



UFSM

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**“Estudo dos metabólitos secundários de *Condalia
buxifolia* e *Scutia buxifolia* e suas atividades
antimicrobianas”**

**Por
Graciela Maldaner**

PPGQ

Santa Maria, RS – Brasil

2005

**“ESTUDO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Condalia buxifolia* E
Scutia buxifolia E SUAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANAS”**

por

Graciela Maldaner

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 de grau de **Mestre em Química**.

Orientador: Prof. Dr. Ademir Farias Morel

Santa Maria, RS-BRASIL.

2005

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

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**“ESTUDO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Condalia buxifolia* E *Scutia
buxifolia* E SUAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANAS”**

elaborada por
Graciela Maldaner

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Química

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. Ademir Farias Morel – Orientador – UFSM

Prof^{ta}. Dr^a. Mara E. F. Braibante - UFSM

Prof. Dr. Ubiratan F. da Silva – UPF

Santa Maria, 30 de novembro de 2005.

Aos meus pais, José Almedo e Inês, dedico esta dissertação pelo seu amor, carinho, dedicação e incentivo.

Aos meus irmãos, Valdir e Raquel, aos meus sobrinhos Giovana e Henrique, e ao meu namorado Jorge Luiz, ofereço esta dissertação pelo apoio incentivo, compreensão, carinho e confiança.

Ao Prof. Dr. Ademir Farias Morel, meu sincero e especial agradecimento pela orientação, confiança, amizade e dedicação prestados no decorrer deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Em memória à Prof^a. Dr^a. Emília C. M. Dessooy, pela amizade, incentivo e companheirismo.

À Prof. Dr^a. Ionara I. Dalcol, pelo incentivo, apoio, amizade e co-orientação durante a realização deste trabalho.

Aos professores: Dr^a. Mara E. F. Braibante e Dr. Ubiratan F. da Silva, pelo auxílio, para a melhoria deste trabalho como membros da banca examinadora.

Ao Prof. Dr. Sandro R. Giacomelli pela amizade, apoio, incentivo e ensinamentos durante minha iniciação científica.

Aos amigos, Andréia, Cláudia, Carol, Carla Costa, Irene, Ivonete, Luciana (Lú), Mairi, Neiva e Wellington, por compartilhar das alegrias e pelos incentivos nos momentos mais difíceis deste trabalho.

Aos colegas de laboratório Anderson, Carolina, Euclésio, Gilvan, Graciane, Juliano, Ilaine, Suziane, Vanessa e Vinícius Ilha.

A funcionária, Maria Angélica, pela amizade, profissionalismo e dedicação demonstrada na obtenção dos espectros de RMN.

À Coordenação do Programa de Pós Graduação em Química da UFSM, em especial aos funcionários Ademir e Valéria, pela atenção dispensada.

A todas as pessoas (não-citadas) que de forma direta ou indireta colaboraram para a realização deste trabalho, o meu muito obrigado.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais e Exatas
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

ESTUDO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Condalia buxifolia* E *Scutia buxifolia* E SUAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANAS

Autora: Graciela Maldaner
Orientador: Prof. Dr. Ademir Farias Morel
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 30 de novembro de 2005.

O presente trabalho descreve o estudo dos metabólitos secundários de duas espécies pertencentes à família Rhamnaceae: *Condalia buxifolia* e *Scutia buxifolia*, e ainda um estudo da relação estrutura/atividade de sete alcalóides ciclopeptídicos e um ciclopeptídeo neutro: scutianina-B (24), scutianina-C (14), scutianina-D (15), scutianina-E (16), scutianina-F (18), scutianina-M (37), condalina-A (22) e scutianeno-D (38).

Da casca do caule de *Condalia buxifolia* foram isolados três metabólitos: lupeol (34), taraxerol (35) e β -sitosterol (33). Da casca da raiz foi isolado o alcalóide ciclopeptídico condalina-A (22).

Da casca da raiz de *Scutia buxifolia* foram isolados os metabólitos ácido ursólico (36) e β -sitosterol (33), enquanto que os ciclopeptídicos scutianina-B (24), scutianina-C (14) e scutianina-D (15) foram apenas identificados nesta parte da planta através de comparação com amostras autênticas.

Adicionalmente, foram analisadas atividades antimicrobianas das frações e dos metabólitos isolados de *Condalia buxifolia* e *Scutia buxifolia*, através da técnica de bioautografia utilizando-se diferentes microrganismos: duas bactérias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* (Sa) e *Staphylococcus epidermidis* (Se)), três bactérias Gram negativas (*Klebsiella pneumonia* (Kp), *Salmonella setubal* (Ss) e *Escherichia coli* (Ec)) e dois fungos (*Saccharomyces cerevisiae* (Sc) e *Candida albicans* (Ca)). Observou-se, nesta análise, que tanto a estereoquímica dos aminoácidos que constituem a estrutura dos alcalóides, bem como a presença do grupo básico destas estruturas, são importantes para este tipo de atividade.

ABSTRACT

Máster Dissertation
Post-Graduated Course em Chemistry
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.

STUDY OF THE SECONDARY METABOLITES OF *Condalia buxifolia* AND *Scutia buxifolia* AND ITS ANTIMICROBIAL ACTIVITY

Author: Graciela Maldaner
Adviser: Prof. Dr. Ademir Farias Morel
Date and place of defense: Santa Maria, November, 2005.

The present work describes the study of the secondary metabolites of two species that belong to the Rhamnaceae family: *Condalia buxifolia* and *Scutia buxifolia*, and the study of the ratio structure/activity of seven cyclopeptids alkaloids and one neutral cyclopeptide: scutianine-B (**24**), scutianine-C (**14**), scutianine-D (**15**), scutianine-E (**16**), scutianine-F (**18**), scutianine-M (**37**), condaline-A (**22**) and scutianene-D (**38**).

In the bark of the bole of *Condalia buxifolia* three metabolites were isolated: lupeol (**34**), taraxerol (**35**) and β -sitosterol (**33**). In the bark of the roots was isolated the cyclopeptidc alkaloid condaline-A (**22**).

In the bark of the roots of *Scutia buxifolia* the metabolites ursolic acid (**36**) and β -sitosterol (**33**) were isolated, whereas the cyclopeptids alkaloids scutianine-B (**24**), scutianine-C (**14**) and scutianine-D (**15**) were only identified in this part of the plant by comparison with authentic samples.

Additionally, the antimicrobial activity of the portions and the isolated metabolites of *Condalia buxifolia* and *Scutia buxifolia* were analyzed by Bioautography test, utilizing different microorganisms: two gram positive bacteria (*Staphylococcus aureus* (*Sa*) and *Staphylococcus epidermidis* (*Se*)), three gram negative bacteria (*Klebsiella pneumonia* (*Kp*), *Salmonella setúbal* (*Ss*) and *Escherichia coli* (*Ec*)) and two fungus (*Saccharomyces cerevisiae* (*Sc*) and *Candida albicans* (*Ca*)). In this analysis it was observed that the stereochemistry of the amino acids that compose the alkaloids structure and the presence of the basic group of these structures are important to this sort of activity.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	6
RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABELAS	13
LISTA DE ESQUEMAS	14
LISTA DE QUADROS	15
LISTA DE APÊNDICE	16
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	17
1- INTRODUÇÃO	19
2- OBJETIVOS	21
3 - REVISÃO DA LITERATURA	22
3.1- Alcalóides Ciclopeptídicos.....	22
3.1.1- Alcalóides Ciclopeptídicos de Treze Membros.....	23
3.1.2- Alcalóides Ciclopeptídicos de Catorze Membros.....	24
3.1.3- Alcalóides ciclopeptídicos de quinze membros.....	33
3.1.4 - Atividade Biológica de Alcalóides Ciclopeptídicos.....	34
3.2- Determinação Estrutural.....	35
4- PARTE EXPERIMENTAL	37
4.1- Procedimentos experimentais gerais.....	37
4.1.1- Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.....	37
4.1.2- Aparelho de ponto de fusão.....	37
4.1.3- Materiais e Métodos Cromatográficos.....	37
4.1.3.1- Cromatografia em Coluna.....	37
4.1.3.2- Cromatografia em Placa Preparativa (CPP).....	38
4.1.3.3- Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	38
4.1.4- Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i>	38
4.1.4.1- Microrganismos empregados nos ensaios.....	38
4.1.4.2- Padrões utilizados nos ensaios microbiológicos.....	39

4.1.4.3- Meios de cultura.....	39
4.1.4.4- Preparo das suspensões dos microrganismos (inóculo).....	39
4.1.4.5- Determinação da atividade antimicrobiana pelo método de bioautografia.....	40
4.1.5- Plantas estudadas: <i>Condalia buxifolia</i> e <i>Scutia buxifolia</i>	40
4.1.5.1- <i>Condalia buxifolia</i>	40
4.1.5.1.1- Extração, fracionamento e cromatografia.....	41
4.1.5.1.2- Fração Hexânica da casca do caule.....	42
4.1.5.1.3- Fração acetato de etila da casca da raiz.....	42
4.1.5.2- <i>Scutia buxifolia</i>	42
4.1.6- Metabólitos Isolados e Identificados de <i>Scutia buxifolia</i> Reiss e <i>Condalia buxifolia</i>	45
4.1.6.1- Alcalóides ciclopeptídicos.....	45
4.1.6.1.1- Condalina-A ²⁴ , (22)	45
4.1.6.2- Terpenos.....	46
4.1.6.2.1- Ácido Ursólico, (36)	46
4.1.6.2.2- Lupeol (34).....	47
4.1.6.2.3- Taraxerol (35)	48
4.1.6.3- Esteróides.....	49
4.1.6.3.1- β -sitosterol, (33).....	49
5- APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	50
5.1- Análise fitoquímica.....	50
5.1.1- <i>Condalia buxifolia</i>	50
5.1.1.1- Casca do caule.....	50
5.1.1.1.1- Fração Hexânica.....	51
5.1.1.1.1.1- β -sitosterol ⁴⁵ (33).....	52
5.1.1.1.1.2- Lupeol ⁴³ (34).....	55
5.1.1.1.1.3- Identificação do triterpeno Taraxerol (35) ⁴⁴	60
5.1.1.2- Casca da raiz.....	65
5.1.1.2.1- Fração acetato de etila.....	65
5.1.1.2.2- Identificação do Alcalóide Ciclopeptídico, Condalina ²⁴ (22).....	67
5.1.2- <i>Scutia buxifolia</i> Reiss.....	75

5.1.2.1- Casca da raiz de <i>Scutia buxifolia</i>	75
5.1.2.1.1- Metabólitos isolados e identificados de <i>Scutia buxifolia</i> Reiss.....	76
5.1.2.1.1.1- Metabólitos isolados da fração hexânica.....	76
5.1.2.1.1.1.1- Identificação do triterpeno, ácido ursólico (36).....	77
5.1.2.1.1.2- Metabólitos identificados da fração diclorometano.....	82
5.2- Atividade antimicrobiana.....	84
5.2.1- Determinação da atividade antimicrobiana de <i>Condalia buxifolia</i>	85
5.2.2- Determinação da atividade antimicrobiana de <i>Scutia buxifolia</i>	87
5.2.2.1- Determinação da atividade antimicrobiana dos metabólitos isolados de <i>Scutia buxifolia</i>	87
5.2.3- Determinação da atividade dos alcalóides ciclopeptícos selecionados para comparação estrutura-atividade.....	87
6-CONCLUSÃO	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
APÊNDICE	96

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- (A) RAIZ DE <i>CONDALIA BUXIFOLIA</i> ; (B) PARTE AÉREA DE <i>CONDALIA BUXIFOLIA</i>	20
FIGURA 2- <i>S. BUXIFOLIA</i>	20
FIGURA 3- ESPECTRO DE ^1H DE B-SITOSTEROL (33) EM CDCl_3 A 400.13 MHz.	53
FIGURA 4 - ESPECTRO DE RMN ^{13}C DO B-SITOSTEROL (33), EM CDCl_3 A 100,32 MHz.	53
FIGURA 5- ESPECTRO DE RMN ^1H , A 400, 13 MHz, DO LUPEOL (34) EM CDCl_3	56
FIGURA 6- ESPECTRO DE RMN ^{13}C DO LUPEOL (34), EM CDCl_3 , A 100,32 MHz.....	57
FIGURA 7- ESPECTRO DE RMN DEPT 135° DO LUPEOL (34), EM CDCl_3 , A 100,32 MHz.....	58
FIGURA 8- ESPECTRO DE RMN DE ^1H DO TARAXEROL (35), EM CDCl_3 , 400.13 MHz	61
FIGURA 9- ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DE TARAXEROL (35), EM CDCl_3 , 100.32 MHz.....	62
FIGURA 10- ESPECTRO DPT 135° DE TARAXEROL (35), EM CDCl_3 , 100.32 MHz	63
FIGURA 11- ESPECTRO DE ^1H DE <i>CONDALINA-A</i> (22) EM DMSO, 400.13 MHz.....	68
FIGURA 11.1- ESPANSÃO DO ESPECTRO DE ^1H DE <i>CONDALINA-A</i> (22) EM DMSO, 400.13 MHz.	689
FIGURA 12- ESPECTRO DE RMN 2D, COSY, CORRELAÇÃO ^1H - ^1H , REGIÃO ENTRE 0,5 A 4,0 PPM DE <i>CONDALINA-A</i> (22) EM DMSO, 400.13 MHz.	70
FIGURA 13- ESPECTRO DE RMN 2D, COSY, CORRELAÇÃO ^1H - ^1H , REGIÃO ENTRE 4,0 A 9,0 PPM DE <i>CONDALINA-A</i> (22) EM DMSO, 400.13 MHz.	71
FIGURA 14- ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DE <i>CONDALINA-A</i> (22) EM DMSO, 100.32 MHz.....	72
FIGURA 15- ESPECTRO DE RMN 2D, HMQC, CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C , DE <i>CONDALINA-A</i> (22) EM DMSO, 400.13 MHz.....	73
FIGURA 16- ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE ÁCIDO URSÓLICO (36), EM CDCl_3 , A 400.13MHz.....	78
FIGURA 17- ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DE ÁCIDO URSÓLICO (36), EM CDCl_3 , A 400.13MHz.....	79
FIGURA 18- ESPECTRO DEPT 135° DE ÁCIDO URSÓLICO (36), EM CDCl_3 , A 400.13MHz.	80
FIGURA 19 - QUANTIDADE MÍNIMA (31,2µg) PARA A INIBIÇÃO DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> , SOBRE CCD.	86
FIGURA 20 - QUANTIDADE MÍNIMA (3,12 µg) PARA A INIBIÇÃO DE <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i> , SOBRE CCD.....	86

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- ATIVIDADE BIOLÓGICA DE ALCALÓIDES CICLOPEPTÍDICOS DE 14-MEMBROS	34
TABELA 2- MICRORGANISMOS INDICADORES	38
TABELA 3- MEIOS DE CULTURA	39
TABELA 4- FRAÇÕES OBTIDAS DO FRACIONAMENTO REALIZADO DE <i>C. BUXIFOLIA</i>	42
TABELA 5- CROMATOGRAFIA EM COLUNA DA FRAÇÃO HEXÂNICA DA CASCA DO CAULE DE <i>CONDÁLIA BUXIFOLIA</i>	51
TABELA 6- DADOS DE RMN DE ^{13}C DO B-SITOSTEROL (33) ⁴⁶	54
TABELA 7- DADOS DE RMN DE ^{13}C DE LUPEOL (34).....	59
TABELA 8- DADOS DE RMN DE ^{13}C DO TARAXEROL (35) ⁴⁵	64
TABELA 9- CROMATOGRAFIA EM COLUNA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DA CASCA DA RAIZ DE <i>CONDALIA BUXIFOLIA</i>	66
TABELA 10- DADOS DE RMN DE ^1H ^{13}C DE CONDALINA-A (22).....	74
TABELA 11- CROMATOGRAFIA DA FRAÇÃO HEXÂNICA DE <i>S. BUXIFOLIA</i> DA CASCA DA RAIZ.....	76
TABELA 12- DADOS DE RMN DE ^{13}C DE ÁCIDO URSÓLICO (36).....	81
TABELA 13- ATIVIDADE ANTIMICROBIANA (EM MG) DAS FRAÇÕES DAS CASCA DO CAULE DE <i>CONDALIA BUXIFOLIA</i>	85
TABELA 14- ATIVIDADE ANTIMICROBIANA (EM MG) DAS FRAÇÕES DA CASCA DA RAIZ DE <i>CONDALIA BUXIFOLIA</i>	85
TABELA 15- ATIVIDADE ANTIMICROBIANA (EM MG) DOS METABÓLITOS ISOLADOS DE <i>C. BUXIFOLIA</i>	86
TABELA 16 - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA (EM MG) DAS FRAÇÕES DA CASCA DA RAIZ DE <i>S. BUXIFOLIA</i>	87
TABELA 17- ESTRUTURA DOS ALCALÓIDES UTILIZADOS PARA O ESTUDO DA RELAÇÃO ESTRUTURA- ATIVIDADE.....	88
TABELA 18- RESULTADO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA (EM MG) DOS ALCALÓIDES CICLOPEPTÍDICOS TESTADOS.....	90

LISTA DE ESQUEMA

ESQUEMA 1- ESTRUTURA GERAL DE ALCALÓIDES CICLOPEPTÍDICOS	22
ESQUEMA 2- FRACIONAMENTO DA CASCA DA RAIZ E DA CASCA DO CAULE DE <i>C. BUXIFOLIA</i>	41
ESQUEMA 3: FRACIONAMENTO AO QUAL O EXTRATO METANÓLICO DA CASCA DA RAIZ DE <i>S. BUXIFOLIA</i> FOI SUBMETIDO.....	43

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1- ALCALÓIDES CICLOPEPTÍDICOS IDENTIFICADOS POR CCD DA CASCA DA RAIZ DE <i>SCUTIA</i> <i>BUXIFOLIA</i>	83
--	----

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice 1- Publicação referente ao trabalho realizado durante o desenvolvimento desta Dissertação.....	97
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

δ	Deslocamento químico
<i>J</i>	Constante de acoplamento
λ	Comprimento de onda
μg	Micro grama
ATCC	American Type Culture Collection
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celcius
CC	Cromatografia em Coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CPP	Cromatografia em placa preparativa
CG	Cromatografia gasosa
COSY	Correlated spectroscopy
d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
FDA	Food and Drug Administration
HMQC	Heteronuclear multiple-quantum correlation
Hz	Hertz
m	Multiplete
mg	Miligramas
NPPN	Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais
Pág.	Página
ppm	Parte por milhão
R _f	Fator de retenção
RMN	Ressonância magnética nuclear
s	Singleto
t	Triplete
TMS	Tetrametilsilano
TSA	Trypticase Soy Agar
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
FNH	Fração neutra hexânica

FND	Fração neutra diclorometano
FNAE	Fração neutra acetato de etila
FNA	Fração neutra acetona
FNM	Fração neutra metanólica
NA	Não ativa
UI	Unidades Internacionais

1- INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais teve seu início provavelmente na pré-história. Os homens primitivos, assim como os animais iniciaram as “práticas de saúde” alimentando-se de determinadas plantas. Hoje em dia, vários medicamentos industrializados têm sido desenvolvidos a partir de plantas medicinais, com base nas indicações populares.

A biodiversidade de nossos vegetais constitui uma grande riqueza em potencial para a saúde humana. Apesar disso, somente 1% das espécies vegetais conhecidas da Terra foram estudadas e várias espécies estão desaparecendo do Planeta num ritmo sem precedentes, principalmente devido aos desmatamentos intencionais para a agricultura extensiva, extração de madeira, criação de gado, em áreas que antes eram constituídas por vegetação nativa, além do constante aumento do nível de poluição das águas, solos e ar.

O estudo de plantas medicinais tem seu valor substancial, pois possibilita investigar os constituintes destas e podendo relacioná-las ao uso popular. Dentro disso, o grupo do Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais (NPPN), cujo coordenador é o Professor Dr. Ademir Farias Morel, vem contribuindo não somente para a fitoquímica clássica, ou seja, isolamento e determinação estrutural, mas também realizando trabalhos que envolvem atividade biológica de plantas que apresentam algum tipo de uso na medicina popular.

Plantas da família Rhamnaceae, do gênero *Condalia buxifolia* e *Scutia buxifolia*, que são alvo deste estudo, apresentam uma variada classe de constituintes químicos como alcalóides ciclopeptídicos^{1,2}, ciclopeptídeos³, flavonóides, antocianinas, taninos, esteróides, triterpenos, e saponinas⁴.

O Gênero *Condalia buxifolia* compreende 18 espécies distribuídas em todo o continente Americano, do Norte ao Sul da América⁵. Cinco destas espécies são encontradas na América do Sul, sendo que uma destas se encontra no Brasil⁶. *Condalia buxifolia* Reissek é uma árvore de aproximadamente quatro metros de altura, sendo encontrada no Brasil, Uruguai e Argentina. A figura 2 (a) apresenta a casca da raiz e a figura 2 (b) apresenta a parte aérea da planta. É usada na medicina popular como febrífuga, antiinflamatória e contra disenterias⁷.

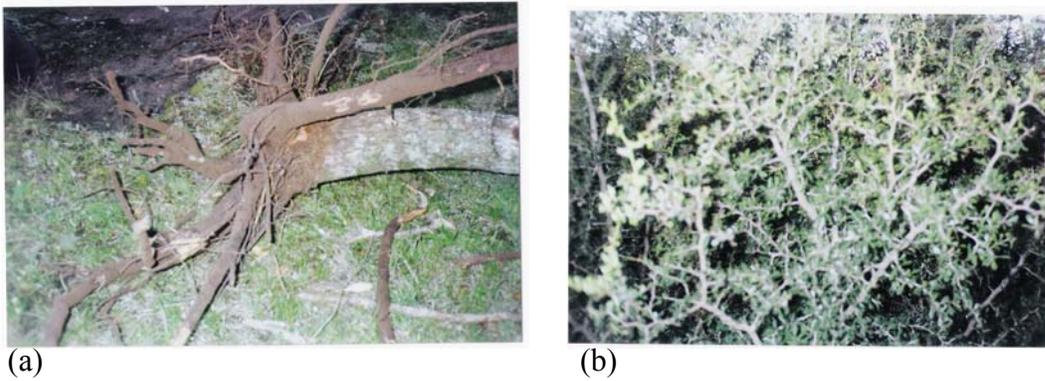


Figura 1- (a) Raiz de *Condalia buxifolia*; (b) Parte aérea de *Condalia buxifolia*

Scutia buxifolia Reiss, pertencente à família Rhamnaceae, é nativa da América do Sul, ocorrendo principalmente no Rio Grande do Sul, Argentina e Uruguai⁸. Conhecida popularmente como coronilha, espinho de touro, canela-de-espinho, laranjeira do mato⁹. É usada popularmente como cardiotônico através da infusão em água da casca do caule.



Figura 2- *Scutia buxifolia*

2-OBJETIVOS

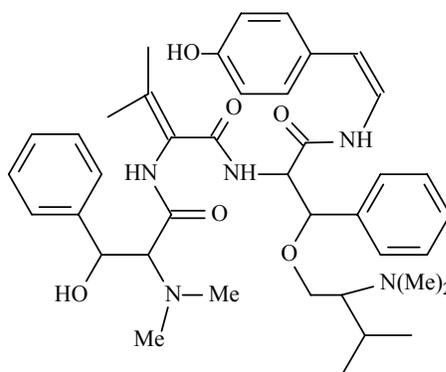
Esta dissertação teve como principais objetivos:

- 1- Analisar os constituintes químicos presentes na casca do caule (estudo este ainda não descrito na literatura) e casca da raiz da espécie *Condalia buxifolia*, pertencente à família Rhamnaceae.
- 2- Analisar os constituintes químicos da casca da raiz da espécie *Scutia buxifolia* (Rhamnaceae), parte da planta ainda não estudada pelo grupo;
- 3- Avaliar a atividade antimicrobiana das frações e metabólitos isolados das duas espécies: *Condalia buxifolia* e *Scutia buxifolia*, e de alcalóides já isolados anteriormente e disponíveis no laboratório, fazendo uma correlação estrutura e atividade antimicrobiana.

