



UFSM

Dissertação de Mestrado

**ALCALÓIDES CICLOPEPTÍDICOS DA ESPÉCIE
Discaria americana GILLES AND HOOKER:
ESTEREOQUÍMICA E ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA**

Janice Dahmer

PROGRAMA DE PÓS GRADUÇÃO DE QUÍMICA

Santa Maria, RS, Brasil

2013

JANICE DAHMER

ALCALÓIDES CICLOPEPTÍDICOS DA ESPÉCIE *Discaria americana* GILLES AND HOOKER: ESTEREOQUÍMICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós Graduação de Química da Universidade Federal de Santa Maria como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Química**.

Orientador: Ademir Farias Morel

Santa Maria, RS, Brasil
2013

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Departamento de Química
Programa de Pós Graduação

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

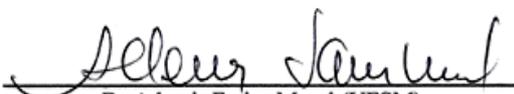
**ALCALÓIDES CICLOPEPTÍDICOS DA ESPÉCIE *Discaria
americana* GILLES AND HOOKER: ESTEREOQUÍMICA E
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

elaborado por

Janice Dahmer

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Química

COMISSÃO EXAMINADORA:


Dr Ademir Farias Morel (UFSM)
Presidente/Orientador


Dr^a Graciela Maldaner (URCAMP)
Primeiro Membro


Dr Miguel Soriano Balbarda Caro (UFSC)
Segundo Membro

Santa Maria, 02 de Agosto de 2013.

A Ademar, Noeli, Jordana e Fabiano; por tudo aquilo que só nós sabemos.

AGRADECIMENTOS

Muito obrigado ao professor e amigo Ademir Farias Morel, pelas preciosas orientações, pela atenção, pela disponibilidade e por saber reconhecer e aceitar o meu tempo para o cumprimento de cada etapa deste trabalho. Mas, sobretudo, muito obrigado pela confiança em mim depositada.

Muito obrigado ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pelo suporte financeiro.

Muito obrigada a Andréia, Doti, Karine, Gabi Scapin, Gabi do Carmo, Laura, Michele, Patrícia, Tatá, e Tanize, pela amizade.

Agradeço aos colegas de NPPN, Lizi, Matheus, Adri, Lu, Marcelo Pedroso pela convivência e amizade.

Agradeço a Alexandre Tiburski Neto pela realização das atividades antimicrobianas e ao Marcelo pelos RMNs. Aos dois pela ajuda nas coletas.

Muito obrigado aos meus pais, Ademar Albino Dahmer e Noeli Dahmer, por não medirem esforços em sua dedicação a mim e a minha irmã, para que tenhamos uma vida melhor.

Muito obrigado ao Fabiano Rocha Flores, por estar sempre ao meu lado, por ter me dado força nos momentos difíceis, através de seu apoio, das palavras de incentivo. Também por ter me ajudado nas coletas.

“Recomeçar... Não importa onde você parou... em que momento da vida você cansou... o que importa é que sempre é possível e necessário “Recomeçar”. Recomeçar é dar uma nova chance a si mesmo... é renovar as esperanças na vida e o mais importante... acreditar em você de novo... Sofreu muito nesse período? Foi aprendizado. Chorou muito? Foi limpeza da alma. Ficou com raiva das pessoas? Foi para perdoá-las um dia. Tem tanta gente esperando apenas um sorriso seu para “chegar” perto de você. Recomeçar... hoje é um bom dia para começar novos desafios. Onde você que chegar? Ir alto... sonhe alto... queira o melhor do melhor... pensando assim trazemos pra nós aquilo que desejamos... Se pensarmos pequeno coisas pequenas teremos.... Já se desejarmos fortemente o melhor e principalmente lutarmos pelo melhor, o melhor vai se instalar em nossa vida. “Porque sou do tamanho daquilo que vejo, e não do tamanho da minha altura.”

Carlos Drummond de Andrade

RESUMO

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

ALCALÓIDES CICLOPEPTÍDICOS DA ESPÉCIE *Discaria americana* GILLES AND HOOKER: ESTEREOQUÍMICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

AUTOR: JANICE DAHMER

ORIENTADOR: ADEMIR FARIAS MOREL

LOCAL E DATA DA DEFESA: SANTA MARIA, 02 DE AGOSTO DE 2013

A proposta deste trabalho foi a de realizar um estudo fitoquímico do extrato bruto das cascas das raízes da espécie *Discaria americana* Gilles and Hooker. A origem dessa proposta vem do conhecimento do uso dessa planta na medicina popular para o tratamento de várias enfermidades tais como febre, doenças de pele, afecções no estômago, diabetes e como tônico, na forma de chás e infusões. Por meio deste estudo foi possível isolar seis compostos, dentre os quais quatro são alcalóides ciclopeptídicos, um alcalóide ciclopeptídico neutro e um triterpenóide. Os alcalóides ciclopeptídicos isolados são conhecidos como Discarina B (**23**), Discarina C (**44**), Frangufolina (**26**) e Frangulanina (**27**). O alcalóide ciclopeptídico neutro é conhecido como Discareno C (**63**) e o triterpenóide é conhecido como Ácido Betulínico (**69**). Neste estudo foi possível determinar a configuração absoluta do composto Discarina C (**44**) através de Difração de Raio-X e derivatização dos aminoácidos presentes na molécula, os quais foram submetidos à cromatografia gasosa enantiosseletiva. Ainda na análise fitoquímica foi possível constatar a atividade significativa de alguns dos compostos isolados. Os alcalóides ciclopeptídicos Discarina B (**23**), Discarina C (**44**), Frangulanina (**27**) e o alcalóide ciclopeptídico neutro Discareno C (**63**) se mostraram fortes bacteriostáticos frente à cepa *Salmonella typhimurium*, sendo que a Discarina C (**44**) apresentou forte potencial bactericida frente a essa cepa. Discarina B (**23**) apresentou significativo potencial bacteriostático e bactericida frente à *Enterococcus spp* e apreciável potencial bacteriostático frente à *Escherichia coli*. Foi possível estabelecer uma relação entre suas estruturas e configurações e seu potencial antimicrobiano.

Palavras-chave:

Discaria americana - Rhamnaceae - Estudo Fitoquímico - Estereoquímica - Atividade Antimicrobiana

ABSTRACT

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

CYCLOPEPTIDES ALKALOIDS OF SPECIES *Discaria americana* GILLES AND HOOKER: STEREOCHEMISTRY AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY

AUTHOR: JANICE DAHMER

ADVISER: ADEMIR FARIAS MOREL

DATE AND PLACE OF DEFENSE: SANTA MARIA, AUGUST 2th, 2013

The purpose of this study was to conduct a phytochemical study of the crude extract of the root bark of the species *Discaria americana* Gilles and Hooker. The origin of this knowledge has been proposed the use of this plant in popular medicine for the treatment of various diseases such as fever, skin diseases, stomach disorders, diabetes and as a tonic in the form of teas and infusions. Through this study was isolated six compounds among which four are cyclopeptide alkaloids, one cyclopeptide alkaloid neutral and one triterpenoid. Cyclopeptide alkaloids isolated are known as Discarine B (**23**) C Discarine (**44**) Frangufoline (**26**) and Frangulanine (**27**). The cyclopeptide alkaloid neutral is known as Discarene C (**63**) and triterpenoid is known as Betulinic Acid (**69**). In this study it was possible to determine the absolute configuration of the compound Discarine C (**44**) by X-ray diffraction and derivatisation of the amino acids present in the molecule, which were subjected to enantioselective gas chromatography. Still in phytochemical analysis, we determined the significant activity of some of the isolated compounds. The alkaloid ciclopeptídico Discarine B (**23**), Discarine C (**44**), Frangulanine (**27**) and cyclopeptide alkaloid neutral Discarene C (**63**) proved strong bacteriostatic against the strain *Salmonella typhimurium* being the Discarine C (**44**) showed strong potential bactericidal front of this strain. Discarine B (**23**) showed significant potential bacteriostatic and bactericidal against the *Enterococcus spp* and appreciable potential bacteriostatic front *Escherechia coli*. It was possible to establish a relationship between their structure and configuration and its antimicrobial activity.

Key-words:

Discaria americana - Rhamnaceae - Phytochemical Study - Stereochemistry-
Antimicrobial Activity

RESUMEN

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

ALCALOIDES CICLOPEPTÍDICOS DE LA ESPECIE *Discaria americana* GILLES Y HOOKER: ESTEREOQUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

AUTOR: JANICE DAHMER

ORIENTADOR: ADEMIR FARIAS MOREL

LOCAL Y FECHA DE LA DEFENSA: SANTA MARIA, 02 DE AGOSTO DE 2013

El propósito de este estudio fue realizar un estudio fitoquímico del extracto crudo de la cáscara de la raíz de la especie *Discaria americana* Gilles y Hooker. El origen de este conocimiento se ha propuesto en el uso de esta planta en la medicina popular para el tratamiento de diversas enfermedades tales como fiebre, enfermedades de la piel, trastornos estomacales, la diabetes y como un tónico en forma de té e infusiones. A través de este estudio se aislaron seis compuestos, entre los cuales cuatro son alcaloides ciclopeptídicos, un alcaloide ciclopeptídico neutro y triterpenoides. Los alcaloides ciclopeptídicos aislados se conocen como Discarina B (**23**), Discarina C (**44**), Frangufolina (**26**) y Frangulanina (**27**). El alcaloide ciclopeptídico neutro se conoce como Discareno C (**63**) y el triterpenoide se conoce como Ácido Betulínico (**68**). En este estudio, fue posible determinar la configuración absoluta del compuesto Discarina C (**44**) por difracción de rayos X y derivatización de los aminoácidos presentes en la molécula, que se sometió a cromatografía de gases enantioselectiva. Aún en el análisis fitoquímico, se determinó la actividad significativa de algunos de los compuestos aislados. Los alcaloides ciclopeptídicos Discarina B (**23**), Discarina C (**44**), Frangulanina (**27**) y alcaloide ciclopeptídeo neutro Discareno C (**63**) se demostraron fuertes bacteriostáticos contra la cepa de *Salmonella typhimurium*, y Discarina C (**44**) mostró un gran potencial bactericida contra esta cepa. Discarina B (**23**) mostró significativo potencial bacteriostático y bactericida contra el *Enterococcus spp* y apreciables potenciales bacteriostáticos contra *Escherechia coli*. Fue posible establecer una relación entre sus estructuras y configuraciones y su actividad antimicrobiana.

Palabras clave:

Discaria americana - Rhamnaceae - Estudio Fitoquímico - Actividad Antimicrobiana
- Estereoquímica

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Etapas geralmente envolvidas nos trabalhos de investigação fitoquímica	27
FIGURA 2: Biossíntese dos metabólitos secundários.....	29
FIGURA 3: Alcalóides diméricos	30
FIGURA 4: <i>Discaria americana</i> Gilles and Hooker.....	33
FIGURA 5: Estrutura do alcalóide peptídico linear Lasiodina-A.....	36
FIGURA 6: Estrutura básica dos alcalóides ciclopeptídicos.....	37
FIGURA 7: Estruturas gerais dos alcalóides ciclopeptídicos <i>sensu stricto</i> com anéis de 4(13)-, 5(13)-, 4(14)- e 4(15)-membros.....	38
FIGURA 8: Unidades 2-metóxi-5-hidróxi-estirilamina e trans-3-hidróxirolina.....	46
FIGURA 9: Unidade hidroxiestirilamina.....	47
FIGURA 10: β -hidroxileucina.....	47
FIGURA 11: β -hidroxifenilalanina.....	47
FIGURA 12: Unidade 2-metóxi-5-(β -vinil)-fenilalanina.....	48
FIGURA 13: Estruturas dos prováveis precursores dos alcalóides ciclopeptídicos.....	49
FIGURA 14: <i>p</i> -fenilenodialanina e seu correspondente dihidro.....	50
FIGURA 15: Percurso biogénico da macroclicização dos alcalóides ciclopeptídicos de 13-, 14- e 15- membros.....	51
FIGURA 16: Fracionamento submetido ao extrato bruto das cascas da raiz de <i>Discaria americana</i> coletada em São Sepé.....	63
FIGURA 17: Espectro de RMN de ^1H do alcalóide ciclopeptídico Discarina B, em CDCl_3 a 400MHz.....	77
FIGURA 18: Expansão do espectro de RMN de ^1H , região entre δ 2,50-4,90 ppm, do alcalóide ciclopeptídico Discarina B, em CD.....	78
FIGURA 19: Expansão do espectro de RMN de ^1H , região entre δ 0,79-1,98 ppm, do alcalóide ciclopeptídico Discarina B, em CDCl_3 a 400MHz.....	79
FIGURA 20: Expansão do espectro de RMN de ^1H , região entre δ 5,91-8,19 ppm, do alcalóide ciclopeptídico Discarina B, em CDCl_3 a 400MHz.....	80
FIGURA 21: Espectro de RMN de ^1H - ^1H , COSY, do alcalóide ciclopeptídico Discarina B, em CDCl_3 a 400MHz.....	81

FIGURA 22: Expansão do espectro de RMN de COSY, região entre δ 6,75-8,25 ppm, do alcalóide ciclopeptídico Discarina B, em CDCl_3 a 400MHz.....	82
FIGURA 23: Expansão do espectro de RMN de COSY, região entre δ 2,75-8,25 ppm, do alcalóide ciclopeptídico Discarina B, em CDCl_3 a 400MHz.....	83
FIGURA 24: Expansão do espectro de RMN de COSY, região entre δ 0,79-2,55 ppm, do alcalóide ciclopeptídico Discarina B, em CDCl_3 a 400MHz.....	84
FIGURA 25: Expansão do espectro de RMN de COSY, região entre δ 0,79-7,25 ppm, do alcalóide ciclopeptídico Discarina B, em CDCl_3 a 400MHz.....	85
FIGURA 26: Espectro de RMN de ^{13}C do alcalóide ciclopeptídico Discarina B, em CDCl_3 a 100MHz.....	86
FIGURA 27: Espectro de RMN de ^1H do alcalóide ciclopeptídico Discarina C, em CDCl_3 a 400MHz.....	90
FIGURA 28: Espectro de RMN de ^1H - ^1H , COSY, do alcalóide ciclopeptídico Discarina C, em CDCl_3 a 400MHz.....	91
FIGURA 29: Expansão do espectro de RMN de ^1H , região entre δ 0,63-1,75 ppm, do alcalóide ciclopeptídico Discarina C, em CDCl_3 a 400MHz	92
FIGURA 30: Expansão do espectro de RMN de ^1H , região entre δ 4,00-6,50 ppm, do alcalóide ciclopeptídico Discarina C, em CDCl_3 a 400MHz.....	93
FIGURA 31: Expansão do espectro de RMN de COSY, região entre δ 0,80-6,25 ppm, do alcalóide ciclopeptídico Discarina C, em CDCl_3 a 400MHz.....	93
FIGURA 32: Expansão do espectro de RMN de COSY, região entre δ 4,00-7,75 ppm, do alcalóide ciclopeptídico Discarina C, em CDCl_3 a 400MHz.....	94
FIGURA 33: Expansão do espectro de RMN de ^1H , região entre δ 0,63-1,75 ppm, do alcalóide ciclopeptídico Discarina C, em CDCl_3 a 400MHz.....	95
FIGURA 34: Expansão do espectro de RMN de COSY, região entre δ 0,63-1,75 ppm, do alcalóide ciclopeptídico Discarina C, em CDCl_3 a 400MHz.....	96
FIGURA 35: Expansão do espectro de RMN de COSY, região entre δ 6,30-6,80 ppm, do alcalóide ciclopeptídico Discarina C, em CDCl_3 a 400MHz.....	97
FIGURA 36: Expansão do espectro de RMN de ^1H , região entre δ 6,00-6,70 ppm, do alcalóide ciclopeptídico Discarina C, em CDCl_3 a 400MHz.....	97
FIGURA 37: Expansão do espectro de RMN de ^1H , região entre δ 6,00-7,50 ppm, do alcalóide ciclopeptídico Discarina C, em CDCl_3 a 400MHz.....	98
FIGURA 38: Expansão do espectro de RMN de COSY, região entre δ 6,00-7,00 ppm, do alcalóide ciclopeptídico Discarina C, em CDCl_3 a 400MHz.....	99

FIGURA 39: Espectro de RMN de ^{13}C do alcalóide ciclopeptídico Discarina C, em CDCl_3 a 100MHz.....	100
FIGURA 40: Espectro de RMN de ^1H , do alcalóide ciclopeptídico Frangufolina, em CDCl_3 a 400MHz.....	104
FIGURA 41: Expansão do espectro de RMN de ^1H , região entre δ 0,50-1,30 ppm, do alcalóide ciclopeptídico Frangufolina, em CDCl_3 a 400MHz.....	104
FIGURA 42: Expansão do espectro de RMN de ^1H , região entre δ 3,90-4,95 ppm, do alcalóide ciclopeptídico Frangufolina, em CDCl_3 a 400MHz.....	105
FIGURA 43: Expansão do espectro de RMN de COSY, região entre δ 1,75-5,00 ppm, do alcalóide ciclopeptídico Frangufolina, em CDCl_3 a 400MHz.....	106
FIGURA 44: Expansão do espectro de RMN de COSY, região entre δ 1,00-6,00 ppm, do alcalóide ciclopeptídico Frangufolina, em CDCl_3 a 400MHz.....	107
FIGURA 45: Expansão do espectro de RMN de ^1H , região entre δ 1,50-3,30 ppm, do alcalóide ciclopeptídico Frangufolina, em CDCl_3 a 400MHz.....	108
FIGURA 46: Expansão do espectro de RMN de COSY, região entre δ 1,70-5,00 ppm, do alcalóide ciclopeptídico Frangufolina, em CDCl_3 a 400MHz.....	108
FIGURA 47: Expansão do espectro de RMN de ^1H , , região entre δ 5,75-7,80 ppm, do alcalóide ciclopeptídico Frangufolina, em CDCl_3 a 400MHz.....	109
FIGURA 48: Expansão do espectro de RMN de COSY, região entre δ 4,00-8,00 ppm, do alcalóide ciclopeptídico Frangufolina, em CDCl_3 a 400MHz.....	110
FIGURA 49: Espectro de RMN de ^{13}C , do alcalóide ciclopeptídico Frangufolina, em CDCl_3 a 100MHz.....	111
FIGURA 50: Espectro de RMN de ^1H , do alcalóide ciclopeptídico Frangulanina, em CDCl_3 a 400MHz.....	114
FIGURA 51: Expansão do espectro de RMN de ^1H , região entre δ 0,70-2,75 ppm, do alcalóide ciclopeptídico Frangulanina, em CDCl_3 a 400MHz.....	114
FIGURA 52: Expansão do espectro de RMN ^1H , região entre δ 0,70-1,80 ppm, do alcalóide ciclopeptídico Frangulanina, em CDCl_3 a 400MHz.....	115
FIGURA 53: Expansão do espectro de RMN de ^1H , região entre δ 0,70-2,75 ppm, do alcalóide ciclopeptídico Frangulanina, em CDCl_3 a 400MHz.....	116
FIGURA 54: Expansão do espectro de RMN de ^1H , região entre δ 5,75-7,50 ppm, do alcalóide ciclopeptídico Frangulanina, em CDCl_3 a 400MHz.....	117
FIGURA 55: Espectro de RMN COSY ^1H - ^1H , do alcalóide ciclopeptídico Frangulanina, em CDCl_3 a 400MHz.....	117

FIGURA 56: Espectro de RMN de ^{13}C , do alcalóide ciclopeptídico Frangulanina, em CDCl_3 a 100MHz.....	118
FIGURA 57: Espectro de RMN de ^1H , do alcalóide ciclopeptídico neutro Discareno C, em CDCl_3 a 400MHz.....	122
FIGURA 58: Espectro de COSY ^1H - ^1H , do alcalóide ciclopeptídico neutro Discareno C, em CDCl_3 a 400MHz.....	123
FIGURA 59: Expansão do espectro de RMN de ^1H , região entre δ 1,25-4,25 ppm, do alcalóide ciclopeptídico neutro Discareno C, em CDCl_3 a 400MHz.....	124
FIGURA 60: Expansão do espectro de RMN de ^1H , região entre δ 6,00-6,75 ppm, do alcalóide ciclopeptídico neutro Discareno C, em CDCl_3 a 400MHz.....	125
FIGURA 61: Expansão do espectro de RMN de ^1H , região entre δ 0,70-2,50 ppm, do alcalóide ciclopeptídico neutro Discareno C, em CDCl_3 a 400MHz.....	125
FIGURA 62: Expansão do espectro de RMN de ^1H , região entre δ 4,75-6,50 ppm, do alcalóide ciclopeptídico neutro Discareno C, em CDCl_3 a 400MHz.....	126
FIGURA 63: Expansão do espectro de COSY, região entre δ 6,50-7,75 ppm, do alcalóide ciclopeptídico neutro Discareno C, em CDCl_3 a 400MHz.....	127
FIGURA 64: Espectro de RMN de ^{13}C , do alcalóide ciclopeptídico neutro Discareno C, em CDCl_3 a 100MHz.....	128
FIGURA 65: Difração de Raio-X da Discarina C (44) onde C são os carbonos; O são os oxigênios (vermelho); N são os nitrogênios (azul) e H (branco).....	133
FIGURA 66: Cromatogramas dos aminoácidos derivatizados e do alcalóide ciclopeptídico Discarina C.....	133
FIGURA 67: Estruturas do alcalóide ciclopeptídico Discarina C e dos aminoácidos L-Leucina e L-eritro- β -Fenilserina.....	134
FIGURA 68: Expansão do espectro NOESY, região entre δ 4,00-6,00 ppm, do alcalóide ciclopeptídico Discarina C apresentando as correlações entre os H-4 e NH-6.....	135
FIGURA 69: Expansão do espectro NOESY, região entre δ 4,75-7,50 ppm, do alcalóide ciclopeptídico Discarina C apresentando as correlações do H-4 com o NH-6 e com o NH-21.....	135
FIGURA 70: Relação de Karplus para constantes de acoplamento $^3J_{\text{H}3-\text{H}4}$ do alcalóide ciclopeptídico Discarina C.....	137
FIGURA 71: Expansão do espectro RMN ^{13}C , região entre δ 50,00-85,00 ppm, do alcalóide ciclopeptídico Discarina C.....	138

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Alcalóide ciclopeptídico do tipo 4(13)-Nummularina C.....	38
TABELA 2 – Alcalóides ciclopeptídicos do tipo 5(13)-Zizifina A.....	39
TABELA 3 – Alcalóides ciclopeptídicos do tipo 4(14)-Frangulanina.....	40
TABELA 4 – Alcalóides ciclopeptídicos do tipo 5(14)-Scutianina A.....	41
TABELA 5 – Alcalóides ciclopeptídicos do tipo 4(14)-Integerrina.....	41
TABELA 6 – Alcalóides ciclopeptídicos do tipo 5(14)-Adouetina Z.....	42
TABELA 7 – Alcalóides ciclopeptídicos do tipo 4(14)-Amfibina F.....	42
TABELA 8 – Alcalóides ciclopeptídicos do tipo 5(14)-Amfibina B.....	43
TABELA 9 – Alcalóides ciclopeptídicos do tipo 4(14)-Pandamina.....	43
TABELA 10 – Alcalóides ciclopeptídicos do tipo 4(15)-Mucronina A.....	44
TABELA 11 – Alcalóides ciclopeptídicos do tipo neutro.....	44
TABELA 12 – Proposta para a formação biossintética dos precursores dos alcalóides ciclopeptídicos.....	51
TABELA 13 – Sistemas Solventes utilizados na cromatografia CC, CCD e CCPD	60
TABELA 14 – Cromatografia da fração Alcalóides Totais (FBEAT)	64
TABELA 15 – Microorganismos indicadores	65
TABELA 16 – Meios de cultura empregados	66
TABELA 17 – Rendimento das frações da <i>Discaria americana</i> em São Sepé –RS	75
TABELA 18 – Rendimento dos compostos isolados da <i>Discaria americana</i> em São Sepé –RS	75
TABELA 19 – Dados de RMN de ¹ H da Discarina B (23) (CDCl ₃ , 400,13MHz)	86
TABELA 20 – Dados de RMN de ¹³ C da Discarina B (23) (CDCl ₃ , 100,62MHz)	88
TABELA 21 – Dados de RMN de ¹ H da Discarina C (44) (CDCl ₃ , 400,13MHz)	100
TABELA 22 – Dados de RMN de ¹³ C da Discarina C (44) (CDCl ₃ , 100,62MHz)	101
TABELA 23 – Dados de RMN de ¹ H da Frangufolina (26) (CDCl ₃ , 400,13MHz) e RMN de ¹³ C da Frangufolina (26) (CDCl ₃ , 100,62MHz)	111
TABELA 24 – Dados de RMN de ¹ H da Frangulanina (27) (CDCl ₃ , 400,13MHz)	119
TABELA 25 – Dados de RMN de ¹³ C da Frangulanina (27) (CDCl ₃ , 100,62MHz)	120

TABELA 26 – Dados de RMN de ^1H do Discareno C (63) (CDCl_3 , 400,13MHz)	128
TABELA 27 – Dados de RMN de ^{13}C do Discareno C (63) (CDCl_3 , 100,62MHz)	129
TABELA 28 – Concentração Inibitória Mínima e Concentração Letal Mínima dos cinco compostos isolados de <i>Discaria americana</i> frente à bactérias Gram-positivas e Gram-negativas	140
TABELA 29 – Concentração Inibitória Mínima e Concentração Letal Mínima dos cinco compostos isolados de <i>Discaria americana</i> frente à fungos	141
TABELA 30 - Estruturas dos alcalóides ciclopeptídicos e do alcalóide ciclopeptídeo neutro.....	145

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1: Estruturas numeradas, características e identificação dos compostos isolados..73

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1: Degradação Química	72
-------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS

δ	Deslocamento Químico
<i>J</i>	Constante de Acoplamento
μg	Micrograma
ATCC	American Type Culture Collection
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celcius
CC	Cromatografia em Coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CGC	Cromatografia Gasosa Enantiosseletiva
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLM	Concentração Letal Mínima
CPP	Cromatografia em Placa Preparativa
COSY	Correlated Spectroscopy
NOESY	Nuclear Overhouser Enhancenment Spectroscopy
d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
GC	Cromatografia Gasosa
Hz	Hertz
m	Multipleto
mg	Miligramas
NPPN	Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais
Pág.	Página
ppm	Parte por Milhão
Rf	Fator De Retenção
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
s	Singleto
t	Tripleto
TMS	Tetrametilsilano
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria

FEB	Fração Etérea Básica
FBEAT	Fração Etérea Básica Alcalóides Totais
FBER	Fração Etérea Básica Resíduo

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	22
OBJETIVOS	26
1 REVISÃO DE LITERATURA	27
1.1 DESCRIÇÃO DA PLANTA.....	31
1.1.1 Família Rhamnaceae.....	31
1.1.1.1 Espécie <i>Discaria americana</i> Gilles and Hooker.....	32
1.2 ALCALÓIDES	34
1.2.1 Alcalóides ciclopeptídicos.....	35
1.2.1.1 Classificação dos alcalóides ciclopeptídicos.....	45
1.2.1.1.1 Alcalóides ciclopeptídicos de treze membros.....	46
1.2.1.1.2 Alcalóides ciclopeptídicos de quatorze membros.....	46
1.2.1.1.3 Alcalóides ciclopeptídicos de quinze membros.....	48
1.2.1.2 Biossíntese dos alcalóides ciclopeptídicos.....	49
1.3 ATIVIDADE FARMACOLÓGICA.....	52
1.3.1 Atividade antimicrobiana	52
1.3.1.1 Ensaio para determinação da atividade antimicrobiana.....	53
1.3.1.2 Atividade antimicrobiana dos alcalóides ciclopeptídicos.....	55
1.4 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL E ESTEREOQUÍMICA.....	56
1.4.1 Métodos para obtenção da determinação estrutural e estereoquímica.....	56
1.4.2 Determinação estrutural e estereoquímica dos alcalóides ciclopeptídicos.....	57
2 PARTE EXPERIMENTAL	59
2.1 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS GERAIS	59
2.1.1 Espectroscopia Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H e ¹³ C	59
2.1.2 Aparelho de Ponto de Fusão	59
2.1.3 Cromatógrafo Gasoso	59
2.1.4 Fluorímetro	59
2.1.5 Materiais e Métodos Cromatográficos	60
2.1.6 Difração de Raio-X	61
2.2 PREPARAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL.....	62
2.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA <i>IN VITRO</i>	65
2.3.1 Micoorganismos Utilizados.....	65
2.3.2 Padrões Utilizados nos Ensaio Microbiológicos.....	65
2.3.3 Meios de Cultura Empregados (Fórmula gL ⁻¹).....	66
2.3.4 Preparo das Suspensões Microbianas (Inóculo).....	66
2.3.5 Determinação da CIM pelo Método de Microdiluição.....	67
2.4 METABÓLITOS ISOLADOS E IDENTIFICADOS DE <i>Discaria americana</i> Gilles and Hooker	68
2.4.1 Alcalóides Ciclopeptídicos	68
2.4.1.1 Discarina B, J01 (23)	68

2.4.1.2 Discarina C, J02 (44)	68
2.4.1.3 Frangufolina, J11 (26)	69
2.4.1.4 Frangulanina, J09 (27)	70
2.4.2 Alcalóide Ciclopeptídico neutro	70
2.4.2.1 Discareno C, 10E (63)	70
2.4.3 Triterpenóide	71
2.4.3.1 Ácido Betulínico, J21 (69)	71
2.5 DEGRADAÇÃO QUÍMICA DOS ALCALÓIDES CICLOPEPTÍDICOS	72
2.5.1 Hidrólise dos alcalóides ciclopeptídicos	72
2.5.2 Esterificação dos aminoácidos	72
2.5.3 N, ou N,O-trifluoracetilação	72
3 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	73
3.1 RENDIMENTO DO EXTRATO BRUTO, DAS FRAÇÕES E DOS COMPOSTOS ISOLADOS	75
3.2 METABÓLITOS ISOLADOS DAS CASCAS DA RAIZ DE <i>D. americana</i>	76
3.2.1 Alcalóides Ciclopeptídicos	76
3.2.1.1 Alcalóide J01	76
3.2.1.2 Alcalóide J02	89
3.2.1.3 Alcalóide J11	103
3.2.1.4 Alcalóide J09	113
3.2.2 Alcalóide Ciclopeptídico Neutro E10.....	121
3.2.3 Triterpenóide	131
3.2.3.1 Triterpenóide J21	131
3.3 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DA CONFIGURAÇÃO ABSOLUTA DOS ALCALÓIDES CICLOPEPTÍDICOS	132
3.4 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	139
3.4.1 Correlação da atividade antimicrobiana e estrutura/configuração dos alcalóides isolados.....	145
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	151
BIBLIOGRAFIA.....	153

INTRODUÇÃO

Devido a sua complexidade, ainda não é conhecida com exatidão a grandeza da biodiversidade do Brasil. Estima-se que há mais de dois milhões de espécies diferentes de plantas, animais e microorganismos. Entre elas, as espécies vegetais totalizam aproximadamente 550.000 exemplares, sendo que cerca de 55.000 são espécies vegetais já catalogadas encontradas em florestas tropicais, e as 500.000 espécies restantes são ainda desconhecidas. Sabe-se que a grande maioria das espécies vegetais está distribuída pelas regiões equatoriais da América do Sul, da África e da Ásia, e a maior diversidade global é encontrada na flora colombiana, equatoriana e peruana, integradas por mais de 40.000 espécies que habitam uma área de apenas 2% da superfície terrestre.

A biodiversidade se define como a variedade e a variabilidade existente entre os organismos vivos e as complexidades ecológicas em que elas ocorrem. Ela é uma associação de vários componentes hierárquicos, tais como ecossistemas, comunidades, espécies, populações e genes em uma determinada área. Seus componentes podem fornecer inúmeros produtos de importância econômica, dentre os quais se destacam os fitoterápicos, medicamentos preparados exclusivamente à base de plantas medicinais, como por exemplo a “sete-sangrias”, e os fitofármacos, substâncias extraídas de plantas que apresentam atividades farmacológicas podendo ter aplicação terapêutica, como por exemplo o jaborandi, cujas folhas produzem a pilocarpina, utilizada para o tratamento de glaucoma. A capacidade terapêutica desses componentes é originária dos recursos genéticos destes vegetais.

O uso de plantas para o tratamento de doenças é muito antigo. O conhecimento popular sobre como utilizá-las já percorreu séculos e ainda hoje elas são um recurso terapêutico para muitas pessoas em todo o mundo, principalmente no Brasil. Mesmo tendo seu uso baseado na crença popular, a qual não oferece garantias quanto a sua validade, as plantas medicinais não foram substituídas pelos fármacos sintéticos. Isso se dá pela insatisfação quanto à eficácia, pelo custo elevado e pelos efeitos indesejáveis provenientes dos medicamentos alopáticos, juntamente com uma admiração pelos “produtos naturais”. Essa valorização dos produtos naturais provocou um aumento na procura de informações que confirmem cientificamente a eficácia e a segurança terapêutica destas plantas (NIERO et al.,

2003). O que se constata atualmente é que o interesse no aproveitamento de fontes naturais, principalmente quando se refere a plantas para uso farmacêutico, vem crescendo significativamente nos últimos anos.

Considerando-se a situação referida de que a maior parte das plantas do globo terrestre se localiza nos países tropicais, sendo que o Brasil dispõe de aproximadamente 30% da flora mundial, entende-se que o avanço das pesquisas nacionais se encontra deficitária, uma vez que apenas 8% das plantas brasileiras foram estudadas até hoje (BRAZ-FILHO et al., 2007; SIMÕES et al., 2004). Mesmo com somente 8% das plantas brasileiras estudadas, o mercado brasileiro de medicamentos fitoterápicos cresce 15% ao ano, ao passo que o crescimento anual do mercado de medicamentos sintéticos é de apenas 3 a 4% (ABIFITO, 2001, apud, REIS et al., 2004). Fato que pode indicar uma preferência popular nacional pelo uso direto das plantas medicinais.

No Brasil, 60 milhões de pessoas não tem acesso à maioria dos medicamentos que estão disponíveis no mercado interno. Apesar de a população brasileira gastar 8 bilhões de dólares por ano em medicamentos, apenas 20% da população consome 63% dos medicamentos sintéticos produzidos e o restante, 80% dela, utiliza as plantas medicinais como principal ou, por vezes, único recurso terapêutico. Ao se observar outros países, especificamente os subdesenvolvidos e os em desenvolvimento, da mesma forma estima-se que aproximadamente 80% de suas populações são dependentes da medicina caseira e a utilizam para suas necessidades primárias de saúde (BRAZ-FILHO et al., 2007).

Uma possível razão para a configuração de tal panorama é a de que os medicamentos quimioterápicos e os fitoterápicos industrializados têm um valor agregado muito alto, o que aumenta em muito seu valor comercial, restringindo assim sua compra. As pessoas com baixo poder aquisitivo encontram, por vezes, nos remédios caseiros, oriundos da medicina popular, preparados com as plantas disponíveis onde vivem ou comprados em mercados e feiras-livres, a única opção para o tratamento de suas enfermidades. É a chamada fitoterapia de base empírica. Dessa forma, a quantidade de plantas utilizadas na medicina popular é maior do que as usadas cientificamente, o que pode ser considerado por parte dos pesquisadores da área de produtos naturais uma valiosa fonte de informações e de inspiração para que se façam mais descobertas de compostos biologicamente ativos segundo os parâmetros do conhecimento científico.

Essa cultura terapêutica fundamentada no uso direto de plantas medicinais tem aumentado o interesse de pesquisadores em estudá-las a fim de, primeiramente, descobrir agentes biologicamente ativos, para então conhecer seus constituintes químicos bioativos

(quando presentes) e não bioativos, o que define quais plantas podem vir a serem usadas para fins medicinais. Esse processo abrange áreas multidisciplinares tais como a etnobotânica, a fitoquímica e a farmacologia. Dessa forma, os estudos fitoquímicos vêm permitindo a descoberta de inúmeras substâncias que vieram a fazer parte, direta ou indiretamente, do arsenal terapêutico da medicina, através de produtos tecnológicos ou em preparados mais simples, o que permite a utilização das plantas medicinais de uma maneira mais correta e segura. Entretanto, parece não restar dúvida quanto a que os estudos fitoquímicos são, ainda, uma área de pesquisa muito pouco explorada.

As culturas primitivas ao redor do mundo revelaram à civilização ocidental não apenas novos fármacos, mas também descobertas em outras áreas. Na América do Sul, infelizmente, tornaram-se remotas as possibilidades de se obter das populações indígenas mais informações acerca das plantas úteis. Isso se deve ao fato de que a maioria dos costumes existentes já foram investigados e a aculturação dos povos primitivos é, atualmente, muito rápida. Outro fator importante é que as populações indígenas descobriram somente uma pequena parte dos organismos úteis. A quantidade de plantas que contêm substâncias com potencial biológico, farmacológico ou terapêutico, e que não foram descobertas por essas populações, é imensa.

Nos últimos anos, no estado do Rio Grande do Sul, iniciou-se a expansão de estudos envolvendo plantas medicinais em pesquisas de pós-graduação, as quais estão relacionadas com estudos etnobotânicos. Dentro deste contexto, o grupo do Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais (NPPN) de Santa Maria, coordenado pelo Prof. Dr. Ademir Farias Morel, vem contribuindo não somente para a fitoquímica clássica (isolamento e determinação estrutural), mas também realizando trabalhos que envolvem estudos de atividade biológica de extratos, frações e de metabólitos isolados puros de plantas que são utilizadas na medicina popular regional.

As espécies de maior interesse do grupo pertencem às famílias Rutaceae, Sterculiaceae, **Rhamnaceae**, Asteraceae, Anarcadiaceae, Santalaceae, Rubiaceae, Myrtaceae, Apocinaceae e Guttiferae (Clusiaceae), as quais são nativas do recentemente reconhecido Bioma do Pampa e de parte do Bioma Mata Atlântica, que se estende até os arredores da cidade de Santa Maria, RS. 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 pastagens nativas entremeadas por matas de galeria. Esta mata é constituída por várias espécies nativas, pertencentes às famílias mencionadas acima.

Além da realização de testes para a verificação da atividade antifúngica, antioxidante, antibacteriana e antiviral dos extratos das plantas, frações e substâncias puras, o grupo do

NPPN, em colaboração com o grupo espanhol do Instituto de Pesquisas Biomédicas de Barcelona coordenado pelo Prof. Dr. Ernest Giralt, recentemente introduziu protocolos de avaliação de extratos de plantas, frações e substâncias puras frente a enzimas específicas como a acetilcolinesterase (AChE), a dipeptidil peptidase (DPP IV) e a prolil oligopeptidase (POP). Os testes de atividade frente a estas enzimas permitem identificar possíveis inibidores das mesmas que podem tornar-se potentes componentes de novos fármacos para tratamentos de doenças como o *Mal de Alzheimer* (inibidores da AChE), diabetes mellitus (inibidores da DPP IV), o transtorno bipolar e ansiedade (inibidores da POP).

Enquanto Bacharel em Química, graduanda em Farmácia e mestranda no Programa de Pós-Graduação em Química da UFSM, e enquanto integrante do NPPN, minha contribuição ao grupo tem se dado através de estudos etnobotânicos, fitoquímicos, de atividades farmacológicas e de determinação estrutural desenvolvidos atualmente nessa Dissertação de Mestrado, a qual é dedicada à espécie *Discaria americana* Gilles and Hooker pertencente à família Rhamnaceae. Esta família é amplamente empregada no tratamento de várias doenças como disenteria, agente antitérmico, pressão alta e alguns tipos de infecções, sendo encontrada em formações vegetais nativas do Rio Grande do Sul.

A espécie que aqui é objeto de estudo, a *Discaria americana* Gilles and Hooker, é conhecida popularmente como brusca, quina-do-campo ou quina-do-rio-grande no Brasil; como brusquilla na Argentina; e coronillo-del-campo ou quina-del-campo no Uruguai. Delas são utilizadas as cascas de sua raiz como agente antitérmico, no tratamento de doenças de pele, contra afecções gástricas, diabetes e como tônico sob a forma de chás e infusões.

Desta forma, considera-se relevante salientar a importância de um estudo fitoquímico mais aprofundado com o intuito de encontrar os metabólitos secundários responsáveis por sua ação farmacológica. É ao que se dedica este estudo.

Na sequência, estão apresentados os objetivos estabelecidos para este trabalho.

OBJETIVOS

Este trabalho tem como principal objetivo o isolamento, a determinação da configuração absoluta e a avaliação da atividade antimicrobiana dos alcalóides ciclopeptídicos já conhecidos ou novos das raízes da espécie *Discaria americana* Gilles and Hooker (Rhamnaceae), espécie medicinal nativa do Bioma Pampa. Além destes objetivos, pretende-se verificar a possibilidade de uma relação entre a atividade antimicrobiana e a estrutura/configuração dos alcalóides isolados.

1 REVISÃO DA LITERATURA

A química de produtos naturais compreende várias aplicações, uma das principais está direcionada para o descobrimento de novas substâncias medicinais. Tal descobrimento se dá por meio do isolamento de substância ativa no extrato da planta visando posterior síntese de moléculas análogas à isolada, para que assim possam ser produzidas em larga escala pelas indústrias. Essa aplicação foi possível a partir do conhecimento de que as plantas, para desenvolverem-se, realizam vários processos de biossíntese, os quais resultam na formação, acúmulo e degradação de inúmeras substâncias orgânicas no interior das suas células, em seus diversos tecidos, e de que esses compostos orgânicos possuem propriedades farmacológicas.

Sabendo isso, que as plantas produzem e acumulam substâncias orgânicas que potencialmente possuem propriedades terapêuticas, foram sendo aperfeiçoados métodos e técnicas de obtenção de tais compostos, principalmente através de estudos dos aspectos biossintéticos, estruturais e das propriedades dos metabólitos secundários destes organismos vivos. Entretanto, mesmo com a produção em escala industrial destas moléculas, não resta dúvida de que é a natureza que produz a maioria das substâncias orgânicas conhecidas.

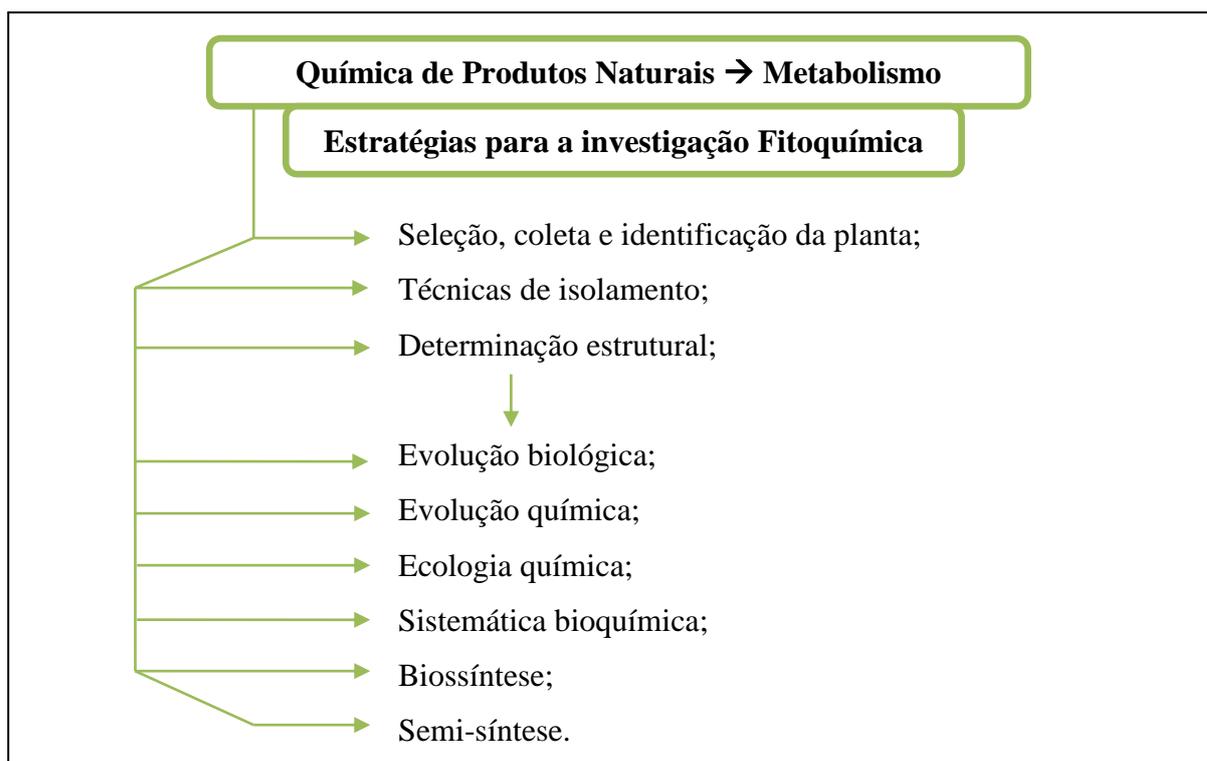


Figura 1: Etapas geralmente envolvidas nos trabalhos de investigação fitoquímica (BRAZ-FILHO et al., 2007).

Num estudo fitoquímico, os processos de seleção, coleta e identificação da planta são importantes para que se tenha a certeza da família, gênero e espécie da planta com a qual se deseja trabalhar (Figura 1). As técnicas de isolamento variam conforme os metabólitos secundários característicos de cada família, sendo levados em conta vários aspectos, tais como a polaridade da molécula e a solubilidade. As estratégias de investigação fitoquímica envolvem, também, aspectos biossintéticos, os quais auxiliam na compreensão das rotas metabólicas das plantas, e a elucidação das estruturas dos metabólitos secundários, os quais são importantes para o entendimento do caráter medicinal das plantas, além das propriedades farmacológicas propriamente ditas desses metabólitos isolados no estudo fitoquímico.

Ao estudar as características fitoquímicas de uma planta é preciso considerar que ela possui dois grupos de metabólitos distintos importantes para o seu desenvolvimento: os primários e os secundários. Os metabólitos primários, encontrados em todos os seres vivos, tais como os aminoácidos, monossacarídeos, ácidos carboxílicos, lipídeos, entre outros, são essenciais para o crescimento e a manutenção da vida, mas não possuem atividade farmacológica. Os metabólitos secundários, biossintetizados a partir dos metabólitos primários, são produtos de metabolismo específico, estão relacionados aos processos adaptativos, sendo por isso, restritos a certas plantas e microorganismos. Os metabólitos secundários são caracterizados pela diversidade química como alcalóides, esteróides, terpenóides, flavonóides, etc. (VERPOORTE, 2000). São eles que possuem as atividades farmacológicas objeto de interesse.

Os metabólitos secundários das plantas medicinais são influenciados por três fatores principais: hereditários (composição genética), ontogênicos (estágio de desenvolvimento) e ambientais. Os efeitos genéticos induzem mudanças qualitativas e quantitativas neles, já as causas ambientais induzem a mudanças principalmente quantitativas. Além disso, a quantidade e a identidade de metabólitos secundários produzidos pelas plantas podem variar de acordo com seu estágio de desenvolvimento (VERPOORTE, 2000).

Durante muito tempo os metabólitos secundários foram considerados produtos da excreção vegetal, algumas vezes com estruturas químicas e propriedades biológicas interessantes. Atualmente, são conhecidos vários compostos que possuem papéis vitais na mediação de interações ecológicas, como a defesa contra herbívoros e microorganismos, além da atração de polinizadores, dispersores de sementes e em interações alelopáticas (SANTOS, 1999). Mesmo que esse processo ocorra igualmente em animais, é principalmente nos vegetais que se encontra o interesse de pesquisa de diversas áreas das ciências relacionadas à alimentação e à saúde.

Na sequência, está apresentado o ciclo biossintético através do qual se pode observar as possibilidades e o percurso de produção de metabólitos secundários em uma dada planta (Figura 2).

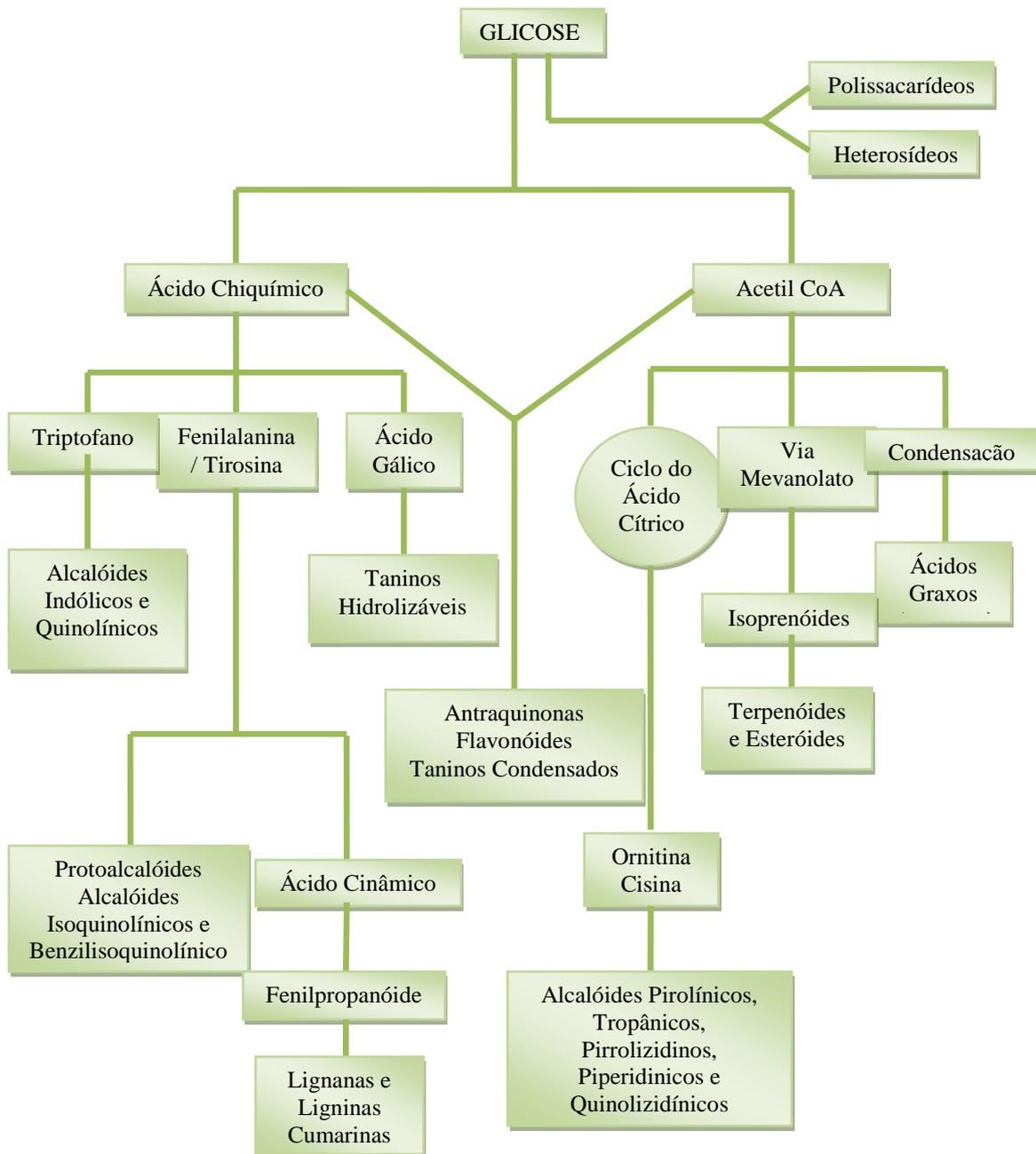


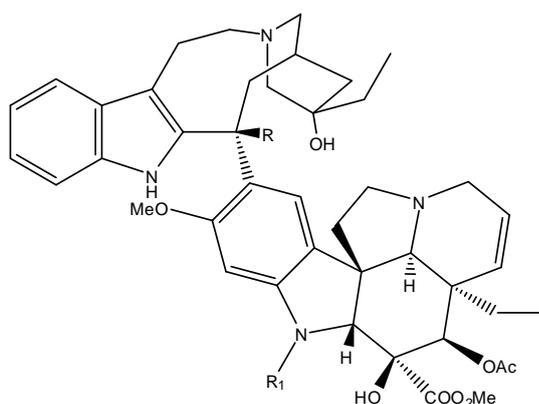
Figura 2: Biossíntese dos metabólitos secundários (SANTOS, 1999).

Reforça-se que a investigação dos metabólitos secundários produzidos pelas plantas medicinais por meio de isolamento, elucidação estrutural e avaliação biológica permite a descoberta de novos compostos orgânicos naturais com significativa importância científica.

Neste contexto, é interessante ressaltar que há duas possibilidades resultantes deste processo enquanto métodos de produção de medicamento.

A primeira delas, mais usual, é a síntese da molécula ativa tendo como modelo a molécula isolada do extrato da planta. A segunda delas corresponde à utilização da própria molécula natural, isolada, obtida em grande quantidade a partir de plantação específica para esse fim. Este segundo método necessita de algumas condições especiais para poder ser utilizado, como a possibilidade de plantio do vegetal em larga escala e a disponibilidade de considerável quantidade do metabólito secundário acumulado na planta em questão.

O uso direto de composto natural como matéria prima para medicamento só é considerado como opção quando são encontradas muitas dificuldades na síntese de algumas substâncias ativas em função de conterem aspectos relevantes (complexos) de estereoquímica, em especial nos casos de estruturas que possuem diversos centros estereogênicos tais como, a vincristina e a vimblastina, alcalóides diméricos isolados da espécie *Catharanthus roseus* os quais são agentes quimioterapêuticos de uso clínico contra o câncer (BRAZ-FILHO et al., 2007). Abaixo (Figura 3), para evidenciar a complexidade de sua estereoquímica, estão apresentadas suas estruturas:



Vincristina (oncovin) R = CO₂Me, R₁ = Me
Vimblastina (velban) R = CO₂Me, R₁ = CHO

Figura 3: Alcalóides diméricos (BRAZ-FILHO et al., 2007).

1.1 DESCRIÇÃO DA PLANTA

O presente segmento deste estudo inicialmente caracteriza a família e a espécie da planta estudada a partir da literatura. São encontradas indicações quanto às possibilidades da *Discaria americana* ser utilizada para fins medicinais.

1.1.1 Família Rhamanceae

A família Rhamnaceae apresenta-se morfológicamente como plantas que podem ser árvores, arbustos ou subarbustos que habitam principalmente ambientes de formações vegetais campestres ou florestais. Esta família é composta por 58 gêneros com cerca de 900 espécies no globo terrestre e possuem hábito muito variável, que inclui desde árvores e arbustos, com frequência xerófilos, até trepadeiras lenhosas e raras ervas. Na América do Sul encontra-se aproximadamente 93 espécies das quais as mais importantes pertencem aos gêneros **Discaria**, *Colletia*, *Gouania*, *Condalia*, *Colubrina*, *Ziziphus*, *Crumenaria*, *Kentrothamnus*, *Retanilla*, *Rhamnus*, *Sageretia* e *Scutia* (SANTOS, 2008).

