

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

Adriana Zambenedetti Gehm

Estudo fitoquímico de *Condalia buxifolia* Reissek: isolamento, determinação estrutural, atividade antimicrobiana, determinação da configuração absoluta e modificações estruturais do alcaloide Condalina-A

Santa Maria, RS
2016

Adriana Zambenedetti Gehm

Estudo fitoquímico de *Condalia buxifolia* Reissek: isolamento, determinação estrutural, atividade antimicrobiana, determinação da configuração absoluta e modificações estruturais do alcaloide Condalina-A

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

Orientador: Prof. Dr. Ademir Farias Morel

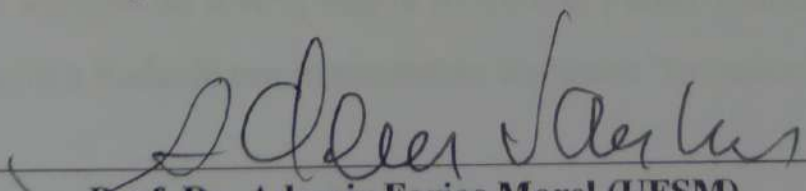
Santa Maria, RS
2016

Adriana Zambenedetti Gehm

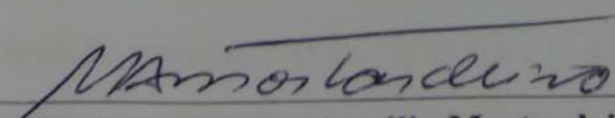
Estudo fitoquímico de *Condalia buxifolia* Reissek: isolamento, determinação estrutural, atividade antimicrobiana, determinação da configuração absoluta e modificações estruturais do alcaloide Condalina-A

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Química, área de Química Orgânica, da Universidade Federal de Santa Maria, como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Química**.

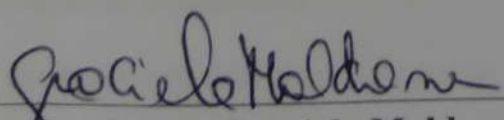
Aprovada em 29 de fevereiro de 2016:



Prof. Dr. Ademir Farias Morel (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Prof. Dr. Marco Aurélio Mostardeiro (UFSM)



Prof. Dr. Graciela Maldaner (URCAMP)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Erico e Arlete, e aos meus irmãos Enrique e Eduardo por todo amor, carinho, incentivo e dedicação.

Ao Prof. Dr. Ademir Farias Morel, pela orientação, paciência e confiança.

A Prof^ª. Dr^ª. Ionara Irion Dalcol pela coorientação e sugestões no exame de qualificação.

Ao Prof. Dr. Marco Aurelio Mostardeiro e a Prof^ª. Dr^ª Graciela Maldaner pelas contribuições na melhoria deste trabalho como membros da banca examinadora.

A Dr^ª. Denise Russowski pela sua participação da banca de exame de qualificação.

Ao Dr. Ubiratan Flores pelas análises de cromatografia gasosa e líquida e espectros de massas de alta resolução.

Ao professor Robert Burrow pelas medidas de difração de raio-X.

Ao Marcelo Pedroso pela aprendizagem e amizade durante minha iniciação científica.

Aos colegas e amigos Adriano, Eveline, Daniela, Tanize, Sabrina, Frederico, Gabriele, Janice, Liziane, Lucimara, Janaína, Alessandra e Vanessa pela agradável e divertida convivência em laboratório.

Às amigas, Rayane, Camila, Chrys, Juliana, Katherine, Luana, Lucila, Morgana, Carine, Gabriela e Taís pelos momentos de descontração, risadas e conversas.

Aos colegas e amigos do RMN, Maria Angélica, Fábio, Paulo, Mário, André, Mariele, Tainara, Suelen, Kamila e Rafaela por entenderem algumas “invasões” de turno para processar espectros.

Aos funcionários do Departamento de Química, Ademir e Valéria pela atenção e incansável disposição em ajudar os alunos da Pós-Graduação em Química.

A todos os citados, obrigada pela amizade, e a todos (não citados) que de alguma maneira colaboraram para a realização deste trabalho.

À CAPES pelo suporte financeiro.

À UFSM e aos professores que fizeram parte de minha formação acadêmica.

RESUMO

AUTOR: Adriana Zambenedetti Gehm

ORIENTADOR: Prof. Dr. Ademir Farias Morel

O presente trabalho descreve o estudo fitoquímico da espécie *Condalia buxifolia* Reissek, pertencente à família Rhamnaceae, estudo da relação estrutura/atividade antimicrobiana e confirmação da configuração absoluta do alcaloide Condalina-A (**1**).

Das cascas das raízes de *Condalia buxifolia* foram isolados: o alcaloide ciclopeptídico Condalina-A (**1**), o fitoesteroide β -sitosterol (**5**), a antraquinona Emodina (**29**), os ácidos graxos oléico (**30**) e behênico (**31**) e um ftalato (**32**).

Para estudo de relação estrutura/atividade dos grupos funcionais da Condalina-A foram obtidos quatro derivados: Di-idroconalina-A (**33**), Dimetildi-idrocondalina-A (**34**), Hidrocloreto (**35**) e Hidroiodeto de Condalina-A (**36**).

Através da medida da difração de raio-X do alcaloide na forma de seu sal Hidroiodeto foi possível confirmar a configuração absoluta dos centros quirais da Condalina-A e determinar o ângulo diedro dos hidrogênios H-3 e H-4.

Adicionalmente, foi analisada a atividade antimicrobiana dos extratos, frações, substâncias isoladas e derivados de Condalina-A através do método da microdiluição em placas, frente a cinco bactérias gram-positivas, seis gram-negativas e sete fungos. Observou-se nesta análise que os extratos e frações testados apresentaram bons resultados principalmente contra as bactérias *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Morganella morganii*, e *Pseudomonas aeruginosa* e os fungos *Candida krusei*, *Cryptococcus gatti*, *Cryptococcus neoformans* e *Saccharomyces cerevisiae*. No estudo da relação estrutura/atividade observou-se que a dupla ligação do alcaloide e o grupo NHCH_3 e $\text{N}^+\text{H}_2\text{CH}_3$ são importantes na atividade antibacteriana para *Enterococcus*. Já para a atividade antifúngica o grupo $\text{N}^+\text{H}_2\text{CH}_3$ e a ausência da dupla ligação são importantes para atividade contra *Candida krusei*.

Paravras-chave: *Condalia buxifolia*.Estudo fitoquímico.Alcaloide ciclopeptidico.Estereoquímica.Modificações estruturais.Atividade biológica.

ABSTRACT

AUTHOR: Adriana Zambenedetti Gehm
ADVISOR: Prof. Dr. Ademir Fariol Morel

This work describes the phytochemical study of the species *Condalia buxifolia* Reissek belonging to Rhamnaceae family, the study of ratio structure/antimicrobial activity and confirmation of the absolute configuration of Condalina-A alkaloid (**1**).

Of the bark of roots

From the bark of roots of *Condalia buxifolia* were isolated: the cyclopeptide alkaloid Condalina-A (**1**), the phytosteroid β -sitosterol (**5**), the anthraquinone Emodin (**29**), the oleic (**30**) and behenic (**31**) fatty acids and a phthalate (**32**).

For study of the ratio structure/activity of functional groups of Condalina-A were obtained four derivatives: Dihydroconaline-A (**33**), Dimetildihydrocondaline-A (**34**), Hydrochloride (**35**) and Hydroiodide of Condaline-A (**36**).

By X-ray diffraction of alkaloid as hydroiodide salt was possible to confirm the absolute configuration of the chiral centers of Condalina-A and determine the dihedral angle of the hydrogens H-3 and H-4.

Additionally, the antimicrobial activity of the extracts, fractions, isolated compounds and derivatives Condalina-A were analyzed by microdilution in plates method, front five gram-positive, six gram-negative bacteria and seven fungi. It was observed in this analysis that the tested extracts and fractions showed good results especially against bacteria *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Morganella morganii*, and *Pseudomonas aeruginosa* and fungi *Candida krusei* *Cryptococcus gatti*, *Cryptococcus neoformans* and *Sacaromyces cerevisiae*. In the study of ratio structure/antimicrobial activity has been observed that for Condalina-A and derivatives, the double bond of the NHCH_3 group and $\text{N}^+\text{H}_2\text{CH}_3$ are important for antibacterial activity front *Enterococcus*. As for antifungal activity the group $\text{N}^+\text{H}_2\text{CH}_3$ and the absence of the double bond are importante for activity against *Candida krusei*.

Keywords: *Condalia buxifolia*.Phytochemical study.Cyclopeptide alkaloid.
.Stereochemistry.structural modifications.Biological activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – <i>Condalia buxifolia</i> Reissek	6
Figura 2 – Estruturas genéricas dos tipos 4(13), 5(13), 4(14), 4(15), 5(14) de alcaloides ciclopeptídicos <i>sensu stricto</i>	11
Figura 3 – Aminoácidos formadores do alcaloide Condalina A.....	14
Figura 4 – Perfil cromatográfico em CLAE do EB1.....	30
Figura 5 – Perfil cromatográfico em CLAE do EB 2.....	31
Figura 6 – Perfil cromatográfico em CLAE da FEB.....	31
Figura 7 – Espectro de RMN de ¹ H da Condalina A, em DMSO, 600 MHz.....	32
Figura 8 – Espectro de RMN de ¹³ C da Condalina A em DMSO, 150 MHz.....	33
Figura 9 – Análise em CG da fração hexano.....	35
Figura 10 – Análise em CLAE da fração diclorometano.....	35
Figura 11 – Análise em CLAE da fração acetato de etila.....	36
Figura 12 – Análise em CLAE da fração metanol.....	36
Figura 13 – Emodina.....	38
Figura 14 – Espectro de RMN de ¹ H de H02, em CDCl ₃ , 400 MHz.....	39
Figura 15 – Espectro de RMN de ¹ H expandido de H02, em CDCl ₃ , 400 MHz.....	40
Figura 16 – Espectro de RMN de ¹³ C de H02, em CDCl ₃ , 100 MHz.....	41
Figura 17 – Espectro de RMN de DEPT 135° de H02, em CDCl ₃ , 100 MHz.....	42
Figura 18 – Di-isobutil ftalato.....	42
Figura 19 – Espectro de RMN de ¹ H de H05, em CDCl ₃ , 400 MHz.....	43
Figura 20 – Espectro de RMN de ¹³ C de H05, em CDCl ₃ , 100 MHz.....	44
Figura 21 – Espectro de RMN de ¹³ C expandido de H05, da região de 26,5 a 31 ppm.....	45
Figura 22 – Espectro de RMN de DEPT 135° de H05, em CDCl ₃ , 100 MHz.....	46
Figura 23 – Mistura de ácidos graxos oleico e heênico.....	46-47
Figura 24 – Espectro de RMN de ¹ H do β-sitosterol, em CDCl ₃ , 400 MHz.....	48
Figura 25 – Espectro de RMN de ¹³ C do β-sitosterol, em CDCl ₃ , 100 MHz.....	48
Figura 26 – β-sitosterol.....	49
Figura 27 – Centros quirais C-3, C-4, C-7, e C-23 da Condalina A.....	50
Figura 28 – Magnitude da constante de acoplamento em função do ângulo diedro entre os átomos que acoplam.....	51
Figura 29 – Modelos de configurações relativas <i>eritro e treo</i>	52
Figura 30 – Espectro de RMN bidimensional de COSY, em DMSO, 600 MHz.....	53
Figura 31 – Espectro de RMN bidimensional de NOESY, em DMSO, 600 MHz.....	54
Figura 32 – Estereoquímica relativa dos carbonos C-3 e C-4 e absoluta e dos carbonos C-7 e C-23.....	53
Figura 33 – Raio X de Hidroiodeto de Condalina-A.....	56
Figura 34 – Espectro de RMN de ¹ H da Diidrocondalina-A, em DMSO, em 400 MHz.....	57
Figura 35 – Comparação dos sinais da dupla ligação pelo espectro de ¹ H do alcaloide Condalina-A e Di-idrocondalina-A, expandidos de 5 ppm a 7,5 ppm, ambas em DMSO, em 400 MHz e 600 MHz respectivamente.....	58
Figura 36 – Espectro de RMN de ¹ H da Diidrocondalina-A, expandido de 2,5 ppm a 4,5 ppm, em DMSO, em 400 MHz.....	59
Figura 37 – Espectro de RMN de ¹³ C da Diidrocondalina-A, em DMSO, 100 MHz.....	60
Figura 38 – Espectro de RMN de DEPT 135 expandido da Diidrocondalina-A, em DMSO, 400 MHz.....	61
Figura 39 – Espectro de RMN de ¹ H da Dimetilcondalina-A, em DMSO, 400 MHz.....	62

Figura 40 – Espectro de RMN de ^{13}C da Dimetilcondalina-A, em DMSO, 100 MHz.....63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Atividades biológicas de alcaloides ciclopeptídicos.....	15
Tabela 2 – Micro-organismos (ATCC) utilizados no teste de atividade antimicrobiana.....	28
Tabela 3 – Fracionamento da FEA e quantidade das frações obtidas.....	34
Tabela 4 – CIM 50/CLM frente a fungos ($\mu\text{g/ml}$)	67
Tabela 5 – CIM 20 frente a fungos ($\mu\text{g/mL}$)	69
Tabela 6 – CIM 50/CLM frente a bactérias ($\mu\text{g/ml}$)	71
Tabela 7 – CIM 20 frente a bactérias ($\mu\text{g/ml}$)	73

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Esquema de fracionamento realizado com o extrato bruto.....	18
Esquema 2 – Reação de hidrogenação e condições reacionais utilizadas.....	22
Esquema 3 – Reação de metilação e condições reacionais utilizadas.....	23
Esquema 4 – Reação de formação de Hidrocloreto de Condalina-A.....	23
Esquema 5 – Reação de formação de Hidroiodeto de Condalina-A.....	24
Esquema 6 – Hidrólise do alcaloide e derivatização dos aminoácidos originados.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	graus celsius
ATCC	American Type Culture Collection
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG	Cromatografia gasosa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
COSY	Correlation Spectroscopy
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
EB	Extrato bruto
FEA	Fração etérea ácida
FEB	Fração etérea básica
Hz	Hertz
J	Constante de acoplamento
m	Multipeto
mg	Miligrama
NEQ	Novas Entidades Químicas
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
NT	Não testado
pág	Página
PN	Produtos naturais
ppm	Parte por milhão
R _f	Fator de retenção
s	Simpleto
t	Tripleto
n	Noneto
tr	tempo de retenção
TMS	Tetrametilsilano
TFA	Ácido trifluoracético
Ψ	Ângulo diedro
δ	Deslocamento químico
μg	micrograma

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	OBJETIVOS.....	3
2.1.	OBJETIVO GERAL.....	3
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3.	REVISÃO DA LITERATURA.....	4
3.1.	FAMÍLIA RHAMNACEAE	4
3.2.	O GÊNERO <i>Condalia</i>	5
3.3.	A ESPÉCIE <i>Condalia buxifolia</i> REISSEK.....	5
3.4.	ALCALOIDES CICLOPEPTÍDICOS	8
3.5.	ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS ALCALOIDEOS CICLOPEPTIDICOS.....	15
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	17
4.1.	MATERIAL VEGETAL.....	17
4.2.	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS	17
4.2.1.	Extrato bruto.....	17
4.2.2.	Extração ácido-base.....	17
4.3.	SOLVENTES E REAGENTES	18
4.4.	REVELADORES	19
4.5.	SOLUÇÃO DE MeOH/HCl 2 mol/L	19
4.6.	MÉTODOS CROMATOGRÁICOS	20
4.7.	HIDROGENADOR.....	20
4.8.	APARELHO DE PONTO DE FUSÃO.....	21
4.9.	ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ¹ H E ¹³ C.....	21
4.10.	ESPECTROFOTÔMETRO.....	21
4.11.	DIFRATÔMETRO.....	21
4.12.	PROCEDIMENTOS REACIONAIS	22
4.12.1.	Reação de hidrogenação	22
4.12.2.	Reação de metilação	22
4.12.3.	Formação de Hidrocloreto de Condalina-A	23
4.12.4.	Formação do sal Hidriodeto de Condalina-A.....	24
4.13.	METABÓLITOS ISOLADOS DA CASCA DA RAIZ DE <i>Condalia buxifolia</i> REISSEK.....	24
4.14.	DERIVADOS DE CONDALINA-A.....	27
4.15.	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	28
4.15.1.	Meios de cultura	29

4.15.2.	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	29
4.15.3.	Determinação da concentração letal mínima (CLM)	29
5.	APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	30
5.1.	PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS EXTRATOS METANÓLICOS E FRAÇÃO ETÉREA BÁSICA	30
5.2.	METABÓLITOS ISOLADOS DA FRAÇÃO ETÉREA BÁSICA	31
5.3.	METABÓLITOS ISOLADOS DA FRAÇÃO ETÉREA ÁCIDA	34
5.3.1.	Metabólitos isolados da fração hexano	37
5.4.	CONFIRMAÇÃO DA ESTEREOQUÍMICA ABSOLUTA DO ALCALOIDE CICLOPEPTÍDICO CONDALINA-A.....	49
5.5.	MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS NO ALCALOIDE CICLOPEPTÍDICO CONDALINA-A	57
5.5.1.	Obtenção da Diidrocondalina-A.....	57
5.5.2.	Obtenção da Dimetildiidrocondalina-A	61
5.5.3.	Formação de Hidrocloreto de Condalina-A	63
5.5.4.	Formação de Hidroiodeto de Condalina-A	64
5.6.	ATIVIDADES ANTIMICROBIANAS	64
5.6.1.	Atividades antifúngicas	65
5.6.2.	Atividades antibacterianas.....	70
6.	CONCLUSÃO.....	75
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
	ANEXO I: CROMATOGRAMA DOS PADRÕES UTILIZADOS EM CLAE E CG.....	81
	ANEXO II: ESPECTROS DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO.....	87
	ANEXO III: ESPECTROS DE RMN COMPLEMENTARES.....	93

1. INTRODUÇÃO

Há relatos de que a utilização das plantas com fins terapêuticos é tão antiga quanto o próprio homem. A história do desenvolvimento das civilizações Oriental e Ocidental é rica em exemplos da utilização de recursos naturais na medicina, no controle de pragas e em mecanismos de defesa. Na China, o Imperador Sheng-Nung utilizou uma série de plantas em seu próprio corpo, para saber o efeito que provocavam e escreveu um tratado denominado PEN TSAO, onde ele mencionava o uso de 252 plantas como medicamentos (JORGE, 2009).

O uso de plantas consagradas pelo uso popular despertou a curiosidade de estudiosos. No início, os químicos estudavam plantas geralmente incorporadas às farmacopeias da época, limitando-se ao isolamento e à determinação estrutural de princípios ativos. Dada a importância das plantas para a medicina da época, a aproximação da Química e da Medicina permitiu um rápido desenvolvimento de seus campos específicos. Assim, muitas substâncias foram conhecidas e introduzidas na terapêutica, permanecendo até hoje como medicamentos, como por exemplo o ácido acetilsalicílico (AAS), descoberto por Felix Hofmann em 1897 que a partir de 1899 foi o um dos fármacos sintéticos pioneiros lançados pela Bayer, com nome comercial de Aspirina® (VIEGAS e BOLZANI, 2006).

Até 2006, apenas 17% das plantas de todo o mundo haviam sido estudadas quanto ao seu emprego medicinal e, na maioria dos casos, sem grande aprofundamento nos aspectos fitoquímicos e farmacológicos. E cerca de 50% dos medicamentos utilizados eram de origem sintética e cerca de 25% de origem vegetal, isolados ou produzidos por semi-síntese. Esses dados demonstram o potencial das plantas para a descoberta de novos fitoterápicos e fitomedicamentos. O Brasil, devido a sua grande extensão de terras e variedade de vegetação, é detentor de grande parte da fonte de produtos naturais, onde espécies ainda não estudadas podem ser usadas como fonte de substâncias de alto valor medicinal (FOGLIO et. al., 2006).

A partir de 2013, 1453 novas entidades químicas (NEQ) foram aprovados pela Food and Drug Administration, dos quais 40% são produtos naturais (PN) ou inspirados em PN (derivados semi-sintéticos, compostos sintéticos baseados em farmacóforos). Nos últimos 30 anos, o aumento de NEQ inspiradas em PN aumentou para aproximadamente 50% do total, e até cerca de 74% na área de anti-tumoral. Durante o período de 2008-2013, 25 medicamentos PN ou derivados de PN foram aprovados para uso (KATZ e BALTZ, 2016).

Drogas brasileiras, em sua grande maioria, são oriundas de plantas silvestres, ou seja, de processos extrativistas. Estas drogas acabam, quase sempre, não apresentando boa qualidade

e falta de padronização. No ramo da biotecnologia, o cultivo de plantas medicinais tem aumentado tanto no Brasil como no resto do mundo, fazendo com que tenham maior resistência a condições climáticas desfavoráveis e a parasitas. O melhoramento de plantas medicinais está diretamente relacionado com capacidade de produção do tipo e da quantidade de determinados princípios ativos (OLIVEIRA, F., 1991).

Em plantas com propriedades medicinais pode-se encontrar substâncias biologicamente ativas distribuídas por suas raízes, caule, cascas e folhas. Estas substâncias são produtos oriundos do metabolismo secundário das plantas, os quais atuam no mecanismo de sobrevivência em determinadas condições ou estresses climáticos. Os metabólitos secundários são específicos para cada espécie de vegetais, representando a individualidade química de cada uma. A determinação e análise estrutural dos metabólitos secundários ativos são de grande importância, podendo auxiliar na compreensão da relação atividade biológica/estrutura, e no planejamento de produtos sintéticos com tais atividades, entre outras aplicações (SIMÕES, 2004)

Neste contexto, o Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais (NPPN) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) estuda a composição química e as atividades biológicas dos metabólitos secundários de espécies de plantas nativas do Rio Grande do Sul, utilizadas na medicina popular. Em busca de compostos biologicamente ativos, o NPPN também prioriza pesquisas na área da semi-síntese, onde é avaliada a relação estrutura/atividade de compostos naturais com seus derivados estruturalmente modificados. Neste trabalho será apresentado um estudo da composição química da espécie *Condalia buxifolia* Reissek, pertencente à família Rhamnaceae.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Este trabalho objetiva um estudo da composição química das cascas das raízes da espécie *Condalia buxifolia* Reissek, avaliação do potencial antimicrobiano dos extratos, frações e substâncias isoladas, além de modificações estruturais e confirmação da configuração absoluta do alcaloide Condalina-A.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtenção do extrato bruto das cascas das raízes da planta e fracionamento ácido-base do mesmo.
- A partir da fração básica de *Condalia buxifolia*, isolamento do alcaloide ciclopeptídico Condalina A em quantidade suficiente para a realização de modificações estruturais e posterior avaliação da atividade antimicrobiana dos derivados obtidos para estudo da relação estrutura/atividade.
- A partir da fração ácida, isolamento e elucidação estrutural de metabólitos secundários.
- Confirmação da configuração absoluta do alcaloide Condalina-A através de difração de raio-X
- Avaliação antimicrobiana dos extratos, frações e substâncias isoladas frente a micro-organismos causadores de doenças oportunistas.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. FAMÍLIA RHAMNACEAE

A família Rhamnaceae é uma família de plantas angiospérmicas, composta por aproximadamente 50 gêneros e 900 espécies, mais comumente encontradas nas regiões tropicais e subtropicais, principalmente na forma árvores, mas também como plantas com flores, arbustos e algumas vinhas e ervas (ALARCÓN e CESPEDES, 2015).

No Brasil, esta família está representada por 13 gêneros: *Alvimiantha*, *Ampeloziziphus*, *Colletia*, *Colubrina*, *Condalia*, *Crumenaria*, *Discaria*, *Gouania*, *Reissekia*, *Rhamnidium*, *Rahmnus*, *Scutia* e *Ziziphus*, constituídos por cerca de 50 espécies (SOUZA e LORENZI 2005).

Destes gêneros, 9 ocorrem naturalmente em áreas campestres do Estado do Rio Grande do Sul, constituídos de 10 espécies: *Colletia paradoxa* Escalante, *Colletia spinosissima* Gmelin, *Colubrina glandulosa* Perkins, *Condalia buxifolia* Reissek, *Discaria americana* Gillies et Hooker, *Gouania ulmifolia* Hooker et Arnott, *Hovenia dulcis* Thunberg, *Rhamnidium glabrum* Reissek, *Rhamnus sphaerosperma* Swartz e *Scutia buxifolia* Reissek (BASTOS, 1988).

Economicamente, algumas espécies possuem modesta importância como *Ceanothus coeruleus*, *Colletia paradoxa*, *Rahmnus spp.*, *Hovenia dulcis*, *Discaria chacaye* e *Colubrina glandulosa* que são consideradas plantas ornamentais. Como exemplo de emprego ornamental pode-se citar a *Colletia paradoxa*, muito utilizada em cercas vivas. *Condalia hookeri*, *C. microphylla*, *C. buxifolia*, *Reynosia latifolia*, *Rhamnus caroliniana*, *Sageretua brandrethiana*, *S. oppositifolia*, *S. theezans*, *Ziziphus jujuba*, *Z. mauritiana*, *Z. joazeiro* e *Z. mistol* produzem frutos ou sementes comestíveis (SANTOS, 2008).

As espécies da família Rhamnaceae destacam-se por produzir uma variedade de metabólitos secundários que abrangem triterpenos, alcaloides ciclopeptídicos, alcaloides benzilisoquinolina e flavonoides (HAGEL e FACCHINI, 2013).

3.2. O GÊNERO *Condalia*

O gênero *Condalia* é constituído por 18 espécies distribuídas pelo continente americano. Cinco destas, são encontradas na América do Sul e uma no Brasil (BASTOS, 1988)

A espécie *Condalia microphylla* Cav., de nome popular “Piquilín”, é encontrada no Chile e Argentina, geralmente na forma arbusto. Em estudos fitoquímicos das partes aéreas foram isolados metabólitos como o esteroide Sitosterol, e os ácidos graxos, Beénico, Lignocérico, Palmitico e Linoleico e a antocianina Malvidina. (FRONTERA, 2000). Também foi relatada a atividade inibitória de crescimento dos insetos *Spodoptera frugiperda*, *Tenebrio molitor*, *Drosophila melanogaster*, atribuída a presença dos alcanos de cadeia longa hentriacontano e triacontano em seu extrato. (CESPEDES, 2013). As partes aéreas das espécies *Condalia montana* e *Condalia buxifolia* também apresentam majoritariamente em sua composição ácidos graxos e alcanos (ZYGADLO, 1992).

Outras doze espécies de Condália são encontradas nas regiões Norte e Central do México: *C. correllii*, *C. ericoides*, *C. globosa*, *C. hookeri*, *C. spathulata*, *C. viridis* e *C. warnockii*, *C. brandegei*, *C. fasciculata*, *C. mexicana*, *C. mirandana* e *C. velutina*, sendo que as cinco últimas só ocorrem no México (NAVA, 2013).

3.3. A ESPÉCIE *Condalia buxifolia* REISSEK

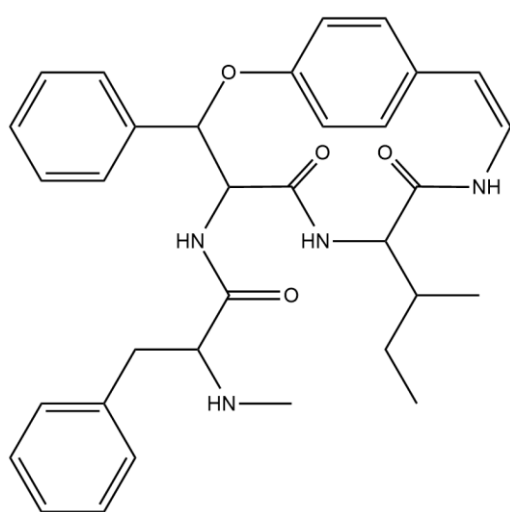
Condalia buxifolia Reissek, representada na Figura 1, conhecida popularmente como Espinilho e Coronilha-folha-de-buxo, é uma árvore de aproximadamente 4 m encontrada no Brasil, Argentina e Uruguai e utilizada na medicina tradicional, como febrífuga, anti-inflamatória, e contra disenterias (BASTOS 1989).

Figura 1 – *Condalia buxifolia* Reissek

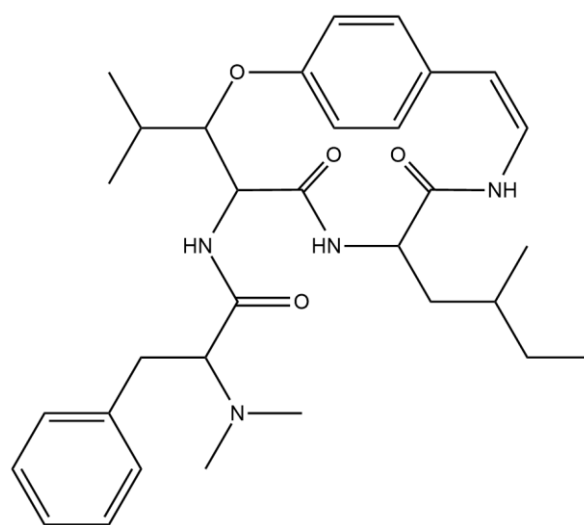


Fonte:Flora digital, Fotografia Daniel Dutra Saraiva

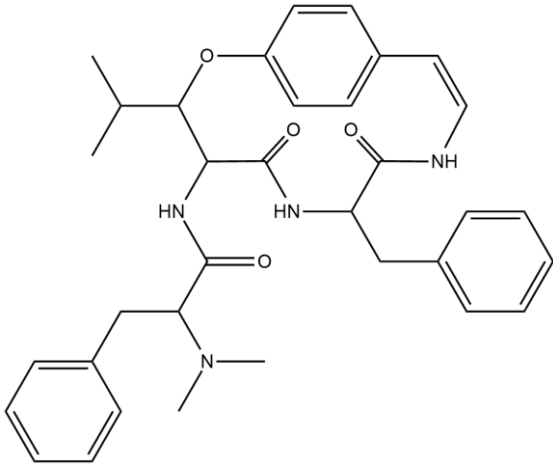
Em 2002, Morel et al. isolaram pela primeira vez da casca da raiz de *Condalia buxifolia* Reissek o alcaloide ciclopeptídico Condalina-A (1), além dos já conhecidos Adoutina-Y (2) (MARCHAND E MONSEUR, 1968), Scutianina-B (3) (TSCHESCHE, 1971, 1974) e Scutianina-C (4) (SIERRA, 1974), o esteroide β -sitosterol (5) e os terpenos Lupeol (6), e Taraxerol (7) isolados da casca do caule (MALDANER, 2005).



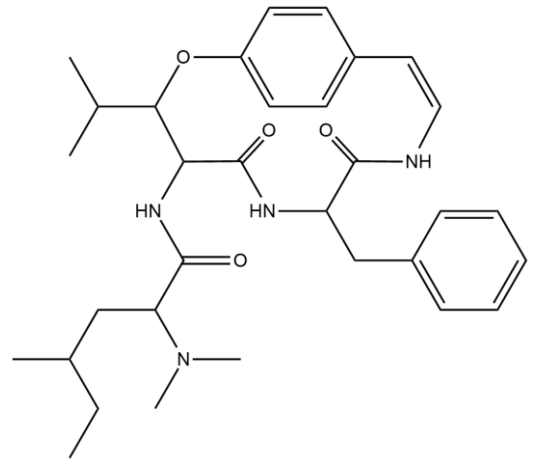
Condalina-A (1)



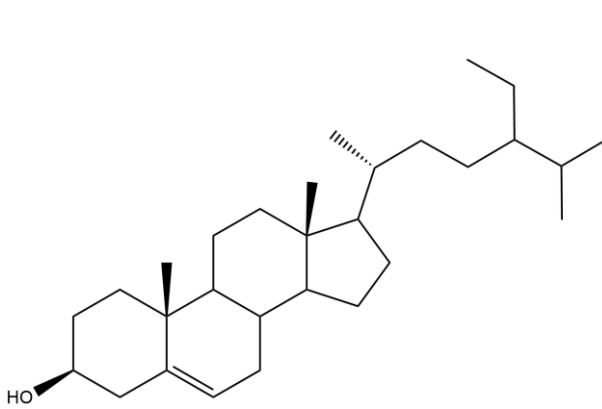
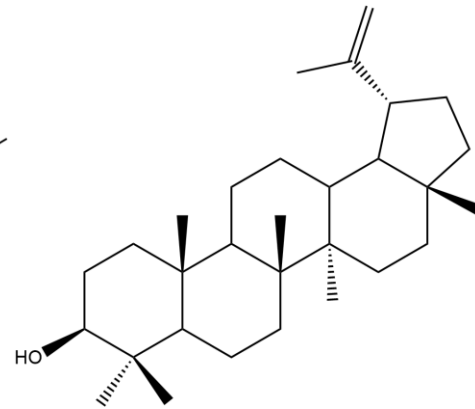
Adoutina-Y (2)



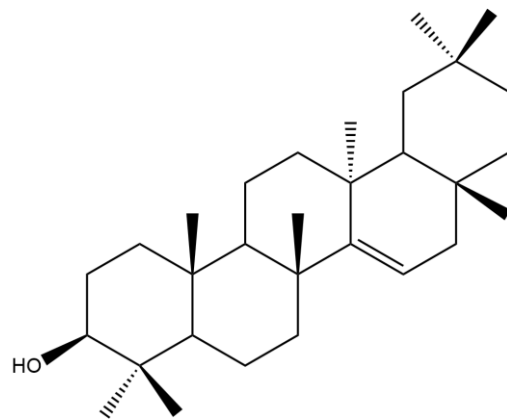
Scutianina-B (3)



Scutianina-C (4)

 β -sitosterol (5)

Lupeol (6)



Taraxerol (7)

Em 2015, ZANCHET e colaboradores avaliaram o efeito farmacológico, do extrato metanólico da casca da raiz de *C. buxifolia* e observaram que quando administrado por via oral (10 - 300 mg/Kg) apresentou efeito antinociceptivo significativo em ratos, num modelo de dor inflamatória induzida por ácido acético.

Em 2015, BALDISSEROTO e colaboradores avaliaram o efeito sedativo natural do extrato metanólico de *Condalia buxifolia* em Jundiás *Ramdia quelea* durante transporte. Neste estudo observou-se uma redução do nível de estresse dos peixes sedados com solução do extrato 5 – 10 µl/L.

3.4. ALCALOIDES CICLOPEPTÍDICOS

Compostos nitrogenados de estrutura complexa e com atividade farmacológica significativa pertencentes ao reino vegetal. (MEISSNER, 1879).

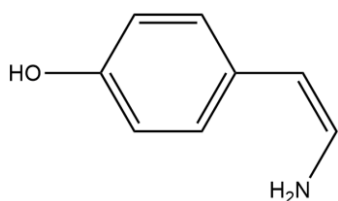
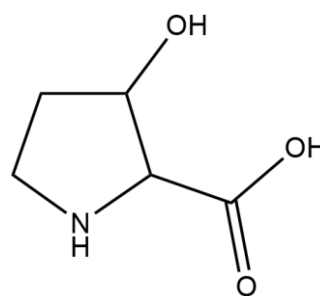
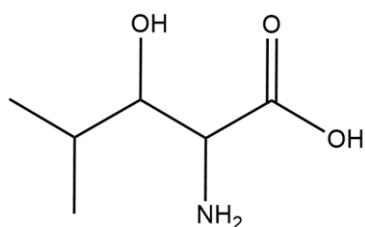
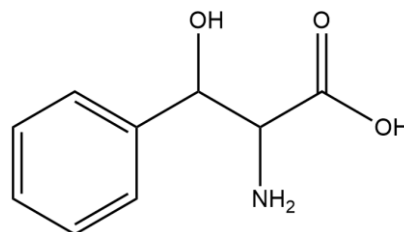
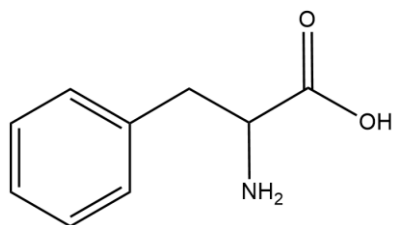
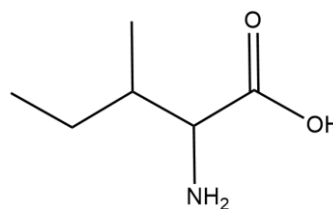
Substância orgânica, de origem natural, cíclica, contendo um ou mais átomos de nitrogênio em um estado de oxidação negativo e cuja distribuição é limitada entre os organismos vivos. (PELLETIER, 1988).

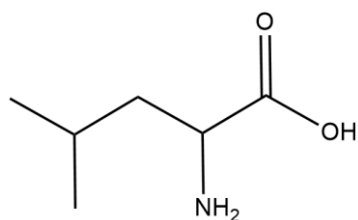
São substâncias básicas que formam um conjunto de compostos pertencentes ao grupo das amins cíclicas, de estruturas complexas, amins secundárias, terciárias, amida ou sal de amônio quaternário, identificadas pela presença do átomo de nitrogênio dentro de um ciclo. (GOURNELIS, 1998; FACCINNI, 2008)

Tomando como base a definição de alcaloide, os alcaloides ciclopeptídicos apresentam um macrocilo em sua estrutura constituído por aminoácidos unidos através de ligações peptídicas. Têm sido encontrados nas cascas, raízes, folhas e sementes de 55 plantas de 11 famílias de plantas superiores, principalmente de gêneros da família Rhamnaceae, mas sua ocorrência também foi confirmada em representantes das famílias Sterculiaceae, Asteraceae, Rubiaceae, Urticaceae, Celastraceae, Euphorbiaceae, Menispermaceae, Pandaceae, Olacaceae e Fabaceae (MOREL, 2009).

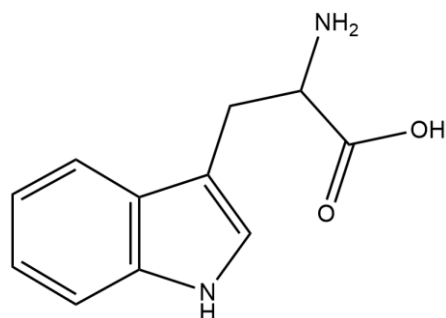
Os alcaloides ciclopeptídicos são classificados de acordo com número de átomos que formam este macrociclo, podendo ser de treze, quatorze ou quinze membros. São geralmente derivados de 4 (ou 3)-hidroxiestirilamina (**8**), uma unidade de β-hidroxi-aminoácido (geralmente 3-hidroxirolina(**9**), 3-hidroxi-leucina(**10**), ou 3-hidroxi-fenilalanina(**11**)), que está ligada ao fragmento de estirilamina através de um heteroátomo e um aminoácido ligado ao

macrocilco, comumente fenilalanina (**12**), isoleucina (**13**), leucina (**14**), triptofano (**15**). Possuem ainda, um resíduo de aminoácido terminal com a função amino, N-mono ou N,N-dimetilada, sendo esta considerada a responsável pela basicidade do e possivelmente pela atividade biológica dos alcaloides ciclopeptídicos. As exceções são o grupo de alcaloides do tipo pandamina que contêm um 2-metóxi-5-hidróxi-estirilamina (**16**) e os alcaloides ciclopeptídicos de 15 membros que contêm 2-metóxi-5-(β -aminovinil)-fenilalanina (**17**) em vez do grupo estirilamina (MOREL, 2009).

