

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

ANÁLISE FITOQUÍMICA DAS ESPÉCIES
Discaria americana e Scutia buxifolia

TESE DE DOUTORADO

Janice Dahmer

**Santa Maria, RS, Brasil
2018**

JANICE DAHMER

ANÁLISE FITOQUÍMICA DAS ESPÉCIES *Discaria americana* e *Scutia buxifolia*

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós Graduação de Química da Universidade Federal de Santa Maria como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Química**.

Orientador: Ademir Farias Morel

Santa Maria, RS, Brasil
2018

Dahmer, Janice
ANÁLISE FITOQUÍMICA DAS ESPÉCIES *Discaria americana* e
Scutia buxifolia / Janice Dahmer.- 2018.
162 p.; 30 cm

Orientador: Adermir Farias Morel
Coorientador: Ionara Irion Dalcol
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Química, RS, 2018

1. *Discaria americana* 2. *Scutia buxifolia* 3.
Rhamnaceae 4. Estudo Fitoquímico 5. Atividade
Antimicrobiana I. Morel, Adermir Farias II. Dalcol,
Ionara Irion III. Título.

© 2018-04-18

Todos os direitos autorais reservados a Janice Dahmer. A reprodução de partes
ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

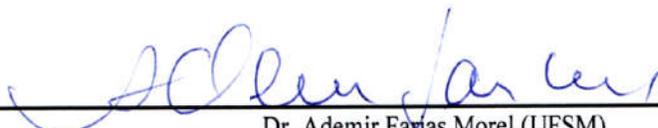
E-mail: dahmer.janice@yahoo.com.br

JANICE DAHMER

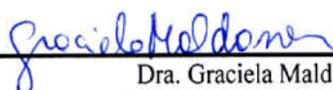
ANÁLISE FITOQUÍMICA DAS ESPÉCIES *Discaria americana* e *Scutia buxifolia*

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós Graduação de Química da Universidade Federal de Santa Maria como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Química**.

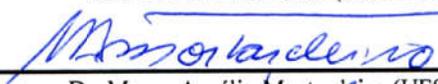
Aprovada em 26 de Fevereiro de 2018:



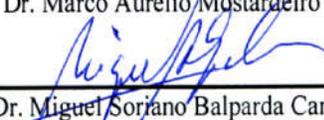
Dr. Ademir Farias Morel (UFSM)
Presidente/Orientador



Dra. Graciela Maldaner (URCAMP)



Dr. Marco Aurélio Mostardeiro (UFSM)



Dr. Miguel Sorjano Balparda Caro (UFSC)



Dr. Vinicius Ilha (UNIVATES)

Santa Maria, RS
2018

RESUMO

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

ANÁLISE FITOQUÍMICA DAS ESPÉCIES *Discaria americana* e *Scutia buxifolia*

AUTOR: JANICE DAHMER

ORIENTADOR: ADEMIR FARIAS MOREL

LOCAL E DATA DA DEFESA: SANTA MARIA, 26 DE FEVEREIRO DE 2018

Este trabalho teve como proposta realizar um estudo fitoquímico do extrato bruto das cascas das raízes da espécie *Discaria americana* Gilles and Hooker e das cascas do caule da espécie *Scutia buxifolia*. Através deste estudo foi possível isolar das Frações Básicas Etéreas Alcaloides Totais (FBEAT) sete compostos de *Discaria americana*, com estruturas já conhecidas. Os alcaloides ciclopeptídicos são Discarina-B (42), -C (41) e -D (43), Frangufolina (46) e Frangulanina (45), Adouetina Y' (47) e, também, o ciclopeptídeo neutro Discareno C (44). Da espécie *Scutia buxifolia* foram isolados, das Frações Básicas Etéreas Alcaloides Totais (FBEAT), os alcaloides ciclopeptídicos com estruturas já conhecidas os diastereoisômeros Scutianina-P (48) e -N (49), Aralionina B (50), e os ciclopeptídeos neutros Scutianenos-X (13) e -Z (15), duas substâncias inéditas, os peptídeos Scutianinas-Q (51) e -R (52) além, de uma amida, (R)-Tembamida (38) a qual é normalmente encontrada em plantas da família Rutaceae. Ainda na análise fitoquímica foi realizado um estudo preliminar quantitativo para verificar a sazonalidade da produção destes compostos nestas espécies. Neste estudo, foi constatada que a maior produção dos alcaloides ciclopeptídicos são nos meses de inverno e verão para ambas as espécies. Isto pode indicar que estes compostos são produzidos quando o ambiente oferece condições extremas de temperaturas. Além disso, foi avaliada o potencial antimicrobiano dos alcaloides ciclopeptídicos e dos ciclopeptídeos neutros isolados além das frações básicas etéreas obtidas de *Discaria americana* e *Scutia buxifolia* frente à cinco bactérias gram-positivas: *Bacillus subtilis*, *Enterococcus* spp., *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e

nove bactérias gram-negativas: *Salmonella typhimurium*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Salmonella enteritidis*, *Enterobacter aerogenes*, *Morganella morganii* e *Shigella sonnei*. Os resultados obtidos a partir desta avaliação foram muito satisfatórios, pois tanto as frações FBEAT tiveram potencial inibitório, variando entre 31,2 µg/ml e 250 µg/ml, quanto aos isolados que apresentaram Concentração Inibitória Mínima entre 1,56 µg/ml e 100 µg/ml. Dos resultados da atividade antimicrobiana, o que chamou mais a atenção foi que todas as amostras aqui testadas tiveram tanto potencial inibitório quanto bactericida frente à *Enterococcus* spp. Os valores da Concentração Inibitória Mínima variou entre 25 µg/ml e 50 µg/ml e Concentração Letal Mínima entre 50 µg/ml e 200 µg/ml para os isolados. Já para as FBEAT, os valores da Concentração Inibitória Mínima variou entre 62,5 µg/ml e 125 µg/ml e Concentração Letal Mínima entre 125 µg/ml e 250 µg/ml.

Palavras-chave:

Discaria americana – *Scutia buxifolia* - Rhamnaceae - Estudo Fitoquímico - Atividade Antimicrobiana

ABSTRACT

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

PHYCHOCHEMICAL ANALYSIS OF SPECIES *Discaria americana e Scutia buxifolia*

AUTHOR: JANICE DAHMER

ADVISER: ADEMIR FARIAS MOREL

DATE AND PLACE OF DEFENSE: SANTA MARIA, February 26, 2018

This work had as a proposal to carry out a phytochemical study of the crude extract of the bark of the roots of the species American *Discaria* Gilles and Hooker and of the bark of the stem of the species *Scutia buxifolia*. Through this study it was possible to isolate seven compounds of the American *Discaria*, with known structures, from the Total Alkaloid Ethereal Fractions (FBEAT). The cyclopeptide alkaloids are *Discarina*-B (42), -C (41) and -D (43), *Franfrepoline* (46) and *Frangulanine* (45), *Adouetine Y* '(47) and also the neutral cycloheptídeo *Discareno C*). From the *Scutia buxifolia* species, the cyclopeptural alkaloids with structures known as *Scutianina*-P (48) and -N (49), *Aralionin B* (50), and *Scutianenos* neutral cyclopeptides were isolated from the Total Alkaloid Ethereal Fractions (FBEAT) -X (13) and -Z (15), two novel substances, the *Scutianinas*-Q (51) and -R (52) peptides in addition to an amide, (R) -*Tamamide* (38) which is usually found in plants of the family *Rutaceae*. Also in the phytochemical analysis was carried out a preliminary quantitative study to verify the seasonality of the production of these compounds in these species. In this study, it was observed that the highest production of cyclopeptide alkaloids are in the winter and summer months for both species. This may indicate that these compounds are produced when the environment offers extreme temperature conditions. In addition, the antimicrobial potential of the cyclopeptide alkaloids and the isolated neutral cyclopeptides in addition to the ethereal basic fractions obtained from the American *Discaria* and *Scutia buxifolia* against the five gram-positive bacteria: *Bacillus subtilis*, *Enterococcus* spp., *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and

nine gram-negative bacteria: *Salmonella typhimurium*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Salmonella enteritidis*, *Enterobacter aerogenes*, *Morganella morganii* and *Shigella sonnei*. The results obtained from this evaluation were very satisfactory, since both the FBEAT fractions had an inhibitory potential, ranging from 31,2 µg/ml to 250 µg/ml, in the case of isolates with a Minimum Inhibitory Concentration between 1,56 µg/ml and 100 µg/ml. From the results of the antimicrobial activity, what was most striking was that all samples tested here had both inhibitory and bactericidal potential against *Enterococcus* spp. Minimum Inhibitory Concentration ranged from 25 µg/ml to 50 µg/ml and Minimum Lethal Concentration between 50 µg/ml and 200 µg/ml for the isolates. For FBEAT, the Minimum Inhibitory Concentration ranged from 62,5 µg/ml to 125 µg/ml and Minimum Lethal Concentration between 125 µg/ml and 250 µg/ml.

Key-words:

Discaria americana – *Scutia buxifolia* - Rhamnaceae - Phytochemical Study - Antimicrobial Activity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Discaria americana</i> Gilles and Hooker	26
Figura 2: <i>Scutia buxifolia</i> Reissek.....	26
Figura 3: Estrutura geral dos alcaloides ciclopeptídicos.....	27
Figura 4: Subtipos estruturais dos alcaloides ciclopeptídicos.....	28
Figura 5: Alcaloides ciclopeptídicos e ciclopeptídeos neutros de <i>Scutia buxifolia</i>	33
Figura 6: Estruturas dos alcaloides ciclopeptídicos e ciclopeptídeo neutro isolados entre 2009 e 2011.	34
Figura 7: Estruturas dos alcaloides ciclopeptídicos e ciclopeptídeos neutros isolados em 2012.....	35
Figura 8: Estruturas dos alcaloides ciclopeptídicos e ciclopeptídeos neutros isolados entre 2013 e 2016.....	36
Figura 9: Estruturas dos alcaloides ciclopeptídicos e ciclopeptídeos neutros isolados em 2017.....	36
Figura 10: Estruturas das β -hidroxiamidas	37
Figura 11: Fracionamento ácido-base.....	43
Figura 12: CLAE das frações AT das coletas dos municípios de Santana do Livramento (SL) e São Sepé (SS).....	75
Figura 13: CLAE das frações AT das coletas dos municípios de Caçapava do Sul, Lavras do Sul, Santana do Livramento e São Sepé.	79
Figura 14: Estrutura do alcaloide ciclopeptídico Aralionina B.	80
Figura 15: Espectro de RMN de ^1H do alcaloide ciclopeptídico Aralionina B, em DMSO-d^6 a 400 MHz.	81
Figura 16: Espectro de COSY do alcaloide ciclopeptídico Aralionina B, em DMSO-d^6 a 400 MHz.....	82
Figura 17: Expansão do espectro de COSY do alcaloide ciclopeptídico Aralionina B, em DMSO-d^6 a 400 MHz.	83
Figura 18: Expansão espectro de RMN ^1H do alcaloide ciclopeptídico Aralionina B, em DMSO-d^6 a 400 MHz.	83
Figura 19: Expansão espectro de RMN ^1H do alcaloide ciclopeptídico Aralionina B, em DMSO-d^6 a 400 MHz.	84
Figura 20: Expansão do espectro de COSY do alcaloide ciclopeptídico Aralionina B, em DMSO-d^6 a 400 MHz.	84

Figura 21: Expansão do espectro de RMN ¹ H do alcaloide ciclopeptídico Aralionina B, em DMSO-d ⁶ a 400 MHz.....	85
Figura 22: Expansão do espectro de COSY do alcaloide ciclopeptídico Aralionina B, em DMSO-d ⁶ a 400 MHz.	86
Figura 23: Expansão do espectro HMBC do alcaloide ciclopeptídico Aralionina B, em DMSO-d ⁶ a 400 MHz.	87
Figura 24: Expansão do espectro HMBC do alcaloide ciclopeptídico Aralionina B, em DMSO-d ⁶ a 400 MHz.	88
Figura 25: Expansão do espectro HMQC do alcaloide ciclopeptídico Aralionina B, em DMSO-d ⁶ a 400 MHz.	88
Figura 26: Expansão do espectro HMBC do alcaloide ciclopeptídico Aralionina B, em DMSO-d ⁶ a 400 MHz.	89
Figura 27: Expansão do espectro HMQC do alcaloide ciclopeptídico Aralionina B, em DMSO-d ⁶ a 400 MHz.	89
Figura 28: Espectro de ¹³ C do alcaloide ciclopeptídico Aralionina B, em DMSO-d ⁶ a 400 MHz.....	90
Figura 29: Espectro de DEPT 135° do alcaloide ciclopeptídico Aralionina B, em DMSO-d ⁶ a 400 MHz.	91
Figura 30: Scutianina-Q (51).....	95
Figura 31: Espectro de RMN de ¹ H de Scutianina-Q (51), em CDCl ₃ a 400 MHz.....	96
Figura 32: Espectro de RMN de Cosy, de Scutianina-Q (51), em CDCl ₃ a 400 MHz...	96
Figura 33: Expansão do espectro de RMN Cosy, de Scutianina-Q (51), em CDCl ₃ a 400 MHz.	97
Figura 34: Expansão do espectro de HMBC, de Scutianina-Q (51), em CDCl ₃ a 400 MHz.	98
Figura 35: Espectro de HMQC, de Scutianina-Q (51), em CDCl ₃ a 400 MHz.....	99
Figura 36: Expansão do espectro HMQC, de Scutianina-Q (51), em CDCl ₃ a 400 MHz.	100
Figura 37: Expansão do espectro de HMBC, de Scutianina-Q (51), em CDCl ₃ a 400 MHz.	100
Figura 38: Espectro de RMN de ¹³ C, de Scutianina-Q (51), em CDCl ₃ a 400 MHz. ...	101
Figura 39: Expansão do espectro de RMN de ¹³ C, de Scutianina-Q (51), em CDCl ₃ a 400 MHz.....	102
Figura 40: Espectro DEPT 135°, de Scutianina-Q (51), em CDCl ₃ a 400 MHz.....	102

Figura 41: Expansão do espectro DEPT 135°, de Scutianina-Q (51), em CDCl ₃ a 400 MHz.	103
Figura 42: Espectro de massas de alta resolução de S18, Scutianina-Q.....	104
Figura 43: Difração de Raio-X de Scutianina-Q.....	105
Figura 44: estrutura dos alcaloides ciclopeptídicos Lasoidina A e Sanjoinina G2.	105
Figura 45: Proposta da formação de um alcaloide ciclopeptídico através do peptídeo Scutianina-Q.....	106
Figura 46: Proposta para rota biogenética de precursores dos alcaloides ciclopeptídicos	107
Figura 47: Possível rota biossintética dos alcaloides ciclopeptídicos de 14-membros. 108	
Figura 48: Estrutura do composto Scutianina R.....	109
Figura 49: Espectro de RMN de ¹ H do peptídeo Scutianina R, em DMSO-d ⁶ a 400 MHz.	110
Figura 50: Espectro de COSY do peptídeo Scutianina R, em DMSO-d ⁶ a 400 MHz. 110	
Figura 51: Expansão do espectro COSY do peptídeo Scutianina R, em DMSO-d ⁶ a 400 MHz.	111
Figura 52: Espectro de RMN de ¹³ C do peptídeo Scutianina R, em DMSO-d ⁶ a 400 MHz.	112
Figura 53: Expansão do Espectro HMBC do peptídeo Scutianina R, em DMSO-d ⁶ a 400 MHz.....	112
Figura 54: Expansão do espectro HMQC do peptídeo Scutianina R, em DMSO-d ⁶ a 400 MHz.....	113
Figura 55: Expansão do Espectro HMQC do peptídeo Scutianina R, em DMSO-d ⁶ a 400 MHz.....	113
Figura 56: Proposta da formação de um ciclopeptídeo neutro através do peptídeo Scutianina-R com a adição do aminoácido Tirosina.	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Alcaloides ciclopeptídicos do tipo 4(14)-Frangulanina.....	29
Tabela 2: Alcaloides ciclopeptídicos do tipo 4(14)-Integerrina.....	30
Tabela 3: Alcaloides ciclopeptídicos do tipo 4(14)-Pandamina.....	30
Tabela 4: Alcaloides ciclopeptídicos do tipo neutro.....	30
Tabela 5: Alcaloides ciclopeptídicos do tipo 5(14)-Scutianina.....	31
Tabela 6: Rendimento da MSM e do EB obtidos das coletas de <i>Discaria americana</i> ...	42
Tabela 7: Cromatografia das frações Alcaloides Totais (FBEAT).....	44
Tabela 8: Rendimento da MSM e do EB obtidos das coletas de <i>Scutia buxifolia</i>	45
Tabela 9: Cromatografia da fração Alcaloides Totais (FBEAT).....	46
Tabela 10: Microrganismos indicadores	48
Tabela 11: Meios de cultura	49
Tabela 12: Rendimento das frações etéreas básicas de <i>Discaria americana</i>	72
Tabela 13: Rendimento das frações etéreas básicas de <i>Scutia buxifolia</i>	72
Tabela 14: Equações de regressão linear e intervalo de concentrações, n=5.....	74
Tabela 15: Conteúdo dos padrões em diferentes frações.....	74
Tabela 16: Equações de regressão linear e intervalo de concentrações, n=5.....	77
Tabela 17: Conteúdo dos padrões em diferentes frações.....	77
Tabela 18: Dados de RMN de ¹ H do alcaloide ciclopeptídico Aralionina B, em DMSO-d ⁶ a 400 MHz.....	91
Tabela 19: Dados de RMN ¹³ C do alcaloide ciclopeptídico Aralionina B, em DMSO-d ⁶ a 400 MHz.....	92
Tabela 20: Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C do peptídeo Scutianina Q.....	103
Tabela 21: Dados de RMN de ¹ H e de ¹³ C do peptídeo Scutianina R.....	114
Tabela 22: Resultado da Atividade Antimicrobiana das FBEAT de <i>D. americana</i>	117
Tabela 23: Resultado da Atividade Antimicrobiana dos padrões isolados de <i>D. americana</i>	118
Tabela 24: Resultado da Atividade Antimicrobiana dos compostos isolados de <i>S. buxifolia</i>	119
Tabela 25: Resultado da Atividade Antimicrobiana das FBEAT de <i>S. buxifolia</i>	120

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Estruturas numeradas, características e identificação dos compostos isolados.	66
--	----

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice 1: Espectro de ^1H da Discarina B, em CDCl_3 a 400MHz.....	131
Apêndice 2: Expansão do espectro de ^1H da Discarina B, em CDCl_3 a 400MHz.....	131
Apêndice 3: Espectro de Cosy da Discarina B, em CDCl_3 a 400MHz.....	132
Apêndice 4: Espectros de ^{13}C da Discarina B, em CDCl_3 a 400MHz.	132
Apêndice 5: Espectro de ^1H da Discarina C, em CDCl_3 a 400MHz.....	133
Apêndice 6: Espectro de Cosy da Discarina C, em CDCl_3 a 400MHz.....	133
Apêndice 7: Espectro de ^{13}C da Discarina C, em CDCl_3 a 400MHz.....	134
Apêndice 8: Espectro de ^1H da Discarina D, em CDCl_3 a 400MHz.....	134
Apêndice 9: Espectro de Cosy da Discarina D, em CDCl_3 a 400MHz.....	135
Apêndice 10: Espectro de ^{13}C da Discarina D, em CDCl_3 a 400MHz.....	135
Apêndice 11: Espectro de ^1H da Frangufolina, em CDCl_3 a 400MHz.	136
Apêndice 12: Espectro de Cosy da Frangufolina, em CDCl_3 a 400MHz.	136
Apêndice 13: Espectro de Cosy da Frangufolina, em CDCl_3 a 400MHz.	137
Apêndice 14: Espectro de ^{13}C da Frangufolina, em CDCl_3 a 400MHz.	137
Apêndice 15: Espectros de Cosy da Frangulanina, em DMSO-d^6 a 400MHz.....	138
Apêndice 16: Espectro de ^{13}C da Frangulanina, em DMSO-d^6 a 400 MHz.....	138
Apêndice 17: Espectro ^1H da Adouetina Y', em CDCl_3 a 400MHz.	139
Apêndice 18: Espectro de Cosy da Adouetina Y', em CDCl_3 a 400MHz.....	139
Apêndice 19: Espectro de ^{13}C da Adouetina Y', em CDCl_3 a 400MHz.....	140
Apêndice 20: Espectro de ^1H do Discareno C, em CDCl_3 a 400MHz.	140
Apêndice 21: Espectro de Cosy do Discareno C, em CDCl_3 a 400 MHz.....	141
Apêndice 22: Espectro de ^{13}C do Discareno C, em CDCl_3 a 400 MHz.....	141
Apêndice 23: Espectro de ^1H de Scutianina P, em CDCl_3 a 400 MHz.....	142
Apêndice 24: Espectro de Cosy de Scutianina P, em CDCl_3 a 400 MHz.....	142
Apêndice 25: Espectro de ^{13}C de Scutianina P, em CDCl_3 a 400 MHz.....	143
Apêndice 26: Espectro de ^1H de Scutianina N, em CDCl_3 a 400 MHz.....	143
Apêndice 27: Espectro de Cosy de Scutianina N, em CDCl_3 a 400 MHz.....	144
Apêndice 28: Espectro de ^{13}C de Scutianina N, em CDCl_3 a 400 MHz.....	144
Apêndice 29: Espectro de ^1H de Tembamida, em CDCl_3 a 400 MHz.....	145
Apêndice 30: Espectro de Cosy de Tembamida, em CDCl_3 a 400 MHz.....	145
Apêndice 31: Espectro de ^{13}C de Tembamida, em CDCl_3 a 400 MHz.....	146
Apêndice 32: Espectro de ^1H de Scutianeno X, DMSO-d^6 a 400 MHz.....	146

Apêndice 33: Espectro APT de Scutianeno X, DMSO-d ⁶ a 400 MHz.....	147
Apêndice 34: Espectro de Cosy de Scutianeno X, DMSO-d ⁶ a 400 MHz.....	147
Apêndice 35: Espectro de ¹ H de Scutianeno Z, DMSO-d ⁶ a 400 MHz.....	148
Apêndice 36: Espectro de Cosy de Scutianeno Z, DMSO-d ⁶ a 400 MHz.....	148
Apêndice 37: Espectro de ¹³ C de Scutianeno Z, DMSO-d ⁶ a 400 MHz.....	149
Apêndice 38: Gráfico da equação da reta de Discarina B.....	150
Apêndice 39: CLAE de Discarina B.....	150
Apêndice 40: Gráfico da equação da reta de Discarina C.....	151
Apêndice 41: CLAE de Discarina C.....	151
Apêndice 42: Gráfico da equação da reta de Frangulanina.....	152
Apêndice 43: CLAE de Frangulanina.....	152
Apêndice 44: Gráfico da equação da reta de Frangufolina.....	153
Apêndice 45: CLAE de Frangufolina.....	153
Apêndice 46: Gráfico da equação da reta de Adouetina Y'.....	154
Apêndice 47: CLAE de Adouetina Y'.....	154
Apêndice 48: Gráfico da equação da reta de Discarina D.....	155
Apêndice 49: CLAE de Discarina D.....	155
Apêndice 50: Gráfico da equação da reta de Discareno C.....	156
Apêndice 51: CLAE de Discareno C.....	156
Apêndice 52: Gráfico da equação da reta de Scutianina P.....	157
Apêndice 53: CLAE de Scutianina P.....	157
Apêndice 54: Gráfico da equação da reta de Aralionina B.....	158
Apêndice 55: CLAE de Aralionina B.....	158
Apêndice 56: Gráfico da equação da reta de Scutianina N.....	159
Apêndice 57: CLAE de Scutianina N.....	159
Apêndice 58: Gráfico da equação da reta de Tembamida.....	160
Apêndice 59: CLAE de Tembamida.....	160
Apêndice 60: Gráfico da equação da reta de Scutianina Q.....	161
Apêndice 61: CLAE de Scutianina Q.....	161
Apêndice 62: Gráfico da equação da reta de Scutianeno Z.....	162
Apêndice 63: CLAE de Scutianeno Z.....	162
Apêndice 64: Gráfico da equação da reta de Scutianeno X.....	163
Apêndice 65: CLAE de Scutianeno X.....	163

LISTA DE ABREVIATURAS

δ	Deslocamento Químico
J	Constante de Acoplamento
μg	Micrograma
ATCC	American Type Culture Collection
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celcius
CC	Cromatografia em Coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLM	Concentração Letal Mínima
CPP	Cromatografia em Placa Preparativa
COSY	Correlated Spectroscopy
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
APT	Attached Proton Test
d	Duplete
dd	Duplo duplete
Hz	Hertz
m	Multiplete
mg	Miligramas
NPPN	Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais
Pág.	Página
ppm	Parte por Milhão
Rf	Fator De Retenção
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
s	Singlete
t	Triplete

TMS	Tetrametilsilano
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
FEB	Fração Etérea Básica
FBEAT	Fração Etérea Básica Alcalóides Totais
FBER	Fração Etérea Básica Resíduo

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS.....	12
LISTA DE QUADROS	13
LISTA DE APÊNDICES	14
LISTA DE ABREVIATURAS.....	16
1 INTRODUÇÃO	22
2 OBJETIVOS.....	24
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	25
3.1 FAMÍLIA RHAMNACEAE.....	25
3.2 <i>Discaria americana</i>	25
3.3 <i>Scutia buxifolia</i>	26
3.4 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	27
3.4.1 Alcaloides	27
3.4.1.1 Alcaloides ciclopeptídicos	27
3.4.1.1.1 Alcaloides ciclopeptídicos de 14 membros	28
3.4.1.1.2 Alcaloides Ciclopeptidicos isolados de <i>Scutia buxifolia</i> e <i>Discaria americana</i>	29
3.4.2 Amidas.....	37
3.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	37
3.6 CLAE - ANÁLISE QUANTITATIVA	38
4 PARTE EXPERIMENTAL	39
4.1 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS GERAIS	39
4.1.1 Espectroscopia Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H e ¹³ C	39
4.1.2 Aparelho de Ponto de Fusão	39
4.1.3 Materiais e Métodos Cromatográficos	39

4.1.4 Cromatografia Líquida de alta eficiência (CLAE / HPLC).....	40
4.1.5 Estudos de linearidade.....	41
4.1.6 Polarímetro	41
4.1.7 Difração de Raio-X	41
4.2 <i>Discaria americana</i> Gilles and Hocker	41
4.2.1 Extração, Fracionamento e Cromatografia.....	41
4.3 <i>Scutia buxifolia</i>	44
4.3.1 Extração, Fracionamento e Cromatografia.....	44
4.4 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA QUANTITATIVA (CLAE / HPLC).....	47
4.4.1 <i>Discaria americana</i>	47
4.4.2 <i>Scutia buxifolia</i>	47
4.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA <i>IN VITRO</i>	48
4.5.1 Micro-organismos Utilizados	48
4.5.2 Padrões utilizados nos Ensaio Microbiológicos.....	48
4.5.3 Meios de culturas empregados.....	49
4.5.4 Preparação dos inóculos e Determinação da CIM pelo método de micro diluição.....	49
4.5.5 Determinação da Concentração Letal Mínima (CLM)	50
4.6 METABÓLITOS ISOLADOS E IDENTIFICADOS	51
4.6.1 Alcaloides Ciclopeptídicos	51
4.6.1.1 Alcaloides isolados de <i>Discaria americana</i>	51
4.6.1.1.1 Discarina B, A08 (42).....	51
4.6.1.1.2 Discarina C, A28 (41).....	52
4.6.1.1.3 Frangulanina, A26 (45).....	53
4.6.1.1.4 Discarina D, A31	54
4.6.1.1.5 Adouetina Y', A10 (47).....	55
4.6.1.1.6 Frangufolina, A19 (46).....	56

4.6.1.2 Alcaloides isolados de <i>Scutia buxifolia</i>	57
4.6.1.2.1 Scutianina P, S01 (50)	57
4.6.1.2.3 Aralionina B, S02 (51).....	58
4.6.1.2.6 Scutianina N, S07 (49).....	59
4.6.2 Ciclopeptídeos Neutros	60
4.6.2.1 Discareno C, E02 (44)	60
4.6.2.2 Scutianeno X, S17 (13).....	61
4.6.2.3 Scutianeno Z, S16 (15).....	62
4.6.3 Peptídeos.....	63
4.6.3.1 Scutianina Q, S18 (52)	63
4.6.3.2 Scutianina R, S04 (52).....	64
4.6.4 Amida	65
4.6.4.1 Tembamida, S10 (38).....	65
5 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	66
5.1 RENDIMENTO DO EXTRATO BRUTO E DAS FRAÇÕES.....	71
5.2 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA QUANTITATIVA	73
5.2.1 <i>Discaria americana</i>	73
5.2.2 <i>Scutia buxifolia</i>	76
5.3 METABÓLITOS ISOLADOS.....	80
5.3.1 Alcaloide Ciclopeptídico	80
5.3.2 Peptídeos.....	95
5.3.2.1 Scutianina-Q, S18 (51)	95
5.3.2.2 Scutianina R, S04 (52).....	109
5.4 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	116
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	124
7 REFERÊNCIAS	126

8 APÊNDICE.....	131
------------------------	------------

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, de um total de 11 milhões, somente cerca de 1,5 milhões de espécies foram catalogadas no planeta, ou seja, aproximadamente 13% do total. No Brasil, existe uma biodiversidade que consiste em torno de 170 a 210 mil espécies correspondendo a 13% das espécies no planeta (STEHMANN e SOBRAL, 2017).

Muitas plantas oriundas das Américas são utilizadas tanto como alimento quanto como medicamento há muitos séculos e, aproximadamente, há mais de 10 mil anos os índios americanos já as utilizavam com o seu conhecimento etnobotânico. Atualmente, muitas destas espécies foram domesticadas a partir deste conhecimento. Também, podemos ressaltar que muitas substâncias bioativas, base de medicamentos, foram descobertas através do conhecimento dos ameríndios tais como, a pilocarpina a qual provém das folhas da espécie de *Pilocarpus* sendo utilizada no tratamento do glaucoma (BRANDÃO, 2017).

Os fitoquímicos são compostos biologicamente ativos, de ocorrência natural sendo encontrados, principalmente, em plantas. Podem trazer, aos seres humanos, mais benefícios que os macronutrientes e os micronutrientes e sua função principal é proteger as plantas de doenças e danos causados por poluição, estresse, exposição excessiva aos raios UV, bem como, por ataques de patógenos. Além disso, fornecem à planta cor, aroma e sabor (SAXENA, NEMA, *et al.*, 2013).

Estes compostos são conhecidos como metabólitos secundários podendo ser encontrados em diferentes partes das plantas tais como raízes, caules, folhas, flores, frutos e sementes. Logo, uma dieta variada com frutas, legumes, verduras, grãos integrais apresenta uma gama de compostos bioativos que podem fornecer inúmeros benefícios à saúde. Isso porque, os fitoquímicos possuem propriedades farmacológicas como atividade antioxidante, efeitos antimicrobianos, dentre outros. Além de ser matéria-prima de vários medicamentos (WADOOD, GHUFRAN, *et al.*, 2013).

No estado do Rio Grande do Sul, ao longo dos últimos anos, houve o início da 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^o. 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 sendo constituída por inúmeras espécies nativas, pertencentes à estas famílias (SANTOS, 2008).

Enquanto Bacharel em Química, Mestre em Química e Doutoranda 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 da determinação estrutural, desenvolvidos atualmente nessa Tese de Doutorado, a qual é dedicada às espécies *Discaria americana* Gilles and Hooker e *Scutia buxifolia* pertencentes à família Rhamnaceae, sendo encontrada em formações vegetais nativas do Rio Grande do Sul. Esta família é amplamente empregada no tratamento de várias enfermidades tais como: disenteria, agente antitérmico, pressão alta e alguns tipos de infecções ((DAHMER, 2013), (MALDANER, 2005)).

A espécie *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. Dela 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 (GIACOMELLI, 2005). Já a espécie *Scutia buxifolia* é conhecida como coronilha, espinho de touro, canela-de-espinho, laranjeira do mato. É utilizada na medicina popular como cardiotônico através da infusão da casca do caule (MALDANER, 2010).

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.

2 OBJETIVOS

Neste trabalho de análise fitoquímica das cascas da raiz da espécie *Discaria americana* e das cascas do caule da espécie *Scutia buxifolia* pretende-se:

- Realizar a extração das cascas da raiz de *Discaria americana* coletadas nos municípios de São Sepé e Santana do Livramento, RS, e das cascas do caule de *Scutia buxifolia* coletadas em São Sepé, Santana do Livramento, Caçapava do Sul e Lavras do Sul, RS;
- Isolar e identificar os metabólitos secundários presentes nas cascas do caule dessas plantas, fazendo uso de técnicas espectroscópicas uni e bidimensionais, como RMN de ^1H e ^{13}C , COSY, DEPT 135, HMQC, HETCOR, HMBC, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e difração de raios X;
- Realizar ensaios biológicos para a determinação da atividade antimicrobiana dos metabólitos isolados das espécies;
- Traçar um perfil cromatográfico dos compostos isolados para avaliar e quantificar essas substâncias em relação à sazonalidade e local de coleta da planta;

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 FAMÍLIA RHAMNACEAE

Comumente encontrada nas regiões tropicais e subtropicais, a família Rhamnaceae é formada por plantas floridas, principalmente árvores, arbustos, algumas videiras e uma erva. Consiste em uma família de aproximadamente 50 gêneros e 900 espécies (ALARCÓN e CESPEDES, 2015). Esta família é representada por 13 gêneros e 48 espécies, no Brasil, sendo distribuída em todos os ecossistemas, principalmente em matas, caatinga e restinga (LIMA e GIULIETTI, 2005).

Podemos encontrar, no Rio Grande do Sul, 8 dos 13 gêneros e 9 das 48 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 (SANTOS, 2008).

Plantas da família Rhamnaceae são utilizadas na medicina popular (folhas, caule, sementes e raízes) para tratar enfermidades como inflamações, febre, insônia, aliviar a dor, convulsões e como antivirais (ALARCÓN e CESPEDES, 2015). Seus principais metabólitos secundários são os alcaloides ciclopeptídicos os quais possuem importantes atividades biológicas, podendo atuar como inseticidas, sedativos, antimicrobianos, antiplasmódicos e antinoceptivos (MALDANER, MARANGON, *et al.*, 2011). Dentre as espécies pertencentes à esta família estão a *Discaria americana* e *Scutia buxifolia*, objetos deste estudo.

3.2 *Discaria americana*

Conhecida popularmente como brusca, quina-do-campo, quina-do-Brasil ou quina-do-Rio-Grande, a espécie *Discaria americana* (Figura 1), é utilizada na medicina popular (casca da raiz) como antitérmica, para o tratamento de doenças de pele, males estomacais, controle do diabetes e como tônico sob a forma de chás e infusões sendo descrita pela primeira na literatura em 1889 (GIACOMELLI, 2005), (SCARPA, ROSSO e ANCONATANI, 2016)).

Figura 1: *Discaria americana* Gilles and Hooker



Fonte: Janice Dahmer

3.3 *Scutia buxifolia*

Nativa da região sul da América do Sul, a espécie *Scutia buxifolia* (Figura 2) pode ser vista no Rio Grande do Sul (Brasil), Argentina e também no Uruguai. Suas cascas do caule são utilizadas na medicina popular como cardiotônica, diurética, anti-hipertensiva. É conhecida popularmente como coronilha, espinho de touro, canela-de-espinho e laranjeira do mato ((Plantas que Curam), (MALDANER, 2010)).

Figura 2: *Scutia buxifolia* Reissek



Fonte: MOLZ, 2009

3.4 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

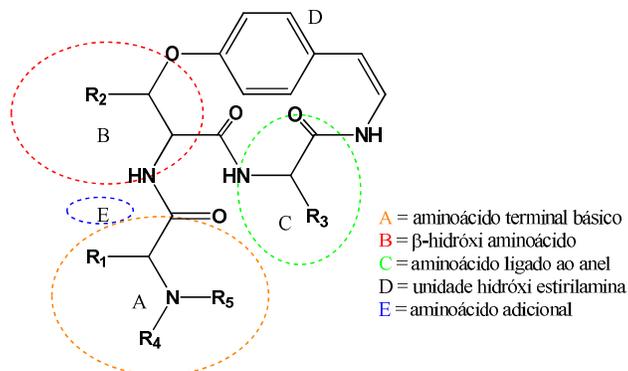
3.4.1 Alcaloides

São compostos nitrogenados que podem apresentar caráter básico, neutro ou ácido (alcaloides quaternários). Podem ser obtidos de plantas, animais, fungos e organismos marinhos. Uma das definições mais aceitas é de Pelletier que define o alcaloide como sendo uma substância orgânica cíclica contendo nitrogênio com estado de oxidação negativo o qual tem uma distribuição entre os organismos vivos, limitada (KLEIN-JÚNIOR e HENRIQUES, 2017).

3.4.1.1 Alcaloides ciclopeptídicos

Largamente distribuídos entre as espécies da família Rhamnaceae, os alcaloides ciclopeptídicos são bases poliamídicas cuja estrutura do anel macro cíclico é composta por uma unidade hidróxi estirilamina, um aminoácido e um β -hidróxi aminoácido os quais são substituídos por uma ou duas unidades de aminoácidos adicionais (Figura 3) (MOSTARDEIRO, ILHA, *et al.*, 2013; CARO, OLIVEIRA, *et al.*, 2012). São classificados em treze, quatorze e quinze membros, conforme o número de átomos que compõem o macro ciclo. Dentre estas classes, a que tem maior representatividade de alcaloides isolados é a de quatorze membros (MALDANER, 2010; TUENTER, EXARCHOU, *et al.*, 2016).

Figura 3: Estrutura geral dos alcaloides ciclopeptídicos



Fonte: MALDANER, 2010

Além dos alcaloides ciclopeptídicos *sensu stricto*, também há relatos de alcaloides peptídeos lineares, os quais possuem seu anel macrocíclico aberto, e os ciclopeptídeos neutros que se diferenciam dos alcaloides ciclopeptídicos pela ausência da unidade básica *N,N*-dimetil ou *N*-metil (MALDANER, 2010).

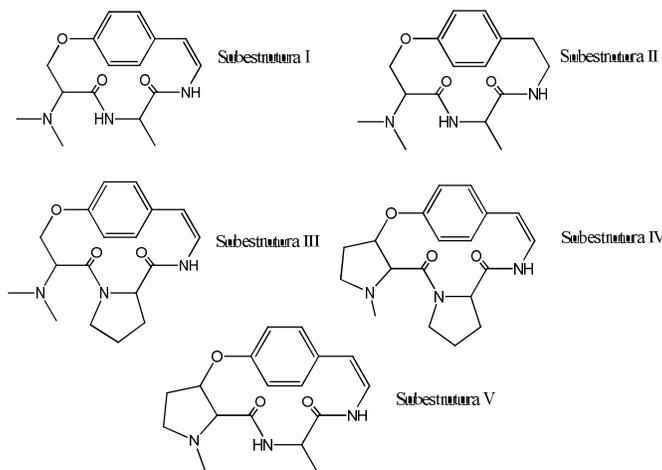
Segundo ALARCÓN e CESPEDES (2015), até 2009 cerca de 455 ciclopeptídeos foram isolados de plantas distribuídas em 26 famílias, 65 gêneros e 120 espécies dentre as quais podemos destacar as famílias Rhamnaceae, Acanthaceae, Malvaceae, Phyllanthaceae e Rubiaceae (TUENTER, EXARCHOU, *et al.*, 2016).

Estes compostos são amplamente estudados devido as suas propriedades farmacológicas e químicas. As principais atividades biológicas descritas na literatura são analgesia, anticonvulsivante, tranquilizante, antinoceptiva, antimicrobiana, antifúngica (TUENTER, EXARCHOU, *et al.*, 2016).

3.4.1.1.1 Alcaloides ciclopeptídicos de 14 membros

Os alcaloides ciclopeptídicos de 14 membros são caracterizados de acordo com o anel macrocíclico. Segundo El-Seedi e colaboradores (2007), estes alcaloides podem ser subdivididos em 5 subtipos estruturais: I (frangulanina, integerrina e scutianina-A), II (pandamina e himenocardina), III (anorladianina), IV (amfibina-F com prolina), V (amfibrinas-B e -F (sem prolina)) representados na Figura 4.

Figura 4: Subtipos estruturais dos alcaloides ciclopeptídicos

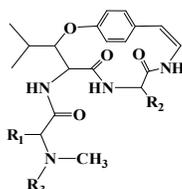


Fonte: EL-SEEDI, ZAHRA, *et al.*, 2007.

3.4.1.1.2 Alcaloides Ciclopeptídicos isolados de *Scutia buxifolia* e *Discaria americana*

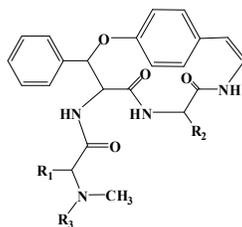
As espécies *Discaria americana* e *Scutia buxifolia* são conhecidas por apresentarem em suas composições químicas alcaloides ciclopeptídicos. Segundo a literatura, até o momento foram isolados e identificados 20 alcaloides ciclopeptídicos da espécie *Discaria americana* e 19 da espécie *Scutia buxifolia* os quais estão listados nas Tabelas 1, 2, 3, 4 e 5 (MOREL, MALDANER e ILHA, 2009). Após anos de estudos de ambas as espécies, foi possível verificar que estes compostos não são produzidos regradamente.

Tabela 1: Alcaloides ciclopeptídicos do tipo 4(14)-Frangulanina.



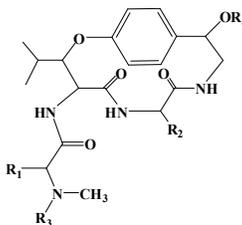
Alcaloide	R ₁	R ₂	R ₃
(47) Adouetina Y'	CH ₂ C ₆ H ₅	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH ₃
(53) Discarina A	CH ₂ C ₈ H ₆ N	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH ₃
(42) Discarina B	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH ₂ C ₈ H ₆ N	CH ₃
(54) Discarina E	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH ₃
(55) Discarina F	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH ₃
(46) Frangufolina	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	CH ₃
(45) Frangulanina	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	CH ₃
(56) Discarina I	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH ₂ C ₈ H ₆ N	H
(57) Discarina X	CH ₂ C ₈ H ₆ N	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	CH ₃
(58) Franganina	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	CH ₃
(59) Scutianina B	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₃
(60) Scutianina C	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₃
(61) Scutianina D	CH ₂ C ₆ H ₅	CH(OH)C ₆ H ₅	CH ₃
(62) Scutianina E	CH ₂ C ₆ H ₅	CH(OH)C ₆ H ₅	CH ₃
(63) Scutianina G	CH ₂ C ₆ H ₅	CH(OH)C ₆ H ₅	CH ₃
(64) Scutianina J	CH(OH)C ₆ H ₅	CH(OH)C ₆ H ₅	CH ₃
(65) Scutianina K	CH ₂ C ₆ H ₅	CH(OH)C ₆ H ₅	CH ₃
(50) Scutianina P	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH(OH)C ₆ H ₅	CH ₃
(66) Scutianina O	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH(OH)C ₆ H ₅	CH ₃
(48) Scutianina N	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH(OH)C ₆ H ₅	CH ₃

Tabela 2: Alcaloides ciclopeptídicos do tipo 4(14)-Integerrina.



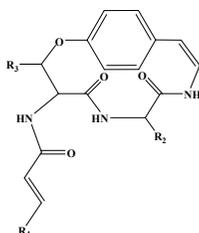
Alcaloide	R ₁	R ₂	R ₃
(61) Adouetina Y	CH ₂ C ₆ H ₅	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH ₃
(41) Discarina C	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	CH ₃
(43) Discarina D	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₃
(62) Scutianina L	CH ₂ C ₆ H ₅	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH ₃
(63) Scutianina M	CH ₂ C ₆ H ₅	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	H

Tabela 3: Alcaloides ciclopeptídicos do tipo 4(14)-Pandamina.



Alcaloide	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
(64) Discarina L	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	CH ₃	H
(65) Discarina G	CH ₂ C ₆ H ₅	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH ₃	H
(66) Discarina H	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	CH ₃	H
(67) Discarina K	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH ₂ C ₈ H ₆ N	CH ₃	H

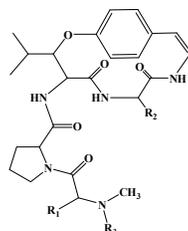
Tabela 4: Alcaloides ciclopeptídicos do tipo neutro.



Alcaloide	R ₁	R ₂	R ₃
(44) Discareno C	CH(CH ₃) ₂	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	C ₆ H ₅
(68) Discareno D	CH(CH ₃) ₂	CH ₂ C ₆ H ₅	C ₆ H ₅
(69) Discarina M	CH(CH ₃) ₂	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	CH(CH ₃) ₂
(70) Discarina N	C ₆ H ₅	CH(OH)C ₆ H ₅	CH(CH ₃) ₂
(71) Scutianeno C	C ₆ H ₅	CH(OH)C ₆ H ₅	CH(CH ₃) ₂

(13) Scutianeno X	C ₆ H ₅	CH(OH)(CH ₃) ₂	C ₆ H ₅
(72) Scutianeno Y	C ₆ H ₅	CH(OH)(CH ₃) ₂	C ₆ H ₅
(73) Scutianeno W	C ₆ H ₅	CH(OH)(CH ₃) ₂	C ₆ H ₅
(15) Scutianeno Z	C ₆ H ₅	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	C ₆ H ₅

Tabela 5: Alcaloides ciclopeptídicos do tipo 5(14)-Scutianina.



Alcaloide	R ₁	R ₂	R ₃
(74) Scutianina A	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₃
(75) Scutianina F	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₂ C ₆ H ₅	H

A espécie *Discaria americana* tem sido estudada desde 1978 pelo grupo NPPN. Ao longo deste tempo foram notáveis algumas mudanças na composição dos alcaloides ciclopeptídicos presentes nesta espécie.

O primeiro relato de isolamento e identificação dos alcaloides ciclopeptídicos desta planta, por integrantes do grupo NPPN, foi em 1978 (MOREL, 1978) onde foram isoladas as Discarinas -X (58) e -B (42). Em 1983, foram isoladas as Discarinas -C (41) e -D (43), Adoutina Y' (47), Frangufolina (46) e Franganina (58) (DIGEL, MOREL, *et al.*, 1983). No ano seguinte, 1984, foram isoladas as Discarinas -H (66), -G (65) e -F (56). Um pouco depois, em 1985, foi descoberto um novo alcaloide ciclopeptídico, Discarina -E (55) além de Franganina (58), isolado anteriormente. Após um curto período de investigação, em 1986, foi possível a identificação da Discarina -I (57) e o isolamento de Discarina -B (42) (HENNIG, MOREL e VOELTER, 1986). Em nova pesquisa realizada em 1987 foram isolados o já conhecido alcaloide ciclopeptídico Franganina (58) e o novo alcaloide identificado como Discarina -K (67) (VOELTER, F, *et al.*, 1987).