No Rio Grande do Sul podem ser encontrados 8 dos 13 gêneros e 9 das 50 espécies brasileiras: *Colletia paradoxa* (Sprengel) Escalante, *C. spinosissima* Gmelin, *Colubrina glandulosa* Perkins, *Condalia buxifolia* Reissek, *Discaria americana* Gilles and Hooker, *Gouania ulmifolia* Hooker et Arnott, *Hovenia dulcis* Thunberg, *Rhamnidium glabrum* Reissek, *Rhamnus sphaerosperma* Swartz e *Scutia buxifolia* Reissek, fazendo do estado o maior representante desta família botânica no país. Com exceção de *Hovenia dulcis*, cultivada como árvore ornamental, frutífera e madeireira, as demais espécies são nativas e habitam terrenos úmidos ou rochosos, em formações campestres ou florestais, inclusive matas com Araucárias.

A maioria dos gêneros citados possui apenas uma única espécie no Estado, e contam com uma extraordinária diversidade de hábito e morfologia, tendendo ao xeromorfismo. Dentre os representantes da família Rhamnaceae é comum o grupamento, redução ou ausência de folhas, a presença de espinhos e tricomas, a existência de caules fotossintetizantes e de hábito arbustivo (SANTOS, 2008).

No Brasil, de acordo com Souza & Lorenzi (2005), ocorrem apenas 13 gêneros na flora nativa: *Alvimiantha* Grey-Wilson, *Ampeloziziphus* Ducke, *Colletia* Comm. ex Juss., *Colubrina* Rich. ex Brongn., *Condalia* Cav., *Crumenaria* Mart., *Discaria* Hooker, *Gouania*

Jack., *Reissekia* Endl., *Rhamnidium* Reissek, *Rhamnus* L., *Scutia* (Comm. ex A. DC.) Brongn. e *Ziziphus* Mill. Dos gêneros exóticos, são cultivadas espécies de *Hovenia* Thunberg e *Sageretia* Brongn. (SANTOS, 2008).

Apesar de pouco valorizadas sob o ponto de vista econômico, algumas espécies de Rhamnaceae prestam-se a usos locais, em muitas partes do mundo. Elas são utilizadas como alimento, no curtimento de peles, como corantes, na lavagem de tecidos, na produção de bebidas fermentadas, como lenha e madeira comercial. Além disso, as plantas da família Rhamnaceae são utilizadas na medicina popular, sendo essas ricas, principalmente, em alcalóides ciclopeptídicos (GIACOMELLI, 2005).

1.1.1.1 Espécie *Discaria americana* Gilles and Hooker

A classificação das espécies do gênero *Discaria* não está bem definida, espécies deste gênero ainda podem ser classificadas no interior dos gêneros *Notophaena* e *Ochetophila*, pertencentes a outras tribos da família Rhamnaceae. A *Discaria americana* pertence à tribo Colletieae, menor tribo da família Rhamnaceae. Esta tribo compreende seis gêneros: *Adolphia*, *Colletia*, *Discaria*, *Kentrothamnus*, *Retanilla* e *Trevoa*, que totalizam em torno de 20 espécies. Preferencialmente, se distribuem pelos Andes e na região do paralelo 30°S, sendo o gênero *Discaria* presente no território de Gondwana, no que hoje se compreende a América do Sul, Austrália e Nova Zelândia (AAGESEN et al., 2005).

O gênero *Discaria* possui uma vasta diversidade de espécies (*D. americana* Gilles and Hooker, *D. articulata* Meirs, *D. chacaye* Tort., *D. nana* Weberb. e *D. trenervis* Reiche), que se distribui desde o sudeste do Brasil e Uruguai (JOHNSTON & SOARES apud SANTOS 2008) até a península de Valdés no litoral argentino chegando à Cordilheira dos Andes na província de Mendoza. Seu habitat compreende regiões serranas, dunas, morros calcários e solos rochosos (TORTOSA apud SANTOS 2008).

A espécie *Discaria americana* é a única encontrada no Brasil, mais precisamente nos estados do Rio Grande do Sul, onde ocorre principalmente nas regiões da Campanha, Depressão Central e Serra do Sudeste, e em Santa Catarina, além de poder ser encontrada no Uruguai e na Argentina. A *Discaria americana* (Figura 4) apresenta-se na natureza na forma de um arbusto de 0,30 a 2 m de altura, densamente ramoso e espinhento, com poucas ou muitas folhas, até ocasionalmente subáfilo; tronco delgado, de casca fina, escuro-acinzentada, formando diminutas placas quadrangulares ou com forma irregular, que se desprendem deixando a periderme adjacente de aspecto ligeiramente marrom; flores completas, perfeitas,

tetrâmeras, raramente pentâmeras, de simetria radial, numerosas, brancas, glabras, pediceladas, pequenas (SANTOS, 2008).



Figura 4: *Discaria americana* Gilles and Hooker.

A espécie é vulgarmente conhecida como brusca (JOHNSTON & SOARES apud SANTOS, 2008), quina-do-campo, quina-do-Brasil ou quina-do-Rio-Grande (CORRÊA apud SANTOS, 2008; GIACOLMELLI, 2005). Na Argentina, recebe os nomes de brusquilla, coronillo-del-campo, quina-del-campo ou tola (TORTOSA apud SANTOS, 2008). No Uruguai, é conhecida como coronillo-del-campo ou quina-del-campo (CORRÊA apud SANTOS, 2008).

O estudo fitoquímico da *Discaria americana* se faz necessário devido ao uso desta espécie na medicina popular em algumas regiões do Rio Grande do Sul. As cascas da raiz são utilizadas como agente antitérmico, no tratamento de doenças de pele, contra afecções estomacais, diabetes e como tônico sob a forma de chás e infusões. A casca da raiz tem princípio amargo, adstringente, com sabor picante. Recentemente, pesquisadores constataram a atividade antimicrobiana dos extratos metanólicos e etéreos básicos de *D. americana*. Foi, também, constatada a presença de alcalóides ciclopeptídicos, denominados de Discarinas A, B, C, D, M e N além de Adouetina-Y, Franganina e Frangulanina, todos do tipo 14 membros, e Discareno C e D (GIACOMELLI et al., 2004). Outros autores encontraram também na *D. americana* compostos voláteis, como óleos essenciais com potente atividade antioxidante (RODRIGUEZ et al., 2008). Além de estarem sendo estudadas para uso medicinal, espécies

do gênero *Discaria* também são observadas como fitorremediadoras, por meio do desenvolvimento de interação com o fungo do gênero *Frankia* (BOLAÑOS et al., 2002; VALVERDE et al., 2002; CHAIA et al., 2006; CUSATO et al., 2007).

A *D. americana* é caracterizada quimicamente apresentando flavonóides, saponinas, triterpenos, ciclopeptídeos, alcalóides ciclopeptídicos. Estes metabólitos secundários já foram isolados, identificados e suas estruturas químicas já foram determinadas. Em outras espécies do gênero *Discaria* foram isolados, tanto das cascas da raiz quanto das partes aéreas, os mesmos alcalóides ciclopeptídicos (MACHADO et al., 1995; MOREL et al., 1995; GIACOMELLI et al., 2005; MASCARETTI et al., 1972; SILVA et al., 1974; TSCHESCHE et al., 1980; RIVERA et al., 1984; RODRIGUEZ et al., 2008).

1.2 ALCALÓIDES

Entre os diversos metabólitos secundários que constituem a *Discaria americana*, os alcalóides foram eleitos como aqueles em que este trabalho concentra seus esforços. As razões para tal opção serão no próximo segmento expostas.

Os alcalóides são um grupo de produtos naturais que exercem poderosos efeitos fisiológicos no organismo dos mamíferos, o que faz deles importantes agentes terapêuticos. São vários os exemplos de alcalóides conhecidos que são utilizados na medicina no tratamento de várias doenças tais como a atropina, morfina, quinina e vincristina. No entanto, alguns alcalóides são extremamente venenosos como os alcalóides do fungo do esporão do centeio, os quais foram responsáveis pelo envenenamento de milhares de pessoas na Europa durante a Idade Média devido ao consumo do pão de centeio contaminado pelo fungo. O efeito psicotrópico também é característico de alguns alcalóides dentre os quais estão a arecolina (estimulante), a cafeína (estimulante), a cocaína (psicotrópico) e a nicotina (psicotrópico) (WATERMAN, 1998 apud SIMÕES et al., 2004).

Sabe-se que as plantas são uma importante fonte de alcalóides, mas esses compostos também podem ser encontrados em animais, fungos e bactérias ou sintetizados em laboratórios. Os alcalóides podem ser encontrados em todas as partes de um vegetal, no entanto há um acúmulo preferencial em um ou mais órgãos ou tecidos, tais como tecidos de

crescimento ativo. Sua síntese ocorre no retículo endoplasmático e é concentrado nos vacúolos. Geralmente são armazenados em locais diferentes de onde foram sintetizados (WATERMAN, 1998 apud SIMÕES et al., 2004).

A maioria possui propriedades básicas por ter em sua estrutura um nitrogênio amínico que pode ser primário, secundário ou terciário além de ser possível a existência de vários nitrogênios em uma mesma molécula sendo que muitos possuem propriedades farmacológicas. São encontrados em aproximadamente 14,2% dos gêneros de plantas superiores como talófitas, pteridófitas, gimnospermas e, na sua grande maioria, angiospermas (WATERMAN, 1998 apud SIMÕES et al., 2004).

Sua definição é relativamente complexa uma vez que não há uma separação precisa entre alcalóides propriamente ditos e aminas complexas de ocorrência natural. Os alcalóides podem ser definidos como uma substância orgânica cíclica de origem natural, a qual contém um nitrogênio com estado de oxidação negativo e com distribuição limitada dentre os organismos vivos. Porém, essa definição exclui vários compostos nitrogenados como aminas, aminoácidos, peptídeos, proteínas, ácidos nucleicos, nucleotídeos, porfirinas, vitaminas e compostos nitro e nitroso. Diferentes pesquisadores contribuíram para outras definições (HESSE, 1978; IKAN, 1991; BRUNETON, 1993; WATERMAN, 1998 apud SIMÕES et al., 2004), no entanto nenhuma conseguiu definir completamente os alcalóides.

Os alcalóides podem ser divididos em alcalóides verdadeiros, contendo um átomo de nitrogênio em um anel heterocíclico, sendo classificados de acordo com o sistema anelar presente na molécula; em protoalcalóides, com o átomo de nitrogênio não heterocíclico; e em pseudoalcalóides, que são compostos nitrogenados com ou sem anéis heterocíclicos os quais não são derivados de aminoácidos. Além disso, os alcalóides podem ser caracterizados de acordo com seu precursor biogênico tais como aminoácidos, isoprenos, policetídeos, ácido nicotínico, L-triptofano, L-tirosina, purinas entre outros. Muitos dos alcalóides podem ser opticamente ativos (SIMÕES et al., 2004).

1.2.1 Alcalóides Ciclopeptídicos

Entre as classes de alcalóides, são os alcalóides ciclopeptídicos que respondem pelo objetivo principal deste trabalho. Esta opção metodológica se deu por conta de que (1) esta classe de compostos é tradicionalmente de interesse do NPPN em razão de ser um dos objetivos do grupo o completo mapeamento da estereoquímica absoluta dos alcalóides

ciclopeptídicos desta planta; e. (2) em função da importância das propriedades que estes metabólitos apresentam.

Alcalóides ciclopeptídicos estão presentes em plantas da família Rhamnaceae podendo ser encontrados em algumas espécies de outras famílias, tais como Sterculiaceae, Urticaceae, Pandaceae, Rubiaceae, Hymenocardiaceae, Celastraceae. São encontrados nas folhas, flores, casca da raiz, tronco de árvore e sementes, no entanto são de difícil isolamento devido ao fato de estarem presentes em pequenas quantidades. Normalmente, o rendimento desses metabólitos, com relação ao material seco da planta, varia de 0,01 a 0,9%, o que depende de vários fatores como o método de isolamento, a região em que crescem e a maturidade da planta (MALDANER, 2005).

O termo alcalóide peptídico foi primeiramente proposto por Goutarel et al. em 1964. Mais tarde, Tschesche sugeriu a denominação “alcalóide ciclopeptídico”, como sendo uma designação mais adequada, considerando que essas bases, apresentam um anel macrociclo em sua estrutura (Figura 6), a única exceção é a Lasiodina-A (Figura 5). Portanto, alcalóides ciclopeptídicos são considerados todos aqueles que possuem um anel macrociclo em sua estrutura. Eles são classificados, de acordo com o número de átomos que fazem parte do macrociclo, em treze, quatorze ou quinze membros. Às vezes, entre as unidades A e B pode ocorrer um aminoácido adicional (intermediário), sendo designado como E (MALDANER, 2005; GIACOMELLI, 2005; GOURNELIS et al., 1997).

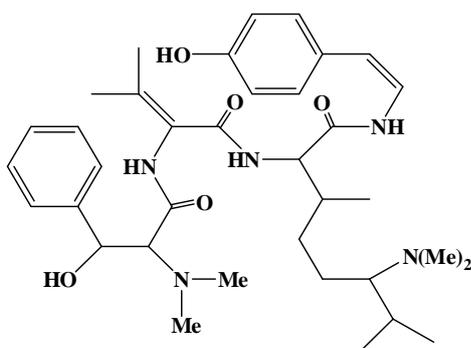


Figura 5: Estrutura do alcalóide peptídico linear Lasiodina-A (MALDANER, 2005).

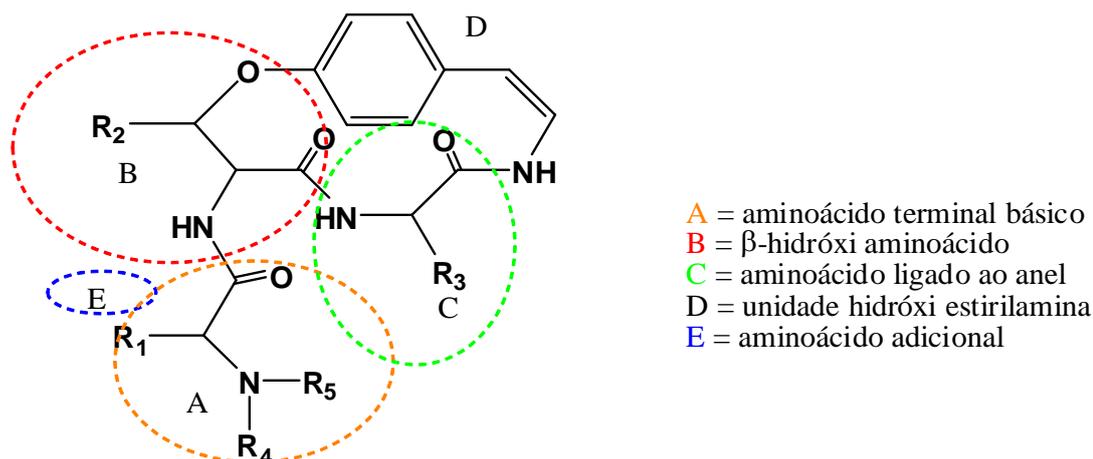


Figura 6: Estrutura básica dos alcalóides ciclopeptídicos (MALDANER, 2005).

Alcalóides ciclopeptídicos são um grupo de bases poliamídicas, as quais apresentam em sua estrutura uma unidade *p*-hidroxiestirilamina derivada da tirosina, cujo fragmento é formado por um α -aminoácido, um β -hidroxiamonoácido (3-hidroxi prolina, 3-hidroxi leucina ou 3-hidroxi fenilserina), além de um aminoácido terminal N-mono ou dimetilado (CARO et. al, 2012; MOSTARDEIRO et. al, 2013).

Os alcalóides ciclopeptídicos, principalmente os encontrados na família Rhamnaceae, têm sido definidos como estruturas com anéis de 13, 14 e 15 membros em que a ligação dos peptídeos de 10 ou 12 membros se expande até as posições 1,3 ou 1,4 do anel. Outra classificação pode ser feita levando em conta o número de anéis e membros, os quais se encaixam em cinco grupos (Figura 7): 4(13)-, 5(13)-, 4(14)-, 5(14)- e 4(15). Com base nessa classificação, estão listados alguns alcalóides ciclopeptídicos nas Tabelas de 1 a 11, que na sequência deste trabalho serão apresentados, de acordo com o número de anéis e membros de suas estruturas (EAST et al., 1998; SUKSAMRARN et al., 2005; TOUMI et al., 2007; TAN & ZHOU, 2006; MOREL et al., 2009; GOURNELIS et al., 1997).

Dos alcalóides peptídicos encontrados até 2009, aproximadamente 209 alcalóides peptídicos foram isolados de plantas superiores, incluindo dois alcalóides peptídicos lineares e sete alcalóides ciclopeptídicos neutros. Dentre esses, mais de 100 alcalóides ciclopeptídicos foram isolados de plantas do gênero *Ziziphus*¹, 52 com anéis ciclopeptídicos de 13 membros,

¹ O gênero *Ziziphus* pertence à família Rhamnaceae. Foi a partir do estudo deste gênero que foram obtidos os primeiros conhecimentos a cerca dos alcalóides ciclopeptídicos da família Rhamnaceae, incluindo a classificação destes quanto ao número de membros e de anéis ciclopeptídicos.

² De agora em diante, sempre que um alcalóide ciclopeptídico cuja estrutura está representada nas Tabelas anteriores for citado, o mesmo virá acompanhado de um número, em negrito, o qual se refere a sua localização

53 de 14 membros e 10 de 15 membros (EAST et al., 1998; SUKSAMRARN et al., 2005; TOUMI et al., 2007; TAN & ZHOU, 2006; MOREL et al., 2009; GOURNELIS et al., 1997).

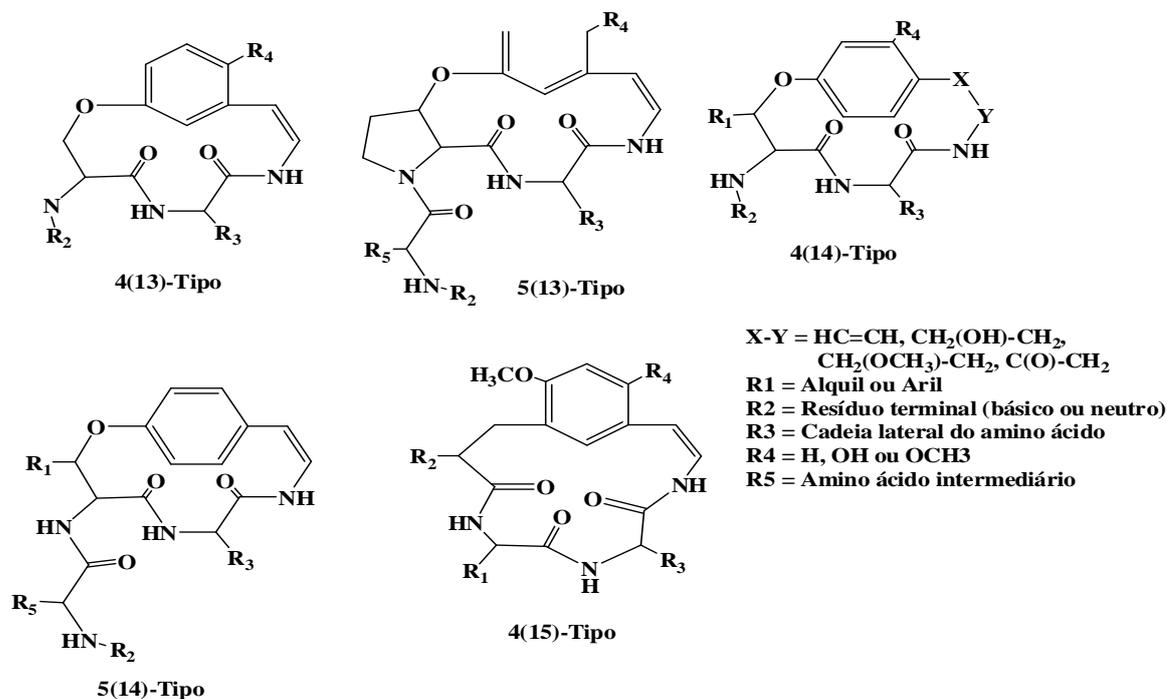
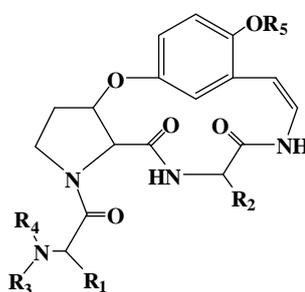


Figura 7: Estruturas gerais dos alcalóides ciclopeptídicos *sensu stricto* com anéis de 4(13)-, 5(13)-, 4(14)- e 4(15)-membros (MOREL et al., 2009).

Tabela 1

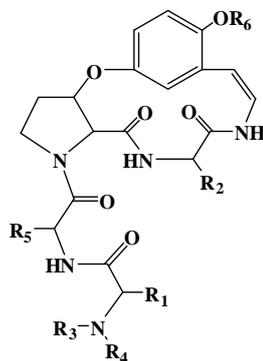
Alcalóide ciclopeptídico do tipo 4(13)-Nummularina C (MOREL et al., 2009)



Alcalóide	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
(1) Nummularina C	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	CH ₃	CH ₃	CH ₃
(2) Nummularina R	CH ₂ C ₈ H ₆ N	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
(3) Nummularina S	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	CH ₂ C ₆ H ₅	H	H	CH ₃
(4) Rugosanine B	CH ₂ C ₈ H ₆ N	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₃	CH ₃	CH ₃
(5) Sativanina G	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃

Tabela 2

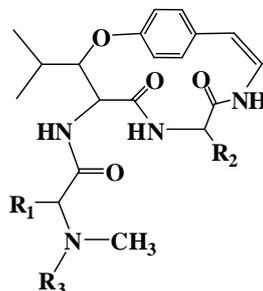
Alcalóides ciclopeptídicos do tipo 5(13)-Zizifina A (MOREL et al., 2009)



Alcalóide	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
(6) Amfibina H	CH ₃	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₃	CH ₃	CH(CH ₃) ₂	CH ₃
(7) Nummularina B	CH ₃	CH ₂ C ₆ H ₅	H	CH ₃	CH(CH ₃) ₂	CH ₃
(8) Nummularina N	H	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₃	CH ₃	CH(CH ₃) ₂	CH ₃
(9) Paliurina A	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₃
(10) Paliurina B	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	H	CH ₃	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₃
(11) Paliurina C	CH ₂ C ₆ H ₅	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH ₃
(12) Paliurina D	CH ₂ C ₆ H ₅	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	H	CH ₃	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH ₃
(13) Paliurina F	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH ₃
(14) Rugosanina A	CH ₃	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	CHO	CH ₃	CH(CH ₃) ₂	CH ₃
(15) Sativanina H	CH ₃	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	CH ₃	CH ₃	CH(CH ₃) ₂	CH ₃
(16) Zizifina N	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₂	CH ₃	CH ₃	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	CH ₃
(17) Zizifina O	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₂	CH ₃	H	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	CH ₃
(18) Zizifina P	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₂	CH ₃	CH ₃	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	H
(19) Zizifina Q	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₂	CH ₃	CH ₃	CH(CH ₃) ₂	CH ₃

Tabela 3

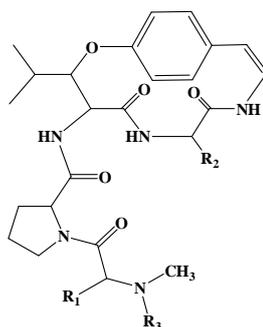
Alcalóides ciclopeptídicos do tipo 4(14)-Frangulanina (MOREL et al., 2009)



Alcalóide	R ₁	R ₂	R ₃
(20) Adouetina Y'	CH ₂ C ₆ H ₅	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH ₃
(21) Americina	CH(CH ₃) ₂	CH ₂ C ₈ H ₆ N	H
(22) Discarina A	CH ₂ C ₈ H ₆ N	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH ₃
(23) Discarina B	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH ₂ C ₈ H ₆ N	CH ₃
(24) Discarina E	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH ₃
(25) Discarina F	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH ₃
(26) Frangufolina	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	CH ₃
(27) Frangulanina	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	CH ₃
(28) Nummularina K	CH ₂ C ₈ H ₆ N	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	CH ₃
(29) Scutianina B	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₃
(30) Scutianina C	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₃
(31) Scutianina D	CH ₂ C ₆ H ₅	CH(OH)C ₆ H ₅	CH ₃
(32) Scutianina E	CH ₂ C ₆ H ₅	CH(OH)C ₆ H ₅	CH ₃
(33) Scutianina G	CH ₂ C ₆ H ₅	CH(OH)C ₆ H ₅	CH ₃
(34) Scutianina J	CH(OH)C ₆ H ₅	CH(OH)C ₆ H ₅	CH ₃
(35) Scutianina K	CH ₂ C ₆ H ₅	CH(OH)C ₆ H ₅	CH ₃
(36) Walterina A	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₃
(37) Walterina B	CH ₂ C ₈ H ₆ N	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH ₃
(38) Walterina C	CH ₂ C ₈ H ₆ N	CH ₃	CH ₃

Tabela 4

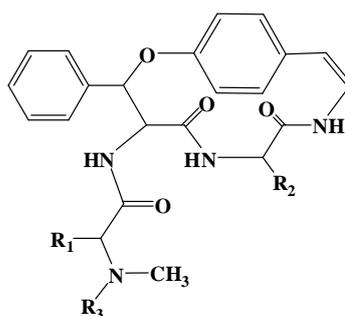
Alcalóides ciclopeptídicos do tipo 5(14)-Scutianina A (MOREL et al., 2009)



Alcalóide	R ₁	R ₂	R ₃
(39) Scutianina A	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₃
(40) Scutianina F	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₂ C ₆ H ₅	H

Tabela 5

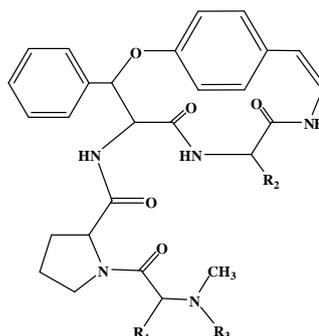
Alcalóides ciclopeptídicos do tipo 4(14)-Integerrina (MOREL et al., 2009)



Alcalóide	R ₁	R ₂	R ₃
(41) Adouetina Y	CH ₂ C ₆ H ₅	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH ₃
(42) Ceanotina E	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	CH ₃
(43) Condalina A	CH ₂ C ₆ H ₅	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	H
(44) Discarina C	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	CH ₃
(45) Discarina D	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₃
(46) Nummularina E	CH(OH)CH ₃	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	CH ₃
(47) Scutianina L	CH ₂ C ₆ H ₅	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH ₃
(48) Scutianina M	CH ₂ C ₆ H ₅	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	H

Tabela 6

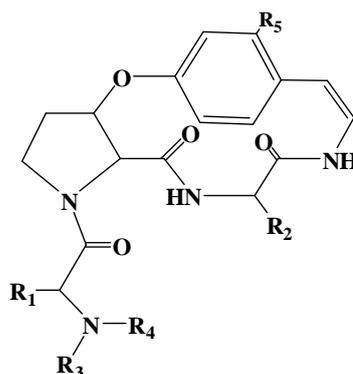
Alcalóides ciclopeptídicos do tipo 5(14)-Adouetina Z (MOREL et al., 2009)



Alcalóide	R ₁	R ₂	R ₃
(49) Adouetina Z	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₃

Tabela 7

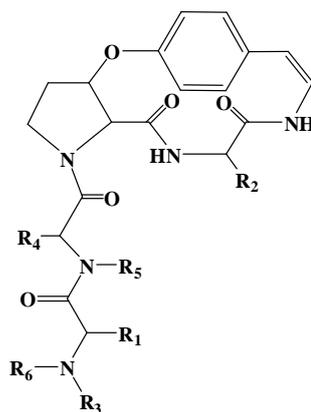
Alcalóides ciclopeptídicos do tipo 4(14)-Amfibina F (MOREL et al., 2009)



Alcalóide	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
(50) Mauritina C	CH(CH ₃) ₂	CH ₂ C ₆ H ₅	H	CH ₃	H

Tabela 8

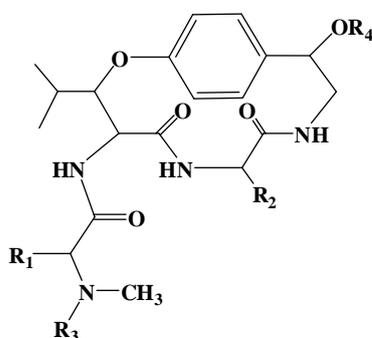
Alcalóides ciclopeptídicos do tipo 5(14)-Amfibina B (MOREL et al., 2009)



Alcalóide	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
(51) Mauritina A	CH ₃	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₃	CH(CH ₃) ₂	H	CH ₃
(52) Mauritina E	CH ₃	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₃	CH(CH ₃) ₂	H	CH ₃
(53) Mauritina B	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₃	CH(CH ₃) ₂	H	CH ₃
(54) Mauritina D	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH ₃	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	H	CH ₃
(55) Mauritina K	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	H	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	H	H

Tabela 9

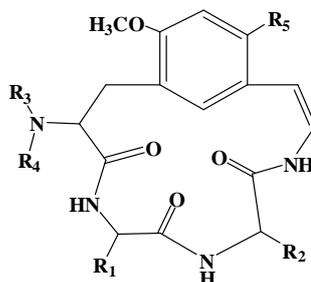
Alcalóides ciclopeptídicos do tipo 4(14)-Pandamina (MOREL et al., 2009)



Alcalóide	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
(56) Discarina L	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	CH ₃	H
(57) Sanjoinina D	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	CH ₃	CH ₃

Tabela 10

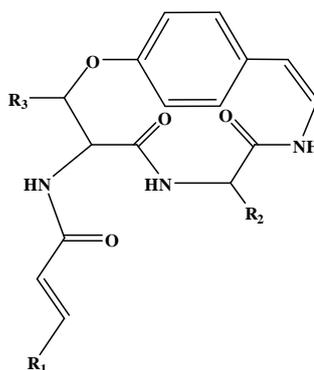
Alcalóides ciclopeptídicos do tipo 4(15)-Mucronina A (MOREL et al., 2009)



Alcalóide	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
(58) Abissinina C	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	H	H	H
(59) Mucronina A	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₃	CH ₃	H
(60) Mucronina F	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	H	H	OCH ₃
(61) Mucronina G	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	H	H	OCH ₃
(62) Mucronina H	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH ₂ C ₆ H ₅	H	H	H

Tabela 11

Alcalóides ciclopeptídicos do tipo neutro (MOREL et al., 2009)



Alcalóide	R ₁	R ₂	R ₃
(63) Discareno C	CH(CH ₃) ₂	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	C ₆ H ₅
(64) Discareno D	CH(CH ₃) ₂	CH ₂ C ₆ H ₅	C ₆ H ₅
(65) Discarina M	CH(CH ₃) ₂	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	CH(CH ₃) ₂
(66) Discarina N	C ₆ H ₅	CH(OH)C ₆ H ₅	CH(CH ₃) ₂
(67) Scutianene C	C ₆ H ₅	CH(OH)C ₆ H ₅	CH(CH ₃) ₂

Os alcalóides ciclopeptídicos são também chamados de alcalóides peptídicos cíclicos, alcalóides ansapeptídicos e fencipeptídeos, sendo formados por uma porção estirilamina, 2 ou 3 α -aminoácidos ligados ao anel, além de apresentar ou não uma ou duas cadeias laterais de resíduos de N-metil ou N,N-dimetil α -aminoácidos, dentre os quais podemos destacar a alanina, a glicina, a leucina, a isoleucina, a fenilalanina, o triptofano, a tirozina e a valina (GOURNELIS et al., 1997; TAN & ZHOU, 2006; MOREL et al., 2009). Essa importante unidade dos alcalóides ciclopeptídicos isolados de várias espécies de *Ziziphus* (Rhamnaceae), a estirilamina, apresentou relevante atividade sedativa em animais *in vivo*, sendo que a eliminação desta porção provoca a perda significativa da atividade biológica (SUH et al., 1997; HWANG et al., 2001; TAN & ZHOU, 2006).

Metabólitos naturais que são, os alcalóides ciclopeptídicos são frequentemente estudados para fins de tratamento para várias doenças infecciosas, uma vez que apresentam atividades biológicas tais como anti-inflamatória, antimicrobiana (ex: Discarina-A (**22**)² e B (**23**), Frangufolina (**26**), Scutianina-B (**29**), Numularina-K (**28**), B (**7**), R (**2**) e S (**3**), Condalina-A (**43**), anfibina-H (**6**), Rugosanina-A (**14**) e B (**4**), Abissenina-C (**58**), Mucronina-F (**60**), G (**61**) e H (**62**)) e antifúngica (ex: Frangufolina (**26**), Numularina-K (**28**), B (**7**), R (**2**) e S (**3**), Anfibina-H (**6**), Rugosanina-A (**14**) e B (**4**), Abissenina-C (**58**)), além de antitérmica, sedativa (ex: Frangufolina (**26**) [Sanjonina-A]³) e hipnótica, somadas a uma atividade antiplasmódica (ex: Zizifina-N (**16**) e Q (**19**)), antimicobacteriana e imunoestimuladora (ex: Paliurina-A (**9**), B (**10**), C (**11**), D (**12**) e F (**13**) e Sativanina-G (**5**)) (SUH et al., 1997; HWANG et al., 2001; TAN & ZHUO, 2006; MOREL et al., 2009; GIACOMELLI et al., 2004; SUKSAMRARN et al., 2005).

1.2.1 Classificação dos alcalóides ciclopeptídicos

Os alcalóides ciclopeptídicos se classificam em alcalóides de treze, quatorze e quinze membros.

² De agora em diante, sempre que um alcalóide ciclopeptídico cuja estrutura está representada nas Tabelas anteriores for citado, o mesmo virá acompanhado de um número, em negrito, o qual se refere a sua localização em tais Tabelas.

³ Sanjonina-A e G2, juntamente com sanjonina-AH1 e Adialdeído (alcalóides sintéticos derivados das sanjoninas naturais) foram relatados como sendo efetivos na inibição das ATPases dependentes das Ca-calmodulinas, as quais estão estreitamente relacionadas com atividade sedativa. Em adição, sanjonina-D (**57**) se mostrou inibidora das fosfodiesterasas dependentes das Ca-calmodulinas. Nummularina-H e paliurina-A (**9**) são capazes de alterar o comportamento do sono.

1.2.1.1 Alcalóides ciclopeptídicos de treze membros

Esta classe de alcalóides identifica-se pela presença de uma unidade 2-metóxi-5-hidróxi-estirilamina (Figura 8). Outro aspecto importante nesse tipo de alcalóide é o grupamento trans-3-hidróxiprolina (Figura 8), presente como hidroxiaminoácido em todos os compostos do gênero.

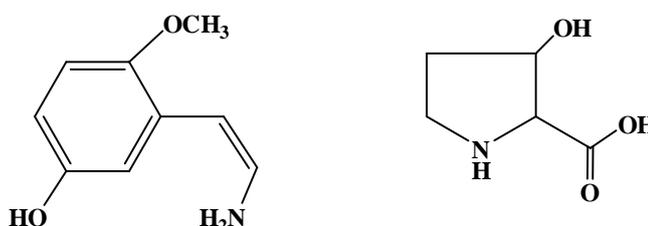


Figura 8: Unidades 2-metóxi-5-hidróxi-estirilamina e trans-3-hidróxiprolina (MALDANER, 2005).

Como exemplo de alcalóides de treze membros pode-se citar a Sativanina H (**15**) isolada da espécie *Ziziphus sativa* (Rhamnaceae) a qual é utilizada para o tratamento de úlceras. Outros alcalóides isolados são a Nummularina B (**7**) e a Nummularina N (**8**), os quais estão presentes na espécie *Ziziphus nummularia* (MALDANER, 2005).

1.2.1.2 Alcalóides ciclopeptídicos de quatorze membros

Os compostos pertencentes a esse grupo abrangem a maior parte dos alcalóides ciclopeptídicos isolados. Suas principais características são a presença de um β -hidroxiaminoácido e de uma unidade hidroxiestirilamina (Figura 9) (MALDANER, 2005).

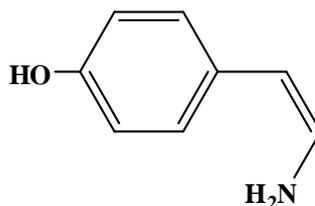


Figura 9: Unidade hidroxiestirilamina (MALDANER, 2005).

Dentre os alcalóides ciclopeptídicos de quatorze membros existem três subgrupos, os quais dependem do tipo do β -hidroxiaminoácido do anel: β -hidroxileucina (Figura 10) nos

alcalóides do tipo Frangulanina (**27**); β -hidroxifenilalanina (figura 11) nos alcalóides do tipo Nummularina-E (**46**); e trans-3-hidroxirolina (Figura 8) nos alcalóides do tipo Maurutina-A (**51**) (MALDANER, 2005).

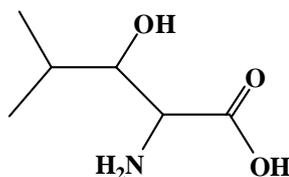


Figura 10: β -hidroxileucina (MALDANER, 2005).

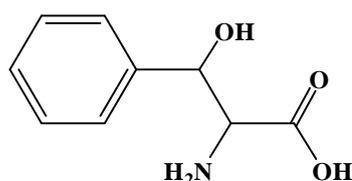


Figura 11: β -hidroxifenilalanina (MALDANER, 2005).

A ocorrência desta classe de compostos foi primeiramente relatada na espécie *Scutia buxifolia* Reiss (Rhamnaceae), em 1964, quando foi observada por pesquisadores a presença de alcalóides ciclopeptídicos. No entanto, em 1967, um grupo da Universidade de Bon, realizou um estudo mais detalhado com a raiz desta planta, coletada em Santa Catarina, da qual foi isolado o alcaloide ciclopeptídico Scutianina-A (**27**) (MALDANER, 2005).

Com o auxílio do desenvolvimento de técnicas cromatográficas e de métodos para a determinação estrutural em meados da década de setenta, houve um aumento considerável no número de alcalóides ciclopeptídicos isolados. Dentre eles, pode-se destacar os alcalóides ciclopeptídicos Scutianina-C (**30**), -D (**31**), -E (**32**) (que é diastereoisômero da Scutianina-D (**31**)), -F (**40**) e -G (**33**) (diastereoisômero da Scutianina-D (**31**) e da -E (**32**)). A estereoquímica da unidade β -hidroxileucina dos diastereoisômeros foi determinada como sendo L-eritro em (**31**) e D-eritro (**32**) e a unidade β -fenilserina como sendo L-treo em (**31**) e D-treo em (**32**) (MALDANER, 2005; GIACOMELLI, 2005).

Morel et al. em 1994, isolaram pela primeira vez de *Scutia buxifolia*, o alcalóide ciclopeptídico Scutianina-J (**34**). A continuação deste estudo pelo grupo resultou no isolamento e elucidação estrutural de dois novos alcalóides ciclopeptídicos, Scutianina-K (**35**) e -L (**35**). Outra espécie da família Rhamnaceae, a *Discaria febrífuga*, foi estudada por Morel

et al., em 1995. Da casca da raiz desta espécie, foi isolado um novo alcalóide ciclopeptídico, Discarina-L (**47**).

No ano de 1999, esse grupo isolou da espécie *Walteria douradinha* pertencente à família das Esterculiaceae, dois novos alcalóides ciclopeptídicos, Walterina-A (**36**) e Walterina-B (**37**), além de dois alcalóides ciclopeptídicos já conhecidos, Adoutina Y' (**20**) e Scutianina-B (**29**). Na continuação do estudo desta mesma espécie, *Walteria douradinha*, neste mesmo ano, o grupo isolou um novo alcalóide ciclopeptídico, Walterina-C (**38**).

Esse mesmo grupo, em 2002, estudou outra espécie, também pertencente à família Rhamnaceae, *Condalia buxifolia*, coletada no Rio Grande do Sul, resultando no isolamento de um novo alcalóide ciclopeptídico, Condalina-A (**43**), além de três alcalóides já conhecidos, Adoutina Y' (**20**), Scutianina-B (**29**) e Scutianina-C (**30**).

Devido aos vários artigos publicados sobre a família Rhamnaceae, demonstrando a presença de alcalóides ciclopeptídicos, Giacomelli et al. (2004), estudaram a espécie *Discaria americana*, a qual aqui é novamente objeto de estudo, da qual isolaram, da casca da raiz, sete alcalóides ciclopeptídicos de estruturas conhecidas e dois ciclopeptídeos neutros, denominados de Discarina-M (**65**) e Discarina-N (**66**).

Todos os alcalóides aqui citados possuem estrutura de anéis de 14 membros.

1.2.1.3 Alcalóides ciclopeptídicos de quinze membros

Esses alcalóides ciclopeptídicos têm como principal característica a presença da unidade 2-metóxi-5-(β -vinil)-fenilalanina (Figura 12). Um exemplo desses compostos é o alcalóide Mucronina-A (**59**), o qual foi isolado da espécie *Ziziphus mucronata* (MALDANER, 2005).

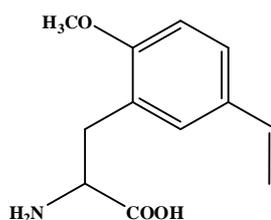


Figura 12: Unidade 2-metóxi-5-(β -vinil)-fenilalanina (MALDANER, 2005).

1.2.2 Biossíntese dos alcalóides ciclopeptídicos

Quanto à biossíntese dos alcalóides ciclopeptídicos, a consulta à literatura permite afirmar que pouco se sabe sobre a rota biossintética dos alcalóides ciclopeptídicos em plantas. No entanto, as investigações realizadas com prováveis intermediários possibilitaram propor algumas rotas principais. Uma delas surgiu com o isolamento de alcalóides lineares como a lasiodina-A (Figura 5), a qual apresenta um grupamento fenólico livre em sua estrutura e a unidade diidroaminoácido. Além desse alcalóide linear, outros também foram isolados da espécie de esponja marinha, *Cliona celeta* (GIACOMELLI, 2005).

A quinona pode ser um provável precursor, sendo composta por uma dihidrofenilalanil-fenilalanina, a qual está ligada a uma tirosina oxidada (Figura 13). O que pode ocorrer nessa rota biossintética é uma descarboxilação, seguida de uma adição de Michael, o que formará um macrociclo. Outra possibilidade é o ataque de um grupo β -hidroxil à carbonila da quinona seguida de uma descarboxilação e consequente formação do hidroxilfenolato (Figura 13). Há ainda a possibilidade de um ataque da hidroxila fenólica ao carbono β da amida α,β -insaturada (Figura 13) (GIACOMELLI, 2005).

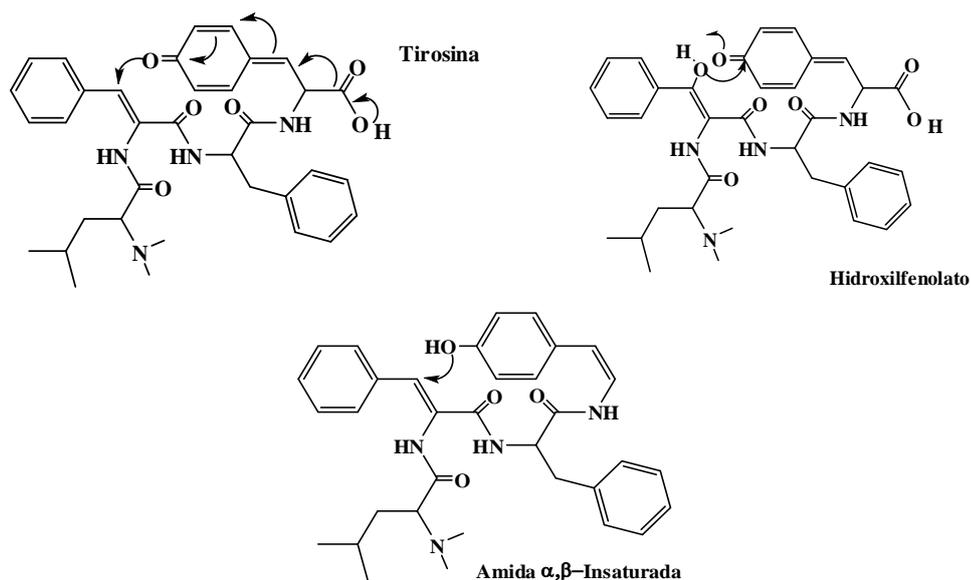


Figura 13: Estruturas dos prováveis precursores dos alcalóides ciclopeptídicos (GIACOMELLI, 2005).

Para alcalóides ciclopeptídicos de 15 membros que não possuem a unidade β -fenoxiaminoácido, a ligação entre o anel benzênico ocorre através dos átomos de carbono. Uma alternativa para a biossíntese desses alcalóides pode ocorrer com a unidade *p*-

fenilenodialanina (Figura 14) como precursora ou, ainda, o correspondente dihidro (Figura 14) (GIACOMELLI, 2005).

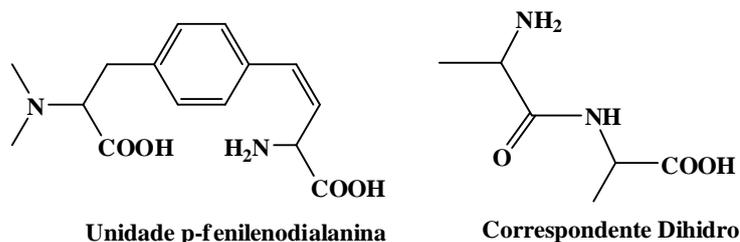
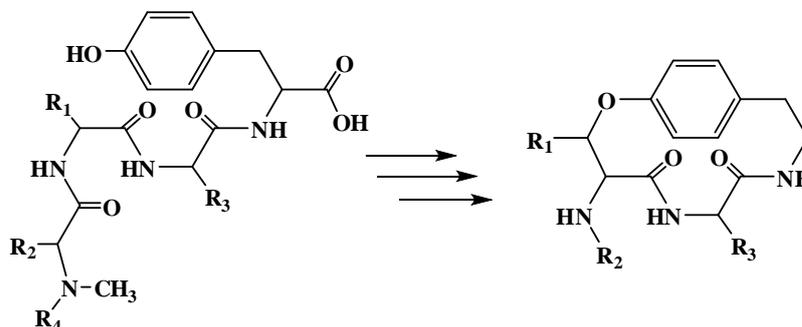


Figura 14: *p*-fenilenodialanina e seu correspondente dihidro (GIACOMELLI, 2005).

Outros autores relataram o primeiro estabelecimento de cultura de tecidos celulares da espécie *Ceanothus americanus* (Rhamnaceae) e um estudo de seus metabólitos secundários. De acordo com eles, essa espécie não acumula alcalóides, porém após adicionar aminoácidos tetrapeptídeos apropriados, ocorreu a formação de estruturas perfeitas de alcalóides ciclopeptídicos, concordando com aqueles alcalóides ciclopeptídicos produzidos pelas raízes de plantas. Nesse estudo foi utilizado uma mistura de valina, leucina, isoleucina, tirosina, fenilalanina e triptofano, e foram isolados novos tetrapeptídeos Val-Leu-Leu-Tyr, Ile-Leu-Leu-Tyr, Phe-Phe-Leu-Tyr e Phe-Phe-Ile-Tyr, sendo esses prováveis precursores dos alcalóides ciclopeptídicos Americana (**21**), Frangulanina (**27**), Ceanotina-E (**42**) e Adoutina-Y (**41**), respectivamente. A tirosina, como esperado, é o aminoácido básico usado como a principal estrutura na biossíntese da unidade estirilamina dos alcalóides ciclopeptídicos de 13 e 14 membros, ao mesmo tempo em que os alcalóides ciclopeptídicos de 15 membros podem envolver uma *m*-fenilenodialanina (Figura 15) (MOREL, 2009; GOURNELIS, 1997).

Tabela 12

Proposta para a formação biossintética dos precursores dos alcalóides ciclopeptídicos (MOREL, 2009)



Alcalóide	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
(41) Adouetina Y	CHC ₆ H ₅	CH ₂ C ₆ H ₅	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH ₃
(27) Frangulanina	CH(CH ₃) ₂	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CHCH ₂ (CH ₃) ₂	CH ₃
(21) Americina	CH(CH ₃) ₂	CH(CH ₃) ₂	CHCH ₂ C ₈ H ₆ N	H
(42) Ceanotina E	CHC ₆ H ₅	CH ₂ C ₆ H ₅	CHCH ₂ (CH ₃) ₂	CH ₃

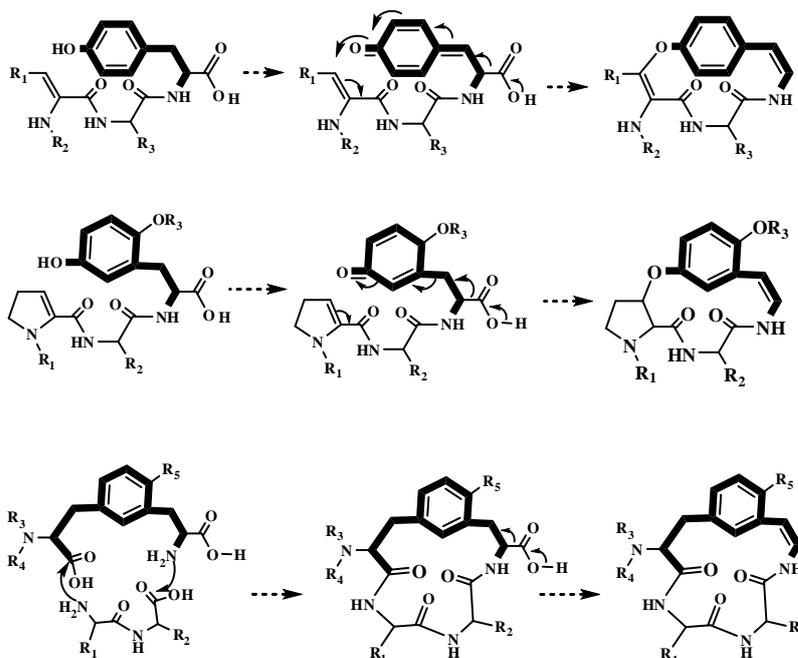


Figura 15: Percurso biogenético para a macrociclização dos alcalóides ciclopeptídicos de 13-, 14- e 15- membros (MOREL, 2009).

1.3 ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS

Atividade farmacológica é um efeito causado por uma substância ativa utilizada no tratamento ou cura de enfermidades que causam alguma desordem no organismo humano. Ela pode ser proveniente de plantas medicinais, chás e infusões, ou de medicamentos industrializados. No caso das plantas medicinais, não são totalmente conhecidas as moléculas bioativas que promovem tal efeito. Nesse sentido, há vários estudos sobre as principais atividades biológicas das mais variadas espécies de plantas conhecidas e utilizadas na medicina popular.

Em várias partes do mundo, ao longo dos séculos, as plantas das quais foram isolados alcalóides ciclopeptídicos são utilizadas para o tratamento de muitas doenças. Isso ocorre pois essas substâncias possuem atividades biológicas importantes como por exemplo as atividades sedativa, antimicrobiana, hiperglicêmica, antioxidante, anti-plasmódica, anti-infecciosa, antidiabética, inibidora da acetilcolinesterase, inseticida, imuno-estimulante, diurética, analgésica, anticonvulsivante, anti-inflamatória, entre outras. É por isso que Morel et al. (2009), afirmam que os alcalóides ciclopeptídicos precisam de uma maior atenção.

Dentre as diversas atividades farmacológicas que poderiam ser estudadas, neste trabalho está destacada a atividade antimicrobiana. Tal opção se deve ao fato de que essas atividades biológicas respondem por aquelas que mais tradicionalmente interessam ao NPPN. Colabora para essa decisão o fato de que já foi relatada a atividade antimicrobiana, por alguns autores, da espécie *Discaria americana*, objeto deste estudo (GIACOMELLI, 2005; SANTOS, 2008).

1.3.1 Atividade antimicrobiana

A descoberta de agentes antimicrobianos ou antibióticos pode representar o maior avanço para o tratamento farmacológico das últimas cinco décadas ou mais, devido aos progressos ilimitados nos estudos envolvendo a terapêutica medicamentosa. Esse grupo de medicamentos atua de forma efetiva contra o efeito de espécies microbianas patogênicas e oportunistas, as quais são responsáveis por diversas doenças, que provocam incapacidade prolongada ou, até mesmo, óbito de seres humanos, não tendo restrição de faixa etária, situação financeira ou estado de saúde (STÜKER, 2007).

São muitas as espécies de microorganismos (bactérias, fungos, actinomeicetos) que produzem substâncias que impedem o crescimento de outros microorganismos, conhecidas

como antibióticos. O termo *antibiótico* é comumente empregado para incluir agentes antimicrobianos sintéticos, tais como as sulfonamidas e as quinolonas. Essas substâncias são muito importantes no tratamento de doenças infecciosas. Além disso, os antibióticos possuem acentuadas diferenças em suas propriedades físicas, químicas e farmacológicas, tanto no mecanismo de ação quanto no espectro bacteriano (GOODMAN e GILMAN, 2005).

O aparecimento crescente de novos mecanismos bacterianos e, conseqüentemente, sua capacidade de resistir à ação dos antimicrobianos tem influenciado na corrida das indústrias farmacêuticas em busca de novos compostos (SEJAS et al., 2003).

As plantas são capazes de produzirem inúmeras substâncias naturais com potencial antimicrobiano e imunomodulador, a fim de se adaptarem às agressões do meio ambiente. Dentre essas substâncias, destacam-se os isoflavonóides, os indóis, os fitoesteróis, os polissacarídeos, os sesquiterpenos, os alcalóides, as glucanas, os taninos, as vitaminas e os minerais (WILLIAMS, 2001).

Essas substâncias antimicrobianas ou antibióticas fazem parte de um grupo especial de agentes farmacológicos, normalmente produzidos e obtidos a partir de organismos vivos. São compostos que devem possuir atividade letal ou inibitória contra muitas espécies microbianas em pequenas concentrações. Além de evitar o desenvolvimento de microorganismos resistentes, essas substâncias não devem apresentar efeitos adversos ao hospedeiro e precisam ter estabilidade química, entre outras características. Dessa forma, a atividade antimicrobiana é um item essencial na caracterização de extratos vegetais, dada a importância e o grande número de doenças infecciosas que assolam as pessoas (COWAN, 1999).

Ensaio que testam a suscetibilidade dos antimicrobianos são importantes, pois avaliam se os microrganismos são suscetíveis a diferentes agentes antimicrobianos. Os resultados destes testes implicam diretamente na escolha do agente antimicrobiano a ser utilizado no tratamento. Dessa forma, a realização dos testes sem controle de qualidade adequado pode indicar o uso de um antimicrobiano inadequado, o que causa falha e risco no tratamento de enfermos (SEJAS et al., 2003).

1.3.1.1 Ensaio para determinação da atividade antimicrobiana

Os métodos utilizados para a investigação da atividade antimicrobiana têm sido desenvolvidos de modo que os resultados sejam confiáveis, de eficaz reprodutibilidade e validados. O *screening* dos extratos de plantas medicinais para a atividade antimicrobiana é, normalmente, realizado pelo método de difusão em disco ou pelo método de bioautografia,

com a finalidade de fazer uma checagem preliminar antes de partir para estudos com maior detalhamento (PORTO, 2005).

