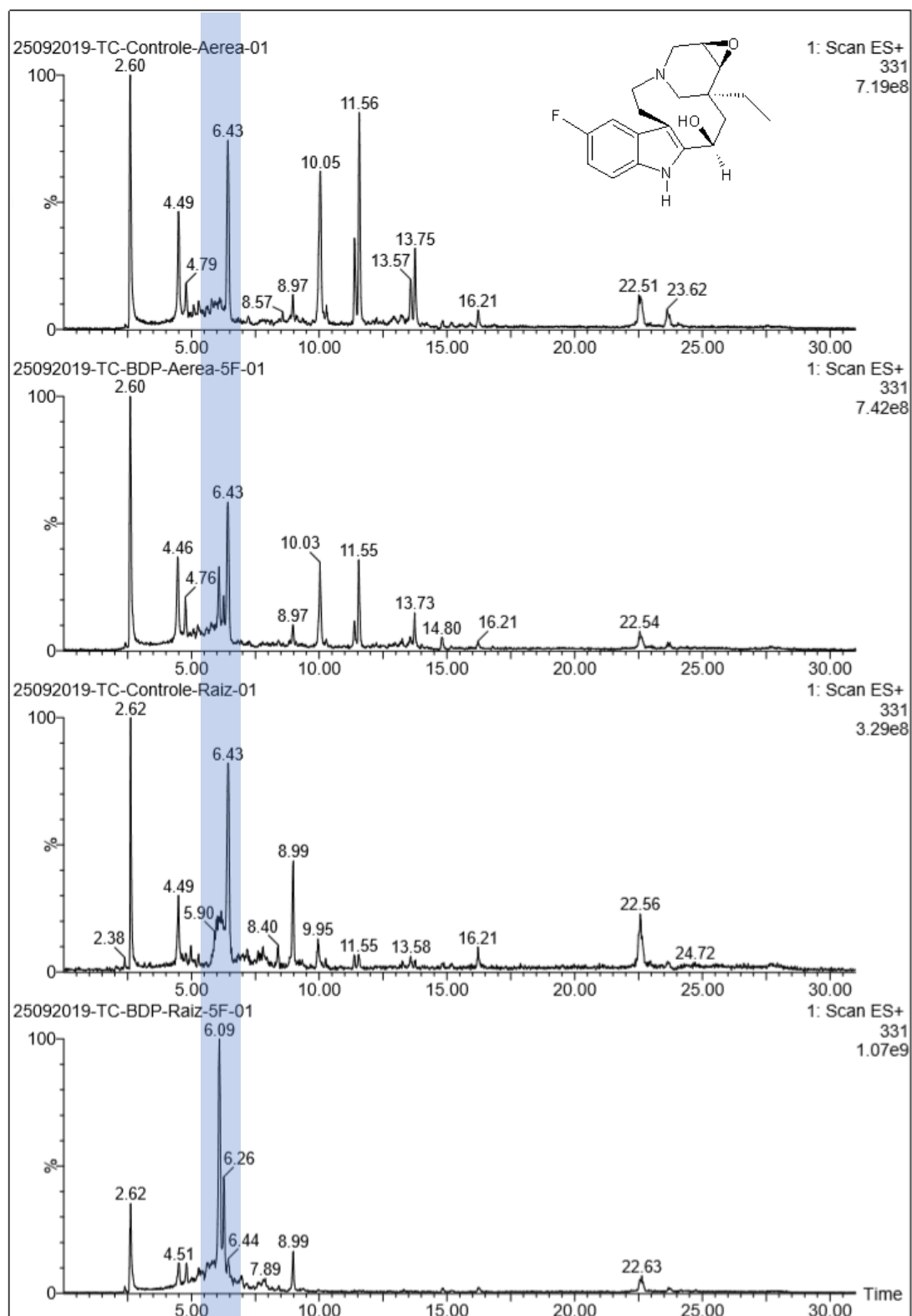


Figura 60. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 325 [M+H]⁺ referente aos alcaloides naturais: tubotaiwina e 16-epi-affinina.

