

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

**ALCALOIDES CICLOPEPTÍDICOS DE *Scutia  
buxifolia* E SUAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANAS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Patrícia Marangon**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2014**

# **ALCALOIDES CICLOPEPTÍDICOS DE *Scutia buxifolia* E SUAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANAS**

**Patrícia Marangon**

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

**Orientador: Prof. Dr. Ademir Farias Morel**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2014**

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

Marangon, Patrícia  
Alcaloides ciclopeptídicos de *Scutia buxifolia* e suas  
atividades antimicrobianas / Patrícia Marangon.-2014.  
143 p.; 30cm

Orientador: Ademir Farias Morel  
Coorientadores: Ionara Irion Dalcol, Graciela Maldaner  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de  
Pós-Graduação em Química, RS, 2014

1. Alcaloides ciclopeptídicos 2. *Scutia buxifolia* 3.  
Atividade antimicrobiana I. Farias Morel, Ademir II.  
Irion Dalcol, Ionara III. Maldaner, Graciela IV. Título.

**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**

**ALCALOIDES CICLOPEPTÍDICOS DE *Scutia buxifolia* E SUAS  
ATIVIDADES ANTIMICROBIANAS**

elaborada por  
**Patrícia Marangon**

como requisito parcial para a obtenção do grau de  
**Mestre em Química**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**Ademir Farias Morel, Dr.**  
(Presidente/Orientador)

---

**Eduardo Miranda Ethur, Dr. (UNIVATES)**

---

**Marco Aurélio Mostardeiro, Dr. (UFSM)**

Santa Maria, 29 de abril de 2014.

*A meus pais, Célio e Inês,  
pelo apoio, carinho e incentivo  
em todos os momentos.*

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Ademir Farias Morel pela orientação, confiança e ensinamentos.

Aos professores Eduardo Miranda Ethur e Marco Aurélio Mostardeiro pela participação e colaboração como banca examinadora.

À professora Graciela Maldaner pela amizade, ensinamentos durante a iniciação científica e colaboração no processo de qualificação.

A minha família e amigos pelo apoio, ajuda e amizade sempre prestados.

Aos colegas e amigos do NPPN: Adriana, Adriano, Alexandre, Denise, Eveline, Frederico, Gabriele, Janice, João, Liziane, Luciana, Marcelo, Mateus, Sabrina e Tanize pela convivência, ajuda, incentivo e momentos de descontração.

A Marcelo, Vinicius e professor Marco Aurélio pela confecção dos espectros de ressonância magnética nuclear.

Ao Alexandre pela realização das atividades antimicrobianas.

À Janice pela ajuda prestada e principalmente pela amizade.

Ao funcionário Ubiratan pela realização das análises de cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas de alta resolução.

Aos funcionários da Pós-Graduação em Química, Ademir e Valéria, que colaboraram para a realização desse trabalho.

A CAPES pelo apoio financeiro.

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

*“Não me deem fórmulas certas,  
porque eu não espero acertar sempre.  
Não me mostrem o que esperam de mim,  
porque vou seguir meu coração.  
Não me façam ser quem não sou.  
Não me convidem a ser igual,  
porque sinceramente sou diferente.  
Não sei amar pela metade.  
Não sei viver de mentira.  
Não sei voar de pés no chão.  
Sou sempre eu mesma,  
mas com certeza não serei  
a mesma pra sempre.”*

*(Clarice Lispector)*

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Química  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

### **ALCALOIDES CICLOPEPTÍDICOS DE *Scutia buxifolia* E SUAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANAS**

Autora: Patrícia Marangon  
Orientador: Ademir Farias Morel  
Data e local da defesa: Santa Maria, 29 de abril de 2014.

A investigação fitoquímica das cascas do caule da espécie *Scutia buxifolia* (Rhamnaceae) levou ao isolamento de quatro alcaloides ciclopeptídicos: scutianina C (**14**) e três diastereoisômeros de scutianina H (**19**), isolados e identificados pela primeira vez, codificados como P06, P11 e P12 e denominados scutianinas -N (**37**), -O (**38**) e -P (**39**), respectivamente. Os metabólitos tiveram suas estruturas elucidadas com base em dados espectrais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  uni e bidimensionais e espectrometria de massas de alta resolução. Os alcaloides diastereoisoméricos P06, P11 e P12 tiveram a estereoquímica do  $\beta$ -hidroxiaminoácido ( $\beta$ -hidroxileucina) estabelecida a partir de dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  pelas constantes de acoplamento entre H-3/H-4 e deslocamentos químicos de C-3 e C-4. Pela técnica de NOESY foram verificadas as correlações espaciais dos hidrogênios e sugeridas as estereoquímicas para a unidade fenilserina. O extrato bruto, as frações ácidas e básicas e os compostos isolados foram testados quanto a sua atividade antimicrobiana e todos demonstraram potencial antimicrobiano.

**Palavras-chave:** Alcaloides ciclopeptídicos. *Scutia buxifolia*. Rhamnaceae. Atividade antimicrobiana.



## ABSTRACT

Master Dissertation  
Post-Graduate Course in Chemistry  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

### CYCLOPEPTIDE ALKALOIDS FROM *Scutia buxifolia* AND THEIR ANTIMICROBIAL ACTIVITIES

Author: Patrícia Marangon

Advisor: Ademir Farias Morel

Date and place of the defense: Santa Maria, April 29th, 2014.

The phytochemical investigation of the stem bark of the specie *Scutia buxifolia* (Rhamnaceae) led to the isolation of four cyclopeptide alkaloids: scutianine C (**14**) and three diastereoisomer of scutianine H (**19**), isolated and identified for the first time, coded as P06, P11 and P12 and called scutianines -N (**37**), -O (**38**) and -P (**39**), respectively. The metabolites had their structures elucidated on the basis of spectral data  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR uni and bidimensional and high resolution mass spectrometry. The diastereoisomeric alkaloids P06, P11 and P12 had the stereochemistry of  $\beta$ -hydroxyamino acid ( $\beta$ -hidroxileucine) established from data  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR by the coupling constants between H-3/H-4 and chemical shifts of C-3 and C-4. By NOESY technique spatial correlations of the hydrogens were verified and suggested stereochemical for phenylserine unit. The crude extract, the acidic and basic fractions and isolated compounds were tested as to their antimicrobial activity and all demonstrated antimicrobial potential.

**Keywords:** Cyclopeptide alkaloids. *Scutia buxifolia*. Rhamnaceae. Antimicrobial activity.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - (a) <i>Scutia buxifolia</i> ; (b) Parte aérea de <i>Scutia buxifolia</i> .....	23
FIGURA 2 - Estrutura geral dos alcaloides ciclopeptídicos .....	25
FIGURA 3 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de P02, scutianina C ( <b>14</b> ), em DMSO, a 400,13 MHz .....	57
FIGURA 4 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ expandido (0,50-2,75 ppm) de P02, scutianina C ( <b>14</b> ), em DMSO, a 400,13 MHz .....	58
FIGURA 5 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ expandido (4,00-5,00 ppm) de P02, scutianina C ( <b>14</b> ), em DMSO, a 400,13 MHz. ....	59
FIGURA 6 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ expandido (5,90-8,20 ppm) de P02, scutianina C ( <b>14</b> ), em DMSO, a 400,13 MHz .....	60
FIGURA 7 - Espectro de RMN 2D, COSY, de P02, scutianina C ( <b>14</b> ), em DMSO, a 400,13 MHz .....	61
FIGURA 8 - Espectro de RMN 2D, COSY, expandido (0,50-5,00 ppm) de P02, scutianina C ( <b>14</b> ), em DMSO, a 400,13 MHz .....	62
FIGURA 9 - Espectro de RMN 2D, COSY, expandido (4,00-8,00 ppm) de P02, scutianina C ( <b>14</b> ), em DMSO, a 400,13 MHz .....	63
FIGURA 10 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de P02, scutianina C ( <b>14</b> ), em DMSO, a 100,62 MHz .....	64
FIGURA 11 - Espectro de massas de alta resolução de P02, scutianina C ( <b>14</b> ).....	65
FIGURA 12 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de P06, scutianina N ( <b>37</b> ), em $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz .....	68
FIGURA 13 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ expandido (0,75-2,75 ppm) de P06, scutianina N ( <b>37</b> ), em $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz .....	69
FIGURA 14 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ expandido (4,30-5,10 ppm) de P06, scutianina N ( <b>37</b> ), em $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz .....	70
FIGURA 15 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ expandido (6,25-7,40 ppm) de P06, scutianina N ( <b>37</b> ), em $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz .....	71

FIGURA 16 - Espectro de RMN 2D, COSY, de P06, scutianina N ( <b>37</b> ), em CDCl <sub>3</sub> , a 600,13 MHz.....	71
FIGURA 17 - Espectro de RMN 2D, COSY, expandido (1,00-5,00 ppm) de P06, scutianina N ( <b>37</b> ), em CDCl <sub>3</sub> , a 600,13 MHz .....	73
FIGURA 18 - Espectro de RMN 2D, COSY, expandido (4,25-7,50 ppm) de P06, scutianina N ( <b>37</b> ), em CDCl <sub>3</sub> , a 600,13 MHz .....	73
FIGURA 19 - Espectro de RMN de <sup>13</sup> C de P06, scutianina N ( <b>37</b> ), em CDCl <sub>3</sub> , a 150,91 MHz.....	74
FIGURA 20 - Espectro de RMN de <sup>13</sup> C expandido (10,0-86,0 ppm) de P06, scutianina N ( <b>37</b> ), em CDCl <sub>3</sub> , a 150,91 MHz .....	75
FIGURA 21 - Espectro de RMN de <sup>13</sup> C expandido (120,0-174,0 ppm) de P06, scutianina N ( <b>37</b> ), em CDCl <sub>3</sub> , a 150,91 MHz. ....	76
FIGURA 22 - Espectro de RMN 2D, HMQC, expandido de P06, scutianina N ( <b>37</b> ), em CDCl <sub>3</sub> , a 600,13 MHz .....	77
FIGURA 23 - Espectro de RMN 2D, HMQC, expandido de P06, scutianina N ( <b>37</b> ), em CDCl <sub>3</sub> , a 600,13 MHz .....	77
FIGURA 24 - Espectro de RMN de HMQC expandido de P06, scutianina N ( <b>37</b> ), em CDCl <sub>3</sub> , a 600,13 MHz .....	78
FIGURA 25 - Espectro de RMN 2D, HMBC, expandido de P06, scutianina N ( <b>37</b> ), em CDCl <sub>3</sub> , a 600,13 MHz .....	79
FIGURA 26 - Espectro de RMN 2D, HMBC, expandido de P06, scutianina N ( <b>37</b> ), em CDCl <sub>3</sub> , a 600,13 MHz .....	79
FIGURA 27 - Espectro de massas de alta resolução de P06, scutianina N ( <b>37</b> ).....	80
FIGURA 28 - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H de P11, scutianina O ( <b>38</b> ), em CDCl <sub>3</sub> , a 600,13 MHz.....	83
FIGURA 29 - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H expandido (0,75-2,90 ppm) de P11, scutianina O ( <b>38</b> ), em CDCl <sub>3</sub> , a 600,13 MHz.....	84
FIGURA 30 - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H expandido (4,10-4,98 ppm) de P11, scutianina O ( <b>38</b> ), em CDCl <sub>3</sub> , a 600,13 MHz.....	85

FIGURA 31 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ expandido (6,20-7,70 ppm) de P11, scutianina O ( <b>38</b> ), em $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz.....	86
FIGURA 32 - Espectro de RMN 2D, COSY, expandido (1,00-5,00 ppm) de P11, scutianina O ( <b>38</b> ), em $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz.....	87
FIGURA 33 - Espectro de RMN 2D, COSY, expandido (4,00-8,00 ppm) de P11, scutianina O ( <b>38</b> ), em $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz.....	88
FIGURA 34 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de P11, scutianina O ( <b>38</b> ), em $\text{CDCl}_3$ , a 150,91 MHz.....	89
FIGURA 35 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ expandido (10,0-95,0 ppm) de P11, scutianina O ( <b>38</b> ), em $\text{CDCl}_3$ , a 150,91 MHz.....	90
FIGURA 36 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ expandido (120,0-174,0 ppm) de P11, scutianina O ( <b>38</b> ), em $\text{CDCl}_3$ , a 150,91 MHz.....	91
FIGURA 37 - Espectro de RMN 2D, HMQC, expandido de P11, scutianina O ( <b>38</b> ), em $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz.....	92
FIGURA 38 - Espectro de RMN 2D, HMQC, expandido de P11, scutianina O ( <b>38</b> ), em $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz.....	92
FIGURA 39 - Espectro de RMN 2D, HMQC, expandido de P11, scutianina O ( <b>38</b> ), em $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz.....	93
FIGURA 40 - Espectro de RMN 2D, HMBC, expandido de P11, scutianina O ( <b>38</b> ), em $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz.....	94
FIGURA 41 - Espectro de RMN 2D, HMBC, expandido de P11, scutianina O ( <b>38</b> ), em $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz.....	94
FIGURA 42 - Espectro de massas de alta resolução de P11, scutianina O ( <b>38</b> ).....	95
FIGURA 43 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de P12, scutianina P ( <b>39</b> ), em $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz.....	98
FIGURA 44 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ expandido (0,80-2,40 ppm) de P12, scutianina P ( <b>39</b> ), em $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz.....	99
FIGURA 45 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ expandido (4,25-5,25 ppm) de P12, scutianina P ( <b>39</b> ), em $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz.....	100

FIGURA 46 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ expandido (6,15-7,30 ppm) de P12, scutianina P ( <b>39</b> ), em $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz. ....	101
FIGURA 47 - Espectro de RMN 2D, COSY, expandido (0,75-2,50 ppm) de P12, scutianina P ( <b>39</b> ), em $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz .....	102
FIGURA 48 - Espectro de RMN 2D, COSY, expandido (1,80-5,30 ppm) de P12, scutianina P ( <b>39</b> ), em $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz .....	103
FIGURA 49 - Espectro de RMN 2D, COSY, expandido (4,10-7,50 ppm) de P12, scutianina P ( <b>39</b> ), em $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz .....	104
FIGURA 50 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de P12, scutianina P ( <b>39</b> ), em $\text{CDCl}_3$ , a 150,91 MHz. ....	105
FIGURA 51 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ expandido (120,0-140,0 ppm) de P12, scutianina P ( <b>39</b> ), em $\text{CDCl}_3$ , a 150,91 MHz .....	105
FIGURA 52 - Espectro de RMN 2D, HMQC, expandido de P12, scutianina P ( <b>39</b> ), em $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz .....	106
FIGURA 53 - Espectro de RMN 2D, HMQC, expandido de P12, scutianina P ( <b>39</b> ), em $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz .....	107
FIGURA 54 - Espectro de RMN 2D, HMQC, expandido de P12, scutianina P ( <b>39</b> ), em $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz .....	107
FIGURA 55 - Espectro de RMN 2D, HMBC, expandido de P12, scutianina P ( <b>39</b> ), em $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz .....	108
FIGURA 56 - Espectro de RMN 2D, HMBC, expandido de P12, scutianina P ( <b>39</b> ), em $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz .....	109
FIGURA 57 - Espectro de massas de alta resolução de P12 scutianina P ( <b>39</b> ) .....	110
FIGURA 58 - Cromatogramas obtidos por CLAE em gradiente de $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$ com fluxo de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , $\lambda=260 \text{ nm}$ . (a) Alcaloide P06. (b) Alcaloide P11. (c) Alcaloide P12 .....	113
FIGURA 59 - Comparação dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ expandidos (0,80-1,50 ppm) em $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz. (a) Alcaloide P06. (b) Alcaloide P11. (c) Alcaloide P12 .....	116

FIGURA 60 - Comparação dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ expandidos (1,40-3,00 ppm) em $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz. (a) Alcaloide P06. (b) Alcaloide P11. (c) Alcaloide P12 .....	117
FIGURA 61 - Comparação dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ expandidos (4,00-5,20 ppm) em $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz. (a) Alcaloide P06. (b) Alcaloide P11. (c) Alcaloide P12 .....	118
FIGURA 62 - Comparação dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ expandidos (6,00-7,80 ppm) em $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz. (a) Alcaloide P06. (b) Alcaloide P11. (c) Alcaloide P12 .....	119
FIGURA 63 - Comparação dos espectros de RMN de $^{13}\text{C}$ expandidos (50,0-90,0 ppm) em $\text{CDCl}_3$ , a 150,91 MHz. (a) Alcaloide P06. (b) Alcaloide P11. (c) Alcaloide P12 .....	120
FIGURA 64 - Comparação dos espectros de RMN de $^{13}\text{C}$ expandidos (136,0-182,0 ppm) em $\text{CDCl}_3$ , a 150,91 MHz. (a) Alcaloide P06. (b) Alcaloide P11. (c) Alcaloide P12 .....	121
FIGURA 65 - Espectro de RMN 2D, NOESY, expandido (0,60-5,40 ppm) de P06, scutianina N ( <b>37</b> ), em $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz .....	123
FIGURA 66 - Espectro de RMN 2D, NOESY, expandido (4,00-7,50 ppm) de P06, scutianina N ( <b>37</b> ), em $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz .....	124
FIGURA 67 - Espectro de RMN 2D, NOESY, expandido (0,60-5,00 ppm) de P11, scutianina O ( <b>38</b> ), em $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz .....	126
FIGURA 68 - Espectro de RMN 2D, NOESY, expandido (4,00-7,90 ppm) de P11, scutianina O ( <b>38</b> ), em $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz .....	127
FIGURA 69 - Espectro de RMN 2D, NOESY, expandido (0,40-5,60 ppm) de P12, scutianina P ( <b>39</b> ), em $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz .....	129
FIGURA 70 - Espectro de RMN 2D, NOESY, expandido (4,00-7,50 ppm) de P12, scutianina P ( <b>39</b> ), em $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz .....	130

## LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1 - Fracionamento do extrato bruto de <i>Scutia buxifolia</i> .....	46
---	----

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Alcaloides ciclopeptídicos de catorze membros isolados de <i>Scutia buxifolia</i> .....	34
TABELA 2 - Separação em coluna cromatográfica da fração etérea básica de <i>Scutia buxifolia</i> .....	47
TABELA 3 - Microrganismos indicadores .....	52
TABELA 4 - Meios de cultura empregados .....	53
TABELA 5 - Rendimento das frações ácidas e básicas da espécie <i>Scutia buxifolia</i> .....	56
TABELA 6 - Dados de RMN de <sup>1</sup> H de P02, Scutianina C ( <b>14</b> ), em DMSO, a 400,13 MHz. ....	66
TABELA 7 - Dados de RMN ( <sup>1</sup> H a 600,13 MHz; <sup>13</sup> C a 150,91 MHz) de P06, Scutianina N ( <b>37</b> ), em CDCl <sub>3</sub> .....	81
TABELA 8 - Dados de RMN ( <sup>1</sup> H a 600,13 MHz; <sup>13</sup> C a 150,91 MHz) de P11, Scutianina O ( <b>38</b> ), em CDCl <sub>3</sub> .....	96
TABELA 9 - Dados de RMN ( <sup>1</sup> H a 600,13 MHz; <sup>13</sup> C a 150,91 MHz) de P12, Scutianina P ( <b>39</b> ), em CDCl <sub>3</sub> .....	111
TABELA 10 - Dados de RMN de <sup>1</sup> H de P06, P11 e P12, em CDCl <sub>3</sub> , a 600,13 MHz.....	114
TABELA 11 - Dados de RMN de <sup>13</sup> C de P06, P11 e P12, em CDCl <sub>3</sub> , a 150,91 MHz.....	115
TABELA 12 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) do extrato bruto e frações ácidas e básicas da espécie <i>Scutia buxifolia</i> , frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas, em µg.mL <sup>-1</sup> .....	133
TABELA 13 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) do extrato bruto e frações ácidas e básicas da espécie <i>Scutia buxifolia</i> , frente a fungos, em µg.mL <sup>-1</sup> .....	134
TABELA 14 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) dos compostos isolados de <i>Scutia buxifolia</i> , frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas e fungos, em µg.mL <sup>-1</sup> .....	136



## LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$\delta$	Deslocamento químico
<i>J</i>	Constante de acoplamento
ACN	Acetonitrila
ATCC	American Type Culture Collection
CC	Cromatografia em Coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLM	Concentração Letal Mínima
COSY	Correlated Spectroscopy
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
DMSO	Dimetilsulfóxido
EB	Extrato Bruto
EMAR	Espectrometria de Massas de Alta Resolução
FAB	Fração Acetato Básica
FEA	Fração Etérea Ácida
FEB	Fração Etérea Básica
FHA	Fração Hexânica Ácida
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
Hz	Hertz
m	Multiplete
MeOH	Metanol
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
Pf	Ponto de fusão
ppm	Parte por milhão
Ref.	Referência
Rf	Fator de retenção

RMN	Ressonância Magnética Nuclear
s	Simpleto
t	Tripleto
td	Tripleto de dupletos
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	21
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	22
<b>3.1 A família Rhamnaceae</b> .....	22
<b>3.2 A espécie <i>Scutia buxifolia</i></b> .....	23
<b>3.3 Principais metabólitos secundários</b> .....	24
3.3.1 Alcaloides .....	24
3.3.1.1 Alcaloides ciclopeptídicos.....	24
3.3.1.1.1 Alcaloides ciclopeptídicos de catorze membros .....	27
3.3.1.2 Alcaloides ciclopeptídicos neutros ou ciclopeptídeos neutros .....	34
<b>3.4 Elucidação estrutural e estereoquímica</b> .....	39
<b>3.5 Atividade antimicrobiana</b> .....	40
<b>4. PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	42
<b>4.1 Procedimentos experimentais gerais</b> .....	42
4.1.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ .....	42
4.1.2 Aparelho de ponto de fusão .....	42
4.1.3 Índice de rotação ótica .....	43
4.1.4 Espectrometria de Massas de Alta Resolução (EMAR) .....	43
4.1.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	43
4.1.6 Materiais e métodos cromatográficos.....	44
<b>4.2 <i>Scutia buxifolia</i></b> .....	44
4.2.1 Coleta do material vegetal.....	44
4.2.2 Extração, fracionamento e cromatografia.....	45
4.2.3 Fração etérea básica.....	46
<b>4.3 Metabólitos isolados e identificados de <i>Scutia buxifolia</i></b> .....	48

4.3.1 Metabólito P02, scutianina C (14) .....	48
4.3.2 Metabólito P06, scutianina N (37) .....	49
4.3.3 Metabólito P11, scutianina O (38) .....	50
4.3.4 Metabólito P12, scutianina P (39).....	51
<b>4.4 Atividade antimicrobiana <i>in-vitro</i>.....</b>	<b>52</b>
4.4.1 Microrganismos e padrões utilizados .....	52
4.4.2 Meios de cultura .....	53
4.4.3 Manutenção dos microrganismos indicadores .....	53
4.4.4 Determinação da CIM e CLM .....	54
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>55</b>
<b>5.1 Rendimento do extrato bruto e frações ácidas e básicas .....</b>	<b>55</b>
<b>5.2 Metabólitos isolados de <i>Scutia buxifolia</i>: fração etérea básica .....</b>	<b>56</b>
5.2.1 Alcaloide P02, scutianina C (14) .....	56
5.2.2 Alcaloide P06, scutianina N (37) .....	67
5.2.3 Alcaloide P11, scutianina O (38) .....	82
5.2.4 Alcaloide P12, scutianina P (39).....	97
<b>5.3 Determinação da estereoquímica relativa dos metabólitos P06, P11 e P12.....</b>	<b>112</b>
5.3.1 Alcaloide P06, scutianina N (37) .....	122
5.3.2 Alcaloide P11, scutianina O (38) .....	124
5.3.3 Alcaloide P12, scutianina P (39).....	127
<b>5.4 Atividade antimicrobiana .....</b>	<b>131</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>137</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>138</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A utilização de produtos naturais com propriedades terapêuticas é bastante antiga e, por muito tempo, produtos minerais, vegetais e animais foram as principais fontes de drogas.<sup>1</sup> As plantas representam uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de fármacos.<sup>2</sup>

O interesse em medicamentos derivados de plantas superiores, especialmente os fitoterápicos, tem aumentado expressivamente. Estima-se que cerca de 25% dos medicamentos são direta ou indiretamente derivados de plantas superiores.<sup>3</sup> Apesar do aumento de estudos nessa área, apenas 15 a 17% das espécies vegetais já foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal.<sup>2,4</sup>

O Brasil possui a maior diversidade vegetal do mundo, contando com mais de 55 mil espécies catalogadas. Devido a esta grande diversidade de espécies, aumentam-se as chances de identificação de substâncias do metabolismo vegetal com atividades farmacológicas e o descobrimento de novos alvos biológicos.<sup>2</sup>

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 80% da população mundial recorre às medicinas tradicionais para atender suas necessidades primárias de assistência médica.<sup>5</sup> Desde 1978, este órgão reconhece o uso de fitoterápicos<sup>6</sup> e tem incentivado o estudo de plantas tradicionalmente conhecidas como medicinais, com o objetivo de avaliar cientificamente os benefícios da utilização desses medicamentos e de conhecer os riscos de seu uso indevido.<sup>7</sup>

O conhecimento popular das plantas é de extrema importância para novos estudos, pois instiga a investigação de seus constituintes, podendo relacioná-los ao uso popular. Neste contexto, o Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais (NPPN) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) vem contribuindo não apenas para a fitoquímica clássica, ou seja, isolamento e determinação estrutural, mas também

---

<sup>1</sup> RATES, S. M. K. *Toxicon*, **2001**, 39, 603-613.

<sup>2</sup> SIMÕES, C. M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia da planta ao medicamento*, **2001**.

<sup>3</sup> CALIXTO, J. B. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **2000**, 33, 2, 179-189.

<sup>4</sup> SOEJARTO, D. D. *J. Ethnopharmacol.*, **1996**, 51, 1-15.

<sup>5</sup> VENDRUSCOLO, G. S.; MENTZ, L. A. *Sér. Bot.*, **2006**, 61, 1-2, 83-103.

<sup>6</sup> PORTAL BRASIL. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br>>. Acesso em 19 de janeiro de 2014.

<sup>7</sup> LOGUERCIO, A. P.; BATTISTIN, A.; VARGAS, A. C.; HENZEL, A.; WITT, N. M. *Cienc. Rural*, **2005**, 35, 2, 371-376.

realizando trabalhos que envolvam atividade biológica de plantas utilizadas na medicina popular.

As espécies de maior interesse do grupo pertencem às famílias Rutaceae, Sterculiaceae, Rhamnaceae, Asteraceae, Anarcadiaceae, Santalaceae, Rubiaceae, Myrtaceae, Apocinaceae e Loganiaceae, nativas do Bioma do Pampa e de parte do Bioma Mata Atlântica. O Bioma do Pampa ocupa uma área de 63% do Rio Grande do Sul, estendendo-se pelo Uruguai, Argentina e Paraguai, e apresenta um ecossistema caracterizado por campos nativos entremeados por matas de ciliares.<sup>8</sup>

Uma das famílias estudadas é a Rhamnaceae. Plantas desta família são ricas em uma classe de compostos denominados alcaloides ciclopeptídicos,<sup>9,10</sup> e têm seu uso bastante difundido na medicina popular, na cura de doenças como disenteria, hipertensão arterial e vários tipos de infecções.<sup>11</sup>

A espécie *Scutia buxifolia*, alvo deste trabalho, pertence à família Rhamnaceae e é conhecida popularmente como coronilha. É nativa da América do Sul, ocorrendo principalmente no Rio Grande do Sul, Argentina e Uruguai, sendo usada na etnofarmacologia como cardiotônica, anti-hipertensiva e diurética através da infusão aquosa da casca do caule.<sup>12,13,14</sup>

---

<sup>8</sup> MINISTÉRIO DE MEIO AMBIENTE. Disponível em: <[www.mma.gov.br](http://www.mma.gov.br)>. Acesso em 19 de janeiro de 2014.

<sup>9</sup> MENEZES, A. S.; MOSTARDEIRO, M. A.; ZANATTA, N.; MOREL, A. F. *Phytochem.*, **1995**, 38, 3, 783-786.

<sup>10</sup> TREVISAN, G.; MALDANER, G.; VELLOSO, N. A.; SANT'ANNA, G. S.; ILHA, V.; GEWEHR, C. C. V.; RUBIN, M. A.; MOREL, A. F.; FERREIRA, J. *J. Nat. Prod.*, **2009**, 72, 608-612.

<sup>11</sup> GIACOMELLI, S. R. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Santa Maria, **2000**.

<sup>12</sup> SILVA, R. C. V. A. F.; CRESTANI, S.; SOUZA, P.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; SANTOS, A. R. S.; MARQUES, M. C. A.; KASSUYA, C. A. L.; SANTOS, J. E. S. *J. Ethnopharmacol.*, **2012**, 141, 997-1004.

<sup>13</sup> MALDANER, G. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Santa Maria, **2005**.

<sup>14</sup> BOLIGON, A. A.; FELTRIN, A. C.; JANOVIK, V.; FROHLICH, J. K.; ATHAYDE, M. L. *Saúde*, **2009**, 35, 2, 4-6.

## 2. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo geral o isolamento de alcaloides ciclopeptídicos das cascas do caule da espécie *Scutia buxifolia*, pertencente à família Rhamnaceae. E como objetivos específicos:

- Identificação e determinação da configuração relativa e/ou absoluta dos centros quirais dos alcaloides ciclopeptídicos por meio de técnicas espectroscópicas de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  uni e bidimensionais (COSY, HMQC, HMBC e NOESY) e espectrometria de massas de alta resolução.

- Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato bruto, frações ácidas e básicas e compostos isolados.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 A família Rhamnaceae

A família Rhamnaceae, juntamente com as famílias Vitaceae e Leeaceae, constitui a ordem Rhamnales e abrange plantas com os mais variados hábitos, desde ervas até árvores, ocorrendo em florestas tropicais e subtropicais de todo o mundo, sendo constituída por 58 gêneros com aproximadamente 900 espécies.<sup>14,15</sup>

Na América do Sul são encontradas cerca de 93 espécies. Dentre as mais importantes citam-se as pertencentes aos gêneros *Discaria*, *Colletia*, *Gouania*, *Condalia*, *Colubriana*, *Ziziphus*, *Crumenaria*, *Kentrothamnus*, *Retanilla*, *Rhamnus*, *Sageretia* e *Scutia*.<sup>15</sup>

Dentre as várias plantas utilizadas na medicina popular brasileira, as pertencentes à família Rhamnaceae são empregadas no tratamento de doenças de pele, disenteria, hipertensão arterial e vários tipos de infecções, além de serem usadas como agente antitérmico.<sup>15</sup> Destacam-se, neste sentido, *Discaria americana*, *Gouania ulmifolia*, *Scutia buxifolia*, *Reissekia smilacina*, *Zizyphus exserta* e *Z. mauritiana* no tratamento de doenças infecciosas. *Discaria americana*, *Ceanothus* spp., *Colletia spinosissima* e *C. paradoxa* são usadas no combate a febre; *Hovenia dulcis* para asma; *Rhamnus catharticus*, *R. purshiana*, *R. pumila* e *R. alpina* como laxantes (popularmente conhecidas como cáscara-sagrada); *Discaria americana*, *Scutia buxifolia*, *Retanilla ephedra*, *R. obcordata*, *Rhamnus inebrians* e *Ceanothus* spp. como tônicos. *Scutia buxifolia* também apresenta propriedades diuréticas e hipotensivas.<sup>16</sup>

A química da família Rhamnaceae é razoavelmente conhecida e envolve muitas classes de compostos, especialmente alcaloides ciclopeptídicos,<sup>17</sup> flavonoides, taninos, esteroides, triterpenos, saponinas e ciclopeptídeos neutros.<sup>11</sup>

---

<sup>15</sup> GIACOMELLI, S. R. Tese de Doutorado - Universidade Federal de Santa Maria, **2005**.

<sup>16</sup> SANTOS, S. R. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Santa Maria, **2008**.

<sup>17</sup> MISSAU, F. C. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Santa Maria, **2003**.



### 3.2 A espécie *Scutia buxifolia*

A espécie *Scutia buxifolia* (Figura 1) é nativa da região sul da América do Sul, com ocorrência predominante no estado do Rio Grande do Sul (Brasil), Argentina e Uruguai.<sup>13,13,17,18,19</sup>



Figura 1 - (a) *Scutia buxifolia*; (b) Parte aérea de *Scutia buxifolia*.

É uma árvore de pequeno a médio porte, de caule reto, medindo até 6 m de altura e 50 cm de diâmetro. Sua casca é avermelhada e fina e seus ramos eretos, frequentemente opostos, com espinhos de até 4 cm de comprimento.<sup>20</sup>

Fornece madeira, violácea ou avermelhada, muito elástica. É usada para obras de esteio, torno, marcenaria, lenha, carvão e trabalhos expostos. As cascas e os frutos contêm matéria tintorial. As folhas servem de alimento para a lagarta da mariposa *Morpho catenarius*. Se desenvolve em qualquer tipo de solo, tanto fértil como árido ou rochoso.<sup>20</sup>

Conhecida popularmente como coronilha,<sup>13,17,18</sup> espinho de touro, canela-de-espinho e laranjeira do mato.<sup>13,17</sup> É usada na medicina popular como cardiotônica, diurética e anti-hipertensiva através da infusão aquosa da casca do caule.<sup>12,13,14</sup> E,

<sup>18</sup> BOLIGON, A. A.; SAGRILLO, M. R.; MACHADO L. F.; FILHO, O. S.; MACHADO, M. M.; CRUZ, I. B. M.; ATHAYDE, M. L. *Molecules*, **2012**, 17, 5757-5769.

<sup>19</sup> MALDANER, G. Tese de Doutorado - Universidade Federal de Santa Maria, **2010**.

<sup>20</sup> PLANTAS QUE CURAM. Disponível em: <<http://www.plantasquecuram.com.br>>. Acesso em 19 de janeiro de 2014.

assim como as demais espécies pertencentes à família Rhamnaceae, apresenta uma variada classe de constituintes químicos como alcaloides ciclopeptídicos, ciclopeptídeos, flavonoides, taninos, esteroides, triterpenos e saponinas.<sup>13</sup>

### 3.3 Principais metabólitos secundários

#### 3.3.1 Alcaloides

Alcaloides são compostos nitrogenados farmacologicamente ativos, que possuem, na sua grande maioria, caráter alcalino. Uma importante fonte desses compostos são as plantas, porém podem também ser encontrados em animais e microrganismos.<sup>2</sup>

São encontrados em aproximadamente 14,2% dos gêneros de plantas superiores, em representantes de todos os grupos vegetais, porém sua maior ocorrência é verificada nas angiospermas. Podem ser encontrados em todas as partes do vegetal, acumulando-se, preferencialmente, em tecidos com crescimento ativo, células epidérmicas e hipodérmicas, bainhas vasculares e vasos lactíferos.<sup>2</sup>

##### 3.3.1.1 Alcaloides ciclopeptídicos

Alcaloides ciclopeptídicos são bases poliamídicas que apresentam em sua estrutura uma unidade *p*-hidroxiestirilamina derivada da tirosina, cujo fragmento é formado por um  $\alpha$ -aminoácido, um  $\beta$ -hidroxiamonoácido (3-hidroxirolina, 3-hidroxileucina ou 3-hidroxifenilserina) e um aminoácido terminal *N*-mono ou dimetilado.<sup>21,22</sup>

---

<sup>21</sup> CARO, M. S. B.; OLIVEIRA, L. H.; ILHA, V.; BURROW, R. A.; DALCOL, I. I.; MOREL, A. F. *J. Nat. Prod.*, **2012**, 75, 1220-1222.

<sup>22</sup> MOSTARDEIRO, M. A.; ILHA, V.; DAHMER, J.; CARO, M. S. B.; DALCOL, I. I.; SILVA, U. F.; MOREL, A. F. *J. Nat. Prod.*, **2013**, 76, 1343-1350.

O termo alcaloide peptídico foi primeiramente proposto por Goutarel e col. em 1964. Mais tarde, Tschesche sugeriu a denominação “alcaloide ciclopeptídico” como sendo uma designação mais adequada, considerando que essas bases, com exceção de lasiodina A (**1**)<sup>13,15</sup> e sanjoinina G2 (**2**),<sup>23,24</sup> apresentam um anel macrociclo em sua estrutura (Figura 2).<sup>13,15,25</sup> Assim, os alcaloides ciclopeptídicos são classificados de acordo com o número de átomos que fazem parte do macrociclo, em treze, catorze ou quinze membros,<sup>13,15,17</sup> sendo a classe de catorze membros a mais representativa devido ao número de alcaloides isolados deste grupo.<sup>17,26</sup>

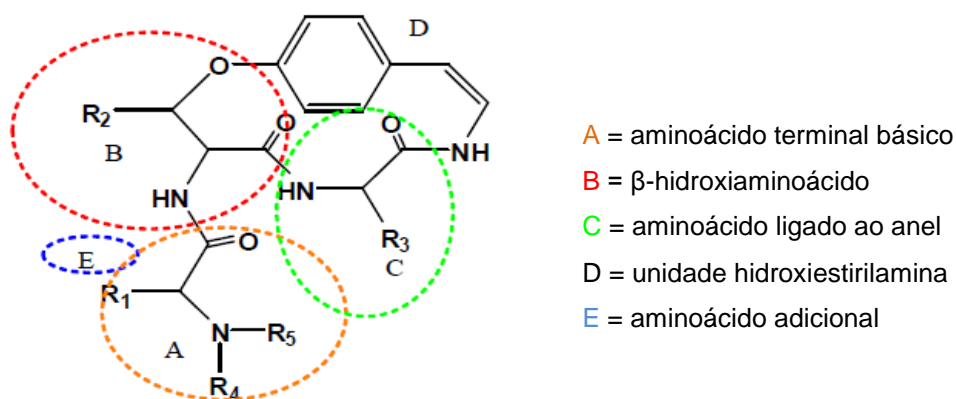
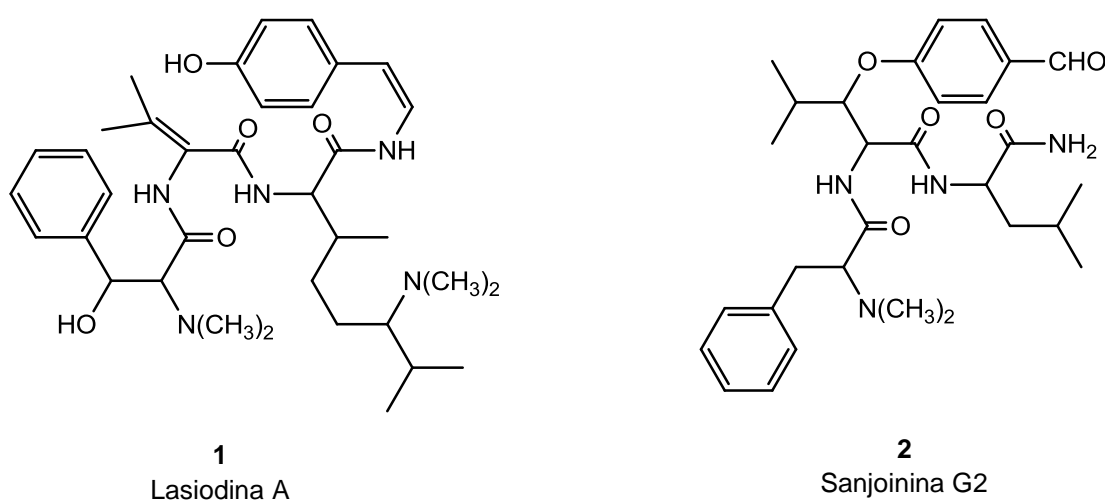


Figura 2 - Estrutura geral dos alcaloides ciclopeptídicos.<sup>25</sup>

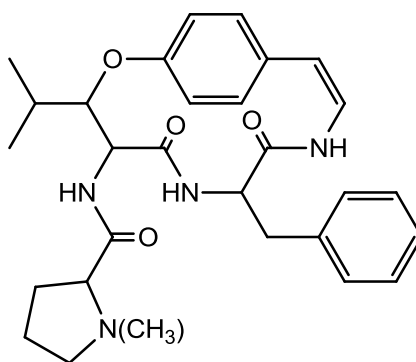
<sup>23</sup> TAN, N. H.; ZHOU, J. *Chem. Rev.*, **2006**, 106, 840-895.

<sup>24</sup> HAN, B. H.; PARK, M. H.; PARK, J. H. *Pure Appl. Chem.*, **1989**, 61, 3, 443-448.

<sup>25</sup> GOURNELIS, D. C.; LASKARIS, G. G.; VERPOORTE, R. *Nat. Prod. Rep.*, **1997**, 14, 75-82.

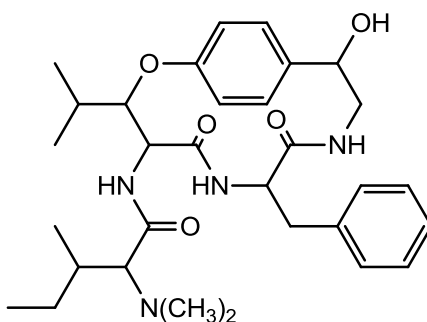
<sup>26</sup> JOULLIÉ, M. M.; RICHARD, D. J. *Chem. Commun.*, **2004**, 2011-2015.

A presença de alcaloides em plantas foi observada por Clinch em 1884, na espécie *Ceanothus americanus*, uma Rhamnaceae amplamente utilizada na medicina popular. Em 1933, Bertho e col. isolaram ceanotina B (**3**) de uma mistura de alcaloides, determinando corretamente sua fórmula empírica (C<sub>29</sub>H<sub>36</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>). Somente em 1965, Warnhoff e col. propuseram uma estrutura para este composto e ceanotina B (**3**) teve sua estrutura revisada e determinada por Klein e col., em 1968.<sup>23</sup>



**3**  
Ceanotina B

Alcaloides ciclopeptídicos foram descobertos em 1963, quando foram isoladas as adoutinas -X, -Y e -Z de *Waltheria americana* (Sterculiaceae) por Pais e col. e zizifina de *Zizyphus oenoplia* (Rhamnaceae) por Menard e col. Como as estruturas dessas substâncias foram elucidadas somente anos mais tarde, considera-se a pandamina (**4**), isolada de *Panda oleosa* (Pandaceae), por Pais e col., como o primeiro alcaloide ciclopeptídico já conhecido, visto que sua estrutura foi completamente elucidada em 1966.<sup>23</sup>



**4**  
Pandamina

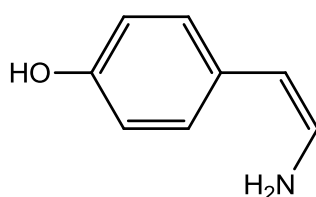
Somente a partir dos anos 1970, com o desenvolvimento de técnicas cromatográficas e métodos de determinação estrutural, o número de alcaloides ciclopeptídicos, isolados e identificados em diferentes espécies de plantas, aumentou consideravelmente.<sup>17</sup>

Há registros de alcaloides ciclopeptídicos em 55 espécies de famílias de plantas superiores,<sup>19</sup> principalmente nas plantas da família Rhamnaceae.<sup>19,10,22</sup> Esses metabólitos também podem ser encontrados em algumas espécies pertencentes às famílias Sterculiaceae, Asteraceae, Rubiaceae, Urticaceae, Celastraceae, Euphorbiaceae, Pandaceae, Olacaceae e Fabaceae.<sup>13,19,27</sup>

Alcaloides ciclopeptídicos podem ocorrer na casca do caule, casca da raiz, folhas, partes aéreas e em sementes,<sup>13,26</sup> no entanto são de difícil isolamento em decorrência das pequenas concentrações em que são encontrados. O rendimento, em relação ao material seco da planta, varia de 0,01 a 0,90% dependendo de fatores como método de isolamento, localização e maturidade da planta.<sup>13</sup>

### 3.3.1.1.1 Alcaloides ciclopeptídicos de catorze membros

Essa classe abrange a maioria dos alcaloides ciclopeptídicos isolados. As principais características desse grupo são a presença de um  $\beta$ -hidroxiaminoácido e de uma unidade *p*-hidroxiestirilamina (**5**).<sup>13,17</sup>

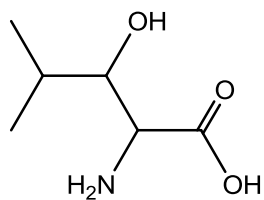
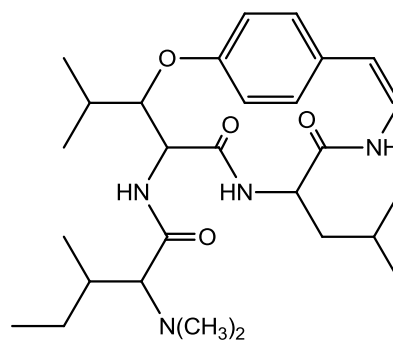


**5**

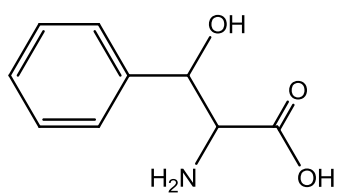
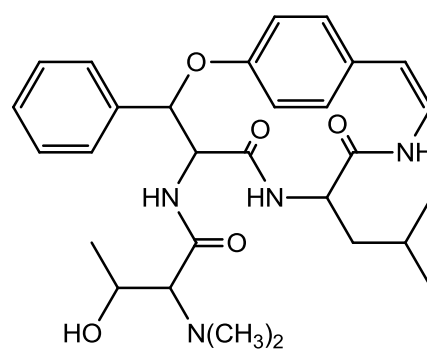
Esses alcaloides são subdivididos em três subgrupos, conforme o tipo do  $\beta$ -hidroxiaminoácido do anel:  $\beta$ -hidroxileucina (**6**) nos alcaloides do tipo

<sup>27</sup> EL-SEEDI, H. R.; ZAHRA, M. H.; GORANSSON, U.; VERPOORTE, R. *Phytochem. Rev.*, **2007**, 6, 143-165.

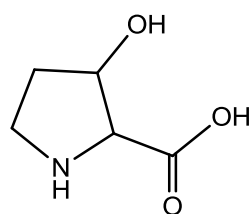
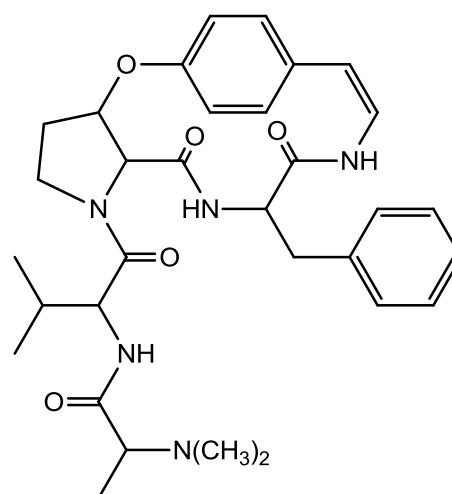
frangulanina (**7**);  $\beta$ -hidroxifenilalanina (**8**) nos alcaloides do tipo nummularina E (**9**); e trans-3-hidroxiprolina (**10**) nos alcaloides do tipo mauritina A (**11**).<sup>13,17</sup>

**6****7**

Frangulanina

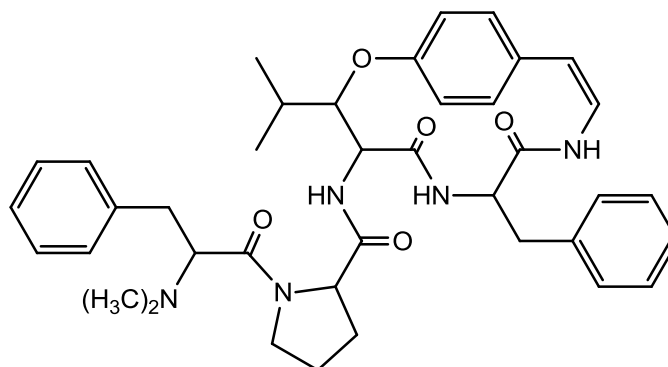
**8****9**

Nummularina E

**10****11**

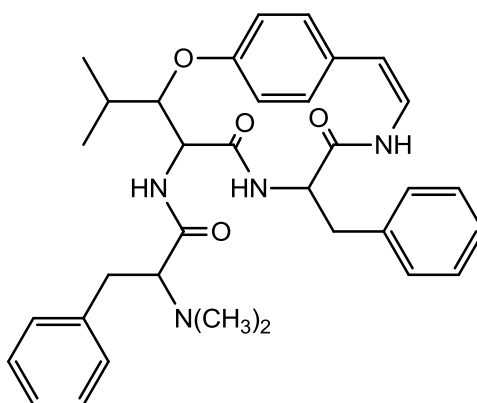
Mauritina A

Na espécie *Scutia buxifolia* (Rhamnaceae), a presença de alcaloides ciclopeptídicos foi observada em 1964, por Wasicky e col. E três anos mais tarde, Tschesche e col. isolaram e elucidaram a estrutura de scutianina A (**12**).<sup>23</sup>



**12**  
Scutianina A

Em 1971, trabalhando com cascas do caule de uma espécie proveniente do Brasil, Tschesche e col. isolaram o alcaloide ciclopeptídico scutianina B (**13**).<sup>28</sup>

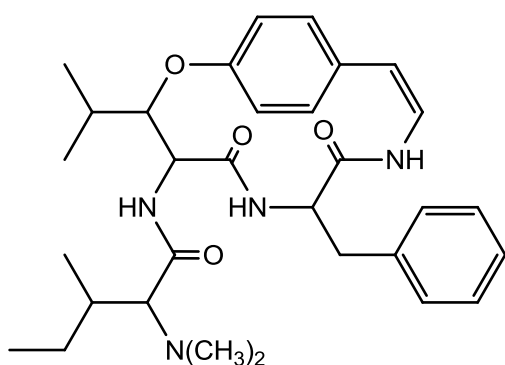


**13**  
Scutianina B

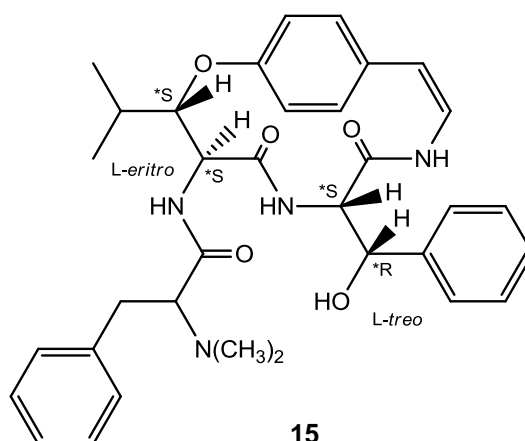
Investigando uma espécie coletada na Argentina, em 1974, Merkuza e col. isolaram e determinaram a estrutura de dois novos alcaloides: scutianinas -C (**14**)

<sup>28</sup> TSCHESCHE, R.; AMMERMANN, E.; FEHLHABER, H. W. *Tetrahedron Lett.*, **1971**, 46, 4405-4400.