Os antimicrobianos naturais são utilizados mundialmente para vários fins, entre eles se destaca o uso na conservação de alimentos, no tratamento de sementes, no combate de microorganismos que causam doenças de pele, no tratamento de úlcera gástrica, além de várias outras doenças. No entanto, um dos principais interesses é o uso de antimicrobianos naturais para combater aos microorganismos resistentes (BARBOSA, 2008).

Para a realização dos ensaios de atividade antimicrobiana *in vitro* são empregados vários métodos e técnicas. Para tanto, são utilizados, preferencialmente, cepas padronizadas, ou microorganismos isolados de materiais biológicos, os quais podem ser espécies de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e de fungos. Além disso, para a determinação da atividade antimicrobiana, qualitativa ou quantitativamente, é necessária a utilização de padrões, normalmente antibióticos, que possuam ação antimicrobiana conhecida, comprovada e de amplo espectro afim de que sirvam de parâmetro para a comparação com os dados obtidos das amostras testadas. Os padrões mais utilizados são o Cloranfenicol (antibiótico produzido pela bactéria *Streptomyces venezuelae*, sendo este, também, sintetizado) e a Nistatina (antibiótico produzido pelo gênero *Streptomyces*) (SEJAS et al., 2003).

No método de difusão em ágar a substância a ser avaliada é colocada em um reservatório (disco de papel, cavidade no meio de cultura ou cilindro sobre a superfície) estando em contato com o meio de cultura sólido que foi anteriormente inoculado com o microorganismo padrão. Após o período de incubação, é realizada a leitura, por meio da medição do diâmetro do halo de inibição, do crescimento microbiano formado (ISENBERG, 1992; KONEMAN, 1997; NCCLS, 2003).

Outro método utilizado é o de diluição, um método quantitativo, que consiste em dissolver, de forma homogênea, uma pequena quantidade da amostra original em um meio líquido ou sólido e após realizar diluições da amostra original e inocular o microorganismo teste. Depois da incubação é feita a leitura, sendo considerada a primeira diluição em que não se observa turvação. Dessa forma, é possível determinar a concentração inibitória mínima (CIM ou MIC) que corresponde a menor concentração com poder de inibir o crescimento microbiano (COWAN, 1999).

Para o método de bioautografia é utilizada uma placa cromatográfica em camada delgada, onde a amostra é eluída. Em seguida, a placa é imersa em um meio de cultura sólido fundido, previamente inoculado com o microorganismo teste, e, então, incubado. A leitura é

feita pela verificação do halo, com atividade antimicrobiana, formado no composto da amostra aplicada (STÜKER, 2007; RAHALISON et al., 1991).

1.3.1.1.1 Atividade antimicrobiana dos alcalóides ciclopeptídicos

Ao se pesquisar a literatura, pode-se encontrar uma indicação quanto à atividade antibacteriana dos alcalóides ciclopeptídicos Adoutina-Y (**41**); Scutianinas -B (**29**), -C (**30**), -D (**31**), -E (**32**), -F (**33**) e -M (**47**); Condalina-A (**43**) e Scutianeno-D/-C (**67**), avaliada por uma bioautografia direcionada usando o bioensaio TLC (cromatografia em camada delgada) frente às cepas bacterianas *Staphilococcus aureus*, *Staphilacoccus epidermidis* e *micrococcus luteus* (gram-positiva), *Klebsiella penumoniae*, *Salmonella setubal* e *Escherichia coli* (gram-negativa) e frente a dois fungos, *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans*.

Tal estudo obteve o seguinte resultado: os alcalóides que apresentaram amplo espectro de atividade foram Condalina-A (**43**) seguido por Scutianina-E (**32**). Já os alcalóides ciclopeptídico Scutianina-D (**31**), um diastereoisômero de Scutianina-E (**32**), mostrou modesta atividade frente a *M. luteus* (25,0 µg), *S. epidermidis* (50,0 µg) e *E. coli* (50,0 µg). Por outro lado, o alcalóide Scutianina-M (**47**), um diastereoisômero de Condalina-A (**43**), foi inativo frente a todas as cepas. O alcalóide Scutianina-B (**29**) apresentou apenas atividade antimicrobiana frente às cepas de *E. coli* (12,5 µg) ao mesmo tempo em que os alcalóides Scutianina-C (**30**), -F (**33**) e Scutianeno-D/C (**67**) não apresentaram atividade frente a todas as cepas testadas. A partir desses resultados foi possível sugerir que a estereoquímica e a presença do resíduo de β -fenilserina na estrutura dos alcalóides possui influencia na atividade antimicrobiana. Outro dado importante é a presença do grupo *N,N*-dimetil (*N*-metil) nas estruturas que não apresentaram atividade, como o alcalóide (**67**) quando comparado com o alcalóide (**31**) (MOREL, 2009).

Os alcalóides Zizifina-N (**16**) e -P (**18**), isolados da espécie *Ziziphus oenoplia* var. *brunoniana*, exibiram fraca atividade antituberculose frente à *Mycobacterium tuberculosis* com ambos os mesmos valores de MIC de 200 µg/mL (MOREL, 2009).

Os alcalóides Scutianinas-A (**39**), B (**29**), -C (**30**), -D (**31**), -E (**32**), Mauritina-A (**51**), -B (**53**), -C (**50**), -D(**54**), -E(**52**) e Mucronina-F (**60**), -G (**61**) e -H (**62**) são inibidores do fungo *Pythium debarryanum* (GOURNELIS, 1997). Nenhum dos alcalóides Adouetina-Y' (**20**); Scutianinas-B (**29**), -C (**30**), -D (**31**), -E (**32**), -F (**40**) e -M (**40**); Condalina-A (**43**) e Scutianeno-D/C (**67**) apresentou atividade antifúngica frente à *S. cedrevisiae* e à *C. albicans*. Outros estudos mostraram que o alcalóide Frangulanina (**27**), isolado da espécie *Melochia*

odorata, exibiu moderada atividade frente *C. albicans* (25,0 µg), *C. neoformans* (> 50,0 µg) e *S. cedrevisiae* (50 µg) pelo método de bioautografia direta. O alcalóide ciclopeptídico Mauriatina-K (55) isolado de *Z. mauritiana* exibiu significativa atividade fungicida contra *Botrytis cinerea* (MOREL, 2009).

1.4 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL E ESTEREOQUÍMICA

A estrutura molecular é a principal característica de uma substância qualquer. A organização espacial dos distintos átomos constituintes da molécula determina a identidade do composto. É dessa identidade que emanam todas as características e propriedades da substância. Pode-se garantir que as propriedades físicas, químicas, biológicas, farmacológicas ou de qualquer tipo de uma dada substância e suas aplicações industriais ou medicinais são consequência de sua estrutura molecular. Dessa forma, reconhecer essa característica fundamental das substâncias é de necessidade, interesse e conveniência óbvios (FELICIANO et al, 2007). Essa afirmação ganha ainda mais relevo quando se leva em consideração o que foi dito anteriormente, quanto à utilização dos produtos naturais são usados como importantes agentes no tratamento de diversas enfermidades pela medicina popular.

Entretanto, há moléculas que diferem entre si minimamente quanto a sua estrutura molecular. Em razão disso, há um ramo da química que necessariamente precisa ser considerado quando se trabalha com determinação estrutural: a estereoquímica. Este ramo estuda os aspectos tridimensionais das moléculas. As moléculas possuem arranjos espaciais muito variados e é essa variedade de arranjos que possibilita que se originem diversos fenômenos, como a isomeria, por exemplo. A isomeria diz respeito à possibilidade de existência de moléculas com o mesmo número e espécie de átomos, mas com arranjos geométricos diferentes. É em função desses diferentes arranjos e da presença de certos grupamentos nessas substâncias, ou seja, da determinação de sua configuração estrutural, que determinadas propriedades podem estar presentes nessas moléculas. Não é diferente no caso dos alcalóides ciclopeptídicos aqui estudados.

1.4.1 Métodos para obtenção da determinação estrutural e estereoquímica

Vários métodos analíticos são utilizados para a elucidação estrutural dos alcalóides ciclopeptídicos tais como espectrometria de massa (EM) e ressonância magnética nuclear (RMN) especialmente RMN 2D (COSY, NOESY, HMQC, HMBC). Além desses, as análises

de Ultra Violeta, Infravermelho, Dicroísmo Circular, Difração de Raio-X e a degradação química também têm sido uma importante ferramenta na elucidação estrutural dessa classe de alcalóides (MOREL, 2009).

As análises de RMN ^1H e ^{13}C fornecem tanto informações sobre a fórmula constitucional quanto sobre os aspectos estereoquímicos e conformacionais dos compostos analisados. Além desses métodos, a difração de raio-X oferece grande auxílio na elucidação estrutural no que diz respeito às análises conformacionais e configuracionais sendo que seu único problema é a dificuldade de se obter cristais perfeitos para o teste. O que ocorre geralmente é a obtenção de substâncias amorfas ou que formam cristais na forma de agulhas, muito finos e pequenos para a cristalografia (MALDANER, 2005).

Outro método muito utilizado na elucidação estrutural absoluta das unidades dos aminoácidos que constituem os alcalóides ciclopeptídicos é a cromatografia gasosa enantiosseletiva. Apesar de ser muito usada para esse fim, apenas o hidroxiaminoácido que participa do macrociclo não pode ainda ser analisado devido à decomposição desta unidade durante o procedimento de hidrólise ácida (MALDANER, 2005).

1.4.1 Determinação estrutural e estereoquímica dos alcalóides ciclopeptídicos

Quanto à determinação estrutural e a estereoquímica dos alcalóides ciclopeptídicos, a literatura pesquisada possibilitou referir que os dados espectrais de RMN ^1H e RMN ^{13}C são uma importante ferramenta para que se possa determinar a configuração relativa ou absoluta do β -hidroxiaminoácido. Os alcalóides ciclopeptídicos, principalmente os do tipo com anéis de 14 membros, contêm ambos os β -hidroxiaminoácidos nas formas L e D. Embora a configuração L tenha sido estabelecida na maioria dos casos, muitos alcalóides, como as Scutianinas-D (**31**), -E (**32**), -L (**47**) e -M (**48**), isolados da espécie *Scutia buxifolia*, e a Condalina-A (**43**), isolado de *Condalia buxifolia*, possuem o resíduo aminoácido do anel também com a configuração estereoquímica oposta (L/D-*treo*- β -hidroxileucina, L/D-*eritro*- β -hidroxileucina, L/D-*treo*- β -fenilserina e L/D-*eritro*- β -fenilserina) (MOREL, 2009; GOURNELIS, 1997).

No espectro de RMN ^1H , na forma *eritro* do β -hidroxiaminoácido pode ser visto um $J_{\alpha,\beta}$ 8 Hz, enquanto que na forma *treo* pode ser visto um $J_{\alpha,\beta}$ 2 Hz. O espectro de RMN ^{13}C fornece informações acerca da configuração absoluta do β -hidroxiaminoácido, ou seja, na forma L-*treo* o carbono α pode ser visto em 55,0 ppm, e na forma D-*treo* pode ser visto em 53,8 ppm. Além disso, é possível observar a diferença no carbono β de uma forma mais

evidente, pois na forma *L-eritro* pode ser visto em 81,5 ppm e na forma *D-eritro* pode ser visto em 87,0 ppm (MOREL, 2009; GOURNELIS, 1997).

Alguns autores relataram a importância da utilização da cromatografia gasosa enantiosseletiva para a determinação da configuração dos resíduos dos aminoácidos que compõem as estruturas dos alcalóides ciclopeptídicos (SIERRA et al, 1972). Essa técnica utiliza os derivados hidrolisados, diastereoisômeros, das unidades dos aminoácidos para a comprovação da configuração (R)D ou (S)L (HAN et al, 1987).

Segundo Joullié e colaboradores (1987), a combinação de dados de RMN e cristalografia de raio-X auxiliam na análise conformacional. Além disso, a utilização de dicroísmo circular fornece informações complementares para os estudos de RMN dos alcalóides ciclopeptídicos. Dessa forma, a combinação dos vários métodos acima citados possibilita a determinação da configuração absoluta dos compostos, incluindo os alcalóides ciclopeptídicos.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS GERAIS

2.1.1 Espectroscopia Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram registrados por um espectrômetro Bruker DPX 400 do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria, operado a 400,13 MHz para ^1H e 100,62 MHz para ^{13}C . O preparo das amostras foi feito com solventes deuterados (0,4mL) e 20,0 mg do composto em tubos de 5 mm. Foi utilizado clorofórmio deuterado (CDCl_3) no preparo das amostras.

O registro dos deslocamentos químicos foram medidos em “ppm” (partes por milhão) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). A referência interna utilizada para os espectros de hidrogênio foi o TMS (δ 0,00) e para os espectros de carbono o CDCl_3 (77,0).

2.1.2 Aparelho de Ponto de Fusão

A determinação dos valores dos pontos de fusão (não corrigidos) das substâncias foi dada por um aparelho MQAPF-301 da Microquímica.

2.1.3 Cromatógrafo Gasoso

A análise cromatográfica foi realizada em cromatógrafo a gás VariaM 3800 o qual está equipado com detector de ionização de chama (DIC), injetor “SPLIT-SPLITLESS”, sendo que a temperatura do injetor é de 220°C e do detector é de 280°C. O H_2 foi utilizado como gás de arraste, a 50 Kpa de pressão (1mL/min). A fase estacionária da coluna empregada foi a Lipodex-E, a qual tem 25m de comprimento e 0,32mm de diâmetro.

2.1.4 Fluorímetro

A leitura dos poços das placas da atividade antimicrobiana foi realizada por meio do Fluorímetro SpectraMaxM2, em 280nm.

2.1.5 Materiais e Métodos Cromatográficos

Para as colunas cromatográficas (CC) foi utilizada sílica gel tipo 60 (Sorbent), 70-230 e 230-400 mesh como adsorvente. As cromatografias em camada delgada (CCD) foram realizadas sob placas de cromatofolhas de alumínio como suporte e sílica gel 60 F₂₅₄ como adsorvente. Já para a cromatografia em placa preparativa (CCDP), foi utilizado sílica gel 60 GF₂₅₄ (Sorbent), placas de vidro de 20x20 cm e água deionizada para a deposição.

A revelação dos cromatogramas foi realizada por meio de lâmpadas ultravioleta ($\lambda = 254$ e 365 nm, Spectroline), reativo de Dragendorff para revelar alcalóides. Os solventes que foram utilizados são das marcas Vetec e Tedia, de grau comercial, os quais foram purificados por técnicas específicas de destilação. As misturas de solventes utilizados na cromatografia CC, CCD e CCDP são abordados na Tabela 13 com seus respectivos gradientes de polaridade (v/v).

Tabela 13

Sistemas Solventes utilizados na cromatografia CC, CCD e CCDP

	Sistema Solvente	Proporção
1	Hexano:AcOET	Gradiente
2	AcOET: MeOH	Gradiente
3	CHCl ₃ :MeOH	Gradiente
4	Hexano:Acetona	Gradiente
5	CH ₂ Cl ₂ : Acetona	10%
6	CHCl ₃ :n-Butanol	3%
7	Hexano:CH ₂ Cl ₂ :Dietilamina	5:4,4:0,6
8	CHCl ₃ :Éter Etilico:n-Butanol	5:4:1
9	Hexano:CH ₂ Cl ₂ :Acetonitrila	4:5:1
10	CH ₂ Cl ₂ :n-Butanol:Ácido Oxálico (5%)	6%: gotas
11	CH ₂ Cl ₂ :n-Butanol	5%
12	CH ₂ Cl ₂ :AcOET	20%
13	Hexano:AcOET:n-Butanol	5:4:1
14	CHCl ₃ :Éter Etilico	25%
15	CHCl ₃ :AcOET	1:1
16	CHCl ₃ :AcOET:MeOH:Éter Diisopropílico	80:20:0,75mL:0,75mL
17	CH ₂ Cl ₂ :n-Butanol	10%

18	EtOH	100%
19	MeOH	100%
20	Éter Etílico:MeOH	2%

2.1.4 Difração de Raio-X

Os dados de intensidade de raio-X foram medidos num espectrômetro Bruker Kappa X8 APEX II CCD sistema difractômetro equipado com um monocromador de grafite e um cristal de Mo K α selado tubo cerâmico de raios X ($\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$).

2.2 PREPARAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

O material vegetal (casca da raiz) foi coletado no distrito de São Rafael localizado no município de São Sepé, RS, no mês de fevereiro de 2012. A identificação deste material foi feita através de comparação com amostra já existente no Herbário do Departamento de Botânica da UFSM, sob o número SMDB 2829.

Após a separação da parte lenhosa e da casca da raiz, todo o material vegetal foi colocado em estufa, 50°C, a fim de secar e eliminar a possibilidade de proliferação de fungos. Após a secagem, as cascas da raiz foram moídas em moinho de Wiley resultando em 4.248,4 g da casca moída. Os 4.248,4 g foram submetidos à extração a quente com aparelho de Soxlet, utilizando metanol como solvente. Ao final de várias extrações, até a exaustão do material vegetal, o solvente foi evaporado em rota evaporador com pressão reduzida, obtendo, assim, o extrato bruto (920,5 g), caracterizado como um resíduo escuro viscoso avermelhado.

O processo de fracionamento do extrato bruto foi realizado em três etapas, as quais estão exemplificadas na Figura 16. A primeira etapa do fracionamento ocorreu com a diluição em água do extrato bruto, seguida da adição de NH_4OH (pH ~ 9) e posterior extração com o solvente éter etílico para obter a fração etérea básica (FEB). Na segunda etapa, a FEB foi submetida a uma lavagem com solução ácida de HCl (2N) (pH ~1,5) em um funil de separação, onde foi vertida exaustivamente, a fim de esgotar, da fase orgânica, os alcalóides. Na terceira etapa, a solução aquosa ácida foi basificada com NH_4OH (pH ~ 9) para, enfim, fazer a extração com éter etílico e obter a fração chamada de alcalóides totais (FBEAT). A fase orgânica da primeira etapa foi chamada de Resíduo (FBER).

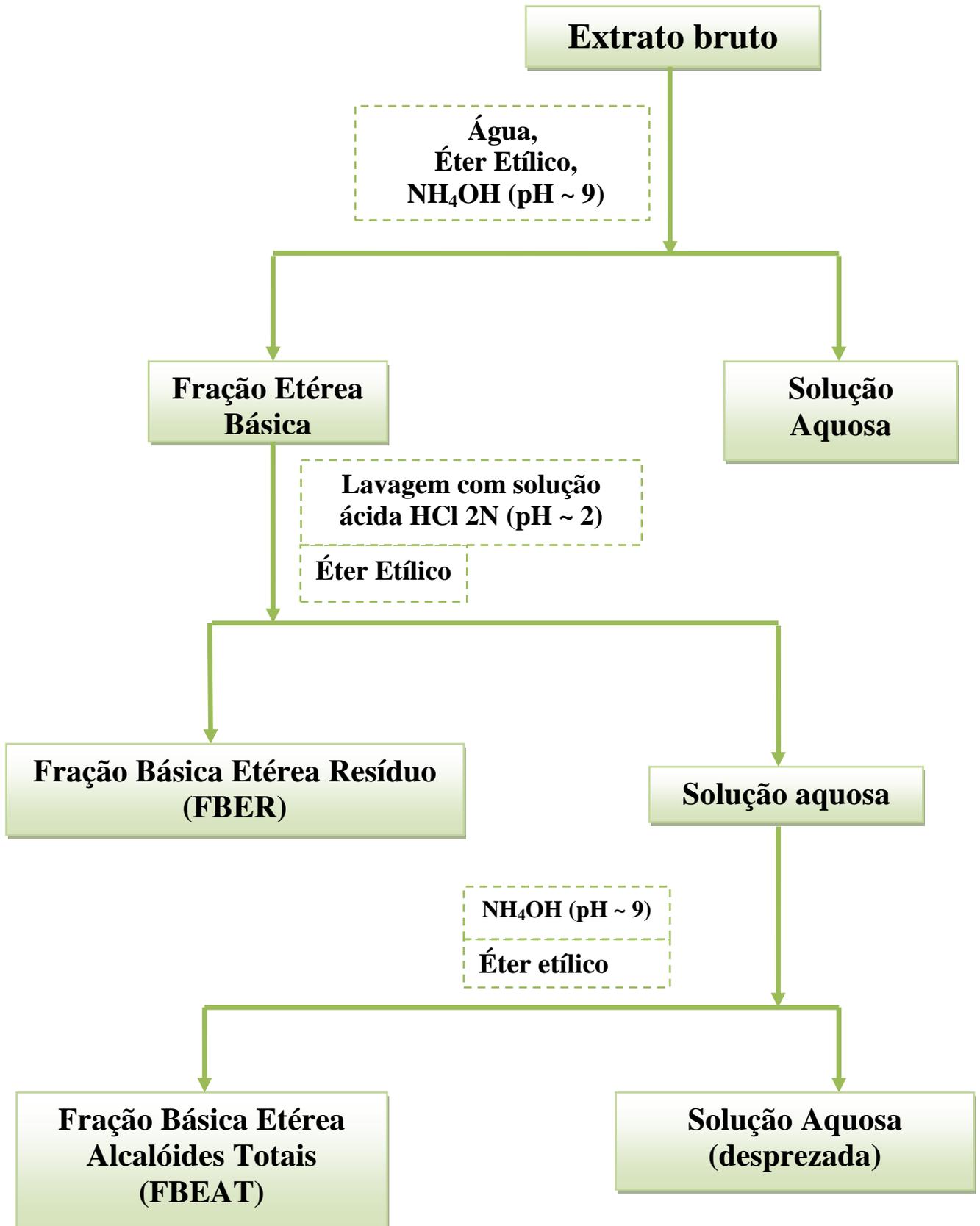


Figura 16: Fracionamento submetido ao extrato bruto das cascas da raiz de *Discaria americana* coletada em São Sepé.

A fração alcalóides totais (4,537g) foi submetida à cromatografia em coluna, na qual foi utilizada sílica gel 60H (70-230 mesh) como adsorvente e Hexano - AcOET - Metanol como sistema eluente, em gradiente de concentrações. Foram coletadas frações de aproximadamente 100,0 mL e analisadas individualmente em CCD. As frações com Rfs semelhantes foram agrupadas conforme indicado na Tabela 14. Essas frações com misturas de substâncias foram submetidas a novos processos de purificação, através de cromatografia em coluna (sílica gel 60H (70-230 mesh)) ou placas preparativas.

Tabela 14
Cromatografia da fração Alcalóides Totais (FBEAT)

Fração	Sistema Solvente	Peso (g)	Substância
1-4 (I)	Hexano: AcOET (30%)	0,0254	mistura de substâncias
5 (II)	Hexano: AcOET (30%)	0,0065	mistura de substâncias
6-11 (III)	Hexano: AcOET (40%)	0,0895	mistura de substâncias
12-13 (IV)	Hexano: AcOET (50%)	0,0165	mistura de substâncias
14-16 (V)	Hexano: AcOET (50%)	0,0185	mistura de substâncias
17-18 (VI)	Hexano: AcOET (50%)	0,0152	mistura de substâncias
19-23 (VII)	Hexano: AcOET (50%)	0,0241	mistura de substâncias
24 (VII)	Hexano: AcOET (50%)	0,0064	mistura de substâncias
25 (IX)	Hexano: AcOET (50%)	0,0259	mistura de substâncias
26 (X)	Hexano: AcOET (50%)	0,0262	10E + mistura de substâncias
27-29 (XI)	Hexano: AcOET (50%)	0,1407	J11 + mistura de substâncias
30 (XII)	AcOET	0,1020	J11 + mistura de substâncias
31 (XIII)	AcOET	0,4948	J09 + mistura de substâncias
32 (XIV)	AcOET	0,5115	J09 + J01 + mistura de substâncias
33-34 (XV)	AcOET	0,5741	J01 + mistura de substâncias
35-45 (XVI)	AcOET	0,5291	J01 + J02 + mistura de substâncias
46-96 (XVII)	AcOET	0,5607	J02 + mistura de substâncias
97-124 (XVIII)	AcOET:CH ₃ OH (5%)	0,0873	mistura de substâncias
125-141 (XIX)	AcOET:CH ₃ OH (5%)	0,0789	mistura de substâncias
142-144 (XX)	AcOET:CH ₃ OH (15%)	0,9580	mistura de substâncias
145-169 (XXI)	AcOET:CH ₃ OH (30%)	0,0832	mistura de substâncias
170-175 (XXII)	AcOET:CH ₃ OH (50%)	0,1197	mistura de substâncias

A FBER foi submetida a sucessivas lavagens com acetona, a fim de purificar o composto **J21**, o que resultou num total de 56,3 mg. O restante da fração não foi cromatografado por falta de tempo.

2.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO*

2.3.1 Micoorganismos Utilizados

Utilizaram-se cepas referência da American Type Culture Collection (ATCC), constituídas de microorganismos Gram-positivos, Gram-negativos e fungos, os quais estão indicados na Tabela 15.

Tabela 15
Microorganismos indicadores

Característica	Microorganismo
Gram- positivas	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633
	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 33019
	<i>Enterococcus spp.</i> ATCC 6589
	<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048
Gram-negativas	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
	<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 1304
	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028
	<i>Burkholderia cepacia</i> ATCC 17759
	<i>Shigella sonnei</i> 25931
Fungos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027
	<i>Cândida albicans</i> ATCC 10231
	<i>Cândida tropicalis</i> ATCC 18803
	<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 28952
	<i>Sacharomyces cerevisiae</i> ATCC 2601
	<i>Cryptococcus gatti</i> ATCC 2601

2.3.2 Padrões Utilizados nos Ensaio Microbiológicos

No método de Microdiluição em Caldo, os antibióticos padrões utilizados foram Ampicilina, Azitromicina e Levofloxacina para bactérias e Nistatina para fungos.

2.3.3 Meios de Cultura Empregados (Fórmula gL⁻¹)

Tabela 16
Meios de cultura empregados (GIACOMELLI, 2005)

Meio de Cultura	Composição	Quantidade (g)
Meio ágar nutriente:		
➤ meio utilizado para o repique de bactérias	/ Cloreto de sódio	8,0
	/ Extrato de carne	3,0
	/ Peptona de gelatina	5,0
	/ Ágar bacteriológico	15,0
Meio ágar sabouraud dextrosado:		
➤ meio utilizado para o repique de fungos	/ Dextrose	40,0
	/ Peptona de carne	5,0
	/ Peptona de caseína	5,0
	/ Ágar	15,0
Meio caldo caseína de soja:		
➤ meio utilizado no cultivo de bactérias	/ Dextrose	2,5
	/ Cloreto de sódio	5,0
	/ Fosfato dibásico de potássio	2,5
	/ Peptona de caseína	17,0
	/ Peptona de soja	3,0
Meio caldo sabouraud dextrosado:		
➤ meio utilizado para o cultivo de fungos	/ Peptona de caseína	40,0
	/ Peptona de carne	5,0
	/ Dextrose	5,0

Todos os meios foram preparados de acordo com as instruções do fabricante, em 1000 mL de água destilada e, esterilizados em autoclave a 121 °C, 1 atm., por 20 minutos. As cepas dos microrganismos indicadores foram armazenadas em tubos de ensaio ágar inclinado contendo 5 mL de ágar nutriente para bactérias ou ágar Sabouraud para fungos, em geladeira. Os repiques são realizados sempre de 24 a 48 horas antes de cada análise.

2.3.4 Preparo das Suspensões Microbianas (Inóculo)

Com o auxílio de uma alça de platina esterilizada, foram transferidas culturas recentes dos microrganismos indicadores para tubos de ensaio contendo 5 mL de solução salina a 0,8%. Padronizou-se o inóculo fazendo a comparação deste com o tubo padronizado 0,5 da

escala nefelométrica de McFarland, que corresponde a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ (Unidades Formadoras de Colônia por mL).

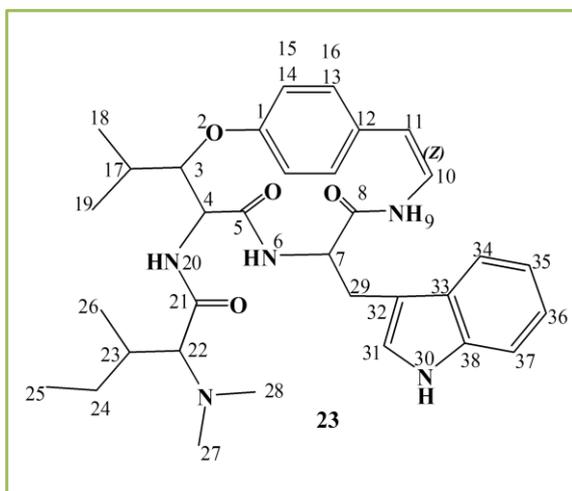
2.3.5 Determinação da CIM pelo Método de Microdiluição

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 microorganismo selecionado. Dessa forma, os ensaios de microdiluição em caldo foram realizados em placas de 96 micropoços utilizando a técnica modificada do NCCLS (2003). Foram efetuadas uma série de diluições das amostras em meio caldo de caseína de soja e de Sabourand, contendo 2% do surfactante Tween 80, a partir da concentração de 500 µg.mL⁻¹ 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 leitura no Fluorímetro, em 280 nm, para a verificação da CIM.

Dos poços que não apresentaram crescimento foram retiradas alíquotas que foram inoculadas em meio sólido e assim foi possível determinar a CLM (concentração letal mínima), considerada a menor concentração de substância capaz de matar 99,9 % das unidades formadoras de colônia. Os testes foram realizados em triplicata, sendo realizada a análise do padrão (**Ampicilina, Azitromicina, Levofloxacina e Nistatina**) simultaneamente.

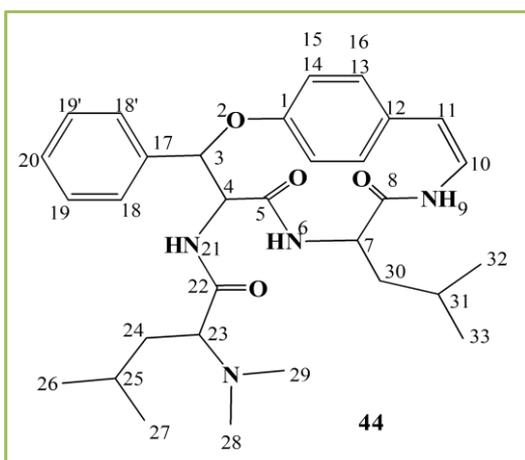
2.4 Metabólitos Isolados e Identificados de *Discaria americana* Gill & Hoocker

2.4.1 Alcalóides Ciclopeptídicos

2.4.1.1 Discarina B, J01 (**23**): sólido branco; Pf.: 238-240°C (Lit. 235-236°C; GIACOMELLI,

2005); Rf.: 0,25 (CHCl₃:MeOH 3%); $[\alpha]_D^{20} = -172$ (c 0,1 em CHCl₃); isolado da fração etérea básica (alcalóides totais) de *D. americana* coletada em São Sepé (Tabela 14); RMN de ¹H a 400,13 MHz, CDCl₃: δ 4,81 (1H, dd, $J=1,8, 8,0$ Hz, H-3), δ 4,35 (1H, dd, $J=8,0, 10,4$ Hz, H-4), δ 5,91 (1H, d, $J=6,6$ Hz, NH-6), δ 4,17 (1H, dd, $J=6,6, 14,7$ Hz, H-7), δ 6,05 (1H, d, $J=9,2$ Hz, NH-9), δ 6,39 (1H, H-10), δ 6,22

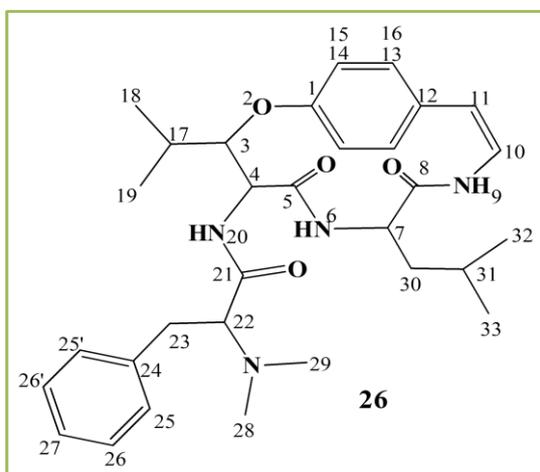
(1H, d, $J=7,6$ Hz, H-11), δ 6,78- 7,18 (4H, H-13, -14, -15, -16), δ 1,89 (1H, *m*, H-17), δ 1,14 (1H, d, $J=6,8$ Hz, H-18), δ 0,90 (3H, d, $J=6,8$ Hz, H-19), δ 6,90 (1H, H-20), δ 2,36 (1H, d, $J=4,5$ Hz, H-22), δ 1,68 (1H, *m*, H-23), δ 1,23-1,39 (1H, *m*, H-24, H_{24'}), δ 0,85 (3H, *t*, H-25), δ 0,79 (3H, d, $J=6,8$ Hz, H-26), δ 1,97 (6H, *s*, N-(CH₃)₂-27, -28), δ 3,20 (1H, dd, $J=4,8, 14,7$ Hz, H-29), δ 2,77 (1H, dd, $J=6,4, 14,7$ Hz, H-29'), δ 8,19 (1H, *s*, NH-30), δ 7,18 (1H, H-31), δ 7,31 (1H, d, $J=8,0$ Hz, H-34), δ 7,12 (1H, H-35), δ 7,10 (1H, H-36), δ 7,58 (1H, d, $J=8,0$ Hz, H-37); RMN de ¹³C a 100,62 MHz, CDCl₃: δ 156,3 (C-1), δ 81,6 (C-3), δ 55,7 (C-4), δ 171,3 (C-5), δ 54,3 (C-7), δ 167,7 (C-8), δ 125,6 (C-10), δ 110,9 (C-11), δ 131,5 (C-12), δ 119,7-131,5 (C-13, -14, -15, -16), δ 29,1 (C-17), δ 20,2 (C-18), δ 14,9 (C-19), δ 172,1 (C-21), δ 74,0 (C-22), δ 34,7 (C-23), δ 27,4 (C-24), δ 12,1 (C-25), δ 14,6 (C-26), δ 42,8 (C-27, -28), δ 27,4 (C-29), δ 109,5-136,5 (C-31, -32, -33, -34, -35, -36, -37, -38).

2.4.1.2 Discarina C, J02 (**44**): sólido branco, Pf.: 240-242°C (Lit. 240-242 °C;

GIACOMELLI, 2005); Rf.: 0,6 (CHCl₃:MeOH 3%); $[\alpha]_D^{20} = -239$ (c 0,1 em CHCl₃); isolado da fração etérea básica (alcalóides totais) de *D. americana* coletada em São Sepé (Tabela 14); ¹H-NMR (400 MHz), CDCl₃: δ 6,07 (1H, d, $J=6,5$ Hz, H-3), δ 4,66 (1H, dd, $J=6,5, 8,0$ Hz, H-4), δ 6,19

(1H, d, $J=8,0\text{Hz}$, NH-6), δ 4,08 (1H, m, H-7), δ 6,53 (1H, d, $J=10,5\text{Hz}$, NH-9), δ 6,65 (1H, dd, $J=7,5, 10,5\text{Hz}$, H-10), δ 6,29 (1H, d, $J=7,5\text{Hz}$, H-11), δ 7,04-7,35 (4H, H-13, -14, -15, -16), δ 7,04-7,35 (5H, H-18, -18', -19, -19', -20), δ 7,32 (1H, NH-21), δ 2,54 (1H, dd, $J=5,0, 7,6\text{Hz}$, H-23), δ 0,89/1,13 (1H, m, H-24, H-24'), δ 1,51 (1H, m, H-25), δ 0,79 (3H, d, $J=6,5\text{Hz}$, H-26), δ 0,72 (3H, d, $J=6,5\text{Hz}$, H-27), δ 1,58 [6H, s, N-(CH₃)₂-28, -29], δ 1,19/1,67 (1H, m, H-30, H-30'), δ 1,24 (1H, m, H-31), δ 0,72 (3H, d, $J=6,5\text{Hz}$, H-32), δ 0,63 (3H, d, $J=6,5\text{Hz}$, H-33); RMN de ¹³C a 100,62 MHz, CDCl₃: δ 155,4 (C-1), δ 81,9 (C-3), δ 56,3 (C-4), δ 171,2 (C-5), δ 52,5 (C-7), δ 167,6 (C-8), δ 125,8 (C-10), δ 115,1 (C-11), δ 132,8 (C-12), δ 123,6-132,1 (C-13, -14, -15, -16), δ 137,4 (C-17), δ 127,8-129,0 (C-18, -18', -19, -19', -20), δ 173,8 (C-22), δ 65,7 (C-23), δ 34,0 (C-24), δ 24,5 (C-25), δ 20,7 (C-26), δ 21,9 (C-27), δ 41,0 (C-28, -29), δ 39,4 (C-30), δ 26,0 (C-31), δ 23,1 (C-32), δ 22,8 (C-33).

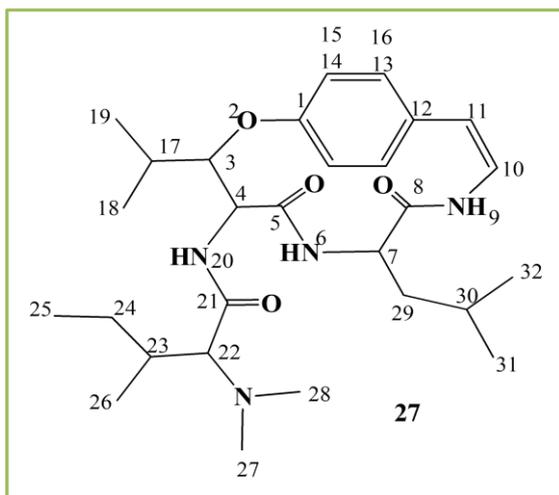
2.4.1.3 Frangulolina J11 (**26**): sólido branco, Pf.: 250-252°C (Lit. 247-249 °C; ABU ZARGA,



1995); Rf.: 0,7 (CHCl₃:MeOH 3%); $[\alpha]_D^{20} = -187$ (c = 0.13 em MeOH); isolada da fração etérea básica (alcalóides totais) de *D. americana* coletada em São Sepé (Tabela 14); ¹H-NMR (400 MHz), CDCl₃: δ 4,92 (1H, dd, $J=1,9, 7,2\text{Hz}$, H-3), δ 4,44 (1H, dd, $J=7,2, 10,2\text{Hz}$, H-4), δ 5,80 (1H, d, $J=7,8\text{Hz}$, NH-6), δ 3,97 (1H, m, H-7), δ 6,40 (1H, d, $J=10,0\text{Hz}$, NH-9), δ 6,58 (1H, dd, $J=7,5, 10,0\text{Hz}$, H-10), δ 6,28 (1H, d, $J=7,5\text{Hz}$, H-11), δ

6,96-7,21 (4H, H-13, -14, -15, -16), δ 1,06 (1H, m, H-17), δ 0,93 (3H, d, $J=6,5\text{Hz}$, H-18), δ 1,18 (3H, d, $J=6,5\text{Hz}$, H-19), δ 7,75 (1H, d, $J=10,2\text{Hz}$, NH-20), δ 3,14 (1H, d, $J=6,2\text{Hz}$, H-22), δ 3,11 (1H, d, $J=6,2\text{Hz}$, H-23), δ 2,75 (1H, m, H-23), δ 6,99-7,21 (5H, H-25, -25', -26, -26', -27), δ 2,18 [6H, s, N-(CH₃)₂-28, -29], δ 1,57/ 1,15 (2H, m, H-30, -30'), δ 1,13 (1H, m, H-31), δ 0,54 (3H, d, $J=6,4\text{Hz}$, H-32), δ 0,58 (3H, d, $J=6,4\text{Hz}$, H-33); RMN de ¹³C a 100,62 MHz, CDCl₃: δ 156,3(C-1), δ 82,1(C-3), δ 55,6 (C-4), δ 171,9 (C-5), δ 52,9 (C-7), δ 167,9 (C-8), δ 125,9 (C-10), δ 116,3 (C-11), δ 131,9 (C-12), δ 122,8-131,9 (C-13, -14, -15, -16), δ 29,6 (C-17), δ 20,6 (C-18), δ 15,3(C-19), δ 172,8 (C-21), δ 70,8 (C-22), δ 31,1 (C-23), δ 140,6 (C-24), δ 126,4-129,2 (C-25, -25', -26, -26', -27), δ 42,2 (C-28, -29), δ 39,6 (C-30), δ 24,7 (C-31), δ 23,4 (C-32), δ 20,8 (C-33).

2.4.1.4 Frangulanina J09 (**27**): sólido branco; Pf.: 275-277°C (Lit. 277-278 °C;

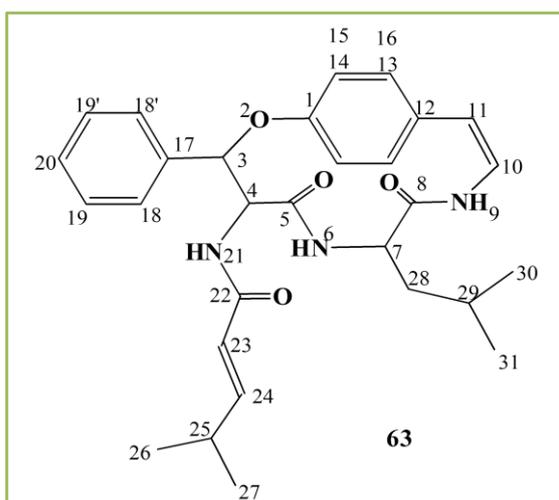


GIACOMELLI, 2005); Rf.: 0,4 (CHCl₃:MeOH 3%); [α]_D²⁰: -288 (c 0,1 em CHCl₃), isolada da fração etérea básica (alcalóides totais) de *D. americana* coletada em São Sepé (Tabela 14); ¹H-NMR (400 MHz), CDCl₃: δ 4,86 (1H, dd, *J*=1,8, 7,5Hz, H-3), δ 4,39 (1H, dd, *J*=7,5Hz, *J*₂=10,0Hz, H-4), δ 5,83 (1H, *d*, *J*=6,7Hz, NH-6), δ 3,92 (1H, m, H-7), δ 6,34 (1H, *d*, *J*=8,0Hz, NH-9), δ 6,49 (1H, *t*, *J*=8,0Hz, H-10), δ 6,34

(1H, *d*, *J*=8,0Hz, H-11), δ 6,97-7,19 (4H, H-13, -14, -15, -16), δ 1,89 (1H, m, H-17), δ 1,18 (3H, *d*, *J*=6,6Hz, H-18), δ 0,93 (3H, *d*, *J*=6,6Hz, H-19), δ 7,29 (1H, *d*, *J*=10,0Hz, NH-20), δ 2,58 (1H, *d*, *J*=2,3Hz, H-22), δ 1,69 (1H, m, H-23), δ 1,42/1,25 (2H, m, H-24, -24'), δ 0,85 (3H, *t*, *J*=7,2Hz, H-25), δ 0,86 (3H, *d*, *J*=7,2Hz, H-26), δ 2,11 (6H, *s*, N-(CH₃)₂-27, -28), δ 1,23/1,57 (2H, m, H-29, -29'), δ 1,32 (1H, m, H-30), δ 0,74 (3H, *d*, *J*=6,8Hz, H-31), δ 0,68 (3H, *d*, *J*=6,8Hz, H-32);); RMN de ¹³C a 100,62 MHz, CDCl₃: δ 156,2 (C-1), δ 81,7 (C-3), δ 55,4 (C-4), δ 172,4 (C-5), δ 52,7 (C-7), δ 168,0 (C-8), δ 125,9 (C-10), δ 117,9 (C-11), δ 131,8 (C-12), δ 121,9-131,4 (C-13, -14, -15, -16), δ 29,2 (C-17), δ 21,6 (C-18), δ 15,3 (C-19), δ 171,5 (C-21), δ 73,1 (C-22), δ 33,9 (C-23), δ 28,4 (C-24), δ 12,3 (C-25), δ 15,1 (C-26), δ 42,9 (C-27, -28), δ 40,3 (C-29), δ 42,9 (C-30), δ 24,5 (C-31), δ 22,8 (C-32).

2.4.2 Alcalóides Ciclopeptídicos Neutros

2.4.2.1 Discareno C 10E (**63**): sólido branco; Pf.: 270-272°C (Lit. 273-275 °C;

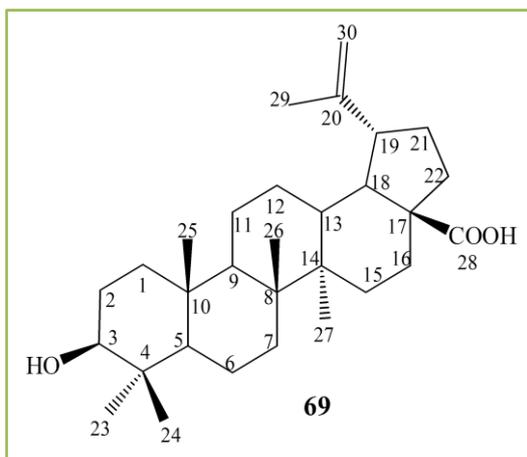


GIACOMELLI, 2005); Rf.: 0,63 (CHCl₃:MeOH 3%); [α]_D²⁰: -51,7 (c 0,2 em CHCl₃:MeOH 1:1), isolada da fração etérea básica (alcalóides totais) de *D. americana* coletada em São Sepé (Tabela 14); ¹H-NMR (400 MHz), CDCl₃: δ 6,06 (1H, *d*, *J*=6,3Hz, H-3), δ 4,78 (1H, dd, *J*=6,3, 8,5Hz, H-4), δ 6,24 (1H, *d*, *J*=6,9Hz, NH-6), δ 4,07 (1H, m, H-7), δ

6,56 (1H, d, $J=10,3\text{Hz}$, NH-9), δ 6,64 (1H, dd, $J=7,6, 10,3\text{Hz}$, H-10), δ 6,34 (1H, d, $J=7,6\text{Hz}$, H-11), δ 7,05-7,49 (4H, H-13, -14, -15, -16), δ 7,05-7,49 (5H, H-18, -18', H-19, -19', H-20), δ 5,07 (1H, d, $J=8,5\text{Hz}$, NH-21), δ 5,14 (1H, dd, $J=10,0\text{Hz}$, H-23), δ 6,28 (1H, d, $J=3,6, 10,0\text{Hz}$, H-24), δ 2,15 (1H, m, H-25), δ 0,83/0,85 (6H, d, $J=2,6\text{Hz}$, H-26, -27), δ 1,67/1,24 (2H, m, H-28, -28'), δ 1,15 (1H, m, H-29), δ 0,67 (3H, d, $J=6,5\text{Hz}$, H-30), δ 0,58 (3H, d, $J=6,5\text{Hz}$, H-31); RMN de ^{13}C a 100,62 MHz, CDCl_3 : δ 155,5 (C-1), δ 82,2 (C-3), δ 56,4 (C-4), δ 171,2 (C-5), δ 52,7 (C-7), δ 167,5 (C-8), δ 125,7 (C-10), δ 115,0 (C-11), δ 132,8 (C-12), δ 123,5-132,2 (C-13, -14, -15, -16), δ 136,8 (C-17), δ 123,8-129,9 (C-18, -18', -19, 19', -20), δ 165,9 (C-22), δ 119,4 (C-23), δ 152,9 (C-24), δ 30,8 (C-25), δ 21,3 (C-26), δ 21,2 (C-27), δ 39,4 (C-28), δ 24,6 (C-29), δ 23,1 (C-30), δ 20,7 (C-31).

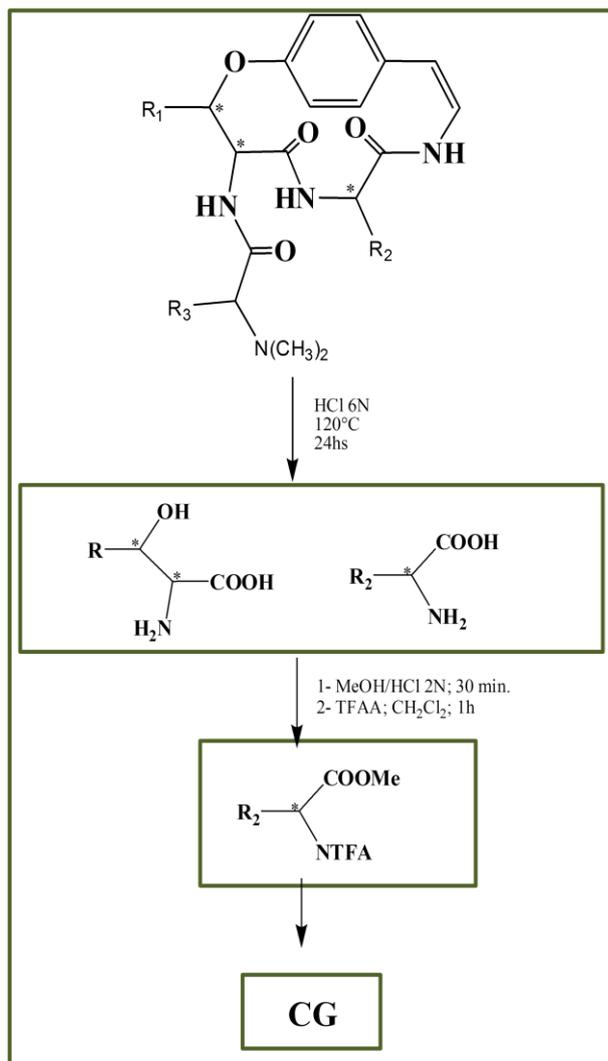
2.6.3 Triterpenóide

2.6.3.1 Ácido Betulínico, J21 (**69**): sólido branco; Pf.: 288-289 °C (Lit 290-291 °C;



GIACOMELLI, 2005); Rf.: 0,61, em CHCl_3 :MeOH (95:5); isolado das cascas da raiz de *D. americana* (página 65); Para este metabólito não foi realizado as técnicas de RMN por que já está bem caracterizado. Neste caso, foi feito somente comparação com um padrão em CCD bem como o ponto de fusão para a identificação deste metabólito.

2.7 DEGRADAÇÃO QUÍMICA DOS ALCALÓIDES CICLOPEPTÍDICOS (Esquema 1)



Esquema 1: Degradação química

2.7.1 Hidrólise dos alcalóides ciclopeptídicos

Foram adicionados 2 mg do alcalóide ciclopeptídico e 1 mL de HCl 6N, previamente destilado, em uma ampola de vidro a qual foi devidamente selada e deixada a 120°C durante 24 h. Após, o produto foi evaporado em rotavapor sob vácuo e, depois, colocado em dessecador à vácuo, sob NaOH, durante 12 h.

2.7.2 Esterificação dos aminoácidos

Em um vidro de 1,5 mL foi colocado o produto da hidrólise e 1,0 mL de MeOH-HCl 2,0 N, bem vedado, para a realização da reação de esterificação, catalisada por ácido, das unidades dos aminoácidos hidrolisados. A reação foi realizada em temperatura ambiente durante 30 minutos, seguida da evaporação do solvente com corrente de nitrogênio.

2.7.3 N, ou N, O-trifluoracetilação

Os aminoácidos esterificados foram dissolvidos em um vidro de 1,5 mL bem vedado, em 200,0 µL de diclorometano e 50,0 µL de anidrido trifluoracético. Decorridos 30 minutos, em temperatura ambiente, houve a remoção do solvente por corrente de nitrogênio. Em seguida, o produto da reação foi solubilizado em 500,0 µL de diclorometano e foi realizada a análise por CG.

3 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Neste capítulo serão apresentados os resultados e a discussão da análise fitoquímica da casca da raiz da espécie *Discaria americana*, o extrato bruto, a fração de resíduo (FBER), a fração alcalóides totais (FBEAT), bem como os metabólitos isolados destas frações.

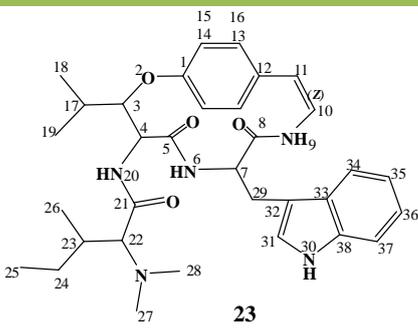
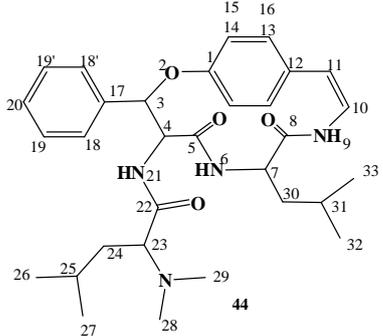
A determinação das estruturas dos compostos isolados foi realizada com base nos dados espectrais de RMN ^1H e de ^{13}C uni e bidimensionais, dados de difração de raio-X, espectrometria de massa além da comparação de dados obtidos de literatura.

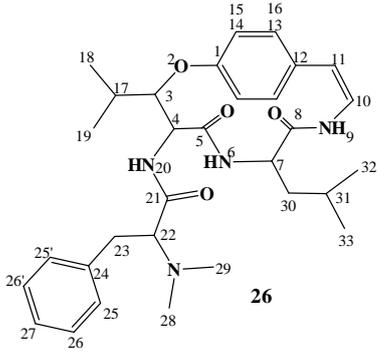
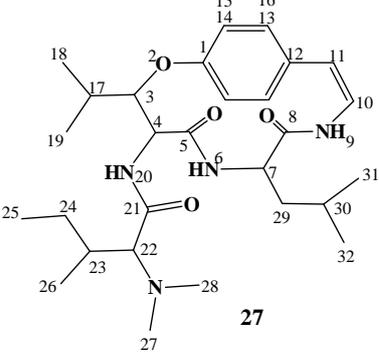
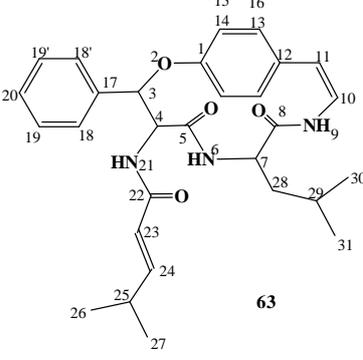
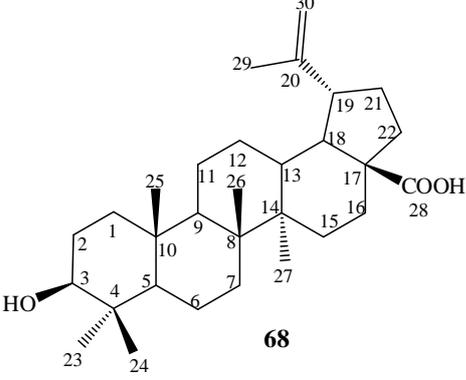
Com a análise da FBEAT foi possível isolar e identificar cinco metabólitos, dos quais quatro são alcalóides ciclopeptídicos: Discarina B (**23**), Discarina C (**44**), Frangufolina (**26**), Frangulanina (**27**) e um alcalóide ciclopeptídico neutro: Discareno C (**63**). Da FBER foi isolado o triterpeno Ácido Betulínico (**69**).