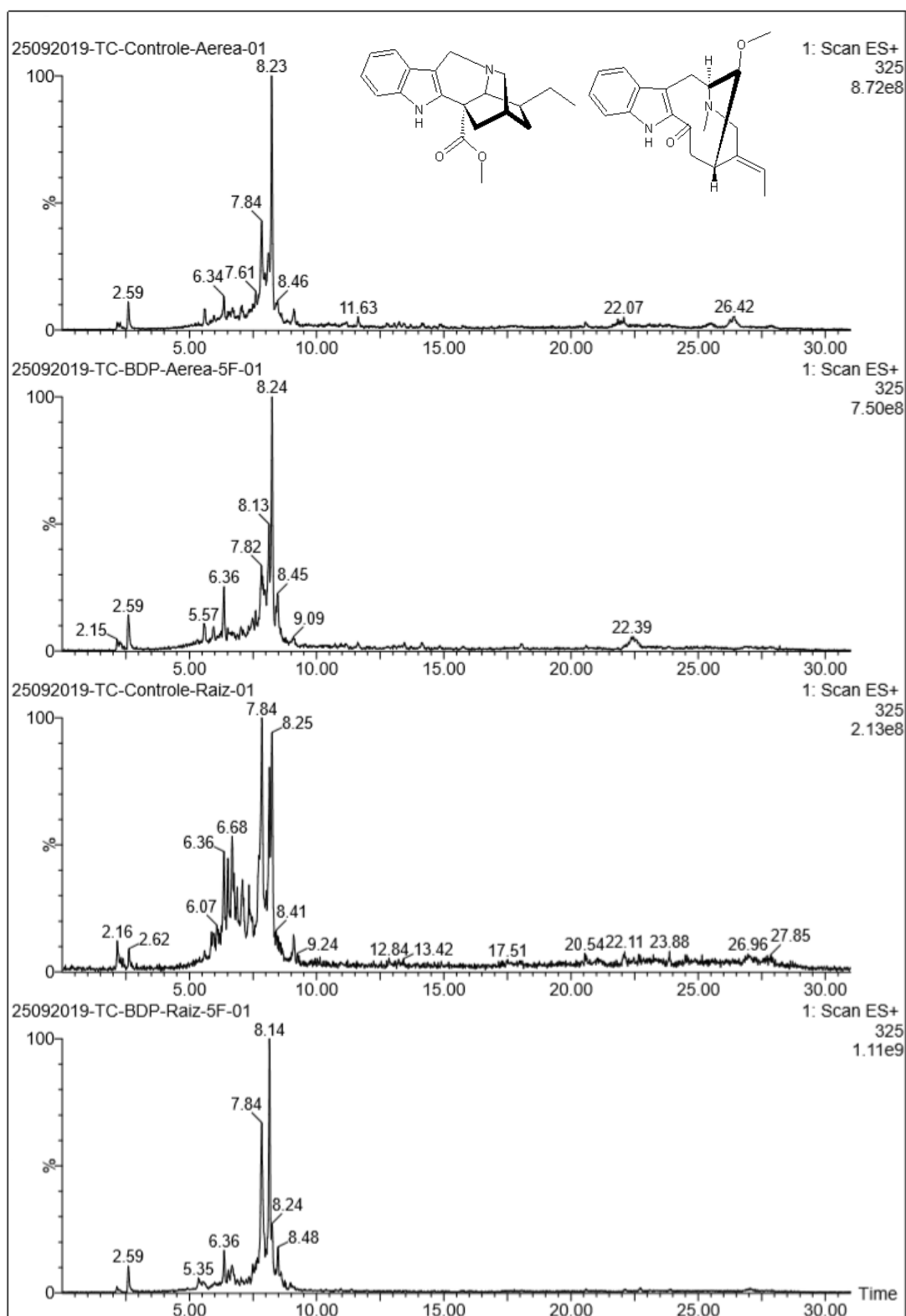


Figura 61. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 343 $[M+H]^+$ referente aos alcaloides análogos: tubotaiwina e 16-epi-affinina fluorada.

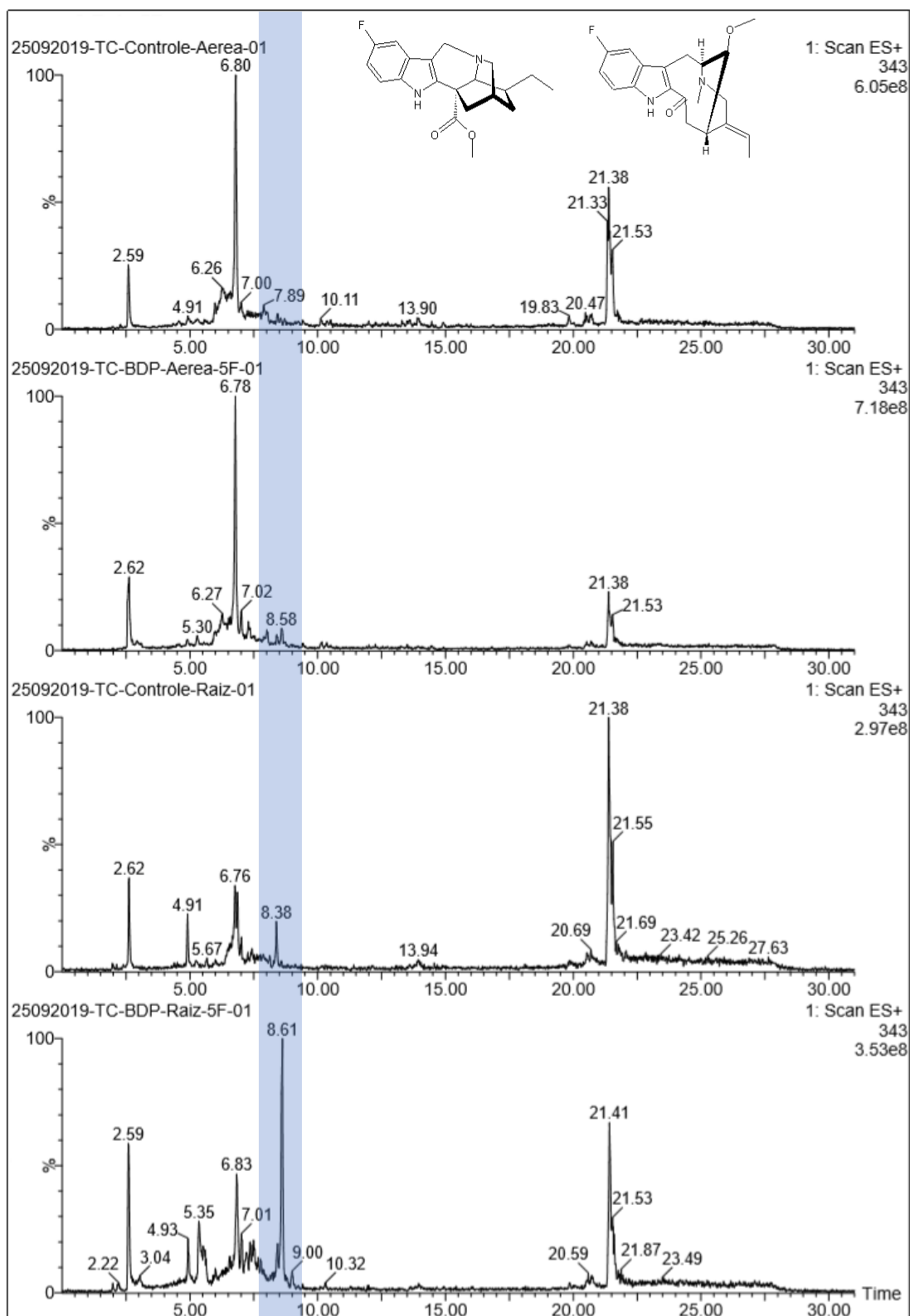


Figura 62. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 369 [M+H]⁺ referente ao alcaloide natural: isovoacangina.