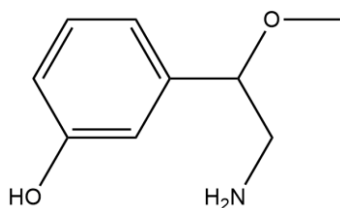
Estirilamina (**8**)3-hidroxirolina (**9**)3-hidroxiileucina (**10**)3-hidroxiifenilalanina (**11**)Fenilalanina (**12**)Isoleucina (**13**)



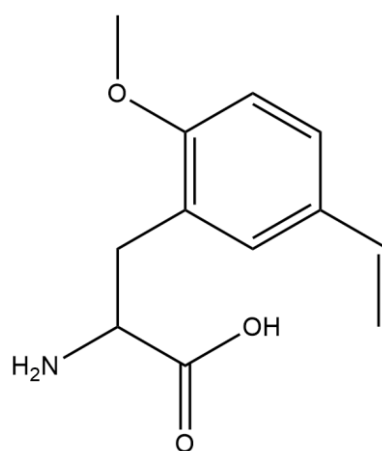
Leucina (14)



Triptofano (15)



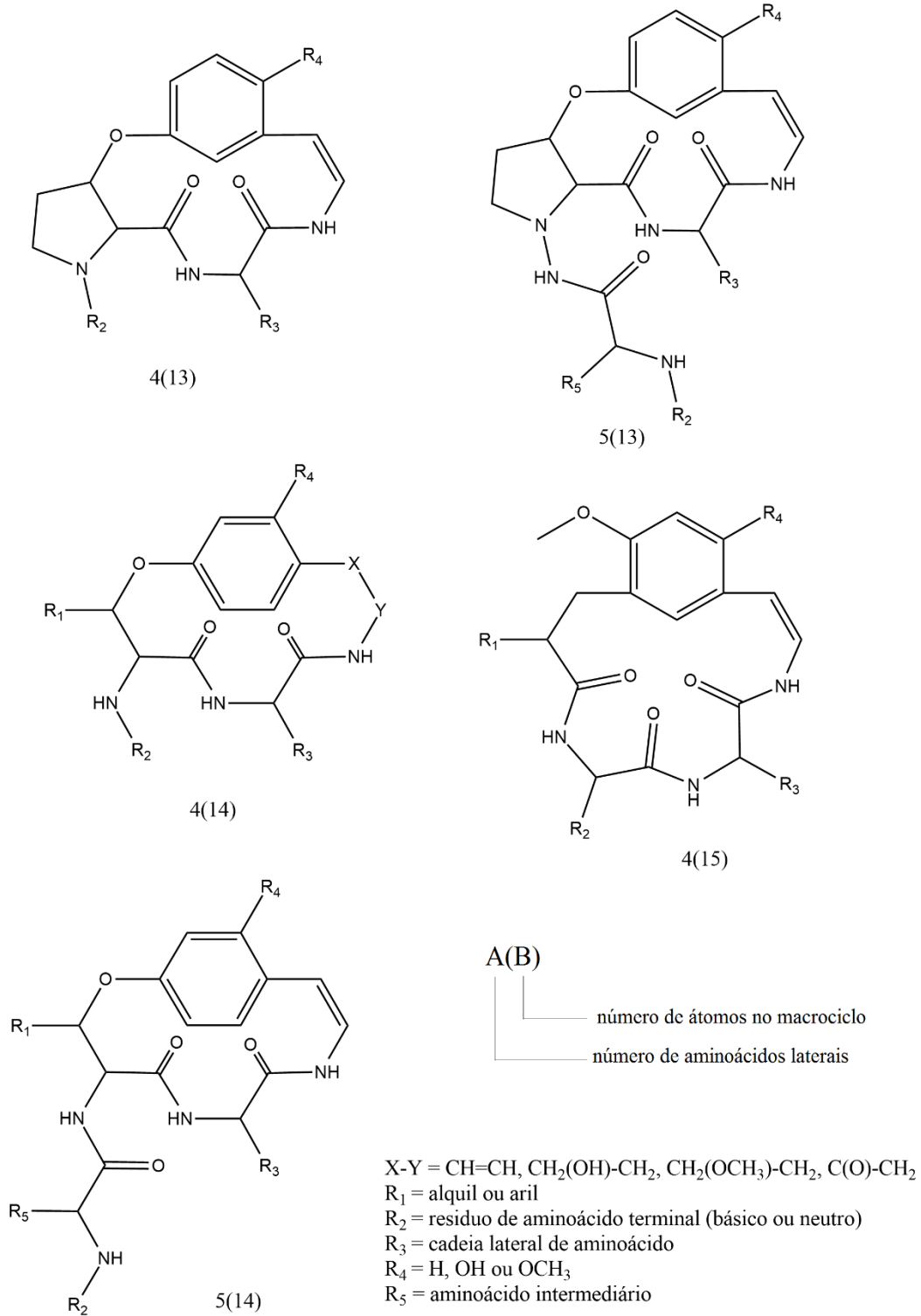
2-metóxi-5-hidróxi-estirilamina (16)



2-metoxi-5-(β-vinil)-fenilalanina (17)

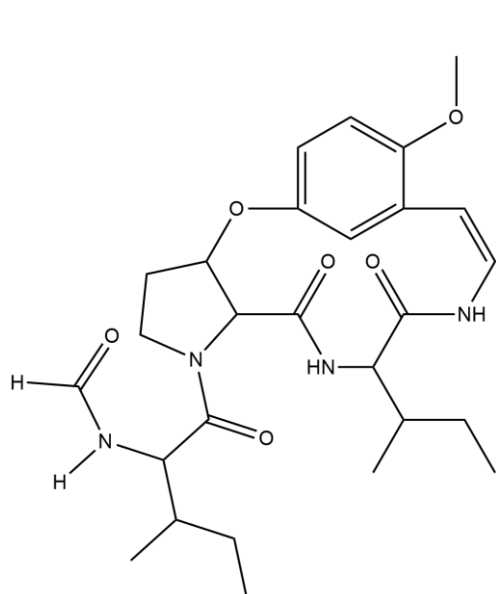
Os alcaloides ciclopeptídicos são classificados de acordo com um sistema de nomenclatura como alcaloides ciclopeptídicos *stricto sensu* (do latim, literalmente), alcaloides peptídicos lineares, e ciclopeptídicos neutros. Os alcaloides ciclopeptídicos *sensu stricto* foram classificados em subgrupos, de acordo com o número de aminoácidos laterais (fora do macrocilo) e o tamanho do macrociclo, em alcaloides do tipo 4(13), 5(13), 4(14), 5(14), e 4(15), conforme a Figura 2 (JOULLIE, 2004).

Figura 2 – Estruturas genéricas dos tipos 4(13), 5(13), 4(14), 4(15), 5(14) de alcaloides ciclopeptídicos *sensu stricto*

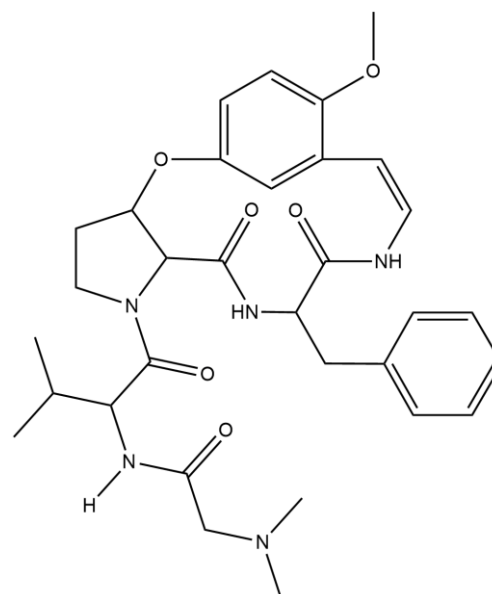


Os alcaloides ciclopeptídicos de 13 membros caracterizam-se pela presença de 2-metóxi-5-hidróxi-estirilamina (**13**) e 3-hidroxirolina (**9**).

Como exemplos desta classe podemos citar os alcaloides Sativanina K (**18**) (SHAH, 1987), do tipo 4(13), isolado da espécie *Ziziphus sativa* e Nummularina N (**19**) (ITOKAWA, 1997), do tipo 5(13), isolado da espécie *Ziziphus numulária*.

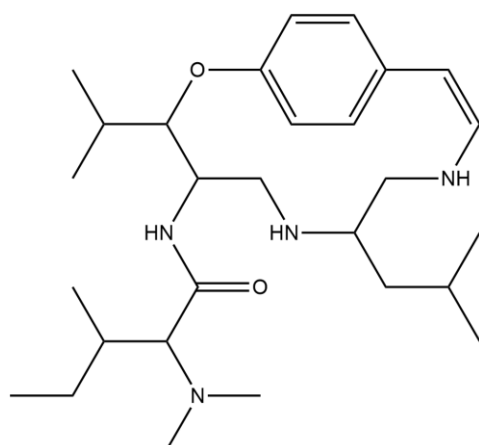


Sativanina K (**18**)

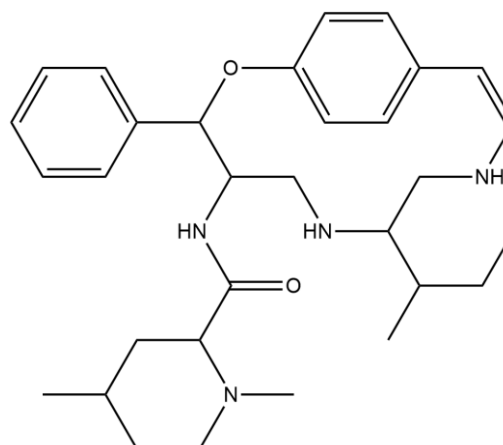


Nummularina N (**19**)

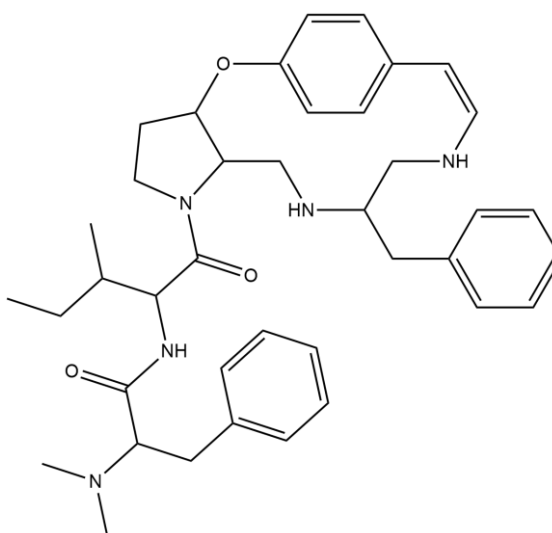
A maioria dos alcaloides ciclopeptídicos conhecidos até o momento, são os de quatorze membros, onde seu macrociclo é formado por uma unidade de estirilamina (**8**) e um β -hidroxiaminoácido: β -hidroxileucina (**10**) na Frangulanina (**20**) (WAHRNHOFF, 1965), do tipo 4(14). β -hidroxifenilalanina (**11**) na Myriantina A (**21**) (MARCHAND, 1968), do tipo 4(14), 3-hidroxirolina (**12**) da Anfibina B (**22**) (TSCHESCHE, 1972), do tipo 5(14).



Frangulanina (20)



Myriantina A (21)

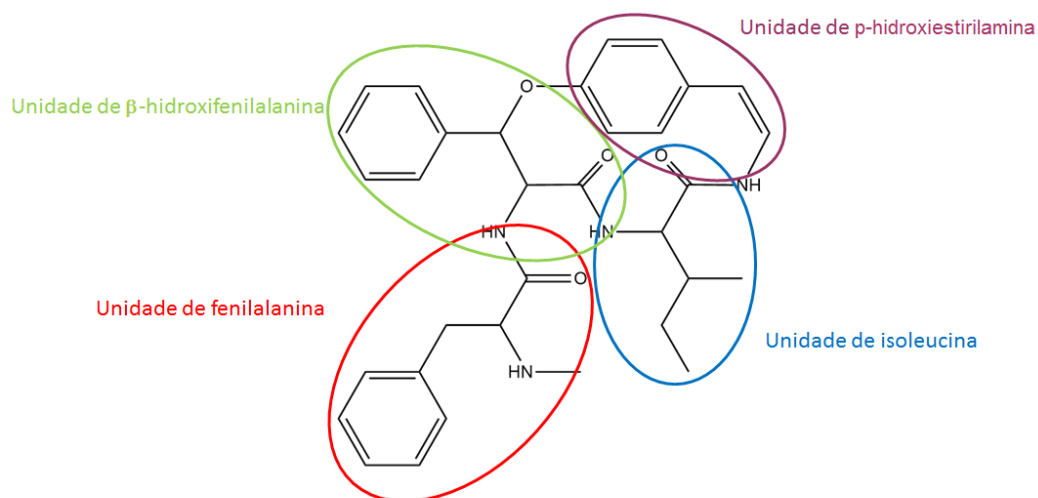


Anfibina B (22)

Com o desenvolvimento de técnicas cromatográficas e de elucidação estrutural que se deu a partir da década de setenta, o número de novos alcaloides ciclopeptídicos identificados aumentou consideravelmente.

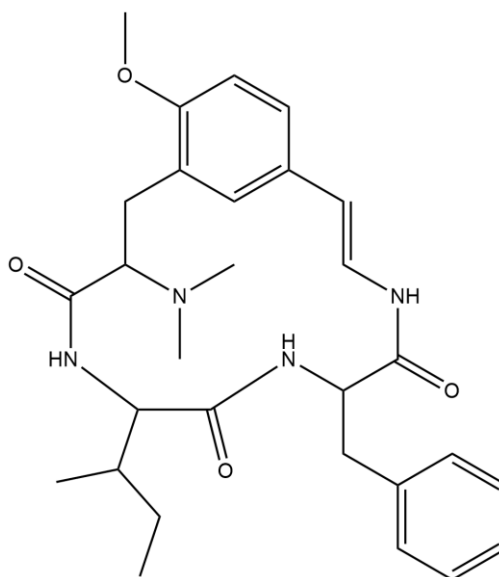
O alcaloide alvo deste estudo, Condalina-A, é um alcaloide ciclopeptídico de 14 membros formada por uma unidade de hidroxiestirilamina, β -hidroxifenilalanina, isoleucina e fenilalanina, conforme a Figura 3.

Figura 3 – Aminoácidos formadores do alcaloide Condalina A.



Fonte: Adaptado de MOREL 2002

Os alcaloides ciclopeptídicos de quinze membros são caracterizados pela presença de uma unidade de 2-metoxi-5-(β-vinil)-fenilalanina (**17**). Mucronina-A (**23**) foi isolada da espécie *Ziziphus mucronata* (TSCHECHE, 1974).



Mucronina-A (**23**)

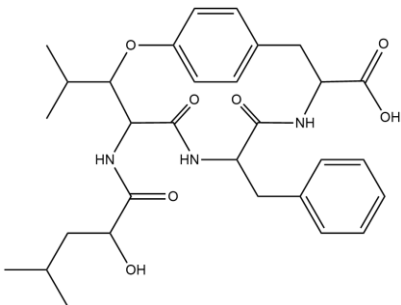
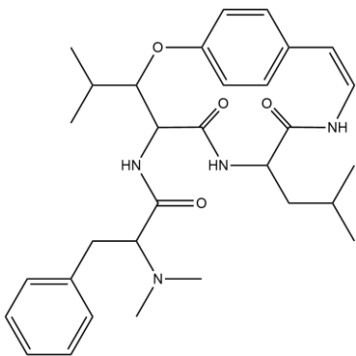
Na literatura não há relatos da biossíntese dos alcaloides ciclopeptídicos, somente evidências de seus aminoácidos precursores, onde há uma etapa anterior de formação de tetrapeptídeos e posteriormente a ciclização do ciclopeptídeo (ILHA, 2011).

3.5. ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS ALCALOIDES CICLOPEPTÍDICOS

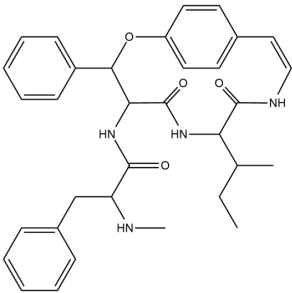
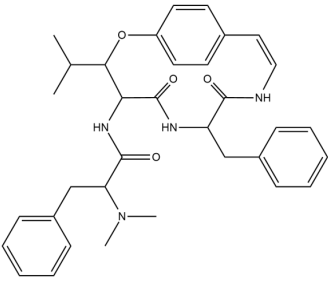
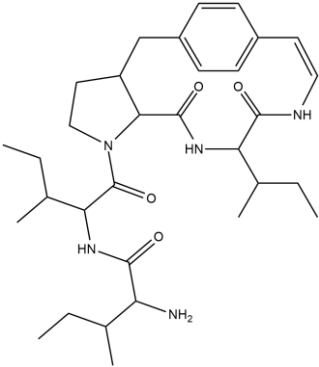
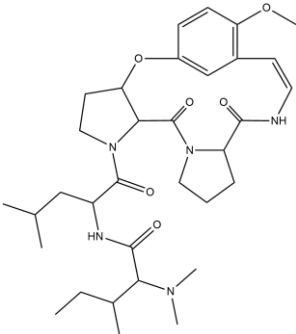
O fato de as *Ranunculaceae* serem amplamente utilizadas na medicina popular tornou-as alvos de estudos nas últimas décadas e diversas atividades biológicas foram atribuídas devido a presença de alcaloides ciclopeptídicos, tais como: ação sedativa, antibacteriana, antifúngico, antiplasmódico, antiinflamatório, diurético, antidesintérica entre outras. Por isso os alcaloides ciclopeptídicos ganham destaque na constante busca por novas substâncias biologicamente ativas. A Tabela 1 exemplifica algumas atividades biológicas dos alcaloides ciclopeptídicos de 14 membros.

Tabela 1 – Atividades biológicas de alcaloides ciclopeptídicos de 14 membros.

(continua)

Alcaloide	Fonte	Atividade biológica
<p>Ácido vignático A</p>  <p>(24)</p>	<i>Vinga adiata</i>	Atividade inseticida (SUGAWARA 1996)
<p>Frangufolina</p>  <p>(25)</p>	<i>Ziziphus vulgaris</i>	Atividade sedativa (SUH, 1997)

(continua)

<p style="text-align: center;">Condalina-A</p>  <p style="text-align: center;">(1)</p>	<p><i>Condalia buxifolia</i> Reiseek</p>	<p>Atividade antibacteriana contra <i>M. luteus</i>, <i>S. aureus</i>, <i>S. epidermidis</i>, <i>E. coli</i>, <i>K. pneumoniae</i> e <i>S. setubal</i> (MOREL 2002, 2005)</p>
<p style="text-align: center;">Scutianina-B</p>  <p style="text-align: center;">(3)</p>	<p><i>Scutia buxifolia</i> Reissek</p>	<p>Atividade antibacteriana contra <i>E. coli</i> (MOREL, 2002, 2005)</p>
<p style="text-align: center;">Mauritina-K</p>  <p style="text-align: center;">(26)</p>	<p><i>Ziziphus mauritiana</i></p>	<p>Atividade antifúngica contra <i>Botrytis cinérea</i> (PANDEY et. al., 2007)</p>
<p style="text-align: center;">Zizifina-N</p>  <p style="text-align: center;">(27)</p>	<p><i>Ziziphus oenopila</i></p>	<p>Atividade antiplasmodica contra <i>P. falsiparum</i> (MIC = 3,92mg/ml) (SUKSAMARAN, 2005)</p>

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAL VEGETAL

As raízes da planta *Condalia buxifolia* foram coletadas em Lavras do Sul (30° 48' 57'' S e 53° 53' 35'' O) no verão, janeiro de 2014, e no inverno, julho de 2014. Após descascadas, as cascas das raízes foram secas em estufa de ar circulante a 50 °C por 24h, e moídas a fino grão em moinho tipo Willey. A planta foi identificada pela Prof^a. Dr^a. Nelci R. Bastos e possui exsicata no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Maria, sob número de registro SMDB 3296.

4.2. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

4.2.1. Extrato bruto

As plantas coletadas no verão e no inverno foram extraídas separadamente, resultando em dois extratos brutos: O primeiro foi feito em aparelho de Soxhelt com 1055 g de casca de raiz moída proveniente da coleta de janeiro, e após extração com metanol resultou em 297 g de extrato bruto seco (EB 1). O segundo foi feito em sistema de refluxo com 2513 g de casca de raiz proveniente da coleta de julho, e que após extração com metanol resultou em 590 g de extrato bruto seco (EB 2). A extração em Soxhlet é mais prática quando comparada a extração em refluxo, pois elimina a etapa de filtração. A fim de observação da variação dos metabólitos presentes no extrato da raiz da planta, os EB1 e EB2 foram submetidos a análise em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

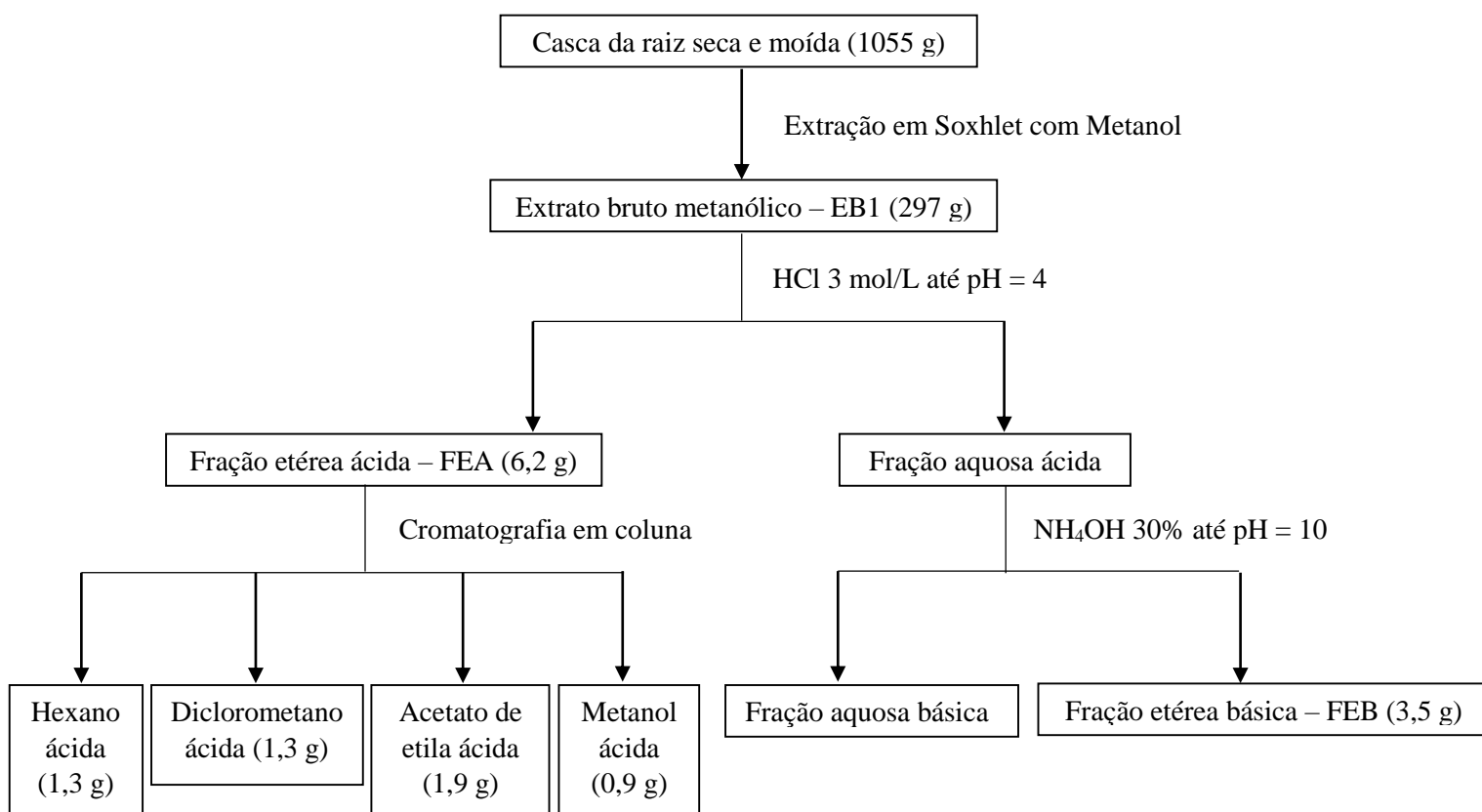
4.2.2. Extração ácido-base

Foi realizada extração ácido-base somente do EB 1. O extrato foi dissolvido em água destilada e acidificado com solução de ácido clorídrico 3 mol/L até pH 4. Em funil de separação, foi feita extração exaustiva com éter dietílico, resultando em 6,2 g de fração etérea ácida (FEA). Posteriormente a FEA foi submetida a um fracionamento com solventes de ordem crescente de polaridade, hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, a fim de facilitar o isolamento dos metabólitos. Este fracionamento foi realizado transformando-se toda FEA em uma pastilha,

com aproximadamente 5g de sílica, a qual foi utilizada como fase estacionária em uma coluna cromatográfica eluiu-se exaustivamente com cada solvente resultando em 4 frações: hexano ácida, diclorometano ácida, Acetato de etila ácida e Metanol ácida.

A fração aquosa remanescente da extração ácida, foi basificada com solução de hidróxido de amônio 30% até pH 10, novamente colocada em funil de separação e extraída exaustivamente com éter dietílico, resultando em 3,5 g de fração etérea básica (FEB), que foi posteriormente submetida a purificação em coluna cromatográfica.

Esquema 1 – Esquema de extração ácido-base realizado com EB1 e posterior fracionamento da fração ácida obtida.



4.3. SOLVENTES E REAGENTES

Os solventes hexano, acetato de etila, diclorometano, clorofórmio e metanol foram purificados e tratados conforme descrito por D.D Perrin, 1998. Os demais solventes e reagentes como como acetona, éter dietílico, ácido clorídrico, hidróxido de amônio e formaldeído são

P.A. (padrão analítico), das marcas Vetec ou Synth, e não foram purificados. Iodeto de metila e paládio adsorvido sobre carbono são da Sigma Aldrich e também não foram purificados. Os solventes deuterados utilizados foram clorofórmio e dimetilsulfóxido da marca Cambridge Isotope Laboratories, Inc.

4.4. REVELADORES

Diferentes reveladores foram aplicados para visualização da placa cromatográfica, conforme classes de metabólitos secundários, com auxílio de frasco borrifador ou pipeta, além da luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 nm e 365 nm.

Solução ácida, utilizada como revelador universal.

Preparo da solução: 50 ml de ácido sulfúrico concentrado adicionados a 950 ml de etanol.

Solução de Draggendorf, revelador específico para compostos nitrogenados.

Solução A: 0,85 g de nitrato de bismuto, 10 ml de ácido acético e 40 ml de água.

Solução B: 8 g de iodeto de potássio e 20 ml de água.

Preparo da solução: 5 ml A + 5 ml B + 20 ml de ácido acético e água até completar 100 ml.

Solução de cloreto férrico, revelador específico para compostos fenólicos.

Preparo da solução: 1 g de cloreto férrico sólido em 100 ml de água.

Solução de vanilina, revelador específico para terpenos:

Preparo da solução: 15 g de vanilina são dissolvidas em 250 mL de etanol a 0 °C. Em seguida são adicionados lentamente 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado.

4.5. SOLUÇÃO DE MeOH/HCl 2 mol/L

O preparo da solução de MeOH/HCl 2 mol/L deu-se pela adição gota a gota de ácido sulfúrico concentrado a cloreto de cálcio, liberando ácido clorídrico gasoso que é conduzido por uma mangueira a um balão contendo metanol anidro resfriado a 0 °C. A concentração foi

controlada pela massa de HCl dissolvida no metanol, pesando-se o balão durante o procedimento. A solução final foi armazenada em frasco de vidro a baixa temperatura.

4.6. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

As análises em CLAE foram realizadas em um cromatógrafo Agilent Technologies Modelo 1200, com detector DAD com coluna de fase reversa ZORBAX Eclipse Plus C18 (4,6 mm x 150 mm, 5 μ m) e fase móvel composta de acetonitrila (0,036% ácido trifluoracético - TFA) e água (0,036% TFA)

As análises em cromatografia gasosa (CG) foram realizadas em cromatógrafo Varian CP 3800, equipado com coluna DB5; a temperatura de operação do injetor foi de 220 °C, do detector 300 °C e a da coluna 50-280 °C com aumento de 10 °C/min; o gás de arraste utilizado foi hidrogênio (H₂) e na chama, ar sintético. As análises de cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas foram realizadas em Cromatógrafo HP 6890 SériE CG system com detector de massas HP 5973 Impacto de Elétrons (CG/EM-IE) com Coluna Capilar DB5-5MS Agilent Technologies 30 m x 32 μ m x 0,25 μ m; a temperatura de operação do injetor foi de 220 °C, do detector 250°C e do forno, a temperatura inicial foi de 60 °C e a máxima 325 °C; utilizou-se como gás de arraste, hélio (He).

As cromatografias em coluna (CC) foram realizadas com sílica gel 230-400 mesh, e eluída com solventes puros ou em sistema de gradiente, sendo o método utilizado para a purificação dos extratos, frações e reações.

As cromatografias em camada delgada (CCD) foram realizadas em placas comerciais de sílica gel 60 GF₂₅₄, sendo o método utilizado para acompanhamento da eluição e pureza dos compostos bem como em CC e reações.

4.7. HIDROGENADOR

As reações de hidrogenação foram realizadas em hidrogenador, pertencente ao laboratório de Produtos Naturais da UFSM. O processo ocorre sob pressão, em um reator de vidro que contém a substância a ser hidrogenada, solvente e o catalisador. O reator é conectado ao cilindro de gás hidrogênio comprimido através de um sistema de válvulas que transfere o gás para o reator, aumentando a pressão interna, medida em Kp/m². A reação é mantida sob agitação mecânica, promovendo contato entre o hidrogênio e a substância a ser hidrogenada.

4.8. APARELHO DE PONTO DE FUSÃO

As medidas de ponto de fusão das substâncias foram realizadas em aparelho digital MQAPF-302 da Microquímica, a uma taxa de aumento de temperatura de 5°C/min.

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

Os espectros de RMN uni (^1H , ^{13}C , DEPT 135°) e bidimensionais homonuclear (COSY e NOESY) foram realizados em espectrômetro Bruker, operando a aproximadamente 400,13 MHz para ^1H e 100,62 MHz para ^{13}C ou 600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C pertencente ao Departamento de Química, da Universidade Federal de Santa Maria. As amostras foram preparadas em tubos de 5mm com 0,4 mL de dimetilsulfóxido deuterado (DMSO), para as amostras de Condalina A e derivados, e de clorofórmio deuterado (CDCl_3) para as demais. A calibração dos espectros foi realizada utilizando-se como referência interna o TMS (δ 0,00 ppm) para ^1H e CDCl_3 (δ 77,00 ppm) e DMSO (δ 39,5 ppm) para ^{13}C .

4.10. ESPECTROFOTÔMETRO

Para as leituras de microplacas utilizadas para avaliação dos resultados das atividades antimicrobianas, utilizou-se espectrofotômetro SpectraMax M2 e SoftMax Pro 5.4.1 (Molecular Devices Inc., USA), operando em 620 nm e 25°C.

4.11. DIFRATÔMETRO

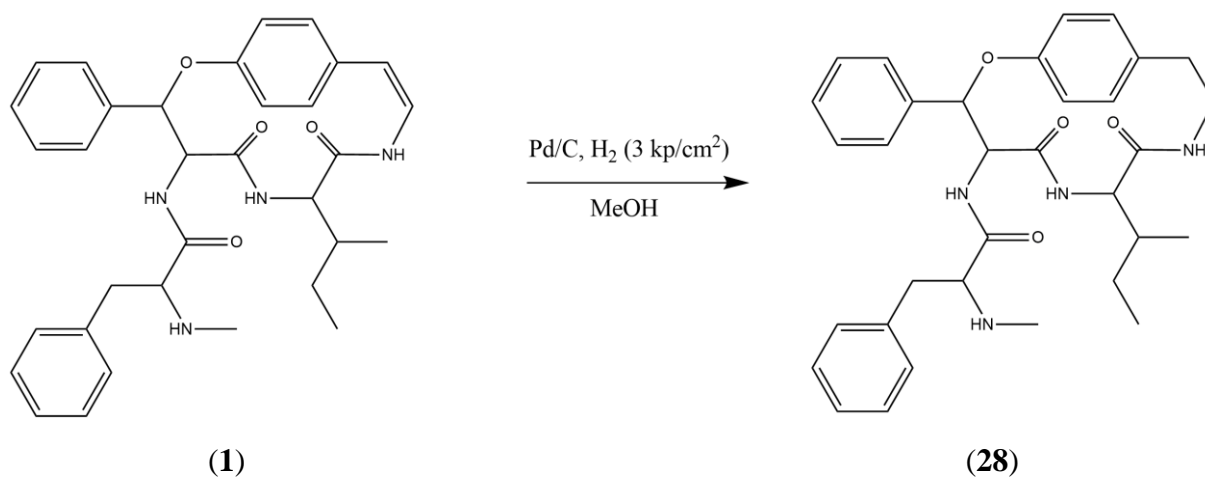
As medidas de raio x dos cristais obtidos foram realizadas em difratômetro Bruker Kappa APEX II CCD, pertencente ao departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria. As estruturas foram resolvidas com o programa SHELXS-2013. As representações gráficas das estruturas cristalinas foram realizadas através dos programas DIAMOND e ORTEP.

4.12. PROCEDIMENTOS REACIONAIS

4.12.1. Reação de hidrogenação

A redução da dupla ligação da Condalina-A foi realizada em hidrogenador, adicionando-se ao reator de vidro do equipamento 50 mg (0,09mmol) do alcaloide Condalina-A e solubilizados em 10 mL de metanol anidro e quantidade catalítica de Pd/C. Esta mistura foi mantida sob agitação mecânica em sistema fechado sob pressão de H₂, a 3kp/m², durante uma noite. (MOREL, 1979), conforme o Esquema 2. Após realização de CCD, mesmo não sendo observada mudança de *R_f*, o Pd/C foi filtrado em funil de vidro com algodão e o solvente removido em rotaevaporador a vácuo, e após purificação em CC obteve-se como produto um sólido branco com 85% de rendimento.

Esquema 2 – Reação de hidrogenação e condições reacionais utilizadas

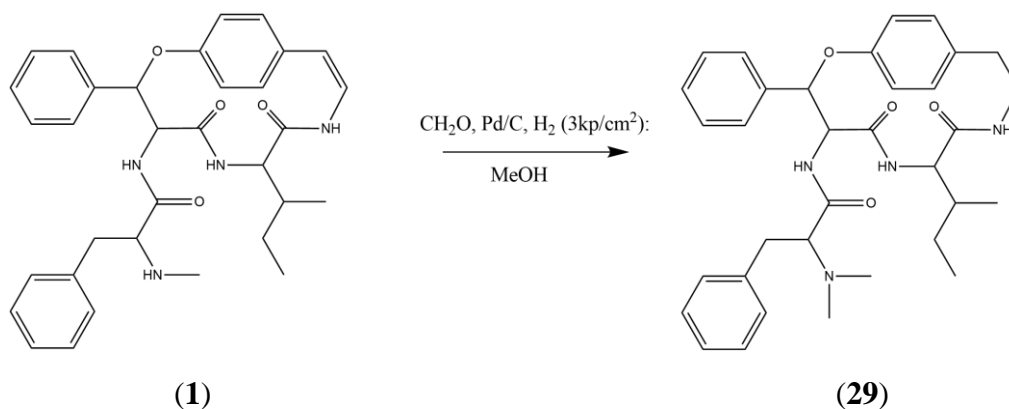


4.12.2. Reação de metilação

Para a reação de metilação do grupamento amino N-metilado da Condalina-A foi realizada em hidrogenador, adicionando-se ao reator de vidro do equipamento 20 mg (0,036mmol) do alcaloide, dissolvidos em 5 mL de MeOH anidro, 0,072 mmol de solução de formaldeído 37% e quantidade catalítica de Pd/C (MOSTARDEIRO, 2001). Esta mistura foi mantida sob agitação mecânica em sistema fechado, sob pressão de H₂, a 3kp/m², durante 5h. O final da reação foi verificado por CCD, sendo observada a formação de um produto majoritário com *R_f* maior e positivo para Dragendorff. A extração da reação foi procedida

conforme descrito na literatura, e após purificação em CC obteve-se como produto de um sólido branco com 55% de rendimento.

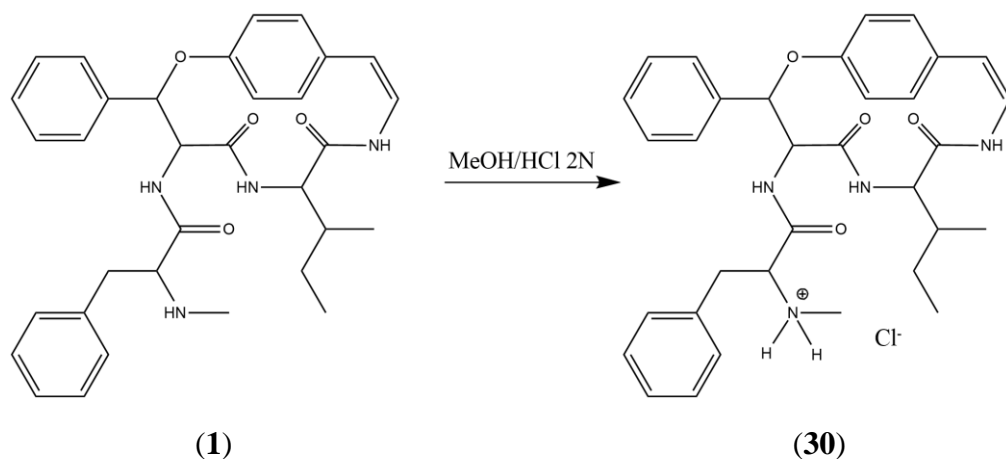
Esquema 3 – Reação de metilação e as condições reacionais utilizadas.



4.12.3. Formação de Hidrocloreto de Condalina-A

Para a formação do sal hidrocloreto de Condalina-A, foram adicionados em um frasco pequeno de vidro 20 mg (0,036mmol) do alcaloide e solubilizados 1 mL de uma solução de ácido clorídrico (HCl) em MeOH 2 mol/L. A mistura foi mantida em repouso a baixa temperatura, a fim de favorecer a cristalização. A formação do sal foi verificada por CCD. Após evaporação do solvente, obteve-se um sólido marrom, que foi submetido a análise de seu ponto de fusão.

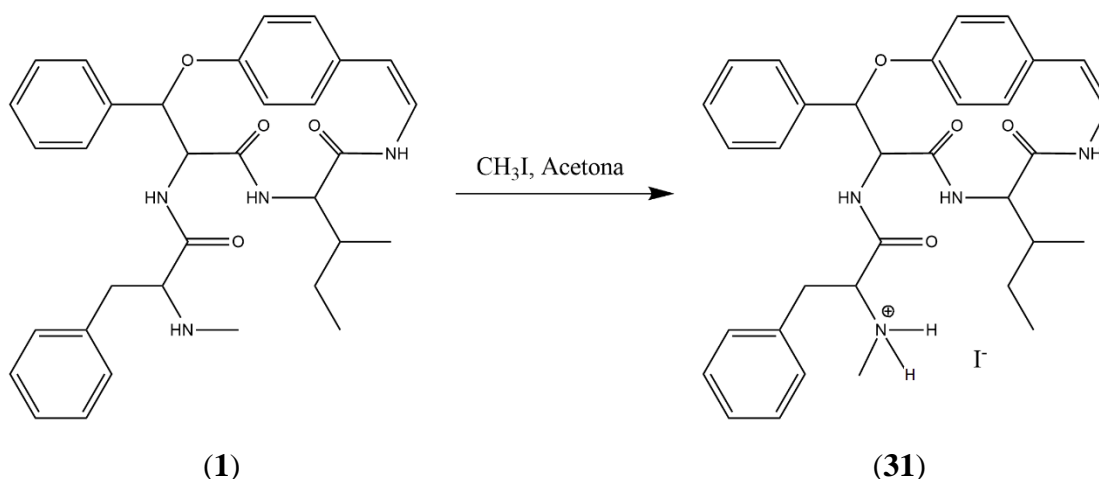
Esquema 4 – Reação de formação de Hidrocloreto de Condalina-A.



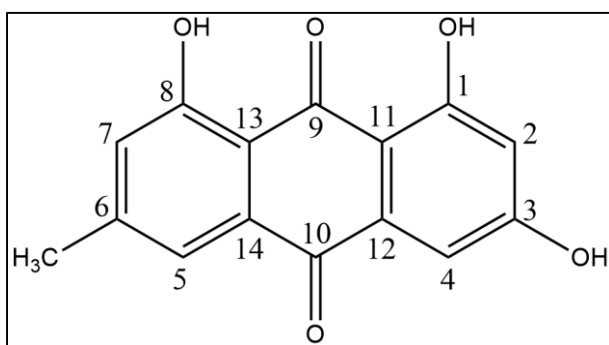
4.12.4. Formação do sal Hidroiodeto de Condalina-A

Para a formação do sal hidroiodeto de Condalina-A, foram adicionados a uma balão de vidro de 25 mL, 50mg (0,09mmol) do alcaloide e solubilizados em 2 mL de acetona. Logo após, 1 ml de CH₃I foi adicionado com seringa de vidro, e a reação foi mantida sob agitação e refluxo por 2 horas. O final da reação foi verificado por CCD e a mistura foi transferida para um frasco pequeno de vidro e mantida a temperatura ambiente para cristalização completa do sal formado. A formação do sal foi verificada por CCD, por ponto de fusão, além da análise por difração de raio-X do cristal formado.