Estes compostos, assim como as frações FBER e FBEAT, foram submetidos à análise antimicrobiana.

No Quadro 1 estão ilustrados os compostos isolados e identificados durante este estudo.

Quadro 1: estruturas numeradas, características e identificação dos compostos isolados

Estrutura	Características	Identificação
 <p style="text-align: center;">23</p>	<p>Sólido branco</p> <p>Pf.: 238-240°C (Lit. 235-236 °C (GIACOMELLI, 2005));</p>	<p>Discarina B J01 (23)</p> <p>Isolamento: pág. 62 Identificação: pág. 68 e 76 Ensaio: pág. 132</p>
 <p style="text-align: center;">44</p>	<p>Sólido branco</p> <p>Pf.: 240-242°C (Lit. 240-242 °C (GIACOMELLI, 2005))</p>	<p>Discarina C J03 (44)</p> <p>Isolamento: pág. 62 Identificação: pág. 68 e 89 Ensaio: pág. 132</p>

	<p>Sólido branco,</p> <p>Pf.: 250-252°C (Lit. 247-249 °C (ABU ZARGA, 1995))</p>	<p>Frangufolina J11 (26)</p> <p>Isolamento: pág. 62 Identificação: pág. 69 e 103 Ensaio: pág. 132</p>
	<p>Sólido branco</p> <p>Pf.: 275-277°C (Lit. 277-278 °C (GIACOMELLI, 2005))</p>	<p>Frangulanina J 09 (27)</p> <p>Isolamento: pág. 62 Identificação: pág. 70 e 113 Ensaio: pág. 132</p>
	<p>Sólido branco</p> <p>Pf.: 270-272°C (Lit. 273-275 °C (GIACOMELLI, 2005));</p>	<p>Discareno C 10E (63)</p> <p>Isolamento: pág. 62 Identificação: pág. 70 e 121 Ensaio: pág. 132</p>
	<p>Sólido branco</p> <p>Pf.: 288-289 °C (Lit 290-291 °C (GIACOMELLI, 2005))</p>	<p>Ácido Betulínico J21 (68)</p> <p>Isolamento: pág. 62 Identificação: pág. 131</p>

3.1 RENDIMENTO DO EXTRATO BRUTO, DAS FRAÇÕES E DOS COMPOSTOS ISOLADOS

Após a secagem e a moagem das cascas da raiz da espécie *D. americana* coletada no mês de fevereiro de 2012, obteve-se 4.248,4 g do material seco moído, o qual foi submetido à extração, conforme descrito na página 62, onde foram obtidos 920,5 g de extrato bruto metanólico (21,66 % do material seco moído). Este extrato foi submetido a fracionamento ácido-base conforme descrito na página 73, Figura 16, obtendo-se a FBER (Fração Básica Etérea Resíduo) e a FBEAT (Fração Básica Etérea Alcalóides Totais).

Os rendimentos abaixo, Tabelas 17 e 18, são referentes à planta seca moída e ao extrato bruto obtido.

Tabela 17

Rendimento das frações da espécie
Discaria americana em São Sepé.

Frações	Quantidade Obtida	% em relação à planta seca moída	% em relação ao extrato bruto
FBER	13,4542g	0,32	1,46
FBEAT	5,6834g	0,13	0,62

Tabela 18

Rendimento dos compostos isolados da *Discaria americana* em São Sepé

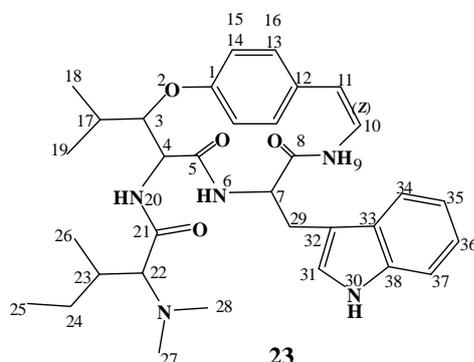
Composto puro	Quantidade Obtida	% em relação à planta seca moída	% em relação ao extrato bruto
Discarina B	0,1277 g	0,0030	0,0139
Discarina C	0,3849 g	0,0091	0,0418
Frangufolina	0,0507 g	0,0012	0,0055
Frangulanina	0,0813 g	0,0019	0,0088
Discareno C	0,0231 g	0,0005	0,0025
Ácido Betulínico	0,0563 g	0,0013	0,0061

3.2 METABÓLITOS ISOLADOS DAS CASCAS DA RAIZ DA *D. americana*

3.2.1 Alcalóides Ciclopeptídicos

3.2.1.1 Alcalóide J01

Este metabólito foi isolado da FBEAT, obtida do fracionamento ácido-base do extrato bruto, conforme descrito na página 62, das cascas da raiz da espécie *Discaria americana* coletada no distrito de São Rafael, em São Sepé, RS. O alcalóide foi identificado por meio de dados de RMN ^1H e ^{13}C , assim como por comparação com dados obtidos da literatura (GIACOMELLI, 2005).



Através de análise do espectro de RMN ^1H (Figura 17) e de dados obtidos da literatura (GIACOMELLI, 2005) é possível verificar que os sinais que estão localizados na região entre δ 2,30-4,90 ppm (Figura 18) correspondem aos hidrogênios metínicos α -carbonílicos (H-4, H-7 e H-22), ao hidrogênio β -carbonílico (H-3) pertencente a unidade β -hidroxileucina e aos hidrogênios diastereotópicos β -carbonílicos H-29 (δ 3,20 ppm) e H-29' (δ 2,77 ppm).

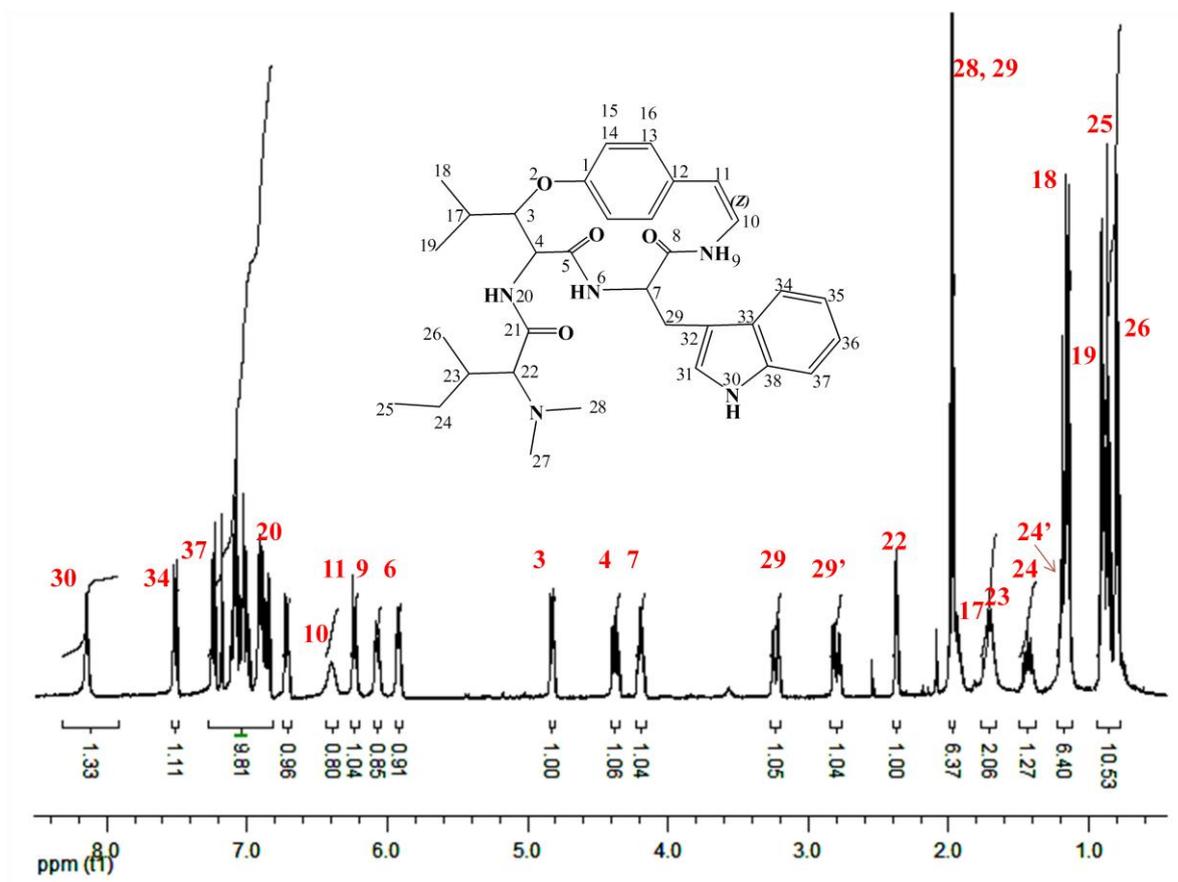


Figura 17: Espectro de RMN de ¹H do alcalóide ciclopeptídico Discarina B, em CDCl₃ a 400MHz.

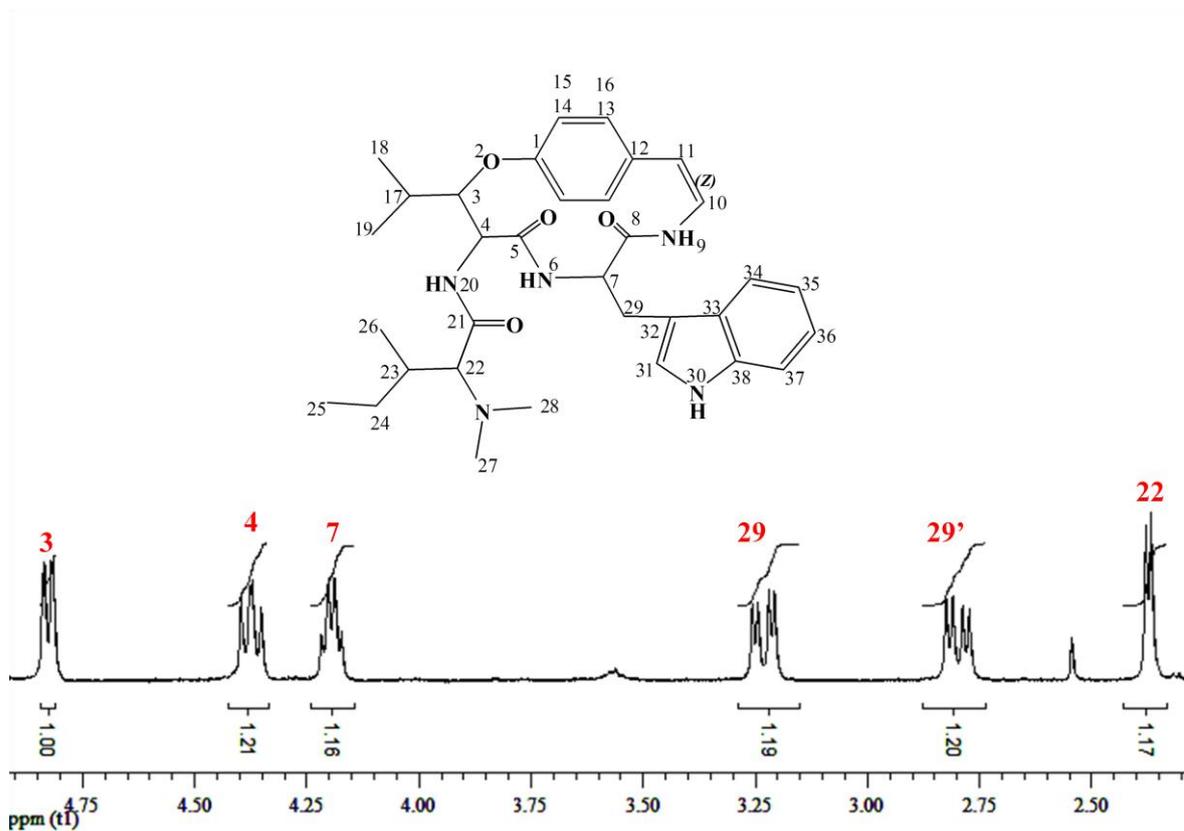


Figura 18: Expansão do espectro de RMN de ^1H , região δ 2,30-4,90 ppm, do alcalóide ciclopeptídico Discarina B, em CDCl_3 a 400MHz.

Na região espectral que compreende os deslocamentos químicos entre δ 0,79-1,97 ppm encontram-se os hidrogênios metílicos Me-18 (δ 1,14 ppm), Me-19 (δ 0,90 ppm), Me-25 (δ 0,85 ppm) e Me-26 (δ 0,79 ppm). Além destes, é verificado a presença dos hidrogênios metilênicos diastereotópicos H-24 (δ 1,39 ppm) e H-24' (δ 1,23 ppm) e os hidrogênios metínicos H-23 (δ 1,68 ppm) e H-17 (δ 1,89 ppm) (Figura 19).

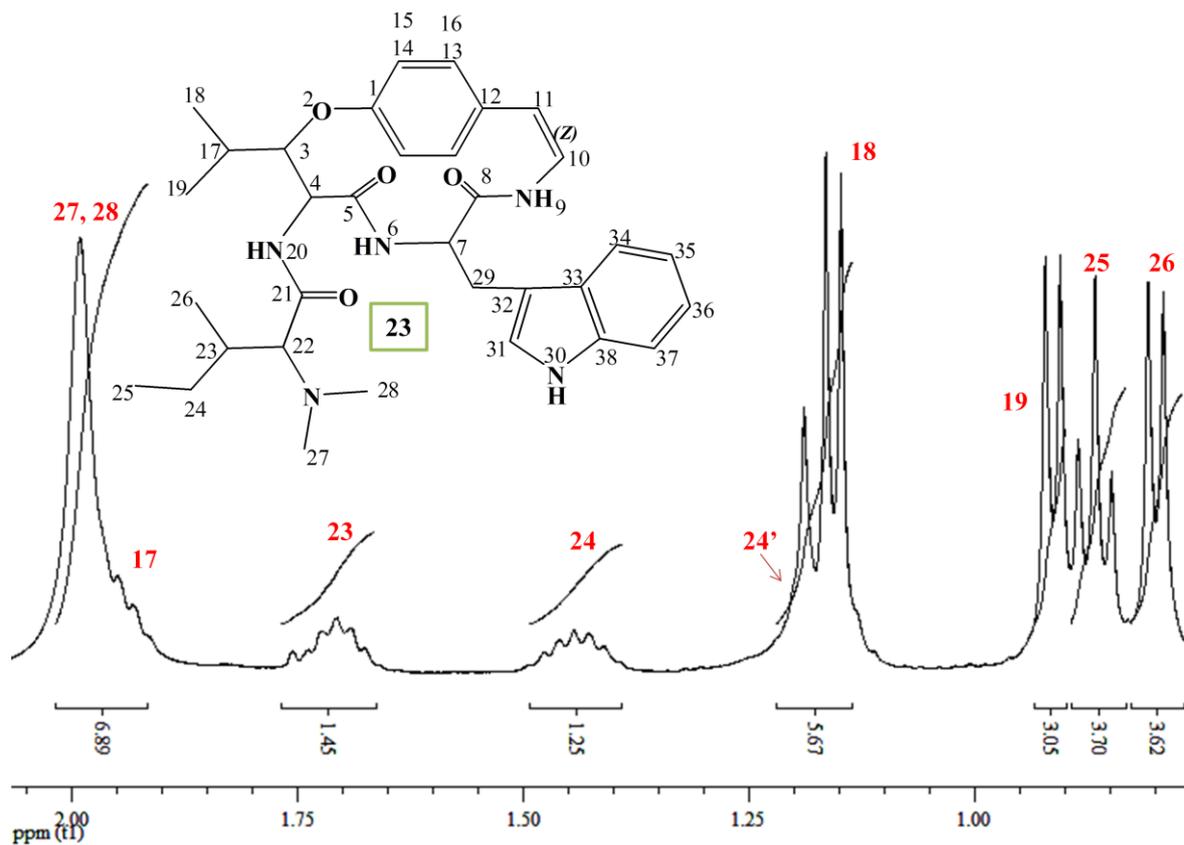


Figura 19: Expansão do espectro de RMN de ^1H , região δ 0,79-1,98 ppm, do alcalóide ciclopeptídico Discarina B, em CDCl_3 a 400MHz.

Os sinais dos hidrogênios amídicos NH-6, NH-9 e NH-20, das funções peptídicas, apresentam-se na forma de dubletos e têm seus deslocamentos químicos na região compreendida entre δ 5,91-8,19 ppm. Também nessa região encontra-se o dubleto do hidrogênio indólico NH-30, da unidade triptofano, os sinais dos hidrogênios olefínicos do grupamento enamina, os hidrogênios que pertencem à unidade *p*-hidróxiestirilamina e os hidrogênios do resíduo triptofano (Figura 20).

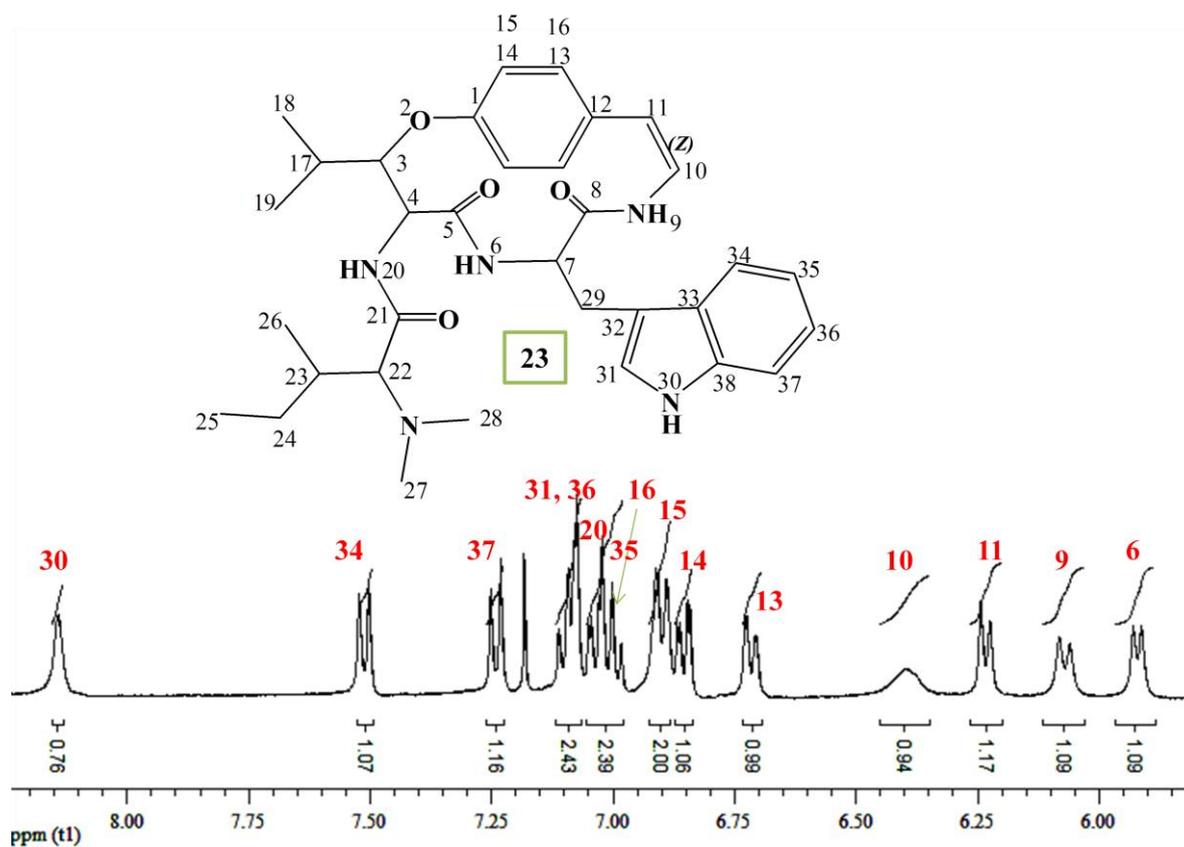


Figura 20: Expansão do espectro de RMN de ^1H , região δ 5,91-8,19 ppm, do alcalóide ciclopeptídico Discarina B, em CDCl_3 a 400MHz.

As posições de ressonância dos hidrogênios que constituem o alcalóide Discarina B foram identificadas por meio do espectro de COSY (Figura 21).

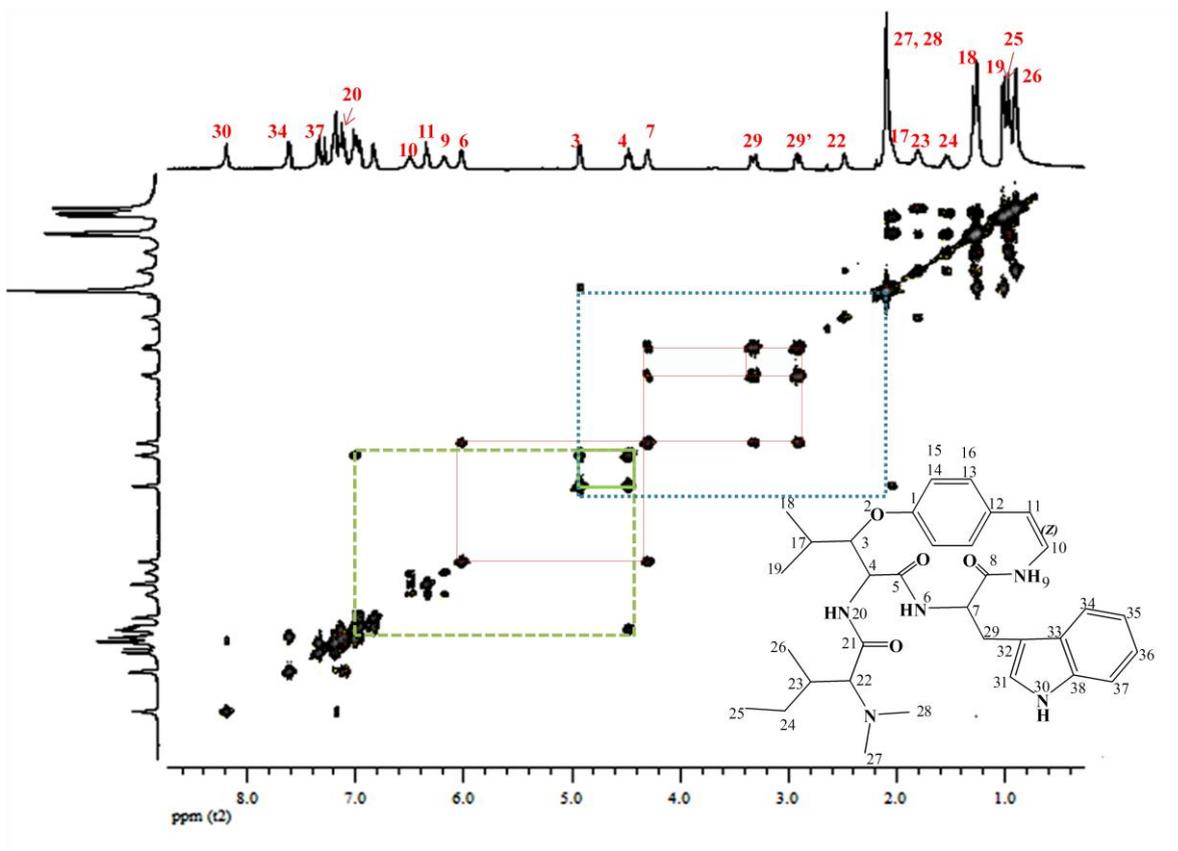


Figura 21: Espectro de RMN de ^1H - ^1H , COSY, do alcalóide ciclopeptídico Discarina B, em CDCl_3 a 400MHz.

Os sinais do resíduo indólico foram atribuídos a partir do sinal do NH-30 em δ 8,19 ppm. O hidrogênio NH-30 (*s*) apresenta uma correlação com o hidrogênio H-31 em δ 7,18 ppm. Ainda nessa região, H-35 (δ 7,12 ppm) se correlaciona com H-34 (δ 7,50 ppm) e com H-36 (δ 7,10 ppm). H-36 apresenta, também, uma correlação com H-37 (δ 7,23 ppm), como mostrado na Figura 22.

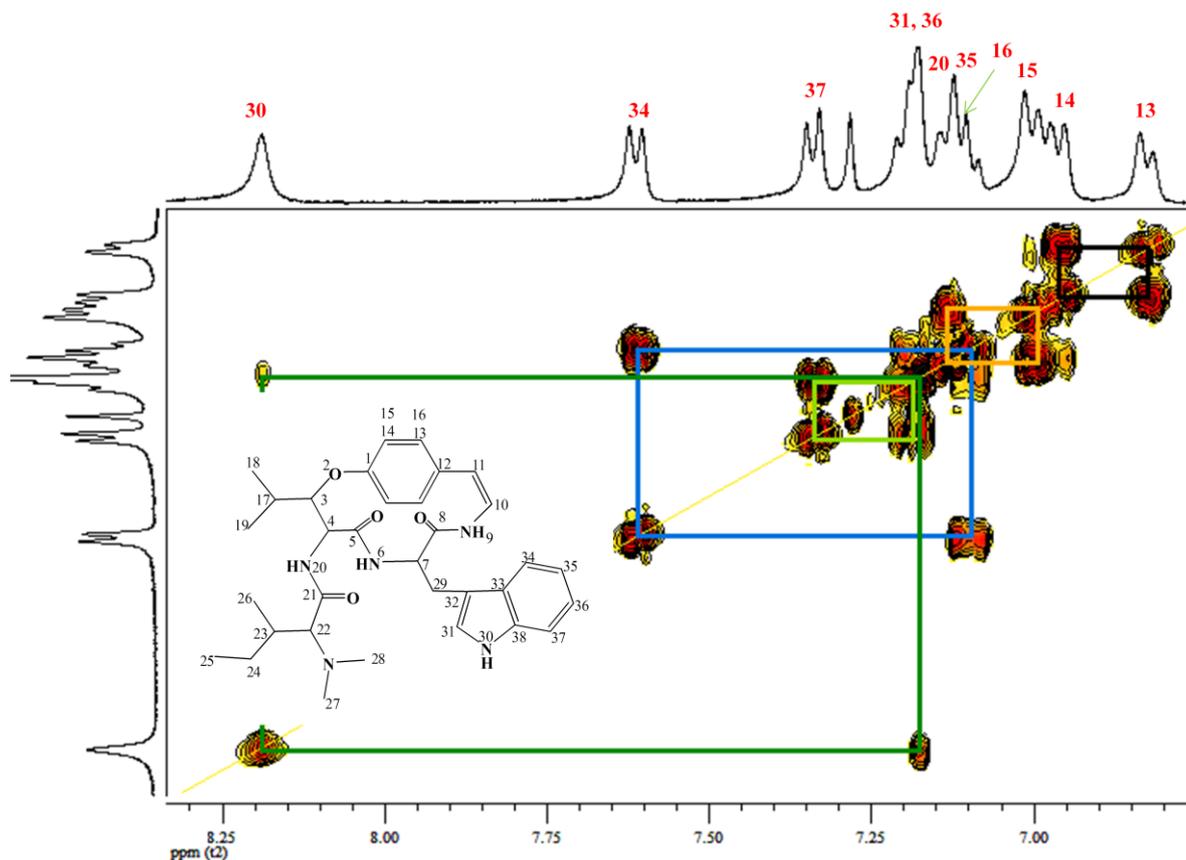


Figura 22: Expansão do espectro de RMN de COSY, região δ 6,75-8,25 ppm, do alcalóide ciclopeptídico Discarina B, em CDCl_3 a 400MHz.

Os hidrogênios não aromáticos, como o H-7 (δ 4,17 ppm) (Figura 23), têm sinais de correlação com o hidrogênio amídico NH-6 (δ 5,91 ppm), além de apresentar correlações com os hidrogênios metilênicos diastereotópicos H-29 (δ 3,20 ppm) e H-29' (δ 2,77 ppm). Sendo que estes não apresentam correlação com outros hidrogênios, o que define a posição da unidade triptofânica.

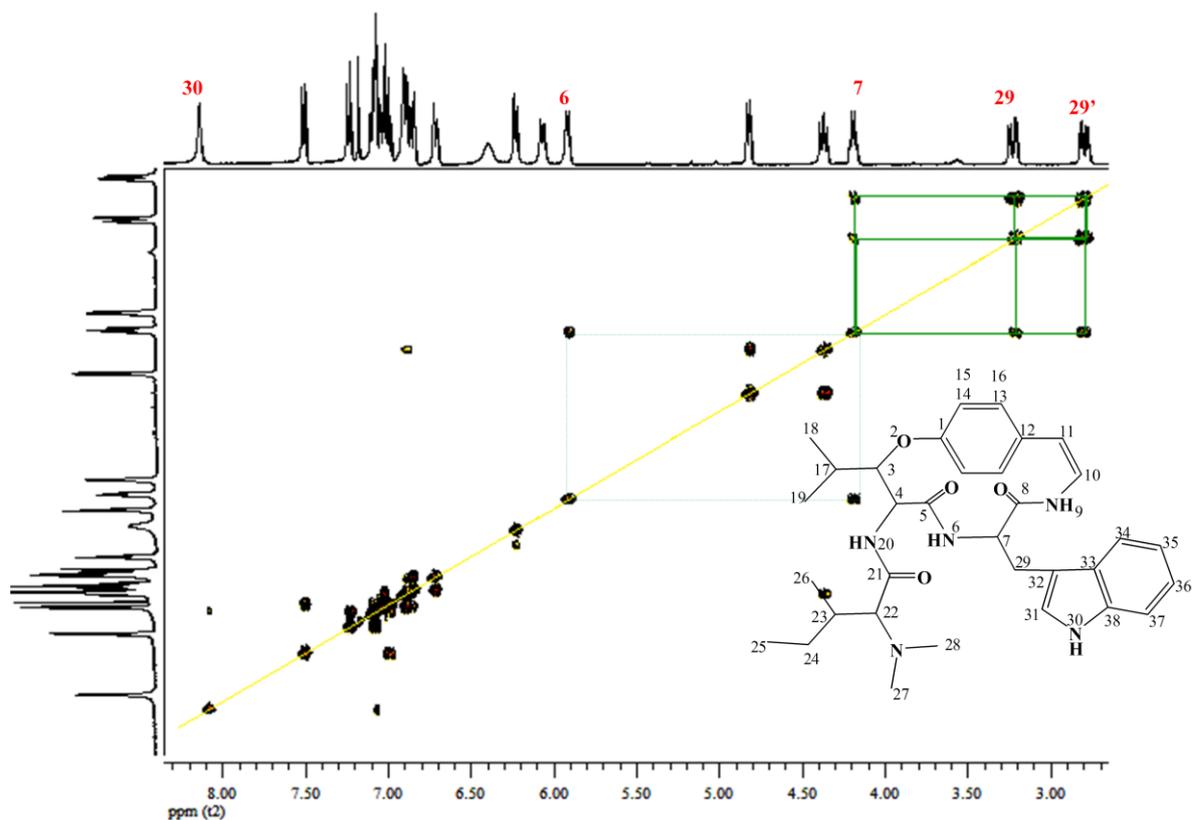


Figura 23: Expansão do espectro de RMN de COSY, região δ 2,75-8,25 ppm, do alcalóide ciclopeptídico Discarina B, em CDCl_3 a 400MHz.

Na atribuição dos sinais da unidade *N,N*-dimetil isoleucina foi utilizado como ponto de partida o sinal do hidrogênio α -carbonílico H-22 (δ 2,36 ppm), como mostra a Figura 24. Com isso, foi verificada a correlação deste hidrogênio com o hidrogênio metínico H-23 (δ 1,68 ppm), que por sua vez, apresentou correlação com os hidrogênios H-24 (δ 1,39ppm), H24' (δ 1,23 ppm) e a metila Me-26 (δ 0,79 ppm). Esses hidrogênios correlacionam-se entre si por serem geminais não equivalentes, além de se correlacionarem com a metila Me-25 (δ 0,85 ppm). As metilas da unidade *N,N*-dimetil (Me-27 e Me -28, δ 1,97 ppm) se apresentam na forma de um singlete, o qual não mostra nenhuma correlação. Dessa forma, foi possível identificar os deslocamentos químicos dos hidrogênios da unidade *N,N*-dimetil isoleucina.

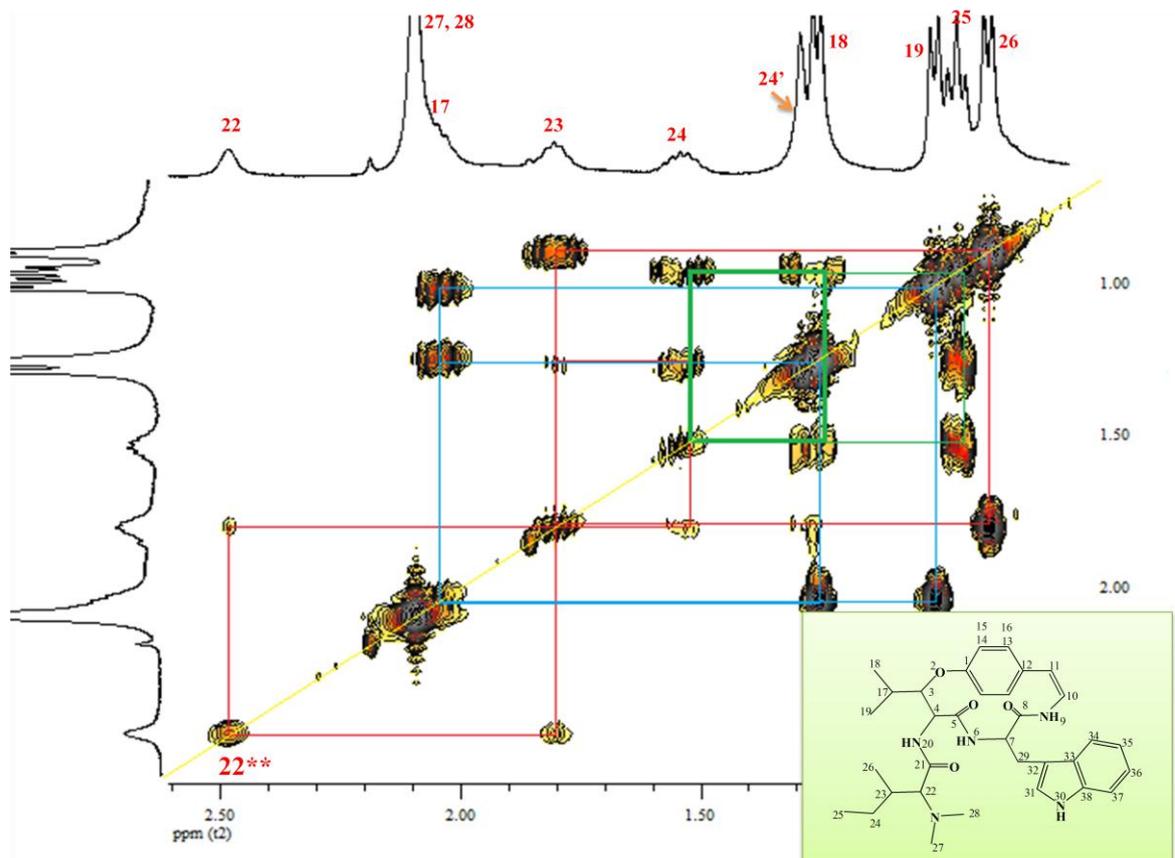


Figura 24: Expansão do espectro de RMN de COSY, região δ 0,79-2,55 ppm, do alcalóide ciclopeptídico Discarina B, em CDCl_3 a 400MHz.

Os hidrogênios da unidade β -hidroxileucina foram identificados tendo como ponto de partida o sinal do hidrogênio metínico H-4 (δ 4,35 ppm). Com isso, foi possível verificar a presença de duas correlações distintas que H-4 faz com NH-20 amídico (δ 7,06 ppm) e com H-3 metínico (δ 4,81 ppm). Pode ainda ser atribuída a H-3 a correlação com H-17 γ -carbonílico (δ 1,89 ppm) que se apresenta na forma de um multipletto. A H-17 estão correlacionados, também, as metilas Me-18 (δ 1,14 ppm) e Me-19 (δ 0,90 ppm) (Figura 25).

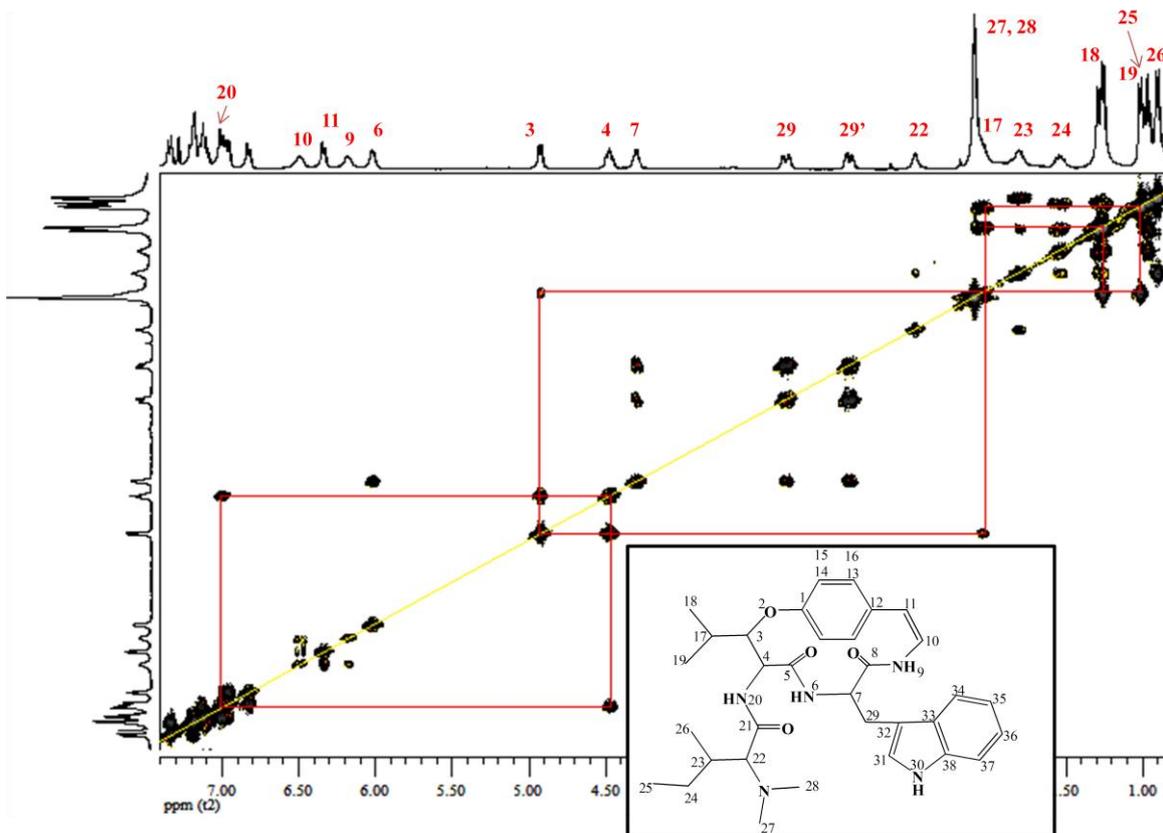


Figura 25: Expansão do espectro de RMN de COSY, região δ 0,79-7,25 ppm, do alcalóide ciclopeptídico Discarina B, em CDCl_3 a 400MHz.

Na Figura 26, espectro de RMN ^{13}C do alcalóide ciclopeptídico Discarina B, foi possível identificar trinta sinais que estão distribuídos em uma região espectral entre δ 12,13-172,14 ppm, o que indica a presença de carbonos metílicos, metilênicos, metínicos e desprotonados. Entre eles, três indicam sobreposição de dois núcleos de carbonos, o que remete a um total de trinta e três carbonos, como indicado na estrutura **23**.

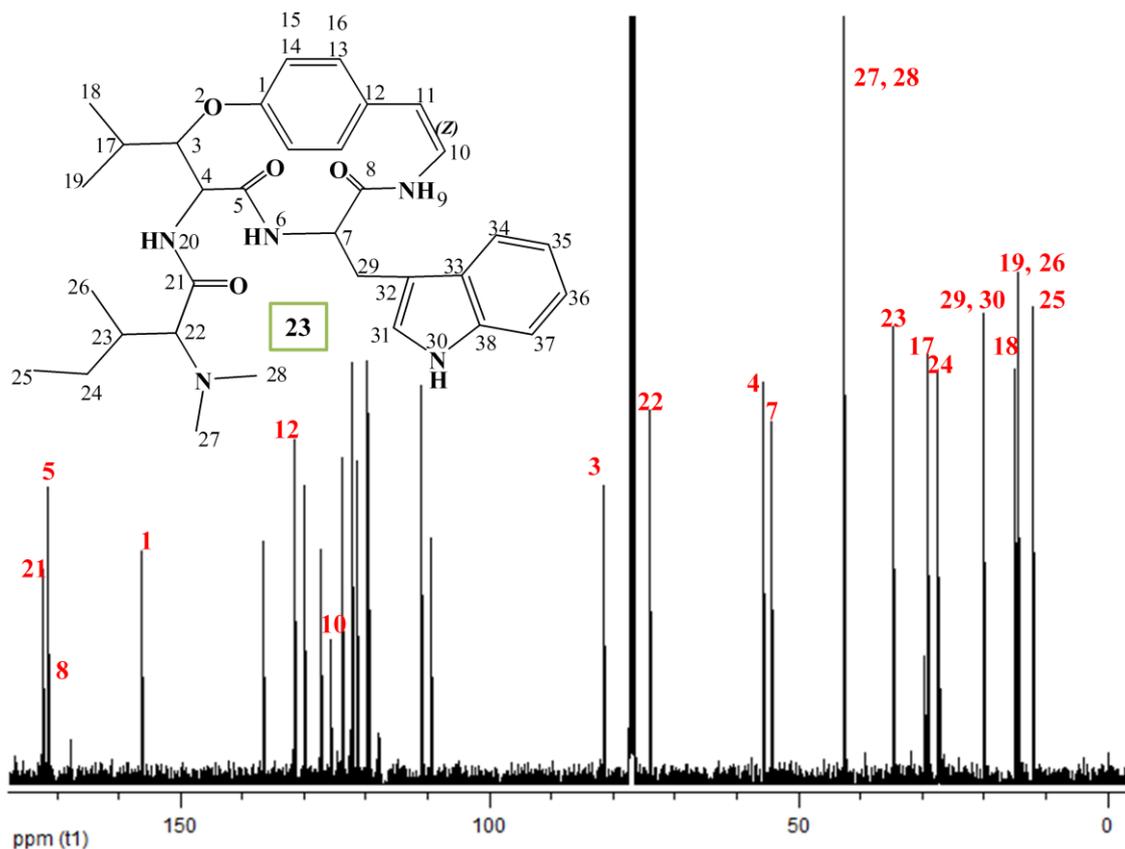


Figura 26: Espectro de RMN de ^{13}C do alcalóide ciclopeptídico Discarina B, em CDCl_3 a 100MHz.

Por meio das observações acima descritas e tomando por base os dados obtidos da literatura, foi proposta a estrutura **23**, a qual corresponde ao alcalóide ciclopeptídico Discarina B, cuja fórmula molecular é $\text{C}_{33}\text{H}_{43}\text{N}_5\text{O}_4$, isolado primeiramente da espécie *Discaria americana*.

Os dados físicos e espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C estão listados na parte experimental (página 68).

Nas Tabelas 19 e 20 estão listados os deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C , bem como os comparativos da literatura.

Tabela 19: Dados de RMN ^1H da Discarina B (**23**) (CDCl_3 , 400,13 MHz)

Posição	δ_{H} ppm	δ_{H}^* ppm
1	-	-
2	-	-
3	4,81 (dd, $J=2,0$, 8,0 Hz)	4,91 (dd, $J=2,0$, 5,6 Hz)
4	4,35 (dd, $J=8,0$, 10,4 Hz)	4,44 (dd, $J=5,6$, 8,0 Hz)

5	-	-
6	5,91 (d, $J=6,6$ Hz)	5,96 (d, $J=6,8$ Hz)
7	4,17 (dd, $J=6,6, 11,6$ Hz)	4,26 (m)
8	-	-
9	6,05 (d, $J=9,2$ Hz)	6,13 (d, $J=9,2$ Hz)
10	6,39	6,48
11	6,22 (d, $J=7,6$ Hz)	6,29 (d, $J=7,6$ Hz)
12	-	-
13	6,71	6,78-7,18
14	6,84	6,78-7,18
15	6,89	6,78-7,18
16	6,98	6,78-7,18
17	1,89 (m)	1,99 (m)
18	1,14 (d, $J=6,8$ Hz)	1,23 (d, $J=6,8$ Hz)
19	0,90 (d, $J=6,8$ Hz)	0,98 (d, $J=6,7$ Hz)
20	7,04 (d, $J=7,7$ Hz)	7,07
21	-	-
22	2,36 (d, $J=4,7$ Hz)	2,44 (d, $J=4,4$ Hz)
23	1,68 (m)	1,78 (m)
24	1,39 (m)	1,50 (m)
24'	1,23 (m)	1,26 (m)
25	0,85 (t, CH ₃)	0,94 (t, CH ₃)
26	0,79 (d, $J=6,8$ Hz, CH ₃)	0,88 (d, $J=6,8$ Hz, CH ₃)
27	1,97 (s, N-(CH ₃) ₂)	2,05 (s, N-(CH ₃) ₂)
28	1,97 (s, N-(CH ₃) ₂)	2,05 (s, N-(CH ₃) ₂)
29	3,20 (dd, $J=4,8, 14,7$ Hz)	2,87 (dd, $J=4,8, 7,8$ Hz)
29'	2,77 (dd, $J=6,4, 14,7$ Hz)	3,31 (dd, $J=4,8, 7,8$ Hz)
30	8,19 (s, NH)	8,14 (s, NH)
31	7,09	7,16
32	-	-
33	-	-
34	7,50 (d, $J=8,0$ Hz)	7,31 (d, $J=8,0$ Hz)
35	7,02	7,12
36	7,07	7,09
37	7,23 (d, $J=8,0$ Hz)	7,59 (d, $J=8,1$ Hz)
38	-	-

δ_{H^*} (CDCl₃, 400 MHz) conforme Giacomelli (2005).

Tabela 20: Dados de RMN ¹³C da Discarina B (**23**) (CDCl₃, 100,62 MHz)

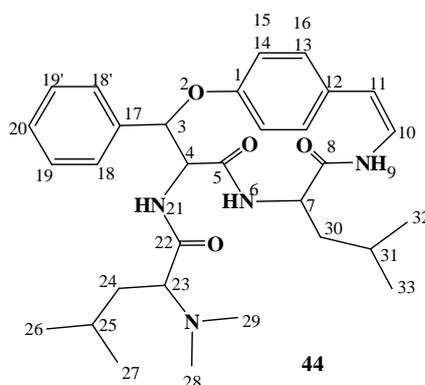
Posição	δ_{H} ppm	δ_{H^*} ppm
1	156,3	156,3
2	-	-
3	81,6	81,6
4	55,7	55,7
5	171,4	171,3
6	-	-
7	54,3	54,3
8	167,7	167,5
9	-	-
10	125,6	125,6
11	110,9	114,0
12	129,9	131,5
13	119,7-131,5	119,7-131,5
14	119,7-131,5	119,7-131,5
15	119,7-131,5	119,7-131,5
16	119,7-131,5	119,7-131,5
17	29,1	29,1
18	20,2	20,1
19	14,9	14,9
20	-	-
21	172,1	172,2
22	74,0	74,0
23	34,7	34,7
24	27,4	27,5
25	12,1	12,1
26	14,6	14,6
27	42,8	42,8
28	42,8	42,8
29	27,4	27,3
30	-	-
31	109,5-136,5	109,5-136,5
32	109,5-136,5	109,5-136,5
33	109,5-136,5	109,5-136,5
34	109,5-136,5	109,5-136,5

35	109,5-136,5	109,5-136,5
36	109,5-136,5	109,5-136,5
37	109,5-136,5	109,5-136,5
38	109,5-136,5	109,5-136,5

δ_{C^*} (CDCl₃, 400 MHz) conforme Giacomelli (2005).

3.2.1.2 Alcalóide J02

Este alcalóide (**estrutura 44**) foi isolado da FBEAT, obtida do fracionamento ácido-base do extrato bruto, conforme descrito na página 62, das cascas da raiz da espécie *Discaria americana* coletada no distrito de São Rafael, em São Sepé, RS, no mês de fevereiro de 2012. O mesmo foi identificado por meio de dados de RMN ¹H e ¹³C, assim como por comparação com dados obtidos da literatura (GIACOMELLI, 2005).



Analisando o espectro de RMN ¹H (Figura 27) e COSY (Figura 28) deste alcalóide, pode ser identificada a presença de três sinais de hidrogênios metílicos (um destes sinais apresenta sobreposição de dois núcleos, o que indica a presença de duas metilas) na forma de dubletos, na região espectral entre δ 0,63-0,79 ppm, os quais caracterizam a presença das unidades leucina e *N,N*-dimetilleucina como sendo parte da estrutura do alcalóide **J02**. Esses hidrogênios correspondem às metilas Me-26 (δ 0,79 ppm) e Me-27 (δ 0,72 ppm), pertencentes à unidade *N,N*-dimetilleucina e às metilas Me-32 (δ 0,72 ppm) e Me-33 (δ 0,63 ppm), pertencentes à unidade leucina (Figura 29).

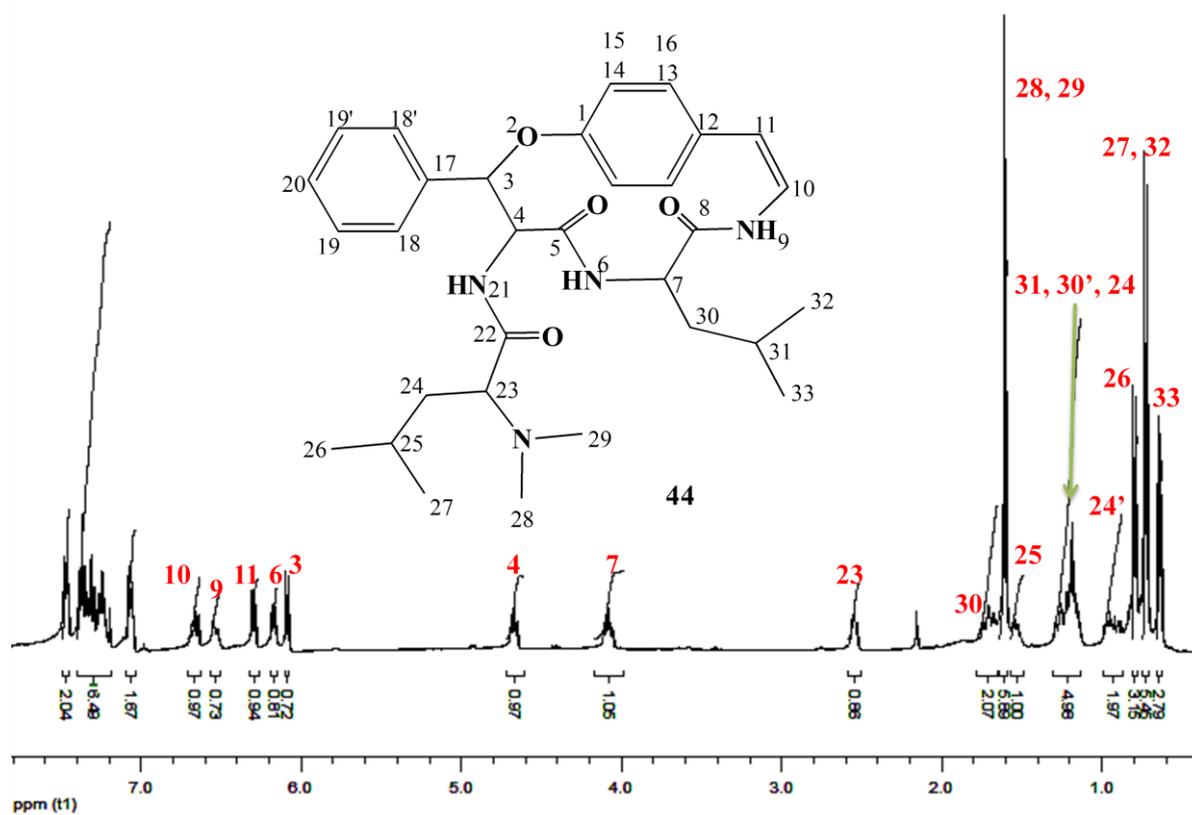


Figura 27: Espectro de RMN de ¹H do alcalóide ciclopeptídico Discarina C, em CDCl₃ a 400MHz.