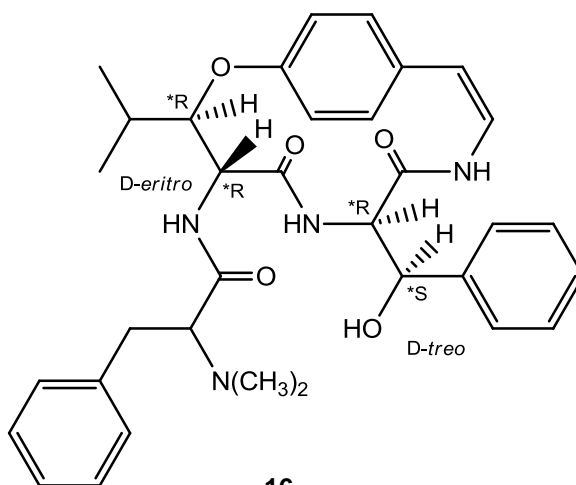
e -D (**15**).<sup>29,30</sup> No mesmo ano, Tschesche e Ammermann isolaram scutianina E (**16**), diastereoisômero de scutianina D (**15**).<sup>31</sup> A estereoquímica da unidade β-hidroxicina dos diastereoisômeros foi determinada como sendo L-eritro em (**15**) e D-eritro em (**16**) e a unidade fenilserina como sendo L-treo em (**15**) e D-treo em (**16**).<sup>13,17,32</sup>



**14**  
Scutianina C



**15**  
Scutianina D



**16**  
Scutianina E

<sup>29</sup> MERKUZA, V. M.; SIERRA, M. G.; MASCARETTI, O. A.; RUVEDA, E. A.; CHANG, C. J.; WENKERT, E. *Phytochem.*, **1974**, 13, 1279-1282.

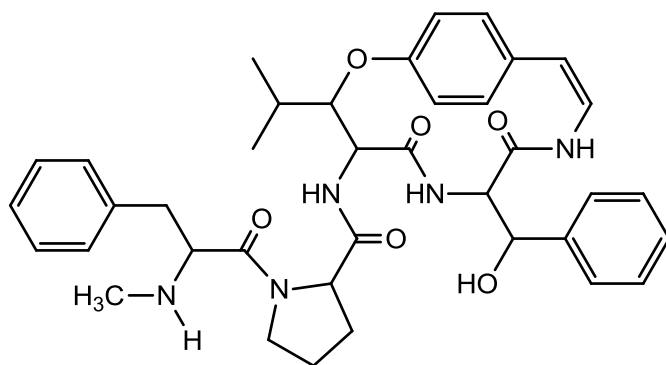
<sup>30</sup> SIERRA, M. G.; MASCARETTI, O. A.; MERKUZA, V. M.; TOSTI, E. L.; RUVEDA, E. A.; CHANG, C. J. *Phytochem.*, **1974**, 13, 2865-2869.

<sup>31</sup> TSCHESCHE, R.; AMMERMAN, E. *Chem. Ber.*, **1974**, 107, 7, 2274-2283.

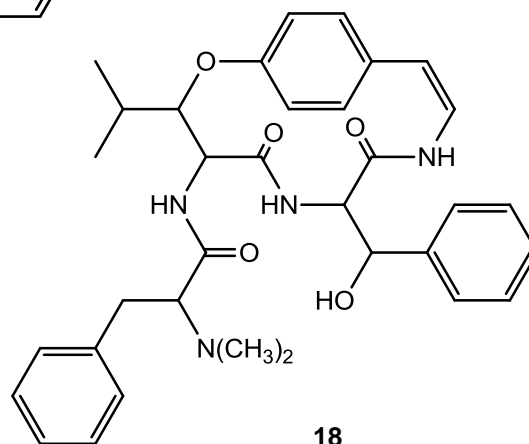
<sup>32</sup> MOREL, A. F.; BRAVO, R. V. F.; REIS, F. A. M.; RUVEDA, E. A. *Phytochem.*, **1979**, 18, 473-477.



Em 1977, Tschesche e col. isolaram e determinaram a estrutura de scutianina F (**17**).<sup>33</sup> No mesmo ano, Tschesche e Hillebrand isolaram scutianina G (**18**), outro diastereoisômero das scutianinas -D (**15**) e -E (**16**).<sup>34</sup>

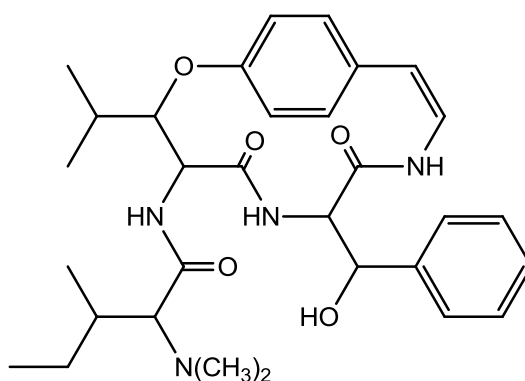


**17**  
Scutianina F



**18**  
Scutianina G

Em 1979, Morel e col. isolaram um novo alcaloide ciclopeptídico de *Scutia buxifolia*, scutianina H (**19**).<sup>32</sup>

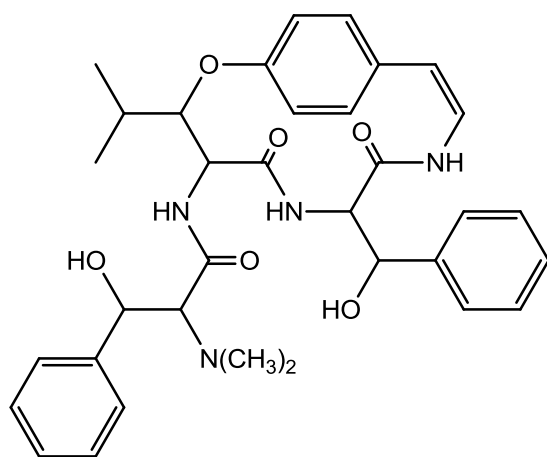


**19**  
Scutianina H

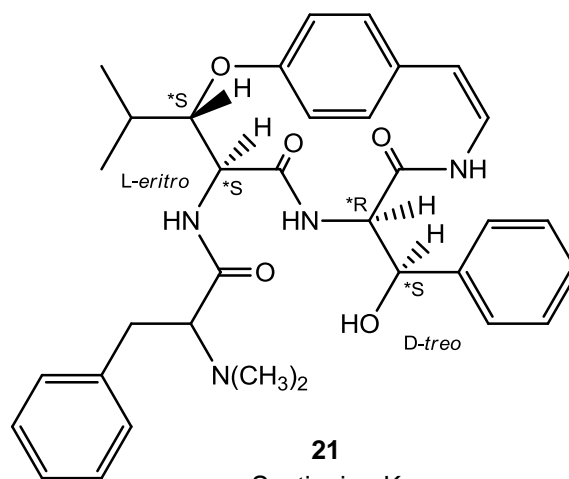
<sup>33</sup> TSCHESCHE, R.; HILLEBRAND, D.; WILHELM, H.; AMMERNAN, E.; ECKHARDT, G. *Phytochem.*, **1977**, 16, 1025-1028.

<sup>34</sup> TSCHESCHE, R.; HILLEBRAND, D. *Phytochem.*, **1977**, 16, 1817-1818.

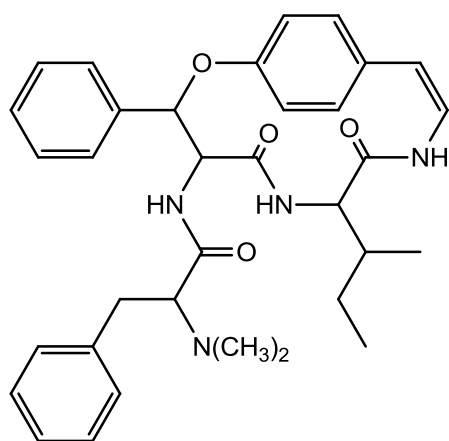
Morel e col., em 1994, obtiveram pela primeira vez o alcaloide ciclopeptídico scutianina J (**20**).<sup>9</sup> Alguns anos mais tarde, em 1997, a continuação deste trabalho pelo mesmo grupo resultou no isolamento de dois novos alcaloides, denominados scutianinas -K (**21**) e -L (**22**).<sup>35</sup> Scutianina K (**21**) é também diastereoisômero das scutianinas -D (**15**), -E (**16**) e -G (**18**).



**20**  
Scutianina J



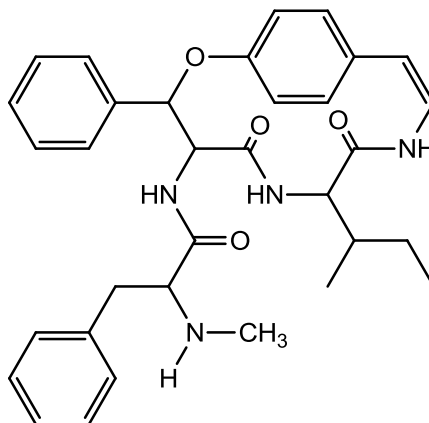
**21**  
Scutianina K



**22**  
Scutianina L

<sup>35</sup> MOREL, A. F.; MACHADO, E. C. S.; MOREIRA, J. J.; MENEZES, A. S.; MOSTARDEIRO, M. A.; ZANATTA, N.; WESSJOHANN, L. A. *Phytochem.*, **1998**, 47, 1, 125-129.

Em 2005, Morel e col. isolaram das cascas do caule de *Scutia buxifolia* um novo alcaloide ciclopeptídico, denominado scutianina M (**23**).<sup>36</sup>



**23**  
Scutianina M

Informações sobre os alcaloides ciclopeptídicos de catorze membros isolados de *Scutia buxifolia* são mostrados na Tabela 1.

<sup>36</sup> MOREL, A. F.; MALDANER, G.; ILHA, V.; MISSAU, F.; SILVA, U. F.; DALCOL, I. I. *Phytochem.*, **2005**, 66, 2571-2576.

Tabela 1 - Alcaloides ciclopeptídicos de catorze membros isolados de *Scutia buxifolia*.

Alcaloide	Fórmula molecular	Peso molecular	PF (°C)	[α] <sub>D</sub>	Ref.
Scutianina A (12)	C <sub>39</sub> H <sub>47</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>	665,3577	196-197	-399° (CHCl <sub>3</sub> , c=0,15)	37
Scutianina B (13)	C <sub>34</sub> H <sub>40</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	568,3050	248-250	-296° (CHCl <sub>3</sub> , c=0,1)	28
			235-236	-308° (CHCl <sub>3</sub> , c=0,1)	29
			248	-290° (CHCl <sub>3</sub> , c=0,1)	32
Scutianina C (14)	C <sub>31</sub> H <sub>42</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	534,3206	202-204	-188° (CHCl <sub>3</sub> , c=0,15)	29
			263-265	-189° (CHCl <sub>3</sub> , c=0,1)	32
Scutianina D (15)	C <sub>34</sub> H <sub>40</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	584,2999	255-256	-210° (CHCl <sub>3</sub> , c=0,5)	30
			217-218	-202° (CHCl <sub>3</sub> , c=0,1)	32
Scutianina E (16)	C <sub>34</sub> H <sub>40</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	584,2999	121	-22,2° (CHCl <sub>3</sub> , c=0,1)	31
			110-110,2	-21° (CHCl <sub>3</sub> , c=0,1)	32
Scutianina F (17)	C <sub>38</sub> H <sub>45</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>	651,3421	208	-132° (MeOH, c=0,02)	33
Scutianina G (18)	C <sub>34</sub> H <sub>40</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	584,2999	162	-112° (MeOH, c=0,02)	34
Scutianina H (19)	C <sub>31</sub> H <sub>42</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	550,3155	242-243	-233° (CHCl <sub>3</sub> , c=0,1)	32
Scutianina J (20)	C <sub>34</sub> H <sub>40</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	600,2948	Amorfo	-	9
Scutianina K (21)	C <sub>34</sub> H <sub>40</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	584,2999	215-217	-20,9° (CHCl <sub>3</sub> , c=0,1)	35
Scutianina L (22)	C <sub>34</sub> H <sub>40</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	568,3050	122-123	-72° (CHCl <sub>3</sub> , c=2,4)	35
Scutianina M (23)	C <sub>33</sub> H <sub>38</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	554,2893	257-259	+120° (CHCl <sub>3</sub> , c=0,018)	36

### 3.3.1.2 Alcaloides ciclopeptídicos neutros ou ciclopeptídeos neutros

Estes metabólitos vêm sendo isolados de plantas, principalmente da família Rhamnaceae, e se diferenciam dos alcaloides ciclopeptídicos pela ausência do grupamento básico *N,N*-dimetila ou *N*-metila.<sup>19</sup>

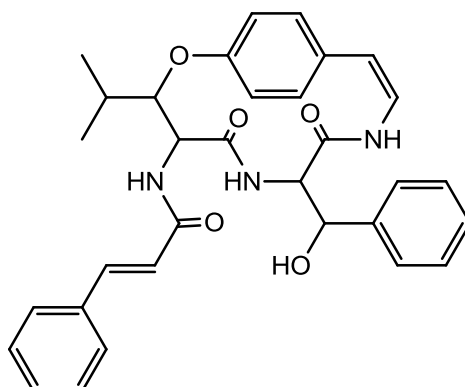
Há controvérsias quanto à classificação destes metabólitos em alcaloides ou apenas peptídeos cíclicos neutros. Joullié e Richard desenvolveram um sistema de nomenclatura que classifica os alcaloides peptídicos como: (i) alcaloides

<sup>37</sup> MOREL, A. F.; MALDANER, G.; ILHA, V. *Alkaloids Chem. Biol.*, **2009**, 67, 79-141.

ciclopeptídicos *sensu stricto*, com propriedades básicas e um aminoácido terminal *N*-mono ou -dimetilado; (ii) alcaloides peptídicos lineares; (iii) ciclopeptídeos neutros, que não apresentam a cadeia lateral *N*-mono ou -dimetilada no aminoácido terminal.<sup>38</sup>

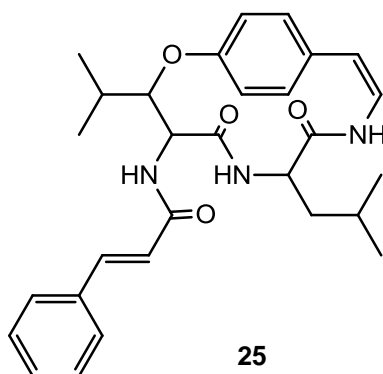
Para diferenciar esta classe de metabólitos dos alcaloides ciclopeptídicos, é comum a utilização da terminação *eno* para denominá-los, enquanto a terminação *ina* é utilizada para denominar os alcaloides básicos,<sup>19</sup> embora alguns ciclopeptídeos neutros possuam o sufixo *ina*.

O primeiro relato desta classe de compostos foi em 1974, quando Sierra e col. isolaram e determinaram a estrutura do ciclopeptídeo neutro scutianeno C<sup>29</sup> (= scutianeno D)<sup>38</sup> (**24**) de *Scutia buxifolia* (Rhamnaceae).<sup>29</sup>



**24**  
Scutianeno C

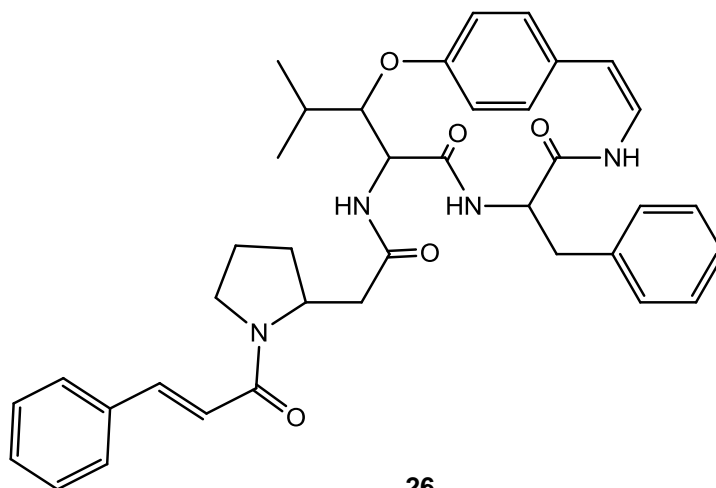
Em 1989, Han e col. isolaram das sementes de *Zizyphus vulgaris* Lamarck var. *spinosa* Bunge (Rhamnaceae), a sanjoinenina (**25**).<sup>24</sup>



**25**  
Sanjoinenina

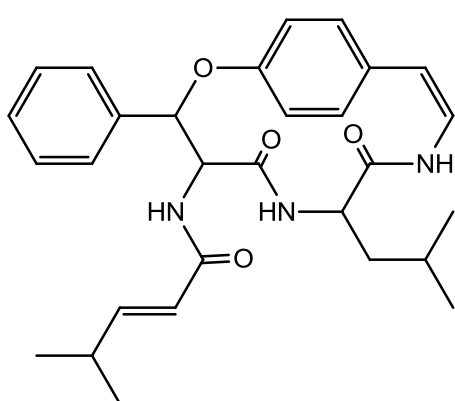
<sup>38</sup> MALDANER, G.; MARANGON, P.; ILHA, V.; CARO, M. S. B.; BURROW, R. A.; DALCOL, I. I.; MOREL, A. F. *Phytochem.*, **2011**, 72, 804-809.

Abu-Zarga e col. isolaram, em 1995, lotusanina B (**26**) da espécie *Ziziphus lotus* Lam. (Rhamnaceae).<sup>39</sup>

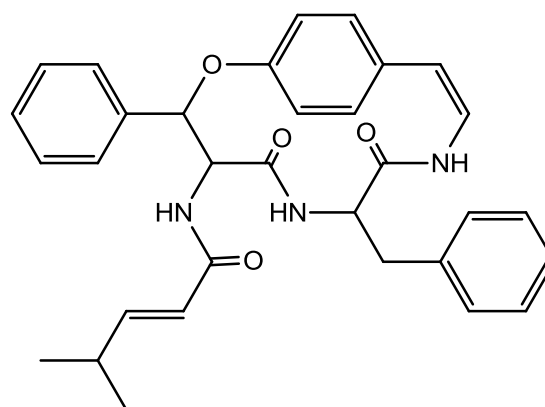


**26**  
Lotusanina B

Em 2001, investigando a espécie *Discaria americana* Gill & Hook (Rhamnaceae), Giacomelli e col. isolaram e determinaram a estrutura de dois novos ciclopeptídeos neutros, discareno C (**27**) e discareno D (**28**).<sup>40</sup>



**27**  
Discareno C

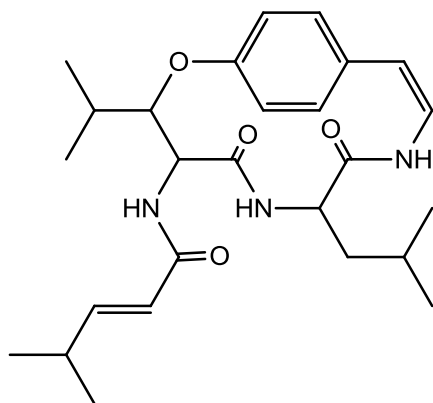


**28**  
Discareno D

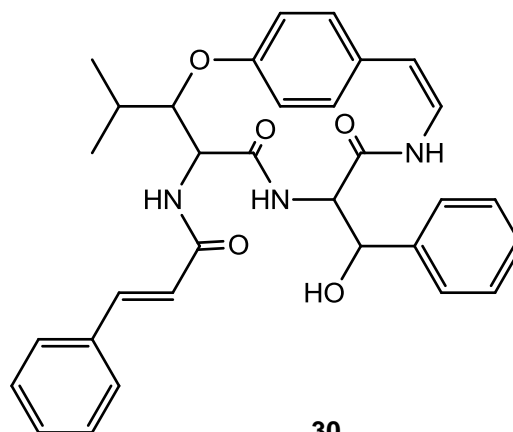
<sup>39</sup> ABU-ZARGA, M.; SABRI, S.; AL-ABOUDI, A.; AJAZ, M. S.; SULTANA, N.; RAHMAN, A. *J. Nat. Prod.*, **1995**, 58, 4, 504-511.

<sup>40</sup> GIACOMELLI, S. R.; MISSAU, F. C.; MOSTARDEIRO, M. A.; SILVA, U. F.; DALCOL, I. I.; ZANATTA, N.; MOREL, A. F. *J. Nat. Prod.*, **2001**, 64, 997-999.

Em continuação aos estudos com a espécie *Discaria americana* Gill & Hook (Rhamnaceae), Giacomelli e col. isolaram, em 2004, dois novos compostos, denominados discarinas -M (**29**) e -N (**30**).<sup>41</sup>

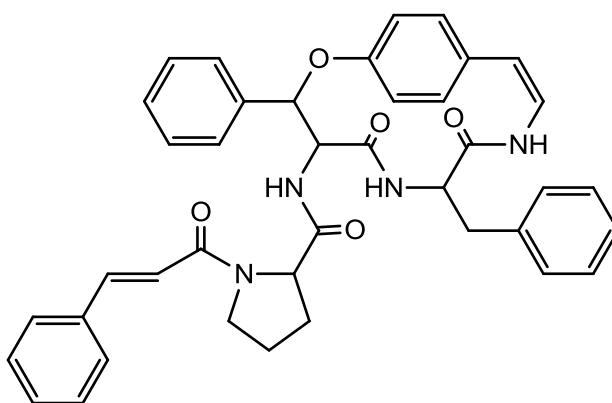


**29**  
Discarina M



**30**  
Discarina N

Em 2009, Oliveira e col. isolaram das folhas de *Amaioua guianensis* (Rubiaceae) o ciclopeptídeo neutro amaiouina (**31**).<sup>42</sup>



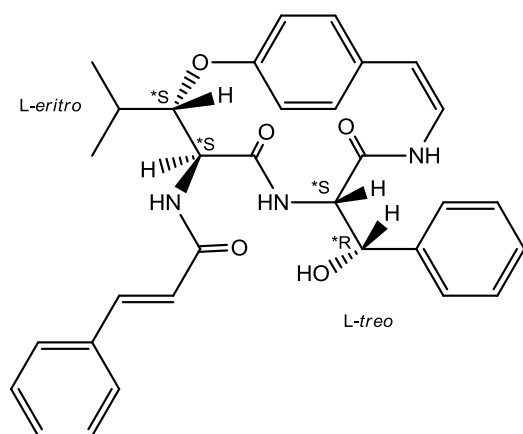
**31**  
Amaiouina

Em 2011, Maldaner e col. isolaram, da espécie *Scutia buxifolia* (Rhamnaceae), quatro novos ciclopeptídeos neutros, scutianeno E (**32**), 3,4,28-tris-epi-scutianeno E (**33**), 28-epi-scutianeno E (**34**) e scutianeno L (**35**).<sup>38</sup> Os

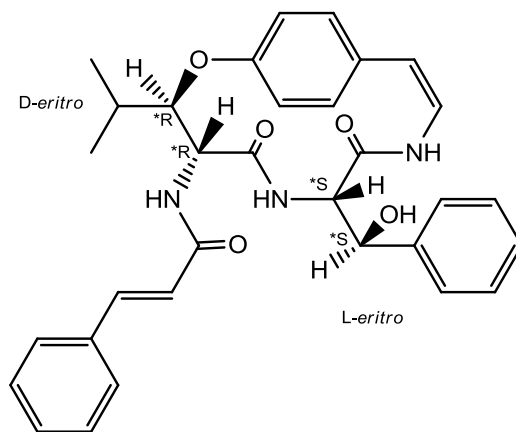
<sup>41</sup> GIACOMELLI, S. R.; MALDANER, G.; GONZAGA, W. A.; GARCIA, C. M.; SILVA, U. F.; DALCOL, I. I.; MOREL, A. F. *Phytochem.*, **2004**, 65, 933-937.

<sup>42</sup> OLIVEIRA, P. L.; TANAKA, C. M. A.; KATO, L.; SILVA, C. C.; MEDINA, R. P.; MORAES, A. P.; SABINO, J. R.; OLIVEIRA, C. M. A. *J. Nat. Prod.*, **2009**, 72, 1195-1197.

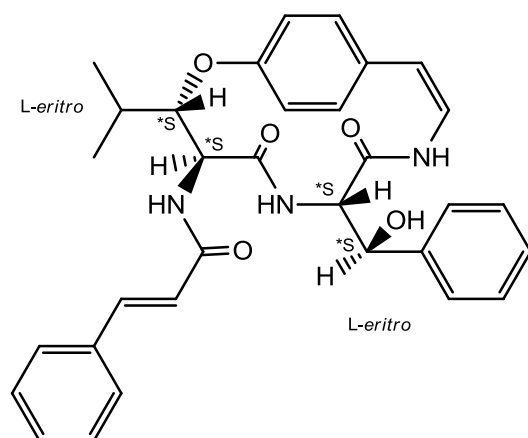
compostos (32), (33) e (34) são diastereoisômeros. Os quatro compostos tiveram sua estereoquímica definida.



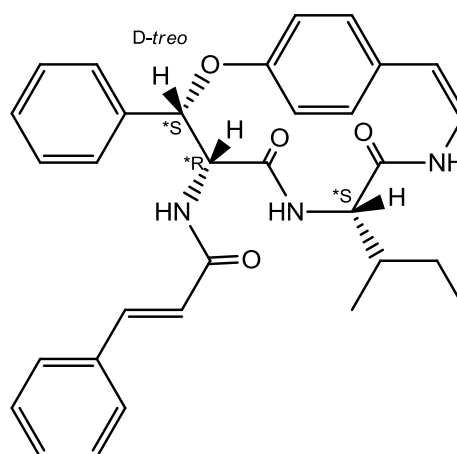
**32**  
Scutianeno E



**33**  
3,4,28-tris-epi-scutianeno E



**34**  
28-epi-scutianeno E

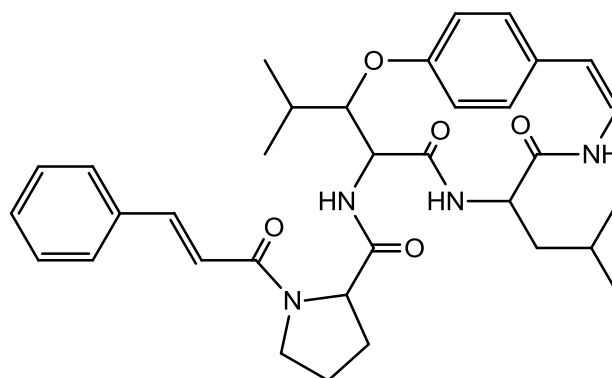


**35**  
Scutianeno L

Zhang e col., em 2012, isolaram das cascas do caule da espécie *Podocarpus nagi* (Podocarpaceae) o composto denominado nagitida A (36).<sup>43</sup>

<sup>43</sup> ZHANG, Y.; TANG, C.; SOB, S. V. T.; KE, C.; YE, Y. *Chin. J. Chem.*, **2012**, 30, 1361-1364.





36

Nagitida A

### 3.4 Elucidação estrutural e estereoquímica

As técnicas analíticas mais utilizadas para a elucidação estrutural de alcaloides ciclopeptídicos são a espectrometria de massas (EM) e a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) uni e bidimensional (COSY, NOESY, HMQC, HMBC).<sup>23,25,37,44</sup> Além destas técnicas, análises de ultravioleta (UV), infravermelho (IV), dicroísmo circular (DC), difração de raios-X e degradação química também são ferramentas importantes para elucidação estrutural destes compostos.<sup>23,37</sup>

A técnica de espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  é indispensável para determinação estrutural de alcaloides ciclopeptídicos, além de ser um importante método para definir a configuração relativa ou absoluta do  $\beta$ -hidroxiaminoácido. No espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , a forma *eritro* do  $\beta$ -hidroxiaminoácido apresenta um  $J_{\alpha,\beta}$  de aproximadamente 8 Hz, enquanto os compostos com configuração *treo* apresentam um  $J_{\alpha,\beta}$  próximo de 2 Hz. O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  fornece informações sobre a configuração absoluta do  $\beta$ -hidroxiaminoácido. Na forma *L-eritro* o sinal do carbono  $\alpha$  aparece com um deslocamento químico próximo de 55,0 ppm, enquanto na forma *D-eritro* este sinal aparece em aproximadamente 53,8 ppm. Para o carbono  $\beta$ , a diferença é mais evidente, na forma *L-eritro* o sinal

<sup>44</sup> DIAS, G. C. D.; GRESSLER, V.; HOENZEL, S. C. S. M.; SILVA, U. F.; DALCOL, I. I.; MOREL, A. F. *Phytochem.*, **2007**, 68, 668-672.

deste carbono aparece em torno de 81,5 ppm e na forma D-*eritro* aparece em campo mais baixo, com deslocamento químico de aproximadamente 87,0 ppm.<sup>21,22,25,37</sup>

A técnica de difração de raios-X é um método auxiliar de grande importância na elucidação estrutural no que diz respeito às análises conformacionais e configuracionais. O maior problema encontrado é a dificuldade em se obter cristais ideais para o teste. Geralmente obtêm-se substâncias amorfas ou que formam cristais na forma de agulhas, muito finos e pequenos para a cristalografia.<sup>13</sup>

A cromatografia gasosa enantiosseletiva é também uma ferramenta importante utilizada na determinação da estereoquímica absoluta das unidades dos aminoácidos que constituem os alcaloides ciclopeptídicos, porém o hidroxiaminoácido participante do macrociclo não pôde ainda ser analisado por este método devido à decomposição que esta unidade sofre durante o procedimento de hidrólise ácida.<sup>13,45</sup>

### 3.5 Atividade antimicrobiana

Compostos antimicrobianos ou antibióticos constituem um grupo especial de agentes terapêuticos, geralmente produzidos e obtidos de organismos vivos. São substâncias que, em pequenas concentrações, devem, entre outras coisas, possuir atividade letal ou inibitória contra espécies microbianas e prevenir o desenvolvimento de microrganismos resistentes.<sup>46</sup>

Apesar da grande variedade de antibióticos produzidos pela indústria farmacêutica, tem-se observado o aparecimento de novos agentes patogênicos, assim como um aumento da resistência de microrganismos aos antibióticos tradicionais usados para fins terapêuticos, devido ao uso intensivo dos mesmos.<sup>47</sup>

Diante disso, a pesquisa por novos agentes antimicrobianos se faz necessária<sup>47</sup> e entre as fontes de possíveis moléculas bioativas estão as espécies

---

<sup>45</sup> SILVA, U. F.; CARDOSO, C. D.; ZANATTA, N.; MOREL, A. F.; ICHELN, D.; GEHRCKE, B. *Phytochem. Anal.*, **1996**, 7, 20-23.

<sup>46</sup> STÜKER, C. Z. Dissertação - Universidade Federal de Santa Maria, **2007**.

<sup>47</sup> OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. *Rev. Bras. Farmacogn.*, **2008**, 18, 2, 301-307.

vegetais. As plantas são capazes de produzir inúmeras substâncias naturais com potencial antimicrobiano e imunomodulador, a fim de se adaptarem às agressões do meio ambiente. Essas substâncias podem ser isoflavonoides, indóis, fitoesteróis, polissacarídeos, sesquiterpenos, alcaloides, glucanas, taninos, vitaminas e minerais.<sup>48</sup> Assim, a atividade antimicrobiana é um item relevante na caracterização de extratos,<sup>49</sup> óleos essenciais e substâncias obtidas de espécies vegetais.

Ensaio antimicrobianos são de grande importância, pois avaliam a suscetibilidade dos microrganismos frente a diferentes agentes antimicrobianos.<sup>50</sup> Vários métodos são utilizados na determinação da atividade antimicrobiana *in vitro*, sendo aplicados em estudos preliminares na triagem de novas substâncias ativas. A técnica de difusão em ágar e métodos de diluição em meio líquido são comumente utilizados para avaliação da potência antimicrobiana de compostos químicos.<sup>46</sup>

Técnicas de diluição, desenvolvidas em microplacas, permitem a análise de vários compostos e de uma ampla variedade de microrganismos concomitantemente, utilizando pequenos volumes de amostra, com baixo custo, e apresentando bons resultados. Estas técnicas são de grande valia quando se tratando de produtos naturais, especialmente os de origem vegetal, extraídos em pequenas quantidades.<sup>46,51</sup>

---

<sup>48</sup> WILLIAMS, J. E. *Altern. Med. Rev.*, **2001**, 6, 6, 567-579.

<sup>49</sup> COWAN, M. M. *Clin. Microbiol. Rev.*, **1999**, 12, 4, 564-582.

<sup>50</sup> SEJAS, L. M.; SILBERT, S.; REIS, A. O.; SADER, H. S. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, **2003**, 39,1, 27-35.

<sup>51</sup> DEVIENNE, K. F.; RADDI, M. S. G. *Braz. J. Microbiol.*, **2002**, 33, 166-168.

## 4. PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1 Procedimentos experimentais gerais

#### 4.1.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram realizados em espectrômetro Bruker DPX-400 (operando a 400,13 MHz para  $^1\text{H}$  e 100,62 MHz para  $^{13}\text{C}$ ) e espectrômetro Bruker ASCEND 600 (operando a 600,13 MHz para  $^1\text{H}$  e 150,91 MHz para  $^{13}\text{C}$ ) do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria.

As amostras foram preparadas com solventes deuterados (0,4 mL) e quantidade de 5-20 mg do composto em tubos de 5 mm. Os solventes utilizados foram clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) e dimetilsulfóxido deuterado ( $\text{DMSO-}d_6$ ).

Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram registrados em “ppm” (partes por milhão) e as constantes de acoplamento ( $J$ ) foram calculadas em Hertz (Hz). Para a calibração dos espectros utilizou-se como referência interna o tetrametilsilano (TMS,  $\delta$  0,00 ppm) para os espectros de hidrogênio, e para a calibração dos espectros de carbono utilizou-se  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta$  77,00 ppm) e  $\text{DMSO-}d_6$  ( $\delta$  39,50 ppm).

#### 4.1.2 Aparelho de ponto de fusão

Os valores de ponto de fusão (Pf) das substâncias foram determinados em aparelho MQAPF-302 Digital da Microquímica Equipamentos.

#### 4.1.3 Índice de rotação ótica

A determinação da rotação ótica das amostras foi realizada em um polarímetro Perkin Elmer 341 automático com lâmpada de mercúrio com precisão de 0,05 graus, em cubeta de 10 cm de comprimento, utilizando clorofórmio como solvente. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Análises Químicas Industriais e Ambientais (LAQIA) / CEPETRO da Universidade Federal de Santa Maria.

#### 4.1.4 Espectrometria de Massas de Alta Resolução (EMAR)

As análises foram realizadas em um espectrômetro de massas de alta resolução modelo Xevo G2 Q-TOF da Waters do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria - Laboratório de Análises Químicas Industriais e Ambientais (LAQIA). As amostras foram introduzidas através de infusão direta de uma solução de ACN:H<sub>2</sub>O (1:1) com 0,1% de ácido fórmico a 5  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ , em modo ESI (+), tensão do capilar 2 kV, cone de extração 4 V, cone de amostragem 30 V. A temperatura da fonte foi de 150 °C, temperatura do gás de dessolvatação (N<sub>2</sub>) de 500 °C, fluxo de gás no cone a 10 L.h<sup>-1</sup> e do gás de dessolvatação (N<sub>2</sub>) a 600 L.h<sup>-1</sup>.

#### 4.1.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo Agilent 1200 com detector DAD (210-380 nm), utilizando-se coluna ZORBAX Eclipse Plus C18 (4,6 x 250 mm; 5  $\mu\text{m}$ ) em forno a 40 °C. Foi utilizado um gradiente de H<sub>2</sub>O:ACN com fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>. O sistema de gradiente consistiu de H<sub>2</sub>O:ACN 95:05 variando até 50:50 em um tempo de 30 min. De 30 a 40 min essa proporção variou a 05:95 e assim se manteve até o final da análise (60 min).

#### 4.1.6 Materiais e métodos cromatográficos

Nas separações por Cromatografia em Coluna (CC) utilizou-se sílica gel tipo F60 (Silicycle), 230-400 mesh como adsorvente. A purificação dos compostos foi feita por meio de Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP), utilizando-se placas de vidro (20 cm x 20 cm) recobertas com sílica gel 60 GF<sub>254</sub> (Sorbent) como adsorvente.

A cromatografia em Camada Delgada (CCD) foi realizada em cromatofolhas de alumínio e sílica gel 60 GF<sub>254</sub> como adsorvente. As cromatoplacas foram reveladas através de lâmpadas ultravioleta ( $\lambda = 254$  e  $365$  nm, Spectroline), reagente de Dragendorff para revelação de alcaloides e nebulização com solução de álcool etílico e ácido sulfúrico e (95:05, v/v) seguido de aquecimento para demais metabólitos.

Os solventes utilizados foram produtos analiticamente puros, ou então de grau comercial, sendo purificados por técnicas específicas de destilação, das marcas Vetec e Tedia. Os principais sistemas de solvente utilizados para CC, CCD e CCDP foram: clorofórmio:metanol 96:04, 95:05, 93:07, 90:10 v/v; clorofórmio:acetona 95:05, 90:10 v/v e dicloro:metanol 95:05 v/v.

## 4.2 *Scutia buxifolia*

### 4.2.1 Coleta do material vegetal

As cascas do caule da espécie *Scutia buxifolia* foram coletadas no município de Santana do Livramento, RS em agosto de 2012.

A identificação do material botânico foi realizada através de comparação com amostra já existente no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Maria, sob o código SMDB 3296.

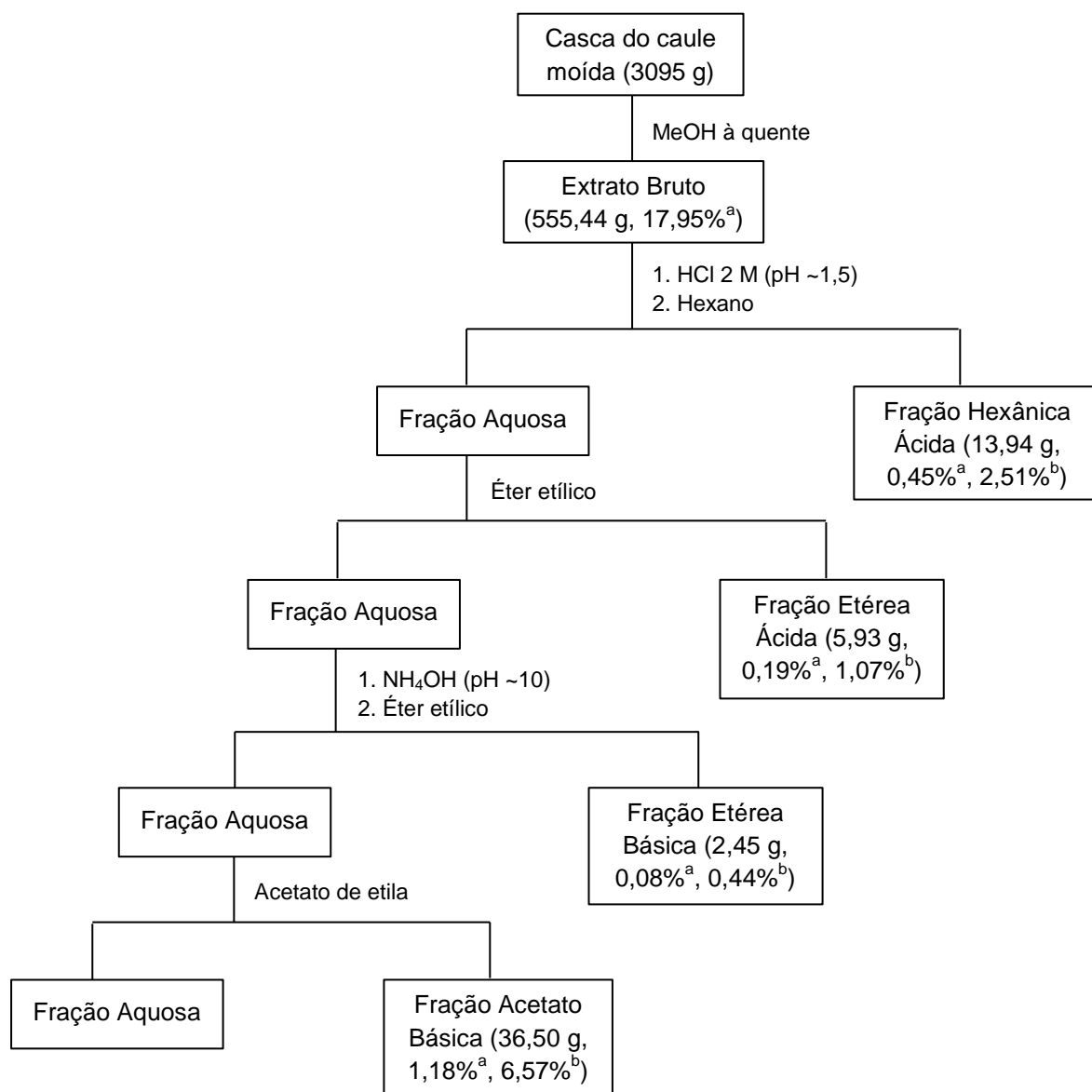
#### 4.2.2 Extração, fracionamento e cromatografia

O material vegetal coletado foi seco em estufa de ar circulante a temperatura de 50 °C e, posteriormente, triturado em moinho mecânico, obtendo-se 3,095 Kg. Este material foi submetido à extração a quente em aparelho de Soxhlet, utilizando-se metanol como solvente. Após extração exaustiva do material, o solvente foi evaporado em rota evaporador a pressão reduzida, obtendo-se um resíduo escuro e viscoso, denominado extrato bruto (EB).

O extrato bruto (555,44 g) foi solubilizado em água, acidificado com ácido clorídrico (HCl) 2 M a pH próximo de 1,5 e extraído, em funil de separação, primeiramente com hexano para remover o material graxo e depois com éter etílico. Em ambos os casos o solvente foi evaporado em rota evaporador, obtendo-se duas frações: fração hexânica ácida (FHA) e fração etérea ácida (FEA). A solução aquosa remanescente foi alcalinizada com hidróxido de amônio (NH<sub>4</sub>OH) até pH próximo a 10 e extraída exaustivamente com éter etílico e acetato de etila, evaporando-se o solvente em rota evaporador. Desta forma obtiveram-se a fração etérea básica (FEB) e a fração acetato básica (FAB). O fracionamento é representado no Esquema 1.

As frações obtidas foram submetidas à análise em CCD, utilizando-se vários sistemas de solvente. Após eluição, as placas cromatográficas foram reveladas em lâmpadas UV<sub>254 nm</sub> e UV<sub>365 nm</sub>, reagente de Draggendorf e solução álcool etílico: ácido sulfúrico (95:05 v/v) seguido de aquecimento. As frações etérea básica e acetato básica apresentaram manchas alaranjadas frente ao reagente de Draggendorf, mostrando positividade para alcaloides. A fração etérea ácida apresentou manchas escuras quando revelada com solução de ácido sulfúrico.

Devido à forte positividade da fração etérea básica frente a alcaloides, esta foi analisada separadamente para isolamento e identificação dos mesmos.



<sup>a</sup> Rendimento em relação à planta moída

<sup>b</sup> Rendimento em relação ao extrato bruto

Esquema 1 - Fracionamento do extrato bruto de *Scutia buxifolia*.

#### 4.2.3 Fração etérea básica

A fração etérea básica (2,30 g) foi submetida à cromatografia em coluna, utilizando sílica gel F60 (230-400 mesh) como adsorvente e  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$  como sistema eluente, com aumento gradativo da polaridade. Frações de



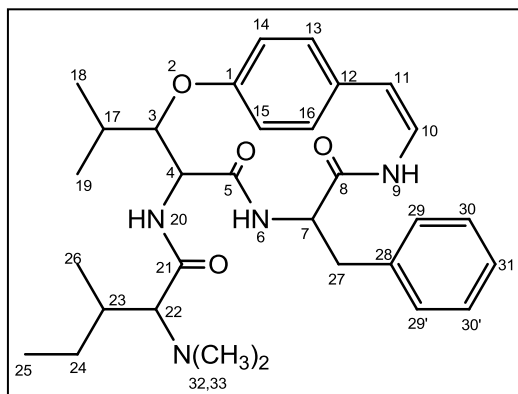
aproximadamente 100 mL foram coletadas, rotaevaporadas e analisadas por CCD. As frações semelhantes foram reunidas, conforme Tabela 2. As frações com mistura de substâncias foram submetidas a novos processos de purificação por CC ou CCDP.

Tabela 2 - Separação em coluna cromatográfica da fração etérea básica de *Scutia buxifolia*.

Subfrações	Frações	Sistema Solvente	Substância	Peso (mg)
I	1-16	CHCl <sub>3</sub> :MeOH 1%	Mistura	70,4
II	17-18	CHCl <sub>3</sub> :MeOH 1%	Mistura	16,3
III	19-24	CHCl <sub>3</sub> :MeOH 3%	P02 + Mistura	44,5
IV	25	CHCl <sub>3</sub> :MeOH 3%	P02	10,3
V	26-28	CHCl <sub>3</sub> :MeOH 3%	P02 + P12 + Mistura	140,5
VI	29-32	CHCl <sub>3</sub> :MeOH 3%	P02 + P12 + Mistura	34,3
VII	33-39	CHCl <sub>3</sub> :MeOH 5%	P12 + P06 + Mistura	41,2
VIII	40-44	CHCl <sub>3</sub> :MeOH 5%	P12 + P06 + Mistura	29,6
IX	45-49	CHCl <sub>3</sub> :MeOH 5%	P11 + Mistura	55,0
X	50-53	CHCl <sub>3</sub> :MeOH 10%	Mistura	50,4
XI	54-56	CHCl <sub>3</sub> :MeOH 10%	Mistura	31,5
XII	57-60	CHCl <sub>3</sub> :MeOH 15%	Mistura	26,0
XIII	61-67	CHCl <sub>3</sub> :MeOH 15%	Mistura	412,0
XIV	68-76	CHCl <sub>3</sub> :MeOH 20%	Mistura	315,7
XV	77-82	CHCl <sub>3</sub> :MeOH 30%	Mistura	332,2
XVI	83-89	CHCl <sub>3</sub> :MeOH 50%	Mistura	403,1
XVII	90-95	MeOH	Mistura	210,4

### 4.3 Metabólitos isolados e identificados de *Scutia buxifolia*

#### 4.3.1 Metabólito P02, scutianina C (14)



**Aspecto físico:** sólido branco (40 mg)

**Pf:** 211,5-213 °C (Lit. 202-204 °C)<sup>29</sup>

**Rf:** 0,45 (CHCl<sub>3</sub>:MeOH 95:05)

**[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>:** -220°, c=0,2 em CHCl<sub>3</sub> (Lit. -188°, c=0,1 em CHCl<sub>3</sub>)<sup>29</sup>

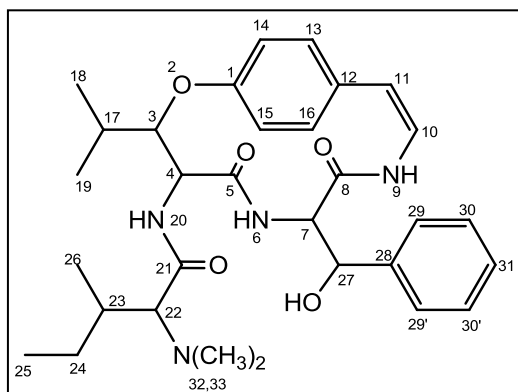
**Fórmula molecular:** C<sub>31</sub>H<sub>42</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>

**Massa molecular:** 534

**RMN de <sup>1</sup>H a 400,13 MHz, DMSO:** δ 4,75 (1H, dd, *J*=1,7; 8,1 Hz, H-3), δ 4,39 (1H, t, *J*=8,1 Hz, H-4), δ 6,90-7,25 (1H, NH-6), δ 4,14 (1H, dd, *J*=8,4; 13,8 Hz, H-7), δ 7,57 (1H, NH-9), δ 6,01 (1H, H-10), δ 6,55 (1H, d, *J*=7,6 Hz, H-11), δ 6,90-7,25 (4H, H-13, H-14, H-15, H-16), δ 2,18 (1H, m, H-17), δ 1,12 (3H, d, *J*=6,6 Hz, H-18), δ 0,93 (3H, d, *J*=6,6 Hz, H-19), δ 8,02 (1H, d, *J*=9,6 Hz, NH-20), δ 2,63 (1H, d, *J*=9,6 Hz, H-22), δ 1,70 (1H, m, H-23), δ 1,50 (1H, m, H-24), δ 1,03 (1H, m, H-24'), δ 0,77 (3H, t, *J*=7,2 Hz, H-25), δ 0,56 (3H, d, *J*=6,6 Hz, H-26), δ 2,70 (1H, m, H-27), δ 2,55 (1H, m, H-27'), δ 6,90-7,25 (5H, H-29, H-29', H-30, H-30', H-31), δ 2,18 (6H, s, H-32, H-33).

**RMN de <sup>13</sup>C a 100,62 MHz, DMSO:** δ 10,28, δ 14,78, δ 15,02, δ 20,26, δ 24,87, δ 27,86, δ 32,92, δ 37,88, δ 41,21 (C-32, C-33), δ 53,77, δ 54,68, δ 71,01, δ 81,31 (C-3), δ 118,85, δ 121,33, δ 126,02, δ 126,27, δ 128,09 (C-29, C-29'), δ 128,54, δ 128,71 (C-30, C-30'), δ 129,07, δ 129,91, δ 130,71, δ 136,78, δ 155,74, δ 168,73, δ 170,19, δ 170,25.

## 4.3.2 Metabólito P06, scutianina N (37)



**Aspecto físico:** sólido amarelado (16,5 mg)

**Pf:** 210,8-212 °C (Lit. 242-243 °C)<sup>32</sup>

**Rf:** 0,23 (CHCl<sub>3</sub>:MeOH 95:05)

**[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>** = -165°, c=0,2 em CHCl<sub>3</sub> (Lit. -233°, c=0,1 em CHCl<sub>3</sub>)<sup>32</sup>

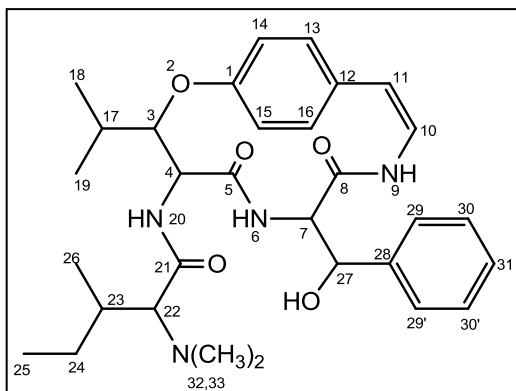
**Fórmula molecular:** C<sub>31</sub>H<sub>42</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>

**Massa molecular:** 550

**RMN de <sup>1</sup>H a 600,13 MHz, CDCl<sub>3</sub>:** δ 4,87 (1H, dd, *J*=2,0; 7,9 Hz, H-3), δ 4,41 (1H, H-4), δ 6,29 (1H, NH-6), δ 4,41 (1H, H-7), δ 6,29 (1H, NH-9), δ 6,48 (2H, d, *J*=5,6 Hz, H-10, H-11), δ 6,99 (1H, td, *J*=2,2; 8,3 Hz, H-13), δ 6,89 (1H, d, *J*=8,4 Hz, H-14 ou H-15), δ 7,10 (1H, dd, *J*=2,5; 8,4 Hz, H-14 ou H-15), δ 6,99 (1H, td, *J*=2,2; 8,3 Hz, H-16), δ 2,05 (1H, m, H-17), δ 1,23 (3H, d, *J*=6,8 Hz, H-18), δ 1,00 (3H, d, *J*=6,8 Hz, H-19), δ 7,12 (1H, NH-20), δ 2,58 (1H, d, *J*=3,7 Hz, H-22), δ 1,79 (1H, m, H-23), δ 1,55 (1H, m, H-24), δ 1,26 (1H, m, H-24'), δ 0,95 (3H, t, *J*=7,4 Hz, H-25), δ 0,89 (3H, d, *J*=6,8 Hz, H-26), δ 5,03 (1H, d, *J*=4,0 Hz, H-27), δ 7,25-7,32 (2H, m, H-29, H-29'), δ 7,32-7,36 (2H, m, H-30, H-30'), δ 7,25-7,32 (1H, m, H-31), δ 2,15 (6H, s, H-32, H-33), δ 3,95 (1H, OH).