Esquema 5 – Reação de formação do sal hidroiodeto de Condalina-A.



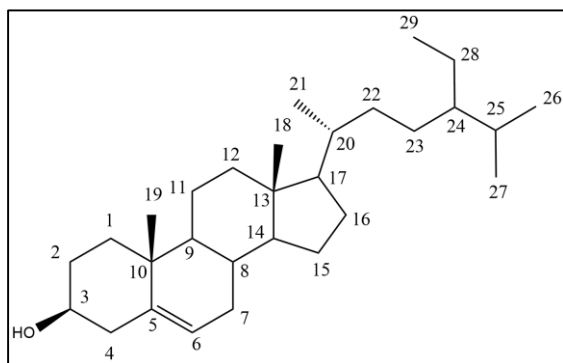
4.13. METABÓLITOS ISOLADOS DA CASCA DA RAIZ DE *Condalia buxifolia* REISSEK



Emodina – sólido, cor de laranja, P.f. = 265°C, C₁₅H₁₀O₅, peso molecular 270,04 g (MESELHY, 2003). Dados de RMN de ¹H, CDCl₃, 400 MHz, em ppm: 2,49 (3H, s, CH₃), 7,13 (1H, s, H-2), 7,31 (1H, s, H-4), 7,69 (1H, s, H-5) e 7,85 (1H, s, H-7), 12,03 (1H, s, OH-1), 12,14 (1H, s, OH-8).

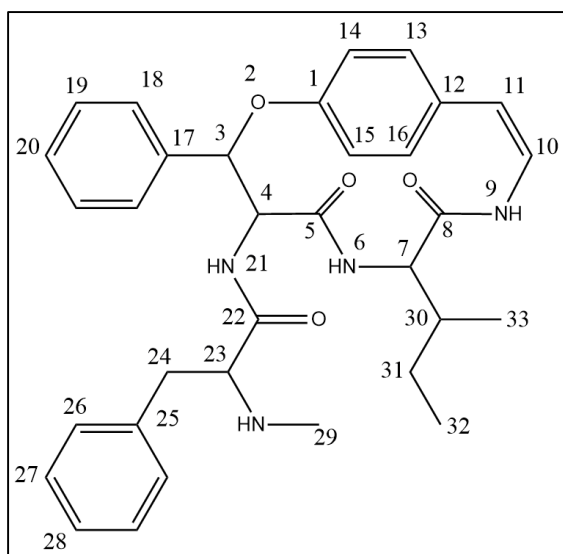
Dados de RMN de ¹³C, CDCl₃, 100 MHz, em ppm: 22,3 (CH₃), 113,8 (C-11), 115,9 (C-12), 119,9 (C-2), 121,4

(C-4), 124,4 (C-7), 124,6 (C-5), 133,3 (C-14), 133,7 (C-13), 137,0 (C-8) 149,4 (C-6), 162,4 (C-3), 162,7 (C-1), 182 (C-10), 192,6 (C-9).



β -sitosterol – Sólido branco cristalino, P.f. = 140 °C, $[\alpha]_D = -36^\circ$, fórmula molecular $C_{29}H_{50}O$ e peso molecular 414,71 g/mol (ZULLO, 1987; OJA, 2009). Dados de RMN de 1H , $CDCl_3$, 400 MHz em ppm: δ 0,68; 0,80; 0,82; 0,84; 0,92; 1,0 (3H, CH_3 18, 19, 21, 26 e 27), 5,35 (1H, m, H-6), 3,5 (1H, m, H-3), 0,9 – 2,3 (m, outros hidrogênios).

Dados de RMN de ^{13}C , $CDCl_3$, 100MHz, em ppm: δ 37,2 (C-1), 31,7 (C-2), 71,8 (C-3), 42,3 (C-4), 140,8 (C-5), 121,7 (C-6), 31,9 (C-7) 31,9 (C-8), 50,1 (C-9), 36,5 (C-10), 21,1 (C-11), 39,8 (C-12), 42,3 (C-13), 56,7 (C-14), 24,3 (C-15), 28,2 (C-16), 56,0 (C-17), 11,8 (C-18), 18,8 (C-19), 36,1 (C-20), 19,0 (C-21), 33,9 (C-22), 26,1 (C-23), 45,8 (C-24), 29,2 (C-25), 19,8 (C-26), 19,3 (C-27), 23,1 (C-28), 11,9 (C-29).

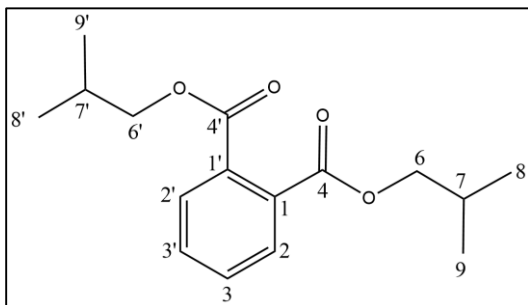


Condalina-A – Sólido amarelado amorfo, P.f. = 118-120°, $[\alpha]_D = -73^\circ$ (c 0,08 em MeOH), fórmula molecular $C_{33}H_{38}N_4O_4$, peso molecular 554,29 g/mol, $[M+H]^+$ m/z 555 (MOREL, 2002). Dados de RMN de 1H , DMSO, 600 MHz, em ppm: δ 5,76 (1H, s, H-3), 4,59 (1H, dd, H-4, $J_{4-21} = 9$ Hz), 8,04 (2H, s e d, NH-6 e NH-21, $J_{21-4} = 8$ Hz), 3,94 (1H, t, H-7, $J_{7-6} = J_{7-30} = 9$ Hz) 8,48 (1H, s, NH-9), 5,97 (1H, d, H-10, $J_{10-11} = 7,8$ Hz $J_{10-9} =$), 6,75 (1H, d, H-11 $J_{11-10} = 7,2$

Hz), 6,92 – 7,61 (14 H aromáticos, m, H-13, H-14, H-15, H-16, H-18, H-19, H-20, H-26, H-27, H-28), 3,01 (1H, dd, H-23, $J_{23-24} = 8,4$ Hz), 2,37 (1H, m, H-24), 2,52 (1H, m, H-24'), 2,11 (3H, s, H-29), 1,30 (1H, m, H-31), 0,87 (1H, m, H-31') 1,41 (1H, m, H-30), 0,73 (3H, d, H-33, $J_{33-30} = 6,6$ Hz) 0,74 (2H, t, H-32, $J_{32-31} = 7,2$ Hz).

Dados de RMN de ^{13}C , DMSO, 150 MHz, em ppm: δ 10,7 (C-33), 15,1 (C-32), 24,3 (C-31), 34,2 (C-29), 36,6 (C-30), 39,2 (C-24), 55,2 (C-4), 56,7 (C-7), 65,6 (C-23), 86,2 (C-3), 119,8 (C-15), 121,7 (C-16), 125,9 (C-14), 126,9 (C-11), 127,0 (C-18), 127,6 (C-20), 127,9 (C-26),

128,9 (C-19), 129,4 (C-13), 129,8 (C-27), 131,4 (C-10), 132,3 (C-12), 138,2 (C-25), 139,7 (C-17), 158,5 (C-1), 166,9 (C-5), 169,9 (C-8), 172,6 (C-22).



Di-isobutil ftalato – aspecto oleoso, amarelo, $C_{16}H_{22}O_4$, Peso molecular = 278,15, m/z 278,1.

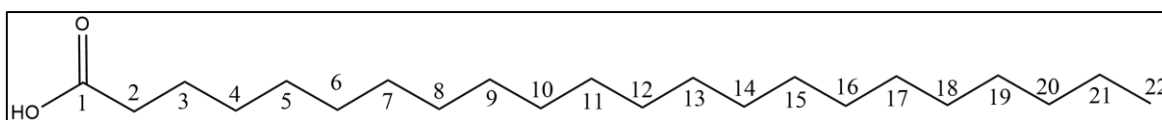
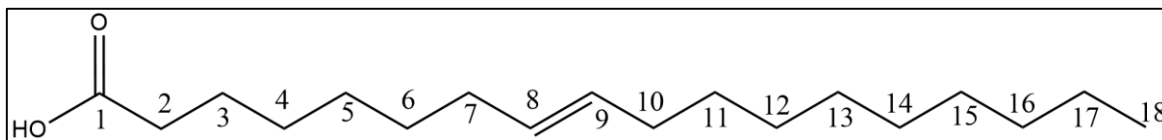
Dados de RMN de 1H , $CDCl_3$, 400 MHz, em ppm:

δ 0,99 (12H, d, H-8, H-9, H-8' e H-9', $J_{8-7} = J_{9-7} = J_{8'-7'} = J_{9'-7'} = 6,8$ Hz) 2,04 (2H, n, H-7 e H-7', $J_{7-8} = J_{7'-8'} = J_{7-9} = J_{7'-9'} = 6,4$ Hz) 4,09 (4H, d, H-6 e H-

6', $J_{6-7} = J_{6'-7'} = 6,4$ Hz) 7,52 (2H, m, H-2 e H-3, $J = 8$ Hz) 7,72 (2H, m, H-2' e H-3', $J = 8$ Hz).

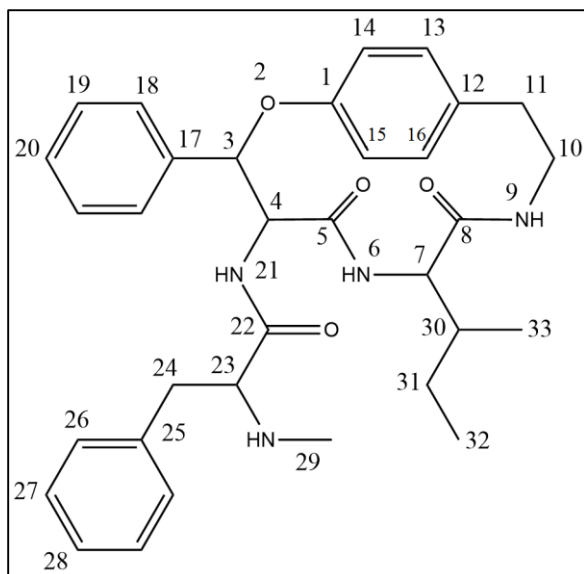
Dados de RMN de ^{13}C , $CDCl_3$, 100 MHz, em ppm: δ 19,1 (C-9, C-8, C-9' e C-8'), 27,7 (C-7 e C-7') 71,79 (C-6 e C6'), 128,8 (C-2 e C-2') 130,8 (C-3 e C-3') 132,4 (C-1 e C-1') 167,6 (C-4 e C-4').

Mistura de ácido oleico e behênico: Sólido amarelo, $C_{18}H_{34}O_2$ – peso molecular 282,26 g/mol, $C_{22}H_{44}O_2$, - peso molecular 340,3 g/mol.



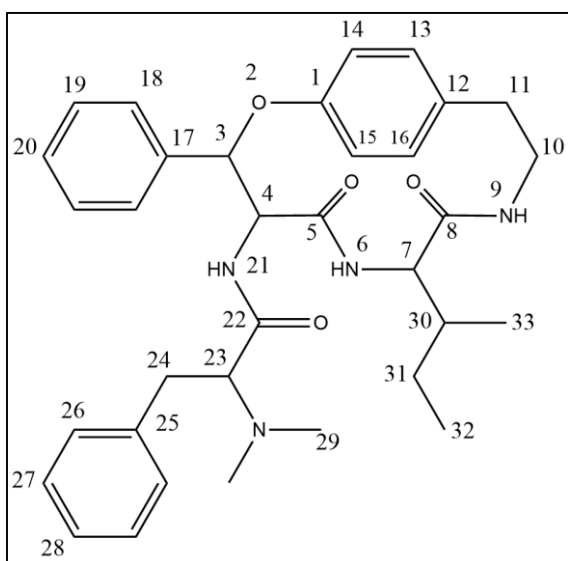
Dados de RMN de 1H , $CDCl_3$, 400 MHz, em ppm: δ 0,88 (3H, m, H-22 e H-18), 1,63 (4H, qui, H-3), 2,01 (4H, m, H-7 e H-10 próximos a dupla), 2,34 (2H, t, H-2), 5,35 (2H, m, H-10 e H-11), 1,26 (45H, m, demais hidrogênios) Dados de RMN de ^{13}C , $CDCl_3$, 100 MHz, em ppm: δ 14,07 (C-18 e C-22); 22-34 (todos os CH_2); 129,71 (C-8), 130,01 (C-9); 180,13 (C-1).

4.14. DERIVADOS DE CONDALINA-A



Di-hidrocondalina-A – sólido branco amorfo, $C_{33}H_{40}N_4O_4$, peso molecular 556,29 g/mol, $[M+H]^+$ m/z 557. Dados de RMN de 1H , DMSO, 400 MHz, em ppm: δ 5,77 (1H, s, H-3), 4,73 (1H, dd, H-4, $J_{4-21} = 4,7$ Hz), 8,04 (1H, s e d, NH-6 e NH-21, $J_{21-4} = 8$ Hz), 3,76 (1H, t, H-7, $J_{7-6} = J_{7-30} = 9$ Hz), 8,48 (1H, s, NH-9), 2,71 (2H, m, H-10), 3,89 (2H, m, H-11), 6,92 – 7,61 (14 H aromáticos, m, H-13, H-14, H-15, H-16, H-18, H-19, H-20, H-26, H-27, H-28), 3,01 (1H, dd, H-23, $J_{23-24} = 8,4$ Hz), 2,37 (1H,

m, H-24), 2,52 (1H, m, H-24'), 2,16 (3H, s, H-29), 1,30 (1H, m, H-31), 0,87 (1H, m, H-31') 1,41 (1H, m, H-30), 0,73 (3H, d, H-33, $J_{33-30} = 6,6$ Hz) 0,74 (2H, t, H-32, $J_{32-31} = 7,2$ Hz). Dados de RMN de ^{13}C , DMSO, 100 MHz, em ppm: δ 10,6 (C-33), 14,9 (C-32), 24,2 (C-31), 34,0 (C-29), 33,8 (C-11), 37,2 (C-30), 38,3 (C-10), 38,7 (C-24), 55,2 (C-4), 56,8 (C-7), 65,3 (C-23), 85,5 (C-3), 118,8 (C-15), 120,6 (C-16), 125,8 (C-14), 126,7 (C-18), 127,3 (C-20), 127,6 (C-26), 127,7 (C-19), 128,6 (C-28), 129,7 (C-13), 133,4 (C-12), 138,0 (C-25), 139,4 (C-17), 157,3 (C-1), 166,4 (C-5), 169,5 (C-8), 172,2 (C-22).



Dimetildi-hidrocondalina-A – sólido branco amorfo, $C_{34}H_{42}N_4O_4$, peso molecular 570,32 g/mol, $[M+H]^+$ m/z 571. Dados de RMN de 1H , DMSO, 400 MHz, em ppm: δ 5,77 (1H, s, H-3), 4,6 (1H, d, H-4, $J_{4-6} = J_{4-21} = 9$ Hz), 8,04 (1H, d, NH-6, $J_{6-7} = J_{6-4} = 7,8$ Hz), 3,9 (1H, t, H-7, $J_{7-6} = J_{7-30} = 9$ Hz), 8,4 (1H, s, NH-9), 2,71 (2H, m, H-10), 3,89 (2H, m, H-11), 6,8 – 7,4 (14H aromáticos, m, H-1, H-12, H-13, H-14, H-15, H-16, H-17, H-18, H-19, H-20, H-25, H-26, H-27, H-28 e NH-21), 3,01 (1H, dd, H-23, $J_{23-24'} = J_{23-24} = 8,4$ Hz), 2,37 (1H, m, H-24), 2,52 (1H, m, H-24'), 2,1 (6H, s, H-29), 1,3 (1H, m, H-30), 0,87 (1H, m, H-31')

1,4 (1H, m, H-31), 0,73 (3H, d, H-33, $J_{33-30} = 6,6$ Hz) 0,74 (2H, t, H-32,

$J_{32-31} = 7,2$ Hz). Dados de RMN de ^{13}C , DMSO, 100 MHz, em ppm: δ 10,6 (C-33), 14,8 (C-32), 24,1 (C-31), 33,8 (C-11), 37,2 (C-30), 38,4 (C-10), 39,4 (C-24), 41,4 (C-29), 55,6 (C-4), 56,7 (C-7), 69,1 (C-23), 85,5 (C-3), 118,7 (C-15), 120,6 (C-16), 125,2 (C-14), 125,7 (C-18), 126,6 (C-20), 127,3 (C-26), 127,5 (C-19), 128,6 (C-13), 129,7 (C-27), 133,3 (C-12), 139,3 (C-25), 139,4 (C-17), 157,5 (C-1), 157,5 (C-5), 166,3 (C-8), 170,4 (C-22).

4.15. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Para a avaliação das atividades antimicrobianas foram utilizadas cepas-padrão da American Type Culture Collection (ATCC), conforme a Tabela 2. Os padrões utilizados para leitura e validação do método foram Cloranfenicol para as culturas de bactérias e Fluconazol para a dos fungos, preparadas conforme as normas da Food and Drugs Administration.

Tabela 2 – Micro-organismos (ATCC) utilizados no teste de atividade antimicrobiana.

Gram-positivos	Gram-negativos	Fungos
<i>Pseudomas aeruginosa</i> (27853)	<i>Bacillus cereus</i> (33019)	<i>Cândida albicans</i> (44373)
<i>Burkholderia cepacia</i> (17759)	<i>Enterococcus</i> (6589)	<i>Cândida parapslosis</i> (22018)
<i>Morganella morgani</i> (25829)	<i>Staphylococcus aureus</i> (25923)	<i>Cândida krusei</i> (6258)
<i>Escherichia coli</i> (25922)	<i>Enterobacter aerogenes</i> (13048)	<i>Cândida tropicalis</i> (750)
<i>Shigella sonnei</i> (25931)	<i>Bacillus subtilis</i> (19659)	<i>Cryptococcus neoformans</i> (28952)
<i>Salmonella typhimurium</i> (14028)	<i>Cryptococcus gatti</i> (56990)	<i>Sacharomyces cereviseae</i> (2601)

4.15.1. Meios de cultura

Para o meio de cultura para as bactérias, usou-se caldo de caseína de soja constituído de 5g de cloreto de sódio, 2,5g de dextrose, 2,5g de fosfato dibásico de potássio, 17g de peptona de caseína, 3g de peptona de soja e 1L de água destilada.

Para o meio de cultura para os fungos, usou-se caldo Sabouraud dextrosado constituído de 40g de dextrose, 5g de peptona de carne, 5g de peptona de caseína e 1L de água destilada.

4.15.2. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A CIM é a menor concentração de um composto capaz de inibir o crescimento de micro-organismos, sob condições de cultura adequadas e padronizadas. Este método trata-se de um ensaio quantitativo aplicado a avaliação do potencial das substâncias puras.

A determinação da CIM foi realizada pelo método de microdiluição em caldo, conforme descrito pela National Committee for Clinical Laboratories Standards. (NCCLS, 2003)

Este teste foi realizado em placas de cultura estéreis de 96 poços, onde cada poço foi inoculado com os micro-organismos na concentração de 1.10^6 células viáveis e, posteriormente, as amostras a serem testadas foram adicionadas no primeiro poço seguindo-se a diluição em série, de 200 µg/mL até 1,56 µg/mL. As placas foram incubadas por 24 horas a 35°C para as bactérias e, por 48 horas a 25°C para os fungos. Após a incubação, determinou-se o crescimento microbiano através da leitura da microplaca no espectrofluorímetro utilizando o comprimento de onda de 620 nm.

4.15.3. Determinação da concentração letal mínima (CLM)

A CLM é a menor concentração da substância capaz de alcançar uma redução maior que 99% do número das unidades formadoras de colônia (UFC). Neste método, as culturas de micro-organismos que não apresentaram crescimento ou foram inibidas no método CIM, foram inoculadas novamente utilizando 10 µL de cada uma das soluções presentes nos poços do teste anterior e 90 µL de um novo meio de cultura líquido apropriado para cada classe de micro-organismo. Após incubação por tempo necessário para o crescimento de cada micro-organismo determinou-se a CLM.

5. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

5.1. PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS EXTRATOS METANÓLICOS E FRAÇÃO ETÉREA BÁSICA

Comparando-se os cromatogramas apresentados nas Figuras 4 e 5 observa-se que houve pouca variação na composição química no extrato metanólico das cascas das raízes de *Condalia buxifolia* Reissek entre o verão (EB 1) e o inverno (EB 2). Na Figura 6 observa-se um pico principal na FEB com $t_r = 11,288$ min (21%), que também é observado nos cromatogramas do EB1 com $t_r = 11,730$ min (2,6%) e do EB2 com $t_r = 11,432$ min (9,9%). Com base em estudos anteriores sabe-se que a planta *Condalia buxifolia* apresenta o alcaloide ciclopeptídico Condalina-A em sua composição, acredita-se seja justamente este metabólito a substância em destaque nos cromatogramas. Também pode ser observada a eficiência da extração ácido-base para obtenção de alcaloides, uma vez que o cromatograma da fração básica apresenta grau de pureza considerável para uma fração sem purificação em coluna cromatográfica.

O comprimento de onda escolhido para apresentação dos cromatogramas foi de 220 nm por detectar maior quantidade de compostos comparado a outros comprimentos de onda testados e devido a substância de interesse apresentar máxima absorção nestes comprimentos de onda.

Figura 4 – Perfil cromatográfico em CLAE do EB1.

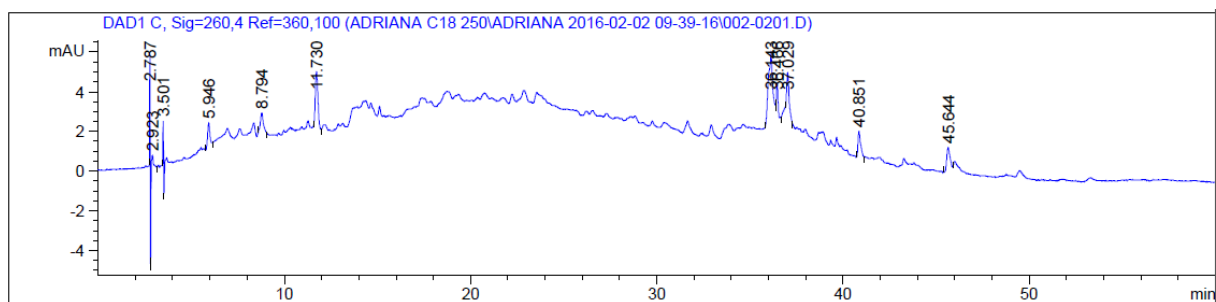


Figura 5 – Perfil cromatográfico em CLAE do EB 2.

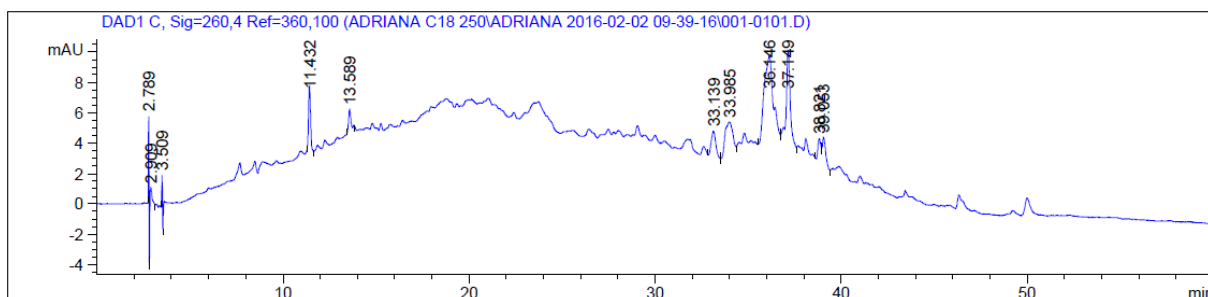
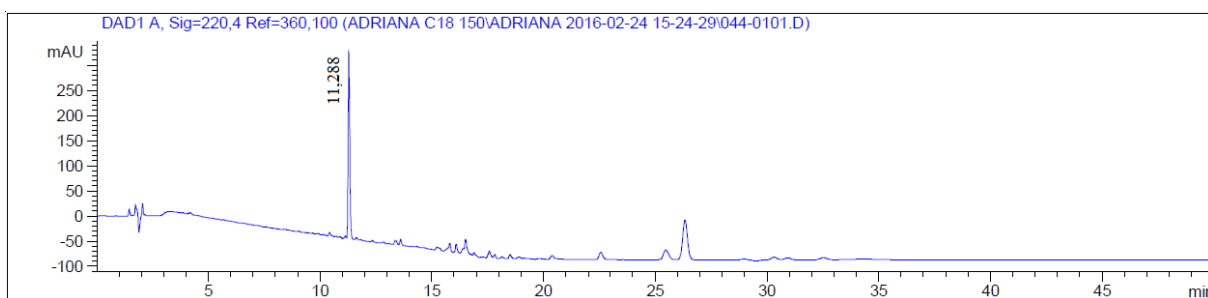


Figura 6 – Perfil cromatográfico da FEB



5.2. METABÓLITOS ISOLADOS DA FRAÇÃO ETÉREA BÁSICA

A FEB foi submetida a purificação por cromatografia em coluna utilizando-se sistemas de solvente em gradiente de clorofórmio e metanol 1%, 5%, 10% ,50% ,100%, a fim de isolamento do alcaloide ciclopeptídico Condalina-A (**1**). Foram obtidos 2,1g do metabólito desejado, cujos espectros de ^1H e ^{13}C são mostrados nas figuras 7 e 8 respectivamente, com sinais atribuídos por comparação com dados da literatura. (MALDANER, 2005). O espectro de DEPT 135° da Condalina-A e uma expansão do espectro de ^{13}C da região do solvente deuterado DMSO, para melhor visualização do C-24, encontram-se no ANEXO II (pág 94).

Figura 7 – Espectro de RMN de ^1H da Condalina-A, em DMSO, 600 MHz

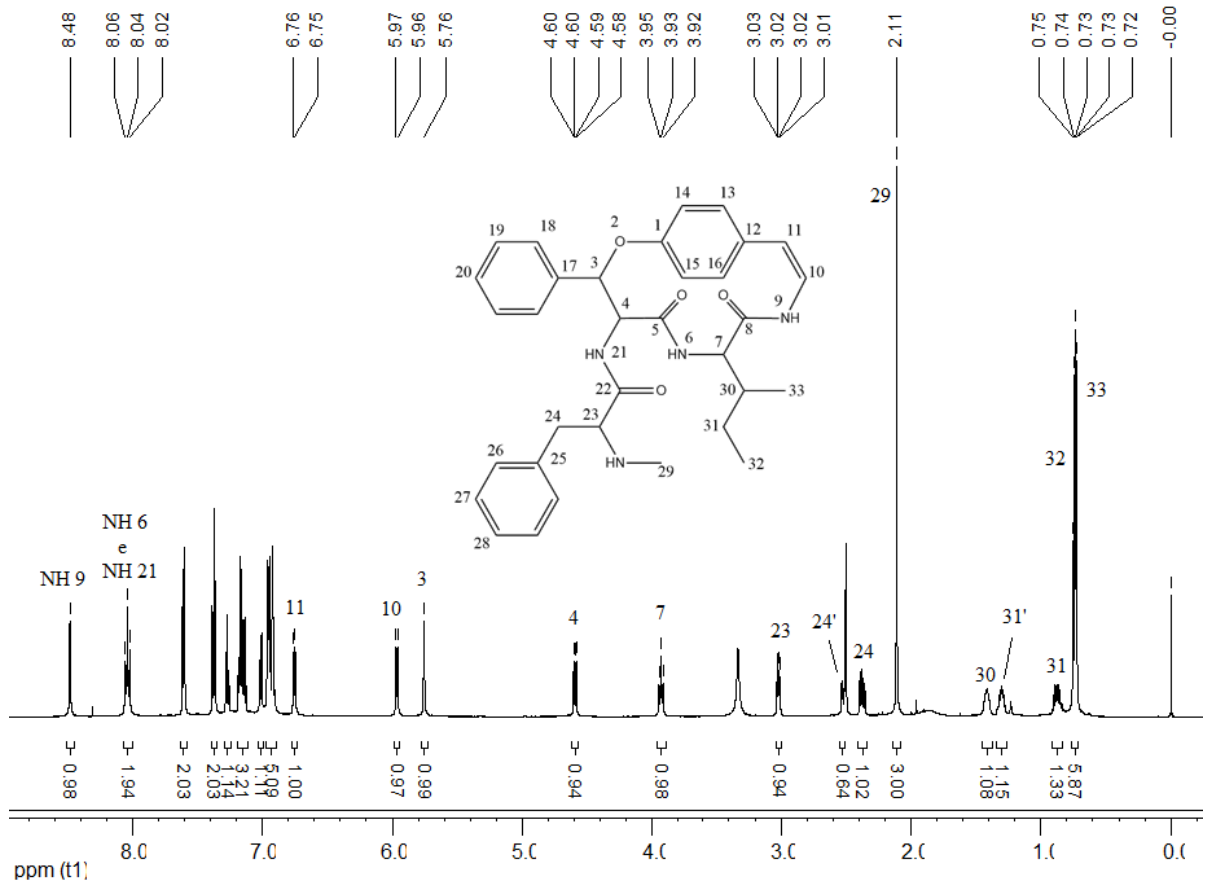
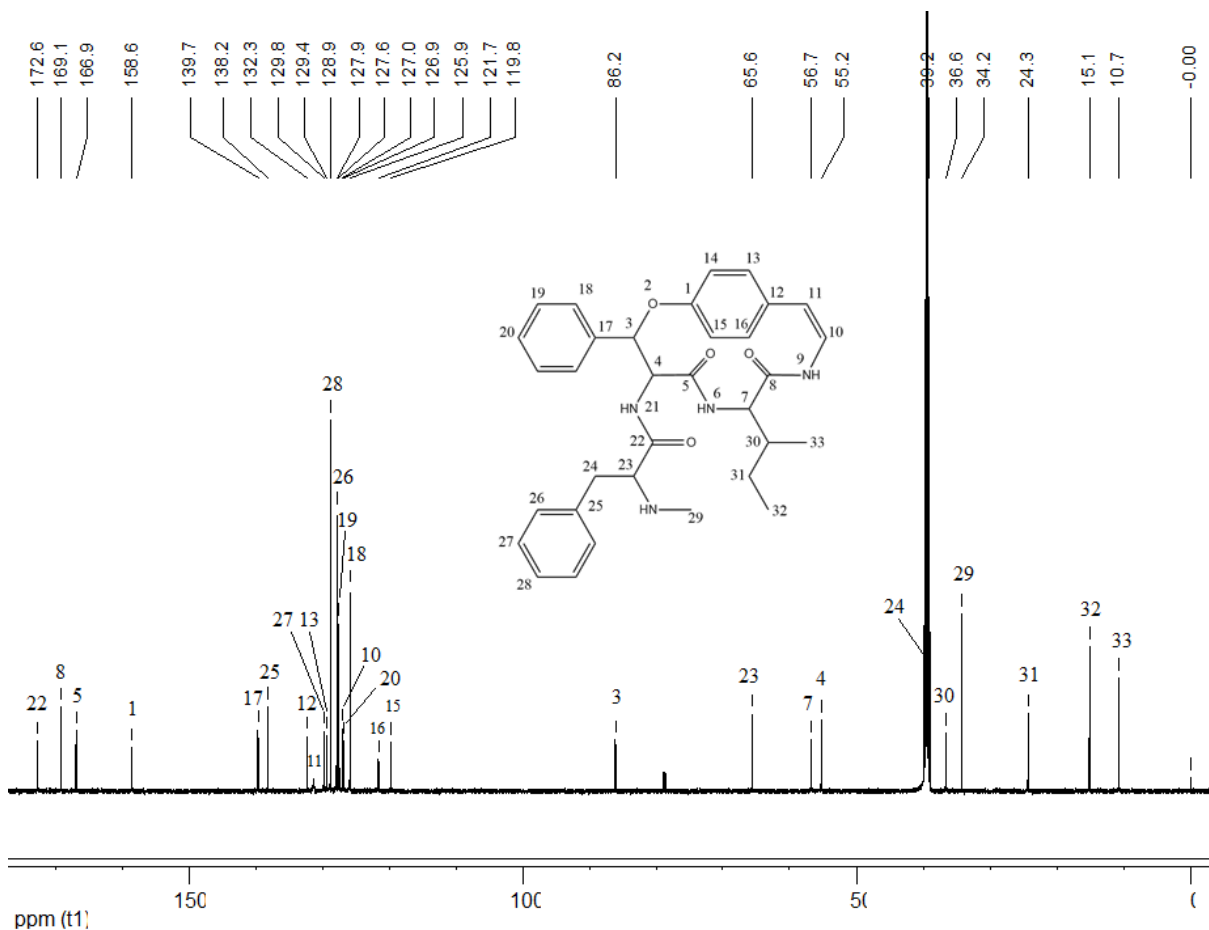


Figura 8 – Espectro de RMN de ^{13}C da Condalina A em DMSO, 150 MHz

A escolha do solvente DMSO para as amostras de Condalina A e derivados foi baseada no fato de que os solventes influenciam no deslocamento químico de hidrogênios e carbonos, em especial hidrogênios ligados a átomos diferentes de carbono que tendem a formar ligações de hidrogênio intramoleculares, neste caso os hidrogênios amídicos. As ligações de hidrogênio intramoleculares diminuem a densidade eletrônica em torno dos hidrogênios causando-lhes uma maior blindagem e assim os sinais dos hidrogênios aromáticos ficam sobrepostos com os hidrogênios amídicos, impossibilitando a atribuição de sinais. Solventes apróticos desfavorecem a formação de ligações hidrogênio intramolecular. O DMSO impede que ocorram ligações de hidrogênio na estrutura da Condalina-A e os hidrogênios amídicos são observados com deslocamento em campo mais baixo (mais desblindados). (METZKER, 2014)

Neste trabalho, 2,1 g de Condalina-A foram obtidos a partir de 1055 g de casca de raiz (0,19%). Maldaner, em seu trabalho em 2005, obteve 145 mg do alcaloide puro a partir de 2200 g de casca de raiz da planta (0,007%). Este rendimento acima do esperado pode ser explicado pelo fato de a coleta do material vegetal ter sido feita em locais diferentes. A planta utilizada neste trabalho foi coletada em Lavras do Sul-RS enquanto que a utilizada por MALDANER, foi coletada no município de Caçapava do Sul/RS.

5.3. METABÓLITOS ISOLADOS DA FRAÇÃO ETÉREA ÁCIDA

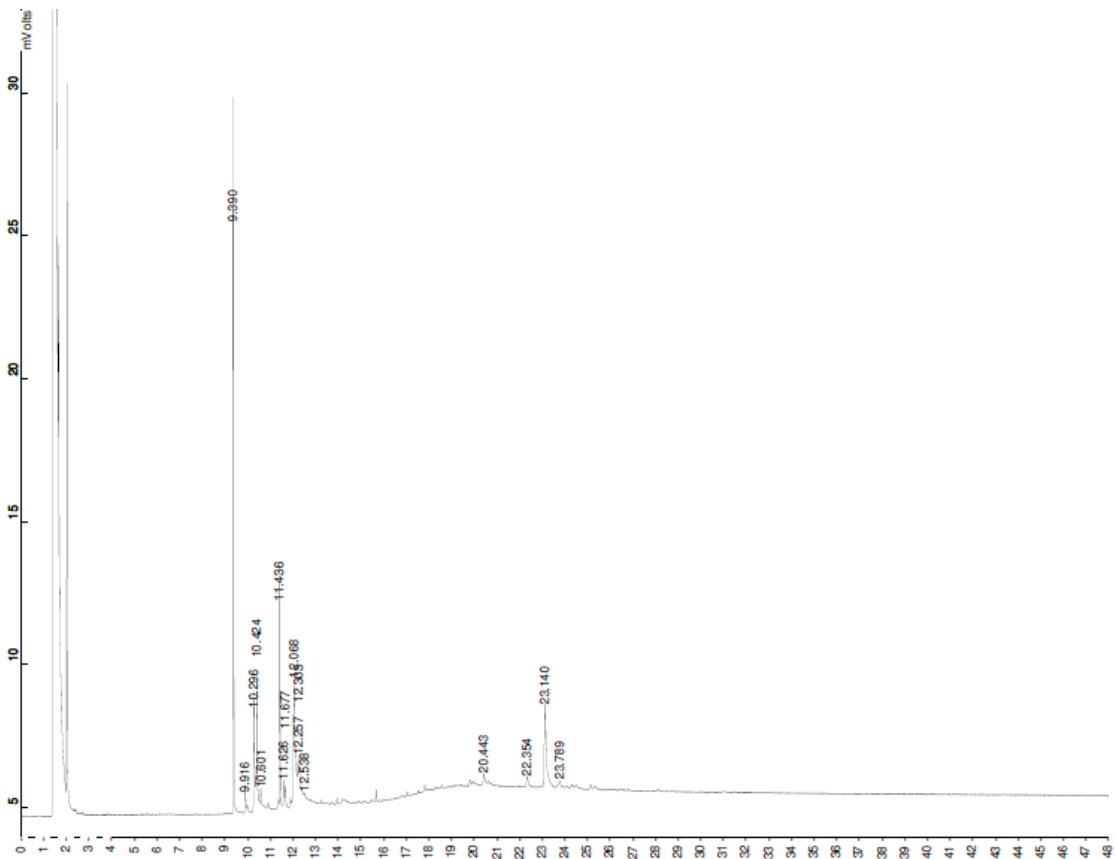
Verificou-se por CCD uma grande quantidade de compostos presentes nesta fração. A fim de facilitar o isolamento destes, optou-se por fazer primeiramente um fracionamento com solventes em ordem crescente de polaridade, hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol. Obteve-se quatro frações, mostradas na Tabela 3.

Tabela 3 – Fracionamento da FEA e quantidade das frações obtidas

Fração	Quantidade obtida (g)
Fração hexano	1,31
Fração diclorometano	1,30
Fração acetato de etila	1,95
Fração metanol	0,98

A fração hexano foi submetida a análise por CG e as frações diclorometano, acetato de etila e metanol a análise por CLAE. As frações foram comparadas com alguns padrões disponíveis no laboratório, conforme os cromatogramas mostrados nas figuras 9, 10, 11 e 12. As frações hexano e diclorometano foram submetidas a cromatografia em coluna, mas só foi possível a identificação de metabólitos da fração hexano.

Figura 9 – Análise em CG da fração hexano



Nas análises de CG, os padrões utilizados para comparação foram de β -sitosterol ($t_r = 23,123$ min) e Estigmasterol ($t_r = 22,345$ min). Embora não tenham sido feitas coinjeções do padrão + amostra, por comparação dos tempos de retenção com os padrões pode-se dizer que o pico com $t_r = 23,140$ min corresponde ao β -sitosterol e o pico com $t_r = 22,354$ min corresponde ao Estigmasterol, em quantidade muito pequena. Os cromatogramas dos padrões encontram-se no anexo I (a partir da pág 81)

Figura 10 – Análise em CLAE da fração diclorometano.

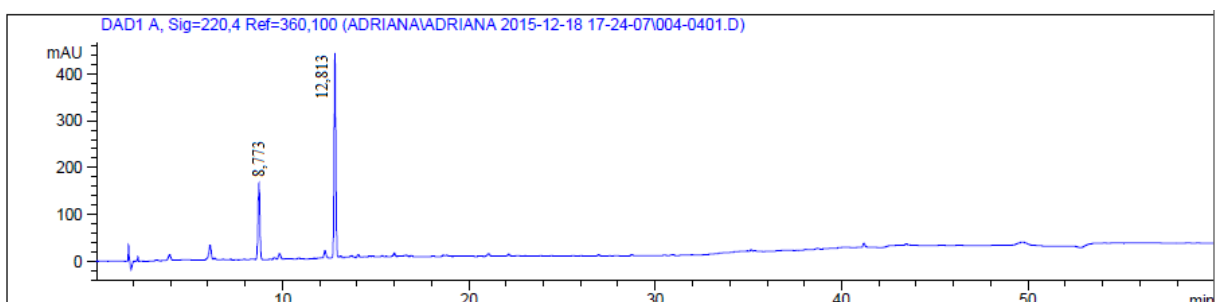


Figura 11 – Análise em CLAE da fração acetato de etila.