3 - REVISÃO DA LITERATURA

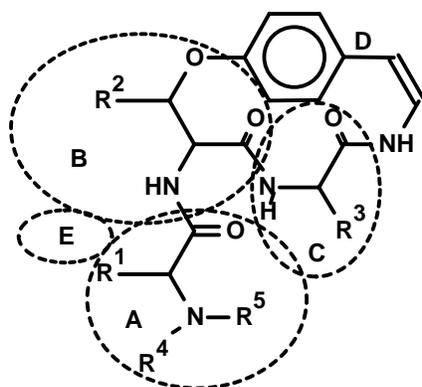
3.1- Alcalóides Ciclopeptídicos

Até o momento, muitos alcalóides ciclopeptídicos têm sido isolados de várias espécies de plantas. O termo alcalóide peptídico foi primeiramente proposto por Goutarel et al¹⁰ em 1964. Mais tarde, Tschesche¹¹ sugeriu a denominação “**alcalóide ciclopeptídico**”, como sendo uma designação mais adequada, considerando que essas bases, com única exceção, lasiodina-A (**1**)¹², apresentam um anel macrociclo em sua estrutura (Esquema 1). Portanto, alcalóides ciclopeptídicos são considerados todos aqueles que possuem um anel macrociclo em sua estrutura. Eles são classificados de acordo com o número de átomos que fazem parte do macrociclo em treze, catorze ou quinze membros.



1

Esquema 1- Estrutura geral de alcalóides ciclopeptídicos

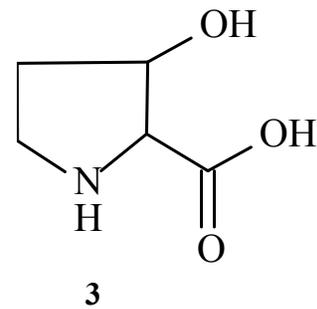
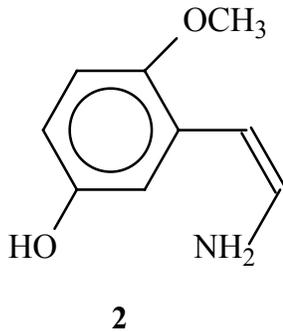


- A = aminoácido terminal básico
- B = *b*-hidróxi aminoácido
- C = aminoácido ligado ao anel
- D = unidade hidróxi etirilamina
- E = aminoácido adicional

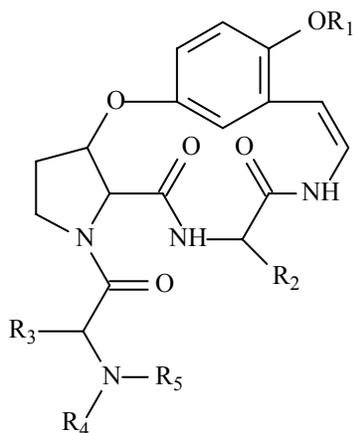
Os alcalóides ciclopeptídicos comuns em plantas da família Rhamnaceae, são também encontrados em outras famílias como: Sterculiaceae, Pandaceae, Rubiaceae, Urticaceae, Hymenocardiaceae, e Celastraceae¹⁰. Eles ocorrem nas folhas, flores, casca da raiz, casca do tronco e sementes, mas são muitas vezes difíceis de serem isolados, por estarem presentes em pequenas quantidades. O rendimento de base, em relação ao material seco da planta, varia de 0,01 a 0,09% e depende de fatores, tais como: método de isolamento, região de crescimento e maturidade da planta¹¹.

3.1.1- Alcalóides Ciclopeptídicos de Treze Membros

Esta classe de alcalóides identifica-se pela presença de uma unidade 2-metóxi-5-hidróxi-estirilamina (**2**). Outro aspecto importante nesse tipo de alcalóide é o grupamento trans-3-hidróxiprolina (**3**), presente como hidróxiaminoácido em todos os compostos do gênero.



Da espécie *Zizyphus sativa* (Rhamnaceae), que é usada na cura de úlceras, podemos citar alcalóides ciclopeptídicos de treze membros como a sativanina H (**4**)¹³. De uma outra espécie, *Zizyphus nummularia*, foi isolado nummularina B (**5**), e nummularina N (**6**)¹³.



Sativanina H(**4**): $R_1 = \text{Me}$, $R_2 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{Me})_2$, $R_3 = \text{CH}(\text{Me})_2$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = \text{COCH}_2\text{NHMe}$

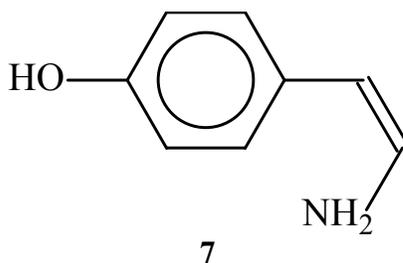
Nummularina B (**5**): $R_1 = \text{Me}$, $R_2 = \text{CH}_2\text{Ph}$, $R_3 = \text{CH}(\text{Me})_2$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = \text{COCH}(\text{NHMe})\text{Me}$

Nummularina N (**6**): $R_1 = \text{Me}$, $R_2 = \text{CH}_2\text{Ph}$, $R_3 = \text{CH}(\text{Me})_2$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = \text{COCH}_2\text{NMe}_2$

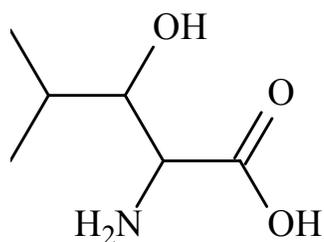
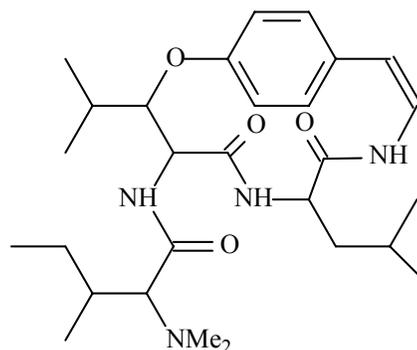
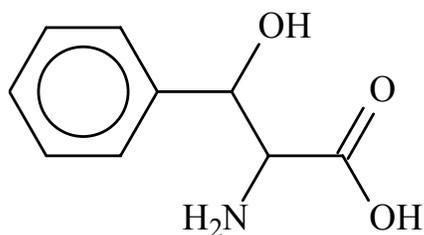
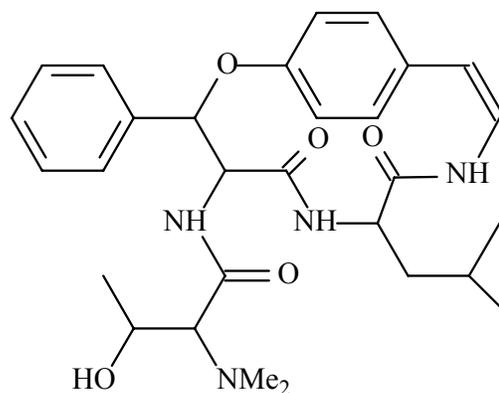
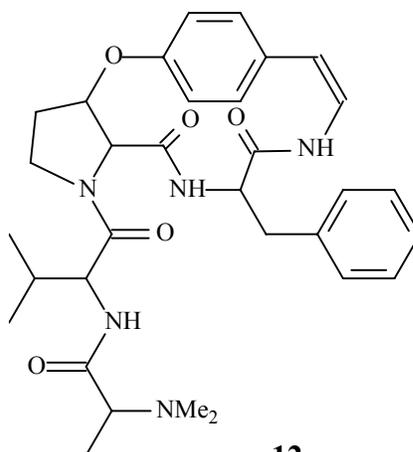
3.1.2- Alcalóides Ciclopeptídicos de Catorze Membros

Este grupo de compostos compreende a maioria dos alcalóides ciclopeptídicos isolados até o momento.

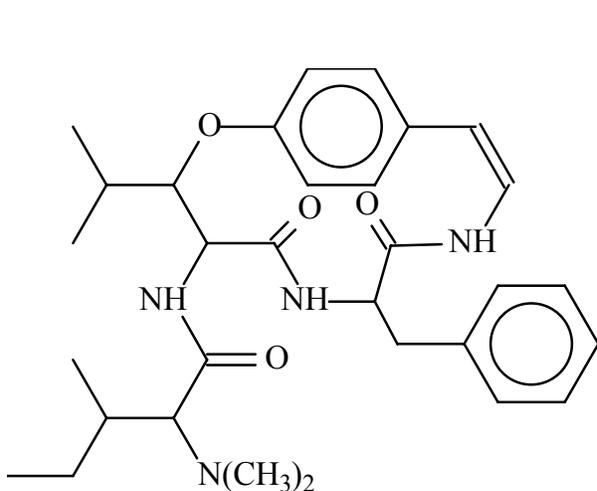
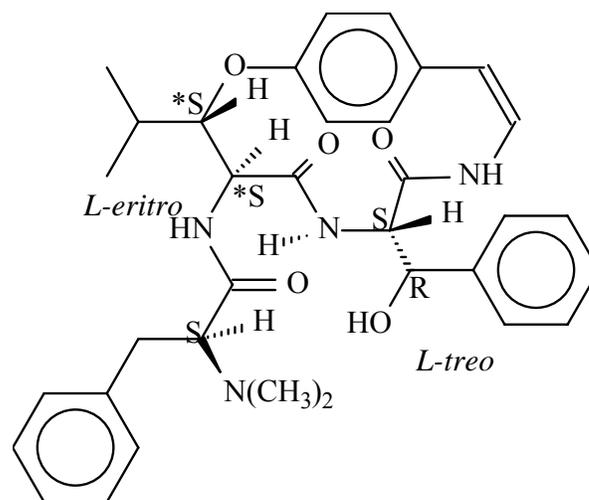
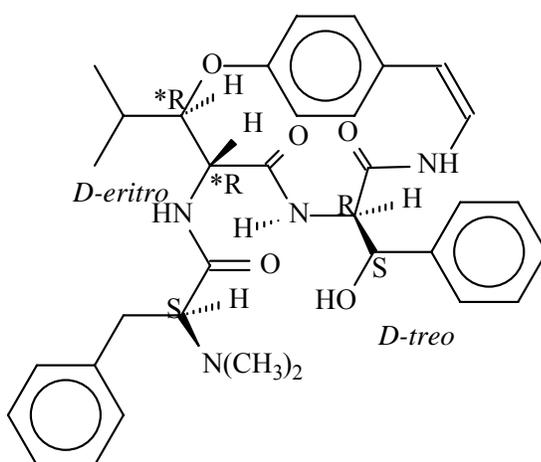
As principais características dessas bases são a presença de um β - hidroxiaminoácido e de uma unidade hidroxiestirilamina (**7**).



Estes alcalóides ciclopeptídicos de catorze membros são subdivididos em três subgrupos, dependendo do tipo do β -hidróximaminoácido do anel: β -hidroxileucina (**8**), nos alcalóides do tipo Frangulanina (**9**)¹⁴, β -hidroxifenilalanina (**10**), nos alcalóides do tipo Nummularina-E (**11**)¹⁵, e trans-3-hidróxiprolina (**3**), nos alcalóides do tipo Mauritina-A(**12**)¹⁶.

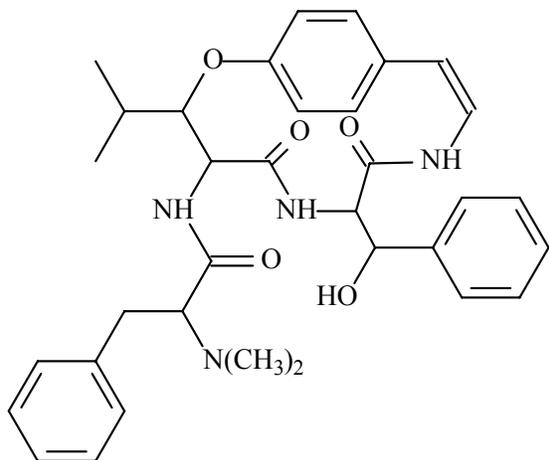
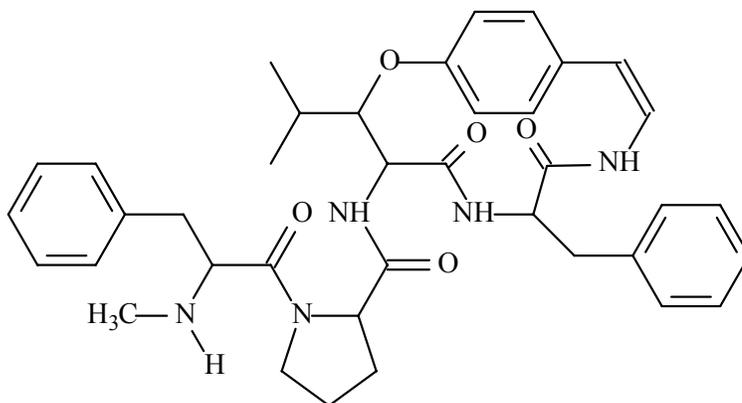
**8****9****10****11****12**

Em 1974, Gonzalez et al.¹⁸ trabalhando com a espécie *Scutia buxifolia* coletada na Argentina, isolaram e determinaram a estrutura de dois alcalóides ciclopeptídicos: Scutianina-C (**14**) e -D (**15**), assim como nesse mesmo ano, Tschesche, R. e Ammermann, R.¹⁹ isolaram da raiz da mesma planta, Scutianina-E (**16**), um diastereoisômero da Scutianina-D (**15**). A estereoquímica da unidade β-hidroxileucina dos diastereoisômeros foi determinada como sendo L-eritro em (**15**) e D-eritro em (**16**), e a unidade β-fenilserina como sendo L-treo em (**15**) e D-treo em (**16**).

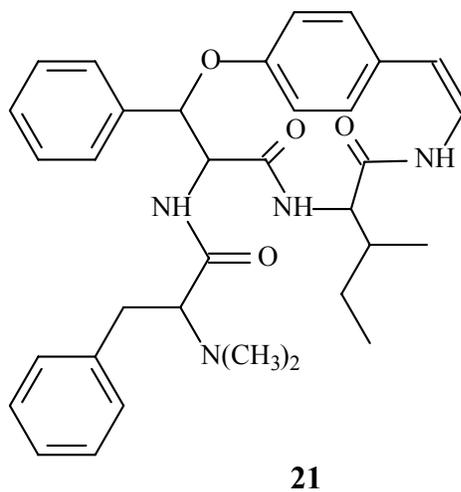
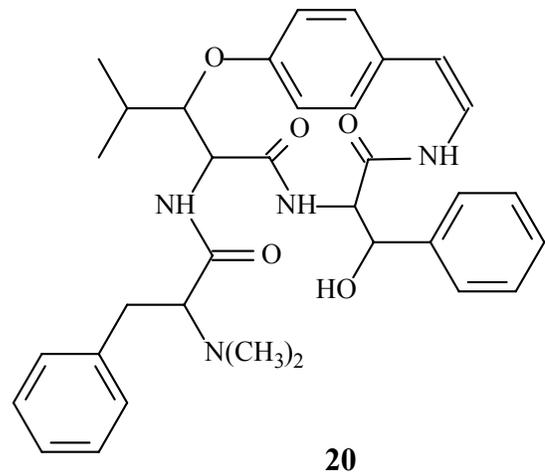
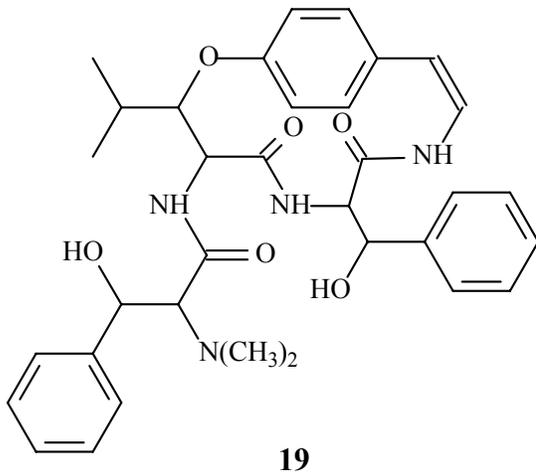
**14****15****16**

Em 1977, Tschesche, R. e Hillebrand, D.²⁰ isolaram da casca do caule de *Scutia buxifolia*, o alcalóide ciclopeptídico Scutianina-G (**17**) que é outro diastereoisômero da Scutianina -D (**15**) e -E (**16**).

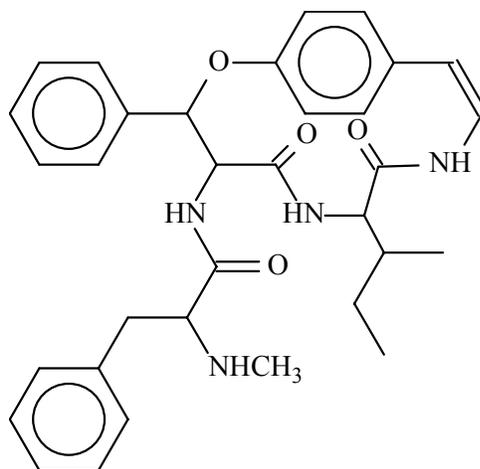
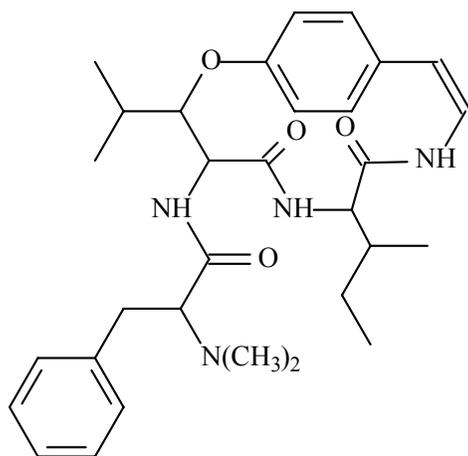
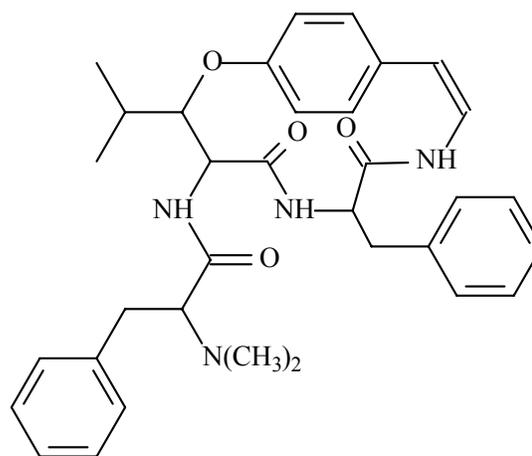
No mesmo ano, Tschesche et al.²¹, continuando o trabalho citado anteriormente, isolaram e determinaram a estrutura da Scutianina-F (**18**).

**17****18**

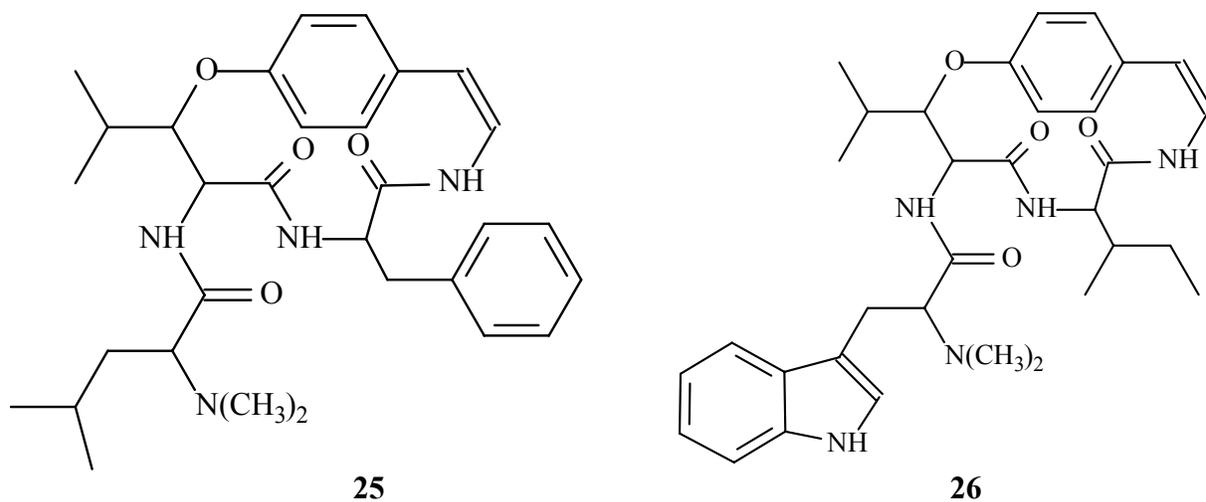
Morel et al. em 1994²², isolaram pela primeira vez de *Scutia buxifolia*, o alcalóide ciclopeptídico denominado Scutianina-J (**19**). A continuação deste estudo pelo grupo, resultou no isolamento e elucidação estrutural de dois novos alcalóides ciclopeptídicos, Scutianina-K (**20**) e – L (**21**)²³.



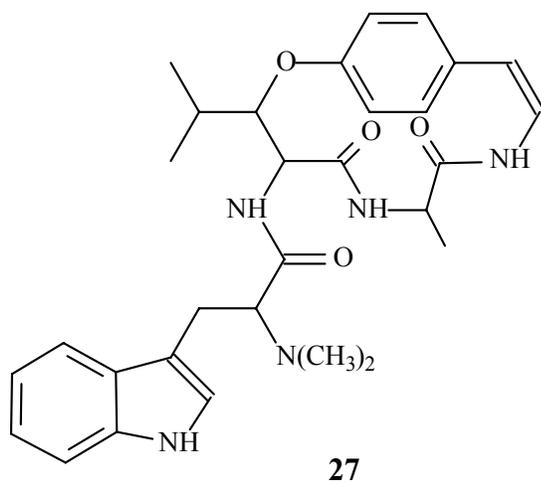
No ano de 2002, Morel et al.²⁴, estudando outra espécie, também pertencente à família Rhamnaceae, *Condalia buxifolia*, coletada no Rio Grande do Sul, resultou no isolamento de um novo alcalóide ciclopeptídico, Condalina-A (**22**), além de três alcalóides já conhecidos, Adoutina Y' (**23**), Scutianina-B (**24**) e Scutianina-C (**14**).

**22****23****24**

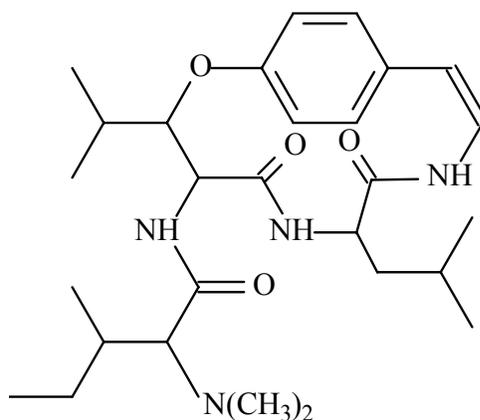
No ano de 1999, Morel et al²⁵, isolaram da espécie *Walteria douradinha* pertencente à família das Esterculiaceae, dois novos alcalóides ciclopeptídicos, Walterina-A (**25**) e Walterina-B (**26**), além de dois alcalóides ciclopeptídicos já conhecidos, Adoutina Y' (**23**) e Scutianina-B (**24**).



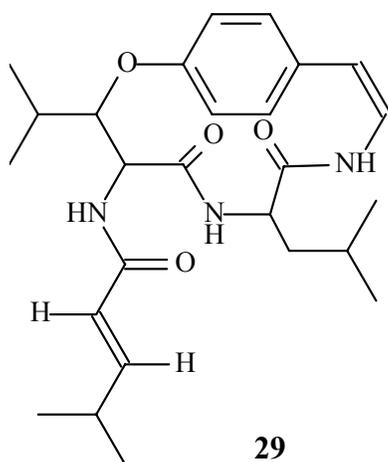
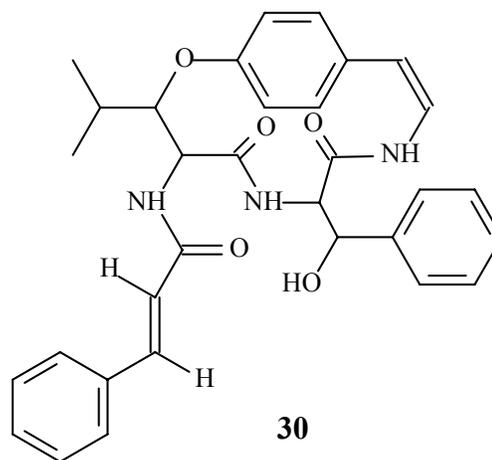
Na continuação do estudo desta mesma espécie, *Walteria douradinha*, em 1999 Morel et al²⁶, isolaram um novo alcalóide ciclopeptídico, Walterina-C (**27**).