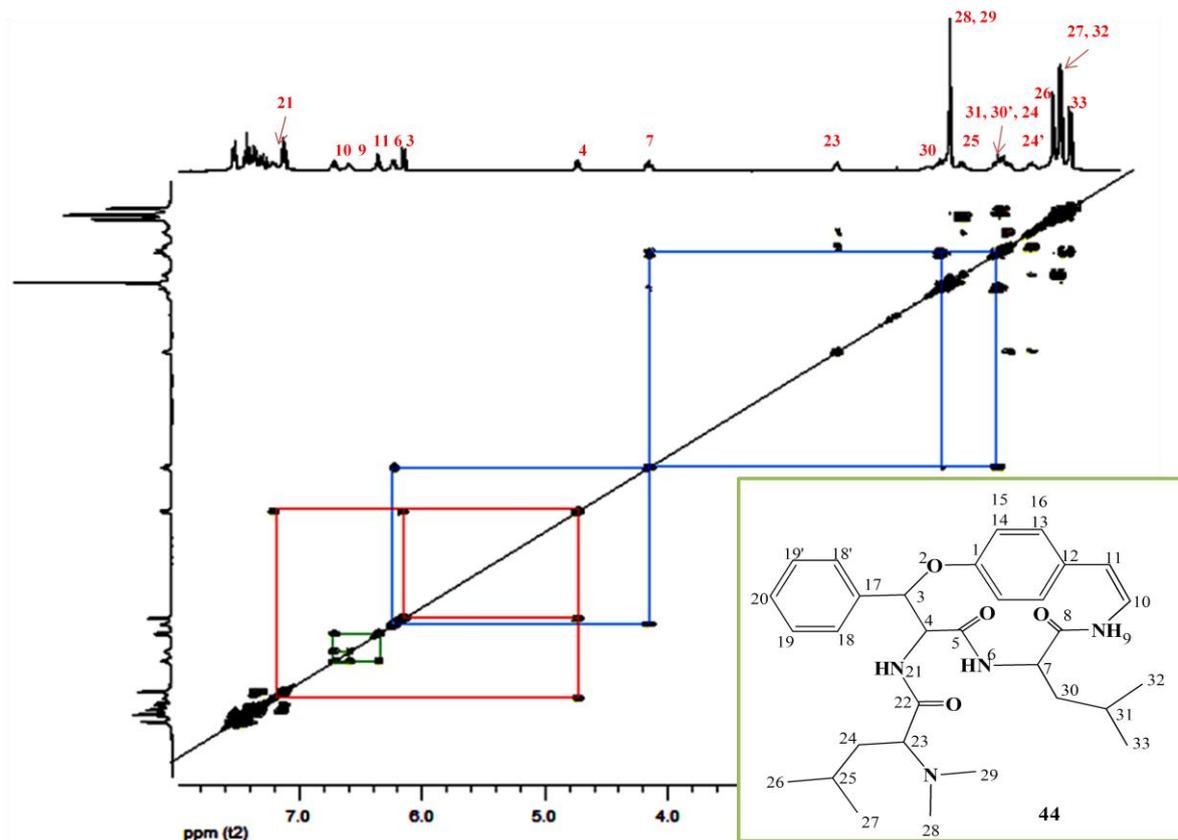


Figura 28: Espectro de RMN de ^1H - ^1H , COSY, do alcalóide ciclopeptídico Discarina C, em CDCl_3 a 400MHz

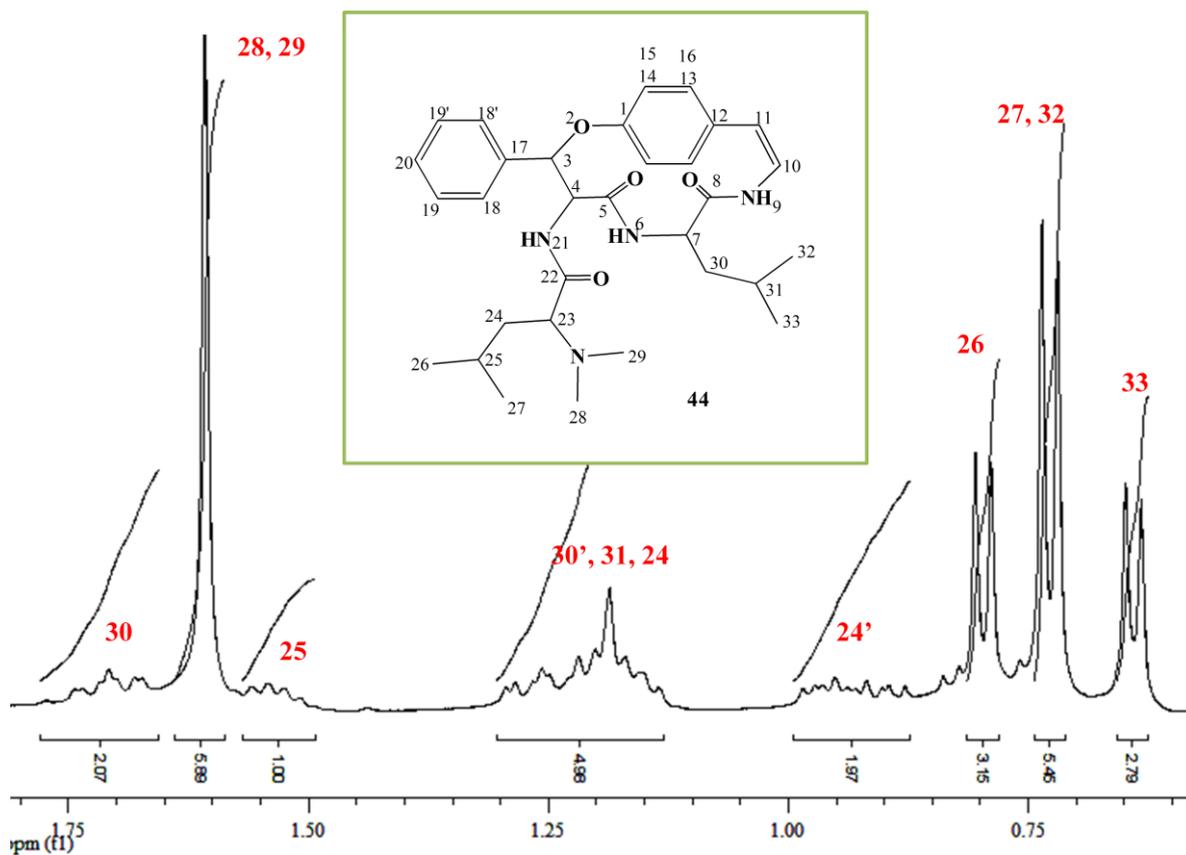


Figura 29: Expansão do espectro de RMN de ^1H , região δ 0,63-1,75 ppm, do alcalóide ciclopeptídico Discarina C, em CDCl_3 a 400MHz.

A unidade leucina pode ser confirmada pela presença de dois dubletos que resultam do acoplamento das Me-32 e Me-33 com o hidrogênio metínico H-31 (δ 1,19 ppm) na forma de um multipeto. Além disso, o hidrogênio metínico α -carbonílico H-7 (δ 4,05 ppm) forma um multipeto pelo acoplamento com os hidrogênios metilênicos diastereotópicos H-30 (δ 1,67 ppm) e H-30' (δ 1,19 ppm) e com o hidrogênio amídico NH-6 (δ 6,18 ppm), Figuras 30 e 31.

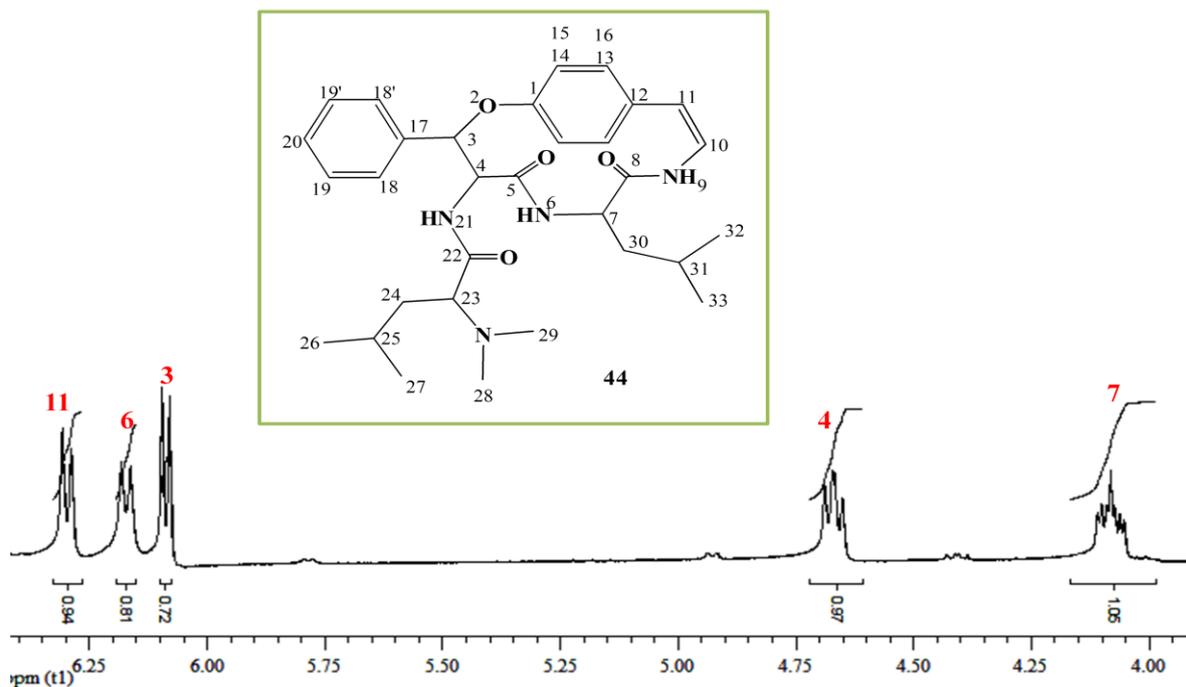


Figura 30: Expansão do espectro de RMN de ^1H , região δ 4,00-6,50 ppm, do alcalóide ciclopeptídico Discarina C, em CDCl_3 a 400MHz.

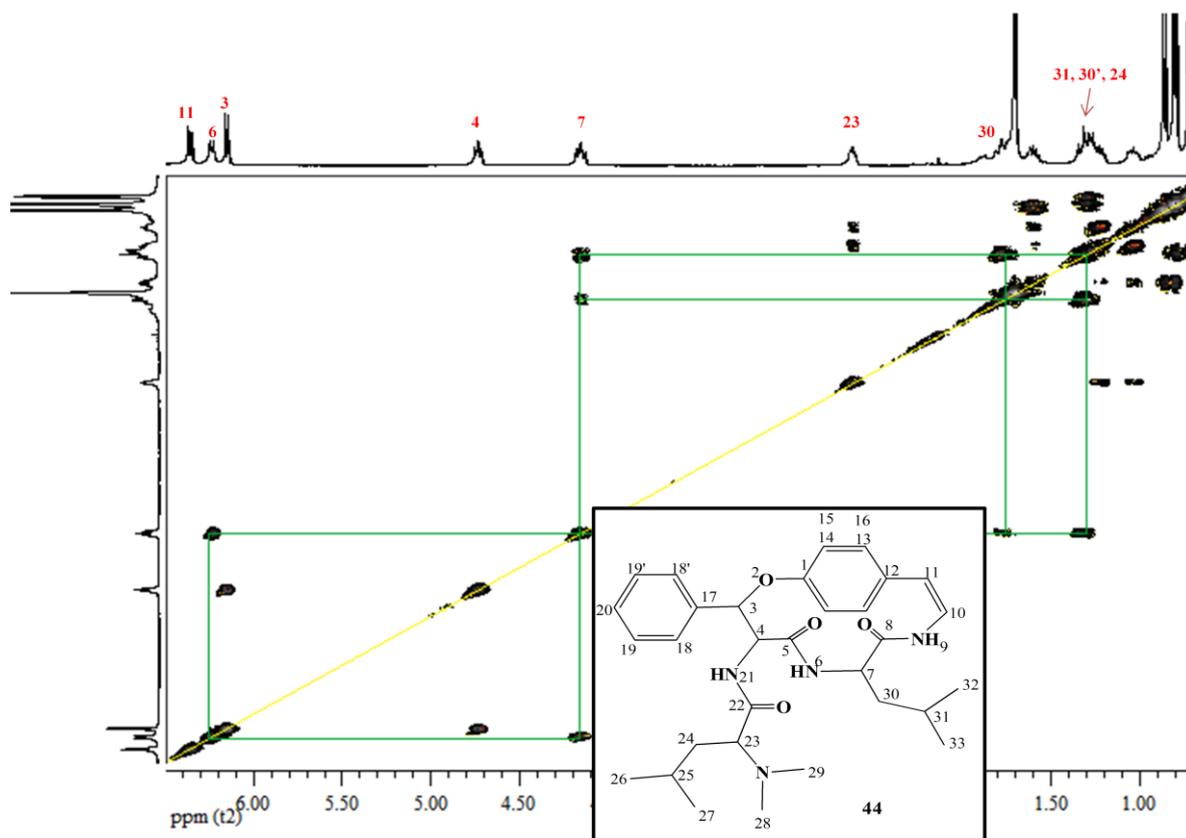


Figura 31: Espectro de RMN de COSY, região δ 0,80-6,25 ppm, do alcalóide ciclopeptídico Discarina C, em CDCl_3 a 400MHz.

H-3 (δ 6,07 ppm) encontra-se em campo baixo, na forma de um dubleto, pois acopla somente com o hidrogênio metínico H-4 (δ 4,66 ppm), que por sua vez, acopla com o hidrogênio amídico NH-21 (δ 7,32 ppm), aparece na forma de um duplo dubleto. Já a correlação entre os hidrogênios metínicos H-3 e H-17 não foi observada, o que sugere que C-17 não seja protonado. Dessa forma, é possível eliminar a possibilidade da existência da unidade β -hidroxileucina neste metabólito e propor a presença da unidade β -fenilserina como um hidróxiaminoácido pertencente ao sistema macrocíclico (Figura 32 e 31).

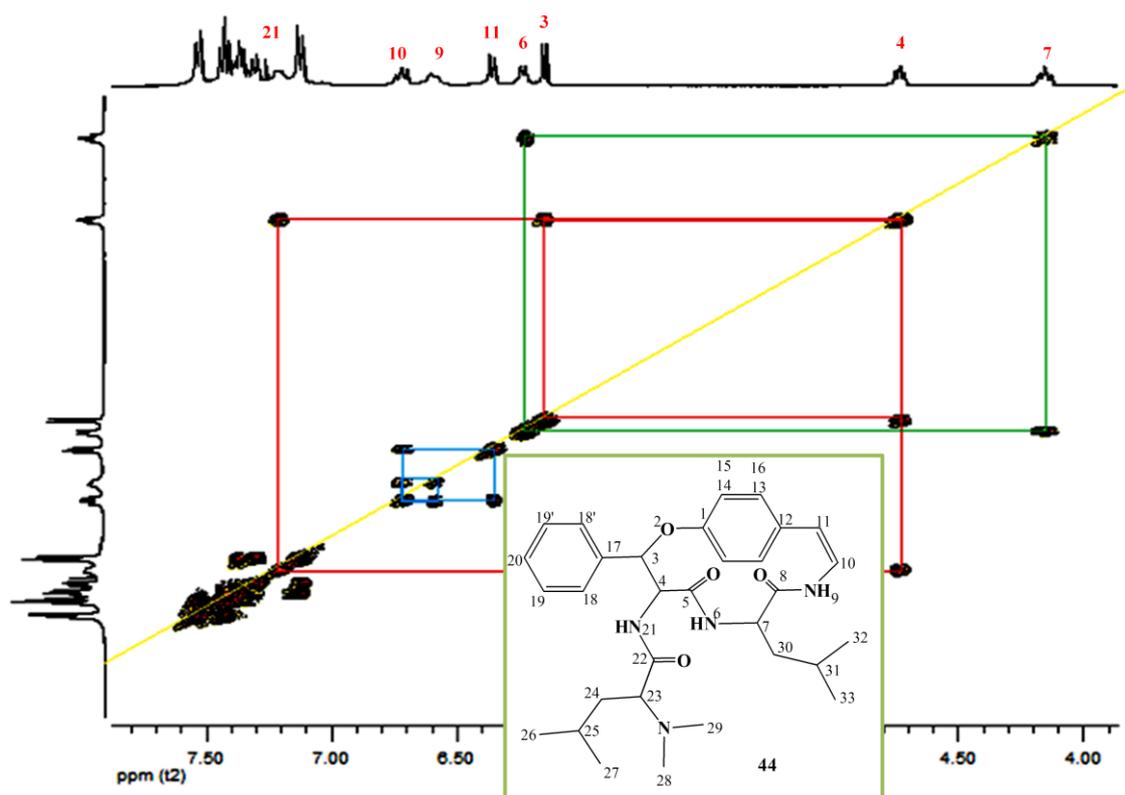


Figura 32: Expansão do espectro de RMN de COSY, região δ 4,00-7,75 ppm, do alcalóide ciclopeptídico Discarina C, em CDCl_3 a 400MHz.

A unidade básica terminal está caracterizada pelos sinais situados na região entre δ 0,72-2,54 ppm que correspondem aos hidrogênios H-23, H-24, H-24', H-25, H-26, H-27, H-28, H-29, os quais foram atribuídos de acordo com as multiplicidades apresentadas por meio dos valores $^1J_{\text{HH}}$, além da posição de ressonância característica conforme foi observado na literatura (GIACOMELLI, 2005). Nota-se que o sinal atribuído ao hidrogênio metínico H-23 tem correlação com os hidrogênios metilênicos diastereotópicos H-24/H-24' e com o

hidrogênio metínico H-25, na forma de um duplo dubleto. H-25 também se correlaciona com os hidrogênios das metilas Me-26 e Me-27, o que completa o sistema de spins da unidade *N,N*-dimetil leucina. As metilas desta unidade se apresentam na forma de um singlete em δ 1,62 [6H, N-(CH₃)₂-28, -29] (Figuras 33 e 34).

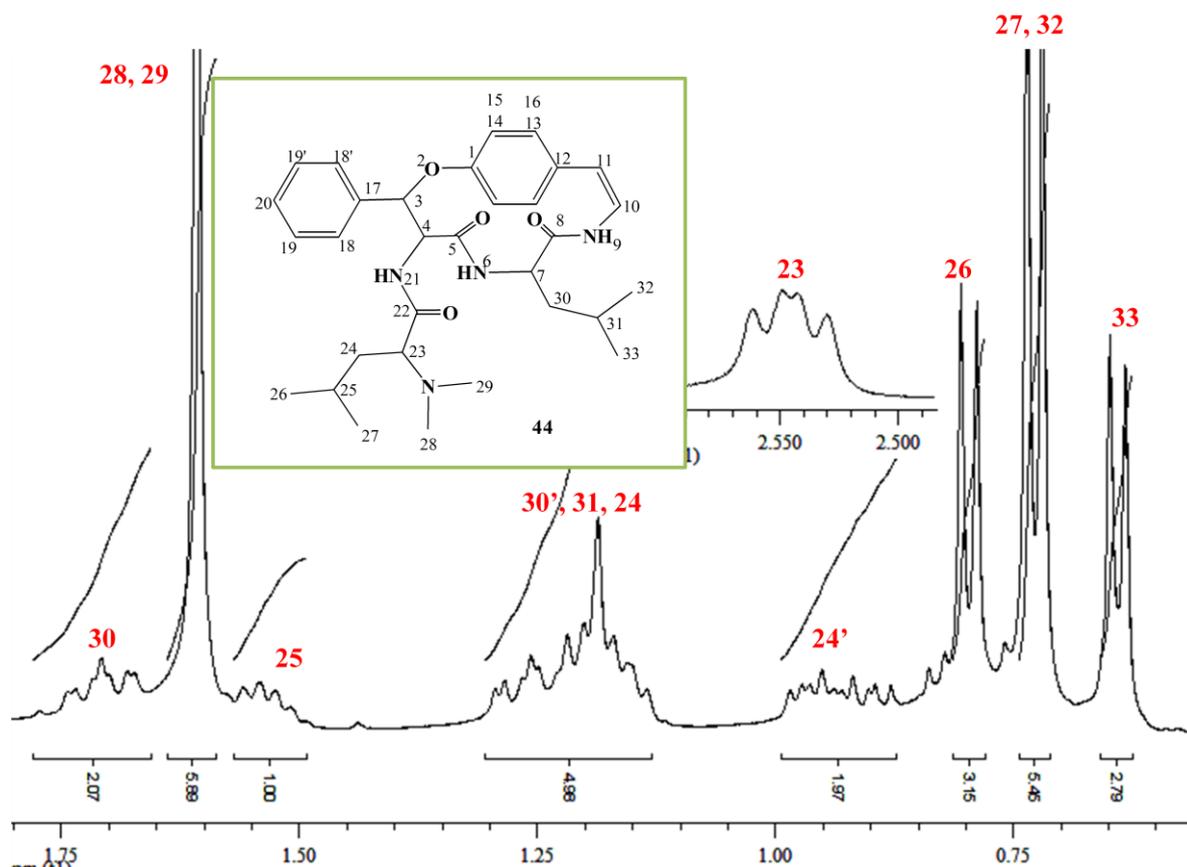


Figura 33: Expansão do espectro de RMN de ¹H, região δ 0,63-1,75 ppm, do alcalóide ciclopeptídico Discarina C, em CDCl₃ a 400MHz.

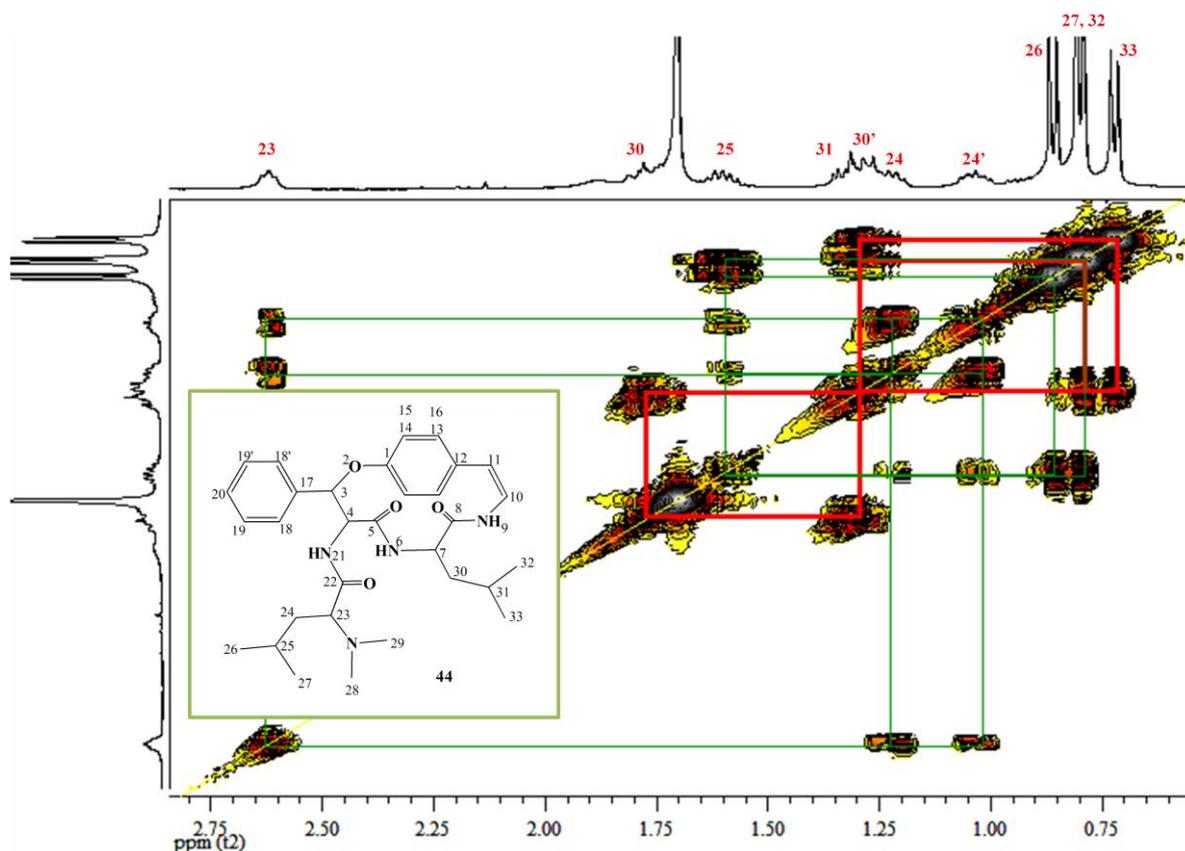


Figura 34: Expansão do espectro de RMN de COSY, região δ 0,63-1,75 ppm, do alcalóide ciclopeptídico Discarina C, em CDCl_3 a 400MHz.

Os sinais dos hidrogênios NH-9 (δ 6,53 ppm), H-10 (δ 6,65 ppm), H-11 (δ 6,29 ppm) são referentes ao grupo enamina. O duplete do NH-9 é formado pelo acoplamento com H-10, o qual acopla também com H-11, formando um duplo duplete. Já H-11, por acoplar somente com H-10, se apresenta na forma de um duplete (Figuras 35 e 36).

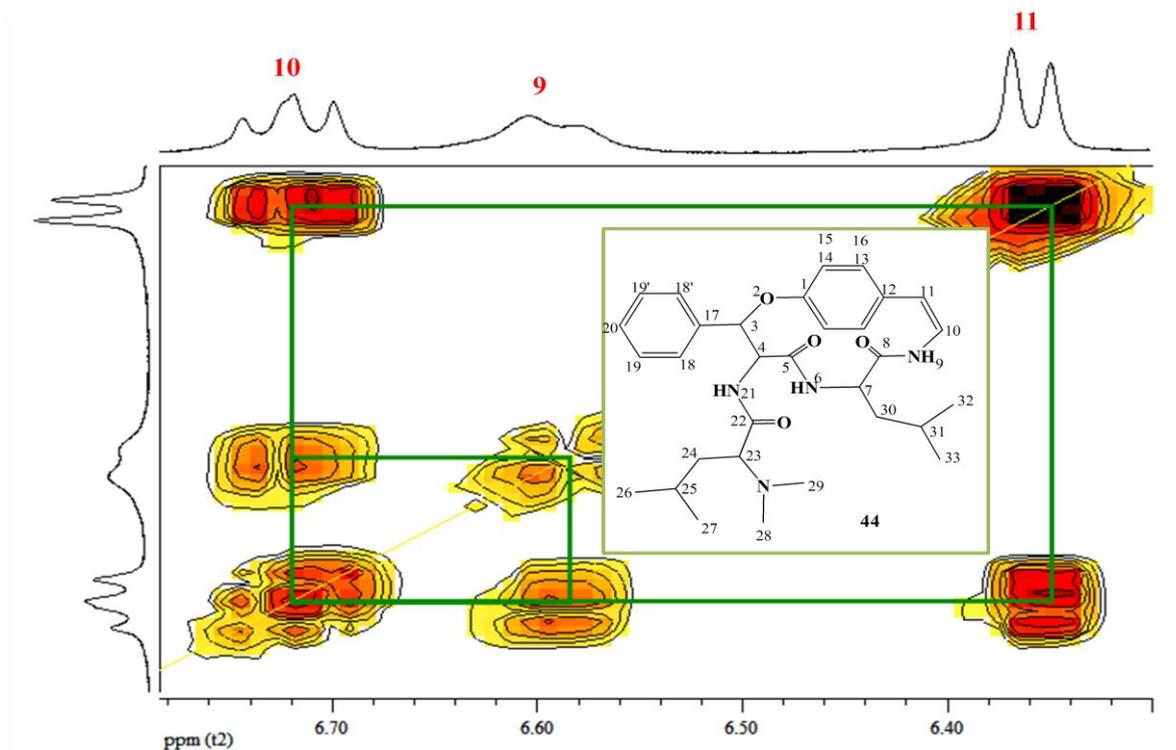


Figura 35: Expansão do espectro de RMN de COSY, região δ 6,30-6,80 ppm, do alcalóide ciclopeptídico Discarina C, em CDCl_3 a 400MHz.

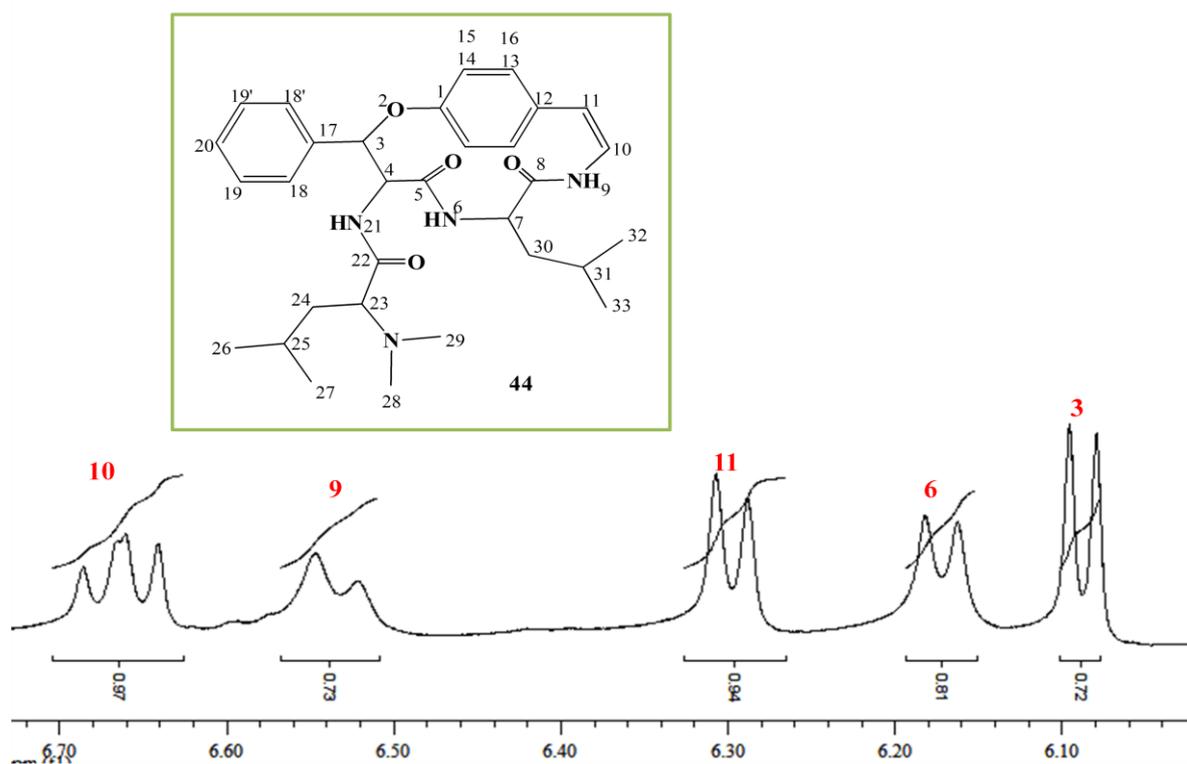


Figura 36: Expansão do espectro de RMN de ^1H , região δ 6,00-6,70 ppm, do alcalóide ciclopeptídico Discarina C, em CDCl_3 a 400MHz.

Na região espectral compreendida entre δ 7,04-7,35 ppm (Figura 37) estão localizados os sinais dos hidrogênios aromáticos das unidades *p*-hidróiestirilamina e da β -fenilserina que correspondem aos dois sistemas de spins mostrados no espectro COSY, (Figura 38).

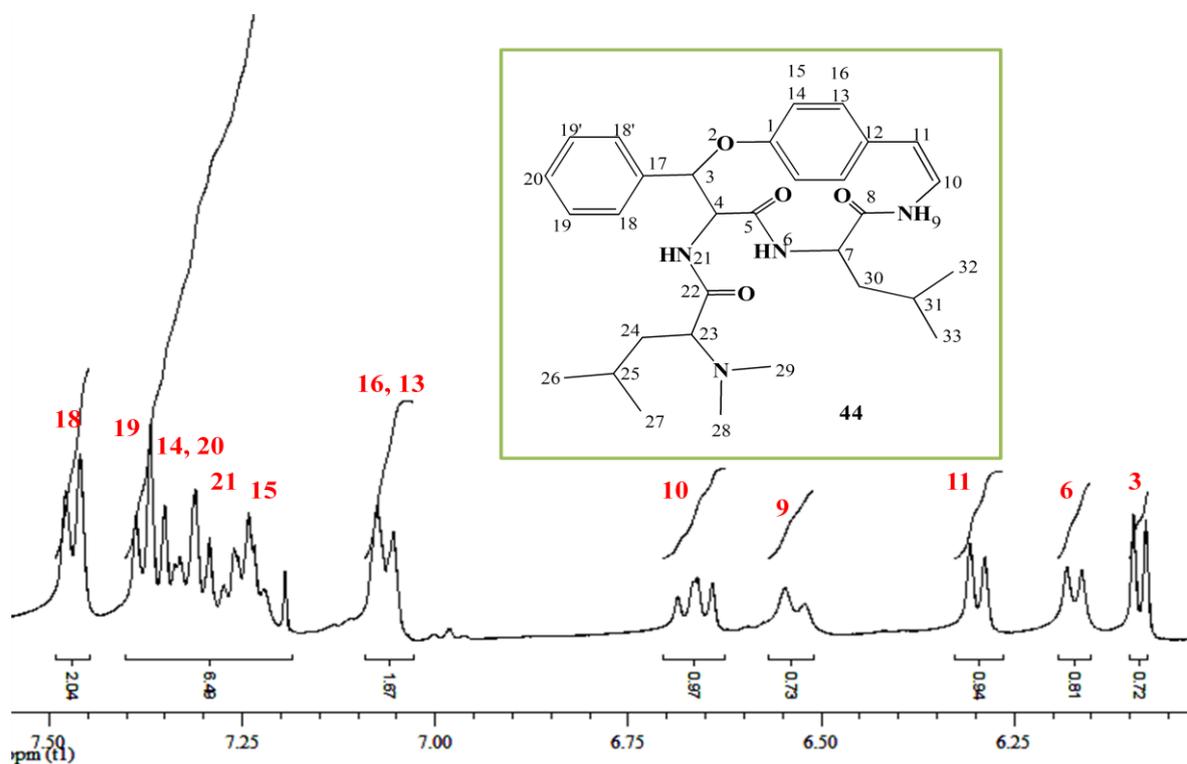


Figura 37: Expansão do espectro de RMN de ^1H , região δ 6,00-7,50 ppm, do alcalóide ciclopeptídico Discarina C, em CDCl_3 a 400MHz.

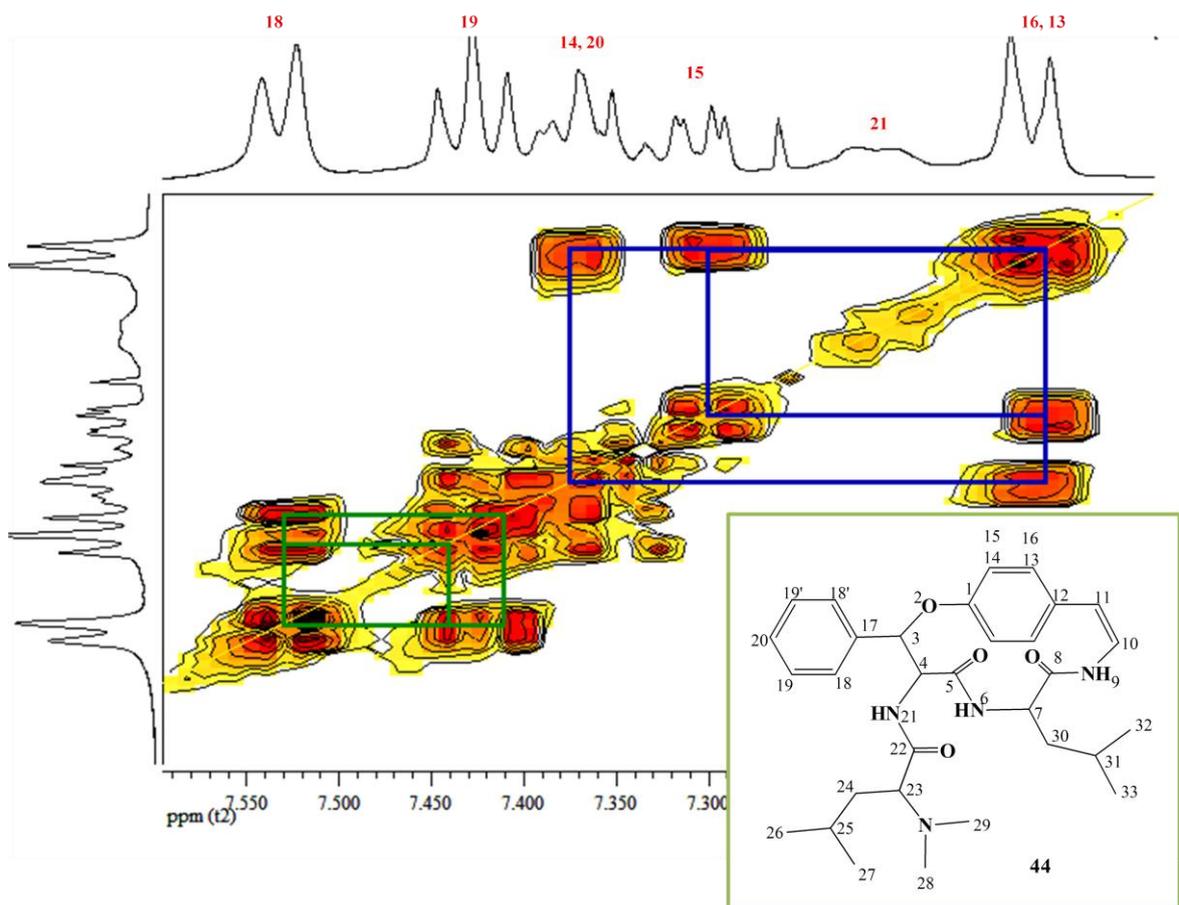


Figura 38: Expansão do espectro de RMN de COSY, região δ 6,00-7,60 ppm, do alcalóide ciclopeptídico Discarina C, em CDCl_3 a 400MHz.

No espectro de RMN ¹³C, Figura 39, é verificado a presença de 30 sinais de carbono. Destes sinais, um indica sobreposição de sinais de dois núcleos de carbonos, indicando que a estrutura deste alcalóide seja composta por trinta e um carbonos, e que possui a seguinte fórmula molecular: $\text{C}_{31}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_4$.

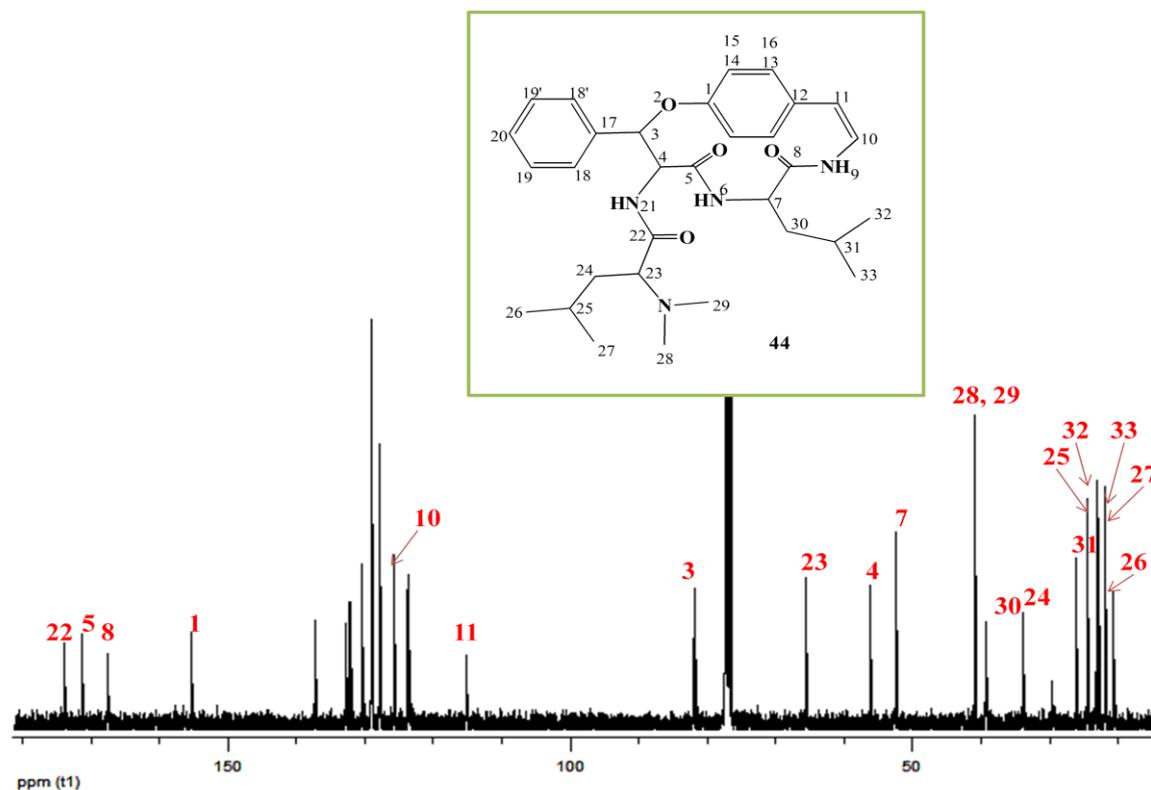


Figura 39: Espectro de RMN de ^{13}C do alcalóide ciclopeptídico Discarina C, em CDCl_3 a 100MHz.

Por meio das análises acima citadas e consultas à literatura, o alcalóide J02 foi identificado como sendo o alcalóide ciclopeptídico Discarina C (**44**), o qual já tinha sido isolado da *Discaria febrífuga*. Seus dados espectrais de RMN de ^1H e de ^{13}C estão descritos na parte experimental (página 62).

Nas tabelas 21 e 22 estão listados os deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C , bem como os comparativos da literatura.

Tabela 21: Dados de RMN ^1H da Discarina C (**44**) (CDCl_3 , 400,13 MHz)

Posição	δ_{H} ppm	δ_{H}^* ppm
1	-	-
2	-	-
3	6,07 (d, $J=6,5\text{Hz}$)	6,16 (d, $J=6,4\text{Hz}$)
4	4,66 (dd, $J=6,5, 8,0\text{Hz}$)	4,74 (dd, $J=6,4, 8,8\text{Hz}$)
5	-	-
6	6,19 (d, $J=8,0\text{Hz}$)	6,26 (d, $J=8,0\text{Hz}$)
7	4,08 (m)	4,14 (m)

8	-	-
9	6,53 (d, $J=10,5\text{Hz}$)	6,61 (d, $J=10,4\text{Hz}$)
10	6,65 (dd, $J=7,5, 10,5\text{Hz}$)	6,73 (dd, $J=7,6, 10,4\text{Hz}$)
11	6,29 (d, $J=7,5\text{Hz}$)	6,37 (d, $J=7,6\text{Hz}$)
12	-	-
13	7,04-7,35	7,12-7,55
14	7,04-7,35	7,12-7,55
15	7,04-7,35	7,12-7,55
16	7,04-7,35	7,12-7,55
17	-	-
18	7,04-7,35	7,12-7,55
18'	7,04-7,35	7,12-7,55
19	7,04-7,35	7,12-7,55
19'	7,04-7,35	7,12-7,55
20	7,04-7,35	7,12-7,55
21	7,32	7,32
22	-	-
23	2,54 (dd, $J=5,0, 7,6\text{Hz}$)	2,61 (dd, $J=4,8\text{Hz}, 5,2\text{Hz}$)
24	1,22 (m)	1,31 (m)
24'	1,02 (m)	1,00 (m)
25	1,51 (m)	1,23 (m)
26	0,79 (d, $J=6,5\text{Hz}$)	0,71 (d, $J=6,8\text{Hz}$)
27	0,72 (d, $J=6,5\text{Hz}$)	0,79 (d, $J=6,8\text{Hz}$)
28	1,58 (s, N-(CH ₃) ₂)	1,66 (s, N-(CH ₃) ₂)
29	1,58 (s, N-(CH ₃) ₂)	1,66 (s, N-(CH ₃) ₂)
30	1,67 (m)	1,77 (m)
30'	1,19 (m)	1,27 (m)
31	1,24 (m)	1,61 (m)
32	0,72 (d, $J=6,5\text{Hz}, \text{CH}_3$)	0,79 (d, $J=6,8\text{Hz}, \text{CH}_3$)
33	0,63 (d, $J=6,6\text{Hz}, \text{CH}_3$)	0,87 (d, $J=6,4\text{Hz}, \text{CH}_3$)

δ_{H^*} (CDCl₃, 400 MHz) conforme Giacomelli (2005).

Tabela 22: Dados de RMN ¹³C da Discarina C (**44**) (CDCl₃, 100,62 MHz)

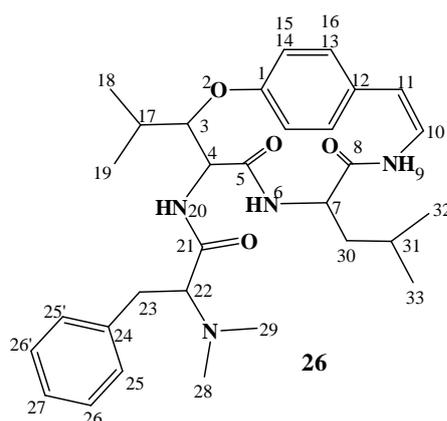
Posição	δ_{H} ppm	δ_{H^*} ppm
1	155,4	155,3
2	-	-

3	81,9	81,9
4	56,3	55,9
5	171,2	171,1
6	-	-
7	52,5	54,0
8	167,6	167,5
9	-	-
10	125,8	125,6
11	115,1	115,0
12	132,8	132,7
13	123,6-132,1	123,6-132,1
14	123,6-132,1	123,6-132,1
15	123,6-132,1	123,6-132,1
16	123,6-132,1	123,6-132,1
17	137,4	137,2
18	127,8-129,0	123,6-132,1
18'	127,8-129,0	123,6-132,1
19	127,8-129,0	123,6-132,1
19'	127,8-129,0	123,6-132,1
20	127,8-129,0	123,6-132,1
21	-	-
22	173,8	173,8
23	65,7	65,4
24	34,0	33,7
25	24,5	24,4
26	20,7	20,5
27	21,9	21,8
28	41,0	40,9
29	41,0	40,9
30	39,4	40,9
31	26,0	26,1
32	23,1	23,2
33	22,8	22,8

δ_{C^*} (CDCl₃, 400 MHz) conforme Giacomelli (2005).

3.2.1.3 Alcalóide J11

O alcalóide J11 (**26**) foi isolado da FBEAT, pela primeira vez, obtida do fracionamento ácido-base do extrato bruto das cascas da raiz da espécie *Discaria americana*, a qual foi coletada no distrito de São Rafael, em São Sepé, RS, no mês de fevereiro de 2012, conforme descrito na página 62. O mesmo foi identificado por meio de dados de RMN ^1H e ^{13}C . Não foi possível comparar os dados espectrais com a literatura, pois as condições não são as mesmas.



Com base no espectro de RMN de ^1H (Figura 40) é possível verificar a presença de quatro sinais de hidrogênios metílicos, os quais estão localizados na região entre δ 0,55-1,21 ppm. Estes hidrogênios apresentam-se na forma de dubletos e caracterizam a presença das unidades leucina e β -hidroxileucina como integrantes do sistema macrocíclico de quatorze membros por meio dos sinais δ 0,93 (3H, d, $J=6,5\text{Hz}$, CH_3 -18), δ 1,19 (3H, d, $J=6,5\text{Hz}$, CH_3 -19), δ 0,54 (3H, d, $J=6,4\text{Hz}$, CH_3 -32), δ 0,58 (3H, d, $J=6,4\text{Hz}$, CH_3 -33) (Figura 41).

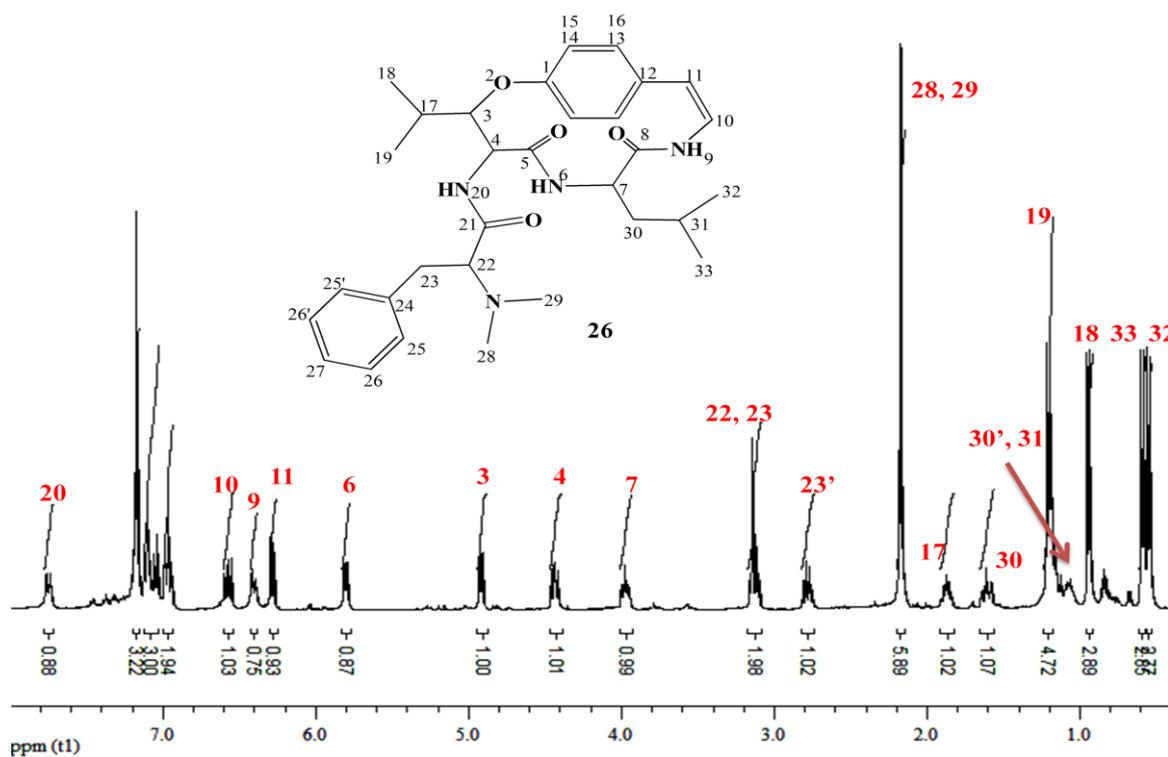


Figura 40: Espectro de RMN de ^1H , do alcalóide ciclopeptídico Frangulofina, em CDCl_3 a 400MHz.

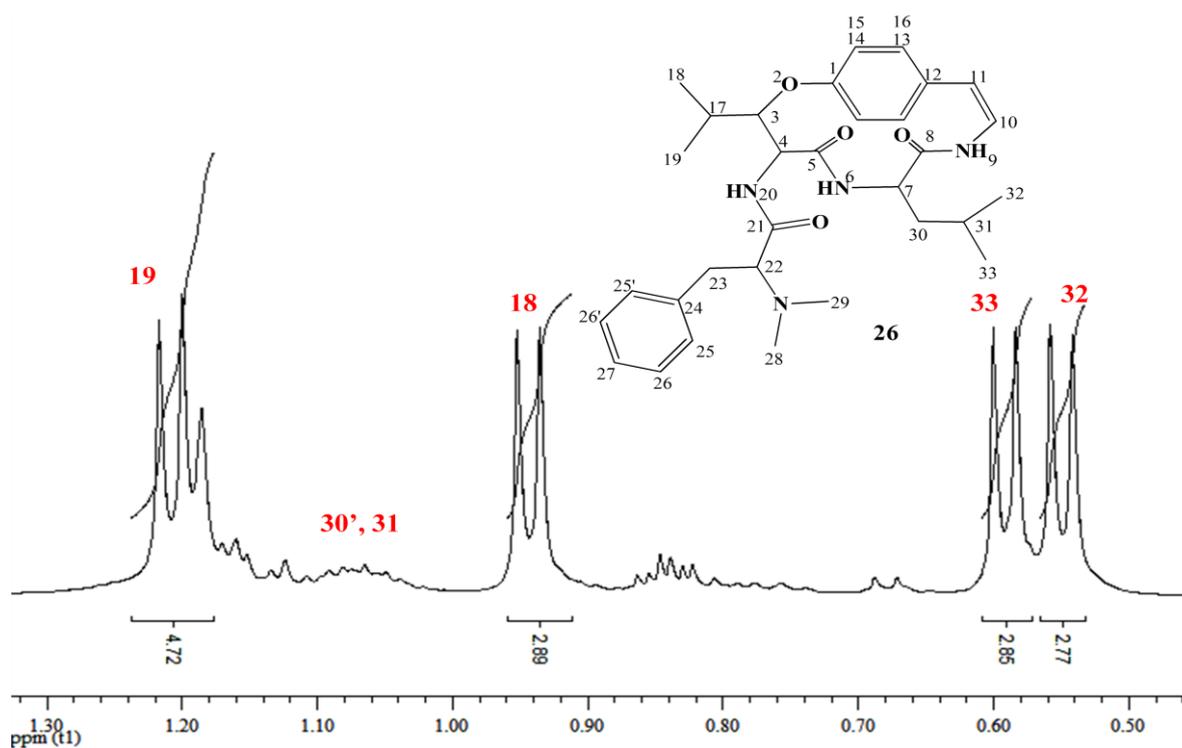


Figura 41: Expansão do espectro de RMN de ^1H , região entre δ 0,50-1,30 ppm, do alcalóide ciclopeptídico Frangulofina, em CDCl_3 a 400MHz.

Ao observar a unidade β -hidroxileucina é possível verificar que o hidrogênio metínico H-3 (β -carbonílico) acopla em δ 4,91 ppm (1H, dd, $J=1,9, 7,2$ Hz), na forma de um duplo dubleto, por acoplar com os hidrogênios metínicos H-4 (δ 4,42 ppm, 1H, dd, $J=7,2, 10,2$ Hz) e H-17 (δ 1,84 ppm, 1H, m). Outro acoplamento que ocorre nesta unidade é o do H-4 com o hidrogênio amídico NH-20 (δ 7,74 ppm, 1H, d, $J=10,2$ Hz), na forma de um dubleto (Figuras 42 e 43).

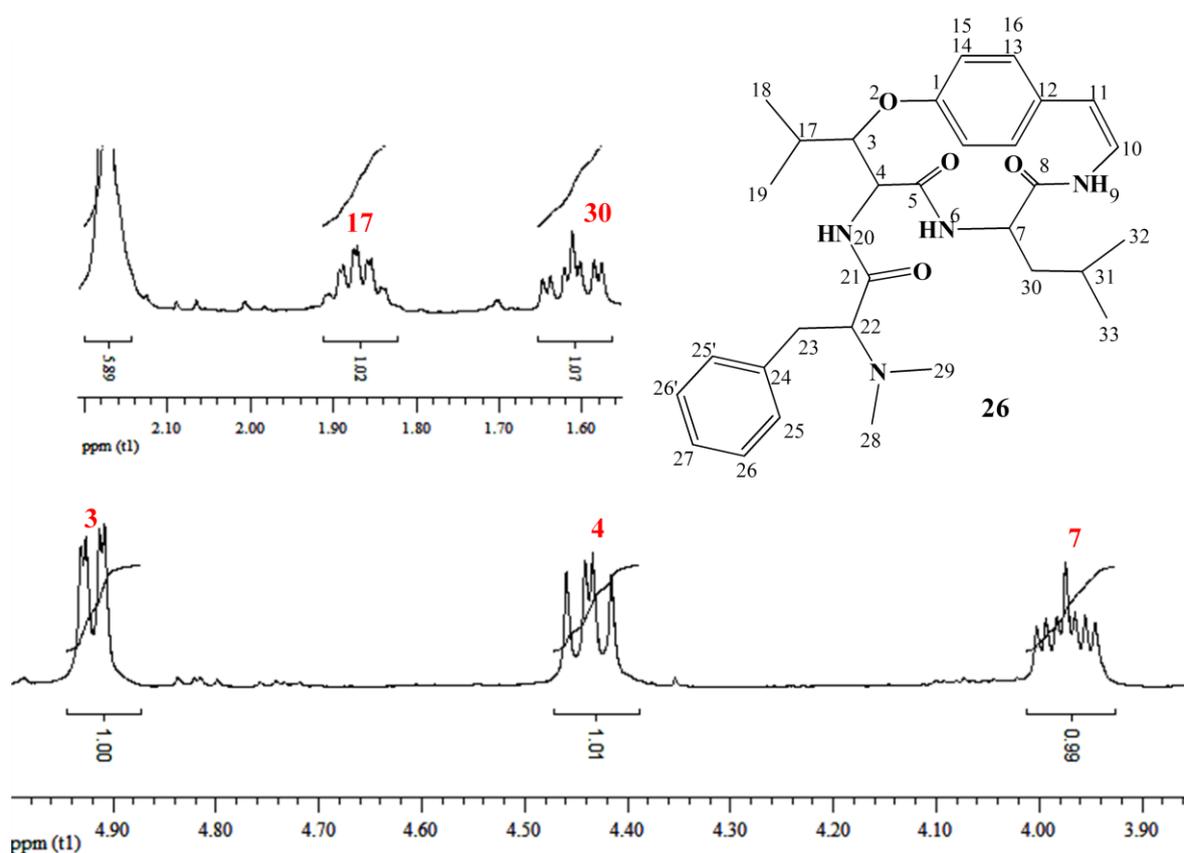


Figura 42: Expansão do espectro de RMN de ^1H , região entre δ 3,90-4,95 ppm, do alcalóide ciclopeptídico Frangulofina, em CDCl_3 a 400MHz.