**RMN de <sup>13</sup>C a 150,91 MHz, CDCl<sub>3</sub>:** δ 156,30 (C-1), δ 81,33 (C-3), δ 55,85 (C-4), δ 171,67 (C-5), δ 59,20 (C-7), δ 166,52 (C-8), δ 121,21 (C-10 ou C-11), δ 125,22 (C-10 ou C-11), δ 131,07 (C-12), δ 122,11 (C-13 ou C-16), δ 130,84 (C-13 ou C-16), δ 120,50 (C-14 ou C-15), δ 129,79 (C-14 ou C-15), δ 28,99 (C-17), δ 20,15 (C-18), δ 14,85 (C-19), δ 172,85 (C-21), δ 73,76 (C-22), δ 34,52 (C-23), δ 27,54 (C-24), δ 12,23 (C-25), δ 14,59 (C-26), δ 72,90 (C-27), δ 138,79 (C-28), δ 125,95 (C-29, C-29'), δ 128,57 (C-30, C-30'), δ 128,03 (C-31), δ 43,04 (C-32, C-33).

## 4.3.3 Metabólito P11, scutianina O (38)



**Aspecto físico:** sólido branco (5 mg)

**Pf:** 104-105 °C (Lit. 242-243 °C)<sup>32</sup>

**Rf:** 0,20 (CHCl<sub>3</sub>:MeOH 95:05)

**[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>:** +23,5°, c=0,17 em CHCl<sub>3</sub> (Lit. -233°, c=0,1 em CHCl<sub>3</sub>)<sup>32</sup>

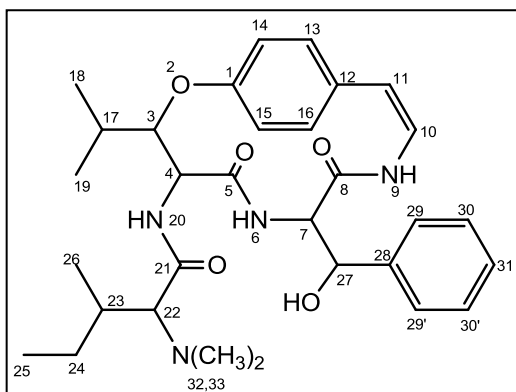
**Fórmula molecular:** C<sub>31</sub>H<sub>42</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>

**Massa molecular:** 550

**RMN de <sup>1</sup>H a 600,13 MHz, CDCl<sub>3</sub>:** δ 4,14 (1H, dd, *J*=5,0; 7,8 Hz, H-3), δ 4,57 (1H, dd, *J*=6,4; 7,8 Hz, H-4), δ 6,45 (1H, NH-6), δ 4,33 (1H, dd, *J*=3,6; 7,8 Hz, H-7), δ 6,40 (1H, NH-9), δ 6,24 (1H, H-10), δ 6,60 (1H, d, *J*=7,4 Hz, H-11), δ 7,03 (1H, m, H-13), δ 6,97 (1H, d, *J*=8,4 Hz, H-14 ou H-15), δ 7,13 (1H, dd, *J*=2,2; 8,4 Hz, H-14 ou H-15), δ 7,03 (1H, m, H-16), δ 2,74 (1H, H-17), δ 1,17 (3H, d, *J*=6,6 Hz, H-18 ou H-19), δ 1,18 (3H, d, *J*=6,6 Hz, H-18 ou H-19), δ 7,65 (1H, NH-20), δ 2,69 (1H, H-22), δ 1,87 (1H, m, H-23), δ 1,58 (1H, m, H-24), δ 1,32 (1H, m, H-24'), δ 0,96 (6H, H-25, H-26), δ 4,92 (1H, d, *J*=3,6 Hz, H-27), δ 7,24 (2H, d, *J*=8,3 Hz, H-29, H-29'), δ 7,30 (2H, t, *J*=7,3 Hz, H-30, H-30'), δ 7,26 (1H, s, H-31), δ 2,27 (6H, s, H-32, H-33).

**RMN de <sup>13</sup>C a 150,91 MHz, CDCl<sub>3</sub>:** δ 155,65 (C-1), δ 88,31 (C-3), δ 54,00 (C-4), δ 170,01 (C-5), δ 58,62 (C-7), δ 167,54 (C-8), δ 125,40 (C-10), δ 124,69 (C-11), δ 131,86 (C-12), δ 121,36 (C-13 ou C-16), δ 129,90 (C-13 ou C-16), δ 122,99 (C-14 ou C-15), δ 130,31 (C-14 ou C-15), δ 29,88 (C-17), δ 18,17 (C-18 ou C-19), δ 20,23 (C-18 ou C-19), δ 171,07 (C-21), δ 73,44 (C-22), δ 34,66 (C-23), δ 27,36 (C-24), δ 12,20 (C-25), δ 14,98 (C-26), δ 73,44 (C-27), δ 139,22 (C-28), δ 125,98 (C-29, C-29'), δ 128,47 (C-30, C-30'), δ 127,91 (C-31), δ 43,34 (C-32, C-33).

## 4.3.4 Metabólito P12, scutianina P (39)



**Aspecto físico:** sólido amarelado (12 mg)

**Pf:** 189-190 °C (Lit. 242-243 °C)<sup>32</sup>

**Rf:** 0,27 (CHCl<sub>3</sub>:MeOH 95:05)

**[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>** = -173,7°, c=0,19 em CHCl<sub>3</sub> (Lit. -233°, c=0,1 em CHCl<sub>3</sub>)<sup>32</sup>

**Fórmula molecular:** C<sub>31</sub>H<sub>42</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>

**Massa molecular:** 550

**RMN de <sup>1</sup>H a 600,13 MHz, CDCl<sub>3</sub>:** δ 4,87 (1H, dd, *J*=2,2; 7,8 Hz, H-3), δ 4,41 (1H, dd, *J*=7,8; 9,4 Hz, H-4), δ 6,38 (1H, d, *J*=7,6 Hz, NH-6), δ 4,33 (1H, dd, *J*=3,6; 7,6 Hz, H-7), δ 6,25 (1H, NH-9), δ 6,50 (2H, d, *J*=7,1 Hz, H-10, H-11), δ 7,01 (1H, m, H-13), δ 7,07 (1H, dd, *J*=2,4; 8,6 Hz, H-14 ou H-15), δ 7,11 (1H, dd, *J*=2,4; 8,6 Hz, H-14 ou H-15), δ 7,01 (1H, m, H-16), δ 1,96 (1H, m, H-17), δ 1,22 (3H, d, *J*=6,8 Hz, H-18), δ 0,98 (3H, d, *J*=6,8 Hz, H-19), δ 7,25 (1H, NH-20), δ 2,35 (1H, d, *J*=3,4 Hz, H-22), δ 1,72 (1H, m, H-23), δ 1,50 (1H, m, H-24), δ 1,31 (1H, m, H-24'), δ 0,93 (3H, t, *J*=7,2 Hz, H-25), δ 0,87 (3H, d, *J*=6,8 Hz, H-26), δ 5,11 (1H, m, H-27), δ 7,28 (4H, d, *J*=4,4 Hz, H-29, H-29', H-30, H-30'), δ 7,22 (1H, m, H-31), δ 2,00 (6H, s, H-32, H-33).

**RMN de <sup>13</sup>C a 150,91 MHz, CDCl<sub>3</sub>:** δ 156,35 (C-1), δ 81,43 (C-3), δ 55,38 (C-4), δ 172,18 (C-5), δ 58,86 (C-7), δ 171,64 (C-8), δ 125,49 (C-10), δ 120,94 (C-11), δ 131,19 (C-12), δ 129,99 (C-13 ou C-16), δ 130,96 (C-13 ou C-16), δ 120,67 (C-14 ou C-15), δ 122,31 (C-14 ou C-15), δ 29,03 (C-17), δ 20,19 (C-18), δ 14,89 (C-19), δ 167,32 (C-21), δ 72,26 (C-22), δ 34,09 (C-23), δ 28,22 (C-24), δ 12,47 (C-25), δ 15,06 (C-26), δ 72,26 (C-27), δ 139,52 (C-28), δ 126,23 (C-29, C-29'), δ 128,55 (C-30, C-30'), δ 127,84 (C-31), δ 42,74 (C-32, C-33).

#### 4.4 Atividade antimicrobiana *in-vitro*

A atividade antimicrobiana dos compostos foi determinada pelo método de microdiluição em caldo e a leitura das placas foi realizada por meio de aparelho espectrofotômetro, no comprimento de onda de 620 nm. Os ensaios microbiológicos foram realizados na Universidade do Oeste de Santa Catarina (UNOESC).

##### 4.4.1 Microrganismos e padrões utilizados

Para os ensaios microbiológicos, utilizaram-se cepas padrão da American Type Culture Collection (ATCC), constituídas de microrganismos gram-positivos, gram-negativos e fungos, conforme Tabela 3. Como antibióticos padrões foram utilizados ampicilina, azitromicina e levofloxacina para bactérias e nistatina para fungos.

Tabela 3 - Microrganismos indicadores.

Característica	Microrganismo	ATCC
Gram-positivos	<i>Enterococcus</i> spp.	6589
	<i>Staphylococcus aureus</i>	25923
	<i>Bacillus subtilis</i>	6633
	<i>Bacillus cereus</i>	33019
Gram-negativos	<i>Escherichia coli</i>	25922
	<i>Salmonella typhimurium</i>	14028
	<i>Burkholderia cepacia</i>	17759
	<i>Shigella sonnei</i>	25931
	<i>Morganella morganii</i>	25829
Fungos	<i>Cryptococcus neoformans</i>	28952
	<i>Candida albicans</i>	10231
	<i>Candida krusei</i>	6258
	<i>Candida parapsilosis</i>	22018
	<i>Candida tropicalis</i>	18803

#### 4.4.2 Meios de cultura

Os meios de cultura empregados para a análise estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4 - Meios de cultura empregados.

<b>Meio de Cultura</b>	<b>Utilização</b>	<b>Composição</b>	<b>Quantidade</b>
Meio ágar nutriente	Repique de bactérias	Cloreto de sódio	8,0 g
		Extrato de carne	3,0 g
		Peptona de gelatina	5,0 g
		Ágar bacteriológico	15,0 g
		Água destilada	1000 mL
Meio ágar Sabouraud dextrosado	Repique de fungos	Dextrose	40,0 g
		Peptona de carne	5,0 g
		Peptona de caseína	5,0 g
		Ágar	15,0 g
		Água destilada	1000 mL
Meio caldo caseína de soja	Cultivo de bactérias	Dextrose	2,5 g
		Cloreto de sódio	5,0 g
		Fosfato dibásico de potássio	2,5 g
		Peptona de caseína	17,0 g
		Peptona de soja	3,0 g
		Água destilada	1000 mL
Meio caldo Sabouraud dextrosado	Cultivo de bactérias	Dextrose	40,0 g
		Peptona de carne	5,0 g
		Peptona de caseína	5,0 g
		Água destilada	1000 mL

#### 4.4.3 Manutenção dos microrganismos indicadores

As cepas dos microrganismos indicadores foram armazenadas em tubos de ensaio inclinado contendo 5-8 mL de ágar nutriente para bactérias ou ágar

Sabouraud para fungos, em geladeira. Os repiques foram realizados de 24 a 48 horas antes de cada análise.

#### 4.4.4 Determinação da CIM e CLM

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

Os ensaios de microdiluição em caldo foram realizados em placas de 96 micropoços utilizando a técnica modificada do NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards).<sup>52,53</sup> Foi realizada a diluição seriada das amostras em meio caldo caseína de soja e Sabouraud, contendo 2% do surfactante Tween 80, iniciando da concentração de 500 µg.mL<sup>-1</sup> de amostra. Os poços foram então inoculados com a suspensão microbiana e as placas foram incubadas por 24 horas a 35-37 °C para bactérias e por 48 horas a 25-27 °C para fungos. Após o período de incubação, foi realizada a leitura das placas por meio de aparelho espectrofotômetro, em 620 nm, para a verificação da CIM.

As culturas de microrganismos que não apresentaram crescimento ou foram inibidas, foram inoculadas em meio sólido e após o tempo de incubação foi possível determinar a CLM (Concentração Letal Mínima), considerada a menor concentração de substância capaz de matar 99,9% das unidades formadoras de colônia (UFC).

Os testes foram realizados em triplicata, sendo realizada a análise dos padrões (ampicilina, azitromicina, levofloxacina e nistatina) simultaneamente.

---

<sup>52</sup> NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. 7th ed., CLSI document M7-A7, Wayne, PA, 2006.

<sup>53</sup> NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. 2nd ed., CLSI document M27-A2, Wayne, PA, 2002.



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados os resultados e a discussão do estudo fitoquímico realizado com extrato bruto, frações ácidas e básicas e metabólitos isolados das cascas do caule da espécie *Scutia buxifolia*. A determinação estrutural dos metabólitos isolados foi estabelecida com base na interpretação de dados espectrais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  uni e bidimensionais, espectrometria de massas de alta resolução e comparação com dados da literatura.

A investigação da fração etérea básica conduziu ao isolamento e identificação de quatro alcaloides ciclopeptídicos de 14-membros: scutianina C (**14**) e três diastereoisômeros de scutianina H (**19**), isolados e identificados pela primeira vez, codificados e nomeados neste trabalho como P06, scutianina N (**37**); P11, scutianina O (**38**) e P12, scutianina P (**39**). Estes compostos, assim como o extrato bruto e as frações ácidas e básicas, foram submetidos à análise antimicrobiana.

### 5.1 Rendimento do extrato bruto e frações ácidas e básicas

Após coleta, secagem e moagem das cascas do caule, obteve-se 3095 g do material seco moído, o qual foi extraído com metanol, obtendo-se 555,44 g do extrato bruto metanólico (EB). Este extrato foi submetido a um fracionamento ácido/base conforme descrito na parte experimental (pág. 45), obtendo-se as frações: hexânica ácida (FHA), etérea ácida (FEA), etérea básica (FEB) e acetato básica (FAB). Os rendimentos, em relação à planta moída e ao extrato bruto, são mostrados na Tabela 5.

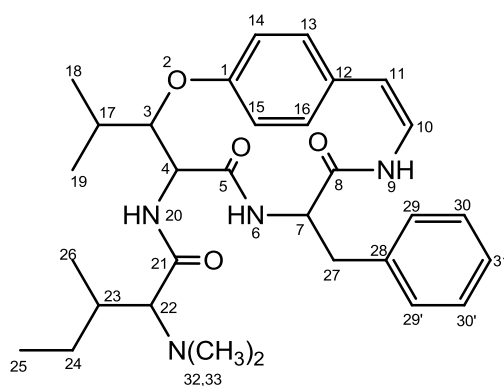
Tabela 5 - Rendimento das frações ácidas e básicas da espécie *Scutia buxifolia*.

Frações	Quantidade obtida (g)	% em relação à planta moída	% em relação ao extrato bruto
FHA	13,94	0,45	2,51
FEA	5,93	0,19	1,07
FEB	2,45	0,08	0,44
FAB	36,50	1,18	6,57

## 5.2 Metabólitos isolados de *Scutia buxifolia*: fração etérea básica

### 5.2.1 Alcaloide P02, scutianina C (**14**)

Este metabólito foi obtido como um sólido branco da fração etérea básica de *Scutia buxifolia*, conforme descrito na parte experimental (pág. 48). O alcaloide foi comparado, por CCD, com padrões de alcaloides isolados anteriormente e apresentou um R<sub>f</sub> muito semelhante ao padrão do alcaloide conhecido como scutianina C (**14**). A estrutura do composto foi confirmada por meio de experimentos de RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C e COSY, espectrometria de massas de alta resolução e comparação com dados da literatura.<sup>19</sup>



**14**  
Scutianina C

Pela análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 3) pode-se observar a presença das unidades  $\beta$ -hidroxileucina, fenilserina e *N,N*-dimetil isoleucina.

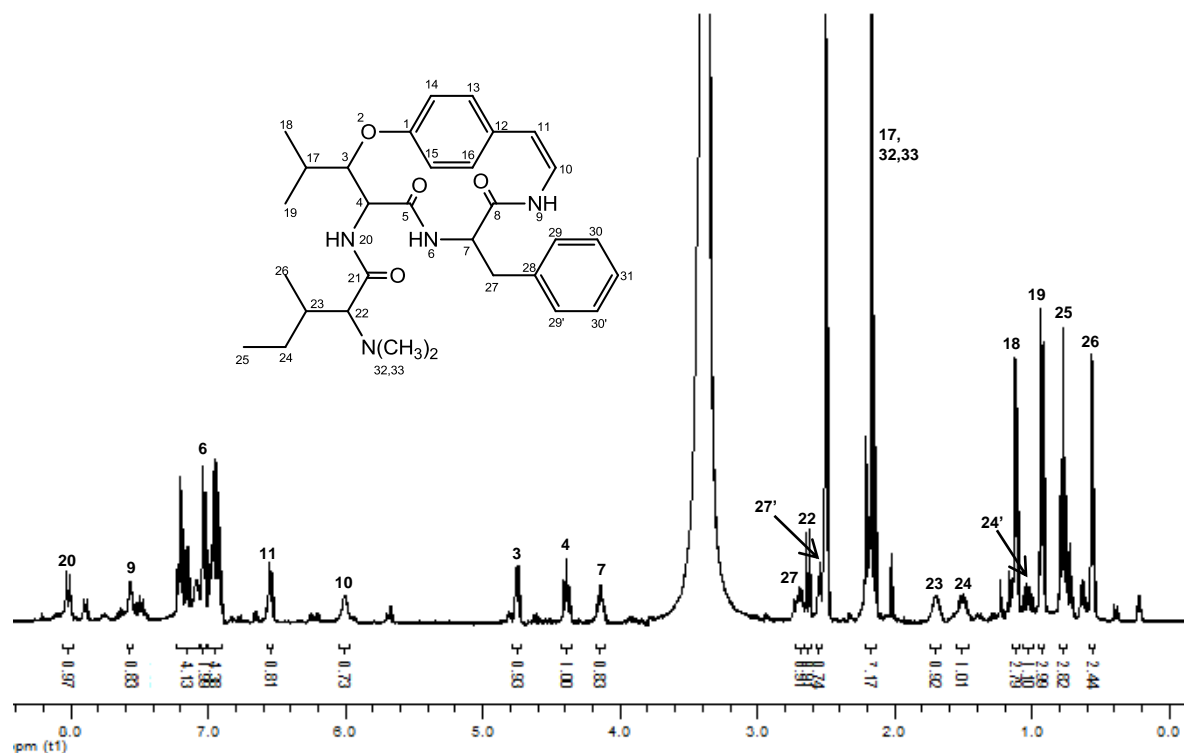


Figura 3 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de P02, scutianina C (**14**), em DMSO, a 400,13 MHz.

Na região espectral que compreende os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) entre 0,50-1,20 ppm observam-se quatro sinais referentes a metilas, correspondentes as unidades isoleucina e  $\beta$ -hidroxileucina. Os dupletos correspondentes aos hidrogênios metílicos H-18 e H-19 da unidade  $\beta$ -hidroxileucina absorvem em  $\delta$  1,12 ppm ( $J=6,6$  Hz) e  $\delta$  0,93 ppm ( $J=6,6$  Hz), respectivamente. Os hidrogênios metílicos da unidade isoleucina são verificados como um tripleto (H-25,  $\delta$  0,77 ppm,  $J=7,2$  Hz) e um duplete (H-26,  $\delta$  0,56 ppm,  $J=6,6$  Hz). Nessa região também é observada a presença do hidrogênio metilênico H-24' ( $\delta$  1,03 ppm).

Na região compreendida entre  $\delta$  1,40-2,75 ppm podem ser observados o H-24 ( $\delta$  1,50 ppm), os hidrogênios metínicos H-22 ( $\delta$  2,63 ppm), H-23 ( $\delta$  1,70 ppm) e H-17 ( $\delta$  2,18 ppm), os hidrogênios metílicos H-32 e H-33 da unidade *N,N*-dimetil

isoleucina ( $\delta$  2,18 ppm) e os hidrogênios metilênicos H-27 ( $\delta$  2,70 ppm) e H-27' ( $\delta$  2,55 ppm).

Estes sinais podem ser melhor visualizados na expansão do espectro apresentada na Figura 4.

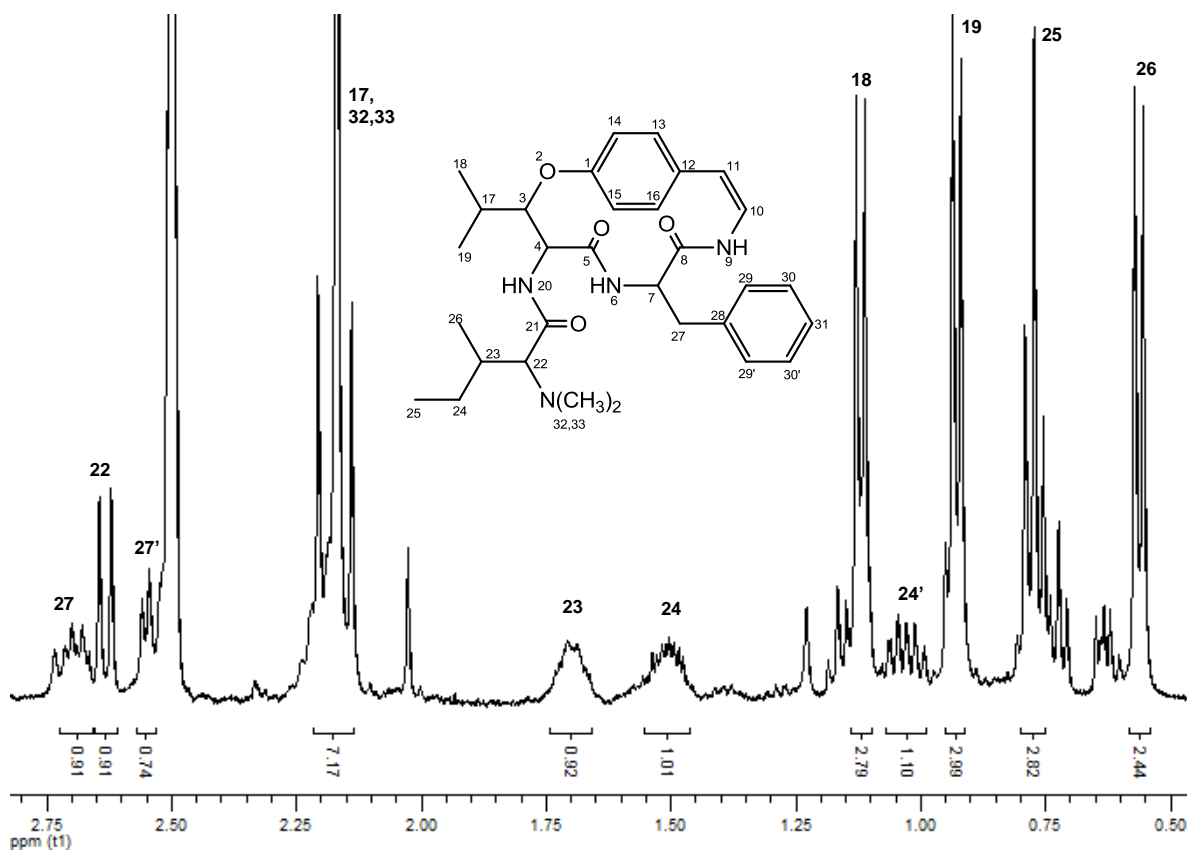


Figura 4 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  expandido (0,50-2,75 ppm) de P02, scutianina C (**14**), em DMSO, a 400,13 MHz.

Na região espectral compreendida entre  $\delta$  4,00-5,00 ppm, observa-se a presença dos hidrogênios metínicos  $\alpha$ -carbonílicos H-4 ( $\delta$  4,39 ppm, t,  $J=8,1$  Hz) e H-7 ( $\delta$  4,14 ppm, dd,  $J=8,1$ ; 13,8 Hz) e do hidrogênio  $\beta$ -carbonílico H-3 ( $\delta$  4,75 ppm, dd,  $J=1,7$ ; 8,1 Hz), conforme Figura 5.

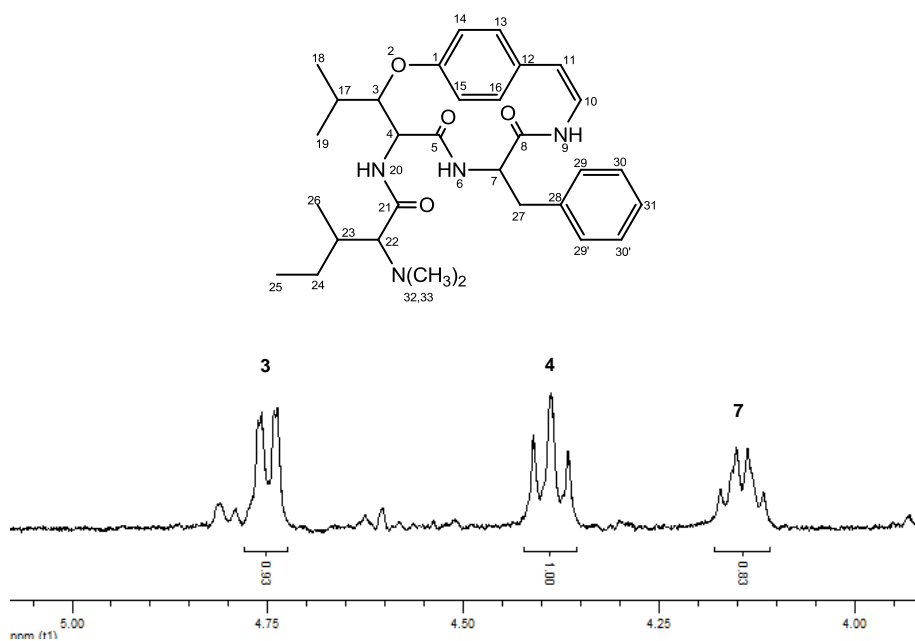


Figura 5 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  expandido (4,00-5,00 ppm) de P02, scutianina C (**14**), em DMSO, a 400,13 MHz.

Na região entre  $\delta$  6,80-7,30 ppm verifica-se a presença do hidrogênio amídico NH-6, juntamente com os sinais aromáticos das unidades estirilamina e fenilserina, porém, devido a sobreposição dos sinais, a atribuição de cada pico foi dificultada. Os sinais dos hidrogênios amídicos NH-9 e NH-20 (d,  $J=9,6$  Hz) têm seus deslocamentos químicos em 7,57 e 8,02 ppm, respectivamente. Os hidrogênios olefínicos H-10 e H-11 (d,  $J=7,6$  Hz), da unidade estirilamina, foram atribuídos aos sinais em  $\delta$  6,01 e 6,55 ppm, respectivamente. Estes deslocamentos podem ser visualizados na expansão do espectro mostrada na Figura 6.

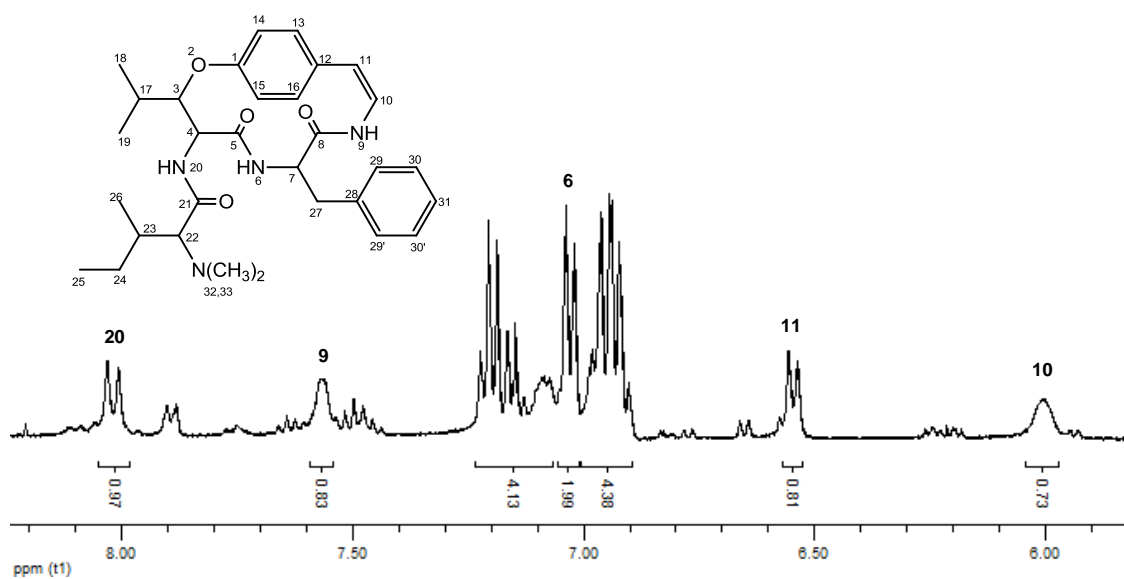


Figura 6 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  expandido (5,90-8,20 ppm) de P02, scutianina C (**14**), em DMSO, a 400,13 MHz.

No espectro de RMN de 2D, COSY, é possível observar as correlações dos hidrogênios, conforme Figura 7. Os principais sistemas de spins foram analisados, confirmando desta forma a presença das unidades isoleucina *N,N*-dimetilada,  $\beta$ -hidroxileucina e fenilserina.

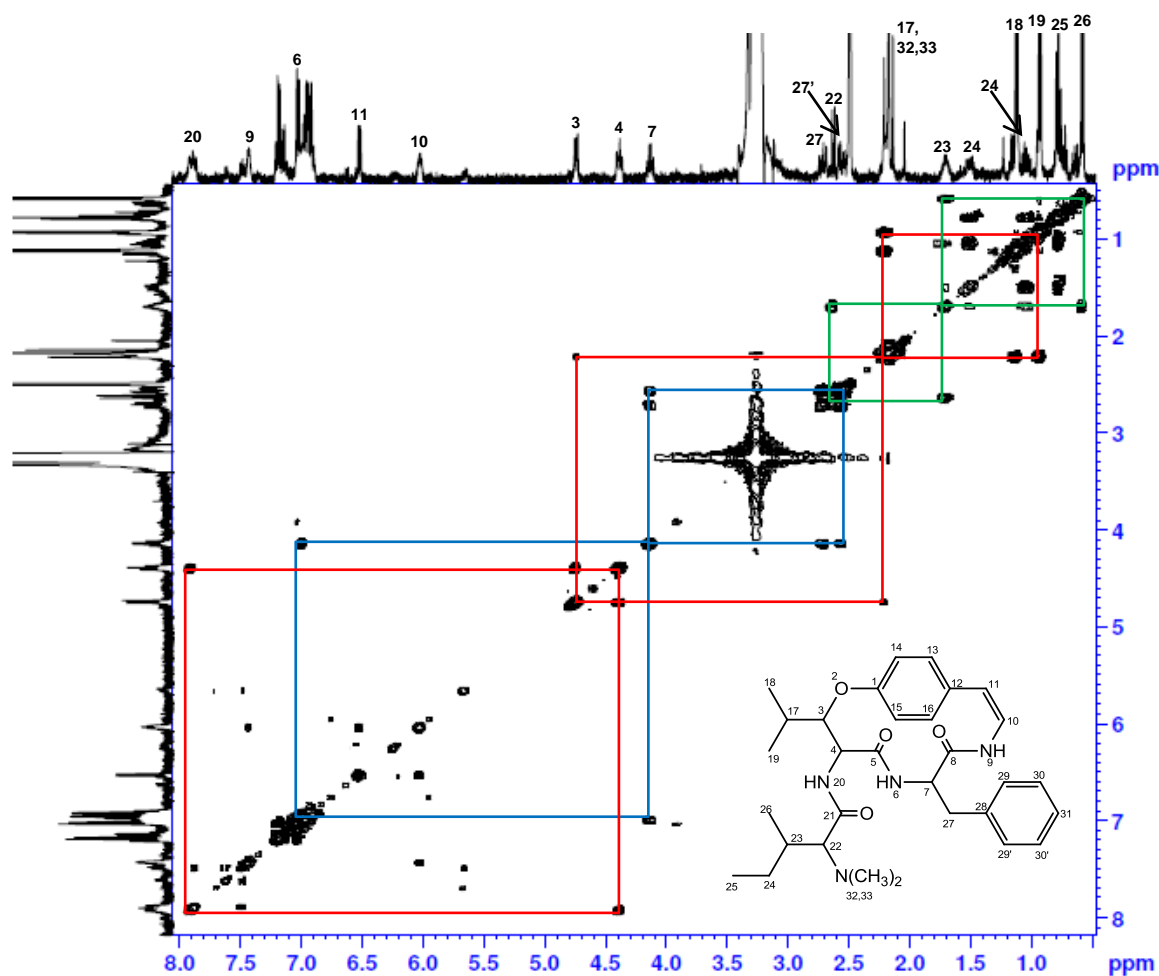


Figura 7 - Espectro de RMN 2D, COSY, de P02, scutianina C (**14**), em DMSO, a 400,13 MHz.

O tripleto H-25 ( $\delta$  0,77 ppm) tem correlação com H-24 e H-24' ( $\delta$  1,50 e 1,03 ppm). Estes correlacionam com o H-23 ( $\delta$  1,70 ppm) que também apresenta correlação com o hidrogênio metínico H-22 ( $\delta$  2,63 ppm) e com o hidrogênio metílico H-26 ( $\delta$  0,56 ppm), confirmando uma unidade isoleucina. Considerando a correlação do H-7 ( $\delta$  4,14 ppm) com os hidrogênios diastereotópicos H-27 e H-27' ( $\delta$  2,70 e 2,55 ppm), confirma-se a unidade isoleucina como o aminoácido *N,N*-dimetilado. Os hidrogênios metílicos H-18 ( $\delta$  1,12 ppm) e H-19 ( $\delta$  0,93 ppm) correlacionam com o H-17 ( $\delta$  2,18 ppm) que por sua vez correlaciona com o hidrogênio  $\beta$ -carbonílico H-3 ( $\delta$  4,75 ppm) e este com o com o hidrogênio  $\alpha$ -carbonílico H-4 ( $\delta$  4,39 ppm), confirmando a posição da unidade leucina. As correlações que confirmam a

presença das unidades *N,N*-dimetil isoleucina e  $\beta$ -hidroxileucina são mostradas na Figura 8.

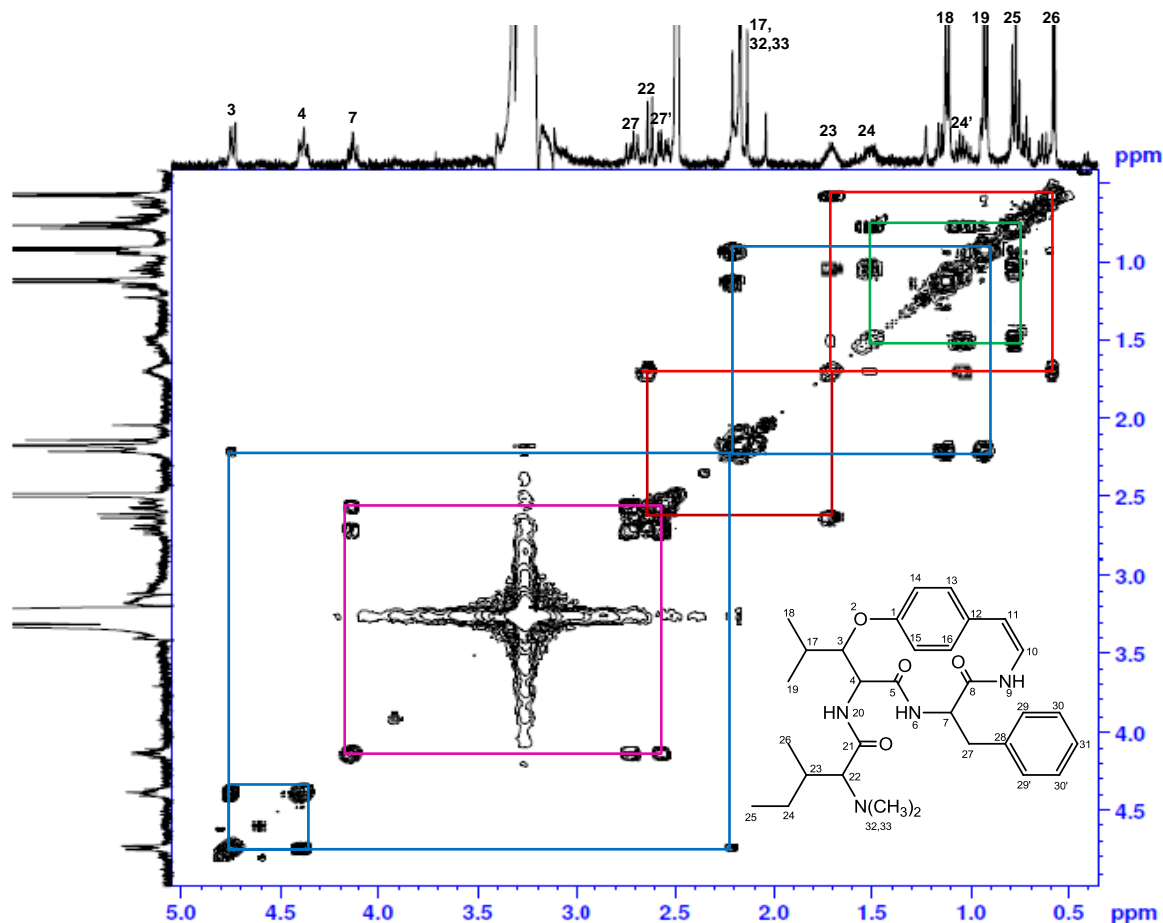


Figura 8 - Espectro de RMN 2D, COSY, expandido (0,50-5,00 ppm) de P02, scutianina C (**14**), em DMSO, a 400,13 MHz.

O H-7 ( $\delta$  4,14 ppm) possui correlação com o hidrogênio amídico NH-6, que está na mesma região espectral dos hidrogênios aromáticos, dificultando assim a atribuição do sinal com exatidão ( $\delta$  6,90-7,25 ppm). O hidrogênio  $\alpha$ -carbonílico H-4 ( $\delta$  4,39 ppm) correlaciona com o hidrogênio  $\beta$ -carbonílico H-3 ( $\delta$  4,75 ppm) e também com o hidrogênio amídico NH-20 ( $\delta$  8,02 ppm). Os hidrogênios olefínicos H-10 e H-11 ( $\delta$  6,01 e 6,55 ppm) têm correlação entre si, e o H-10 correlaciona também com o NH-9 ( $\delta$  7,57 ppm). Estas correlações são mostradas na Figura 9.



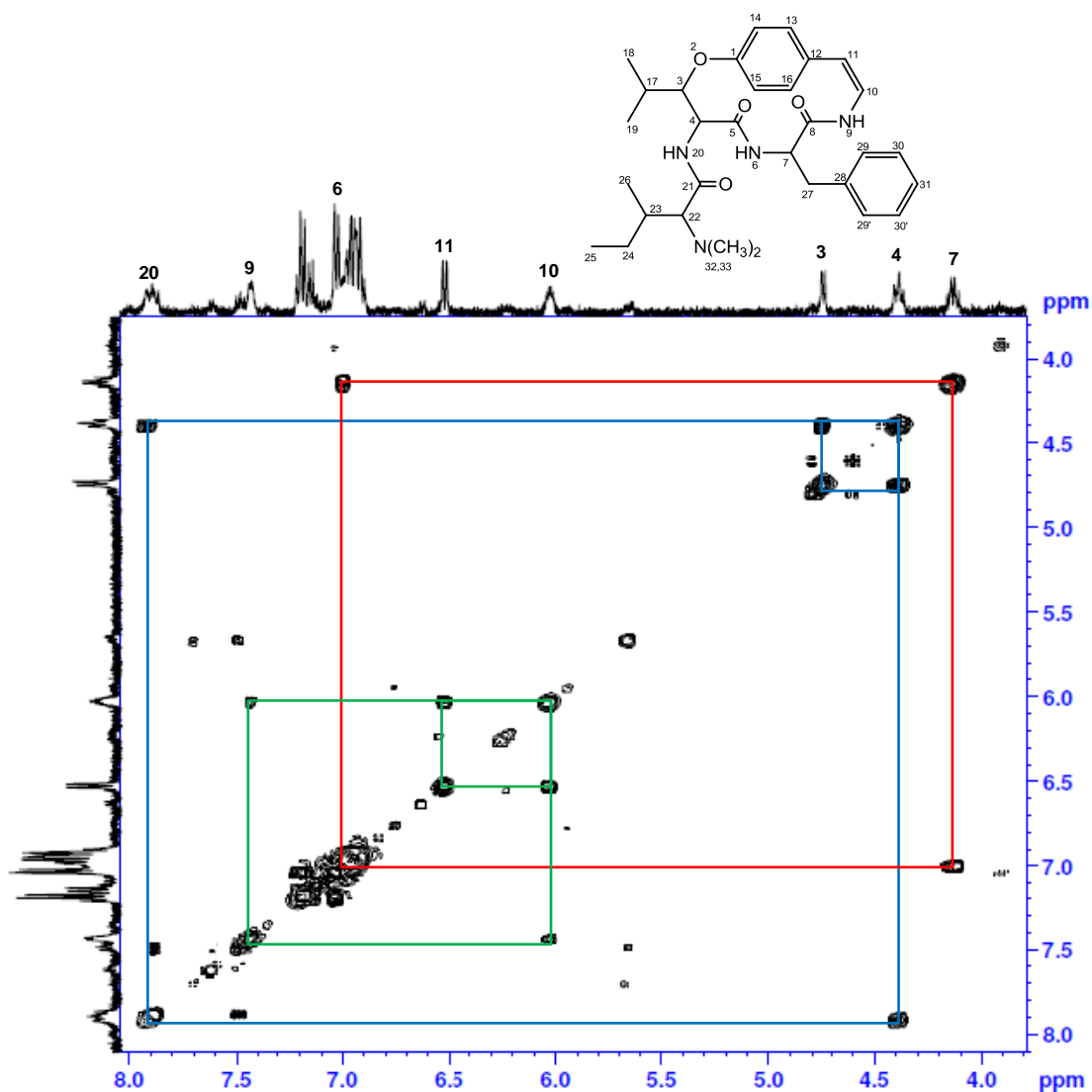


Figura 9 - Espectro de RMN 2D, COSY, expandido (4,00-8,00 ppm) de P02, scutianina C (**14**), em DMSO, a 400,13 MHz.

No espectro de  $^{13}\text{C}$  (Figura 10) é possível identificar 28 sinais distribuídos na região espectral entre  $\delta$  10,00-170,50 ppm, o que indica a presença de carbonos metílicos, metilênicos, metínicos e desprotonados. Entre eles, os três sinais de maior intensidade indicam sobreposição de dois núcleos de carbonos (C-29 e C-29', C-30 e C-30' e C-32 e C-33), o que remete a um total de 31 carbonos, como indicado na estrutura **14**.

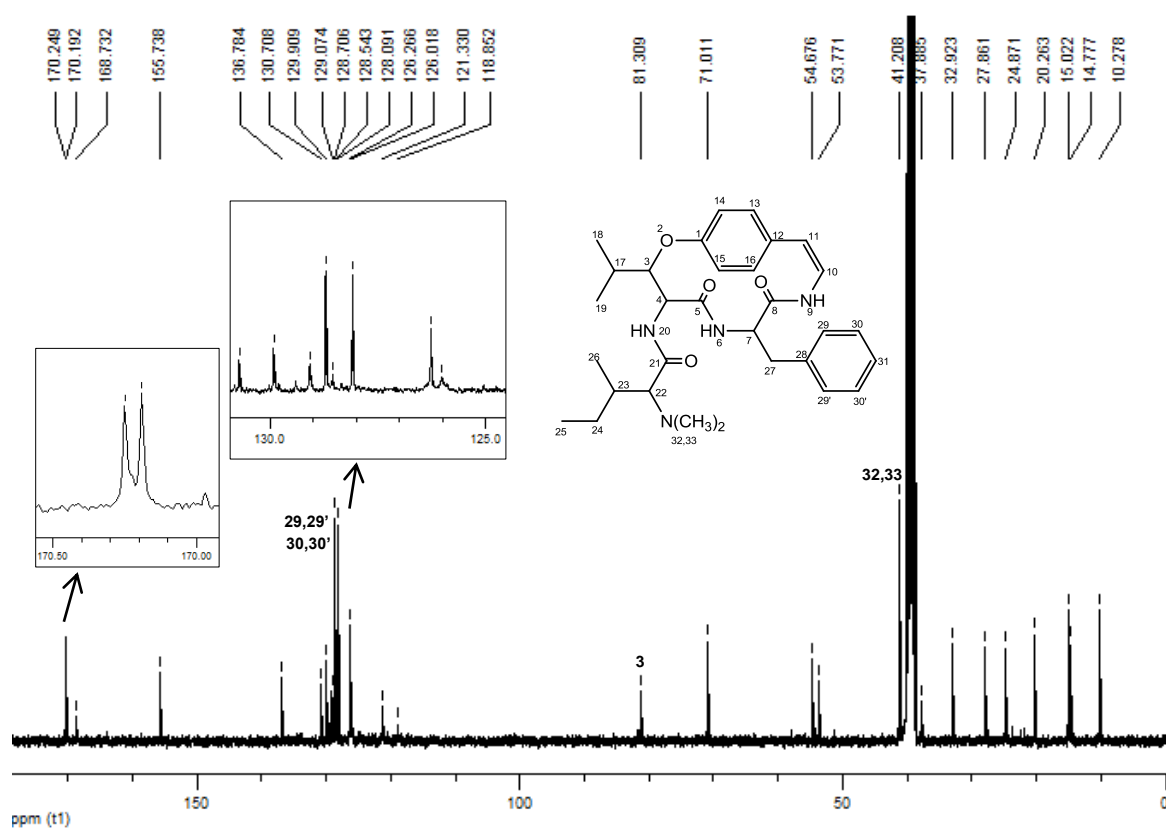


Figura 10 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de P02, scutianina C (**14**), em DMSO, a 100,62 MHz.

O peso molecular do alcaloide P02 foi confirmado através de espectrometria de massas de alta resolução (EMAR). O espectro de massas (Figura 11) exibe um íon  $[\text{M} + \text{H}]$  com  $m/z$  535,3274, indicando massa molecular correspondente à fórmula molecular de scutianina C ( $\text{C}_{31}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_4$ ).

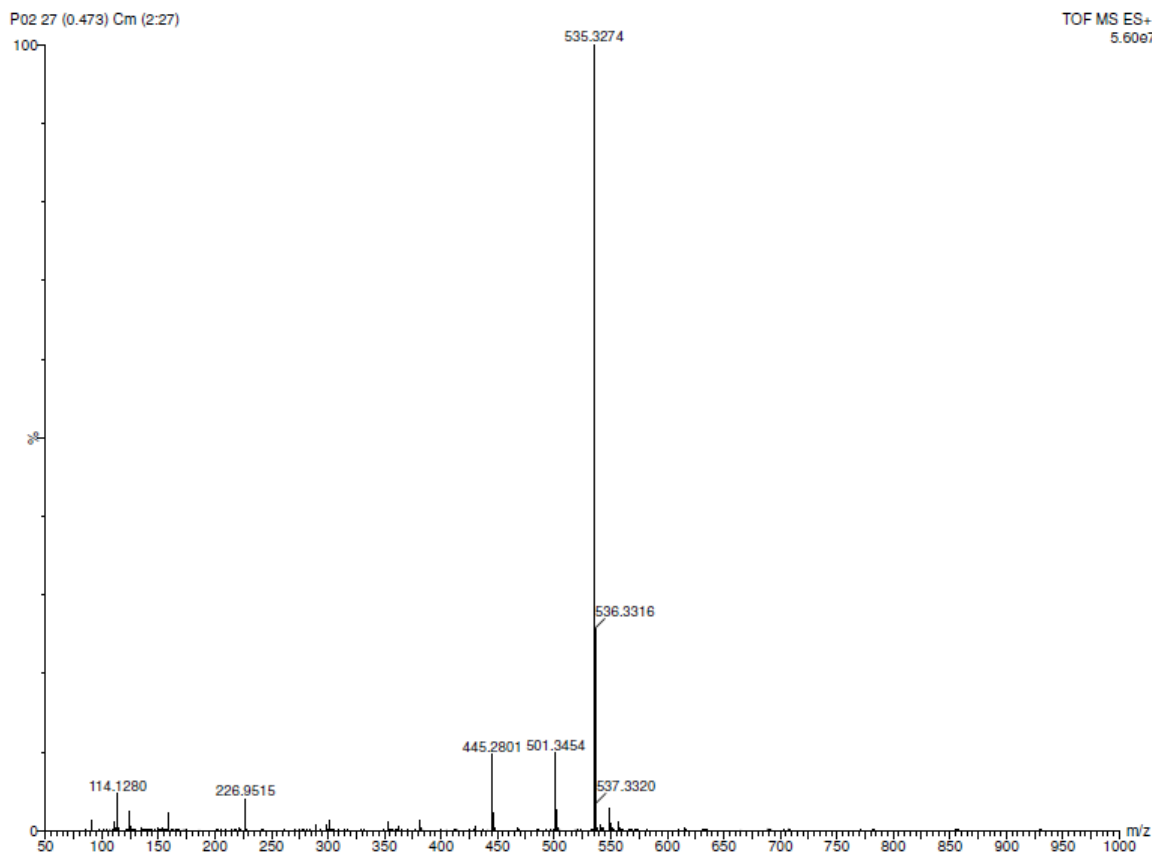


Figura 11 - Espectro de massas de alta resolução de P02, scutianina C (**14**).

Por meio das análises acima discutidas, o composto P02 foi identificado como o alcaloide ciclopeptídico scutianina C (**14**), já isolado desta espécie em estudos anteriores.<sup>9,17,19,29-34,36,38</sup> Os dados físicos e espectrais de RMN de  $^1\text{H}$  encontram-se descritos na parte experimental (pág. 48). Na Tabela 6 estão listados os deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  do composto P02 e dados comparativos da literatura.<sup>19</sup>

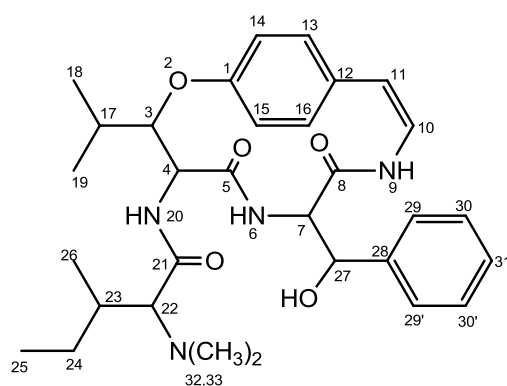
Tabela 6 - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  de P02, scutianina C (**14**), em DMSO, a 400,13 MHz.