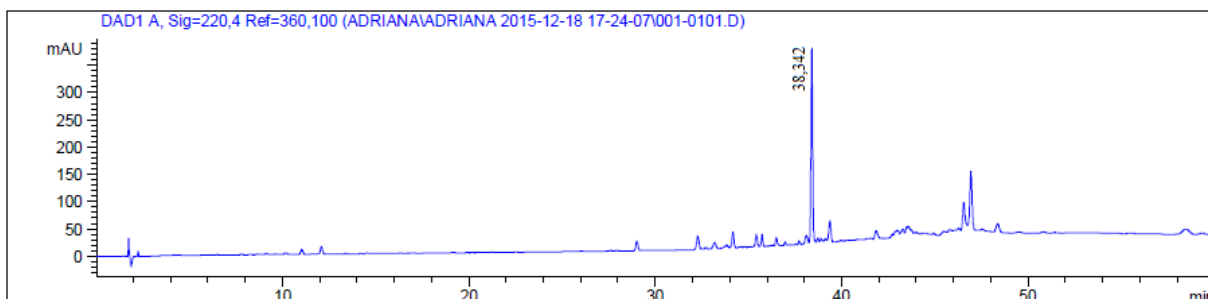
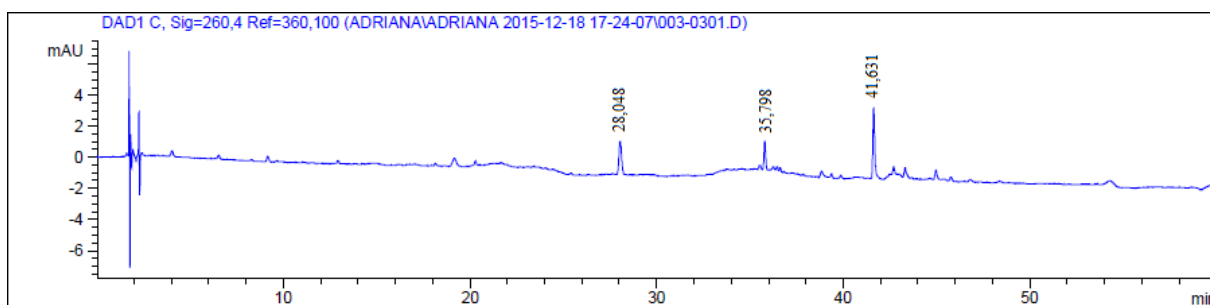


Figura 12 – Análise em CLAE da fração metanol.



Nas análises de CLAE, os padrões utilizados para comparação foram de Ácido clorogênico ($t_r = 16,1$ min), Ácido caféico ($t_r = 16,613$ min), Canferol ($t_r = 31,898$ min), Rutina ($t_r = 26,784$ min), Quercetina ($t_r = 29,704$ min) e Quercitrina ($t_r = 27,962$ min). Através da comparação com os tempos de retenção, a única aproximação que pode ser feita é para a fração metanol em que o pico com $t_r = 28,048$ min é bem próximo do tempo de retenção da Quercitrina, mas este metabólito não foi isolado. Para as frações diclorometano e acetato de etila não foi possível a identificação de nenhum composto por comparação com padrões e é perceptível um pico majoritário com $t_r = 12,813$ min na fração diclorometano e $t_r = 38,348$ min na fração acetato de etila.

5.3.1. Metabólitos isolados da fração hexano

Para CC da fração hexano, 1,3 g da fração foram adsorvidas em sílica, formando uma pastilha e sistemas de solvente em gradiente de hexano e acetato de etila 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 30% 50% 100%. A eluição dos compostos foi acompanhada por CCD. Desta fração foi possível a identificação de quatro compostos, sendo que um destes foi obtido na forma de cristal e sua estrutura foi determinada apenas por difração de raio-X. Os outros três foram identificados por RMN e os espectros de ^1H , ^{13}C e Dept 135.

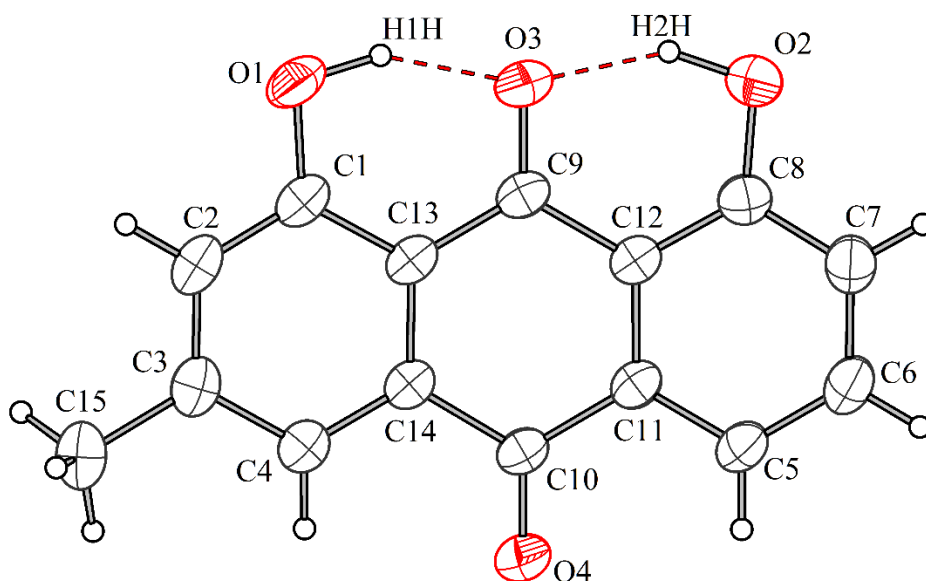
5.3.1.1. Identificação do metabólito codificado como H00

Este metabólito foi obtido na forma de cristais cor de laranja em formato de lâminas quadradas. A estrutura foi determinada somente por análise de difração de raio-X, e foi identificada como sendo a antraquinona Emodina (**29**) representada na Figura 13. A análise por RMN de ^{13}C e ^1H foi realizada para comparação com dados da literatura. Estes espectros encontram-se no ANEXO III (pág 93)

As antraquinonas naturais são encontradas em fungos, particularmente em espécies *Penicillium* e *Aspergillus* e em Líquens. Outras são encontrados em plantas superiores e em alguns casos, podem ser encontradas em insetos. (EVANS, 1996). Entre as propriedades biológicas e farmacológicas descritas para antraquinonas estão toxicidade para cupins, ação protetora contra insetos, atividade alelopática, efeito laxante, atividade antiprotozoária, antibacteriana, antifúngica e antitumoral, porém o uso como agente laxativo é o mais aplicado para esta classe de metabólitos (SIMÕES, 2004; CUNHA, 2010)

A antraquinona Emodina tem sido encontrado em diversas partes (cascas, caule, folhas, flores, sementes e frutos) de diversas espécies vegetais, principalmente das famílias Fabaceae, Polygonaceae e Rhamnaceae (IZHAKI, 2002). Entre algumas das espécies em que é encontrado este metabólito estão as Rahnáceas *Rheum palmatum* (LIU, 2015), *Frangula alnus* Mill (DOMIJAN, 2015), *Cassia tora* L. (NANDANI, 2013), *Senna reticulata* Willd (SILVA 2008) e pela primeira vez isolado da espécie *Condalia buxifolia*.

Figura 13 – Raio-X da Emodina



5.3.1.2. Identificação do metabólito codificado como H02

Este metabólito foi submetido a análise por RMN de ^1H e ^{13}C . Pelo espectro de ^1H da Figura 14 e expansões deste na Figura 15, observa-se um duplete intenso em δ 0,92 ppm com integração para 12H, um multiplete em δ 2,04 ppm, duplete em δ 4,01 ppm, deslocamento característico de hidrogênios ligados a carbonos ligados a oxigênio, com integração para 4H, e em δ 7,5 e 7,7 ppm multipletos com integração para 2H cada um, correspondentes a hidrogênios aromáticos que indicam um padrão característico de substituição no anel aromático. A integração dos sinais e o tipo de multiplete dos hidrogênios aromáticos sugerem uma estrutura simétrica, assim o duplete em 0,92 ppm provavelmente correspondem a duas CH_3 ligadas ao CH em 2,04 ppm, padrão característico do grupo isobutil (que pela integração pode-se perceber dois grupos isobutil) e o duplete em 4,01 ppm provavelmente corresponde a dois CH_2 .

Figura 14 – Espectro de RMN de ^1H de H02, em CDCl_3 , 400M Hz. No detalhe a expansão da região de 7,4 a 7,8 ppm para melhor visualização dos sinais de hidrogênios aromáticos.

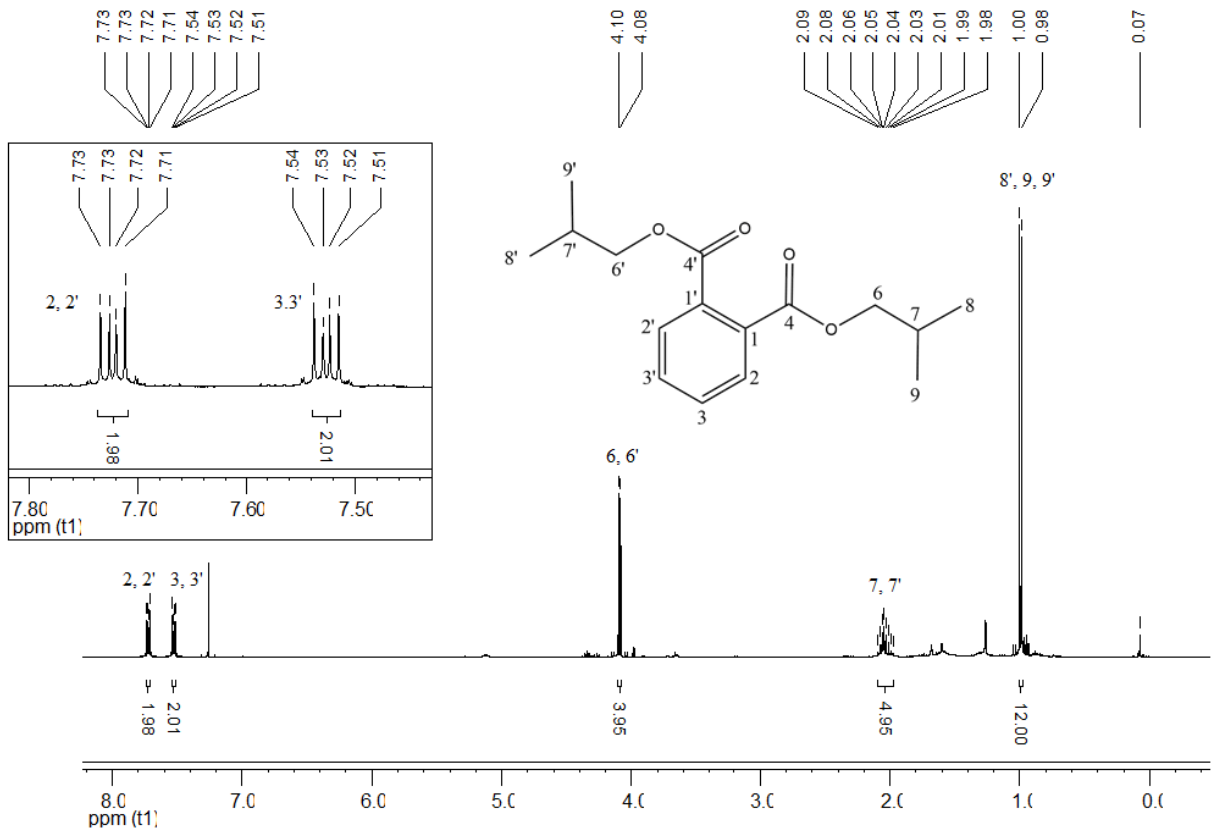
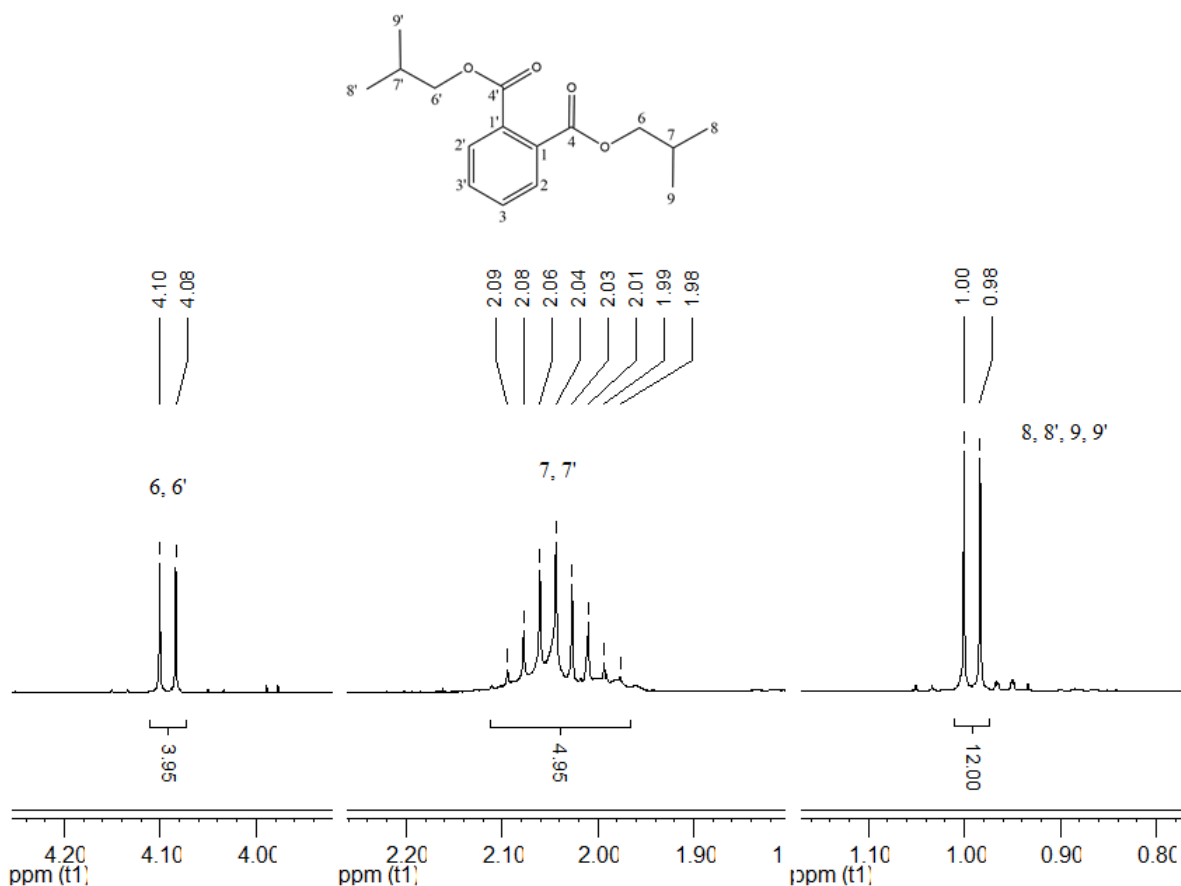
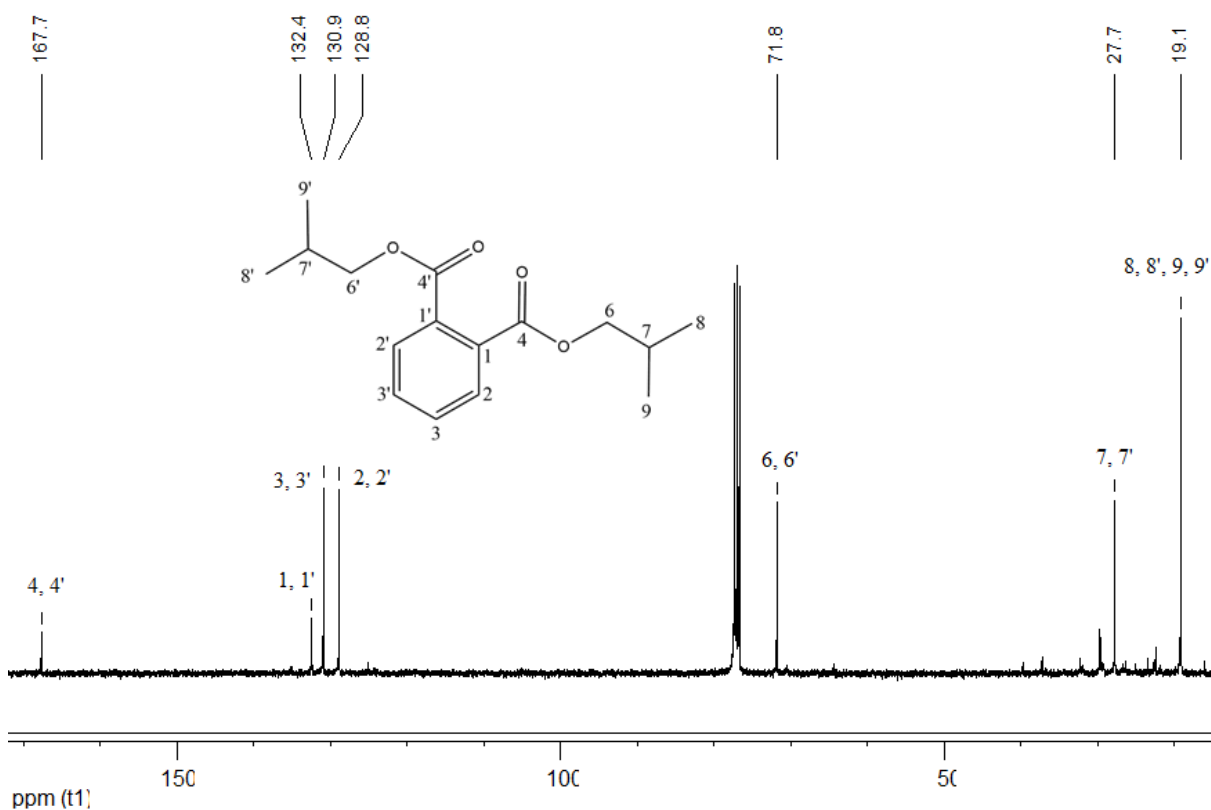


Figura 15 – Espectro de RMN de ^1H expandido de H02, em CDCl_3 , 400 MHz.



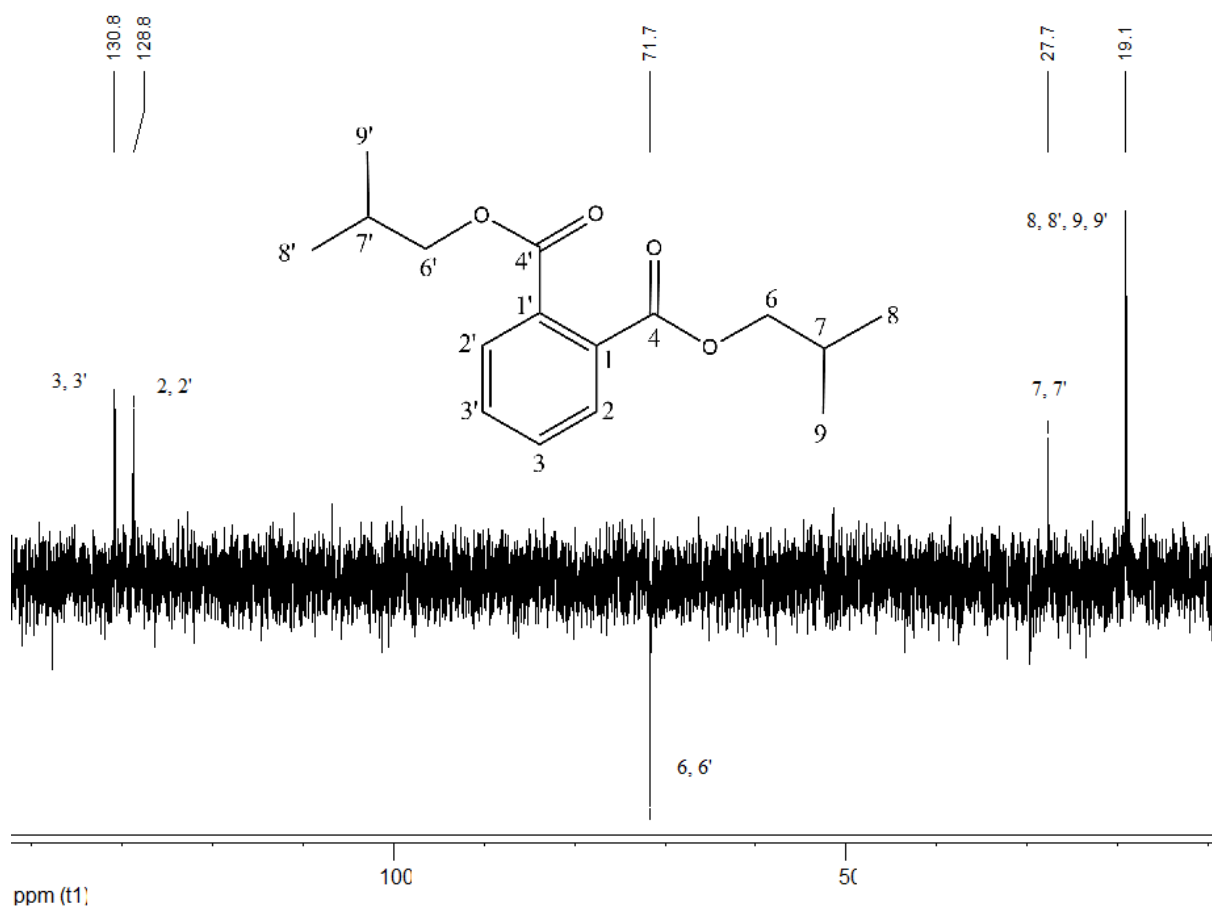
Pelo espectro de ^{13}C apresentado na Figura 16, observa-se um sinal em 19,14 ppm correspondente a CH_3 , um em 27,73 ppm correspondentes a CH , um em 71,79 ppm, deslocamento característico de carbono ligado a oxigênio. Na região dos aromáticos observa-se pela intensidade dos sinais, carbonos hidrogenados em 128,84 ppm e em 130,89 ppm e desidrogenados em 132,4 ppm, além de um sinal em 167,66 ppm, deslocamento característico de carbonilas de éster.

Figura 16 – Espectro de RMN de ^{13}C de H02, em CDCl_3 , 100MHz



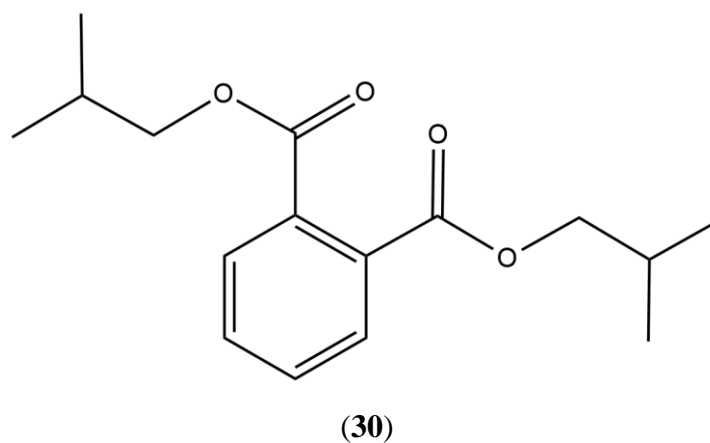
Pelo espectro de DEPT 135° apresentado na Figura 17, observa-se que o sinal em 71,78 ppm corresponde a um CH_2 , e o desaparecimento dos carbonos desidrogenados em 167,66 ppm (correspondente a carbonila) e os dois aromáticos em 130,88 ppm e em 128,84. Considerando uma estrutura simétrica, atribui-se quatro CH_3 em 19,14 ppm, dois CH em 27,73 ppm, dois CH_2 em 71,79 ppm, dois carbonos hidrogenados em 128,84 ppm e em 130,89 ppm e outros dois desidrogenados em 132,4 ppm, além de um duas carbonilas em 167,66 ppm.

Figura 17 – Espectro de RMN de DEPT 135° de H02, em CDCl₃, 100 MHz



Reunindo as informações dos espectros, concluiu-se que a substância H02 trata-se de um di-isobutil ftalato (**30**), cuja estrutura é apresentada na Figura 18.

Figura 18 – Di-isobutil ftalato.

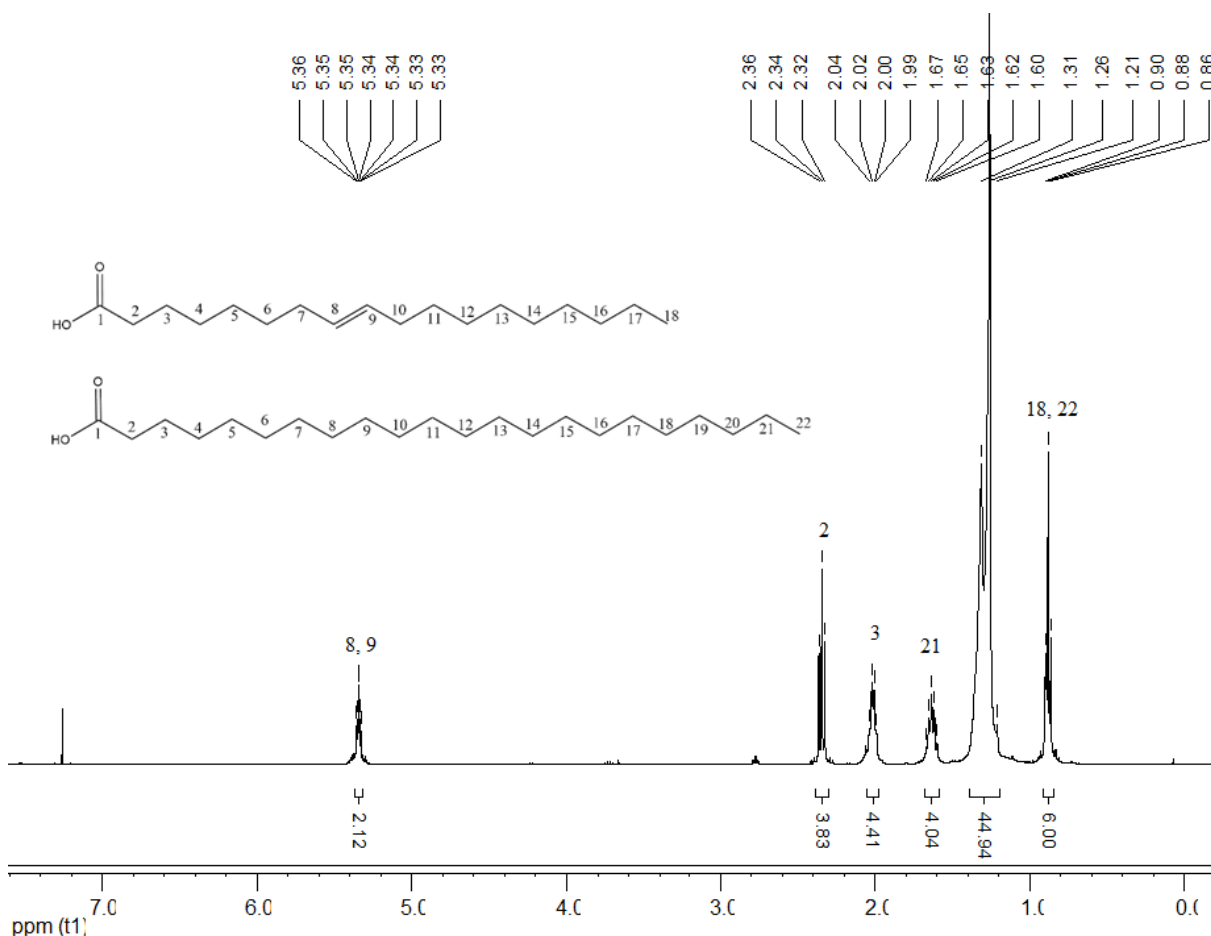


O di-isobutil ftalato foi submetido a análise por espectrometria de massas de alta resolução, fornecendo um pico com relação massa/carga de 278,1, confirmando a estrutura identificada.

5.3.1.3. Identificação do metabólito codificado como H05

O metabólito codificado como H05 foi submetido a análise por RMN de ^1H e ^{13}C . Pelo espectro de ^1H da Figura 19 e expansões deste na Figura 21, observa-se um triplo em 0,88 ppm com integração para 3H, um multipletto intenso em 1,26 ppm com integração para 22H, um quinteto 1,63 ppm com integração para 2H e um multipletto em 2,0 ppm também com integração para 2H, um triplo em 2,34 ppm com integração para 2H e um multipletto em 5,3 ppm. Estes deslocamentos sugerem uma cadeia linear, com vários CH_2 , com uma dupla ligação.

Figura 19 – Espectro de RMN de ^1H de H05, em CDCl_3 , 400 MHz



Pelo espectro de ^{13}C apresentado na Figura 20, observa-se um sinal em 180,13 ppm região característica de carbono carbonílico de ácido carboxílico. Os sinais em 130 ppm e em 129,71 ppm confirmam a presença de uma dupla ligação. O sinal em 14 ppm corresponde a um CH_3 e os sinais de 22 ppm a 34 ppm correspondem a vários CH_2 , conforme a expansão do espectro de ^{13}C da Figura 21.

Figura 20 – Espectro de RMN de ^{13}C de H05, em CDCl_3 , 100 MHz

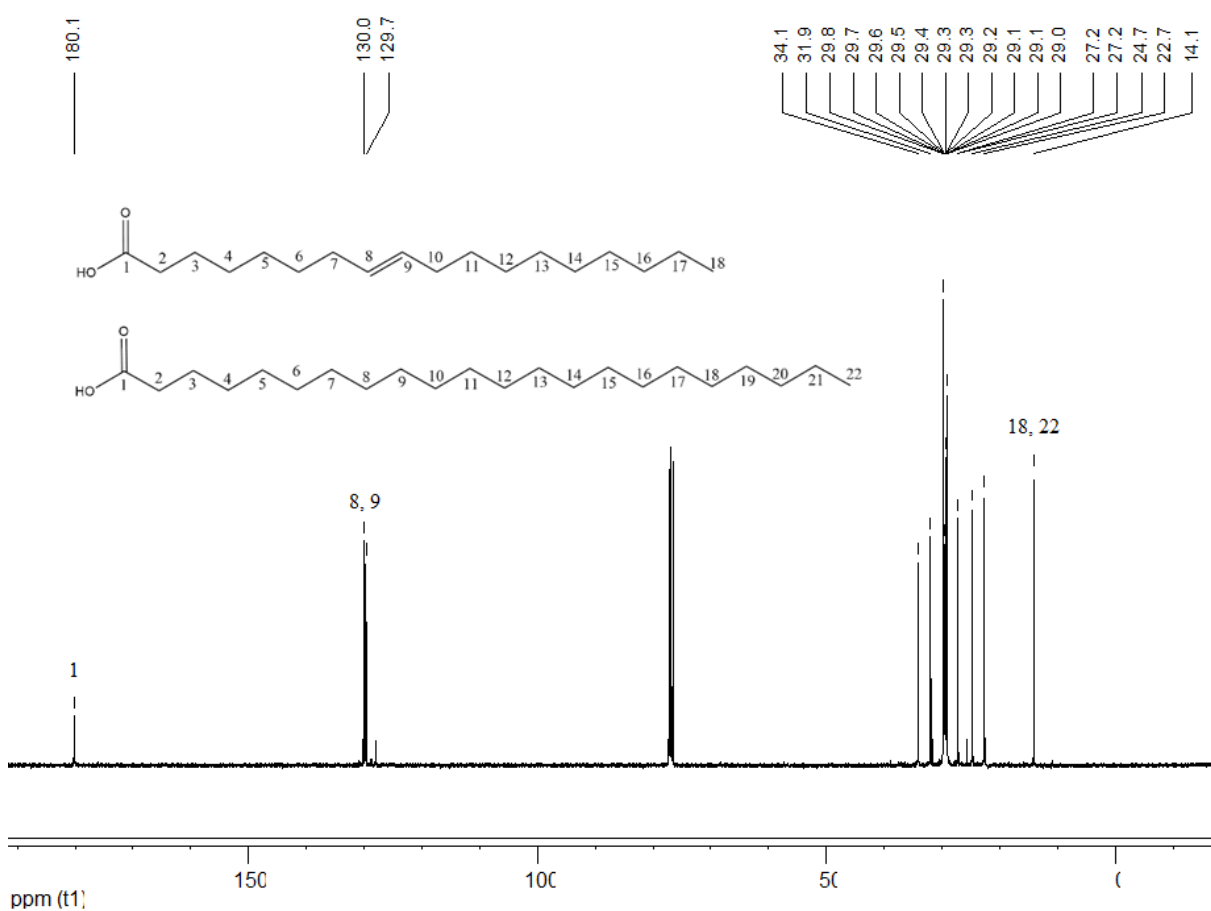
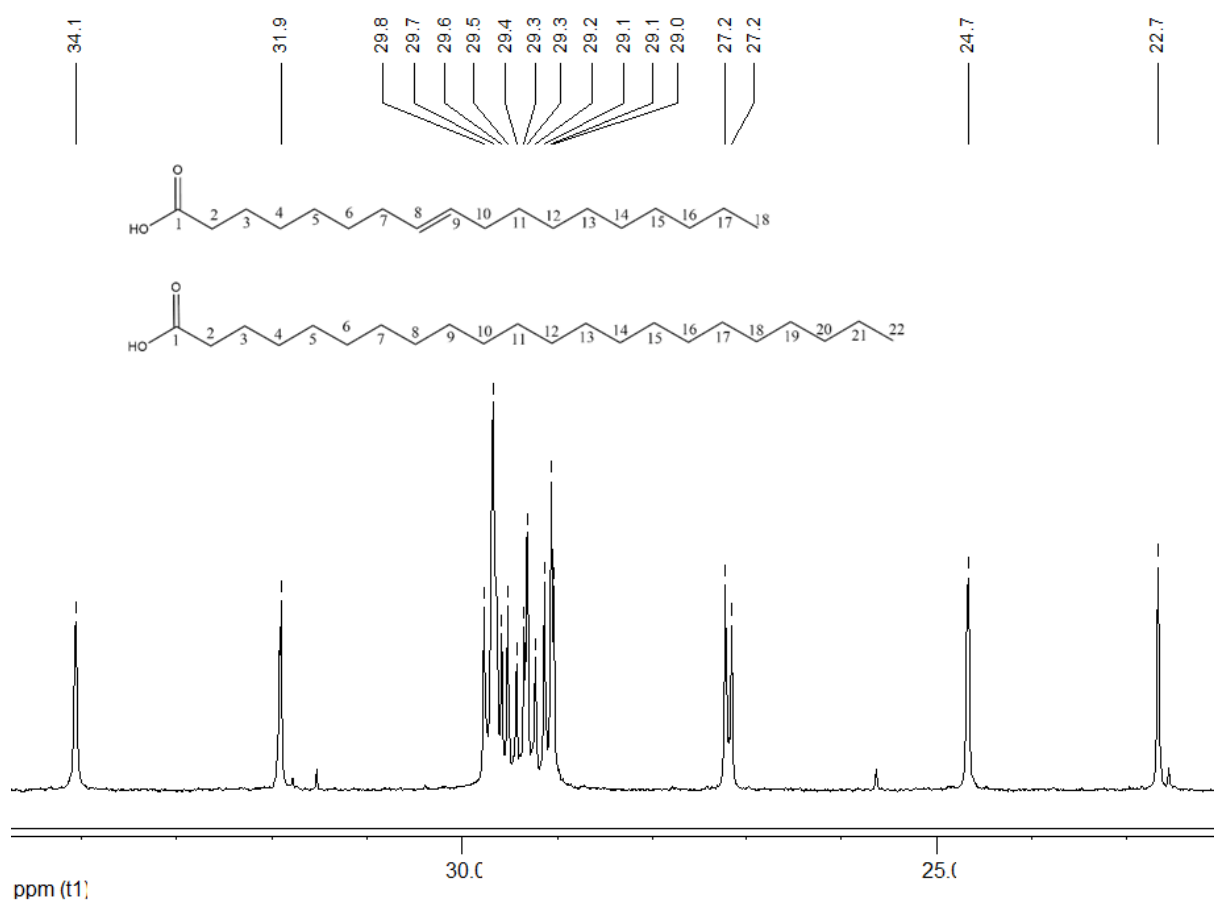
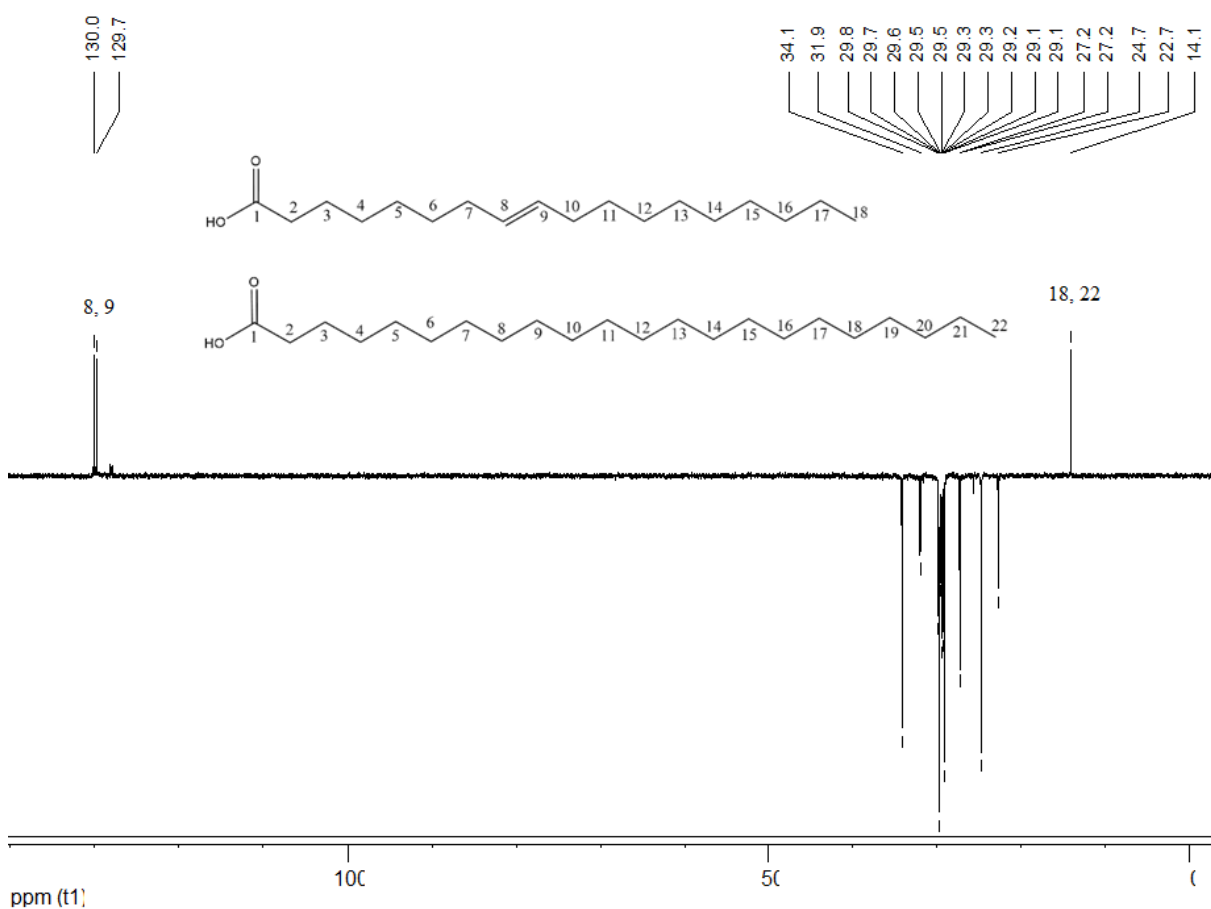


Figura 21 – Espectro de RMN de ^{13}C expandido de H05, da região de 14 a 34 ppm.