Até 1993 não houve relato da descoberta de novos alcaloides sendo isolado apenas a Discarina -B (42) (MACHADO, ZANATTA e MOREL, 1993). Dois anos depois, em 1995, em uma nova pesquisa, foi identificado um novo alcaloide ciclopeptídico Discarina -L (64) (MOREL, MACHADO e WESSJOHANN, 1995).

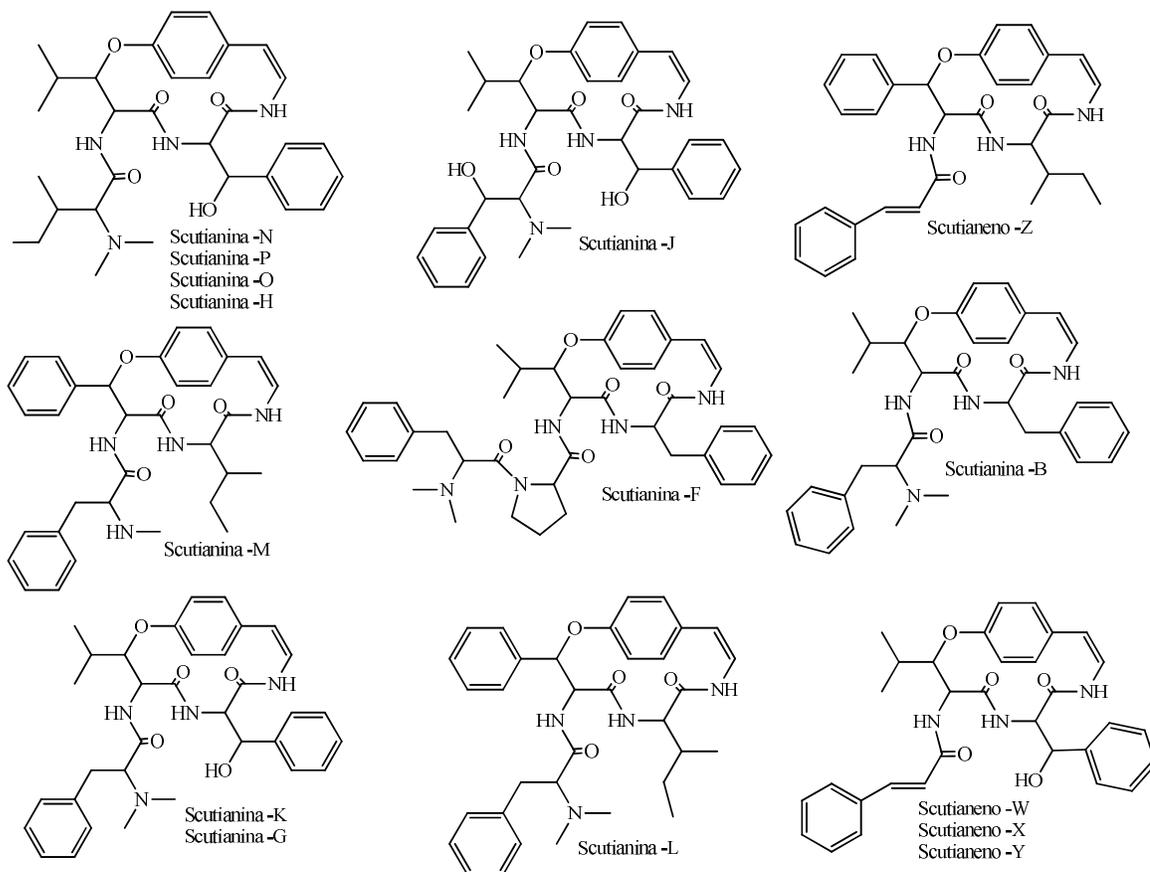
Desde 1995, somente em 2001 foram isolados alguns alcaloides ciclopeptídicos conhecidos como Adoutina Y' (47), Adoutina Y (61), Franganina (58), as Discarinas -C (41), -D (43) e -B (42) e os novos ciclopeptídeos neutros Discareno -C (44) e -D (68) (GIACOMELLI, MISSAU, *et al.*, 2001). Novamente, em 2004, foram identificados dois novos compostos, os ciclopeptídeos neutros Discarina -M (69) e -N (70), além dos conhecidos Adoutina Y' (47), Adoutina Y (61), Franganina (58), Frangulanina (45), as Discarinas -C (41), -D (43), -A (53) e -B (42) (GIACOMELLI, MALDANER, *et al.*, 2004).

Com base nos dados descritos acima é possível verificar que com o passar dos anos alguns alcaloides ciclopeptídicos não foram mais encontrados como é o caso das Discarinas -X (58), -H (66), -G (65), -F (56), -I (57), -K (67) e -L (64). No entanto, alguns alcaloides como, Adoutina Y' (47), Adoutina Y (61), Franganina (58), as Discarinas -C (41), -D (43) e -B (42) e -A (53) foram novamente identificadas. Em minha dissertação de mestrado, 2013, pude isolar as Discarinas -C (41) e -B (44) além do Discareno -C (44), da Frangulanina (45) e Frangufolina (46) (DAHMER, 2013).

Durante anos de pesquisa de *Scutia buxifolia* foi possível observar certa inconsistência no conteúdo dos alcaloides ciclopeptídicos. A cada coleta realizada foi verificado algumas diferenças na composição alcaloidal. Em 1979 foram isolados e identificados os alcaloides Scutianinas -B, -C, -D, -E e -H (MOREL, BRAVO, *et al.*, 1979). Estes alcaloides, Scutianinas B-E, e um novo alcaloide Scutianina -J foram isolados em uma nova coleção em 1995 (MENEZES, MOSTARDEIRO, *et al.*, 1995). No entanto, Scutianina -H não foi isolado. Em 1998, foram isolados novamente Scutianinas B-E além de dois novos alcaloides, Scutianinas -K e -L (MOREL, MACHADO, *et al.*, 1998). Em 2005, porém, foram identificados os alcaloides ciclopeptídicos Scutianinas -F, -M, o ciclopeptídeo neutro Scutianeno -D e os já conhecidos Scutianinas B-E (MOREL, MALDANER, *et al.*, 2005). Já em 2011, foram descobertos quatro novos alcaloides neutros, Scutianenos -X, -Y, -Z, -W, bem como os isolados anteriormente, Scutianinas B-E (MALDANER, MARANGON, *et al.*, 2011). Por fim, em 2013 foram isolados três compostos com a mesma fórmula molecular, mesma composição química e mesma conectividade entre suas unidades de aminoácidos sugerindo que são diastereoisômeros, as Scutianinas -O, -P e -N, sendo que além destes, somente Scutianina C foi isolada (MARANGON, 2014). Porém, vale ressaltar que estes compostos citados anteriormente poderiam estar presentes nas frações obtidas das coletas, mas em pouca quantidade e, portanto, não teriam sido purificados e

identificados. Na Figura 12 estão listados os alcaloides citados anteriormente com suas respectivas estruturas.

Figura 5: Alcaloides ciclopeptídicos e ciclopeptídeos neutros de *Scutia buxifolia*.

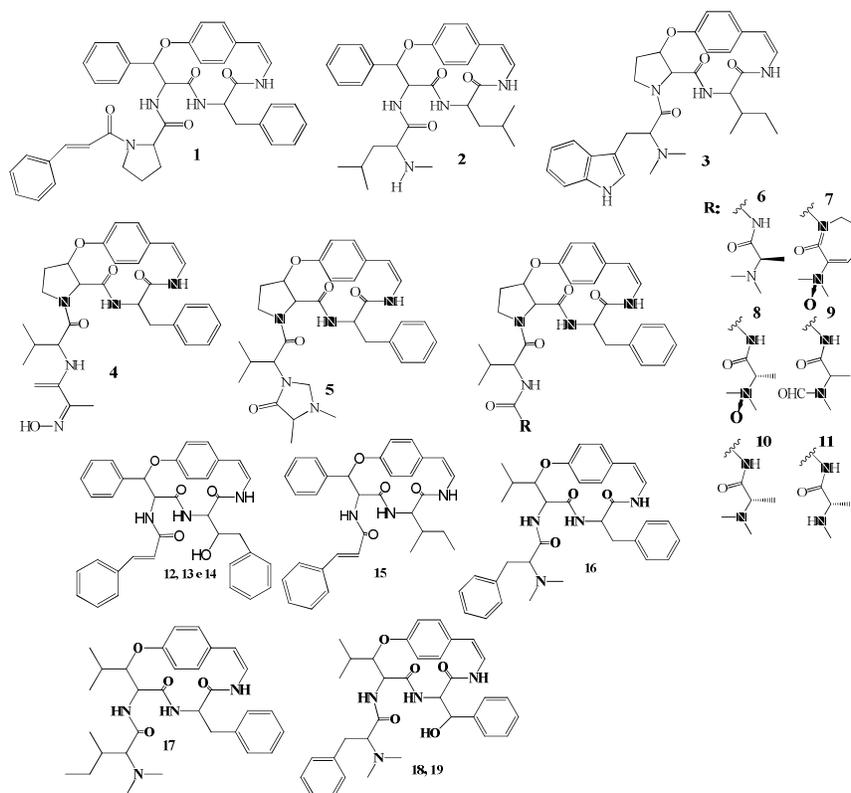


3.4.1.2 Alcaloides ciclopeptídicos de 14 membros isolados entre 2009 e 2018

Desde 2009, trinta e sete alcaloides ciclopeptídicos de 14 membros foram isolados, dos quais somente dezessete estruturas são novas, além de, oito novos ciclopeptídeos neutros. Oliveira *et al.*(2009), isolaram um novo ciclopeptídeo neutro, a Amaiouine (**1**) das folhas da espécie *Amaiouine guianensis*. Em 2011, Panseeta *et al.* determinaram a estrutura de um novo alcaloide ciclopeptídico Mauritina-L (**2**) além do conhecido Hensina-A (**3**) da espécie *Ziziphus mauritiana*. Ainda em 2011, foram isolados seis novos compostos Apetalina-A (**4**), -B (**5**), -C (**6**) Epimauritina-A (**7**), Epimauritina -A N-óxido (**8**) e Mauritina-A N-óxido (**9**) da espécie *Ziziphus apetalata*

(HAN, JI, *et al.*, 2011). Neste mesmo estudo foram isolados também os alcaloides ciclopeptídicos já conhecidos Mauritina-A (**10**) e -F (**11**). Maldaner *et al.*, (2011) isolaram quatro novos ciclopeptídeos neutros Scutianeno E (**12**), 3,4,28-tris-epi-scutianeno E (**13**), 28-epi-scutianeno E (**14**) e o Scutianeno L (**15**) da *Scutia buxifolia* Reissek. Além destes, foram encontradas as Scutianinas-B (**16**), -C (**17**), -D (**18**) e -E (**19**), Figura 5.

Figura 6: Estruturas dos alcaloides ciclopeptídicos e ciclopeptídeo neutro isolados entre 2009 e 2011.

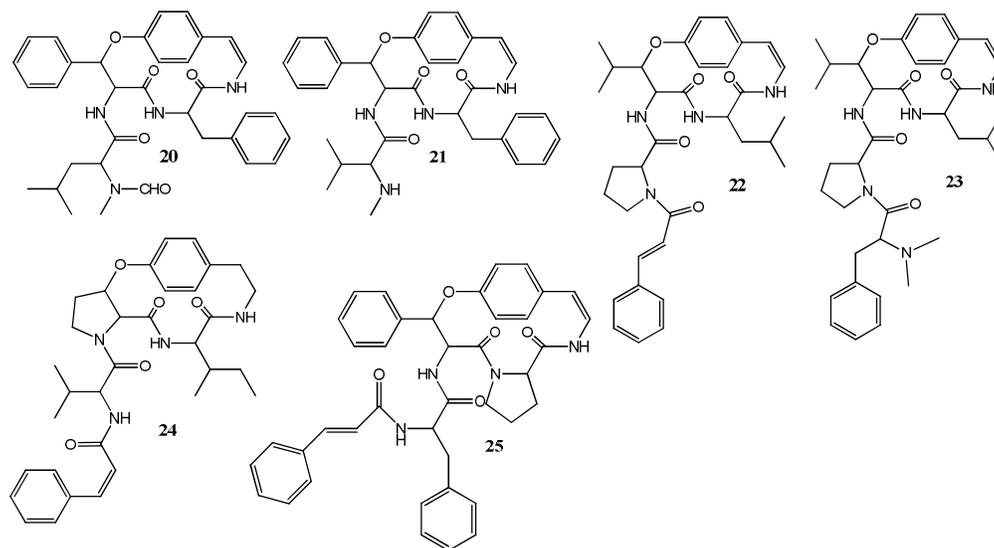


Fonte: Janice Dahmer

No ano seguinte, Pandey *et al.*, (2012) estudaram a espécie *Ziziphus xylopira* e identificaram dois novos alcaloides ciclopeptídicos de 14 membros, Xilopirina-G (**20**) e -H (**21**), ambos do tipo integerrina. Neste mesmo ano, Zhang *et al.*, (2012), determinaram a estrutura de um ciclopeptídeo neutro de estrutura desconhecida Nagitides-A (**22**) e um alcaloide ciclopeptídico Nagitides-B (**23**) das cascas do caule de *Podocarpus nagi*. Já da espécie *Ziziphus oxyphylla* Edgew foram descobertos, das

cascas do caule e raízes, dois novos ciclopeptídeos neutros Oxifillina-B (**24**) e -C (**25**) (KALEEM, NISAR, *et al.*, 2012), Figura 6.

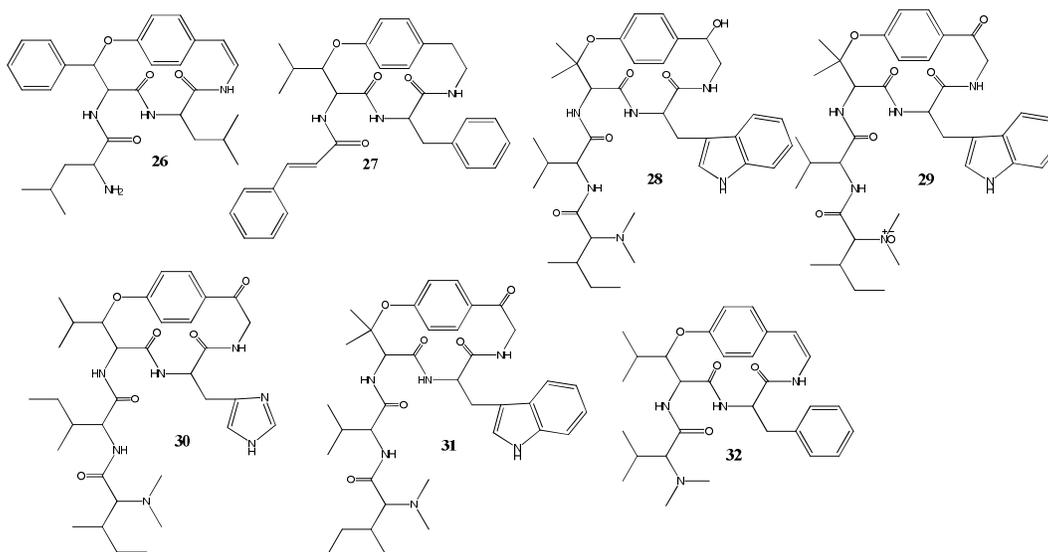
Figura 7: Estruturas dos alcalóides ciclopeptídicos e ciclopeptídeos neutros isolados em 2012.



Fonte: Janice Dahmer

Em 2013, somente foi isolado um alcalóide ciclopeptídico da espécie *Ziziphus rugosa*, o Xilopirina-F (**26**) mas de estrutura conhecida (SINGH, RAGHUBANSHI e YADAVA, 2013). Já em 2015, foi determinada a estrutura somente de um novo ciclopeptídeo neutro, Justicianeno-A (**27**) de *Justicia procumbens* (HONG, CHEN, *et al.*, 2015). O ano de 2016 foi mais produtivo pois foram isolados tres novos alcalóides ciclopeptídicos: Himenocardinol (**28**), Himenocardina N-óxido (**29**), Himenocardina-H (**30**), além de, um já conhecido Himenocardina (**31**) (TUENTER, EXARCHOU, *et al.*, 2016). Neste mesmo ano, foi determinada a estrutura de um novo alcalóide ciclopeptídico, Ixorina (**32**), da espécie *Ixorina brevifolia* (MEDINA, SCHUQUEL, *et al.*, 2016), Figura 7.

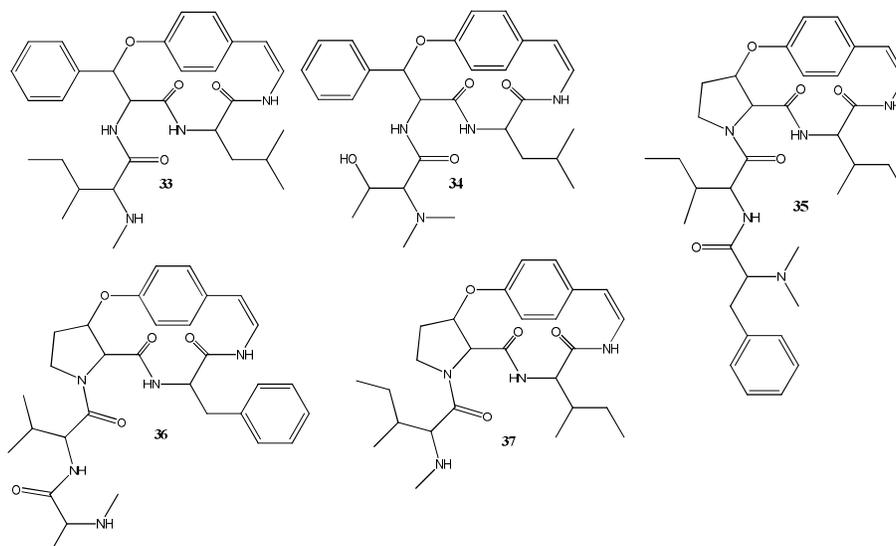
Figura 8: Estruturas dos alcaloides ciclopeptídicos e ciclopeptídeos neutros isolados entre 2013 e 2016.



Fonte: Janice Dahmer

Tuenter *et al.*, em 2017, isolaram quatro alcaloides ciclopeptídicos conhecidos, Nummularina-D (33), -E (34), Amfibina-D (35), Mauritina-F (36) e um novo composto Nummularina-U (37), Figura 8.

Figura 9: Estruturas dos alcaloides ciclopeptídicos e ciclopeptídeos neutros isolados em 2017.

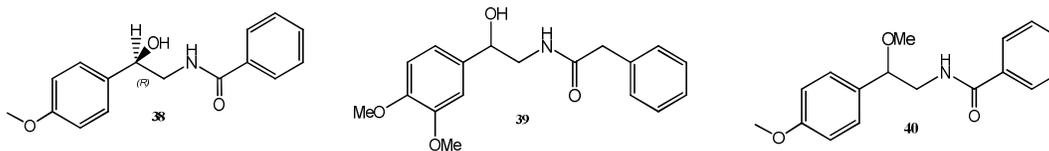


Fonte: Janice Dahmer

3.4.2 Amidas

Amidas são substâncias básicas, como os alcaloides, que revelam positivamente para o reagente de Dragendorff. São normalmente encontradas nas espécies da família Rutaceae. As mais conhecidas são a (*R*)-(-)-Tembamida (**38**), *O*-Metilbalsamida (**39**) e a *O*-Metiltembamida (**40**) (AGUIRRE, SALGADO-RODRÍGUEZ, *et al.*, 2001) (DE MOURA, MOREL, *et al.*, 2002), Figura 9.

Figura 10: Estruturas das β -hidroxiamidas



Fonte: Janice Dahmer

3.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Há, nos últimos anos, um aumento no interesse na pesquisa e no desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos a fim de combater a resistência microbiana através de várias fontes. Na década de 1960, quando quase todos os grupos de antibióticos importantes (tetraciclina, cefalosporinas, aminoglicosídeos e macrólidos) foram descobertos, os principais problemas de doenças infecciosas foram resolvidos. Atualmente, estes compostos estão no limiar de perder sua eficácia devido ao aumento da resistência microbiana. Essa possível perda do poder bactericida e bacteriostático terá um impacto considerável pois muitas bactérias estão adquirindo resistência a múltiplos fármacos e, dessa forma, tornou-se uma preocupação global para a saúde pública (BALOUIRI, SADIKI e IBNSOUDA, 2016).

Com isso, a busca por novas fontes de antibióticos é de suma importância. Neste contexto, a pesquisa de produtos naturais ainda é uma das principais fontes de novas moléculas de substâncias bioativas, os chamados de metabólitos secundários. Derivados de micro-organismos eucarióticos, de bactérias procarióticas, de plantas e de inúmeros organismos animais, eles ocupam a maior parte dos antimicrobianos encontrados até o momento. Com uma grande variedade de substâncias complexas e

estruturalmente diversificada. A investigação de extratos de plantas, óleos essenciais, compostos puros isolados ou até mesmo moléculas sintetizadas tem concentrado muitos pesquisadores a descobrir novos potenciais agentes antimicrobianos (BALOUIRI, SADIKI e IBNSOUDA, 2016) (BROWN e WRIGHT, 2016).

3.6 CLAE - ANÁLISE QUANTITATIVA

Utilizada como técnica de separação em várias áreas do conhecimento, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) evoluiu ao longo dos anos permitindo um significativo avanço na análise de substâncias químicas de interesse nas áreas de saúde, transporte, alimentos e esportes. Entre 1903 e 1906 a cromatografia foi consolidada como técnica científica, quando foram divulgados os resultados de pesquisas sistemáticas sobre o assunto (LANÇAS, 2009).

A cromatografia é um processo físico que se fundamenta na separação de compostos utilizando duas fases, sendo que uma é fixa (fase estacionária) e a outra é um fluido que percola por meio da fase estacionária (fase móvel). Ela é classificada de acordo com o mecanismo de separação, quanto à técnica empregada e em relação ao tipo de fase móvel (LANÇAS, 2009). Está dividida em várias categorias conforme o mecanismo de separação: cromatografia de adsorção, de partição, de troca iônica, de exclusão molecular, de afinidade e quiral (HARRIS e LUCY, 2017).

As plantas são uma importante fonte de compostos bioativos para as mais variadas áreas, principalmente a de produtos naturais que está diretamente ligada à medicina popular. Dessa forma, a avaliação do perfil químico de extratos brutos vegetais tem se mostrado um desafio devido à grande diversidade de classes de compostos que encontramos nas plantas. São eles, flavonoides, terpenos, taninos, saponinas, alcaloides, dentre outros. Porém, com o avanço tecnológico das técnicas analíticas está sendo possível a identificação e a quantificação destes metabólitos (NICULAU, DE FREITAS, *et al.*, 2016).

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS GERAIS

4.1.1 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, operado a 400,13 MHz para ^1H e 100,62 MHz para ^{13}C do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria. O preparo das amostras foi feito com clorofórmio deuterado (CDCl_3) e DMSO deuterado (DMSO- d_6).

Os registros 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) e o DMSO- d_6 (39,43).

4.1.2 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, cedido pelo Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria.

4.1.3 Materiais e Métodos Cromatográficos

Para as colunas cromatográficas (CC) foi utilizada sílica gel (Silicycle), 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 (Macherey-Nagel), 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 alcaloides. 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 os seguintes:

- ✓ Clorofórmio, metanol (CHCl₃:MeOH 2%, 3%, 5%, 6%, 8%, 10%, 30%, 1:1);
- ✓ Éter de petróleo, Acetato de Etila (56:44, 60:40);
- ✓ Éter de petróleo, Acetato de Etila, Metanol (60:40:1, 50:50:2, 40:60:1);
- ✓ Clorofórmio, Éter diisopropílico 5%.

4.1.4 Cromatografia Líquida de alta eficiência (CLAE / HPLC)

4.1.4.1 Condições instrumentais da CLAE

As análises de CLAE foram realizadas em cromatógrafo (AGILENT 1200) com detector DAD (210-380 nm), utilizando-se coluna ZORBAX Eclipse Plus C18 (4,6 x 250 mm; 5µm). Tanto para *Discaria americana* quanto para a *Scutia buxifolia*, foi utilizado como sistema eluente acetonitrila:metanol:água (0,036% TFA) no gradiente: 0 a 25 minutos, 3% acetonitrila (0,036% TFA): 2% metanol: 95% água (0,036% TFA); 25 a 30 minutos, 50% acetonitrila (0,036% TFA): 12% metanol: 38% água (0,036% TFA), 30 a 40 minutos, 65% acetonitrila (0,036% TFA): 15% metanol: 20% água (0,036% TFA), 40 a 50 minutos, 78% acetonitrila (0,036% TFA): 20% metanol: 2% água (0,036% TFA) e 50 a 60 minutos, 3% acetonitrila (0,036% TFA): 2% metanol: 95% água (0,036% TFA) com fluxo de 1mL.min⁻¹, temperatura de 40°C. O volume de injeção foi de 10 µL e a detecção foi em 260 nm. Os compostos foram identificados por comparação com os tempos de retenção dos padrões.

4.1.4.2 Preparação das amostras

As frações etéreas básicas foram obtidas conforme a Figura 10 (pág. 40). Para a análise na CLAE todas as frações foram solubilizadas em metanol grau HPLC, filtradas em filtro de membrana antes da injeção. As soluções foram preparadas em balões volumétricos de 10 mL para ambas as espécies.

4.1.5 Estudos de linearidade

Para as soluções dos padrões os compostos foram solubilizados em metanol e preparados cinco soluções com diferentes concentrações. Cada concentração foi analisada em triplicata usando as mesmas condições descritas anteriormente. Para a *Discaria americana* foram utilizados os padrões: Discarina B (10,1 mg), Discarina C (7,2 mg), Discarina D (6,1 mg), Frangulanina (7,4 mg), Frangufolina (5,2 mg), Adouetina Y' (2,4 mg) e Discareno C (3,4 mg). Apenas a solução estoque da Discarina B foi preparada em balões volumétricos 10 mL, os padrões restantes foram preparados soluções de 5 mL.

Os padrões para *Scutia buxifolia*, foram Scutianina-P (6,2 mg), -N (6,3 mg), -Q (6,7 mg), Tembamida (11,2 mg), Scutianeno-X (6,0 mg), -Z (4,4 mg) e -Y (6,2 mg), Aralionina B (5,7 mg). As soluções foram preparadas em balões volumétricos de 5 e 10 mL e em cinco diferentes concentrações as quais foram analisadas em triplicata utilizando as mesmas condições.

4.1.6 Polarímetro

A rotação específica foi medida em um Polarímetro AUTOPOL I, com Lâmpada de Tungstênio com precisão de 0,001°, em cubeta de 100mm de comprimento utilizado metanol como solvente.

4.1.7 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 ($\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$).

4.2 *Discaria americana* Gilles and Hocker

4.2.1 Extração, Fracionamento e Cromatografia

A espécie *Discaria americana* foi coletada nos municípios de São Sepé e Santana do Livramento em diferentes épocas do ano a fim de poder traçar seu perfil

cromatográfico qualitativo e verificar as possíveis variações dos seus metabólitos secundários levando em conta os aspectos de sazonalidade e locais de coleta. A identificação dos materiais foi feita através de comparação com amostra já existente no Herbário do Departamento de Botânica da UFSM, sob o número SMDB 2829.

Para cada uma das coletas foi realizado a separação da parte lenhosa da casca da raiz, sendo que todo o material vegetal, em separado, 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 de cada coleta foram moídas em moinho de Wiley obtendo, assim, a massa seca moída (MSM). Cada uma das MSM foi submetida à extração com aparelho de Soxhlet, 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 (EB), caracterizado como um resíduo escuro viscoso avermelhado.

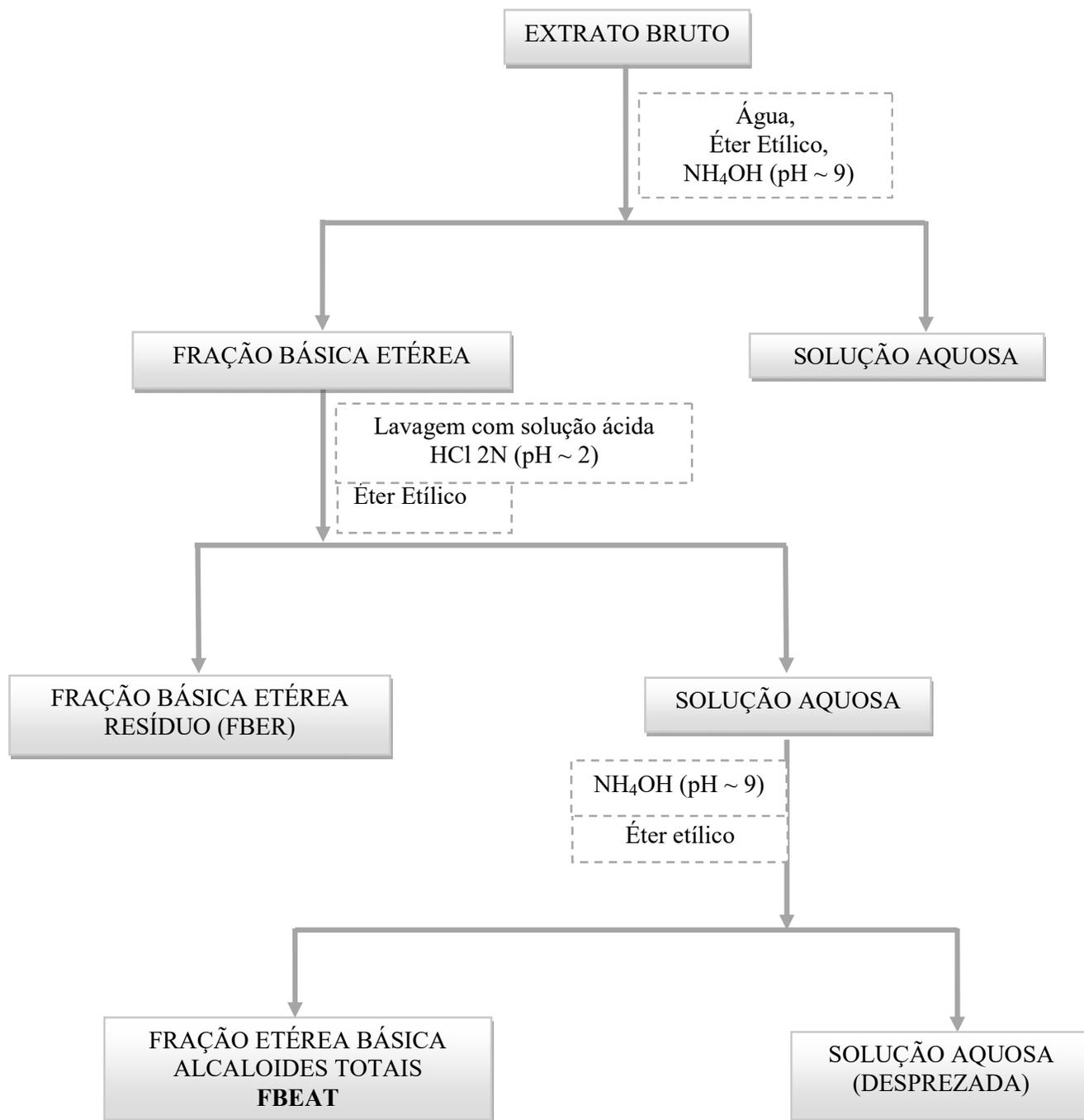
O rendimento da MSM e do EB de cada coleta está listado na tabela abaixo (Tabela 6).

Tabela 6: Rendimento da MSM e do EB obtidos das coletas de *Discaria americana*

Local de Coleta/Mês/Ano	Massa Seca Moída (MSM)	Extrato Bruto (EB)
São Sepé 05/11	1.756,7g	402,9g
São Sepé 08/13	8.387,6g	1.122,23g
Santana do Livramento 04/11	1.050,00g	311,2g
Santana do Livramento 09/11	1.013,5g	217,15g

O processo de fracionamento do extrato bruto de cada uma das coletas foi realizado em três etapas, as quais estão exemplificadas na Figura 10. A primeira etapa do fracionamento ocorreu com a diluição em água do extrato bruto, seguida da adição de NH₄OH (pH ~ 9) e posterior extração com o solvente éter dietílico para obter a fração básica etérea (FBE). Na segunda etapa, a FEB foi submetida a uma lavagem com solução ácida de HCl (2N) (pH ~1,5) em uma ampola de separação, onde foi vertida exaustivamente, a fim de esgotar, da fase orgânica, os alcaloides. Na terceira etapa, a solução aquosa ácida foi basificada com NH₄OH (pH ~ 9) para, enfim, fazer a extração com éter dietílico e obter a fração chamada de alcaloides totais (FBEAT). A fase orgânica da primeira etapa foi chamada de Resíduo (FBER).

Figura 11: Fracionamento ácido-base



A fração alcaloides totais da coleta de São Sepé 08/13 não foi trabalhada pois sua composição química era similar as outras coletas e já havia bastante material para trabalhar. As demais frações foram analisadas por CCD, utilizando vários sistemas solventes, lâmpadas UV₂₅₄ e UV_{365nm}, reagente de Drangendorff e ácido sulfúrico/etanol

(10:30 v:v). Assim, foi observado que as frações básicas etéreas alcaloides totais continham manchas com Rfs semelhantes, desta forma, foram reunidas, **6,1409 g**, e submetidas à cromatografia em coluna, na qual foi utilizada sílica gel 60H (230-400 mesh) como adsorvente e Clorofórmio-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 7. Essas frações com misturas de substâncias foram submetidas a novos processos de purificação, através de cromatografia em coluna (sílica gel, 230-400 mesh) ou placas preparativas.

Tabela 7: Cromatografia das frações Alcaloides Totais (FBEAT)

Fração	Sistema Solvente	Peso (g)	Substância
1-17 (I)	CHCl ₃	0,3254	mistura de substâncias
18-27 (II)	CHCl ₃ :MeOH (1%)	1,0591	A28, A08, A26
28-57 (III)	CHCl ₃ :MeOH (1%)	3,4982	A28, A19, A10
58-62 (IV)	CHCl ₃ :MeOH (2%)	0,5807	A28, A29
63-82 (V)	CHCl ₃ :MeOH (3%)	0,8651	A10, A08, A26, A28
83-97 (VI)	CHCl ₃ :MeOH (5%)	1,1016	mistura de substâncias
98-99 (VII)	CHCl ₃ :MeOH (10%)	1,9753	mistura de substâncias
100-104 (VII)	CHCl ₃ :MeOH (30%)	0,8183	mistura de substâncias

4.3 *Scutia buxifolia*

4.3.1 Extração, Fracionamento e Cromatografia

As cascas do caule da espécie *Scutia buxifolia* foram coletadas nas cidades de São Sepé, Santana do Livramento, Caçapava do Sul e Lavras, RS. A identificação do material coletado foi realizada através de comparação com amostra já existente no Herbário do Departamento de Botânica – UFSM, sob número SMDB 3296. Estas coletas foram realizadas em diferentes meses do ano para verificar o perfil cromatográfico quantitativo levando em consideração o local de coleta e a sazonalidade. Os dados de cada coleta estão listados na Tabela 8.

As cascas do caule, de cada coleta em separado, foram colocadas em estufa, 50°C, a fim de secar e eliminar a possibilidade de proliferação de fungos. Após a secagem, as cascas do caule de cada coleta foram moídas em moinho de Wiley obtendo, assim, a massa seca moída (MSM). Cada uma das MSM foi submetida à extração 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 (EB), caracterizado como um resíduo escuro viscoso avermelhado.

Tabela 8: Rendimento da MSM e do EB obtidos das coletas de *Scutia buxifolia*

Local de Coleta/Mês/Ano	Massa Seca Moída (MSM)	Extrato Bruto (EB)
São Sepé 08/13	1.057,0g	208,5g
Santana do Livramento 06/13	1.230,5g	292,1g
^a Santana do Livramento C/E 09/13	833,6g	113,9g
^a Santana do Livramento S/E 09/13	482,6g	98,1g
^a Caçapava do Sul S/E 10/13	2.841,5g	560,1g
^a Caçapava do Sul C/E 10/13	2.229,9g	515,0g
Lavras do Sul 01/14	1.210,3g	359,3g
Lavras do Sul 07/14	1.397,0g	374,6g
Santana do Livramento 04/14	6.454,4g	1.397,9g

^a = C/E: Com Espinho; S/E: Sem Espinho

O processo de fracionamento do extrato bruto de cada uma das coletas também foi realizado em três etapas, as quais estão exemplificadas na Figura 10. As frações obtidas foram avaliadas por CCD e foi possível verificar que possuíam manchas com Rfs parecidas. Dessa forma, foi decidido reunir todas as frações para poder conseguir um maior rendimento dos compostos isolados uma vez que há perdas no processo cromatográfico e alguns dos compostos obtidos em trabalhos anteriores se encontravam em pouquíssimas concentrações. Além disso, para cada fração obtida foi traçado seu perfil cromatográfico quantitativo (pág. 70) podendo, então, verificar em quais coletas os compostos isolados estão presentes.

As frações reunidas (11,3402g) foram submetidas à cromatografia em coluna (Tabela 9), tendo como fase estacionária sílica gel (230-400 mesh) e clorofórmio –

metanol como sistema eluente, em gradientes de concentrações. As frações coletadas, aproximadamente 100mL, foram analisadas em CCD e as que possuíam Rf's semelhantes foram agrupadas conforme indicado na Tabela 9. As frações foram submetidas a novos processos de purificação por meio de cromatografia em coluna ou placas preparativas.

Tabela 9: Cromatografia da fração Alcaloides Totais (FBEAT)

Fração	Sistema Solvente	Peso (g)	Substância
1-8 (S01)	CHCl ₃	0,4396	MS
9-16 (S02)	CHCl ₃ :MeOH (1%)	3,8792	S10, S02, MS
17-25 (S03)	CHCl ₃ :MeOH (3%)	2,2018	S16, MS
26-33 (S04)	CHCl ₃ :MeOH (5%)	0,8342	S02, S16, MS
34-36 (S05)	CHCl ₃ :MeOH (5%)	0,3319	S01, S17, MS
37-46 (S06)	CHCl ₃ :MeOH (7%)	0,9369	S04, S17, S01, MS
47-51 (S07)	CHCl ₃ :MeOH (15%)	0,4978	S04, S17, S16, MS
52-60 (S08)	CHCl ₃ :MeOH (15%)	0,8826	S16, S17, MS
61-66 (S10)	CHCl ₃ :MeOH (30%)	0,7734	S01, MS
67-68 (S11)	CHCl ₃ :MeOH (30%)	0,1743	S07, S01, S18, MS
69-71 (S12)	CHCl ₃ :MeOH (50%)	0,2583	S18, MS

MS: Mistura de Substâncias

4.4 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA QUANTITATIVA (CLAE / HPLC)

As espécies pertencentes à família Rhamnaceae são amplamente utilizadas na medicina popular, em particular, as espécies *Discaria americana* e *Scutia buxifolia*. Além da composição química destas duas espécies ter intrigado nosso grupo de pesquisa, Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais (NPPN), estas duas plantas são nativas da nossa região o que nos permitiu as monitorar durante alguns anos com o intuito de averiguar não somente seus metabólitos secundários, mas também provar seu uso etnofarmacológico cientificamente.

Os cromatogramas serão analisados quantitativamente com os padrões purificados no nosso grupo de pesquisa por alunos da pós-graduação.

4.4.1 *Discaria americana*

As frações de alcaloides totais das coletas dos municípios de São Sepé e Santana do Livramento, RS, apresentaram algumas variações em sua composição química quando analisadas via Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE/HPLC). Para tanto, foram utilizados os seguintes padrões: Discarina C (**41**), Discarina B (**42**), Discarina D (**43**), Discareno C (**44**), Frangulanina (**45**), Frangufolina (**46**) e Adouetina Y' (**47**). As frações analisadas de alcaloides totais obtidas do fracionamento, descrito anteriormente (Figura 10), são das coletas descritas na Tabela 7.

4.4.2 *Scutia buxifolia*

Os padrões utilizados para a análise da espécie *Scutia buxifolia* foram Scutianina-N (**48**) e -P (**49**), e os Scutianenos -X (**13**), -Z (**15**), além dos compostos isolados pela primeira vez na espécie, Aralionina-B S02 (**50**) e Tembamida S10 (**38**), além do composto com estrutura inédita, S18 (**51**). Foram analisadas as frações de alcaloides totais obtidas do fracionamento descrito anteriormente (Figura 10) das coletas descritas na Tabela 9, das cidades de São Sepé, Santana do Livramento, Caçapava do Sul e Lavras do Sul, RS.

4.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO*

4.5.1 Micro-organismos Utilizados

Os métodos utilizados para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e as concentrações letais mínimas (CLM) foram de micro diluição em caldo padronizados (M7-A6) e (M27-A2) pelo CLSI (NCCLS, 2006; NCCLS, 2002).

Os micro-organismos que foram empregados para a realização da atividade antimicrobiana são cepas referência da American Type Collection (ATCC), constituídos de micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos, Tabela 10.

Tabela 10: Microorganismos indicadores

Característica	Micro-organismo	ATCC
Gram-positivo	<i>Bacillus subtilis</i>	19659
	<i>Enterococcus</i> spp.	6589
	<i>Enterococcus faecalis</i>	19433
	<i>Staphylococcus aureus</i>	25923
	<i>Bacillus cereus</i>	11778
Gram-negativo	<i>Salmonella typhimurium</i>	14028
	<i>Proteus mirabilis</i>	25933
	<i>Escherichia coli</i>	25922
	<i>Pseudomonas aeruginosas</i>	27853
	<i>Shigella flexneri</i>	12022
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	13048
	<i>Morganella morganii</i>	25829
	<i>Shigella sonnei</i>	25931
<i>Enterobacter aerogenes</i>	13048	

4.5.2 Padrões utilizados nos Ensaios Microbiológicos

O padrão utilizado para bactérias, Clorofenicol, foi preparado conforme FDA (FDA, 1991).

4.5.3 Meios de culturas empregados

Os meios foram preparados conforme instruções do fabricante e, esterilizados em autoclave a 121°C, 1 atm, por 45 minutos. As cepas dos micro-organismos indicadores foram armazenadas em geladeira, sendo utilizado meio Ágar Müller-Hinton.

Tabela 11: Meios de cultura

Meio de cultura	Composição	Quantidade (g)
Repique de bactérias		
	Cloreto de sódio	8,0
Meio Ágar nutriente	Extrato de carne	3,0
	Peptona de gelatina	5,0
	Ágar bacteriológico	15,0
Cultivo de bactérias		
	Dextrose	2,5
Meio caldo de caseína de soja	Cloreto de sódio	5,0
	Fosfato dibásico de potássio	2,5
	Peptona de caseína	17,0
	Peptona de soja	3,0

4.5.4 Preparação dos inóculos e Determinação da CIM pelo método de micro diluição

Foram transferidos, com o auxílio de uma alça de platina, culturas dos micro-organismos indicadores para tubos de ensaio contendo 5 mL de solução salina 0,8%. Os inóculos foram padronizados comparando com o tubo padrão 0,5 da escala nefelométrica de McFarland, correspondendo a $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ (Unidades Formadoras de Colônia por mL).

As amostras testadas foram diluídas em meio líquido (1mg/mL) e diluídas novamente em placas de cultura estéreis de 96 poços, nas concentrações de 200 a 1,56 µg/mL para os padrões e 500 a 31,5 µg/mL para as FBEAT. Cada poço foi inoculado com os microrganismos (1×10^6 células viáveis) e homogeneizados, sendo então, as microplacas incubadas por 24 horas a 35 °C para bactérias. Após a incubação, o

crescimento microbiano foi visualizado pela turvação, podendo ser determinado o CIM, 50 % da capacidade de inibir o crescimento do micro-organismo em específico.

A leitura foi realizada por meio da medida de Densidade Ótica em um espectrofotômetro (Molecular Devices modelo SpectraMax M2). A microplaca de 96 poços foi colocada num Spectra Max M2 espectrofotômetro de microplacas (Molecular Devices Corp) programado para realizar as medições a 23°C. As densidades óticas das culturas celulares foram lidas utilizando um comprimento de onda de 620 nm, e agitação (30 s) entre cada uma das medições de leitura (LEHTINEN, JÄRVINEN, *et al.*, 2006).

4.5.5 Determinação da Concentração Letal Mínima (CLM)

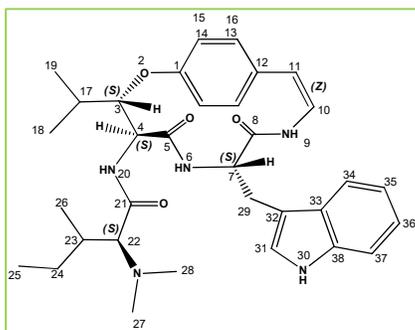
Nos poços que não apresentaram crescimento de micro-organismos, foram repicados das diluições para placa de Petri contendo ágar Müller-Hinton para bactérias. Depois do período de incubação, foi determinada a menor concentração capaz de causar a morte dos micro-organismos, correspondendo, dessa forma, a CLM. Os mesmos foram realizados em triplicata, e a análise dos padrões foi realizada ao mesmo tempo.

4.6 METABÓLITOS ISOLADOS E IDENTIFICADOS

4.6.1 Alcaloides Ciclopeptídicos

4.6.1.1 Alcaloides isolados de *Discaria americana*

4.6.1.1.1 Discarina B, A08 (42)



Aspecto físico: sólido branco 48,1 mg;

Pf.: 238-240°C (Lit. 237-239°C; (GIACOMELLI, 2005);

Rf.: 0,25 (CHCl₃:MeOH 3%);

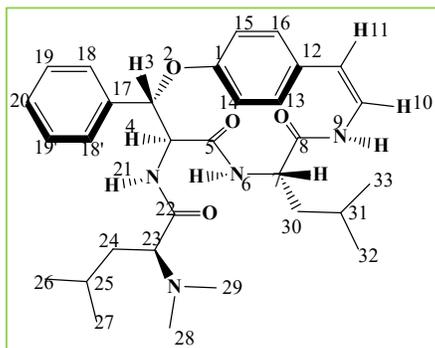
[α]_D²⁰ = -172 (c 0,1 em CHCl₃), (GIACOMELLI, 2005);

Isolamento: *Discaria americana*.