Posição	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm); J (Hz)	* $\delta$ $^1\text{H}$ (ppm); J (Hz)
1	-	-
2	-	-
3	4,75 (dd, J=1,7; 8,1)	4,42 (d, J= 8,0)
4	4,39 (t, J= 8,1)	4,43 (d, J= 8,0)
5	-	-
6	6,90-7,00	6,95-7,27
7	4,14 (dd, J=8,1; 13,8)	4,19 (t)
8	-	-
9	7,57	6,95-7,27
10	6,01	6,58
11	6,55 (d, J=7,6)	6,28
12	-	-
13	6,90-7,25	6,95-7,27
14	6,90-7,25	6,95-7,27
15	6,90-7,25	6,95-7,27
16	6,90-7,25	6,95-7,27
17	2,18 (m)	2,05 (m)
18	1,12 (d, J=6,6)	1,21 (d, J=7,2)
19	0,93 (d, J=6,6)	0,98 (d, J= 7,2)
20	8,02 (d, J= 9,6)	6,95-7,27
21	-	-
22	2,63 (d, J=9,6)	2,49 (d, J=5,7)
23	1,70 (m)	1,78 (m)
24	1,50 (m)	1,53 (m)
24'	1,03 (m)	NR
25	0,77 (t, J=7,2)	0,93 (t)
26	0,56 (d, J=6,6)	0,84 (d, J=6,7)
27	2,70 (m)	2,79 (m)
27'	2,55 (m)	NR
28	-	-
29	6,90-7,25	6,95-7,27
29'	6,90-7,25	6,95-7,27
30	6,90-7,25	6,95-7,27
30'	6,90-7,25	6,95-7,27
31	6,90-7,25	6,95-7,27
32	2,18 (s)	2,11 (s)
33	2,18 (s)	2,11 (s)

\* $\delta$   $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400,13 MHz) conforme Maldaner (2010)<sup>18</sup>; NR=não referenciado

### 5.2.2 Alcaloide P06, scutianina N (**37**)

O alcaloide P06 (**37**) foi obtido como um sólido amarelado da fração etérea básica de *Scutia buxifolia*, conforme descrito na parte experimental (pág. 49). Este composto foi identificado por meio de dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (uni e bidimensionais), e seu peso molecular foi confirmado por espectrometria de massas de alta resolução.



**37**  
Scutianina N

Com base no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 12) é possível verificar a presença das unidades  $\beta$ -hidroxileucina, fenilserina e *N,N*-dimetil isoleucina.

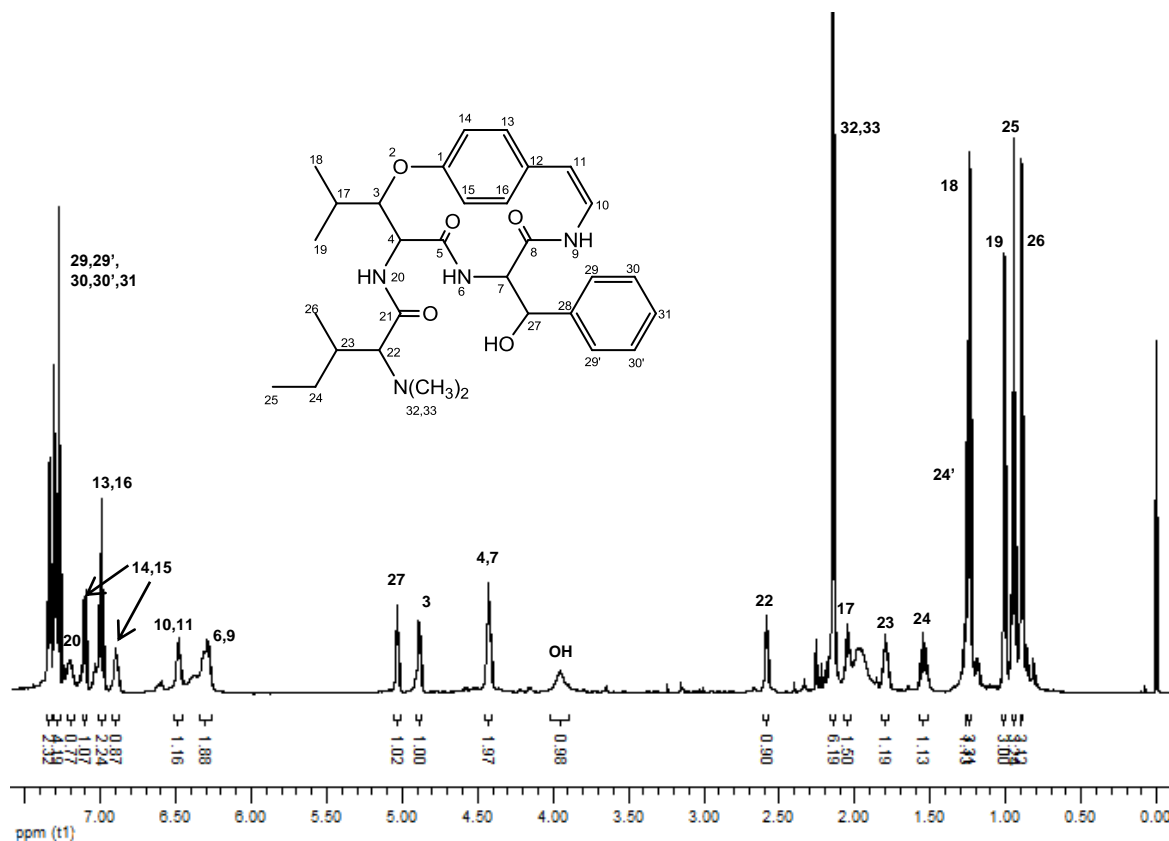


Figura 12 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de P06, scutianina N (**37**), em  $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz.

Na região espectral compreendida entre 0,80-2,65 ppm são observados os sinais dos hidrogênios metílicos da unidade isoleucina, H-25 ( $\delta$  0,95 ppm, t,  $J=7,4$  Hz) e H-26 ( $\delta$  0,89 ppm, d,  $J=6,8$  Hz) e da unidade  $\beta$ -hidroxileucina, na forma de dupletos, H-18 ( $\delta$  1,23 ppm,  $J=6,8$  Hz) e H-19 ( $\delta$  1,00 ppm,  $J=6,8$  Hz). Os hidrogênios metilênicos diastereotópicos H-24 e H-24' absorvem, na forma de multipletos, em  $\delta$  1,55 e 1,26 ppm, respectivamente. Também podem ser visualizados os hidrogênios metínicos H-23 ( $\delta$  1,79 ppm, m), H-17 ( $\delta$  2,05 ppm, m) e H-22 ( $\delta$  2,58 ppm, d,  $J=3,7$  Hz) e os hidrogênios metílicos H-32 e H-33 da unidade *N,N*-dimetil isoleucina como um simpleto em  $\delta$  2,15 ppm. A expansão do espectro é mostrada na Figura 13.

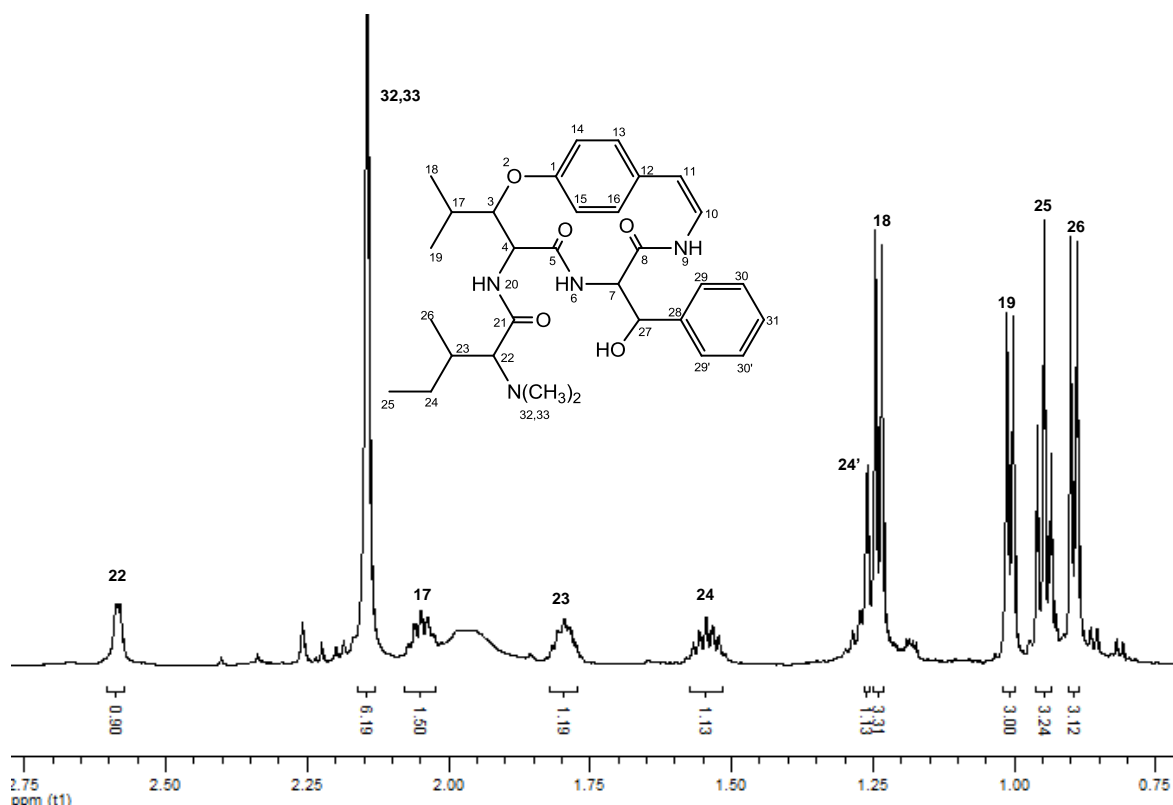


Figura 13 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  expandido (0,75-2,75 ppm) de P06, scutianina N (**37**), em  $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz.

O hidrogênio  $\beta$ -carbonílico H-3 da unidade  $\beta$ -hidroxileucina pode ser visto com deslocamento químico de 4,87 ppm, na forma de duplo duplete, devido ao acoplamento com o H-17 ( $J=2,0$  Hz) e com o H-4 ( $J=7,9$  Hz). Esta constante de acoplamento de aproximadamente 8,0 Hz sugere uma configuração *eritro* para o  $\beta$ -hidroxiaminoácido.<sup>21,22,25,37</sup> Os hidrogênios  $\alpha$ -carbonílicos H-4 e H-7 aparecem como um único sinal em  $\delta$  4,41 ppm e o hidrogênio  $\beta$ -carbonílico H-27 absorve em  $\delta$  5,03 ppm na forma de duplete ( $J=4,0$  Hz). Esta região espectral está expandida na Figura 14.

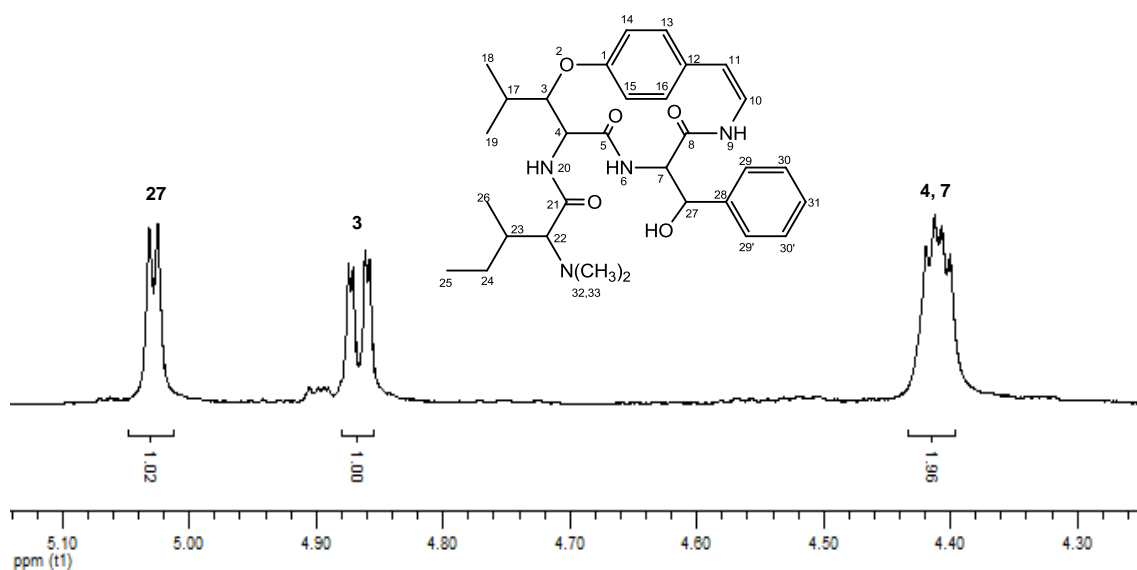


Figura 14 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  expandido (4,30-5,10 ppm) de P06, scutianina N (**37**), em  $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz.

Na Figura 15 pode-se observar a região entre 6,25-7,40 ppm, na qual encontram-se os sinais dos hidrogênios amídicos, olefínicos e aromáticos. Os hidrogênios amídicos NH-6 e NH-9 aparecem como um único sinal com deslocamento químico de 6,29 ppm, já o NH-20 aparece em campo mais baixo ( $\delta$  7,12 ppm). Os hidrogênios olefínicos H-10 e H-11 também aparecem juntos em  $\delta$  6,48 ppm e os hidrogênios aromáticos são observados na faixa entre 6,85-7,35 ppm.



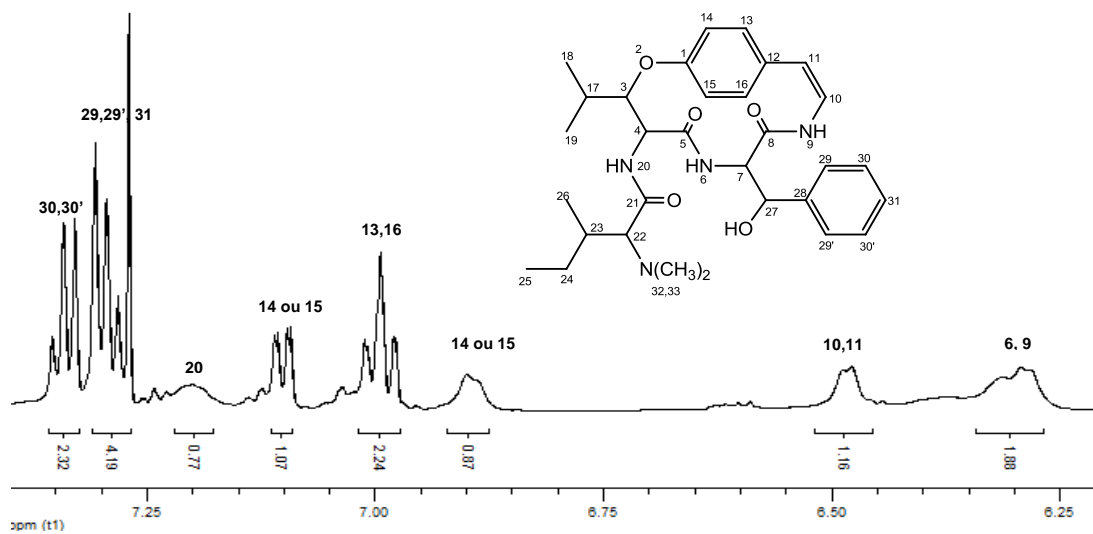


Figura 15 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  expandido (6,25-7,40 ppm) de P06, scutianina N (**37**), em  $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz.

No espectro de RMN de 2D, COSY, é possível observar três sistemas de spins distintos, como mostrado na Figura 16.

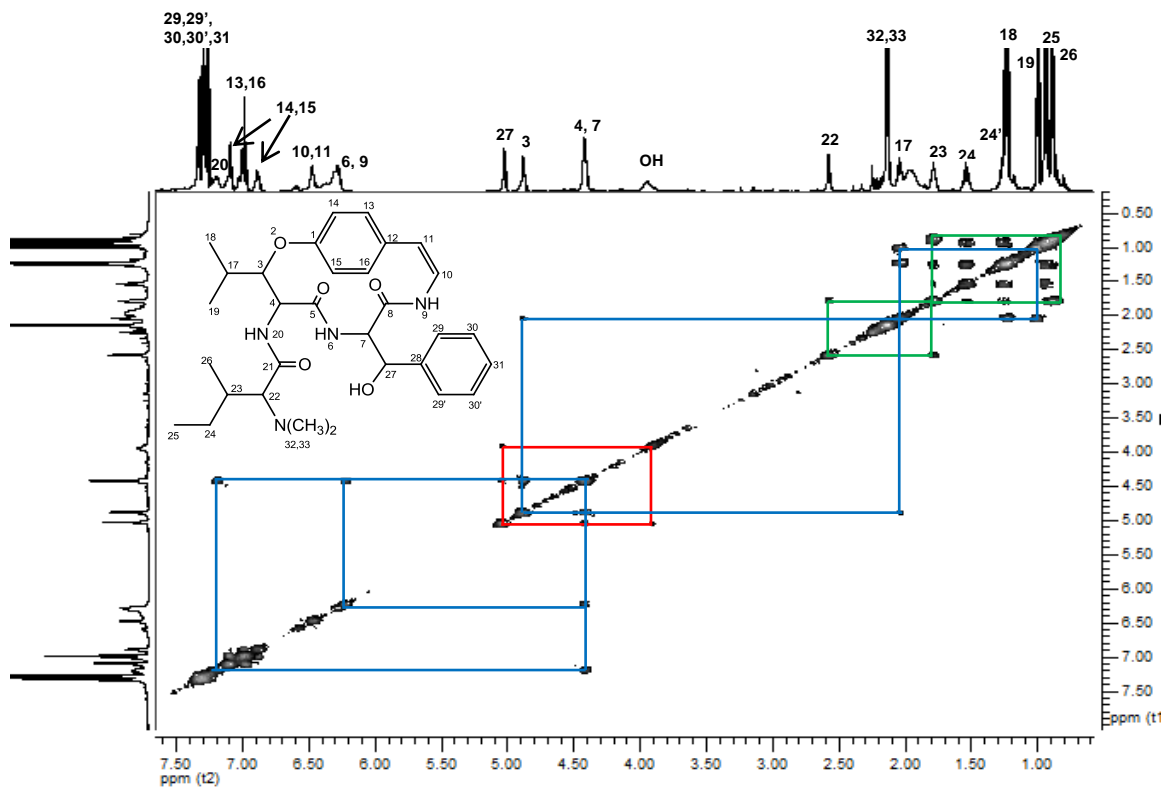


Figura 16 - Espectro de RMN 2D, COSY, de P06, scutianina N (**37**), em  $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz.

Para melhor identificação dos sistemas de spins fizeram-se necessárias expansões do espectro, que são mostradas nas Figuras 17 e 18.

Na atribuição dos sinais da unidade *N,N*-dimetil isoleucina, verifica-se a correlação do tripleto H-25 ( $\delta$  0,95 ppm) com os hidrogênios diastereotópicos H-24 ( $\delta$  1,55 ppm) e H-24' ( $\delta$  1,26 ppm). Estes correlacionam com o hidrogênio metínico H-23 ( $\delta$  1,70 ppm) que, por sua vez, apresenta correlação com o H-22 ( $\delta$  1,79 ppm) e com o H-26 ( $\delta$  0,89 ppm). Os hidrogênios metílicos H-32 e H-33 da unidade *N,N*-dimetil apresentam-se na forma de simpleto com deslocamento químico de 2,15 ppm e não apresentam qualquer correlação.

Os hidrogênios H-18 ( $\delta$  1,23 ppm) e H-19 ( $\delta$  1,00 ppm) da unidade  $\beta$ -hidroxileucina têm correlação com o H-17 ( $\delta$  2,05 ppm) que, por sua vez, correlaciona com o hidrogênio  $\beta$ -carbonílico H-3 ( $\delta$  4,87 ppm). A partir do H-3 é possível identificar o H-4 ( $\delta$  4,41 ppm) pela correlação entre eles, sendo que este último completa o sistema de spins se correlacionando com o hidrogênio amídico NH-20 ( $\delta$  7,12 ppm).

O hidrogênio  $\alpha$ -carbonílico H-7 possui correlação com o hidrogênio amídico NH-6 ( $\delta$  6,29 ppm) e com o hidrogênio metínico H-27 ( $\delta$  5,03 ppm). Este último correlaciona também com a hidroxila (OH,  $\delta$  3,95 ppm), completando o sistema de spins da unidade fenilserina do sistema macrociclo de 14-membros.

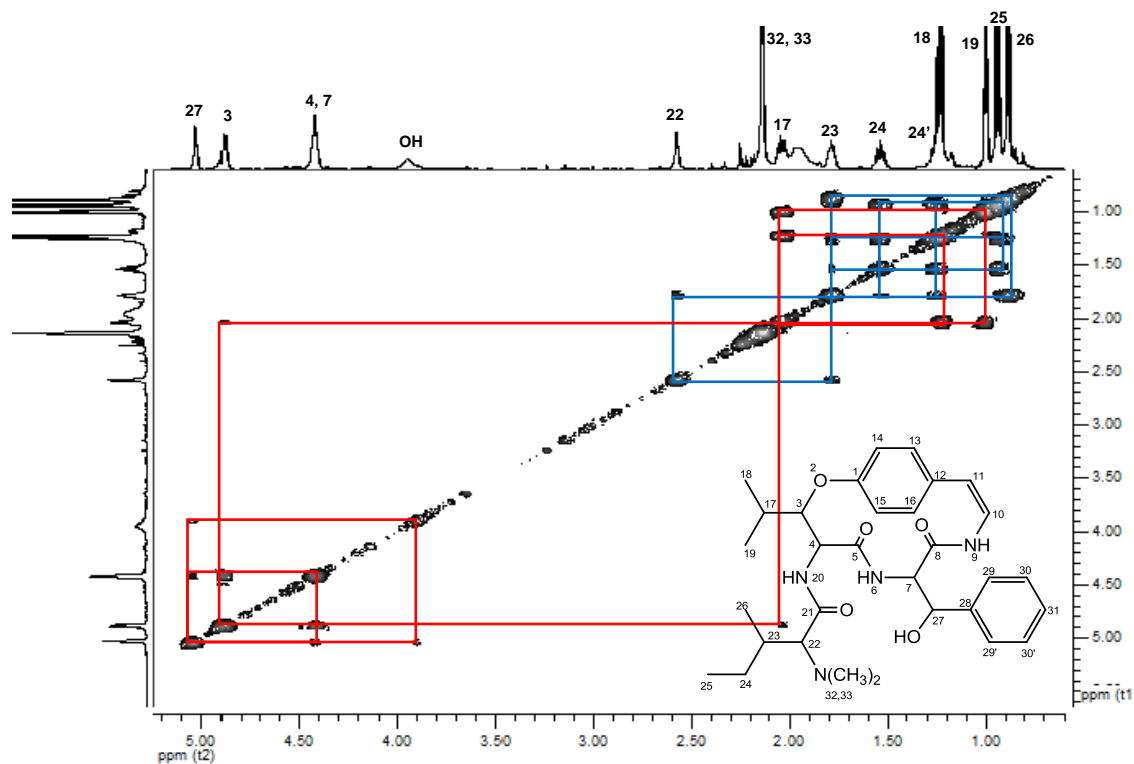


Figura 17 - Espectro de RMN 2D, COSY, expandido (1,00-5,00 ppm) de P06, scutianina N (**37**), em  $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz.

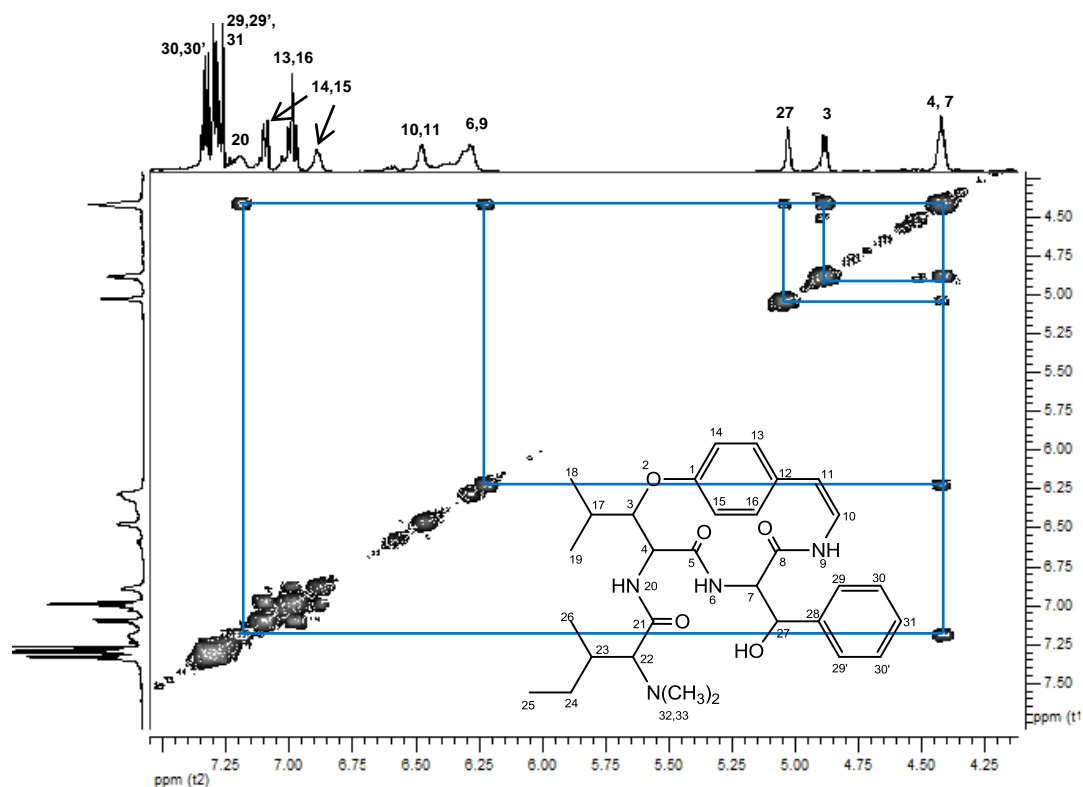


Figura 18 - Espectro de RMN 2D, COSY, expandido (4,25-7,50 ppm) de P06, scutianina N (**37**), em  $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 19) mostra sinais distribuídos na região espectral entre  $\delta$  12,00-173,00 ppm, indicando a presença de carbonos metílicos, metilênicos, metínicos e desprotonados.

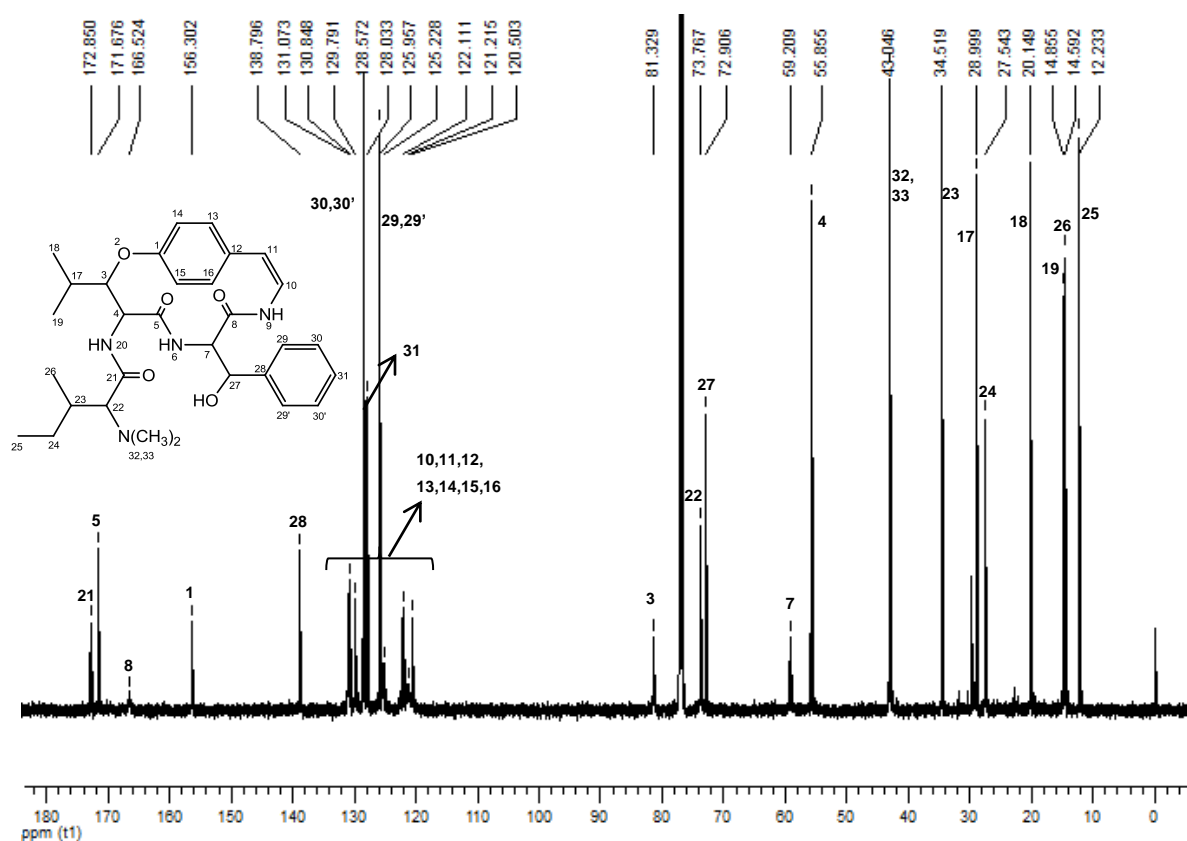


Figura 19 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de P06, scutianina N (**37**), em  $\text{CDCl}_3$ , a 150,91 MHz.

Na região entre  $\delta$  12,00-15,00 ppm encontram-se os carbonos metílicos das unidades isoleucina (C-25,  $\delta$  12,23 ppm e C-26,  $\delta$  14,59 ppm) e  $\beta$ -hidroxileucina (C-18,  $\delta$  20,15 ppm e C-19,  $\delta$  14,85 ppm). O carbono metilênico C-24 aparece em  $\delta$  27,54 ppm. Os sinais em  $\delta$  28,99 e 34,52 ppm são referentes aos carbonos C-17 e C-23, respectivamente. Em  $\delta$  43,04 ppm é observado o sinal dos carbonos metílicos da unidade *N,N*-dimetil, C-32 e C-33. Os sinais dos carbonos metínicos C-3, C-4, C-7, C-22 e C-27 são observados entre  $\delta$  55,80-81,40 ppm.

Os dados de deslocamento químico dos carbonos C-3 e C-4 podem ser utilizados para prever a estereoquímica destes centros quirais. Assim, os

deslocamentos químicos de 81,33 ppm para o C-3 e 55,85 ppm para C-4, sugerem uma estereoquímica *L-eritro* para a unidade  $\beta$ -hidroxileucina, conforme dados da literatura.<sup>21,22,25,37</sup> A Figura 20 mostra uma expansão do espectro, onde estes deslocamentos podem ser melhor visualizados.

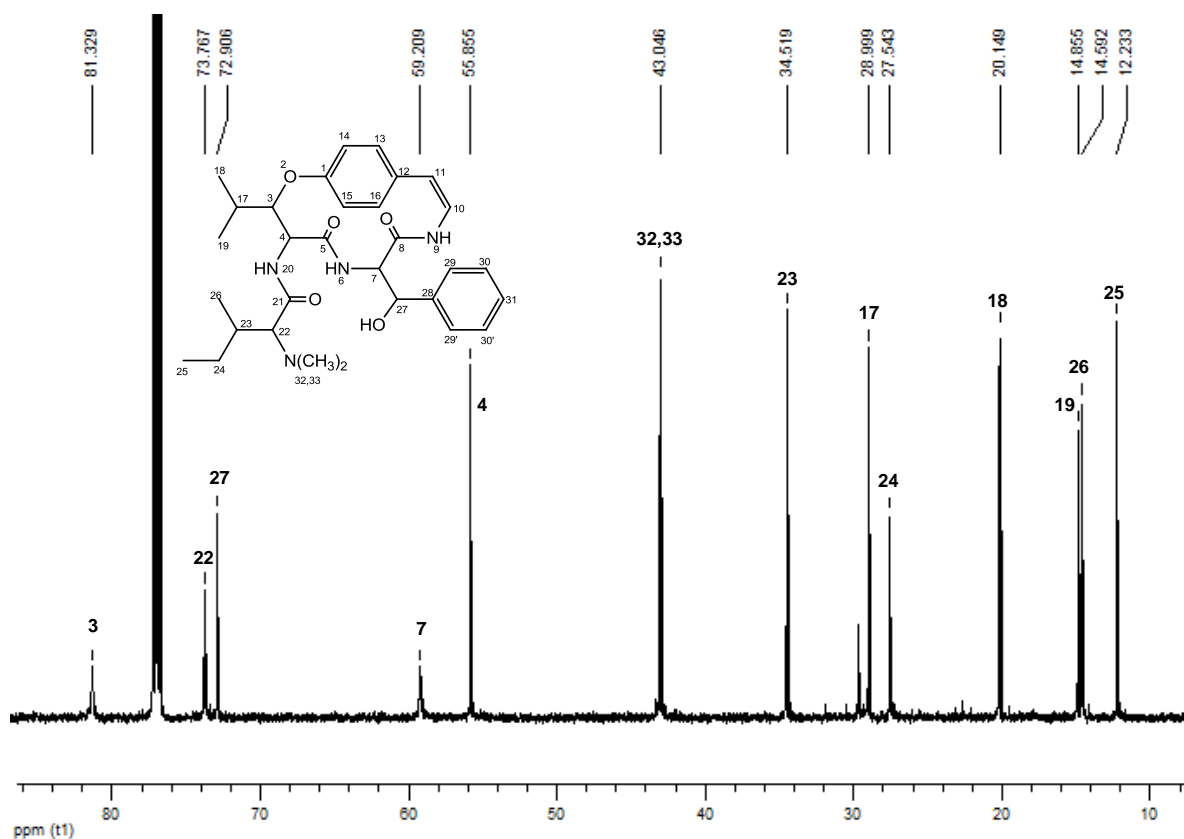


Figura 20 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  expandido (10,0-86,0 ppm) de P06, scutianina N (**37**), em  $\text{CDCl}_3$ , a 150,91 MHz.

Na região entre  $\delta$  120,00-173,00 ppm são observados carbonos metínicos e desprotonados, como mostra a Figura 21.

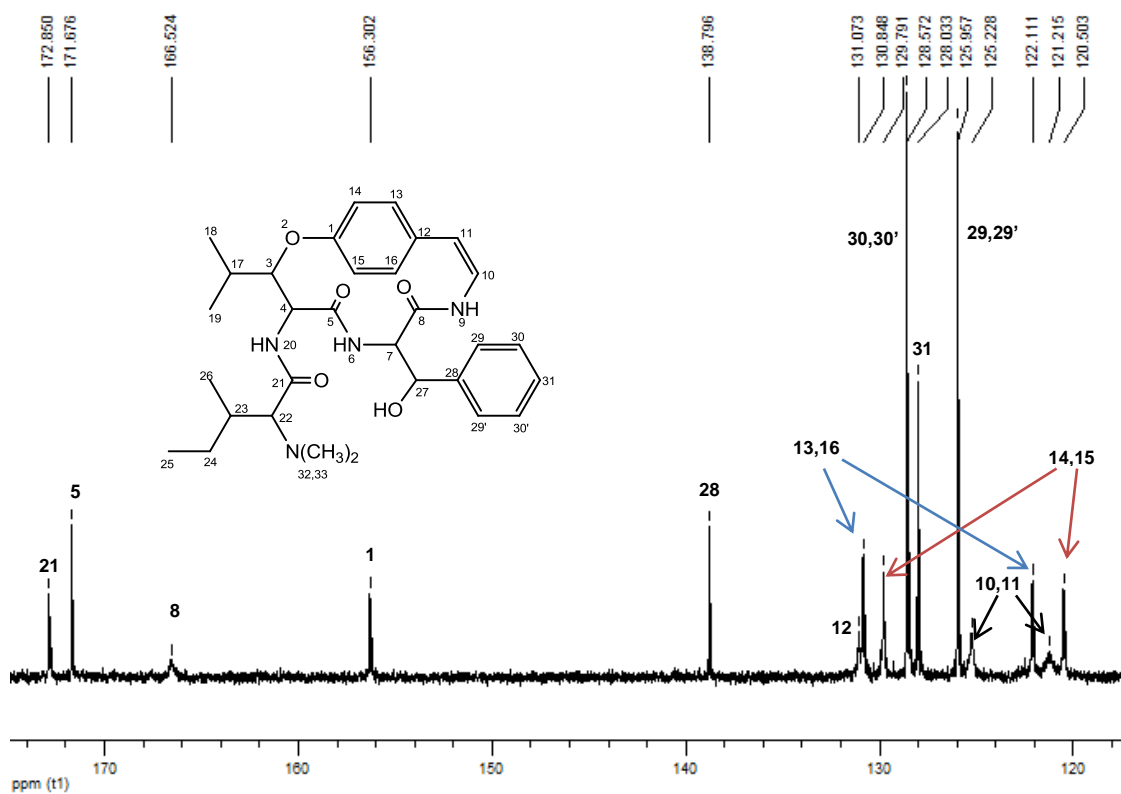


Figura 21 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  expandido (120,0-174,0 ppm) de P06, scutianina N (**37**), em  $\text{CDCl}_3$ , a 150,91 MHz.

Pela análise do espectro de RMN bidimensional, HMQC, é possível observar as correlações entre carbono e hidrogênio existentes na estrutura de P06 (Figuras 22, 23 e 24).

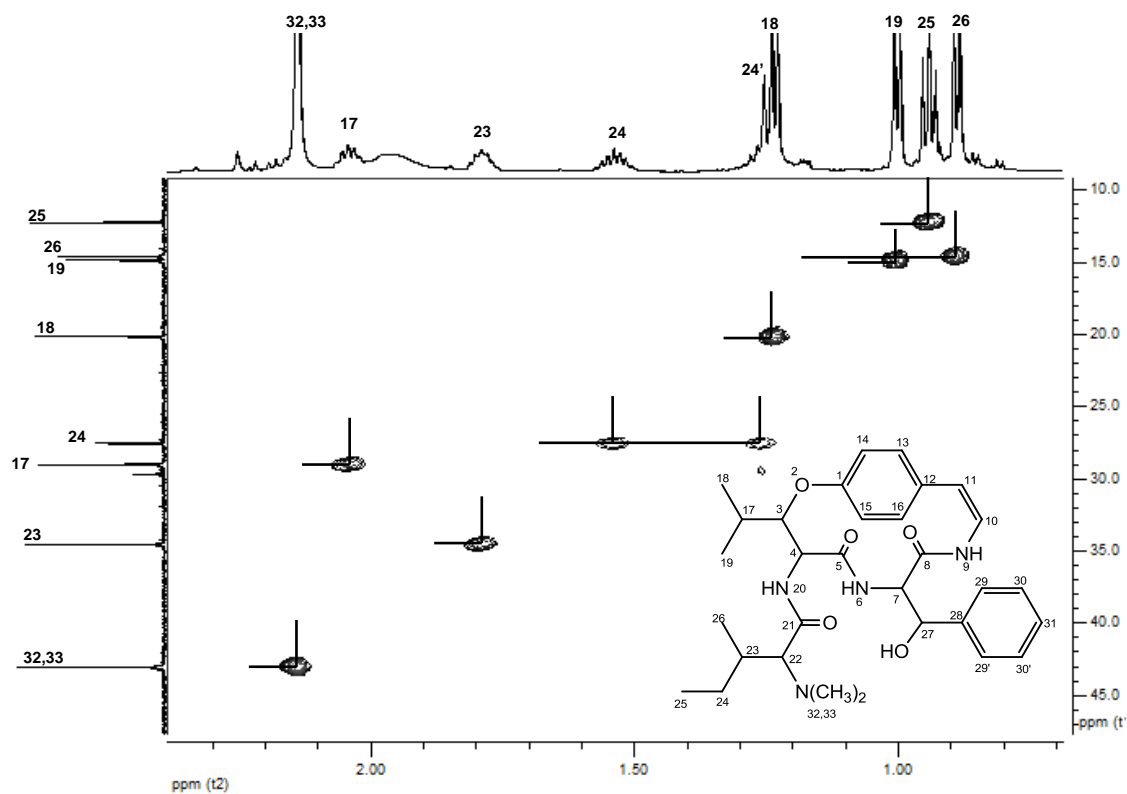


Figura 22 - Espectro de RMN 2D, HMQC, expandido de P06, scutianina N (**37**), em  $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz.

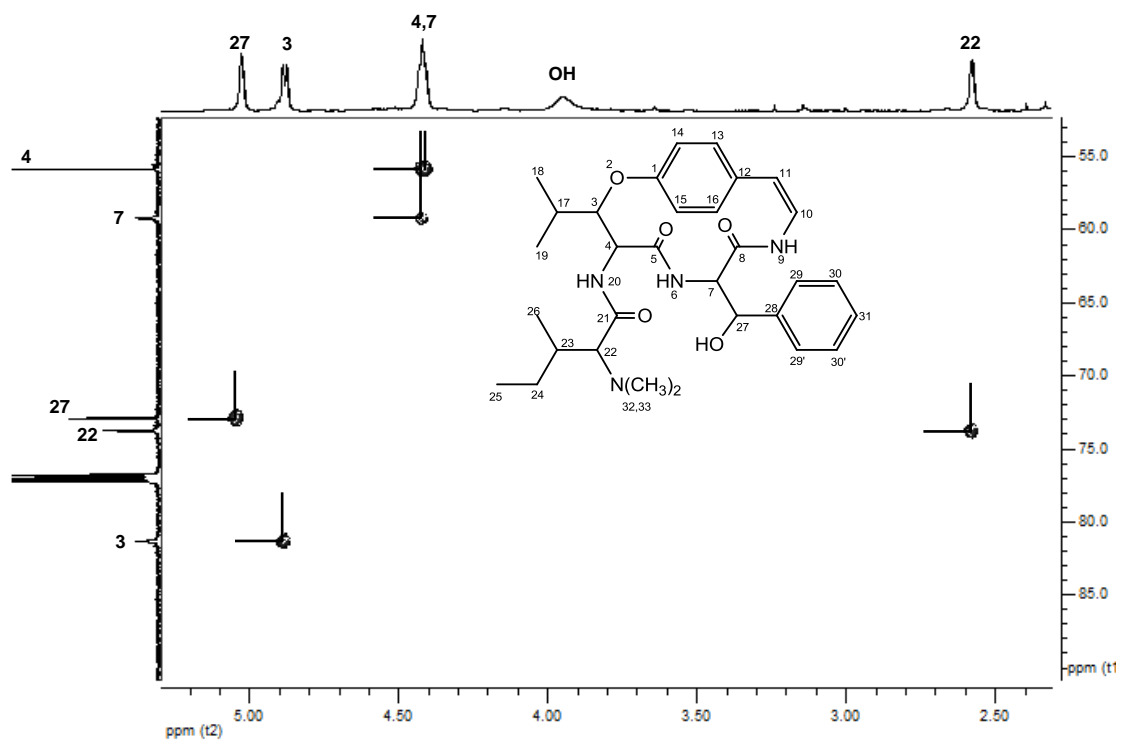


Figura 23 - Espectro de RMN 2D, HMQC, expandido de P06, scutianina N (**37**), em  $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz.

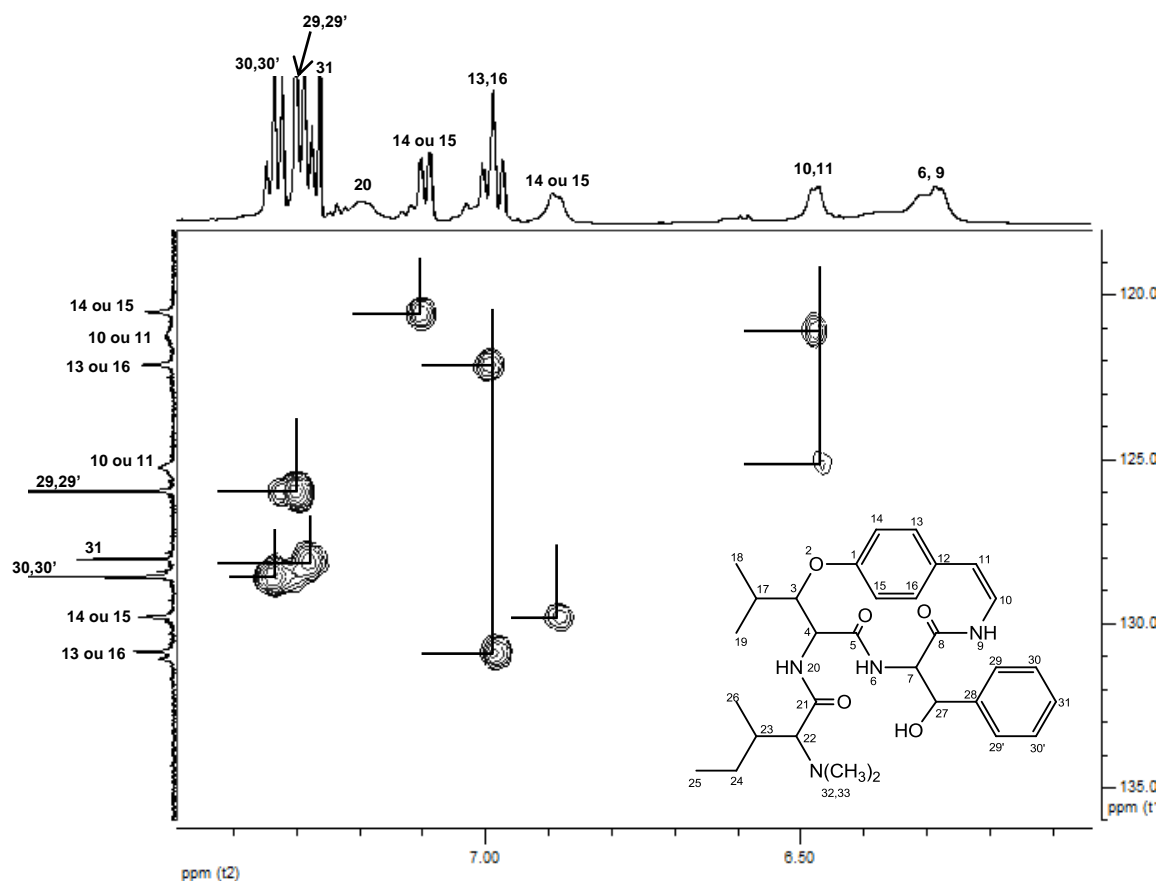


Figura 24 - Espectro de RMN de HMQC expandido de P06, scutianina N (**37**), em  $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz.

A atribuição dos sinais dos carbonos desprotonados foi possível através do espectro de RMN bidimensional, HMBC, que revela correlações entre carbono e hidrogênio a longa distância (Figuras 25 e 26).



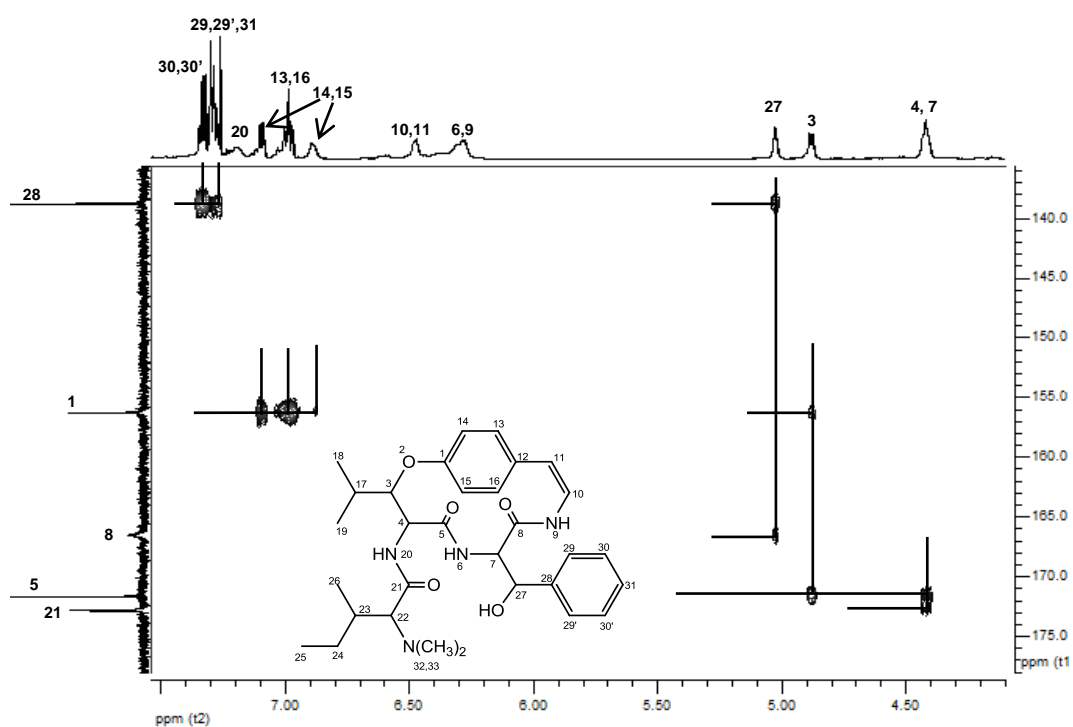


Figura 25 - Espectro de RMN 2D, HMBC, expandido de P06, scutianina N (**37**), em  $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz.

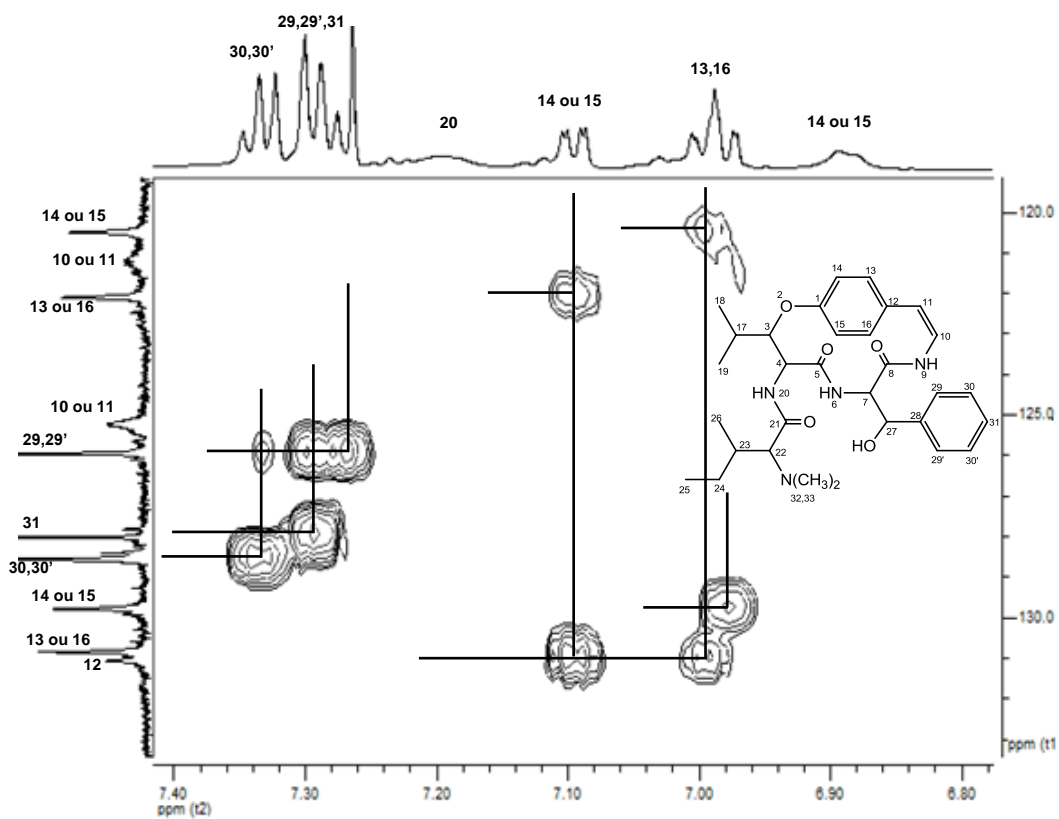


Figura 26 - Espectro de RMN 2D, HMBC, expandido de P06, scutianina N (**37**), em  $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz.