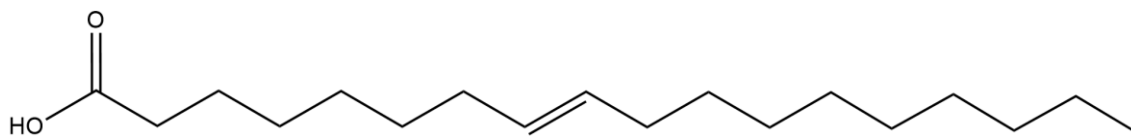
Pelo espectro de DEPT 135° apresentado na Figura 22, confirma-se que os sinais de 22 ppm a 34 ppm são CH_2 e os sinais da dupla ligação em 130 ppm e 129,7 ppm são CH. O sinal em 14 ppm corresponde a um CH_3 terminal.

Figura 22 – Espectro de RMN de DEPT 135 de H05, em CDCl_3 , 100 MHz

A substância isolada foi submetida a análise por cromatografia gasosa acoplado a espectrômetro de massas, mostrando que há uma mistura de duas substâncias uma com relação massa/carga de 282,1 e outra com 340,9.

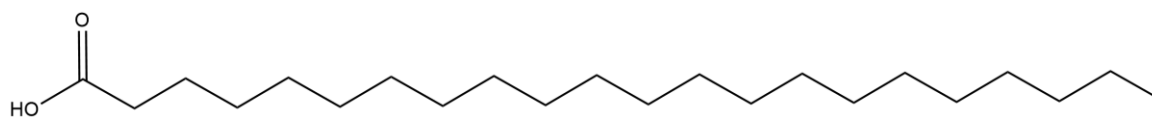
Reunindo a informações dos espectros, concluiu-se que H05 trata-se de uma mistura de dois ácidos graxos. O ácido oleico (**31**) com cadeia de 17 carbonos e uma instauração (m/z 282,1) e o ácido behênico (**32**) com cadeia de 21 carbonos (m/z 340,9) conforme a Figura 23.

Figura 23 – Ácido Oleico e Behênico

Ácido Oleico (**31**)

(continua)

(continua)

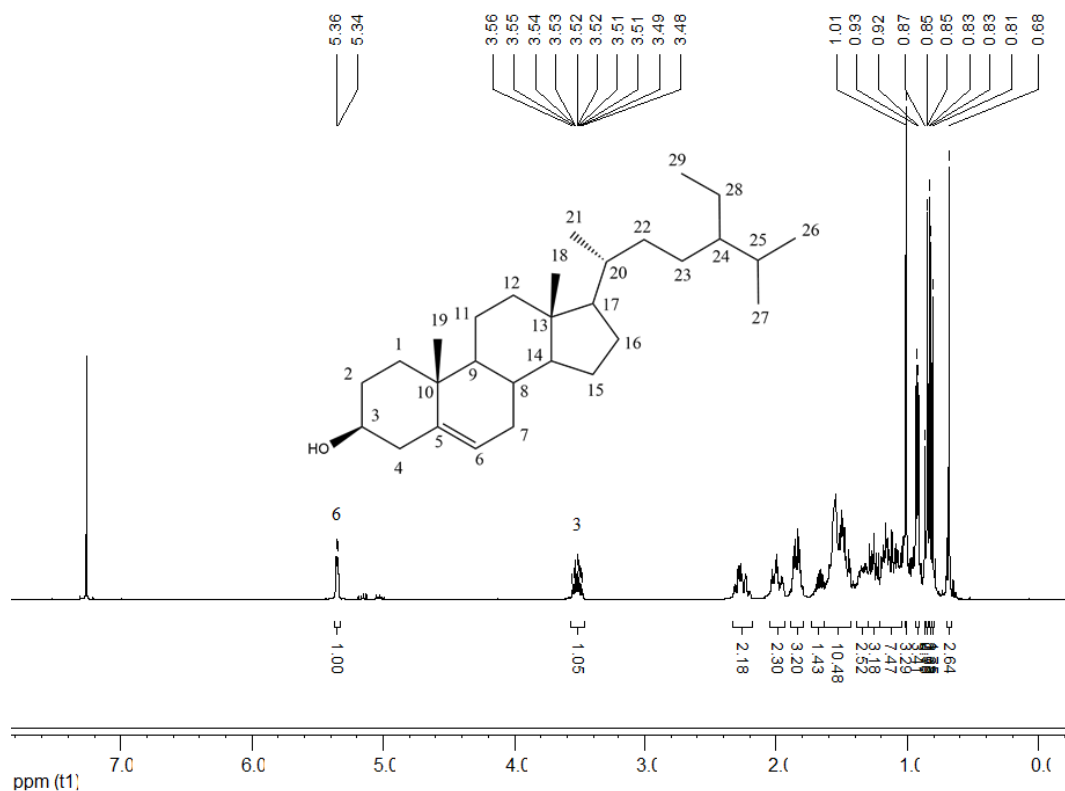
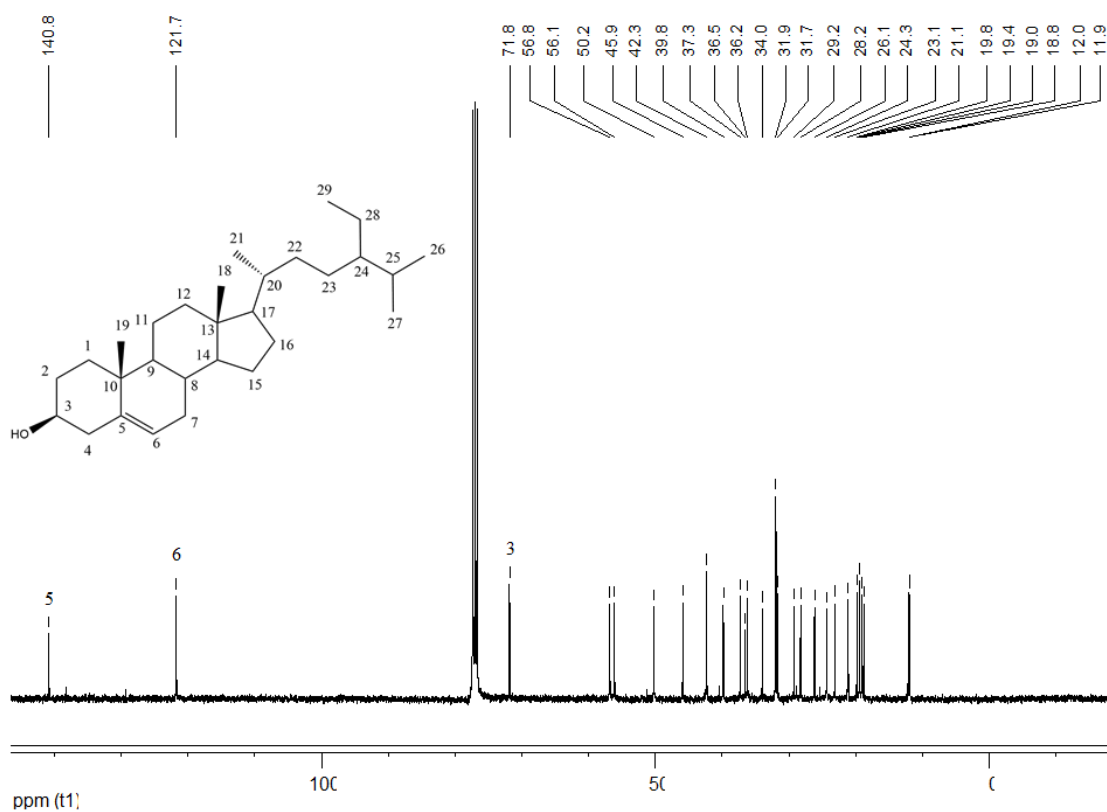


Ácido Behênico (32)

5.3.1.4. Identificação do metabólito codificado como H07

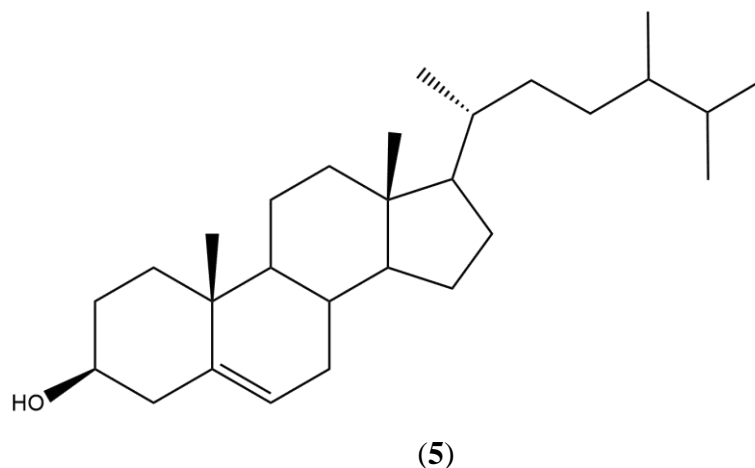
O metabólito H07 foi obtido na forma de cristais brancos em formato de agulha. Após lavagem com hexano e recristalização com acetato foram obtidos 20 mg do produto que foi submetido a análise por RMN de ^{13}C e ^1H e conforme as Figuras 24 e 25. Através de comparação dos deslocamentos de carbono com dados da literatura (MALDANER, 2005) o metabólito foi identificado como sendo o fitoesteroide β -sitosterol (5), representado na Figura 26.

O β -sitosterol é um metabólito muito comum em vegetais, podendo ser encontrado em quase todas as espécies principalmente em plantas superiores. Frequentemente o β -sitosterol pode ser encontrado na forma de derivados mais complexos, como ésteres de ácidos graxos, aromáticos ou glicosilados (PRIDHAM, 1967; LEHNINGER, 1995; ROBINSON, 1991) que conferem ao β -sitosterol diversas atividades biológicas: agente alelopático, feromônio de agregação, tem ação antiviral, antiinflamatória, antibacteriano, atividade frente ao vírus da hepatite (ensaios *in vitro*) e ainda apresentando atividade citotóxica seletiva contra alguns tipos de células cancerígenas, além de atuarem na diminuição do colesterol total do plasma sanguíneo e no combate a arteriosclerose (enrijecimento das artérias). (LI E ZHAO, 2015; ESPINDOLA, 2006; MORI, 1993; CUI, 2008; DROZDOVA, 2007; OLIVEIRA, A., 2007; SOLOMONS, 2006; COLE, 2015).

Figura 24 – Espectro de RMN de ^1H do β -sitosterol, em CDCl_3 , 400 MHzFigura 25 – Espectro de RMN de ^{13}C do β -sitosterol, em CDCl_3 , 100 MHz

A comparação com dados da literatura (MALDANER, 2005) possibilitou a confirmação de que o metabólito em questão é o β -sitosterol (5), representado na Figura 26.

Figura 26 – β -sitosterol.

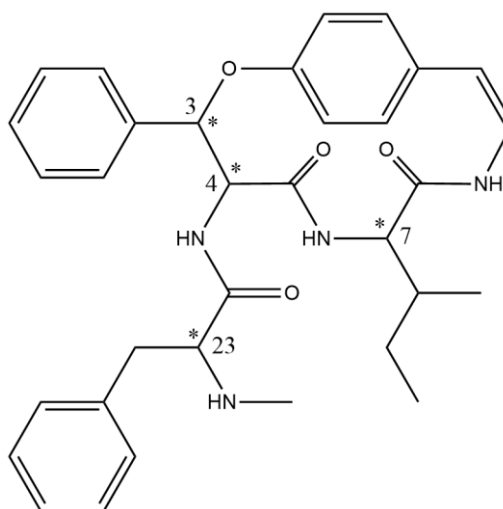


5.4. CONFIRMAÇÃO DA ESTEREOQUÍMICA ABSOLUTA DO ALCALOIDE CICLOPEPTÍDICO CONDALINA-A

A configuração absoluta está relacionada com a disposição dos grupos ao redor do centro quiral ou outro elemento de quiralidade, em outras palavras é o arranjo real dos grupos em uma molécula quiral e pode ser determinada por técnicas espectropolarimétricas ou utilizando-se reações de estereoquímica conhecida, com moléculas cuja configuração absoluta seja conhecida. As configurações absolutas são especificadas pela convenção R, S ou por projeções de Fischer (SOLOMONS et al, 2005). Já a configuração relativa se refere à disposição dos grupos em uma molécula, entre átomos ligados a diferentes centros, como cis/trans, eritro/treo, syn/anti etc. (LÓPEZ, 2001).

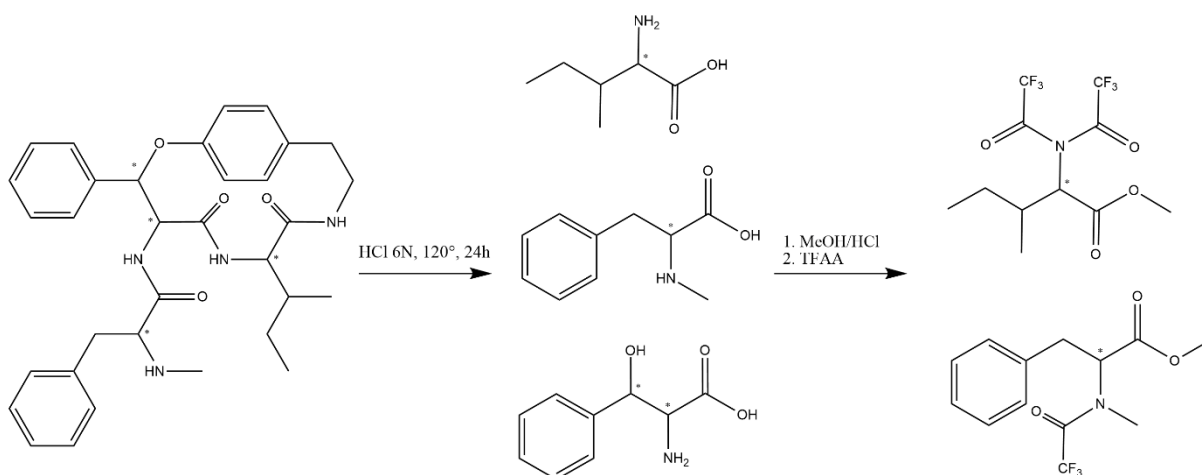
O alcaloide ciclopeptídico Condalina-A teve a configuração absoluta do carbono C-7 do aminoácido isoleucina e do carbono C-23 da N-metil-fenilalanina definidas por cromatografia gasosa enantiosseletiva, utilizando-se uma coluna contendo 3-pentil-2,6-dimetil- β -ciclodextrina como fase estacionária. Já a configuração relativa do carbono C-3 e do carbono C-4 da unidade de β -hidroxifenilalanina, foi determinada por análise das constantes de acoplamento vicinal dos hidrogênios H-3 e H-4 com auxílio das técnicas bidimensionais COSY e NOESY. (MOREL, 2002). Os centros quirais da Condalina-A estão representados na Figura 27.

Figura 27 – Centros quirais C-3, C-4, C-7, e C-23 da Condalina A.



Na metodologia citada, foi realizada uma hidrólise ácida da Diidrocondalina-A. A seguir os aminoácidos resultantes foram derivatizados com uma reação de esterificação da função ácido carboxílico, seguidos de uma reação de acetilação da função amino, conforme o Esquema 6.

Esquema 6 – Hidrólise do alcaloide e derivatização dos aminoácidos originados.



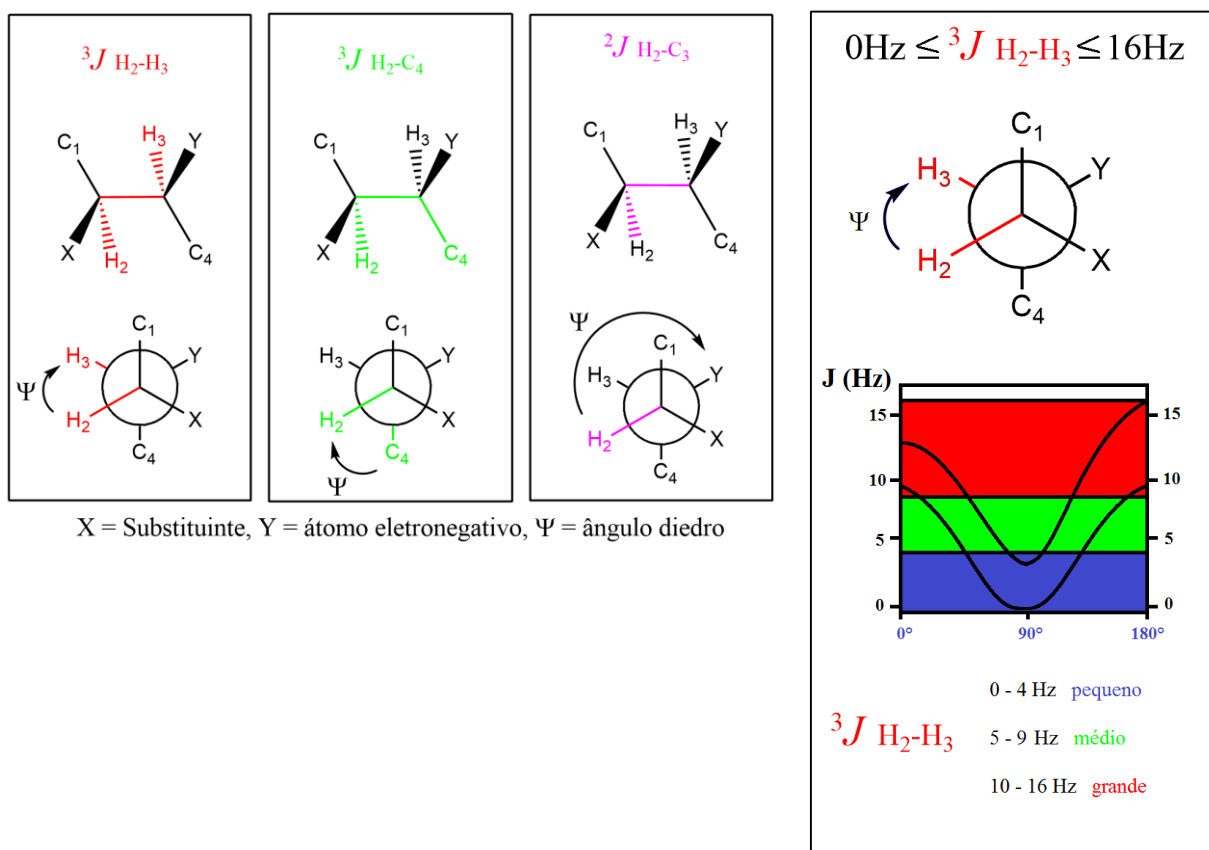
A mesma derivatização foi realizada com os aminoácidos correspondentes a Diidrocondalina-A hidrolisada, na forma de mistura (*D, L*) e na forma pura (*L*) pura, para serem utilizados como padrões na cromatografia gasosa. Ao comparar os tempos de retenção desses padrões com aqueles dos aminoácidos correspondentes a Dihidrocondalina-A hidrolisada, foi

possível atribuir a configuração absoluta de C-7 e C-23 como *L(S)*, como pode ser observado na Figura 32.

A degradação da unidade β -hidroxifenilalanina no processo de hidrólise do alcaloide impossibilitou a determinação da configuração absoluta dos carbonos C-3 e C-4. Por este motivo utiliza-se experimentos de RMN que permitem análise das constantes de acoplamento vicinal entre hidrogênios.

O valor de constantes de acoplamento vicinal fornece dados que se relacionam com os ângulos diedros entre os hidrogênios que acoplam. (KARPLUS, 1959). Na figura 28, podemos observar a relação entre o ângulo diedro e a dimensão entre esses acoplamentos, que pode ser pequeno, médio ou grande. (BIFULCO 2007)

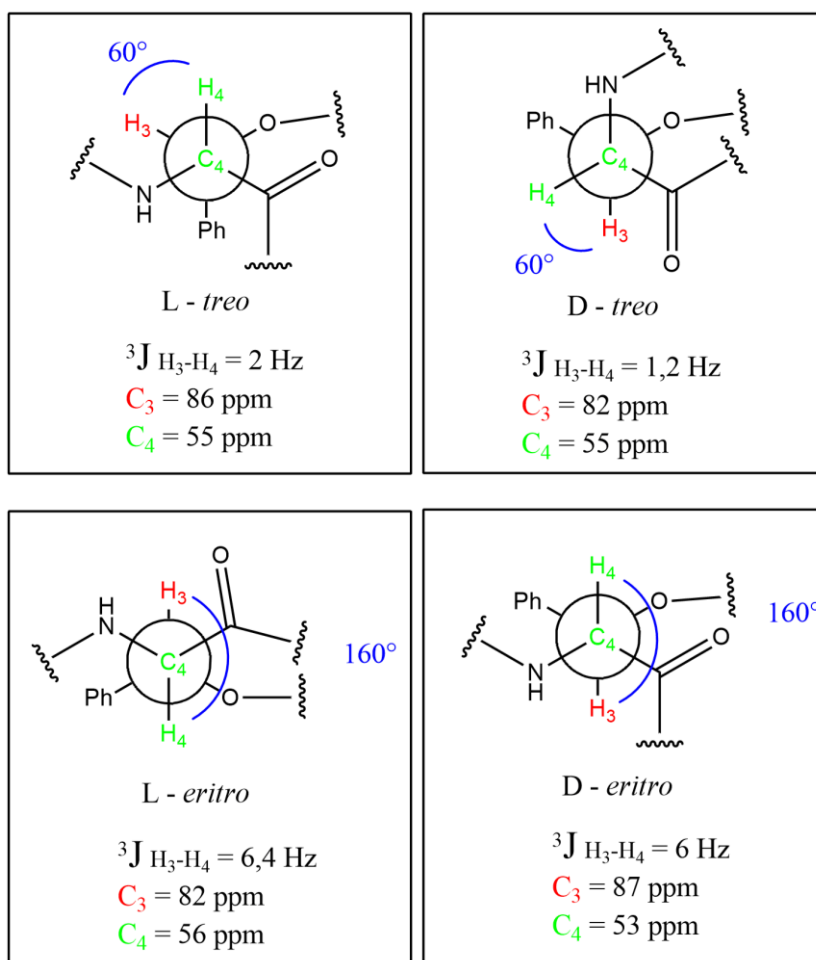
Figura 28 – Magnitude da constante de acoplamento em função do ângulo diedro entre os átomos que acoplam.



Fonte: Adaptado de Bifulco et. al. 2007

A partir destas análises dois tipos de configurações relativas podem ser obtidas: *eritro* e *treo*, conforme a Figura 29. (BIFULCO, 2007)

Figura 29 – Modelos de configurações relativas *eritro* e *treo*.

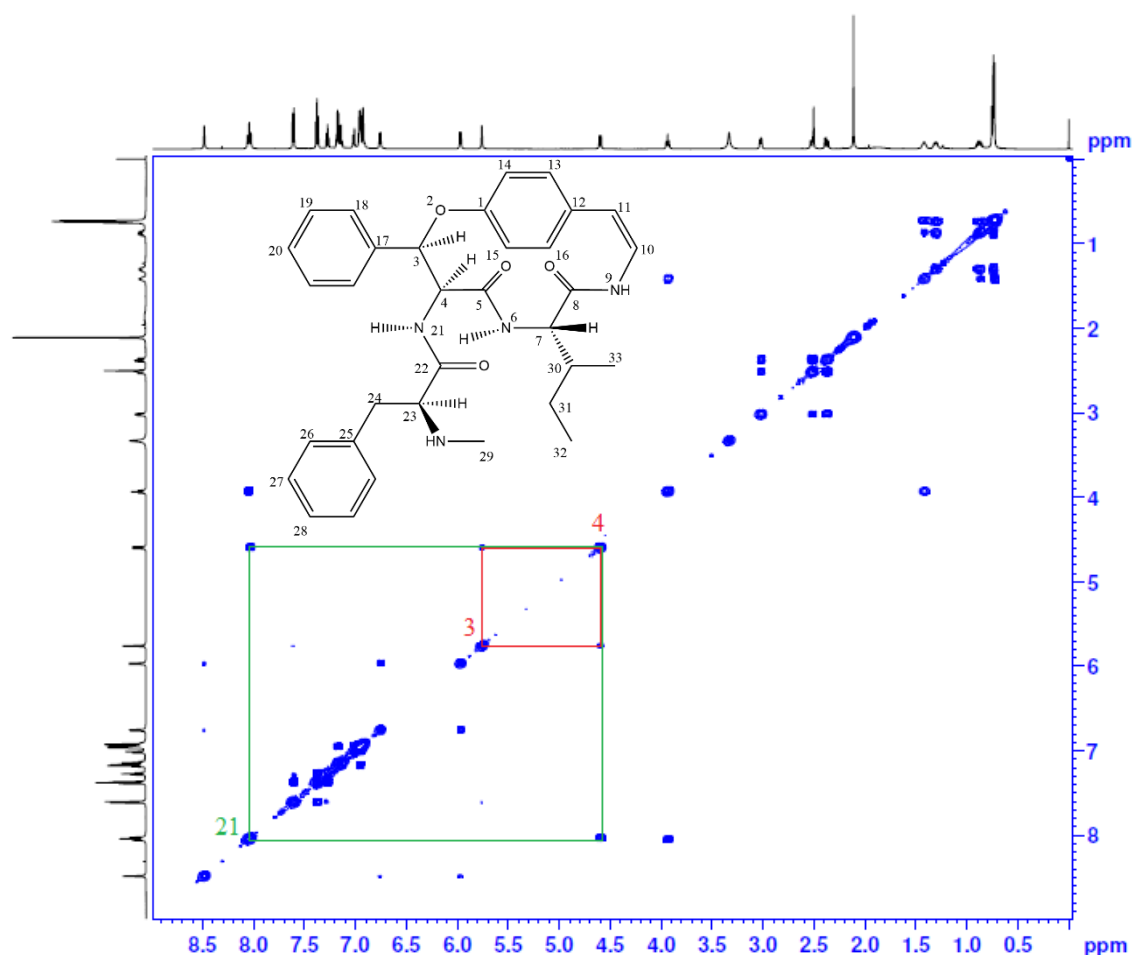


Fonte: Adaptado de Morel et al. 2013

Para alcaloides que possuem uma constante de acoplamento entre os hidrogênios H-3 e H-4 de 8 Hz é visto uma configuração *eritro* na unidade β -hidroxiaminoácido, e para alcaloides que possuem uma constante de acoplamento entre os hidrogênios H-3 e H-4 de 2 Hz é visto uma configuração *treo*. Para a série L-*eritro* o sinal de carbono alfa (C-4) é observado em 56 ppm e para D-*eritro* é observado em 53,8 ppm. O carbono beta (C-3) para L-*eritro*, aparece em 81,5 ppm e para D-*eritro* aparece em um campo mais baixo, 87 ppm. Para a série D-*treo* o carbono C-3 é observado em 82,0 ppm enquanto o C-4 aparece em 55,0 ppm. Na série L-*treo*, o carbono C-3 aparece em 86,0 ppm enquanto C-4 é observado em 55,0 ppm. (MOREL, 2013).

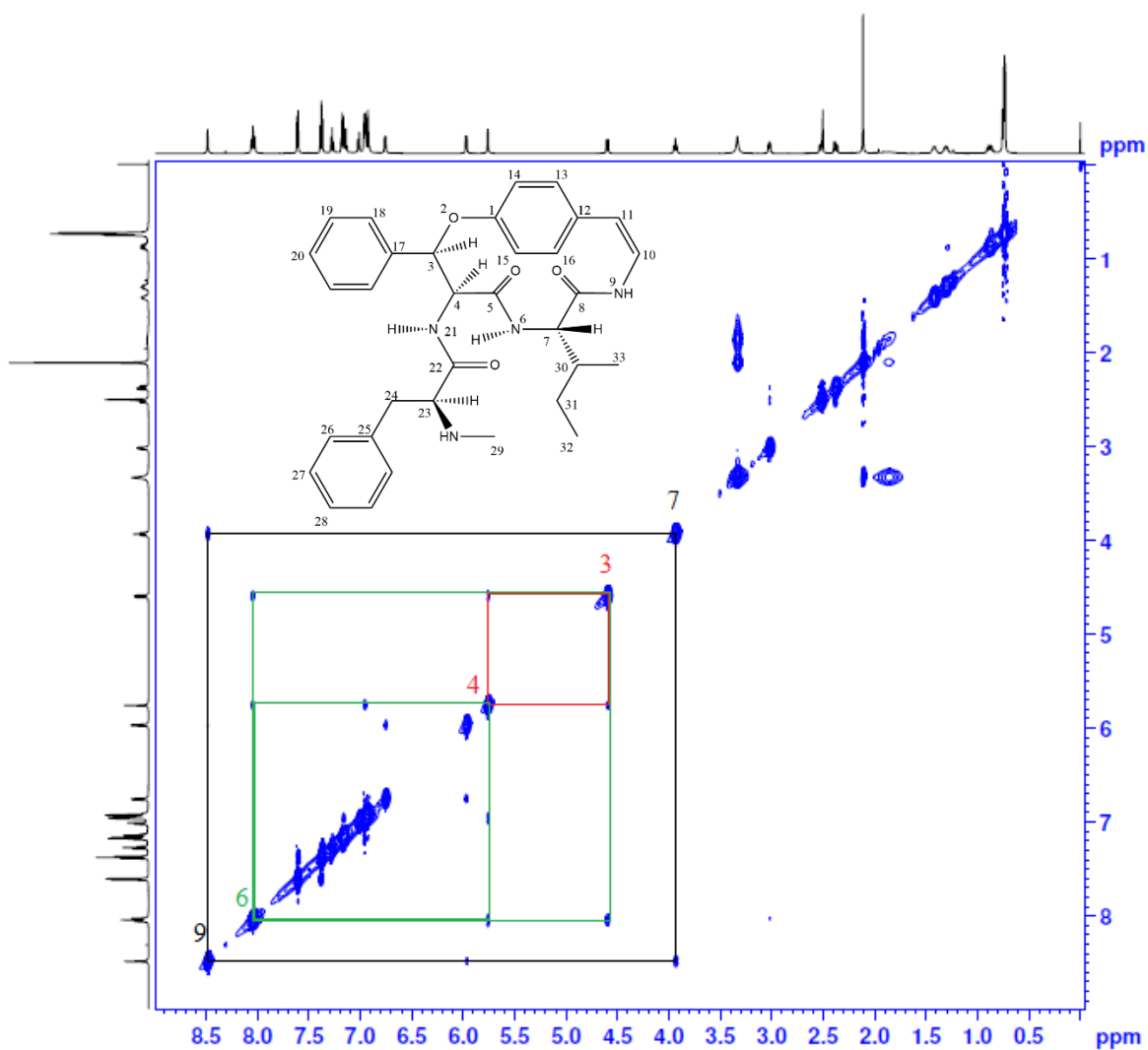
Para o alcaloide Condalina-A o hidrogênio H-3, mostrado na Figura 7 (página 32) foi observado como um simpleto em δ 5,81 ppm (1H, s) e mostrou um acoplamento no COSY com H-4, observado em δ 4,58 ppm que por sua vez mostrou acoplamento no COSY com N-H 21 (1H, d, $J_{4,6} = 9,2$ Hz), conforme a Figura 30. A constante de acoplamento vicinal perto de zero dos prótons de β -hidroxifenilalanina (H-3 e H-4) e o deslocamento do carbono C-3 em 86 ppm e do carbono C-4 em 55 ppm (Figura) indicam uma configuração *L-treo* para este resíduo de aminoácido.

Figura 30 – Espectro de RMN bidimensional de COSY, em DMSO, 600 MHz.



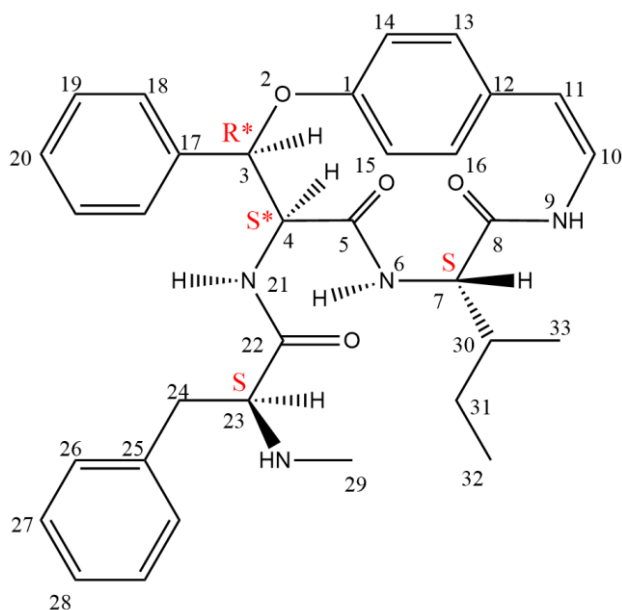
O espectro NOESY apresentado na Figura 31, mostra acoplamento entre H-3 e H-4. Por sua vez, H-4 tem acoplamento com NH-6, mas NH-6 só apresenta correlação com H-3 e H-4 e não com H-7 e este último apresenta correlação com NH-9.

Figura 31 – Espectro de RMN bidimensional de NOESY, em DMSO, 600 MHz.



O fato de NH-6 não apresentar correlação com o H-7, confirma que a β-hidroxifenilalanina de Condalina-A tem uma configuração *L-treo* ($3R^* / 4S^*$), conforme a apresentada na Figura 32.

Figura 32 – Estereoquímica relativa dos carbonos C-3 e C-4 e absoluta e dos carbonos C-7 e C-23.



No presente trabalho a configuração absoluta de todos os centros quirais do alcaloide Condalina-A foram determinados através da medida de difração de raio-X de seu cristal na forma de seu sal Hidroiodeto.

A região de raios-X corresponde a comprimentos de onda da mesma ordem de grandeza dos espaçamentos entre os planos dos cristais. É isto que permite que a radiação possa ser difratada pelos átomos constituintes da estrutura cristalina como foi primeiramente reconhecido por Max von Laue em 1912. A técnica de difração de raios-X permite identificar os planos importantes da rede cristalina bem como o respectivo espaçamento que resulta da difração. Incidindo sobre um cristal, os raios-X penetram e sofrem um fenômeno de reflexão, (relacionado com a difração pela Lei de Bragg), pelos vários planos. A reflexão do feixe de radiação pelos planos definidos pelas camadas de átomos que constituem a organização interna do cristal dá origem a interferências entre os raios refletidos pelos diferentes planos, uma vez que são percorridos trajetos diferentes. A informação que se pode recolher analisando e interpretando as consequências destas reflexões e interferências permite estabelecer a malha tridimensional do cristal e, através dum tratamento mais elaborado, a geometria tridimensional das próprias moléculas do cristal. (GONSALVES, 2011)

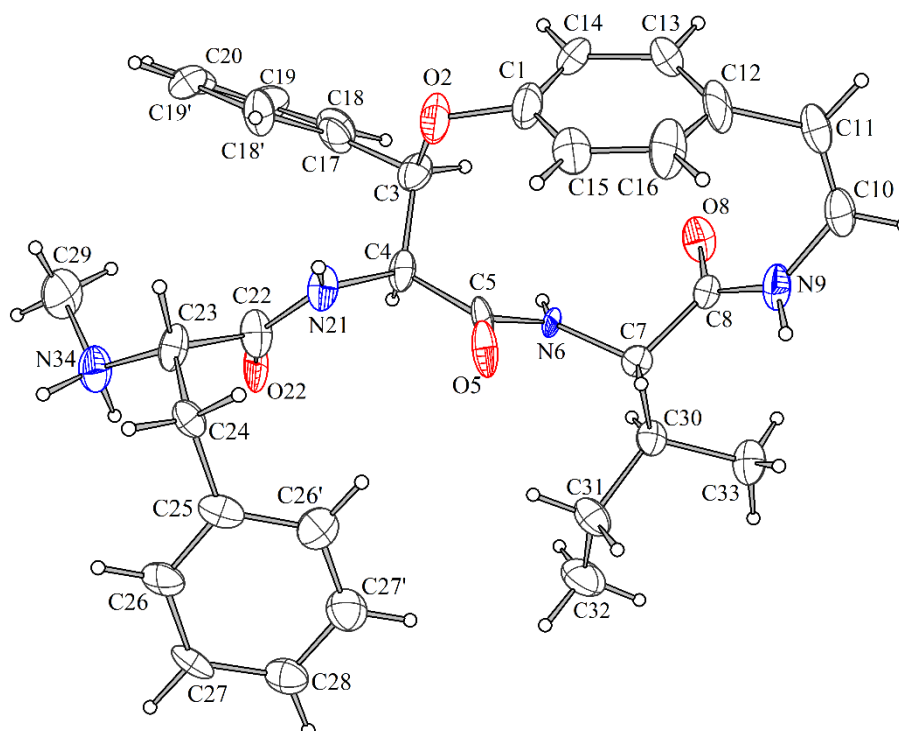
Através de modificações das técnicas normais de raio-X, Bijvoet e col. em 1951 desenvolveram um método de determinação da configuração absoluta pela difração de raios-X

de cristais. Este é o único método que independe da comparação com estruturas de configurações absolutas já conhecidas. (EUSÉBIO, 2012)

Os átomos de uma estrutura fornecem uma grade de difração em três dimensões iguais para uma estrutura simétrica (Lei de Friedel). Porém quando a estrutura é assimétrica essa lei não é mais válida. O método de Bijvoet se utiliza deste efeito para determinar a estereoquímica absoluta de uma molécula, principalmente se existem átomos pesados na estrutura, como metais de transição ou halogênios. A presença do átomo pesado na molécula de interesse é um método usado para resolução do problema da fase, este átomo é localizado e uma fase inicial é usada como modelo para iniciar a estrutura. (BARBOSA, 2009)

A Figura 33 demonstra a estrutura obtida a partir da medida da difração de raio-X do sal Hidroiodeto de Condalina-A, método que permitiu a determinação da configuração absoluta de todos os centros do alcaloide. O carbono C-7 possui configuração S, o C-23 S, o C-3 R e o C-4 S, e H-3 e H-4 estão em lados opostos, em conformação *treo*, estando de acordo com as configurações atribuídas anteriormente por MALDANER. E ainda pôde-se obter o valor do ângulo diedro entre H-3 e H-4, de $\Psi = 58,20^\circ$, condição para que se encontrem nesta conformação.

Figura 33 – Raio X de Hidroiodeto de Condalina-A



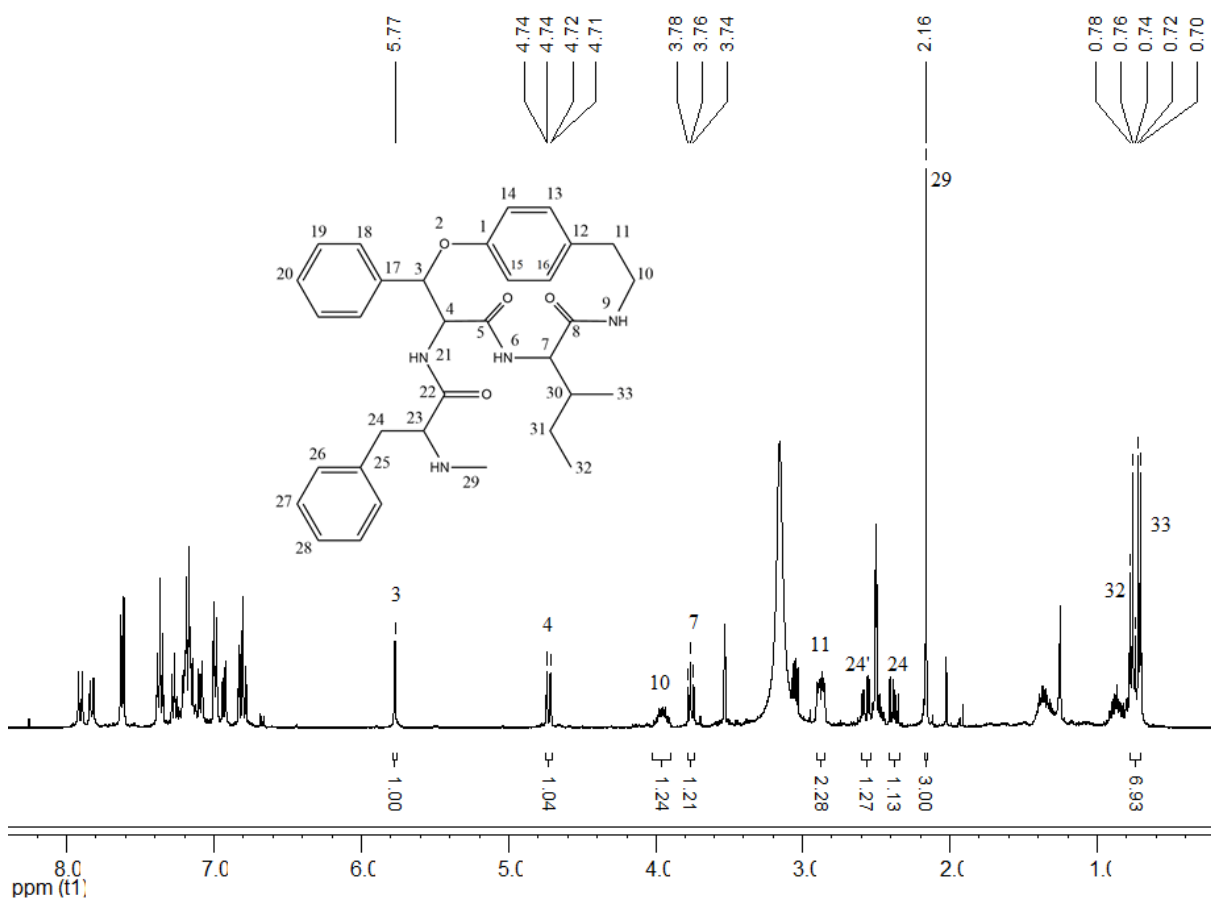
5.5. MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS NO ALCALOIDE CICLOPEPTÍDICO CONDALINA-A

5.5.1. Obtenção da Diidrocondalina-A

O produto obtido na reação de hidrogenação (**33**) foi submetido a análise por RMN de ^1H e ^{13}C e por espectrometria de massas de alta resolução onde foi observado um pico de $[\text{M}+\text{H}]^+$ com relação massa/carga de 557,3149, conforme espectro no ANEXO II (pág 89).