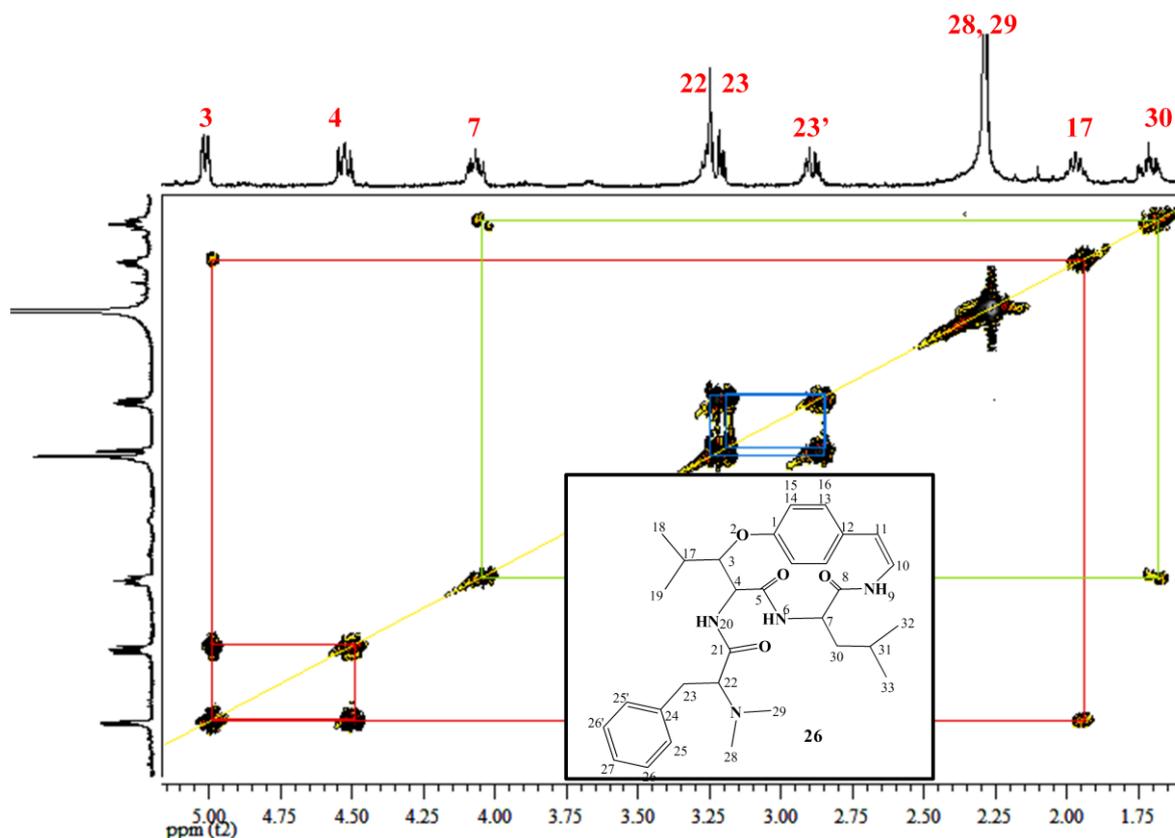


Figura 43: Expansão do espectro de RMN de COSY, região entre δ 1,75-5,00 ppm, do alcalóide ciclopeptídico Frangulofina, em CDCl_3 a 400MHz.

O hidrogênio metínico α -carbonílico H-7 da unidade leucina forma um multipletto em δ 3,97 ppm (1H, m) resultante do acoplamento com os hidrogênios diastereotópicos H-30 (δ 1,58 ppm) e H-30' (δ 1,15 ppm), os quais aparecem na forma de um multipletto, e com o hidrogênio amídico NH-6 (δ 5,80 ppm, 1H, d, $J=7,8\text{Hz}$), que forma um dupletto por acoplar com o H-7. O sistema de spins desta unidade se completa pelo acoplamento de H-30 com H-31 (δ 1,13 ppm, 1H, m), o qual se correlaciona com os hidrogênios metilênicos Me-32 (δ 0,54 ppm, 3H, d, $J=6,4\text{Hz}$) e Me-33 (δ 0,59 ppm, 3H, d, $J=6,4\text{Hz}$), como mostram as Figuras 42, 43 e 44 .

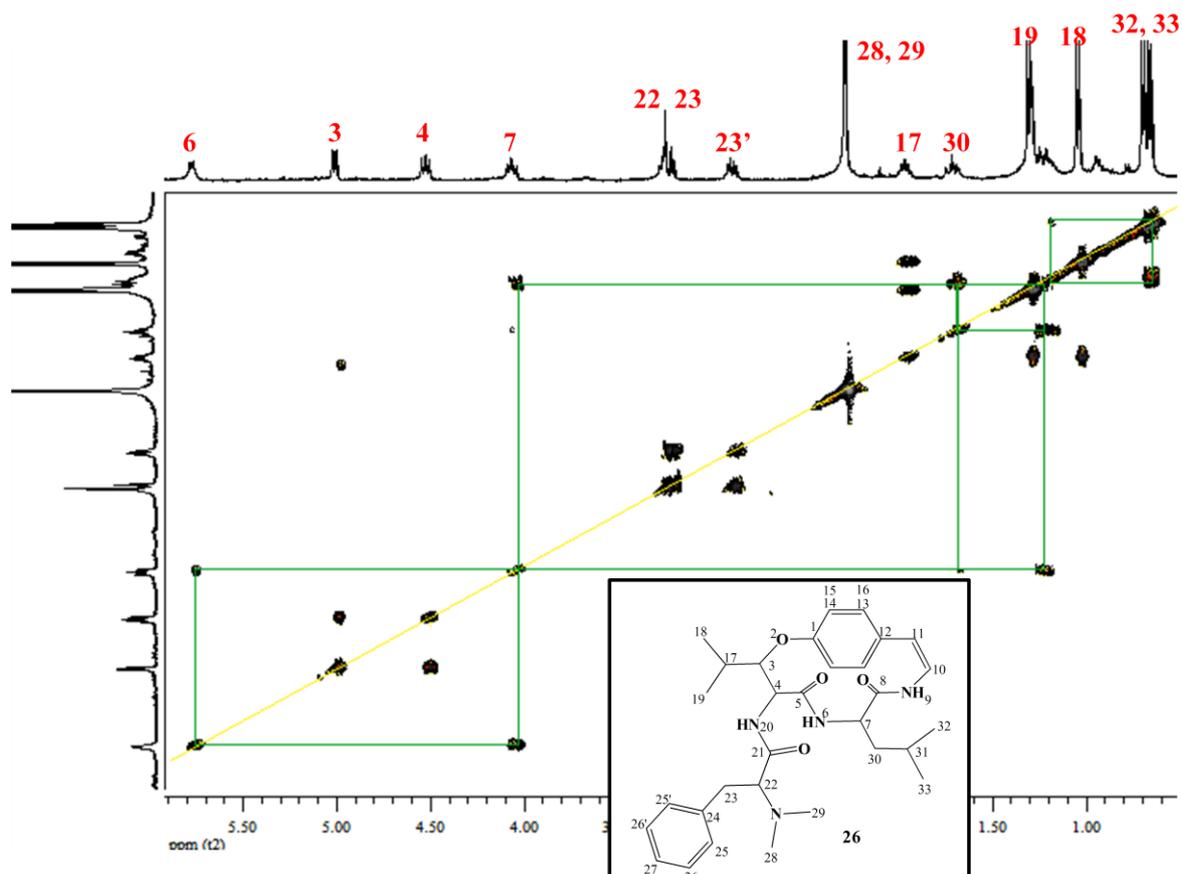


Figura 44: Expansão do espectro de RMN de COSY, região entre δ 1,00-6,00 ppm, do alcalóide ciclopeptídico Frangulofina, em CDCl_3 a 400MHz.

O hidrogênio metínico H-22 (α -carbonílico) aparece em δ 3,14 ppm (1H, d, $J=6,2\text{Hz}$) e os hidrogênios diastereotópicos H-23 e H-23' aparecem em δ 3,10 (1H, d, $J=6,2\text{Hz}$) e δ 2,75 (1H, d, $J=6,2\text{Hz}$), respectivamente. Tais hidrogênios pertencem ao resíduo terminal básico da estrutura do alcalóide **J11**. As atribuições destes hidrogênios evidenciam a formação de um sistema de spins isolado (Figura 45), o que indica a presença da unidade fenilalanina no resíduo básico terminal *N,N*-dimetil a qual tem seus deslocamentos químicos na região que compreende δ 6,99-7,21 ppm (5H, H-25, -25', -26, -26', -27). Ainda nesta unidade, os sinais das metilas do resíduo básico terminal *N,N*-dimetil aparecem na forma de um singlete em δ 2,18 ppm [6H, *s*, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ -28, -29] (Figura 46).

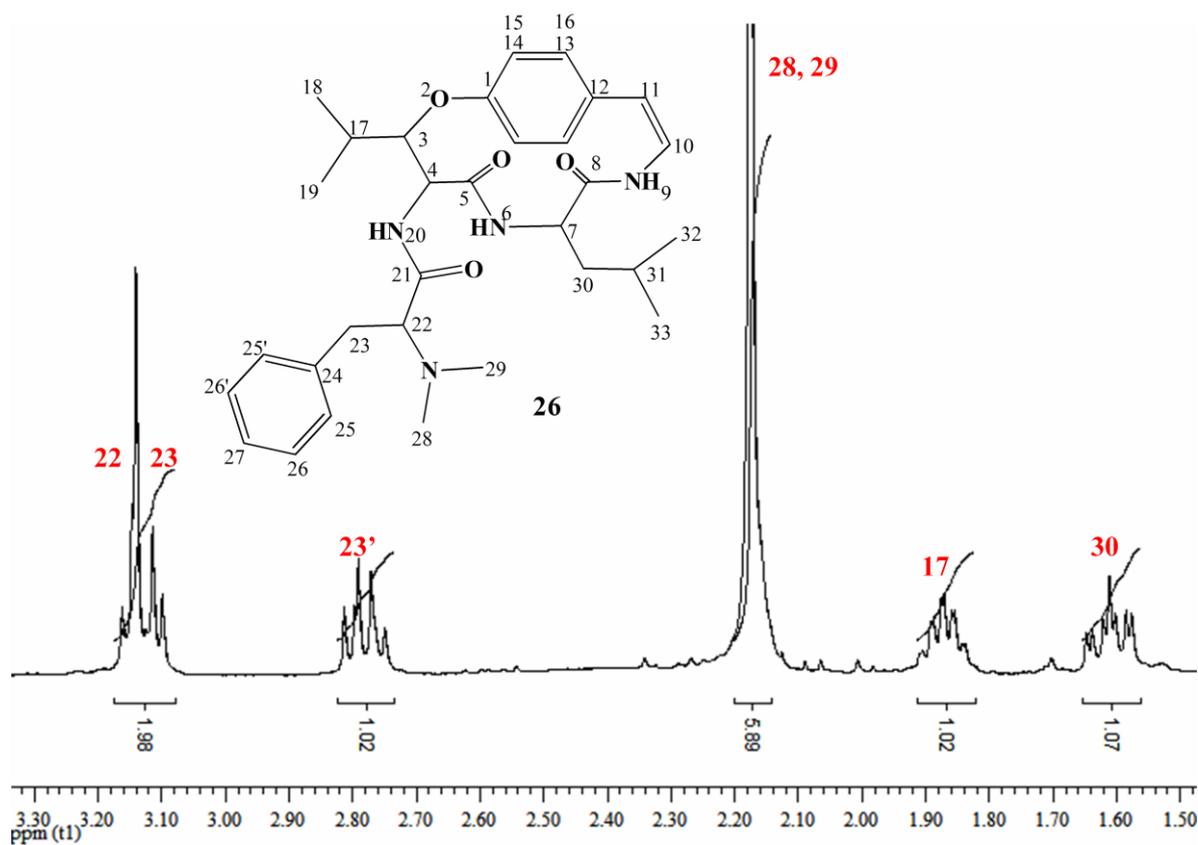


Figura 45: Expansão do espectro de RMN de ^1H , região entre δ 1,50-3,30 ppm, do alcalóide ciclopeptídico Frangulofolina, em CDCl_3 a 400MHz.

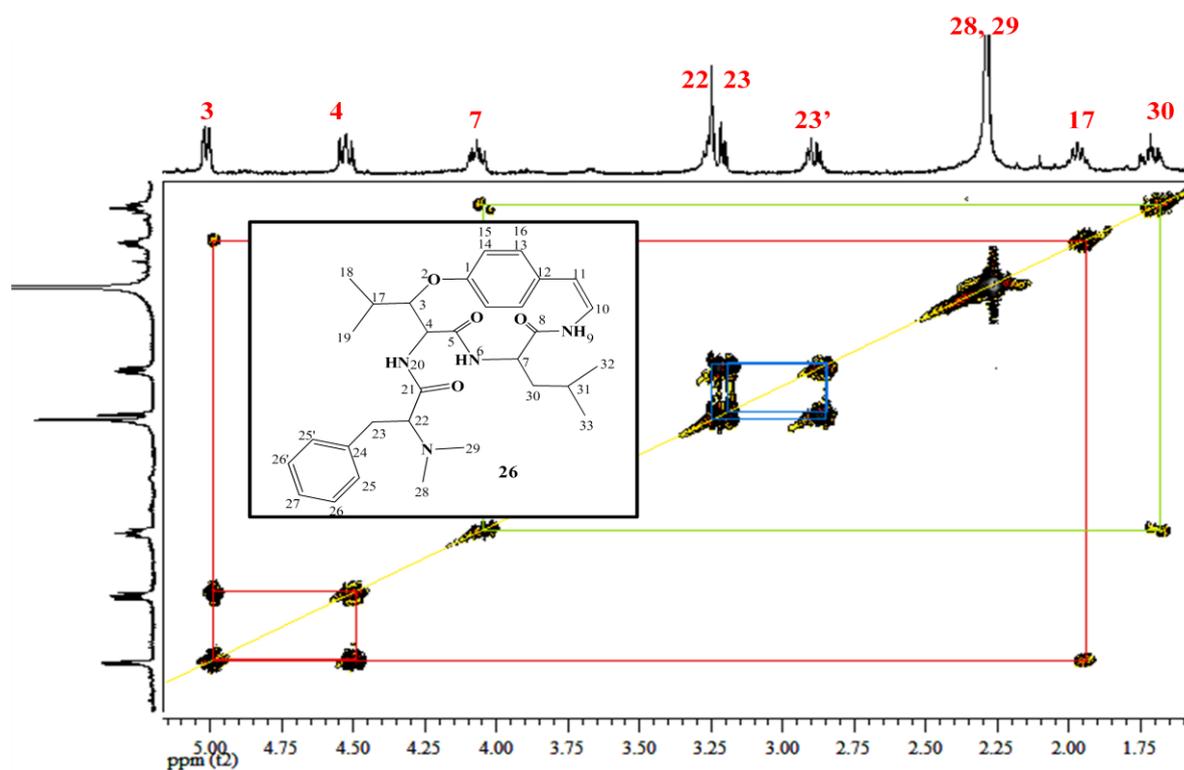


Figura 46: Expansão do espectro de RMN de COSY, região entre δ 1,70-5,00 ppm, do alcalóide ciclopeptídico Frangulofolina, em CDCl_3 a 400MHz.

A unidade estirilamina apresenta seus hidrogênios aromáticos em uma região espectral entre δ 6,96-7,21 (4H, H-13, -14, -15, -16), sendo que os sinais dos mesmos aparecem em sobreposição com os sinais da unidade fenilalanina. Já os sinais que correspondem aos hidrogênios olefínicos H-10 (1H, dd, $J=7,5, 10,0\text{Hz}$) e H-11 (1H, d, $J=7,5\text{Hz}$) e ao hidrogênio amídico NH-9 (1H, d, $J=10,0\text{Hz}$) aparecem na região δ 6,28-6,58 ppm. H-10 apresenta um duplo dubleto, pois acopla com H-11 e com NH-9. Já H-11 forma um dubleto, pois acopla somente com H-10, enquanto que NH-9 acopla somente com H-10, apresentando um sinal de dubleto (Figuras 47 e 48).

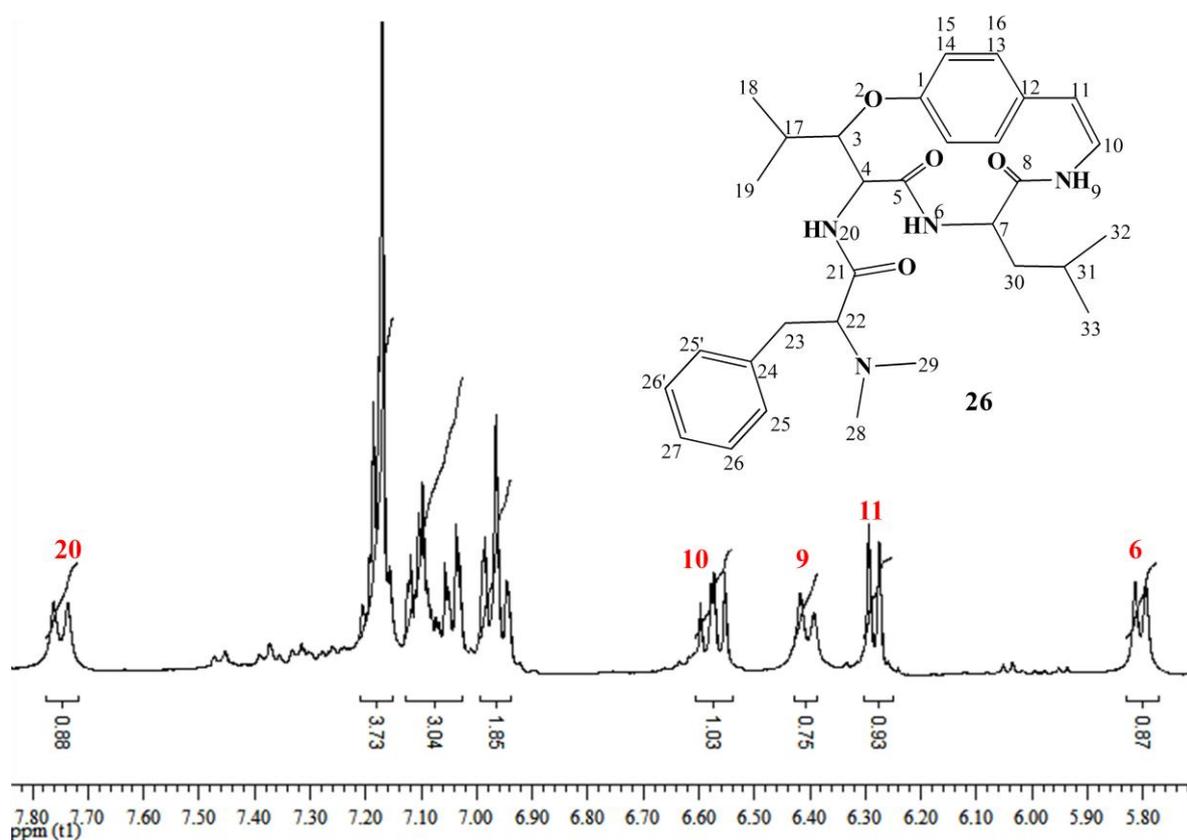


Figura 47: Expansão do espectro de RMN de ^1H , região entre δ 5,75-7,80 ppm, do alcalóide ciclopeptídico Frangulofina, em CDCl_3 a 400MHz.

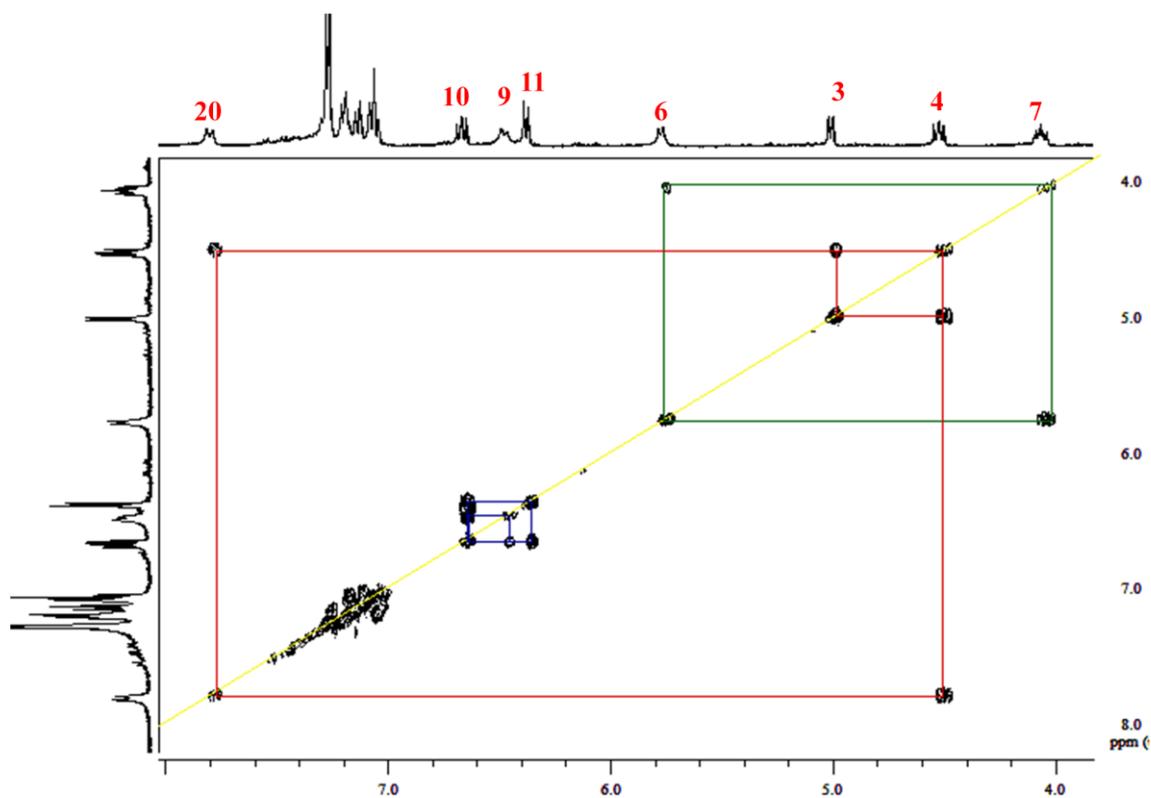


Figura 48: Expansão do espectro de RMN de COSY, região entre δ 4,00-8,00 ppm, do alcalóide ciclopeptídico Frangulolona, em CDCl_3 a 400MHz.

Com o espectro de RMN ^{13}C (Figura 49) foi possível identificar a presença de vinte e nove sinais de carbonos, sendo que dois destes sinais apresentavam dois núcleos de carbono, resultando em um total de trinta e um carbonos. Dessa forma, define a estrutura do alcalóide ciclopeptídico tendo como fórmula molecular $\text{C}_{31}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_4$.

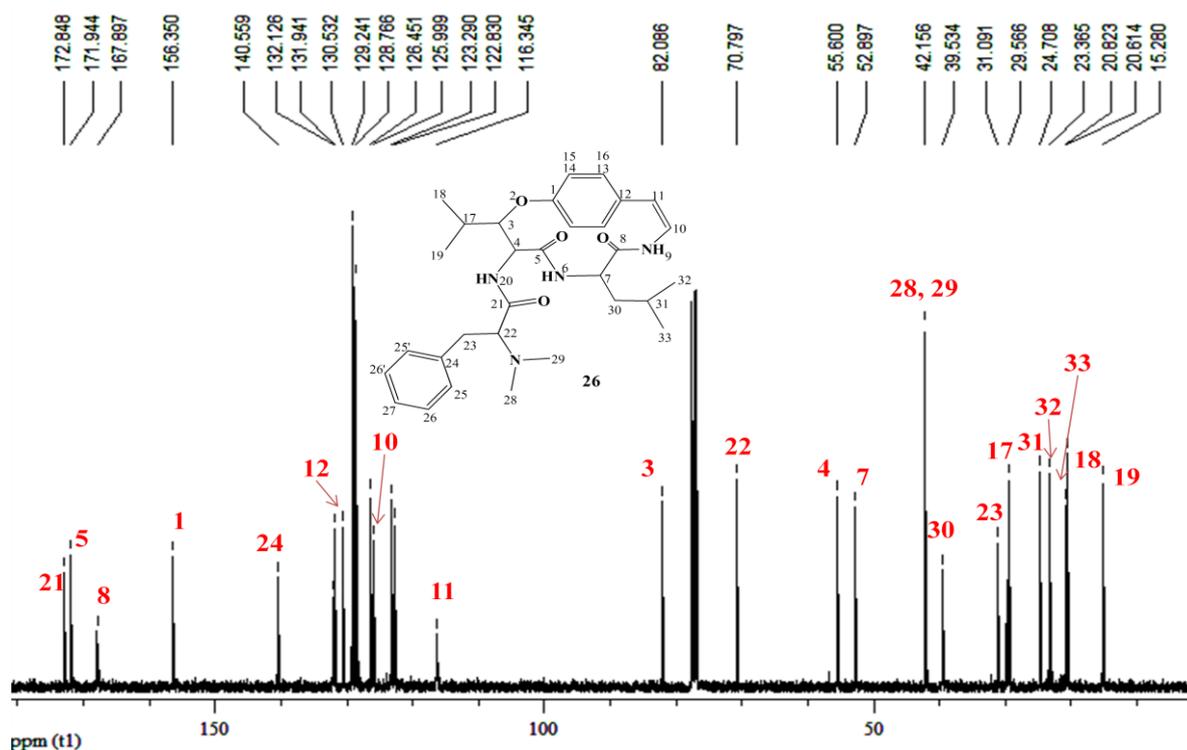


Figura 49: Espectro de RMN de ^{13}C , do alcalóide ciclopeptídico Frangulofolina, em CDCl_3 a 100MHz.

Por meio dos dados obtidos dos espectros de RMN de ^1H , de ^{13}C e COSY acima discutidos, relacionados aos dados obtidos da literatura, foi possível propor a estrutura **26** para o composto **J11**, o qual corresponde ao alcalóide ciclopeptídico Frangulofolina, isolado anteriormente da espécie *Ziziphus lotus* (ABU ZARGA, 1995).

Na Tabela 23 estão listados os deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C .

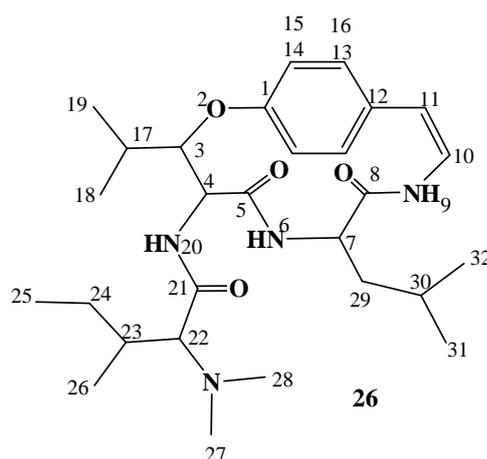
Tabela 23: Dados de RMN ^1H da Frangulofolina (**26**) (CDCl_3 , 400,13 MHz) e de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100,62 MHz)

Posição	δ_{H} ppm	δ_{C} ppm
1	-	156,4
2	-	-
3	4,91 (1H, dd, $J=1,9, 7,2\text{Hz}$)	82,1
4	4,42 (1H, dd, $J=7,2, 10,2\text{Hz}$)	55,6
5	-	171,9
6	5,80 (1H, d, $J=7,8\text{Hz}$)	-
7	3,95 (1H, m)	52,9
8	-	167,9
9	6,39 (1H, d, $J=10,0\text{Hz}$)	-

10	6,55 (1H, dd, $J=7,5, 10,0\text{Hz}$)	125,9
11	6,28 (1H, d, $J=7,5\text{Hz}$)	116,3
12	-	131,9
13	6,96-7,21	122,8-131,9
14	6,96-7,21	122,8-131,9
15	6,96-7,21	122,8-131,9
16	6,96-7,21	122,8-131,9
17	1,84 (1H, m)	29,6
18	0,94 (3H, d, $J=6,5\text{Hz}$)	15,3
19	1,19 (3H, d, $J=6,5\text{Hz}$)	20,6
20	7,74 (1H, d, $J=10,2\text{Hz}$)	-
21	-	172,8
22	3,14 (1H, d, $J=6,2\text{Hz}$)	70,8
23	3,10 (1H, d, $J=6,2\text{Hz}$)	31,1
23'	2,75 (1H, d, $J=6,2\text{Hz}$)	-
24	-	140,6
25	6,99-7,21	126,4-129,2
25'	6,99-7,21	126,4-129,2
26	6,99-7,21	126,4-129,2
26'	6,99-7,21	126,4-129,2
27	6,99-7,21	126,4-129,2
28	2,18 (s, N-(CH ₃) ₂)	42,2
29	2,18 (s, N-(CH ₃) ₂)	42,2
30	1,57 (1H, m)	39,5
30'	1,15 (1H, m)	-
31	1,13 (1H, m)	24,7
32	0,54 (3H, d, $J=6,4\text{Hz}$)	23,4
33	0,58 (3H, d, $J=6,4\text{Hz}$)	20,8

3.2.1.4 Alcalóide J09

Este metabólito, J09 (**26**), foi isolado da FBEAT, obtida do fracionamento ácido-base do extrato bruto das cascas da raiz da espécie *Discaria americana*, a qual foi coletada no distrito de São Rafael, em São Sepé, RS, no mês de fevereiro de 2012, conforme descrito na página 62. O mesmo foi identificado por meio de dados de RMN ^1H e ^{13}C , assim como por comparação com dados obtidos da literatura (GIACOMELLI, 2005).



O espectro de RMN ^1H de J09 (Figura 50) permitiu verificar a presença de cinco sinais de hidrogênios metílicos os quais se localizam na região entre δ 0,69-1,20 ppm. Dentre estes hidrogênios, os hidrogênios H-25 (δ 0,85 ppm) e H-26 (δ 0,86 ppm) da unidade *N,N*-dimetil isoleucina aparecem com sobreposição de sinais. Ainda nesta unidade, os hidrogênios metílicos H-24 e H-24' aparecem, respectivamente, em δ 1,42 ppm e δ 1,26 ppm, na forma de um multiplete pelo acoplamento com os hidrogênios H-23 (δ 1,70 ppm, m) e H-25. Além disso, o H-22 (δ 2,58 ppm) aparece na forma de um dublete pelo acoplamento com o H-23, (Figura 51).

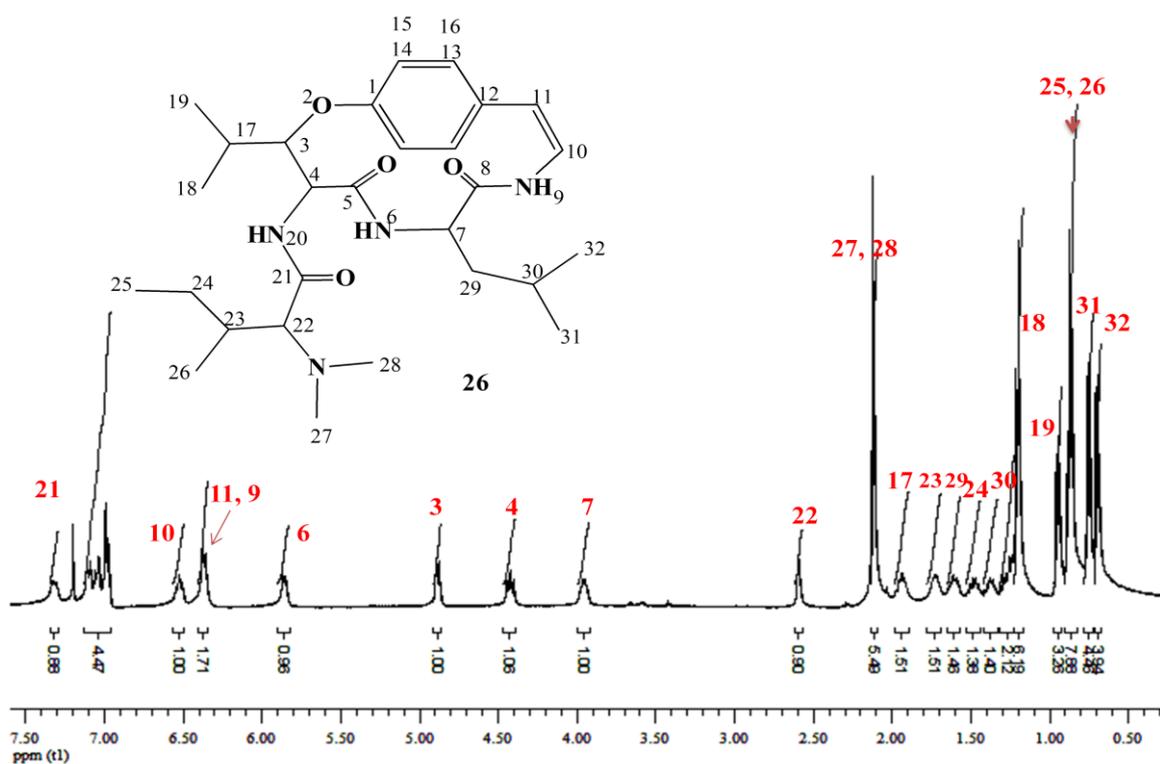


Figura 50: Espectro de RMN de ^1H , do alcalóide ciclopeptídico Frangulanina, em CDCl_3 a 400MHz.

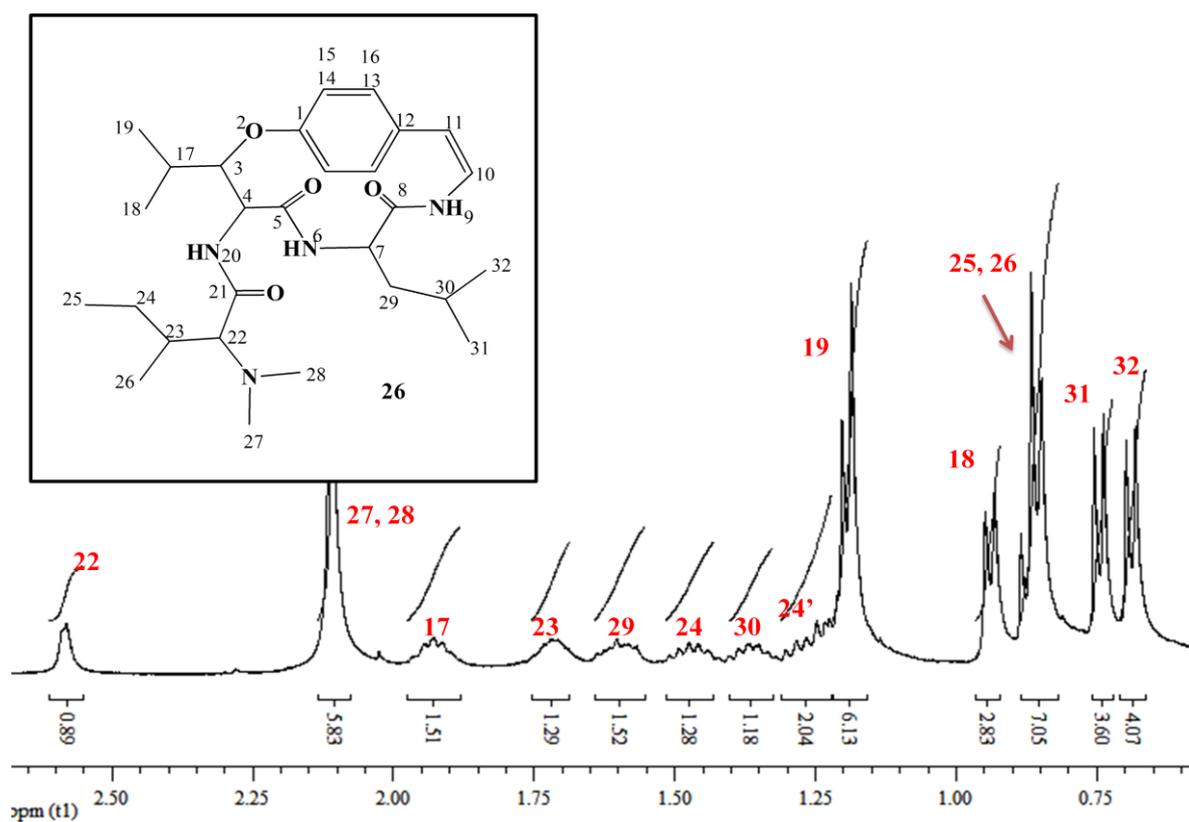


Figura 51: Expansão do espectro de RMN de ^1H , região entre δ 0,70-2,75 ppm, do alcalóide ciclopeptídico Frangulanina, em CDCl_3 a 400MHz.

Os sinais dos hidrogênios pertencentes à unidade leucina do sistema macrocíclico aparecem na região compreendida entre δ 0,75 ppm e δ 5,85 ppm. O hidrogênio metínico H-7 (δ 3,92 ppm), α -carbonílico, aparece na forma de um multipletto pelo acoplamento com o hidrogênio amídico NH-6 (δ 5,84 ppm) e com os hidrogênios diastereotópicos H-29 (δ 1,57 ppm) e H29' (δ 1,25 ppm). Tais hidrogênios aparecem na forma de multipletos pelo acoplamento com os hidrogênios metínicos H-7 e H-30 (δ 1,45 ppm). O H-30 aparece na forma de um multipletto pelo acoplamento com o hidrogênio H-7 e com os hidrogênios das metilas Me-31 (δ 0,74 ppm) e Me-32 (δ 0,68 ppm). Com isso, confirma-se a presença deste aminoácido na estrutura do alcalóide **J11** (Figura 52).

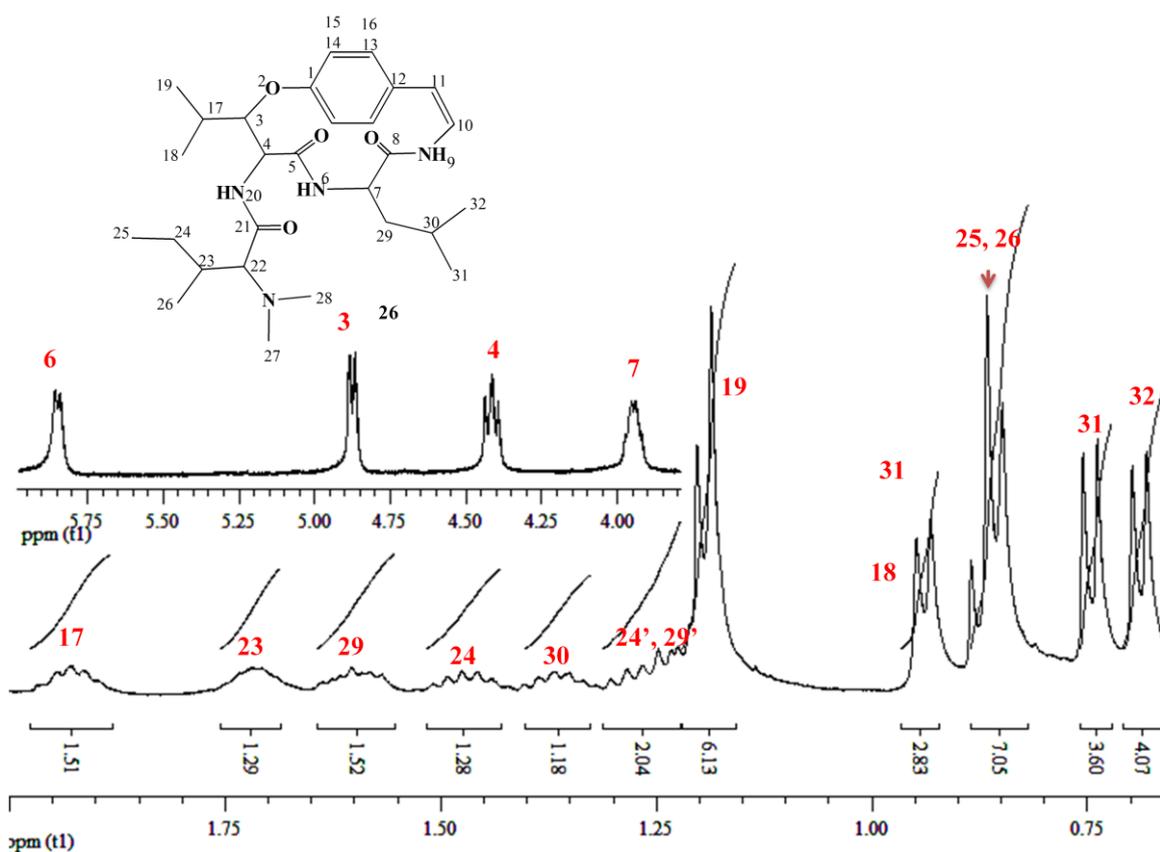


Figura 52: Expansão do espectro de RMN COSY ^1H - ^1H , região entre δ 0,70-1,80 ppm, do alcalóide ciclopeptídico Frangulanina, em CDCl_3 a 400MHz.

Os hidrogênios pertencentes à unidade β -hidroxileucina são os hidrogênios amídico H-20, os metínicos H-4, H-3 e H-17, e os metílicos Me-18 e Me-19. H-20 (δ 7,29 ppm) aparece na forma de um dubleto pelo acoplamento com H-4 (δ 4,39 ppm), que por sua vez aparece na forma de um duplo dubleto por acoplar com H-20 e com H-3 (δ 4,87 ppm), o qual aparece na forma de um duplo dubleto pelo acoplamento com H-4 e com H-17 (δ 1,89 ppm). H-17

aparece na forma de um multipeto pelo acoplamento com H-3 e com as metilas Me-18 (δ 1,87 ppm, d) e Me-19 (δ 0,93 ppm, d) (Figura 53).

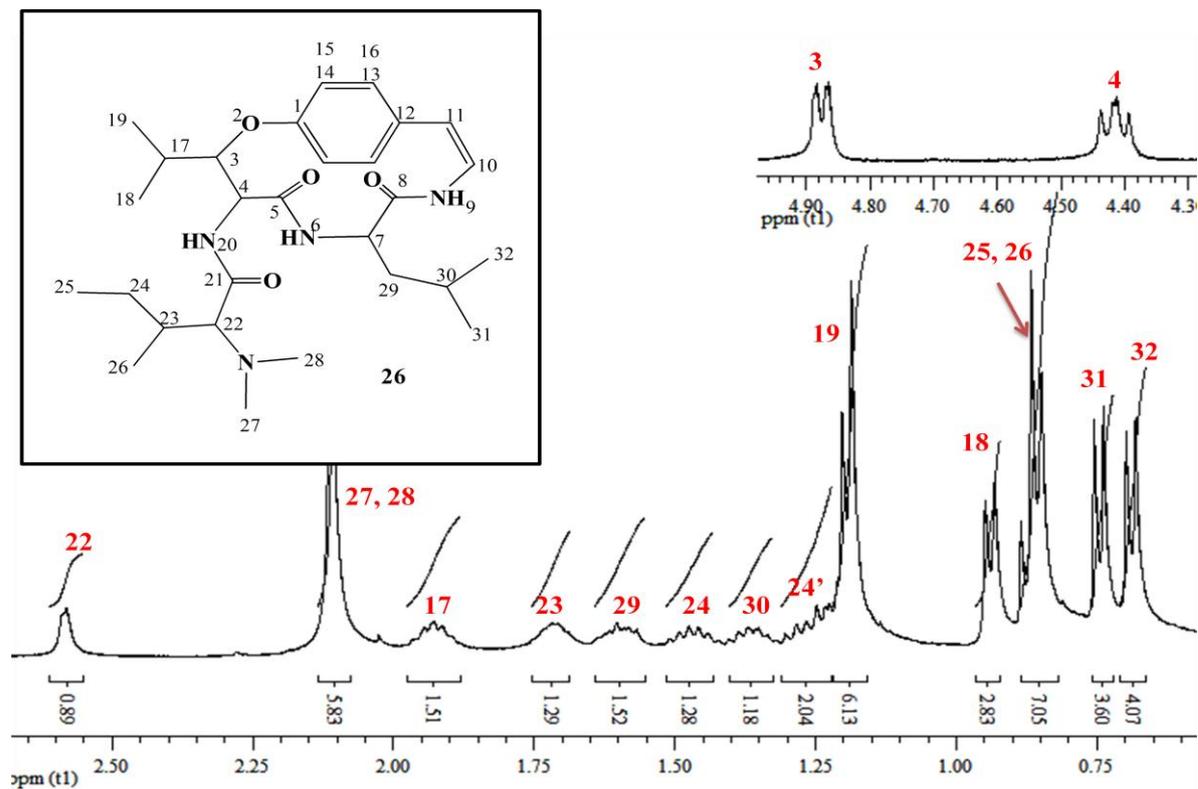


Figura 53: Expansão do espectro de RMN de ^1H , região entre δ 0,70-2,75 ppm, do alcalóide ciclopeptídico Frangulanina, em CDCl_3 a 400MHz.

O hidrogênio olefínico H-10 (δ 6,50 ppm) aparece na forma de um tribleto pelo acoplamento com o hidrogênio olefínico H-11 (δ 6,35 ppm) e com o hidrogênio amídico NH-9 (δ 6,35 ppm). Os sinais dos H-11 e H-9 aparecem sobrepostos. Os sinais do anel aparecem na região entre δ 6,97-7,19 ppm (Figura 54). Os sistemas de spins estão mostrados na (Figura 55).

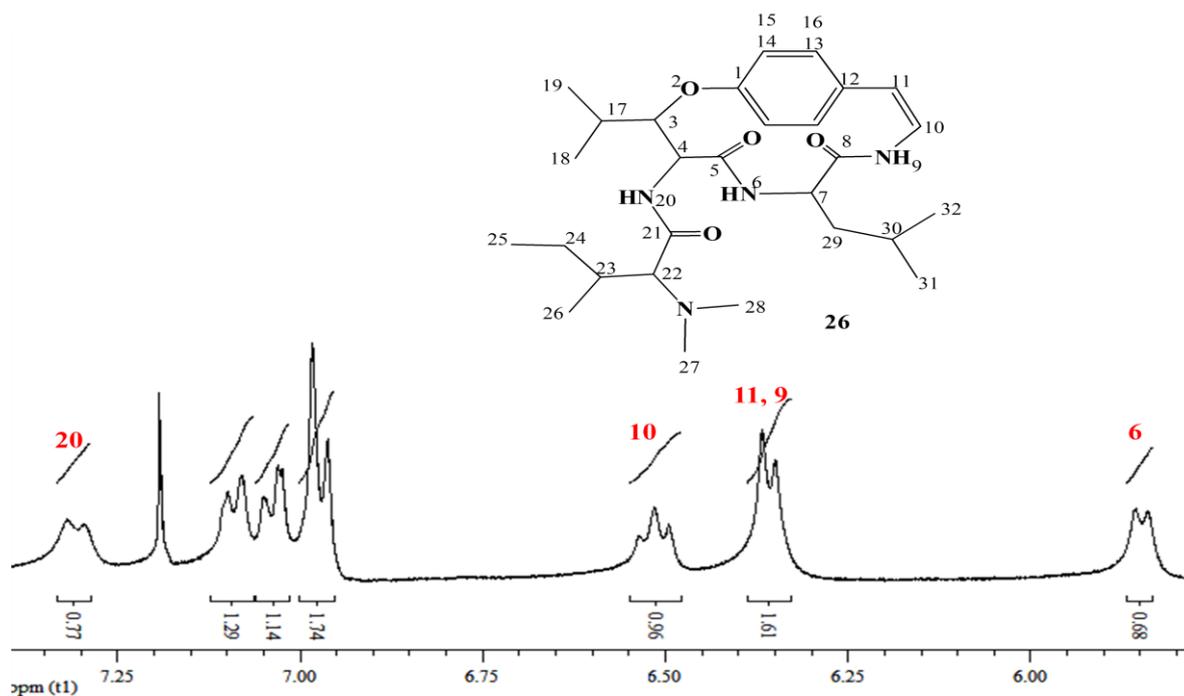


Figura 54: Expansão do espectro de RMN de ^1H , região entre δ 5,75-7,50 ppm, do alcalóide ciclopeptídico Frangulanina, em CDCl_3 a 400MHz.

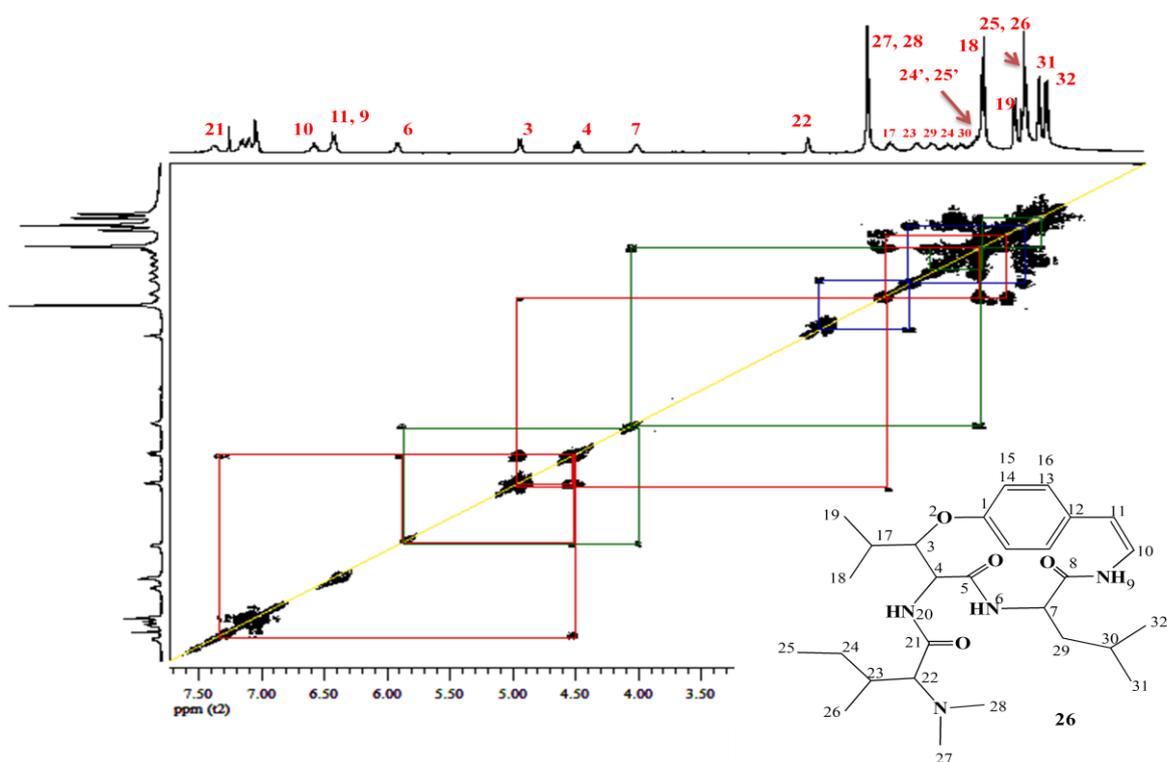


Figura 55: Espectro de RMN COSY ^1H - ^1H , do alcalóide ciclopeptídico Frangulanina, em CDCl_3 a 400MHz.

Com o espectro de RMN de ^{13}C (Figura 56) foi verificado a presença de vinte e oito sinais de carbonos que estão distribuídos em uma região espectral que compreende δ 12,3-172,4 ppm, o que evidencia a presença de carbonos desidrogenados, metínicos, metilênicos e metílicos, cuja fórmula molecular é $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{N}_4\text{O}_4$.

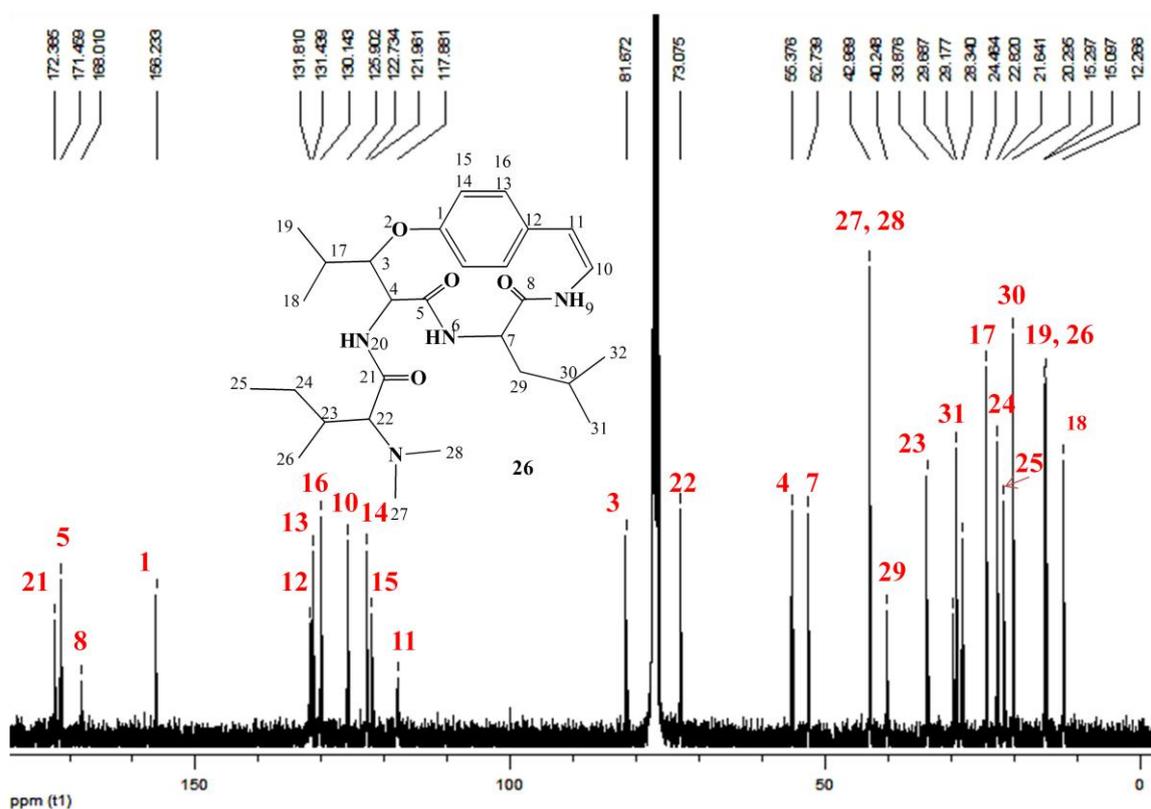


Figura 56: Espectro de RMN de ^{13}C , do alcalóide ciclopeptídico Frangulanina, em CDCl_3 a 100MHz.