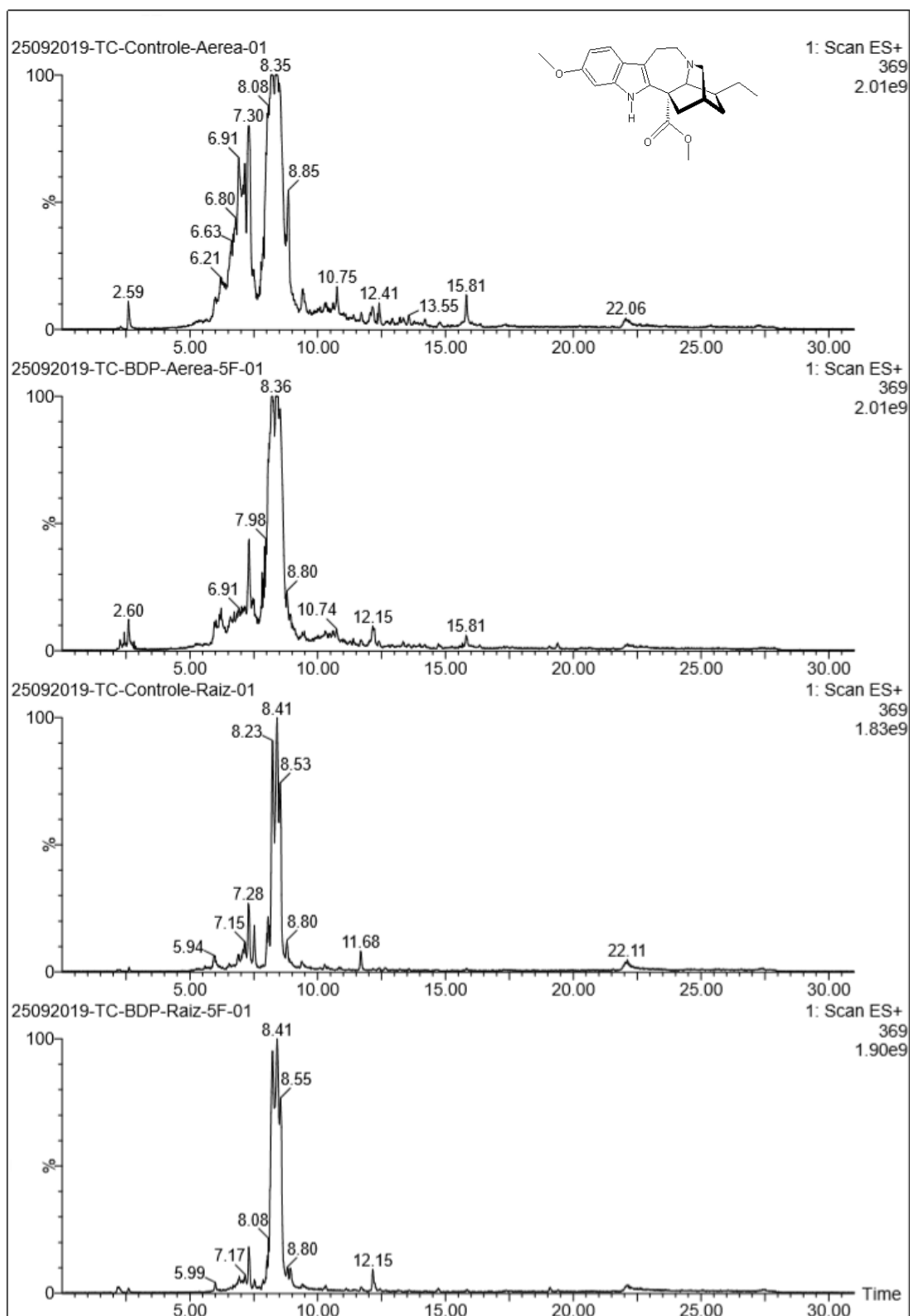


Figura 63. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 387 [M+H]⁺ referente ao alcaloide análogo: isovoacangina fluorada.