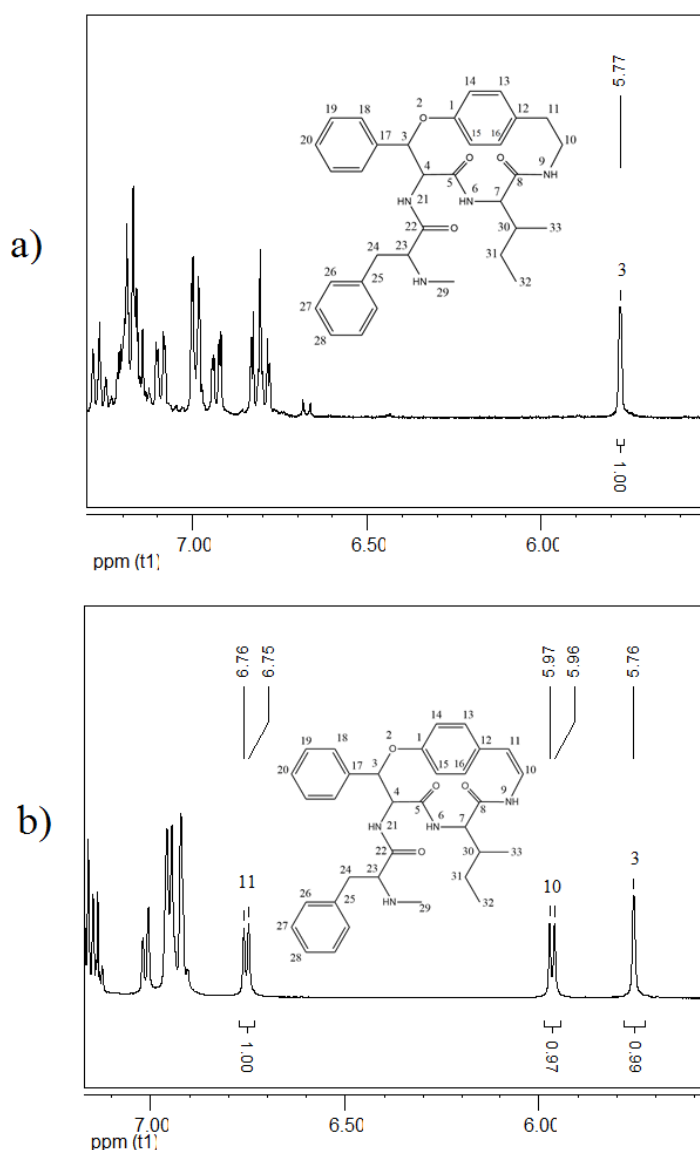
No espectro de ^1H da Diidrocondalina-A apresentado na Figura 34 observamos a ausência dos sinais da dupla ligação, em δ 5,97 ppm (1H, d, $J_{10,11}=7,2$) correspondente ao H-10 e em δ 6,75 ppm (1H, d, $J_{11,10}=7,6$) correspondente ao H-11.

Figura 34 – Espectro de RMN de ^1H da Diidrocondalina-A, em DMSO, em 400 MHz.



Na figura 35 é feita uma comparação dos espectros de ^1H da Condalina-A e da Diidrocondalina-A, onde pode observar-se com mais clareza o desaparecimento do sinal da dupla ligação.

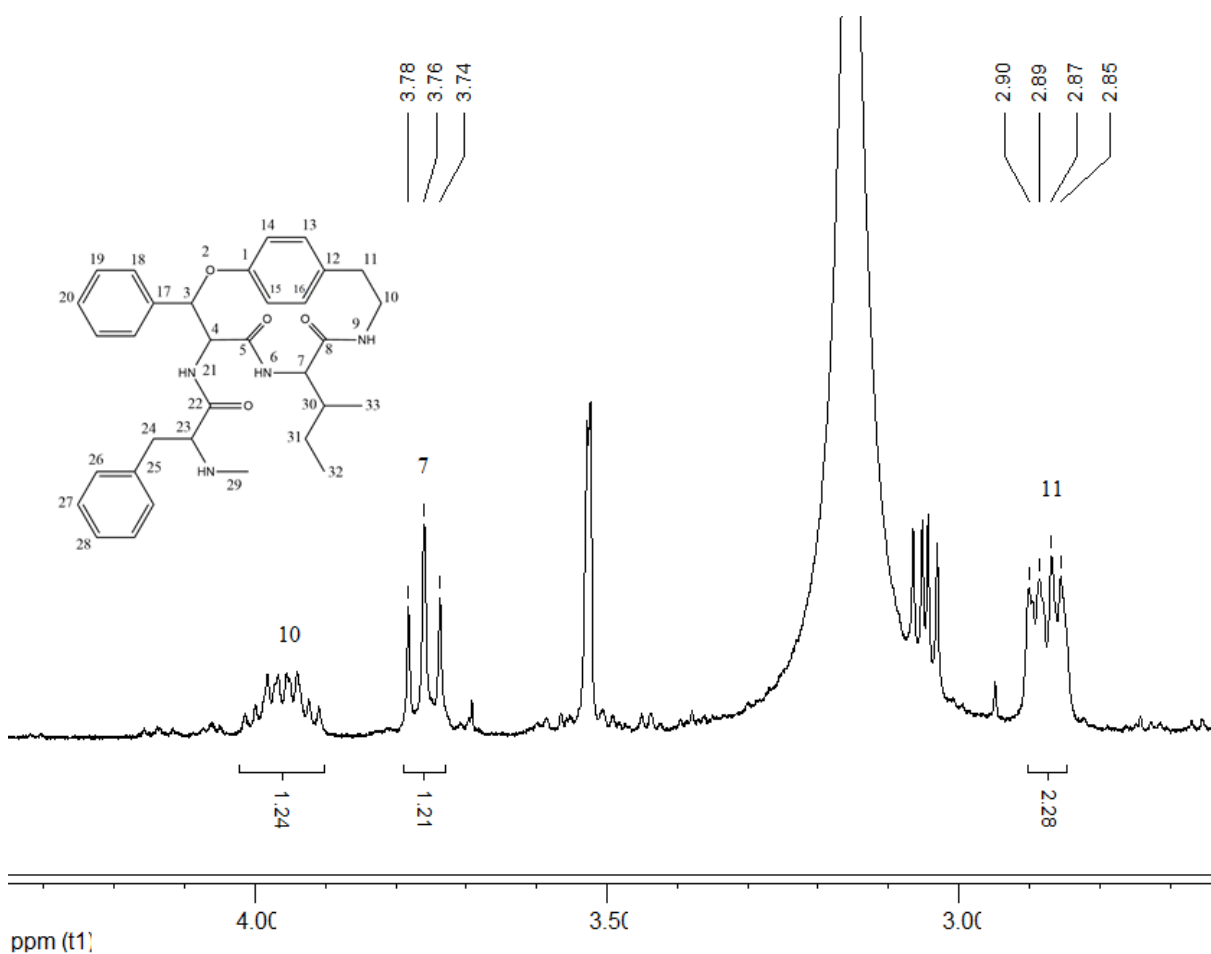
Figura 35 – Comparação dos sinais da dupla ligação pelo espectro de ^1H do alcaloide Condalina-A e Di-idrocondalina-A, expandidos de 5 ppm a 7,5 ppm, ambas em DMSO, em 400 MHz e 600 MHz respectivamente.



- Expansão do espectro de ^1H da Di-idrocondalina-A. Observa-se a ausência dos sinais da dupla ligação.
- Expansão do espectro de ^1H da Condalina-A. Os hidrogênios da dupla ligação H-10 e H-11, tem deslocamento 5,96 ppm e 6,75 ppm respectivamente.

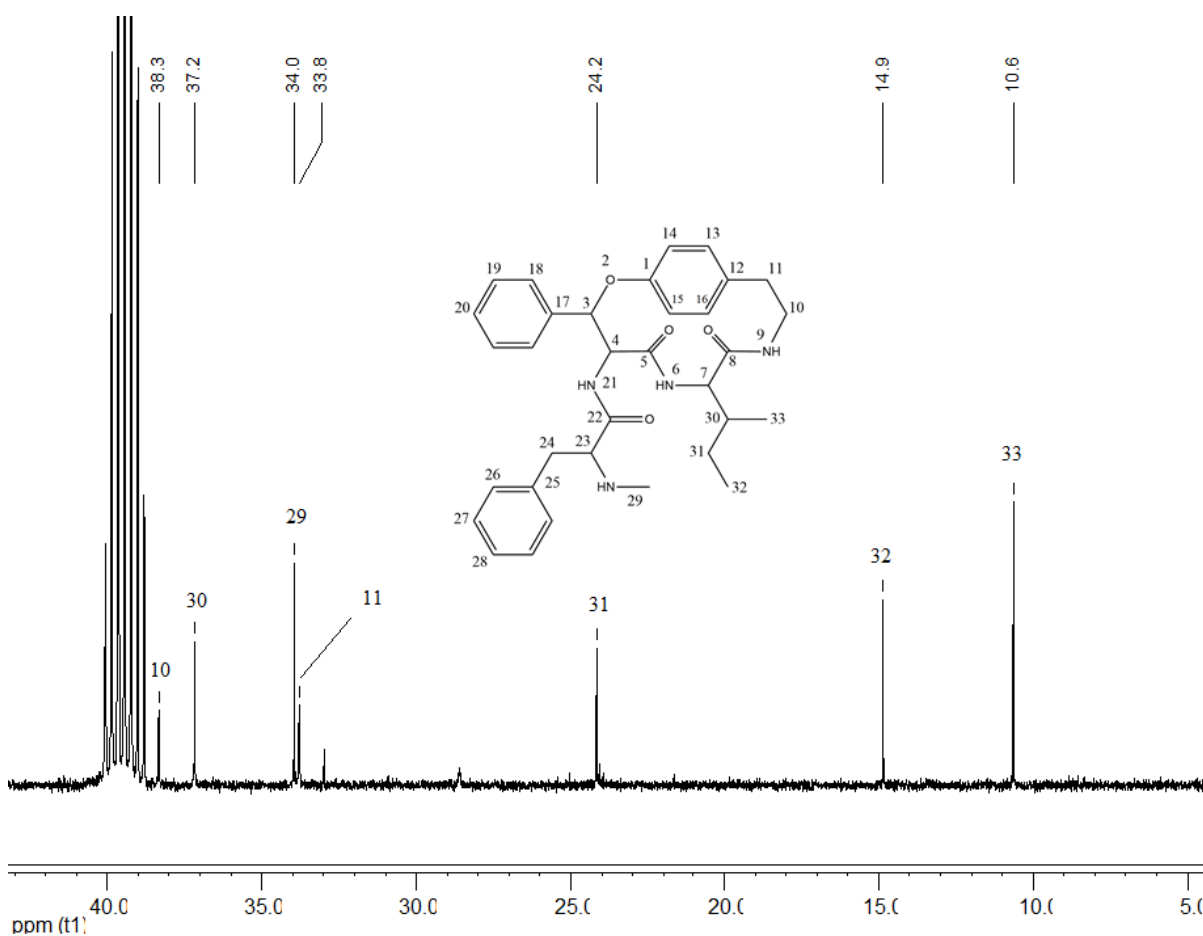
Na expansão do espectro de ^1H da Diidrocondalina-A apresentada na Figura 36, observa-se o surgimento de dois sinais de hidrogênios alquílicos em δ 2,71 ppm (2H, m) correspondente aos hidrogênios da posição 10 e δ 3,89 ppm (2H, m) correspondentes aos hidrogênios da posição 11.

Figura 36 – Espectro de RMN de ^1H da Diidrocondalina-A, expandido de 2,5 ppm a 4,5 ppm, em DMSO, em 400 MHz.



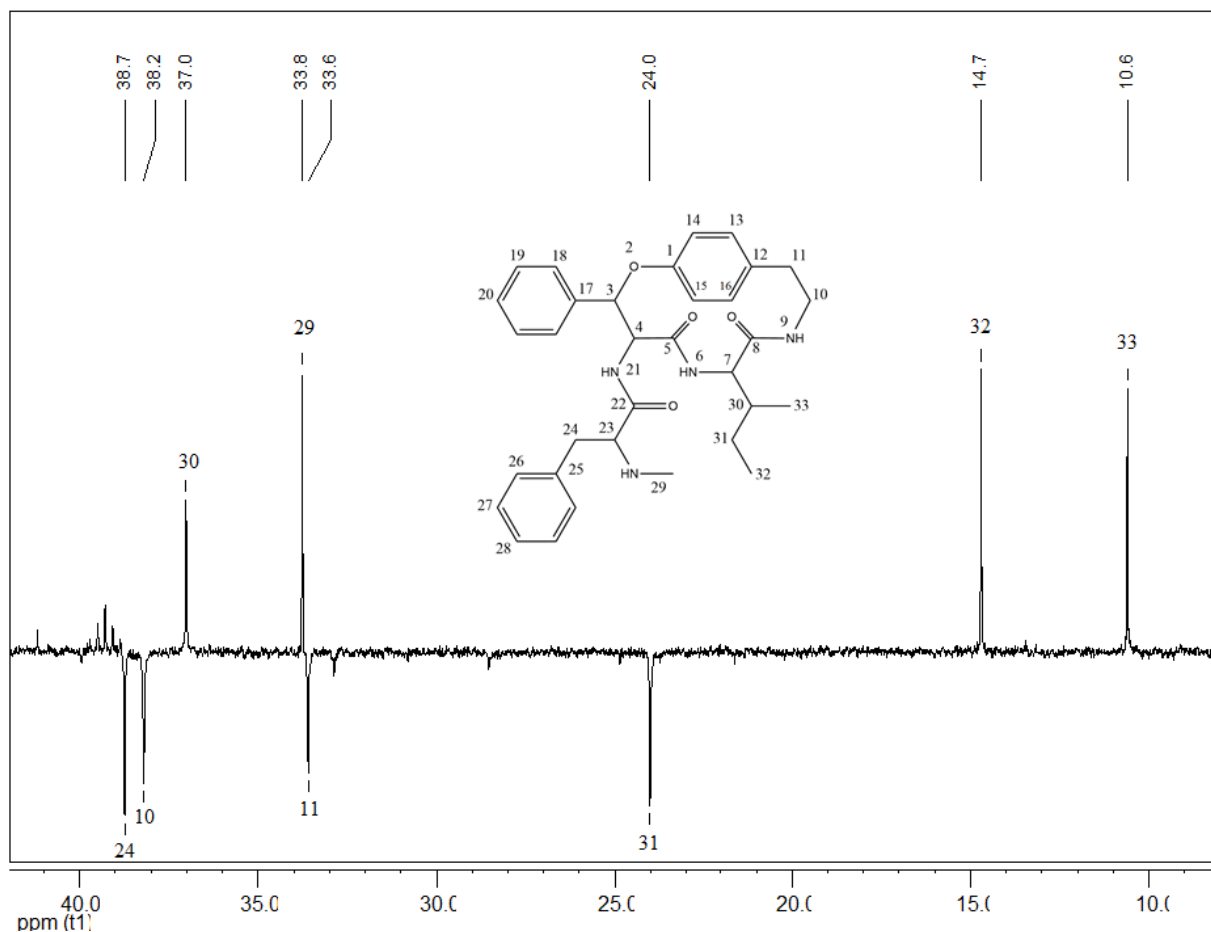
Na expansão do espectro de RMN de ^{13}C apresentado na Figura 37 observa-se o surgimento de dois sinais, como esperado para reação de hidrogenação. Um em 38,33 ppm e outro em 33,79 ppm, referentes a CH_2 11 e CH_2 10 respectivamente, atribuídos por comparação com dados da literatura (MOREL, 2002).

Figura 37 – Espectro de RMN de ^{13}C expandido da Diidroconalina-A, em DMSO, 100 MHz.



O espectro completo de ^{13}C da Diidrocondalina-A encontra-se no ANEXO III (pág 95). No espectro de RMN de DEPT 135° apresentado na Figura 38, observa-se 4 CH_2 . Dois já existentes no alcaloide, em 24,17 ppm correspondente ao C-31 da unidade de aminoácido isoleucina e em 38,89 ppm correspondente ao C-24 da unidade de aminoácido fenilalanina, o qual não é possível verificar no espectro de ^{13}C , pois fica sobreposto com o sinal do solvente deuterado DMSO. E dois formados a partir da hidrogenação da dupla, em 38,35 ppm correspondente ao C-10 e em δ 33,74 ppm correspondente ao C-11, atribuídos por comparação com dados da literatura (MOREL, 2002).

Figura 38 – Espectro de RMN de DEPT 135 expandido da Diidrocondalina-A, em DMSO, 400 MHz.



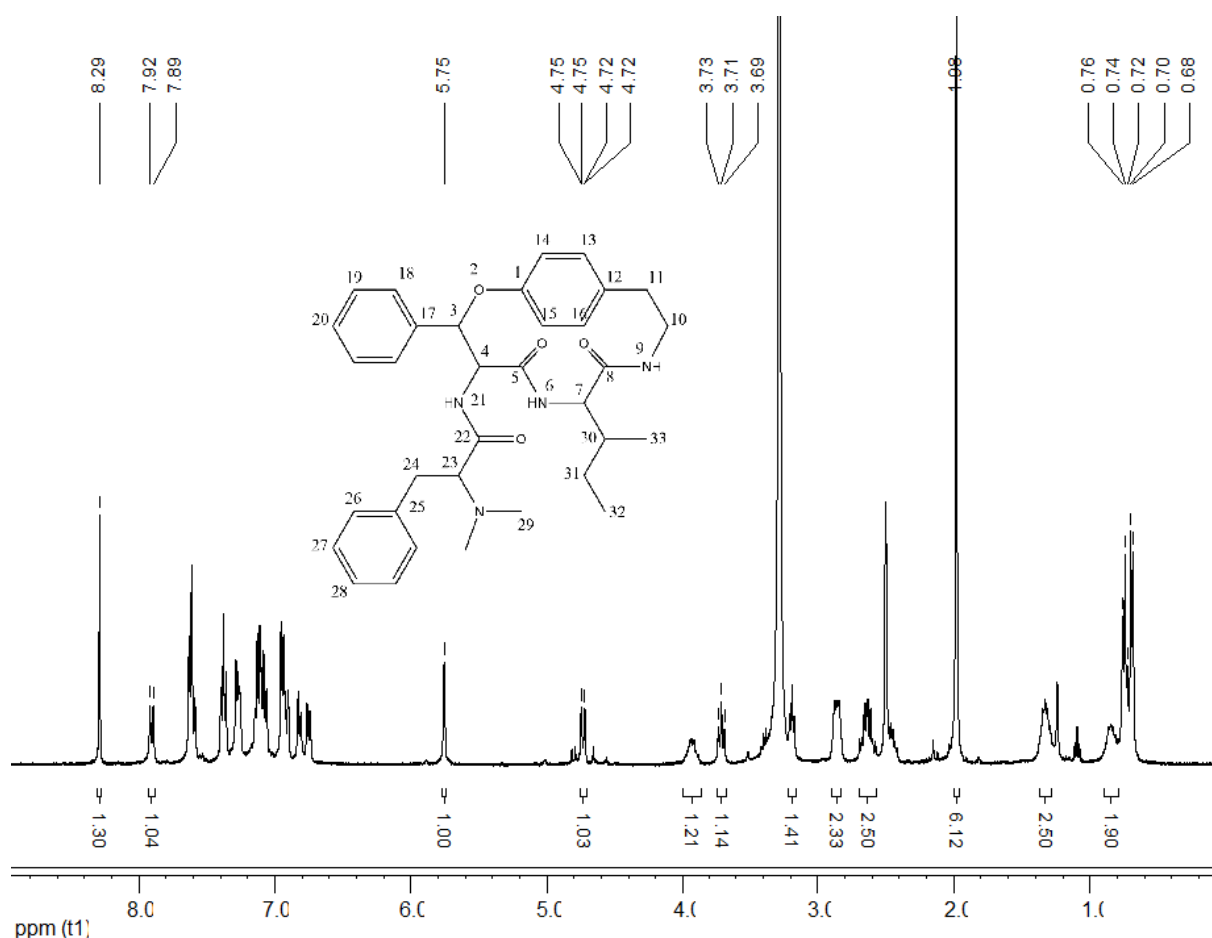
5.5.2. Obtenção da Dimetildiidrocondalina-A

O produto obtido na reação de metilação (**34**) foi submetido a análise por RMN de ^1H e ^{13}C e por espectrometria de massas de alta resolução fornecendo relação massa carga $[\text{M}+1]^+$ 571,3315, conforme a espectro no ANEXO II (pág 90).

No espectro de hidrogênio da Figura 39, observa-se que o simpleto em δ 1,89 ppm tem integração para 6 hidrogênios, sugerindo que ocorreu a metilação do grupo amino N-metilado do alcaloide, tornando-o um grupo amino N,N-dimetilado, e por isso é observado somente um sinal para as duas metilas (são quimicamente equivalentes).

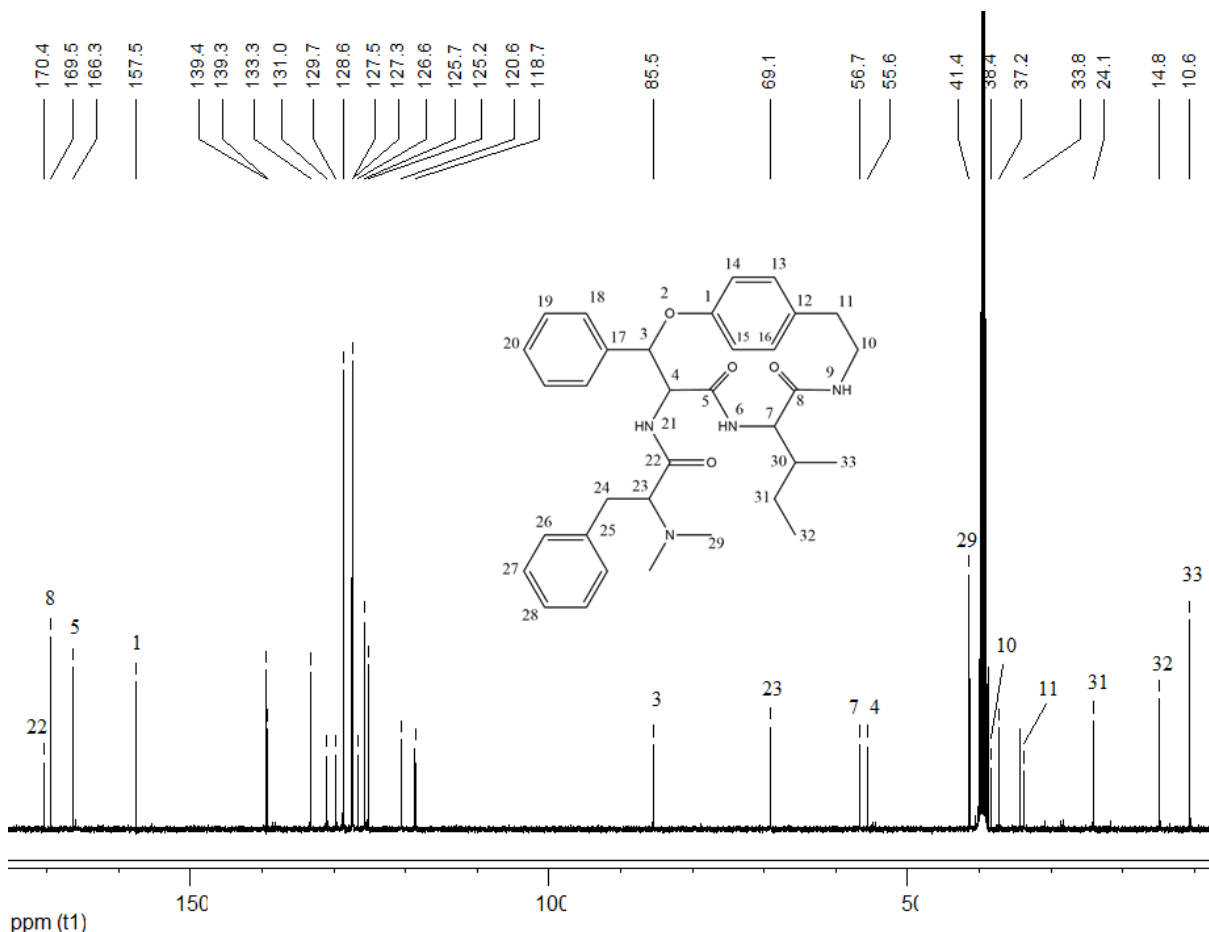
A ausência dos sinais da dupla ligação em δ 5,9 ppm e d 6,8 ppm, sugere que além da metilação, ocorreu a hidrogenação da dupla ligação, uma vez que as condições desta reação são as mesmas utilizadas para hidrogenação (Pd/C e H₂).

Figura 39 – Espectro de RMN de ¹H da Dimetildiidrocondalina-A, em DMSO, 400 MHz.



Com a dimetilação do grupo NHCH₃ esperava-se que o sinal mantivesse o deslocamento de 34,17 ppm correspondente a metila 29, com o dobro da intensidade, correspondendo a duas metilas na mesma posição. Mas no espectro de ¹³C da Figura 40, observa-se a ausência do sinal em 34,17 e o surgimento de um sinal em 41,49 ppm com o dobro da intensidade, sendo por isso atribuído ao grupo N(CH₃)₂.

Figura 40 – Espectro de RMN de ^{13}C da Dimetildiidrocondalina-A, em DMSO, 100 MHz.



5.5.3. Formação de Hidrocloreto de Condalina-A

Não foi observada a formação de cristais de Hidrocloreto de Condalina-A (**35**), por esse motivo a comprovação de formação do sal foi verificada por CCD, onde observou-se um produto majoritário de *R_f* junto a base e por ponto de fusão, P.f.: 245-250 °C. Com base na teoria de que sais de amônio são sólidos com alto ponto de fusão. O fato de o Hidrocloreto conter uma ligação N-H a mais que o alcaloide o deixa mais polar e conseqüentemente com ponto de fusão maior, conforme verificado experimentalmente.

Não foi possível a identificação por RMN devido à baixa qualidade do espectro obtido. Este composto foi submetido a avaliação da atividade antimicrobiana.

5.5.4. Formação de Hidroiodeto de Condalina-A

A comprovação de formação do Hidroiodeto de Condalina-A (**36**), foi verificada por CCD, onde observou-se um produto majoritário de *Rf* junto a base e por ponto de fusão, P.f.: 218 – 220 °C. O cristal obtido foi submetido a análise de difração de raio-X, o que possibilita além da determinação estrutural, a determinação da configuração absoluta de todos os centros do alcaloide. Pela estrutura determinada observa-se que ocorreu uma protonação ao invés de uma metilação do NH-29, pois o cristal formado é apenas o alcaloide Condalina-A na forma de seu sal H⁺I, e não o sal dimetilado como se esperava. Possivelmente, devido a contaminação do iodeto de metila com ácido iodídrico (HI).

5.6. ATIVIDADES ANTIMICROBIANAS

No início do século XIX com o surgimento da química farmacêutica, as plantas tornaram-se a principal fonte de recursos para o desenvolvimento de novos fármacos. Em consequência ao grande desenvolvimento da Medicina e da Química Orgânica, dentre tantos outros, observados após a Segunda Guerra Mundial, a indústria farmacêutica mundial passou a valorizar e investir em substâncias de origem sintética, o que acarretou em acentuado declínio no interesse por pesquisa e desenvolvimento de produtos farmacêuticos de origem natural. Entretanto, após anos de investimento maciço na química sintética, nas últimas duas décadas, tem-se observado uma diminuição crescente no número de novas entidades químicas que chegaram ao mercado farmacêutico, o que tem sido um dos grandes fatores para a revalorização dos produtos naturais. (VIEGAS, 2009)

Os compostos de origem natural são considerados indispensáveis, pois além de seu uso na medicina popular, também são utilizados como protótipos para a síntese de compostos biologicamente ativos; submetidos a modificações estruturais para o aumento de sua atividade biológica e/ou diminuir sua toxicidade (HOSTETTMANN et al., 2003)

Nos últimos anos, o aumento da resistência dos micro-organismos frente a agentes antimicrobianos impulsionou a busca por novas substâncias biologicamente ativas. O uso indiscriminado das drogas disponíveis no mercado contribui com o aumento progressivo da resistência microbiana, que é considerado um sério problema de saúde pública, uma vez que os agentes que causam doenças infecciosas, bactérias, vírus, fungos e parasitas, evoluem continuamente para contornar os antimicrobianos que são utilizadas para combater a infecção.

Apesar de uma crescente necessidade de novos medicamentos, houve poucos novos antibióticos aprovados nas últimas duas décadas, pois o número de micro-organismos resistentes e patogênicos cresce mais rápido do que a capacidade dos laboratórios e indústrias farmacêuticas de produzirem novas drogas.

A maioria dos micro-organismos utilizados nos testes antimicrobianos no presente trabalho, fazem parte do grupo de causadores de infecções oportunistas, desenvolvendo-se frequentemente em pacientes imunocomprometidos.

Pelo método da micro diluição em placas, foram testadas as atividades antifúngica e antibacteriana do Extrato Metanólico, FEB, FEA, frações hexano, diclorometano, acetato de etila, metanol, β -sitosterol, Diisobutil ftalato, Condalina-A, Diidrocondalina-A, Dimetilcondalina-A, Condalina-AH⁺I⁻, Condalina-AH⁺Cl⁻, sendo que de Condalina-A e Diidrocondalina-A já haviam sido testadas pelo método da bioautografia, onde a substância a ser testada é aplicada em uma CDD e esta colocada em contato com o meio de cultura inoculado com o micro-organismo.

Os resultados dos testes antimicrobianos são expressos em função da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração letal mínima (CLM), onde a CIM 50 é definida como a concentração inibitória mínima capaz de inibir em 50% o crescimento dos micro-organismos, a CIM 20 refere-se à capacidade de inibição de 20% do crescimento dos micro-organismos e a CLM a concentração mínima capaz de matar os micro-organismos. Os resultados obtidos nos testes são mostrados nas Tabelas 4, 5 e 6 e 7.

5.6.1. Atividades antifúngicas

Muitos fungos apresentam potencial patogênico para os humanos, causando micoses superficiais, cutâneas, subcutâneas e sistêmicas ou profundas. Além dessas micoses, encontradas principalmente no hospedeiro normal, as micoses chamadas oportunistas se caracterizam por serem causadas por fungos de baixa virulência, que convivem pacificamente com o hospedeiro, mas que, ao encontrar distúrbios do sistema imunológico, desenvolvem seu poder patogênico, invadindo os tecidos e causando lesões.

Nos últimos vinte anos, a frequência das infecções fúngicas sistêmicas, principalmente as oportunistas invasivas, têm crescido drasticamente e isso se deve a fatores como a imunossupressão causada pela Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), induzida para transplantes ou resultante da quimioterapia com antitumorais, o uso indiscriminado de

antimicrobianos de largo espectro, o uso crônico de corticóides e a prática de procedimentos médicos invasivos, envolvendo grandes cirurgias com circulação extracorpórea, uso de cateteres periféricos, centrais e próteses, hemodiálise e procedimentos endoscópicos. (MATERIAL DIDÁTICO CLAUDIA-USP Dodds Ashley ES, Lewis R, Lewis JS, Martin C, and Andes D. Pharmacology of systemic antifungal agents. Clin.Infect.Dis.,43 (Suppl 1):S28-39, 2006.)

Os fungos do gênero *Candida* estão presentes na flora natural do tubo digestivo humano e causam infecções nas mucosas de pacientes imunodeprimidos. *Candida krusei*, causa infecções localizadas não agressivas, mais comumente na pele, boca e região genital. Os casos mais graves de infecção ocorrem em pacientes com sistema imunológico comprometido.

As infecções causadas por fungos dos genero *Cryptococcus* são chamadas criptococose. Entre as espécies deste gênero, *Cryptococcus neoformans* é o principal patógeno humano e animal. A maioria das espécies vive no solo e não é prejudicial para os humanos. É conhecido por causar uma forma rara e grave de meningite em pacientes imunocomprometidos, mas a maioria das infecções causadas por este fungo ocorrem nos pulmões. *Cryptococcus gattii* é endêmico de zonas tropicais da África e Austrália. É capaz de causar infecção em pessoas não-imunocomprometidas. (CHENG, 2000).

Na Tabela 4 estão apresentados os dados referentes a CIM 50 e CLM, e na tabela 5, os dados referentes a CIM 20, frente a cepas de fungos.

Tabela 4 – CIM 50/CLM frente a fungos ($\mu\text{g/ml}$)

Amostras/Micro-org*.	<i>Ca</i>	<i>Cp</i>	<i>Ck</i>	<i>Ct</i>	<i>Cg</i>	<i>Cn</i>	<i>Sc</i>
Ext. Met.	100/200	100/200	50 /100	100/>200	50 />200	100/200	50 /100
FEA	100/200	100/200	50 /200	100/>200	50 />200	50 /200	50 /100
FEB	100/200	100/>200	50 /100	100/>200	100/>200	100/200	50 /200
F. Diclorometano	100/200	100/200	50 /100	100/>200	50 />200	25 /200	50 /100
F. Acetato	100/200	100/>200	50 /200	100/>200	100/>200	50 /200	50 /200
F. Hexano	100/200	100/>200	50 /200	100/>200	50 />200	50 /200	50 /200
F. Metanol	100/200	100/>200	50 /200	100/>200	50 />200	50 /200	50 /200
Diidrocondalina-A	NT	125/125	31,2 /125	125/>250	125/250	NT	125/250
Dimetildiidrocondalina-A	NT	125/>250	62,5/125	125/>250	125/125	NT	125/>250
Hidrocloreto	NT	125/>250	31,2 /250	125/>250	125/250	NT	125/250
Hidriodeto	NT	125/250	31,2 /125	125/250	125/125	NT	125/250
β -sitosterol	NT	125/>250	62,5/125	125/250	125/125	NT	125/250
Ácidos graxos	NT	125/>250	31,2 /125	125/125	125/125	NT	125/125
Condalina-A	NT	125/250	62,5/250	125/250	125/125	NT	125/250
Fluconazol	6,25/100	3,9/62,5	31,2 /125	125/125	6,25/125	6,25/200	15,6/125

Ca-Candida albicans, *Cp-Candida parapslosis*, *Ck-Candida krusei*;; *Ct-Candida tropicalis*;; *Cg-Cryptococcus gatti*; *Cn-Cryptococcus neoformans* *Sc-Sacharomyces cervisiae* (NT) – Os fungos *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* apresentaram problemas de crescimento na segunda remessa de testes de atividades antimicrobianas e não foi possível realizar o teste para estes micro-organismos.

Os dados de CIM 50 da tabela 4 demonstram que os melhores resultados para as amostras testadas foram frente a cepa de *Candida krusei*, pois todas apresentaram inibição em concentração próxima ou igual ao padrão (32,1 µg/ml). Todos extratos e frações apresentaram uma CIM de 50 µg/ml e as substâncias isoladas CIM 32,1 µg/ml ou 62,5 µg/ml. Para *Saccharomyces cerevisiae* todos os extratos e frações apresentaram CIM de 50 µg/ml. Para *Cryptococcus gatti*, Ext. Met, FEA, F. Diclorometano, F hexano, e F Metanol apresentaram uma CIM de 50 µg/ml. Para *Cryptococcus neoformans*, FEA, F. acetato, F. hexano e F. metanol apresentaram uma CIM de 50 µg/ml e a F. diclorometano apresentou uma CIM de 25 µg/ml

Com respeito ao estudo da relação estrutura/atividade, Diidrocondalina-A apresentou CIM 31,2 mg/ml, para *Candida krusei* menor que Condalina-A (62,5 µg/ml), indicando que ausência da dupla ligação melhora a atividade fungicida. Os sais diidroclorados também apresentaram CIM 31,2 µg/ml. Dimetildiidrocondalina-A apresentou CIM 62,5 mg/ml, indicando que a modificação simultânea na dupla ligação e no grupo amino N-metilado não contribuiu para a melhora da atividade.

Quanto a determinação da CLM, nenhuma amostra testada foi letal para *Cryptococcus gatti* e *Candida tropicalis*. Para *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans* a CLM foi de 200 µg/ml. Para *Candida parapslosis* somente Ext. Met., FEA e F. diclorometano apresentaram CLM de 200 µg/ml. Para *Candida krusei* e *Sacharomyces cerevisiae* a CLM variou de 100 a >250 µg/ml, sendo que a CLM do padrão é 125 µg/ml.

Tabela 5 – CIM 20 frente a fungos (µg/mL)

Amostra/Micro-org*.	<i>Ca</i>	<i>Cp</i>	<i>Ck</i>	<i>Ct</i>	<i>Cg</i>	<i>Cn</i>	<i>Sc</i>
Ext. Met.	50	50	25	100	25	50	50
FEA	50	50	12,5	100	12,5	25	50
FEB	100	100	12,5	100	25	50	50
F. Diclorometano	50	50	12,5	50	25	3,12	50
F. Acetato	100	100	12,5	50	25	25	50
F. Hexano	50	50	12,5	50	25	50	50
F. Metanol	50	100	25	50	12,5	12,5	50
Diidrocondalina-A	NT	-	7,8	-	-	NT	62,5
Dimetildiidrocondalina-A	NT	-	31,2	-	-	NT	62,5
Hidrocloreto	NT	62,5	15,6	-	62,5	NT	62,5
Hidriodeto	NT	-	15,6	-	62,5	NT	62,5
β-sitosterol	NT	-	31,2	-	62,5	NT	62,5
Ácidos graxos	NT	-	15,6	-	62,5	NT	62,5
Condalina-A	NT	-	15,6	-	62,5	NT	62,5
Fluconazol	<6,25	3,9	7,8	25	62,5	3,12	7,8

**Ca-Candida albicans*, *Cp-Candida parapslosis*, *Ck-Candida krusei*;; *Ct-Candida tropicalis*;; *Cg-Cryptococcus gatti*; *Cn-Cryptococcus neoformans* *Sc-Sacharomyces cerevisae*

(-) - Não foi identificado inibição de 20%

Os dados de CIM 20 apresentados na tabela 5 demonstram um maior potencial fungistático para as amostras testadas, sendo que a F. diclorometano apresentou MIC 20 na mesma concentração do padrão, 3,12 µg/ml. Os resultados mais expressivos foram para as cepas de *Candida krusei* e *Cryptococcus gatti* com CIM variando de 12,5 a 25µg/ml e *Cryptococcus neoformans* com CIM variando de 3,12 a 50µg/ml. Para os outros micro-organismos as amostras apresentaram uma CIM mínima de 50mg/ml e máxima de 100µg/ml. Somente Condalina-A·H⁺Cl⁻ apresentou CIM 20 de 62,5mg/ml para *Candida parapslosis*.