Com base nos dados descritos acima, e com o auxílio de dados da literatura, foi proposto que o alcalóide J09 tenha a estrutura **27**, o que remete ao alcalóide ciclopeptídico Frangulanina, isolado anteriormente de várias espécies da família Rhamnaceae.

Os dados físicos e os deslocamentos químicos dos hidrogênios e dos carbonos do alcalóide J09 estão descritos na página 70, na parte experimental.

Nas Tabelas 24 e 25 estão listados os deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C , bem como os comparativos da literatura.

Tabela 24: Dados de RMN ^1H da Frangulanina (**27**) (CDCl_3 , 400,13 MHz)

Posição	δ_{H} ppm	δ_{H}^* ppm
1	-	-
2	-	-
3	4,88 (1H, dd, $J=1,8, 7,5\text{Hz}$)	4,93 (1H, dd, $J=7,6, 7,7\text{Hz}$)
4	4,42 (1H, dd, $J=7,5, 10,0\text{Hz}$)	4,48 (1H, dd, $J=7,7, 8,6\text{Hz}$)
5	-	-
6	5,85 (1H, d, $J=6,7\text{Hz}$)	6,07 (1H, d, $J=7,4\text{Hz}$)
7	3,95 (1H, m)	4,02 (m)
8	-	-
9	6,36 (1H, d, $J=8,0\text{Hz}$)	6,48
10	6,49 (1H, t, $J=8,0\text{Hz}$)	6,56 (1H, d, $J=7,9\text{Hz}$)
11	6,36 (1H, d, $J=8,0\text{Hz}$)	6,44 (1H, d, $J=7,9\text{Hz}$)
12	-	-
13	6,97-7,19	7,03-7,16
14	6,97-7,19	7,03-7,16
15	6,97-7,19	7,03-7,16
16	6,97-7,19	7,03-7,16
17	1,98 (1H, m)	2,01(m)
18	1,20 (3H, d, $J=6,6\text{Hz}$)	1,26 (3H, d, $J=8,0\text{Hz}$)
19	0,94 (3H, d, $J=6,6\text{Hz}$)	1,01 (3H, d, $J=6,8\text{Hz}$)
20	7,29 (1H, d, $J=10,0\text{Hz}$)	7,25 (1H, d, $J=8,6\text{Hz}$)
21	-	-
22	2,59 (1H, d, $J=2,3\text{Hz}$)	2,65 (1H, d, $J=4,9\text{Hz}$)
23	1,69 (1H, m)	1,77 (1H, m)
24	1,49 (1H, m)	1,52 (1H, m)
24'	1,25 (1H, m)	1,29 (1H, m)
25	0,87 (3H, t, $J=7,2\text{Hz}$)	0,95 (3H, t, CH_3)
26	0,75 (1H, d, $J=7,2\text{Hz}$)	0,91 (1H, d, $J=6,6\text{Hz}$)
27	2,14 (3H, s, $\text{N}-(\text{CH}_3)_2$)	2,18 (3H, s, $\text{N}-(\text{CH}_3)_2$)
28	2,14 (3H, s, $\text{N}-(\text{CH}_3)_2$)	2,18 (3H, s, $\text{N}-(\text{CH}_3)_2$)
29	1,65 (1H, m)	1,64 (1H, m)
29'	1,39 (1H, m)	1,25 (1H, m)
30	1,45 (1H, m)	1,79 (1H, m)
31	0,75 (3H, d, $J=6,8\text{Hz}$)	0,75 (3H, d, $J=6,6\text{Hz}$)
32	0,69 (3H, d, $J=6,8\text{Hz}$)	0,81 (3H, d, $J=6,5\text{Hz}$)

δ_{H}^* (CDCl_3 , 400 MHz) conforme Giacomelli (2005).

Tabela 25: Dados de RMN ^{13}C da Frangulanina (**27**) (CDCl_3 , 100,62 MHz)

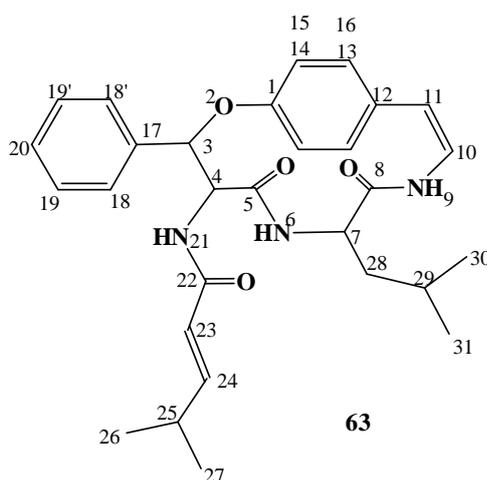
Posição	δ_{C} ppm	δ_{C^*} ppm
1	156,2	156,3
2	-	-
3	81,7	81,7
4	55,4	55,4
5	172,4	172,3
6	-	-
7	52,7	52,7
8	168,0	168,1
9	-	-
10	125,9	125,9
11	117,9	118,2
12	131,8	131,7
13	121,9-131,4	121,7-131,3
14	121,9-131,4	121,7-131,3
15	121,9-131,4	121,7-131,3
16	121,9-131,4	121,7-131,3
17	29,2	29,1
18	21,6	21,6
19	15,3	15,3
20	-	-
21	171,5	171,4
22	73,1	73,1
23	33,9	33,9
24	28,3	28,2
25	12,3	12,1
26	15,1	15,0
27	42,9	42,9
28	42,9	42,9
29	40,3	40,3
30	42,9	42,9
31	24,5	24,5
32	22,8	22,8

δ_{C^*} (CDCl_3 , 400 MHz) conforme Giacomelli (2005).

3.2.2 Alcalóide Ciclopeptídico Neutro

3.2.2.1 Alcalóide Ciclopeptídico Neutro E10

Este metabólito foi isolado da FBEAT, obtida das cascas da raiz da *Discaria americana*, coletada no distrito de São Rafael, em São Sepé, RS no mês de fevereiro de 2012. Quando revelado em reagente Drangendorff, apresentou uma coloração branca em CCD.



Após analisar os espectros de RMN de ^1H (Figura 57) e de ^{13}C (Figura 64) deste metabólito foi possível verificar algumas semelhanças com os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C do alcalóide ciclopeptídico Discarina C (**44**). Além disso, houve a possibilidade de visualizar algumas diferenças, tais como a ausência da unidade *N,N*-dimetil, a presença de mais dois sinais de hidrogênios olefínicos, um aparecendo em δ 6,28 ppm e o outro em δ 5,14 ppm, e a inexistência dos picos relacionados aos hidrogênios diastereotópicos H-24 e H-24'.

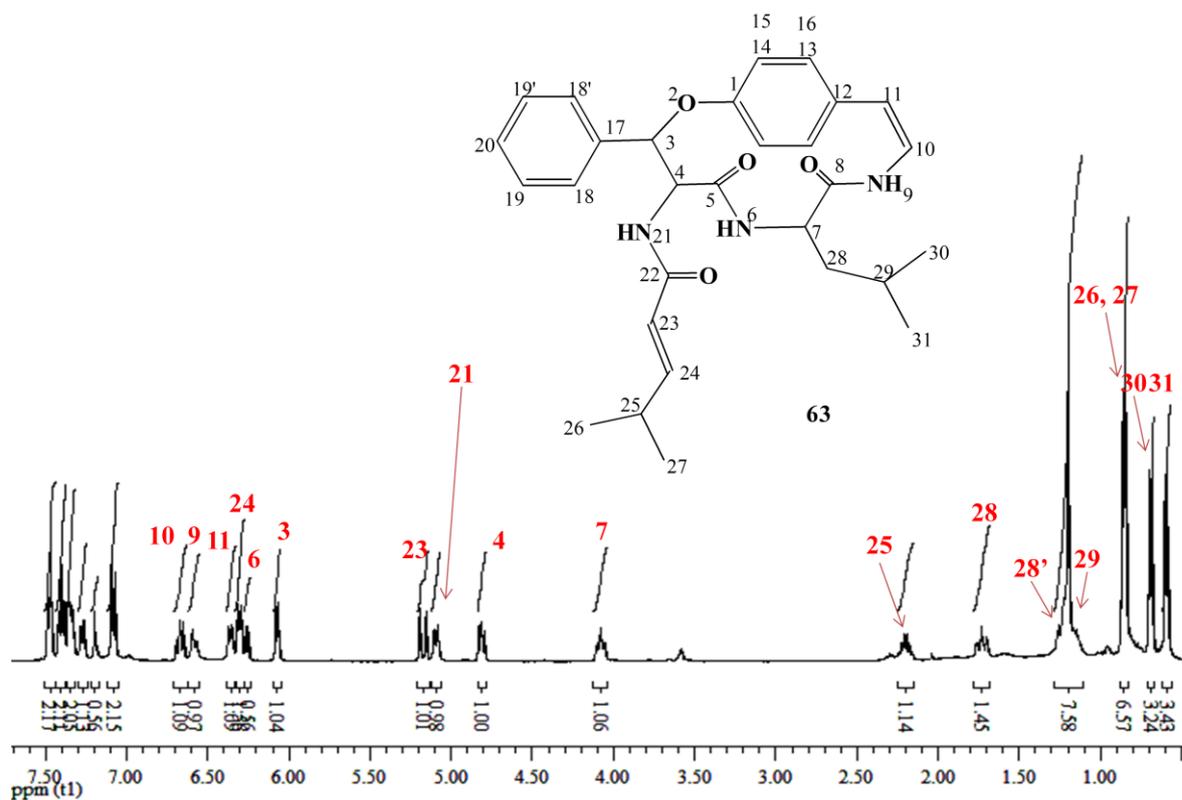


Figura 57: Espectro de RMN de ¹H, do alcalóide ciclopeptídico neutro Discareno C, em CDCl₃ a 400MHz.

Com o espectro de COSY ¹H-¹H (Figura 58) foi possível identificar a unidade leucina. As metilas Me-30 e Me-31 aparecem respectivamente em δ 0,67 ppm (3H, d, $J=6,5$ Hz) e δ 0,58 (3H, d, $J=6,5$ Hz), na forma de dupletos pelo acoplamento com o hidrogênio metínico H-29 (δ 1,15 ppm, 1H, m).

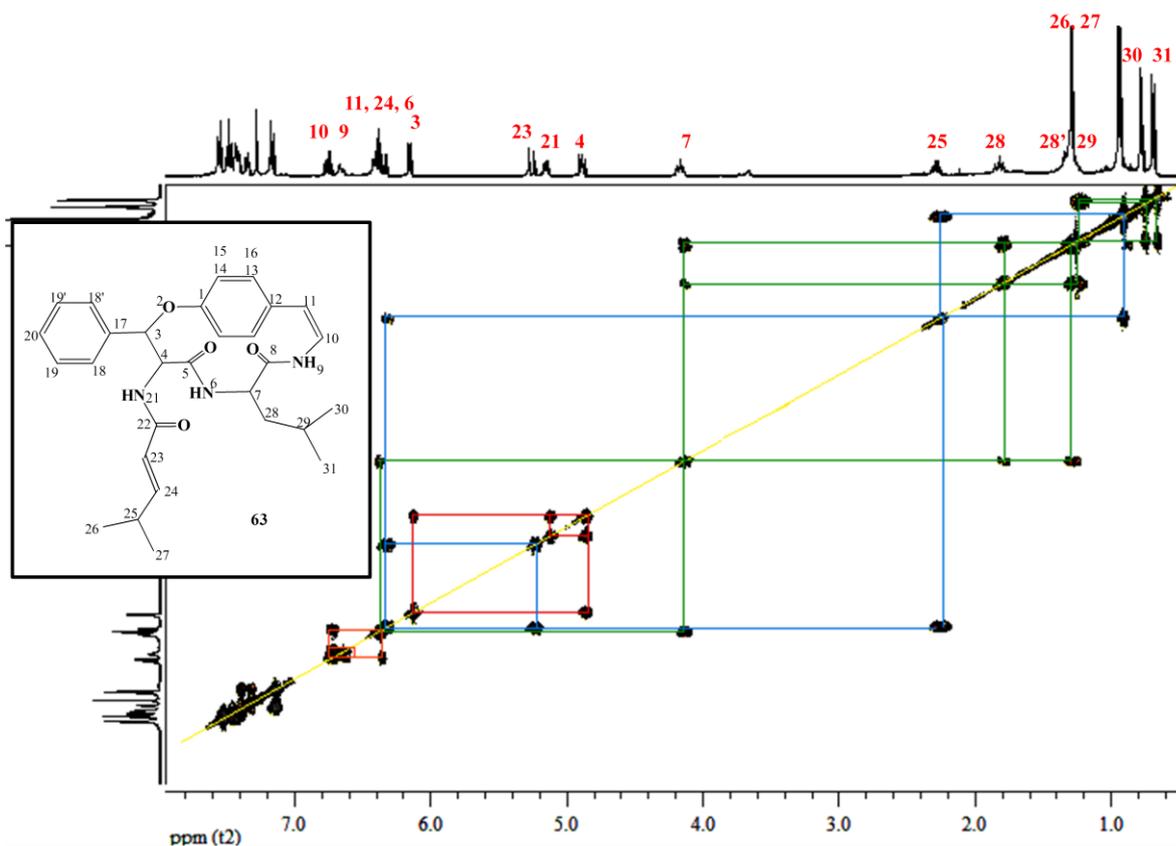


Figura 58: Espectro de COSY ^1H - ^1H , do alcalóide ciclopeptídico neutro Discareno C, em CDCl_3 a 400MHz.

O hidrogênio metínico H-7 (δ 4,04 ppm, 1H, m) aparece na forma de um multiplete, pois acopla com os hidrogênios metilênicos diastereotópicos H-28 e H-28' (δ 1,69/1,24 ppm, 2H, m) e com o hidrogênio amídico NH-6 (δ 6,24 ppm, 1H, d, $J=6,8\text{Hz}$) (Figuras 59).

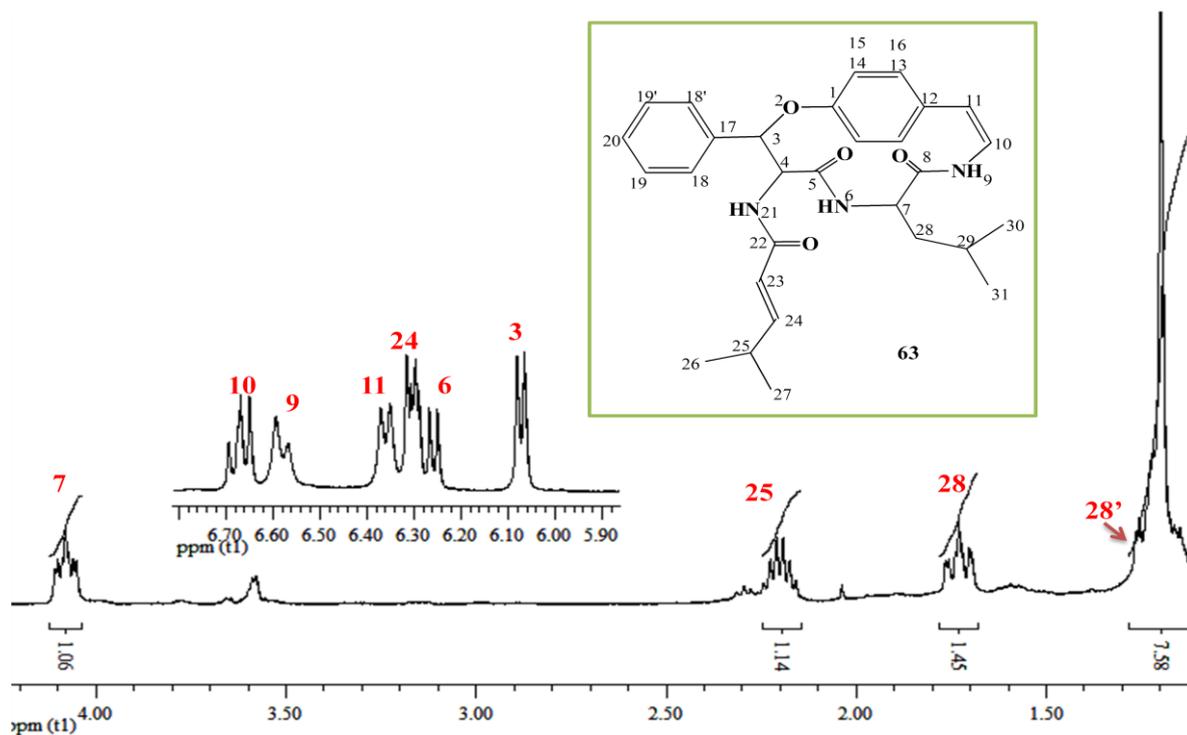


Figura 59: Expansão do espectro de RMN de ^1H , região entre δ 1,25-4,25 ppm, do alcalóide ciclopeptídico neutro Discareno C, em CDCl_3 a 400MHz.

Na região com os deslocamentos químicos entre δ 4,78 e 6,28 ppm foi possível constatar a presença dos hidrogênios olefínicos que não fazem parte do sistema macrocíclico, H-24 (δ 6,28 ppm, 1H, dd, $J=3,6, 10,0\text{Hz}$) e H-23 (δ 5,14 ppm, 1H, d, $J=10,0\text{Hz}$). H-24 aparece na forma de um duplo dubleto pelo acoplamento com o H-23 e com o hidrogênio metínico H-25 (δ 2,15 ppm, 1H, m). H-25 aparece como um multiplete pelo seu acoplamento com H-24 e com os hidrogênios das metilas Me-26 (δ 0,85 ppm, 3H, d, $J=2,6\text{Hz}$) e Me-27 (δ 0,83 ppm, 1H, d, $J=2,6\text{Hz}$), as quais aparecem como dubletos pelo acoplamento com H-25 (Figuras 60 e 61).

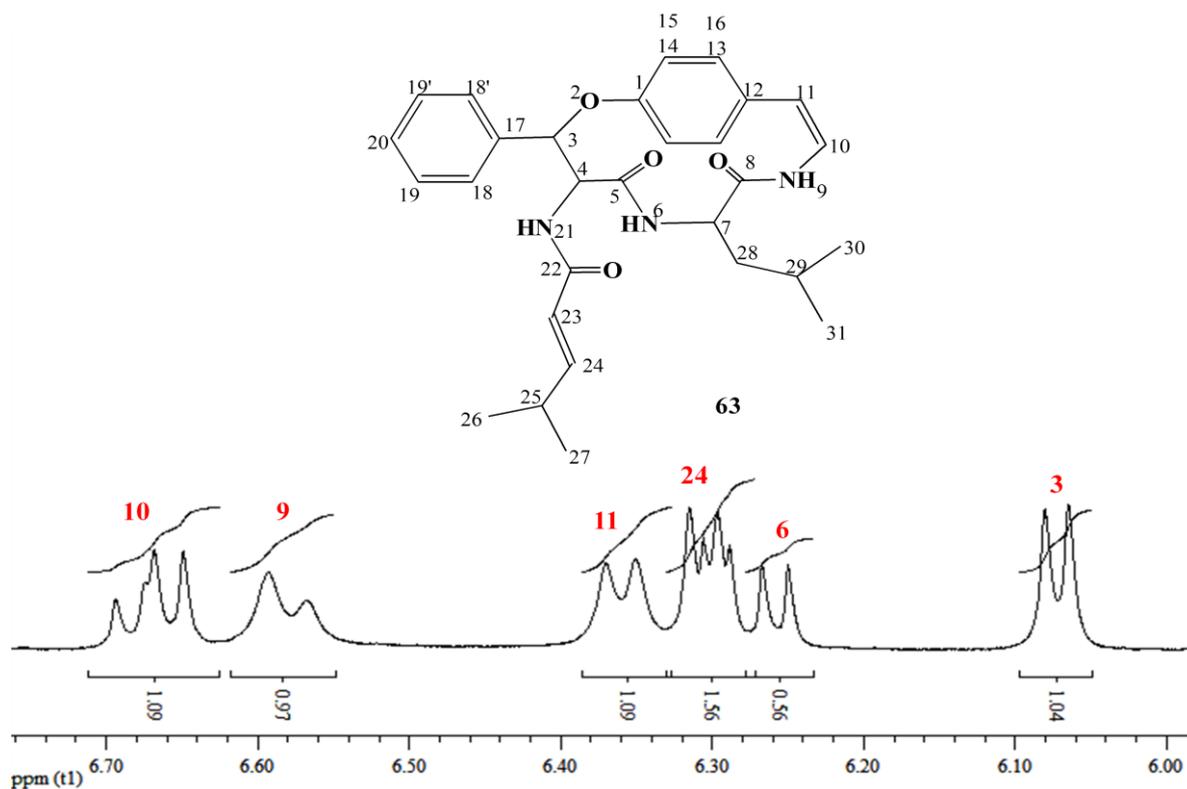


Figura 60: Expansão do espectro de RMN de ¹H, região entre δ 6,00-6,75 ppm, do alcalóide ciclopeptídico neutro Discareno C, em CDCl₃ a 400MHz.

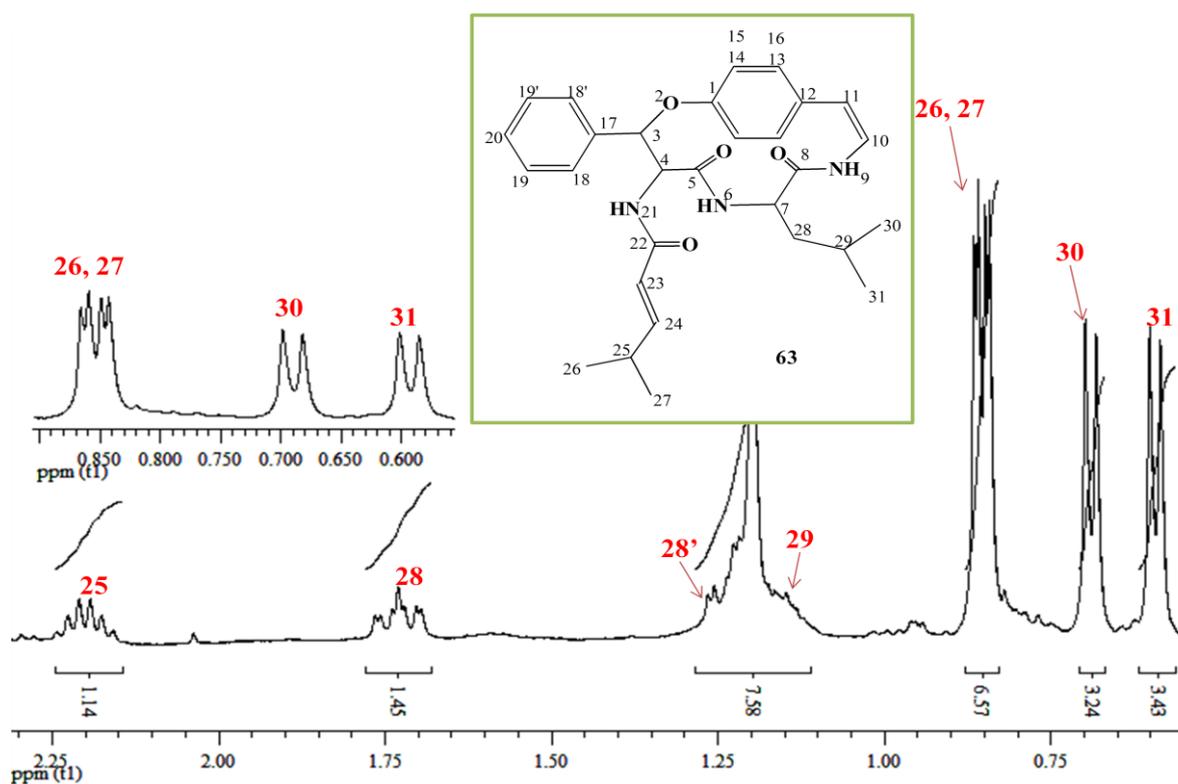


Figura 61: Expansão do espectro de RMN de ¹H, região entre δ 0,70-2,50, do ciclopeptídeo neutro Discareno C, em CDCl₃ a 400MHz.

A unidade β -fenilserina é representada na estrutura do alcalóide ciclopeptídico neutro pelos sinais do H-3 (δ 6,06 ppm, 1H, d, $J=6,3\text{Hz}$), o qual acopla com H-4 (δ 4,78 ppm, 1H, dd, $J=6,3, 8,5\text{Hz}$) na forma de um dubleto. Já H-4 aparece na forma de um duplo dubleto pelo acoplamento com H-3 e com o hidrogênio amídico NH-21 (δ 5,07 ppm, 1H, d, $J=8,5\text{Hz}$) que, por sua vez, aparece como um dubleto pelo acoplamento com H-4 (Figura 62).

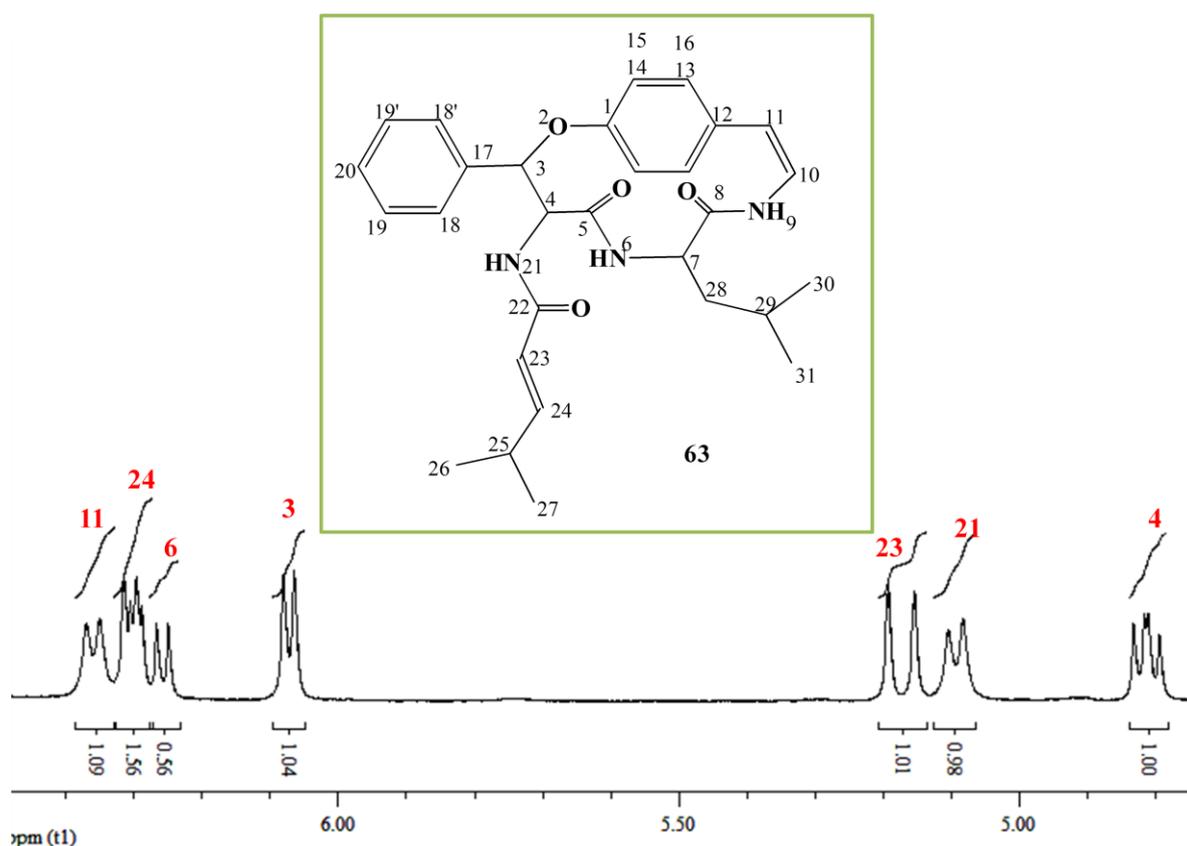


Figura 62: Expansão do espectro de RMN de ^1H , região entre δ 4,75-6,50 ppm, do alcalóide ciclopeptídico neutro Discareno C, em CDCl_3 a 400MHz.

Na Figura 63 é possível verificar o sistema de spins dos hidrogênios olefínicos H-10 (δ 6,64 ppm) e H-11 (δ 6,34 ppm). H-10 aparece na forma de duplo dubleto pelo acoplamento com o H-9 (δ 6,56 ppm), Já os hidrogênios aromáticos aparecem na região compreendida entre δ 7,06 e 7,47 ppm. Esses fazem parte da unidade *p*-hidroxiestirilamina e β -fenilserina, na forma de sinais complexos (Figura 63).

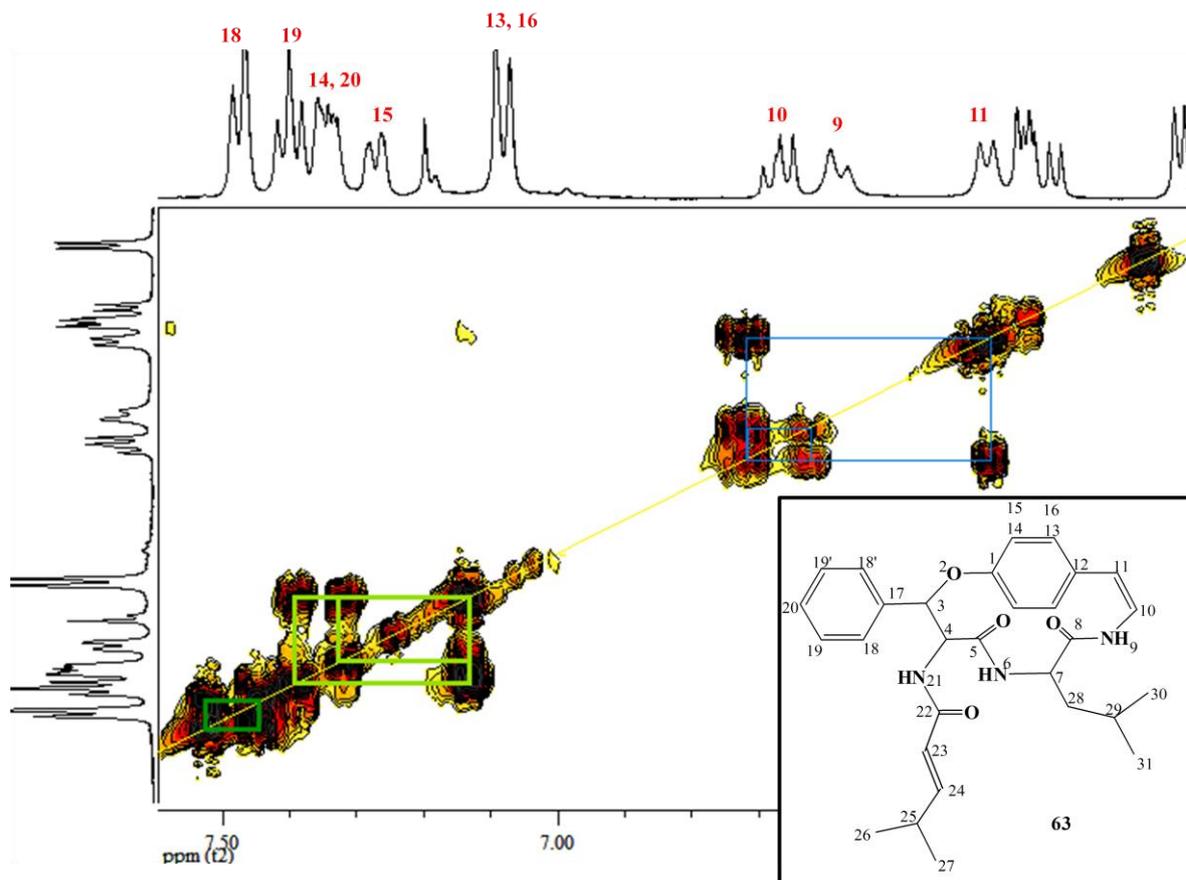


Figura 63: Expansão do espectro de COSY ^1H - ^1H , região entre δ 6,50-7,75 ppm, do alcalóide ciclopeptídico neutro Discareno C, em CDCl_3 a 400MHz.

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 64) apresentou 27 sinais os quais estão distribuídos em uma região compreendida entre δ 20,72-171,2 ppm. Dois destes sinais apresentam maior intensidade o que indica a presença de dois núcleos de carbono dessa forma. É possível afirmar a presença de 29 átomos de carbonos, o que confirma a fórmula molecular de $\text{C}_{29}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_4$.

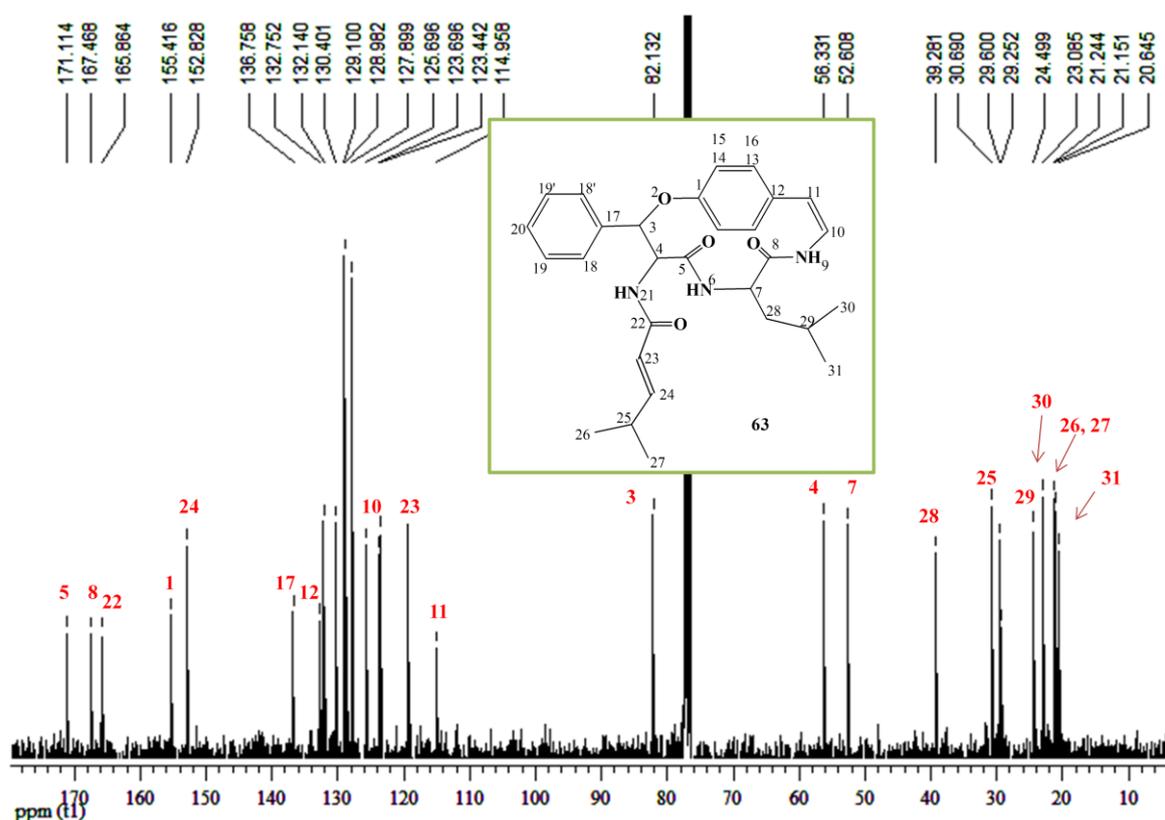


Figura 64: Espectro de RMN de ^{13}C , do alcalóide ciclopeptídico neutro Discareno C, em CDCl_3 a 100MHz.

Nas Tabelas 26 e 27 estão listados os deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C , bem como os comparativos da literatura.

Tabela 26: Dados de RMN ^1H da Discareno C (**63**) (CDCl_3 , 400,13 MHz)

Posição	δ_{H} ppm	δ_{H}^* ppm
1	-	-
2	-	-
3	6,06 (1H, d, $J=6,3\text{Hz}$)	6,06 (1H, d, $J=6,3\text{Hz}$)
4	4,78 (1H, dd, $J=6,3, 8,5\text{Hz}$)	4,86 (1H, dd, $J=6,2, 8,8\text{Hz}$)
5	-	-
6	6,24 (1H, d, $J=6,8\text{Hz}$, NH)	6,38 (1H)
7	4,04 (1H, m)	4,13 (m)
8	-	-
9	6,56 (1H, d, $J=10,3\text{Hz}$)	6,64 (1H, d, $J=10,2\text{Hz}$)
10	6,64 (1H, dd, $J=8,0, 10,3\text{Hz}$)	6,74 (1H, dd, $J=7,6\text{Hz}, 10,2\text{Hz}$)
11	6,34 (1H, d, $J=8,0\text{Hz}$)	6,37 (1H, d, $J=7,6\text{Hz}$)
12	-	-

13	7,06 e 7,47	7,17
14	7,06 e 7,47	7,33
15	7,06 e 7,47	7,41
16	7,06 e 7,47	7,15
17	-	-
18	7,06 e 7,47	7,52
18'	7,06 e 7,47	7,52
19	7,06 e 7,47	7,47
19'	7,06 e 7,47	7,47
20	7,06 e 7,47	7,43
21	5,07 (1H, d, $J=8,5\text{Hz}$)	5,12 (1H, d, $J=8,8\text{Hz}$)
22	-	-
23	5,14 (1H, d, $J=10,0\text{Hz}$)	5,23 (1H, d, $J=14,0\text{Hz}$)
24	6,28 (1H, dd, $J=3,6, 10,0\text{Hz}$)	6,36 (1H, dd, $J=6,8, 14,0\text{Hz}$)
25	2,15 (1H, m)	2,27 (1H, m)
26	0,85 (3H, d, $J=2,6\text{Hz}$)	0,92 (3H, d, $J=6,7\text{Hz}$)
27	0,83 (3H, d, $J=2,6\text{Hz}$)	0,91 (3H, d, $J=6,7\text{Hz}$)
28	1,69 (1H, m)	1,79 (1H, m)
28'	1,24 (1H, m)	1,29 (1H, m)
29	1,15 (1H, m)	1,18 (1H, m)
30	0,67 (3H, d, $J=6,5\text{Hz}$)	0,75 (3H, d, $J=6,5\text{Hz}$)
31	0,58 (3H, d, $J=6,5\text{Hz}$)	0,64 (3H, d, $J=6,5\text{Hz}$)

δ_{H}^* (CDCl₃, 400 MHz) conforme Giacomelli (2005).

Tabela 27: Dados de RMN ¹³C da Discareno C (**63**) (CDCl₃, 100,62 MHz)

Posição	δ_{C} ppm	δ_{C}^* ppm
1	155,5	155,2
2	-	-
3	82,2	81,9
4	56,4	56,1
5	171,2	171,1
6	-	-
7	52,7	52,5
8	167,5	167,4
9	-	-

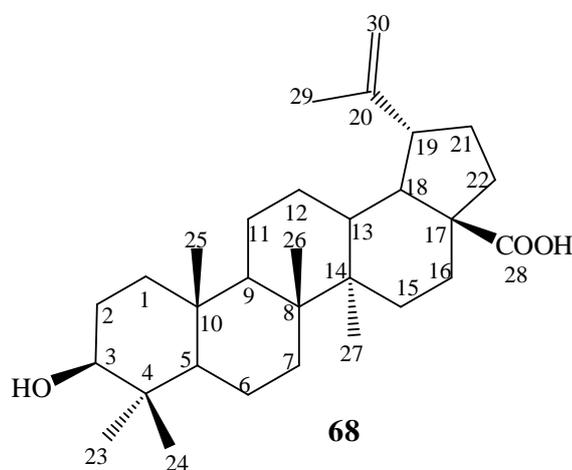
10	125,7	125,4
11	115,0	114,8
12	132,8	132,6
13	123,5-132,2	130,3
14	123,5-132,2	123,6
15	123,5-132,2	129,1
16	123,5-132,2	132,1
17	136,8	136,5
18	123,8-129,9	127,8
18'	123,8-129,9	127,8
19	123,8-129,9	128,9
19'	123,8-129,9	128,9
20	123,8-129,9	123,4
21	-	-
22	165,9	165,8
23	119,4	119,1
24	152,9	153,0
25	30,8	30,7
26	21,3	21,2
27	21,2	21,1
28	39,4	39,1
29	24,6	23,1
30	23,1	22,5
31	20,7	20,4

δ_{C^*} (CDCl₃, 400 MHz) conforme Giacomelli (2005).

3.2.3 Triterpenóide

3.2.3.1 Triterpenóide Ácido Betulínico (**J21**)

Este composto (**68**) foi isolado da FBER, obtida do fracionamento ácido-base do extrato bruto das cascas da raiz da espécie *Discaria americana*. Este metabólito já foi isolado das partes aéreas e das cascas da raiz desta espécie, bem como de outras espécies pertencentes à família Rhamnaceae. Por meio de comparação com um padrão do ácido betulínico, em CCD, com diferentes sistemas solventes e através de ponto de fusão, foi possível caracterizar este composto como sendo o triterpeno ácido betulínico. Uma vez que este composto está bem caracterizado na literatura optou-se por não fazer experimentos de RMN.



3.3 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DA CONFIGURAÇÃO ABSOLUTA DOS ALCALÓIDES CICLOPEPTÍDICOS

A determinação da configuração absoluta dos alcalóides ciclopeptídicos isolados neste trabalho, como Discarina B (**23**), Frangufolina (**26**), Frangulanina (**27**) e do alcalóide ciclopeptídico neutro Discareno C (**63**), era um dos principais objetivos traçados para este trabalho. A associação da difração de raios-X, da técnica de RMN de ^1H , de ^{13}C e de hidrogênios NOESY, e da cromatografia gasosa enantiosseletiva, é a ferramenta para a determinação de tais configurações.

Para a análise de Raio-X é necessário que se forme cristais passíveis de serem analisados. A obtenção de tais cristais pode ser proveniente de cristalização do metabólito isolado puro ou da obtenção de cristalização de um sal. O Raio-X proveniente da cristalização do metabólito puro apenas fornece a configuração relativa necessitando, assim, da associação com cromatografia gasosa enantiosseletiva para a obtenção da configuração absoluta. Por outro lado, a formação de um sal com um átomo pesado como o iodo possibilita a determinação da configuração absoluta sem a necessidade de se associar outros métodos.

Infelizmente, a tentativa de obter um cristal do sal de Iodeto, através da reação do alcalóide ciclopeptídico Discarina B (**23**) com Iodeto de Metila, não logrou sucesso.

O único alcalóide que formou cristais possíveis de serem analisados por difração de Raios-X, sem a necessidade da formação de um sal, foi Discarina C (**44**), mostrado na Figura 65. Como se trata de um experimento simples de Raio-X, a configuração dos centros estereogênicos é apenas relativa. Esta configuração tornou-se absoluta quando associamos os dados de Raio-X com os dados da cromatografia gasosa enantiosseletiva.

Para isso, Discarina C (**44**) foi submetida a uma hidrólise ácida, e sua estrutura foi fragmentada em seus aminoácidos, com a manutenção da configuração natural. Estes aminoácidos, após derivatizados, foram submetidos a uma análise quiral, utilizando-se uma coluna capilar recheada com ciclodextrina modificada (Lipodex-E (2,6-Pe-3-Bc- γ -CD)) (Figura 66). Este resultado mostrou que a configuração absoluta do aminoácido leucina é L (S), validando os demais centros quirais determinados por Raio-X como absolutos.

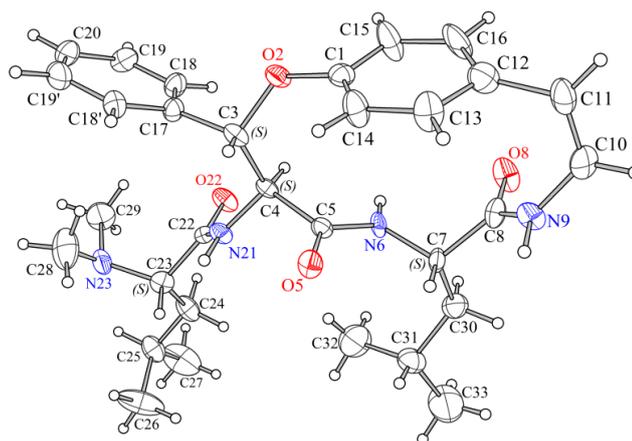
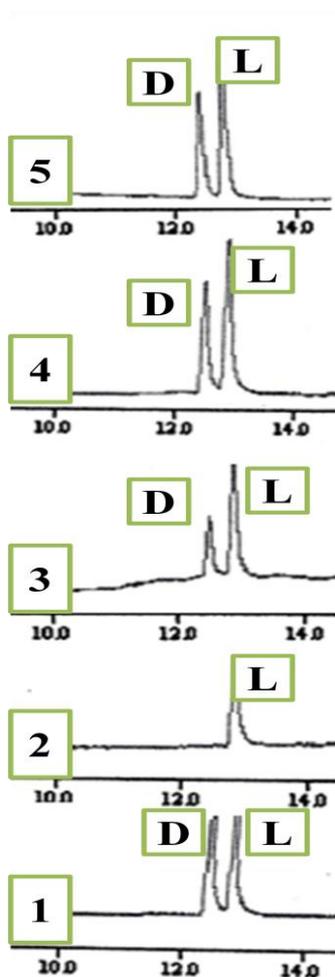


Figura 65: Difração de Raio-X da Discarina C (**44**) onde C são os carbonos; O são os oxigênios (vermelho); N são os nitrogênios (azul) e H (branco).



A estrutura da Discarina C é formada pelos aminoácidos β -hidroxifenilserina e leucina. A determinação da estereoquímica da unidade leucina, α -aminoácido, foi realizada por meio de hidrólise ácida, de acordo com o descrito na parte experimental (página 72), seguida da derivatização a fim de adquirir a volatilidade necessária para as análises por cromatografia gasosa.

A Figura 66 apresenta os cromatogramas de D,L-leucina (1), de L-Leucina (2), de Discarina C hidrolisada (3), de Discarina C somada com D,L-leucina (4) e de D,L-Leucina somada a L-Leucina (5). Tais cromatogramas foram realizados com uma coluna de fase estacionária Lipodex-E (2,6-Pe-3-Bc- γ -CD). Após análise feita, confirmou-se que L-Leucina é o aminoácido ligado ao sistema macrocíclico, e que sua configuração é S.

Figura 66: Cromatogramas dos aminoácidos derivatizados e do alcalóide ciclopeptídico Discarina C.

A estrutura da Discarina C (**44**) foi também analisada através da técnica NOESY. Infelizmente, os dados de NOESY não são suficientes para a determinação da configuração relativa ou absoluta da unidade de β -HO-aminoácido que forma o macrociclo devido à pequena distância entre H-C3-C4-H, a qual permite o aparecimento de NOE entre H-3 e H-4, apesar de estarem em relação *anti*. A unidade β -HO-aminoácido se decompõe durante a hidrólise ácida, o que impede a determinação de sua configuração por CG enantiosseletiva.

Em que pesem as dificuldades, o espectro NOESY foi analisado. Neste espectro, mostrado nas Figuras 68 e 69, é possível visualizar uma correlação espacial entre os hidrogênios amídico NH-6 e o hidrogênio metínico H-4, o que indica que estão no mesmo lado da estrutura em uma relação *syn*. Já o hidrogênio metínico H-3 não apresentou correlação com H-4, o que mostra que estão em posição *anti*, o mesmo resultado foi observado no Raio-X. Além disso, NH-6 não apresenta correlação com o hidrogênio metínico H-7 indicando que estão em posições opostas, *anti*. Uma vez que a configuração absoluta do aminoácido leucina é *S* e que o hidrogênio metínico H-7, está acima do plano, em uma posição β , pode-se afirmar que os hidrogênios NH-6 e H-4 estão na face α do plano, portanto, a unidade hidroxifenilserina tem sua configuração absoluta determinada como *L-eritro* (*3S/4S*), e o alcalóide, a configuração absoluta *3S, 4S, 7S, 23S* (Figura 67).

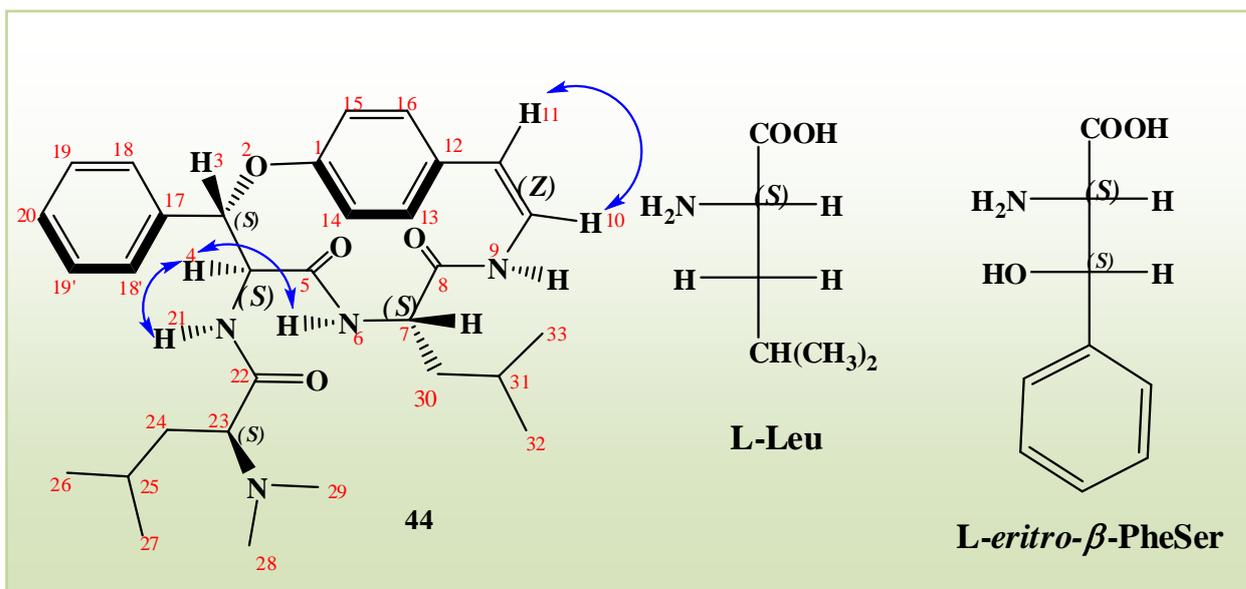


Figura 67: Estruturas do alcalóide ciclopeptídico Discarina C e dos aminoácidos L-Leucina e L-eritro- β -Fenilserina.

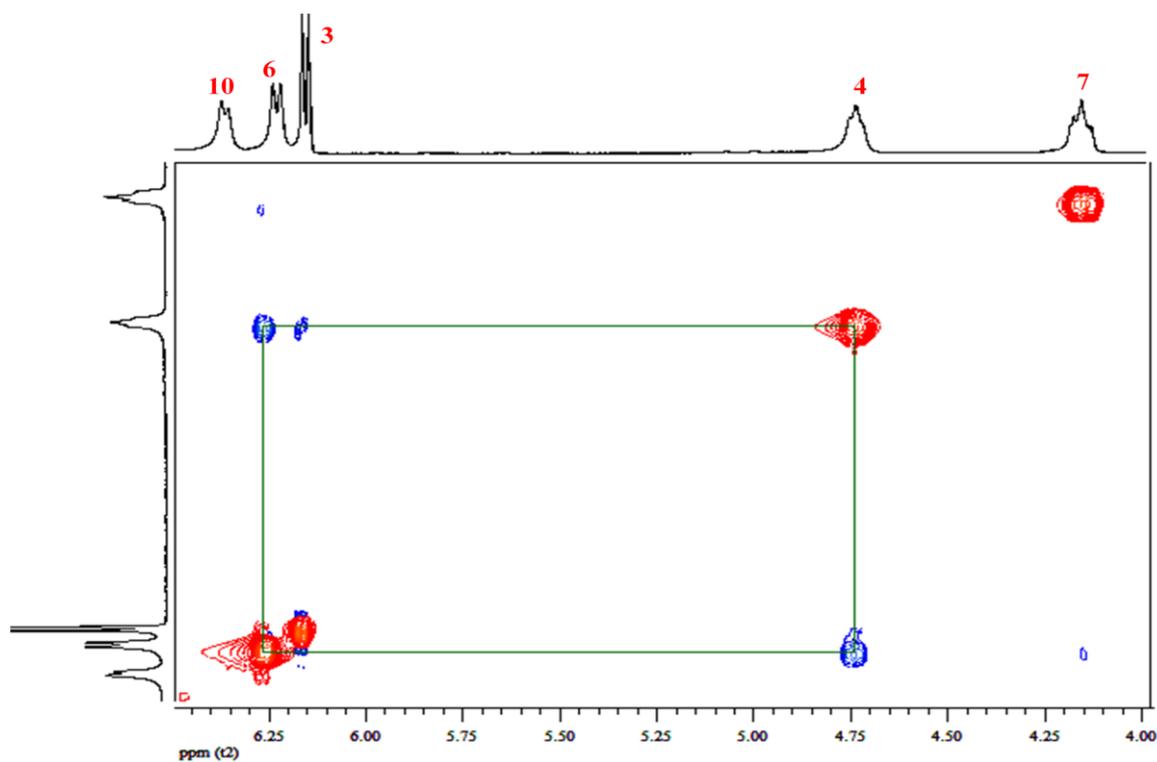


Figura 68: Expansão do espectro NOESY, região entre δ 4,00-6,50 ppm, do alcalóide ciclopeptídico Discarina C apresentando as correlações entre os H-4 e NH-6.

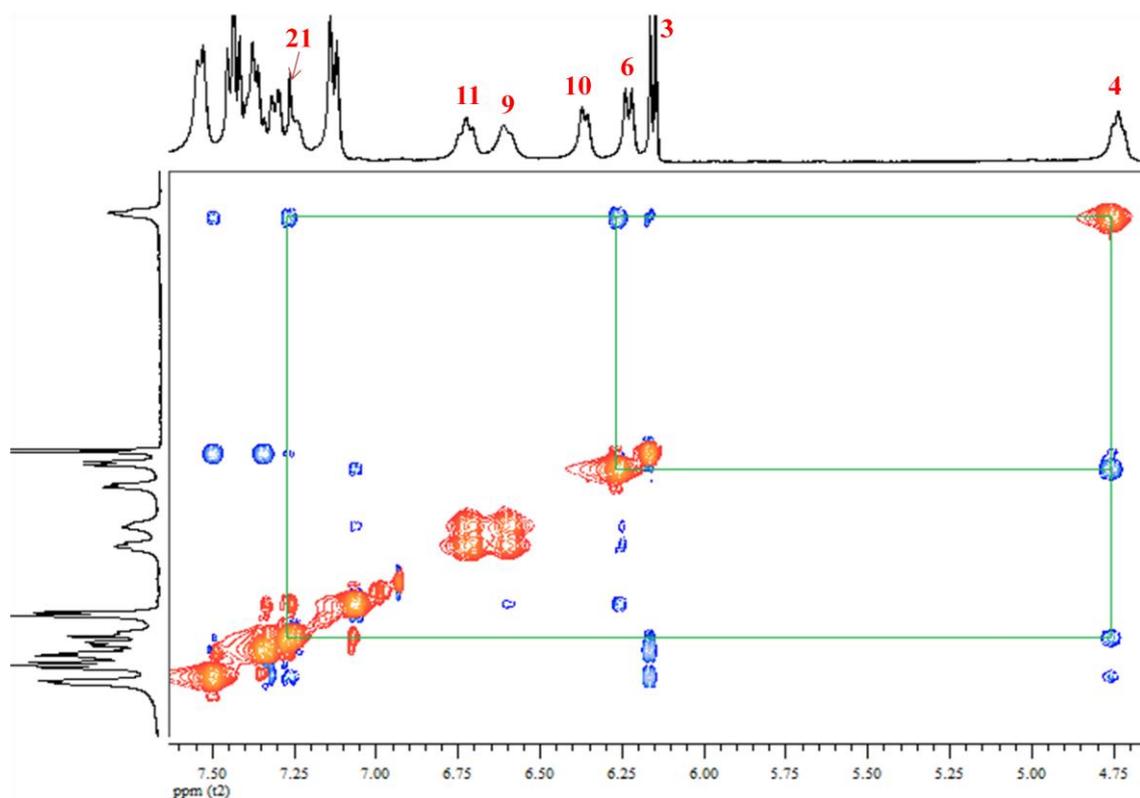


Figura 69: Expansão do espectro NOESY, região entre δ 4,75-7,50 ppm, do alcalóide ciclopeptídico Discarina C apresentando as correlações do H-4 com o NH-6 e com o NH-21.