Discaria febrífuga, uma outra espécie da família Rhamnaceae, foi estudada por Morel et al¹ em 1995. Estudando a casca da raiz desta espécie, isolou-se um novo alcalóide ciclopeptídico denominado como Discarina-L (**28**).

**28**

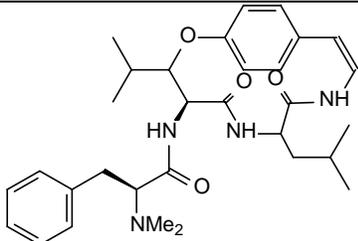
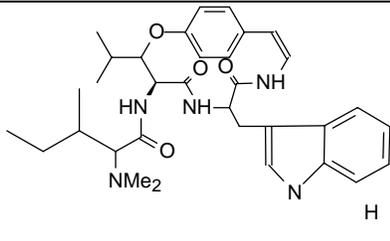
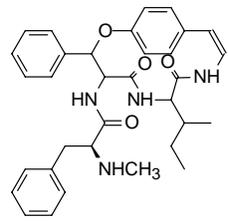
Devido aos vários artigos publicados sobre esta família, demonstrando a presença de alcalóides ciclopeptídicos, Giacomelli et al²⁷, estudaram a espécie *Discaria americana*, da qual isolaram, da casca da raiz, sete alcalóides ciclopeptídicos de estruturas conhecidas e dois ciclopeptídeos neutros, denominados de Discarina-M (**29**) e Discarina-N (**30**).

**29****30**

3.1.4 - Atividade Biológica de Alcalóides Ciclopeptídicos

Cada vez mais, a medicina moderna vem buscando em moléculas de origem natural e de seus derivados, as atividades biológicas necessárias para combater microrganismos causadores de patologias e doenças que assolam a humanidade há séculos. Alcalóides ciclopeptídicos são substâncias que podem apresentar um potencial nesta área. Na Tabela 1 mostrada abaixo, exemplificamos com algumas estruturas de alcalóides ciclopeptídicos de 14-membros, atividades biológicas intrínsecas aos mesmos.

Tabela 1- Atividade biológica de alcalóides ciclopeptídicos de 14-membros

Composto	Frangulanina ²⁹	Discarina-B ²⁷	Condalina-A ²⁴
Estrutura			
Atividades biológicas	Sedativa (<i>in vivo</i>) (3 mg Kg ⁻¹)	Antibacteriana (<i>in vitro</i>) contra <i>Klebsiella pneumoniae</i> (6,75µg)	Antibacteriana (<i>in vitro</i>) contra <i>Staphylococcus epidermidis</i> (3,12 µg)

Segundo a literatura¹⁰, a baixa concentração de alguns alcalóides ciclopeptídicos presentes na planta, é uma das razões pelas quais poucos estudos tenham sido realizados sobre suas propriedades biológicas. Entretanto, o interesse nesta classe de compostos tem aumentado, principalmente devido a atividade demonstrada, principalmente antimicrobiana, de muitos representantes^{11,30,31,32}.

Alguns alcalóides ciclopeptídicos na forma livre ou como sais hidrocloreto, como por exemplo, as Scutianinas -A, -B, -C, -E e Discarina-A, exibiram atividade contra bactérias Gram-positivas *Bacillus subtilis*, sendo que Discarina-A e Scutianina-C mostraram atividade nas concentrações de 200 e 25 µg, respectivamente^{19,27}. Também os alcalóides mauritina-A, -B e -D, na forma de sais hidrocloreto apresentam fraca atividade bacteriana contra o mesmo microrganismo³³.

Condalina-A, Discarina-B, Frangufolina, Nummularina-K e Scutianina-B exibiram uma significativa atividade antibacteriana contra as bactérias Gram-negativas *Klebsiela pneumoniae*, *Escherichia coli* e contra a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus*^{27,34,35}, enquanto que os alcalóides Mucronina-F, -G, -H e Pubescina-A, na forma de seus sais hidrocloreto apresentam boa atividade frente as bactérias *B. subtilis* e *E. coli*²⁸.

Embora exista pouco conhecimento a respeito de suas funções biológicas nas plantas, há evidências de que alcalóides ciclopeptídicos atuem como ionóforos (transportadores de íons) e possam estar envolvidos na absorção de nutrientes do solo, principalmente íons de metais alcalinos³⁶.

3.2- Determinação Estrutural

Para a determinação de suas estruturas, as principais ferramentas atualmente utilizadas são: espectrometria de massas (MS) e a espectroscopia RMN. Técnicas auxiliares como a espectroscopia no IV e UV, juntamente com reações de degradações químicas, também podem ser utilizadas.

A utilização da técnica de Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e ¹³C é indispensável nas determinações estruturais de alcalóides ciclopeptídicos. Estas já demonstraram ser valiosas para identificação e determinação da estrutura de alcalóides ciclopeptídicos, bem como, para definir a configuração relativa de β-hidroxiácidos³⁷, principalmente após o surgimento das técnicas bidimensionais (2D) homonucleares e heteronucleares, tais como: COSY, NOESY, HMQC e HMBC, etc.

Além de informações sobre a fórmula constitucional, as análises de RMN também fornecem valiosas informações quanto a aspectos estereoquímicos e conformacionais.

A aplicação da difração de Raio-X também é um método auxiliar de grande importância na elucidação estrutural, principalmente em análises conformacionais e configuracionais. Um dos problemas encontrados para a utilização desta ferramenta, é a dificuldade em se obter cristais ideais. Normalmente são substâncias amorfas, ou que formam cristais em forma de agulhas muito finos e pequenos para a cristalografia.

A cromatografia gasosa enantiosseletiva tem sido uma ferramenta utilizada com muito sucesso na determinação da estereoquímica absoluta das unidades dos aminoácidos participantes das estruturas de alcalóides ciclopeptídicos³⁸. Até o momento, apenas o hidroxiaminoácido

participante do macrociclo não pôde ser analisado por esta ferramenta, devido à decomposição que esta unidade sofre durante o procedimento de hidrólise ácida. Nosso grupo de pesquisa é pioneiro na utilização desta técnica cromatográfica na resolução da estereoquímica absoluta de vários alcalóides ciclopeptídicos isolados no grupo³⁸.

4- PARTE EXPERIMENTAL

4.1- Procedimentos experimentais gerais

4.1.1- Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de ressonância magnética nuclear uni e bidimensional foram realizados em espectrômetro Bruker DPX-400 operando a 400.13 MHz para ^1H e 100.32 MHz para ^{13}C , realizados em tubos de 5 mm de diâmetro a 300K.

Os deslocamentos químicos (δ) são medidos em ppm em relação a um padrão interno de Me_4Si ($\delta = 0$) para espectros de hidrogênio e nos espectros de ^{13}C o próprio solvente serve para este fim (CDCl_3 ($\delta = 77$) ou DMSO-d_6 ($\delta = 39,5$)).

Os espectros 2D Homonuclear (**COSY**) e Heteronuclear (**HMQC**) foram realizados conforme os parâmetros de aquisição fornecidos pelo aparelho e processados pelo *software* XwinNmr 1.3 da Bruker.

4.1.2- Aparelho de ponto de fusão

Os valores dos pontos de fusão (não corrigidos) das substâncias foram determinadas em um aparelho MQAPF-301 da Microquímica.

4.1.3- Materiais e Métodos Cromatográficos

4.1.3.1- Cromatografia em Coluna

A cromatografia em coluna (CC) foi realizada com sílica gel (70-230 Mesh), produzida pela Merck, e eluída por solventes puros ou sistemas de gradientes; sendo este o método utilizado para realizar uma primeira filtração das frações e posterior realização de cromatografia em placa preparativa (CPP).

4.1.3.2- Cromatografia em Placa Preparativa (CPP)

As placas preparativas foram obtidas pela deposição, em placa de vidro de 20 cm², de uma camada de 0,75 mm de sílica gel 60 GF₂₅₄ (marca Merck) em água.

4.1.3.3- Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A técnica de cromatografia em camada delgada do tipo ascendente foi realizada em cromatoplasmas comerciais de sílica gel 60 GF₂₅₄ e utilizada a título de acompanhamento das cromatografias em coluna e avaliação do grau de pureza das substâncias isoladas.

A detecção dos componentes sucedeu-se através da irradiação por luz UV ($\lambda = 254$ e 365 nm) e detecção direta com reagentes específicos como: reagente de Dragendorff, modificado segundo Munier e Machebouf³⁹ (seletivo para alcalóides e nitrogênios substituídos), solução de ácido sulfúrico e álcool etílico (10:90) seguido de aquecimento.

4.1.4- Atividade antimicrobiana *in vitro*

4.1.4.1- Microrganismos empregados nos ensaios

Utilizaram-se cepas padrão da American Type Culture Collection (ATCC), constituídas de microrganismos Gram-positivos, Gram-negativos e fungos conforme Tabela 2.

Tabela 2- Microrganismos indicadores

Microrganismos		
Gram-negativos	Gram-positivos	Fungos
<i>Escherichia coli</i> 11103	<i>Staphylococcus aureus</i> 6538p	<i>Candida albicans</i> 10231
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 10031	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Salmonella setubal</i> 19196	12228	2601

4.1.4.2- Padrões utilizados nos ensaios microbiológicos

As substâncias utilizadas como padrões foram as seguintes: Cloranfenicol para bactérias, potência (978.9 UI/mg); Nistatina para fungos, potência (2464.38 UI /mg), padrões primários da USP, que foram preparados conforme FDA⁴⁰.

4.1.4.3- Meios de cultura

Os respectivos meios foram pesados, dissolvidos em água destilada, fervidos e esterilizados em autoclave a 121°C por vinte minutos. Após a esterilização, os tubos foram mantidos inclinados até a sua solidificação.

As cepas dos microrganismos foram repicadas a cada 15 dias, em tubos de ensaios contendo de 5-8,0 mL de Ágar simples para bactérias e Ágar Sabouraud para fungos, sendo os mesmos incubados a 37 °C de 24-48 horas (Tabela 3).

Tabela 3- Meios de cultura

Meios de Cultura			
Ágar simples		Ágar sabouraud	
Caldo Nutriente	8,0 g	Peptona	10,0 g
Ágar-ágar	15,0 g	Dextrose	40,0 g
Água destilada	1.000,0 mL	Ágar-ágar	15,0 g
		Água destilada	1.000,0 mL

Para as análises de atividade nas amostras em estudo foi utilizado o meio de cultura Ágar Mueller-Hinton. De acordo com instruções do fabricante, reidratou-se 38,0 g em água destilada, esterilizando em seguida em autoclave a 120°C por quinze minutos.

4.1.4.4- Preparo das suspensões dos microrganismos (inóculo)

Os microrganismos utilizados foram mantidos em tubos de ensaios inclinados contendo de 5-8,0 mL de meio ágar nutriente inclinado. Para o desenvolvimento dos ensaios foram efetivadas novas culturas, em tubos com os mesmos meios por 24 horas à temperatura de 32-35 °C.

4.1.4.5- Determinação da atividade antimicrobiana pelo método de bioautografia

O ensaio de determinação da atividade antimicrobiana pelo método de bioautografia foi realizado de acordo com Rahalison e colaboradores⁴¹. Para a realização deste, foram utilizadas placas de Petri, onde foram depositadas as cromatoplacas com as amostras a serem analisadas. Em seguida, foram adicionadas 10,0 mL de meio de cultura inoculado com o microrganismo indicador sobre as cromatoplacas. Após a solidificação do meio, as placas foram incubadas por uma noite a 37 °C. Decorrido o período de incubação, as cromatoplacas foram reveladas com uma solução aquosa de sal de tetrazóleo (20,0 mg / mL), e incubadas por um período entre 2 a 4 horas a 37 °C.

Foram testadas as atividades antimicrobianas das frações e das substâncias isoladas, contra bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*; bactérias Gram-negativas *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella setubal*, *Escherichia coli*; fungos *Cândidas albicans* e *Sacaromices cerevisae* foram determinados por este método⁴². Os microrganismos usados para os ensaios antimicrobianos foram conservados no Laboratório de Microbiologia do Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais (NPPN) do Departamento de Química da UFSM. Para os ensaios das substâncias isoladas foram testadas as seguintes concentrações: 100,0; 50,0; 25,0; 12,5; 6,25 e 3,12 µg, enquanto que para as frações as concentrações foram de 500,0; 250,0; 125,0; 62,5, 31,2µg, aplicados em cromatoplacas.

4.1.5- Plantas estudadas: *Condalia buxifolia* e *Scutia buxifolia*

4.1.5.1- *Condalia buxifolia*

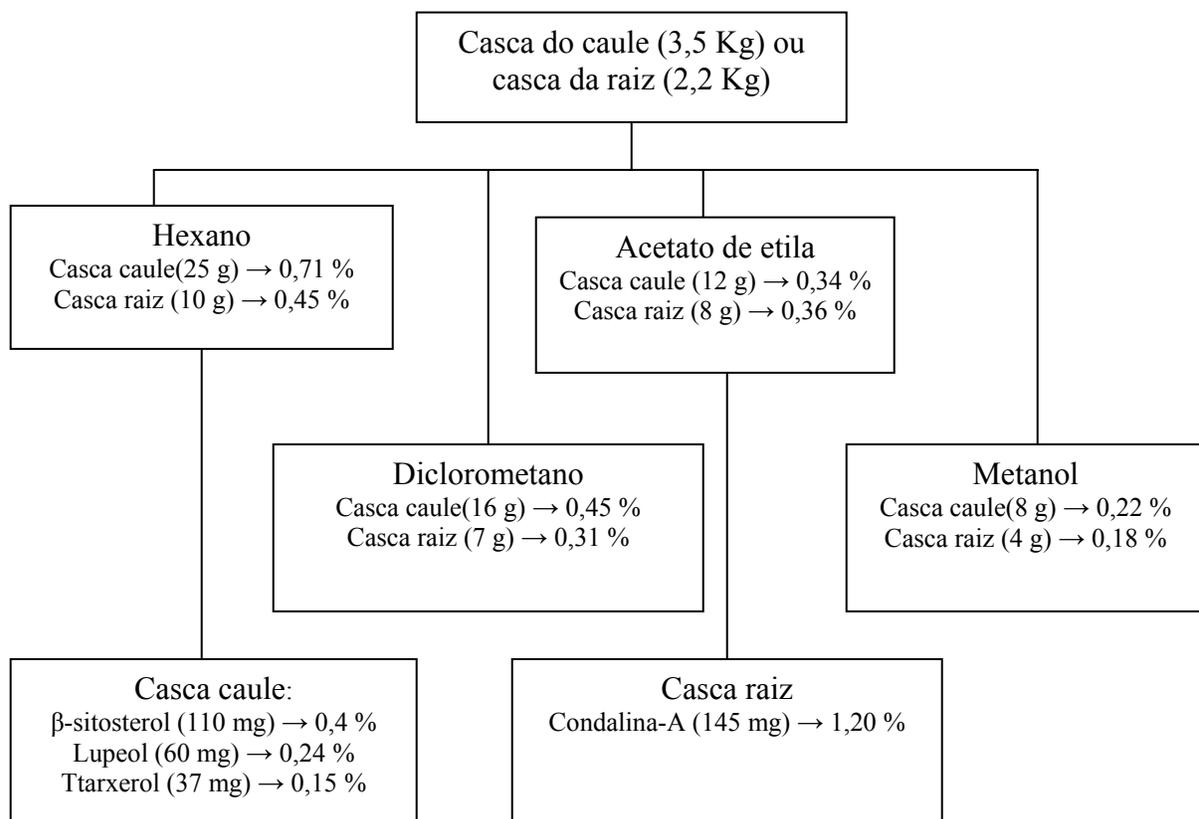
A espécie *Condalia buxifolia* foi coletada no mês de setembro de 2003, no interior do município de Caçapava do Sul no Rio Grande do Sul. A identificação do material botânico foi realizada através de comparação com amostra já existente no Herbário do Departamento de Botânica – UFSM, sob número SMDB 3296.

4.1.5.1.1- Extração, fracionamento e cromatografia

A casca da raiz (2,2 Kg) e a casca do caule (3,5 Kg) de *Condalia buxifolia* foram secas sob a ação da luz a uma temperatura de 50°C, moídas a fino grão em moinho Wiley. Este material seco foi extraído à quente sob refluxo, com solvente em ordem crescente de polaridade (hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol).

O Esquema 2 a seguir mostra o fracionamento do pó da casca da raiz e da casca do caule.

Esquema 2- Fracionamento da casca da raiz e da casca do caule de *C. buxifolia*



A Tabela 4 apresenta as quantidades das frações obtidas do pó da casca da raiz e da casca do caule da espécie *Condalia Buxifolia*.

Tabela 4- Frações obtidas do fracionamento realizado de *C. buxifolia*

Frações	Casca da Raiz	Casca do Caule
Fração hexânica	10 g	25 g
Fração diclorometano	7 g	16 g
Fração acetato de etila	5 g	12 g
Fração metanólica	4 g	8 g

4.1.5.1.2- Fração Hexânica da casca do caule

A fração hexânica resultante do fracionamento da casca do caule foi cromatografada em coluna de sílica gel (70-230 mesh), isolando-se três metabólitos: β -sitosterol (**33**), lupeol (**34**) e taraxerol (**35**).

4.1.5.1.3- Fração acetato de etila da casca da raiz

Da fração acetato de etila, resultante do fracionamento da casca da raiz de *C. buxifolia*, foi isolado o alcalóide ciclopeptídico condalina-A (**22**).

4.1.5.2- *Scutia buxifolia*

A espécie vegetal *Scutia buxifolia* (casca da raiz) foi coletada em março de 2003 no município de Santana do Livramento no estado do Rio Grande do Sul. A identificação do material botânico foi através de comparação com a amostra já existente no Herbário do Departamento de Botânica - UFSM, registrada sob o número SMBD 146.

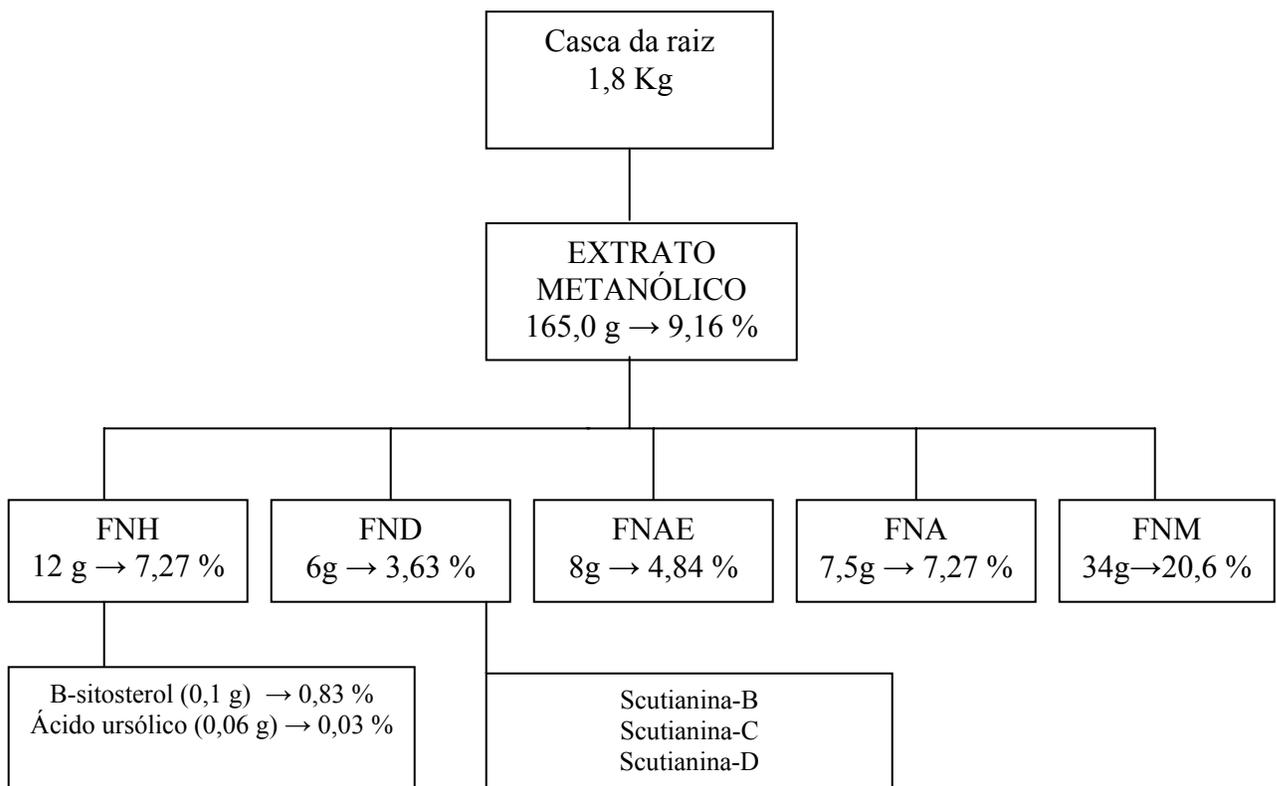
4.1.5.2.1- Casca da raiz

4.1.5.2.1.1- Extração, fracionamento e cromatografia

A casca da raiz de *S. buxifolia* coletada em Santana do Livramento, foi seca em estufa à temperatura controlada (50°C), moída a fino grão em moinho Wiley, obtendo-se 1,8 Kg. Este material foi extraído com metanol à quente em aparelho de Soxhlet. O solvente foi evaporado à pressão reduzida em evaporador rotativo, obtendo-se assim o extrato bruto metanólico (165 g).

Optou-se, devido à formação de emulsões, por se fazer um fracionamento neutro do extrato bruto (Esquema 3), porém com Soxhlet a quente, utilizando solventes em ordem crescente de polaridade como hexano, diclorometano, acetato de etila, acetona e metanol. Após a evaporação do solvente obtiveram-se as respectivas frações neutras: fração neutra hexânica (FNH), fração neutra diclorometano (FND), fração neutra acetato de etila (FNAE), fração neutra acetona (FNA) e fração neutra metanólica (FNM).

Esquema 3: Fracionamento ao qual o extrato metanólico da casca da raiz de *S. buxifolia* foi submetido



4.1.5.2.1.2- Fração Hexânica

Da fração hexânica, resultante do fracionamento da casca da raiz de *S. buxifolia*, foram isolados dois metabólitos: β -sitosterol (**33**) e ácido Ursólico (**36**).

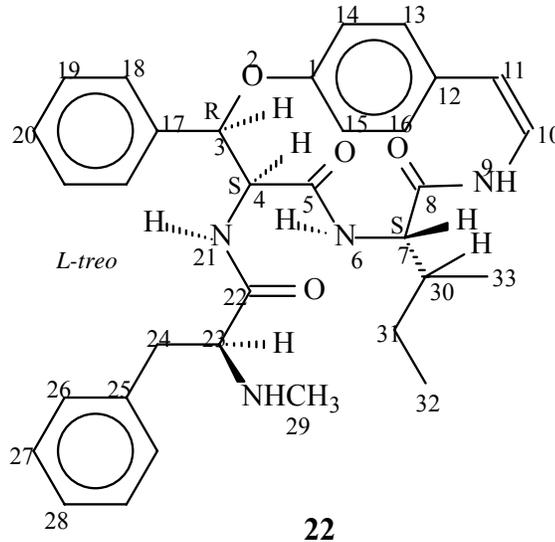
4.1.5.2.1.3- Fração Diclorometano

A fração diclorometano foi submetida apenas à análise de CCD comparativa, utilizando-se amostras autênticas de Scutianina-B (**24**), -C (**14**), -D (**15**) e -E (**16**). Pôde-se identificar por esta comparação a presença dos alcalóides ciclopeptídicos Scutianina-B (**24**), -C (**14**) e -D (**15**).