5.6.2. Atividades antibacterianas

Um das cepas testadas é *Staphylococcus*, que está presente na flora natural do homem, bovinos e cães e podem causar patologias no trato urinário ou órgãos genitais, doenças pulmonares e infecções alimentares, ect.

As bactérias do gênero *Salmonella* são os agentes mais frequentes de intoxicação alimentar no homem, através de alimentos contaminados. A aves, principalmente a galinha, suas carcaças e ovos são os principais habitats desse micro-organismo.

Escherichia coli pode causar no uma série de patologias no homem como diarreias, infecção no aparelho urinário e órgãos genitais. A forma mais comum de adquirir estas enfermidades é através da ingestão de água contaminada com este micro-organismo.

Morganella morganii é encontrada nas fezes e intestino dos seres humanos, cães e outros mamíferos. É conhecido por ser um organismo causador de infecções oportunistas no trato respiratório, urinário, infecções de feridas. Ela pode causar infecções devastadoras nos recém-nascidos e estágios de pós-operatório, especialmente em pacientes diabéticos

Na Tabela 6 estão apresentados os dados referentes a CIM 50 e CLM, e na tabela 7, os dados referentes a CIM 20, frente a cepas de bactérias gram-positivas e gram-negativas.

Tabela 6 – CIM 50/CLM frente a bactérias (µg/ml)

Amostra/Micro-org.*	Gram-positivas					Gram-negativas					
	<i>Sa</i>	<i>Bc</i>	<i>Ea</i>	<i>E</i>	<i>Bs</i>	<i>Ss</i>	<i>Ec</i>	<i>Bc</i>	<i>Mm</i>	<i>St</i>	<i>Pa</i>
Ext. Met	200/>200	6,2 />200	50/>200	100/>200	25 >200	50/200	25/>200	50/>200	12,5 />200	200/>200	6,2 /200
FEA	200/>200	6,2 />200	50/100	200/>200	6,2 >200	50/200	100/>200	25/>200	3,1 />200	200/>200	12,5 /200
FEB	200/>200	12,5 />200	100/200	200/>200	6,2 >200	50/200	100/>200	25/>200	6,2 />200	200/>200	12,5 /200
F. Dicloro	200/>200	6,2 />200	12,5 /100	200/>200	6,2 >200	12,5 /200	100/>200	25/>200	3,1 />200	200/>200	12,5 /200
F. Acetato	200/>200	6,2 />200	100/>200	200/>200	6,2 >200	50/200	100/>200	25/>200	3,1 />200	200/>200	12,5 /200
F. Hexano	200/>200	6,2 />200	50/100	100/>200	25 >200	50/100	100/>200	25/>200	3,1 />200	200/>200	12,5 /200
F. Metanol	200/>200	6,2 />200	50/200	100/>200	25 />200	50/200	25/>200	50/>200	3,1 />200	200/>200	6,2 /200
Diidrocondalina-A	NT	125/>250	NT	62,5/>250	125/>250	125/250	125/250	125/>250	NT	125/>250	125/250
Dimetildiidrocondalina-A	NT	62,5/>250	NT	125/>250	125/>250	62,5 /250	125/250	125/>250	NT	125/>250	125/250
Hidrocloreto	NT	62,5/>250	NT	15,6 />250	125/>250	125/250	125/250	125/>250	NT	125/>250	125/250
Hidriodeto	NT	62,5/>250	NT	15,6 />250	125/>250	62,5 />250	125/250	125/>250	NT	125/>250	125/>250
β-sitosterol	NT	62,5/>250	NT	15,6 />250	125/>250	62,5/250	125/>250	250/>250	NT	125/>250	125/250
Ácidos graxos	NT	31,2/>250	NT	7,8 />250	62,5/>250	31,2/125	125/250	62,5/>250	NT	125/>250	125/250
Condalina-A	NT	62,5/>250	NT	15,6 />250	125/>250	125/250	125/250	125/>250	NT	125/>250	125/250
Cloranfenicol	6,2/>200	3,9/15,2	6,2/50	1,9/62,5	1,9/62,5	1,9/15,2	1,9/15,2	3,9/62,5	3,1/100	1,9/62,5	125/250

*Gram-positivas: *Sa* – *Staphylococcus aureus*, *Bc* - *Bacillus cereus*, *Ea*- *Enterobacter aerogenes*, *E* – *Enterococcus*, *Bs*- *Bacillus subtilis*. Gram-negativas: *St*- *Salmonella typhimurium*, *Ec*- *Escherichia coli*, *Bc*- *Burkholderia cepacia*, *Mm*- *Morganella morganii*, *Ss*- *Shigella sonnei*, *Pa* – *Pseudomonas aeruginosa*

(NT) - As bactérias *Staphylococcus aureus*, *Morganella morganii*, *Enterobacter aerogenes*, apresentaram problemas de crescimento na segunda remessa de testes de atividades antimicrobianas e não foi possível realizar o teste para estes micro-organismos

As amostras testadas, de uma forma geral, apresentaram maior inibição frente as cepas de bactérias do que de fungos. Levando em consideração que muitas das amostras testadas, são extratos e frações, estes resultados tornam-se mais interessantes, pois as substâncias isoladas destes extratos devem ser mais ativas contra os micro-organismos.

Os dados de CIM 50 da tabela 6 demonstram que os extratos apresentaram bons resultados para duas bactérias Gram-positivas, *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis* duas bactérias Gram-negativas, *Morganella morganii* e *Pseudomonas aeruginosa*. Para *Bacillus cereus*, a amostra FEB apresentou MIC de 12,5 µg/ml e todas as outras 6,2 µg/ml. Para *Bacillus subtilis*, a amostra Ext. Met., F. hexano e F. metanol apresentaram MIC de 25 µg/ml e as outras 6,2 µg/ml. Para *Morganella morganii*, Ext. Met. apresentou CIM 12,5 mg/ml, FEB 6,2 mg/ml e as demais amostras testadas apresentaram CIM igual ao padrão, 3,1 µg/ml. Para *Pseudomonas aeruginosa* os extratos apresentaram MIC 50 bem menores que o padrão, 125 µg/ml, o que torna este resultado duvidoso, pois as substâncias puras apresentam atividade antibacteriana inferiores aos extratos, e ainda as substâncias puras foram testadas em uma segunda remessa de testes antimicrobianos e o valor de CIM para o padrão aumenta de 6,2 µg/ml para 125 µg/ml. E ainda para *Shigella sonnei* e *Enterobacter aerogenes* a F. diclorometano apresentou MIC de 12,5 µg/ml. As substâncias β-sitosterol e ácidos graxos obtiveram CIM de 15,6µg/ml e 7,8 µg/ml respectivamente para *Enterococcus*, Hidrocloroto de Condalina-A, Hidroiodeto de Condalina-A e Condalina-A.

Quanto ao estudo da relação estrutura/atividade observa-se que os derivados de Condalina-A que contém a dupla ligação, a própria Condalina-A, Hidroiodeto, e Hidrocloroto, apresentaram, para *Enterococcus*, MIC de 15,6 µg/ml enquanto que os derivados hidrogenados Diidrocondalina-A e Dimetildiidrocondalina-A apresentaram MIC de 62,5 mg/ml e 125 mg/ml respectivamente, mostrando que este grupamento tem uma função importante na atividade antimicrobiana para este micro-organismo.

Quanto a determinação da CLM, as amostras testadas foram letais somente para as bactérias Gram-positivas *Shigella sonnei* e *Pseudomonas aeruginosa* com CLM de 200µg/ml e para a bactérias Gram-negativa *Enterobacter aerogenes*, onde a CLM variou de 100 a 200 µg/ml.

Tabela 7 – CIM 20 frente a bactérias (µg/ml)

Amostras/Micro-org.*	Gram-positivas					Gram-negativas					
	<i>Sa</i>	<i>Bc</i>	<i>Ea</i>	<i>E</i>	<i>Bs</i>	<i>Ss</i>	<i>Ec</i>	<i>Bc</i>	<i>Mm</i>	<i>St</i>	<i>Pa</i>
Ext. Met	100	6,2	6,2	100	25	50	25	50	3,1	100	6,2
FEA	200	6,2	6,2	200	6,2	50	100	25	3,1	100	12,5
FEB	200	6,2	12,5	200	6,2	50	100	25	6,2	100	12,5
F. Diclorometano	200	6,2	12,5	200	6,2	12,5	100	25	6,2	100	12,5
F. Acetato	200	6,2	12,5	200	6,2	50	100	25	3,1	100	12,5
F. Hexano	200	25	50	100	25	50	100	25	3,1	100	12,5
F. Metanol	200	6,2	6,2	100	25	50	25	50	3,1	100	6,2
Diidrocondalina-A	NT	62,5	NT	31,2	125	62,5	125	62,5	NT	125*	62,5
Dimetildiidrocondalina-A	NT	62,5	NT	15,6	31,2	31,2	125	31,2	NT	125*	15,6
Hidrocloreto	NT	7,8	NT	1,9	62,5	62,5	125	62,5	NT	31,2	15,6
Hidriodeto	NT	15,6	NT	1,9	15,6	31,2	125	62,5	NT	31,2	62,5
β-sitosterol	NT	31,2	NT	1,9	15,6	62,5	125	31,2	NT	62,5	15,6
Ácidos graxos	NT	15,6	NT	1,9	62,5	31,2	125	62,5	NT	62,5	15,6
Condalina-A	NT	31,2	NT	1,9	31,2	62,5	125	125	NT	62,5	15,6
Cloranfenicol	3,1	1,9	3,1	<1,9	<1,9	<1,9	<1,9	1,9	3,1	<1,9	15,6

*Gram-positivas: *Sa* – *Staphylococcus aureus*, *Bc* - *Bacillus cereus*, *Ea*- *Enterobacter aerogenes*, *E* – *Enterococcus*, *Bs*- *Bacillus subtilis*. Gram-negativas: *St*- *Salmonella typhimurium*, *Ec*- *Escherichia coli*, *Bc*- *Burkholderia cepacia*, *Mm*- *Morganella morganii*, *Ss*- *Shigella sonnei*, *Pa* – *Pseudomonas aeruginosa*

Os dados de CIM 20 da tabela 6 demonstraram um maior potencial bacteriostático para as amostras testadas, sendo que para *Bacillus cereus*, a F. hexano apresentou MIC de 25µg/ml e as todas as outras amostras apresentaram 6,2 µg/ml. Para *Enterobacter aerogenes*, as amostras Ext. Met., FEA e F. Metanol apresentaram MIC de 6,2µg/ml e FEB, F. diclorometano e F. acetato, apresentaram 12,5µg/ml. Para *Bacillus subtilis* as amostras FEA, FEB, F. hexano, F. diclorometano e F. acetato apresentaram MIC de 6,2µg/ml e as demais apresentaram 25µg/ml. Para *Shigella sonnei* a F. diclorometano apresentou MIC de 12,5mg/ml e as demais 50mg/ml. Para *Morganella morganii*, as amostras FEB e F. diclorometano apresentaram MIC de 6,2µg/ml e as demais amostras apresentaram MIC iguais ao padrão, 3,1µg/ml. E ainda para *Pseudomonas aeruginosa* as amostras Ext. Met. e F. Metanol apresentaram MIC igual ao padrão, 6,2µg/ml e as demais amostras 12,5µg/ml

6. CONCLUSÃO

Após avaliação fitoquímica das cascas das raízes da espécie *Condalia buxifolia* Reissek, pode-se evidenciar diferentes classes de metabólitos secundários presentes nesta parte da planta, como alcaloides ciclopeptídicos, terpenos, antraquinonas, esteroides e ácidos graxos.

Em relação ao isolamento de substâncias, foi possível a identificação de 6 metabólitos: Condalina-A, β -sitosterol, Emodina, uma mistura de dois ácidos graxos e Diisobutil ftalato.

Em relação às modificações estruturais, foram obtidos quatro derivados de Condalina-A: Diidrocondalina-A, Dimetildiidrocondalina-A, Hidroiodeto de Condalina-A, Hidroclorato de Condalina-A.

A respeito das análises antimicrobianas, os extratos e frações testados apresentaram bons resultados principalmente contra as bactérias *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Morganella morganii*, e *Pseudomonas aeruginosa* e os fungos *Candida krusei*, *Cryptococcus gatti*, *Cryptococcus neoformans* e *Saccharomyces cerevisiae*.

Quanto ao estudo da relação estrutura/atividade observa-se que a dupla ligação do alcaloide e o grupo NHCH_3 e $\text{N}^+\text{H}_2\text{CH}_3$ são importantes na atividade antibacteriana para *Enterococcus*. Já para a atividade antifúngica *Candida krusei* o grupo $\text{N}^+\text{H}_2\text{CH}_3$ e a ausência da dupla ligação são mais importantes para. As modificações estruturais não tiveram influência sobre o CLM de nenhum micro-organismo.

Não foi possível avaliar a atividade antibacteriana para as substâncias isoladas e derivados de Condalina-A para as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes*, *Morganella morganii*, e para os fungos *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*, pois estes micro-organismos não se desenvolveram na segunda remessa de amostras.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALARCÓN, J.; CESPEDES, C. L. **Chemical constituents and biological activities of South American Rhamnaceae**, *Phytochemistry Reviews*, v. 14, p. 389-401, 2015.

ASHLEY, D. E. S. et al. **Pharmacology of systemic antifungal agents**. *Clin. Infect. Dis.* v. 43, p. 28-39, 2006.

BARBOSA, K. F. **Determinação por Difração de Raios-X da Estrutura Molecular do 1L-1,2,3,4,5-Ciclohexanopentol**. Dissertação (Mestrado em química) – Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, 2009.

BASTOS, N. R. **Estudos preliminares da família Rhamnaceae R. BR. no RS**. Pesquisas, série Botânica, São Leopoldo, n. 39, p. 41-48, 1988.

BASTOS, N. R. **A Família Rhamnaceae R. BR no Rio Grande do Sul: Gêneros *Condalia Cav.* e *Scutia Comm. Ex. Brongn.*** Pesquisas, séries Botânica, São Leopoldo, n. 40, p. 69-84, 1989

BIFULCO et.al. **Determination of Relative Configuration in organic Compounds by NMR Spectroscopy and Computational Methods**. *Chemical. Reviews.* v. 107, p. 3744-3779, 2007.

CHENG, M. F. et. al. ***Cryptococcus laurenti* fungemia in a premature neonate**. *Journal of Clinical Microbiology.* v. 39, p.1608 – 1611, 2001.

COLE, C. et. al. **Arum Palaestinum with isovanillin, linoleic acid and b-sitosterol inhibits prostate câncer spheroids and reduces the growth rate of prostate tumors in mice**. *BMC, Complementary and alternative medicine*, v. 5, p. 264, 2015.

CUI, J.; HUANG, L. **A facile and efficient synthesis of some (6E)-hydroximino-4-en-3-onosteroids, steroidal oximes from *Cinachyrella spp.*sponges**. *Steroids*, v. 73, 252–256, 2008.

CUNHA, A.P. **Farmacognosia e Fitoquímica**. Fundação Calouste Gulbenkian, 3 ed., Lisboa, 2010.

DOMIJAN, A. M., et. al. **Toxicity and antioxidant capacity of *Frangula alnus* Mill. bark and its active component emodin**. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 73 p. 923-929, 2015.

DROZDOVA, F. V.; MEKHTIEVA, A. P. **Cytotoxic Derivatives of (22R, 23R)-Dihydroxystigmastan**. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, v. 33, p. 326–333, 2007.

ESPINDOLA, J. A. A. **Floresta e ambiente. Potencial alelopático de ésteres derivados do ácido cinâmico**. v. 13, p. 53-60, 2006.

FACCHINI, P.J. **Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications**. *Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v. 52, p. 29-66, 2001.

FOGLIO, M. A. et. al., **Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar**, Multiciência, 2006.

FRONTERA, M. A. et. al. **Phytochemical Study of *Condalia microphylla* Cav.** *Molecules*, v. 5, p. 470-471, 2000.

GONSALVES, A. M. d'A. R.; SERRA, M. E. S; EUSÉBIO, M. E. S. **Estereoquímica**. Editora da Universidade de Coimbra, 2011.

GOURNELIS, D.C.; LASKARIS, G.G.; VERPOORTE, R. **Cyclopeptide alkaloids**. *Natural Product Reports*, v. 14, p. 75-82, 1997.

HAGEL, J. M.; FACCHINI, P. J. **Benzylisoquinoline alkaloid metabolism: a century of discovery and a brave new world**, *Plant and Cell Physiology*, v. 54, p. 647-672, 2013.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T.V. **Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts**. *Journal of Applied Microbiology*, v. 86, p. 985–990, 1999.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **Princípios ativos de plantas superiores**. São Paulo: EDUFSCAR, 2003.

ILHA, V. **Síntese de Peptídeos Lineares Precursores dos Alcaloides Condalina-A, Scutianina-M, Scutianina-L e Adoutina-Y: Estudos Estruturais e Suas Atividades Biológicas**. Tese (Doutorado em química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

ITOKAWA, H. et al. **The Alkaloids**, v. 49, p. 301-313, 1997

IZHAKI, I. **Emodin – a secondary metabolite with multiple ecological functions in higher plants**. *New Phytologist*. v.155, p. 205–217, 2002.

JOULLIE, M. M.; RICHARD, D. J. **Cyclopeptide alkaloids: chemical and biology**. *Chemical Communications*, p. 2011-2015, 2004.

KARPLUS, M. **Contact electron-spin coupling of nuclear magnetic moments**. *Journal of Chemical Physics*, v. 30, p. 11-15, 1959.

KATZ, L.; BALTZ, R. H. **Natural products discovery: past, present, and future**, *The Society for Industrial Microbiology and Biotechnology*, p. 1-22, 2016

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 2ª ed. São Paulo: Sarvier Editora de Livros Médicos Ltda., p. 188-191 e 502-510, 1995.

LIU, Z., et. al. **Antiviral Effect of Emodin from *Rheum palmatum* against Coxsackievirus B5 and Human Respiratory Syncytial Virus *In Vitro***. *Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]*. v. 35, p. 916-922, 2015

LÓPEZ, C. A. **Introducción a la química farmacêutica**. 2ª Ed. Madri: McGraw-Hill/Interamericana de España, S.A.U, 2001.

MALDANER, G. **Estudo dos metabólitos secundários de *Condalia buxifolia* e *Scutia buxifolia* e suas atividades antimicrobianas**. 96 p. Dissertação (Mestrado em química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2005.

MARCHAND, J.; MONSEUR, X.; PAIS M. **Peptide alkaloids, VII. 5. Myrianthines A, B and C, peptide alkaloids of *M. arboreus* P. Beauv.** Annales Pharmaceutiques Françaises, França. v. 26, p. 771-778, 1968.

MEFFEL, C. M. L.- **Agentes antifúngicos – material didático, FMRP – USP. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition**. NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003

METZKER, D. S. **Avaliação estrutural por rmn de alcaloides ciclopeptídicos de 14 membros: Discarina-C, Adoutina-X e Condalina-A**. 105 p. Dissertação (Mestrado em química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2014.

MOREL, A. F. et al. **Absolute Configuration of Franganine**. Journal of Natural Products, v 75, n. 6, p. 1220-1222, 2012

MOREL, A. F. et al. **Antibacterial cyclopeptide from the bark of *Condalia buxifolia***. Phytochemistry, v. 61, p. 561-566, 2002

MOREL, A. F. et al. **Cyclopeptide Alkaloids: Stereochemistry and Synthesis of the Precursors of Discarines C and D and Myrianthine A**. Journal of Natural Products, v. 76, p. 1343-1350, 2013.

MOREL, A. F., et. al. **Phytochemistry**, v. 18, p. 473-477, 1979.

MOREL, A. F.; MACHADO, E. C.; WESSJOHANN, L. A. **Cyclopeptide alkaloids of *Discaria febrífuga* (Rhamnaceae)**. Phytochemistry, v. 39, p. 431-434, 1995.

MOREL, A. F.; MALDANER, G.; ILHA, V. **The alkaloids, Chemistry and Pharmacology**, New York: Academic Press, v. 67, 2009

MORI, K.; FUKAMATSU, K. **Synthesis of Blattellastanoside A, the Aggregation Pheromone of a Steroid Qiucoiside Isolated as the German Cockroach**. Proc. Japan Acad.; v. 69; Ser. B; 1993.

MOSTARDEIRO, M. A. **Peptídeos bioativos intermediários na síntese de alcaloides ciclopeptídicos de 14 membros**. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2001.

NANDANI, D., VERMA, R., N., BATRA, A. **Isolation and identification of quercetin and emodin from *Cassia tora* L.** Annals of Phytomedicine v. 2, p. 96-104, 2013

NAVA, R. F.; ARREGUÍN-SÁNCHEZ, M. de la Luz., QUIROZ-GARCÍA, D. L. **Revisión del género *condalia* (rhamnaceae) en México**. Polibitânica, v. 36, 15-40, p. 1405-2768; México,

OJA, V.; CHEN, X. **Sublimation Thermodynamic Parameters for Cholesterol, Ergosterol, β -Sitosterol, and Stigmasterol**. J.Chem Eng., v. 54, p. 730–734, 2009.

OLIVEIRA, A. B. **Microencapsulamento de estigmasterol proveniente de *Musa paradisiaca* L., Musaceae**. p. 11-31. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

OLIVEIRA, F. **Farmacognosia**, Editora Atheneu, 1991.

PANDEY, V. B. et. al. **Mauritine-K, a new antifungal cyclopeptide alkaloid from *Ziziphus mauritiana***. Journal of the Indian Chemical Society v. 84, p. 781-784, 2007.

PERRIN, D. D.; AMAREGO, W. L. F. **Purification of laboratory chemicals**, Pergamon Press, New York, Third edition, 1998.

PRIDHAM, J. B. **Terpenoids in Plants**. London, Academic Press., 1967.

ROBINSON, T. **The Organic Constituents of Higher Plants**. 6a ed. Massachusetts: Cordus Press., 1991.

SANTOS, S. **Estudo anatômico do lenho e descrição morfológica de cinco espécies *Sulrio-grandenses* da família Rhamnaceae**. 121 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2008.

SANTOS, S. R.; MARCHIORI, J. N. C.; CANTODOROW, TS. **Identificação botânica e anatomia da madeira de *Discaria americana* Gillies et Hooker**. Balduinia, v. 10, p. 11-20, 2007.

JORGE, S. S. A. **Plantas Medicinais – coletânea dos saberes**, 2009.

SHAH, A. H.; AL-YAHYA, M. A.; DEVI, S.; PANDEY, V. B. **Phytochemistry**. v. 26, p. 1230, 1987.

SIERRA, M., G. et al. **Phytochemistry**. v. 13, p. 2865, 1974.

SILVA, M., G., V.; SANTOS, R., N., **Constituintes químicos do caule de *Senna reticulata* (Leguminosae)**. Química Nova, v. 31, No 8, p. 1979 – 1981, 2008.

SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, Editora, 5ª ed, UFSC, Florianópolis, 2004.

SOLOMONS, T.W.G; FRYHLE, C.B.; **Química Orgânica**. 8ª Ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005.

SOLOMONS, T. W.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**. v.2, 8a ed. Rio de Janeiro: LTC, 2006.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em PAG II.** Nova Odessa: Instituto Plantarum, 640 p., 2005.

SUGAWARA, F., et. al. **Insecticidal peptide from mung bean: Resistance factor against infestation with Azuki bean weevil.** Journal of agriculture and food chemistry. v. 44, p. 3360, 1996.

SUH, D.-Y. et. al. **Metabolic Cleavage of Franguloline in Rodents: In vitro and in vivo study.** J. Nat. Prod. v. 60, p. 265, 1997.

SUKSAMRARN, N., et. al. **Ziziphine N, O, P and Q, new antiplasmodial cyclopeptide alkaloids from *Ziziphus oenoplia* var. *brunoniana*.** Tetrahedron v. 61, p. 1175, 2005.

TSCHESCHE, R. et al. **Alkaloids from Rhamnaceae XVII: Mauritine-C, -D, -E and -F, new peptide alkaloids from *Ziziphus mauritiana*.** Liebigs Annalen der Chemie. v. 10, p. 1694-1701, 1974

TSCHESCHE, R.; KAUBMANN, E. U.; FEHLHABER, H. W. **Alkaloids from Rhamnaceae. XIII: Amphibine B, C, D and E, four peptide alkaloids from *Zizyphus aphibia*.** Chemische Berichte. v. 105, p. 3094, 1972

VIEGAS, C. Jr. et. al. **Modificações Estruturais na (-)-Cassina e LASSBio-767: Estratégias para a Descoberta e Otimização de Novos Candidatos a Fármacos,** Revista Virtual de Quimica, . v. 1, p. 117-127, RJ, 2009

VIEGAS, C. Jr.; BOLZANI, V. S. **Os produtos naturais e a química medicinal moderna,** Quimica. Nova, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

WAHRNHOF, E. W.; PRADHAN, S. K.; MA, J. C. N. **Canadian Journal of Chemistry.** v. 43, p. 2594, 1965.

ZANCHET, E., M. et al. **Pharmacological evidence favouring the traditional use of the root bark of *Condalia buxifolia* Rissek in the relief of pain and inflammation in mice.** Journal of Ethnopharmacology, v. 175, p. 370–377, 2015.

ZYGADLO, J. et. al. **Distribution of alkanes and fatty acids in the *Condalia montana* (*Rhamnaceae*) species complex.** P1. Syst. Evol., v. 179, p 89-93, 1992.

ZULLO, M. A. T.; RAMOS, M. T. B.; MONTEIRO, D. A.; JR., G. G. **Extração e isolamento de diosgenina de Barbasco, Bragantia, Campinas,** v. 46, p. 9-15, 1987.

ANEXO I
CROMATOGRAMA DOS PADRÕES UTILIZADOS EM CLAE E CG

Padrão de β -sitosterol (Tr=23,133 min)

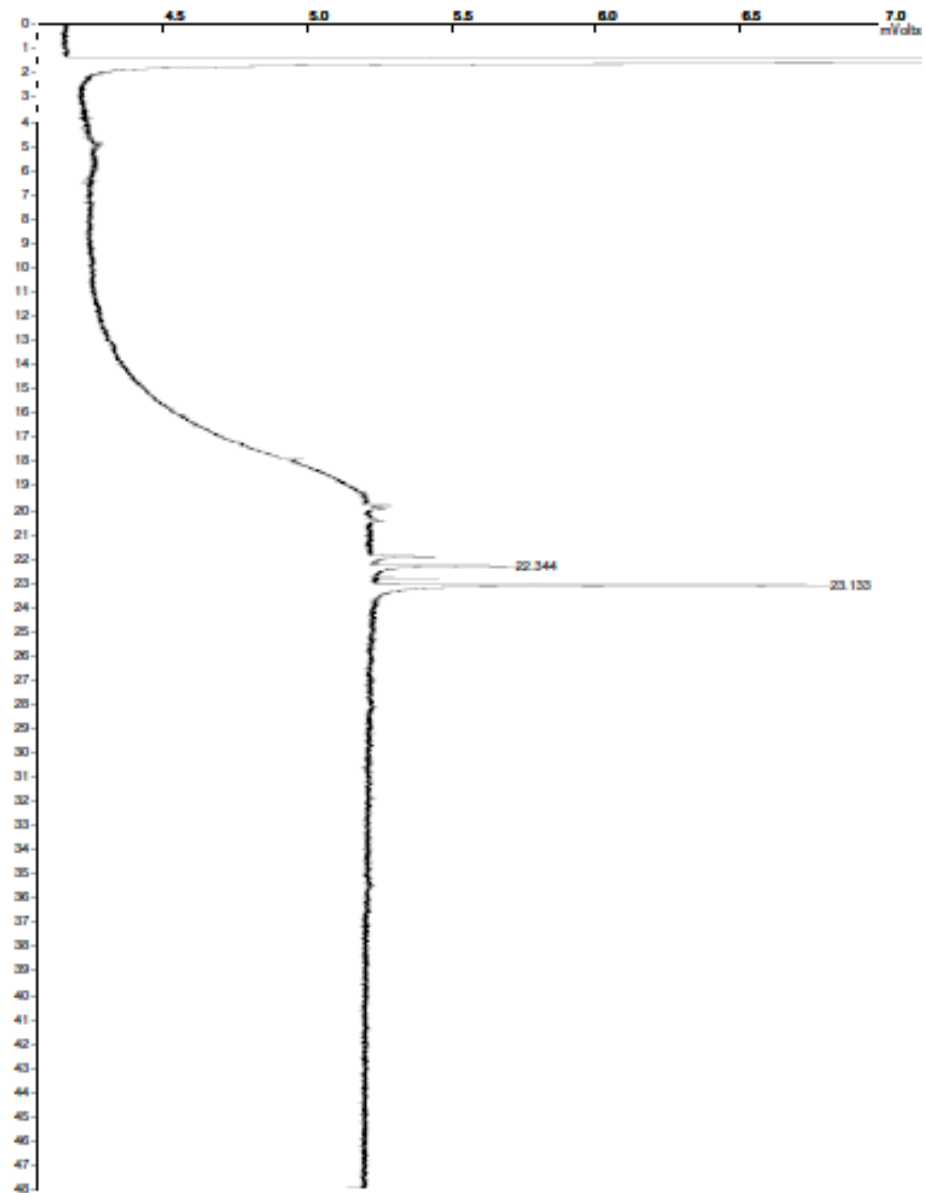
Title :
Run File : C:\STAR\SABRINA\MODULE16\STAR023.RUN
Method File : c:\star\sabrina\module16\untitled.mth
Sample ID : SITOSTEROL

Injection Date: 10-DEC-15 3:11 PM Calculation Date: 15-DEC-15 7:01 AM

Operator : Bira Detector Type: ADCB (1 Volt)
Workstation: Bus Address : 16
Instrument : 3800 Sample Rate : 10.00 Hz
Channel : B - B Run Time : 48.002 min

***** Star Chromatography Workstation ***** Version 4.51 *****

Chart Speed - 0.47 cm/min Attenuation - 12 Zero Offset - -138%
Start Time - 0.000 min End Time - 48.000 min Min / Tick - 1.00



Padrão de Estigmasterol (Tr=22,345 min)

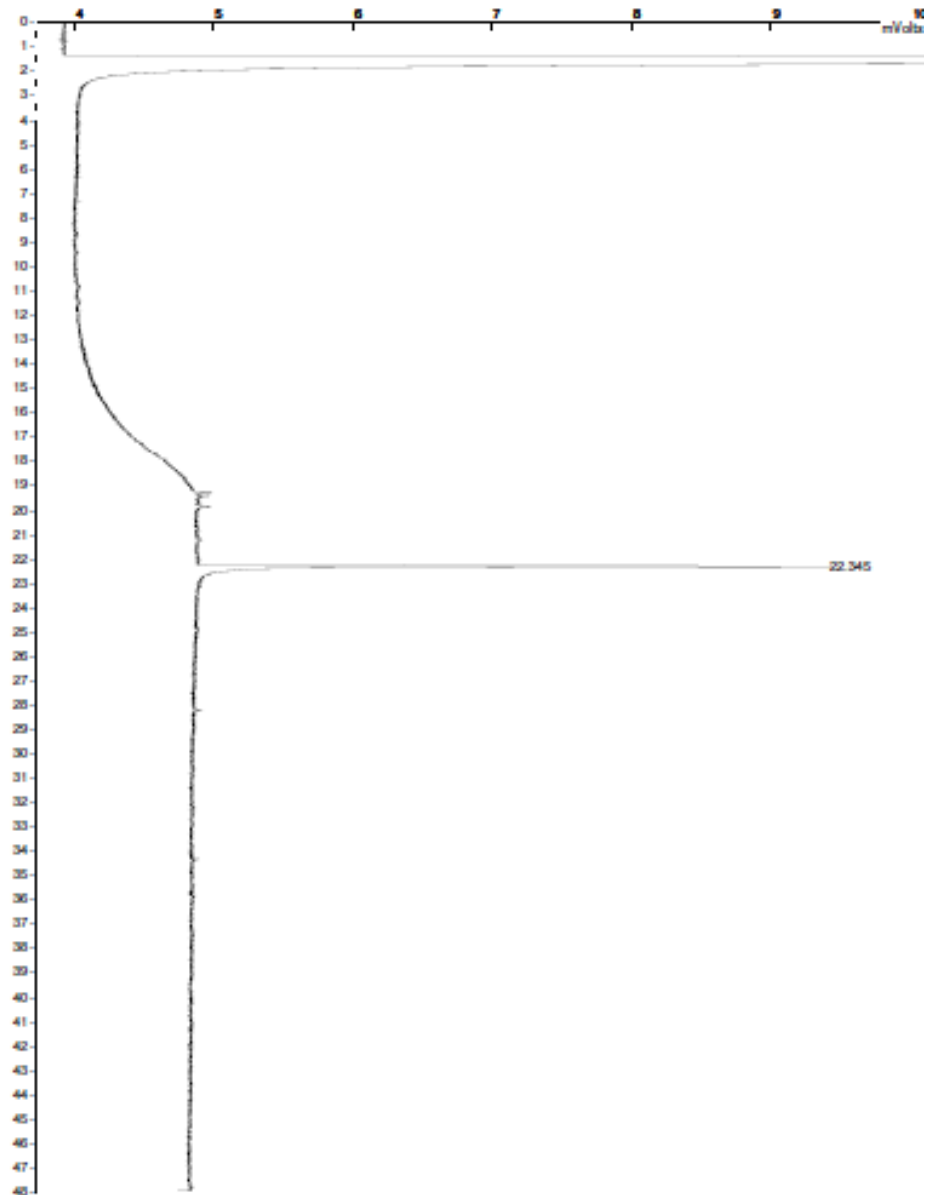
Title :
Run File : C:\STAR\SABRINA\MODULE16\STAR020.RUN
Method File : c:\star\sabrina\module16\untitled.mth
Sample ID : ESTIGMASTEROL

Injection Date: 10-DEC-15 10:40 AM Calculation Date: 10-DEC-15 11:29 AM

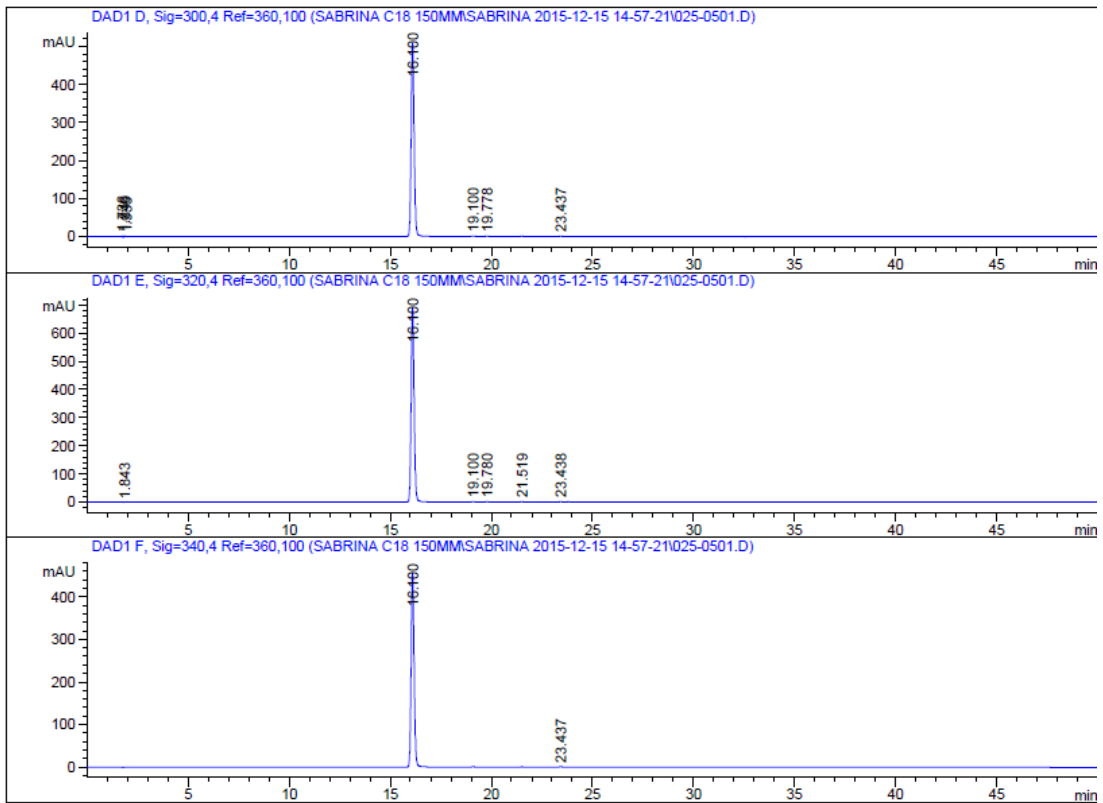
Operator : Bira Detector Type: ADCE (1 Volt)
Workstation: Bus Address : 16
Instrument : 3800 Sample Rate : 10.00 Hz
Channel : B - B Run Time : 48.002 min

***** Star Chromatography Workstation ***** Version 4.51 *****

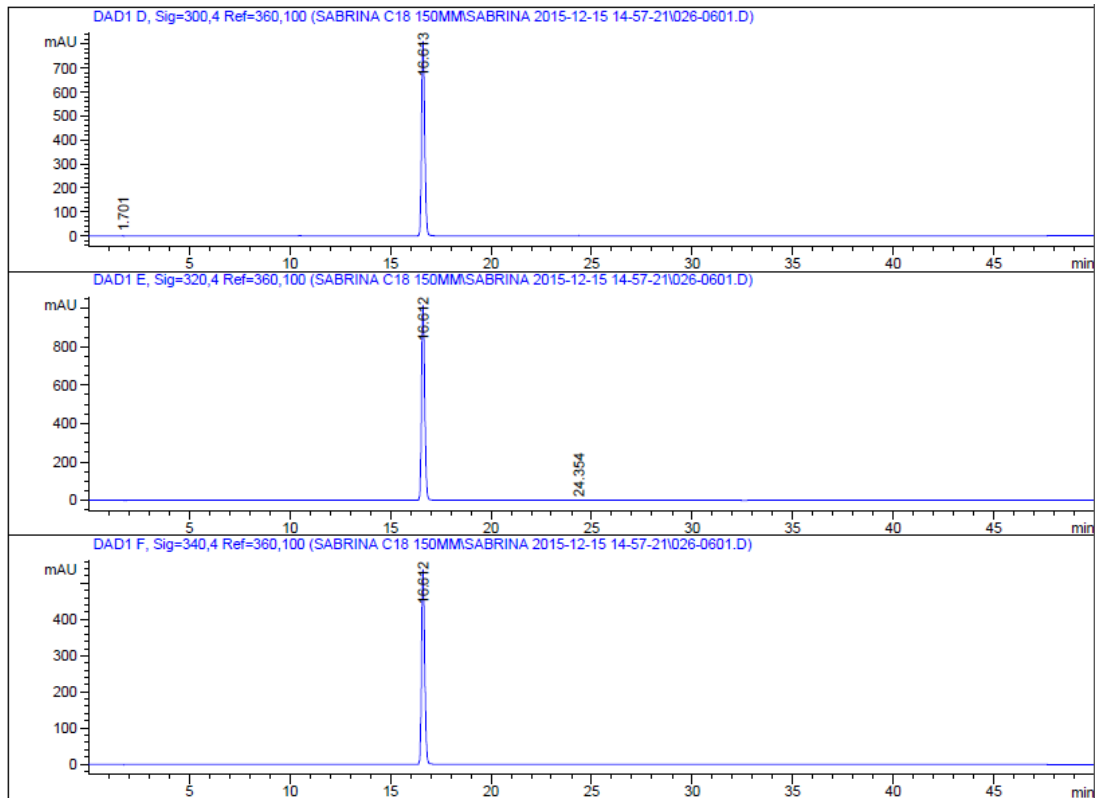
Chart Speed - 0.47 cm/min Attenuation - 26 Zero Offset - -58%
Start Time - 0.000 min End Time - 48.000 min Min / Tick - 1.00