O peso molecular do alcaloide P06 foi confirmado por EMAR. O espectro de massas de alta resolução mostra um íon  $[M + H]$  com  $m/z$  551,3259, indicando massa molecular correspondente à estrutura proposta ( $C_{31}H_{42}N_4O_5$ ). O espectro é mostrado na Figura 27.

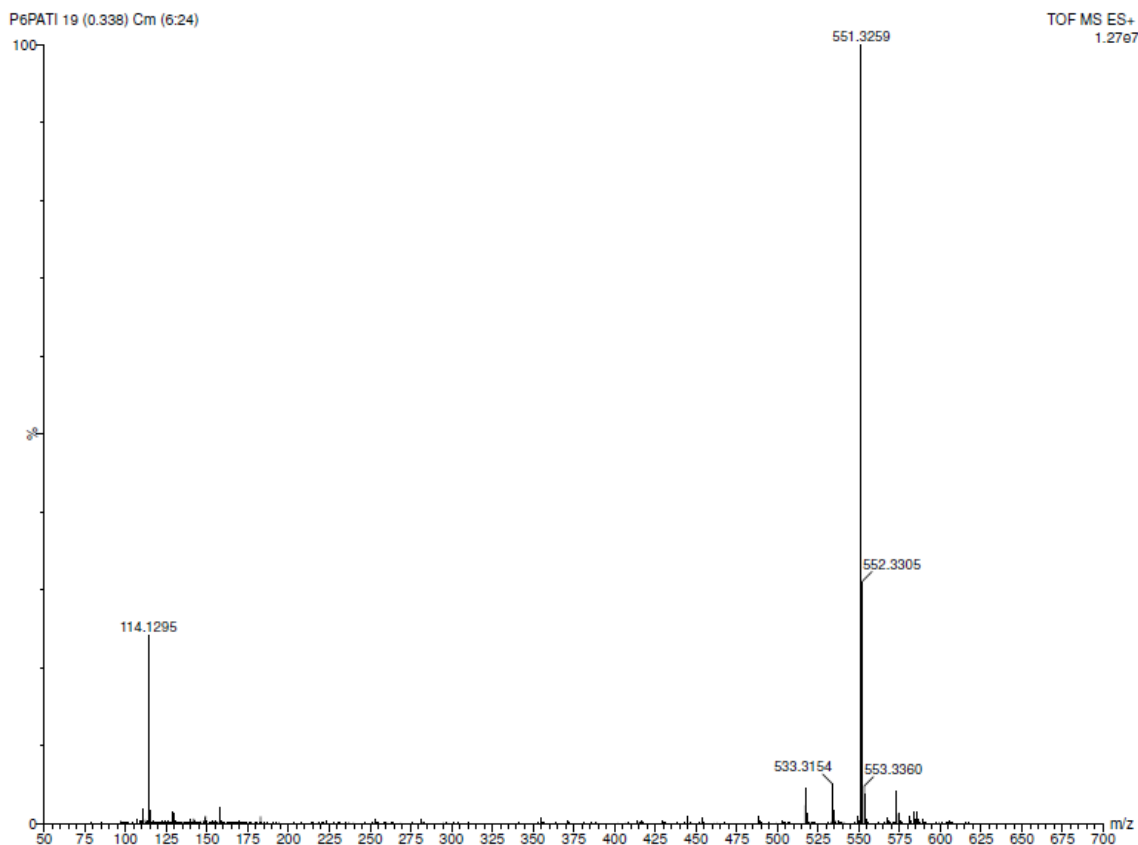


Figura 27 - Espectro de massas de alta resolução de P06, scutianina N (**37**).

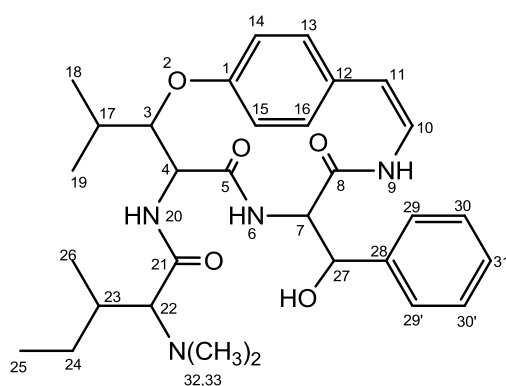
Dados físicos e espectrais de RMN de  $^1H$  e  $^{13}C$  do composto P06 foram descritos na parte experimental (pág. 49). Na Tabela 7 estão listados os deslocamentos químicos de  $^1H$  e  $^{13}C$  do composto isolado.

Tabela 7 - Dados de RMN ( $^1\text{H}$  a 600,13 MHz;  $^{13}\text{C}$  a 150,91 MHz) de P06, scutianina N (**37**), em  $\text{CDCl}_3$ .

Posição	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm); $J$ (Hz)	$\delta$ $^{13}\text{C}$ (ppm)
1	-	156,30
2	-	-
3	4,87 (dd, $J=2,0$ ; 7,9)	81,33
4	4,41	55,85
5	-	171,67
6	6,29	-
7	4,41	59,20
8	-	166,52
9	6,29	-
10	6,48 (d, $J=5,6$ )	121,21 ou 125,22
11	6,48 (d, $J=5,6$ )	121,21 ou 125,22
12	-	131,07
13	6,99 (dt, $J=2,2$ ; 8,3)	122,11 ou 130,84
14	6,89 (d, $J=8,4$ ) ou 7,10 (dd, $J=2,5$ ; 8,4)	120,50 ou 129,79
15	6,89 (d, $J=8,4$ ) ou 7,10 (dd, $J=2,5$ ; 8,4)	120,50 ou 129,79
16	6,99 (dt, $J=2,2$ ; 8,3)	122,11 ou 130,84
17	2,05 (m)	28,99
18	1,23 (d, $J=6,8$ )	20,15
19	1,00 (d, $J=6,8$ )	14,85
20	7,12	-
21	-	172,85
22	2,58 (d, $J=3,7$ )	73,76
23	1,79 (m)	34,52
24	1,55 (m)	27,54
24'	1,26 (m)	-
25	0,95 (t, $J=7,4$ )	12,23
26	0,89 (d, $J=6,8$ )	14,59
27	5,03 (d, $J=4,0$ )	72,90
28	-	138,79
29	7,25-7,32	125,95
29'	7,25-7,32	125,95
30	7,32-7,36	128,57
30'	7,32-7,36	128,57
31	7,25-7,32	128,03
32	2,15 (s)	43,04
33	2,15 (s)	43,04
OH	3,95	-

### 5.2.3 Alcaloide P11, scutianina O (**38**)

O alcaloide P11 (**38**) foi obtido como um sólido branco da fração etérea básica de *Scutia buxifolia*, conforme descrito na parte experimental (pág. 50). Este composto foi identificado por meio de dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (uni e bidimensionais), e teve seu peso molecular confirmado por espectrometria de massas de alta resolução.



**38**  
Scutianina O

Pelo espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 28) é possível observar, na região entre  $\delta$  0,90-1,20 ppm, a sobreposição de sinais dos hidrogênios metílicos.

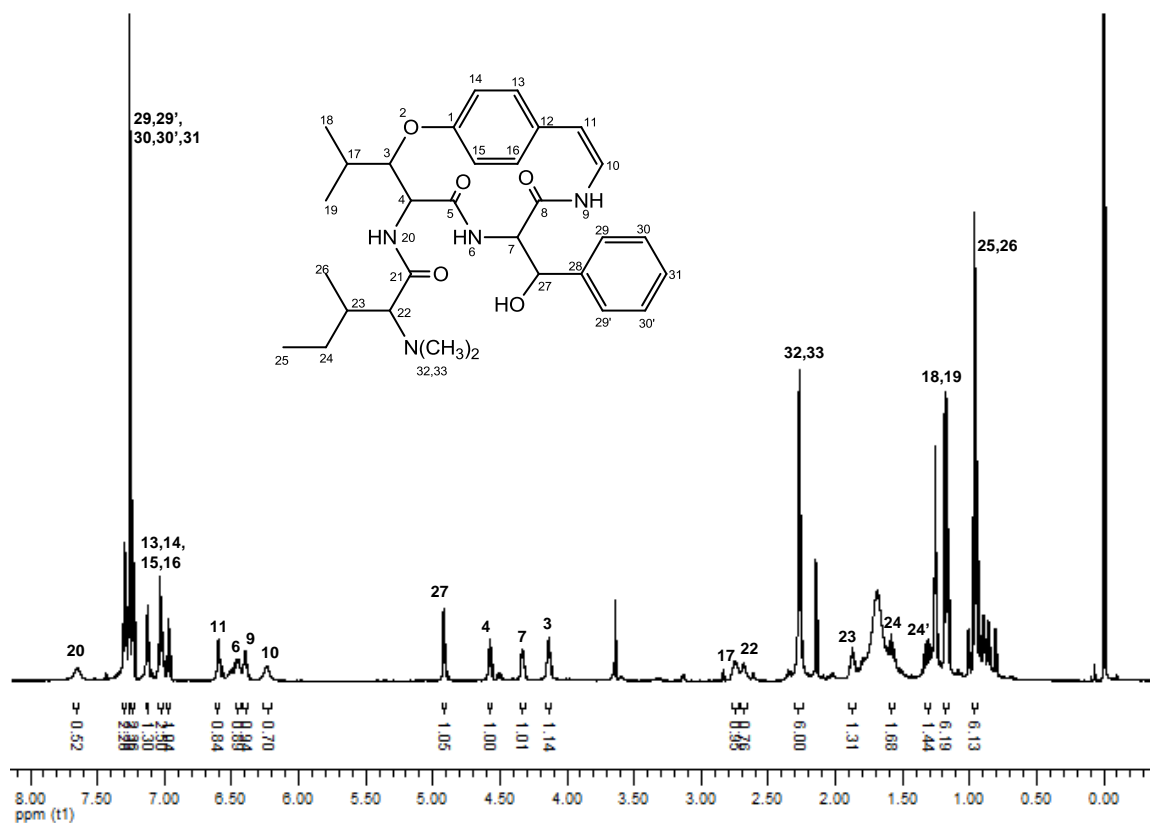


Figura 28 - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de P11, scutianina O (**38**), em CDCl<sub>3</sub>, a 600,13 MHz.

Na expansão do espectro (Figura 29) é possível identificar um duplete e um triplete sobrepostos em  $\delta$  0,96 ppm, referentes aos hidrogênios H-25 e H-26 da unidade isoleucina. Com deslocamentos químicos de 1,17 e 1,18 ppm estão os H-18 e H-19 da unidade  $\beta$ -hidroxileucina, ambos na forma de duplete, com uma constante de acoplamento de 6,6 Hz.

Na região entre  $\delta$  1,25-2,90 ppm são observados os sinais dos hidrogênios metilênicos diastereotópicos H-24 ( $\delta$  1,58 ppm) e H-24' ( $\delta$  1,32 ppm), dos hidrogênios metínicos H-23 ( $\delta$  1,87 ppm), H-22 ( $\delta$  2,69 ppm) e H-17 (2,74 ppm) e dos hidrogênios metílicos da unidade *N,N*-dimetil, H-32 e H-33, que aparecem como um simpleto em  $\delta$  2,27 ppm.

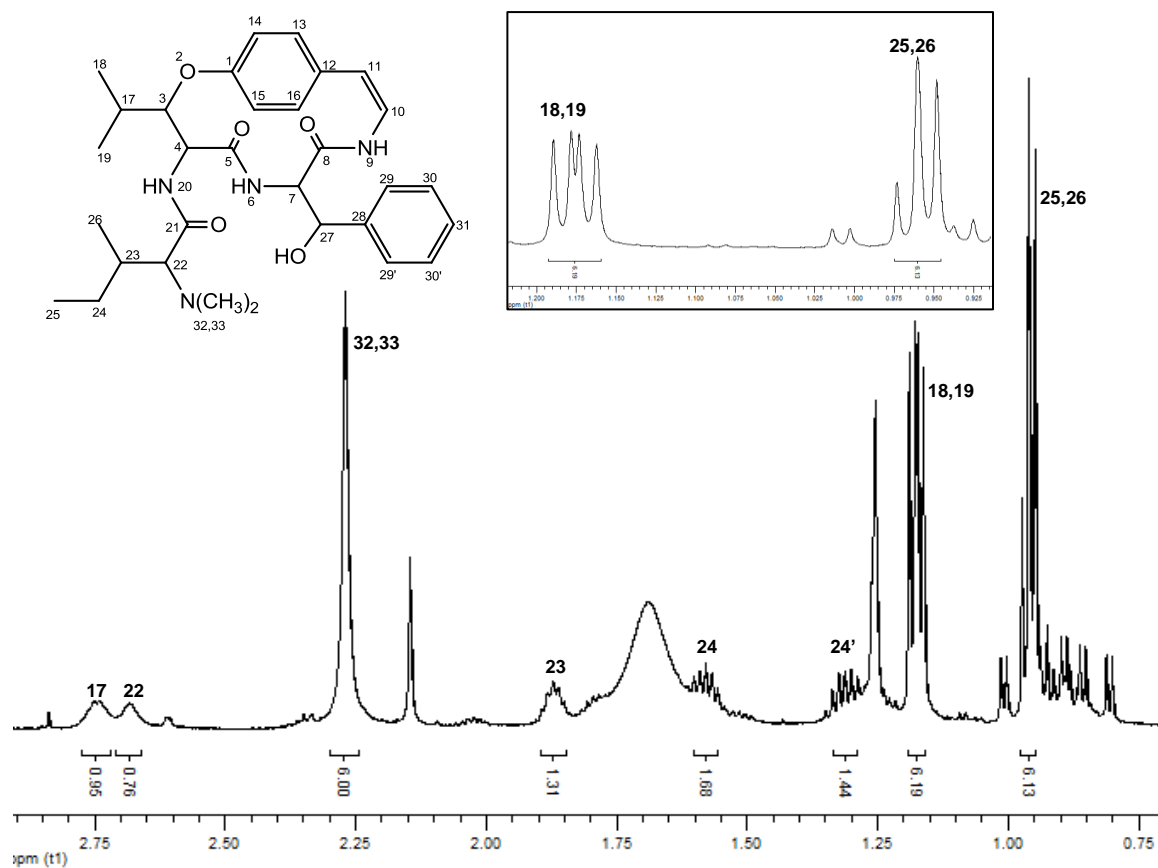


Figura 29 - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H expandido (0,75-2,90 ppm) de P11, scutianina O (**38**), em CDCl<sub>3</sub>, a 600,13 MHz.

Na região entre  $\delta$  4,10-4,95 ppm são vistos os hidrogênios  $\alpha,\beta$ -carbonílicos das unidades  $\beta$ -hidroxileucina (H-3 e H-4) e fenilserina (H-7 e H-27). O H-3 apresenta-se na forma de duplo duplete ( $J=5,0; 7,8$  Hz) em  $\delta$  4,14 ppm. A constante de acoplamento de aproximadamente 8,0 Hz indica configuração *eritro* para o  $\beta$ -hidroxiaminoácido.<sup>21,22,25,37</sup> O H-4 aparece em  $\delta$  4,57 ppm (dd,  $J=6,4; 7,8$  Hz). Com deslocamentos químicos de 4,33 e 4,92 ppm são observados o H-7 (dd,  $J=3,6; 7,8$  Hz) e o H-27 (d,  $J=3,6$  Hz), respectivamente. A expansão do espectro é mostrada na Figura 30.

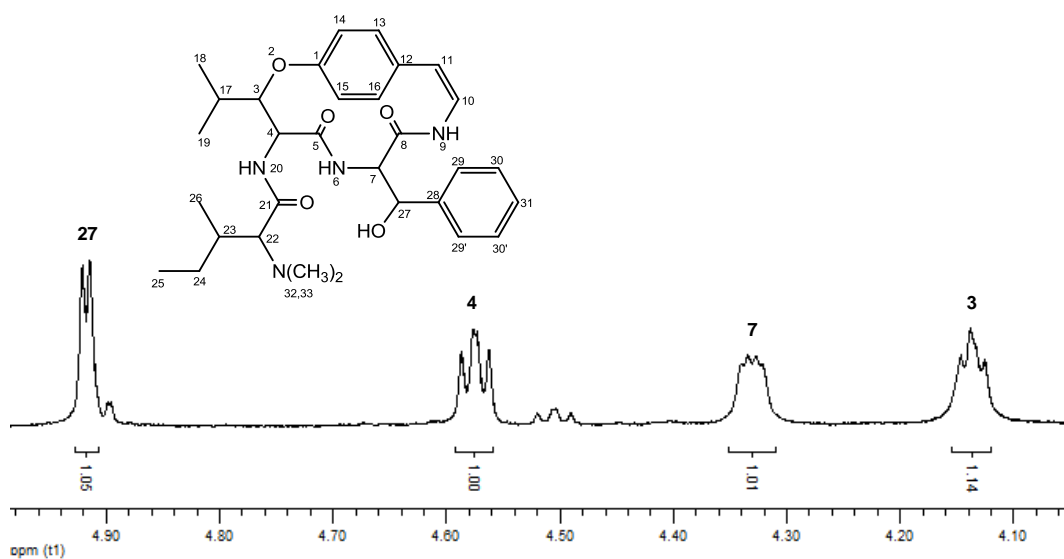


Figura 30 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  expandido (4,10-4,98 ppm) de P11, scutianina O (**38**), em  $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz.

Na região espectral compreendida entre  $\delta$  6,20-7,70 ppm podem ser observados os hidrogênios amídicos, olefínicos e aromáticos. Os hidrogênios amídicos NH-6, NH-9 e NH-20 apresentam deslocamentos químicos de 6,45, 6,40 e 7,65 ppm, respectivamente. Os hidrogênios olefínicos H-10 e H-11 aparecem em  $\delta$  6,24 e 6,60 ppm. Com deslocamentos químicos entre 6,95-7,15 ppm estão os hidrogênios aromáticos da unidade estililamina (H-13, H-14, H-15 e H-16). Os hidrogênios aromáticos da unidade fenilserina são observados em campo mais baixo, H-29 e H-29' ( $\delta$  7,24 ppm), H-30 e H-30' ( $\delta$  7,30 ppm) e H-31 ( $\delta$  7,26 ppm). A Figura 31 mostra a expansão do espectro.

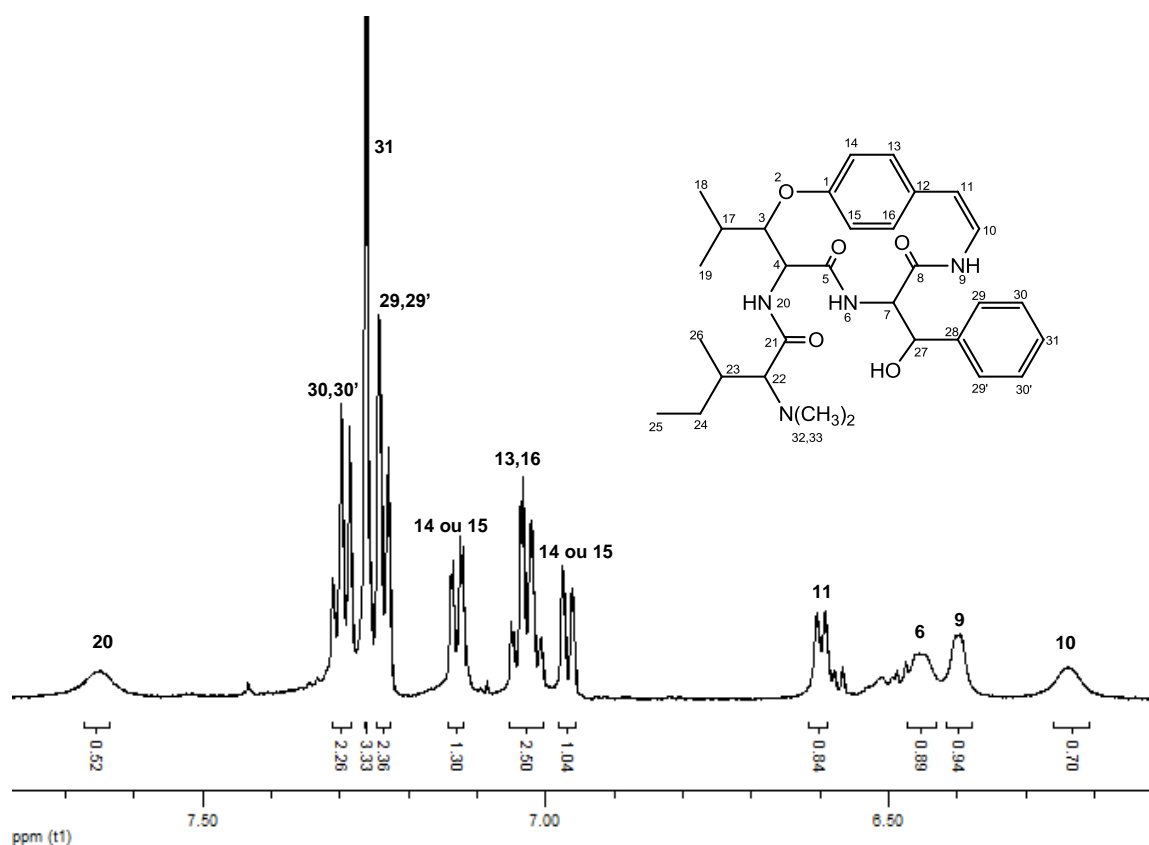


Figura 31 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  expandido (6,20-7,70 ppm) de P11, scutianina O (**38**), em  $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz.

Pelo espectro de RMN de 2D, COSY, é possível observar as correlações dos hidrogênios. Na caracterização da unidade isoleucina, pode-se observar a correlação do H-25 ( $\delta$  0,96 ppm) com os hidrogênios diastereotópicos H-24 ( $\delta$  1,58 ppm) e H-24' ( $\delta$  1,32 ppm) e destes com o H-23 ( $\delta$  1,87 ppm) que correlaciona também com o H-22 ( $\delta$  2,69 ppm) e o H-26 ( $\delta$  0,96 ppm). Com relação à unidade leucina, observa-se a correlação do hidrogênio metínico H-17 ( $\delta$  2,74 ppm) com os hidrogênios metílicos H-18 e H-19 ( $\delta$  1,17 e 1,18 ppm) e também com o hidrogênio  $\beta$ -carbonílico H-3 ( $\delta$  4,14 ppm) que, por sua vez, tem correlação com o hidrogênio  $\alpha$ -carbonílico H-4 ( $\delta$  4,57 ppm), como mostra a Figura 32.



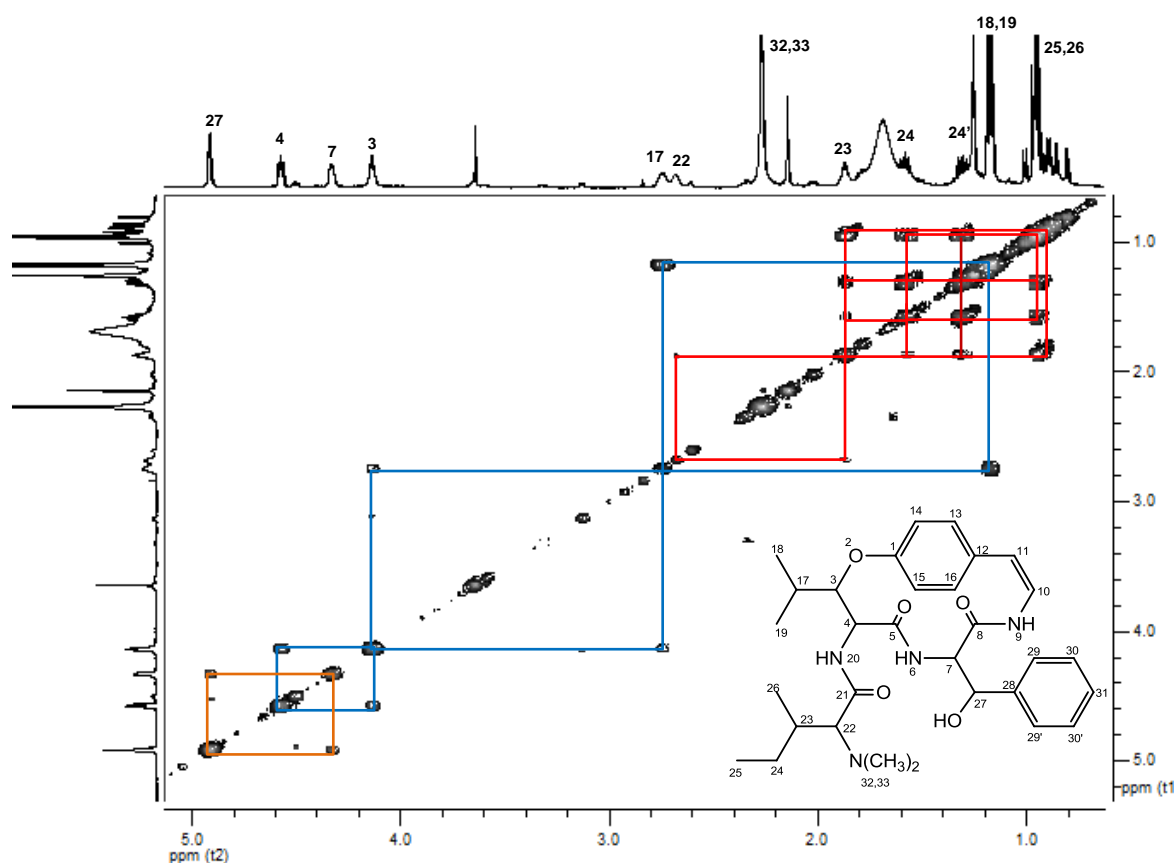


Figura 32 - Espectro de RMN 2D, COSY, expandido (1,00-5,00 ppm) de P11, scutianina O (**38**), em  $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz.

Na Figura 33 podem ser observados os principais sistemas de spins na região entre  $\delta$  4,00-8,00 ppm. O H-4 ( $\delta$  4,57 ppm) tem correlação com o H-3 e com o hidrogênio amídico NH-20 ( $\delta$  7,65 ppm). O H-7 ( $\delta$  4,33 ppm) correlaciona com o hidrogênio metínico H-27 ( $\delta$  4,92 ppm) e com o hidrogênio amídico NH-6 ( $\delta$  6,45 ppm). Os hidrogênios olefínicos H-10 ( $\delta$  6,24 ppm) e H-11 ( $\delta$  6,60 ppm) correlacionam entre si.

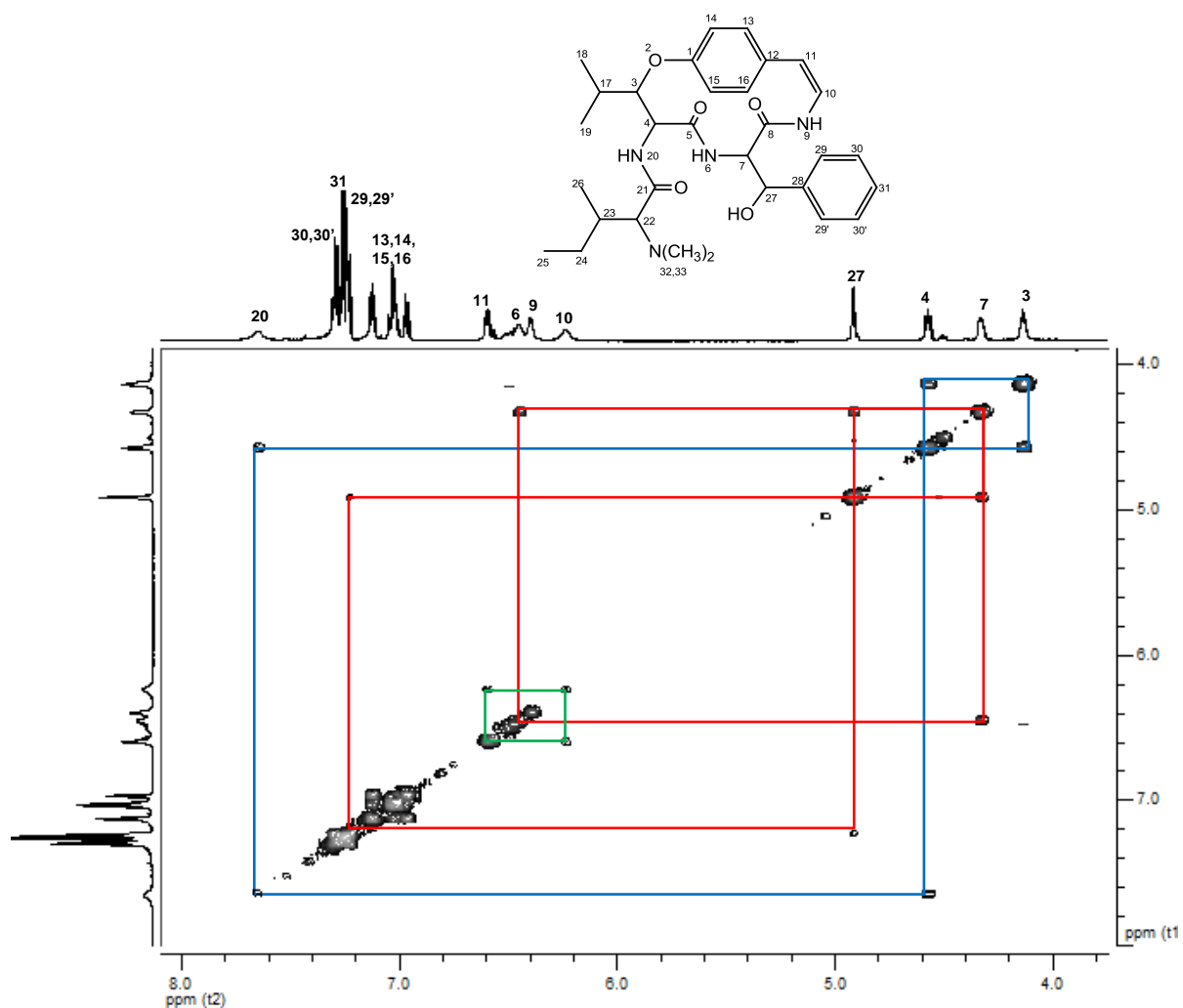


Figura 33 - Espectro de RMN 2D, COSY, expandido (4,00-8,00 ppm) de P11, scutianina O (**38**), em  $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 34) apresenta sinais na região entre  $\delta$  12,00-171,10 ppm, o que indica a presença de carbonos metílicos, metilênicos, metínicos e desprotonados.

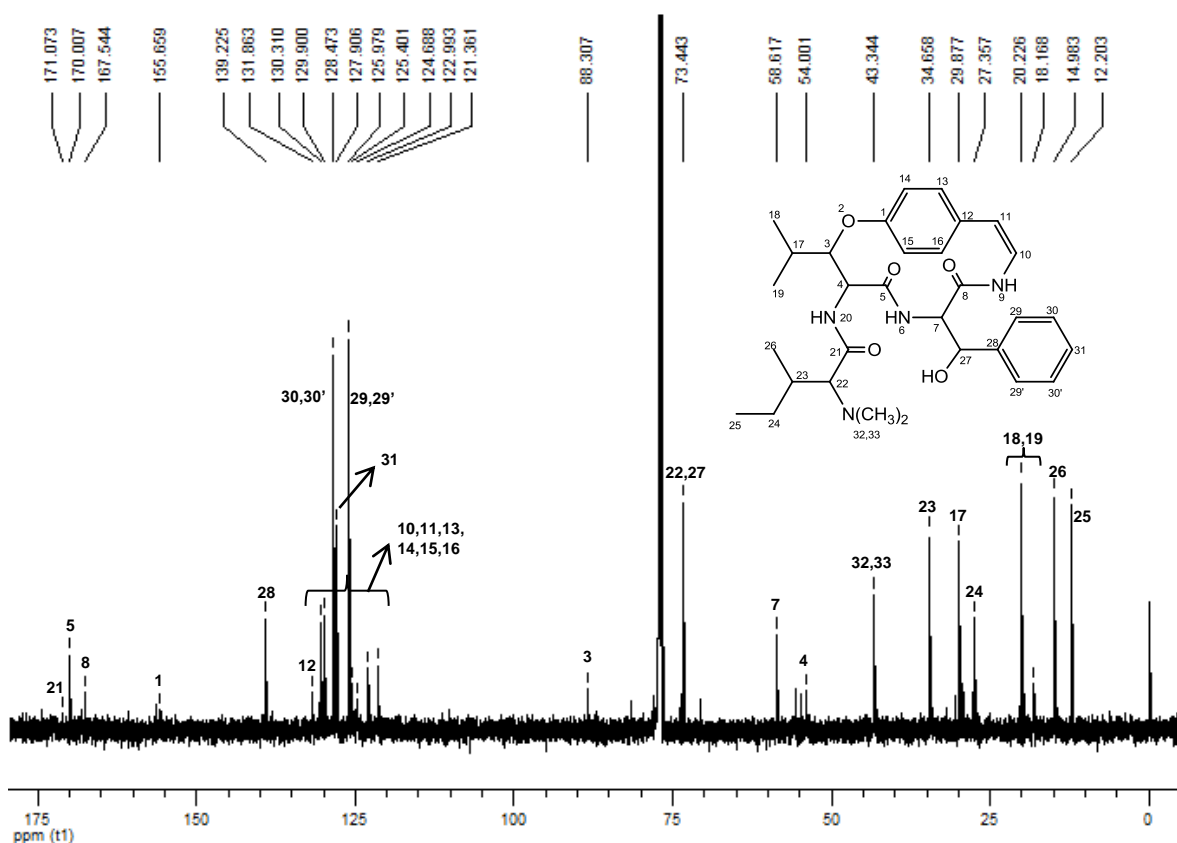


Figura 34 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de P11, scutianina O (**38**), em  $\text{CDCl}_3$ , a 150,91 MHz.

Os carbonos metílicos da unidade  $\beta$ -hidroxileucina, C-18 e C-19, são vistos em  $\delta$  18,17 e 20,23 ppm e os da unidade isoleucina, C-25 e C-26, em  $\delta$  12,20 e 14,98 ppm. Com deslocamento químico de 27,36 ppm é observado o carbono metilênico C-24. Entre  $\delta$  28,00-89,00 ppm estão, além dos carbonos metílicos da unidade *N,N*-dimetil (C-32 e C-33,  $\delta$  43,34 ppm), os carbonos metínicos C-3 ( $\delta$  88,31 ppm), C-4 ( $\delta$  54,00 ppm), C-17 ( $\delta$  29,88 ppm), C-23 ( $\delta$  34,66 ppm) e, com mesmo deslocamento químico,  $\delta$  73,44 ppm, os carbonos C-22 e C-27 (Figura 35).

De acordo com a literatura,<sup>21,22,25,37</sup> os deslocamentos químicos dos carbonos C-3 e C-4 podem ser utilizados para prever a estereoquímica da unidade  $\beta$ -hidroxiaminoácido. Os deslocamentos químicos de 88,31 ppm para o C-3 e de 54,00 ppm para C-4 sugerem uma estereoquímica *D-eritro* para a unidade  $\beta$ -hidroxileucina.

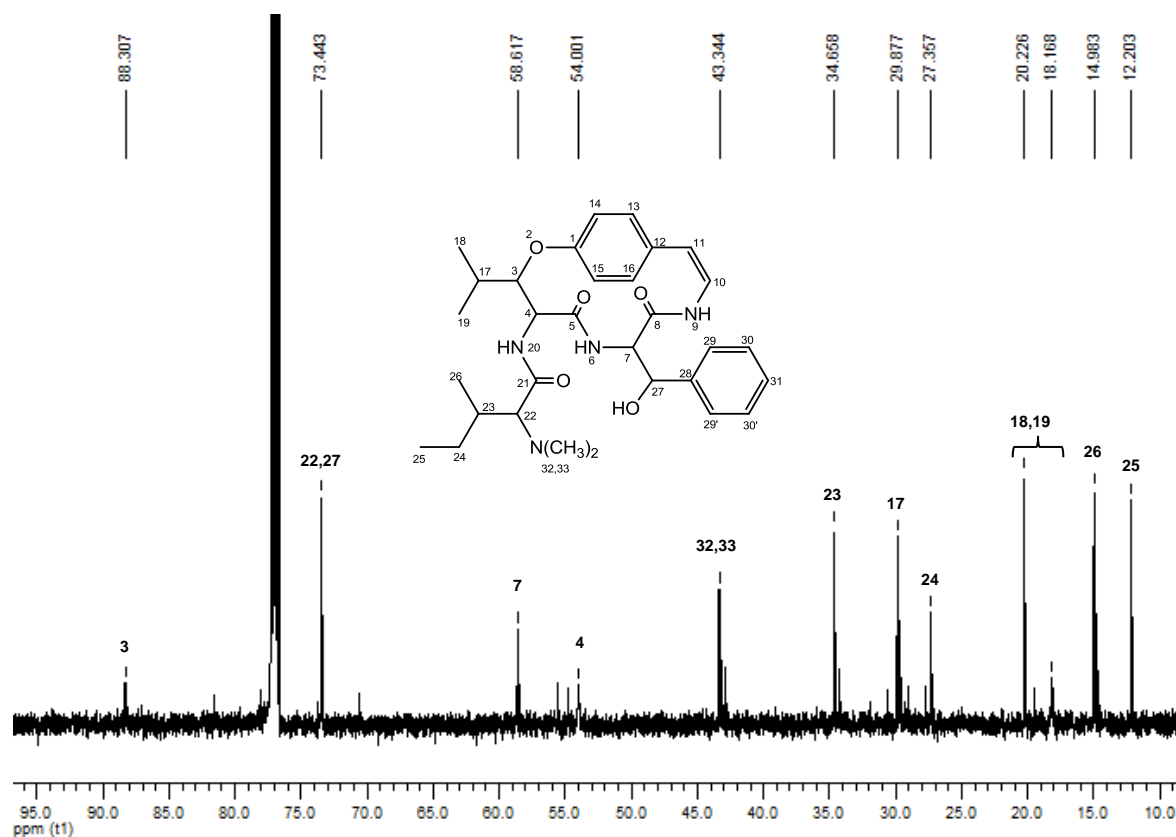


Figura 35 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  expandido (10,0-95,0 ppm) de P11, scutianina O (**38**), em  $\text{CDCl}_3$ , a 150,91 MHz.

Na região espectral entre  $\delta$  121,00-131,00 ppm são visualizados os carbonos hidrogenados aromáticos das unidades estililamina e fenilserina e os carbonos olefínicos C-10 e C-11. Em campo mais baixo ( $\delta$  131,50-170,10 ppm) são observados os carbonos quaternários. A expansão do espectro é mostrada na Figura 36.

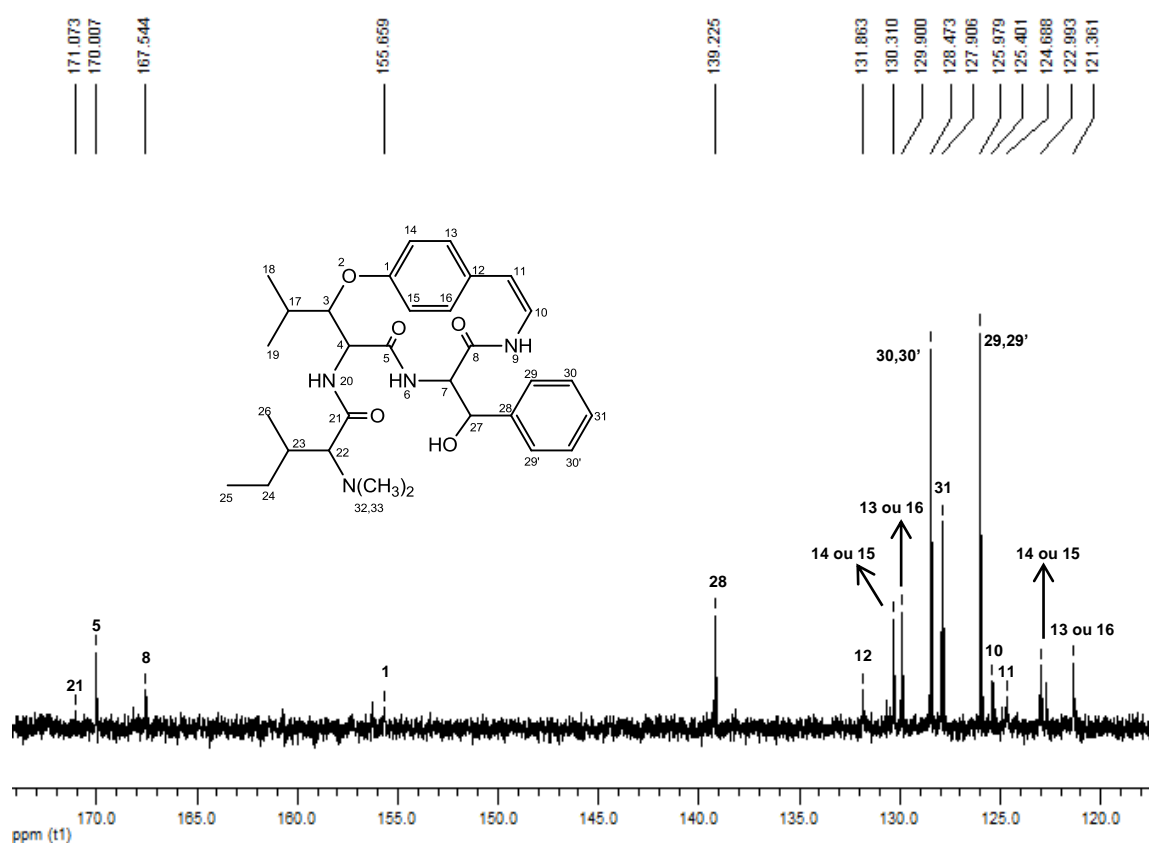


Figura 36 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  expandido (120,0-174,0 ppm) de P11, scutianina O (**38**), em  $\text{CDCl}_3$ , a 150,91 MHz.

As correlações entre carbono e hidrogênio podem ser observadas no espectro de RMN bidimensional, HMQC (Figuras 37, 38 e 39).

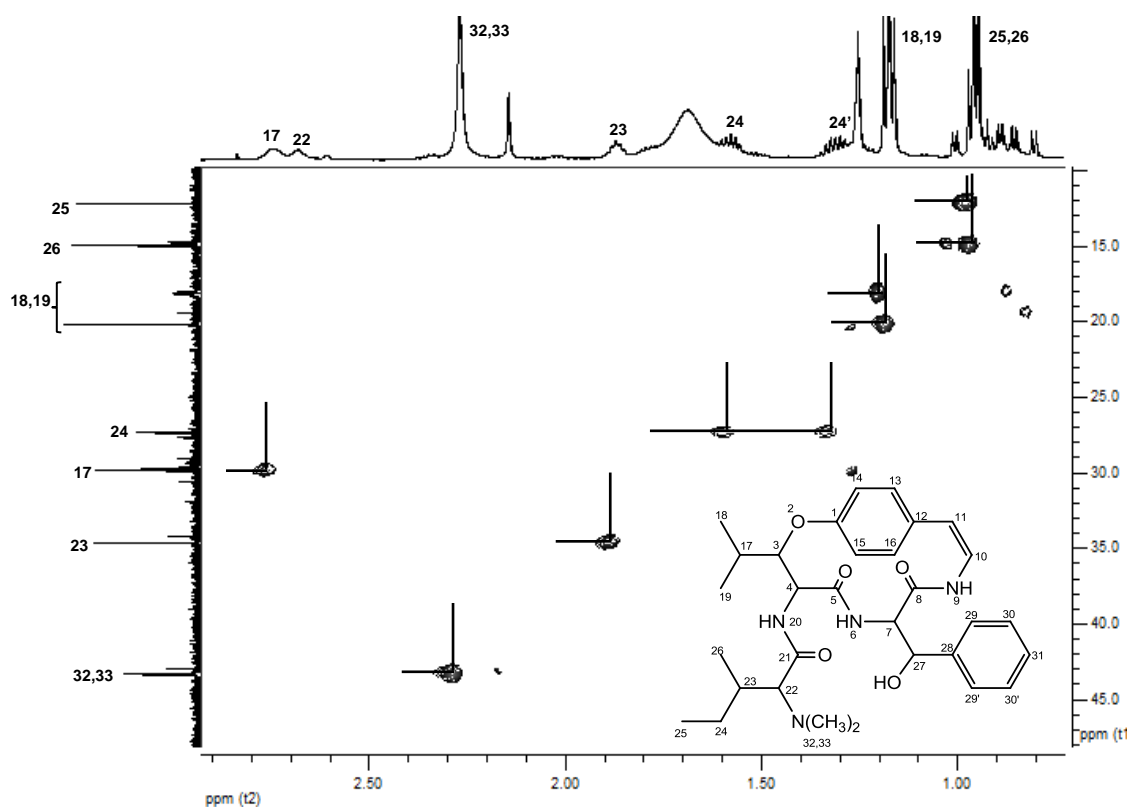


Figura 37 - Espectro de RMN 2D, HMQC, expandido de P11, scutianina O (**38**), em  $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz.

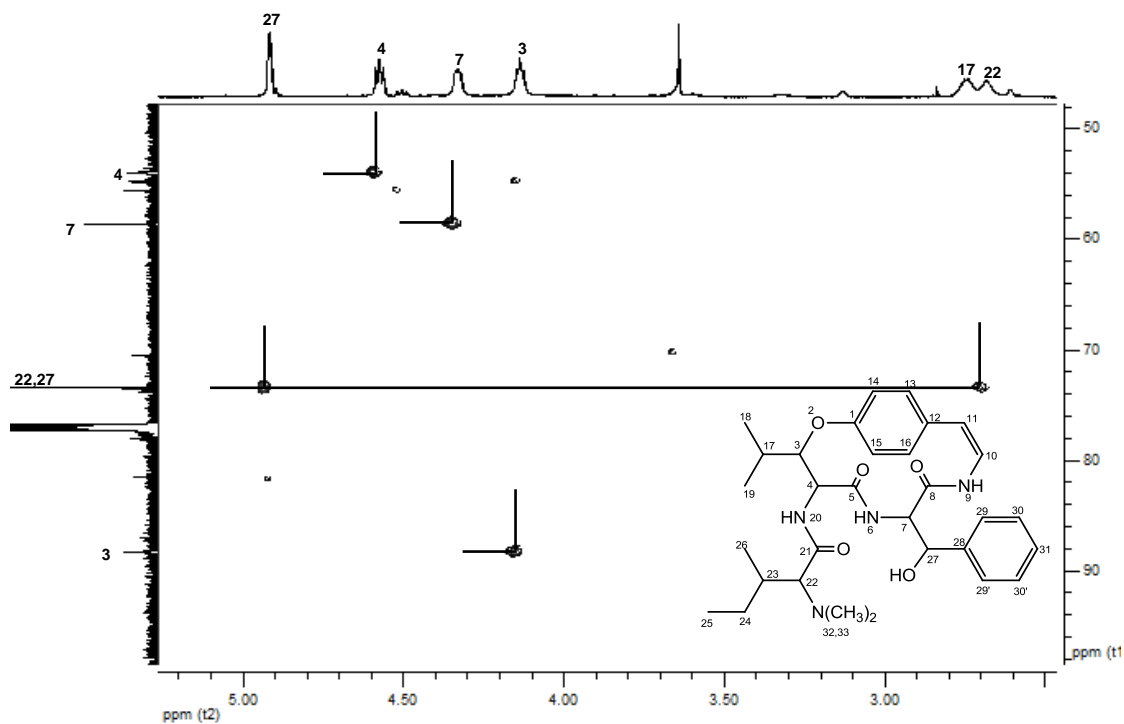


Figura 38 - Espectro de RMN 2D, HMQC, expandido de P11, scutianina O (**38**), em  $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz.

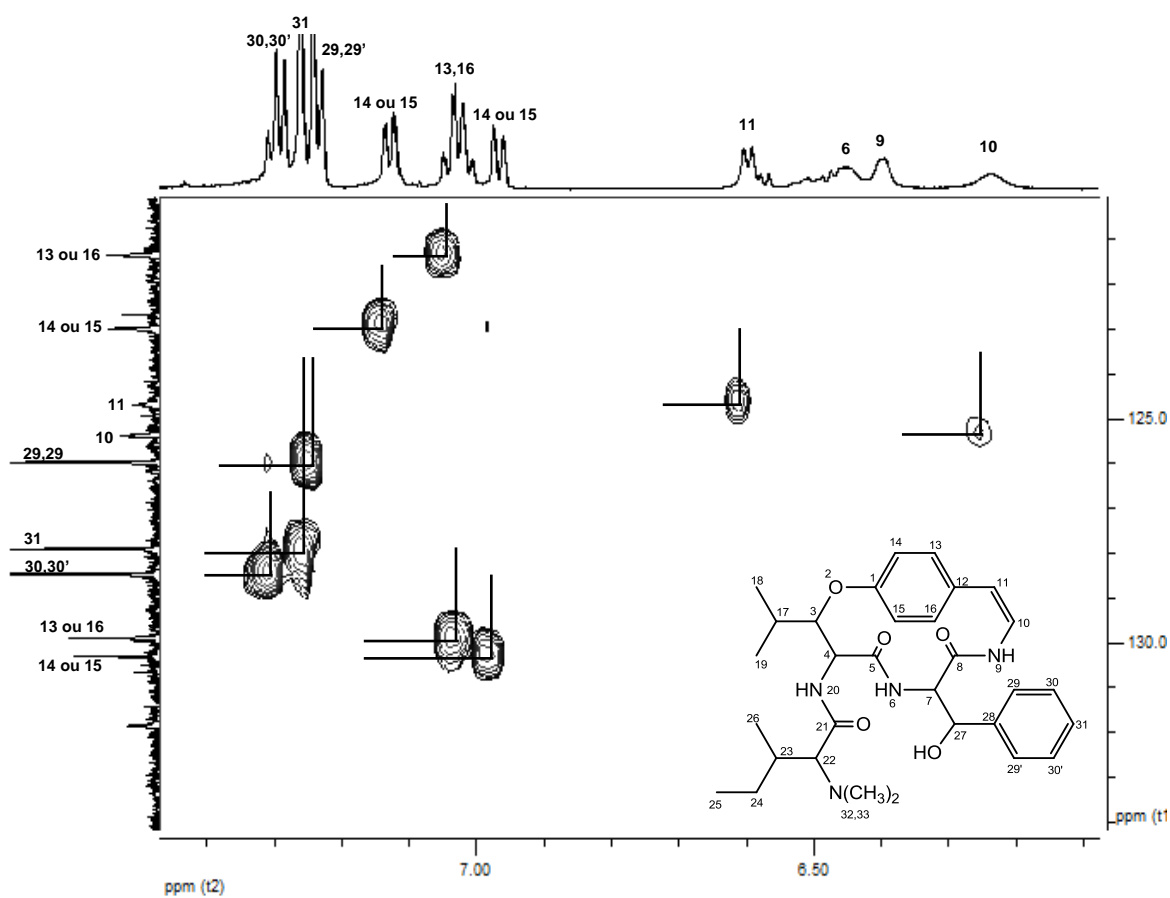


Figura 39 - Espectro de RMN 2D, HMQC, expandido de P11, scutianina O (**38**), em  $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz.