4.1.6- Metabólitos Isolados e Identificados de *Condalia buxifolia* e *Scutia buxifolia*

4.1.6.1- Alcalóides ciclopeptídicos

4.1.6.1.1- Condalina-A²⁴, (22)



Dados de RMN de ¹H em ppm a 400,13 MHz, em DMSO: δ 5,75 (s, H-3), 4,69 (d, $J_{4,21} = 9,2$, H-4), 8,03 (d, $J_{6,7} = 9,0$, H-6), 3,95 (dd, $J_{7,6} = 9,0$, $J_{7,30} = 4,4$, H-7); 8,49 (NH-9), 5,96 (d, $J_{10,11} = 7,3$; $J_{10,9} = 9,0$, H-10), 6,74 (d $J_{11,10} = 7,24$, H-11), 7,00 (H-13), 6,93 (H-14), 7,14(H-15), 6,91 (H-16), 7,58 (H-18), 7,34 (H-19), 7,24 (H-20), 8,76 (d, $J_{21,4} = 9,3$, H-21), 3,85 (dd, $J_{23,24} = 5,6$; $J_{23,24'} = 13,6$, H-23), 3,02 (H-24), 7,0-7,5 (H-26 – H-28), 1,89 (s, H-29), 1,33 (m, H-30), 0,92/1,29 (m, H-31), 0,78 (d, $J_{33,30} = 6,5$, H-32), 0,75 (t, $J_{32,33} = 6,5$, H-33).

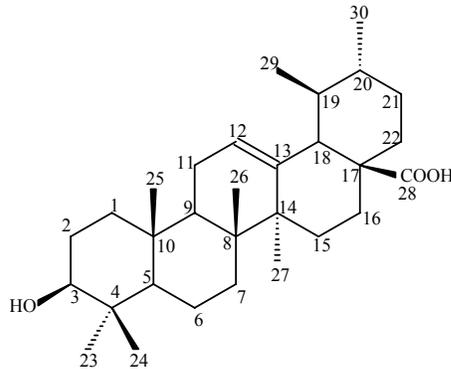
Dados de RMN de ¹³C em ppm a 100,62 MHz, em DMSO: δ 159,2 (C-1), 86,0 (C-3), 56,0 (C-4), 166,7 (C-5), 57,2 (C-7), 168,4 (C-8), 131,9 (C-10), 127,3 (C-11), 132,8 (C-12), 130,0 (C-13), 125,0 (C-14), 120,2 (C-15), 122,2 (C-16), 139,9 (C-17), 126,5 (C-18), 127,9 (C-19), 127,6 (C-20), 173,0 (C-22), 63,0 (C-23), 38,4 (C-24), 137,0 (C-25), 129,0 (C-26), 129,8 (C-27), 36,9 (C-29), 33,6 (C-30) 24,7 (C-31), 15,6 (C-32), 11,1 (C-33).

Pf: 216-218°C

Rf: 0,75 (CHCl₃-MeOH 97:3)

4.1.6.2- Terpenos

4.1.6.2.1- Ácido Ursólico⁴³, (33)



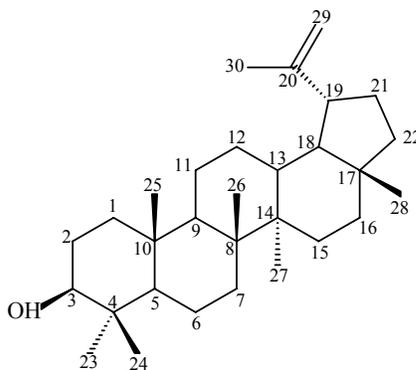
33

Dados de RMN ¹H em ppm a 400,13 MHz, CDCl₃: δ 3,14 (1H, dd, *J*= 6,0, 10,6, H-3), 5,17 (1H, t, H-12), 2,16 (1H, d, *J*= 11,5, H-18), 1,81 (1H, dd, *J*= 6,0, 6,41, H-19), 0,67, 0,78, 0,85, 0,88, 0,91, 0,95, 1,0, (3H, CH₃-23, -24, -25, -26, -27, -29, -30), 1,06-1,85 (m, outros hidrogênios).

Dados de RMN ¹³C em ppm a 100,62 MHz, CDCl₃: δ 38,6 (C-1), 27,2 (C-2), 78,9 (C-3), 38,7 (C-4), 55,2 (C-5), 18,2 (C-6), 32,9 (C-7), 39,4 (C-8), 47,1 (C-9), 36,9 (C-10), 23,2 (C-11), 125,5 (C-12), 138,1 (C-13), 41,9 (C-14), 28,0 (C-15), 24,2 (C-16), 47,0 (C-17), 52,8 (C-18), 38,8 (C-19), 39,0 (C-20), 30,6 (C-21), 36,6 (C-22), 28,1 (C-23), 15,5 (C-24), 15,4 (C-25), 16,8 (C-26), 23,5 (C-27), 180,0 (C-28), 16,9 (C-29), 21,1 (C-30).

Pf: 294-296°C

Rf: 0,22 (Hexano-Acetato de Etila 75:25)

4.1.6.2.2- Lupeol⁴⁴ (34)

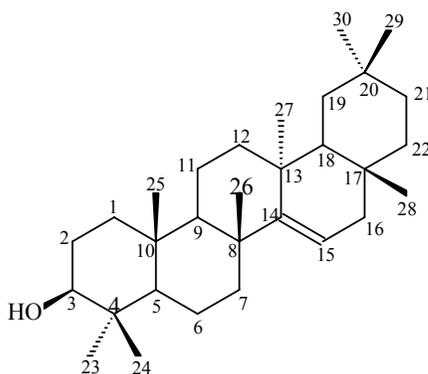
34

Dados de RMN de ^1H em ppm a 400.13 MHz, CDCl_3 : δ 3,16 (1H, dd, $J= 4,9, 5,0$, H-3), 1,89 (1H, m, H-13), 2,35 (1H, m, H-19), 0,73, 0,76, 0,80, 0,91, 0,94, 0,95, 1,01, 1,65 (3H, s, CH_3 -23, -24, -25, -26, -27, -28, -30), 4,53/4,65 (2H, s, H-29, -29'), 0,64-1,62 (m, outros hidrogênios).

Dados de RMN de ^{13}C em ppm a 100.62 MHz, CDCl_3 : δ 38,8 (C-1), 27,4 (C-2), 78,9 (C-3), 38,8 (C-4), 55,2 (C-5), 18,1 (C-6), 34,3 (C-7), 40,8 (C-8), 50,4 (C-9), 37,2 (C-10), 20,9 (C-11), 25,2 (C-12), 37,9 (C-13), 42,8 (C-14), 27,4 (C-15), 35,5 (C-16), 42,9 (C-17), 48,3 (C-18), 47,9 (C-19), 150,8 (C-20), 29,6 (C-21), 40,0 (C-22), 27,9 (C-23), 15,4 (C-24), 16,0 (C-25), 15,4 (C-26), 15,4 (C-27), 18,3 (C-28), 109,3 (C-29), 19,2 (C-30).

Pf: 216-217 °C

Rf: 0,42 (Hexano-acetato de etila 90:10)

4.1.6.2.3- Taraxerol⁴⁵ (35)

35

Dados de RMN de ^1H em ppm a 400.13 MHz, CDCl_3 : δ 3,19 (1H, $J=9,3$, H-3), 0,77 (1H, H-5), 2,04 (1H, m, H-7), 1,03 (1H, $J=4,3$, H-9), 5,53 (1H, dd, $J=3,0, 5,1$, H-15), 1,64/1,89 (1H, dd, $J=3,0, 5,1$, H-15), 1,64/1,89 (2H, dd, $J=2,4, 12,2$, H-16), 0,80, 0,82, 0,90, 0,91, 0,92, 0,95, 0,97, 1,09 (3H, s, CH_3 -23, -24, -25, -26, -27, -28, -29, -30), 1,22-1,66 (m, outros hidrogênios).

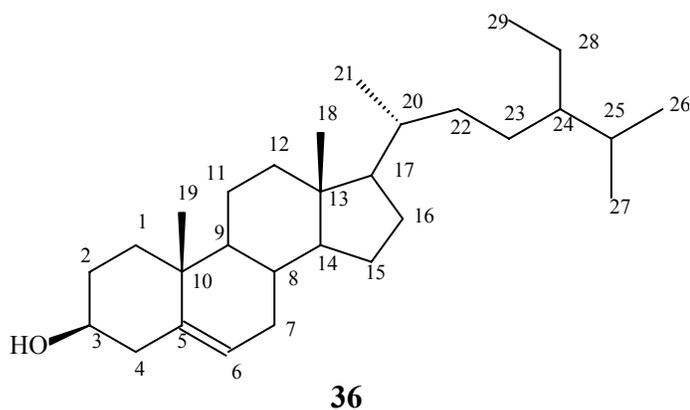
Dados de RMN de ^{13}C em ppm a 100.62 MHz, CDCl_3 : δ 37,7 (C-1), 27,1 (C-2), 79,0 (C-3), 38,9 (C-4), 55,5 (C-5), 18,8 (C-6), 35,1 (C-7), 38,7 (C-8), 48,9 (C-9), 37,7 (C-10), 17,5 (C-11), 35,1 (C-12), 37,5 (C-13), 158,1 (C-14), 116,8 (C-15), 36,9 (C-16), 38,0 (C-17), 49,3 (C-18), 40,9 (C-19), 28,8 (C-20), 33,7 (C-21), 33,1 (C-22), 28,0 (C-23), 15,4 (C-24), 15,4 (C-25), 29,9 (C-26), 25,9 (C-27), 29,9 (C-28), 33,3 (C-29), 21,5 (C-30).

Pf: 279-281 °C

Rf: 0,57 (CH_2Cl_2 -MeOH 90:10)

4.1.6.3- Esteróides

4.1.6.3.1- β -sitosterol⁴⁶, (36)



Dados de RMN de ^1H em ppm a 400.13 MHz, CDCl_3 : δ 3,51 (1H, m, H-3), 0,68, 0,80, 0,84, 0,86, 0,96, 1,0 (3H, CH_3 -18, -19, -21, -27, -29), 5,34 (1H, d, H-6), 0,91-2,31 (m, outros hidrogênios).

Dados de RMN de ^{13}C em ppm a 100.62 MHz, CDCl_3 : δ 37,3 (C-1), 31,5 (C-2), 71,7 (C-3), 42,3 (C-4), 140,8 (C-5), 121,7 (C-6), 31,9 (C-7), 31,7 (C-8), 50,1 (C-9), 36,5 (C-10), 21,1 (C-11), 39,8 (C-12), 42,3 (C-13), 56,8 (C-14), 24,3 (C-15), 28,2 (C-16), 56,1 (C-17), 11,8 (C-18), 18,8 (C-19), 36,1 (C-20), 19,0 (C-21), 34,0 (C-22), 26,1 (C-23), 45,9 (C-24), 29,2 (C-25), 19,8 (C-26), 19,4 (C-27), 23,1 (C-28), 12,0 (C-29).

Pf: 138-140 °C

Rf: 0,65 (HCCl_3 -MeOH 95:05)

5- APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Neste capítulo, duas espécies de plantas pertencentes à família Rhamnaceae, serão discutidas quanto à sua composição química, e atividade biológica, neste caso antimicrobiana, das frações e dos metabólitos isolados e identificados.

Os resultados, seguidos de discussão, serão apresentados na seguinte ordem:

- a) composição química das cascas do caule e cascas da raiz de *Condalia buxifolia*;
- b) composição química da casca da raiz de *Scutia buxifolia*;
- c) análise da atividade antimicrobiana, pelo método de bioautografia, das frações e metabólitos isolados e de alguns já existentes no laboratório, discutindo a relação estrutura atividade existente entre os alcalóides ciclopeptídicos e ciclopeptídeo neutro analisados.

5.1- Análise fitoquímica

5.1.1- *Condalia buxifolia*

5.1.1.1- Casca do caule

A escolha pelo estudo das cascas do caule desta planta se deve a que nenhum estudo havia sido feito anteriormente desta parte da planta. Para isso, foram coletadas as cascas do caule da planta, cujo tratamento fitoquímico está descrito na parte experimental.

As frações obtidas do fracionamento foram analisadas em CCD, lâmpada UV_{254nm} e UV_{365nm} e revelada com ácido sulfúrico/etanol (10:90 v/v) seguido de aquecimento. Optou-se por trabalhar com a fração hexânica primeiramente, pois se observou uma melhor separação, em CCD, dos metabólitos encontrados nesta fração. A fração diclorometano foi cromatografada em coluna cromatográfica, porém, devido à dificuldade encontrada em se isolar seus metabólitos por esta técnica, não foi analisada. A fração acetato de etila também não foi analisada, pois a análise em CCD não mostrou boa resolução.

5.1.1.1.1- Fração Hexânica

Esta fração (25 g), foi submetida à cromatografia em coluna, utilizando-se sílica gel 60 (70-230 Mesh) como fase estacionária, e hexano-clorofórmio-metanol como sistema eluente, em várias concentrações, aumentando a polaridade gradativamente.

Frações de 30 mL foram coletadas em frascos de vidro e analisadas individualmente em CCD conforme suas semelhanças em Rfs, resultando em novas frações que estão relatadas na Tabela 5.

Todas as frações obtidas não se apresentavam puras, sendo estas submetidas a novos processos de purificação, através de recristalização ou separação em placas preparativas. Foi possível o isolamento de uma série de metabólitos conhecidos, tais como lupeol⁴³ (**34**), taraxerol⁴⁵ (**35**) e β -sitosterol⁴⁶ (**36**). Apesar de β -sitosterol e lupeol serem de ocorrência comum em plantas, estão sendo descritos pela primeira vez nas casca do caule de *C. buxifolia*.

Os sistemas de solventes mais utilizados em CCD e placas preparativas foram os mesmos utilizados na cromatografia em coluna (Tabela 5).

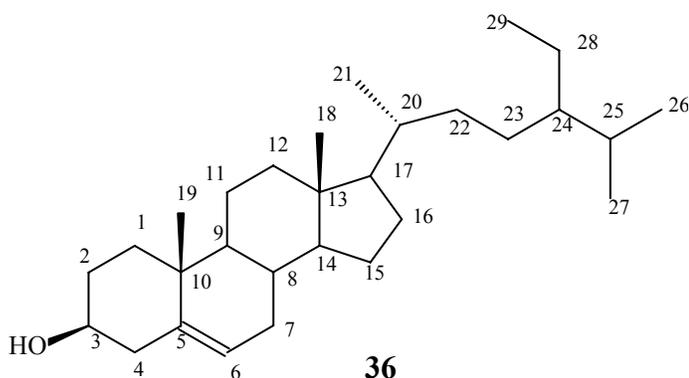
Tabela 5- Cromatografia em coluna da fração hexânica da casca do caule de *Condalia Buxifolia*

Fração	Sistema de solvente	Substância	Peso
I	Hexano	Mistura de substâncias	600 mg
II	Hexano: CHCl ₃ (80:20)	Mistura de substâncias	60 mg
III	Hexano: CHCl ₃ (50:50)	Mistura de substâncias	40 mg
IV	CHCl ₃	Mistura de substâncias	250 mg
V	CHCl ₃ : MeOH (95:05)	Mistura de substâncias	180 mg
VI	CHCl ₃ : MeOH (90:10)	Mistura de substâncias	70 mg
VII	CHCl ₃ : MeOH (80:20)	β -sitosterol + impurezas	140 mg
VIII	CHCl ₃ : MeOH (70:30)	Lupeol + Taraxerol	130 mg
IX	CHCl ₃ : MeOH (60:40)	Mistura de substâncias	300 mg
X	CHCl ₃ : MeOH (50:50)	Mistura de substâncias	275 mg

As estruturas destas substâncias foram elucidadas a partir dos dados obtidos por análises espectroscópicas de RMN de ^1H e ^{13}C e experimento de DEPT 135° , e comparação com os registros na literatura para essas substâncias, que foram fundamentais para a confirmação de suas estruturas.

5.1.1.1.1- β -sitosterol⁴⁶ (36)

O metabólito **36** (110 mg), foi obtido como um sólido branco, da fração hexânica da casca do caule de *C. buxifolia*, da sub-fração VII (Tabela 5 Pág. 51), após cromatografia em placa preparativa, utilizando-se CHCl_3 -MeOH (95:05), como sistema de solvente. Também foi isolado da casca da raiz de *S. buxifolia* da sub-fração III (Tabela 11, Pág. 76).



Sua estrutura foi determinada com base nos dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C , comparação destes dados com os já descritos na literatura⁴⁶ e através de CCD, com amostra autêntica. Deste modo, foi possíveis identificar o metabólito isolado como sendo β -sitosterol (**33**).

A Tabela 6 (Pág. 54) apresenta a comparação dos dados de RMN de ^{13}C da literatura com os obtidos experimentalmente para este metabólito.

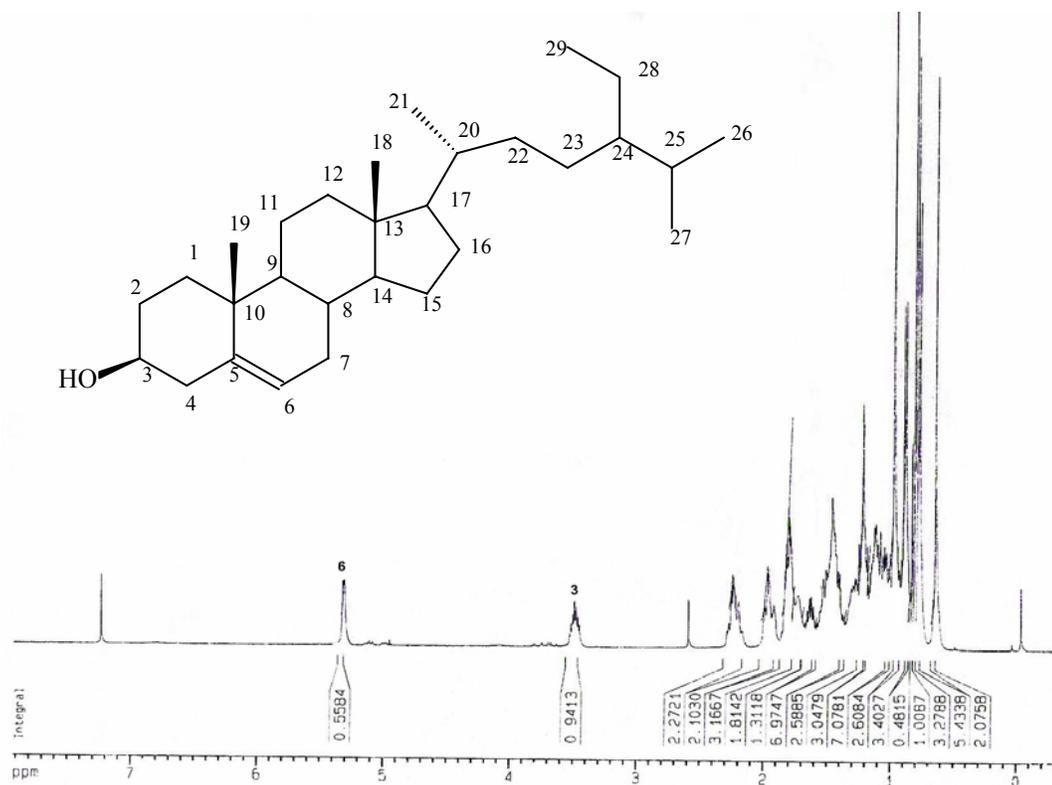


Figura 3- Espectro de ^1H de β -sitosterol (**33**) em CDCl_3 a 400.13 MHz.

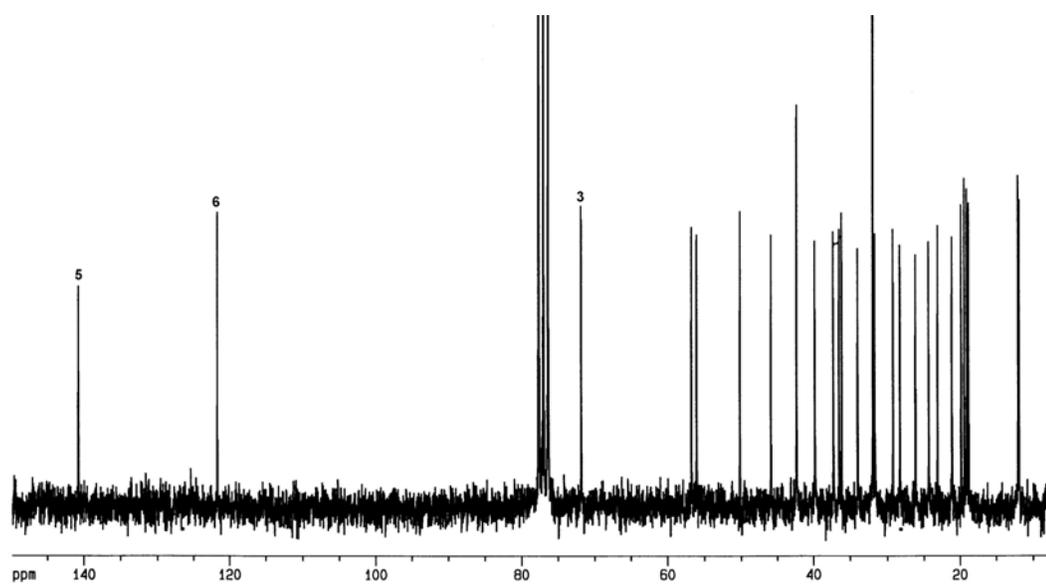


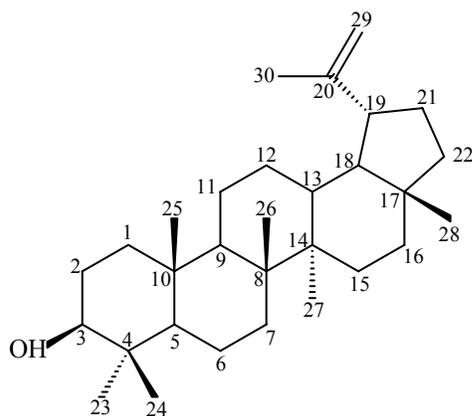
Figura 4 - Espectro de RMN ^{13}C do β -sitosterol (**33**), em CDCl_3 a 100,32 MHz.

Tabela 6- Dados de RMN de ^{13}C do β -sitosterol (33)⁴⁶

Posição	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) de 36 determinados	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) de 36 da literatura ⁴⁶
1	37,3	37,3
2	31,5	31,7
3	71,8	71,8
4	42,3	42,3
5	140,8	140,8
6	121,7	121,7
7	31,9	32,0
8	31,7	32,0
9	50,1	50,1
10	36,5	36,5
11	21,1	21,1
12	39,8	39,8
13	42,3	42,3
14	56,8	56,8
15	24,3	24,3
16	28,2	28,3
17	56,1	56,1
18	11,8	11,9
19	18,8	18,8
20	36,1	36,2
21	19,0	19,1
22	34,0	34,0
23	26,1	26,1
24	45,9	45,9
25	29,2	29,2
26	19,8	19,8
27	19,4	19,4
28	23,1	23,1
29	12,0	12,0

5.1.1.1.2- Lupeol⁴⁴ (34)

A substância **34** foi obtida na forma de um sólido branco (60 mg), após realização de cromatografia em placa preparativa em hexano-acetato de etila (90:10) da sub-fração VIII (Tabela 5, Pág. 51), da fração hexânica da casca do caule de *C. buxifolia*. A estrutura deste composto foi determinada por métodos espectroscópicos e por comparações com dados da literatura⁴⁴. Por meio destas análises, comprovou-se tratar do triterpeno lupeol (**34**).



34

O espectro de RMN de ^1H (Figura 5) de **34**, é característico de compostos triterpênicos. Na região entre 0,70 e 1,80 ppm observa-se sinais referentes aos sete grupos metílicos presentes em **34**, a 0,75, 0,78, 0,83, 0,93, 0,95, 1,15 e 1,17 ppm.

Os hidrogênios da dupla ligação presentes na estrutura **34** são identificados pelos sinais em 4,57 e 4,68 ppm. O hidrogênio ligado ao átomo do carbono quiral (C-3), tem um deslocamento químico de 3,18 ppm e aparece na forma de um duplo dubleto (1H, $J=8$ e 12 Hz), pois acopla com os hidrogênios diastereotópicos em C-2.