RMN de ¹H a 400,13 MHz, CDCl₃: δ 4,89 (1H, dd, *J*=2,1, 7,7 Hz, H-3), δ 4,43 (1H, dd, *J*=7,8, 10,4 Hz, H-4), δ 5,97 (1H, d, *J*=7,1 Hz, NH-6), δ 4,26 (1H, dd, *J*=6,7, 11,5 Hz, H-7), δ 6,13 (1H, d, *J*=8,9 Hz, NH-9), δ 6,5 (1H, H-10), δ 6,3 (1H, d, *J*=7,6 Hz, H-11), δ 6,79 (1H, dd, *J*=1,6, 8,6 Hz, H-13), δ 6,93 (1H, H-14), δ 6,97 (1H, H-15), δ 7,10 (1H, H-16), δ 2,01 (1H, *m*, H-17), δ 1,22 (1H, d, *J*=6,8 Hz, H-18), δ 0,97 (3H, d, *J*=6,4 Hz, H-19), δ 6,96 (1H, NH-20), δ 2,43 (1H, d, *J*=4,7 Hz, H-22), δ 1,78 (1H, *m*, H-23), δ 1,49-1,25 (1H, *m*, H-24, H24'), δ 0,93 (3H, t, *J*=7,4, H-25), δ 0,87 (3H, d, *J*=6,8 Hz, H-26), δ 2,04 (6H, s, N-(CH₃)₂-27, -28), δ 3,31 (1H, dd, *J*=4,9, 14,7 Hz, H-29), δ 2,86 (1H, dd, *J*=6,1, 14,7 Hz, H-29'), δ 8,65 (1H, s, NH-30), δ 7,16 (1H, H-31), δ 7,58 (1H, d, *J*=8,1 Hz, H-34), δ 7,06 (1H, H-35), δ 7,30 (1H, d, *J*=8,1 Hz, H-36), δ 7,16 (1H, H-37);

RMN de ¹³C a 100,62 MHz, CDCl₃: δ 156,2 (C-1), δ 81,4 (C-3), δ 55,6 (C-4), δ 171,3 (C-5), δ 54,2 (C-7), δ 167,6 (C-8), δ 125,6 (C-10), δ 117,5 (C-11), δ 129,9 (C-13), δ 122,1 (C-14), δ 131,5 (C-15), δ 121,4 (C-16), δ 29,1 (C-17), δ 20,2 (C-18), δ 14,9 (C-19), δ 172,3 (C-21), δ 74,0 (C-22), δ 34,7 (C-23), δ 27,5 (C-24), δ 14,5 (C-25), δ 12,2 (C-26), δ 42,8 (C-27, -28), δ 27,3 (C-29), δ 123,9 (C-31), δ 136,4 (C-32), δ 109,4 (C-33), δ 119,6 (C-34), δ 122,3 (C-35), δ 110,9 (C-36), δ 117,8 (C-37), δ 127,1 (C-38).

4.6.1.1.2 Discarina C, A28 (41)



Aspectos físicos: sólido branco 276,9 mg,

Pf.: 240-242°C (Lit. 240-242 °C; GIACOMELLI, 2005);

Rf.: 0,6 (CHCl₃:MeOH 3%);

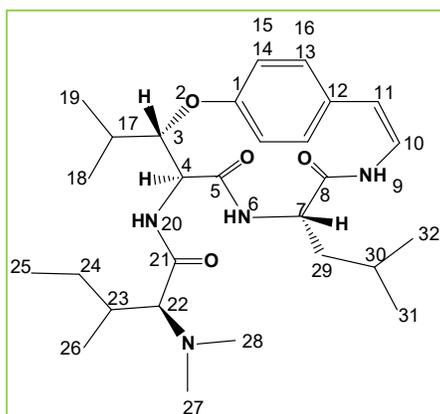
[α]_D²⁰ = -239 (c 0,1 em CHCl₃), (GIACOMELLI, 2005);

Isolamento: *Discaria americana*.

RMN de ¹H (400 MHz), CDCl₃: δ 6,15 (1H, d, $J=6,4$ Hz, H-3), δ 4,73 (1H, dd, $J=6,4, 8,8$ Hz, H-4), δ 6,22 (1H, d, $J=7,6$ Hz, NH-6), δ 4,15 (1H, m, H-7), δ 6,59 (1H, d, $J=10,0$ Hz, NH-9), δ 6,73 (1H, dd, $J=7,6, 10,4$ Hz, H-10), δ 6,36 (1H, d, $J=7,6$ 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 7,30 (1H, NH-21), δ 2,62 (1H, dd, $J=4,8, 8,0$ Hz, H-23), δ 1,03/1,25 (1H, m, H-24, H-24'), δ 1,61 (1H, m, H-25), δ 0,87 (3H, d, $J=6,5$ Hz, H-26), δ 0,81 (3H, d, $J=6,4$ Hz, H-27), δ 1,69 [6H, s, N-(CH₃)₂-28, -29], δ 1,81/1,39 (1H, m, H-30, H-30'), δ 1,43 (1H, m, H-31), δ 0,81 (3H, d, $J=6,8$ Hz, H-32), δ 0,79 (3H, d, $J=6,8$ Hz, H-33);

RMN de ¹³C a 100,62 MHz, CDCl₃: δ 155,5 (C-1), δ 82,0 (C-3), δ 56,3 (C-4), δ 171,3 (C-5), δ 52,5 (C-7), δ 167,6 (C-8), δ 125,8 (C-10), δ 115,1 (C-11), δ 132,4 (C-12), δ 123,7-132,2 (C-13, -14, -15, -16), δ 137,4 (C-17), δ 127,8-132,2 (C-18, -18', -19, -19', -20), δ 173,9 (C-22), δ 65,7 (C-23), δ 34,1 (C-24), δ 24,6 (C-25), δ 20,7 (C-26), δ 21,9 (C-27), δ 41,0 (C-28, -29), δ 39,4 (C-30), δ 26,1 (C-31), δ 23,1 (C-32), δ 22,8 (C-33).

4.6.1.1.3 Frangulanina, A26 (45)



Aspecto físico: sólido branco 47,8 mg;

Pf.: 275-277°C (Lit. 277-278 °C; GIACOMELLI, 2005);

Rf.: 0,4 (CHCl₃: MeOH 3%);

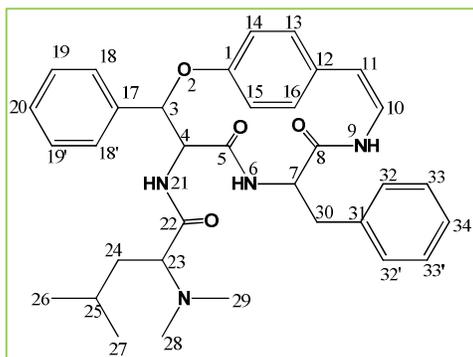
[α]_D²⁰: -288 (c 0,1 em CHCl₃), (GIACOMELLI, 2005);

Isolamento: *Discaria americana*.

RMN de ¹H (400 MHz), DMSO-d₆: 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, DMSO-d₆: 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).

4.6.1.1.4 Discarina D, A31 (43)



Aspecto físico: sólido branco 6,1 mg;

Pf.: 210-212°C (Lit. 211-213 °C;

GIACOMELLI, 2005);

Rf.: 0,66 (CHCl₃:MeOH 3%);

[α]_D²⁰: -148 (c 0,1 em CHCl₃),

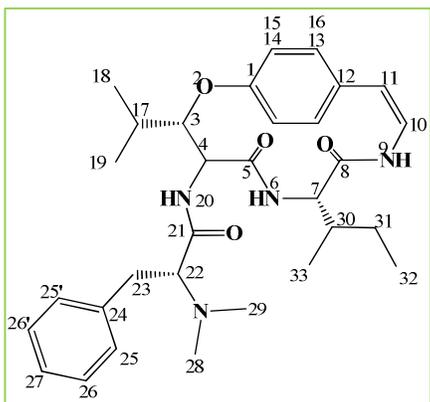
(GIACOMELLI, 2005);

Isolamento: *Discaria americana*.

RMN de ¹H (400 MHz), CDCl₃: δ 6,39 (1H, d, *J*=7,6Hz, H-3), δ 4,65 (1H, dd, *J*=6,0, 8,8Hz, H-4), δ 6,11 (1H, *d*, *J*=6,4Hz, NH-6), δ 4,55 (1H, m, H-7), δ 6,55 (1H, d, *J*=10,0Hz, NH-9), δ 6,67 (1H, t, *J*=8,8Hz, H-10), δ 6,44 (1H, d, *J*=8,0Hz, H-11), δ 7,05-7,49 (4H, H-13, -14, -15, -16), δ 7,05-7,49 (5H, H-18, -18', -19, -19', -20), δ 7,29 (1H, NH-21), δ 2,27 (1H, dd, *J*= 6,0, 7,6 H-23), δ 1,11/0,92 (2H, m, H-24, -24'), δ 1,49 (1H, m, H-25), δ 0,84 (3H, d, *J*=6,8Hz, H-26), δ 0,78 (3H, d, *J*=6,4Hz, H-27), δ 1,58 (6H, s, N-(CH₃)₂-28, -29), δ 3,18 (1H, dd, *J*= 3,6, 15,2Hz, H-30), δ 2,85 (1H, dd, *J*= 8,8, 15,2Hz, H-30'), δ 7,05-7,49 (5H, H-32, -32', -33, -33', -34);

RMN de ¹³C a 100,62 MHz, CDCl₃: δ 155,4 (C-1), δ 82,0 (C-3), δ 56,0 (C-4), δ 171,2 (C-5), δ 54,1 (C-7), δ 167,0 (C-8), δ 125,7 (C-10), δ 116,5 (C-11), δ 132,5 (C-12), δ 123,5-132,0 (C-13, -14, -15, -16), δ 137,4 (C-17), δ 123,5-132,0 (C-18, -18', -19, -19', -20), δ 173,7 (C-22), δ 65,2 (C-23), δ 34,8 (C-24), δ 26,0 (C-25), δ 22,2 (C-26), δ 22,8 (C-27), δ 40,9 (C-28, -29), δ 36,4 (C-30), δ 123,5-132,0 (C-31, -31', -32, -32', -33).

4.6.1.1.5 Adouetina Y', A10 (47)



Aspecto físico: sólido branco 2,4 mg;

Pf.: 288-289 °C (288-289°C Lit. (GIACOMELLI, 2005)

Rf.: 0,60 (CHCl₃:MeOH 3%);

[α]_D²⁰: -230 (c 0,1 em CHCl₃), (GIACOMELLI, 2005);

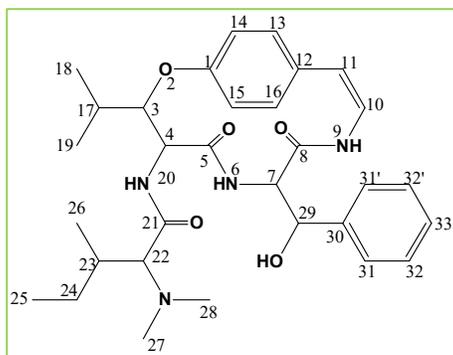
Isolamento: *Discaria americana*.

RMN de ¹H (400 MHz), CDCl₃: δ 5,01 (1H, dd, *J*=2,0, 7,2Hz, H-3), δ 4,47 (1H, dd, *J*=7,6, 10,4Hz, H-4), δ 5,77 (1H, d, *J*=7,6Hz, NH-6), δ 3,91 (1H, m, H-7), δ 6,41 (1H, d, *J*=8,0Hz, NH-9), δ 6,64 (1H, dd, *J*=7,2, 9,6Hz, H-10), δ 6,34 (1H, d, *J*=7,6Hz, H-11), δ 6,95-7,25 (4H, H-13, -14, -15, -16), δ 1,91 (1H, m, H-17), δ 1,27 (3H, d, *J*=6,8Hz, H-18), δ 1,01 (3H, d, *J*=6,8Hz, H-19), δ 7,74 (1H, d, *J*=8,8Hz, NH-20), δ 3,18 (1H, m, H-22), δ 3,18 (1H, m, H-23), δ 2,85 (1H, dd, *J*= 4,8, 14,0Hz, H-23'), δ 6,95-7,25 (5H, H-25, -25', -26, -26', 27), δ 2,27 (6H, s, N-(CH₃)₂-28, -29), δ 2,05 (1H, m, H-30), δ 0,85 (2H, m, H-31, -31'), δ 0,69 (3H, t, *J*=4,4Hz, H-32), δ 0,40 (3H, d, *J*=7,2Hz, H-33);

RMN de ¹³C a 100,62 MHz, CDCl₃: δ 155,8 (C-1), δ 81,3 (C-3), δ 55,2 (C-4), δ 172,1 (C-5), δ 59,5 (C-7), δ 166,9 (C-8), δ 125,5 (C-10), δ 115,9 (C-11), δ 131,8 (C-12), δ 122,8-130,0 (C-13, -14, -15, -16), δ 29,3 (C-17), δ 20,3 (C-18), δ 15,6 (C-19), δ 172,7 (C-21), δ 70,8 (C-22), δ 29,9 (C-23), δ 140,27 (C-24), δ 122,8-130,0 (C-25, -25', -26, -26', -27), δ 41,8 (C-28, -29), δ 34,5 (C-30), δ 23,6 (C-31), δ 15,13 (C-32), δ 11,99 (C-33).

4.6.1.2 Alcaloides isolados de *Scutia buxifolia*

4.6.1.2.1 Scutianina P, S01 (50)



Aspecto físico: sólido branco 26,6 mg;

Pf.: 189-190 °C (Lit. 189-190 °C

(MARANGON, 2014);

Rf.: 0,52 (CHCl₃:MeOH 5%);

[α]_D²⁰: -137,7° (c= 0,19 em CHCl₃),

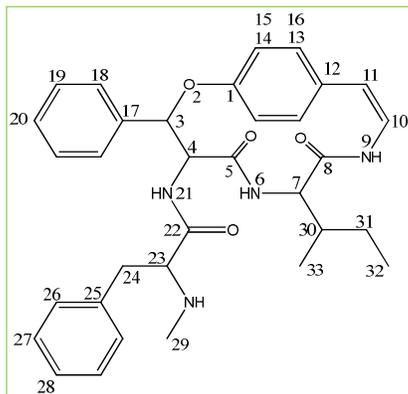
(MARANGON, 2014);

Isolamento: *Scutia buxifolia*

RMN de ¹H (400 MHz), CDCl₃: δ 4,87 (1H, d, *J*=6,8, Hz, H-3), δ 4,39 (1H, dd, *J*=7,5Hz, *J*₂=10,0Hz, H-4), δ 6,39 (1H, *d*, *J*=8,0Hz, H-6), δ 4,32 (1H, s, H-7), δ 6,28 (1H, s, H-9), δ 6,51 (1H, s, H-10), δ 6,51 (1H, s, H-11), δ 7,03-7,13 (4H, H-13, -14, -15, -16), δ 1,96 (1H, H-17), δ 1,21 (3H, d, *J*=6,8Hz, H-18), δ 0,96 (3H, d, *J*=6,8Hz, H-19), δ 7,26 (1H, NH-20), δ 2,31 (1H, s, H-22), δ 1,74 (1H, m, H-23), δ 1,49/1,31 (2H, m, H-24, -24'), δ 0,93 (3H, t, *J*=7,6Hz, H-25), δ 0,84 (3H, d, *J*=6,8Hz, H-26), δ 1,96 (6H, s, N-(CH₃)₂-27, -28), δ 5,13 (1H, s, H-29), δ 7,13-7,29 (5H, H-31, 31', -32, -32', -33);

RMN de ¹³C a 100,62 MHz, CDCl₃: δ 156,3 (C-1), δ 81,5 (C-3), δ 55,3 (C-4), δ 172,1 (C-5), δ 58,8 (C-7), δ 171,7 (C-8), δ 120,5 (C-10), δ 125,5 (C-11), δ 131,0 (C-12), δ 131,0 (C-13 ou C-16), δ 131,0 (C-13 ou C-16), δ 122,4 (C-14 ou C-15), δ 120,9 (C-14 ou -15), δ 28,2 (C-17), δ 20,2 (C-18), δ 15,1 (C-19), δ 167,3 (C-21), δ 72,2 (C-22), δ 34,1 (C-23), δ 29,0 (C-24), δ 12,5 (C-25), δ 14,9 (C-26), δ 42,7 (C-27, -28), δ 139,5 (C-30), δ 126,2 (C-31, -31'), δ 128,6 (C-32, -32'), δ 127,8 (C-33).

4.6.1.2.3 Aralionina B, S02 (51)



Aspecto físico: Sólido branco 5,7 mg;

Pf.: 102,4-104,6

Rf.: 0,54 (CHCl₃: MeOH 7%)

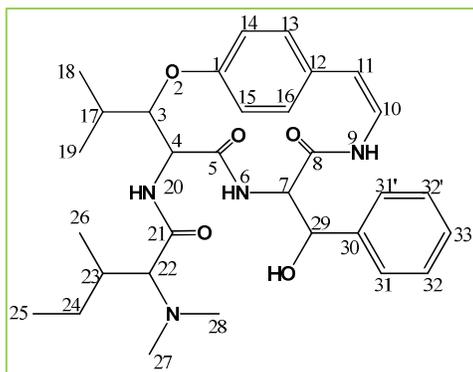
[α]_D²⁰: -68,11° (c= 0,054 em MeOH)

Isolamento: *Scutia buxifolia*

RMN de ¹H (400 MHz), DMSO-d⁶: δ 5,76 (1H, s, H-3), δ 4,63 (1H, dd, J = 1,6, 10,0, H-4), δ 7,60 (1H, d, J =8,8 Hz, H-6), δ 3,92 (1H, t, J = 8,4, H-7), δ 8,21 (1H, s, H-9), δ 5,98 (1H, d, J =8,4 Hz, H-10), δ 6,72 (1H, d, J =7,6 Hz, H-11), δ 6,93-7,19 (4H, H-13, -14, -15, -16), δ 7,60 (2H, d, J = 7,6, H-18, 18'), δ 7,37 (2H, t, J = 7,2 H-19, 19'), δ 7,37 (1H, H-20), δ 7,94 (1H, d, J = 10,0, H-21), δ 3,05 (1H, dd, J =5,6, 8,4, H-23), δ 2,56 (1H, dd, J =5,2, 14,0, H-24), δ 2,38 (1H, dd, J =8,4, 14,0, H-24'), δ 6,93-7,19 (5H, H-26, -26', -27, -27', -28), δ 2,15 (3H,s, H-29), δ 2,47 (1H, m, H-30), δ 0,92/ 1,31 (2H, m, H-31/ H-31'), δ 0,75 (3H, H-32), δ 0,75 (3H, H-33);

RMN de ¹³C a 100,62 MHz , DMSO-d⁶: δ 158,3 (C-1), δ 85,9 (C-3), δ 55,1 (C-4), δ 166,9 (C-5), δ 56,8 (C-7), δ 168,7 (C-8), δ 126,8 (C-10), δ 128,6 (C-11), δ 132,1 (C-12), δ 119,5-127,7 (C-13, -14, -15, -16), δ 139,4 (C-17), δ 126,8 (C-18), δ 127,7 (C-19), δ 127,3 (C-21), δ 172,4 (C-22), δ 65,3 (C-23), δ 38,8 (C-24), δ 138,0 (C-25), δ 119,5-127,7 (C-26, -26', -27, -27', -28), δ 33,9 C-29), δ 36,27 (C-30), δ 24,1 (C-31), δ 10,4 (C-32), δ 14,9 (C-33).

4.6.1.2.6 Scutianina N, S07 (49)



Aspecto físico: Sólido branco 6,3 mg;

Pf.: 209-211 °C (Lit. 210,8-212 °C

(MARANGON, 2014)

Rf.: 0,44 (CHCl₃: MeOH 5%)

[α]_D²⁰: -165 (c=0,2 em CHCl₃)

(MARANGON, 2014)

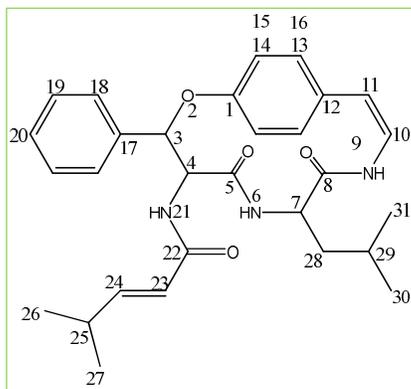
Isolamento: *Scutia buxifolia*

RMN de ¹H (400 MHz), CDCl₃: δ 4,88 (1H, dd, *J*=2,0; 7,6 Hz, H-3), δ 4,38 (1H, m, H-4), δ 6,15 (1H, d, *J*=7,6 Hz, H-6), δ 4,42 (1H, m, H-7), δ 6,22 (1H, d, *J*=7,6 Hz, H-9), δ 6,39 (1H, H-10), δ 6,46 (1H, d, *J*=7,2 Hz, H-11), δ 6,99 (1H, H-13), δ 7,10 (1H, d, *J*=2,4, 8,4, H-14), δ 6,87 (1H, d, *J*=8,4 H-15), δ 6,98 (1H, H-16), δ 2,04 (1H, m, H-17), δ 1,24 (3H, d, *J*=6,8, H-18), δ 0,99 (3H, d, *J*=6,8, H-19), δ 7,18 (1H, d, *J*=8,0, NH-20), δ 2,57 (1H, d, *J*=4,4, H-22), δ 1,82 (1H, m, H-23), δ 1,29/ 1,53 (2H, m, H-24/ H-24'), δ 0,95 (3H, t, *J*=7,2, H-25), δ 0,89 (3H, d, *J*=6,8, H-26), 2,14 (6H, s, CH₃-27, -28, N(CH₃)₂), δ 5,06 (1H, s, H-29), δ 7,26-7,33 (5H, H-31/31', -32/32', -33);

RMN de ¹³C a 100,62 MHz, CDCl₃: δ 156,3 (C-1), δ 81,3 (C-3), δ 55,9 (C-4), δ 171,6 (C-5), δ 59,4 (C-7), δ 166,3 (C-8), δ 125,2 (C-10), δ 120,2 (C-11), δ 131,1 (C-12), δ 130,9 (C-13), δ 129,8 (C-14), δ 120,8 (C-15), δ 122,1 (C-16), δ 28,9 (C-17), δ 20,1 (C-18), δ 14,8 (C-19), δ 172,9 (C-21), δ 73,7 (C-22), δ 34,5 (C-23), δ 27,6 (C-24), δ 12,2 (C-25), δ 14,5 (C-26), δ 43,1 (C-27, -28), δ 72,7 (C-29), δ 138,7 (C-30), δ 125,9 (C-31, -31'), δ 128,6 (C-32, 32'), δ 128,0 (C-33).

4.6.2 Ciclopeptídeos Neutros

4.6.2.1 Discareno C, E02 (44)



Aspecto físico: pó branco 3,4 mg;

PF.: 274-275°C (Lit. 273-275 °C
(GIACOMELLI, 2005);

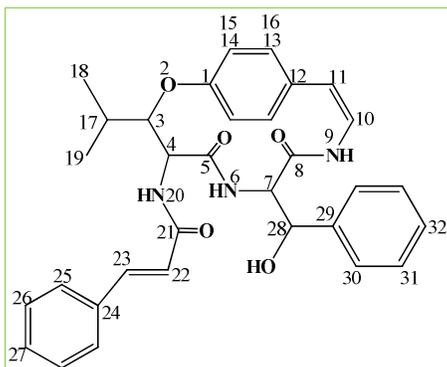
Rf.: 0,63 (CHCl₃-MeOH 3%);

Isolamento: *Discaria americana*

¹H-NMR (600 MHz), CDCl₃: δ 6,14 (1H, d, $J=4,0$ Hz, H-3), δ 4,85 (1H, dd, $J=4,4, 10,0$ Hz, H-4), δ 6,32 (1H, d, $J=5,2$ Hz, NH-6), δ 4,13 (1H, m, H-7), δ 6,63 (1H, d, $J=6,8$ Hz, NH-9), δ 6,75 (1H, t, $J=6,8$ Hz, H-10), δ 6,36 (1H, H-11), δ 7,15-7,55 (4H, H-13, -14, -15, -16), δ 7,15-7,55 (5H, H-18, -18', H-19, -19', H-20), δ 5,07 (1H, d, $J=5,6$ Hz, NH-21), δ 5,22 (1H, d, $J=10,4$ Hz, H-23), δ 6,36 (1H, m, H-24), δ 2,26 (1H, m, H-25), δ 0,92/0,91 (6H, d, $J=4,0$ Hz, H-26, -27), δ 1,78/1,31 (2H, m, H-28, -28'), δ 1,17 (1H, m, H-29), δ 0,75 (3H, d, $J=4,4$ Hz, H-30), δ 0,65 (3H, d, $J=6,5$ Hz, H-31);

RMN de ¹³C a 150,92 MHz , CDCl₃: δ 155,4 (C-1), δ 82,1 (C-3), δ 56,3(C-4), δ 171,2 (C-5), δ 52,7 (C-7), δ 167,5 (C-8), δ 125,7 (C-10), δ 114,9 (C-11), δ 132,8 (C-12), δ 123,6-132,3 (C-13, -14, -15, -16), δ 136,7 (C-17), δ 123,6-132,3 (C-18, -18', -19, 19', -20), δ 165,9 (C-22), δ 119,3 (C-23), δ 153,1 (C-24), δ 30,8 (C-25), δ 21,4 (C-26), δ 21,3 (C-27), δ 39,3 (C-28), δ 24,5 (C-29), δ 23,2 (C-30), δ 20,6 (C-31).

4.6.2.2 Scutianeno X, S17 (13)



Aspecto físico: pó branco 9,4 mg;

PF.: 227-229°C (Lit. 228-230 °C

(MALDANER, 2010);

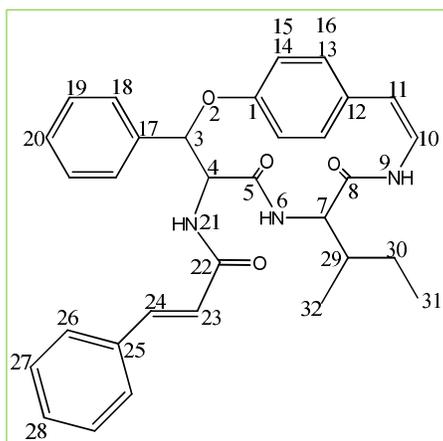
Rf.: 0,44 (CHCl₃-MeOH 7%);

Isolamento: *Scutia buxifolia*

RMN de ¹H a 400,13 MHz, DMSO: δ 4,17 (1H, d, *J*= 7,2, Hz, H-3), 4,19 (1H, dd, *J*= 7,2; 9,0 Hz, H-4), 7,08(1H, s, NH-6), 4,09 (1H, t, *J*=9,6; Hz, H-7), 8,30 (1H, s, NH-9), 5,97 (1H, dd, *J*= 7,3; 1,2 Hz, H-10), 6,76 (1H, d, *J*=7,3 Hz, H-11), 6,67-7,64 (4H, H-13, H-14, H-15, H-16), 1,86 (1H, m, H-17), 1,15 (3H, d, *J*= 6,8 Hz, H-18), 0,89 (3H, d, *J*= 6,8 Hz, H-19), 7,96 (1H, d, *J*= 9,6 Hz, NH-20), 6,42 (1H, d, *J*= 15,8 Hz, H-22), 7,40 (1H, d, *J*= 15,7 Hz, H-23), 6,67-7,64 (5H, H-25, H-25'', H-26, H-26'', H-27); 4,26 (1H, dd, *J*= 9,5; 4,6 Hz, H-28), 5,31 (1H, d, *J*= 4,6 Hz, HO-28) 6,66-7,64 (5H, H-30, H-30'', H-31, H-31'', H-32);

RMN de ¹³C a 100,62 MHz, DMSO: δ 158,4 (C-1), 86,1 (C-3), 56,0 (C-4), 166,7 (C-5), 57,2 (C-7), 168,4 (C-8), 127,3 (C-10), 117,3-141,8 (C-11, C-12, C-13, C-14, C-15, C-16), 27,8 (C-17), 20,1 (C-18), 14,7 (C-19), 163,2 (C-21), 121,6 (C-22), 138,9 (C-23), 134,5 (C-24), 117,3-141,8 (C-25, C-25', C-26, C-26', C-27), 73,2 (C-28), 117,28-141,8 (C-29, C-30, C-30', C-31, C-31', C-32).

4.6.2.3 Scutianeno Z, S16 (15)



Aspecto físico: sólido branco 16,9 mg;

Pf.: 246-248°C (Lit. 248-250 °C (MALDANER, 2010));

Rf.: 0,64 (CHCl₃-MeOH 7%);

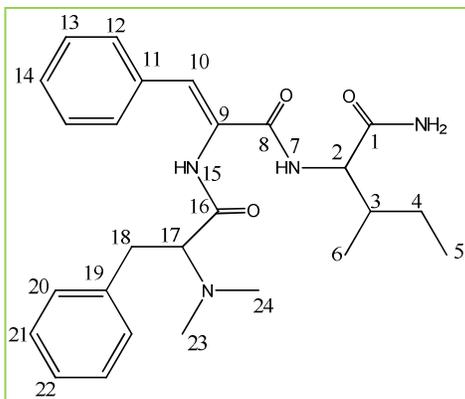
Isolamento: *Scutia buxifolia*

RMN de ¹H a 400,13 MHz, DMSO-d⁶: δ 5,73 (1H, s, H-3), 4,81 (1H, dd, *J* = 1,6; 10,0 Hz, H-4), 7,83 (1H, d, *J* = 9,2, NH-6), 3,92 (1H, H-7), 8,23 (1H, s, NH-9), 6,71 (1H, d, *J* = 7,6 Hz, H-10), 5,99 (1H, d, *J* = 7,2 Hz, H-11), 6,92-7,62 (4H, H-13, -14, -15, -16), 6,92-7,62 (5H, H-18, -18', -19, -19', -20), 7,97 (1H, d, *J* = 10,0 Hz, NH-21), 6,96 (1H, d, *J* = 16,4 Hz, H-23), 7,21 (1H, d, *J* = 16,0 Hz, H-24), 6,92-7,62 (5H, H-26, H-26', H-27, H-27', H-28); 1,43 (1H, m, H-29), 1,32/0,91 (2H, m, H-30, 30'), 0,75 (6H, H-31, -32);

RMN de ¹³C a 100,62 MHz, DMSO: δ 158,6 (C-1), 86,3 (C-3), 56,9 (C-4), 167,1 (C-5), 55,7 (C-7), 168,8 (C-8), 129,9 (C-10), 126,8 (C-11), 121,82-134,8 (C-12, -13, -14, -15, -16), 138,4 (C-17), 121,82-134,8 (C-18, -18', -19, -19', -20), 164,6 (C-22), 121,82-134,8 (C-23), 121,82-134,8 (C-24), 139,5 (C-25), 121,8-134,8 (C-26, -26, -27, -27', -28), 40,6 (C-29), 24,2 (C-30), 10,55 (C-31), 14,9 (C-32).

4.6.3 Peptídeos

4.6.3.1 Scutianina Q, S18 (52)



Aspecto físico: sólido amarelo 60 mg;

Pf.: 127-129 °C

Rf.: 0,12 (CHCl₃: MeOH 7%)

[α]_D²⁰: -207° (c= 0,14 em MeOH)

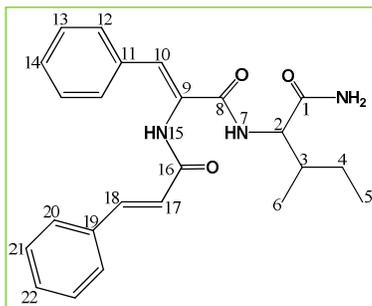
Isolamento: *Scutia buxifolia*

IUPAC: (Z)-2-(2-(2-(dimetilamino)-3-fenilpropanamido)-3-fenilacrilamido)-3-metilpentanamida

RMN de ¹H (400 MHz), CDCl₃: δ 4,44 (1H, dd, *J*=4,8, 8,6 Hz, H-2), δ 2,12 (1H, m, H-3), δ 1,46/1,03 (2H, m, H-4), δ 0,90 (3H, t, *J*=7,3 Hz, H-5), δ 0,96 (3H, d, *J*=6,9 Hz, H-6), δ 6,96 (1H, s, H-10), δ 6,45 (1H, d, *J*= 8,4Hz, NH-7), δ 7,25-7,31 (5H, H-12, -12', -13, -13', -14), δ 5,56 (1H, s, NH-15), δ 3,48 (1H, dd, *J*=5,2, 7,8Hz, H-17), δ 3,20 (2H, dd, *J*=7,8, 13,9 Hz, H-18), δ 2,88 (2H, dd, *J*=5,2, 13,9Hz, H-18'), δ 7,25-7,31 (5H, H-20, -21, -22, -23), δ 2,35 (6H, s, N-(CH₃)₂-24, -25);

RMN de ¹³C a 100,62 MHz , CDCl₃: δ 173,5 (C-1), δ 58,2 (C-2), δ 36,1 (C-3), δ 24,5 (C-4), δ 15,9 (C-5), δ 11,7 (C-6), δ 165,5 (C-8), δ 129,7 (C-9), δ 125,6 (C-10), δ 133,5 (C-11), δ 129,2-126,2 (C- 12, -13, -14), δ 172,5 (C-16), δ 70,9 (C-17), δ 30,7 (C-18), δ 139,5 (C-19), δ 129,2-126,2 (C- 20, -21, -22), δ 42,0 (C-23, -24).

4.6.3.2 Scutianina R, S04 (52)



Aspecto físico: sólido branco, 1,36 mg;

Pf.: 191,4-192,1 °C

Rf.: 0,12 (CHCl₃: MeOH 7%)

[α]_D²⁰:

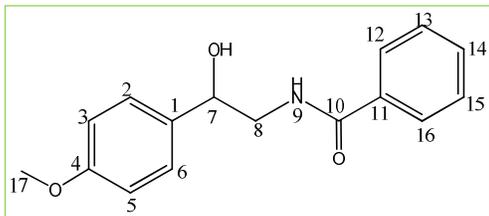
Isolamento: *Scutia buxifolia*

RMN de ¹H (400 MHz), CDCl₃: δ 4,24 (1H, dd, *J*=4,8, 8,6 Hz, H-2), δ 1,83 (1H, m, H-3), δ 1,48/1,13 (2H, m, H-4), δ 0,84 (3H, t, *J*=7,2 Hz, H-5), δ 0,88 (3H, d, *J*=6,8 Hz, H-6), δ 7,59 (1H, d, *J*=6,8 Hz, NH-7), δ 7,06 (1H, s, H-10), δ 7,29-7,61 (5H, H-12, -12', -13, -13', -14), δ 9,67 (1H, s, NH-15), δ 7,57 (1H, d, *J*=15,2Hz, H-17), δ 6,86 (1H, d, *J*=16,0Hz, H-18), δ 7,29-7,61 (5H, H-20, -20', -21, -21', -22);

RMN de ¹³C a 100,62 MHz , CDCl₃: δ 172,7 (C-1), δ 57,2 (C-2), δ 36,4 (C-3), δ 24,2 (C-4), δ 11,1 (C-5), δ 15,5 (C-6), δ 164,7 (C-8), δ 129,7 (C-9), δ 129,99 (C-10), δ 133,9 (C-11), δ 126,9-129,7 (C- 12, -13, -14), δ 167,7 (C-16), δ 140,3 (C-17), δ 120,9 (C-18), δ 134,5 (C-19), δ 126,9-129,7 (C- 20, -21, -22).

4.6.4 Amida

4.6.4.1 Tembamida, S10 (38)



Aspecto físico: sólido branco 17,2 mg;

Pf.: 146 °C (Lit. 144-146 °C (AGUIRRE, SALGADO-RODRÍGUEZ, *et al.*, 2001));

Rf.: 0,64 (CHCl₃-MeOH 7%);

Isolamento: *Scutia buxifolia*

RMN de ¹H a 400,13 MHz, CHCl₃: δ 3,52/ 3,87 (2H, m, H-8, -8'), 4,91 (1H, dd, *J*= 3,2, 7,6, H-7), 6,89 (2H, d, *J*= 8,8, H-3, -5), 7,33 (2H, d, *J*= 8,6 Hz, H-2, -6), 7,43 (2H, d, *J*=7,7 Hz, H-13, -15), 7,49 (1H, m, H-14), 7,75 (2H, d, *J*= 7,2Hz, H-12, -16);

RMN de ¹³C a 100,62 MHz, CHCl₃: δ 47,7 (C-8), 55,3 (C-17), 73,3 (C-7), 114,0 (C-3, -5), 126,9 (C-2, -6), 127,1 (C-12, -16), 128,6 (C-13, -15), 131,6 (C-14), 133,9 (C-11), 134,2 (C-1), 159,4 (C-4), 168,5 (C-10);

5 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

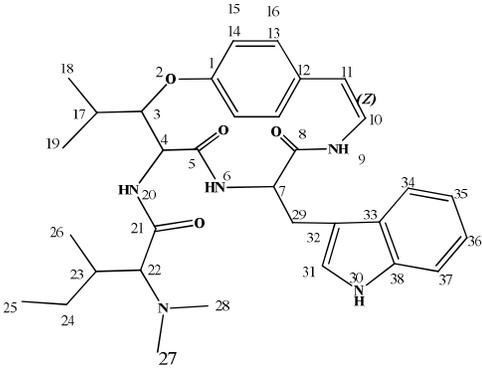
Neste capítulo serão apresentados os resultados e a discussão da análise fitoquímica da casca da raiz da espécie *Discaria americana* e da casca do caule da espécie *Scutia buxifolia*, os extratos brutos, as frações de resíduo (FBER), as frações de alcaloides totais (FBEAT), bem como os metabólitos isolados destas frações de ambas as espécies.

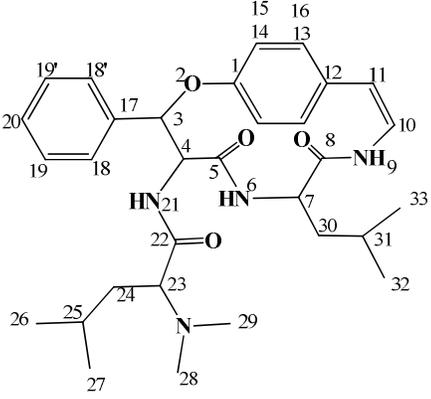
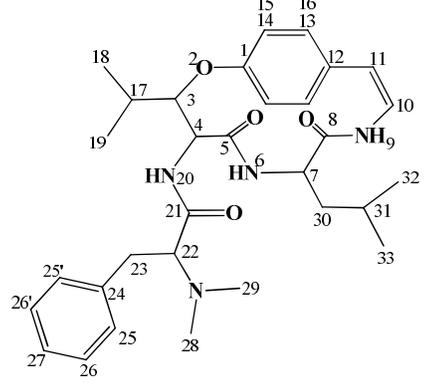
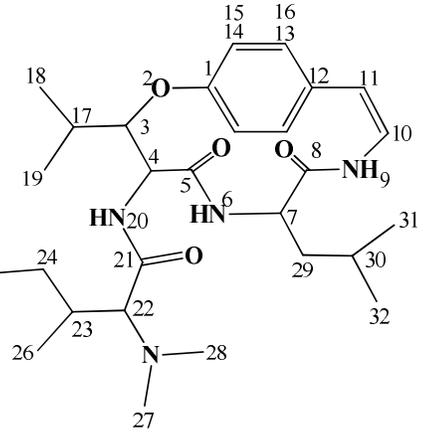
A determinação das estruturas dos compostos isolados foi realizada com base nos dados espectrais de RMN ^1H e de ^{13}C uni e bidimensionais.

Com a análise das FBEAT foi possível isolar e identificar os seguintes alcaloides ciclopeptídicos: Discarina B (42), Discarina C (41), Frangulanina (45), Discarina D (43), Frangufolina (46) e Adouetina Y' (47) da espécie *Discaria americana*. Da espécie *Scutia buxifolia* foram isolados: Scutianina-N (48), -P (49), Scutianina-Q (51), Aralionina-B (50), (R)-Tembamida (38), Scutianeno-X (13) e -Z (15), e Scutianina-R (52).

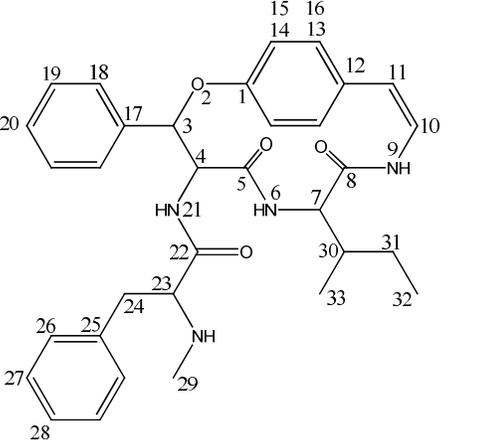
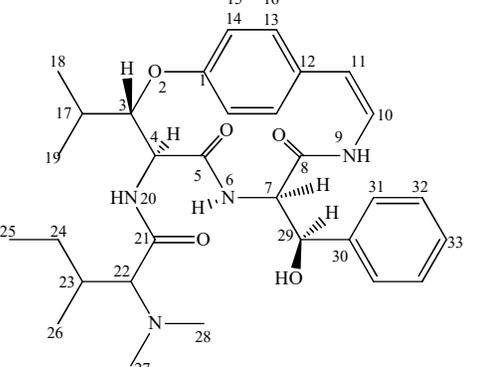
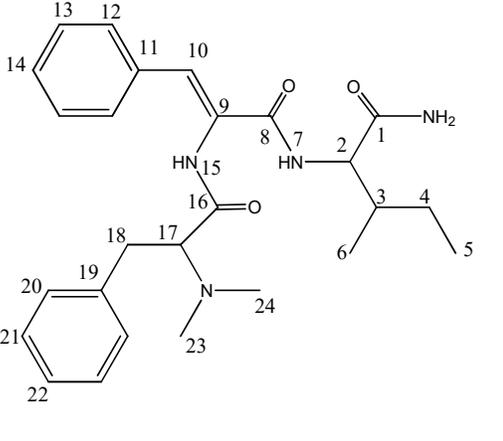
No Quadro 1 estão ilustrados os compostos isolados e identificados durante este estudo.

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

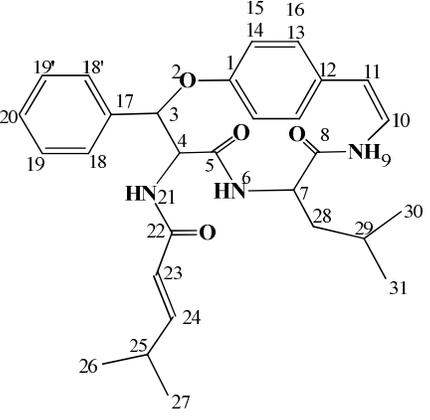
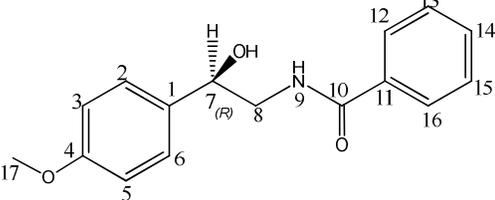
Estrutura	Características	Identificação
	<p>Sólido branco</p> <p>Pf.: 238-240°C</p>	<p>Discarina B, A08, (42)</p> <p>Isolamento: pág. 40</p> <p>Identificação: pág. 48</p> <p>Ensaio: pág. 116</p>

	<p>Sólido branco</p> <p>Pf.: 240-242°C</p>	<p>Discarina C, A28, (41)</p> <p>Isolamento: pág. 40 Identificação: pág. 49 Ensaio: pág. 115</p>
	<p>Sólido branco,</p> <p>Pf.: 250-252°C</p>	<p>Frangufolina, A19, (46)</p> <p>Isolamento: pág. 40 Identificação: pág. 53 Ensaio: pág. 115</p>
	<p>Sólido branco</p> <p>Pf.: 275-277°C</p>	<p>Frangulanina, A26, (45)</p> <p>Isolamento: pág. 40 Identificação: pág. 50 Ensaio: pág. 115</p>

	<p>Sólido branco Pf.: 288-289°C</p>	<p>Adouetina Y², A10, (47) Isolamento: pág. 40 Identificação: pág. 52 Ensaio: pág. 115</p>
	<p>Sólido branco Pf.: 210-212°C</p>	<p>Discarina D, A29, (43) Isolamento: pág. 40 Identificação: pág. 51 Ensaio: pág. 115</p>
	<p>Sólido branco Pf.: 189-190°C</p>	<p>Scutianina P, S01, (49) Isolamento: pág. 40 Identificação: pág. 54 Ensaio: pág. 116</p>

	<p>Sólido branco Pf.: 102,4-104,6°C</p>	<p>Aralionina B, S02, (50) Isolamento: pág. 40 Identificação: pág. 55 e 77 Ensaio: pág. 116</p>
	<p>Sólido branco Pf.: 209-211°C</p>	<p>Scutianina N, S07, (48) Isolamento: pág. 40 Identificação: pág. 56 Ensaio: pág. 116</p>
	<p>Sólido amarelo cristalino</p> <p>IUPAC: (Z)-2-(2-(2-(dimethylamino)-3-phenylpropanamido)-3-phenylacrylamido)-3-methylpentanamide</p> <p>PF: 127-129 °C</p>	<p>Scutianina Q, S18, (51) Isolamento: pág. 40 Identificação: pág. 60 e 92 Ensaio: pág. 116</p>

	<p>Sólido branco</p> <p>Scutianina R, S04, (52)</p> <p>IUPAC: 2-((Z)-2-cinnamamido-3-phenylacrylamido)-3-methylpentanamide</p> <p>PF: 191,4-192,1 °C</p>	<p>Isolamento: pág. 40</p> <p>Identificação: pág. 61 e 106</p> <p>Ensaio: pág. 116</p>
	<p>Sólido branco</p> <p>Scutianeno X S17, (13)</p> <p>Pf: 227-229°C</p>	<p>Isolamento: pág. 40</p> <p>Identificação: pág. 58</p> <p>Ensaio: pág. 116</p>
	<p>Sólido branco</p> <p>Scutianeno Z, S16, (15)</p> <p>Pf: 246-248°C</p>	<p>Isolamento: pág. 40</p> <p>Identificação: pág. 59</p> <p>Ensaio: pág. 116</p>

	<p>Sólido branco</p> <p>Pf.: 270-272°C (Lit. 273-275 °C (GIACOMELLI, 2005));</p>	<p>Discareno C E02 (44) Isolamento: pág. 40 Identificação: pág. 57 Ensaio: pág. 116</p>
	<p>Sólido branco cristalino</p> <p>Pf.: 146°C</p>	<p>Tembamida S10 (38) Isolamento: pág. 40 Identificação: pág. 47</p>

5.1 RENDIMENTO DO EXTRATO BRUTO E DAS FRAÇÕES

Após a secagem e a moagem das cascas da raiz da espécie *D. americana* coletada nos municípios de São Sepé e Santana do Livramento, RS, os quais foram submetidos à extração, conforme descrito na página 62, onde foram obtidos os extratos brutos metanólicos. Este extrato foi submetido a fracionamento ácido-base conforme descrito na página 32, Figura 10, obtendo-se as FBER (Fração Básica Etérea Resíduo) e as FBEAT (Fração Básica Etérea Alcaloides Totais) de cada uma das coletas.