Através das correlações entre hidrogênio e carbono a longa distância, apresentadas no espectro de RMN de 2D, HMBC, a atribuição dos sinais dos carbonos desprotonados tornou-se possível (Figuras 40 e 41).

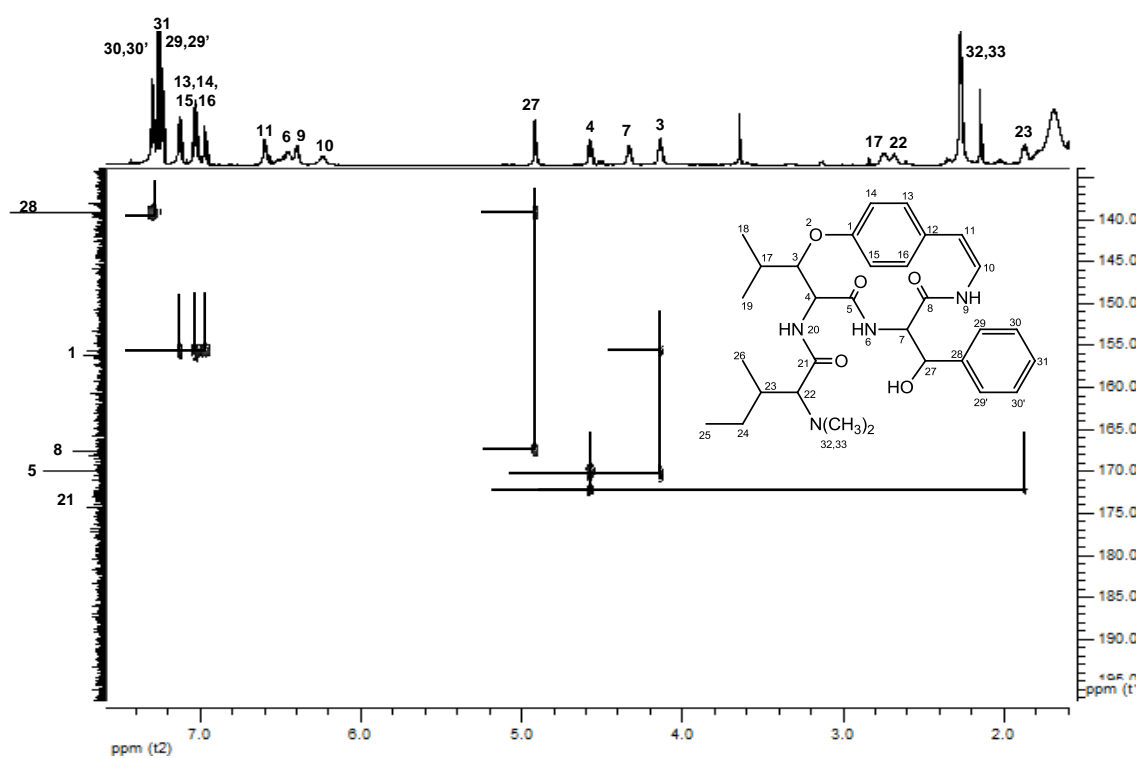


Figura 40 - Espectro de RMN 2D, HMBC, expandido de P11, scutianina O (**38**), em  $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz.

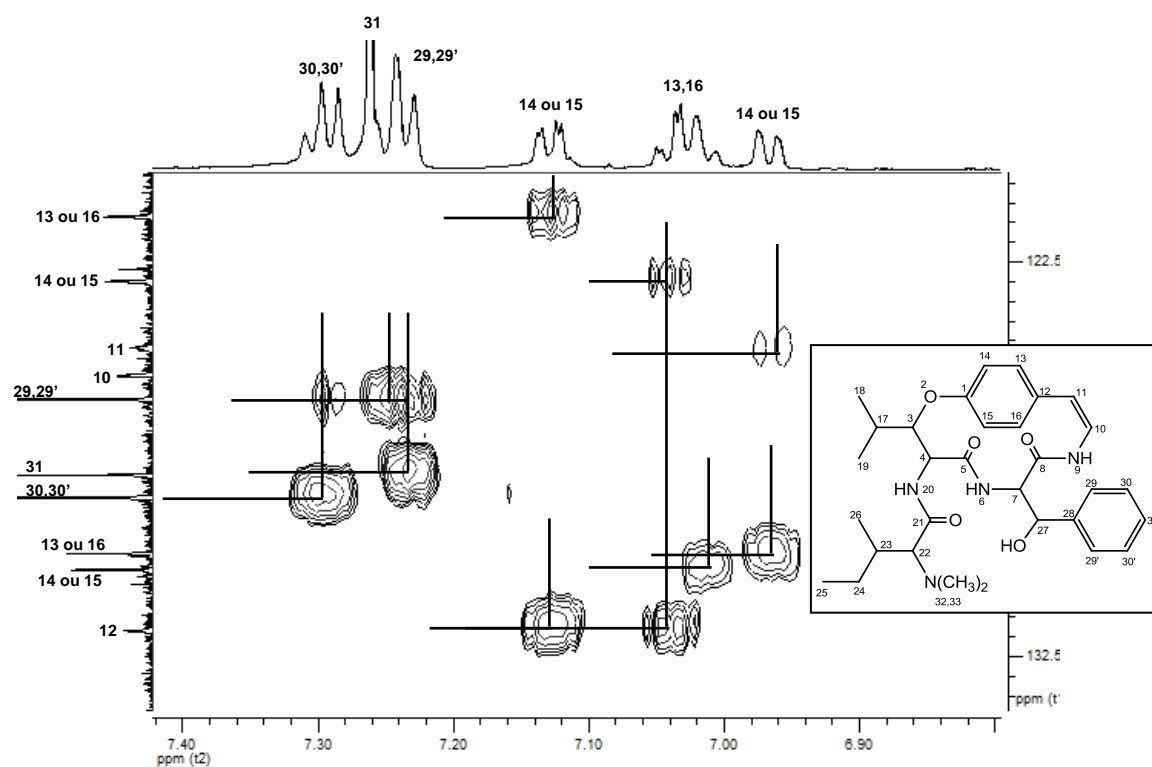


Figura 41 - Espectro de RMN 2D, HMBC, expandido de P11, scutianina O (**38**), em  $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz.



O alcaloide P11 teve sua massa confirmada por EMAR. O espectro, mostrado na Figura 42, exibe um íon  $[M + H]$  com  $m/z$  551,3251, o qual corresponde à massa molecular proposta para o composto ( $C_{31}H_{42}N_4O_5$ ).

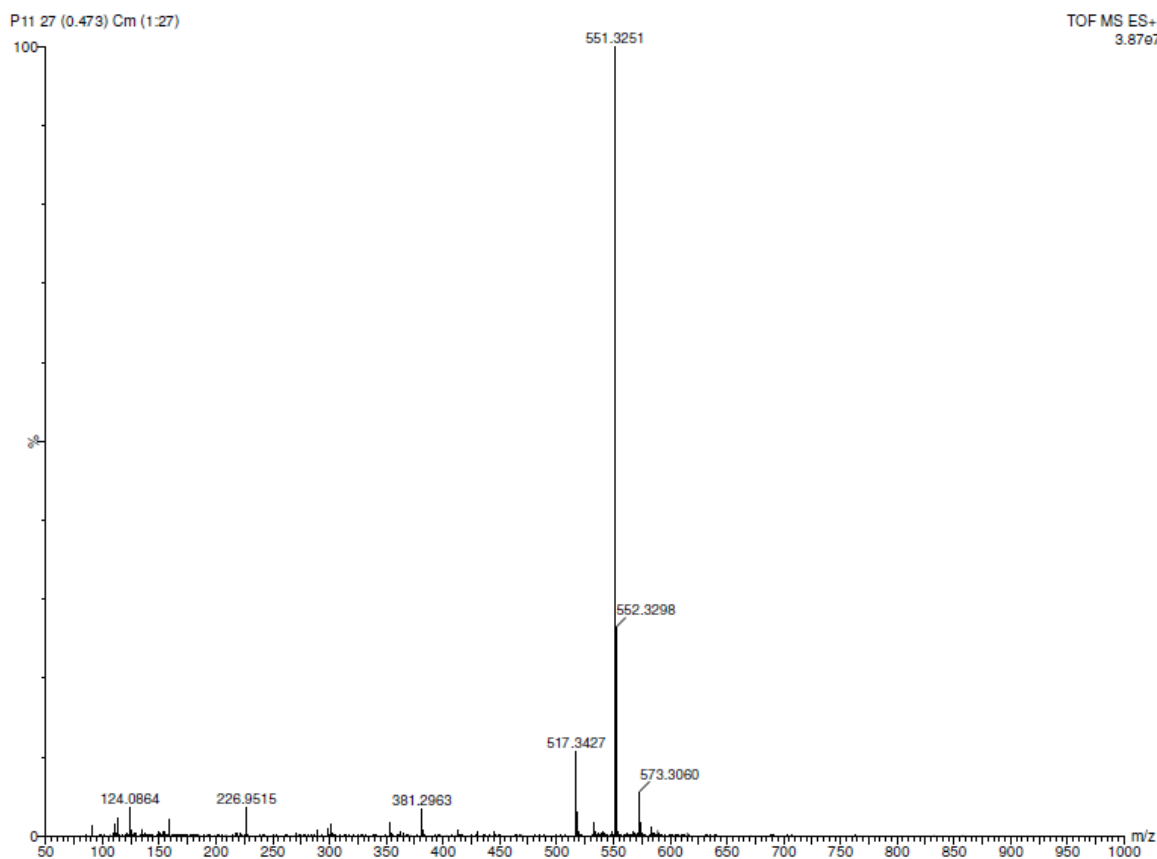


Figura 42 - Espectro de massas de alta resolução de P11, scutianina O (**38**).

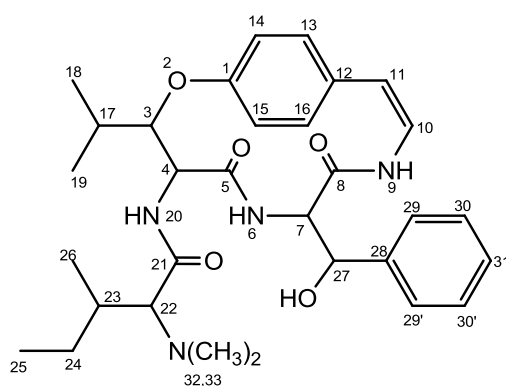
Na Tabela 8 estão listados os deslocamentos químicos de RMN de  $^1H$  e  $^{13}C$  obtidos para o alcaloide scutianina O (**38**).

Tabela 8 - Dados de RMN ( $^1\text{H}$  a 600,13 MHz;  $^{13}\text{C}$  a 150,91 MHz) de P11, scutianina O (**38**), em  $\text{CDCl}_3$ .

Posição	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm); $J$ (Hz)	$\delta$ $^{13}\text{C}$ (ppm)
1	-	155,65
2	-	-
3	4,14 (dd, $J=5,0$ ; 7,8)	88,31
4	4,57 (dd, $J=6,4$ ; 7,8)	54,00
5	-	170,01
6	6,45	-
7	4,33 (dd, $J=3,6$ ; 7,8)	58,62
8	-	167,54
9	6,40	-
10	6,24	125,40
11	6,60 (d, $J=7,4$ )	124,69
12	-	131,86
13	7,03 (m)	121,36 ou 129,90
14	6,97 (d, $J=8,4$ ) ou 7,13 (dd, $J=2,2$ ; 8,4)	122,99 ou 130,31
15	6,97 (d, $J=8,4$ ) ou 7,13 (dd, $J=2,2$ ; 8,4)	122,99 ou 130,31
16	7,03 (m)	121,36 ou 129,90
17	2,74 (m)	29,88
18	1,17 (d, $J=6,6$ ) ou 1,18 (d, $J=6,6$ )	18,17 ou 20,23
19	1,17 (d, $J=6,6$ ) ou 1,18 (d, $J=6,6$ )	18,17 ou 20,23
20	7,65	-
21	-	171,07
22	2,69	73,44
23	1,87 (m)	34,66
24	1,58 (m)	27,36
24'	1,32 (m)	-
25	0,96	12,20
26	0,96	14,98
27	4,92 (d, $J=3,6$ )	73,44
28	-	139,22
29	7,24 (d, $J=8,3$ )	125,98
29'	7,24 (d, $J=8,3$ )	125,98
30	7,30 (t, $J=7,3$ )	128,47
30'	7,30 (t, $J=7,3$ )	128,47
31	7,26	127,91
32	2,27 (s)	43,34
33	2,27 (s)	43,34

#### 5.2.4 Alcaloide P12, scutianina P (**39**)

O alcaloide P12 (**39**) foi obtido como um sólido amarelado da fração etérea básica de *Scutia buxifolia*, conforme descrito na parte experimental (pág. 51). Este composto foi identificado por meio de dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (uni e bidimensionais), e teve seu peso molecular confirmado por espectrometria de massas de alta resolução.



**39**  
Scutianina P

Pelo espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 43) pode-se observar a presença das unidades  $\beta$ -hidroxileucina, fenilserina e *N,N*-dimetil isoleucina.

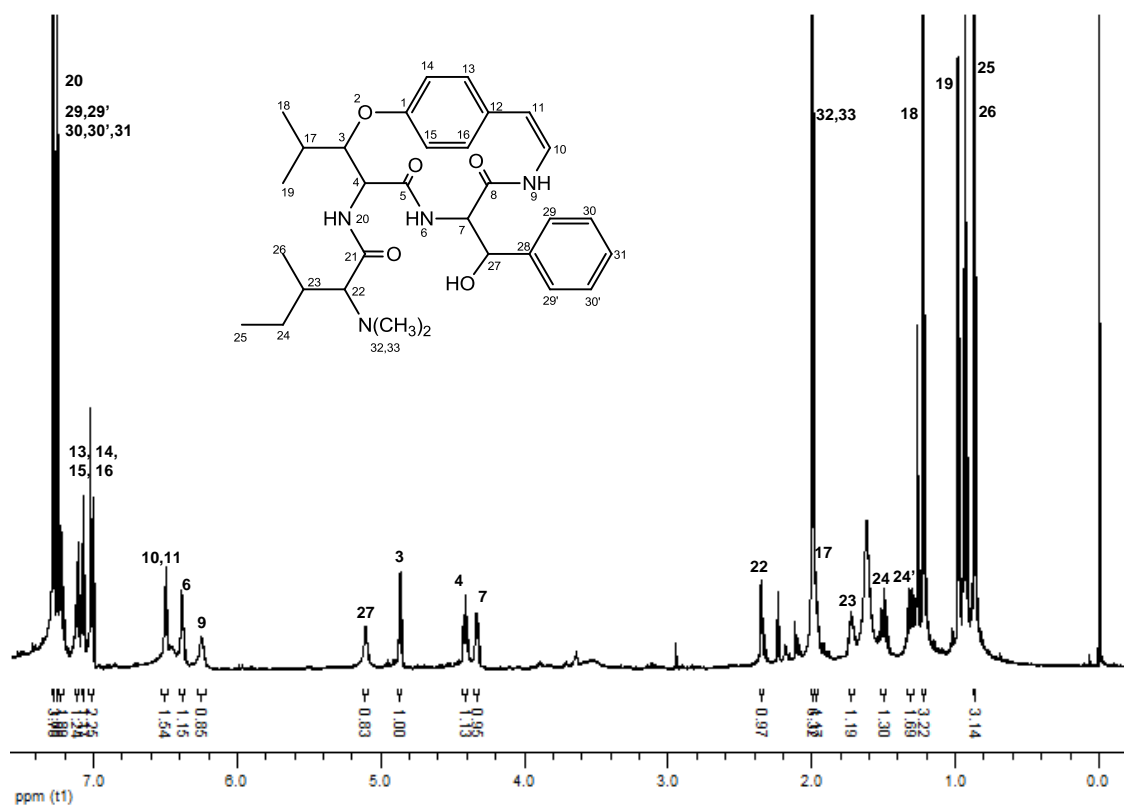


Figura 43 - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de P12, scutianina P (**39**), em CDCl<sub>3</sub>, a 600,13 MHz.

Na região espectral compreendida entre  $\delta$  0,80-1,24 ppm são observados quatro sinais referentes a hidrogênios metílicos. O tripleto (H-25,  $J=7,4$  Hz) em  $\delta$  0,93 ppm e o duplete (H-26,  $J=6,8$  Hz) em  $\delta$  0,87 ppm fazem parte da unidade isoleucina. Os outros dois dupletos, H-18 ( $\delta$  1,22 ppm,  $J=6,8$  Hz) e H-19 ( $\delta$  0,98 ppm,  $J=6,8$  Hz) são constituintes da unidade  $\beta$ -hidroxileucina.

Com deslocamentos químicos de 1,31 e 1,50 ppm são vistos os multipletos referentes aos hidrogênios metilênicos H-24' e H-24, respectivamente. Os hidrogênios metínicos H-17 (m), H-22 (d,  $J=3,4$  Hz) e H-23 (m) são observados em  $\delta$  1,96, 2,35 e 1,72 ppm, respectivamente. Os hidrogênios metílicos da unidade *N,N*-dimetil apresentam-se na forma de simpleto em  $\delta$  2,00 ppm. Estes sinais são mostrados na expansão do espectro, Figura 44.

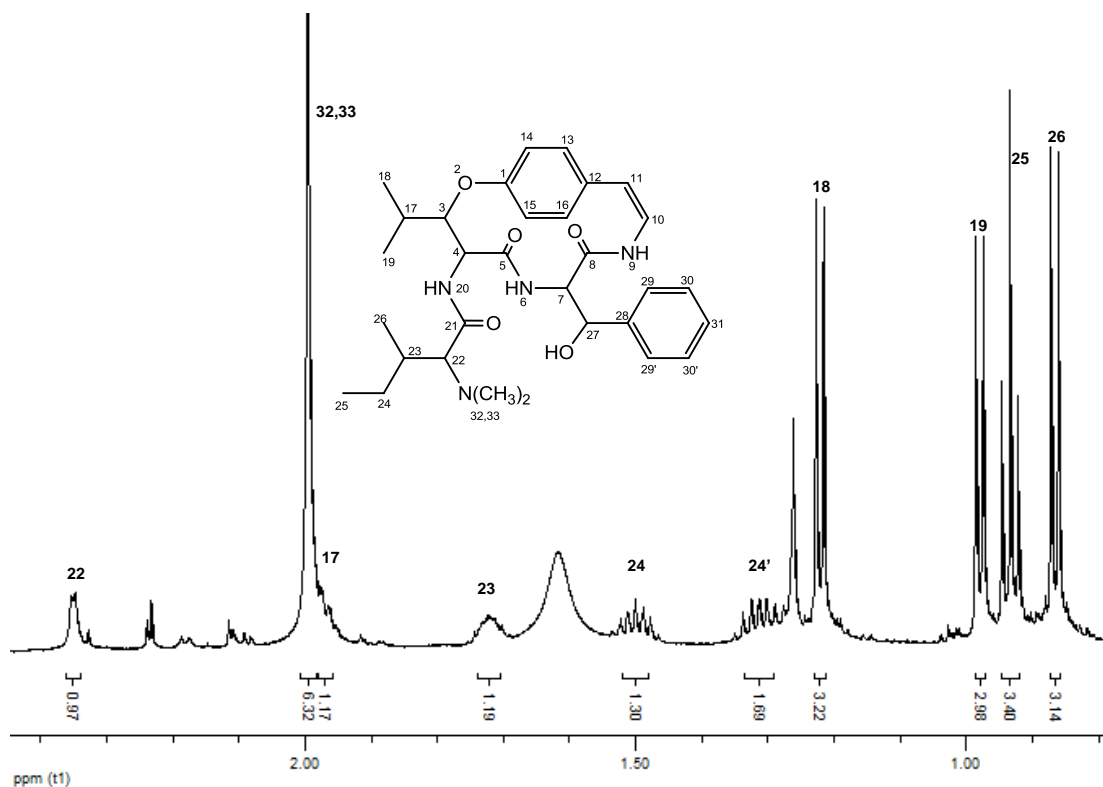


Figura 44 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  expandido (0,80-2,40 ppm) de P12, scutianina P (**39**), em  $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz.

Entre  $\delta$  4,25-5,25 ppm (Figura 45) são observados quatro sinais referentes aos hidrogênios metínicos H-3 ( $\delta$  4,87 ppm, dd,  $J=2,2; 7,8$  Hz), H-4 ( $\delta$  4,41 ppm, dd,  $J=7,8; 9,4$  Hz), H-7 ( $\delta$  4,33 ppm, dd,  $J=3,6; 7,6$  Hz) e H-27 ( $\delta$  5,11 ppm).

A constante de acoplamento de aproximadamente 8,0 Hz entre os hidrogênios  $\alpha,\beta$ -carbonílicos, H-3 e H-4, da unidade  $\beta$ -hidroxileucina, sugere uma configuração *eritro* para o  $\beta$ -hidroxiaminoácido. Para configuração *treo*, essa constante deveria ser de aproximadamente 2,0 Hz.<sup>21,22,25,37</sup>

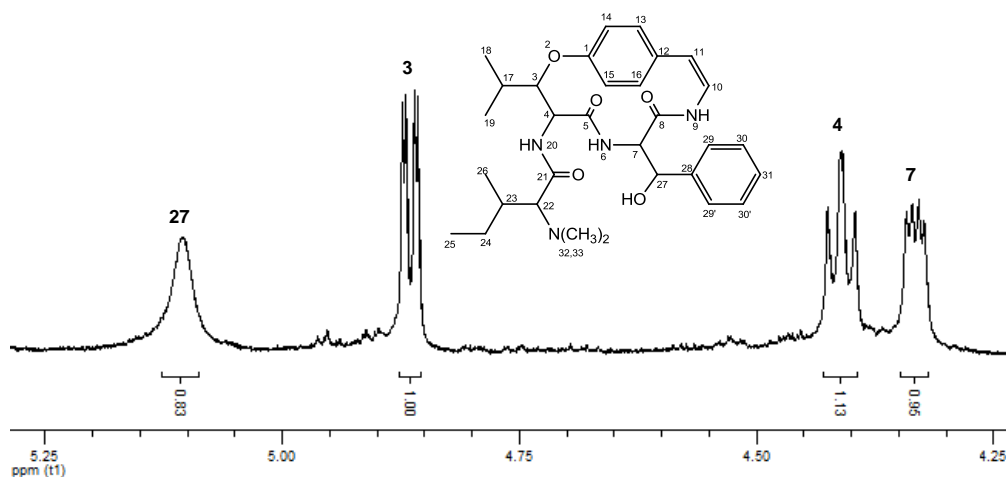


Figura 45 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  expandido (4,25-5,25 ppm) de P12, scutianina P (**39**), em  $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz.

Em campo baixo, na região entre  $\delta$  6,20-7,30 ppm observam-se os hidrogênios amídicos NH-6 ( $\delta$  6,38 ppm, d,  $J=7,6$  Hz), NH-9 ( $\delta$  6,25 ppm) e NH-20 ( $\delta$  7,25 ppm) e os hidrogênios olefínicos H-10 e H-11 como um único sinal, na forma de duplete ( $J=7,1$  Hz), em  $\delta$  6,50 ppm. Os hidrogênios aromáticos da unidade estirilamina são encontrados na região entre  $\delta$  6,95-7,15 ppm e os hidrogênios aromáticos da unidade fenilserina entre  $\delta$  7,20-7,30 ppm. A Figura 46 mostra a expansão do espectro nessa região.

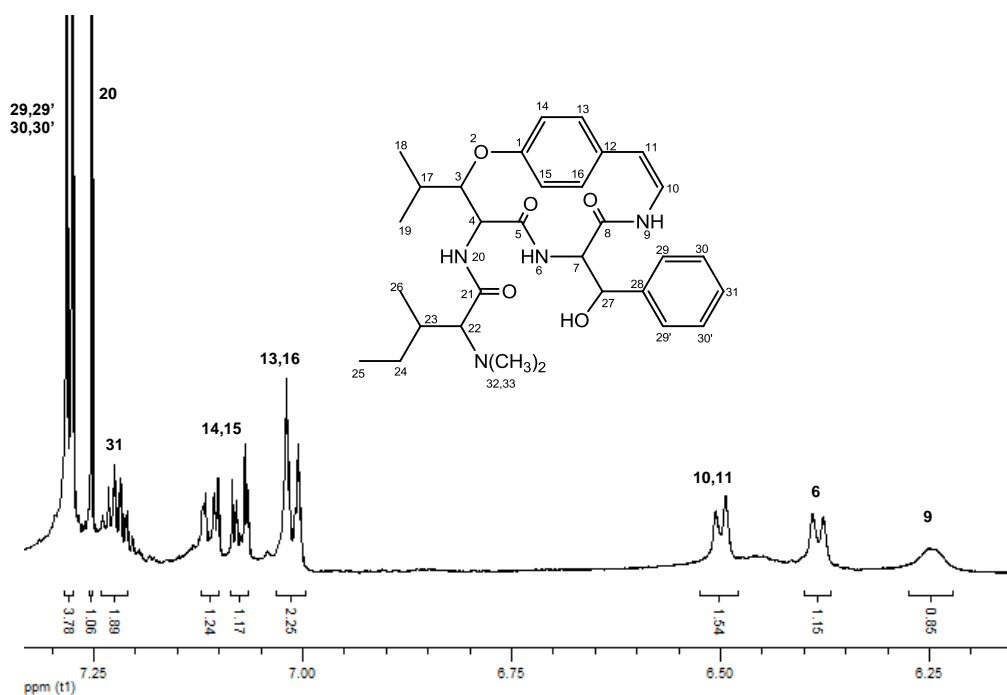


Figura 46 - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H expandido (6,15-7,30 ppm) de P12, scutianina P (**39**), em CDCl<sub>3</sub>, a 600,13 MHz.

Pelo espectro de RMN bidimensional, COSY, é possível observar as correlações dos hidrogênios. Os principais sistemas de spins da região entre  $\delta$  0,75-2,50 ppm são mostrados na Figura 47. O hidrogênio metílico H-25 ( $\delta$  0,93 ppm) tem correlação com os hidrogênios diastereotópicos H-24 ( $\delta$  1,50 ppm) e H-24' ( $\delta$  1,31 ppm) e estes correlacionam com o H-23 ( $\delta$  1,72 ppm) que, por sua vez, correlaciona também com H-22 ( $\delta$  2,35 ppm) e H-26 ( $\delta$  0,87 ppm), completando o sistema de spins da unidade isoleucina. O hidrogênio H-17 ( $\delta$  1,96 ppm) da unidade leucina correlaciona como os hidrogênios metílicos, H-18 ( $\delta$  1,22 ppm) e H-19 ( $\delta$  0,98 ppm), da mesma unidade.

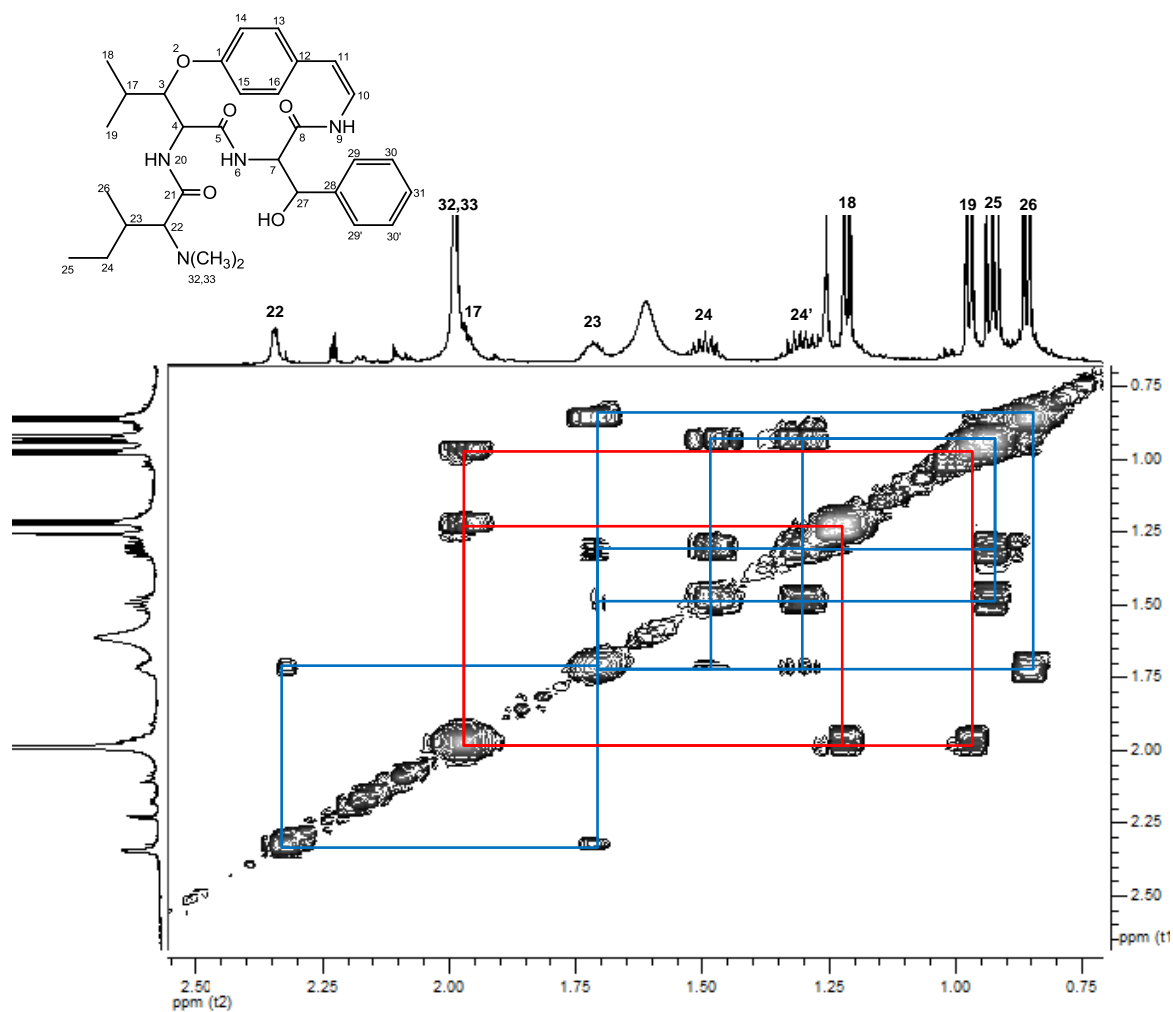


Figura 47 - Espectro de RMN 2D, COSY, expandido (0,75-2,50 ppm) de P12, scutianina P (**39**), em  $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz.

Na região espectral entre  $\delta$  1,80-5,30 ppm (Figura 48) pode-se observar que o hidrogênio metínico H-17 ( $\delta$  1,96 ppm) possui correlação com o hidrogênio  $\beta$ -carbonílico H-3 ( $\delta$  4,87 ppm) e este com o hidrogênio  $\alpha$ -carbonílico H-4 ( $\delta$  4,41 ppm), constituintes da unidade leucina. Observa-se também que os hidrogênios H-7 ( $\delta$  4,33 ppm) e H-27 ( $\delta$  5,11 ppm) da unidade fenilserina correlacionam entre si.



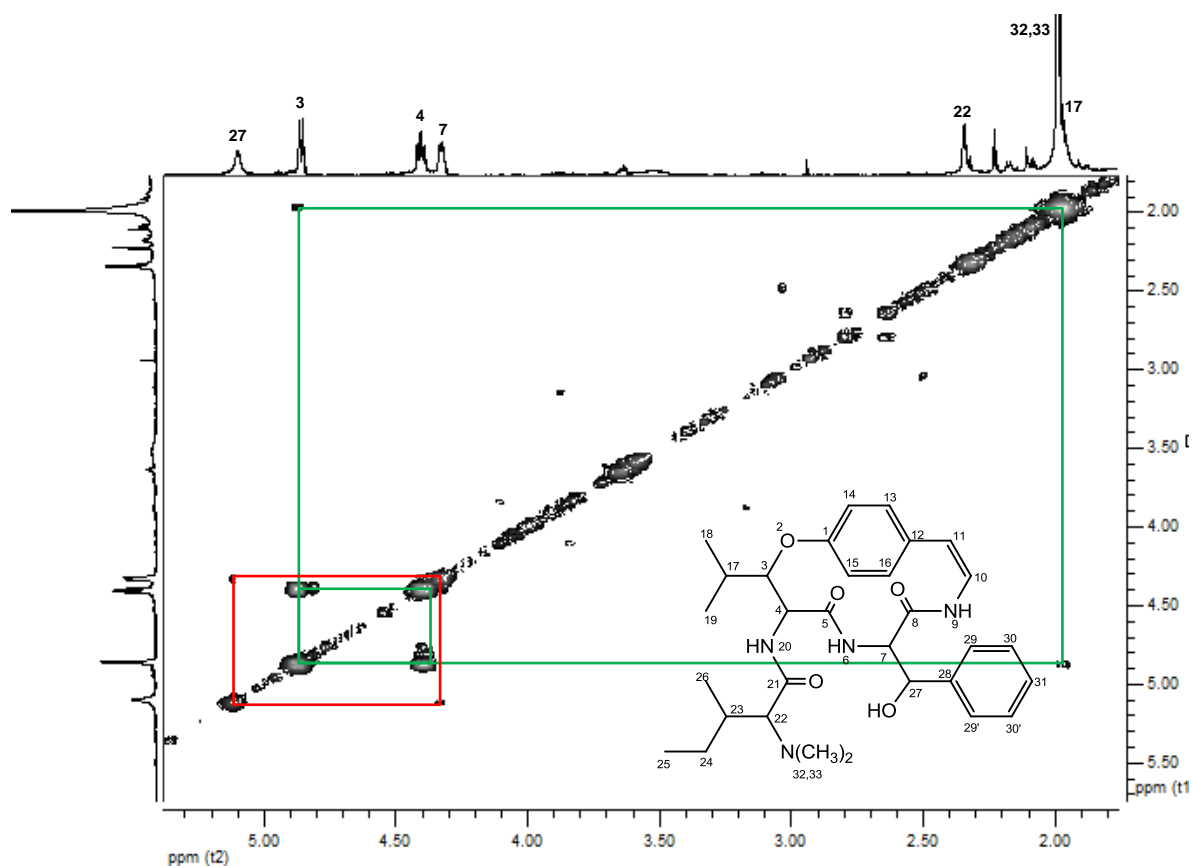


Figura 48 - Espectro de RMN 2D, COSY, expandido (1,80-5,30 ppm) de P12, scutianina P (**39**), em  $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz.

Pela correlação existente entre o H-7 ( $\delta$  4,33 ppm) e o NH-6 ( $\delta$  6,38 ppm) é possível identificar o hidrogênio amídico. Da mesma forma se dá a identificação do hidrogênio amídico NH-20 ( $\delta$  7,25 ppm), que tem correlação com o H-4 ( $\delta$  4,41 ppm), como mostra a Figura 49.

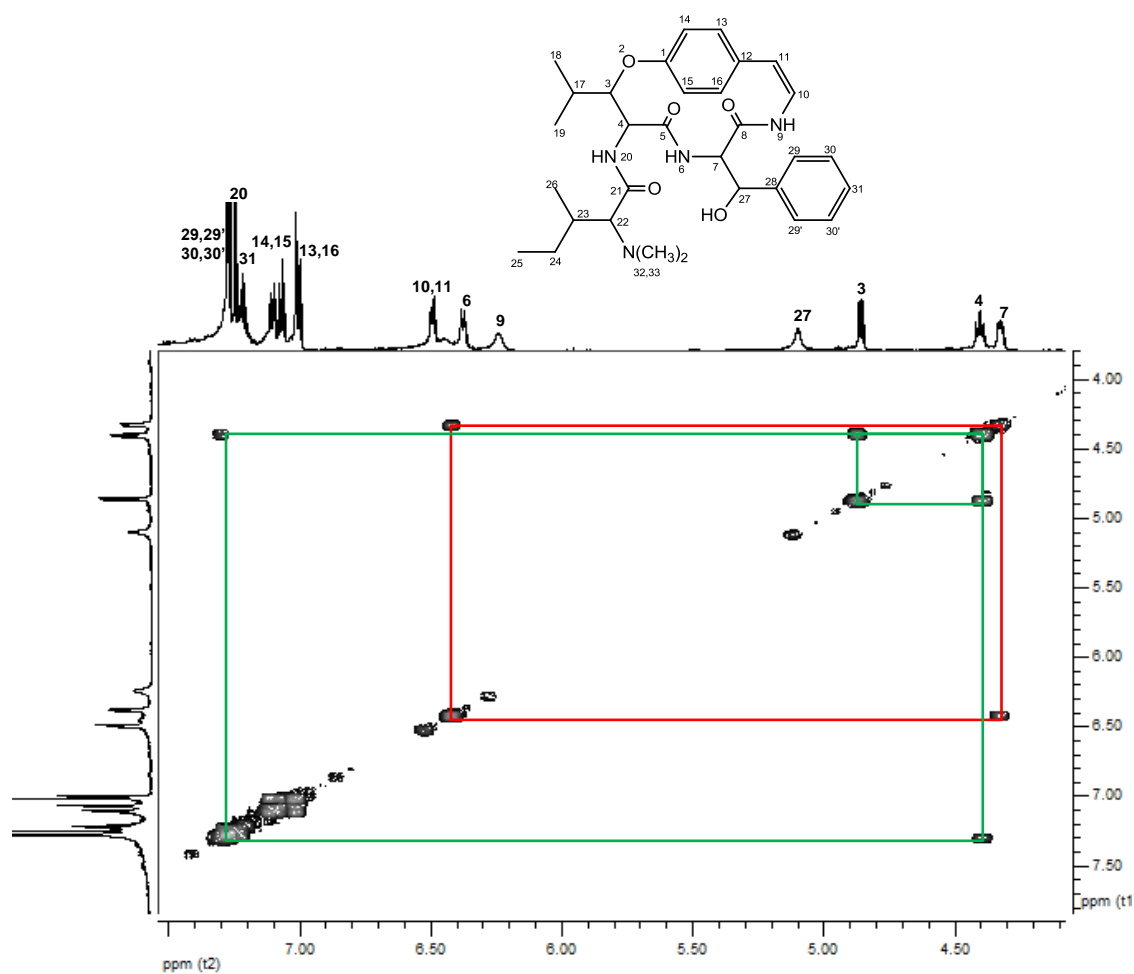


Figura 49 - Espectro de RMN 2D, COSY, expandido (4,10-7,50 ppm) de P12, scutianina P (**39**), em  $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  totalmente desacoplado (Figuras 50 e 51) apresenta sinais na região entre  $\delta$  12,40-172,20 ppm. Dos sinais identificados, quatro indicam sobreposição de dois núcleos de carbono (C-22 e C-27, C-29 e C-29', C-30 e C-30', C-32 e C-33).

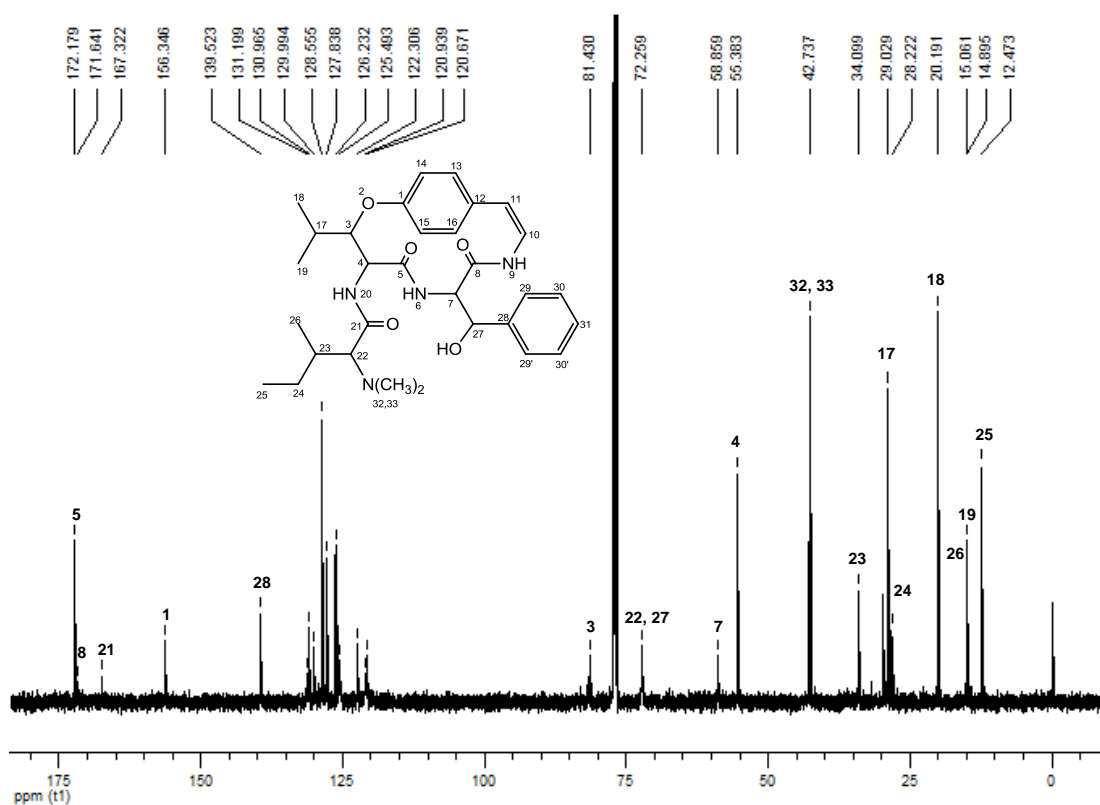


Figura 50 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de P12, scutianina P (**39**), em  $\text{CDCl}_3$ , a 150,91 MHz.

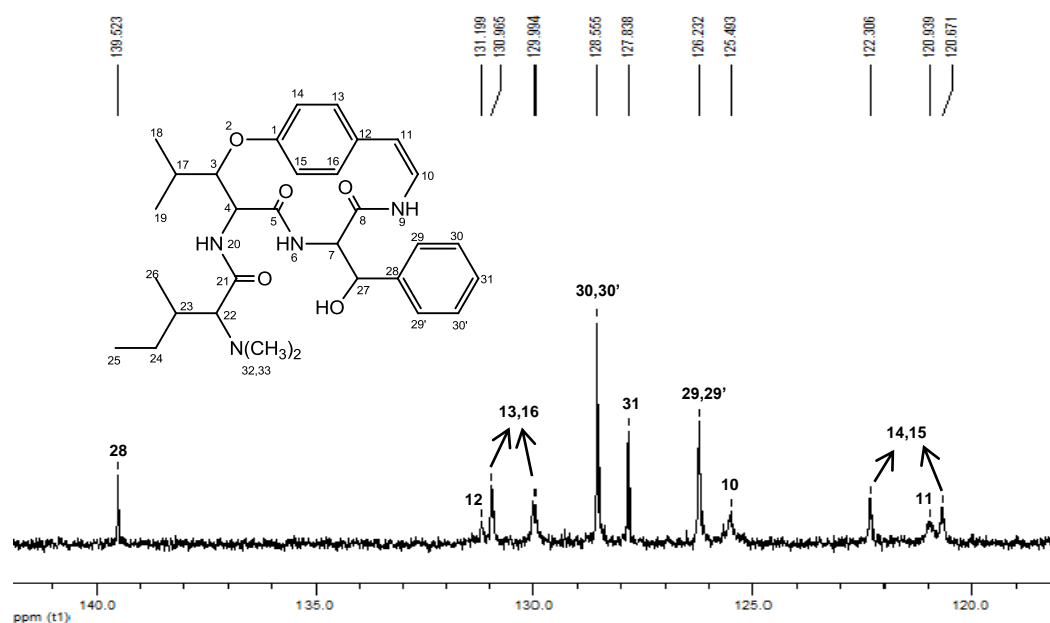


Figura 51 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  expandido (120,0-140,0 ppm) de P12, scutianina P (**39**), em  $\text{CDCl}_3$ , a 150,91 MHz.

Os dados de deslocamento químico dos carbonos C-3 e C-4 podem ser utilizados para prever a estereoquímica absoluta da unidade  $\beta$ -hidroxiaminoácido.<sup>21,22,25,37</sup> Desta forma, os deslocamentos químicos de 81,43 ppm para o C-3 e de 55,38 ppm para o C-4 sugerem uma estereoquímica *L-eritro* para a unidade  $\beta$ -hidroxileucina.

Pelo espectro de RMN de 2D, HMQC, é possível observar a correlação do hidrogênio ligado diretamente ao seu carbono, permitindo assim a atribuição de alguns sinais (Figuras 52, 53 e 54).

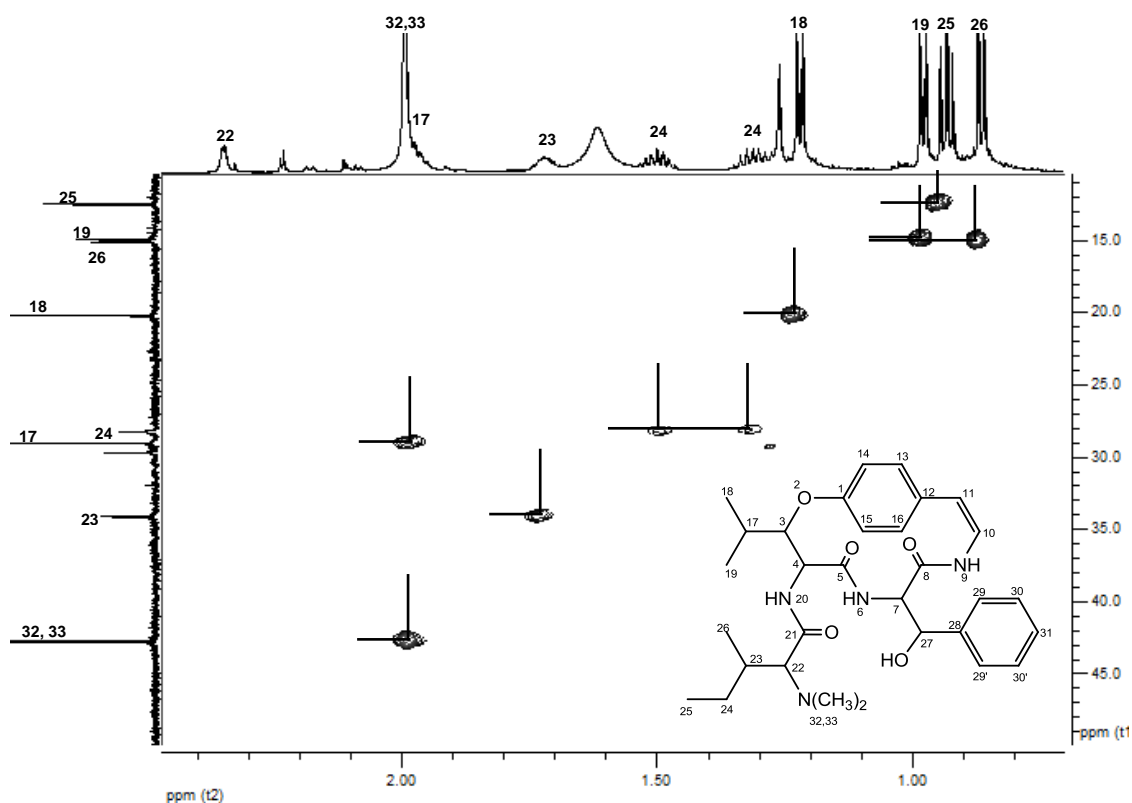


Figura 52 - Espectro de RMN 2D, HMQC, expandido de P12, scutianina P (**39**), em  $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz.

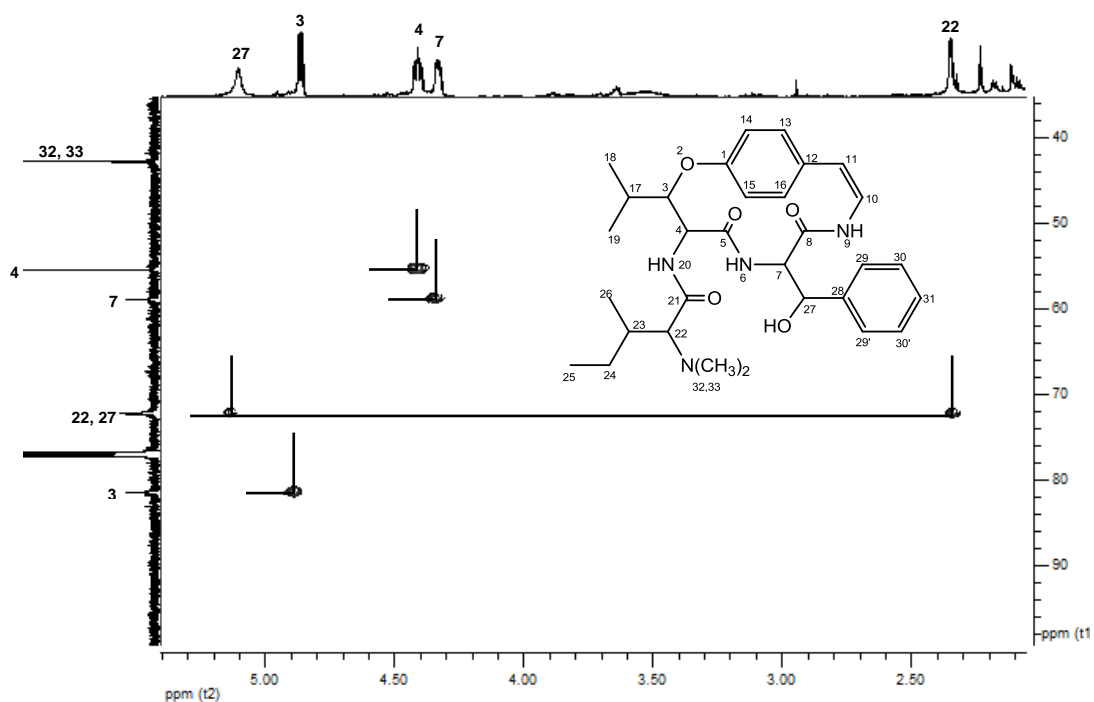


Figura 53 - Espectro de RMN 2D, HMQC, expandido de P12, scutianina P (**39**), em  $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz.