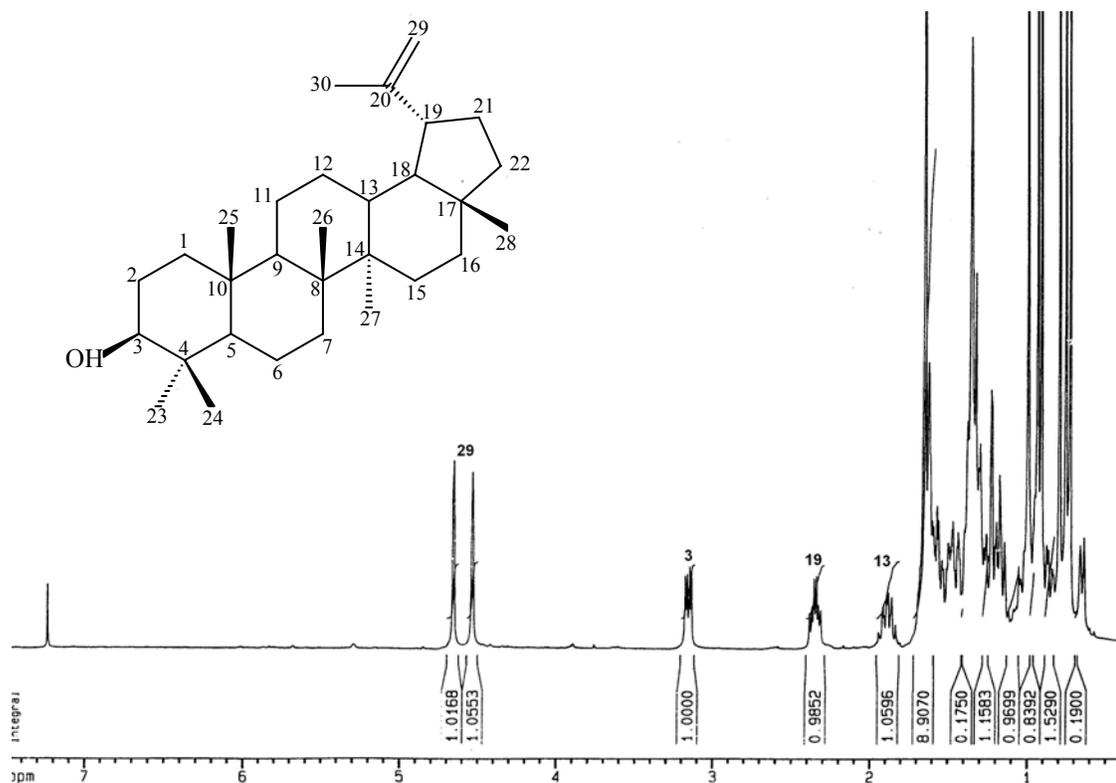


Figura 5- Espectro de RMN ^1H , a 400, 13 MHz, do Lupeol (**34**) em CDCl_3

A atribuição de sinais de RMN de ^{13}C (Tabela 7, pág. 59) foi realizada através de técnicas de ressonância de carbono totalmente desacoplado (Figura 6) e DEPT 135° (Figura 7, Pág. 58) e em conjunto com comparações de dados da literatura⁴⁴.

Analisando-se o espectro de carbono (^{13}C), verifica-se a presença de 26 carbonos, sendo quatro sinais sobrepostos, que são as metilas 24, 26 e 27 com deslocamento químico em 15,4 ppm, o carbono 1 e 4 em 38,8 ppm, os carbonos 2 e 15 em 27,4 ppm, confirmando a presença dos trinta carbonos.

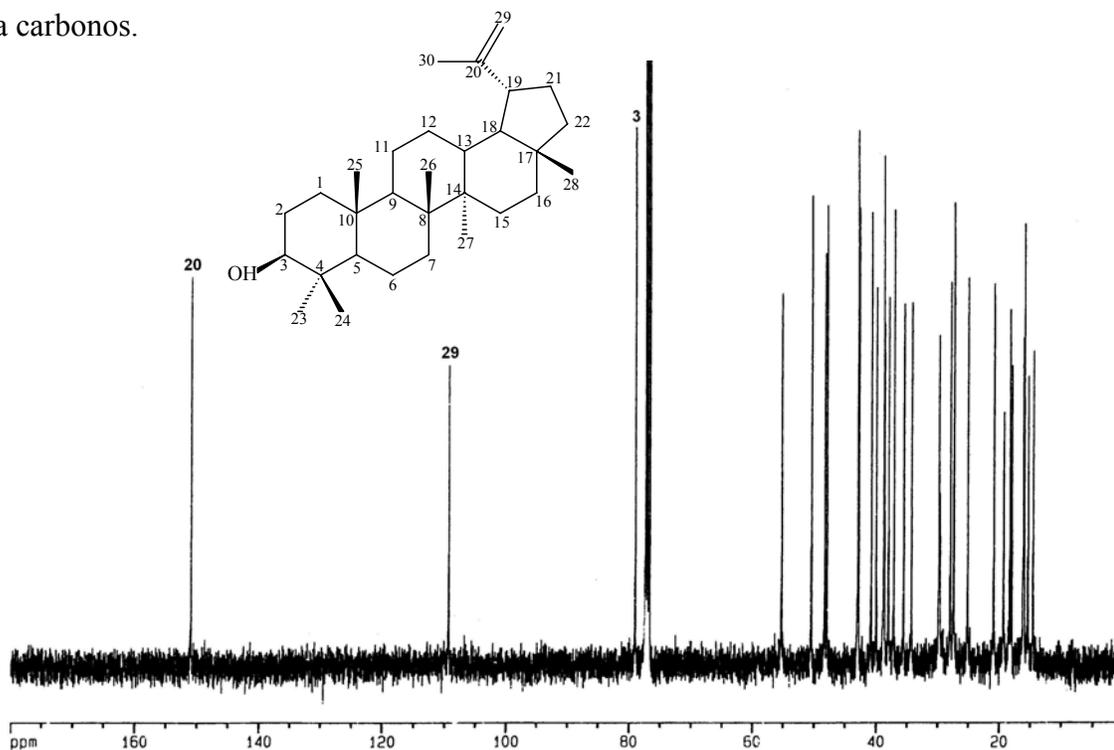


Figura 6- Espectro de RMN ^{13}C do Lupeol (**34**), em CDCl_3 , a 100,32 MHz

O espectro de DEPT 135° (Figura 7) possibilitou a identificação de treze sinais referentes a carbonos metínicos (CH) e metílicos (CH₃) com amplitude positiva, onze sinais com amplitude negativa referente a carbonos metilênicos (CH₂), sugerindo desta maneira que o metabólito possua seis carbonos quaternários, pois estes não aparecem no espectro de DEPT 135°.

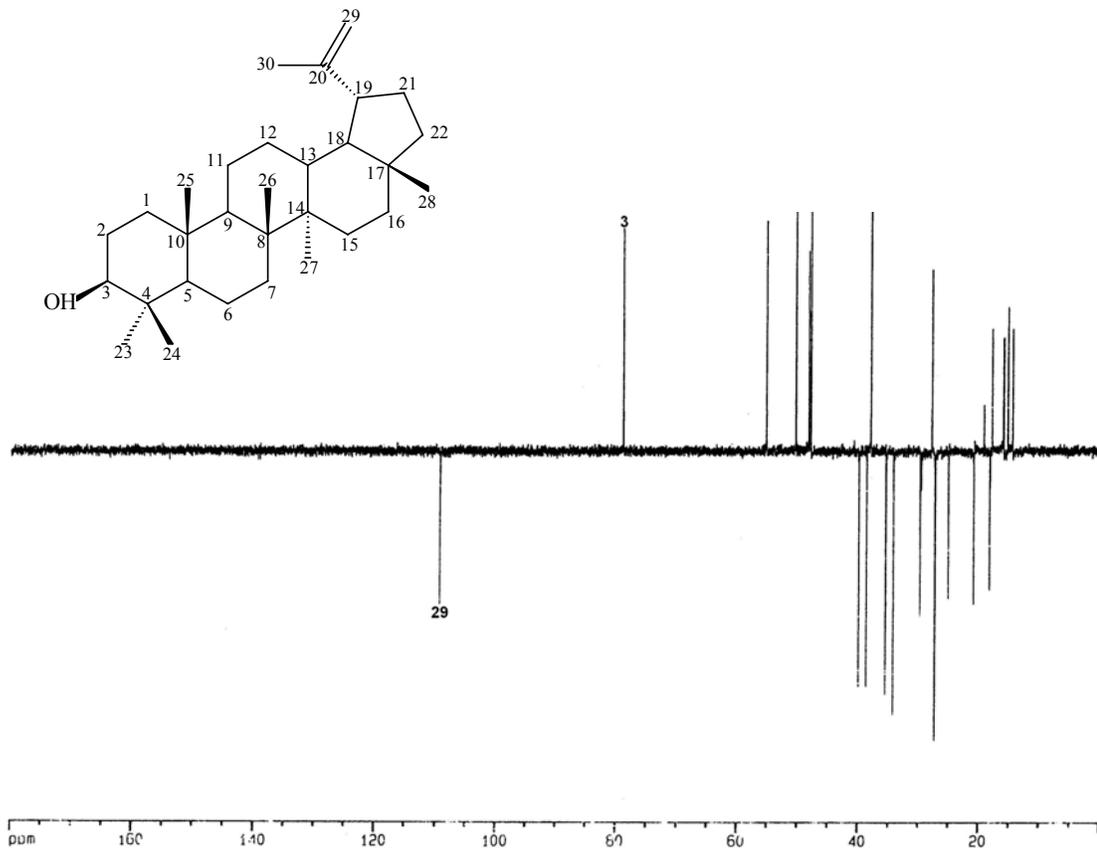


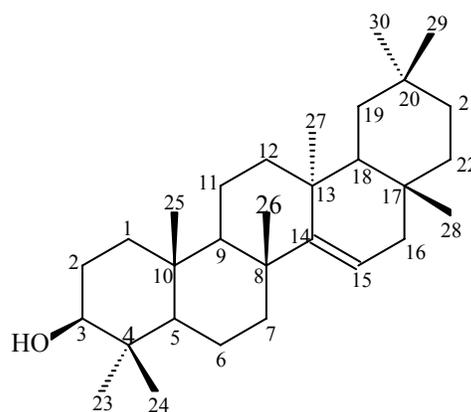
Figura 7- Espectro de RMN DEPT 135° do Lupeol (**34**), em CDCl₃, a 100,32 MHz

Tabela 7- Dados de RMN de ^{13}C de Lupeol (**34**)

Posição	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) de 34 determinados	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) de 34 da literatura ⁴⁴
1	38,8	38,8
2	27,4	27,5
3	78,9	79,1
4	38,8	38,8
5	55,2	55,4
6	18,1	18,4
7	34,3	34,4
8	40,2	40,9
9	50,4	50,6
10	37,2	37,2
11	21,9	21,0
12	25,2	25,3
13	37,9	38,2
14	42,8	42,9
15	27,4	27,5
16	35,5	35,7
17	42,9	43,0
18	48,3	48,5
19	47,9	48,0
20	150,8	150,9
21	29,6	29,7
22	40,0	40,1
23	27,9	28,0
24	15,4	15,4
25	16,0	16,1
26	15,4	15,9
27	15,4	14,5
28	18,3	18,0
29	109,3	109,3
30	19,2	19,4

5.1.1.1.3-Identificação do triterpeno Taraxerol (35)⁴⁵

Esta substância foi isolada como um sólido branco (37 mg), da fração VIII do extrato hexânico da casca do caule de *C. buxifolia*, (Tabela 5, Pág. 51), através de placa preparativa, utilizado como sistema eluente Hexano/acetato de etila (90:10). A estrutura foi confirmada através da análise dos métodos espectroscópicos e por dados da literatura⁴⁵, chegando à estrutura de um triterpeno denominado taraxerol (35).

**35**

O espectro de RMN de ^1H (Figura 8) de **35** apresentou sinais em 0,80, 0,82, 0,90, 0,91, 0,92, 0,95, 0,97, 1,09 ppm (singletos), atribuídos aos grupos metílicos Me-23, -24, -25, -26, -27, -28, -29, -30. O duplo dubleto em 5,53 ppm (1H, dd, H-15) sugeriu à presença de uma ligação dupla endocíclica na estrutura. O dubleto em 3,19 ppm (1H, d, H-3) relativo ao hidrogênio carbinólico H-3. No mesmo espectro, observa-se vários sinais entre 1,66-1,22 ppm, que foram atribuídos aos grupos metilênicos e metínicos do composto taraxerol (**35**).

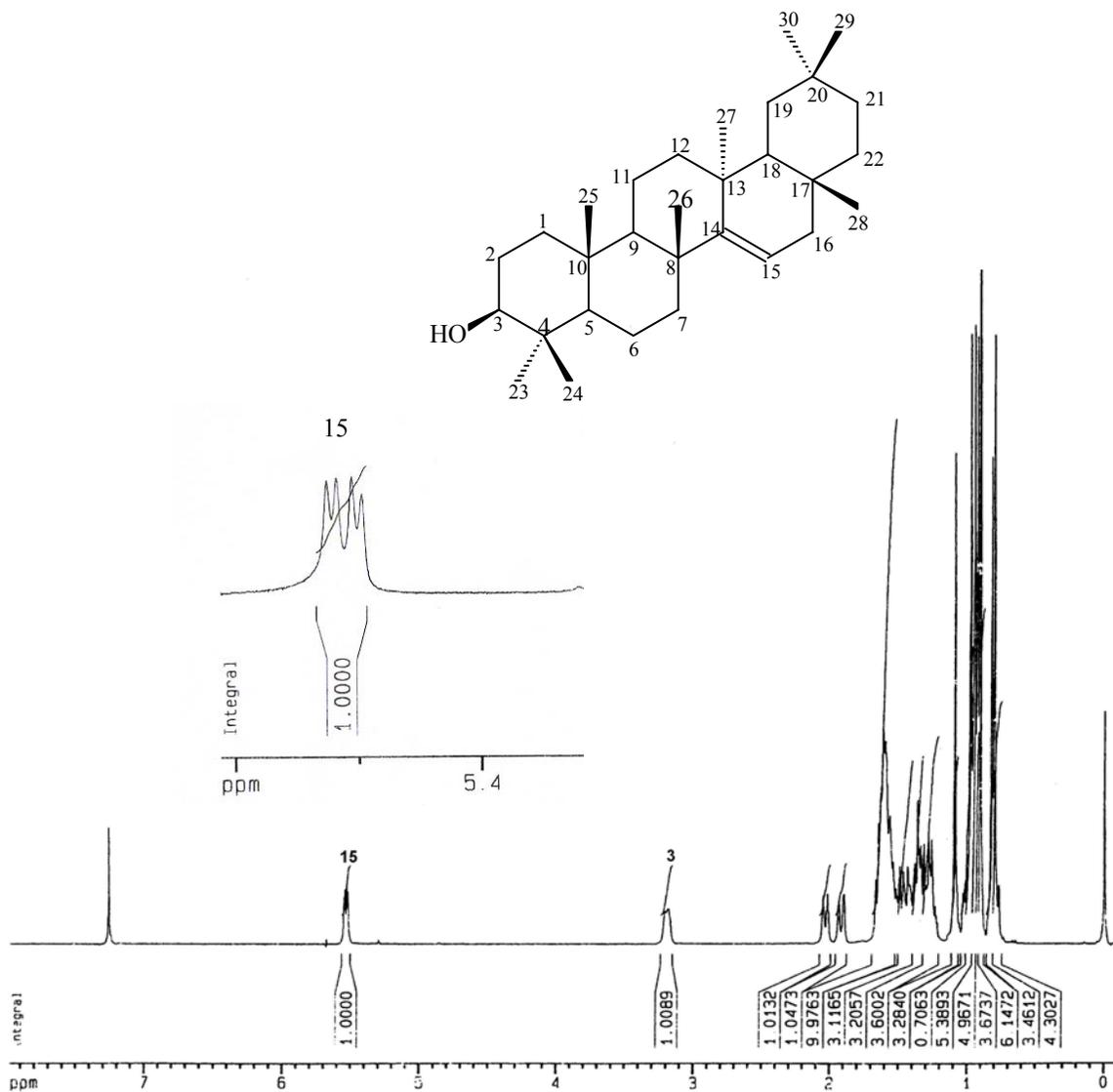


Figura 8- Espectro de RMN de ^1H Do Taraxerol (**35**), em CDCl_3 , 400.13 MHz

No espectro de RMN ^{13}C (Figura 9) de **35** observaram-se vinte e sete sinais de carbono, sendo três carbonos sobrepostos, o que corresponde a 30 carbonos no total caracterizando um esqueleto triterpênico para este metabólito. Os sinais em 158,1 (C-14) e 116,8 ppm (C-15), correspondem os carbonos da dupla ligação.

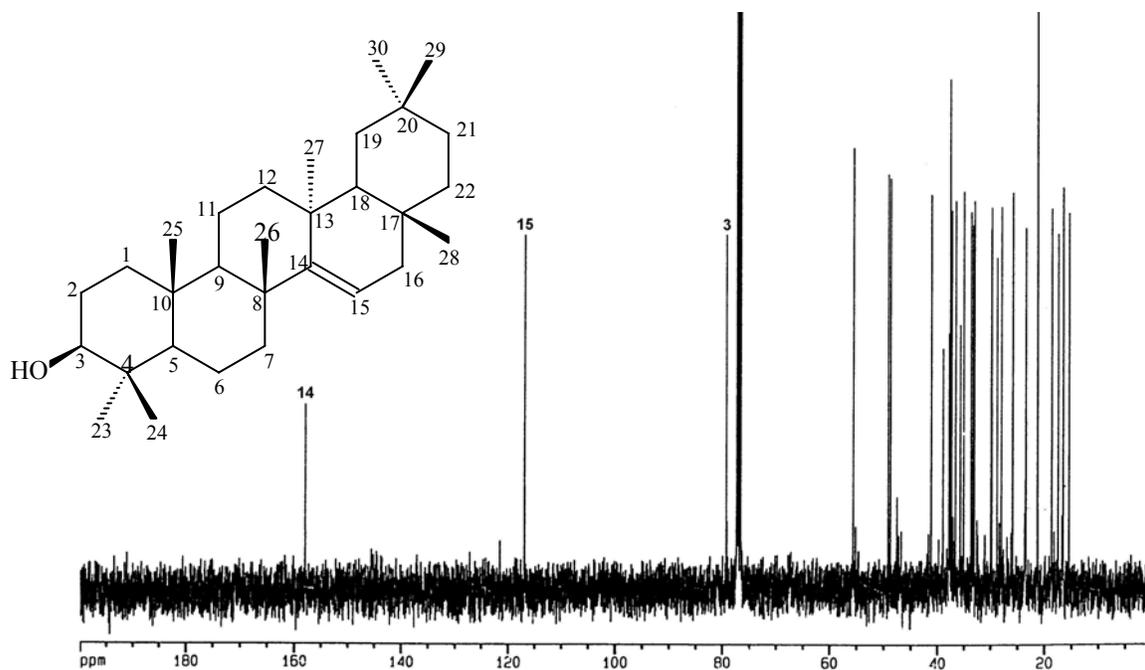


Figura 9- Espectro de RMN de ^{13}C de Taraxerol (**35**), em CDCl_3 , 100.32 MHz

O espectro DEPT 135° (Figura 10) mostrou apenas vinte sinais de carbonos, o que corresponde a vinte e três sinais devido a sobreposição de três sinais de carbono, sendo, portanto, onze primários ou terciários (amplitude positiva), com sinais sobrepostos do C-24 e 25, C-26 e 28) e nove secundários (amplitude negativa) com dois carbonos sobrepostos (C-7 e C-12), concluindo-se que temos 7 carbonos desidrogenados na estrutura de **35**, pois são os carbonos que desaparecem no DEPT 135°. Com base nestes dados e registros na literatura⁴⁵ foi possível sugerir a estrutura **35** ao triterpeno Taraxerol⁴⁵, composto isolado pela primeira vez nesta espécie. Os deslocamentos químicos de todos os carbonos presentes na estrutura **35** e a comparação destes com os dados da literatura, podem ser visualizados na Tabela 8 (Página 64).

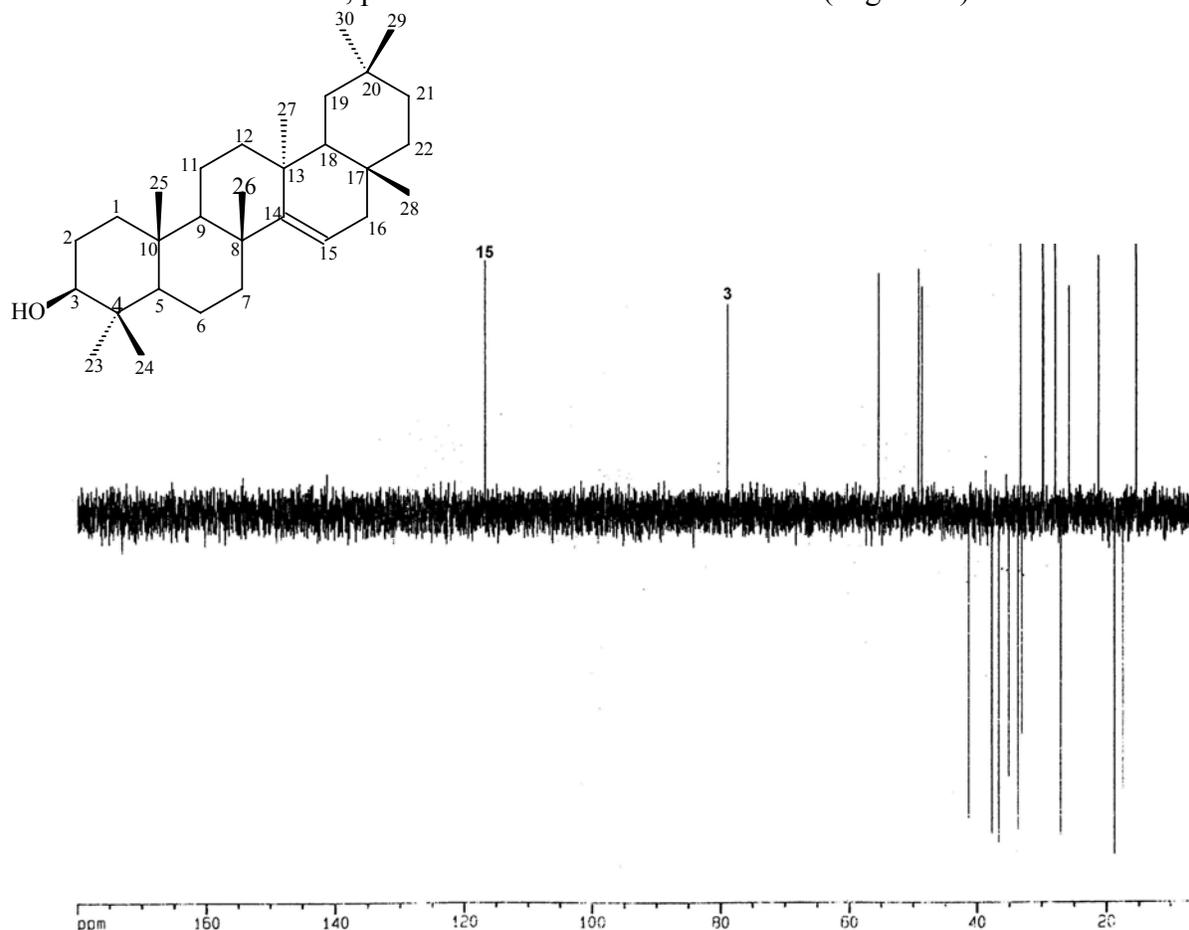


Figura 10- Espectro DPT 135° de Taraxerol (**35**), em CDCl₃, 100.32 MHz

Tabela 8- Dados de RMN de ^{13}C do Taraxerol (**35**)⁴⁵

Posição	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) de 35 determinados	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) de 35 da literatura ⁴⁵
1	37,7	38,1
2	27,1	27,3
3	79,0	79,2
4	38,9	39,1
5	55,5	55,7
6	18,8	18,2
7	35,1	35,3
8	38,7	38,9
9	48,9	48,9
10	37,7	37,9
11	17,5	17,7
12	35,1	35,4
13	37,5	37,9
14	158,1	158,1
15	116,8	117,0
16	36,9	36,9
17	38,0	38,1
18	49,3	49,4
19	40,9	41,4
20	28,8	29,0
21	33,7	33,9
22	33,1	33,2
23	28,0	28,1
24	15,4	15,6
25	15,4	15,6
26	29,9	30,1
27	25,9	26,0
28	29,9	30,0
29	33,3	33,5
30	21,5	21,5

5.1.1.2- Casca da raiz

Esta parte da planta foi alvo de estudo pelo nosso grupo de pesquisa, devido à presença, observada anteriormente, do alcalóide ciclopeptídico condalina-A (**22**). A principal finalidade de se isolar este composto na forma pura, foi obter cristais para a análise de difração de raios-X, além de submeter o alcalóide a análises de atividade antimicrobiana, comparando estrutura-atividade com seu diastereoisômero, scutianina-M, isolado anteriormente pelo grupo⁴⁷ da espécie *Scutia buxifolia*.