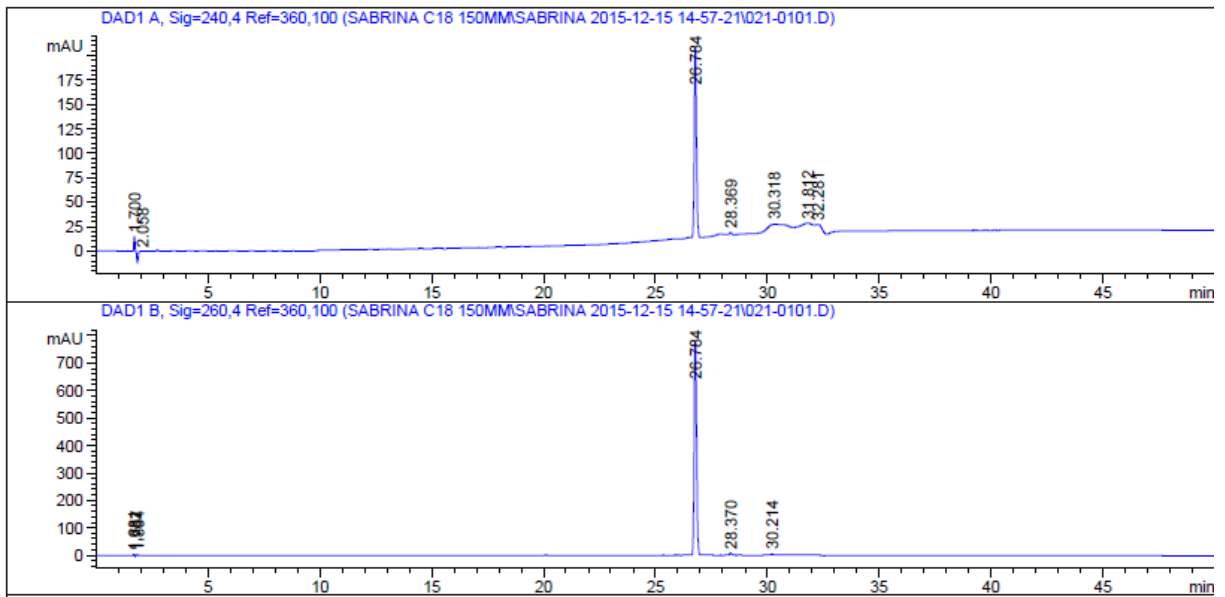
Padrão de Ácido clorogênico (Tr=16,100 min)



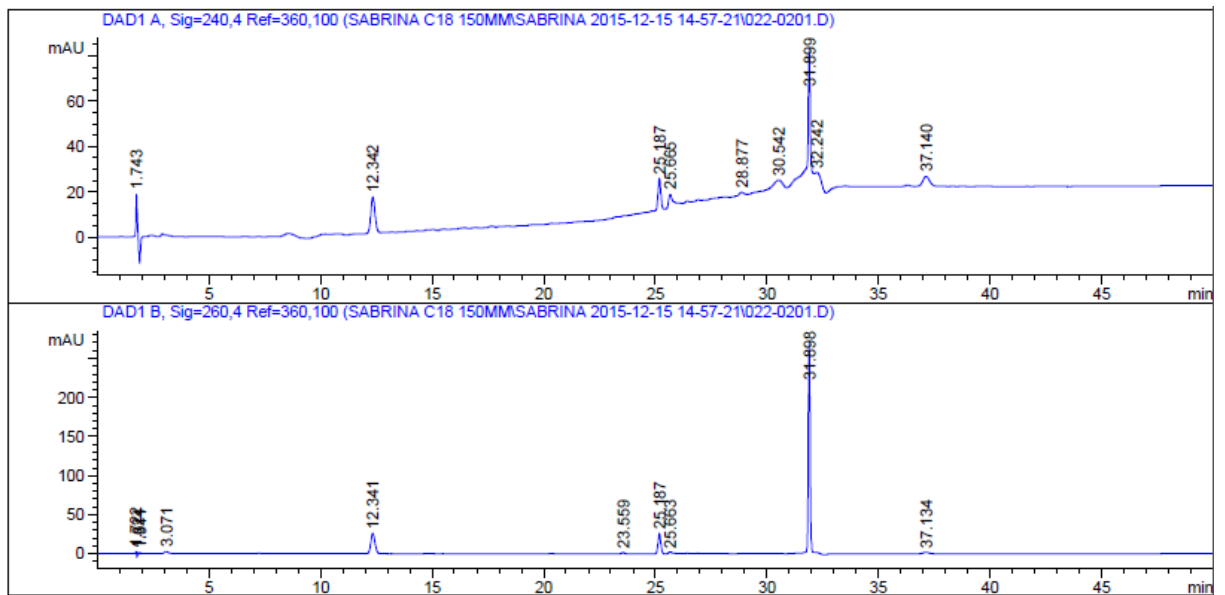
Padrão de Ácido caféico (Tr=16,612 min)



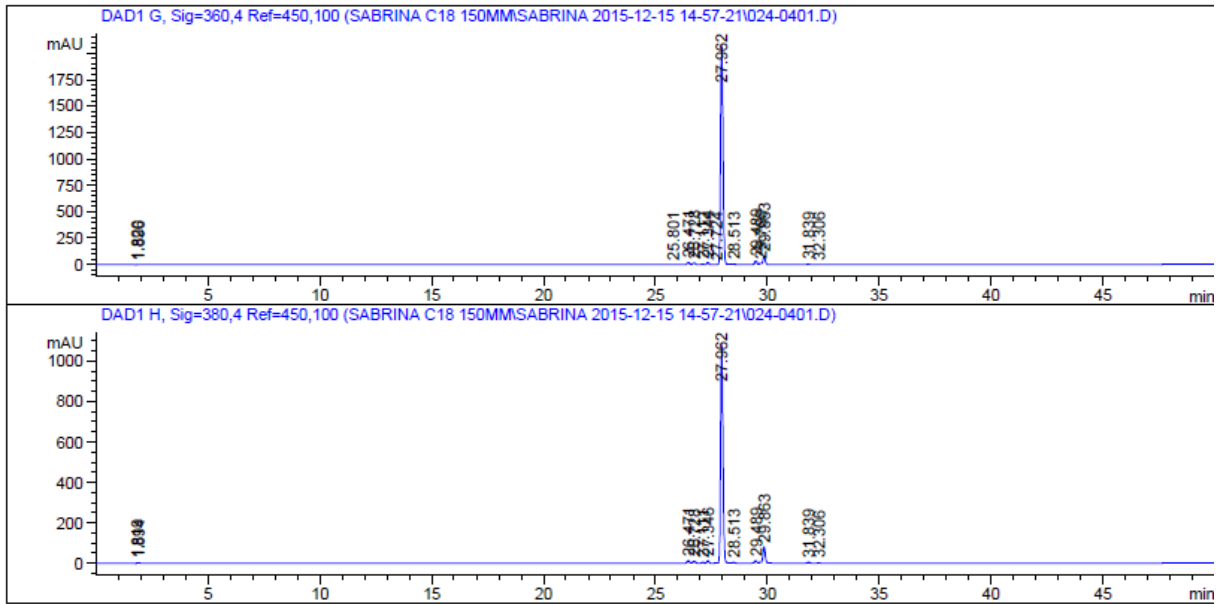
Padrão de Rutina (Tr=26,784 min)



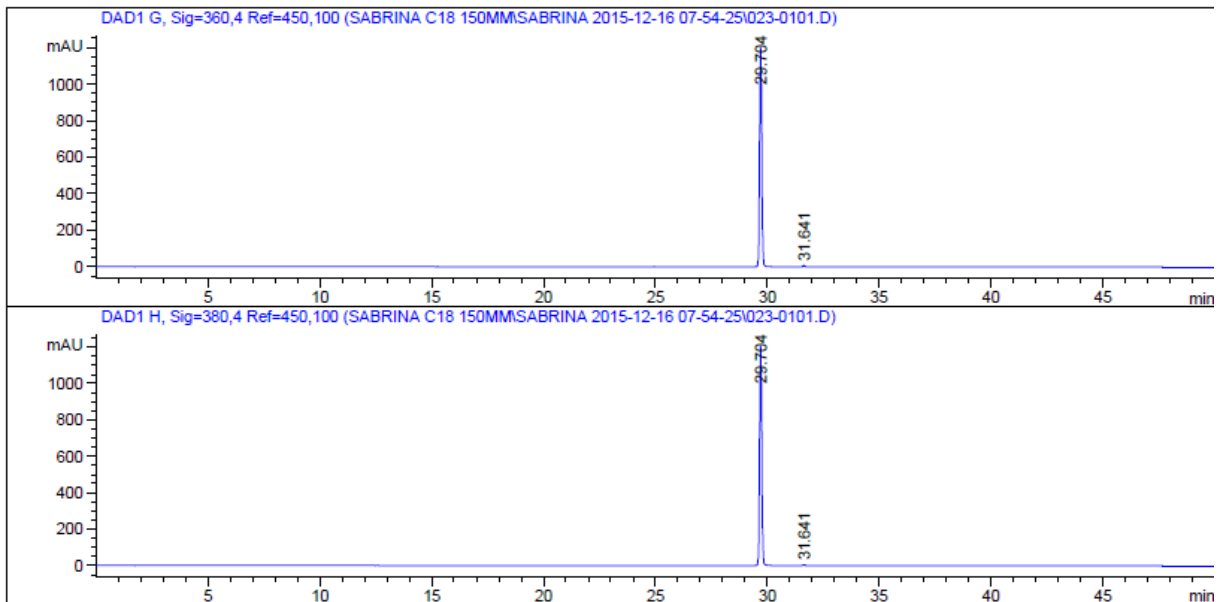
Padrão de Canferol (Tr=31,898 min)



Padrão de Quercitrina (Tr=27,962 min)

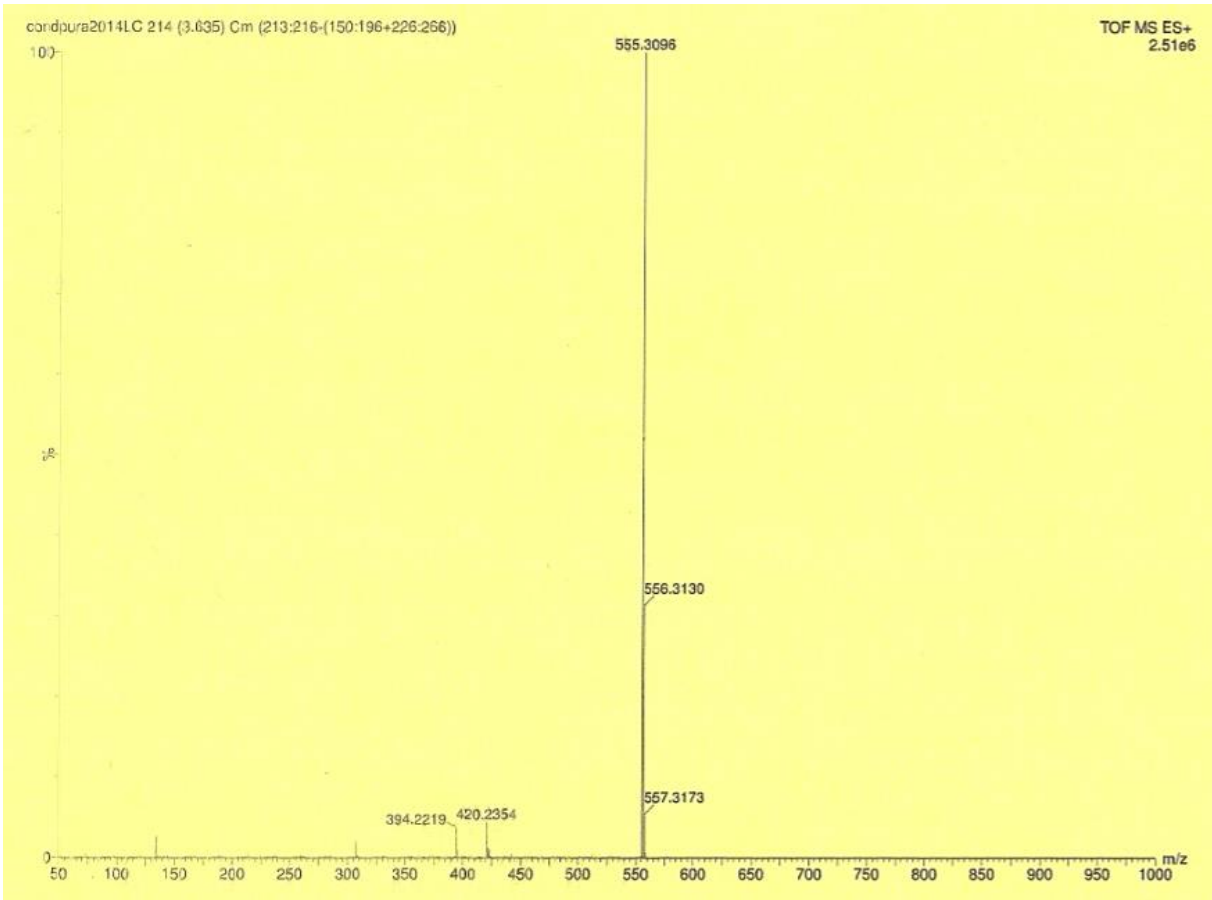


Padrão de Quercetina (Tr=29,704 min)

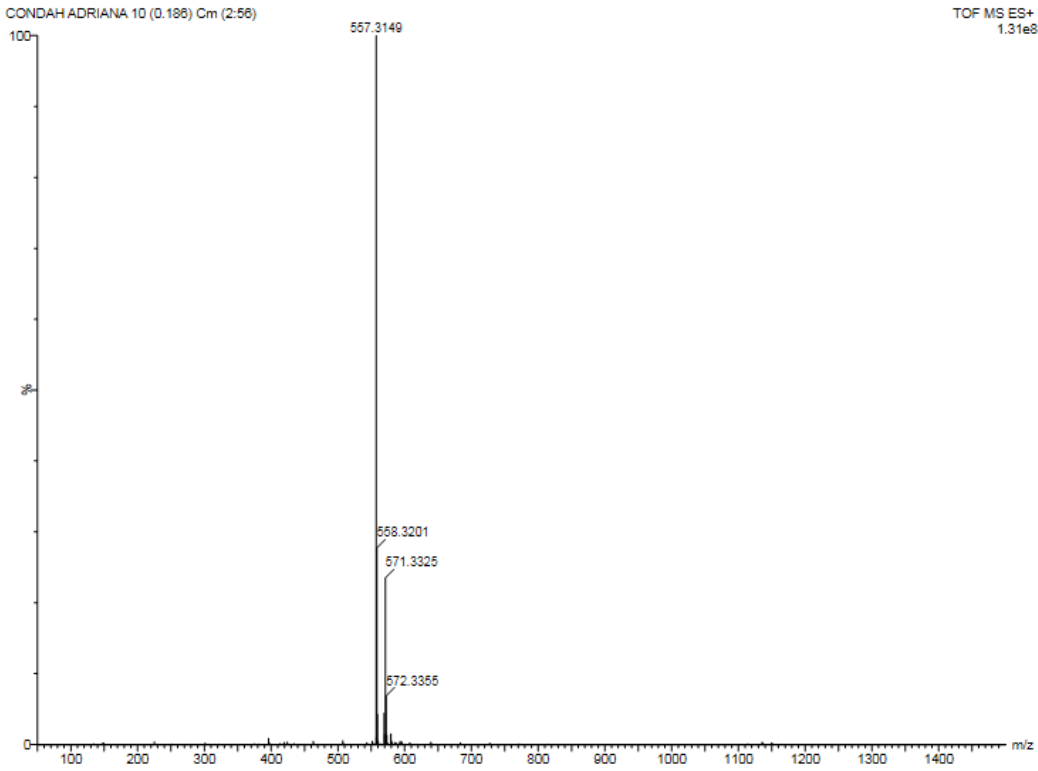


ANEXO II
ESPECTROS DE MASSAS

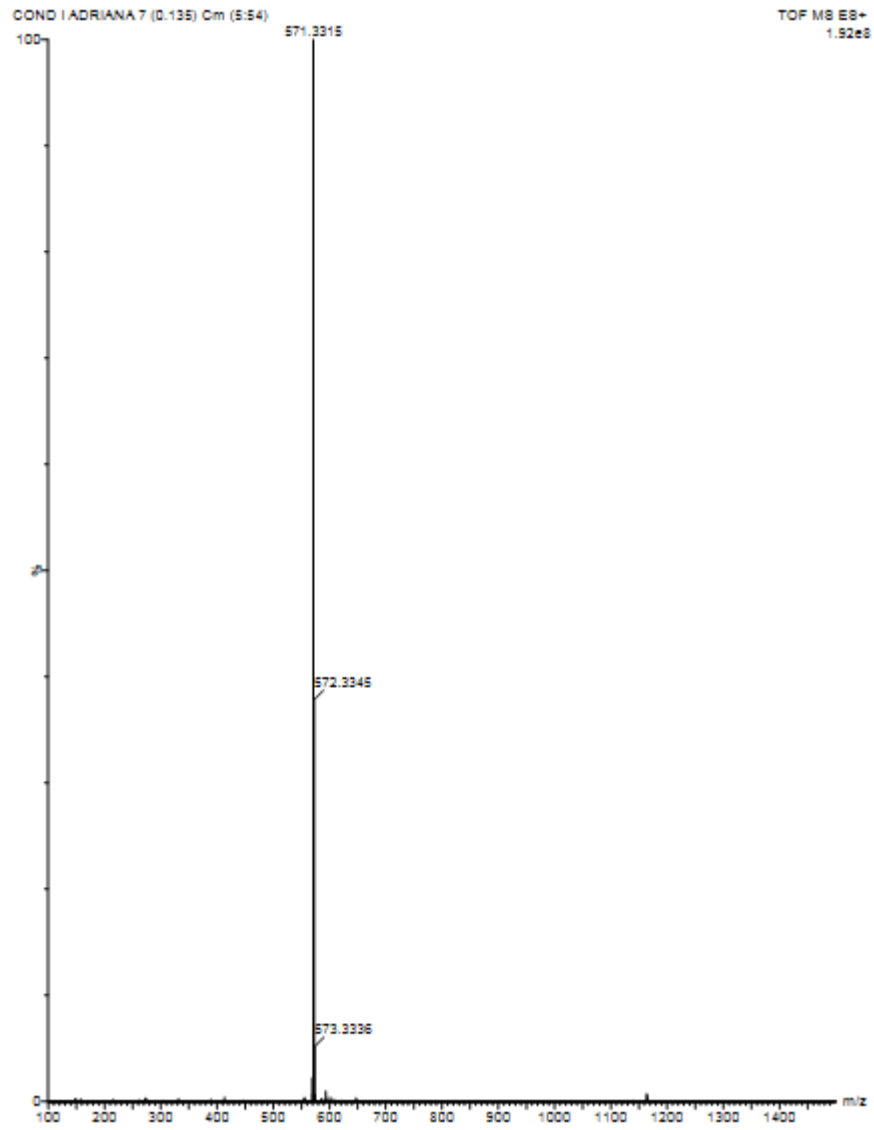
Espectro de massas de alta resolução da Condalina-A



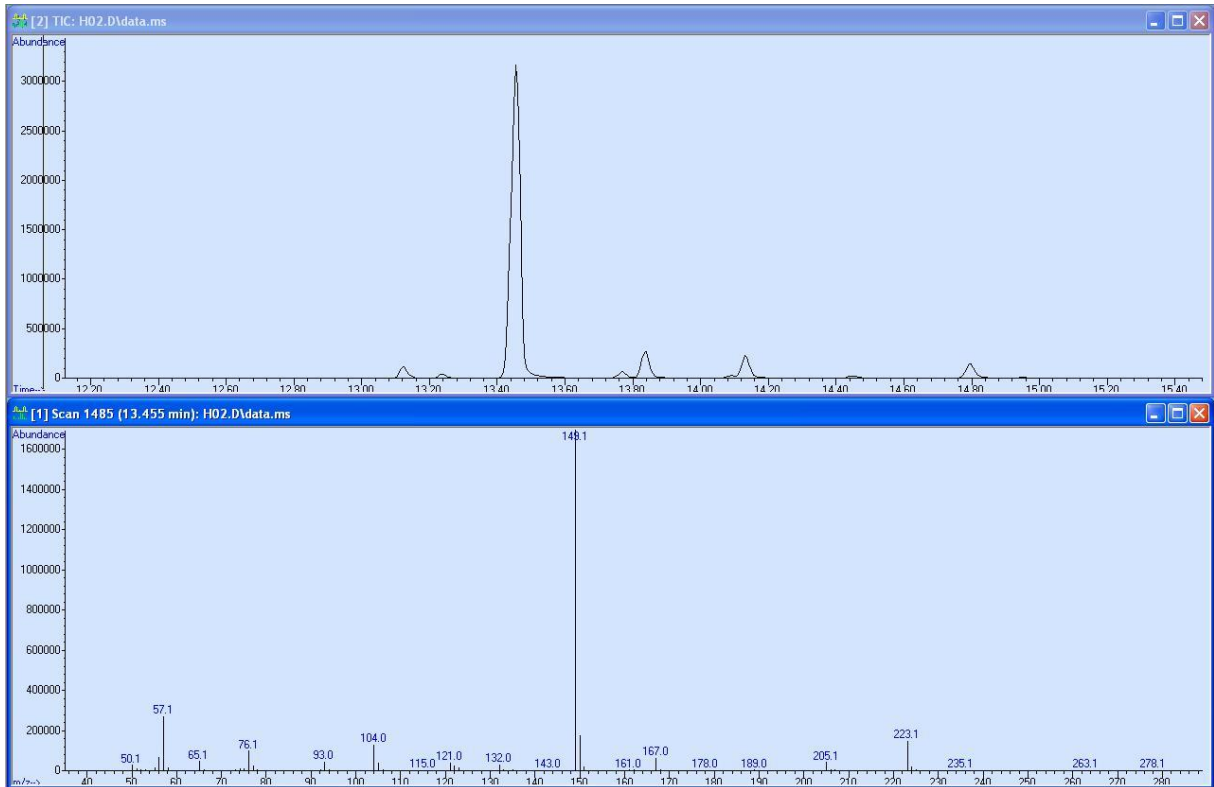
Espectro de massas de alta resolução da Diidrocondalina-A



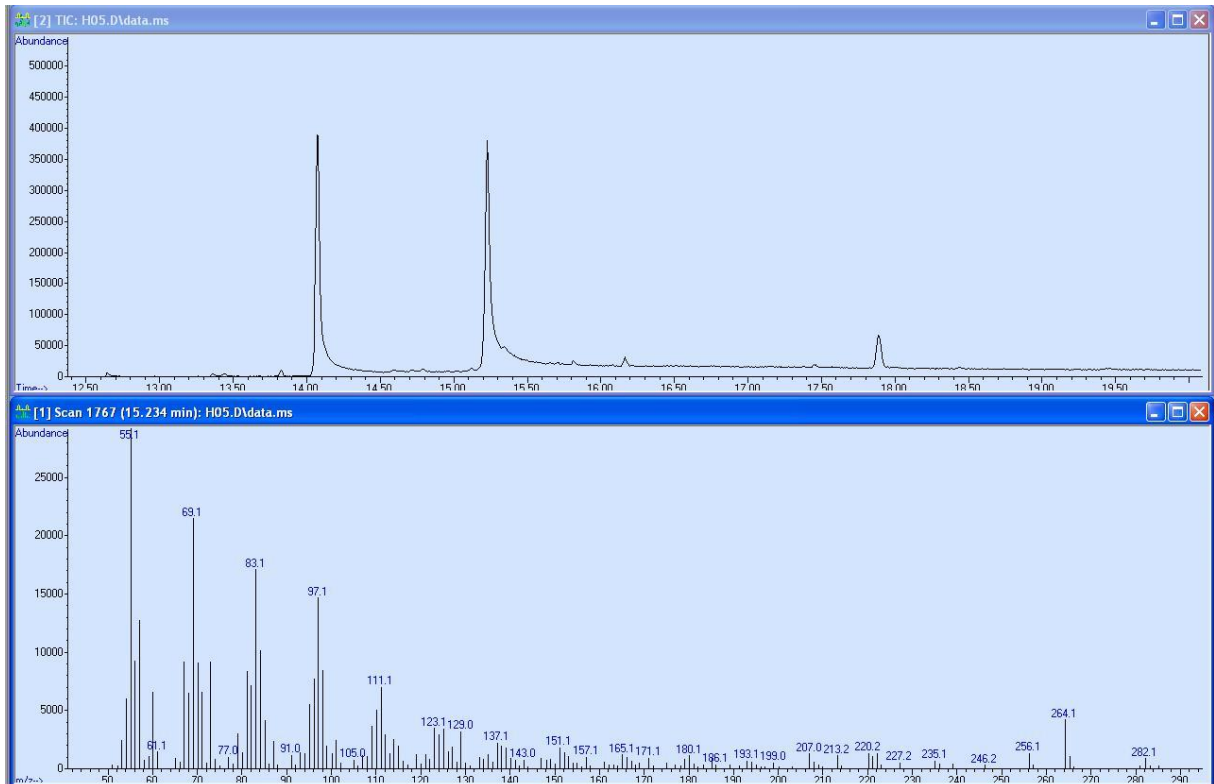
Espectro de massas de alta resolução da Dimetilcondalina-A



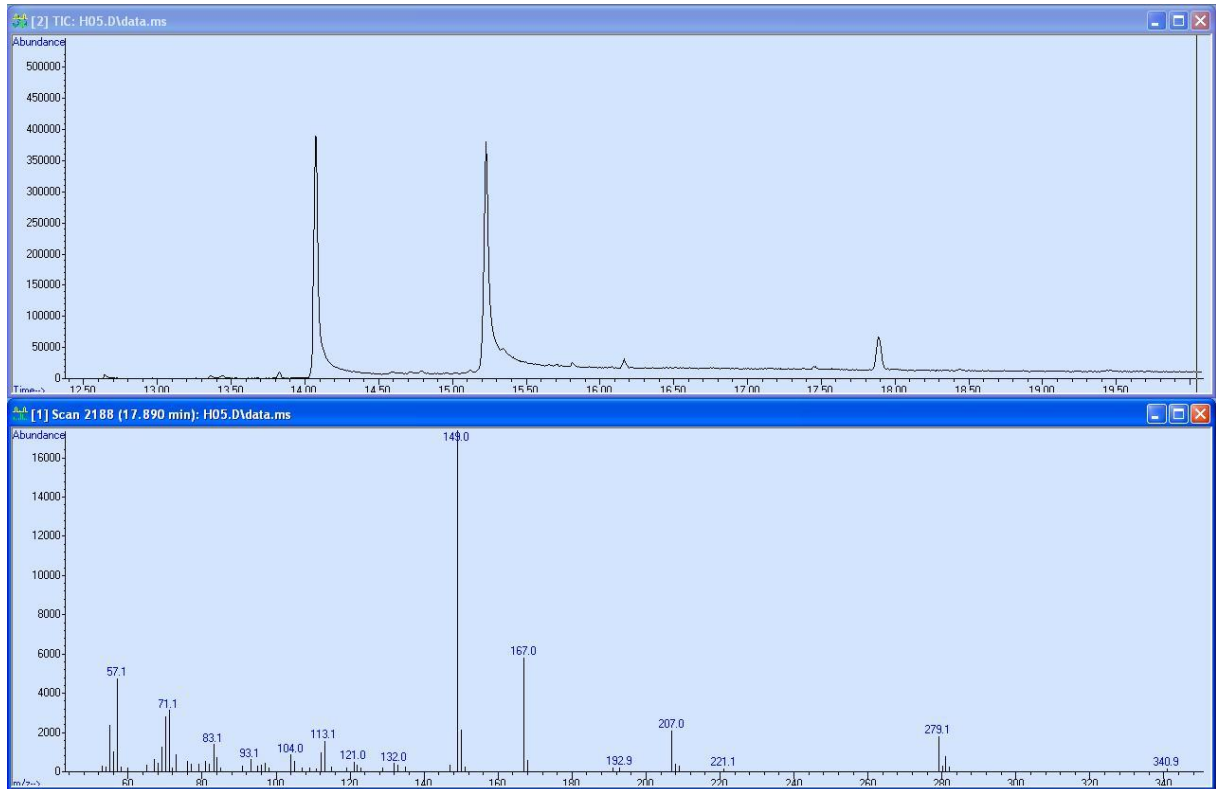
CG-MS de H02



CG-MS de H05 -1

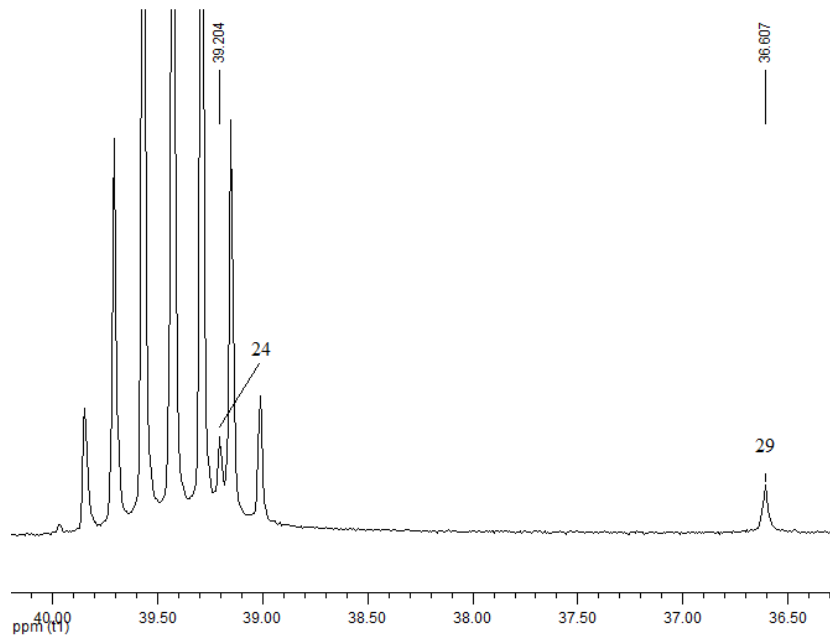


CG-MS de H05 -1

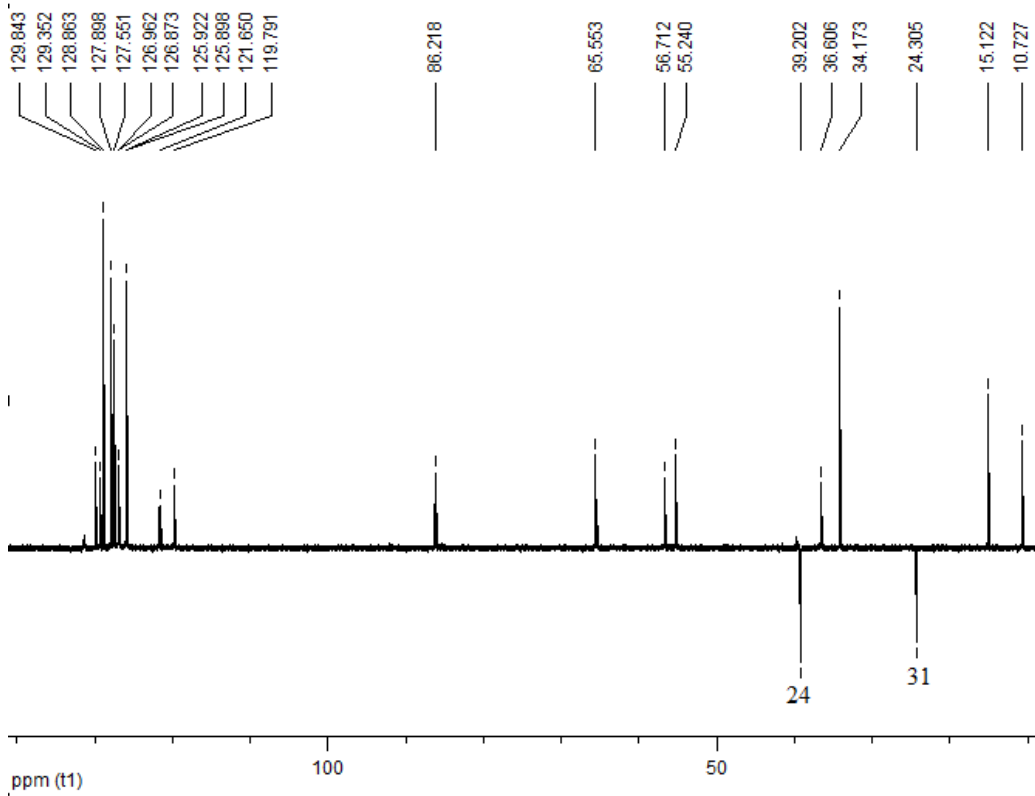


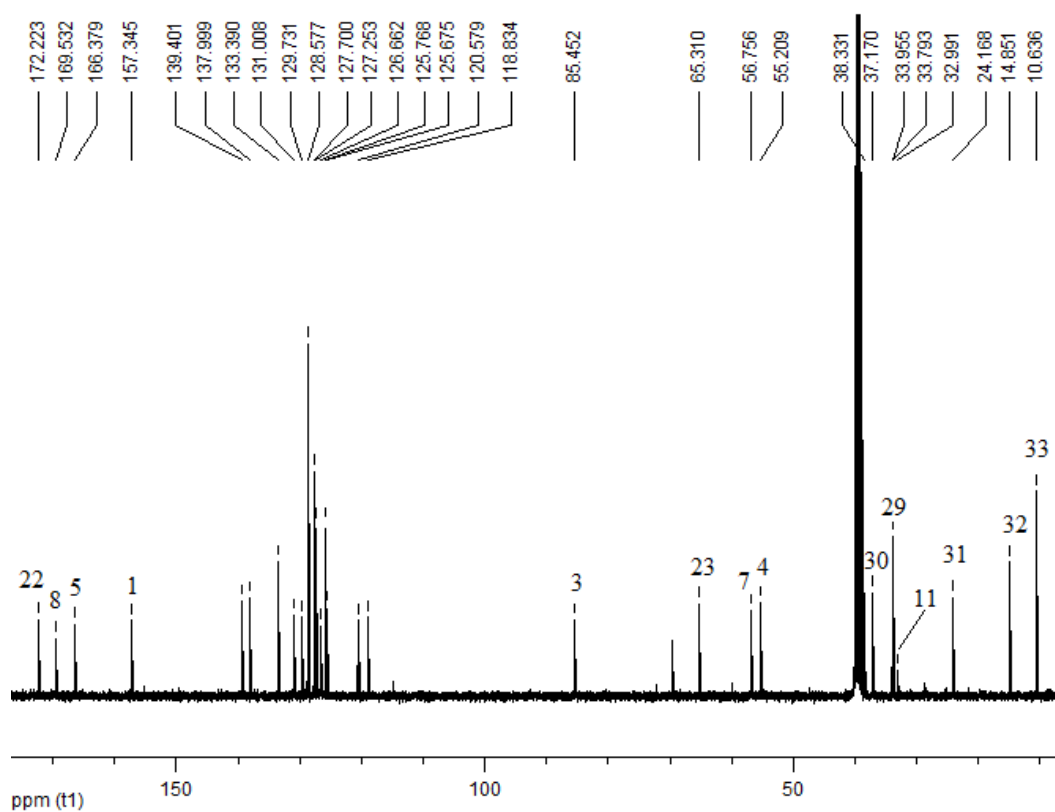
ANEXO III
ESPECTROS DE RMN COMPLEMENTARES

Espectro de RMN de ^{13}C expandido da Condalina-A, que mostra C-24 junto ao sinal do solvente deuterado DMSO.

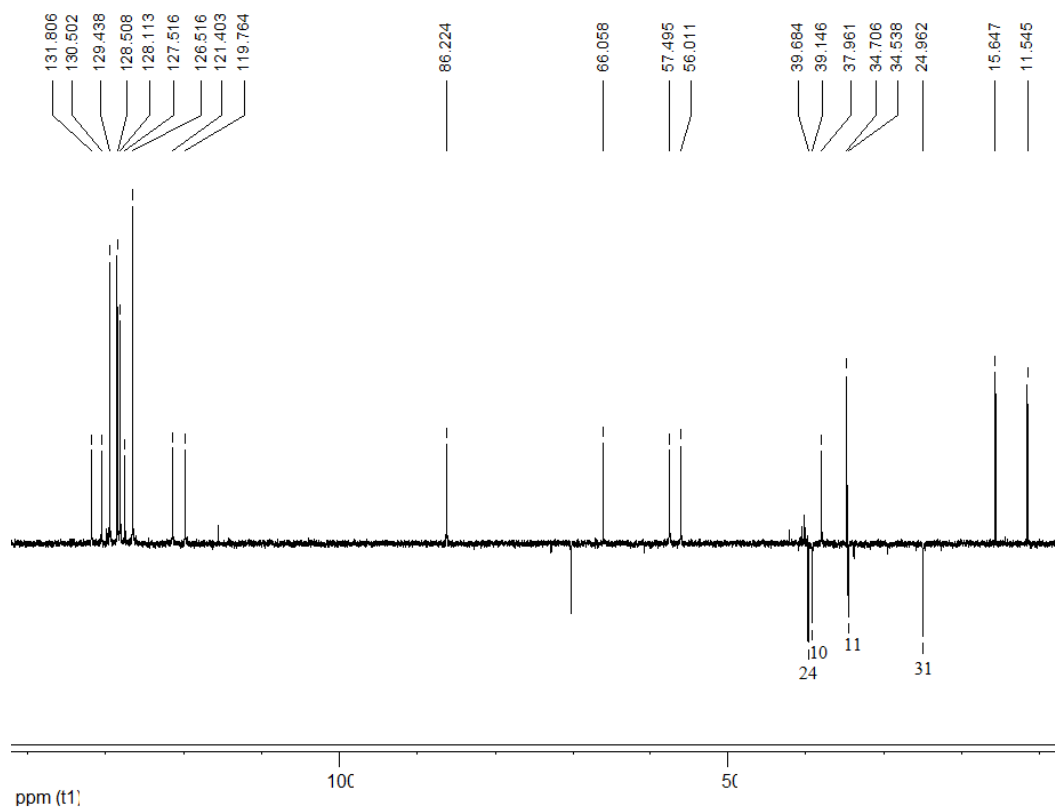


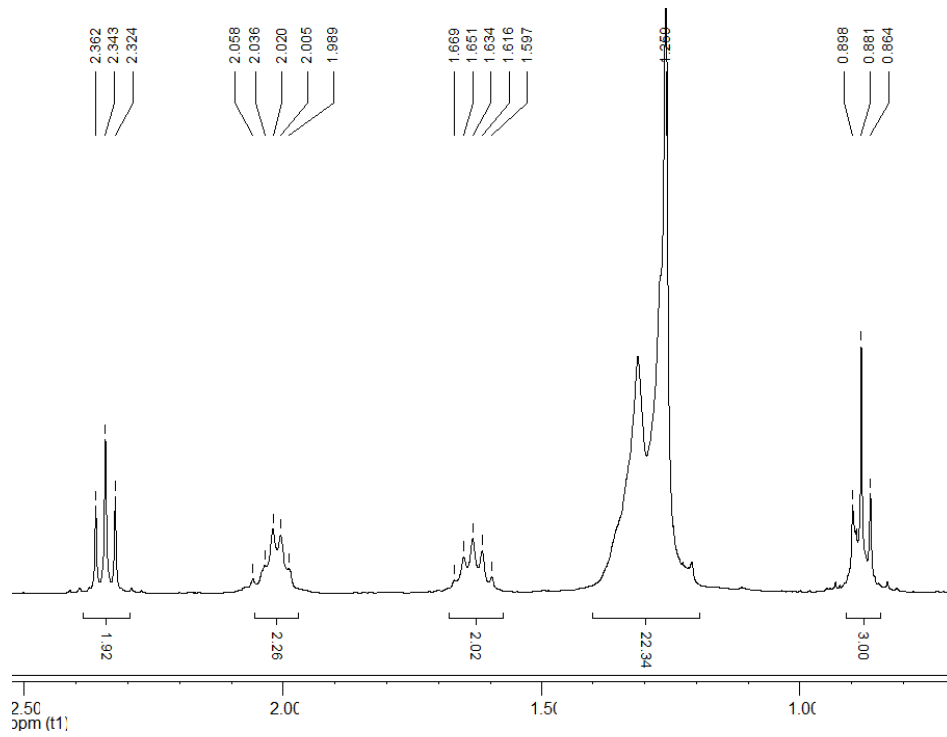
Espectro de DEPT 135 da Condalina-A, em DMSO, 150 MHz.



Espectro de RMN de ^{13}C da Diidrocondalina-A, em DMSO, 100 MHz.

Espectro de DEPT 135 da Diidrocondalina-A, em DMSO, 100 MHz.



Espectro de RMN de ^1H expandido da mistura de ácidos graxosEspectro de RMN de ^1H expandido de 5 a 5,5 ppm da mistura de ácidos graxos