Para a espécie *Scutia buxifolia*, foi realizado o mesmo procedimento descrito na página 32, Figura 10, com as cascas do caule coletadas nos municípios de São Sepé, Santana do Livramento, Caçapava do Sul e Lavras do Sul, RS.

Os rendimentos abaixo, Tabelas 12 e 13, são referentes à planta seca moída e ao extrato bruto obtido das espécies *Discaria americana* e *Scutia buxifolia*, respectivamente.

Tabela 12: Rendimento das frações etéreas básicas de *Discaria americana*.

Local de Coleta/Mês/Ano	Massa Seca Moída (MSM)	Extrato Bruto (EB)	Fração Básica Etérea Resíduo (FBER)	Fração Básica Etérea Alcaloides Totais (FBEAT)	% em relação à planta seca moída (FBER/FBEAT)	% em relação ao extrato bruto (FBER/FBEAT)
São Sepé 05/11	1.756,7g	402,9g	8,0986g	2,4693g	0,46/0,14	2,01/0,61
São Sepé 08/13	8.387,6g	1.122,23g	25,6996g	6,6795g	0,31/0,08	2,29/0,59
Santana do Livramento 04/11	1.050,00g	311,2g	13,8377g	0,8703g	1,32/0,08	4,45/0,28
Santana do Livramento 09/11	1.013,5g	217,15g	9,6619g	2,8013g	0,95/0,28	4,45/1,29

Tabela 13: Rendimento das frações etéreas básicas de *Scutia buxifolia*.

Local de Coleta/Mês/Ano	Massa Seca Moída (MSM)	Extrato Bruto (EB)	Fração Básica Etérea Resíduo (FBER)	Fração Básica Etérea Alcaloides Totais (FBEAT)	% em relação à planta seca moída (FBER/FBEAT)	% em relação ao extrato bruto (FBER/FBEAT)
São Sepé 08/13	1.057,0g	208,5g	3,5836g	0,211g (pH~9)	0,34/0,02	1,72/0,10
Santana do Livramento 06/13	1.230,5g	292,1g	6,3854g	1,1726g (pH~11)	0,52/0,10	2,19/0,40
Santana do Livramento C/E 09/13	833,6g	113,9g	3,9279g	0,5535g (pH~11)	0,47/0,07	3,45/0,49
Santana do Livramento S/E 09/13	482,6g	98,1g	1,8097g	0,2247g (pH~11)	0,38/0,05	1,85/0,23
Caçapava do Sul S/E 10/13	2.841,5g	560,1g	6,3657g	0,6295g (pH~9)	0,22/0,02	1,14/0,11
Caçapava do Sul C/E 10/13	2.229,9g	515,0g	6,7292g	3,1052g (pH~11)	0,30/0,14	1,31/0,60
Lavras do Sul 01/14	1.210,3g	359,3g	5,4300g	1,2700g (pH~11)	0,45/0,11	1,51/0,35
Lavras do Sul 07/14	1.397,0g	374,6g	7,1032g	1,3869g (pH~11)	0,51/0,10	1,90/0,37
Santana do Livramento 04/14	6.454,4g	1.397,9g	17,1131g	2,9868g (pH~11)	0,27/0,05	1,22/0,21

5.2 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA QUANTITATIVA

Como descrito na revisão da literatura, as espécies *Discaria americana* e *Scutia buxifolia* produzem vários metabólitos secundários, dentre os quais se destacam os alcaloides ciclopeptídicos. De acordo com MOREL, MALDANER e ILHA, 2009, foram isolados e identificados 20 alcaloides ciclopeptídicos da espécie *Discaria americana* e 19 da espécie *Scutia buxifolia* listados nas Tabelas 1 a 5. No entanto, ao longo de vários anos de estudo destas espécies foi possível verificar certo grau de variabilidade destes compostos no que diz respeito ao local de coleta e época do ano em que foram coletadas.

Dessa forma, se faz necessária uma averiguação mais detalhada da composição química destas espécies. Para tanto, foram realizadas a análise quantitativa das frações etéreas alcaloides totais para verificar a frequência e a quantidade em que os alcaloides ciclopeptídicos aparecem nos diferentes locais de coleta e a sua sazonalidade. A seguir seguem uma breve revisão dos alcaloides ciclopeptídicos isolados até o momento das espécies *Discaria americana* e *Scutia buxifolia*, e os dados obtidos com a análise.

5.2.1 *Discaria americana*

Esta espécie tem sido estudada por vários anos pelo grupo NPPN. Ao longo deste tempo foram notáveis algumas mudanças na composição dos alcaloides ciclopeptídicos presentes na espécie *Discaria americana*.

Dessa forma, neste trabalho pretendo avaliar de forma quantitativa algumas frações obtidas entre 2011 e 2013 verificando as variações no perfil cromatográfico de cada uma delas utilizando como padrão as Discarinas-C (41) e -B (42), além do Discareno-C (44), da Frangulanina (45), Frangufolina (46) isoladas novamente durante o Doutorado, bem como a Discarina-D (43) e a Adouetina Y' (47) isoladas também durante este trabalho.

Para cada padrão foram preparadas cinco diferentes concentrações e analisadas em triplicata no sistema solvente acima para a análise a obtenção dos cinco pontos de calibração de cada um dos sete alcaloides ciclopeptídicos, como mostra a Tabela 14. As curvas de calibração se encontram na Lista de Apêndices.

Tabela 14: Equações de regressão linear e intervalo de concentrações, n=5

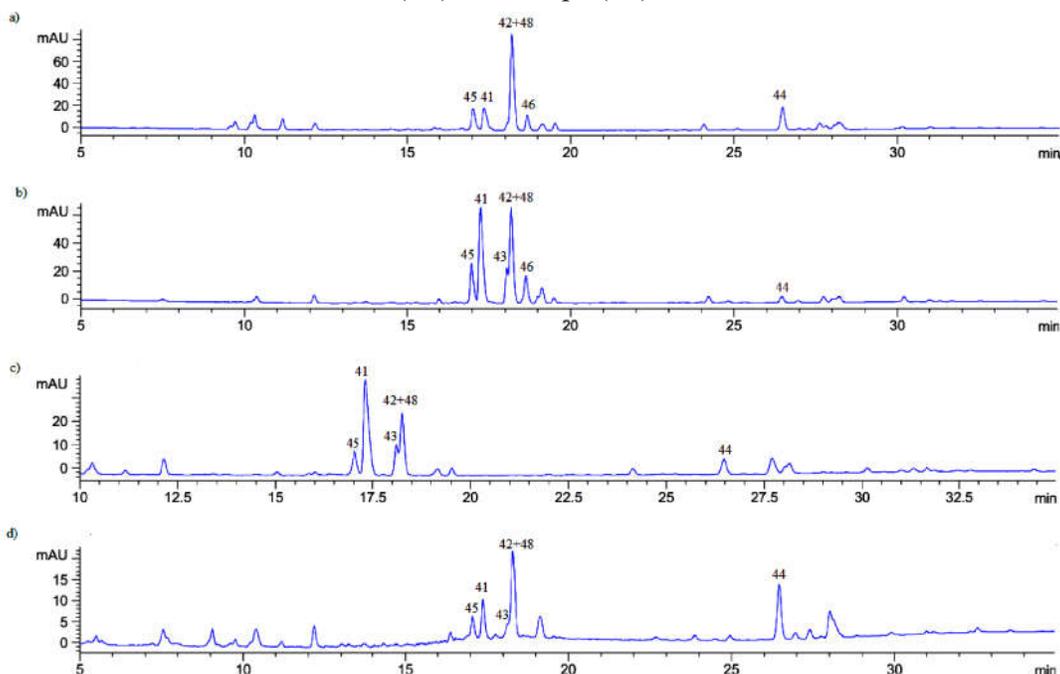
Padrões	Equação de Regressão	r ²	Intervalo de [] mg/mL	Tempo de Retenção (min.)
41	$y=3239,5*x + 64,467$	0,9939	0,72 – 0,0072	17,314
42	$y=6268,1*x + 87,008$	0,9973	0,51 – 0,0051	18,268
43	$y= 3083,1*x + 41,507$	0,9983	0,61 – 0,0061	18,162
44	$y=4664,1*x + 33,894$	0,995	0,34 – 0,0034	26,512
45	$y= 2577,4*x + 54,721$	0,9964	074 – 0,0074	16,979
46	$y= 2377*x + 43,167$	0,9951	0,52 – 0,0052	18,644
47	$y=1939,3*x + 10,14$	0,9979	0,24 – 0,0024	18,235

Como é possível verificar na Tabela 14, os tempos de retenção dos alcaloides ciclopeptídicos **42**, **43** e **47** são muito próximos sendo que seus picos ficam sobrepostos e, por isso, não foi possível realizar a quantificação mas foram identificados por meio de co injeções nas FBEAT. Embora tenham sido testados outros sistemas solventes, infelizmente, não houve sucesso na separação dos mesmos. Dessa forma, foram determinadas as quantidades dos padrões **41**, **44**, **45** e **46** cujos dados estão demonstrados na Tabela 15. Na Figura 11, é possível perceber que **42** e **43** estão presentes em todas as FBEAT e **47** não aparece na SL09/11. Além disso, somente nas coletas de coleta de SS08/13, e na coleta de SL04/11 não há a presença de **46**.

Tabela 15: Conteúdo dos padrões em diferentes frações

FBEAT	[] em mg/g			
	41	45	46	44
SL 09/11	203,77	88,76	50,37	60,83
SS 05/11	7,03	44,94	80,52	4,02
SS 08/13	38,22	29,46	-	10,96
SL 04/11	17,69	7,08	-	15,60

Figura 12: CLAE das frações AT das coletas dos municípios de Santana do Livramento (SL) e São Sepé (SS).



CLAE das FBEAT: a) coleta de SL 09/11, B) coleta de SS 05/11, c) coleta de SS 08/13, d) coleta de SL 04/11.

De acordo com os dados obtidos, Tabela 15, é possível verificar as diferentes concentrações de cada padrão em cada uma das frações. Na FBEAT, SL09/11, a quantidade de **41**, que é de 203,77 mg/g, é de quase 200 mg/g a mais que nas outras frações. Além disso, se compararmos as coletas SL09/11 e SL04/11, ambas de Santana do Livramento, RS, a quantidade da primeira em relação a segunda é de 186,08 mg/g de fração, indicado que a época do ano influencia na produção do alcaloide (em setembro é a época de floração da *D. americana*). Essa relação quantidade/época do ano também pode ser vista nas coletas de São Sepé, SS08/13 (38,22 mg/g) e SS05/11 (7,03 mg/g). As concentrações maiores são dentro do período que compreende o inverno o que pode indicar que a planta produz mais essa substância nesse período para alguma necessidade de defesa. Por outro lado, o local de coleta também indica a possibilidade do habitat influenciar na produção.

Para **45**, podemos verificar que no outono (Abril e Maio) há as menores quantidades indicando que a planta produz, assim como o alcaloide **41**, maiores quantidades no inverno. Já para **46**, a mesma situação não ocorre. Este alcaloide ciclopeptídico não é produzido em duas das plantas, nas coletas SS08/13 e SL04/11.

Ainda pode-se verificar a inversão da produção sendo que é produzido em maior quantidade no outono, ao contrário de **41** e **45**.

O ciclopeptídeo neutro **44** tem maior produção no mês de setembro, coleta SL09/11, e como o alcaloide ciclopeptídico **46**, não segue um padrão de produção quando comparado com os alcaloides ciclopeptídicos **41** e **45**. Assim, sua produção pode estar vinculada a época de floração para a planta e não com a estação do ano nem ao habitat.

5.2.2 *Scutia buxifolia*

Essa é uma análise preliminar do conteúdo presente na espécie *Scutia buxifolia*. Dessa forma, este trabalho pretende avaliar, de forma quantitativa, esta variabilidade levando em conta os locais de coleta e a época do ano em que foram realizadas as coletas das frações básicas etéreas alcaloides totais (FBEAT) de Lavras do Sul (LS01/14 e LS07/14), de Santana do Livramento (SL04/14, SL06/13, SL09/13S/E e SL09/13C/E), de Caçapava do Sul (CS10/13S/E e CS10/13C/E) e de São Sepé (SS08/13).

As análises de CLAE foram realizadas em conforme descrito no item 4.1.4.1. A Tabela 16 indica os tempos de retenção dos padrões dos alcaloides utilizados, bem como a equação da reta (regressão Linear) para esta análise. Os padrões aqui utilizados da *Scutia buxifolia* são os alcaloides ciclopeptídicos Scutianina-N (**48**), -P (**49**) e Aralionina-B (**50**) (Condalina-A), os ciclopeptídeos neutros Scutianeno-X (**13**) e -Z (**15**), o precursor de alcaloides ciclopeptídicos Scutianina-Q (**51**) e a β -hidroxiamida (R)-(-)Tembamida (**38**). O ciclopeptídeo neutro Scutianeno-Y (**72**) não foi utilizado nesta análise devido a sua não solubilidade no solvente utilizado. Nos cromatogramas **a** e **b** da Figura 13 os picos referentes aos alcaloides ciclopeptídicos **48** e **49** ficaram sobrepostos e, dessa forma, não foi possível fazer a quantificação destas coletas sendo, portanto, somente identificados.

Assim como para a espécie *D. americana*, foram preparadas cinco diferentes concentrações, para cada padrão, e analisadas em triplicata no sistema solvente acima para a obtenção dos cinco pontos de calibração de cada um dos sete alcaloides ciclopeptídicos, como mostra a Tabela 16. As curvas de calibração se encontram na Lista de Apêndices.

Tabela 16: Equações de regressão linear e intervalo de concentrações, n=5

Padrões	Equação de Regressão	r²	Intervalo de [] mg/mL	Tempo de Retenção (min.)
48	$y = 3248,3 * x + 54,007$	0,9982	0,63 – 0,0063	16,078
49	$y = 3234,8 * x + 68,618$	0,9936	0,62 – 0,0062	16,219
50	$y = 1584,2 * x + 9,2054$	0,9994	0,57 – 0,0057	17,976
51	$y = 10527 * x + 28,554$	0,9999	0,67 – 0,0067	18,171
38	$y = 3813 * x + 70,283$	0,9961	0,56 – 0,0056	15,838
13	$y = 10646 * x + 247,36$	0,9928	0,60 – 0,0060	23,179
15	$y = 9747,2 * x + 32,9$	0,9996	0,44 – 0,0044	25,519

A Tabela 17 apresenta o conteúdo dos padrões nas diferentes frações de diferentes épocas do ano e locais.

Tabela 17: Conteúdo dos padrões em diferentes frações

FBEAT	[] em mg/g de FBEAT						
	48	49	50	51	38	13	15
SL06/13	6,10	14,23	1,70	14,16	-	3,83	130,83
SS08/13	-	-	-	4,11	-	6,05	-
SL09/13 S/E	-	-	-	-	2,95	15,44	-
SL09/13 C/E	5,15	38,80	-	-	-	121,85	-
CS10/13 C/E	-	-	136,13	43,77	112,53	-	30,28
CS10/13 S/E	-	-	111,30	29,92	12,57	17,01	87,55
SL04/14	0,20	-	-	18,29	-	-	1,27
LS07/13	14,10	22,29	190,42	125,60	2,67	-	19,17
LS01/14	-	-	-	100,18	-	-	21,90

Com base nos dados da Tabela 17 e na Figura 13, é possível perceber uma grande variabilidade na produção dos metabólitos sendo, a maior produção dos alcaloides ciclopeptídicos no inverno (coletas SL 06/13, LS 07/13, SS08/13, SL 09/13 (C/E e S/E)) variando a quantidade produzida, dependendo do local e o período do inverno. O que pode ser observado na coleta SL 07/13 é que houve uma demanda maior de alguns alcaloides ciclopeptídicos, ou seja, houve a produção de praticamente todos os

alcaloides ciclopeptídicos e da amida **38**, apenas com a exceção do ciclopeptideo neutro **13**.

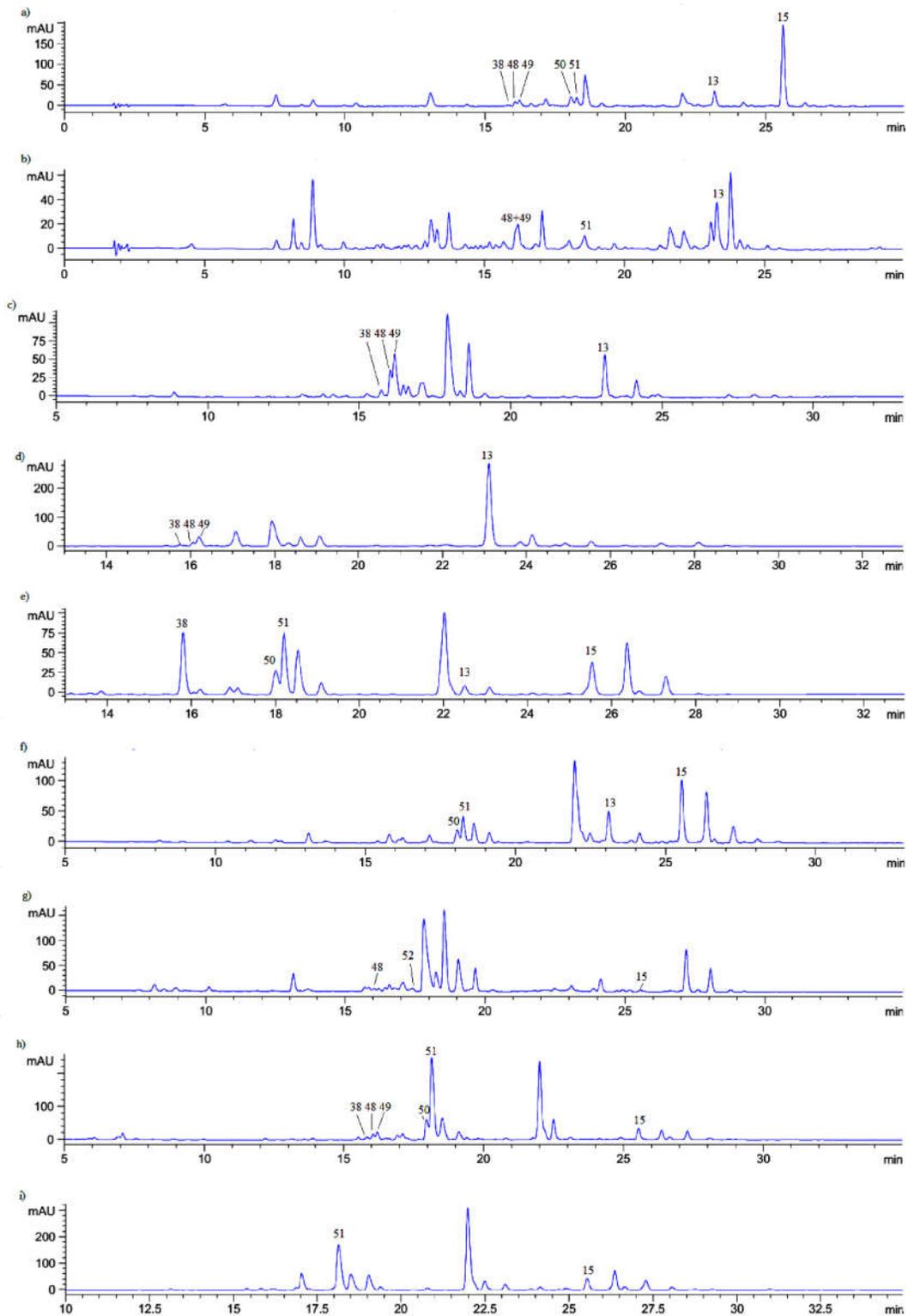
Já no mês de Setembro, coletas de Santana do Livramento (SL09/13 com espinho e sem espinho), foram produzidos **48** (37,04 mg/g), **49** (98,04 mg/g) e **13** (121,85 mg/g) em maior quantidade quando comparado com as outras coletas. Contudo, nessas mesmas coletas pode-se observar que há variações de uma planta para a outra, o que pode indicar que a presença do espinho proporciona uma maior proteção à planta e, por isso, não haveria a necessidade da produção em maior escala dos alcaloides ciclopeptídicos **48** e **49**. Outro dado intrigante, porém, é que na planta com espinho há uma maior produção do ciclopeptideo neutro **13** o que pode sugerir que a produção deste metabólito pode não estar ligada a defesa e sim a outra necessidade da planta.

O ciclopeptideo neutro **15** teve sua maior produção em junho (130,83 mg/g) e sua segunda maior produção foi em outubro, coletas de Caçapava do Sul CS10/13 C/E (30,28 mg/g) e CS10/13 S/E (87,55 mg/g). Essa maior produção pode ser em decorrência da agressão sofrida devido ao frio intenso que ocorre na região no mês de junho e em outubro poderia ser por coincidir com a época de floração.

Com relação ao peptídeo **51**, o que se percebe é o pico de produção nos meses de janeiro (100 mg/g) e julho (125,60 mg/g) períodos em que ocorrem temperaturas extremas de calor e de frio e, possivelmente, requerem maior produção de alcaloides. Este peptídeo também foi produzido, em menor escala, nos meses de abril (18,29 mg/g), de junho (14,16 mg/g), de agosto (4,11 mg/g) e de outubro (43,77 mg/g e 29,92 mg/g).

A amida **38**, isolada pela primeira vez nesta espécie e, também, na família Rhamnaceae vem sendo produzida principalmente no mês de outubro (112,53 mg/g e 12,57 mg/g) porém, foi possível verificar sua produção nesta época do ano somente no município de Caçapava do Sul, RS. **38** também foi encontrado nas coletas SL09/13 S/E (2,95 mg/g) e LS07/13 (2,67 mg/g) mas, como pode ser percebido, em quantidade muito menor.

Figura 13: CLAE das frações AT das coletas dos municípios de Caçapava do Sul, Lavras do Sul, Santana do Livramento e São Sepé.



CLAE das FBEAT: a) coleta SL06/13, b) coleta SS08/13, c) coleta SL09/13 S/E, d) coleta SL 09/13 C/E, e) coleta CS 10/13 C/E, f) coleta CS 10/13 S/E, g) coleta SL 04/14, h) coleta LS 07/13 e, i) coleta LS 01/14.

5.3 METABÓLITOS ISOLADOS

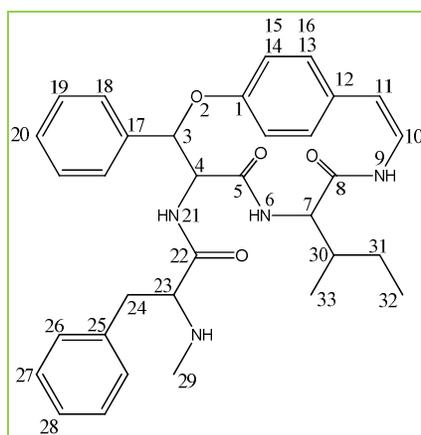
Aqui serão discutidos os espectros dos compostos isolados de estrutura desconhecida, os peptídeos S18 e S04, e do alcaloide ciclopeptídico S02. Os demais alcaloides ciclopeptídicos e ciclopeptídeos neutros não terão seus espectros discutidos pois suas estruturas estão bem definidas e já descritas na literatura. Seus dados de RMN de ^1H e ^{13}C estão descritos na parte experimental e seus espectros estão na Lista de Apêndices.

5.3.1 Alcaloide Ciclopeptídico

5.3.1.1 Aralionina B, S02 (50)

Este metabólito foi isolado da FBEAT, obtida do fracionamento ácido-base do extrato bruto, conforme descrito na página 40, das cascas do caule da espécie *Scutia buxifolia*. O mesmo foi identificado por meio de dados de RMN ^1H e ^{13}C , assim como por comparação com dados obtidos da literatura (ARBAIN e TAYLOR, 1993; TSCHESCHE, KAUBMANN e FELHABER, 1970).

Figura 14: Estrutura do alcaloide ciclopeptídico Aralionina B.



Os espectros de RMN de ^1H e COSY (Figuras 15 e 16) permitiram verificar a presença das unidades β -hidroxifenilserina, *N*-metil fenilalanina e o resíduo aminoácido

isoleucina. Para confirmar a presença da unidade β -hidroxifenilserina foi utilizado o hidrogênio β -carbonílico H-3 como ponto de partida. Este hidrogênio aparece na forma de um simplete em δ 5,76 ppm o qual tem correlação somente com o hidrogênio α -carbonílico H-4 (dd, $J= 1,6, 10,0$), que aparece na forma de um duplo duplete pela correlação com o hidrogênio amídico NH-21 (δ 7,94 ppm, d, $J= 10,0$) e com o H-3, constatando este sistema de spins.

Figura 15: Espectro de RMN de ^1H do alcaloide ciclopeptídico Aralionina B, em DMSO-d^6 a 400 MHz.

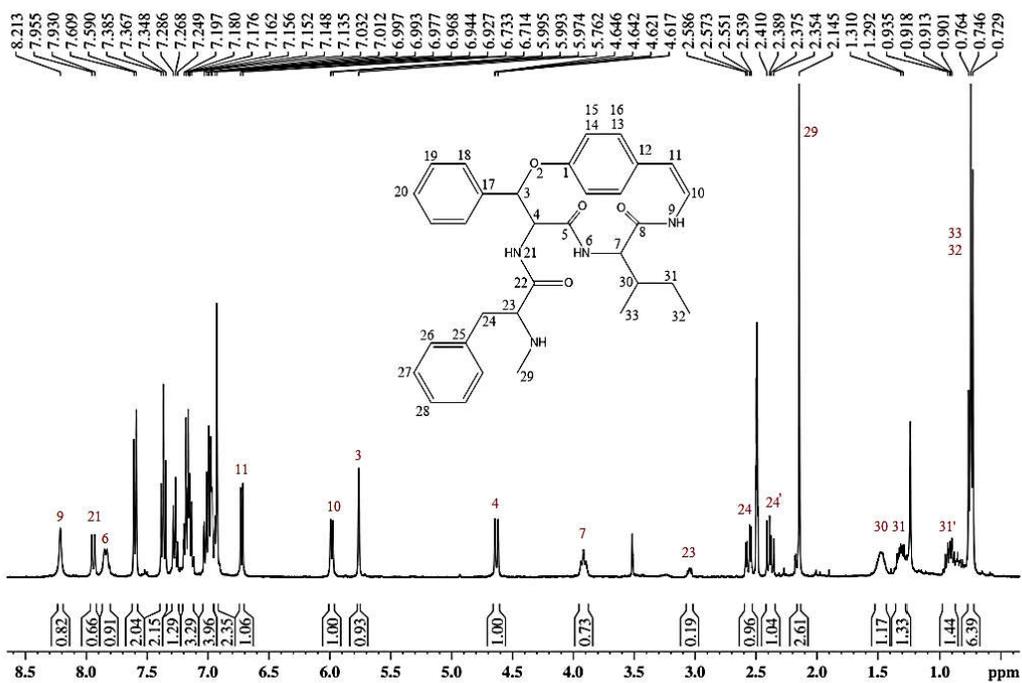
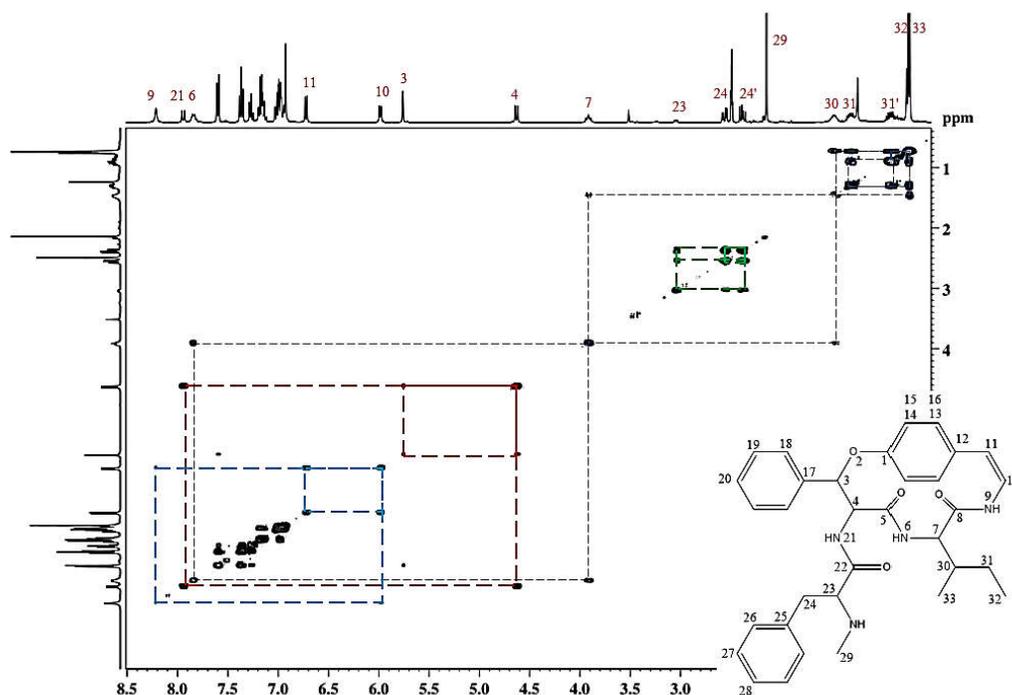


Figura 16: Espectro de COSY do alcaloide ciclopeptídico Aralionina B, em DMSO-d⁶ a 400 MHz.



Já a unidade *N*-metil fenilalanina foi determinada a partir do hidrogênio metínico H-23, δ 3,05 ppm, dd, $J=5,6, 8,4$ Hz, o qual aparece na forma de um duplo duplete pela correlação com os hidrogênios metínicos diastereotópicos H-24 e H-24' que também aparecem na forma de um duplo duplete com constante de acoplamento $J_{24,23}=5,2$ Hz e $J_{24,24'}=14,0$ Hz para H-24 (δ 2,56 ppm) e $J_{24,23}=8,4$ Hz e $J_{24,24'}=14,0$ Hz para H-24' (δ 2,38 ppm) (Figuras 17, 18 e 19), pelo acoplamento com somente o H-23.

Ainda na Figura 17, podemos perceber os sinais da unidade de aminoácido isoleucina através das correlações entre os hidrogênios metínicos H-7 e H-30, os hidrogênios metilênicos H-31 e H-31' e, as metilas Me-32 e -33. O H-7 aparece na forma de um triplete pela correlação com o hidrogênio amídico NH-6 (δ 7,60 ppm, d, $J=8,8$ Hz), Figura 22 (expansão do espectro de COSY), e com o hidrogênio metínico H-30, o qual aparece na forma de um multiplete pela sua correlação com o H-7, com a Me-33 (δ 0,75 ppm) e com os hidrogênios diastereotópicos H-31 e H-31', ambos aparecem na forma de um multiplete em δ 0,92 ppm (H-31') e δ 1,31 ppm (H-31) e fazem correlação com a Me-32. Na Figura 19 é possível verificar essa correlação da unidade isoleucina de forma mais efetiva.

Figura 17: Expansão do espectro de COSY do alcaloide ciclopeptídico Aralionina B, em DMSO-d⁶ a 400 MHz.

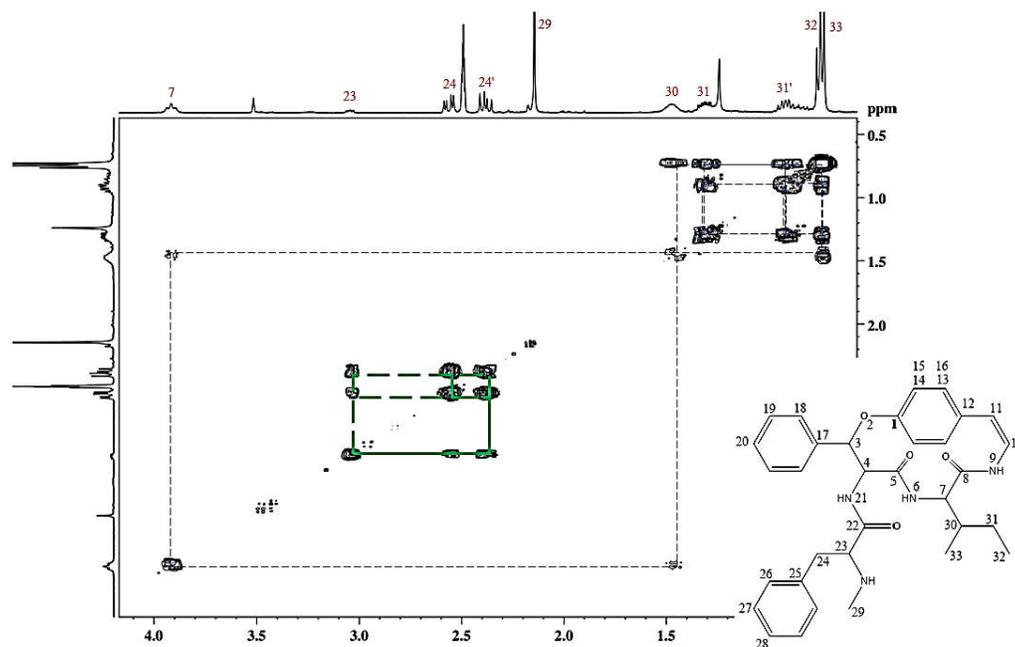


Figura 18: Expansão espectro de RMN ¹H do alcaloide ciclopeptídico Aralionina B, em DMSO-d⁶ a 400 MHz.

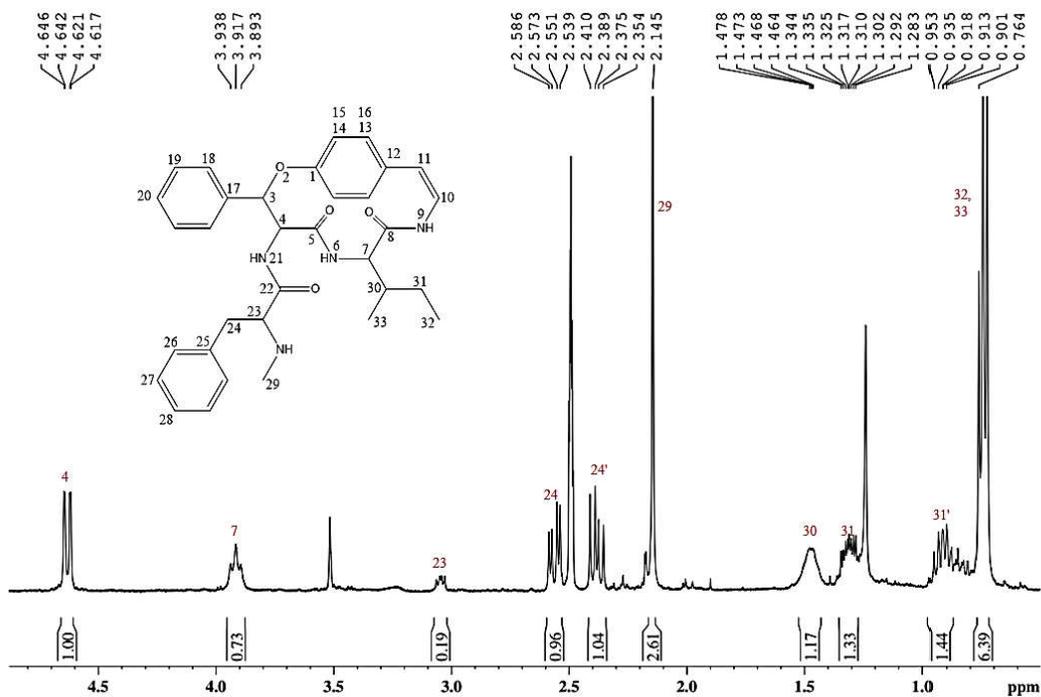


Figura 19: Expansão espectro de RMN ^1H do alcaloide ciclopeptídico Aralionina B, em DMSO-d^6 a 400 MHz.

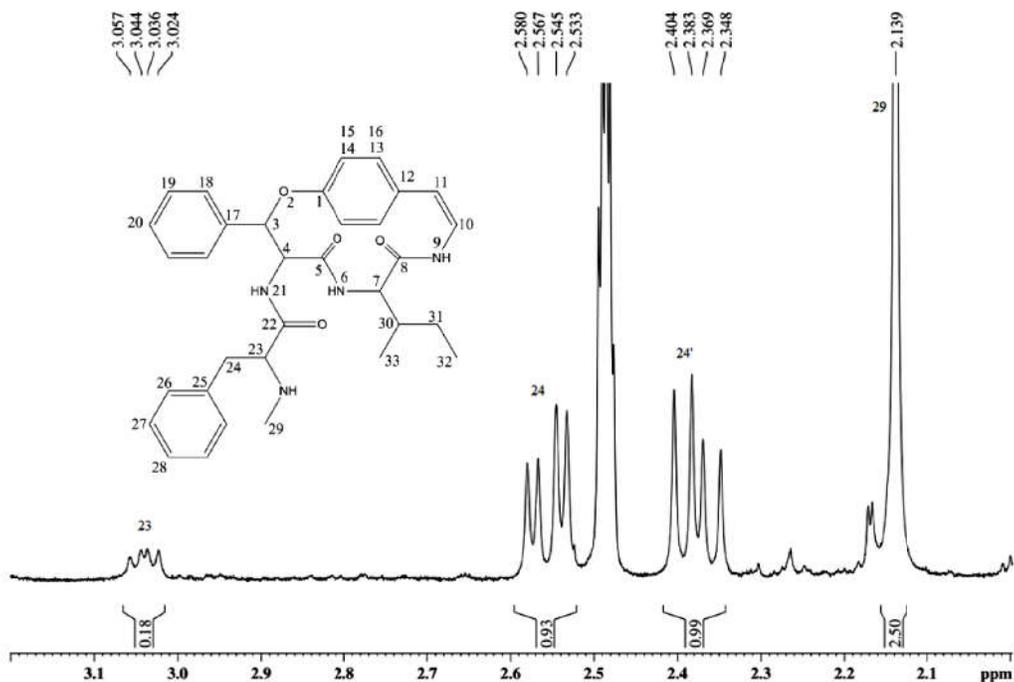
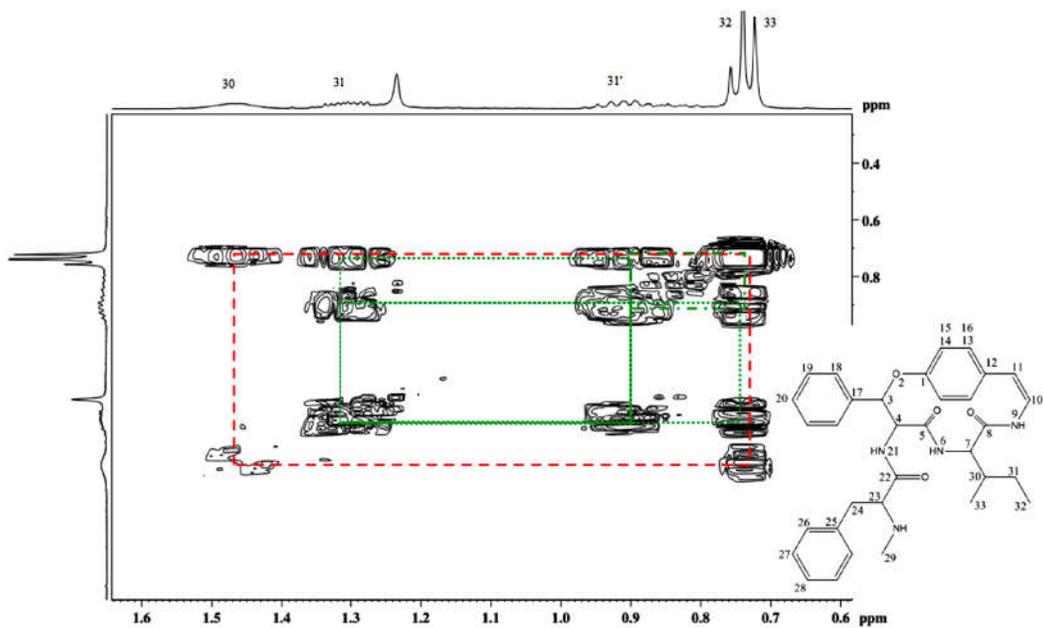


Figura 20: Expansão do espectro de COSY do alcaloide ciclopeptídico Aralionina B, em DMSO-d^6 a 400 MHz.



Na região compreendida entre δ 5,90 e 8,30 ppm estão os hidrogênios aromáticos, olefínicos e amídicos. Os sinais correspondentes aos hidrogênios olefínicos

H-10 e H-11 e, o hidrogênio amídico NH-9, que fazem parte do anel macrocíclico do alcaloide ciclopeptídico Aralionina-B. O hidrogênio H-11 (δ 6,72 ppm, d, $J=7,6\text{Hz}$) apresenta correlação com H-10 (δ 5,98 ppm, d, $J=8,4\text{Hz}$) ambos na forma de um duplete. H-10 também tem correlação com o hidrogênio amídico NH-9 o qual aparece na forma de um simplete em δ 8,21ppm, Figura 22.

Nas figuras 21 e 22 (expansões dos espectros de ^1H e de COSY, respectivamente) os sinais dos hidrogênios aromáticos aparecem entre δ 6,89 e 7,63 ppm. O anel pertencente à unidade β -hidroxifenilserina teve seus sinais atribuídos com o auxílio dos espectros HMBC e HMQC (Figuras 22 e 23). Os hidrogênios H-18 e H-18' aparecem na forma de um duplete em δ 7,60 ppm (d, $J= 7,6\text{Hz}$) pela correlação com os hidrogênios H-19 e H-19' (δ 7,37 ppm, t, $J= 7,2\text{Hz}$) os quais aparecem na forma de um triplete pois se correlacionam também com o hidrogênio H-20 (δ 7,37 ppm). No entanto, não foi possível a atribuição dos sinais dos hidrogênios aromáticos do anel do sistema macrocíclico bem como, os sinais do anel da unidade *N*-metil fenilalanina devido a sobreposição dos sinais.

Figura 21: Expansão do espectro de RMN ^1H do alcaloide ciclopeptídico Aralionina B, em DMSO-d^6 a 400 MHz.

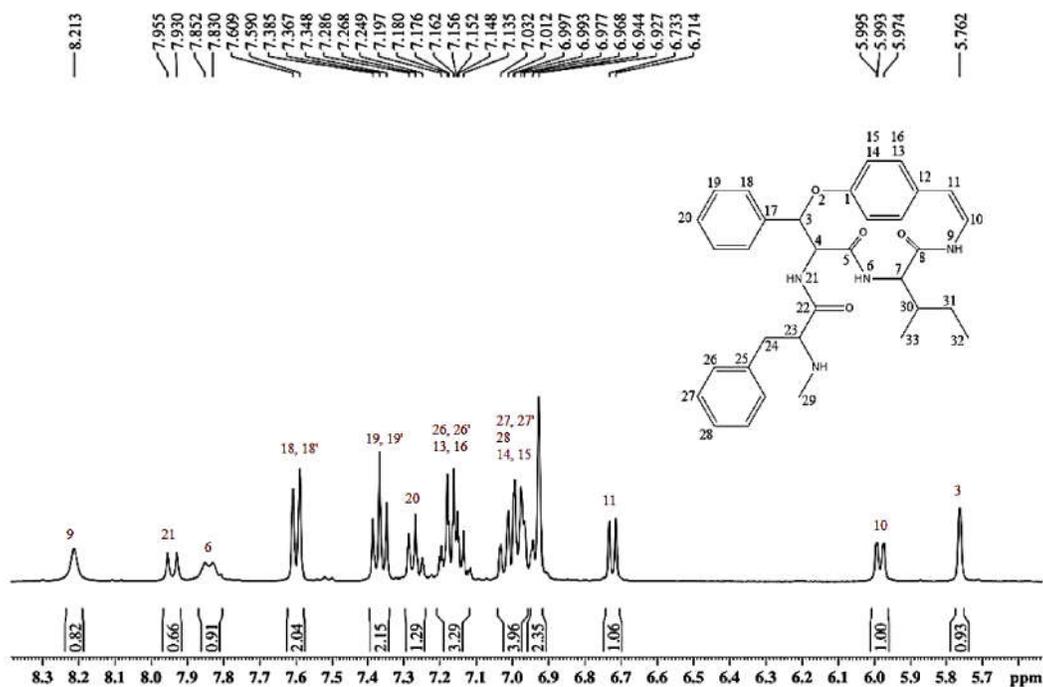
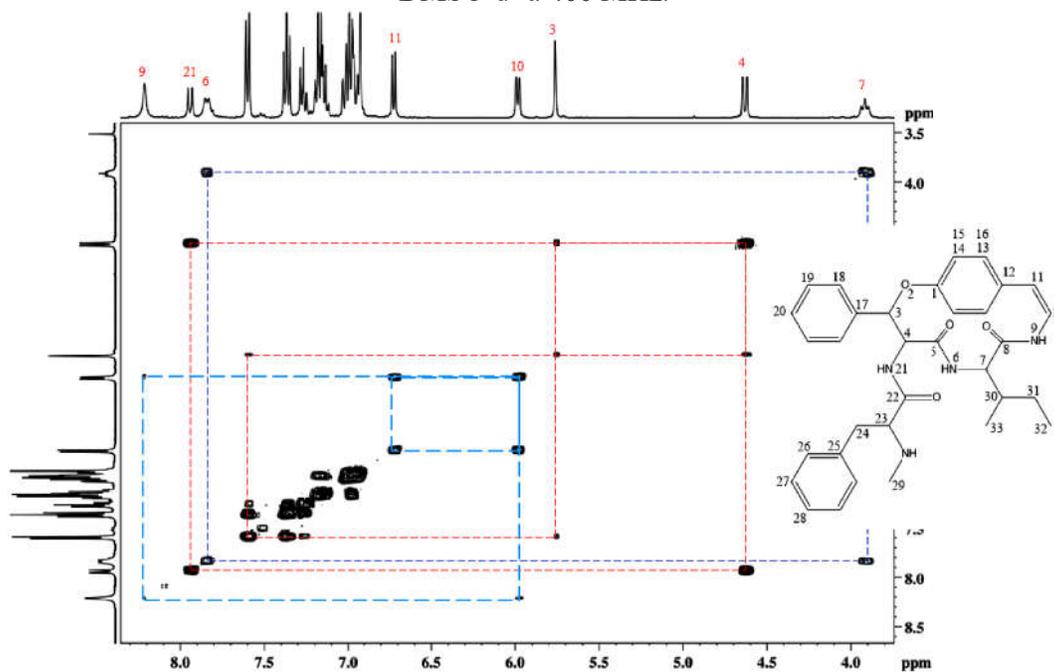
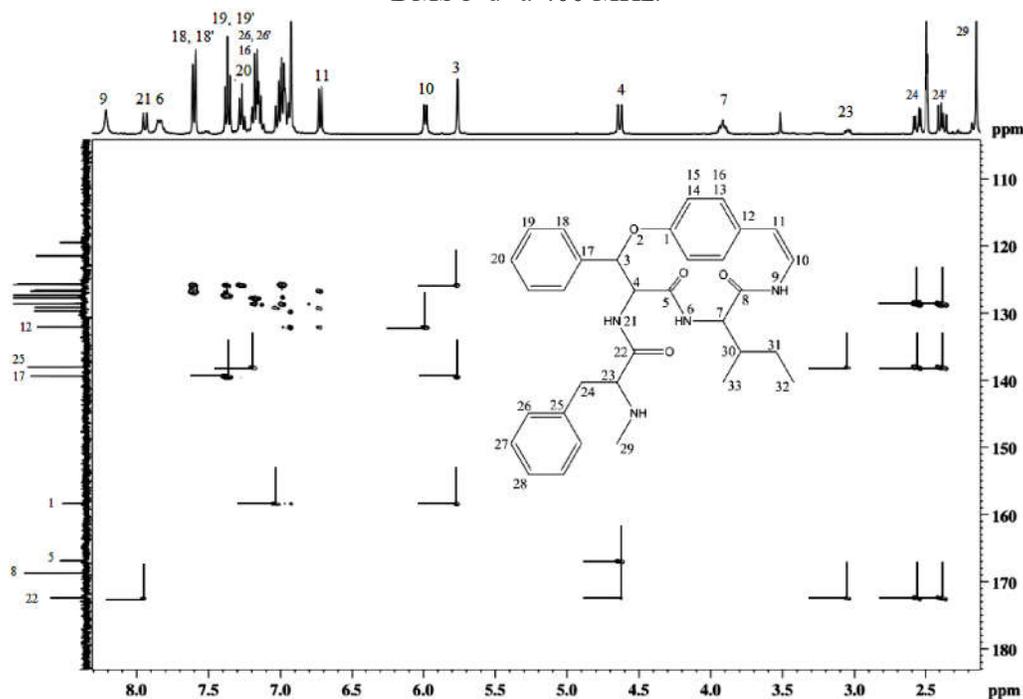


Figura 22: Expansão do espectro de COSY do alcaloide ciclopeptídico Aralionina B, em DMSO-d⁶ a 400 MHz.