5.1.1.2.1- Fração acetato de etila

Das frações obtidas, a fração acetato de etila foi a que apresentou uma melhor separação e uma maior concentração deste alcalóide. Devido a esse motivo, optou-se por trabalhar somente com a fração acetato de etila. Para isto, 10,0 g desta fração foram cromatografadas em coluna utilizando-se sílica gel 60 (70-230 mesh), como suporte sólido, e clorofórmio-metanol, em várias concentrações, como sistema eluente. Foram coletadas frações de 30 mL em frascos de vidro. Após minuciosas análises em CCD, as frações que deram teste positivo para alcalóides, foram reunidas conforme suas semelhanças em R_fs, resultando assim em 8 frações finais. A reunião destas frações, purificação através de placas preparativas e recristalizações, resultou no alcalóide desejado, conhecido como condalina-A (**22**).

Algumas substâncias não foram identificadas devido à pequena quantidade isolada e alguns, devido a sua insolubilidade, o que impossibilitou a realização de análises espectroscópicas.

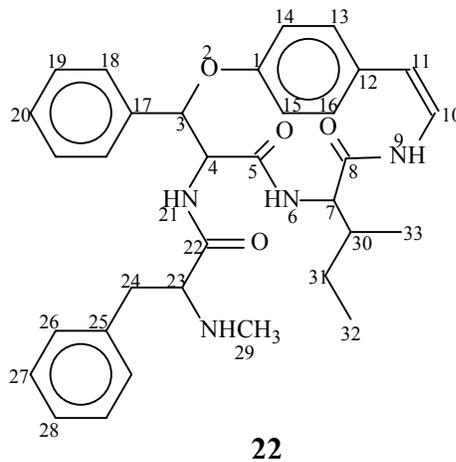
A Tabela 9 apresenta o procedimento utilizado em que a fração acetato de etila foi submetida.

Tabela 9- Cromatografia em coluna da fração acetato de etila da casca da raiz de *Condalia Buxifolia*

Sub-fração	Sistema de solvente	Substância	Peso
I	CHCl ₃	Mistura de substâncias	200 mg
II	CHCl ₃ :MeOH (99:02)	22 + Impureza	70 mg
III	CHCl ₃ :MeOH (95:05)	22 + Impureza	80 mg
IV	CHCl ₃ :MeOH (92:08)	22	40 mg
V	CHCl ₃ :MeOH (90:10)	22 + Impureza	80 mg
VI	CHCl ₃ :MeOH (80:20)	Mistura de substâncias	130 mg
VII	CHCl ₃ :MeOH (50:50)	Mistura de substâncias	75 mg
VII	MeOH	Mistura de substâncias	230 mg

5.1.1.2.2- Identificação do Alcalóide Ciclopeptídico, Condalina-A²⁴ (22)

Como demonstrado anteriormente, condalina-A (22), foi obtido da fração acetato de etila da casca da raiz de *C. buxifolia*, das sub-frações III e IV da coluna cromatográfica (Tabela 9, Pág. 66). Através de recristalizações em acetona, foi obtida na forma de um sólido incolor, em aproximadamente 145 mg. Através de análises de RMN uni e bidimensionais, comprovou-se a estrutura do alcalóide Condalina-A (22).



O espectro de RMN de ^1H de condalina-A (**22**) (Figura 11) apresenta uma metila com deslocamento químico em 0,75 ppm (t, $J_{32,31} = 6,8$ Hz) e outra metila em 0,78 ppm (d, $J_{33,30} = 6,5$ Hz) que correspondem aos hidrogênios das metilas ligadas aos carbonos C-32 e C-33 respectivamente.

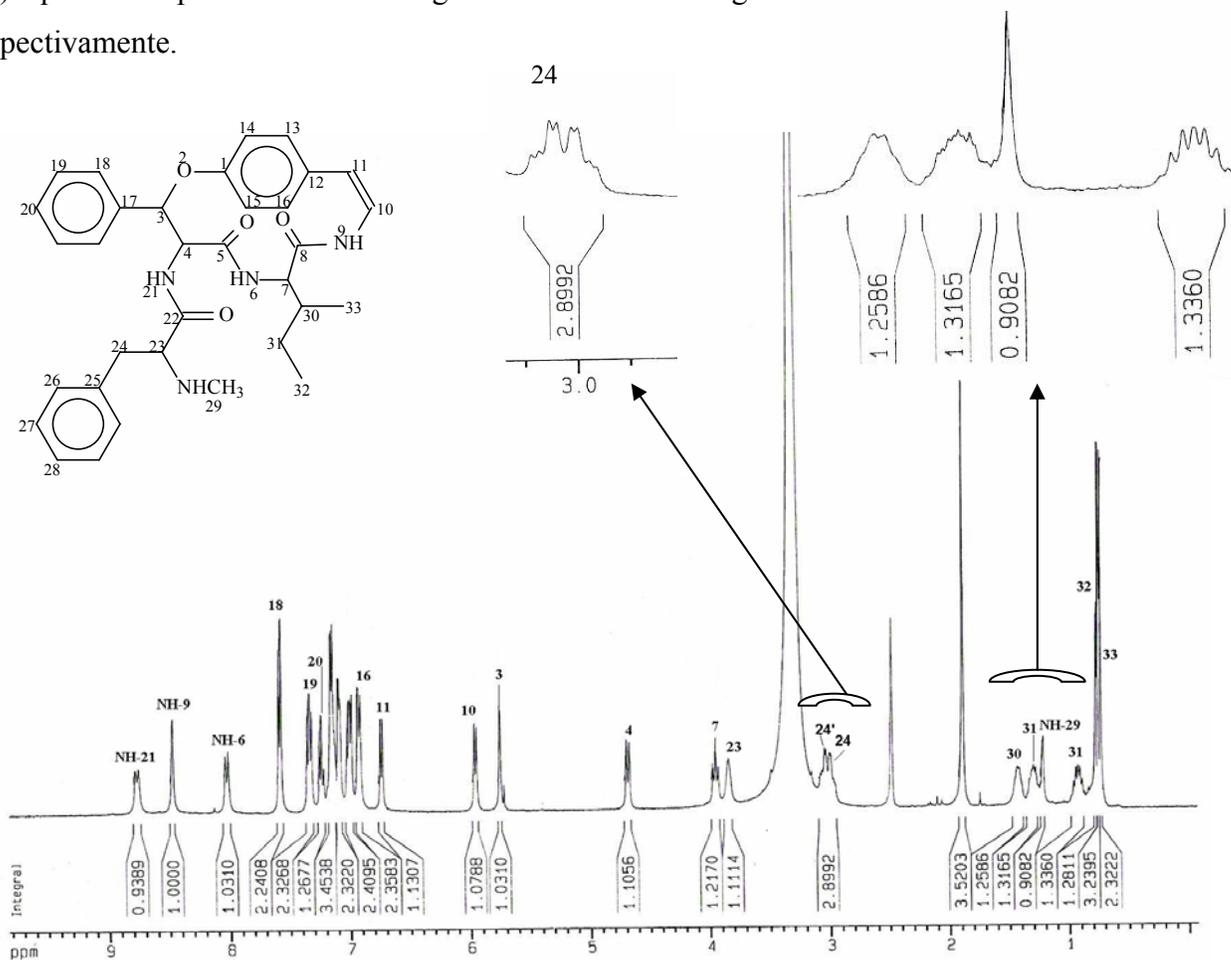


Figura 11- Espectro de ^1H de Condalina-A (**22**) em DMSO, 400.13 MHz.

Os hidrogênios do carbono metilênico, C-24, foram observados como duplo dubletos, com deslocamento químico em 3,02 ppm ($J_{24', 23} = 5,6$; $J_{24, 24'} = 11\text{Hz}$) e em 3,04 ppm ($J_{24, 23} = 13,6$, $J_{24', 24} = 8,4$ Hz) e o hidrogênio ligado ao carbono C-23 aparece como dubleto com um deslocamento químico de 3,85 ppm.

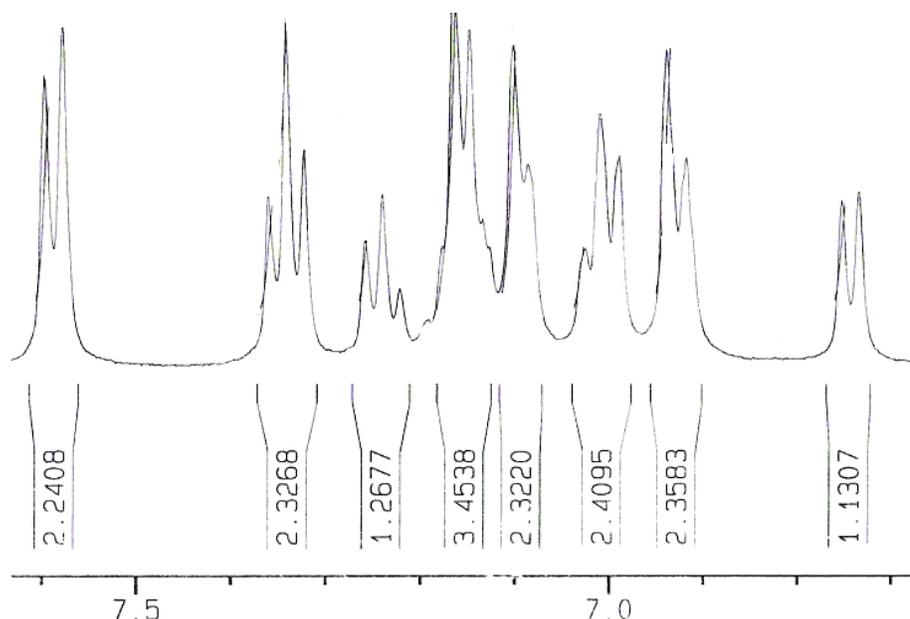


Figura 11.1 - Expansão do espectro de ^1H da região entre 6.4 – 7.6 ppm.

No espectro de COSY (H-H) (Figura 12), o dubleto em 0,78 ppm mostra uma correlação com o sinal em 1,34 ppm (1H, m), que corresponde ao hidrogênio ligado ao carbono C-30, e o tripleto em 0,75 ppm apresenta uma correlação com o sinal em 0,93 e 1,29 ppm (2H, m) que correspondem aos hidrogênios diastereotópicos ligados ao carbono C-31. O hidrogênio ligado ao C-30 possui correlação com o sinal 3,95 ppm (1H, t) que corresponde ao hidrogênio ligado ao carbono C-7. Este sistema de spins confirma que o α -aminoácido do anel é a isoleucina.

No mesmo espectro de COSY (Figura 12), aparece a correlação entre os hidrogênios ligados aos carbonos C-24 e C-23. Já o singlete com deslocamento químico de 1,89 ppm (3H) foi atribuído aos hidrogênios da metila do grupo N-metil (NH-29). Este sistema de spins confirma a presença do aminoácido N-metil fenilalanina como cadeia lateral.

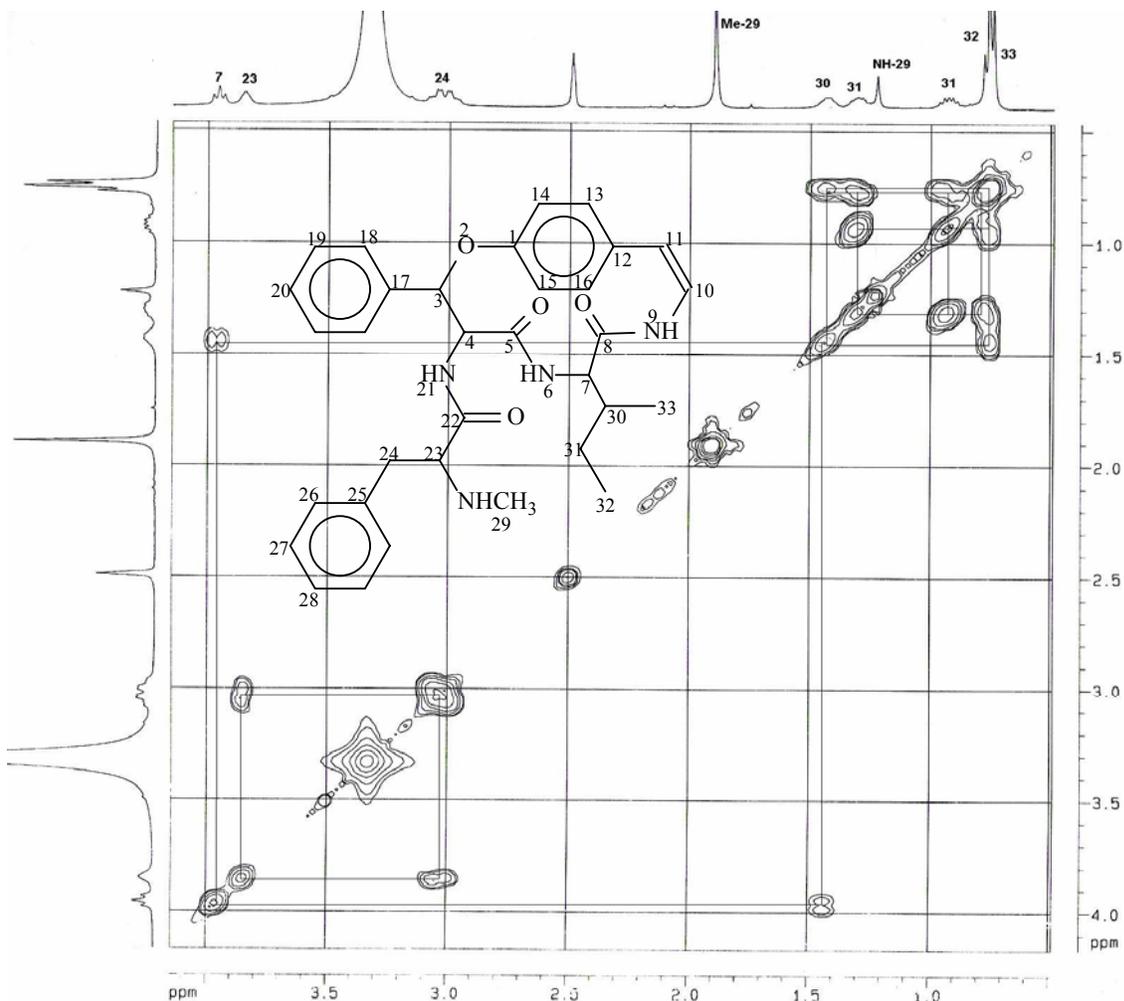


Figura 12- Espectro de RMN 2D, COSY, correlação ^1H - ^1H , região entre 0,5 a 4,0 ppm de Condalina-A (**22**) em DMSO, 400.13 MHz.

A unidade β -fenilserina, que é o aminoácido hidroxilado do anel macrocíclico, foi identificado pela correlação entre o hidrogênio ligado ao carbono C-3, com deslocamento químico em 5,75 ppm (1H, s), e o sinal com deslocamento químico em 4,69 ppm (1H, d) se refere ao hidrogênio ligado ao carbono C-4, que também exibe uma correlação com NH-21, com um deslocamento químico de 8,76 ppm (1H, d, $J_{21,4} = 9,3\text{Hz}$) (Figura 13). O hidrogênio olefínico ligado ao carbono C-10 aparece como um dubleto em 5,96 ppm ($J_{10,11} = 7,3\text{ Hz}$), e aparece acoplando com o hidrogênio olefínico do carbono C-11 com deslocamento químico de 6,74 ppm ($J_{11,10} = 7,3\text{ Hz}$).

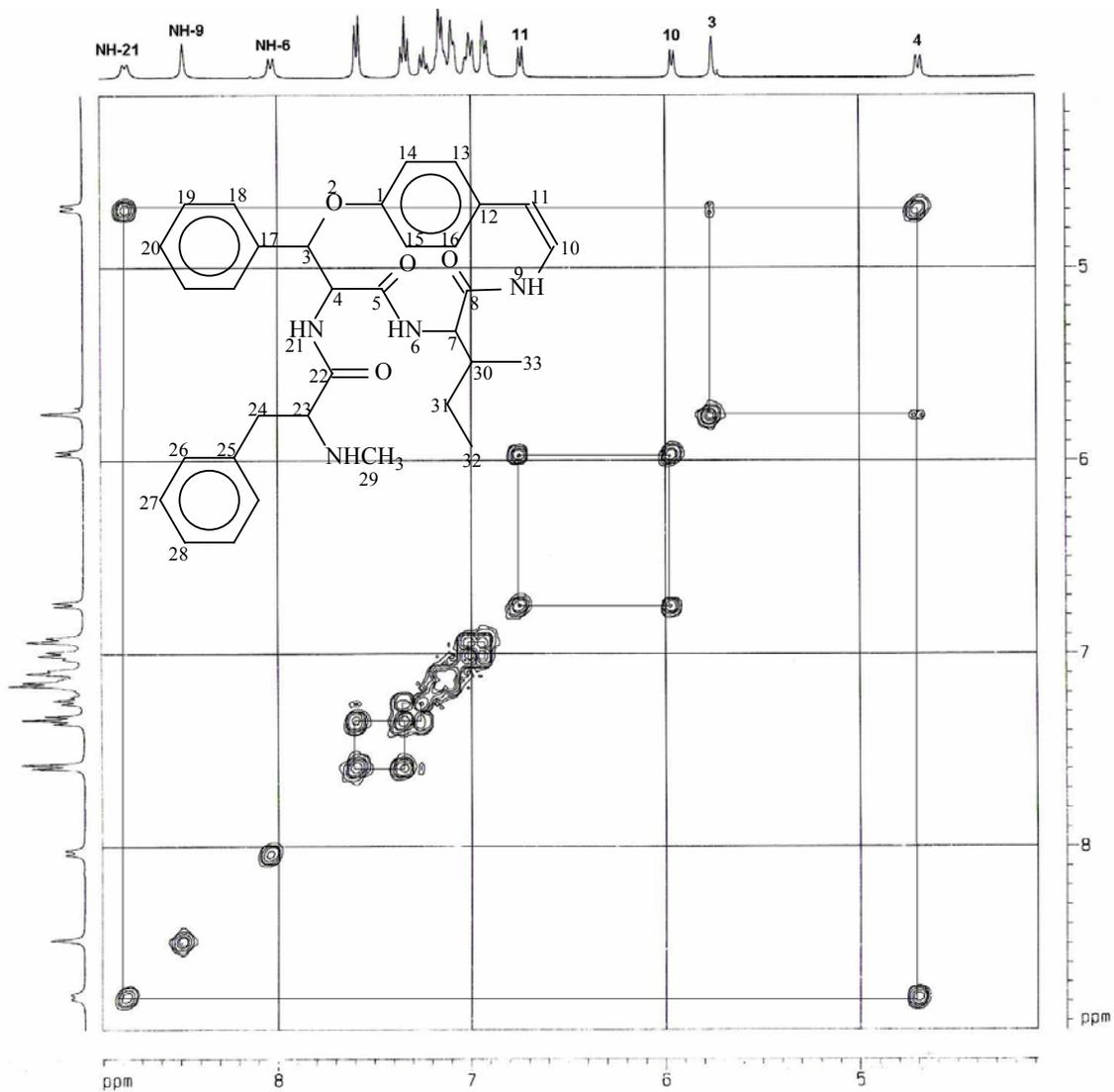


Figura 13- Espectro de RMN 2D, COSY, correlação ^1H - ^1H , região entre 4,0 a 9,0 ppm de Condalina-A (**22**) em DMSO, 400.13 MHz.

As atribuições dos deslocamentos químicos de todos os hidrogênios e as constantes de acoplamento estão relacionados na parte experimental (Pág. 45). A análise do espectro de RMN de ^{13}C (100,6 MHz, DMSO) (Figura 14) também foi de grande importância para a elucidação da estrutura de condalina-A (**22**). Os deslocamentos químicos dos carbonos e a comparação destes com os da literatura estão dispostos na Tabela 10 (Pág 74).

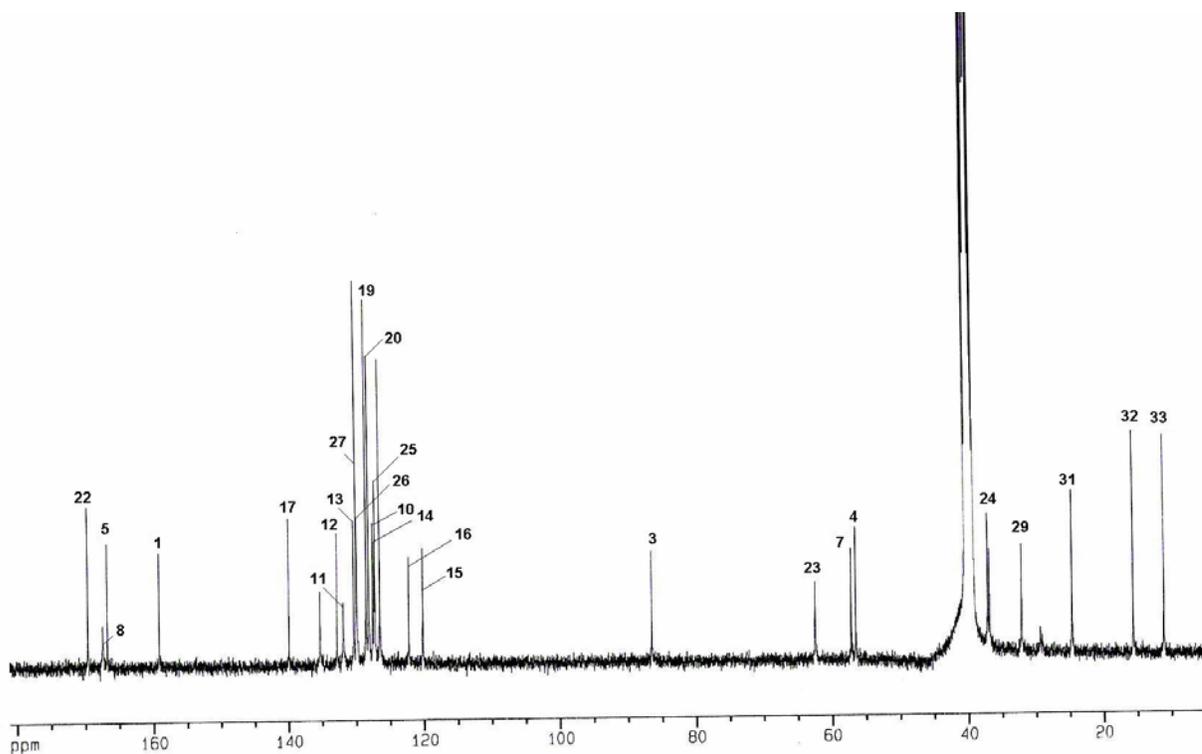


Figura 14- Espectro de RMN de ^{13}C de Condalina-A (**22**) em DMSO, 100.32 MHz.

Ainda foi realizado o espectro de RMN de 2D heteronuclear, HMQC (Figura 15). Este foi importante para confirmarmos a estrutura **22**.