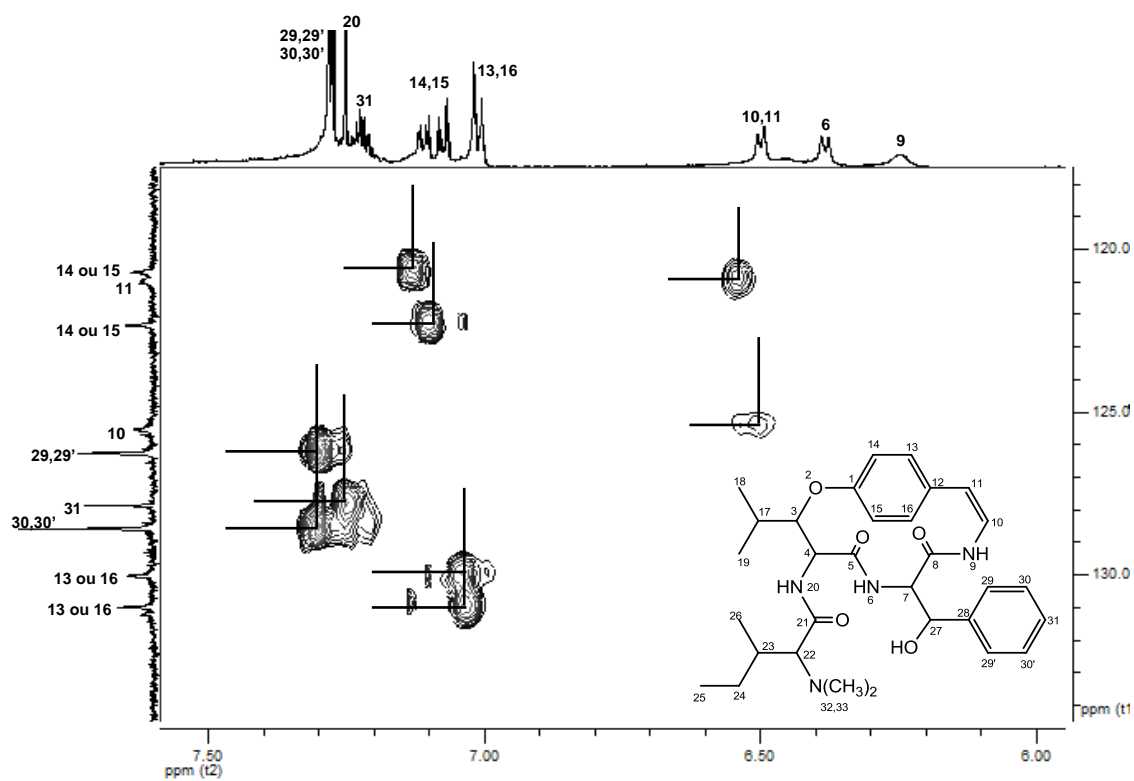


Figura 54 - Espectro de RMN 2D, HMQC, expandido de P12, scutianina P (**39**), em  $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz.

O espectro de RMN de 2D, HMBC, revela correlações entre carbono e hidrogênio à longa distância, permitindo a atribuição dos sinais dos carbonos desprotonados. As principais correlações são mostradas nas Figuras 55 e 56.

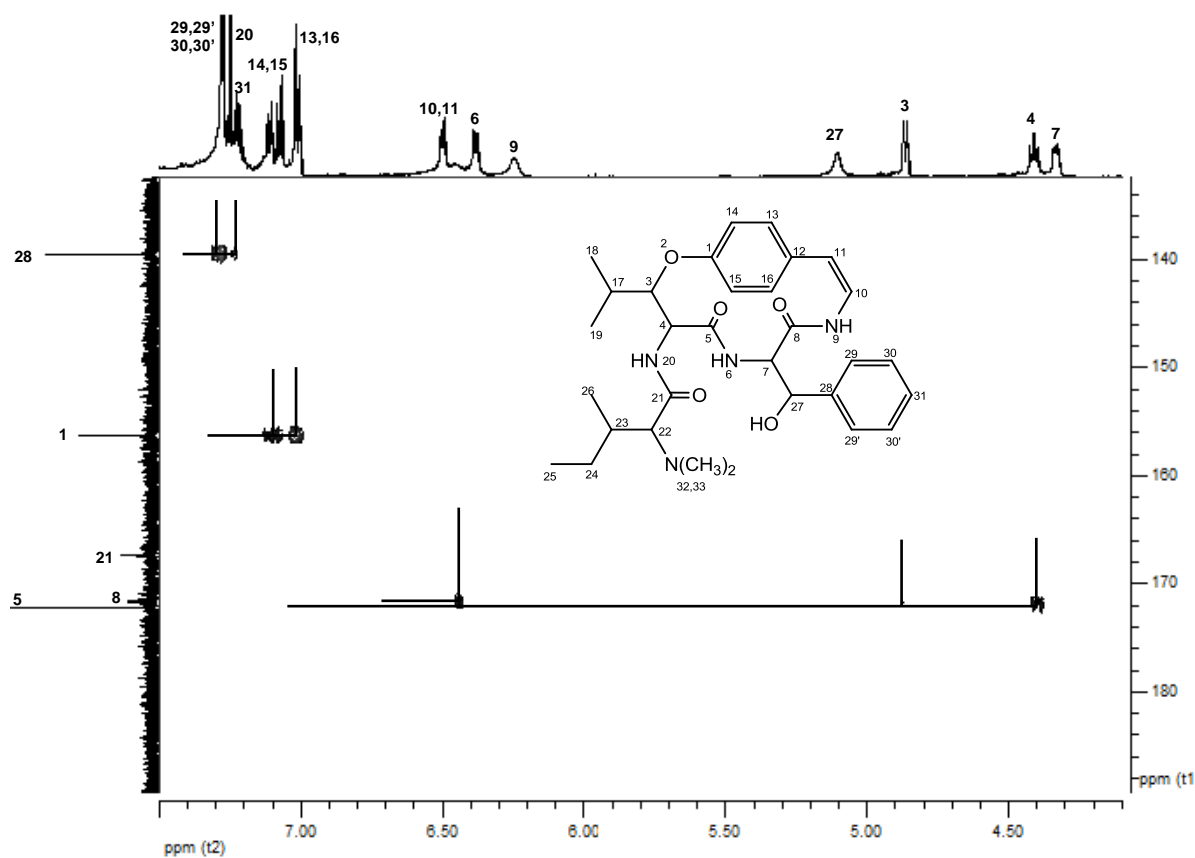


Figura 55 - Espectro de RMN 2D, HMBC, expandido de P12, scutianina P (**39**), em CDCl<sub>3</sub>, a 600,13 MHz.

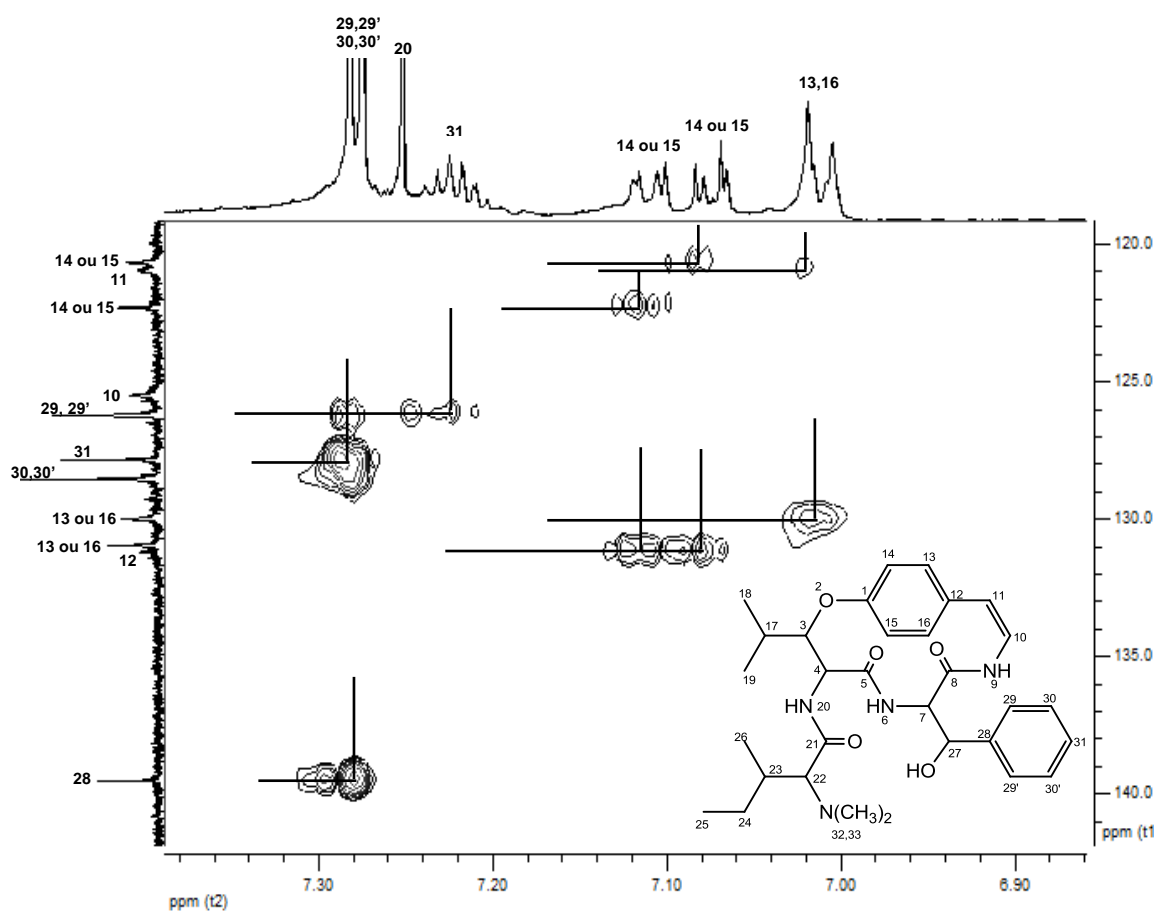


Figura 56 - Espectro de RMN 2D, HMBC, expandido de P12, scutianina P (**39**), em  $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz.

O espectro de massas de alta resolução exibe um íon  $[\text{M} + \text{H}]$  com  $m/z$  551,3251, confirmando o peso molecular do composto P12 ( $\text{C}_{31}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_5$ ), como mostrado na Figura 57.

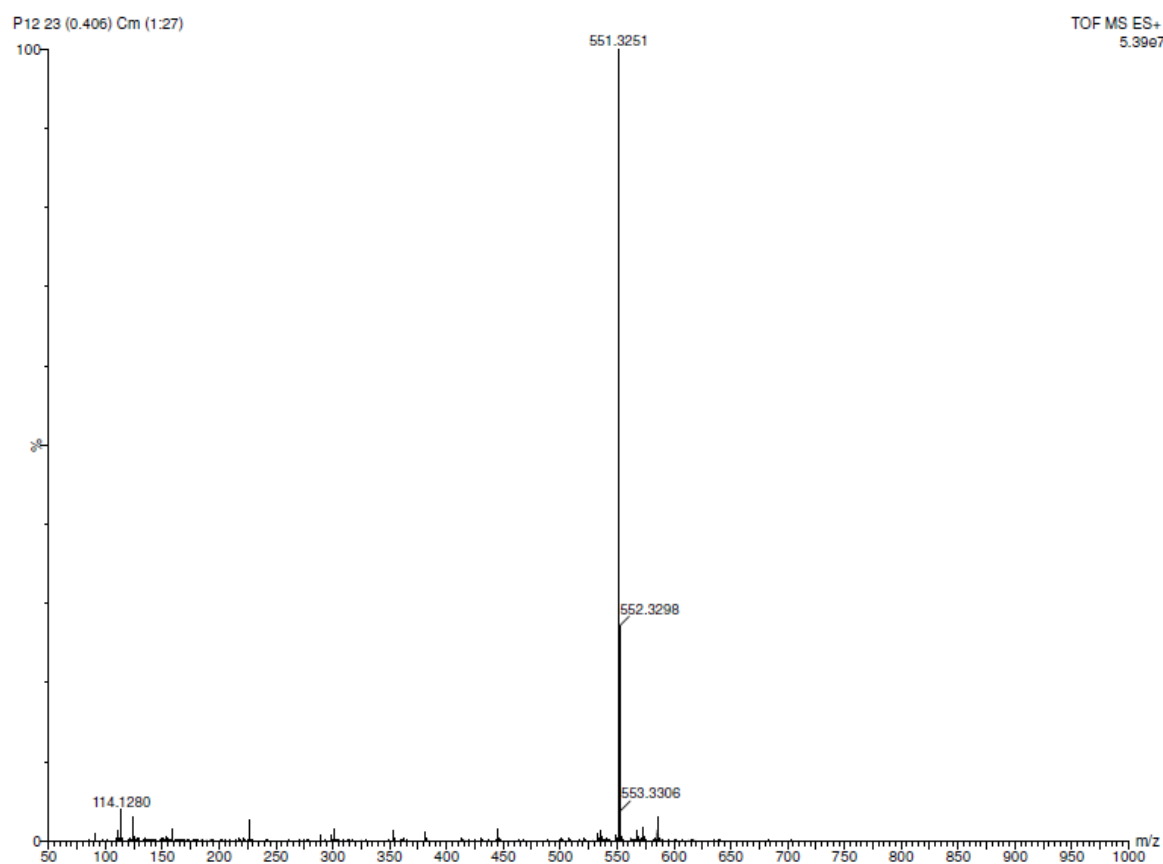


Figura 57 - Espectro de massas de alta resolução de P12, scutianina P (**39**).

Os deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  obtidos para o composto P12 estão listados na Tabela 9.



Tabela 9 - Dados de RMN ( $^1\text{H}$  a 600,13 MHz;  $^{13}\text{C}$  a 150,91 MHz) de P12, scutianina P (**39**), em  $\text{CDCl}_3$ .

Posição	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm); $J$ (Hz)	$\delta$ $^{13}\text{C}$ (ppm)
1	-	156,35
2	-	-
3	4,87 (dd, $J=2,2$ ; 7,8)	81,43
4	4,41 (dd, $J=7,8$ ; 9,4)	55,38
5	-	172,18
6	6,38 (d, $J=7,6$ )	-
7	4,33 (dd, $J=3,6$ ; 7,6)	58,86
8	-	171,64
9	6,25	-
10	6,50 (d, $J=7,1$ )	125,49
11	6,50 (d, $J=7,1$ )	120,94
12	-	131,19
13	7,01 (m)	129,99 ou 130,96
14	7,07 (d, $J=2,4$ ; 8,6) ou 7,11 (dd, $J=2,4$ ; 8,6)	120,67 ou 122,31
15	7,07 (d, $J=2,4$ ; 8,6) ou 7,11 (dd, $J=2,4$ ; 8,6)	120,67 ou 122,31
16	7,01 (m)	129,99 ou 130,96
17	1,96 (m)	29,03
18	1,22 (d, $J=6,8$ )	20,19
19	0,98 (d, $J=6,8$ )	14,89
20	7,25	-
21	-	167,32
22	2,35 (d, $J=3,4$ )	72,26
23	1,72 (m)	34,09
24	1,50 (m)	28,22
24'	1,31 (m)	-
25	0,93 (t, $J=7,4$ )	12,47
26	0,87 (d, $J=6,8$ )	15,06
27	5,11	72,26
28	-	139,52
29	7,28 (d, $J=4,4$ )	126,23
29'	7,28 (d, $J=4,4$ )	126,23
30	7,28 (d, $J=4,4$ )	128,55
30'	7,28 (d, $J=4,4$ )	128,55
31	7,22 (m)	127,84
32	2,00 (s)	42,74
33	2,00 (s)	42,74

### 5.3 Determinação da estereoquímica relativa dos metabólitos P06, P11 e P12

Os alcaloides P06, P11 e P12, isolados da fração etérea básica de *Scutia buxifolia*, tiveram suas estruturas elucidadas com base nos dados de espectroscopia de RMN uni e bidimensionais e espectrometria de massas de alta resolução. Os três compostos apresentam a mesma composição molecular,  $C_{31}H_{42}N_4O_5$ , e conectividade de suas unidades de aminoácidos que o alcaloide scutianina H (**19**), isolado anteriormente da mesma espécie,<sup>32</sup> porém apresentam características físicas diferentes.

O trabalho anterior<sup>32</sup> apresenta poucos dados espectrais de RMN de  $^1H$  e nenhum dado de RMN de  $^{13}C$ . Este fato, somado à falta de uma amostra autêntica para comparação em CCD ou CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) impossibilitou a identificação de um dos compostos como sendo de fato o alcaloide scutianina H, no entanto os dois compostos com dados físicos mais próximos deste alcaloide são P06 e P12. Como há esta incerteza, neste trabalho os compostos P06, P11 e P12 foram denominados scutianinas -N (**37**), -O (**38**) e -P (**39**), respectivamente.

Como se tratam de três diastereoisômeros, as diferenças estruturais se devem aos aspectos tridimensionais das moléculas, ou seja, suas estereoquímicas. Para fim de comparação, os três alcaloides foram, inicialmente, submetidos à análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os compostos P06, P11 e P12 apresentaram tempos de retenção de 18,663; 20,342 e 19,648 minutos, respectivamente, em  $\lambda=260$  nm. Devido à sensibilidade do método, pode-se afirmar que tempos de retenção diferentes remetem a substâncias diferentes. Os cromatogramas são mostrados na Figura 58.

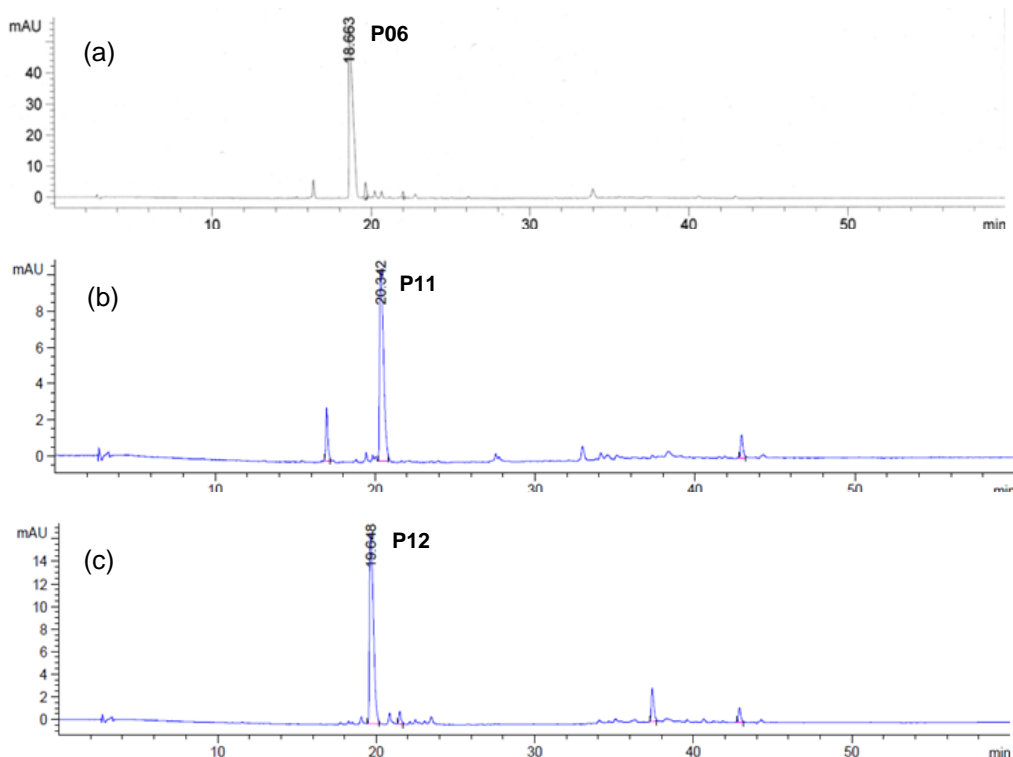


Figura 58 - Cromatogramas obtidos por CLAE em gradiente de H<sub>2</sub>O:ACN com fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>, λ=260 nm. (a) Alcaloide P06. (b) Alcaloide P11. (c) Alcaloide P12.

Assim como podem ser observadas características físicas diferentes para os três compostos, os dados espectrais de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C também apresentam algumas diferenças. Para melhor comparação desses dados, os deslocamentos químicos de <sup>1</sup>H estão listados na Tabela 10 e os deslocamentos químicos de <sup>13</sup>C na Tabela 11.

Como se tratam de alcaloides diastereoisoméricos, os principais dados de RMN a serem observados são os deslocamentos químicos (δ) e constantes de acoplamento (J) dos centros estereogênicos C-3, C-4, C-7 e C-27, responsáveis pela estereoquímica da estrutura.

Tabela 10 - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  de P06, P11 e P12, em  $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz.

Posição	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm); $J$ (Hz)		
	P06	P11	P12
1	-	-	-
2	-	-	-
3	4,87 (dd, $J=2,0$ ; 7,9)	4,14 (dd, $J=5,0$ ; 7,8)	4,87 (dd, $J=2,2$ ; 7,8)
4	4,41	4,57 (dd, $J=6,4$ ; 7,8)	4,41 (dd, $J=7,8$ ; 9,4)
5	-	-	-
6	6,29	6,45	6,38 (d, $J=7,6$ )
7	4,41	4,33 (dd, $J=3,6$ ; 7,8)	4,33 (dd, $J=3,6$ ; 7,6)
8	-	-	-
9	6,29	6,40	6,25
10	6,48 (d, $J=5,6$ )	6,24	6,50 (d, $J=7,1$ )
11	6,48 (d, $J=5,6$ )	6,60 (d, $J=7,4$ )	6,50 (d, $J=7,1$ )
12	-	-	-
13	6,99 (dt, $J=2,2$ ; 8,3)	7,03 (m)	7,01 (m)
14	6,89 (d, $J=8,4$ ) ou 7,10 (dd, $J=2,5$ ; 8,4)	6,97 (d, $J=8,4$ ) ou 7,13 (dd, $J=2,2$ ; 8,4)	7,07 (d, $J=2,4$ ; 8,6) ou 7,11 (dd, $J=2,4$ ; 8,6)
15	6,89 (d, $J=8,4$ ) ou 7,10 (dd, $J=2,5$ ; 8,4)	6,97 (d, $J=8,4$ ) ou 7,13 (dd, $J=2,2$ ; 8,4)	7,07 (d, $J=2,4$ ; 8,6) ou 7,11 (dd, $J=2,4$ ; 8,6)
16	6,99 (dt, $J=2,2$ ; 8,3)	7,03 (m)	7,01 (m)
17	2,05 (m)	2,74 (m)	1,96 (m)
18	1,23 (d, $J=6,8$ )	1,17 (d, $J=6,6$ ) ou 1,18 (d, $J=6,6$ )	1,22 (d, $J=6,8$ )
19	1,00 (d, $J=6,8$ )	1,17 (d, $J=6,6$ ) ou 1,18 (d, $J=6,6$ )	0,98 (d, $J=6,8$ )
20	7,12	7,65	7,25
21	-	-	-
22	2,58 (d, $J=3,7$ )	2,69	2,35 (d, $J=3,4$ )
23	1,79 (m)	1,87 (m)	1,72 (m)
24	1,55 (m)	1,58 (m)	1,50 (m)
24'	1,26 (m)	1,32 (m)	1,31 (m)
25	0,95 (t, $J=7,4$ )	0,96	0,93 (t, $J=7,4$ )
26	0,89 (d, $J=6,8$ )	0,96	0,87 (d, $J=6,8$ )
27	5,03 (d, $J=4,0$ )	4,92 (d, $J=3,6$ )	5,11
28	-	-	-
29	7,25-7,32	7,24 (d, $J=8,3$ )	7,28 (d, $J=4,4$ )
29'	7,25-7,32	7,24 (d, $J=8,3$ )	7,28 (d, $J=4,4$ )
30	7,32-7,36	7,30 (t, $J=7,3$ )	7,28 (d, $J=4,4$ )
30'	7,32-7,36	7,30 (t, $J=7,3$ )	7,28 (d, $J=4,4$ )
31	7,25-7,32	7,26	7,22 (m)
32	2,15 (s)	2,27 (s)	2,00 (s)
33	2,15 (s)	2,27 (s)	2,00 (s)

Tabela 11 - Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  de P06, P11 e P12, em  $\text{CDCl}_3$ , a 150,91 MHz.

Posição	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)		
	P06	P11	P12
1	156,30	155,65	156,35
2	-	-	-
3	81,33	88,31	81,43
4	55,85	54,00	55,38
5	171,67	170,01	172,18
6	-	-	-
7	59,20	58,62	58,86
8	166,52	167,54	171,64
9	-	-	-
10	121,21 ou 125,22	125,40	125,49
11	121,21 ou 125,22	124,69	120,94
12	131,07	131,86	131,19
13	122,11 ou 130,84	121,36 ou 129,90	129,99 ou 130,96
14	120,50 ou 129,79	122,99 ou 130,31	120,67 ou 122,31
15	120,50 ou 129,79	122,99 ou 130,31	120,67 ou 122,31
16	122,11 ou 130,84	121,36 ou 129,90	129,99 ou 130,96
17	28,99	29,88	29,03
18	20,15	18,17 ou 20,23	20,19
19	14,85	18,17 ou 20,23	14,89
20	-	-	-
21	172,85	171,07	167,32
22	73,76	73,44	72,26
23	34,52	34,66	34,09
24	27,54	27,36	28,22
25	12,23	12,20	12,47
26	14,59	14,98	15,06
27	72,90	73,44	72,26
28	138,79	139,22	139,52
29	125,95	125,98	126,23
29'	125,95	125,98	126,23
30	128,57	128,47	128,55
30'	128,57	128,47	128,55
31	128,03	127,91	127,84
32	43,04	43,34	42,74
33	43,04	43,34	42,74

As diferenças podem ser melhor evidenciadas quando os espectros são comparados. A Figura 59 mostra a expansão dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  na região entre  $\delta$  0,80-1,50 ppm. A diferença mais acentuada é com relação aos hidrogênios metílicos das unidades leucina (H-18 e H-19) e isoleucina (H-25 e H-26). Nos compostos P06 e P12, esses hidrogênios desdobram na forma de três dupletos e um triplete. No composto P11, os hidrogênios H-25 e H-26 aparecem sobrepostos e o H-19 é observado em campo mais baixo, junto com o H-18. Este é um indicativo de que P06 e P12 se diferenciam de P11 na unidade  $\beta$ -hidroxileucina.

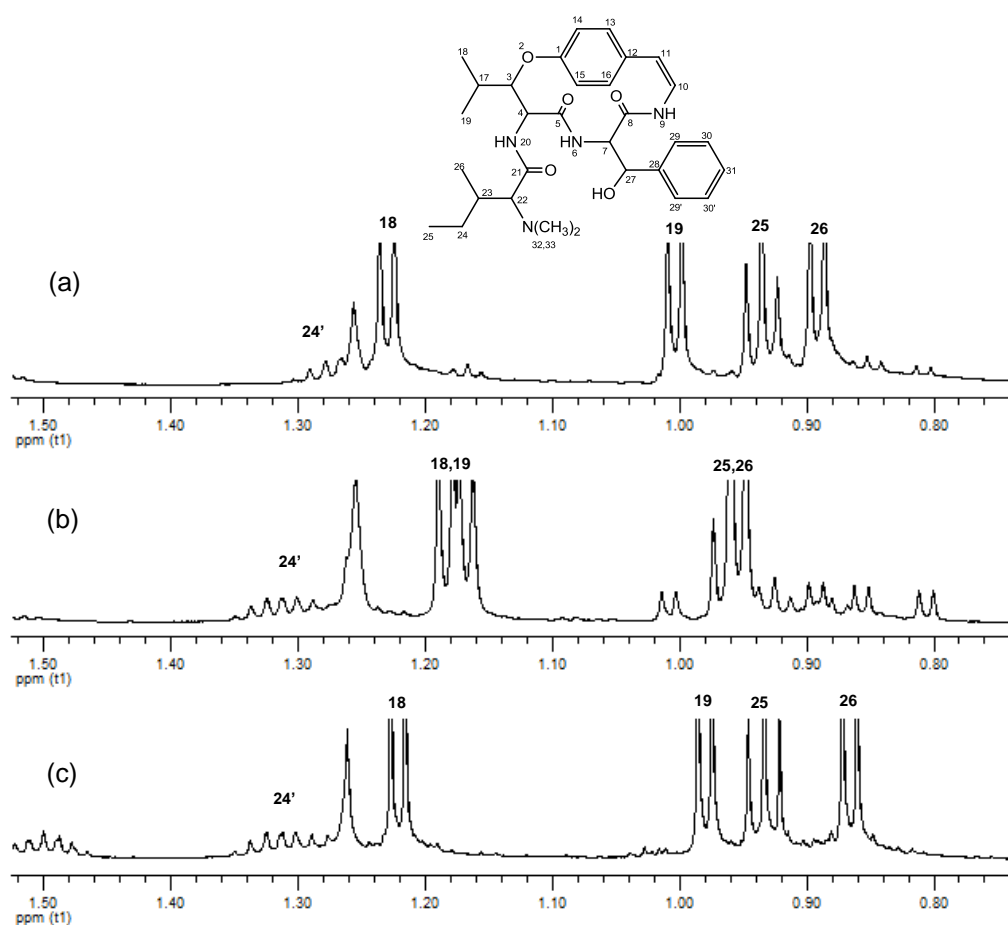


Figura 59 - Comparação dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  expandidos (0,80-1,50 ppm) em  $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz. (a) Alcaloide P06. (b) Alcaloide P11. (c) Alcaloide P12.

Na região espectral entre  $\delta$  1,40-3,00 ppm (Figura 60), os hidrogênios metílicos H-32 e H-33, da unidade *N,N*-dimetil isoleucina são observados com diferentes deslocamentos químicos para os três compostos. O hidrogênio metínico

H-17 é observado com deslocamento químico semelhante em P06 e P12, porém em P11 é observado em campo mais baixo. O H-22, por sua vez, é observado em campo mais alto no composto P12, quando comparado aos demais.

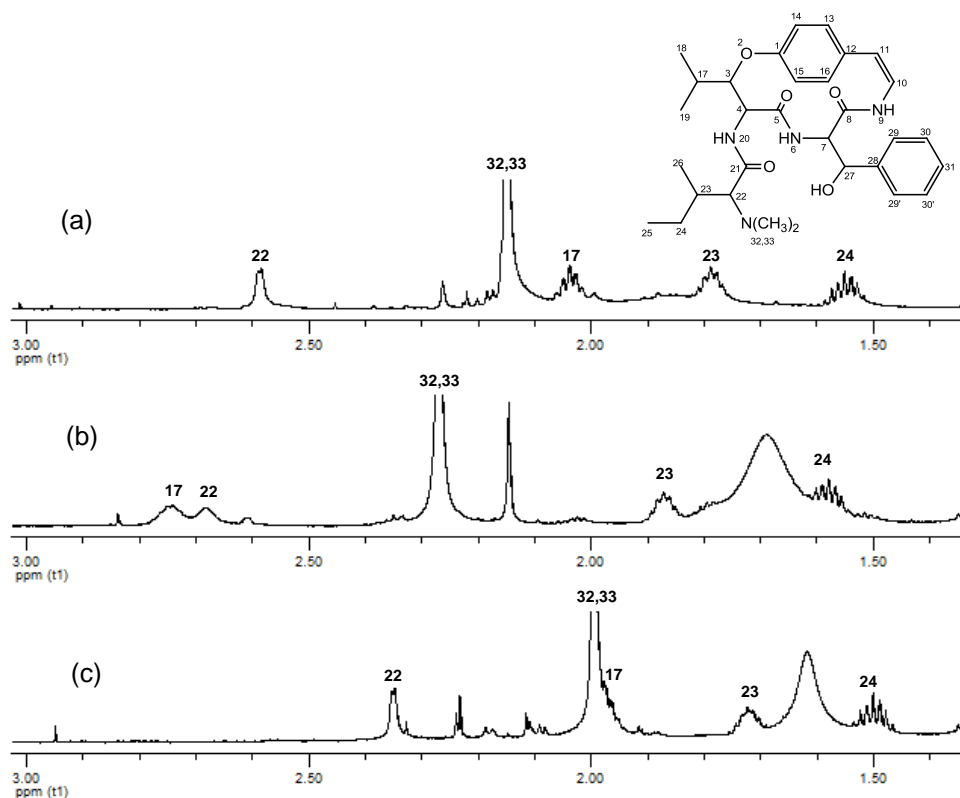


Figura 60 - Comparação dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  expandidos (1,40-3,00 ppm) em  $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz. (a) Alcaloide P06. (b) Alcaloide P11. (c) Alcaloide P12.

Com relação aos hidrogênios  $\alpha,\beta$ -carbonílicos das unidades  $\beta$ -hidroxileucina (H-3 e H-4) e fenilserina (H-7 e H-27), observa-se que no composto P06 os hidrogênios H-4 e H-7 aparecem sobrepostos, enquanto no composto P12 aparecem separados, na forma de duplos dupletos e no composto P11 há inversão das posições dos hidrogênios H-3, H-4 e H-7 (Figura 61). Esta inversão de posições é outro indicativo de que os alcaloides se diferenciam na unidade  $\beta$ -hidroxileucina.

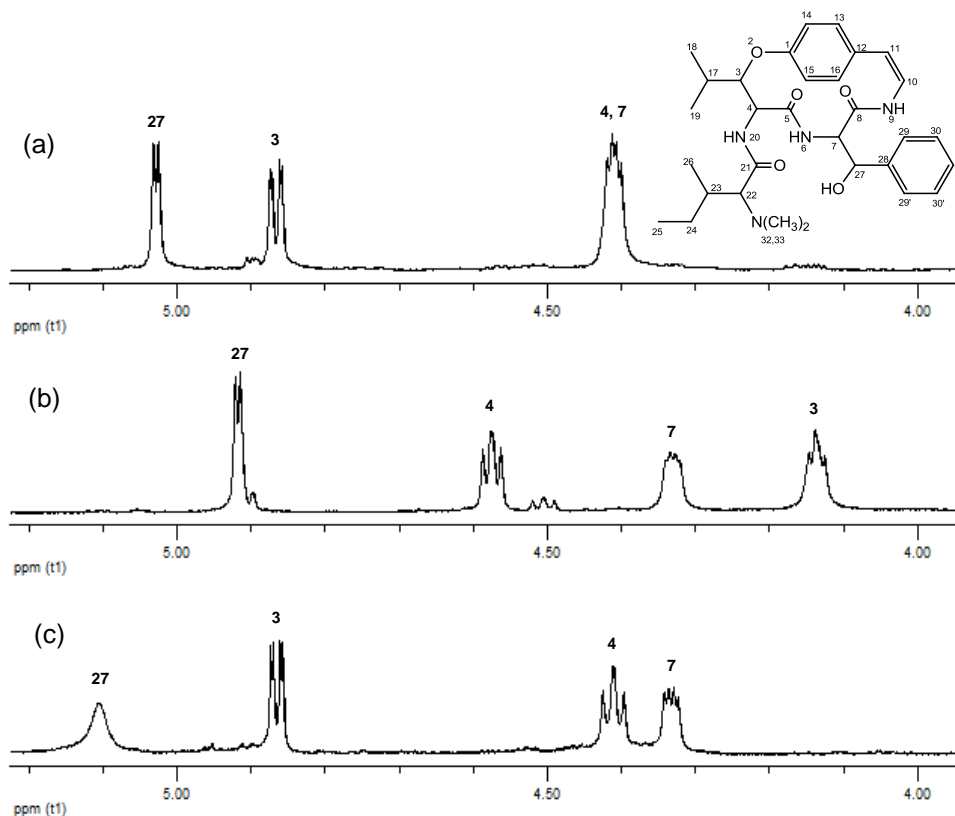


Figura 61 - Comparação dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  expandidos (4,00-5,20 ppm) em  $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz. (a) Alcaloide P06. (b) Alcaloide P11. (c) Alcaloide P12.

Em campo mais baixo ( $\delta$  6,00-7,80 ppm), as principais diferenças são observadas para os hidrogênios amídicos e olefínicos. No composto P06, os hidrogênios amídicos NH-6 e NH-9 são observados como um único sinal, enquanto nos outros dois compostos aparecem separados. O hidrogênio amídico NH-20 absorve em campo mais baixo no composto P11, quando comparado aos demais. Os hidrogênios olefínicos H-10 e H-11 encontram-se sobrepostos em P06 e P12, ao passo que em P11 são observados como dois sinais distintos, sendo o H-10 observado em campo mais alto, quando há inversão de posição com os hidrogênios amídicos NH-6 e NH-9, como mostra a Figura 62.



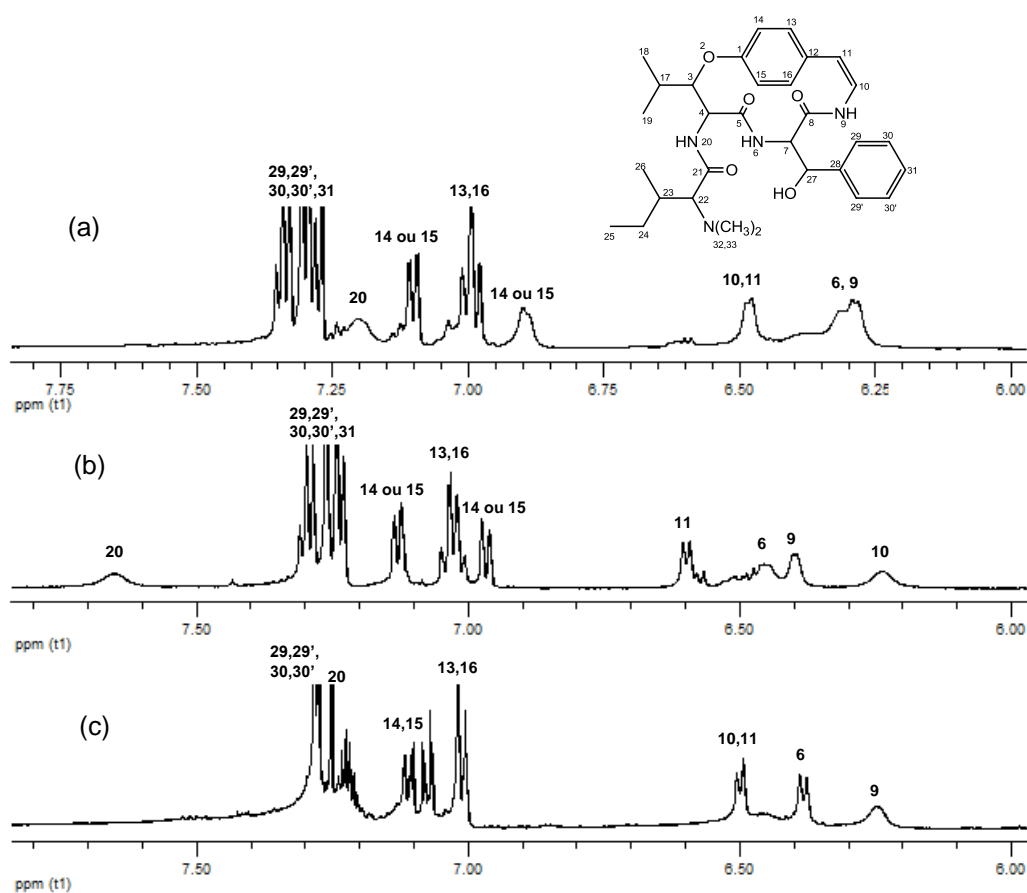


Figura 62 - Comparação dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  expandidos (6,00-7,80 ppm) em  $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz. (a) Alcaloide P06. (b) Alcaloide P11. (c) Alcaloide P12.

Algumas diferenças podem ser observadas nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$ . Na região espectral entre  $\delta$  50,0-90,0 ppm (Figura 63), os carbonos C-22 e C-27 são observados com mesmo deslocamento químico nos compostos P11 e P12, e separados em P06 e o carbono  $\beta$ -carbonílico C-3 é observado em campo mais baixo em P11, quando comparado aos demais compostos.

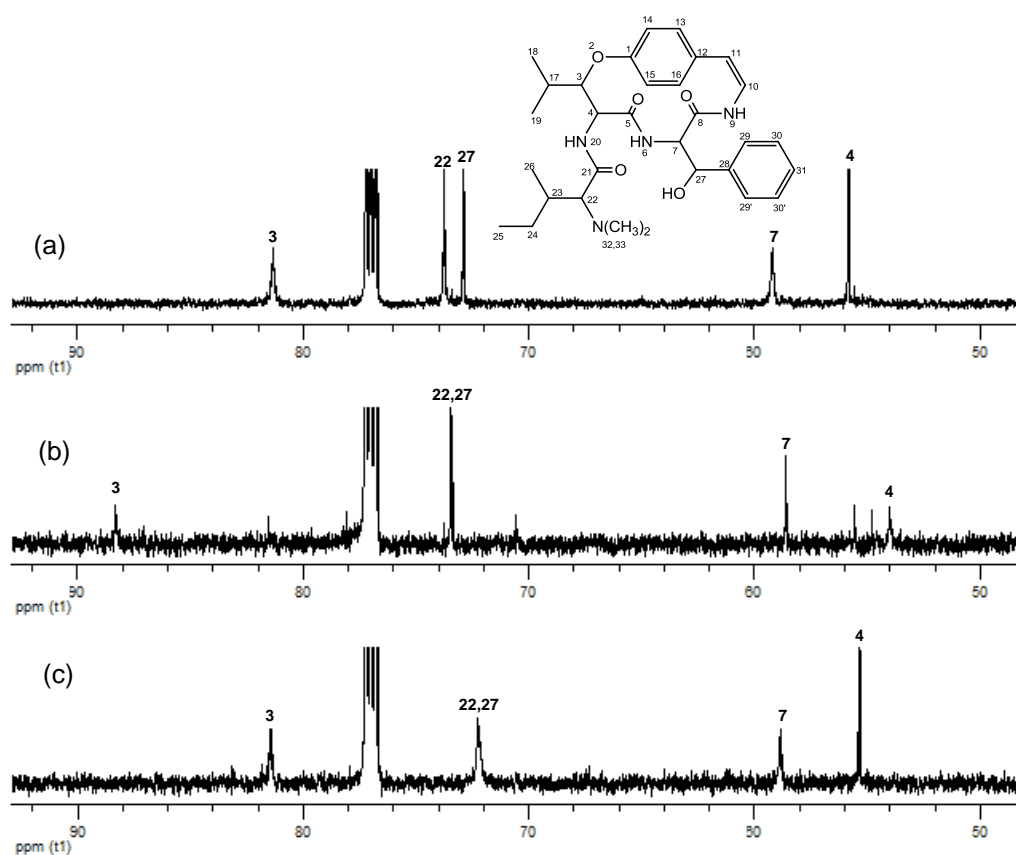


Figura 63 - Comparação dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  expandidos (50,0-90,0 ppm) em  $\text{CDCl}_3$ , a 150,91 MHz. (a) Alcaloide P06. (b) Alcaloide P11. (c) Alcaloide P12.

A Figura 64 mostra a expansão dos espectros na região entre  $\delta$  136,0-182,0 ppm, onde pode-se observar que no composto P12 o carbono C-8 aparece em campo mais baixo e o carbono C-21 em campo mais alto, além de que há inversão de posição do carbono C-21 com os carbonos C-5 e C-8, em relação aos outros compostos.

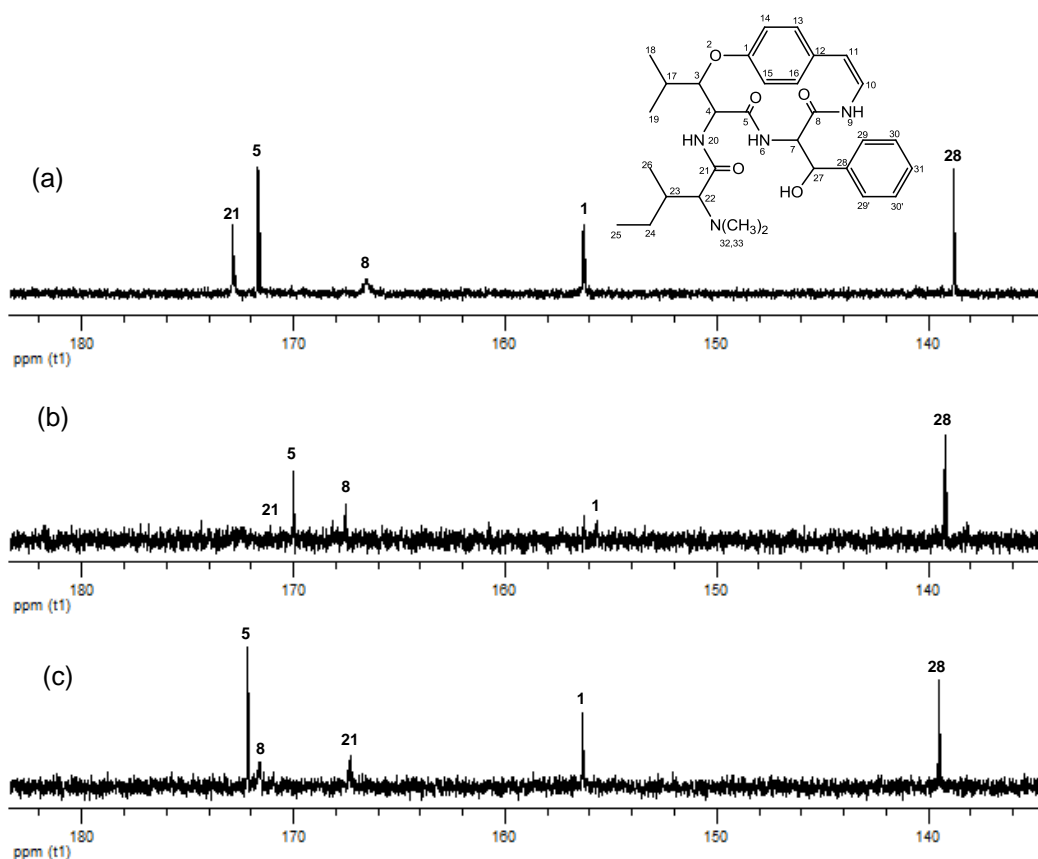


Figura 64 - Comparação dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  expandidos (136,0-182,0 ppm) em  $\text{CDCl}_3$ , a 150,91 MHz. (a) Alcaloide P06. (b) Alcaloide P11. (c) Alcaloide P12.

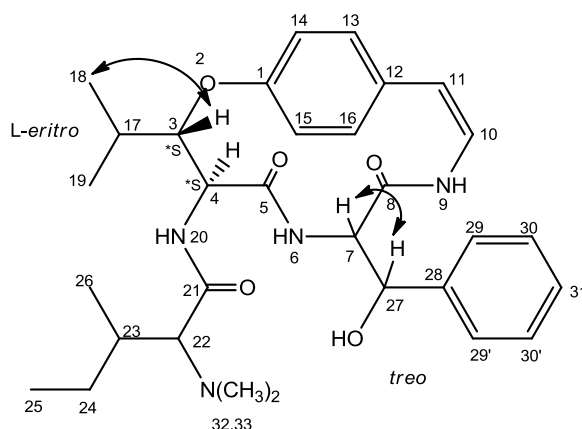
De acordo com a literatura,<sup>21,22,25,37</sup> dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  podem ser utilizados para definir a configuração relativa ou absoluta do  $\beta$ -hidroxiaminoácido em alcaloides ciclopeptídicos de 14-membros.

Pelo espectro de RMN de  $^1\text{H}$  pode-se definir a configuração relativa. A forma *eritro* do  $\beta$ -hidroxiaminoácido apresenta um  $J_{\alpha,\beta}$  próximo de 8 Hz, enquanto a forma *treo* apresenta um  $J_{\alpha,\beta}$  próximo de 2 Hz. O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  fornece informações acerca da configuração absoluta do  $\beta$ -hidroxiaminoácido. Na forma *L-eritro* o sinal do carbono  $\alpha$  aparece com um deslocamento químico de aproximadamente 55,0 ppm, enquanto na forma *D-eritro* este sinal aparece próximo de 53,0 ppm. Para o carbono  $\beta$ , a diferença é mais evidente, na forma *L-eritro* o sinal deste carbono aparece próximo de 81,0 ppm e na forma *D-eritro* aparece com deslocamento químico próximo de 87,0 ppm.<sup>21,22,25,37</sup>

Com base nos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , determinou-se a configuração do  $\beta$ -hidroxiaminoácido ( $\beta$ -hidroxileucina), e pela técnica de NOESY foi possível verificar as correlações espaciais dos hidrogênios e sugerir a estereoquímica da unidade fenilserina, conforme Maldaner e col.<sup>38</sup>

### 5.3.1 Alcaloide P06, scutianina N (**37**)

O alcaloide P06 apresenta um  $J_{3,4}=7,9$  Hz, indicando configuração *eritro* para o  $\beta$ -hidroxiaminoácido. Pelos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  observam-se deslocamentos químicos de 81,33 e 55,85 ppm para C-3 e C-4, respectivamente, indicando configuração  $^*3\text{S}, ^*4\text{S}$  (L-*eritro*- $\beta$ -hidroxileucina).



Scutianina N (**37**)

Pelo espectro de RMN bidimensional, NOESY, pode-se observar as correlações espaciais entre os hidrogênios (Figuras 65 e 66). O hidrogênio metínico H-3 apresenta correlação com os hidrogênios H-17 e H-18, indicando que estes estão no mesmo lado da estrutura. O mesmo acontece entre o H-4 e o H-19. Os hidrogênios H-3 e H-4 não apresentam correlação entre si, indicando que estão em lados opostos, em posição *anti*. Já os hidrogênios metínicos H-7 e H-27 da unidade

fenilserina correlacionam entre si, indicando que estão no mesmo lado do plano, em uma relação *syn*, o que sugere configuração *treo* para esta unidade.

Devido à sobreposição dos hidrogênios metínicos H-4 e H-7, e dos hidrogênios amídicos NH-6 e NH-9, torna-se impossível definir a correlação existente entre os sinais, e conseqüentemente, não é possível sugerir se os hidrogênios H-7 e H-27 estão acima ou abaixo do plano. Assim a unidade fenilserina pode ter configuração  $*7R,*27S$  (*D-treo*-fenilserina) ou  $*7S,*27R$  (*L-treo*-fenilserina).

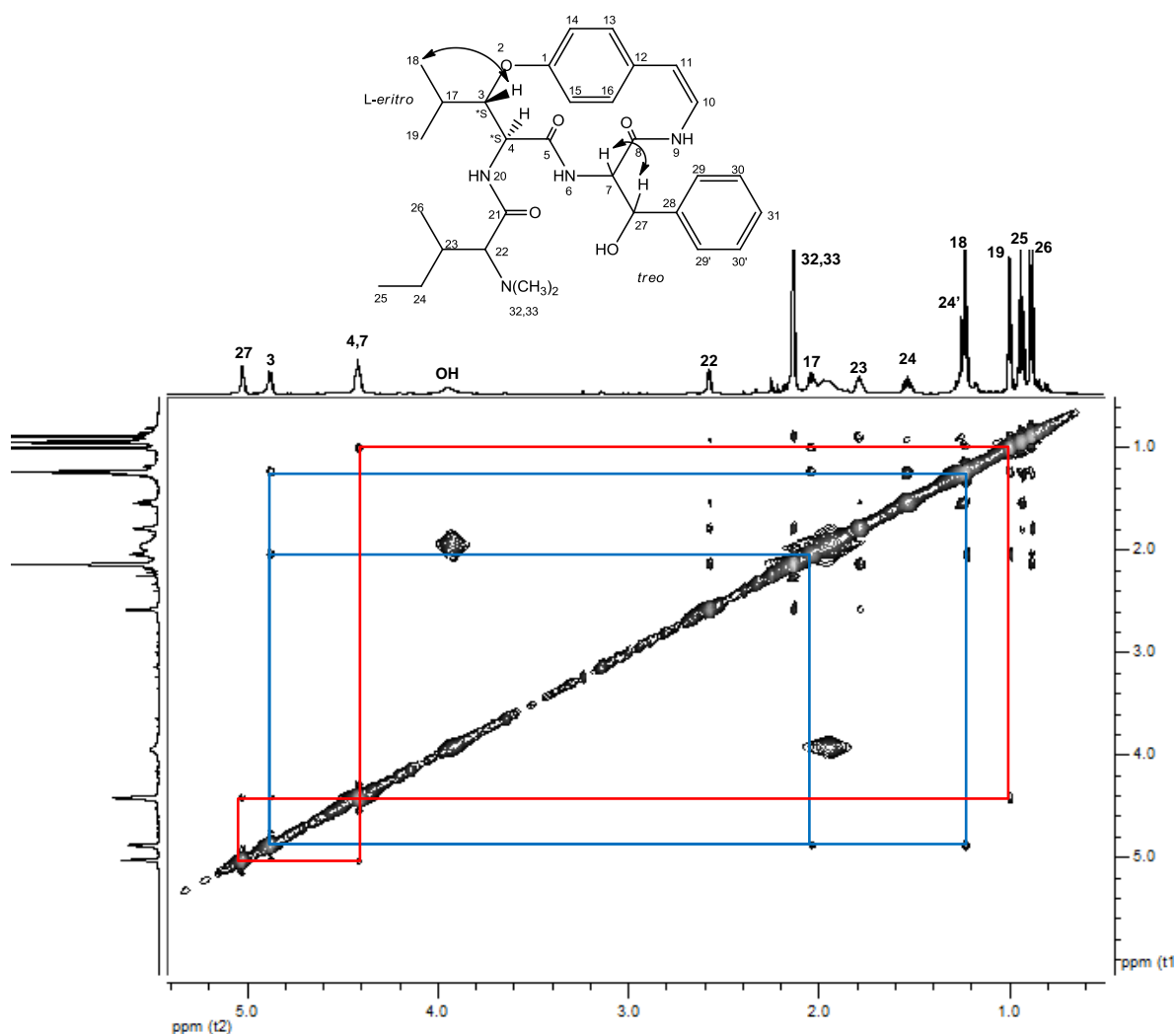


Figura 65 - Espectro de RMN 2D, NOESY, expandido (0,60-5,40 ppm) de P06, scutianina N (**37**), em  $CDCl_3$ , a 600,13 MHz.