Com o auxílio dos espectros HMBC e HMQC foi possível atribuir os sinais dos carbonos. Os sinais dos carbonos aromáticos, olefínicos e carbonílicos aparecem na região compreendida entre 115 e 173 ppm. A atribuição da carbonila C-22 foi feita por meio da sua correlação com os hidrogênios diastereotópicos H-24 e H-24' bem como devido a sua correlação com o hidrogênio amídico NH-21. Já a carbonila C-5 foi atribuída por sua correlação com o hidrogênio metínico H-4, Figura 23 (expansão do espectro de HMBC).

Figura 23: Expansão do espectro HMBC do alcaloide ciclopeptídico Aralionina B, em DMSO-d⁶ a 400 MHz.



A atribuição dos sinais dos carbonos aromáticos foi feita a partir do sinal do hidrogênio metínico H-3 que apresenta correlação com os carbonos C-18/-18' bem como com o carbono quaternário C-17. O C-17 por sua vez, apresenta correlação com os hidrogênios aromáticos H-19/-19'. Estes apresentam correlação com H-20 que também tem correlação com os carbonos C-18/18'.

Os sinais dos carbonos que se referem ao anel da unidade *N*-metil fenilalanina foram atribuídos partindo da correlação apresentada do carbono quaternário C-25 com os hidrogênios aromáticos H-26/-26' e H-27/27'. O carbono C-28 foi atribuído por sua correlação com H-27/27' (Figura 24).

Os sinais dos carbonos do anel pertencente ao macro ciclo foram determinados a partir do sinal do hidrogênio olefínico H-11 que apresenta correlação com o C-12 e com os carbonos C-13 e C-14. Já os carbonos C-15 e C-16, deste mesmo anel, não apresentaram correlação com nenhum hidrogênio.

Assim, através dos espectros de HMBC e HMQC foram atribuídos os sinais de todos os hidrogênios e carbonos pertencentes a esta estrutura aqui proposta. Nas Figuras 24 e 25 estão atribuídos os sinais dos hidrogênios e carbonos aromáticos e olefínicos. Já

a identificação dos sinais dos demais carbonos e hidrogênios pode ser visualizada nas Figuras 26 e 27.

Figura 24: Expansão do espectro HMBC do alcaloide ciclopeptídico Aralionina B, em DMSO-d⁶ a 400 MHz.

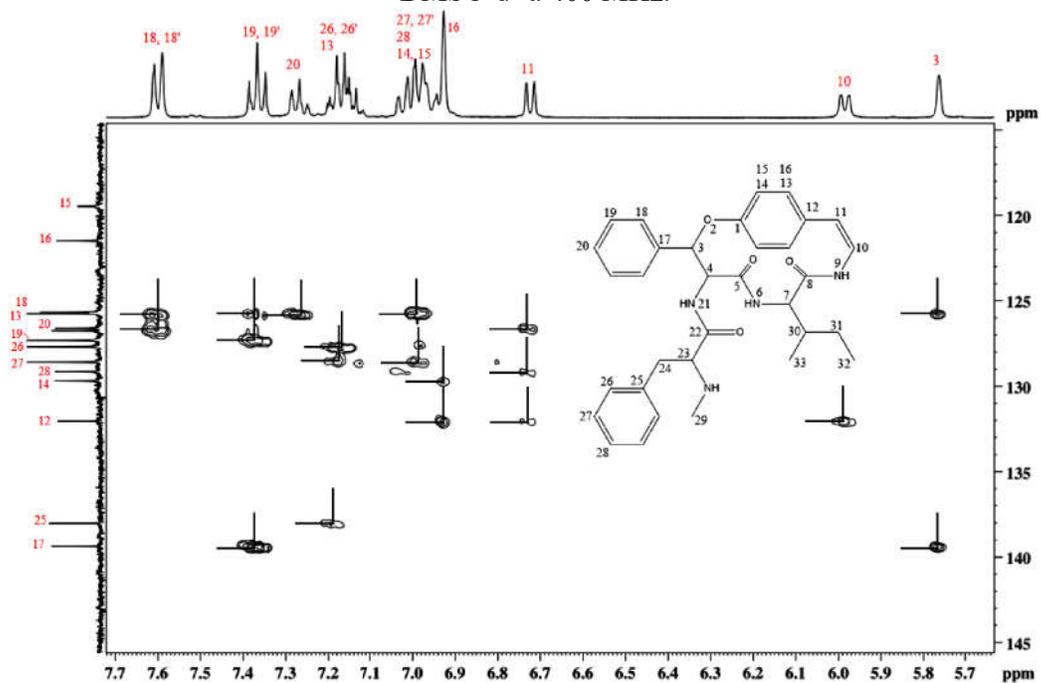


Figura 25: Expansão do espectro HMQC do alcaloide ciclopeptídico Aralionina B, em DMSO-d⁶ a 400 MHz.

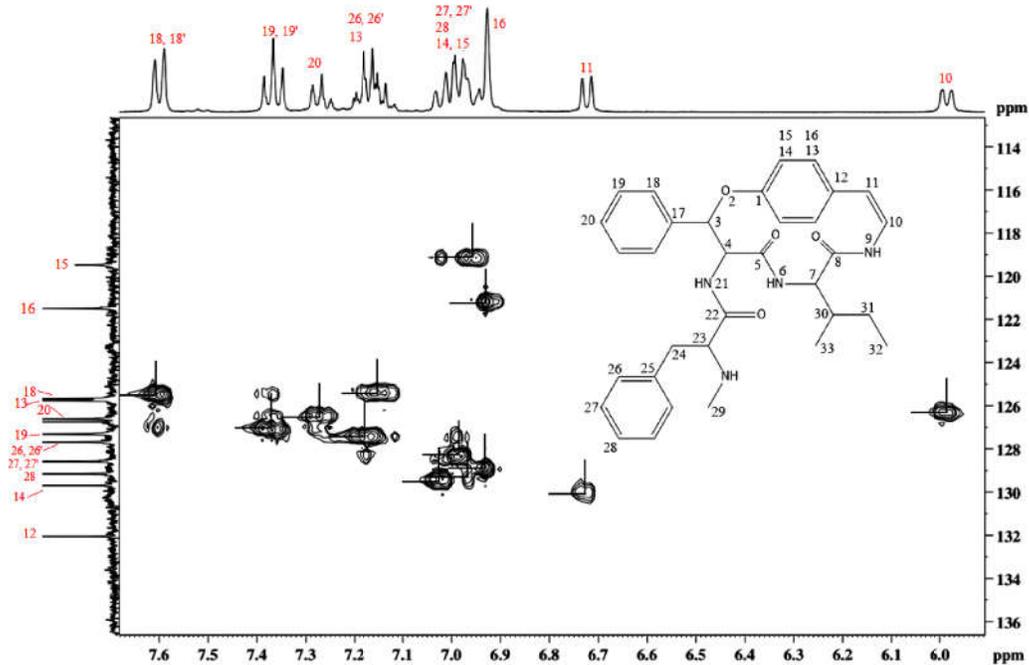


Figura 26: Expansão do espectro HMBC do alcaloide ciclopeptídico Aralionina B, em DMSO-d⁶ a 400 MHz.

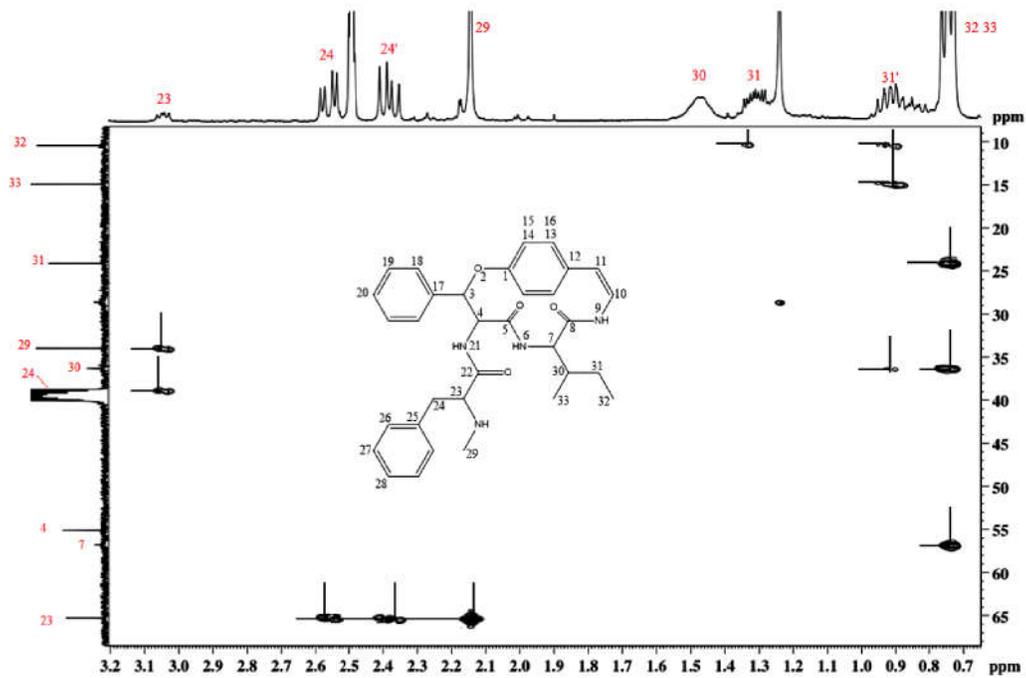
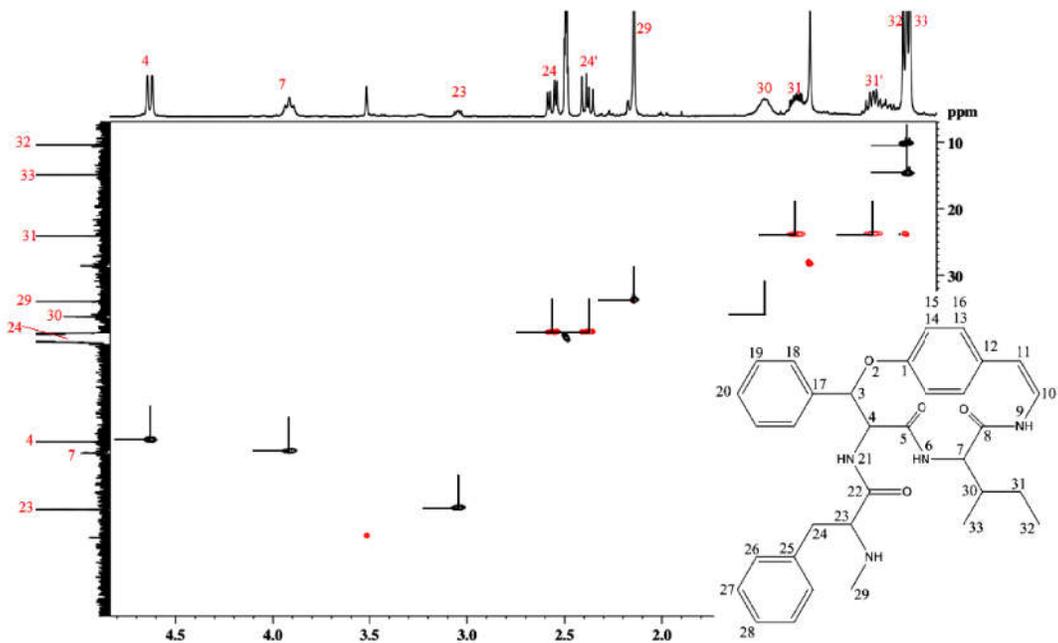


Figura 27: Expansão do espectro HMQC do alcaloide ciclopeptídico Aralionina B, em DMSO-d⁶ a 400 MHz.



No espectro de RMN de ^{13}C aparecem 28 sinais sendo que, na região compreendida entre δ 119 e 140 ppm, existem sinais com maior intensidade indicando que há dois núcleos, dando um total de 33 carbonos, confirmando a estrutura proposta. No espectro de RMN DEPT 135° aparecem somente os sinais dos carbonos aromáticos, olefinicos, metílicos, metínicos e metilênicos estando, portanto, ausentes os carbonos desidrogenados o que possibilitou a identificação dos mesmos, Figuras 28 e 29.

Figura 28: Espectro de ^{13}C do alcaloide ciclopeptídico Aralionina B, em DMSO-d^6 a 400 MHz.

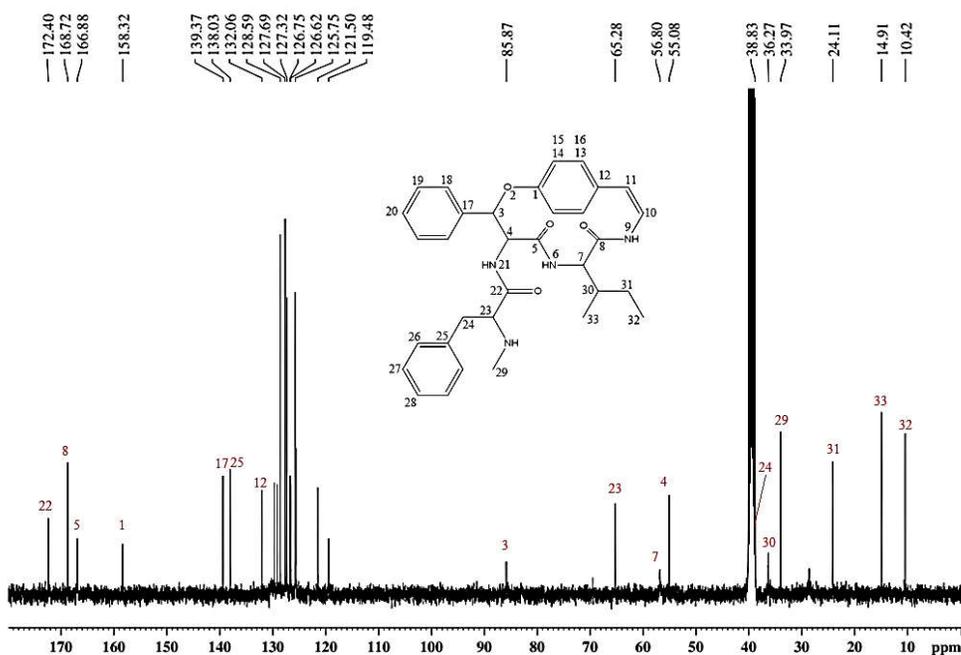


Figura 29: Espectro de DEPT 135° do alcaloide ciclopeptídico Aralionina B, em DMSO-d⁶ a 400 MHz.

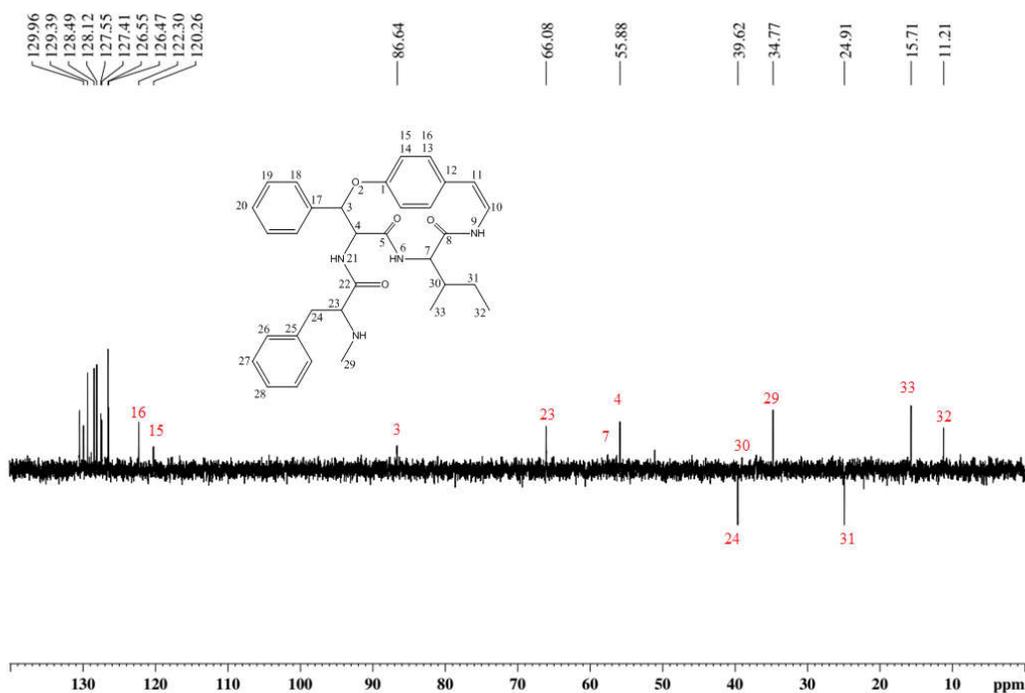


Tabela 18: Dados de RMN de ¹H do alcaloide ciclopeptídico Aralionina B, em DMSO-d⁶ a 400 MHz.

Posição	δ_H ppm	δ_H ppm ^a	δ_H ppm ^b
1	-	-	-
2	-	-	-
3	5,76 (s)	5,75 (s)	5,81(s)
4	4,63 (dd, $J=1,6, 10,0$ Hz)	4,69 (d, $J=9,2$ Hz)	4,58 (d, $J=9,2$ Hz)
5	-	-	-
6	7,60 (d, $J=8,8$ Hz)	8,03 (d, $J=9,0$ Hz)	8,03 (d, $J=9,0$ Hz)
7	3,92 (t, $J=8,4$ Hz)	3,95 (dd, $J=4,4, 9,0$ Hz)	3,90 (dd, $J=4,4, 9,0$)
8	-	-	-
9	8,21 (s)	8,49 (s)	-
10	5,98 (d, $J=8,4$ Hz)	5,96 (d, $J=7,3, 9,0$ Hz)	6,03 (d, $J=7,6, 9,0$ Hz)
11	6,72 (d, $J=7,6$ Hz)	6,74 (d, $J=7,2$ Hz)	6,98 (d, $J=7,6$ Hz)
12	-	-	-
13	6,93-7,19	7,00	6,99
14	6,93-7,19	6,93	6,93
15	6,93-7,19	7,14	7,15
16	6,93-7,19	6,91	6,81
17	-	-	-

18/18'	7,60 (d, $J=7,6$ Hz)	7,58	7,58
19/19'	7,37 (t, $J=7,2$ Hz)	7,34	7,36
20	7,37	7,24	7,25
21	7,94 (d, $J=10,0$ Hz)	8,76 (d, $J=9,3$ Hz)	8,03 (d, $J=9,2$ Hz)
22	-	-	-
23	3,05 (dd, $J=5,6, 8,4$ Hz)	3,85 (dd, $J=5,6, 13,6$ Hz)	3,02(dd, $J=5,6, 13,6$)
24	2,56 (dd, $J=5,2, 14,0$ Hz)	3,02	2,52 (dd, $J=8,4, 13,6$)
24'	2,38 (dd, $J=8,4, 14,0$ Hz)	-	2,38 (dd, $J=5,6, 8,4$)
25	-	-	-
26/26'	6,93-7,19	7,0-7,5	7,0-7,5
27/27'	6,93-7,19	7,0-7,5	7,0-7,5
28	6,93-7,19	7,0-7,5	7,0-7,5
29	2,15 (s)	1,89 (s)	2,08 (s)
30	1,47 (m)	1,33 (m)	1,40 (m)
31	1,31 (m)	1,29 (m)	1,29
31'	0,92 (m)	0,92 (m)	0,86
32	0,75	0,78 (d, $J=6,5$)	0.83 (t) $J_{32,31}=6.5$
33	0,75	0,75 (t, $J=6,5$)	0.84 (d) $J_{33,30}=6.5$

^a (MALDANER, 2005)

^b (MOREL, ARAUJO, *et al.*, 2002)

Tabela 19: Dados de RMN ¹³C do alcaloide ciclopeptídico Aralionina B, em DMSO-d⁶ a 400 MHz.

Posição	δ_H ppm	δ_H ppm ^a	δ_H ppm ^b
1	158,32	159,2	158,6
2	-	-	-
3	85,87	86,0	86,3
4	55,08	56,0	55,3
5	166,88	166,7	167,0
6	-	-	-
7	56,80	57,2	56,8
8	168,72	168,4	169,2
9	-	-	-
10	126,75	131,9	131,4
11	128,59	127,3	126,9
12	132,06	132,8	132,4
13	119,48-127,69	130,0	129,4
14	119,48-127,69	125,0	124,4
15	119,48-127,69	120,2	119,8

16	119,48-127,69	122,2	121,7
17	139,37	139,9	139,7
18/18'	126,75	126,5	126,0
19/19'	127,69	127,9	127,6
20	127,32	127,6	127,0
21	-	-	-
22	172,40	173,0	176,6
23	65,28	63,0	64,5
24	38,83	37,4	39,2
25	138,03	137,0	138,2
26/26'	119,48-127,69	129,0	128,0
27/27'	119,48-127,69	129,8	129,9
28	119,48-127,69		
29	33,97	32,9	37,6
30	36,27	35,6	34,2
31	24,11	24,7	24,4
32	10,42	15,6	15,2
33	14,91	11,1	10,8

^a (MALDANER, 2005)

^b (MOREL, ARAUJO, *et al.*, 2002)

Após uma análise com dados obtidos através dos espectros de ¹H e de ¹³C mostrados acima, e da literatura podemos perceber algumas diferenças em alguns deslocamentos químicos, bem como nos pontos de fusão e dados de rotação ótica. Há descrito na literatura quatro alcaloides ciclopeptídicos com a mesma estrutura (Figura 14). O alcaloide ciclopeptídico Aralionina-B que foi isolada em 1970 por Tschesche (TSCHESCHE, KAUBMANN e FELHABER, 1970); AM-2, isolado em 1993 por Arbain (ARBAIN e TAYLOR, 1993); Condalina-A, isolado em 2002 (MOREL, ARAUJO, *et al.*, 2002) e descrito novamente em 2005 (MALDANER, 2005) e, finalmente a Scutianina-M (MOREL, MALDANER, *et al.*, 2005)).

As principais diferenças estão nos pontos de fusão. Os alcaloides Aralionina-B e Condalina-A possuem pontos de fusão muito próximos, 103-105 °C (1970), 115-116 °C (2002) mas, quando descrito por Maldaner, 2005, seu ponto de fusão foi 216-218°C. Enquanto, o alcaloide AM-2 e a Scutianina-M possuem pontos de fusão semelhantes, 257-258 °C e 257-259 °C, respectivamente. Já o ponto de fusão que obtive foi de 102,4 -104,6 °C.

Comparando os dados de RMN de ^1H e o ponto de fusão dos alcaloides AM-2 e Scutianina-M é possível verificar semelhanças o que pode indicar que sejam compostos idênticos. Já comparando os dados que obtive com os dados descritos por Maldaner, 2005, e MOREL, ARAUJO, *et al.*, 2002, conforme descrito nas Tabelas 18 e 19, é possível perceber algumas diferenças nos deslocamentos químicos da unidade *N*-metil fenilalanina, mais precisamente dos hidrogênios diastereotópicos H-24 e H-24'. Há, também, diferenças nos deslocamentos químicos dos hidrogênios amídicos NH-21 e nos deslocamentos químicos do carbono da carbonila C-22, no carbono C-29 e seu respectivo hidrogênio H-29 (pertencente a unidade *N*-metil). Além disso, a unidade isoleucina apresenta diferenças nos deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos H-30 e C-30, em um dos hidrogênios diastereotópicos H-31' bem como nos deslocamentos químicos dos carbonos metilênicos CH₃-32 e CH₃-33.

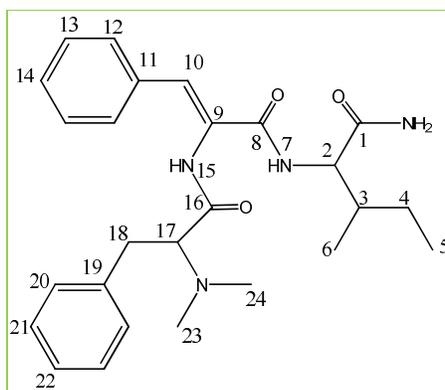
No entanto, o resultado da rotação óptica se mostrou muito próximo, -68° para o composto que isolei e descrito na Literatura como sendo -70° , a 20°C , tanto para Condalina-A quanto para Aralionina-B. Dessa forma, acredito que se trata do mesmo alcaloide ciclopeptídico.

5.3.2 Peptídeos

5.3.2.1 Scutianina-Q, S18 (51)

Scutianina-Q foi isolada da FBEAT obtida das cascas do caule da espécie *Scutia buxifolia* na forma de um sólido amarelo, conforme descrito na parte experimental (pág 40). Sua estrutura foi determinada por meio de RMN de ^1H e de ^{13}C , uni e bidimensionais e homo e heteronucleares e confirmada por difração de Raio-X. Seu peso molecular foi confirmado por espectrometria de massas de alta resolução.

Figura 30: Scutianina-Q (51)



A análise dos espectros de RMN deste metabólito mostra similaridade com espectros de outros alcaloides ciclopeptídicos isolados. Porém, não é observada a presença de dois carbonos e seus respectivos hidrogênios, C-3 e C-4, os quais são característicos dos alcaloides ciclopeptídicos de quatorze membros do tipo Integerrina, o que sugere um sistema não macro cíclico deste metabólito.

Assim, com base no espectro de RMN de ^1H é possível verificar a presença das unidades *N*, *N*-dimetilfenilalanina e isoleucina (Figura 31). Já no espectro de RMN de ^1H - ^1H , Cosy (Figura 32), é constatada as correlações dos hidrogênios H-2 (δ 4,44 ppm, dd, $J=4,8, 8,4$ Hz) que aparece na forma de um duplo duplete pela correlação com o hidrogênio amídico NH-7 (δ 6,45 ppm, d, $J= 8,4\text{Hz}$) e com o hidrogênio metínico H-3 (δ 2,12ppm, 1H, m). O H-3 por sua vez, aparece na forma de um multiplete devido a sua correlação com os hidrogênios diasterotópicos H-4/ H-4' (δ 1,46/1,03 ppm) e com os hidrogênios metilênicos CH_3 -6 (δ 0,96 ppm), o qual aparece na forma de um duplete. Para comprovar a presença da unidade isoleucina podemos verificar a correlação dos

hidrogênios diastereotópicos H-4/ H-4' com a metila CH₃-5 que aparece na forma de um triplete em δ 0,90 ppm (3H, t, $J=7,3$ Hz) finalizando este sistema de spins (Figura 33).

Figura 31: Espectro de RMN de ¹H de Scutianina-Q (**51**), em CDCl₃ a 400 MHz.

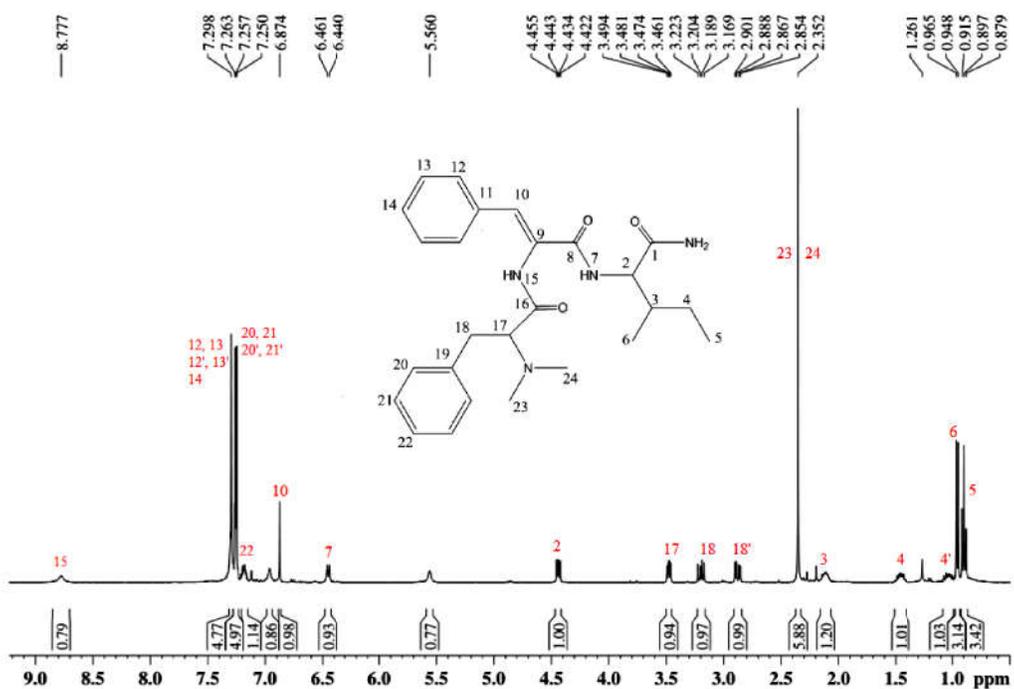


Figura 32: Espectro de RMN de Cosy, de Scutianina-Q (**51**), em CDCl₃ a 400 MHz.

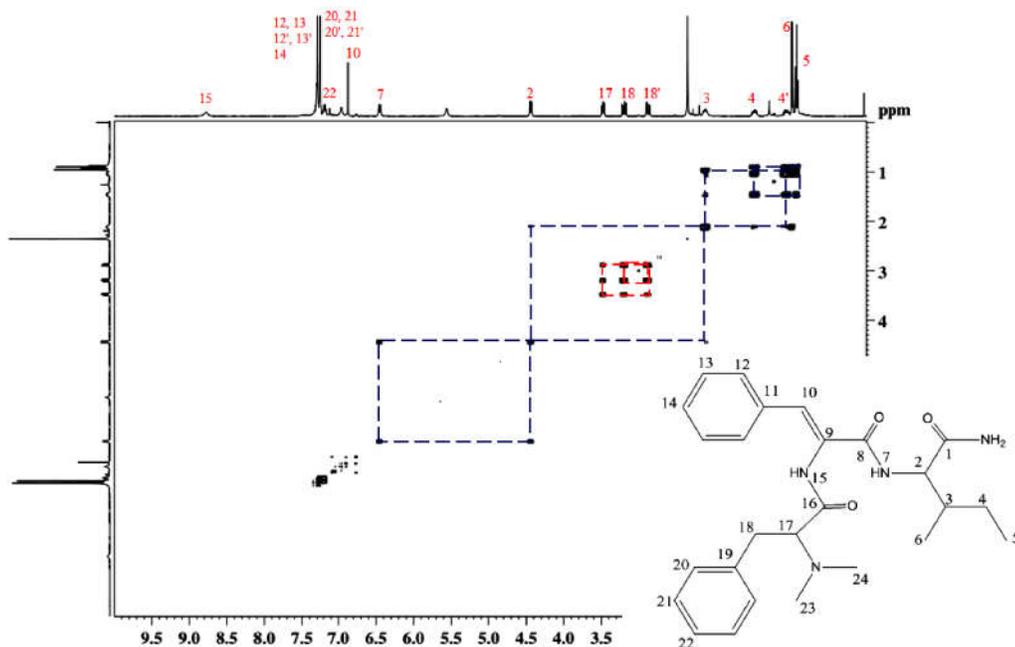
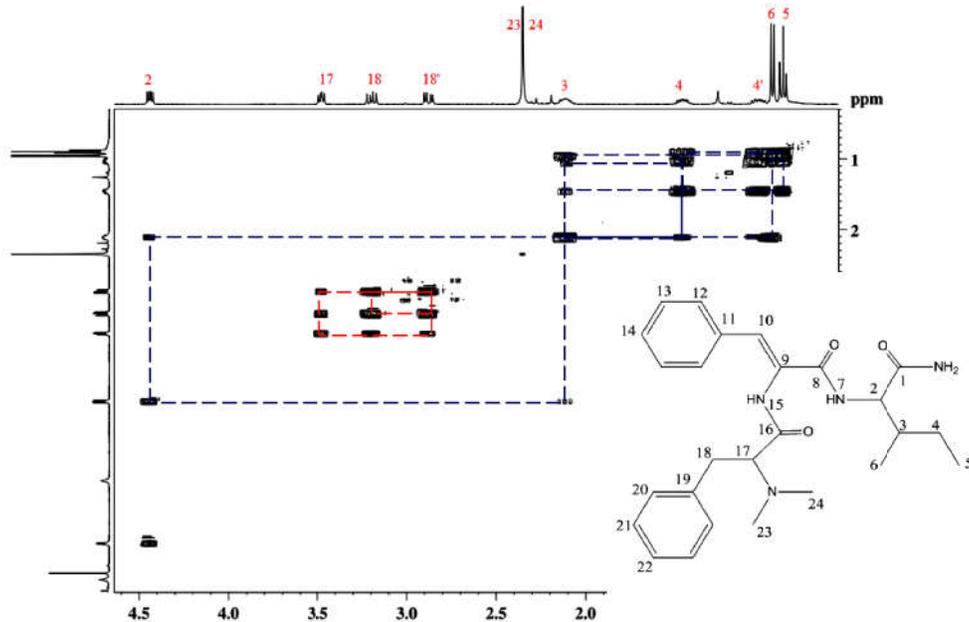


Figura 33: Expansão do espectro de RMN Cosy, de Scutianina-Q (**51**), em CDCl₃ a 400 MHz.



Ainda na Figura 33 podemos visualizar o outro sistema de spins o qual diz respeito à unidade *N,N*-dimetil fenilalanina, formada pelos hidrogênios diastereotópicos H-18 e H-18', que aparecem em δ 3,20 ppm (dd, $J=7,8, 13,9$ Hz) e em δ 2,88 ppm (dd, $J=5,2, 13,9$ Hz) na forma de duplo dupletes e, pelo hidrogênio metínico H-17 (δ 3,48 ppm, dd, $J=5,2, 7,8$ Hz), Figura 33. Nesta mesma região espectral aparece o sinal da unidade *N,N*-dimetil em δ 2,35ppm que corresponde as metilas (CH₃)₂-24 e -25.

As atribuições do sinal olefínico H-10 e dos hidrogênios aromáticos foram feitas através de HMBC e HMQC como mostra as Figuras 34 e 35. No espectro de HMBC podemos visualizar a correlação do H-10 com o C-8 da carbonila, este, por sua vez, também apresenta correlação com o hidrogênio amídico H-7 e o hidrogênio metínico H-2. Neste mesmo espectro é possível verificar a correlação do hidrogênio H-2 com o carbono C-1 da carbonila do grupamento amida.

Ainda na Figura 34, os sinais que correspondem aos hidrogênios H-17, H-18 e H18' permitiram fazer a atribuição da carbonila C-16 (172,5 ppm) bem como, atribuir os sinais dos carbonos aromáticos C-19, C-20 e C-20'. Os sinais dos carbonos C-21, C-21' foram atribuídos pelas suas correlações com os hidrogênios diastereotópicos H-18 e H-18', como mostra o espectro de HMBC (Figura 36). Já o sinal do C-22 foi

identificado por meio do espectro de HMQC e COSY, Figuras 34 e 32, respectivamente.

Figura 34: Expansão do espectro de HMBC, de Scutianina-Q (**51**), em CDCl_3 a 400 MHz.

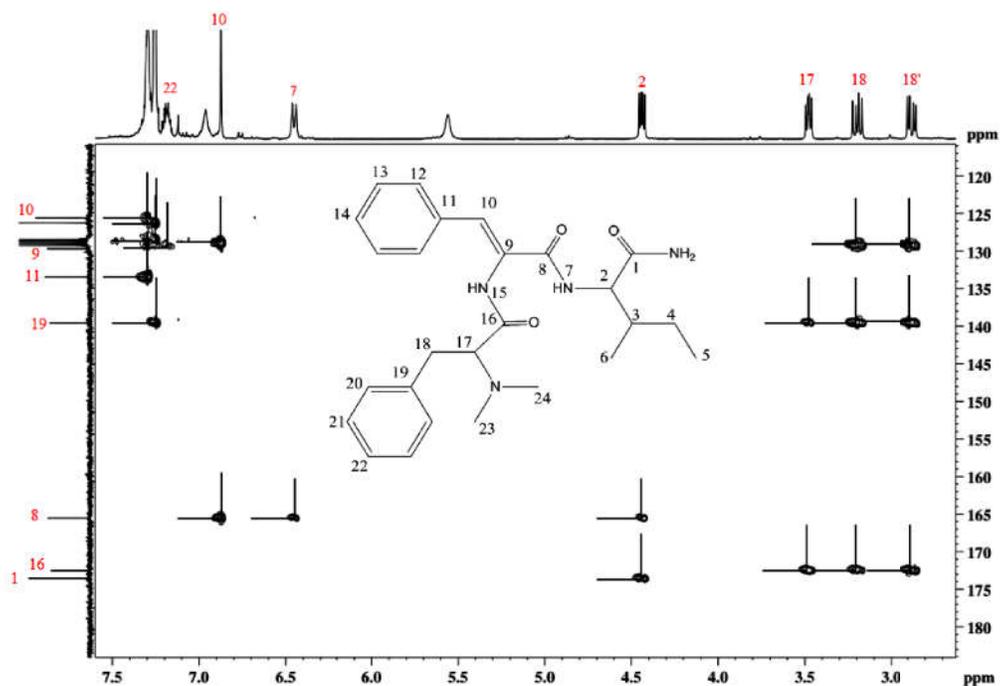
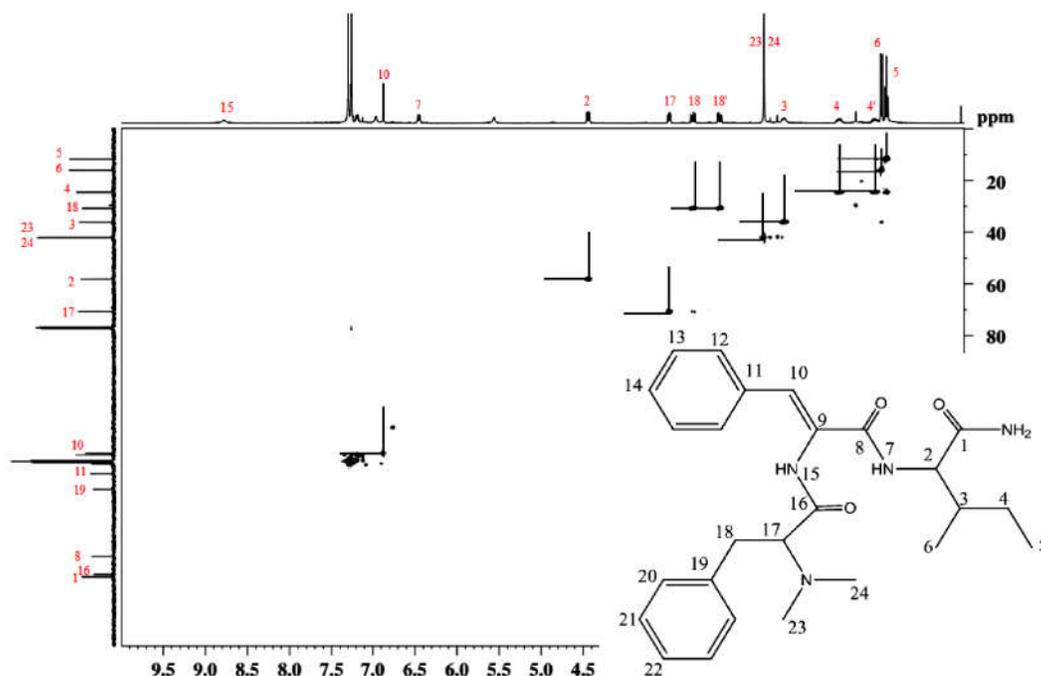


Figura 35: Espectro de HMQC, de Scutianina-Q (**51**), em CDCl₃ a 400 MHz.



Nas expansões dos espectros de HMQC (Figura 36) e HMBC (Figura 37), foi possível atribuir com maior efetividade os sinais dos carbonos aromáticos, dos carbono olefínicos e dos carbono metínicos, metilênicos e metílicos e seus respectivos hidrogênios.

No espectro de HMQC, o hidrogênio olefínico H-10 foi atribuído pela sua correlação com o carbono que tem seu deslocamento químico em 125,6 ppm sendo este então denominado C-10. Ainda, foi atribuído o carbono correspondente ao hidrogênio H-2 o qual tem seu deslocamento químico em 58,2 ppm (Figura 36).

Com o auxílio do espectro de HMBC, foi realizada a atribuição dos carbonos aromáticos. Na Figura 37, podemos destacar a correlação do hidrogênio olefínico H-10 com o sinal de carbono que tem seu deslocamento químico em 129,0 ppm, o qual pode ser identificado como sendo os carbonos C-12 e C-12', devido a intensidade do sinal o que caracteriza a presença de dois núcleos. Já os sinais de carbono com δ em 128,73 e 128,71 foram atribuídos como sendo os carbonos C-13, C-13' e C-14. O sinal correspondente aos C-13 e C-13' é o que tem intensidade do sinal maior pois, apresenta dois núcleos (δ 128,71 ppm), e o sinal do carbono C-14 (128,73 ppm), que coincide com o sinal dos carbonos C-13 e C-13', possui menor intensidade. Ambos os sinais

apresentam correlação com o sinal que correspondem aos hidrogênios aromáticos H-12/-12', H-13/-13', H-14.

Figura 36: Expansão do espectro HMQC, de Scutianina-Q (**51**), em CDCl_3 a 400 MHz.

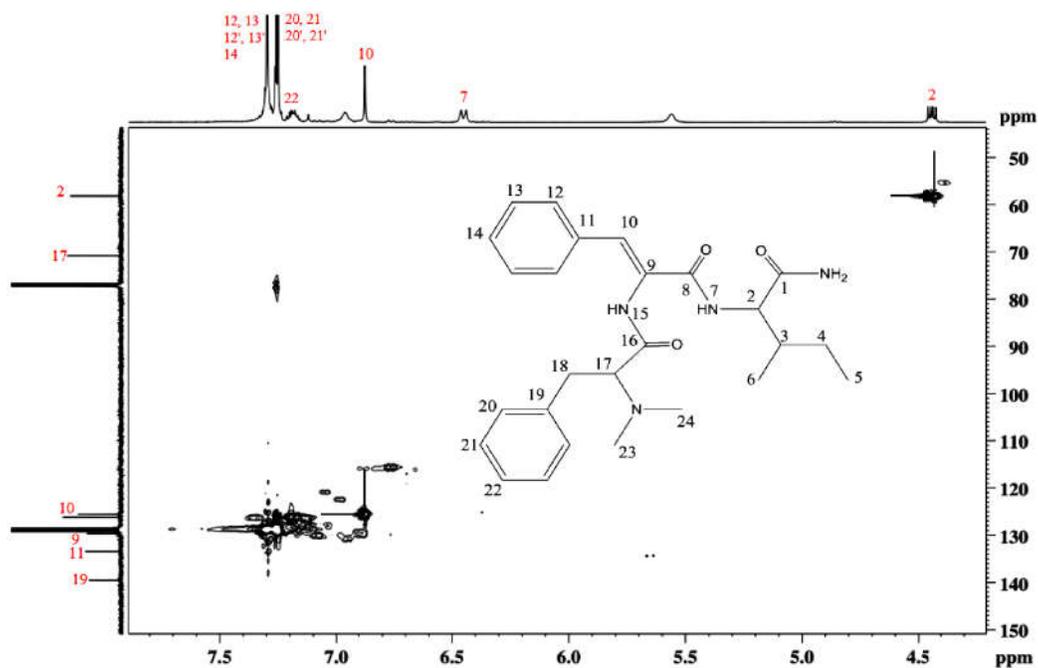
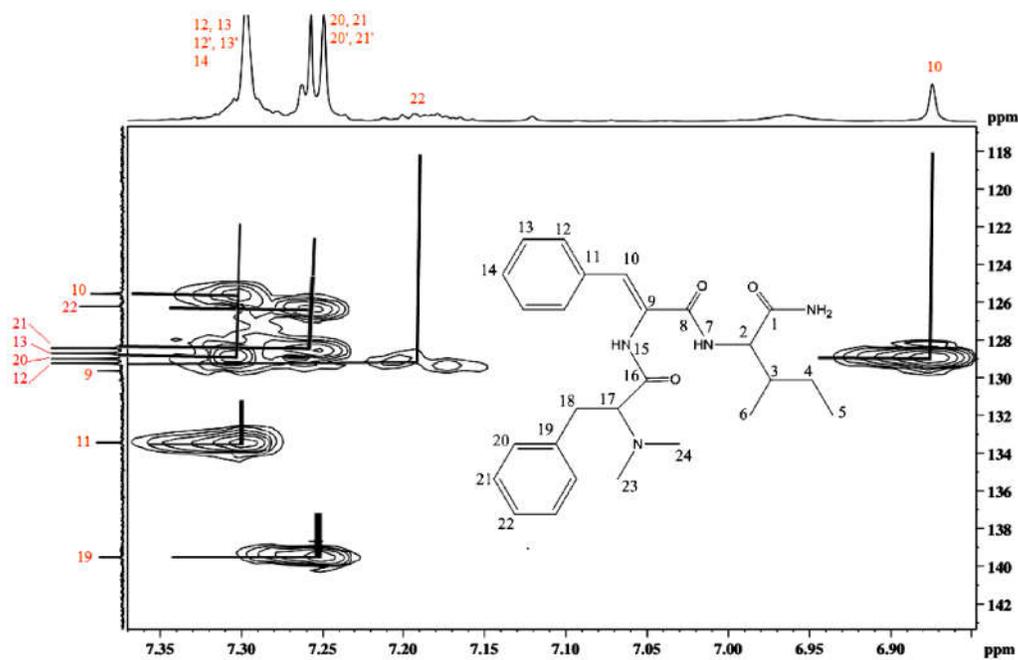


Figura 37: Expansão do espectro de HMBC, de Scutianina-Q (**51**), em CDCl_3 a 400 MHz.