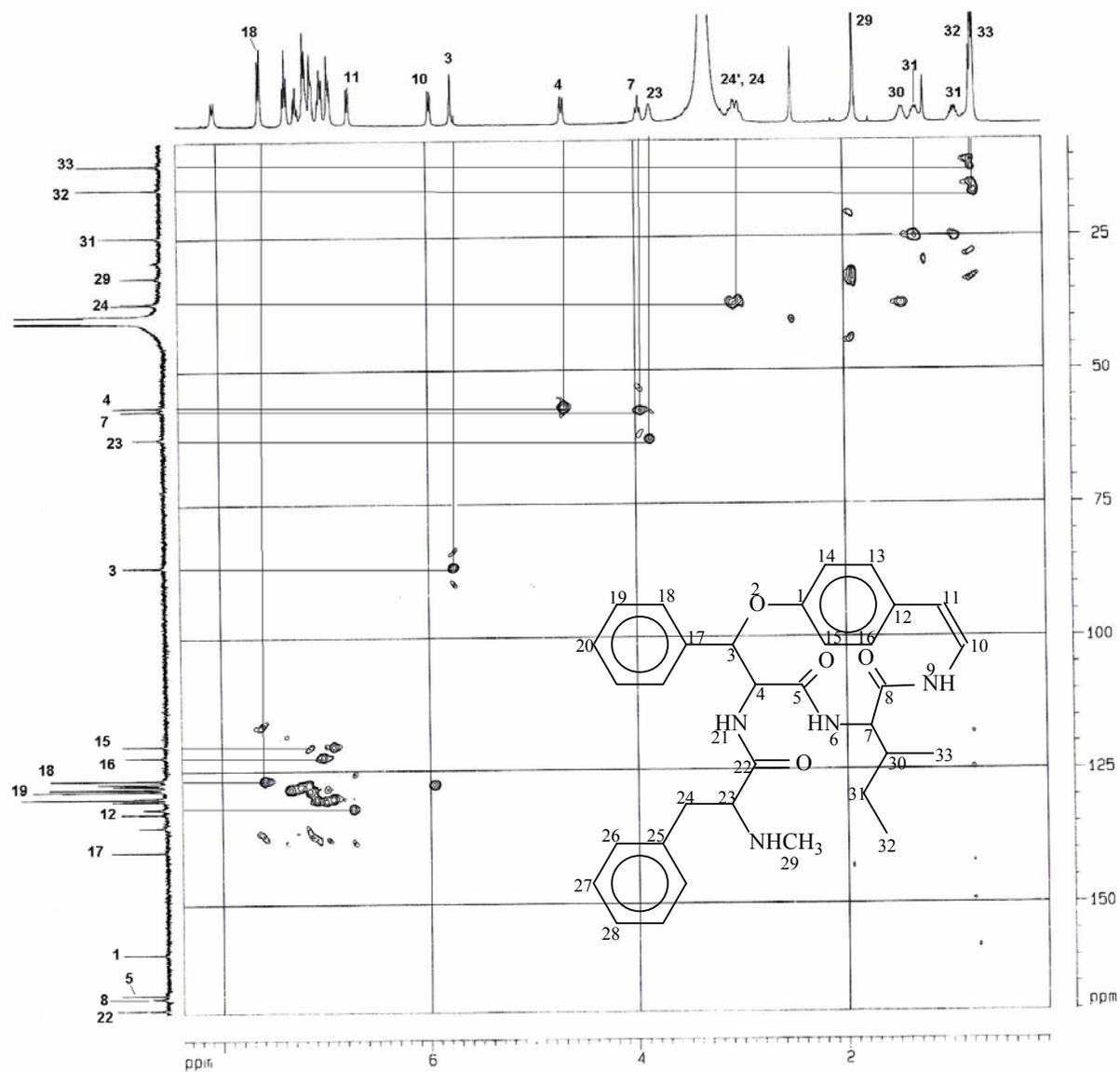


Figura 15- Espectro de RMN 2D, HMQC, correlação ^1H - ^{13}C , de Condalina-A (**22**) em DMSO, 400.13 MHz.

Tabela 10- Dados de RMN de ^1H ^{13}C de Condalina-A (22)

H/C	δ ^1H ppm (J, Hz)	δ ^{13}C ppm	δ ^{13}C ppm (Lit ²⁴)
01	-	159,2	158,6
03	5,75 (s)	86,0	86,3
04	4,69 (d) $J_{4,21} = 9,2$	56,0	55,3
05	-	166,7	167,0
06	8,03 (d) $J_{6,7} = 9,0$	-	-
07	3,95 (dd) $J_{7,6} = 9,0$; $J_{7,30} = 4,4$	57,2	56,8
08	-	168,4	169,2
09	8,49 (NH)	-	-
10	5,96 (d) $J_{10,11} = 7,3$; $J_{10,9} = 9,0$	131,9	131,4
11	6,74 (d) $J_{11,10} = 7,24$	127,3	126,9
12	-	132,8	132,4
13	7,00	130,0	129,4
14	6,93	125,0	124,4
15	7,14	120,2	119,8
16	6,91	122,2	121,7
17	-	139,9	139,7
18	7,58	126,5	126,0
19	7,34	127,9	127,6
20	7,24	127,6	127,0
21	8,76 (d) $J_{21,4} = 9,3$	-	-
22	-	173,0	176,6
23	3,85 (dd) $J_{23,24} = 5,6$; $J_{23,24'} = 13,6$	63,0	64,5
24	3,02	37,4	39,2
		-	
25	-	137,0	138,2
26	7,0-7,5	129,0	128,0
27		129,8	129,9
28			
29	1,89 (s)	32,9	37,6
30	1,33 (m)	35,6	34,2
31	0,92/1,29 (m)	24,7	24,4
32	0,78 (d) $J_{33,30} = 6,5$	15,6	15,2
33	0,75 (t) $J_{32,33} = 6,5$	11,1	10,8

5.1.2- *Sucutia buxifolia* Reiss

Cascas do tronco desta espécie já foram estudadas extensivamente por nosso grupo e por outros grupos de pesquisa. Como a casca da raiz desta espécie nunca foi alvo de estudo por nosso laboratório, o estudo desta parte da planta tornou-se um dos objetivos deste trabalho. Trata-se de um material difícil de ser trabalhado fitoquimicamente, por apresentar uma quantidade muito grande de saponinas, resultando em emulsões de difícil separação durante o processo de obtenção de frações.

5.1.2.1- Casca da raiz de *Scutia buxifolia*

A casca da raiz coletada em Santana do Livramento foi extraída com metanol conforme descrito na parte experimental (pág 43), obtendo-se assim o extrato bruto. Tentou-se realizar um fracionamento ácido/base, com o objetivo de se separar os alcalóides presentes na planta. Devido à presença de uma boa quantidade de saponinas (observação através da formação de espuma), formou-se uma emulsão de difícil separação, mesmo após a adição de uma solução saturada de NaCl. Portanto, optamos por uma outra estratégia de separação. Neste caso, o extrato bruto foi colocado em uma estufa com aquecimento (50°C) e circulação de ar até a secagem total do material. Após, o material seco foi macerado e colocado em um aparelho de Soxhlet, e extraído com solvente em ordem crescente de polaridade (hexano, diclorometano, acetato de etila, acetona e metanol). Após, estas frações foram analisadas individualmente através de CCD, utilizando-se para revelação o reagente de Dragendorff e também ácido sulfúrico/etanol (10:90 v/v) seguido de aquecimento.

A fração hexânica apresentou uma boa separação dos seus metabólitos em CCD, sendo que a maioria não é visível em UV_{250nm}, nem revelam com reagente de Dragendorff, indicando a ausência de alcalóides e revelando somente em ácido sulfúrico/etanol. Já a fração diclorometano apresentou a formação de manchas alaranjadas frente ao reagente Dragendorff, indicando alcalóides nesta fração.

A fração acetato de etila e a fração acetona revelaram manchas escuras em ácido sulfúrico/etanol, porém não revelaram frente ao reagente de Dragendorff. A separação não foi eficiente em CCD, portanto optou-se por se trabalhar com as frações menos polares.

5.1.2.1.1- Metabólitos isolados e identificados de *Scutia buxifolia* Reiss

5.1.2.1.1.1- Metabólitos isolados da fração hexânica

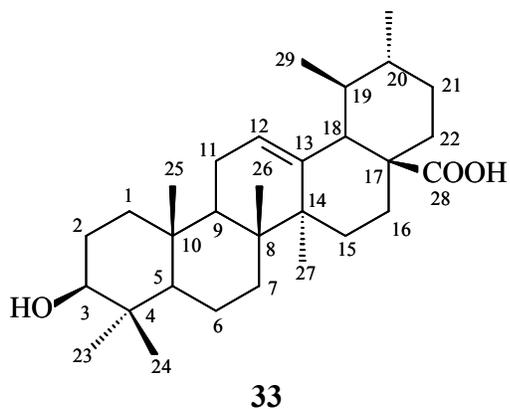
A fração hexânica foi submetida à cromatografia em coluna, utilizando-se sílica gel 60H (70-230 Mesh) como fase estacionária e hexano-acetato de etila como sistema eluente. Foram recolhidas frações de 50ml, analisadas individualmente em CCD, e reunidas conforme as semelhanças de Rfs (Tabela 11), sendo possível o isolamento de dois metabólitos conhecidos: ácido ursólico (**36**) e o β -sitosterol (**33**). Como β -sitosterol, já foi mencionado anteriormente, discutiremos aqui apenas a identificação do triterpeno ácido ursólico (**36**).

Tabela 11- Cromatografia da fração hexânica de *S. buxifolia* da casca da raiz.

Fração	Sistema eluente	Substância	Peso (g)
I	Hexano 100%	Mistura de substâncias	0,220
II	Hexano:Acetato de etila 2%	Mistura de substâncias	0,130
III	Hexano:Acetato de etila 5%	Mistura de substâncias + β -sitosterol	0,150
IV	Hexano:Acetato de etila 10%	Mistura de substâncias + ácido ursólico	0,080
V	Hexano:Acetato de etila 20%	Mistura de substâncias	0,110
VI	Hexano:Acetato de etila 50%	Mistura de substâncias	0,160
VII	Acetato de etila 100%	Mistura de substâncias	0,280

5.1.2.1.1.1- Identificação do triterpeno, ácido ursólico (36)

O metabólito **33** foi isolado na forma de um sólido branco da casca da raiz de *S. buxifolia* (Tabela 11, Pág. 76), purificado através de coluna cromatográfica com sílica gel e eluído com hexano-acetato de etila. Sua estrutura foi elucidada através dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C e comparação com dados já publicados na literatura⁴⁸.



No espectro de RMN de ^1H (Figura 16), de **33**, detectou-se a presença de cinco grupos metílicos terciários, com deslocamento químico de 0,67, 0,78, 0,88, 0,91, 1,01 ppm (3H, Me-23, -24, -25, -26 e -27) e duas metilas secundárias em 0,85 e 0,95 ppm (3H, Me-29 e -30). O hidrogênio carbinólico H-3 foi atribuído ao duplo duplete em 3,14 ppm (1H, dd). O tripleto em 5,17 ppm (1H, t, H-12) é conferido ao hidrogênio olefínico H-12. Os sinais em 2,16 ppm (1H, d), 1,81 ppm (1H, dd) são atribuídos aos hidrogênios metínicos H-18 e H-19, respectivamente. Os dados acima descritos juntamente com o deslocamento químico dos carbonos olefínicos com deslocamento químico de 125,5 ppm (C-12) e 138,1 ppm (C-13), permitem sugerir um esqueleto tipo ursano a este composto.

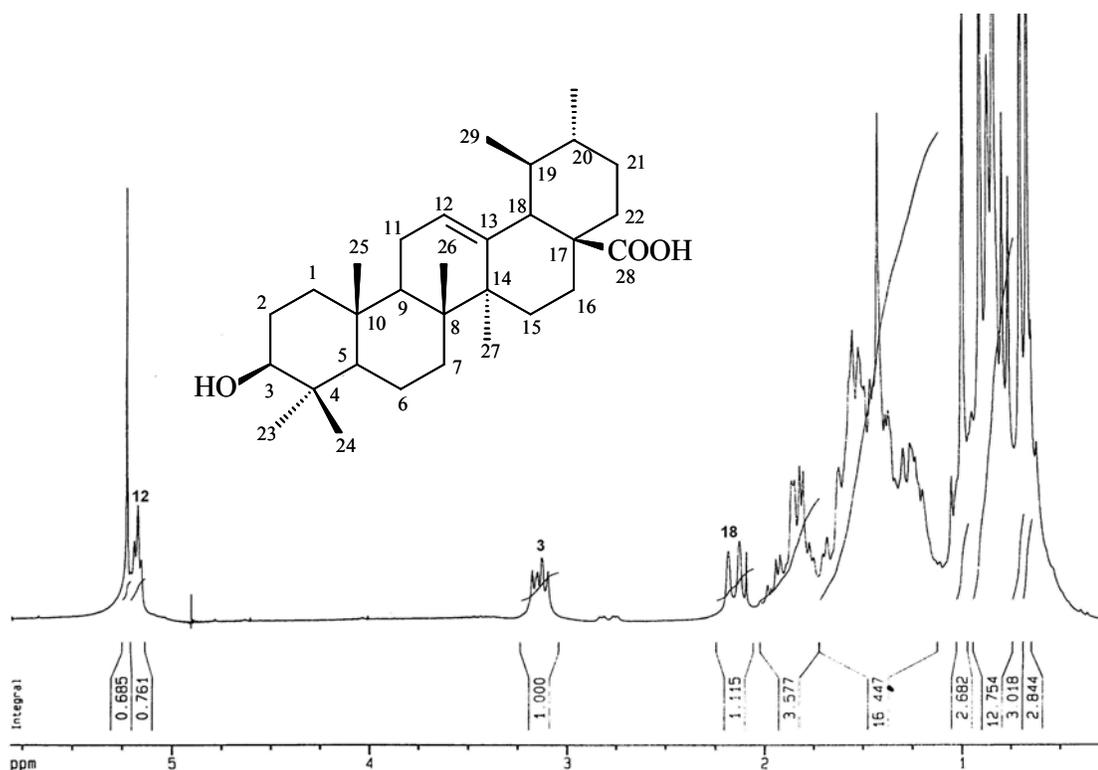


Figura 16- Espectro de RMN de ^1H de ácido ursólico (**36**), em CDCl_3 , a 400.13MHz.

Os espectros de RMN de ^{13}C (Figura 17) e DEPT 135° (Figura 18) permitem confirmar a estrutura **33**, através da atribuição dos sinais aos respectivos carbonos.

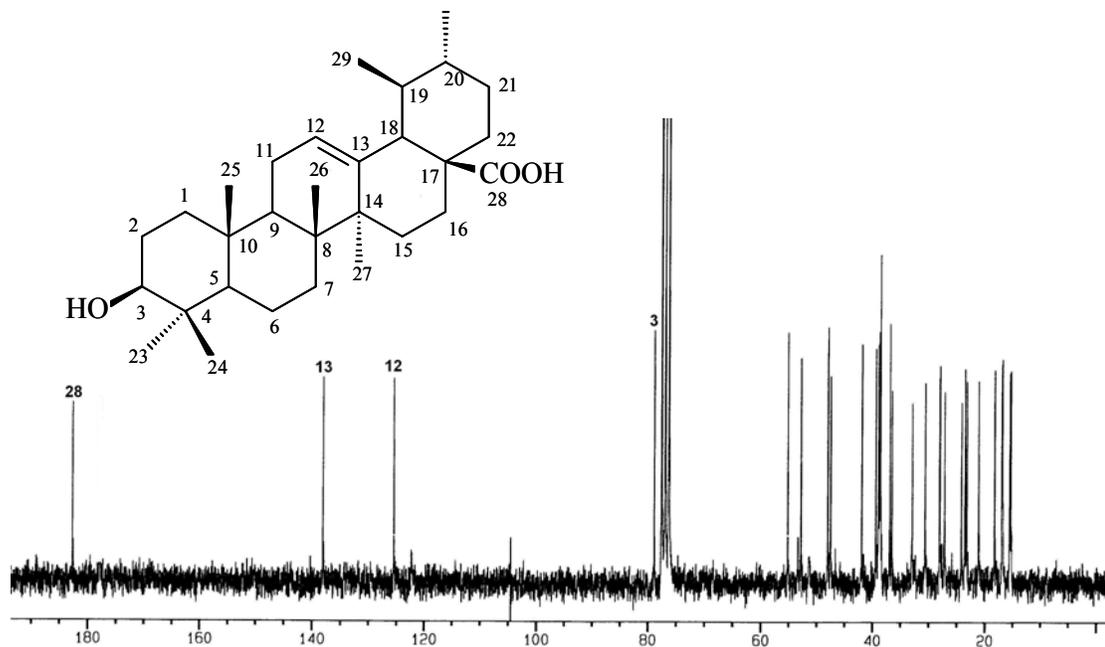


Figura 17- Espectro de RMN de ^{13}C de ácido ursólico (**36**), em CDCl_3 , a 400.13MHz.

O espectro DEPT 135° mostrou 14 sinais com a amplitude positiva (carbonos metílicos e metínicos) e 9 sinais com amplitude negativa (carbonos metilênicos), ficando evidente que 7 carbonos desidrogenados também fazem parte da estrutura, pois não aparecem no espectro de DEPT 135°. A identificação desses sinais, em RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT 135°, e comparação em CCD com amostra autêntica, permitiram confirmar a estrutura **33**, que corresponde ao ácido 3 β -hidróxi-urs-12-eno-28-óico (ácido ursólico)⁴⁸.

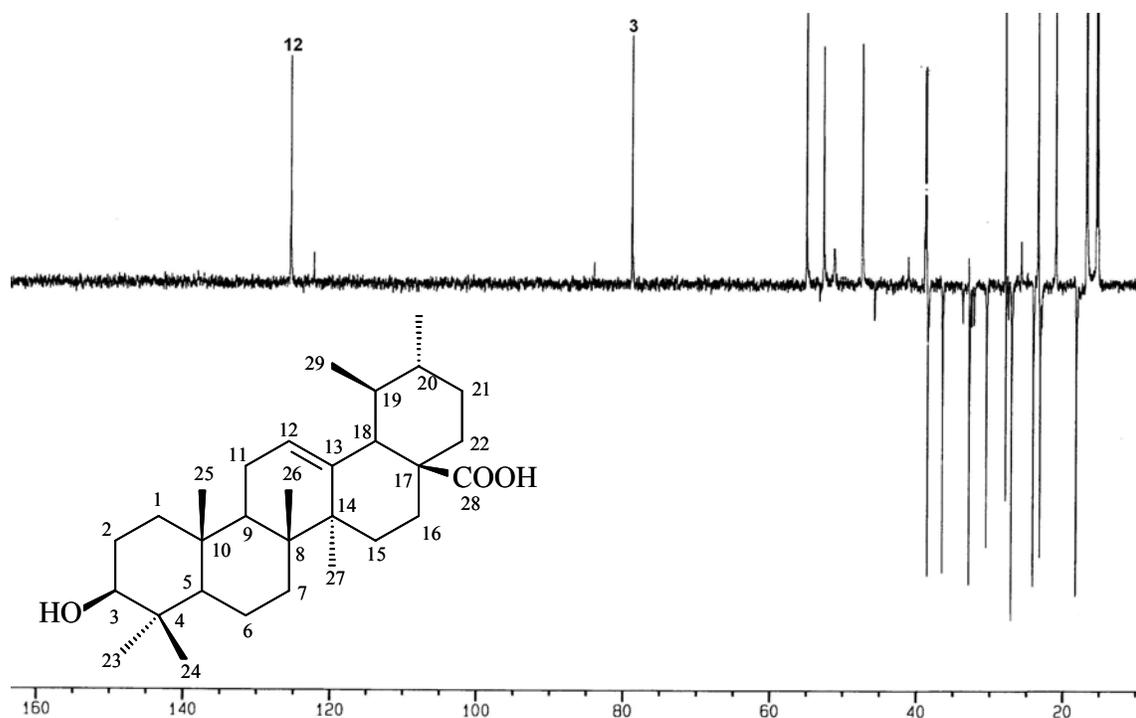


Figura 18- Espectro DEPT 135° de ácido ursólico (**36**), em CDCl_3 , a 400.13MHz.

Na Tabela 12 temos a comparação dos dados de RMN ^{13}C obtidos experimentalmente e os da literatura.

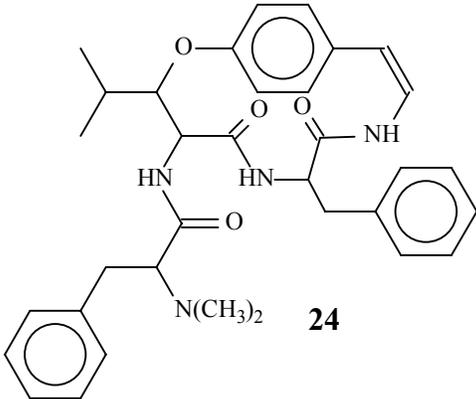
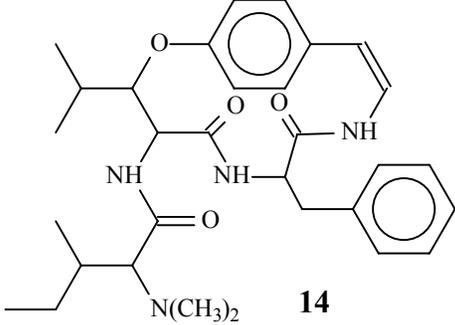
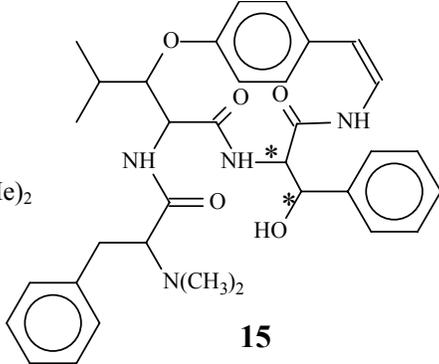
Tabela 12- Dados de RMN de ^{13}C de ácido ursólico (**36**)

Posição	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) de 35 determinados (CDCl_3)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) de 35 da literatura ⁴⁵
1	38,6	38,4
2	27,2	27,0
3	78,9	77,0
4	38,7	38,4
5	55,2	54,9
6	18,2	18,1
7	32,9	32,8
8	39,4	39,2
9	47,1	47,1
10	36,9	36,6
11	23,2	22,9
12	125,5	124,7
13	138,1	138,1
14	41,9	41,7
15	28,0	27,7
16	24,2	23,9
17	47,0	46,9
18	52,8	52,5
19	38,8	38,6
20	39,0	38,6
21	30,6	30,4
22	36,6	36,4
23	28,1	28,2
24	15,5	16,0
25	15,4	15,3
26	16,8	16,9
27	23,5	23,3
28	180,0	179,1
29	16,9	17,0
30	21,1	21,1

5.1.2.1.1.2- Metabólitos identificados da fração diclorometano

Como descrito na parte experimental, a fração diclorometano da casca da raiz de *S. buxifolia* foi a que mostrou a presença de alcalóides (teste positivo para Dragendorff). Inicialmente optou-se por comparar este extrato com amostras de alcalóides padrão do nosso laboratório, isolados anteriormente da casca do tronco da mesma espécie. Por análise em CCD comparativa, pode-se observar a presença dos alcalóides Scutianina – B (**24**), -C (**14**) e –D (**15**) (Quadro 1, Pág. 83). Como são alcalóides já existentes no laboratório, optou-se por não isolá-los, e apenas identificá-los nesta parte da planta.