Outra ferramenta utilizada para comprovar a estereoquímica da unidade β -hidroxifenilserina foram os dados espectrais de RMN ^{13}C do alcalóide Discarina C (**44**). De acordo com Mostardeiro et al, 2013, nos dados espectrais de RMN de ^1H e de ^{13}C do alcalóide frangulanina, a forma *eritro* da unidade β -hidroxiaminoácido mostra um $J_{3,4}$ ca. 8,0 Hz e a geometria muito rígida deste alcalóide permite somente esta configuração. Já a configuração *treo* da 3-hidroxi-leucina mostra um $J_{3,4}$ ca. 2,0 Hz e a rigidez da estrutura do macrociclo comporta unicamente a geometria na configuração *treo* do alcalóide. No entanto, esses dados informam apenas a configuração relativa, *eritro* e *treo*. Para obter a configuração absoluta é necessário analisar os dados do espectro de RMN de ^{13}C , o qual informa a configuração absoluta L ou D *eritro/treo* do resíduo β -hidroxiaminoácido.

Para a configuração L-*eritro* o sinal do deslocamento químico do C-3 (carbono β) aparece em δ 81,5 ppm e do C-4 (carbono α) aparece em δ 56,0 ppm. O deslocamento químico de C-4 e de C-3 para a configuração D-*eritro* é δ 53,0 ppm e δ 87,0 ppm, respectivamente. Na configuração L-*treo*, o sinal de C-3 aparece em δ 86,0 ppm e de C-4 δ em 55,0 ppm; na configuração D-*treo*, o sinal de C-3 aparece em δ 82,0 ppm e de C-4 em δ 55,0 ppm. A Figura 70 mostra as diferenças nos deslocamentos químicos das configurações D-*treo*, L-*treo*, D-*eritro* e L-*eritro*.

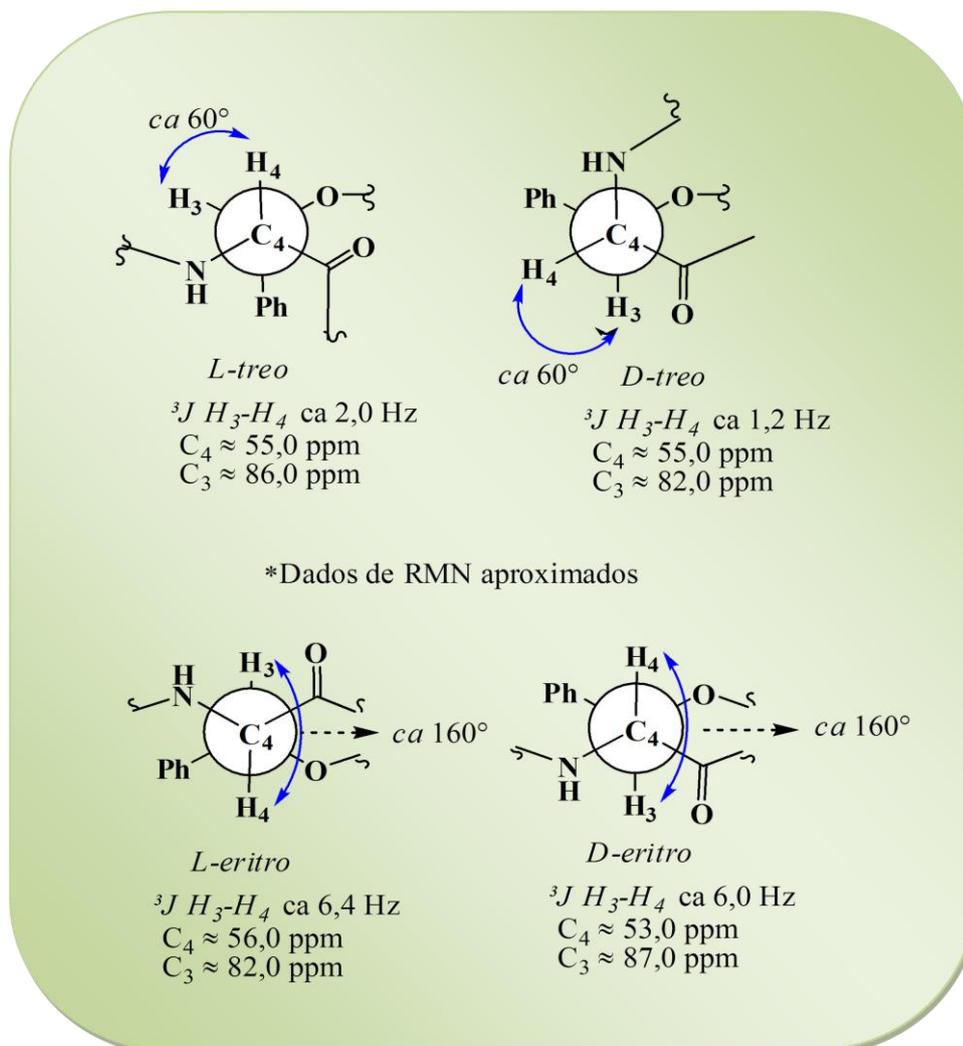


Figura 70: Relação de Karplus para constantes de acoplamento ${}^3J_{H_3-H_4}$ do alcalóide ciclopeptídico Discarina C (MOSTARDEIRO et al, 2013).

A partir desses dados e com base nos dados obtidos do espectro de RMN de ${}^{13}C$ do alcalóide ciclopeptídico Discarina C (**44**) (Figura 71) foi possível estabelecer que a unidade β -hidroxifenilserina apresenta configuração *L-eritro*. Isso porque C-4 tem seu deslocamento químico em δ 56,3 ppm e C-3 em δ 81,9 ppm, os quais são característicos dessa unidade de aminoácido.

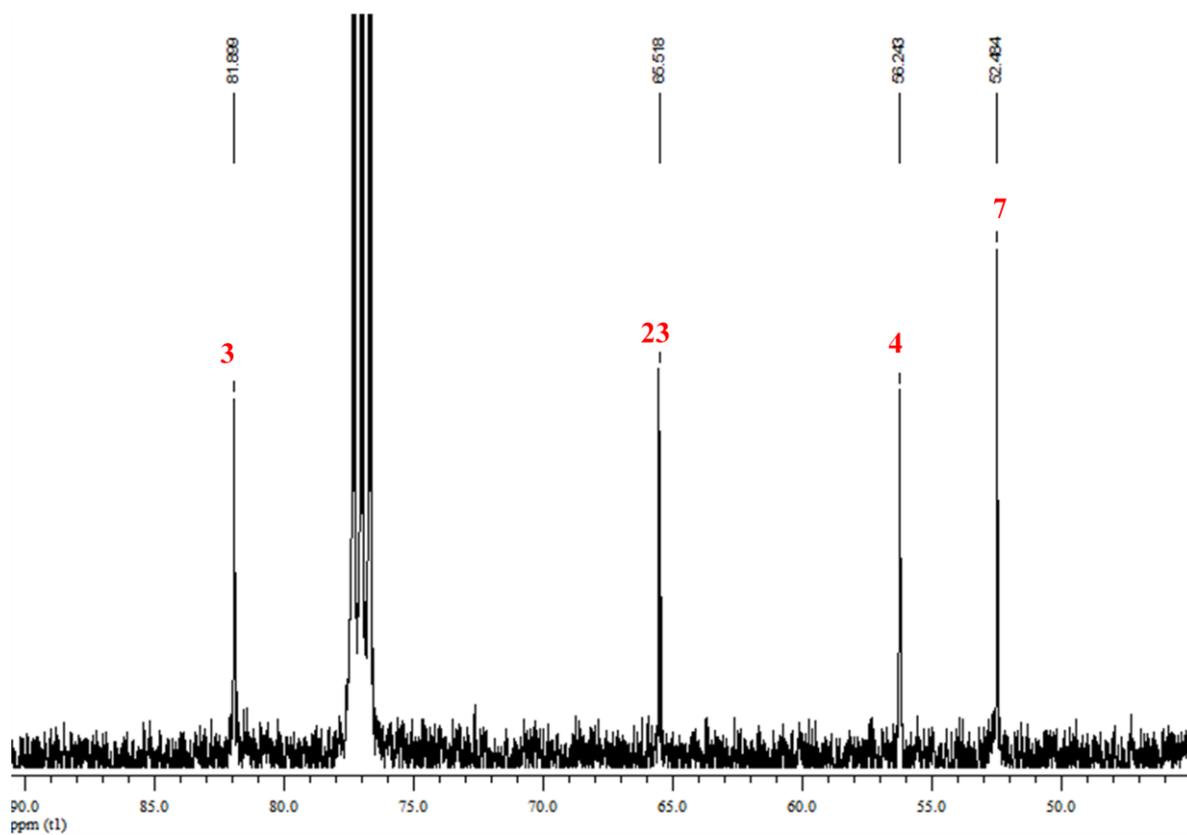


Figura 71: Expansão do espectro RMN ^{13}C , região entre δ 50,00-85,00 ppm, do alcalóide ciclopeptídico Discarina C.

3.4 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

O NPPN utiliza o método da microdiluição em caldo descrito pela NCCL (*National Committee for Clinical Laboratory Standards* (2003)), na determinação da atividade antimicrobiana do extrato bruto, frações e substâncias isoladas das plantas pesquisadas. Essa organização padroniza os testes executados para a avaliação da atividade antimicrobiana de compostos naturais a fim de possibilitar a descrição do potencial farmacológico e a utilidade clínica dessas substâncias de forma segura e correta. Além disso, a utilização de um fluorímetro para a leitura dos poços possibilita uma maior sensibilidade e reprodutibilidade.

Dessa forma, no estudo fitoquímico da espécie *Discaria americana* foram avaliadas as frações FBEAT e FBER e os compostos isolados da FBEAT obtidos durante a realização deste trabalho, com o intuito de verificar qual deles possui potencial antimicrobiano frente a cepas bacterianas e fúngicas causadoras de infecções. Os resultados obtidos estão relacionados nas Tabelas 28 e 29. Vale ressaltar que para a atividade antimicrobiana não foi realizado *screening*, uma vez que já foi relatada a presença dessa atividade por Giacomelli (2005) no extrato bruto das cascas das raízes dessa espécie. O composto triterpênico Ácido Betulínico (**69**) não foi submetido ao teste por já ter sido amplamente estudado.

Tabela 28

Concentração Inibitória Mínima e Concentração Letal Mínima dos cinco compostos isolados de *Discaria americana* frente à bactérias Gram-positivas e Gram-negativas

Atividades Antimicrobiana– $\mu\text{g.mL}^{-1}$																
Microorganismos	Compostos ativos testados															
	Discarina B		Discareno C		Frangufolina		Discarina C		Frangulanina		Ampicilina		Azitromicina		Levofloxacina	
	Gram-positivos		CIM/CLM	CIM/CLM	CIM/CLM	CIM/CLM	CIM/CLM	CIM/CLM	CIM/CLM	CIM/CLM	CIM/CLM	CIM/CLM	CIM/CLM	CIM/CLM	CIM/CLM	CIM/CLM
<i>Staphylococcus aureus</i>	50	100	50	100	100	>100	50	100	50	100	0,77	50	0,77	50	0,77	0,77
<i>Bacillus subtilis</i>	50	>100	100	>100	>100	-	100	>100	50	100	0,77	50	0,77	0,77	0,77	0,77
<i>Bacillus cereus</i>	50	100	50	100	100	>100	50	>100	25	50	50	50	1,55	1,55	0,77	0,77
<i>Enterococcus spp.</i>	0,77	1,55	12,5	12,5	12,5	>100	12,5	100	6,2	12,5	25	50	1,55	6,2	0,77	0,77
<i>Enterobacter aerogenes</i>	6,2	100	50	100	100	>100	100	>100	50	50	50	50	12,5	12,5	0,77	0,77
Gram-negativos																
<i>Escherichia coli</i>	1,55	100	50	100	100	>100	100	>100	50	100	3,1	25	1,55	3,1	0,77	0,77
<i>Enterobacter cloacae</i>	100	100	100	100	100	>100	50	>100	50	50	50	50	0,77	1,55	0,77	0,77
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50	100	50	100	50	>100	50	>100	25	50	25	50	12,5	25	0,77	0,77
<i>Burkholderia cepacia</i>	50	50	100	50	50	>100	100	>100	25	25	50	50	1,55	3,1	0,77	0,77
<i>Shigella sonnei</i>	50	50	100	100	100	>100	50	100	50	50	25	50	3,1	3,1	0,77	0,77
<i>Salmonella typhimurium</i>	6,2	100	0,77	100	50	>100	0,77	3,1	0,77	50	0,77	0,77	3,1	6,2	0,77	0,77

Tabela 29

Concentração Inibitória Mínima e Concentração Letal Mínima dos cinco compostos isolados de *Discaria americana* frente à fungos

Atividade Antifúngica - $\mu\text{g.mL}^{-1}$													
Microorganismos	Compostos ativos testados												
	Discarina B		Discareno C		Frangufolina		Frangulanina		Discarina C		<i>Nistatina</i>		
	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	
<i>Cândida albicans</i>	100	100	>100	-	>100	-	100	>100	100	100	0,77	3,1	
<i>Cândida tropicalis</i>	100	100	>100	-	>100	-	>100	-	100	100	1,52	3,1	
<i>Cryptococcus neoformans</i>	25	50	50	100	25	100	25	50	6,2	25	1,52	3,1	
<i>Cryptococcus gatti</i>	50	100	>100	-	50	100	50	50	50	50	3,1	3,1	
<i>Sacharomyces cerivisae</i>	100	100	>100	-	>100	-	>100	-	100	100	1,52	3,1	

O teste para avaliar o potencial antimicrobiano das frações FBEAT e FBER não teve nenhum resultado significativo, uma vez que os valores para CIM e CLM apresentados para todas as cepas avaliadas foram maiores ou iguais a 500 µg/mL.

Os compostos isolados testados apresentaram atividades significativas frente a algumas cepas. O alcalóide ciclopeptídico Discarina B (**23**) exibiu significativo poder bacteriostático frente a quatro cepas, dentre as quais estão: *Enterococcus spp* (CIM= 0,77 µg/mL e CLM= 1,55 µg/mL), *Enterobacter aerogenes* (CIM= 6,2 µg/mL), *Escherichia coli* (CIM= 1,55 µg/mL) e *Salmonella typhimurium* (CIM= 6,2 µg/mL). Estes resultados indicam que Discarina B (**23**) mostrou potencial bacteriostático superior ou igual aos antibióticos padrões, ou seja, quando comparado ao padrão Azitromicina (CIM= 1,55 µg/mL e CLM= 6,2 µg/mL), Discarina B se mostrou mais potente tanto para CIM quanto para CLM frente à bactéria *Enterococcus spp*. Quando comparado com o padrão Ampicilina (CIM= 25 µg/mL e CLM= 50 µg/mL), o alcalóide ciclopeptídico Discarina B (**23**) apresentou superior poder bacteriostático e bactericida frente à *Enterococcus spp*. Já quando comparado com o padrão Levofloxacina (CIM= 0,77 µg/mL e CLM= 0,77 µg/mL), Discarina B (**23**) apresentou CIM igual e CLM um pouco maior para essa mesma bactéria, resultado igualmente significativo, considerando-se que o CLM pode ser de 2 a 4 vezes maior que o CIM.

O resultado do potencial antimicrobiano de Discarina B (**23**) frente à bactéria *Enterobacter aerogenes* (CIM= 6,2 µg/mL e CLM= 100 µg/mL) apresentou maior eficiência para CIM quando comparado com os padrões Azitromicina (CIM= 12,5 µg/mL) e Ampicilina (CIM= 50 µg/mL). Já o potencial bacteriostático, comparado com o padrão Ampicilina (CIM= 3,1 µg/mL), foi superior frente à bactéria *Escherichia coli* (CIM= 1,55 µg/mL). Ao comparar com o padrão Azitromicina (CIM= 1,55 µg/mL), este apresentou CIM igual. Quando comparado com o padrão Levofloxacina (CIM= 0,77 µg/mL) mostrou pequena diferença para CIM. Por outro lado, o potencial bacteriostático de Discarina C (**23**) frente à *Salmonella typhimurium* (CIM= 6,2 µg/mL) se mostrou menor quando comparado com os padrões Azitromicina (CIM= 3,1 µg/mL), Ampicilina (CIM= 0,77 µg/mL) e Levofloxacina (CIM= 0,77 µg/mL). A menor diferença foi observada para o padrão Azitromicina, sendo que este ainda é um resultado bastante favorável.

Os resultados obtidos para Discarina B frente aos fungos não foram muito satisfatórios, sendo que para o fungo *Cryptococcus neoformans* (CIM= 25 µg/mL e CLM= 50 µg/mL) foi moderado e para os outros fungos: *Cândida albican* (CIM= 100 µg/mL e CLM= 100 µg/mL), *Cândida tropicalis* (CIM= 100 µg/mL e CLM= 100 µg/mL), *Cryptococcus Gatti*

(CIM= 50 µg/mL e CLM= 100 µg/mL) e *Sacharomyces cerivisae* (CIM= 100 µg/mL e CLM= 100 µg/mL), foram baixos, quando comparados com o padrão Nistatina (Tabela 29).

O alcalóide ciclopeptídico Discarina C (**44**) apresentou maior poder bacteriostático frente à *Enterococcus spp.* (CIM= 12,5 µg/mL e CLM= 100 µg/mL) e à *Salmonella typhimurium* (CIM= 0,77 µg/mL e CLM= 3,1 µg/mL). Ao comparar o resultado obtido do padrão Azitromicina frente à *Salmonella typhimurium* (CIM= 3,1 µg/mL e CLM= 6,2 µg/mL), é possível verificar que Discarina C apresentou potencial bacteriostático e bactericida superior ao padrão. Quando comparado os resultados obtidos dos padrões Ampicilina (CIM= 0,77 µg/mL e CLM= 0,77 µg/mL) e Levofloxacina (CIM= 0,77 µg/mL e CLM= 0,77 µg/mL) com o resultado obtido de Discarina C frente à *Salmonella typhimurium*, pode-se destacar que o composto apresentou o mesmo potencial bacteriostático que os padrões e, além disso, os resultados para CLM apresentaram pequena diferença, ou seja, Discarina C apresentou grande potencial bactericida, uma vez que, os valores de CLM são considerados ótimos para valores de 2 a 4 vezes maior que os valores de CIM.

Os resultados obtidos de Discarina C quanto ao potencial bacteriostático frente à *Enterococcus spp* (CIM= 12,5 µg/mL) foram superiores aos resultados alcançados pelo padrão Ampicilina (CIM= 25 µg/mL e CLM= 50 µg/mL). Por outro lado, quando comparados os resultados de Discarina C frente aos fungos *Cryptococcus neoformans* (CIM= 25 µg/mL e CLM= 50 µg/mL) e *Cryptococcus gatti* (CIM= 50 µg/mL e CLM= 50 µg/mL) ao padrão Nistatina (CIM= 1,55 µg/mL e CLM= 3,1 µg/mL; CIM= 3,1 µg/mL e CLM= 3,1 µg/mL, respectivamente) é possível notar que Discarina C apresentou resultado moderado tanto para CIM quanto para CLM.

O potencial bacteriostático do alcalóide ciclopeptídico Frangufolina (**26**) frente à *Enterococcus spp* (12,5 µg/mL), quando comparado com o padrão Ampicilina (CIM= 25 µg/mL e CLM= 50 µg/mL), se mostrou superior. No entanto, quando comparado com os padrões Azitromicina (CIM= 1,55 µg/mL e CLM= 6,2 µg/mL) e Levofloxacina (CIM= 0,77 µg/mL e CLM= 0,77 µg/mL), observou-se um resultado ligeiramente menos significativo, mas ainda apreciável. Quanto aos resultados obtidos para os fungos *Cryptococcus neoformans* (CIM= 25 µg/mL e CLM= 100 µg/mL) e *Cryptococcus gatti* (CIM= 50 µg/mL e CLM= 100 µg/mL) quando comparados com o padrão Nistatina (CIM= 1,55 µg/mL e CLM= 3,1 µg/mL; CIM= 3,1 µg/mL e CLM= 3,1 µg/mL, respectivamente), são considerados moderados.

Quando comparado o resultado da atividade bacteriostática do composto Frangulanina (**27**) frente à cepa *Enterococcus spp.* (CIM= 6,2 µg/mL e CLM= 12,5 µg/mL) ao resultado obtido do padrão Ampicilina (CIM= 25 µg/mL e CLM= 50 µg/mL), nota-se que o alcalóide

ciclopeptídico Frangulanina (**27**) se mostrou mais eficiente que este antibiótico, tanto para o potencial bacteriostático quanto para o potencial bactericida. Já para a cepa *Salmonella typhimurium* (CIM= 0,77 µg/mL e CLM= 100 µg/mL) o resultado do CIM foi superior ao do antibiótico Azitromicina (CIM= 3,1 µg/mL e CLM= 6,2 µg/mL) e equivalente aos antibióticos Ampicilina (CIM= 0,77 µg/mL e CLM= 0,77 µg/mL) e Levofloxacina (CIM= 0,77 µg/mL e CLM= 0,77 µg/mL), o que indica a possibilidade deste composto vir a ser utilizado como agente bacteriostático. Frente à bactéria *Bacillus cereus* (CIM= 25 µg/mL e CLM= 50 µg/mL), apresentou resultado menor para CIM, quando comparado com o padrão Ampicilina (CIM= 0,77 µg/mL e CLM= 100 µg/mL), sendo que o resultado para CLM de Frangulanina (**27**) se equiparou ao do antibiótico. Contra as cepas *Pseudomonas aeruginosa* (CIM= 25 µg/mL e CLM= 50 µg/mL) e *Enterobacter cloacae* (CIM= 25 µg/mL e CLM= 50 µg/mL), os resultados foram idênticos ao padrão Ampicilina (CIM= 25 µg/mL e CLM= 50 µg/mL).

Ainda comparando os resultados com este antibiótico, Frangulanina (**27**) mostrou igual potencial bacteriostático e maior potencial bactericida contra *Burkholderia cepacia* (CIM= 25 µg/mL e CLM= 25 µg/mL). Quanto aos resultados de Frangulanina (**27**) frente aos fungos testados, o maior potencial foi observado frente à *Cryptococcus neoformans* (CIM= 6,2 µg/mL e CLM= 25 µg/mL), sendo que os resultados para os outros fungos foram superiores a 50 µg/mL, tanto para CIM quanto para CLM.

O alcalóide ciclopeptídico neutro Discareno C (**63**) tanto frente à *Salmonella typhimurium* (CIM= 0,77 µg/mL e CLM= 100 µg/mL) quanto para *Enterococcus spp* (CIM= 12,5 µg/mL e CLM= 12,5 µg/mL) apresentou significativo potencial bacteriostático. Para os resultados obtidos frente à *Salmonella typhimurium*, Discareno C (**67**) apresentou maior potencial bacteriostático quando comparado com o controle Azitromicina (CIM= 3,1 µg/mL e CLM= 6,2 µg/mL) e equivalente quando comparado com os antibióticos Ampicilina (CIM= 0,77 µg/mL e CLM= 0,77 µg/mL) e Levofloxacina (CIM= 0,77 µg/mL e CLM= 0,77 µg/mL).

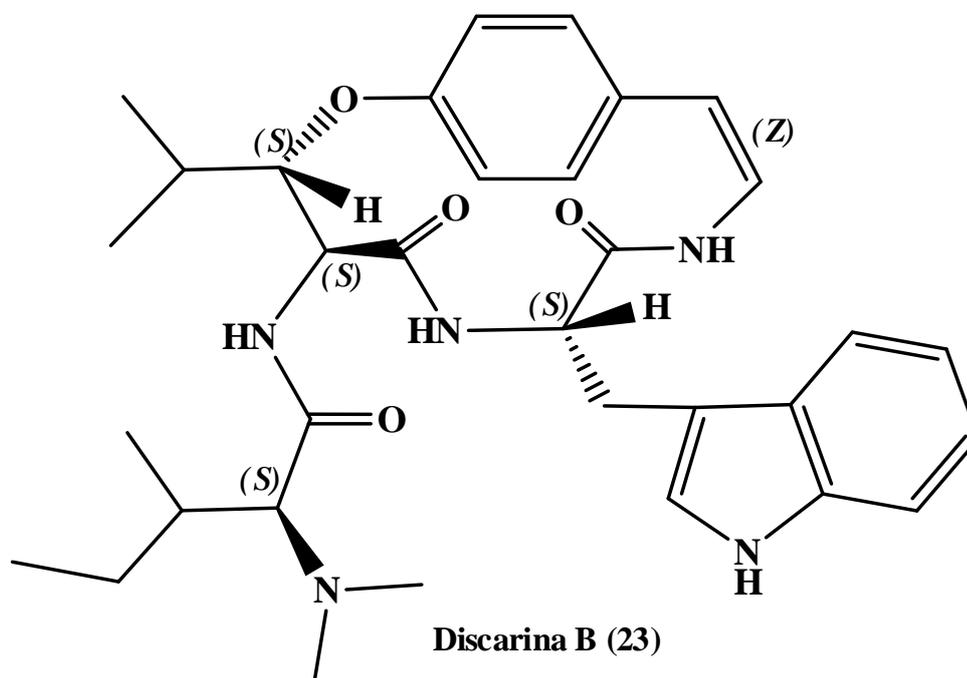
Em contrapartida, quando confrontado com os resultados obtidos dos padrões, frente à *Enterococcus spp* (CIM= 12,5 µg/mL e CLM= 12,5 µg/mL), Discareno C teve maior potencial bacteriostático e bactericida do que a Ampicilina (CIM= 25 µg/mL e CLM= 50 µg/mL). No entanto, o CIM e o CLM de Discareno C contra esta mesma cepa, em comparação com Azitromicina (CIM= 0,77 µg/mL e CLM= 100 µg/mL) e Levofloxacina (CIM= 0,77 µg/mL e CLM= 100 µg/mL), foi menos significativo. Com relação ao CIM e CLM contra os fungos, o alcalóide ciclopeptídico neutro Discareno C (**67**) apresentou melhor resultado frente à *Cryptococcus neoformans* (CIM= 50 µg/mL e CLM= 50 µg/mL).

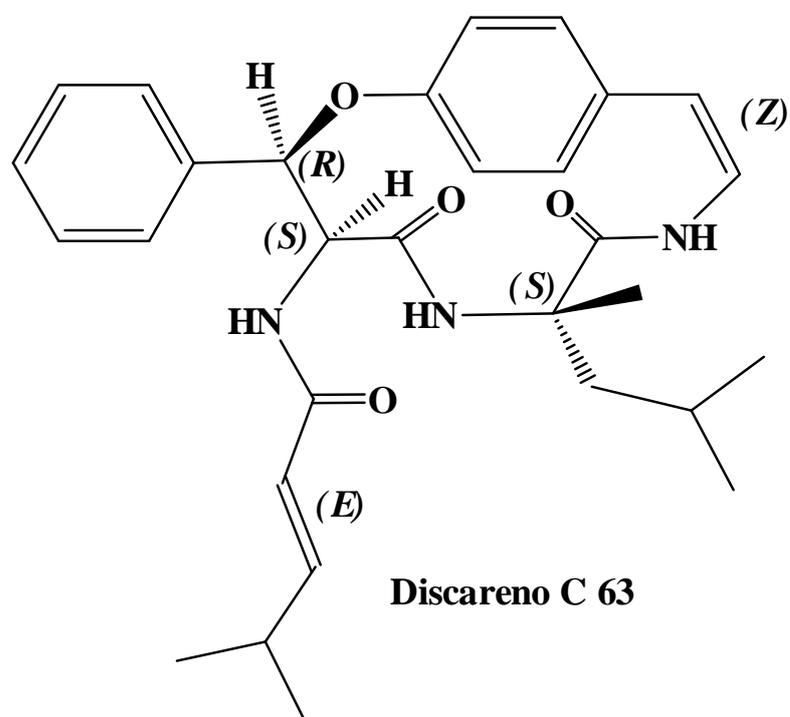
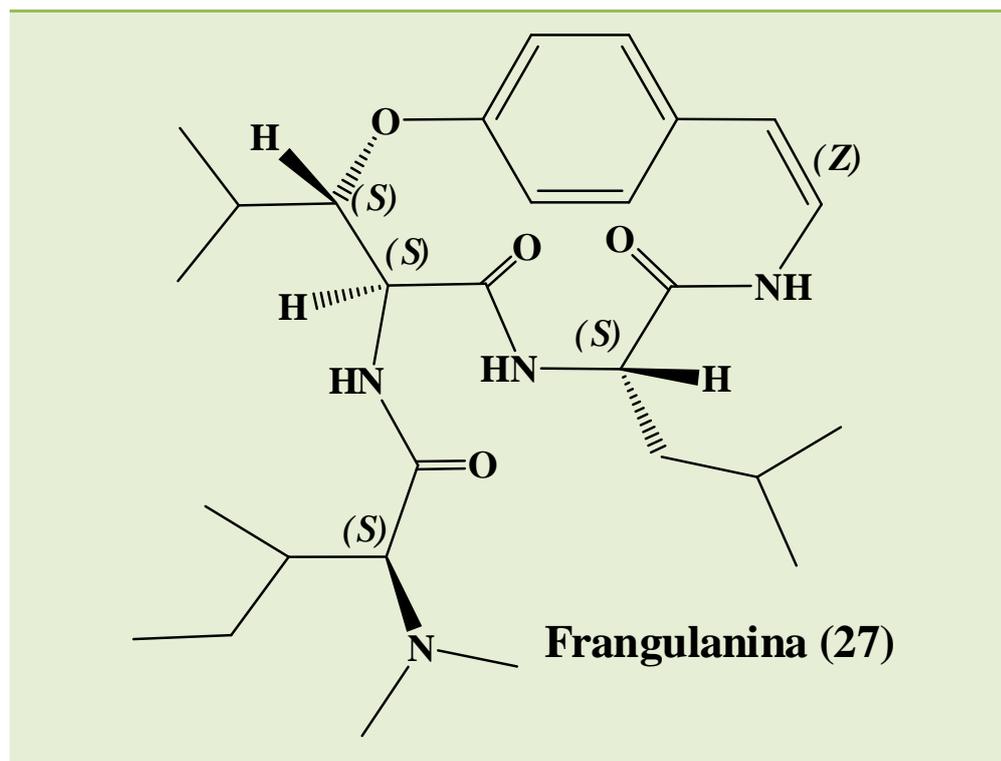
3.4.1 Correlação da atividade antimicrobiana e estrutura/configuração dos alcalóides isolados

Conforme foi citado anteriormente, os quatro alcalóides ciclopeptídicos e o alcalóide ciclopeptídeo neutro demonstrados nas Tabelas 28 e 29 apresentaram significativa atividade antimicrobiana. Neste segmento, é abordada a possibilidade da relação entre a configuração e a atividade antimicrobiana apresentada por Discarina B (**23**), Discarina C (**44**), Frangufolina (**26**), Frangulanina (**27**) e Discareno C (**63**) (Tabela 30).

Tabela 30

Estruturas dos alcalóides ciclopeptídicos e do alcalóide ciclopeptídeo neutro





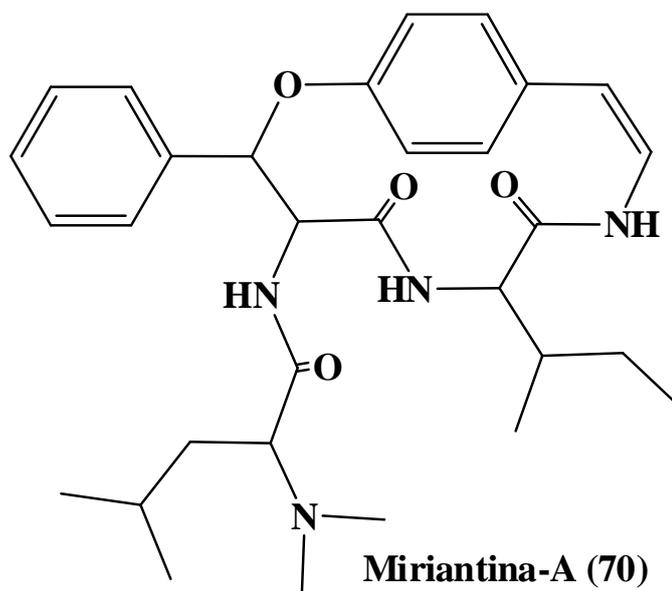
Segundo Joullié et al (2004), alcalóides ciclopeptídicos de 14 membros que apresentam em sua estrutura duas unidades fenilalanina apresentaram atividade antimicrobiana, e os que possuíam apenas uma unidade de fenilalanina ou uma unidade de isoleucina não apresentaram tal atividade. No entanto, a estrutura dos alcalóides

ciclopeptídicos Discarina B (**23**), Frangufolina (**26**) e Frangulanina (**27**) (Tabela 30) apresentam uma unidade fenilalanina ou uma unidade isoleucina e mostra atividade antimicrobiana significativa, conforme citado anteriormente na página 138. Portanto, a afirmação de que a presença de uma unidade fenilalanina ou de uma unidade isoleucina não possibilita ao alcalóide ciclopeptídico apresentar atividade antimicrobiana parece equivocada.

Morel et al (2005) destacaram a importância da unidade *N,N*-dimetil ou *N*-metil para a atividade, bem como, a possível relação entre a estereoquímica e a presença da unidade β -hidroxifenilserina na estrutura dos alcalóides. No entanto, o composto Discareno C (**63**), o qual não apresenta em sua estrutura a unidade *N,N*-dimetil, mostrou grande potencial bacteriostático e bactericida, o que indica que a presença desta unidade pode não ser determinante para se poder observar atividade antimicrobiana. O resultado apresentado para os alcalóides ciclopeptídicos Discarina B (**23**), Frangufolina (**26**) ou Frangulanina (**27**), que não apresentaram potencial antimicrobiano frente a algumas cepas e que apresentam em sua estrutura a unidade *N,N*-dimetil vem ao encontro dessa conclusão. O poder antimicrobiano da unidade *N,N*-dimetil parece ser limitado a algumas bactérias, não todas.

Vale ressaltar que houve diferença significativa entre os resultados para CLM do alcalóide ciclopeptídico Discarina C (**44**) e do alcalóide ciclopeptídico neutro Discareno C (**63**) contra as bactérias *Enterococcus spp* e *Salmonella typhimurium*. Para o resultado obtido frente à *Enterococcus spp*, Discarina C (**44**) (CLM= 100 $\mu\text{g/mL}$) apresentou menor potencial bactericida que Discareno C (**63**) (CLM= 12,5 $\mu\text{g/mL}$). Para o resultado obtido contra a cepa *Salmonella typhimurium*, Discarina C (**44**) (CLM= 3,1 $\mu\text{g/mL}$) mostrou maior potencial bactericida que Discareno C (**63**) (CLM= 100 $\mu\text{g/mL}$). Com isso, a ausência da unidade *N,N*-dimetil, no caso de Discareno C (**63**), ou sua presença, no caso de Discarina C (**44**) frente às referidas bactérias, indica que ela não é fundamental para que seja observado potencial antimicrobiano nestes compostos. Ou, como se disse, que esse potencial é apresentado apenas frente a certas bactérias. Destaca-se que ambas as estruturas apresentam a unidade β -hidroxifenilserina, o que poderia explicar os resultados apresentados na Tabela 28.

De acordo com Mostardeiro et al, 2013, quando comparados entre si os isômeros dos precursores de Discarina C (**44**), Discarina D (**45**) e Miriantina-A (**70**), em suas formas *eritro* (D e L) e *treo* (D e L), os mesmos apresentaram diferenças quanto a sua atividade antimicrobiana. Enquanto a forma *L-eritro* do β -OH aminoácido apresentou atividade frente a qualquer bactéria testada, a forma *D-eritro* do β -OH aminoácido foi inativo.



A partir disso, é possível propor que os resultados da atividade antimicrobiana obtidos dos alcalóides ciclopeptídicos e do alcalóide ciclopeptídeo neutro, podem ser provenientes da configuração dos aminoácidos dos quais são constituídos. O alcalóide Discarina B (**23**) possui em sua estrutura um resíduo β -OH leucina. Como foi dito anteriormente, a forma *L-eritro* qual apresenta os sinais do carbono C-3 em δ 82,0 ppm e C-4 em δ 56,0 ppm. Os sinais do carbono C-3 e C-4 do alcalóide ciclopeptídico Discarina B (**23**) aparecem em δ 81,6 ppm e δ 55,7 ppm, respectivamente, o que pode indicar que a configuração desta unidade seja *L-eritro*, podendo, dessa forma, fornecer uma razão para a significativa atividade que este alcalóide apresentou frente as bactérias *Enterococcus spp* (CIM 0,77 μ g/mL e CLM 1,55 μ g/mL) e *Escherichia coli* (CIM 1,55 μ g/mL).

Da mesma forma, o alcalóide ciclopeptídico Discarina C (**44**) apresenta a unidade β -OH Fenilserina *L-eritro* (C-3 δ 82,1 ppm e C-4 δ 55,6 ppm), o que poderia ser um fator determinante para o potencial bacteriostático e bactericida frente à bactéria *Salmonella typhimurium* (CIM 0,77 μ g/mL e CLM 3,1 μ g/mL).

O alcalóide ciclopeptídico Frangufolina (**26**) apresentou moderada atividade frente a bactéria *Enterococcus spp* (CIM 12,5 μ g/mL), o que pode ser devido a presença da forma *L-eritro* β -OH Leucina em sua estrutura (HAN et al, 1987).

O potencial bacteriostático e bactericida apresentado por Frangulanina (**27**) frente à *Enterococcus spp* (CIM 6,2 μ g/mL e CLM 12,5 μ g/mL) e *Salmonella typhimurium* (CIM 0,77

$\mu\text{g/mL}$) pode ser proveniente da configuração de sua estrutura, ou seja, por apresentar a forma *L-eritro* β -OH Leucina (SIERRA et al, 1972).

A forma *L-treo* β -OH Fenilserina do ciclopeptídeo neutro Discareno C (**63**) (GIACOMELI, 2005) pode ser a responsável pela atividade bacteriostática e bactericida apresentada frente à *Enterococcus spp* (CIM 12,5 $\mu\text{g/mL}$ e CLM 12,5 $\mu\text{g/mL}$) e frente à *Salmonella typhimurium* (CIM 0,77 $\mu\text{g/mL}$).

Com isso, os resultados obtidos para as atividades acima citadas podem ser provenientes da relação estrutura/configuração dos aminoácidos que constituem os alcalóides ciclopeptídicos Discarina B (**23**), Discarina C (**44**), Frangufolina (**26**) e Frangulanina (**27**) e o alcalóide ciclopeptídeo neutro Discareno C (**63**). Bem como há a possibilidade de o potencial antimicrobiano ser proveniente de grupos presentes nestas moléculas, tais como o grupo *N,N*-dimetil, o grupo β -hidroxifenilserina ou o grupo β -hidroxisoleucina presentes nestes compostos. São as últimas conclusões a que este estudo chegou, as quais se complementam.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os objetivos iniciais estabelecidos para a realização deste trabalho eram o isolamento, a determinação da configuração absoluta e a avaliação da atividade antimicrobiana dos alcalóides ciclopeptídicos já conhecidos ou novos das raízes da espécie *Discaria americana* Gilles and Hooker (Rhamnaceae), e a verificação da possibilidade de uma relação entre a atividade antimicrobiana e a estrutura/configuração dos alcalóides isolados.

Realizado o estudo, os objetivos traçados foram alcançados, mesmo que não para todos os alcalóides isolados, mas os resultados obtidos permitiram afirmar a presença da atividade antimicrobiana na planta *Discaria americana* Gilles and Hooker. Permitiram também estabelecer uma significativa indicação de haver uma relação entre, de um lado, a estrutura/configuração dos alcalóides estudados e a presença de certos grupamentos nos mesmos e, de outro, a presença de potencial bacteriostático e bactericida nestes metabólitos secundários. Dentre os alcalóides isolados, o alcalóide ciclopeptídico Frangufolina foi isolado pela primeira vez das cascas da raiz de *Discaria americana*.

No que se refere às dificuldades encontradas para a realização deste trabalho, destaca-se a escassa literatura no idioma nacional sobre o tema estudado. Os textos encontrados no idioma português, em sua grande maioria, respondem por manuais de base, que ora trazem aspectos teóricos gerais sobre o tema, ora instruem também de forma geral sobre como proceder para realizar estudos no tema. Os textos mais específicos, os quais trazem resultados atuais de pesquisas empreendidas sobre metabólitos secundários de plantas biologicamente próximas a *Discaria americana*, são encontrados quase que exclusivamente em idioma estrangeiro, geralmente o inglês. Disso resulta muito tempo perdido nas traduções de tais artigos.

Como sugestão para outros trabalhos, fica a possibilidade de revisão ou ampliação desse estudo, a possibilidade de se trabalhar com outros gêneros e espécies da família Rhamnaceae, principalmente aqueles indicados pela literatura como encontrados no estado do Rio Grande do Sul, como a *Colletia paradoxa* (Sprengel) Escalante, *C. spinosissima* Gmelin, *Colubrina glandulosa* Perkins, *Condalia buxifolia* Reissek, *Discaria americana* Gilles and

Hooker, *Gouania ulmifolia* Hooker et Arnott, *Hovenia dulcis* Thunberg, *Rhamnidium glabrum* Reissek, *Rhamnus sphaerosperma* Swartz e *Scutia buxifolia* Reissek.

Ou mesmo um estudo de outras famílias, como Sterculiaceae, Urticaceae, Pandaceae, Rubiaceae, Hymenocardiaceae, Celastraceae, já que algumas espécies dessas famílias foram apontadas como constituídas também por alcalóides entre seus metabólitos secundários. Especificamente quanto à *Discaria americana*, esta foi caracterizada como apresentando, além dos alcalóides ciclopeptídicos, flavonóides, saponinas, triterpenose e ciclopeptídeos, os quais não foram abordados neste estudo. Ou um estudo de outras partes dessa mesma planta, como suas partes aéreas, por exemplo.

Quanto a todas essas plantas acima citadas e seus respectivos metabólitos secundários, além da antimicrobiana, inúmeras outras atividades farmacológicas podem ser verificadas, como a sedativa, hiperglicêmica, antioxidante, anti-plasmódica, anti-infecciosa, antidiabética, inibidora da acetilcolinesterase, inseticida, imuno-estimulante, diurética, analgésica, anticonvulsivante, anti-inflamatória, entre outras.

Introduzindo a esse panorama a determinação da configuração estrutural de tais compostos, o leque de possibilidades aumenta vertiginosamente. Isso sem nem falar nas possibilidades de síntese ou semi-síntese das substâncias medicinalmente mais interessantes. É indiscutível que ainda há muito que fazer quando o objeto de pesquisa são produtos naturais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAGESEN, L; MEDAN, D; KELLERMANN, J; HILGER, H. H. Phylogeny of the tribe Colletieae (Rhamnaceae) – a sensitivity analysis of the plastid region trnL-trnF combined with morphology. **Plant Systematics and Evolution**, v. 250, p. 197–214, 2005.

BOLAÑOS, L; REDONDO-NIETO, M; BONILLA, I; WALLB, L.G. Boron requirement in the *Discaria trinervis* (Rhamnaceae) and Frankia symbiotic relationship. Its essentiality for Frankia BCU110501 growth and nitrogen fixation. **Physiologia Plantarum**, v. 115, p. 563–570, 2002.

BRAZ-FILHO, R; DE MORAIS, S. M. **Produtos naturais: estudos químicos e biológicos**. Fortaleza: UECE, 2007.

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**, v 75, p. 1220–1222, 2012.

CHAIA, E.E; VALVERDE, C; WALL, L.G. Local adaptation of *Frankia* to different *Discaria* (Rhamnaceae) host species growing in patagonia. **Current Microbiology**, v. 53, p. 523–528, 2006.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

CUSATO, M.S; TORTOSA, R.D; VALIENTE, L; BARNEIX, A.J; PUELLES, M.M. Effects of Zn²⁺ on nodulation and growth of a South American actinorhizal plant, *Discaria americana* (Rhamnaceae). **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 23, n. 6, p. 771-777, 2007.

EAST, S.P; SHAO, F; WILLIAMS, L; JOULLIÉ, M.M. Total synthesis of the cyclopeptide alkaloid sanjoinine G1 and its C-11 epimer. **Tetrahedron**, v. 54, p. 13371-13390, 1998.

FELICIANO, A. S. et al. **Manual de determinación estructural de compuestos naturales**. Bogotá: CYTED, 2007.

GIACOMELLI, S. R. **Estudo fitoquímico de três espécies pertencentes à família Rhamnaceae: *Discaria americana*, *Colletia paradoxa* e *Gouania ulmifolia***. Santa Maria: UFSM, 2005. Tese (Doutorado em Química), Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, 2005.

GIACOMELLI, S. R; MISSAU, F. C; MOSTARDEIRO, M. A; GONZAGA, W. A; DESSOY, E. M; MOREL, A. F. **Ciclopeptídeos isolados de *discaria febrifuga* Mart.** <<http://www.s bq.org.br/ranteriores/23/resumos/1160-2/index.html>>. Acesso em fev 2011.

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*. **Phytochemistry**, v. 65, p. 933-937, 2004.

GIACOMELLI, S.R; MISSAU, F.C; SILVA, U.F; DALCOL, I.I; ZANATTA, N; MOREL, A.F. Cyclopeptides from the bark of *Discaria americana*. **Journal of Natural Products**, v.64, p. 997-999, 2001.

GIACOMELLI, S.R; SILVA, E. R. Determinação do efeito ansiolítico, antinociceptivo e da Atividade scavenger de radicais livres do extrato da parte Aérea de *discaria americana* gill & hook (quina do brasil). In: SUSTENTABILIDADE, BIODIVERSIDADE E AVANÇOS TECNOLÓGICOS, XVI SIIC, 2010, Santiago, **Anais**. Santiago: URI, 2010. 76 e 224.

GOODMAN, J. G; GILMAN, A. G. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10^a ed., McGraw-Hill: Rio de Janeiro, 2005.

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

HAN, B. H; PARK, J. H; PARK, M. H; HAN, Y. N; PARK, M. K. Absolute Configuration of Sanjoinine-A (Frangufoline) and Its Heat Induced Artifact; Sanjoinine-Ahl. **Arch. Pharm. Res.** v. 10, n. 3, p. 200-201, 1987.

HOSTETTMANN, K; QUEIROZ, E. F; VIEIRA, P. C. **Princípios Ativos de Plantas Superiores**. 1^a ed. EdUFSCar: São Carlos, 2003.

HWANG, K. H; HAN, Y. N; HAN, B. H. Inhibition of calmodulin-dependent Calcium-ATPase and phosphodiesterase by various cyclopeptides and peptide alkaloids from the *Zizyphus* species. **Archives of Pharmacal Research**, v. 24, n. 3, p. 202-206, 2001.

ISENBERG, H. D. Clinical microbiology procedures handbook. **American Society for Microbiology**, Washington, D.C., v. 1, 2007.

JIA, A.-Q; TAN, N.-H; YANG, Y.-P; WU, S.-G; WANG, L.-Q; ZHOU, J. Cyclopeptides from three arctic caryophyllaceae plants, chemotaxonomy and distribution significance of caryophyllaceae cyclopeptides. **Acta Botanica Sinica**, v. 46, n. 5, p. 625-630, 2004.

JOULLIÉ, M. M; BHAT, K. L. Cyclopeptide alkaloids. **Journal of Chemistry Education**. v. 64, n. 1, p. 21-27, 1987.

JOULLIÉ, M. M; RICHARD, D. J. Cyclopeptide alkaloids: chemistry and biology. **Chem. Commun.**, 2011–2015, 2004.

KONEMAN, E.W. **Color atlas and textbook of diagnostic microbiology**. 5^a ed. Philadelphia: Lippincott, 1997.

MACHADO, E.C; ZANATTA, N; MOREL, A. F. Atribuição dos deslocamentos químicos de ¹H e ¹³C do alcalóide ciclopeptídico Discarina –B por técnicas de RMN de 1D e 2D. **Química Nova**, v. 16, n. 5, p. 397-403,1993.

MALDANER, G. **Estudo dos metabólitos secundários de *Condalia buxifolia* e *Scutia buxifolia* e suas atividades antimicrobianas**. Santa Maria: UFSM, 2005. Dissertação (Mestrado em Química), Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, 2005.

MASCARETTI, O.A; MERKUZA, V.M; FERRARO, G.E; RUVEDA, E.A; CHANG, C.-J; WENKERT, E. Peptide alkaloids of *Discaria longispina*. **Phytochemistry**, v. 11, p. 1133-1137, 1972.

MEDAN, D; VASELLATI, V. Nonrandom mating in *Discaria americana* (Rhamnaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 201, p. 233-241, 1996.

MENTZ, L.A; LUTZEMBERGER, L.C; SCHENKEL, E.P. Da flora medicinal do Rio Grande do Sul: notas sobre a obra de D'Ávila (1910). **Caderno de Farmácia**, v. 13, n. 1, p. 25-48, 1997.

MOREL, A. F. **Alcalóides peptídicos de *Scutia buxifolia* e *Discaria febrífuga***. Campinas: UNICAMP, 1978. Dissertação (Mestrado em Química), Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 1978.

MOREL, A. F; MACHADO, E.C.S; WESSJOHANN, L.A. Cyclopeptide alkaloids of *Discaria febrifuga* (Rhamnaceae). **Phytochemistry**, v. 39, p.4 31-434, 1995.

MOREL, A. F; MALDANER, G; ILHA, V. Cyclopeptide alkaloids from higher plants. **The Alkaloids Chemistry and Biology**, v. 67, p. 79-136, 2009.

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, 2013.

NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standarts*). **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Sixth Edition**. NCCLS document M7-A6 [ISBN 1-56238-486-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standarts*). **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard - Eighth Edition**. NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania, USA, 19087-1898, 2003.

NIERO, R. et al. Aspectos químicos e biológicos de plantas medicinais e considerações sobre fitoterápicos. In: BRESOLIN, T. M. B; CECHINEL FILHO, V. (orgs.). **Ciências Químico-Farmacêuticas: contribuição e desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos**. Itajaí: UNIVALI, 2003.

PLANTAS VASCULARES. Disponível em
<<http://www.plantasvasculares.uns.edu.ar/herbario/galeria/pehuen/d.html>>. Acesso em: 18 mar 2011.

REIS, M. S; MARIOT, A; STEENBOCK, W. Diversidade e domesticação de plantas medicinais In: SIMÕES, C. M. O. et al. (orgs.). **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. Porto Alegre: Editora da Universidade/ UFRGS, 1999.

RIVERA, A; URZÚA, A; TORRES, R. 1,2-dimethoxy- 1 1-hydroxyaporphine from *Discaria serratifolia* var. *Montana*. **Journal of Natural Products**, v. 47, n. 6, p. 1040-1041, 1984.

ROBBERS, J. E; SPEEDIE, M. K; TYLER, V, E. **Farmacognosia e Farmacobiotechnologia**. São Paulo: Premier, 1997.

SANTOS, S. R. **Estudo anatômico do lenho e descrição morfológica de cinco espécies Sul-rio-grandenses da família Rhamnaceae.** Santa Maria: UFSM, 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal), Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, 2008.

SEMA-RS. Secretaria do Meio-Ambiente do Estado do Rio Grande do Sul. Disponível em: <<http://www.sema.rs.gov.br>>. Acesso em: 15 mar 2009.

SIERRA, G; MASCARETTI, O. A; DIAZ, F. J; RUVEDA, E. A; CHANG, C; HAGAMAN, E; W; WENKE, E. **The Stereochemistry of the P-Hydroxyleucine Unit of Frangulane.** J.C.S. Chem. Comm, 1972.

SILVA, M; BHAKUNI, D; SAMMES, P.G. A new peptide alkaloid from *Discaria crenata*. **Phytochemistry**, v. 13, p. 861-863, 1974.

STÜKER, C. Z. **Estudo dos óleos voláteis de plantas medicinais da família Asteraceae do Rio Grande do Sul: *Baccharidastrium triplinervium*, *Baccaris pentodonta*, *Pulchea sagittalis* e *Eupatorium buniifolium*.** Santa Maria: UFSM, 2007. Dissertação (Mestrado em Química), Departamento de Química, Universidade Federal Santa Maria, 2007.

SUH, D.-Y; KIM, Y.C; KANG, Y.-H; HAN, Y.N; HAN, B.H. Metabolic cleavage of franguloline in rodents: *in vitro* and *in vivo* study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 3, p. 265-269, 1997.

SUKSAMRARN, S; SUWANNAPOCH, N; AUNCHAI, N; KUNO, M; RATANANUKUL, P; HARITAKUN, R; JANSAKUL C; RUCHIRAWAT, S. Ziziphine N, O, P and Q, new antiplasmodial cyclopeptide alkaloids from *Ziziphus oenoplia* var. *brunoniana*. **Tetrahedron**, v. 61, p. 1175-1180, 2005.

TOUMI, M; COUTY, F; EVANO, G. Total synthesis of the cyclopeptide alkaloid paliurine-E. Insights into macrocyclization by ene-enamide RCM. **Journal of Organic Chemistry**, v. 73, n. 4, p. 1270-1281, 2008.

TSCHESCHE, R; HILLEBRAND, D; BICK, I.R.C. Pubescine A, a cyclopeptide alkaloid from *Discaria pubescens*. **Phytochemistry**, v. 19, p.1000-1001, 1980.

VALVERDE, C; FERRARI, A; WALL, L.G. Phosphorus and the regulation of nodulation in the actinorhizal symbiosis between *Discaria trinervis* (Rhamnaceae) and Frankia BCU110501. **New Phytologist**, v. 153, p. 43-51, 2002.

VERPOORTE R. Pharmacognosy in the new millenium: leadfinding and biotechnology. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 52, p. 253-262, 2006.

VIEGAS JUNIOR, C; BOLZANI, V. S; FURLAN, M. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do mal de Alzheimer. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 655-660, 2004.