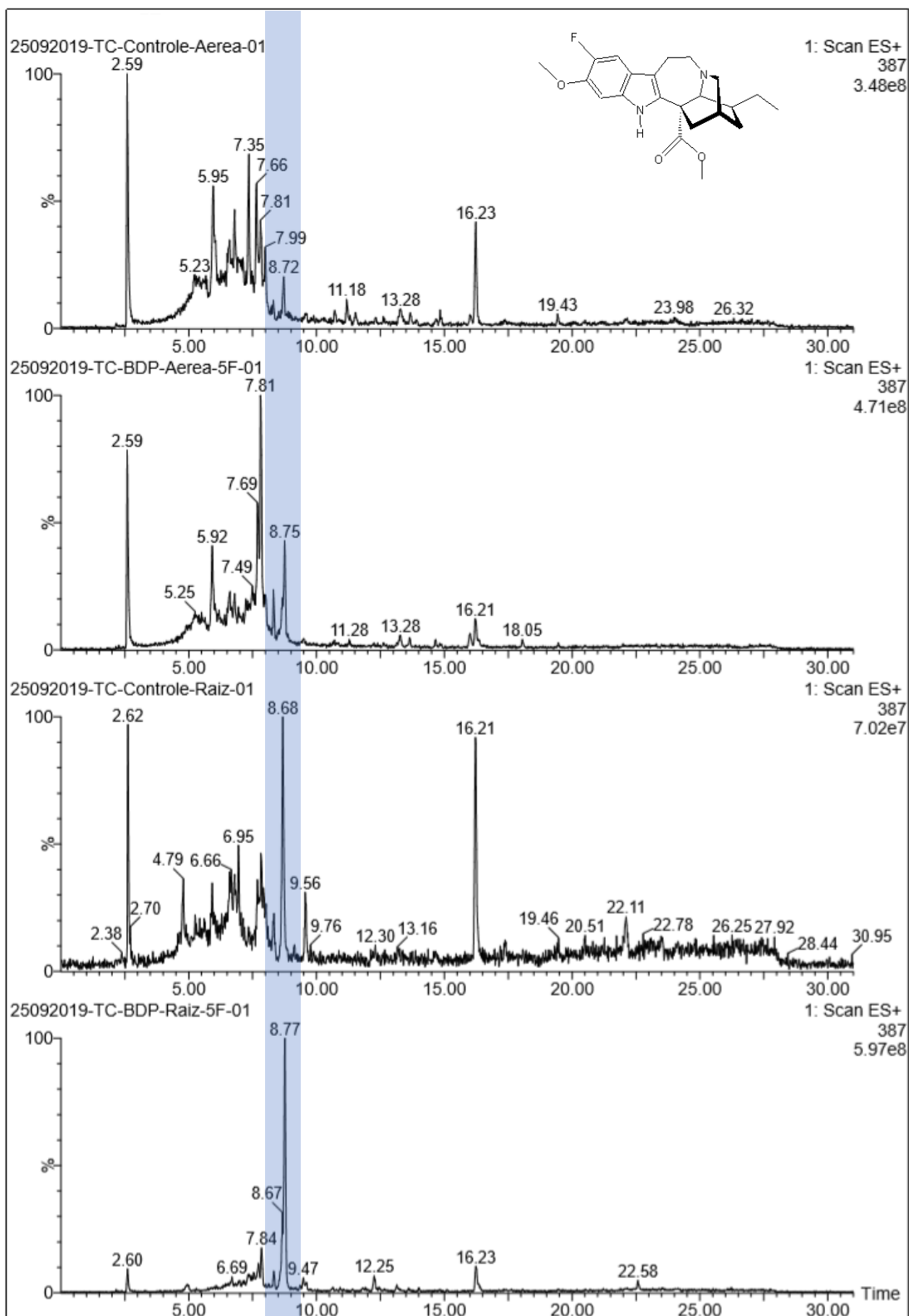


Figura 64. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 311 [M+H]⁺ referente ao alcaloide natural: tabernantina.

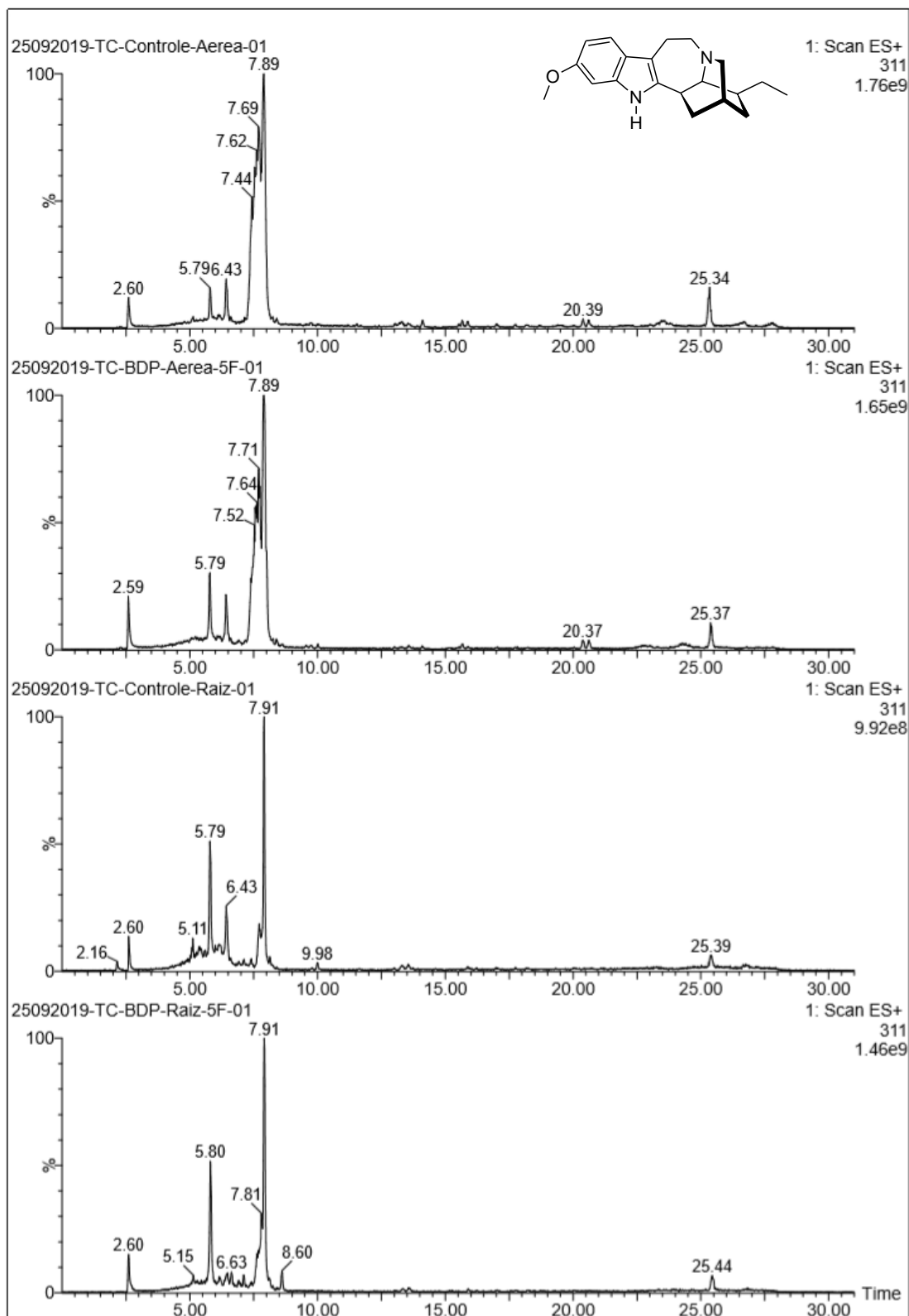


Figura 65. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 329 [M+H]⁺ referente ao alcaloide análogo: tabernantina fluorada.