O espectro de carbono totalmente desacoplado, Figura 38, exibe sinais na região espectral compreendida entre 11,7 ppm e 173,5 ppm. Nele podemos observar a presença de 20 sinais sendo, quatro deles de maior intensidade indicando que há dois núcleos e um deles apresenta intensidade um pouco maior indicando ser tres núcleos (sinais atribuídos aos carbonos aromáticos e aos carbonos olefinicos) resultando num total de 26 carbonos e, assim, confirma a estrutura proposta.

Para os carbonos aromáticos, somente foi possível atribuir os sinais dos carbonos desidrogenados com o auxílio do espectro DEPT 135° (Figura 40). A atribuição dos sinais de carbonos foi possível através dos espectros de HMBC e HMQC como descrito anteriormente. Os sinais podem ser visualizados nas expansões dos espectros de ^{13}C e DEPT 135°, Figuras 39 e 41. Ainda neste espectro podemos destacar a presença de dois carbonos metilênicos, C-18 e C-4, confirmando a estrutura proposta. A Tabela 20 contém os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C .

Figura 38: Espectro de RMN de ^{13}C , de Scutianina-Q (**51**), em CDCl_3 a 400 MHz.

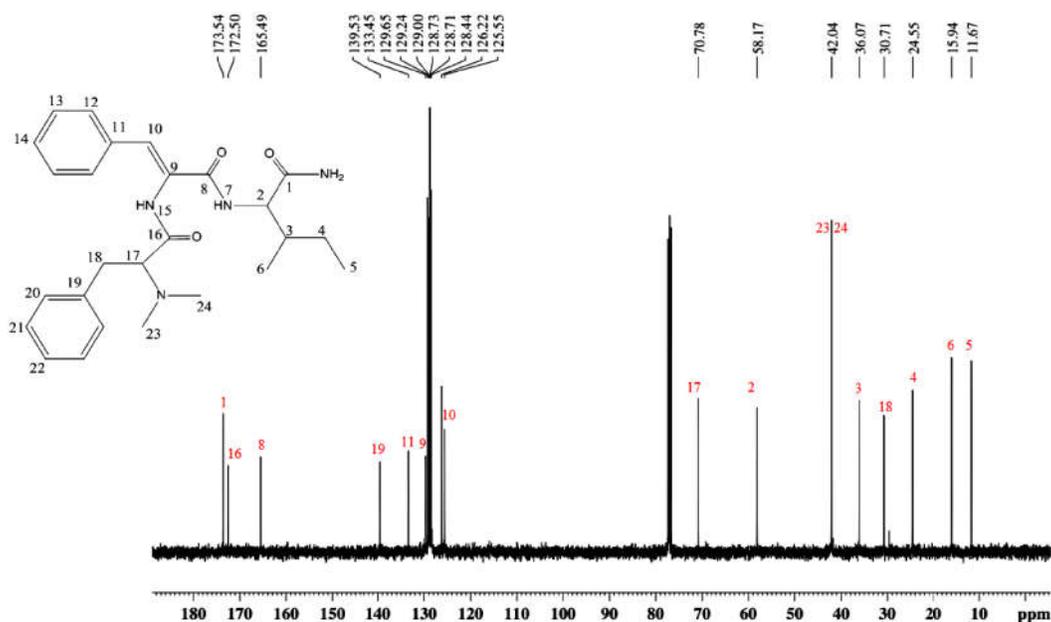


Figura 39: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C , de Scutianina-Q (**51**), em CDCl_3 a 400 MHz.

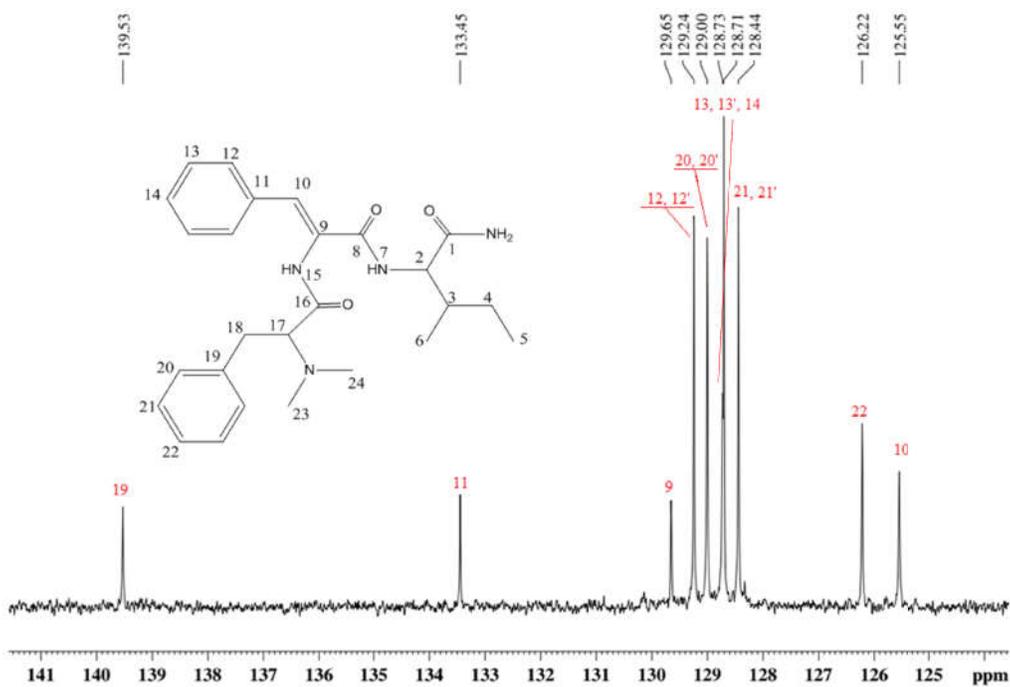


Figura 40: Espectro DEPT 135°, de Scutianina-Q (**51**), em CDCl_3 a 400 MHz.

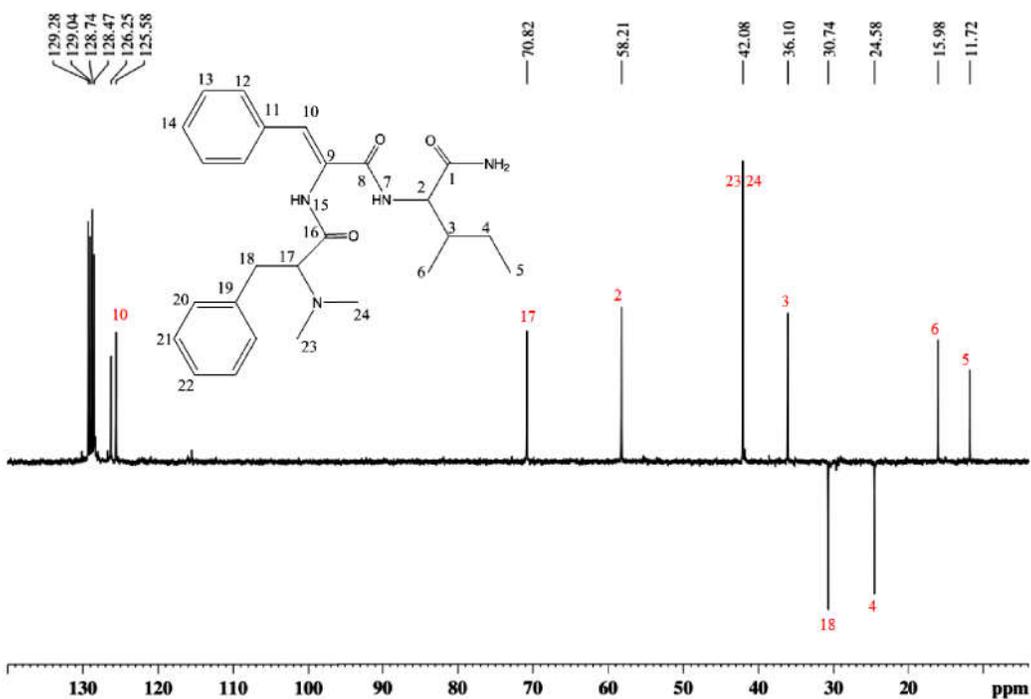


Figura 41: Expansão do espectro DEPT 135°, de Scutianina-Q (**51**), em CDCl₃ a 400 MHz.

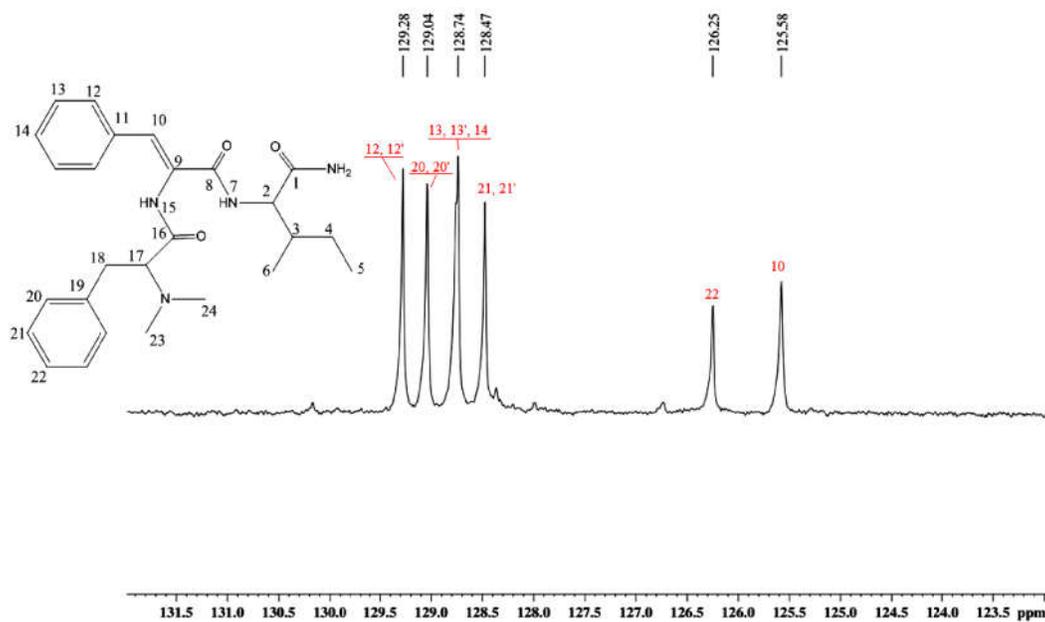


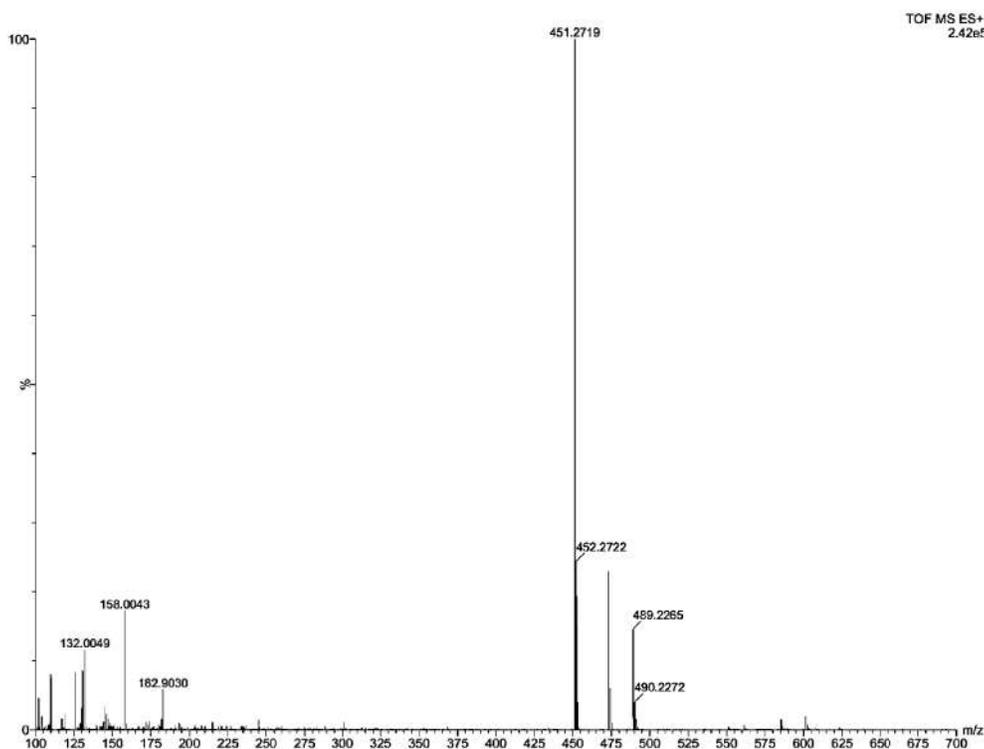
Tabela 20: Dados de RMN de ¹H e ¹³C do peptídeo Scutianina Q

Posição	δ_{Hppm}	δ_{Cppm}^a
1	-	173,5
2	4,44 (1H, dd, J=4,8, 8,6Hz)	58,2
3	2,12 (1H, m)	36,1
4	1,46 (1H, m)	24,5
4'	1,03 (1H, m)	-
5	0,9 (3H, t, J=7,2Hz)	15,9
6	0,96 (3H, d, J=6,8 Hz)	11,7
7	6,45 (1H, d, J= 8,4Hz)	-
8	-	165,5
9	-	129,7
10	6,96 (1H, s)	125,6
11	-	133,5
12/12'	-	129,3
13/13'	7,29	128,7
14	-	128,7
15	8,778 (NH, s)	-
16	-	172,5

17	3,48 (1H, dd, J=5,2, 7,8Hz	70,9
18	3,20 (dd, J=7,8, 13,9 Hz	30,7
18'	2,88 (dd, J=5,2, 13,9Hz	
19	-	139,5
20/20'	7,25	129,0
21/21'	7,25	128,4
22	7,19	126,0

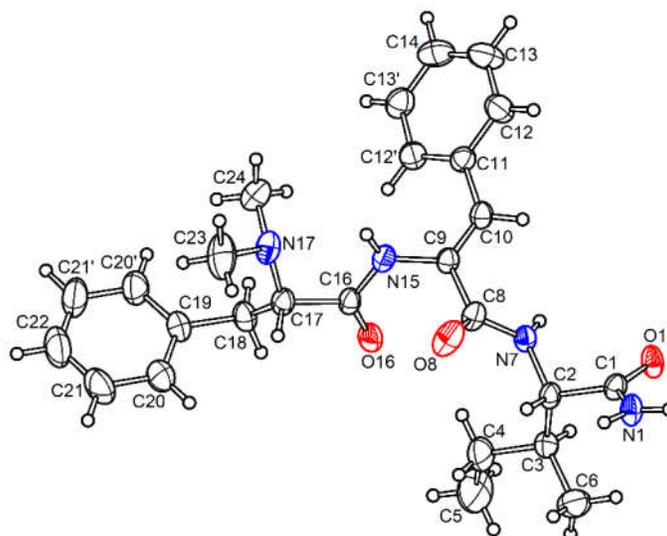
O espectro de massas de alta resolução (Figura 25), EMAR, confirmou a massa molecular do peptídeo que é 450,2631 g.mol⁻¹. Ele mostra um íon [M+H] com m/z 451,2719 indicando a massa molecular correspondente à estrutura proposta, C₂₆H₃₄N₄O₃,

Figura 42: Espectro de massas de alta resolução de S18, Scutianina-Q



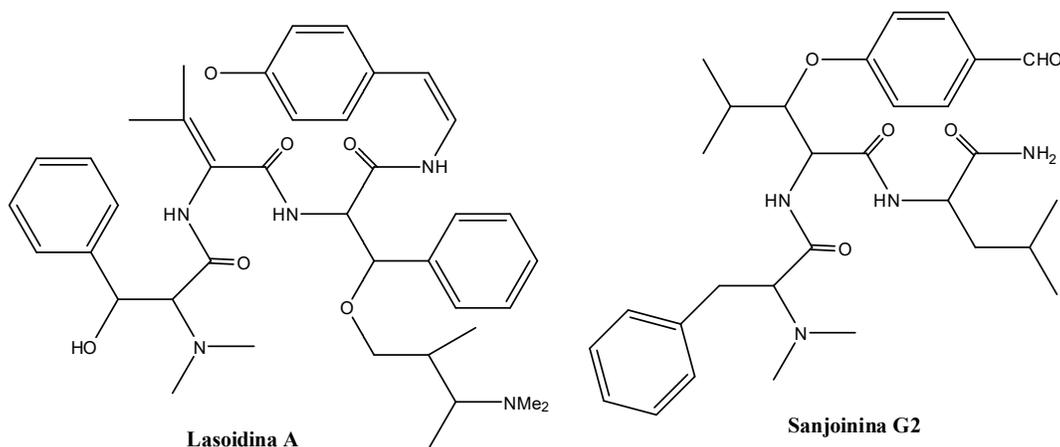
A Figura 43 mostra a estrutura obtida por difração de Raio-X, confirmando a estrutura proposta.

Figura 43: Difração de Raio-X de Scutianina-Q



Acreditamos que o peptídeo Scutianina-Q seja um precursor dos alcaloides ciclopeptídicos, pois tem em sua estrutura unidades de aminoácidos que estão presentes em alguns destes alcaloides. Em 1969, MARCHAND, PAIS, *et al.*, isolaram um alcaloide ciclopeptídico com seu anel macrocíclico aberto na unidade β -hidroxi aminoácido. Em 1989, HAN, PARK e PARK, isolaram outro alcaloide ciclopeptídico com o anel macrocíclico aberto, a Sanjoinina G2, Figura 44.

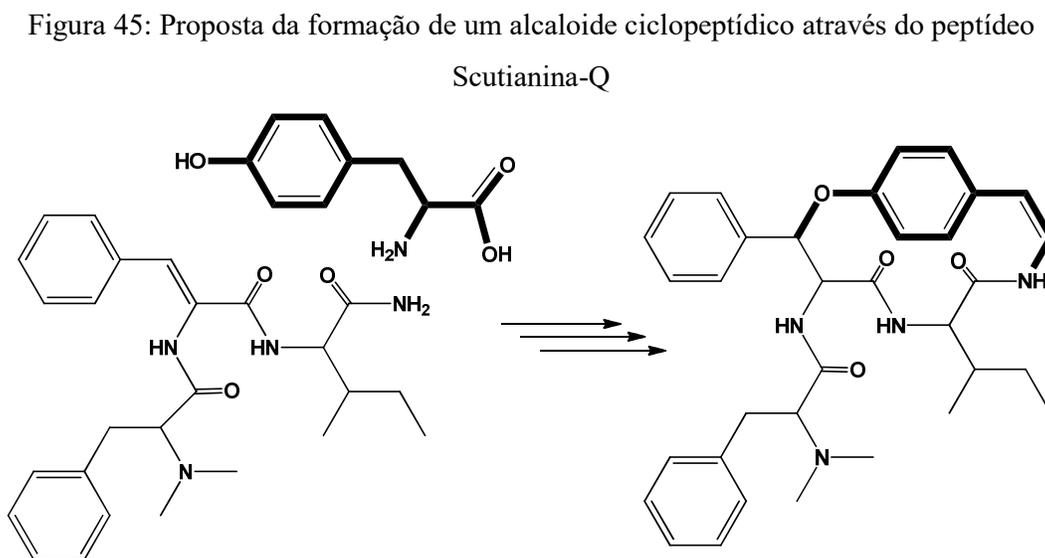
Figura 44: estrutura dos alcaloides ciclopeptídicos Lasoidina A e Sanjoinina G2.



Na estrutura aqui proposta para Scutianina-Q, há a ausência da unidade hidroxiestirilalanina, mas as demais unidades comuns em um alcaloide ciclopeptídico

de 14 membros estão presentes. Portanto, pode-se supor que estes sistemas peptídicos não macrocíclicos sejam precursores de alcaloides ciclopeptídicos com o sistema *ansa* de 14 membros. A formação do sistema *ansa* viria de uma adição de Michael à dupla ligação benzílica em C-10. Possivelmente pela hidroxila de uma unidade de aminoácido tirosina, originando a unidade β -hidroxiaminoácido (β -hidroxifenilserina) do macrociclo. No caso de Lasoidina A, que seria um passo mais adiantado da biossíntese de um sistema macrociclo de 14-membros, mostra que este seria o passo final da macro ciclização. Neste caso, a adição de Michael à dupla, daria origem à unidade β -hidroxileucina.

Dessa forma, Scutianina-Q poderia ser o peptídeo precursor dos alcaloides ciclopeptídicos diastereoisômeros Scutianina-L, isolado em 1998 da espécie *Scutia buxifolia*, e Adouetina Y, isolado em 1969 das espécies *Ceanothus americanus*, *Waltheria americana* e *Discaria febrifuga* ((MOREL, MACHADO, *et al.*, 1998), (SERVIS, KOSAK, *et al.*, 1969)). A Figura 45 apresenta como poderia ocorrer a formação do alcaloide ciclopeptídico a partir do peptídeo Scutianina-Q com a adição da unidade hidroxiestirilalanina (aminoácido Tirosina) para o fechamento do anel macro cíclico.

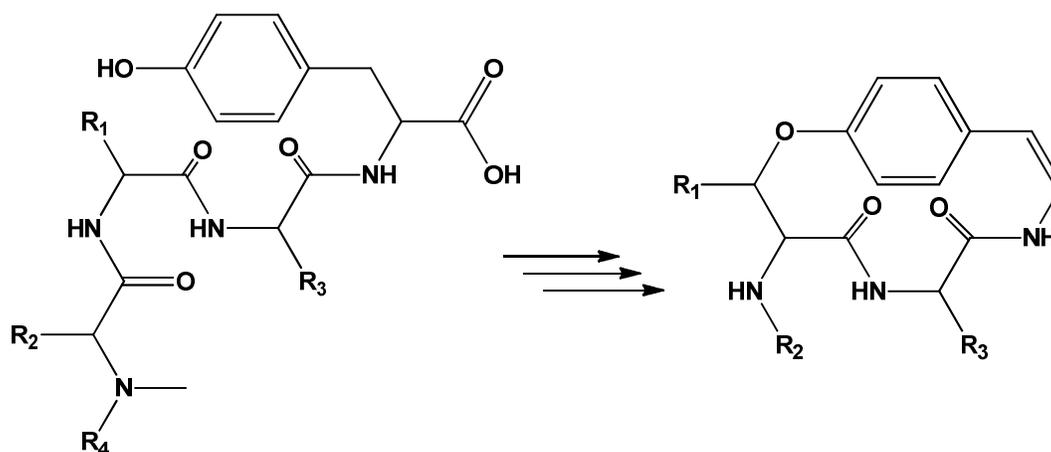


Fonte: Adaptado (MOREL, MALDANER e ILHA, 2009)

De acordo com MOREL, MALDANER e ILHA, 2009, ainda não foram realizadas experiências com precursores marcados que pudessem explicar claramente a rota biossintética dos alcaloides ciclopeptídicos. Contudo, o primeiro estabelecimento

de cultura de tecido de células calosas de *Ceanothus americanus* (Rhamnaceae) foi um estudo de seu metabolismo secundário no qual, foi utilizado uma mistura dos aminoácidos valina, leucina, isoleucina, tirosina, fenilalanina e triptofano, sendo que obtiveram como resultado os novos tetrapeptídeos Val-Leu-Leu-Tyr, Ile-Leu-Leu-Tyr, Phe-Phe-Leu-Tyr e Phe-Phe-Ile-Tyr, os quais são os prováveis precursores dos alcaloides ciclopeptídicos Americina, Frangulanina, Ceanotina E e Adouetina Y, respectivamente, como mostra a Figura 46. Em todos os tetrapeptídeos obtidos, foi usado o aminoácido básico tirosina como bloco de construção na biossíntese da unidade de estirilamina nos alcaloides (BAIG, BANTHORPE, *et al.*, 1993). Em 2006, TAN e ZHOU, propuseram uma rota biossintética dos alcaloides ciclopeptídicos de quatorze membros como mostra a Figura 47.

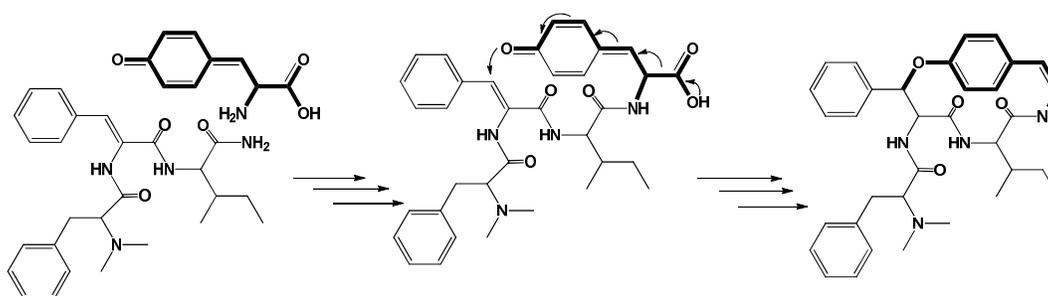
Figura 46: Proposta para rota biogenética de precursores dos alcaloides ciclopeptídicos



R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Alcaloides
CH(CH ₃) ₂	CH(CH ₃) ₂	CHCH ₂ C ₈ H ₆ N	H	Americina
CH(CH ₃) ₂	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CHCH ₂ (CH ₃) ₂	CH ₃	Frangulanina
CHC ₆ H ₅	CH ₂ C ₆ H ₅	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH ₃	Adouetina Y
CHC ₆ H ₅	CH ₂ C ₆ H ₅	CHCH ₂ (CH ₃) ₂	CH ₃	Ceanotina E

Fonte: ((BAIG, BANTHORPE, *et al.*, 1993), (MOREL, MALDANER e ILHA, 2009)).

Figura 47: Possível rota biossintética dos alcaloides ciclopeptídicos de 14-membros.

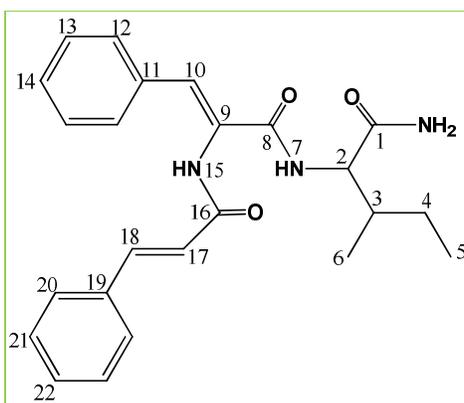


Fonte: Adaptado ((TAN e ZHOU, 2006) (MOREL, MALDANER e ILHA, 2009)).

5.3.2.2 Scutianina R, S04 (52)

Scutianina-R foi isolada da FBEAT, obtida das cascas do caule da espécie *Scutia buxifolia* na forma de um sólido branco, conforme descrito na parte experimental (pág 38). Sua estrutura, Figura 48, foi determinada por meio de RMN de ^1H e de ^{13}C , uni e bidimensionais, homo e heteronucleares.

Figura 48: Estrutura do composto Scutianina R



No espectro de RMN de ^1H (Figura 49) de Scutianina R podemos constatar a ausência da unidade *N,N*-dimetil que está presente na estrutura de Scutianina Q. Além disso, há os sinais de dois hidrogênios olefínicos H-17 (δ 7,57 ppm, d, $J=15,2\text{Hz}$) e H-18 (δ 6,86 ppm, d, $J=16,0\text{Hz}$), os quais não estão presentes no peptídeo Scutianina Q (Figura 51).

A unidade isoleucina (Figura 49 e 50) que pode ser identificada no espectro de RMN COSY, é comprovada pelas correlações dos hidrogênios H-2 (δ 4,24 ppm, dd, $J=4,8, 8,6\text{Hz}$) o qual tem correlação com o hidrogênio amídico NH-7 (δ 7,60 ppm) e com o hidrogênio metínico H-3 (δ 1,83 ppm). O H-3 por sua vez, aparece na forma de um multiplete pela sua correlação com os hidrogênios diasterotópicos H-4 (δ 1,48/1,12 ppm) e com a metila CH_3 -6 (δ 0,88 ppm, d, $J=6,8\text{Hz}$). Já os hidrogênios H-4 e H-4' apresentam correlação com a metila CH_3 -5 (δ 0,84 ppm, t, $J=7,2\text{Hz}$). Esta unidade está presente, também, no peptídeo Scutianina Q e com os deslocamentos químicos muito semelhantes, o que confirma a estrutura proposta do composto Scutianina R.

Figura 49: Espectro de RMN de ^1H do peptídeo Scutinanina R, em DMSO-d_6 a 400 MHz.

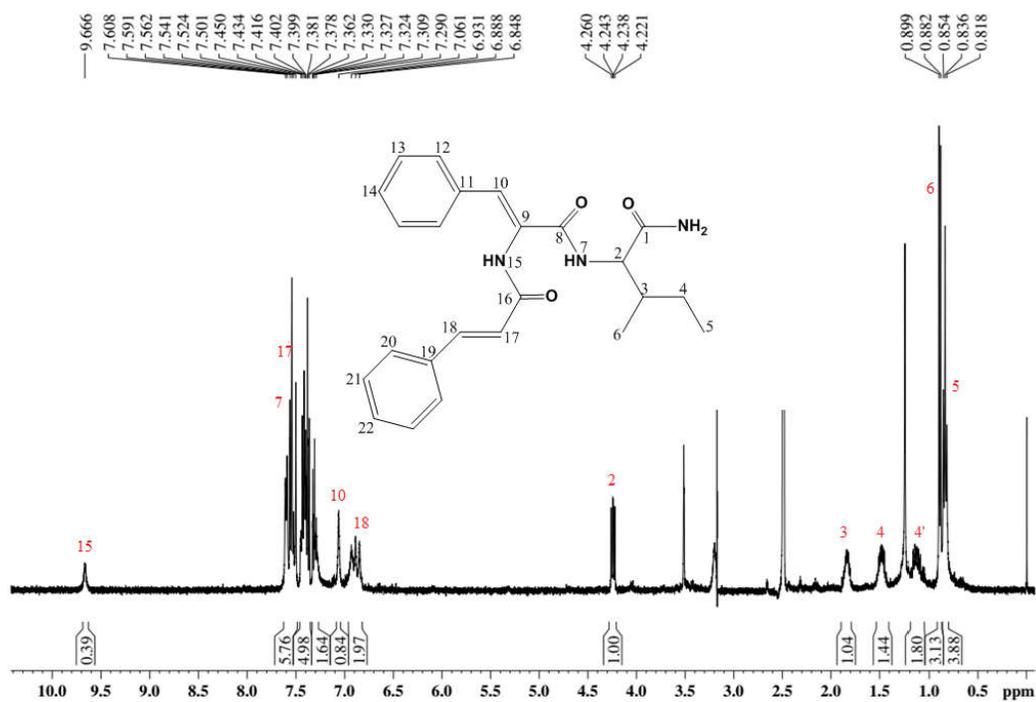


Figura 50: Espectro de COSY do peptídeo Scutinanina R, em DMSO-d_6 a 400 MHz.

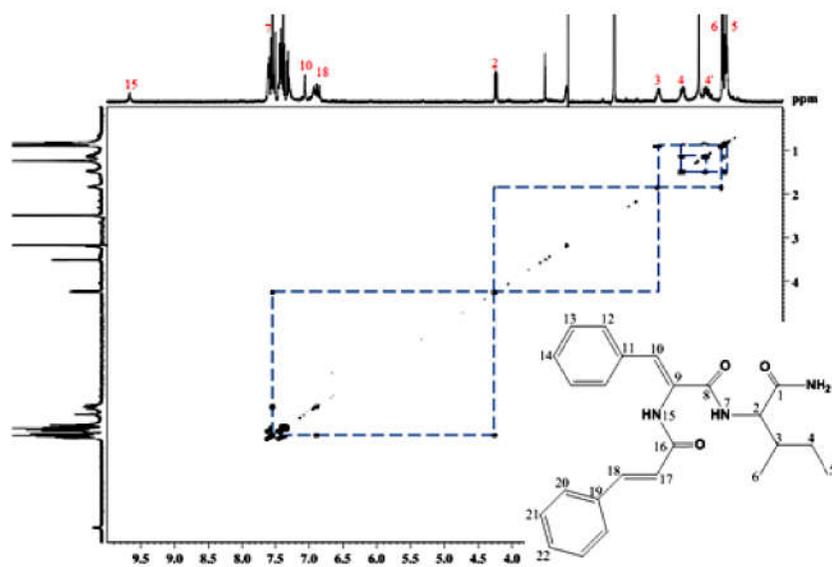
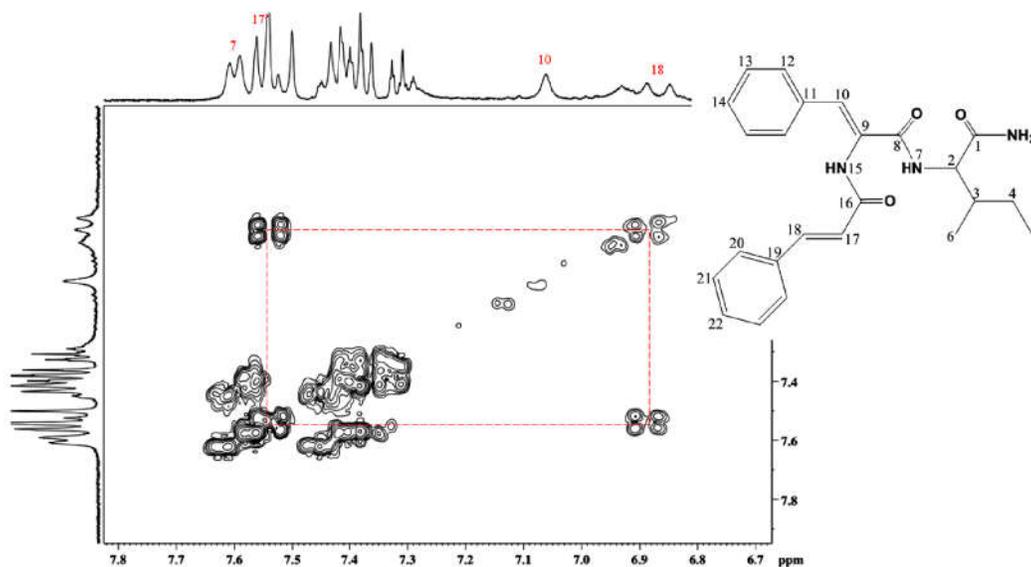


Figura 51: Expansão do espectro COSY do peptídeo Scutinanina R, em DMSO-d⁶ a 400 MHz.



Os sinais de carbono foram atribuídos com o auxílio dos espectros de RMN de ¹³C (Figura 52), HMBC (Figura 53) e HMQC (Figuras 54 e 55). Foi possível verificar a presença de 20 sinais sendo que, quatro deles apresentam maior intensidade o que mostra a presença de dois núcleos totalizando em 24 carbonos distribuídos na região compreendida entre δ 11,0 e 173,0 ppm. Na região entre δ 11,0 e 58,0 ppm se encontram os sinais dos carbonos metínicos C-2 (δ 57,2 ppm) e C-3 (δ 36,4 ppm), do carbono metilênico C-4 (δ 24,2 ppm) e dos carbonos das metilas Me-5 e Me-6 (δ 11,1 e δ 15,5 ppm, respectivamente). Os demais carbonos (aromáticos, olefínicos e carbonílicos) podem ser identificados nas Figuras 52, 53 e 54.

Figura 52: Espectro de RMN de ^{13}C do peptídeo Scutinanina R, em DMSO-d^6 a 400 MHz.

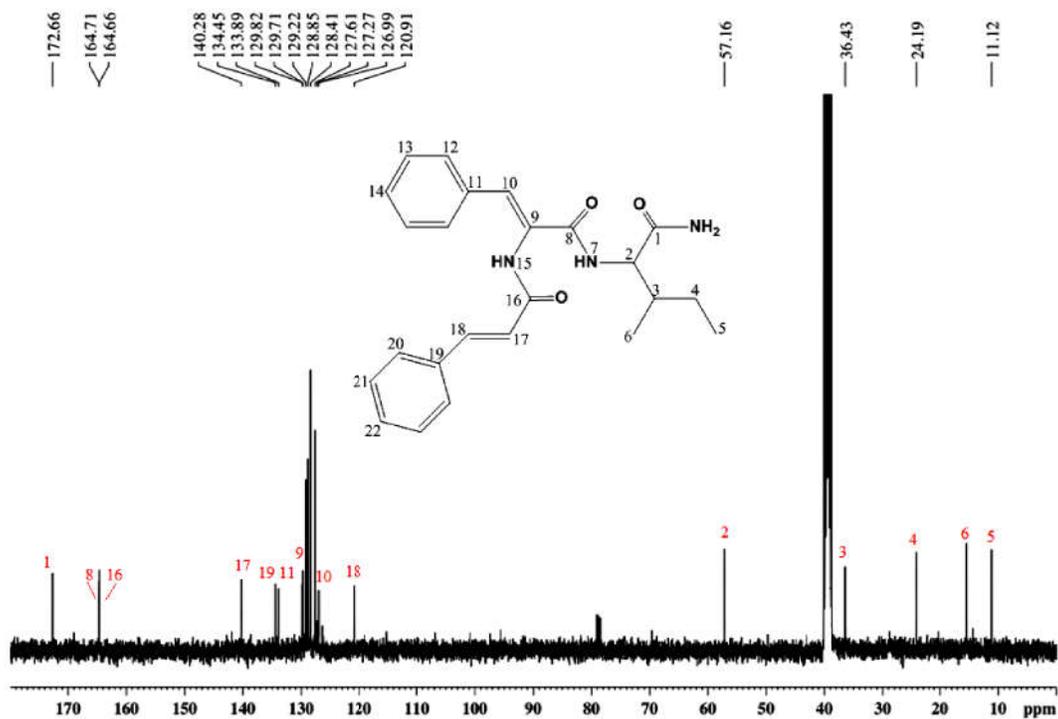


Figura 53: Expansão do Espectro HMBC do peptídeo Scutinanina R, em DMSO-d^6 a 400 MHz.

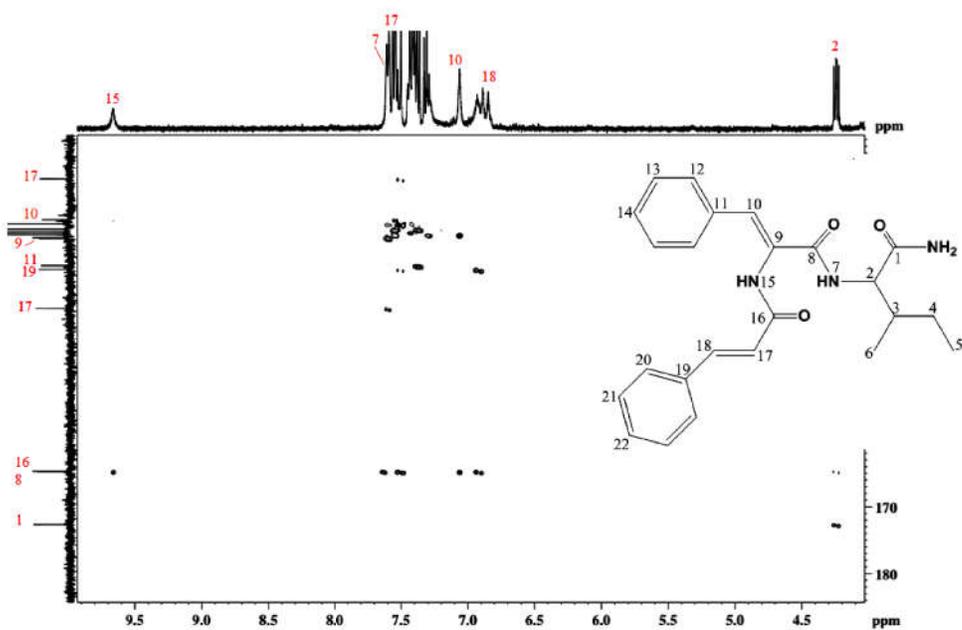


Figura 54: Expansão do espectro HMQC do peptídeo Scutinanina R, em DMSO-d⁶ a 400 MHz.

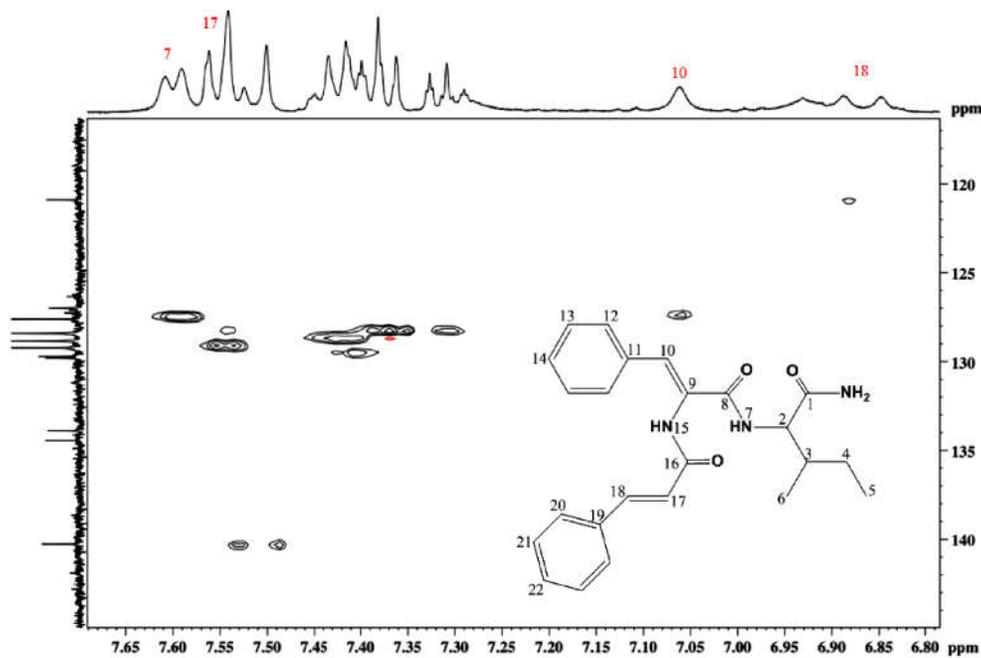


Figura 55: Expansão do Espectro HMQC do peptídeo Scutinanina R, em DMSO-d⁶ a 400 MHz.

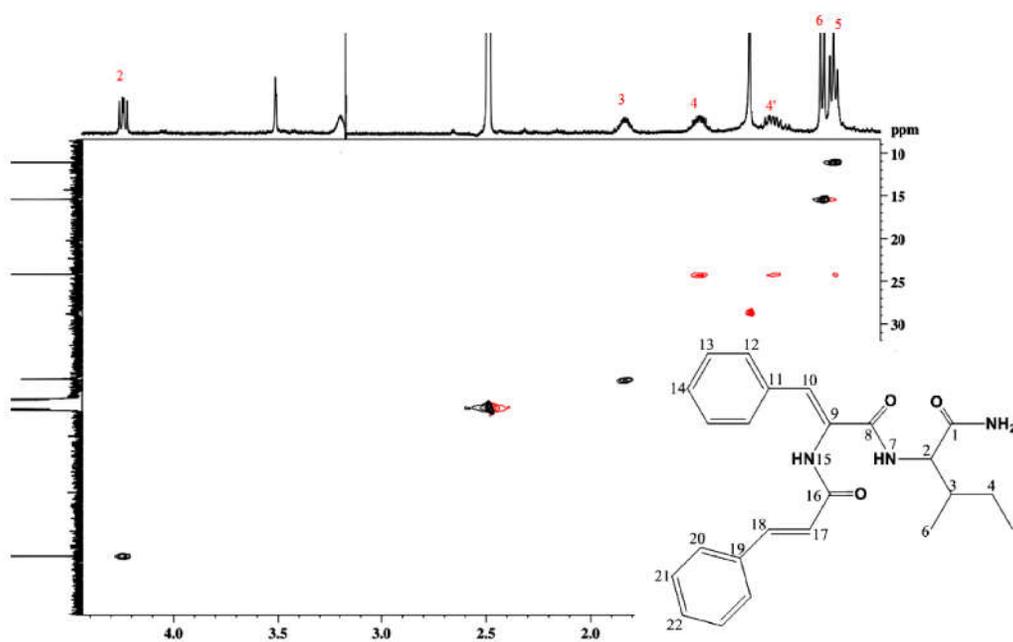
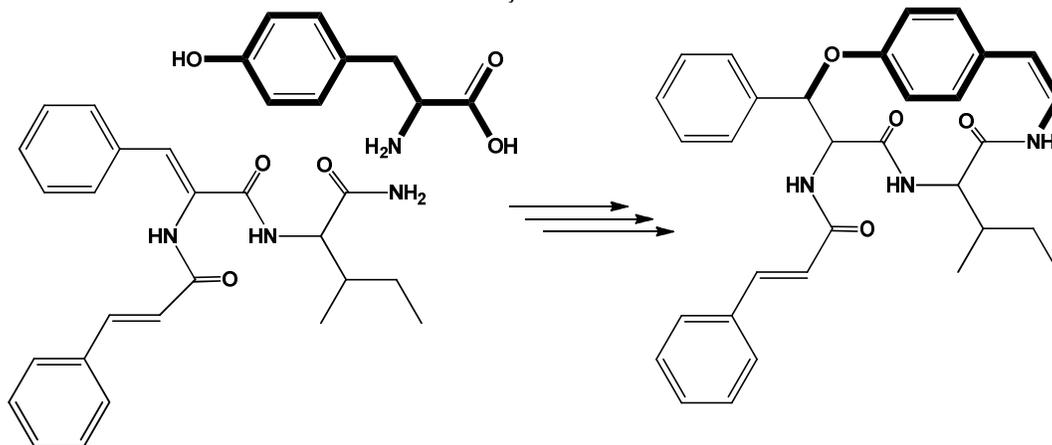


Tabela 21: Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C do peptídeo Scutianina R

Posição	δ_{Hppm}	δ_{Cppm}^a
1	-	172,7
2	4,24 (1H, dd, J=4,8, 8,6Hz)	57,2
3	1,83 (1H, m)	36,4
4	1,48 (1H, m)	24,2
4'	1,13 (1H, m)	
5	0,84 (3H, t, J=7,2Hz)	11,1
6	0,88 (3H, d, J=6,8 Hz)	15,5
7	δ 7,60	-
8	-	164,7
9	-	129,7
10	7,06 (1H, s)	129,99
11	-	133,9
12/12'	7,29-7,61	
13/13'	7,29-7,61	126,9-129,7
14	7,29-7,61	
15	9,67 (NH, s)	-
16	-	167,7
17	7,57 (1H, d, J=15,2Hz)	140,3
18	6,86 (1H, d, J=16,0Hz)	120,9
19	-	134,5
20/20'	7,29-7,61	
21/21'	7,29-7,61	126,9-129,7
22	7,29-7,61	

Da mesma forma em que acreditamos que o peptídeo Scutianina-Q seja um possível precursor dos alcaloides ciclopeptídeos, acreditamos que o peptídeo Scutianina-R seja um possível precursor dos ciclopeptídeos neutros devido a ausência da unidade *N,N*-dimetil ou *N*-metil na estrutura proposta. Assim, o peptídeo Scutianina-R poderia ser o precursor do ciclopeptídeo neutro Scutianeno-Z isolado das cascas do caule da espécie *Scutia buxifolia* em 2011 (MALDANER, MARANGON, *et al.*, 2011). A Figura 27 representa a possível formação do ciclopeptídeo neutro a partir do peptídeo Scutianina-R com a adição do aminoácido Tirosina.