Quadro 1- Alcalóides ciclopeptídicos identificados por CCD da casca da raiz de *Scutia buxifolia*

ALCALÓIDES	PF °C (Lit.)	ESTRUTURA
Scutianina-B ²⁴ $C_{34}H_{40}N_4O_4$	248-250	 <p style="text-align: center;">24</p>
Scutianina-C ²² $C_{31}H_{42}N_4O_4$	267-268	 <p style="text-align: center;">14</p>
Scutianina-D ²³ $C_{34}H_{40}N_4O_5$	219-220	 <p>* treo,L L-Phe(Me)₂</p> <p style="text-align: center;">15</p>

5.2- Atividade antimicrobiana

Um dos objetivos deste trabalho foi o estudo da atividade antimicrobiana de alguns alcalóides encontrados em espécies de plantas medicinais do Rio Grande do Sul, assim como o estudo dos respectivos extratos e frações que deram origem a estes metabólitos. Além disso, objetivou-se realizar um estudo para correlacionar estrutura-atividade dos metabólitos selecionados. Para isso, utilizamos as duas espécies de plantas estudadas neste trabalho: *Scutia buxifolia* e *Condalia buxifolia*. Da espécie *Scutia buxifolia* foram selecionadas as seguintes substâncias: scutianinas-B (**24**), -C (**14**), -D (**15**), -E (**16**), -F (**18**), -M (**37**) e o ciclopeptídeo neutro, scutianeno-D (**38**). Todas estas substâncias já haviam sido isoladas anteriormente em nosso grupo, da casca do caule de *Scutia buxifolia*⁴⁷. Interessante neste estudo é que os alcalóides scutianina -D e -E são duas estruturas diastereoisoméricas, enquanto que a estrutura do componente neutro scutianeno-D (**38**), apresenta uma estrutura semelhante à de scutianina-D (**15**), com a diferença da ausência do grupo básico $-N(CH_3)_2$. Além disso, o interesse em se comparar o alcalóide ciclopeptídico condalina-A (**22**), isolado da casca da raiz de *Condalia buxifolia*, se deveu a que o mesmo trata-se de um diastereoisômero de scutianina M (**37**), isolada das cascas do tronco de *Scutia buxifolia*. Além disso, utilizou-se nas análises, os alcalóides scutianinas -B (**24**), -C (**14**) e -F (**18**), não por suas estereoquímicas, mas por apresentarem em suas estruturas a unidade β -hidroxileucina em vez de β -fenilserina. Portanto, podemos desta maneira, analisar a influência do β -hidroxiaminoácido, a posição deste aminoácido na estrutura, a estereoquímica dos aminoácidos formadores da estrutura dos alcalóides, e influência do grupo básico na atividade desta classe de metabólitos naturais, que apresentam um sistema “ansa” de 14 membros. Importante ressaltar que um estudo deste tipo ainda não havia sido realizado anteriormente.

Para este estudo, utilizaram-se microrganismos que representam as principais bactérias que fazem parte do grupo das infecções oportunistas, aparecendo frequentemente em pacientes imuno comprometidos, como: Bactérias Gram positivas [*Staphylococcus aureus* (Sa), *Staphylococcus epidermidis* (Se), ATCC 12228] e Gram negativas [*Klebsiella pneumoniae* (Kp), ATCC 10031, *Salmonella setubal* (Ss), ATCC 19196, *Escherichia coli* (Ec), ATCC 11103] e os fungos *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), ATCC 2601 e *Cândida albicans* (Ca) ATCC 10231.

O método selecionado foi o método da bioautografia segundo Rahalison e colaboradores⁴¹, por ser um método bem sucedido em nossos laboratórios, e por necessitar uma

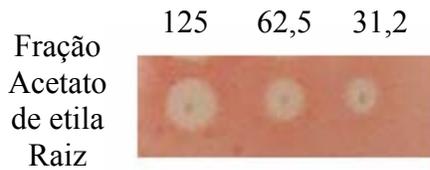


Figura 19 - Quantidade Mínima (31,2µg) para a inibição de *Escherichia coli*, para a fração acetato de etila da casca da raiz de *C. buxifolia* sobre CCD.

Dos metabólitos isolados na espécie *C. buxifolia*, apenas condalina-A (**22**) apresentou atividade antimicrobiana conforme pode ser visualizado na Tabela 15, e na figura 20. A quantidade mínima de inibição deste metabólito foi de 3,12 µg para os microrganismos *Staphylococcus epidermidis* e *Klebsiella pneumoniae*, 6,25 µg para *Salmonella Setubal* e *Escherichia coli* e 12,5 µg para *Staphylococcus aureus* e *Micrococcus luteus*. Para os fungos não foi ativa. Portanto, a atividade encontrada para os extratos obtidos das raízes pode ser devido a outros metabólitos, além de condalina-A, ainda não isolados, ou ao sinergismo entre metabólitos.

Tabela 15- Atividade antimicrobiana (em µg) dos metabólitos isolados de *C. buxifolia*

Material	Microrganismos							
	Sa	Se	Kp	Ss	Ec	Ml	Sc	Ca
Metabólitos isolados								
B-sitosterol (33)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Taraxerol (35)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Lupeol (34)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Condalina-A (22)	12,5	3,12	3,12	6,25	6,25	12,5	NA	NA

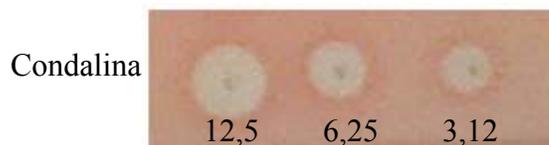


Figura 20 - Quantidade Mínima (3,12 µg) para a inibição de *Klebsiella pneumoniae*, sobre CCD.

5.2.2- Determinação da atividade antimicrobiana de *Scutia buxifolia*

Iniciou-se o estudo com a avaliação da atividade antimicrobiana das frações da casca da raiz de *S. buxifolia* contra sete diferentes microrganismos (cinco bactérias e dois fungos). Os resultados desta análise podem ser observados na Tabela 16. Observa-se que as frações hexano, acetato de etila e acetona foram ativas frente a todas as bactérias utilizadas. Já a fração diclorometano foi ativa apenas para a bactéria *S. epidermidis* na concentração de 250,0 µg. Para os fungos analisados, nenhuma fração foi ativa.

Tabela 16 - Atividade antimicrobiana (em µg) das frações da casca da raiz de *S. buxifolia*

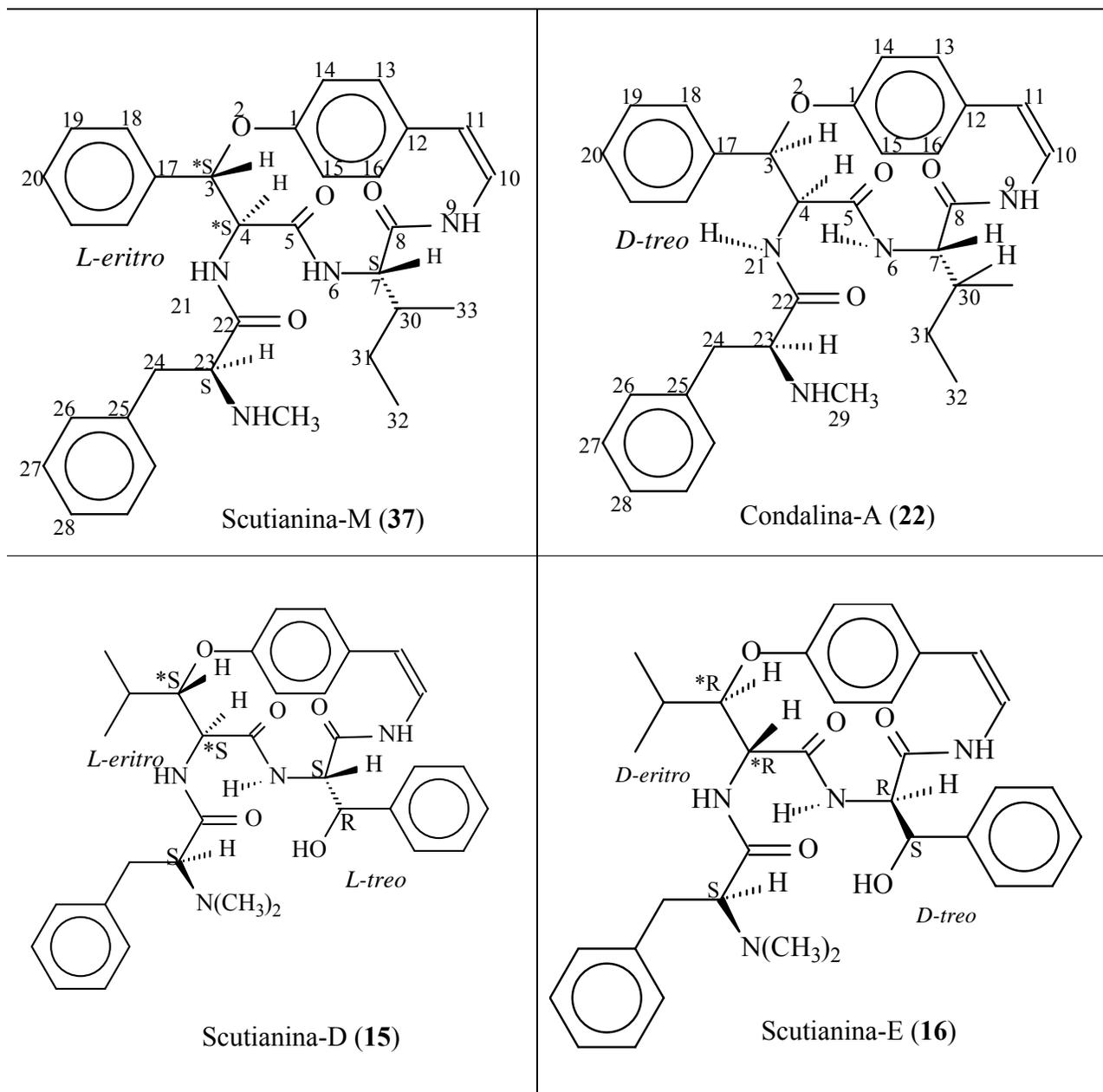
Material	Microrganismos							
	Frações	Sa	Se	Kp	Ss	Ec	Sc	Ca
Hexânica		62,5	62,5	125,0	250,0	250,0	NA	NA
Diclorometano		NA	250,0	NA	NA	NA	NA	NA
Acetato de etila		125,0	250,0	125,0	250,0	62,5	NA	NA
Acetona		62,5	31,2	62,5	125,0	31,2	NA	NA
Metanol		125	125,0	62,5	125,0	125,0	NA	NA

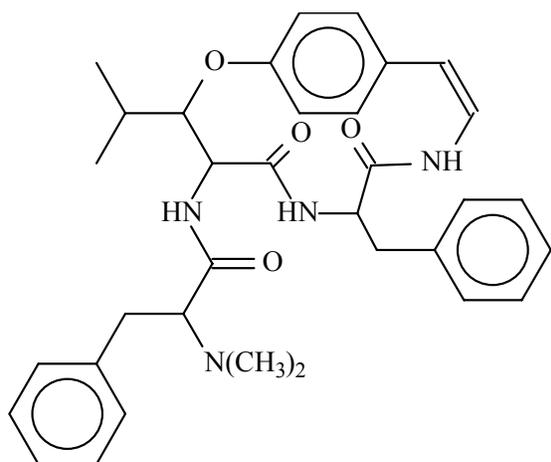
5.2.2.1- Determinação da atividade antimicrobiana dos metabólitos isolados de *Scutia buxifolia*

A determinação da atividade antimicrobiana foi testada apenas para o ácido ursólico, em diferentes concentrações, frente a bactérias Gram positivas, Gram negativas e fungos. Esta substância não foi ativa para nenhuma das cepas testadas.

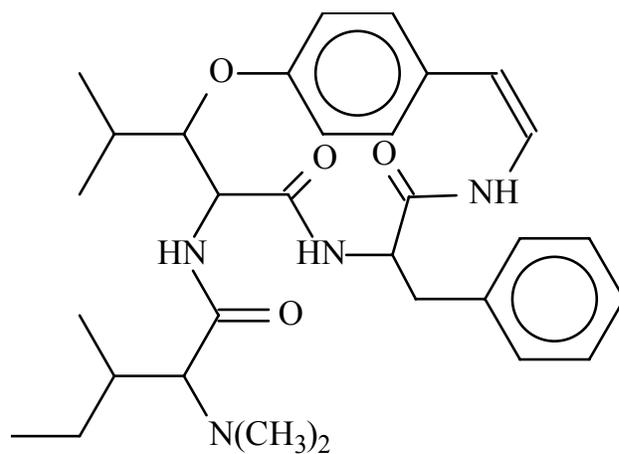
5.2.2- Determinação da atividade antimicrobiana dos alcalóides ciclopeptídicos e ciclopeptídeo neutro selecionados para comparação estrutura-atividade

Na Tabela 17 podemos observar os alcalóides ciclopeptídicos utilizados para a comparação de suas atividades.

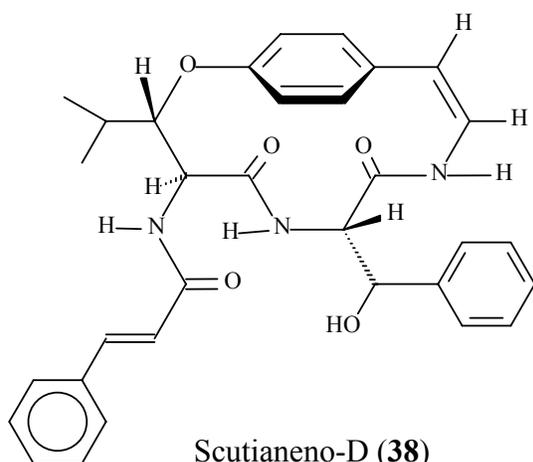
Tabela 17- Estrutura dos alcalóides utilizados para o estudo da relação estrutura-atividade



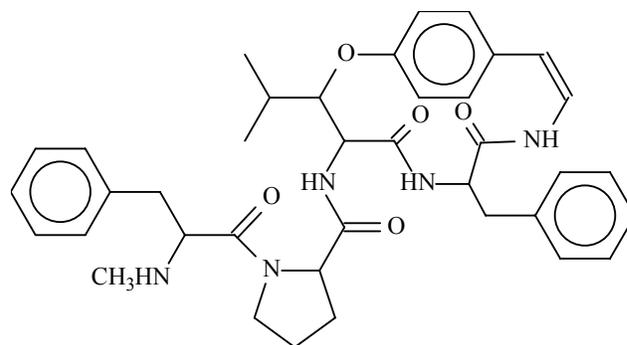
Scutianina-B (24)



Scutianina-C (14)



Scutianeno-D (38)



Scutianina-F (18)

Na tabela 18 podemos observar os resultados da atividade antimicrobiana dos metabólitos testados. Observa-se que dentre todos os compostos analisados, os que se mostraram mais ativos foram os alcalóides Condalina-A e Scutianina-E. Scutianina-D, que é um diastereoisômero de Scutianina-E, apresentou uma modesta atividade antimicrobiana frente aos microrganismos *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli*, sendo que Scutianina-M, que é um diastereoisômero de Condalina-A, não foi ativa para nenhum microrganismo. Scutianina-B apresentou atividade apenas frente ao microrganismo *E. coli* (6,25µg). Já os metabólitos Scutianina-C, -F e Scutianeno-D foram inativos para todos os microrganismos testados.

Tabela 18- Resultado da atividade antimicrobiana (em µg) dos alcalóides ciclopeptídicos testados

Material	Microrganismos					
	Sa	Se	Ml	Ss	Ec	Kp
Metabólitos						
Scutianina-B	NA	NA	NA	NA	6,25	NA
Scutianina-C	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Scutianina-D	NA	50,0	25,0	NA	50,0	NA
Scutianina-E	25,0	6,25	6,25	NA	6,25	12,5
Scutianina-F	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Scutianina-M	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Scutianeno-D	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Condalina-A	12,5	3,12	3,12	6,25	6,25	12,5

6- CONCLUSÃO

Após a avaliação fitoquímica e antimicrobiana realizada com duas espécies pertencentes à família Rhamnaceae, *Condalia buxifolia* e *Scutia buxifolia*, pode-se concluir que:

1) As espécies em estudo apresentaram constituintes químicos de diferentes classes de metabólitos: alcalóides ciclopeptídicos, triterpenóides e esteróides;

2) A investigação química da espécie *C. buxifolia* possibilitou a identificação de quatro metabólitos: condalina-A (**22**), β -sitosterol (**33**), lupeol (**34**) e taraxerol (**35**);

3) Em relação à espécie *S. buxifolia*, isolou-se dois metabólitos: ácido ursólico e β -sitosterol, e ainda permitiu a identificação de três alcalóides ciclopeptídicos: scutianina-B (**24**), scutianina-C (**14**) e scutianina-D (**38**);

4) Nos estudos de atividade antimicrobiana por bioautografia das frações e metabólitos isolados de *Condalia buxifolia* e *Scutia buxifolia*, mostraram zonas de inibição bem definidas contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, demonstrando que esta técnica é sensível e bastante eficiente na busca de substâncias antimicrobianas;

5) Com relação à análise de estrutura/atividade dos alcalóides ciclopeptídicos e ciclopeptídeo neutro pode se concluir:

I) A presença da unidade β -fenilserina é importante para a atividade antimicrobiana desta classe de alcalóides, pois pode-se observar que os alcalóides mais ativos apresentam esta unidade, ou como HO-amino ácido ou como α -aminoácido na estrutura;

II) A estereoquímica dos aminoácidos formadores da estrutura é outro fator importante nesta correlação estrutura-atividade. Podemos observar que o alcalóide condalina-A, que apresenta a unidade fenilserina em sua forma *L-treo* foi à estrutura mais ativa, enquanto que seu diastereoisômero, scutianina M, que apresenta esta unidade na forma *L-eritro*, foi totalmente inativa. Outro exemplo são os dois diastereoisômeros, scutianinas-D e -E,

cujas diferenças configuracionais se encontram nas duas unidades de aminoácidos formadores do sistema *ansa* do macrociclo;

III) Scutianina-E, que apresenta o aminoácido fenilserina em sua forma *D-treo* foi mais ativo que seu diastereoisômero scutianina-D que apresenta esta unidade na forma *L-Treo*. Este resultado sugere que a forma *D-treo* deste aminoácido confere uma maior atividade à estrutura que aquela que contém a forma *L-treo*;

IV) A presença do grupo N,N-dimetil (ou N-metil) na estrutura dos alcalóides é muito importante para este tipo de atividade. Esta afirmação pode ser demonstrada quando comparamos as análises realizadas para o alcalóide Scutianina-D e para a estrutura neutra Scutianeno-D. Observou-se que este último não apresenta nenhum tipo de atividade, se comparado com seu análogo N-dimetilado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Morel, A. F., Machado, E. C., Wessjohann, L. A., *Phytochemistry*, 39, 431-434, **1995**
- 2- Marchand, J., Mouseur, X. & Pais, M., *Ann. Pharm. Fr*, 26, 771, **1968**.
- 3- Morel, A. F., Machado, Bravo, R. V. F., Reis, F. A. M., Ruveda, E. A., *Phytochemistry* 18, 473-477, **1979**.
- 4- Shah, A. H., Ageel, A. M., Tariq, M., Mossa, M. A., Al-Yahya, M. A., *Fitoterapia*, 6, 57, **1986**.
- 5- Johnston, M. C., *Britonia*, 14, 332-338, **1962**.
- 6- Johnston, M. C., Soares, F. M. A., *Flora Ilustrada Catarinense RAMN*, 1-50, **1972**.
- 7- Bastos, N. R., *Pesquisas Botânicas*, 40, 69-84, **1989**.
- 8- Wasicky, R., Wasicky, M., *Planta Med.* 12, 13-25, **1964**.
- 9- Menezes, A. C. S., *Dissertação de Mestrado* – Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, 12, **1996**.
- 10- Gournelis, D. C., Laskaris, G. G., Verpoorte, R., *Natural Product Reports*, 82, 75, **1997**.
- 11- Tschesche, R. and Kausman, E. U., *The Alkaloids*, Vol. 15, *Manske Academic Press*, New York, N. Y., 165-205, **1975**.
- 12- Marchand, J., Pais, M., Mouseur, X; and Jarreau, F. X., *Tetrahedron*, 25, 937, **1969**.
- 13- Itokawa, H., Takeya, K., Hitotsuyanagi, Y., and Morita, H., *The Alkaloids*, 49, 301-313, **1997**.
- 14- Tschesche, R. Und Last, H., *Tetrahedron*, (25), 1993-2998, **1968**.
- 15- Gehrke, I. T. S., *Dissertação de Mestrado* – Universidade Federal de Santa Maria, UFSM **1998**.
- 16- Tschesche, R., Wilhem, H. & Fehlhaber, *Tetrahedron Lett.*, (26), 2609-2612, **1972**.
- 17- Tschesche, R., Welters, R., Fehlhaber, H. W., *Chem. Ber.*, 100, 323-334, **1967**.
- 18- Gonzalez, M. S., Mascaretti, O. A., Merkuza, V. M., *Phytochemistry*, 13, 2865-2860, **1974**.
- 19- Tschesche, R. und Ammermann, E., *Chem. Ber*, 107, 2274-2283, **1974**.
- 20- Tschesche, R., Hilledrand, D., *Phytochemistry*, 16, 1025-1028, **1977**.
- 21- Tschesche, R., Hilledrand, D., *Phytochemistry*, 16, 1817, **1977**.

-
- 22- Morel, A. F., Menezes, A. S., Mostardeiro, M. A., and Zanatta, N., *Phytochemistry*, 38, (03), 783-786, **1995**.
- 23- Morel, A. F., Machado, E. C. S., Moreira, J. J., Menezes, A. S., Mostardeiro, M. A., Zanatta, N., *Phytochemistry*, 47, (01), 125-129, **1998**.
- 24- Morel, A. F., Araújo, C. A., Silva, U. F., Hoelzel, S. C. S. M., Záchia, R., Bastos, N. R., *Phytochemistry*, 61, 561-566, **2002**.
- 25- Morel, A. F., Gehrke, I. T. S., Mostardeiro, M. A., Ethur, E. M., Zanatta, N., Machado, E. C. M., *Phytochemistry*, 51, 473-477, **1999**.
- 26- Morel, A. F., Flach, A., Zanatta, N., Ethur, E. M., Mostardeiro, M. A.; Gehrke, I. T. S., *Tetrahedron Lett.*, 40, 9205-9209, **1999**.
- 27- Giacomelli, S. R., Maldaner, G., Gonzaga, W. A., Garcia, C. M., Silva, U. F., Calcol, I. I., and Morel, A. F., *Phytochemistry*, 65, 933-937, **2004**.
- 28- Tschesche, R., David, S. T., Zerbes, R., Radloff, M. V., Kaussmann, E. U., and Eckhardt, G., *Liebigs Ann. Chem.*, 1915, **1974**.
- 29- Blanpin, O., Pais, M. and Quevauviller, M., *Ann. Pharm. Fr.*, 21, 147, **1963**.
- 30- Schmidt, U., Lieberknecht, A., and Haslinger, E., Ed. Brossi, A., *Academis Press*, New York 26, 299, **1982**.
- 31- Bhat, K. L., and Joullie, M. M., *J. Chem. Educ.* 64, 21, **1987**.
- 32- Joullie, M. M., Nutt, R. F., *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives*, Ed. Pelletir, Wiley, New York 3, 113, **1984**.
- 33- Tschesche, R., Wilhelm, H., Kaussmsnn, E. U., Eckhardt, G., *Liebigs Ann. Chem*, 1694, **1974**.
- 34- Wonhoff, E. W., *Fortschr. Chem. Org. Naturst.*, 28, 163, **1970**.
- 35- Pandey, V. B., and Devi, S., *Planta Med.* 56, 649, **1990**.
- 36- Kawai, K., Nozawa, Y., Ogihara, Y., *Experientia* 33, 27, **1977**.
- 37- Sierra, G. M.; Mascaretti, O. A.; Dias, F. J.; Ruveda, E. V., Chang, C. J., Hagamam, E. W., and Wenkert, E., *J. Chem. Soc. Chem. Commun*, 915, **1972**.
- 38- Silva, U. F.; Cardoso, C. D.; Zanatta, N.; Morel, A. F., *Phytochemical Analysis*, 7, 20, **1996**.
- 39- Hennig, P. *Tese de doutoramento*. Universidade de Tübingeu, **1985**.
- 40- *Food and Drugs Administration: Code of Federal Regulations*, Cap. 21, 300, **1991**.

-
- 41- Rahalison, L., Hamburger, M., Hostettmann, K., Monod, M., FrenK, E. *Phytochemical Analysis* 2, 199, **1991**.
- 42- Saxena, G., Farmer. S., Towers, G.H.N., Hancock, R.E.W., *Phytochemical Analysis* 6, 125, **1995**.
- 43- Porter, R., Reese, P. B., Williams, L., Williams, D., *Phytochemistry* 40, 735, **1995**.
- 44- Reynolds, W. F., Mclean, S., Poplawski, J., Enriquez. R. G., Escobar, L. I. *Tetrahedron* 42, 3419, **1996**.
- 45- Sakuri, N., Yaguchi, Y., Inoue, T., *Phytochemistry*, 26, 217, **1987**.
- 46- Akihisa, T., Thakur, S., Rosenstein, F. U., Matsumoto, T., *Lipids*, 21, 727, **1982**.
- 47- Missau, F. C., *Dissertação de Mestrado* – Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, **2003**.
- 48- Porter, R., Reese, P. B., Williams, D., *Phytochemistry* 40, 735, **1995**.