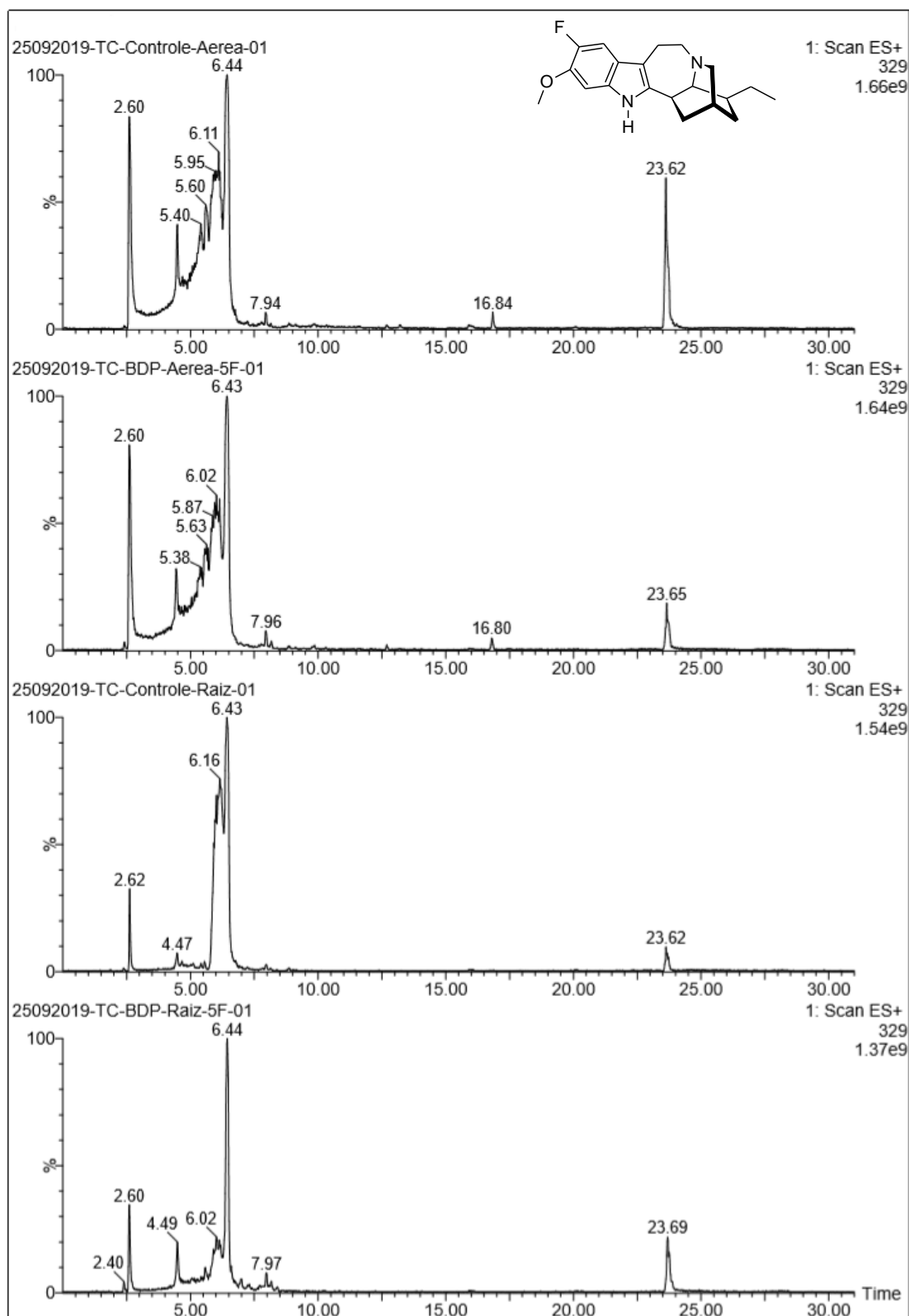


Figura 66. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 337 [M+H]⁺ referente ao alcaloide natural: catarantina.