Figura 56: Proposta da formação de um ciclopeptídeo neutro através do peptídeo Scutianina-R com a adição do aminoácido Tirosina.



Fonte: Adaptado (MOREL, MALDANER e ILHA, 2009).

5.4 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

O Grupo de pesquisa NPPN faz uso do método de microdiluição em caldo descrito pela NCCL (*National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2003)), na determinação da atividade antimicrobiana do extrato bruto, das frações e das substâncias isoladas das plantas pesquisadas. Essa organização é responsável pela padronização dos testes executados a fim de avaliar a atividade antimicrobiana de compostos naturais no intuito de possibilitar a descrição do potencial biológico e sua utilidade clínica de forma segura e correta. Além disso, com a utilização do equipamento fluorímetro na leitura dos poços proporciona uma maior sensibilidade e reprodutibilidade.

Com isso, foram realizadas as atividades das frações etéreas básicas alcaloides totais (FBEAT) das espécies *D. americana* e *S. buxifolia* bem como das substâncias isoladas. No entanto, a amida (**38**) não foi submetida a avaliação pois já é amplamente estudada. As Tabelas 20 e 21 contêm os resultados da atividade antimicrobiana de *D. americana* e as Tabelas 22 e 23 os resultados de *S. buxifolia*.

Tabela 22: resultado da Atividade Antimicrobiana das FBEAT de *D. americana*.

Micro-organismo ^a	CIM/ CLM µg/mL									
	SL 09/11		SS 05/11		SS 08/13		SL 04/11		Croranfenicol ^b	
Gram-positivos										
	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM
<i>Sa</i>	31,2	>500	62,5	>500	500	>500	125	>500	1,56	12,5
<i>Bs</i>	250	>500	250	>500	250	>500	250	>500	3,12	100
<i>Bc</i>	250	>500	>500	>500	500	>500	>500	>500	1,56	6,25
<i>Esp.</i>	62,5	125	62,5	125	125	250	125	250	1,56	1,56
<i>Ef</i>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	6,25	12,5
Gram-negativos										
<i>Ec</i>	125	>500	125	>500	250	>500	250	>500	3,12	100
<i>Pa</i>	125	>500	125	>500	125	>500	250	>500	1,56	12,5
<i>Pm</i>	250	>500	250	>500	250	>500	250	>500	3,12	25
<i>Ss</i>	125	>500	125	>500	125	>500	125	>500	6,25	25
<i>St</i>	125	>500	>500	>500	500	>500	>500	>500	3,12	12,5
<i>Mm</i>	125	500	125	>500	125	>500	125	>500	3,12	25
<i>Sf</i>	250	>500	250	>500	250	>500	250	>500	1,56	1,56
<i>Se</i>	500	500	>500	>500	>500	>500	500	>500	1,56	6,25
<i>Ea</i>	62,5	>500	125	>500	500	>500	125	>500	3,12	12,5
<i>Kp</i>	250	500	250	>500	250	500	250	>500	25	200

^a Bactérias Gram-positivas: Sa: *Staphylococcus aureus*, Bs: *Bacillus subtilis*, Bc: *Bacillus cereus*, Esp.: *Enterococcus spp.*, Ef: *Enterococcus faecalis*; Gram negativa: Ec: *Escherichia coli*, Pa: *Pseudomonas aeruginosa*, Pm: *Proteus mirabilis*, Ss: *Shigella sonnei*, St: *Salmonella typhimurium*, Mm: *Morganella morganii*, Sf: *Shigella flexneri*, Se: *Salmonella enteritidis*, Ea: *Enterobacter aerogenes*, Kp: *Klebsiella pneumoniae*.

^b Padrão

Tabela 23: Resultado da Atividade Antimicrobiana dos padrões isolados de *D. americana*.

Micro-organismo ^a	CIM/ CLM µg/mL															
	Discarina B		Frangulanina		Frangufolina		Adouetina Y'		Discarina D		Discarina C		Discareno C		Clorofenicol ^b	
Gram-positivo																
<i>Sa</i>	200	>200	50	>200	25	>200	25	>200	200	>200	50	>200	200	>200	1,56	12,5
<i>Bs</i>	100	>200	100	>200	100	>200	100	>200	100	>200	100	>200	100	>200	3,12	100
<i>Bc</i>	200	>200	200	>200	100	>200	200	>200	200	>200	200	>200	200	>200	1,56	6,25
<i>Espp.</i>	25	50	25	50	25	50	50	50	50	50	50	50	25	50	1,56	1,56
Gram-negativo																
<i>Ef</i>	>200	>200	50	>200	50	>200	200	>200	>200	>200	100	>200	25	>200	6,25	12,5
<i>Ec</i>	100	>200	100	>200	100	>200	100	>200	100	>200	100	>200	100	>200	3,12	100
<i>Pa</i>	200	>200	200	>200	50	>200	200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	1,56	12,5
<i>Pm</i>	>200	>200	200	>200	200	>200	200	>200	200	>200	200	>200	200	>200	3,12	25
<i>Ss</i>	50	>200	100	>200	100	>200	50	>200	100	>200	100	>200	100	>200	6,25	25
<i>St</i>	200	>200	200	>200	100	>200	100	>200	100	>200	200	>200	>200	>200	3,12	12,5
<i>Mm</i>	NT	NT	NT	NT	NT	NT	50	>200	NT	NT	NT	NT	NT	NT	3,12	25
<i>Sf</i>	25	>200	25	>200	50	>200	50	>200	100	>200	100	>200	100	>200	1,56	1,56
<i>Se</i>	100	>200	200	>200	100	>200	200	>200	200	>200	100	>200	100	>200	1,56	6,25
<i>Ea</i>	200	>200	200	>200	200	>200	200	>200	200	>200	200	>200	200	>200	3,12	12,5
<i>Kp</i>	NT	NT	NT	NT	NT	NT	100	>200	NT	NT	NT	NT	NT	NT	25	200

^a **Bactérias Gram-positivas:** *Sa*: *Staphylococcus aureus*, *Bs*: *Bacillus subtilis*, *Bc*: *Bacillus cereus*, *Espp.*: *Enterococcus* spp., *Ef*: *Enterococcus faecalis*; Gram negativa: *Ec*: *Escherichia coli*, *Pa*: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pm*: *Proteus mirabilis*, *Ss*: *Shigella sonnei*, *St*: *Salmonella typhimurium*, *Mm*: *Morganella morganii*, *Sf*: *Shigella flexneri*, *Se*: *Salmonella enteritidis*, *Ea*: *Enterobacter aerogenes*, *Kp*: *Klebsiella pneumoniae*.

^b **Padrão**

Tabela 24: Resultado da Atividade Antimicrobiana dos compostos isolados de *S. buxifolia*.

Micro-organismo ^a	CIM/ CLM µg/mL																	
	ScutianenoX		Scutianeno Z		ScutianenoY		Scutianina Q		Scutianina P		Aralionina B		Scutianina N		Scutianina R		Cloranfenicol ^b	
Gram-positivas																		
<i>Sa</i>	25	>200	100	>200	100	>200	100	>200	50	>200	50	>200	200	>200	200	>200	1,56	12,5
<i>Bs</i>	100	>200	100	>200	100	>200	200	>200	100	>200	100	>200	100	>200	100	>200	3,12	100
<i>Bc</i>	200	>200	100	>200	200	>200	200	>200	200	>200	100	>200	200	>200	200	>200	1,56	6,25
<i>Espp.</i>	25	200	25	50	25	50	50	200	25	100	25	50	25	100	25	100	1,56	1,56
Gram-negativas																		
<i>Ec</i>	NT	NT	25	>200	25	>200	25	>200	50	>200	50	>200	50	>200	25	>200	6,25	12,5
<i>Pa</i>	100	>200	100	>200	100	>200	200	>200	100	>200	100	>200	100	>200	100	>200	3,12	100
<i>Pm</i>	NT	NT	200	>200	200	>200	100	>200	50	>200	100	>200	200	>200	200	>200	1,56	12,5
<i>Ss</i>	NT	NT	200	>200	100	>200	200	>200	200	>200	100	>200	100	>200	200	>200	3,12	25
<i>St</i>	100	>200	1000	>200	100	>200	200	>200	100	>200	50	>200	100	>200	100	>200	6,25	25
<i>Mm</i>	25	>200	25	>200	50	>200	200	>200	50	>200	50	>200	100	>200	200	>200	3,12	12,5
<i>Sf</i>	50	>200	100	>200	100	>200	50	>200	50	>200	50	>200	100	>200	200	>200	3,12	25
<i>Se</i>	50	>200	50	>200	100	>200	200	>200	100	>200	100	>200	200	>200	100	>200	1,56	1,56
<i>Ea</i>	200	>200	200	>200	200	>200	200	>200	200	>200	200	>200	1,56	>200	200	>200	1,56	6,25
<i>Kp</i>	NT	NT	100	>200	200	>200	200	>200	25	>200	50	>200	200	>200	100	>200	3,12	12,5

^a **Bactérias Gram-positivas:** Sa: *Staphylococcus aureus*, Bs: *Bacillus subtilis*, Bc: *Bacillus cereus*, Espp.: *Enterococcus spp.*, Ef: *Enterococcus fecalis*; **Gram negativa:** Ec: *Escherichia coli*, Pa: *Pseudomonas aeruginosa*, Pm: *Proteus mirabilis*, Ss: *Shigella sonnei*, St: *Salmonella typhimurium*, Mm: *Morganella morganii*, Sf: *Shigella flexneri*, Se: *Salmonella enteritidis*, Ea: *Enterobacter aerogenes*, Kp: *Klebsiella pneumoniae*.

^b Padrão

Tabela 25: Resultado da Atividade Antimicrobiana das FBEAT de *S. buxifolia*.

Micro-organismo ^a	SL06/13	SS08/13	SL09/13S/E	SL09/13C/E	CS10/13C/E	CS10/13S/E	SL04/14	LS07/13	LS01/14	Cloranfenicol ^b										
Gram-positivo																				
<i>Sa</i>	62,5	>500	62,5	>500	500	>500	500	>500	250	>500	250	>500	500	>500	62,5	>500	62,5	>500	1,56	12,5
<i>Bs</i>	250	>500	250	>500	250	>500	250	>500	250	>500	250	>500	250	>500	250	>500	250	>500	3,12	100
<i>Bc</i>	500	>500	250	>500	500	>500	250	>500	500	>500	500	>500	250	>500	500	>500	500	>500	1,56	6,25
<i>Espp.</i>	62,5	125	62,5	125	62,5	125	62,5	125	62,5	125	125	250	62,5	125	62,5	250	62,5	125	1,56	1,56
<i>Sa</i>	125	>500	500	>500	250	>500	>500	>500	NT	NT	>500	>500	500	>500	>500	>500	125	>500	6,25	12,5
Gram-negativo																				
<i>Ec</i>	125	>500	250	>500	125	>500	250	>500	125	>500	250	>500	500	>500	250	>500	250	>500	3,12	100
<i>Pa</i>	250	>500	250	>500	500	>500	500	>500	NT	NT	500	>500	250	>500	>500	>500	250	>500	1,56	12,5
<i>Pm</i>	500	>500	500	>500	500	>500	500	>500	250	>500	500	>500	500	>500	250	>500	500	>500	3,12	25
<i>Ss</i>	250	>500	125	>500	250	>500	250	>500	250	>500	250	>500	250	>500	250	>500	250	>500	6,25	25
<i>St</i>	125	>500	62,5	>500	250	>500	62,5	>500	125	>500	125	>500	250	>500	62,5	>500	125	>500	3,12	12,5
<i>Mm</i>	250	>500	250	>500	250	>500	250	>500	125	>500	250	>500	250	>500	250	>500	250	>500	3,12	25
<i>Sf</i>	125	>500	31,5	>500	62,5	>500	62,5	>500	125	>500	250	>500	250	>500	125	>500	250	>500	1,56	1,56
<i>Se</i>	250	>500	250	>500	250	>500	500	>500	500	>500	500	>500	250	>500	500	>500	500	>500	1,56	6,25
<i>Ea</i>	62,5	>500	62,5	>500	250	>500	500	>500	NT	NT	250	>500	250	>500	62,5	>500	250	>500	3,12	12,5
<i>Kp</i>	250	>500	250	>500	250	>500	250	>500	NT	NT	250	>500	250	>500	125	>500	125	>500	25	200

^a **Bactérias Gram-positivas:** *Sa*: *Staphylococcus aureus*, *Bs*: *Bacillus subtilis*, *Bc*: *Bacillus cereus*, *Espp.*: *Enterococcus spp.*, *Ef*: *Enterococcus faecalis*; **Gram negativa:** *Ec*: *Escherichia coli*, *Pa*: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pm*: *Proteus mirabilis*, *Ss*: *Shigella sonnei*, *St*: *Salmonella typhimurium*, *Mm*: *Morganella morganii*, *Sf*: *Shigella flexneri*, *Se*: *Salmonella enteritidis*, *Ea*: *Enterobacter aerogenes*, *Kp*: *Klebsiella pneumoniae*.

^b Padrão

Os resultados da atividade antimicrobiana, das FBEAT da espécie *Discarium americana*, tiveram para algumas cepas, bons resultados (Tabela 20). Frente à bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus* as frações das coletas SL 09/11 (31,2 µg/mL), SS 05/11 (62,5 µg/mL) e a SL 05/11 (125 µg/mL) apresentaram bons resultados para CIM levando em consideração que são uma mistura de alcaloides. O que possibilita considerar que o sinergismo entre as diferentes estruturas pode atuar na inibição desta bactéria, mas, não houve nenhuma atividade bactericida. A bactéria *Enterococcus spp.* foi inibida pelas FBEAT SL 09/11 (62,5 µg/mL), SS 05/11 (62,5 µg/mL). Para o restante das bactérias, a inibição foi menor ou inexistente naquela concentração testada.

Para os compostos isolados foram obtido resultados satisfatórios para algumas cepas (Tabela 21). O alcaloide ciclopeptídico Discarina-B inibiu o crescimento bacteriano de três bactérias, uma gram-positiva: *Enterococcus spp* (CIM 25 µg/mL e CLM 50 µg/mL); e de duas gram-negativas: *Shigella sonnei* (CIM 50 µg/mL) e *Shigella flexneri* (CIM 25 µg/mL). Frangulanina teve potencial inibitório frente à *Staphylococcus aureus* (50 µg/mL) *Enterococcus spp* de CIM 25 µg/mL e CLM 50 µg/mL, e frente à *Shigella flexneri* de CIM 25 µg/mL. Frangufolina, por sua vez, apresentou poder bacteriostático frente à *Staphylococcus aureus* (25 µg/mL), à *Enterococcus spp* de 25 µg/mL e, também, bactericida de 50 µg/mL. Além disso, inibiu o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* com CIM de 50 µg/mL, e o crescimento da *Shigella flexneri* (50 µg/mL).

Já Adouetina Y' apresentou potencial bacteriostático frente à *Staphylococcus aureus* (25 µg/mL), bacteriostático e bactericida frente à *Enterococcus spp.* (CIM 50 µg/mL, CLM 50 µg/mL), teve poder inibitório também frente à *Shigella sonnei* (CIM 50 µg/mL) e *Shigella flexneri* (50 µg/mL) e foi o único alcaloide ciclopeptídico que apresentou potencial de inibição frente à *Morganella morganii* (50 µg/mL).

Discarina C apresentou CIM e CLM, frente à *Enterococcus spp*, de 50 µg/mL cada. Teve potencial inibitório para *Staphylococcus aureus* (25 µg/mL). Discarina-D teve potencial de inibição somente para *Enterococcus spp* (50 µg/mL). O ciclopeptideo neutro Discareno-C apresentou CIM de 25 µg/mL frente à *Enterococcus fecalis* e *Enterococcus spp* bem como, CLM de 50 µg/mL frente à *Enterococcus spp*.

Na Tabela 21 constam os resultados obtidos para os compostos isolados da espécie *Scutia buxifolia*. Nela podemos observar que os padrões que conseguiram inibir a bactéria *Staphylococcus aureus* foram o ciclopeptideo neutro Scutianeno-X (25

$\mu\text{g/mL}$), Scutianina P (50 $\mu\text{g/mL}$) e Aralionina B (50 $\mu\text{g/mL}$). Para esta bactéria não houve CLM.

Para a bactéria *Enterococcus spp*, todos os compostos testados apresentaram CIM de 25 $\mu\text{g/mL}$, com exceção da Scutianina Q que inibiu com uma concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$. Já os resultados de CLM variaram de 50 $\mu\text{g/mL}$ a 200 $\mu\text{g/mL}$. Com exceção de Scutianeno X, todos os outros padrões testados inibiram a bactéria *Escherichia coli*, Scutianeno Z (25 $\mu\text{g/mL}$), Scutianeno Y (25 $\mu\text{g/mL}$), Scutianina Q (25 $\mu\text{g/mL}$), Scutianina P (50 $\mu\text{g/mL}$), Aralionina B (50 $\mu\text{g/mL}$), Scutianina N (50 $\mu\text{g/mL}$) e Scutianina R (25 $\mu\text{g/mL}$). Nenhum destes compostos teve CLM.

Proteus mirabilis teve seu crescimento inibido apenas por Scutianina P, com CIM de 50 $\mu\text{g/mL}$. Já *Salmonella typhimurium*, foi inibida por Aralionina B com CIM de 50 $\mu\text{g/mL}$. Além disso, os Scutianenos X, -Z e -Y, a Scutianina P e a Aralionina B apresentaram apenas CIM frente à bactéria *Morganella morganii* com 25, 25, 50, 50 e 50 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Para a bactéria *Shigella flexneri*, os alcaloides com maior potencial bacteriostático foram Scutianeno X (50 $\mu\text{g/mL}$), Scutianina Q (50 $\mu\text{g/mL}$), -P (50 $\mu\text{g/mL}$) e Aralionina B (50 $\mu\text{g/mL}$).

Salmonella enteritidis foi inibida pelos ciclopeptídeos neutros Scutianenos X e Z com CIM de 50 $\mu\text{g/mL}$ cada. *Enterobacter aerogenes* teve seu crescimento inibido por Scutianina N com CIM de 1,56 $\mu\text{g/mL}$ sendo o mais significativo resultado considerando as outras bactérias e os outros compostos. Os alcaloides Scutianina P e Aralionina B apresentaram o potencial inibitório frente à *Klebsiella pneumoniae* com CIM de 25 para o primeiro e 50 $\mu\text{g/mL}$, para o segundo.

Os resultados das atividades antimicrobianas das FBEAT de *S. buxifolia*, apresentados na Tabela 23, mostram CIM mais significativos para cinco bactérias, o contrário dos resultados apresentados na Tabela 22, dos padrões que demonstraram potencial bacteriostático para dez bactérias das quatorze testadas. Indicando que estes alcaloides possuem potencial antimicrobiano maior quando isolados do que quando atuam em sinergismo misturados na fração, como é o caso das FBEAT dos alcaloides ciclopeptídicos de *D. americana*. As FBEAT SL06/13, SS08/13, LS07/13 e LS01/14 apresentaram potencial bacteriostático frente à *Staphylococcus aureus* de 62,5 $\mu\text{g/mL}$ cada. Frente à *Enterococcus spp* as frações tiveram CIM entre 62,5 $\mu\text{g/mL}$ e 125 $\mu\text{g/mL}$ e, CLM variando entre 125 $\mu\text{g/mL}$ e 250 $\mu\text{g/mL}$. *Salmonella typhimurium* teve seu crescimento inibido nas FBEAT SS08/13, SL09/13 C/E e LS07/13 com CIM de 62,5 $\mu\text{g/mL}$. SS08/13 teve seu potencial de inibição maior frente à *Shigella flexneri* com

CIM de 31,2 µg/mL. Já SL09/13, C/E e S/E, a inibiram com CIM de 62,5 µg/mL. *Enterobacter aerogenes* foi inibida pelas frações SL06/13, SS08/13 e LS07/13 com CIM de 62,5 µg/mL.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir deste estudo fitoquímico da espécie *Discaria americana* foi possível o isolamento de sete alcaloides ciclopeptídicos: Discarina-B, -C, -D, Frangufolina, Frangulanina, Adouetina Y' e Discareno-D, todos com estrutura conhecida. Porém, a purificação destes compostos possibilitou realizar a análise quantitativa, um estudo preliminar, para verificar a ocorrência destes alcaloides na espécie assim como, quantificá-los nas FBEAT obtidas das cascas da raiz. Dessa forma, foi possível verificar a ocorrência destes em diferentes locais de coleta como, Santana do Livramento e São Sepé, RS. Além disso, foi possível analisar a variabilidade da ocorrência destes compostos em diferentes meses do ano. Dos compostos isolados, infelizmente, não se conseguiu um sistema solvente adequado para separar as Discarinas-B e D e a Adouetina Y' os quais tem seus sinais sobrepostos e de difícil separação. Neste caso, será necessária uma adequação dos eluentes e, talvez, da coluna do equipamento CLAE.

Quanto ao estudo fitoquímico da espécie *Scutia buxifolia*, foram isolados os alcaloides ciclopeptídicos Scutianina-P, -N (diastereoisômeros isolados anteriormente), Aralionina B, conhecida como Condalina A, os ciclipeptídeos neutros Scutianeno-X e -Z. Além destes, foi possível isolar duas novas substâncias, Scutianina Q e R ambas, como discutido anteriormente, precursoras de alguns alcaloides ciclopeptídicos devido as unidades de aminoácidos que compõe suas estruturas. Outra substância que foi uma surpresa estar presente nesta espécie, uma vez que, ela é característica da família Rutaceae, foi a (R)-Tembamida.

Com estes compostos isolados foi possível, também, fazer a análise quantitativa dentro das FBEAT obtidas das cascas do caule. Foram realizadas várias coletas em diferentes locais e épocas do ano e, assim, verificar a sazonalidade da produção destes compostos nesta espécie.

Vale ressaltar, que este é um trabalho preliminar de quantificação e que seriam necessárias várias coletas dentro de cada uma das estações do ano para que se possa ter um dado mais preciso sobre a produção dos alcaloides ciclopeptídicos nas duas espécies aqui estudadas.

Quanto os resultados da atividade antimicrobiana os alcaloides ciclopeptídicos isolados de *Discaria americana* podemos ressaltar a variedade de bactérias tanto Gram-positivas quanto negativas que foram inibidas, ou seja, estes compostos apresentam potencial bacteriostático significativo e, assim, serem fortes candidatos a inibidores

destas bactérias. Assim como, a inibição das FBEAT frente a algumas bactérias testadas mostrou-se muito satisfatório.

Os alcaloides ciclopeptídicos isolados da *Scutia buxifolia* também se mostraram eficientes na inibição quanto na morte das bactérias aqui testadas. Os peptídeos também se mostraram eficientes como inibidores do crescimento bacteriano. Da mesma forma, as FBEAT tiveram excelentes potenciais inibitórios e bactericidas.

7 REFERÊNCIAS

ABU-ZARGA, M.; SALIM, S.; AL-ABOUDI, A. New Cyclopeptide Alkaloids from *Ziziphus lotus*. **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 4, p. 504-511, Abril 1995.

AGUIRRE, G. et al. Asymmetric Synthesis of Naturally Occurring β -Hydroxyamides (R)-Tembamide and (R)-Aegeline. **Revista de la Sociedad Química de México**, v. 45, n. 1, p. 21-24, 2001.

ALARCÓN, J.; CESPEDES, C. L. chemical constituents and biological activities of South American Rhamnaceae. **phytochemistry review**, v. 14, p. 389-401, march 2015.

ARBAIN, D.; TAYLOR, W. C. Cyclopeptide alkaloids from *Antidesma montana*. **Phytochemistry**, v. 33, n. 5, p. 1263-1266, 1993.

BAIG, M. A. et al. Accumulation of tetrapeptide precursors of macrocyclic alkaloids by callus of *Ceanothus americanus*. **Phytochemistry**, v. 34, n. 1, p. 171-174, Agosto 1993.

BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, p. 71-79, 2016.

BRANDÃO, M. G. L. Importância dos registros históricos na investigação e utilização de produtos naturais. In: OLIVEIRA, C. M., et al. **Farmacognosia do Produto Natural ao Medicamento**. Porto Alegre: Atrmed, 2017. Cap. 4, p. 29-38.

BROWN, E. D.; WRIGHT, G. D. Antibacterial drug discovery in the resistance era. **Nature**, v. 529, n. 7586, p. 336-343, 2016.

CARO, M. S. B. et al. Absolute Configuration of Franganine. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 1220-1222, junho 2012.

DAHMER, J. **Alcaloides Ciclopeptídicos da Espécie *Discaria americana* GILLES AND HOOKER: Estereoquímica e Atividade Antimicrobiana**. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS, p. 158. 2013.

DE MOURA, N. F. et al. Alkaloids, amides and antispasmodic activity of *Zanthoxylum hyemale*. **Planta Medica**, v. 68, n. 6, p. 534-538, 2002.

DIGEL, M. et al. Peptide alkaloids from *Discaria febrífuga* Mart. **Physiologische Chemie**, v. 11, p. 1641-1643, 1983.

EL-SEEDI, H. R. et al. Cyclopeptide Alkaloids. **Phytochemistry Review**, v. 6, p. 143-165, 2007.

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

GIACOMELLI, S. R. et al. Cyclopeptides from the bark of *Discaria americana*. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 997-999, 2001.

GIACOMELLI, S. R. et al. Cyclic peptide alkaloids from the bark of *Discaria americana*. **Phytochemistry**, v. 65, p. 933-937, 2004.

HAN, B. H.; PARK, M. H.; HAN, Y. N. Cyclo Peptide and Peptide Alkaloids from seeds of *Zizyphus vulgaris*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 10, p. 3315-3319, Fevereiro 1990.

HAN, B. H.; PARK, M. H.; PARK, J. H. Chemical and Farmalogical Studies on sedative cyclopeptide alkaloids in some Rhamnaceae plants. **Pure Appl Chem**, v. 61, n. 3, p. 443-448, 1989.

HAN, J. et al. Cyclopeptide alkaloids from *Ziziphus apetala*. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 12, p. 2571-2575, 2011.

HARRIS, D. C.; LUCY, C. A. **Análise química quantitativa**. 9. ed. [S.l.]: LTC, 2017.

HENNIG, P.; MOREL, A. F.; VOELTER, W. Discarine-L. A new peptide alkaloid from *Discaria febrifuga* Martius. **Organische Chemie**, v. 9, p. 1180-1185, 1986.

HONG, J. et al. New cyclopeptide alkaloid and lignan glycoside from *Justicia procumbens*, 17, n. 1, 2015. 33-39.

JIN, H. et al. New cyclopeptide alkaloid and lignan glycoside from *Justicia procumbens*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 17, n. 1, p. 33-39, 2015.

KALEEM, W. A. et al. New 14-Membered cyclopeptide alkaloids from *zizyphus oxyphylla* edgew. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 9, p. 11520-11529, 2012.

KLEIN-JÚNIOR, L. C.; HENRIQUES, A. T. Alcaloides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C. M. O., et al. **Farmacognosia: Do Produto natural ao medicamento**. Porto Alegre : Artmed, 2017.

KYO BIN KANG A, G. M. B. K. G. J. et al. Jubanines F–J, cyclopeptide alkaloids from the roots of *Zizyphus jujuba*. **Phytochemistry**, v. 119, p. 90-95, 2015.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia Líquida Moderna: HPLC/CLAE**. Campinas, SP: Editora Átomo, 2009.

LEHTINEN, J. et al. Real-time monitoring of antimicrobial activity with the multiparameter microplate assay. **Journal Microbiol Methods**, v. 66, p. 381-389, 2006.

LIMA, R. B.; GIULIETTI, A. M. RHAMNACEAE. In: WANDERLEY, M. G. L. . S. G. J. . M. T. S. . M. S. E. . **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**. São Paulo: FAPESP:RiMa, v. 4, 2005. p. 331-441.

MACHADO, E. C.; FILHO, A.; MOREL, A. F. Four Cyclopeptide Alkaloids from *Discaria longispina*. **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 4, p. 548-553, Abril 1995.

MACHADO, E. C.; ZANATTA, N.; MOREL, A. F. Atribuição dos deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C do alcaloide 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**. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Química) - UFSM. Santa Maria, RS. 2005.

MALDANER, G. **Estudo dos Metabólitos secundários de *Scutia buxifolia* e suas atividades biológicas**. Tese de Doutorado- Universidade federal de Santa Maria. Santa Maria. 2010.

MALDANER, G. et al. Cyclopeptide alkaloids from *Scutia buxifolia* Reiss. **Phytochemistry**, v. 72, n. 8, p. 804-809, 2011.

MARANGON, P. **Alcaloides Ciclopeptídicos de *Scutia buxifolia* e suas Atividades Biológicas**. Dissertação de mestrado - Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS. 2014.

MARCHAND, J. et al. Alcaloides peptídiques - VII Les Lasiodines A et B, Alcaloides du *Lasiodiscus marmoratus* C. H. Wright (Rhamnacees). **Tetrahedron**, v. 25, p. 937-954, 1969.

MEDINA, R. P. et al. Ixorine, a new cyclopeptide alkaloid from the branches of *ixora brevifolia*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 4, p. 753-758, 2016.

MENEZES, A. S. et al. Scutianine-J, a cyclopeptidic alkaloid isolated from *scutia buxifolia*. **Phytochemistry**, v. 38, n. 3, p. 783-789, 1995.

MOLZ, M. *Scutia buxifolia*. **Flora Digital**, 2009. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=1384>. Acesso em: 08 fevereiro 2018.

MOREL, A. F. **Alcaloides peptídicos de *Scutia buxifolia* e *Discaria febrifuga***. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Química)-Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas. Campinas. 1978.

MOREL, A. F. et al. Peptide Alkaloids of *Scutia buxifolia*. **Phytochemistry**, v. 18, p. 473-477, 1979.

MOREL, A. F. et al. Cyclopeptide alkaloids of *Scutia buxifolia*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 1, p. 125-129, 1998.

MOREL, A. F. et al. Antibacterial cyclopeptide alkaloids from the bark of *Condalia buxifolia*. **Phytochemistry**, v. 61, n. 5, p. 561-566, 2002.

MOREL, A. F. et al. Cyclopeptide alkaloids from *Scutia buxifolia* Reiss and their antimicrobial activity. **Phytochemistry**, v. 66, p. 2571-2576, 2005.

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

MOREL, A. F.; MALDANER, G.; ILHA, V. Cyclopeptide alkaloids from higher plants. In: CORDELL, G. A.; EVANSTON, I. **The Alkaloids Chemistry and Biology**. 1. ed. [S.l.]: Elsevier, v. 67, 2009. Cap. 2, p. 79-136.

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

NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard**. 8. ed. Pensilvânia - USA: NCCLS, v. NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6], 2003.

NICULAU, E. S. et al. Análise Quantitativa de Produtos Naturais em Plantas por CL-EM. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 1, p. 204-230, 2016.

NIERO, R. Aspectos químicos e biológicos de plantas medicinais e considerações sobre fitoterápicos. In: BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO, V. (). **Ciências Químico-Farmacêuticas: contribuição e desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos**. [S.l.]: [s.n.], 2003.

OLIVEIRA, P. L. D. et al. Amaiouine, a new cyclopeptide alkaloid from the leaves of *Amaioua guianensis* Aubl. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 6, p. 1195-1197, 2009.

PANDEY, M. B. et al. Two new 14-membered cyclopeptide alkaloids from *Zizyphus xylopyra*. **Natural Products Research**, v. 26, n. 9, p. 836-841, 2012.

PANSEETA, P. et al. Antiplasmodial and antimycobacterial cyclopeptide alkaloids from the root of *Zizyphus mauritiana*. **Phytochemistry**, v. 72, p. 909-915, 2011.

PLANTAS que Curam. Disponível em: <<http://www.plantasquecuram.com.br/ervas/coronilha.html#.Wndt-KinHIU>>. Acesso em: 27 janeiro 2018.

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. 8-9, 1984.

SANTOS, S. R.. **Estudo anatômico do lenho e descrição morfológica de cinco espécies Sul-rio-grandenses da família Rhamnaceae**. Dissertação de Mestrado - Universidade federal de Santa Maria. Santa Maria. 2008.

SAXENA, M. et al. Phytochemistry of Medicinal Plants. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 1, n. 6, p. 168 a 182, 2013.

SCARPA, G. F.; ROSSO, C. N.; ANCONATANI, L. Etnobotánica médica de grupos criollos de Argentina: Reconocimiento, análisis y puesta en valor de los datos presentados por el gobierno argentino en la exposición universal de París de 1889. **DARWINIANA**, v. 4, n. 2, p. 291-315, 2016.

SERVIS, R. S. et al. Peptide Alkaloids from *Ceanothus americanus* L. (Rhamnaceae). **Journal Am Chem. Soc.**, v. 91, n. 20, p. 5619-5624, Setembro 1969.

SIERRA, M. G. et al. Peptide Alkaloids of *Scutia buxifolia*. **Phytochemistry**, v. 13, p. 2-4, 1974.

SILVA, M. et al. A new peptide alkaloid from *Discaria crenata*. **Phytochemistry**, v. 13, p. 861-863, 1974.

SINGH, J. P.; RAGHUBANSHI, S.; YADAVA, A. Cyclopeptide alkaloids of *Ziziphus rugosa*. **Chem Biol Phys Sci**, v. 3, p. 994-997, 2013.

STEHMANN, J. R.; SOBRAL, M. Biodiversidade no Brasil. In: OLIVEIRA, C. M., et al. **Farmacognosia do Produto Natural ao Medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017.

TAN, N.-H.; ZHOU, J. Plant Cyclopeptides. **Chemistry Review**, v. 106, n. 3, p. 840-895, Fevereiro 2006.

TSCHESCHE, R.; HILLEBRAND, D.; BICK, I. R. C. Pubescine A, a cyclopeptide alkaloid from *Discaria pubescens*. **Phytochemistry**, v. 19, n. 3, p. 1000-1001, 1980.

TSCHESCHE, R.; KAUBMANN, E. U.; FELHABER, H. W. Alkaloide aus Rhamnaceen, IX. Aralionin-B, ein Nebenalkaloid aus *Araliorhamnus vaginata* Perrier. **Chemische Berichte**, v. 103, n. 8, p. 2501-2504, 1970.

TUENTER, E. et al. Cyclopeptide alkaloids. **Phytochemistry Review**, v. 16, n. 4, p. 623-637, November 2016.

TUENTER, E. et al. Cyclopeptide Alkaloids from *Hymenocardia acida*. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 7, p. 1746-1751, 2016.

TUENTER, E. et al. Antiplasmodial Activity, Cytotoxicity and Structure-Activity Relationship Study of Cyclopeptide Alkaloids. **Molecules**, v. 27, n. 2, p. 224, 2017.

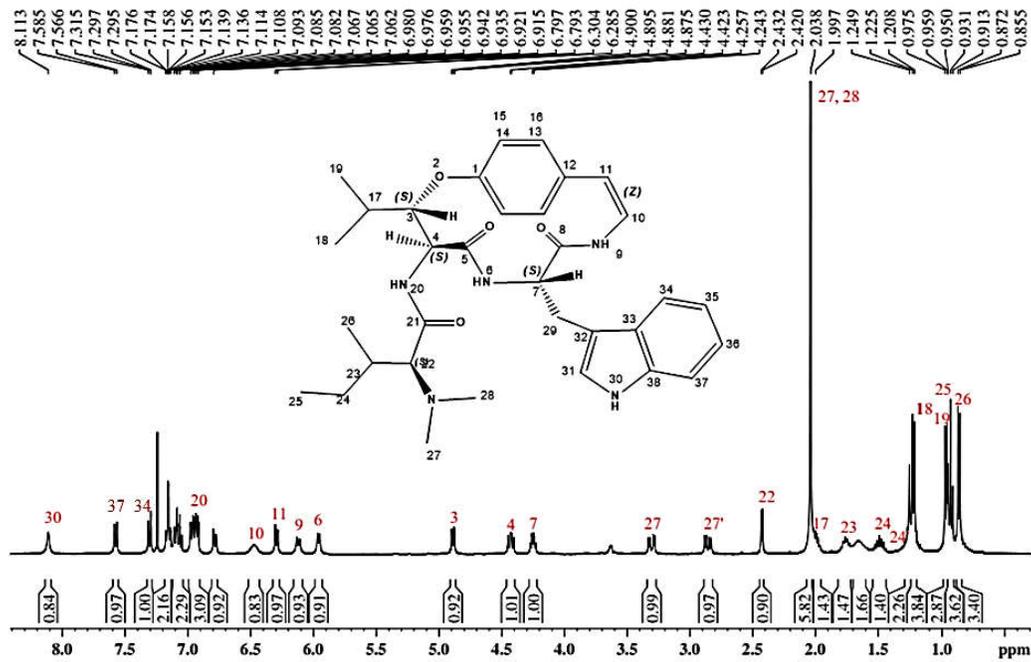
TUENTER, E. et al. Isolation and structure elucidation of cyclopeptide alkaloids from *Ziziphus nummularia* and *Ziziphus spina-christi* by HPLC-DAD-MS and HPLC-PDA-(HRMS)-SPE-NMR. **Phytochemistry**, v. 138, p. 163-169, 2017.

VOELTER, W. et al. Studies on the peptide alkaloids of *Discaria febrifuga*. **Chemical Sciences**, v. 4, p. 467-472, 1987.

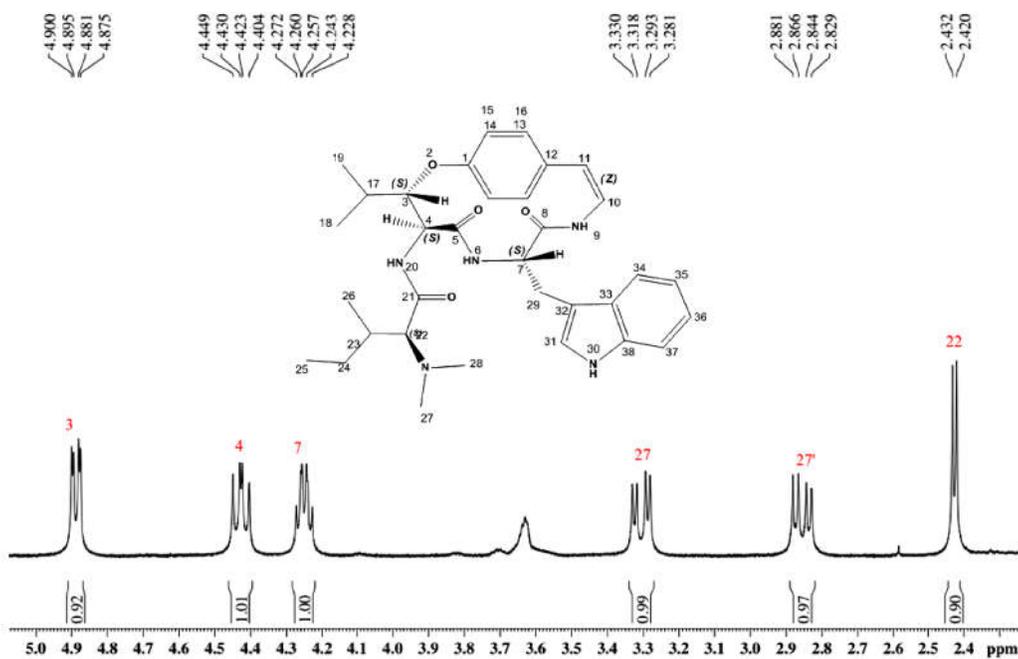
WADOOD, A. et al. Phytochemical Analysis of medicinal plants occurring in local area of Mardan. **Biochemistry & Analytical Biochemistry**, v. 2, p. 1-4, 2013.

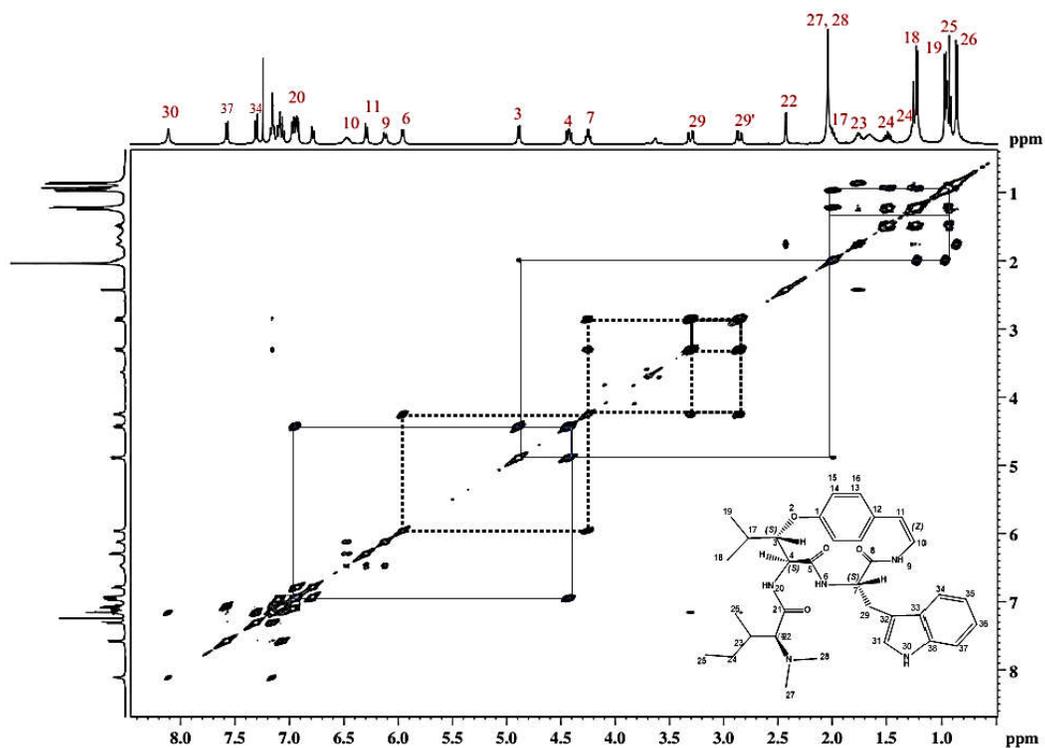
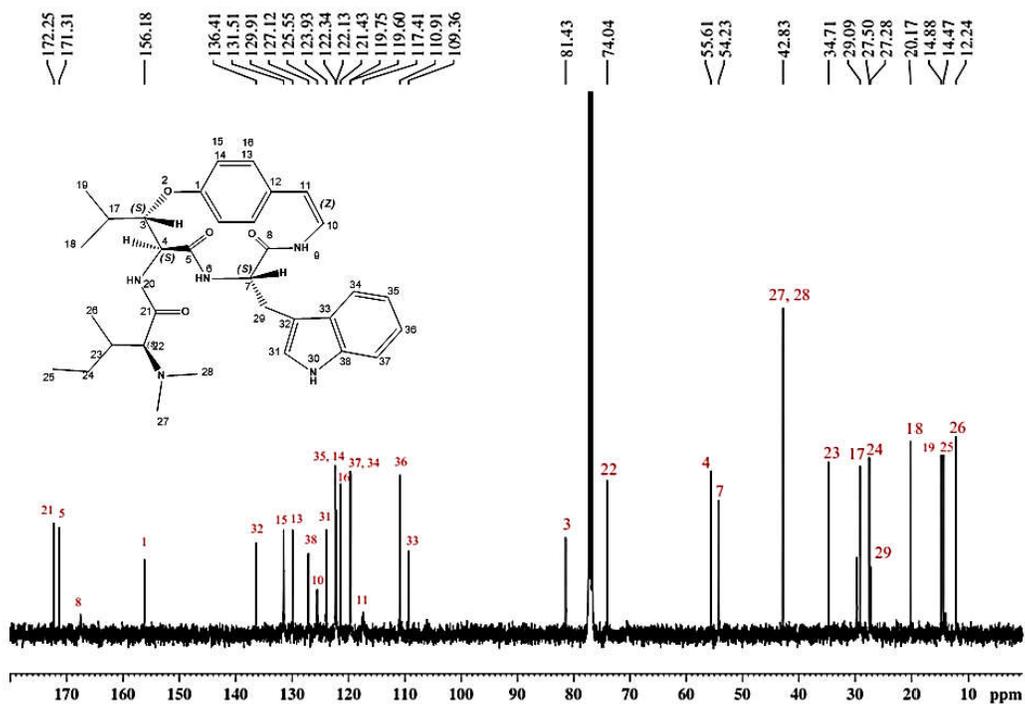
8 APÊNDICE

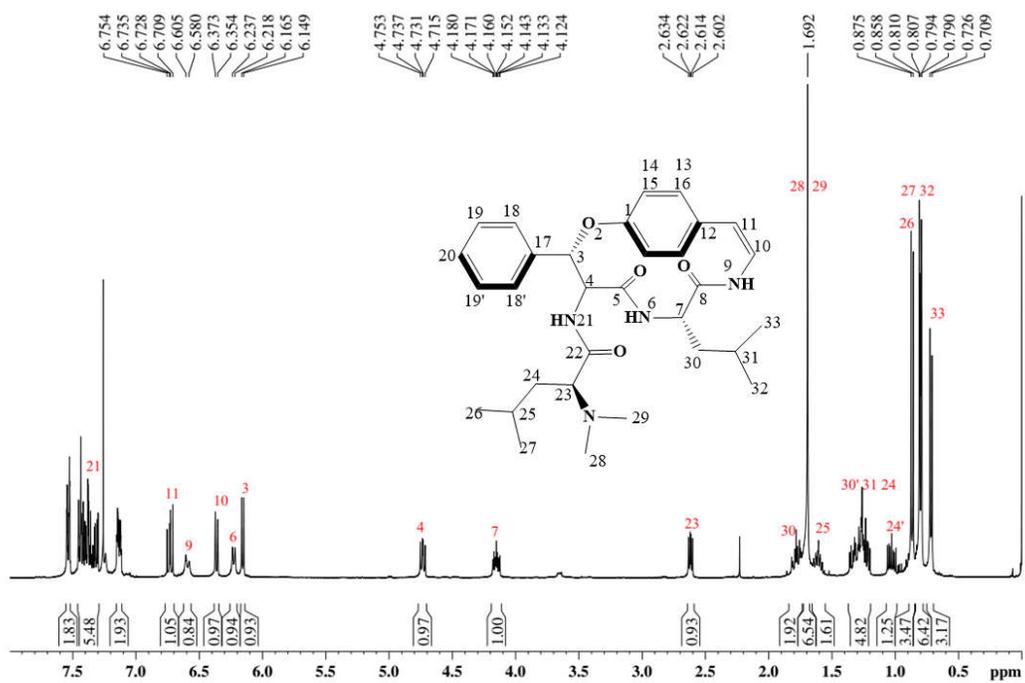
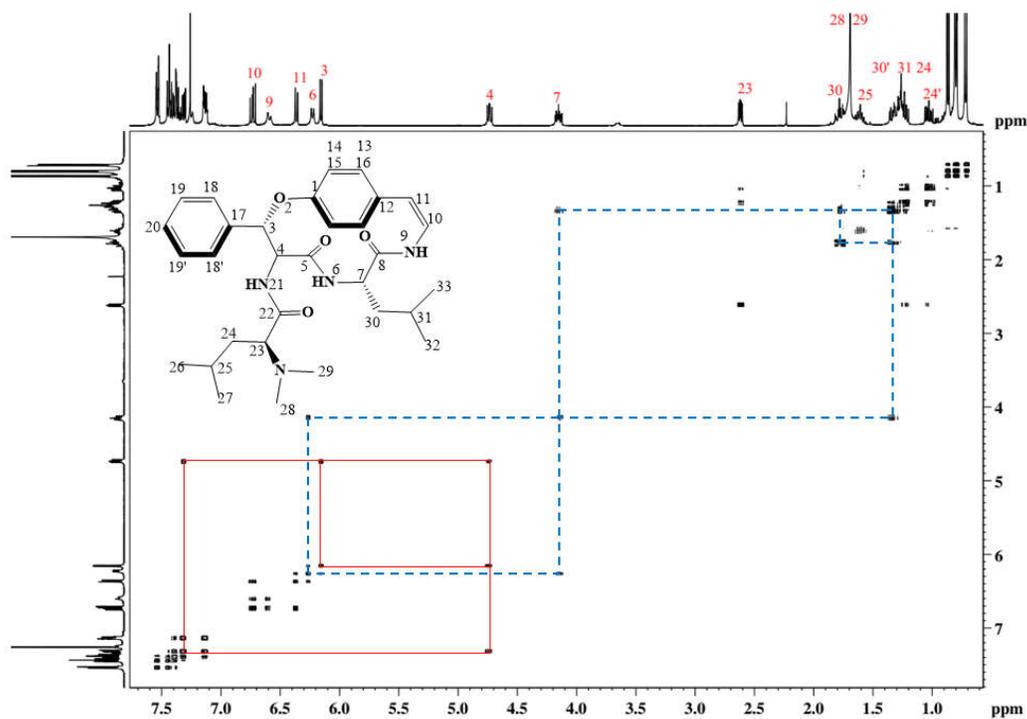
Apêndice 1: Espectro de ^1H da Discarina B, em CDCl_3 a 400MHz.