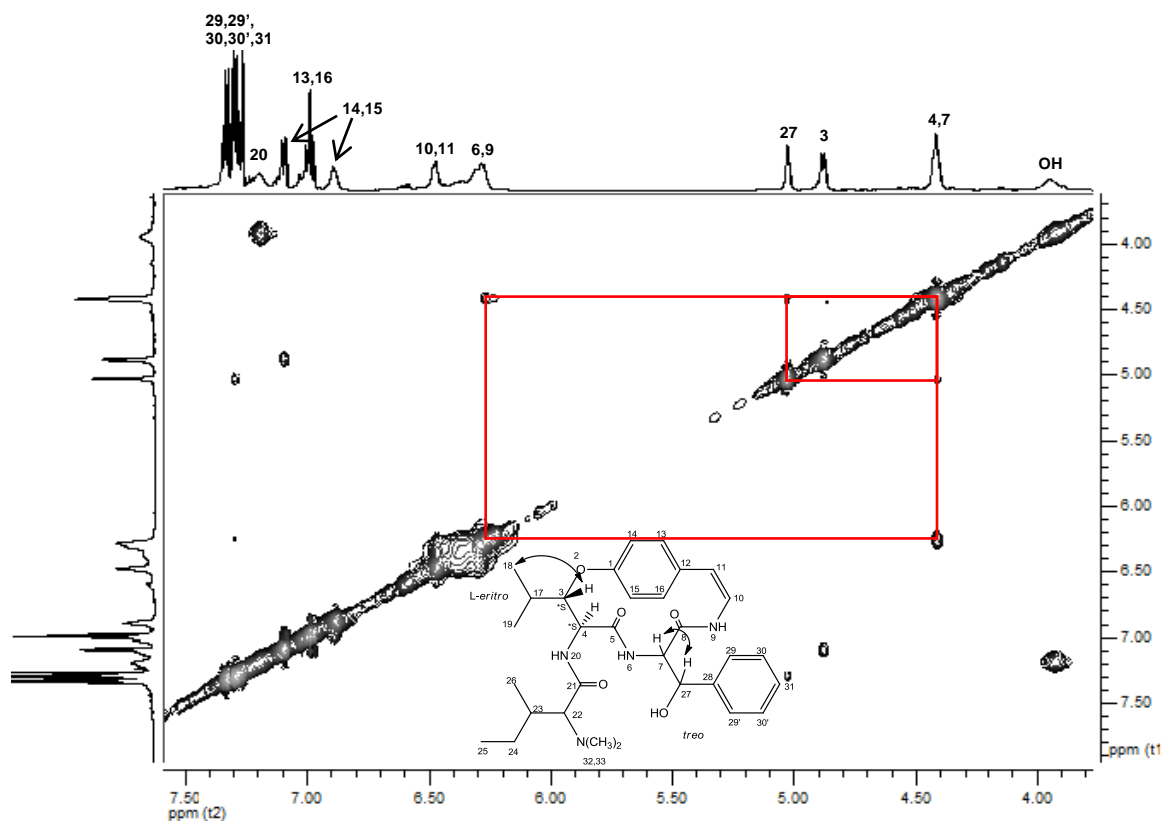
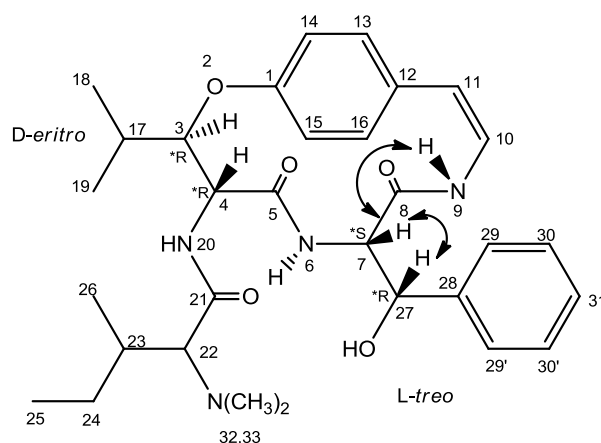


Figura 66 - Espectro de RMN 2D, NOESY, expandido (4,00-7,50 ppm) de P06, scutianina N (**37**), em  $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz.

### 5.3.2 Alcaloide P11, scutianina O (**38**)

O alcaloide P11 apresenta um  $J_{3,4}=7,8$  Hz, indicando configuração *eritro* para o  $\beta$ -hidroxiaminoácido. Pelos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  observam-se deslocamentos químicos de 88,31 ppm para o carbono C-3 e 54,00 ppm para o carbono C-4, o que indica configuração \*3R,\*4R (D-*eritro*- $\beta$ -hidroxileucina).

Scutianina O (**38**)

Pelo espectro de RMN bidimensional, NOESY, pode-se observar que não há correlação espacial entre os hidrogênios H-3 e H-4 da unidade  $\beta$ -hidroxileucina, indicando posição *anti* entre eles. Os hidrogênios H-7 e H-27 da unidade fenilserina apresentam correlação, indicando que estão no mesmo lado da estrutura, em posição *syn*. Também é possível observar correlação entre o H-7 e o hidrogênio amídico NH-9 (Figuras 67 e 68).

Como não há correlação entre os hidrogênios H-4 e NH-6, sugere-se que estes estão em lados opostos no plano. O mesmo acontece entre NH-6 e H-7. Levando em consideração estas observações e a correlação espacial existente entre H-7 e H-27, sugere-se uma configuração *L-treo* para a unidade fenilserina, \*7S,\*27R (*L-treo*-fenilserina).

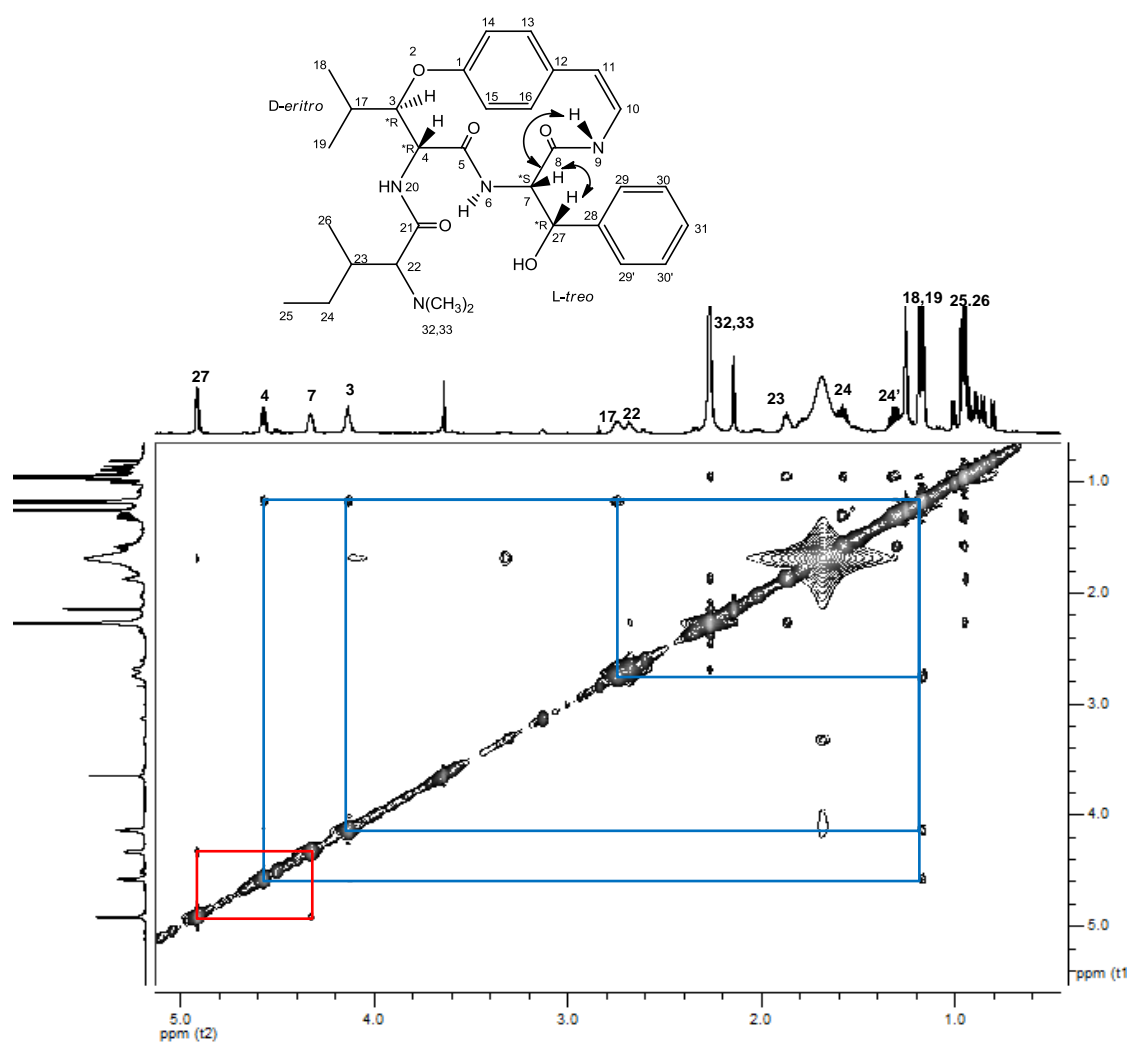


Figura 67 - Espectro de RMN 2D, NOESY, expandido (0,60-5,00 ppm) de P11, scutianina O (**38**), em  $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz.



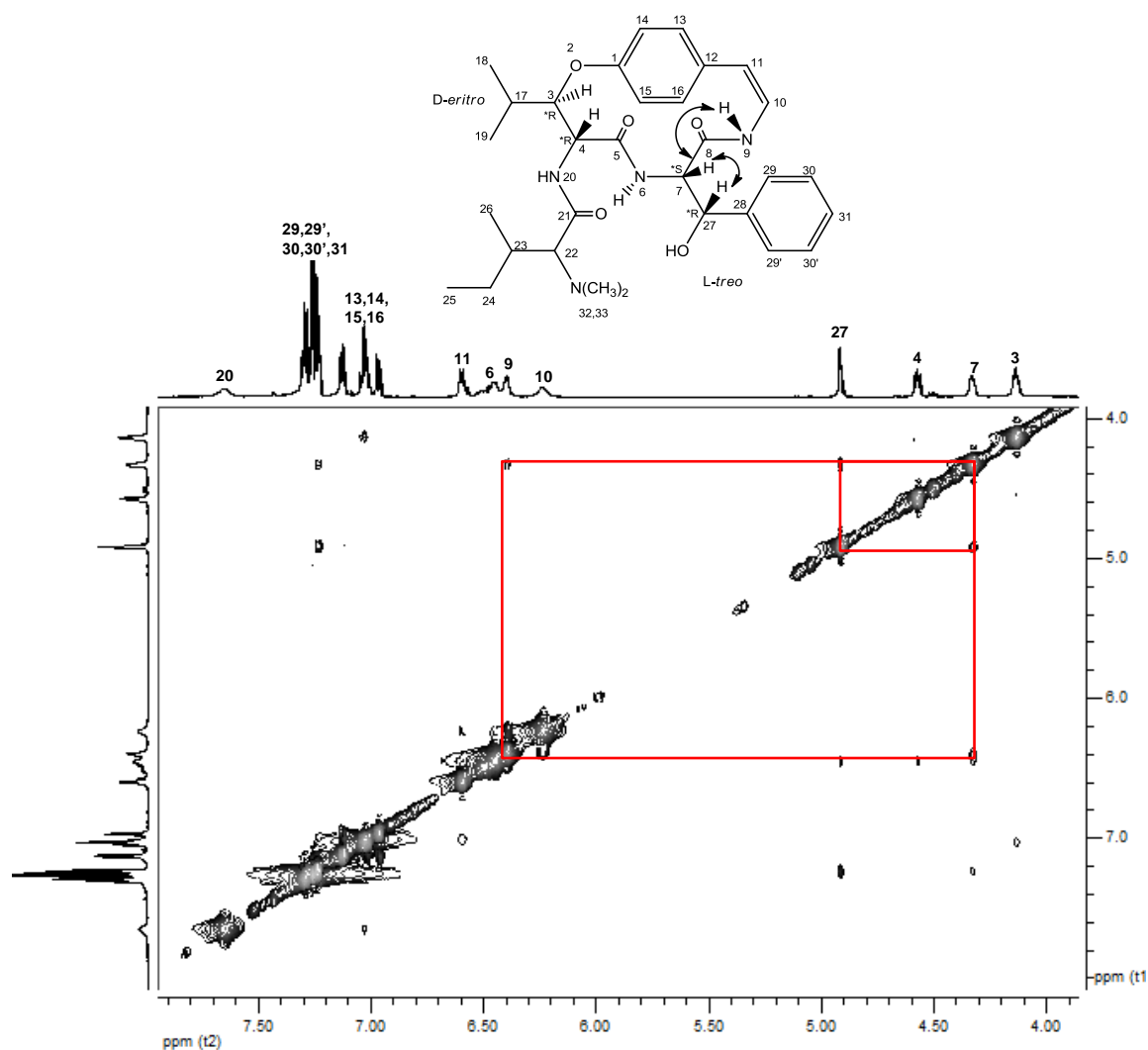
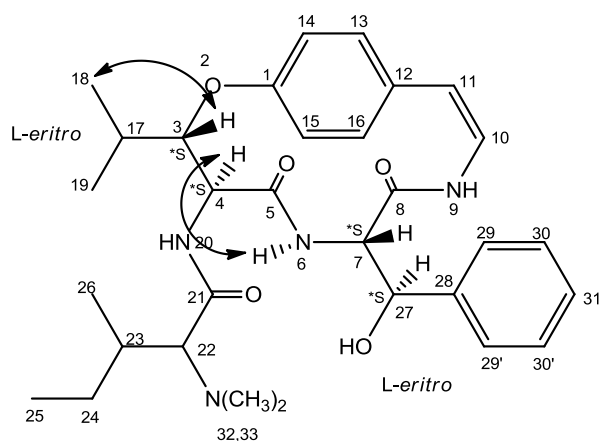


Figura 68 - Espectro de RMN 2D, NOESY, expandido (4,00-7,90 ppm) de P11, scutianina O (**38**), em  $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz.

### 5.3.3 Alcaloide P12, scutianina P (**39**)

O alcaloide P12 apresenta um  $J_{3,4}=7,8$  Hz, indicando configuração *eritro* para o  $\beta$ -hidroxiaminoácido. Pelos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  observam-se deslocamentos químicos de 81,43 e 55,38 ppm para C-3 e C-4, respectivamente, o que indica configuração  $^*3\text{S}, ^*4\text{S}$  (L-*eritro*- $\beta$ -hidroxileucina).

Scutianina P (**39**)

Pelo espectro de RMN bidimensional, NOESY (Figuras 69 e 70), pode-se observar que não há correlação espacial entre os hidrogênios H-3 e H-4 da unidade  $\beta$ -hidroxileucina, indicando que estão em lados opostos do plano, em posição *anti*. O H-3 apresenta correlação com os hidrogênios H-17 e H-18, enquanto o H-4 correlaciona com o H-19 e o NH-6, o que indica que estão em posição *syn*. Em relação à unidade fenilserina, não há correlação entre os hidrogênios H-7 e H-27, indicando uma relação *anti* entre eles, e considerando-se que não há correlação entre o hidrogênio amídico NH-6 e o H-7, sugere-se configuração *L-eritro* para a unidade fenilserina, \*7S,\*27S (*L-eritro*-fenilserina).

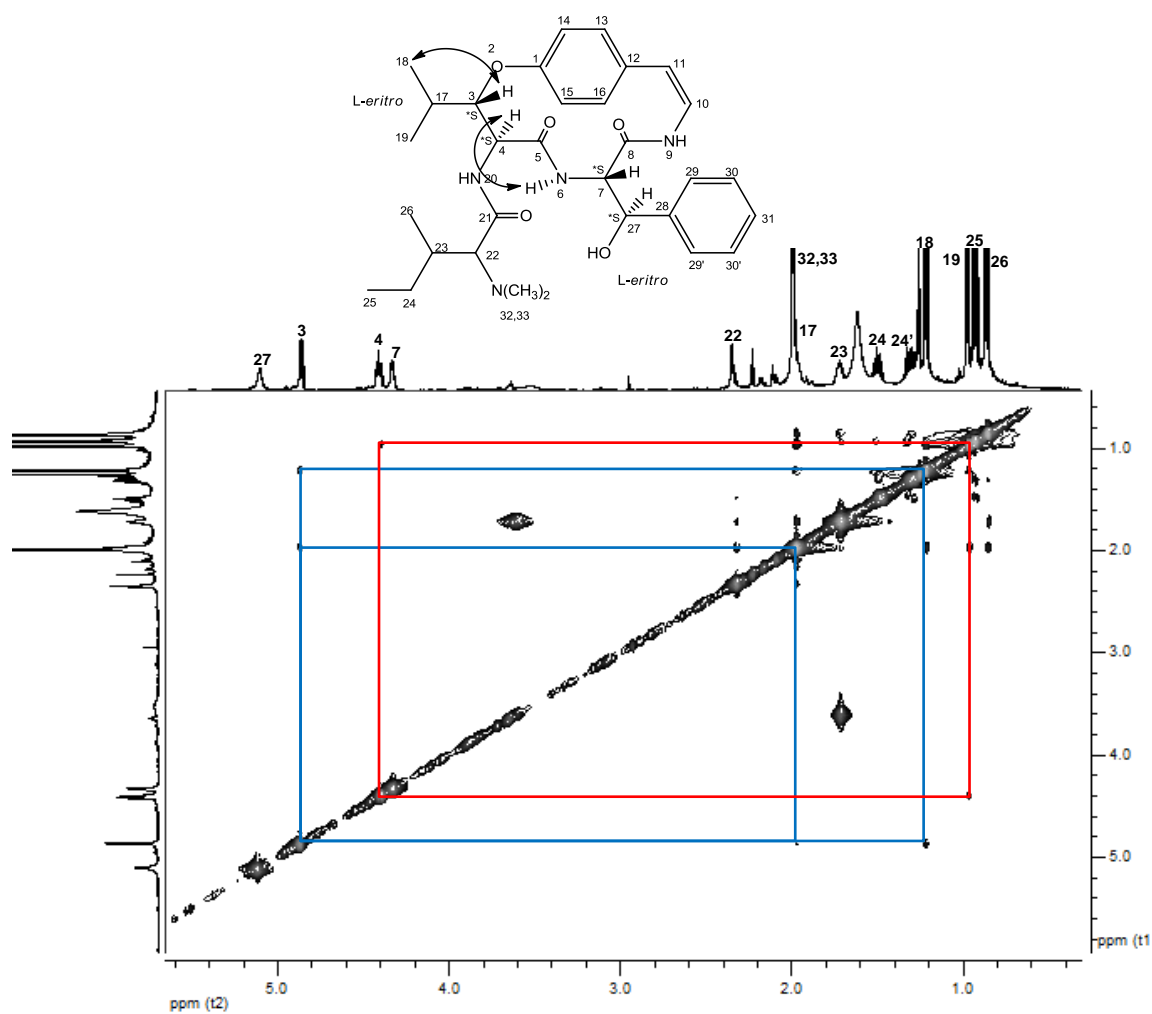


Figura 69 - Espectro de RMN 2D, NOESY, expandido (0,40-5,60 ppm) de P12, scutianina P (**39**), em  $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz.

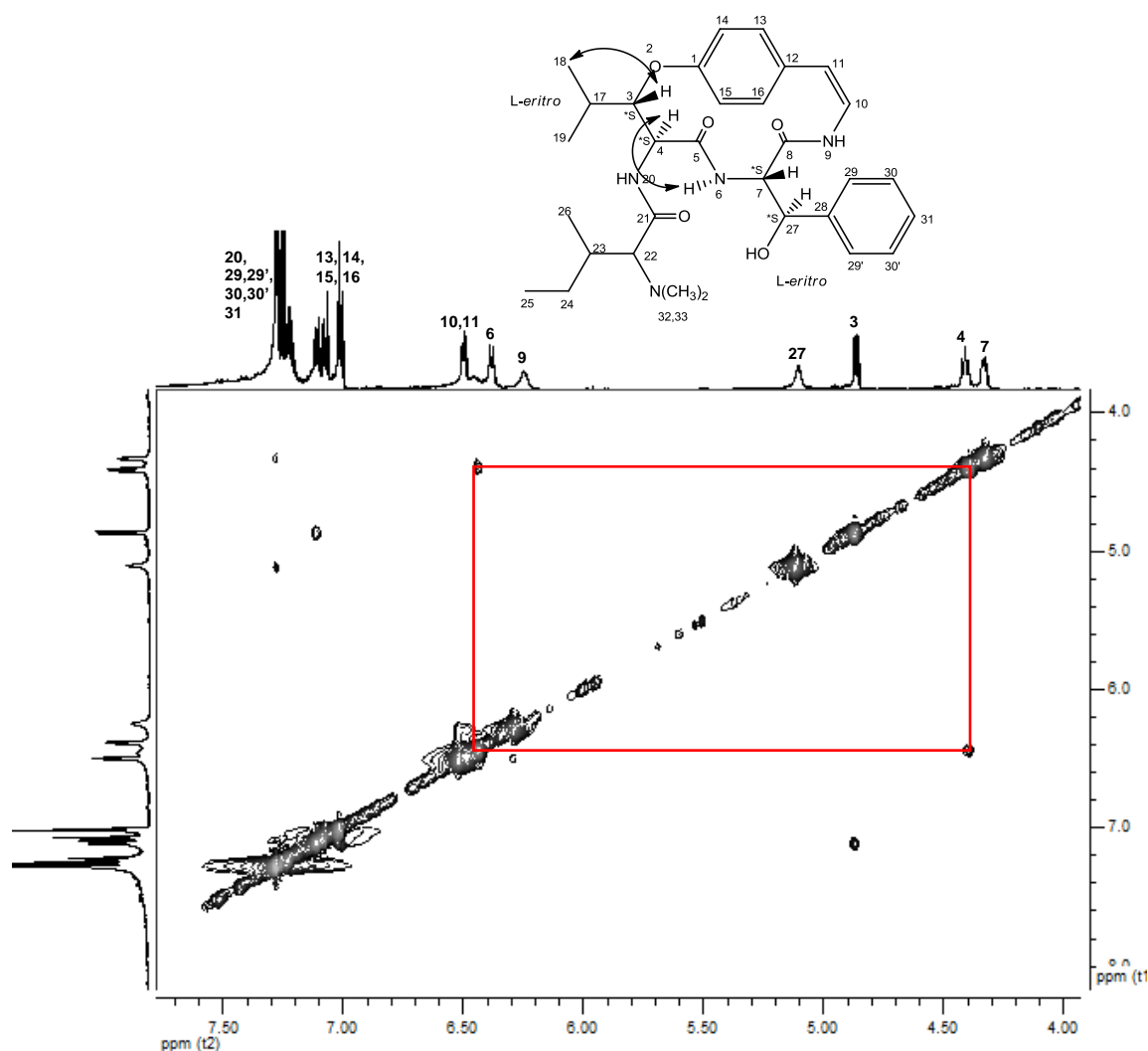


Figura 70 - Espectro de RMN 2D, NOESY, expandido (4,00-7,50 ppm) de P12, scutianina P (**39**), em  $\text{CDCl}_3$ , a 600,13 MHz.

Pelos dados espectrais analisados, observa-se que os alcaloides P06 e P12 possuem configuração *L-eritro* para unidade  $\beta$ -hidroxileucina, enquanto o alcaloide P11 possui configuração *D-eritro*. A configuração da unidade fenilserina foi sugerida, com base nos dados de NOESY. As correlações entre os hidrogênios H-7 e H-27 sugerem configuração *treo* para os compostos P06 ( $*7R, *27S$  *D-treo* ou  $*7S, *27R$  *L-treo*) e P11 ( $*7S, *27R$  *L-treo*). No composto P12, estes hidrogênios não apresentam correlação, sugerindo configuração *eritro* ( $*7S, *27S$  *L-eritro*).

#### 5.4 Atividade antimicrobiana

Com o objetivo de avaliar o potencial antimicrobiano da espécie *Scutia buxifolia*, o extrato bruto, as frações ácidas e básicas e os compostos isolados foram testados frente a microrganismos causadores de infecções. Para a realização do ensaio antimicrobiano, utilizou-se o método de microdiluição em caldo, conforme descrito na parte experimental (pág. 52 a 54).

A efetividade antimicrobiana foi descrita em termos da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração letal mínima (CLM). Os resultados obtidos para o extrato bruto e as frações ácidas e básicas de *Scutia buxifolia* são apresentados nas Tabelas 12 e 13.

O extrato bruto (EB) apresentou CIM de  $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$  frente a todas as bactérias testadas, com exceção de *Morganella morganii*, quando a CIM foi mais satisfatória, de  $62,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . O EB apresentou CLM de  $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$  frente à *Bacillus subtilis* e *Morganella morganii* e de  $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$  frente à *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* e *Shigella sonnei*.

A fração hexânica ácida (FHA) mostrou-se mais eficiente frente à *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Burkholderia cepacia* e *Shigella sonnei*, com CIM de  $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Para as demais bactérias testadas, apresentou uma CIM de  $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Apresentou CLM apenas para *Morganella morganii* ( $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e *Escherichia coli* ( $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

A fração etérea ácida (FEA) mostrou-se mais ativa frente à *Morganella morganii*, com CIM de  $62,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Para as demais bactérias apresentou CIM de  $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , com exceção de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (CIM =  $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Esta fração apresentou CLM de  $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$  frente à *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* e *Shigella sonnei*.

Para a fração etérea básica (FEB), o melhor resultado foi observado frente à *Morganella morganii* (CIM =  $62,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Para as demais bactérias, a CIM foi de  $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , excetuando-se *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, em que a CIM foi de  $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . A FEB apresentou CLM de  $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$  frente à *Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus*.

A fração acetato básica (FAB) mostrou-se ativa frente a todas as cepas gram-positivas e gram-negativas testadas, com uma CIM variando de  $62,5$  a

250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . O melhor resultado foi frente à *Morganella morganii* (62,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Esta fração apresentou CLM de 250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  frente à *Morganella morganii* e de 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  frente à *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* e *Shigella sonnei*.

Em relação aos fungos, tanto o extrato bruto quanto as frações ácidas e básicas demonstraram potencial antifúngico, com concentrações inibitórias mínimas entre 125 e 250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Neste sentido, destacaram-se as frações hexânica ácida e acetato básica com CIM de 125  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  frente a todos os fungos testados. O EB e a FHA apresentaram CLM de 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  frente à *Candida krusei* e *Cryptococcus neoformans*. A FEA apresentou CLM frente à *Candida parapsilosis* (500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e a FEB frente à *Candida tropicalis* (500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). A FAB apresentou CLM de 250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  frente à *Cryptococcus neoformans* e de 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  frente à *Candida tropicalis*.

Tabela 12 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) do extrato bruto e frações ácidas e básicas da espécie *Scutia buxifolia*, frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas, em  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Microrganismos	Substâncias															
	EB		FHA		FEA		FEB		FAB		Ampicilina <sup>b</sup>		Azitromicina <sup>b</sup>		Levofloxacina <sup>b</sup>	
	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM
<b>Gram-positivos<sup>a</sup></b>																
<i>Staphylococcus aureus</i>	125	>500	250	>500	250	>500	250	>500	125	>500	0,77	50	0,77	50	0,77	0,77
<i>Bacillus subtilis</i>	125	250	125	>500	125	500	125	500	250	>500	0,77	50	0,77	0,77	0,77	0,77
<i>Bacillus cereus</i>	125	500	125	>500	125	500	125	500	125	500	50	50	1,55	1,55	0,77	0,77
<i>Enterococcus spp.</i>	125	>500	250	>500	125	>500	125	>500	125	>500	25	50	1,55	6,2	0,77	0,77
<b>Gram-negativos<sup>a</sup></b>																
<i>Escherichia coli</i>	125	500	250	500	250	500	250	>500	250	500	3,1	25	1,55	3,1	0,77	0,77
<i>Burkholderia cepacia</i>	125	>500	125	>500	125	>500	125	>500	250	>500	50	50	1,55	3,1	0,77	0,77
<i>Shigella sonnei</i>	125	500	125	>500	125	500	125	>500	125	500	25	50	3,1	3,1	0,77	0,77
<i>Salmonella typhimurium</i>	125	>500	250	>500	125	>500	125	>500	125	>500	0,77	0,77	3,1	6,2	0,77	0,77
<i>Morganella morganii</i>	62,5	250	250	250	62,5	>500	62,5	>500	62,5	250	0,77	6,2	3,1	6,2	0,77	0,77

<sup>a</sup> ATCC (American Type Culture Collection)

<sup>b</sup> Padrão

EB=extrato bruto, FHA=fração hexânica ácida, FEA=fração etérea ácida, FEB= fração etérea básica, FAB=fração acetato básica

Tabela 13 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) do extrato bruto e frações ácidas e básicas da espécie *Scutia buxifolia*, frente a fungos, em  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Microrganismos	Substâncias											
	EB		FHA		FEA		FEB		FAB		Nistatina <sup>b</sup>	
	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM
<b>Fungos<sup>a</sup></b>												
<i>Candida albicans</i>	125	>500	125	>500	125	>500	125	>500	125	>500	0,77	1,52
<i>Candida tropicalis</i>	250	>500	125	>500	250	>500	125	500	125	500	0,77	1,52
<i>Candida krusei</i>	125	500	125	500	250	>500	250	>500	125	>500	0,77	1,52
<i>Candida parapsilosis</i>	250	>500	125	>500	250	500	250	>500	125	>500	1,52	3,1
<i>Cryptococcus neoformans</i>	125	500	125	500	250	>500	250	>500	125	250	0,77	3,1

<sup>a</sup> ATCC (American Type Culture Collection)

<sup>b</sup> Padrão

EB=extrato bruto, FHA=fração hexânica ácida, FEA=fração etérea ácida, FEB= fração etérea básica, FAB=fração acetato básica



Na Tabela 14 são apresentados os valores de CIM e CLM, frente a bactérias e fungos, obtidos para os compostos isolados de *Scutia buxifolia*.

O composto P02, scutianina C (**14**), mostrou-se ativo contra cepas gram-positivas e gram-negativas com CIM variando de 50 a 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Os melhores resultados (50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) foram verificados frente à *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Burkholderia cepacia*, *Shigella sonnei* e *Morganella morganii*. O alcaloide apresentou CLM de 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  frente à *Morganella morganii* e 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  frente à *Escherichia coli* e *Shigella sonnei*. Quanto ao potencial antifúngico, mostrou-se eficiente apenas contra *Candida tropicalis* e *Cryptococcus neoformans* com CIM de 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e CLM de 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  frente à *Candida tropicalis*.

O composto P06, scutianina N (**37**), apresentou potencial antimicrobiano e antifúngico frente a todas as cepas testadas, com CIM de 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  frente a todos os microrganismos, com exceção de *Enterococcus* spp., *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e *Candida parapsilosis*, quando a CIM foi de 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Apresentou CLM de 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  frente à *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Shigella sonnei*, *Morganella morganii*, *Escherichia coli*, *Candida krusei* e *Cryptococcus neoformans*.

O alcaloide P11, scutianina O (**38**), exibiu maior potencial antimicrobiano frente à *Morganella morganii* (CIM = 25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Para as demais bactérias, a CIM foi de 50 ou 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Apresentou CLM de 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  frente a *Bacillus subtilis*, *Shigella sonnei* e *Morganella morganii*. Em relação aos fungos, os melhores resultados foram verificados frente à *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* e *Cryptococcus neoformans* (CIM = 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Apresentou CLM apenas frente à *Candida parapsilosis* (100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

Scutianina P (**39**), codificada como P12, mostrou maior eficiência frente à *Morganella morganii* (CIM = 25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Para as demais bactérias testadas, a CIM foi de 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , com exceção de *Enterococcus* spp. e *Escherichia coli* (CIM = 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Este composto apresentou CLM de 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* e *Morganella morganii*. Em relação aos fungos testados, os melhores resultados foram obtidos frente à *Candida tropicalis* e *Cryptococcus neoformans* (CIM = 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Para os demais, a CIM foi de 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Observou-se CLM de 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  frente a *Candida tropicalis* e *Cryptococcus neoformans*.

Tabela 14 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) dos compostos isolados de *Scutia buxifolia*, frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas e fungos, em  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Microrganismos	Substâncias															
	P02		P06		P11		P12		Ampilicina <sup>b</sup>		Azitromicina <sup>b</sup>		Levofloxacina <sup>b</sup>		Nistatina <sup>c</sup>	
	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM
<b>Gram-positivos<sup>a</sup></b>																
<i>Staphylococcus aureus</i>	100	>100	50	>100	50	>100	50	>100	0,77	50	0,77	50	0,77	0,77	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	50	>100	50	100	50	100	50	100	0,77	50	0,77	0,77	0,77	0,77	0,77	-
<i>Bacillus cereus</i>	50	>100	50	100	50	>100	50	100	50	50	1,55	1,55	0,77	0,77	-	-
<i>Enterococcus spp.</i>	100	>100	100	>100	100	>100	100	>100	25	50	1,55	6,2	0,77	0,77	-	-
<b>Gram-negativos<sup>a</sup></b>																
<i>Escherichia coli</i>	100	100	100	100	100	>100	100	>100	3,1	25	1,55	3,1	0,77	0,77	-	-
<i>Burkholderia cepacia</i>	50	>100	50	>100	50	>100	50	>100	50	50	1,55	3,1	0,77	0,77	-	-
<i>Shigella sonnei</i>	50	100	50	100	50	100	50	>100	25	50	3,1	3,1	0,77	0,77	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	100	>100	100	>100	100	>100	50	>100	0,77	0,77	3,1	6,2	0,77	0,77	-	-
<i>Morganella morganii</i>	50	50	50	100	25	100	25	100	0,77	6,2	3,1	6,2	0,77	0,77	-	-
<b>Fungos<sup>a</sup></b>																
<i>Candida albicans</i>	>100	-	50	>100	100	>100	100	>100	-	-	-	-	-	0,77	1,52	-
<i>Candida tropicalis</i>	100	100	50	>100	50	>100	50	100	-	-	-	-	-	0,77	1,52	-
<i>Candida krusei</i>	>100	-	50	100	100	>100	100	>100	-	-	-	-	-	0,77	1,52	-
<i>Candida parapsilosis</i>	>100	-	100	>100	50	100	100	>100	-	-	-	-	-	1,52	3,1	-
<i>Cryptococcus neoformans</i>	100	>100	50	100	50	>100	50	100	-	-	-	-	-	0,77	3,1	-

<sup>a</sup> ATCC (American Type Culture Collection)

<sup>b</sup> Padrão para bactérias

<sup>c</sup> Padrão para fungos

P02=scutianina C (14), P06=scutianiana N (37), P11=scutianina O (38), P12=scutianina P (39)

## 6. CONCLUSÃO

O estudo fitoquímico das cascas do caule da espécie *Scutia buxifolia* (Rhamnaceae) levou ao isolamento e elucidação estrutural de quatro alcaloides ciclopeptídicos: scutianina C (**14**) e três diastereoisômeros de scutianina H (**19**), denominados scutianinas -N (**37**), -O (**38**) e -P (**39**). As estruturas dos compostos foram elucidadas com base em dados espectrais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  uni e bidimensionais e espectrometria de massas de alta resolução.

Os compostos **37-39** apresentam estruturas diastereoisoméricas, diferindo nas configurações dos carbonos quirais C-3 e C-4 da unidade  $\beta$ -hidroxiaminoácido ( $\beta$ -hidroxileucina) e C-7 e C-27 da unidade  $\alpha$ -aminoácido do macrociclo (fenilserina).

As estereoquímicas relativas e/ou absolutas foram determinadas ou sugeridas pelos dados espectrais de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e NOESY. Pelos deslocamentos químicos ( $\delta$ ) e constantes de acoplamento ( $J$ ) dos centros estereogênicos C-3 e C-4, determinou-se a configuração da unidade  $\beta$ -hidroxileucina, sendo  $^*3\text{S},^*4\text{S}$  (L-*eritro*- $\beta$ -hidroxileucina) para os compostos **37** e **39** e  $^*3\text{R},^*4\text{R}$  (D-*eritro*- $\beta$ -hidroxileucina) para o composto **38**. Pela análise das correlações nos espectros de NOESY sugeriu-se a configuração da unidade fenilserina. Para scutianina N (**37**) sugeriu-se configuração *treo*, podendo ser  $^*7\text{R},^*27\text{S}$  (D-*treo*-fenilserina) ou  $^*7\text{S},^*27\text{R}$  (L-*treo*-fenilserina). Para scutianina O (**38**) sugeriu-se configuração  $^*7\text{S},^*27\text{R}$  (L-*treo*-fenilserina) e para scutianina P (**39**), configuração  $^*7\text{S},^*27\text{S}$  (L-*eritro*-fenilserina).

O potencial antimicrobiano do extrato bruto, das frações ácidas e básicas e dos compostos isolados foi testado pelo método de microdiluição em caldo. Todas as amostras apresentaram atividade antimicrobiana. O extrato bruto mostrou-se mais ativo frente às bactérias e as frações hexânica ácida e acetato básica frente aos fungos testados. Dos compostos isolados, scutianinas -O e -P apresentaram melhor atividade frente à bactéria gram-negativa *Morganella morganii*. Em relação aos demais microrganismos testados, os compostos isolados apresentaram potencial antimicrobiano semelhante.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. RATES, S. M. K. **Plants as source of drugs**. *Toxicon*, 39, 603-613, 2001.
2. SIMÕES, C. M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 3ª ed., Porto Alegre/ Florianópolis, Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2001.
3. CALIXTO, J. B. **Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents)**. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 33, 2, 179-189, 2000.
4. SOEJARTO, D. D. **Biodiversity prospecting and benefit-sharing: perspectives from the field**. *J. Ethnopharmacol.*, 51, 1-15, 1996.
5. VENDRUSCOLO, G. S.; MENTZ, L. A. **Levantamento etnobotânico das plantas utilizadas como medicinais por moradores do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil**. *Sér. Bot.*, 61, 1-2, 83-103, 2006.
6. PORTAL BRASIL. **Brasil lança formulário nacional de fitoterápicos**. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br>>. Acesso em 19 de janeiro de 2014.
7. LOGUERCIO, A. P.; BATTISTIN, A.; VARGAS, A. C.; HENZEL, A.; WITT, N. M. **Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells)**. *Cienc. Rural*, 35, 2, 371-376, 2005.
8. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Pampa**. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br>>. Acesso em 19 de janeiro de 2014.
9. MENEZES, A. S.; MOSTARDEIRO, M. A.; ZANATTA, N.; MOREL, A. F. **Scutianine-J, a cyclopeptidic alkaloid isolated from *Scutia buxifolia***. *Phytochem.* 38, 3, 783-786, 1995.
10. TREVISAN, G.; MALDANER, G.; VELLOSO, N. A.; SANT'ANNA, G. S.; ILHA, V.; GEWEHR, C. C. V.; RUBIN, M. A.; MOREL, A. F.; FERREIRA, J. **Antinociceptive effects of 14-membered cyclopeptide alkaloids**. *J. Nat. Prod.*, 72, 608-612, 2009.

11. GIACOMELLI, S. R. **Estudo fitoquímico de *Discaria americana* Gill & Hook.** 2000. 148 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2000.
12. SILVA, R. C. V. A. F.; CRESTANI, S.; SOUZA, P.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; SANTOS, A. R. S.; MARQUES, M. C. A.; KASSUYA, C. A. L.; SANTOS, J. E. S. **Endothelium-dependent and independent vasorelaxation induced by an n-butanolic fraction of bark of *Scutia buxifolia* Reiss (Rhamnaceae).** *J. Ethnopharmacol.*, 141, 997-1004, 2012.
13. MALDANER, G. **Estudo dos metabólitos secundários de *Condalia buxifolia* e *Scutia buxifolia* e suas atividades antimicrobianas.** 2005. 96 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.
14. BOLIGON, A. A.; FELTRIN, A. C.; JANOVIK, V.; FROHLICH, J. K.; ATHAYDE, M. L. **Estudo fitoquímico das cascas do tronco de *Scutia buxifolia* Reissek.** *Saúde*, 35, 2, 4-6, 2009.
15. GIACOMELLI, S. R. **Estudo fitoquímico de três espécies pertencentes à família Rhamnaceae: *Discaria americana*, *Colletia paradoxa* e *Gouania ulmifolia*.** 2005. 333 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.
16. SANTOS, S. R. dos **Estudo anatômico do lenho e descrição morfológica de cinco espécies sul-rio-grandenses da família Rhamnaceae.** 2008. 121 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.
17. MISSAU, F. C. **Estudo fitoquímico e determinação da atividade antimicrobiana de alcaloides ciclopeptídicos isolados de *Scutia buxifolia* Reiss.** 2003. 88 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2003.
18. BOLIGON, A. A.; SAGRILLO, M. R.; MACHADO L. F.; FILHO, O. S.; MACHADO, M. M.; CRUZ, I. B. M.; ATHAYDE, M. L. **Protective effects of extracts and flavonoids isolated from *Scutia buxifolia* Reissek against chromosome damage in human lymphocytes exposed to hydrogen peroxide.** *Molecules*, 17, 5757-5769, 2012.

19. MALDANER, G. **Estudo dos metabólitos secundários de *Scutia buxifolia* e suas atividades biológicas**. 2010. 202 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.
20. PLANTAS QUE CURAM. **Coronilha**. Disponível em: <<http://www.plantasquecuram.com.br>>. ficha Acesso em 19 de janeiro de 2014.
21. CARO, M. S. B.; OLIVEIRA, L. H.; ILHA, V.; BURROW, R. A.; DALCOL, I. I.; MOREL A. F. **Absolute configuration of franganine**. *J. Nat. Prod.*, 75, 1220-1222, 2012.
22. MOSTARDEIRO, M. A.; ILHA, V.; DAHMER, J.; CARO, M. S. B.; DALCOL, I. I.; SILVA, U. F.; MOREL, A. F. **Cyclopeptide alkaloids: stereochemistry and synthesis of the precursors of discarine C, D and myriantine A**. *J. Nat. Prod.*, 76, 1343-1350, 2013.
23. TAN, N. H.; ZHOU, J. **Plant cyclopeptides**. *Chem. Rev.*, 106, 840-895, 2006.
24. HAN, B. H.; PARK, M. H.; PARK, J. H. **Chemical and pharmacological studies on sedative cyclopeptide alkaloids in some Rhamnaceae plants**. *Pure Appl. Chem.*, 61, 3, 443-448, 1989.
25. GOURNELIS, D. C.; LASKARIS, G. G.; VERPOORTE, R. **Cyclopeptide alkaloids**. *Nat. Prod. Rep.*, 14, 75-82, 1997.
26. JOULLIÉ, M. M.; RICHARD, D. J. **Cyclopeptide alkaloids: chemistry and biology**. *Chem. Commun.*, 18, 2011-2015, 2004.
27. EL-SEEDI, H. R.; ZAHRA, M. H.; GORANSSON, U.; VERPOORTE, R. **Cyclopeptide alkaloids**. *Phytochem. Rev.*, 6, 143-165, 2007.
28. TSCHESCHE, R.; AMMERMANN, E.; FEHLHABER, H. W. **Alkaloids from Rhamnaceae. X. Scutianine B, an additional peptide alkaloid from *Scutia buxifolia***. *Tetrahedron Lett.*, 46, 4405-4400, 1971.
29. MERKUZA, V. M.; SIERRA, M. G.; MASCARETTI, O. A.; RUVEDA, E. A.; CHANG, C. J.; WENKERT, E. **Peptide alkaloids of *Discaria longispina* and *Scutia buxifolia***. *Phytochem.*, 13, 1279-1282, 1974.

30. SIERRA, M. G.; MASCARETTI, O. A.; MERKUZA, V. M.; TOSTI, E. L.; RUVEDA, E. A.; CHANG, C. J. **Peptide alkaloids of *Scutia buxifolia***. *Phytochem.*, 13, 2865-2869, 1974.
31. TSCHESCHE, R.; AMMERMANN, E. **Alkaloids from Rhamnaceae. XXIII. Scutianine C, D, and E, three further cyclopeptide alkaloids from *Scutia buxifolia***. *Chem. Ber.*, 107, 7, 2274-2283, 1974.
32. MOREL, A. F.; BRAVO, R. V. F.; REIS, F. A. M.; RUVEDA, E. A. **Peptide alkaloids of *Scutia buxifolia***. *Phytochem.*, 18, 473-477, 1979.
33. TSCHESCHE, R.; HILLEBRAND, D.; WILHELM, H.; AMMERNNAN, E.; ECKHARDT, G. **Hysodricanin-A, mauritin-H, scutianin-F und aralionin-C, vier weitere cyclopeptidalkaloide aus *Ziziphus*, *Scutia* und *Araliorhamnus***. *Phytochem.*, 16, 1025-1028, 1977.
34. TSCHESCHE, R.; HILLEBRAND, D. **Scutianin-G, ein weiteres cyclopeptidalkaloid aus *Scutia buxifolia***. *Phytochem.*, 16, 1817-1818, 1977.
35. MOREL, A. F.; MACHADO, E. C. S.; MOREIRA, J. J.; MENEZES, A. S.; MOSTARDEIRO, M. A.; ZANATTA, N.; WESSJOHANN, L. A. **Cyclopeptide alkaloids of *Scutia buxifolia***. *Phytochem.*, 47, 1, 125-129, 1998.
36. MOREL, A. F.; MALDANER, G.; ILHA, V.; MISSAU, F.; SILVA, U. F.; DALCOL, I. I. **Cyclopeptide alkaloids from *Scutia buxifolia* Reiss and their antimicrobial activity**. *Phytochem.*, 66, 2571-2576, 2005.
37. MOREL, A. F.; MALDANER, G.; ILHA, V. **Cyclopeptide alkaloids from higher plants**. *Alkaloids Chem. Biol.*, 67, 79-141, 2009.
38. MALDANER, G.; MARANGON, P.; ILHA, V.; CARO, M. S. B.; BURROW, R. A.; DALCOL, I. I.; MOREL, A. F. **Cyclopeptide alkaloids from *Scutia buxifolia* Reiss**. *Phytochem.*, 72, 804-809, 2011.
39. ABU-ZARGA, M.; SABRI, S.; AL-ABOUDI, A.; AJAZ, M. S.; SULTANA, N.; RAHMAN, A. **New cyclopeptide alkaloids from *Ziziphus lotus***. *J. Nat. Prod.*, 58, 4, 504-511, 1995.

40. GIACOMELLI, S. R.; MISSAU, F. C.; MOSTARDEIRO, M. A.; SILVA, U. F.; DALCOL, I. I.; ZANATTA, N.; MOREL, A. F. **Cyclopeptides from the Bark of *Discaria americana***. *J. Nat. Prod.*, 64, 997-999, 2001.
41. GIACOMELLI, S. R.; MALDANER, G.; GONZAGA, W. A.; GARCIA, C. M.; SILVA, U. F.; DALCOL, I. I.; MOREL, A. F. **Cyclic peptide alkaloids from the bark of *Discaria americana***. *Phytochem.*, 65, 933-937, 2004.
42. OLIVEIRA, P. L.; TANAKA, C. M. A.; KATO, L.; SILVA, C. C.; MEDINA, R. P.; MORAES, A. P.; SABINO, J. R.; OLIVEIRA, C. M. A. **Amaiouine, a cyclopeptide alkaloid from the leaves of *Amaioua guianensis***. *J. Nat. Prod.*, 72, 1195-1197, 2009.
43. ZHANG, Y.; TANG, C.; SOB, S. V. T.; KE, C.; YE, Y. **Two New Cyclopeptides from *Podocarpus nagi***. *Chin. J. Chem.*, 30, 1361-1364, 2012.
44. DIAS, G. C. D.; GRESSLER, V.; HOENZEL, S. C. S. M.; SILVA, U. F.; DALCOL, I. I.; MOREL, A. F. **Constituents of the roots of *Melochia chamaedrys***. *Phytochem.*, 68, 668-672, 2007.
45. SILVA, U. F.; CARDOSO, C. D.; ZANATTA, N.; MOREL, A. F.; ICHELN, D.; GEHRCKE, B. **Determination of the stereochemistry of the N,N-dimethyl amino acid and the  $\alpha$ -amino acid residue of peptide alkaloids by chiral gas chromatography**. *Phytochem. Anal.*, 7, 20-23, 1996.
46. STÜKER, C. Z. **Estudo dos óleos voláteis de plantas medicinais da família Asteraceae do Rio Grande do Sul: *Baccharidastrum triplinervium*, *Baccaris pentodonta*, *Pulchea sagittalis* e *Eupatorium buniifolium***. 2007. 106 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.
47. OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. **Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais**. *Rev. Bras. Farmacogn.*, 18, 2, 301-307, 2008.
48. WILLIAMS, J. E. **Review of antiviral and immunomodulating properties of plants of the peruvian rainforest with a particular emphasis on una de gato and sangre de grado**. *Altern. Med. Rev.*, 6, 6, 567-579, 2001.



49. COWAN, M. M. **Plant products as antimicrobial agents.** *Clin. Microbiol. Rev.*, 12, 4, 564-582, 1999.
50. SEJAS, L. M.; SILBERT, S.; REIS, A. O.; SADER, H. S. **Avaliação da qualidade dos discos com antimicrobianos para testes de disco-difusão disponíveis comercialmente no Brasil.** *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, 39,1, 27-35, 2003.
51. DEVIENNE, K. F.; RADDI, M. S. G. **Screening for antimicrobial activity of natural products using a microplate photometer.** *Braz. J. Microbiol.*, 33, 166-168, 2002.
52. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard.** 7th ed., CLSI document M7-A7, Wayne, PA, 2006.
53. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard.** 2nd ed., CLSI document M27-A2, Wayne, PA, 2002.