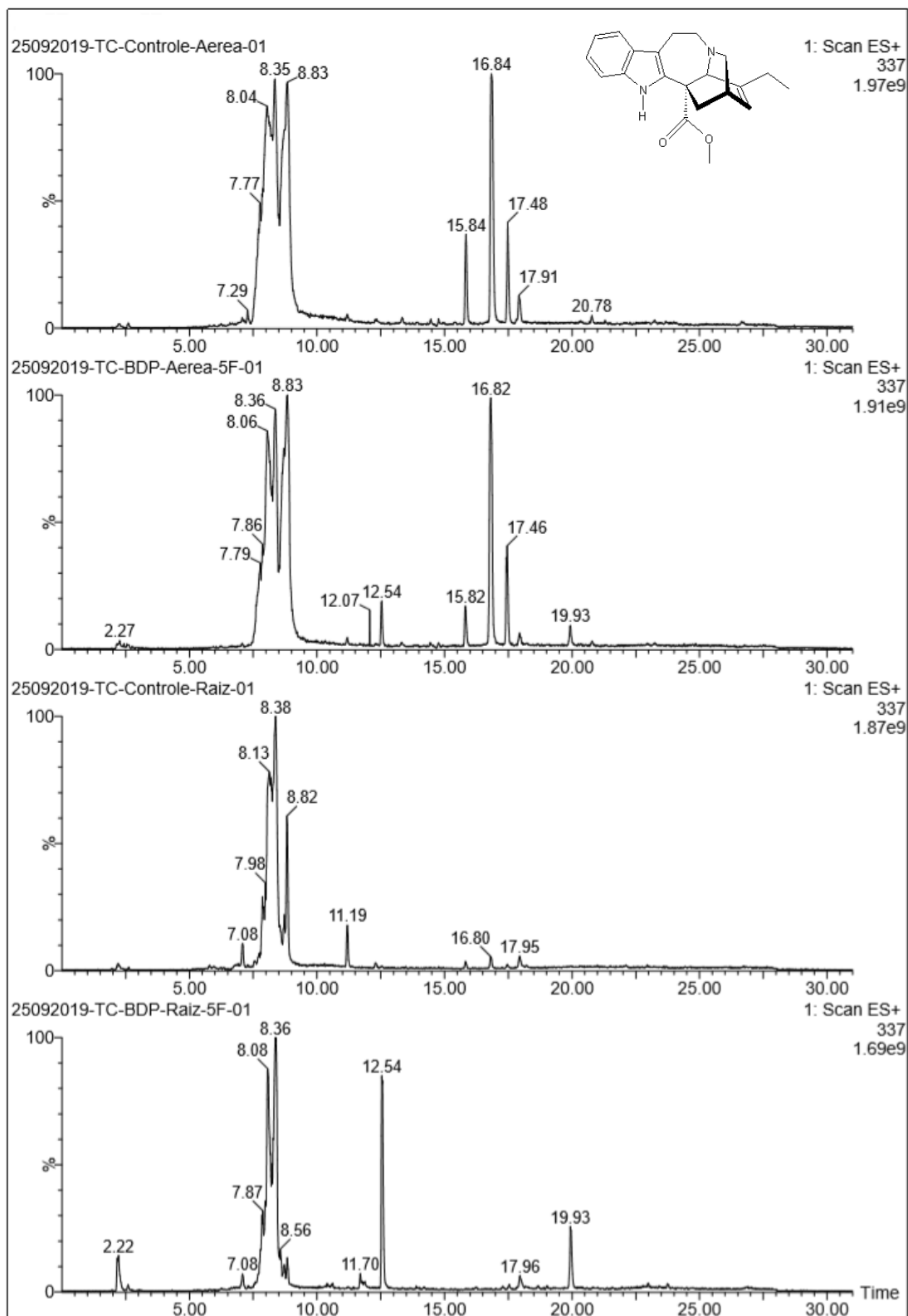


Figura 67. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 355 [M+H]⁺ referente ao alcaloide análogo: catarantina fluorada.

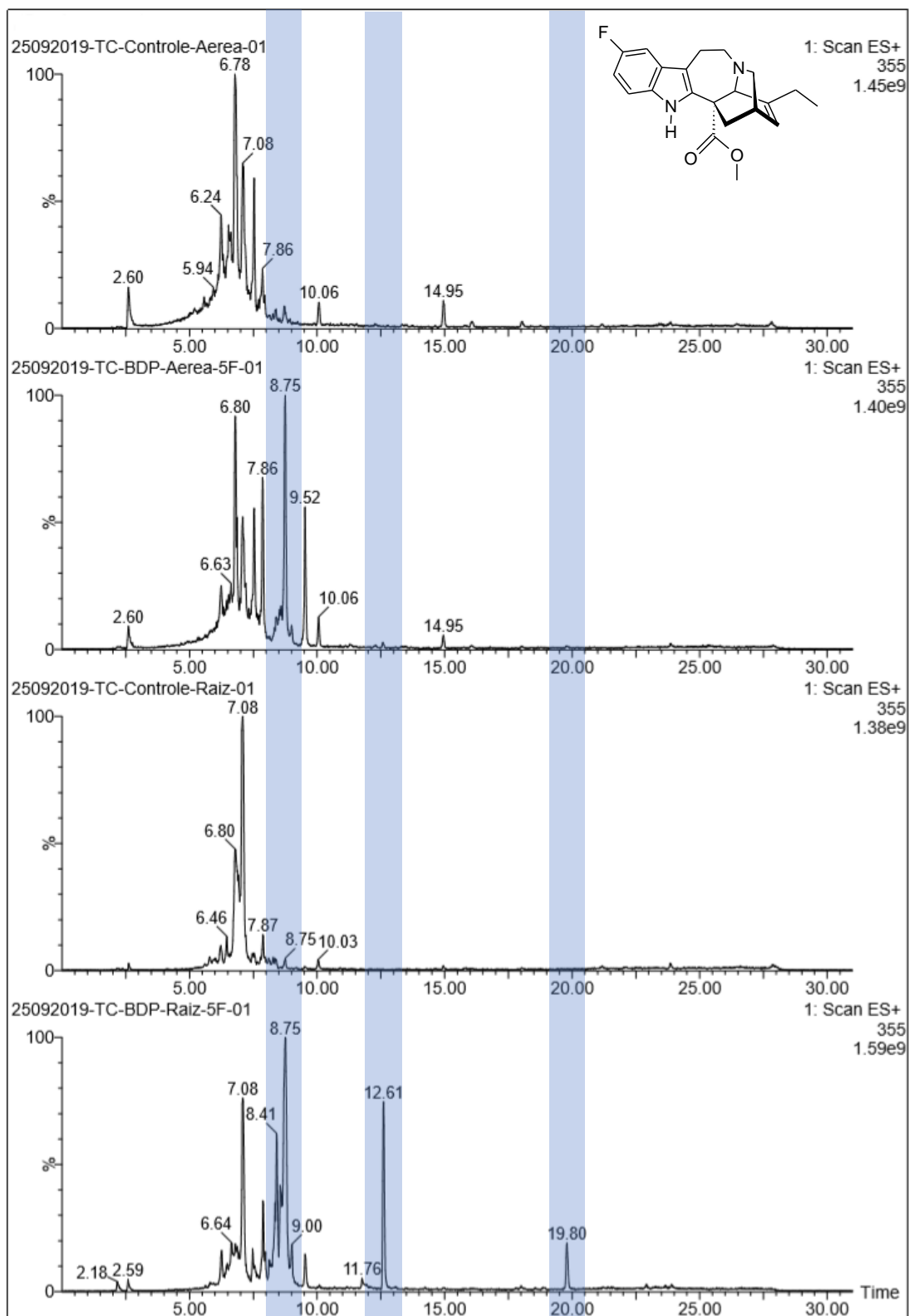


Figura 68. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 297 [M+H]⁺ referente ao alcaloide natural: 19(S)-hydroxiibogamina.

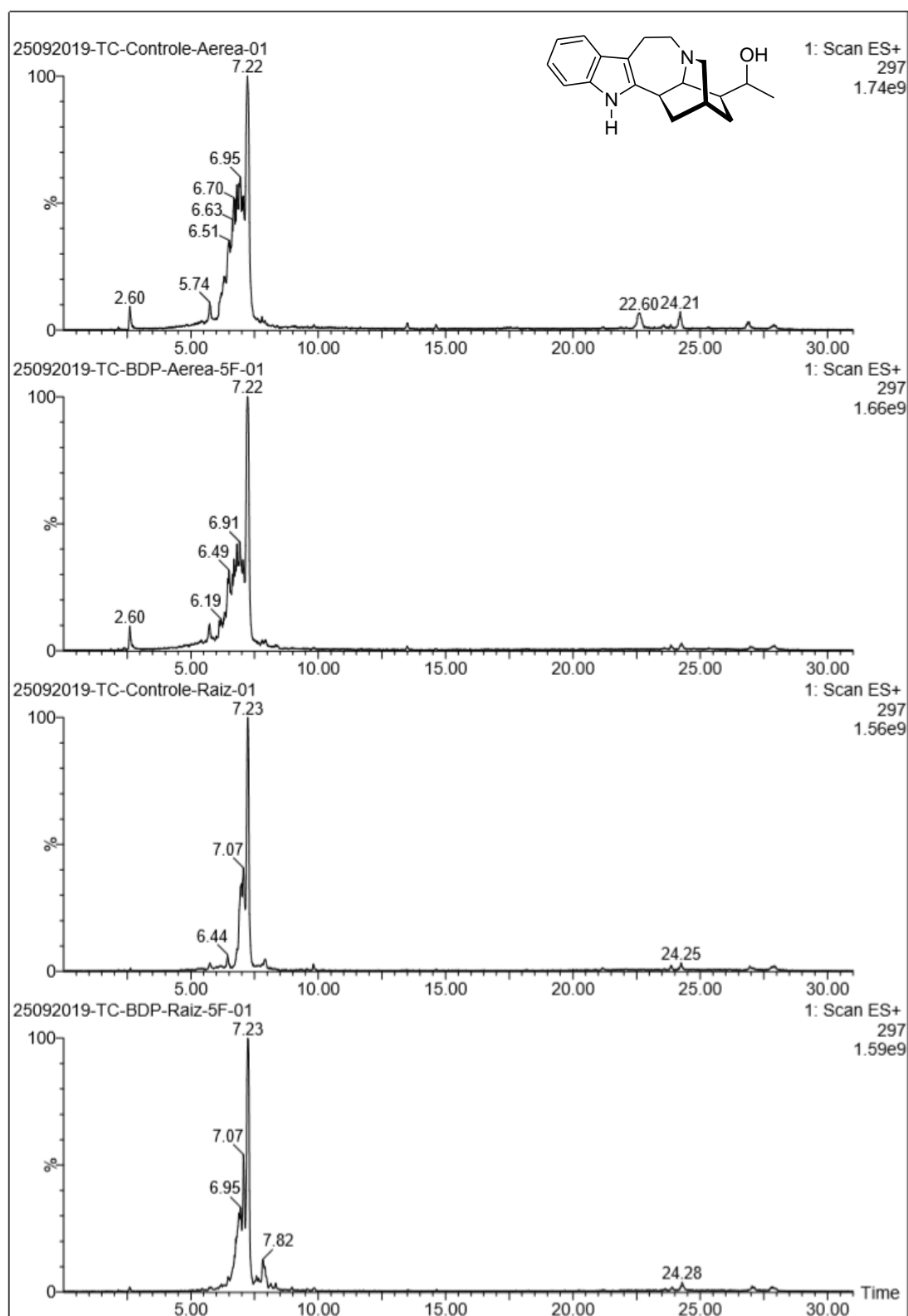


Figura 69. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 315 [M+H]⁺ referente ao alcaloide análogo: 19(S)-hydroxiibogamina fluorada.

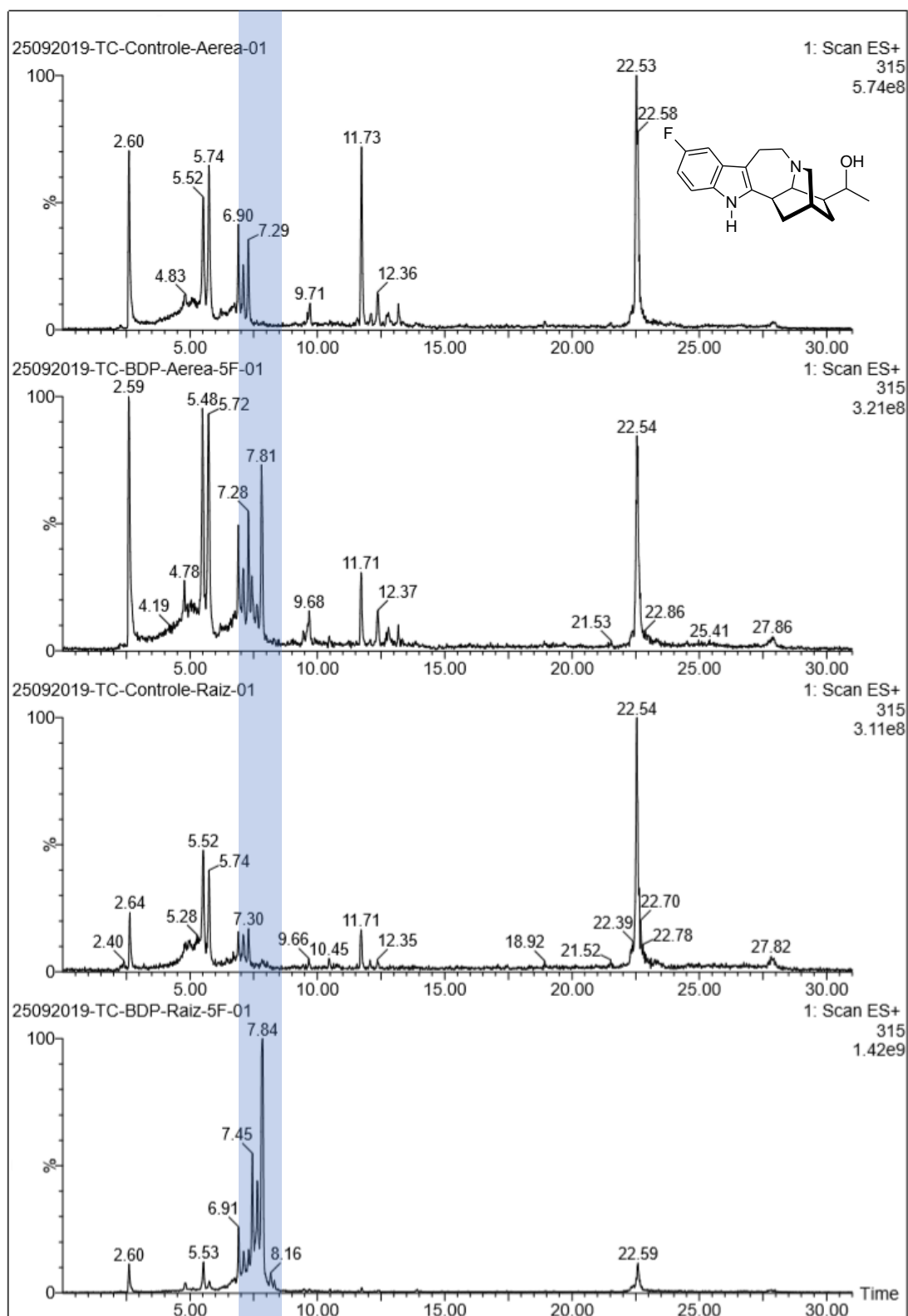


Figura 70. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 309 [M+H]⁺ referente ao alcaloide natural: affinisina.

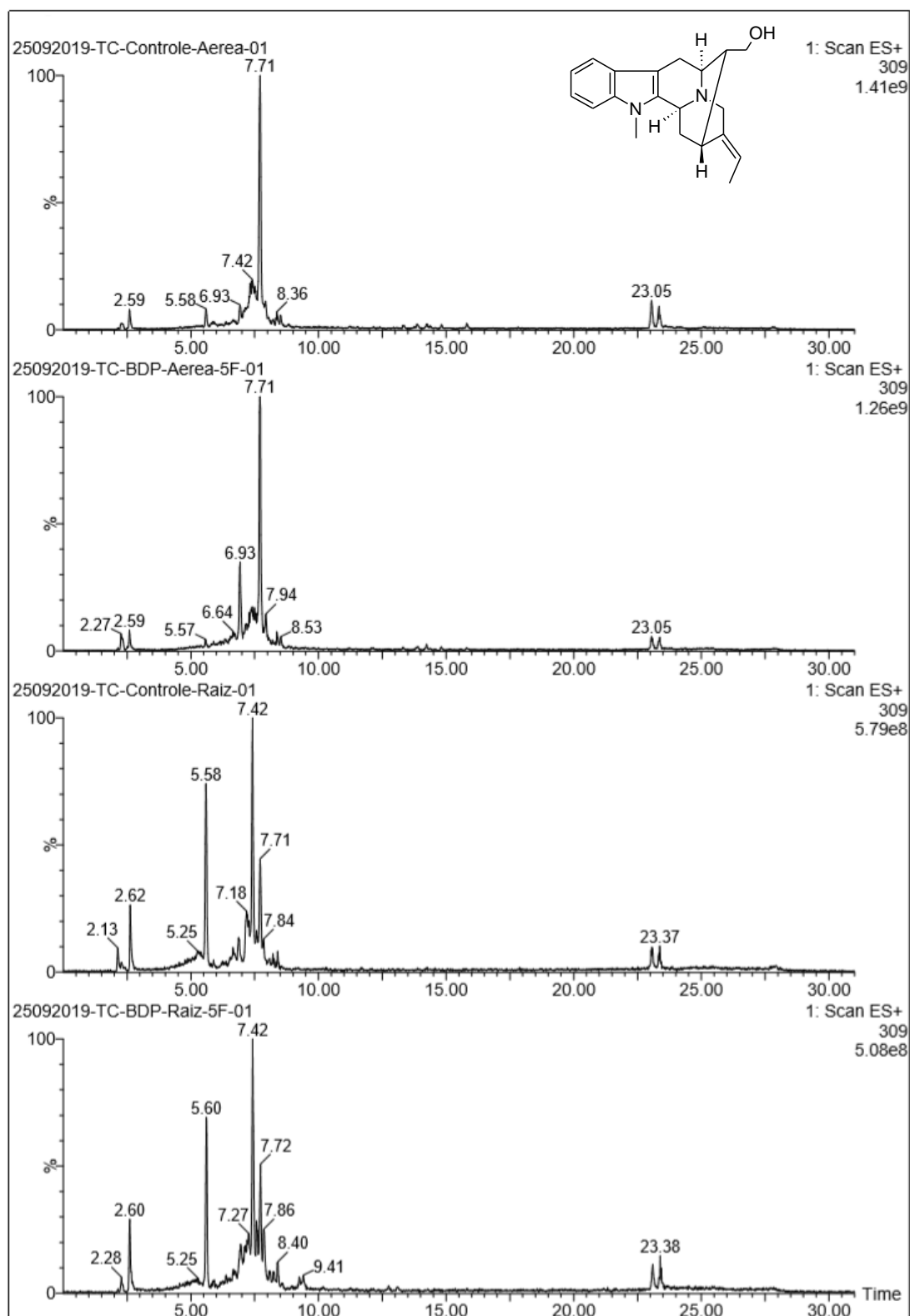


Figura 71. Cromatograma do extrato oriundo de plântulas. Íon 327 [M+H]⁺ referente ao alcaloide análogo: affinisina fluorada.