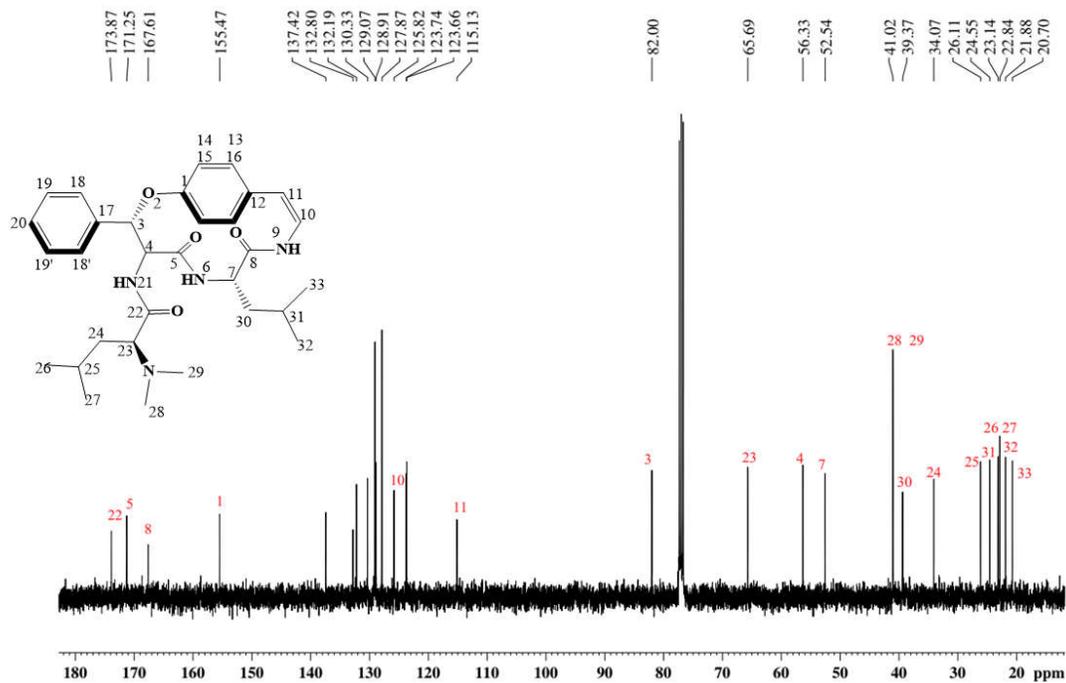
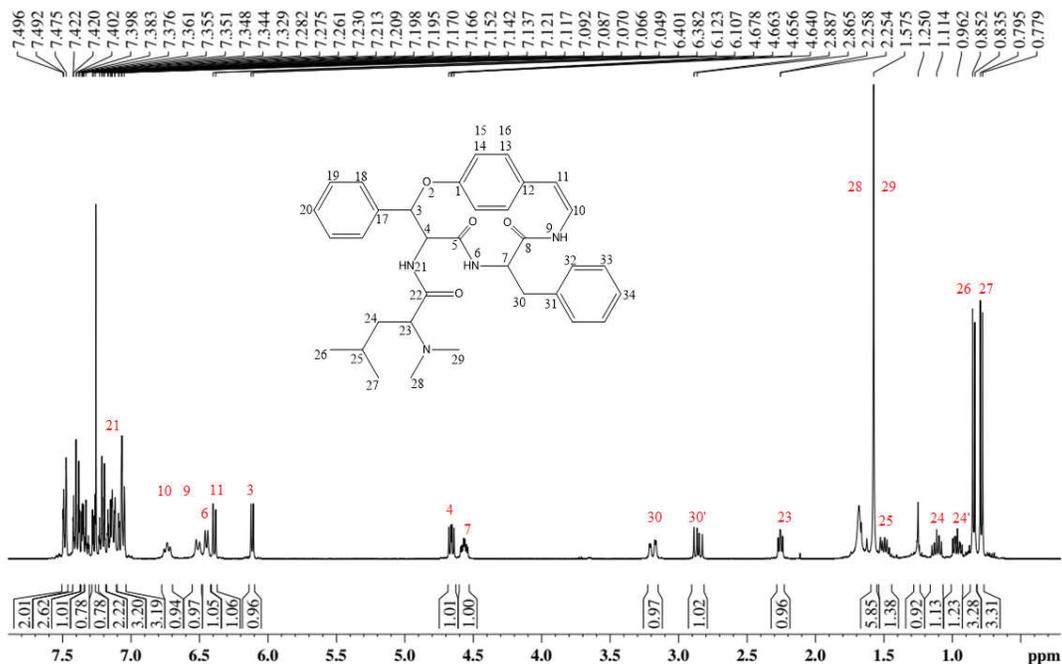


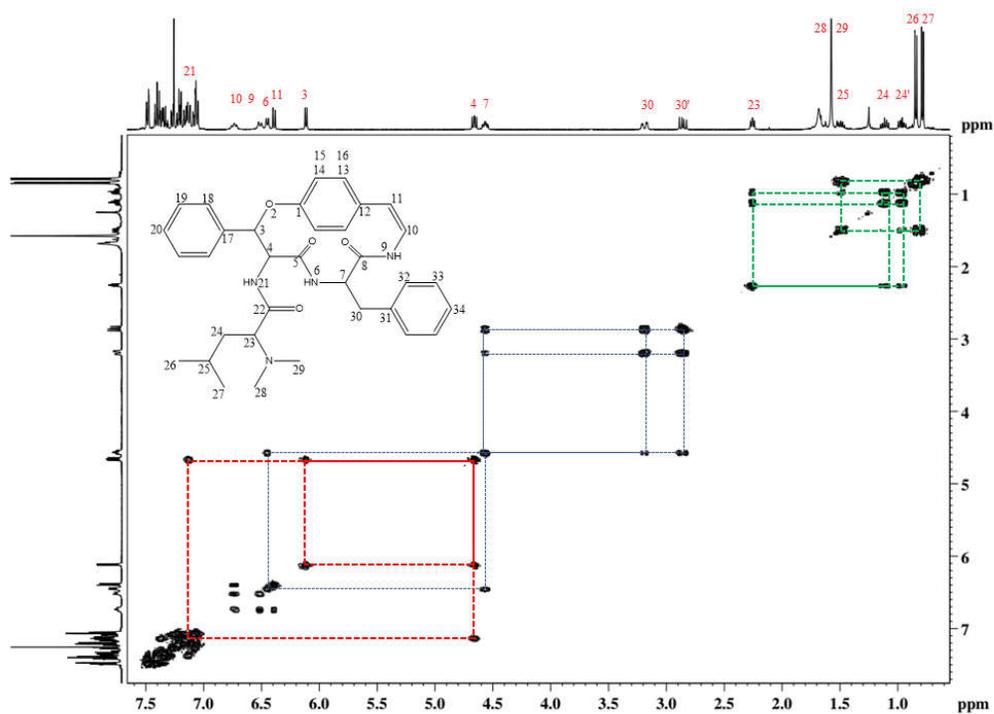
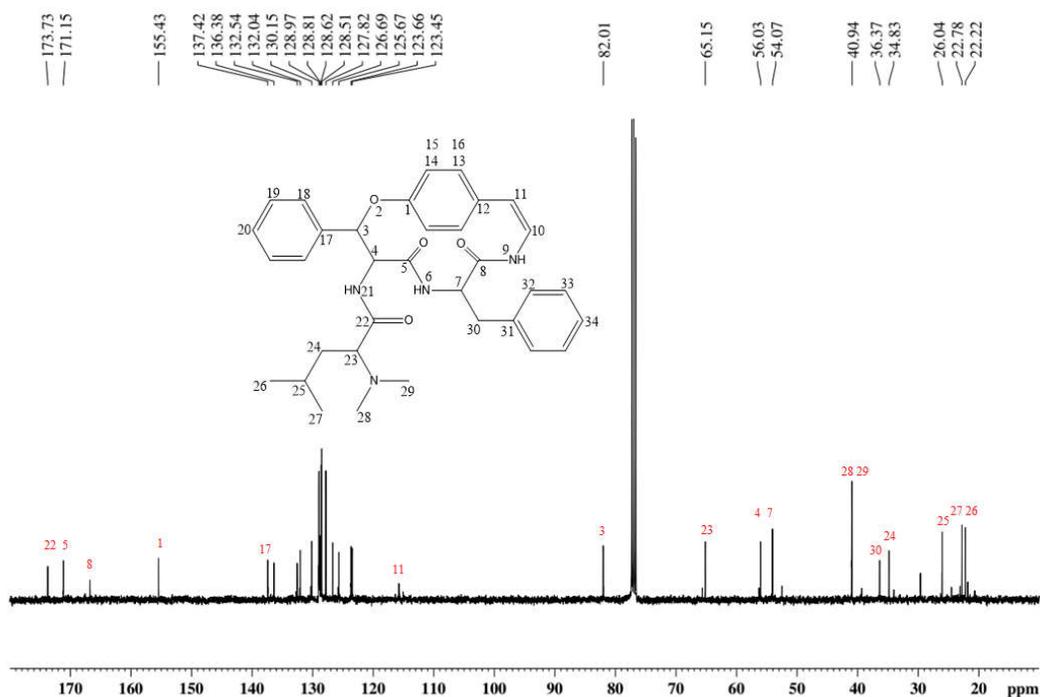
Apêndice 2: Expansão do espectro de ^1H da Discarina B, em CDCl_3 a 400MHz.

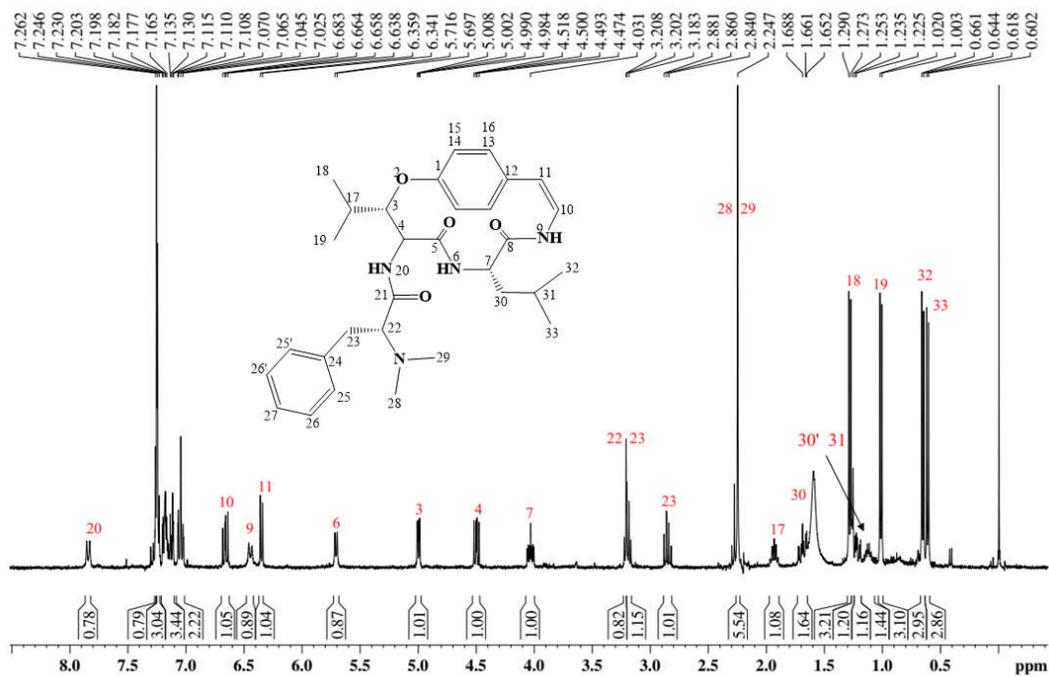
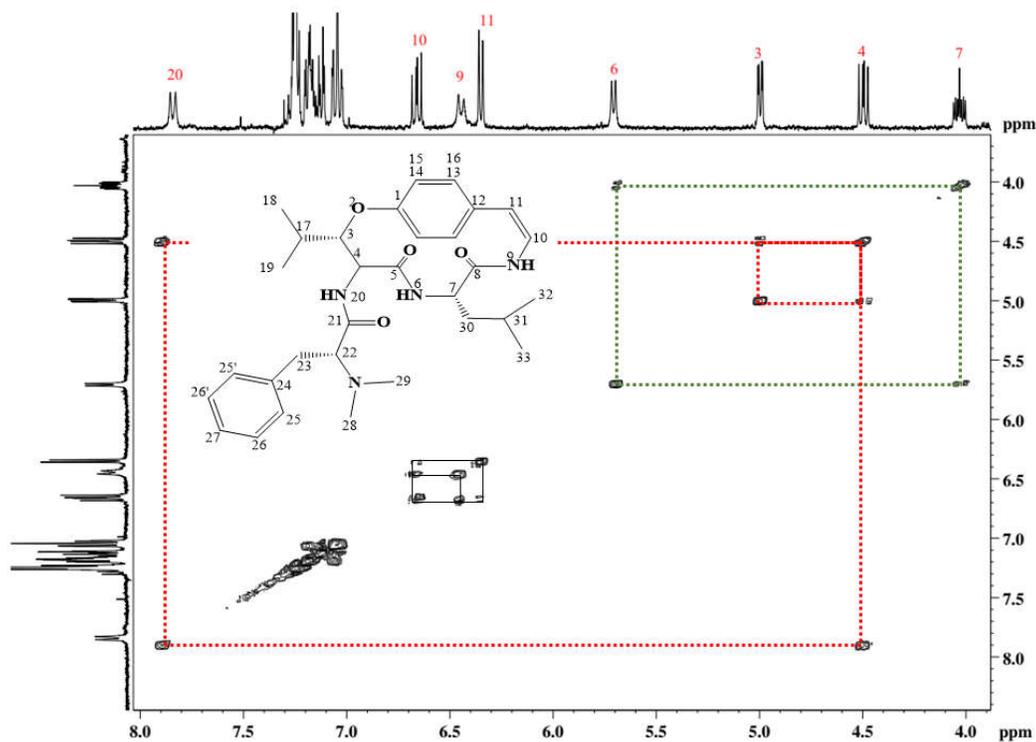


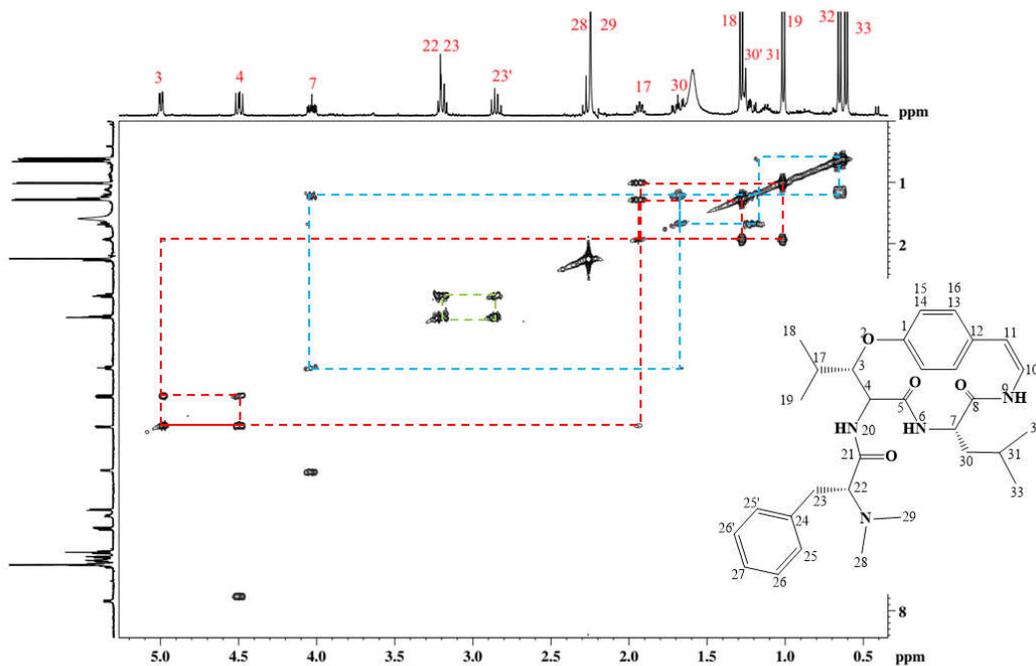
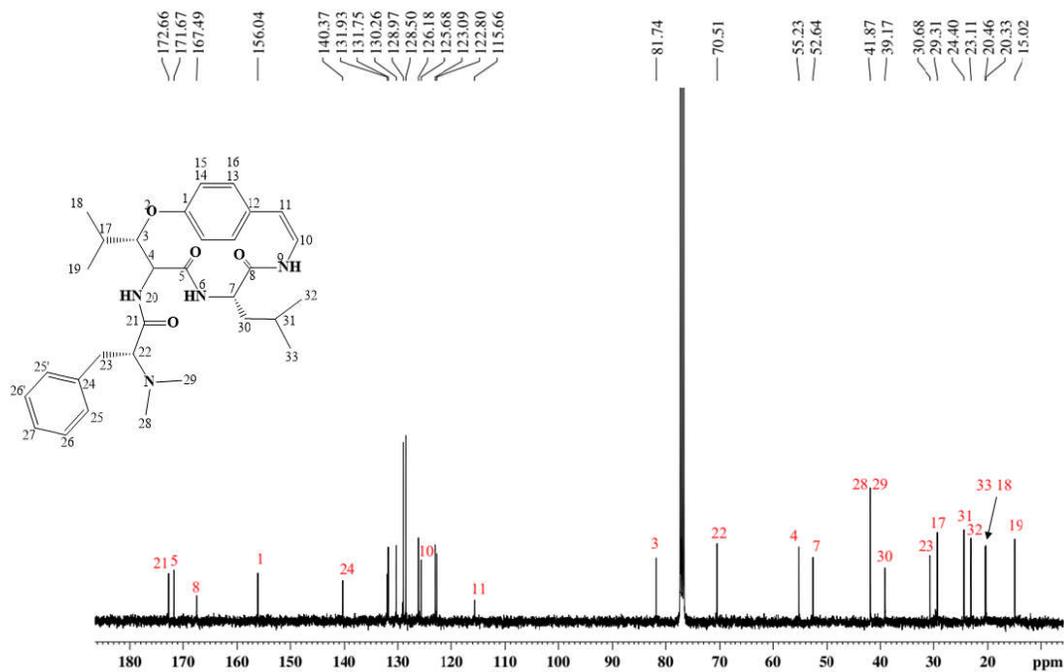
Apêndice 3: Espectro de Cosy da Discarina B, em CDCl_3 a 400MHz.Apêndice 4: Espectros de ^{13}C da Discarina B, em CDCl_3 a 400MHz.

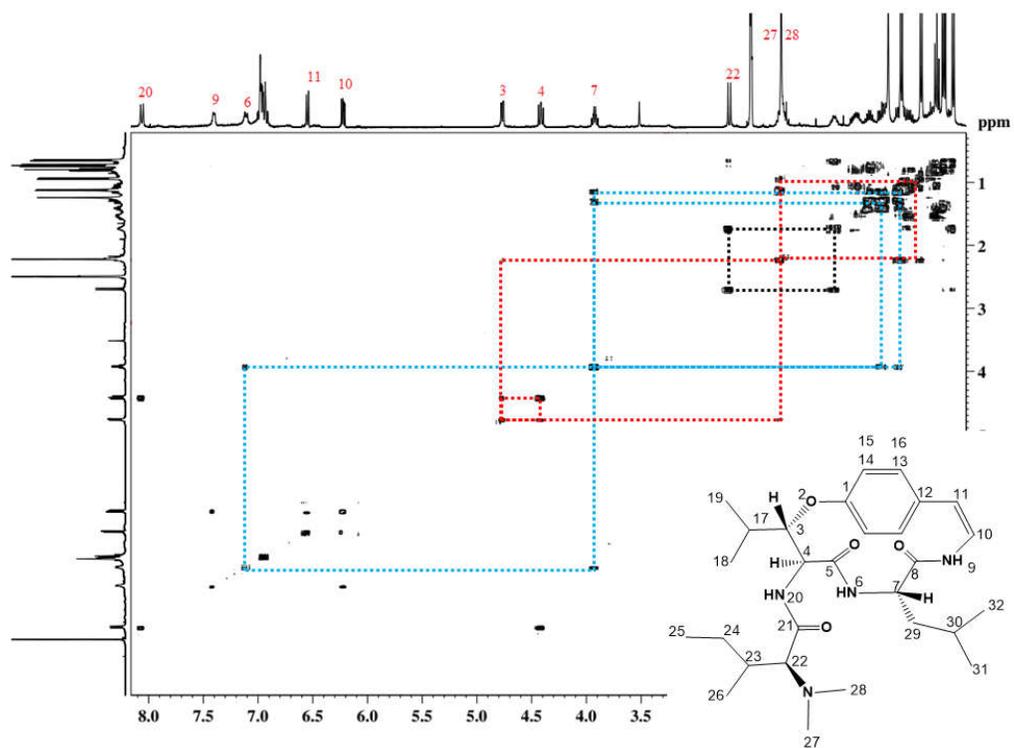
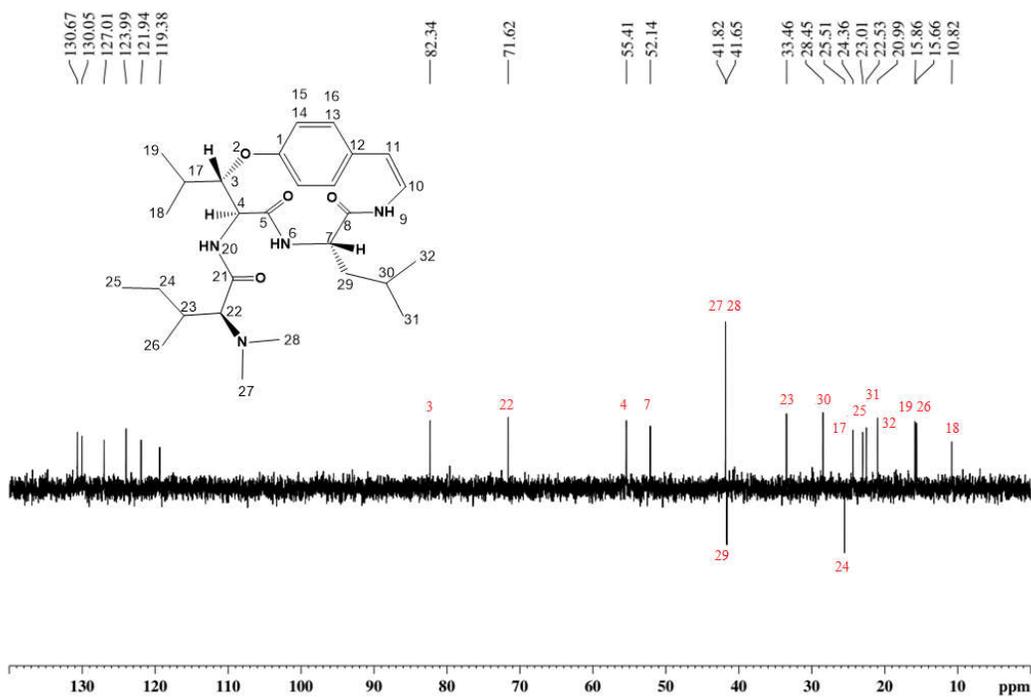
Apêndice 5: Espectro de ^1H da Discarina C, em CDCl_3 a 400MHz.Apêndice 6: Espectro de Cosy da Discarina C, em CDCl_3 a 400MHz.

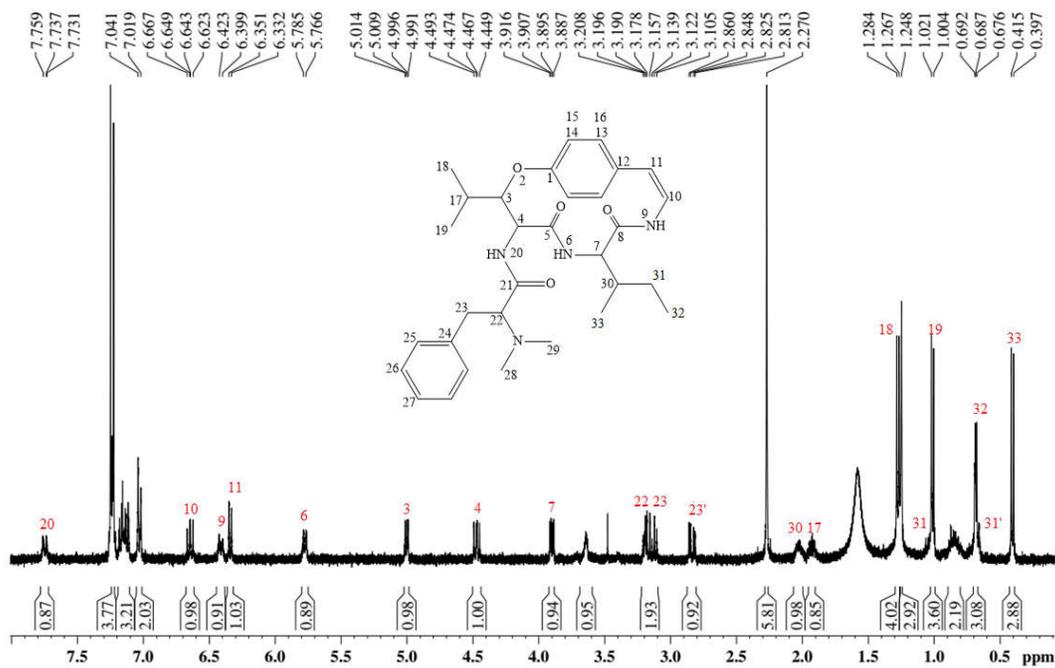
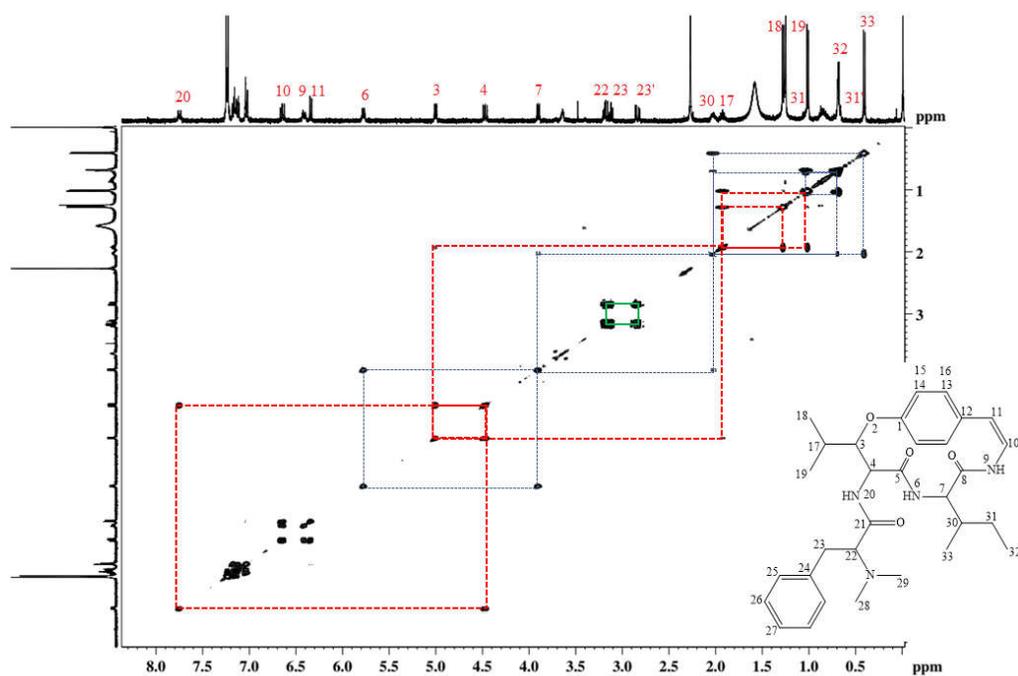
Apêndice 7: Espectro de ^{13}C da Discarina C, em CDCl_3 a 400MHz.Apêndice 8: Espectro de ^1H da Discarina D, em CDCl_3 a 400MHz.

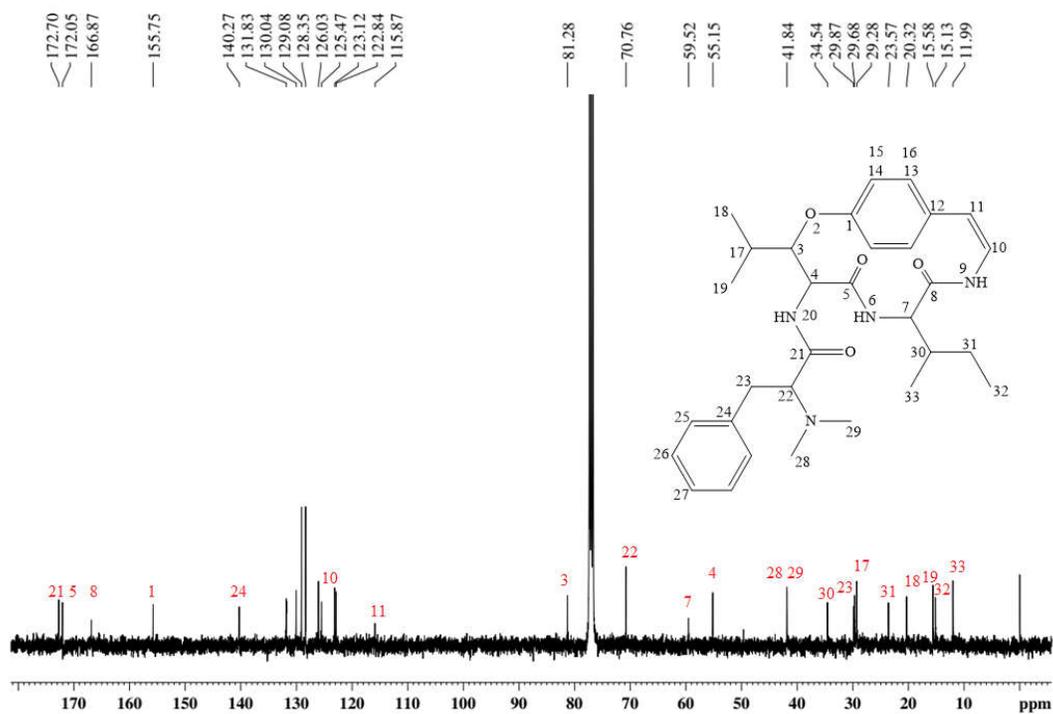
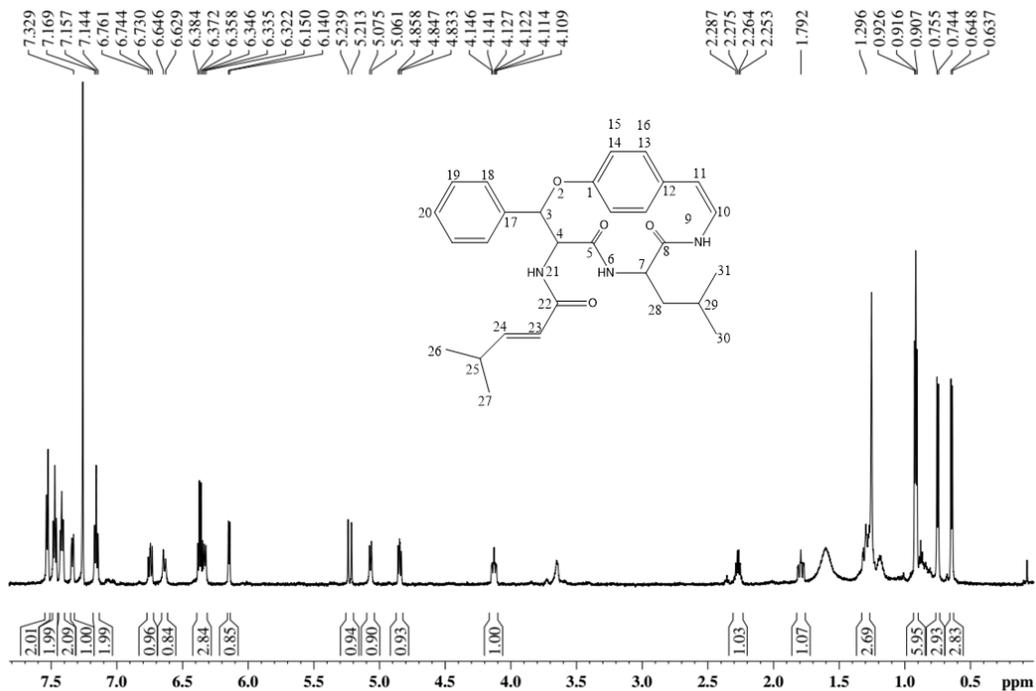
Apêndice 9: Espectro de Cosy da Discarina D, em CDCl_3 a 400MHz.Apêndice 10: Espectro de ^{13}C da Discarina D, em CDCl_3 a 400MHz.

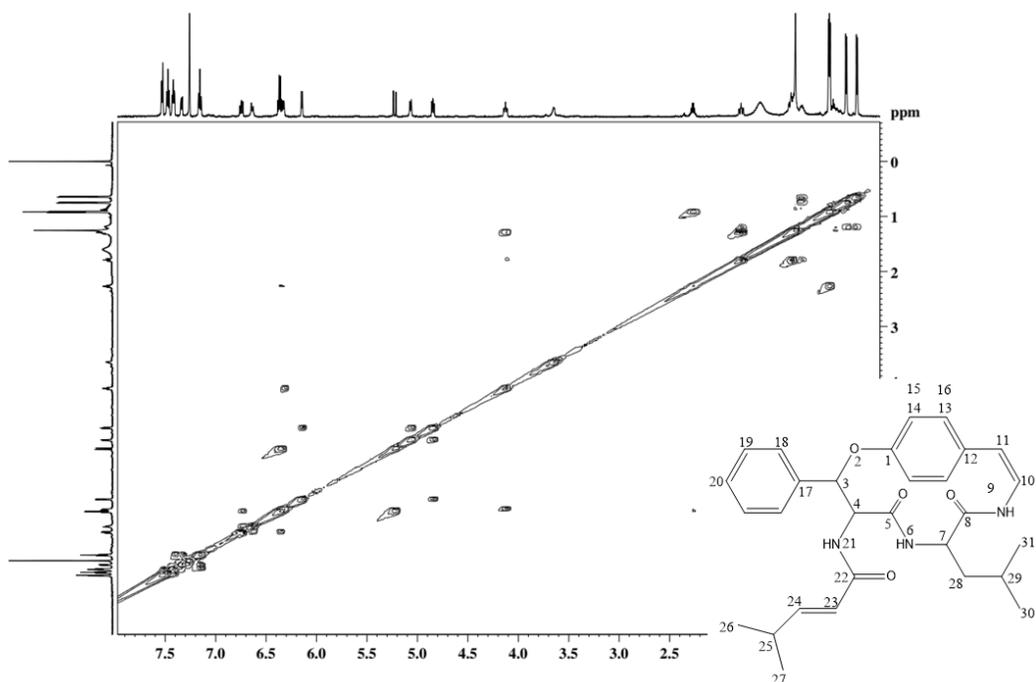
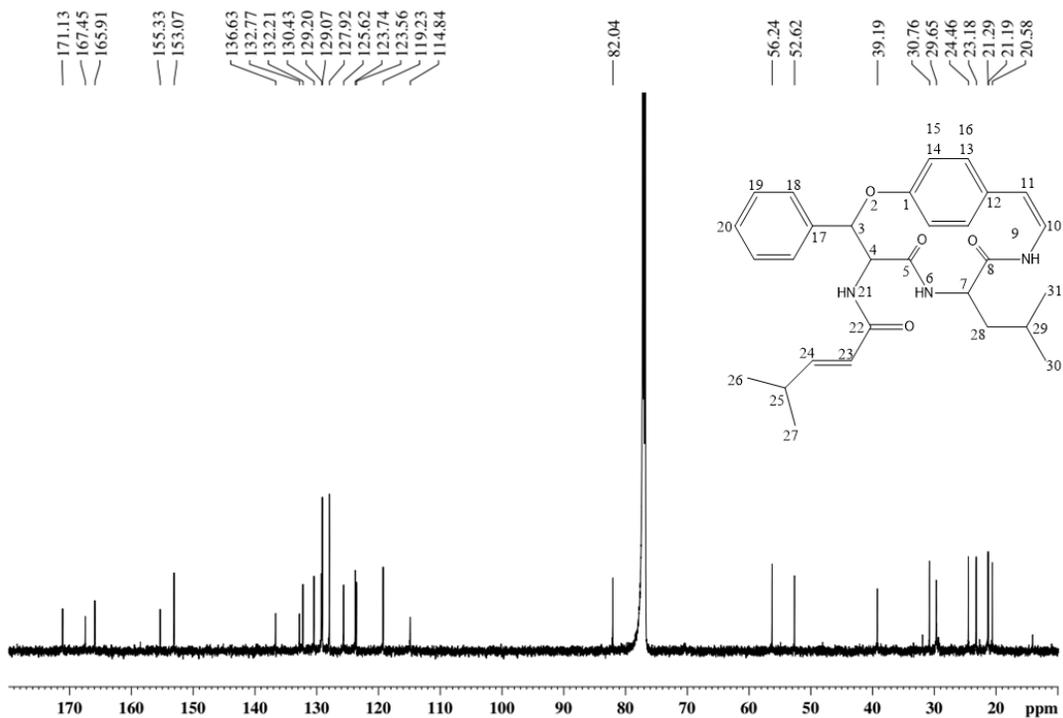
Apêndice 11: Espectro de ^1H da Frangufolina, em CDCl_3 a 400MHz.Apêndice 12: Espectro de Cosy da Frangufolina, em CDCl_3 a 400MHz.

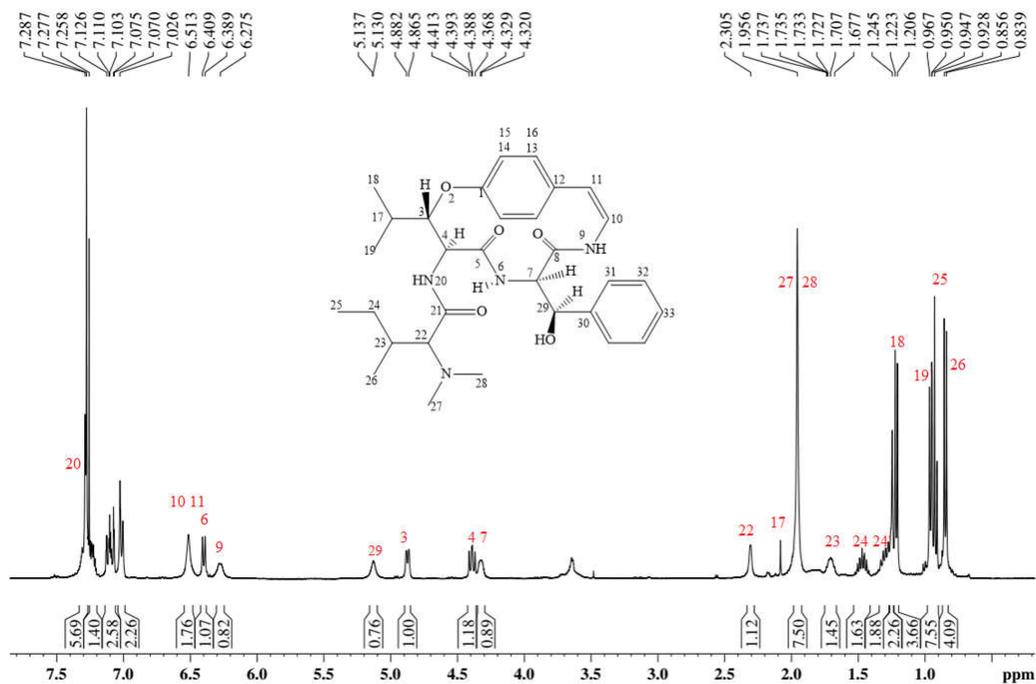
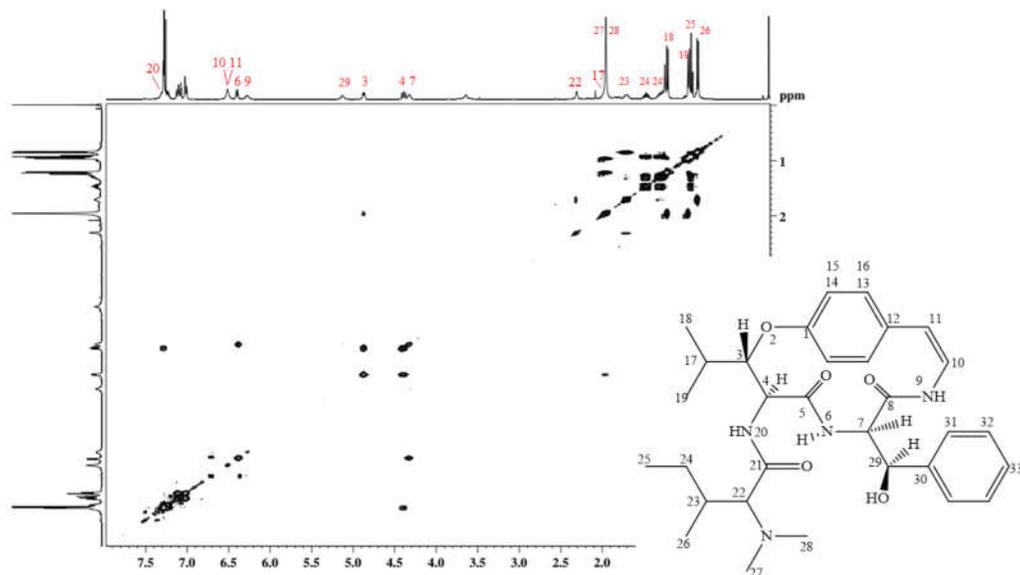
Apêndice 13: Espectro de Cosy da Frangufolina, em CDCl_3 a 400MHz.Apêndice 14: Espectro de ^{13}C da Frangufolina, em CDCl_3 a 400MHz.

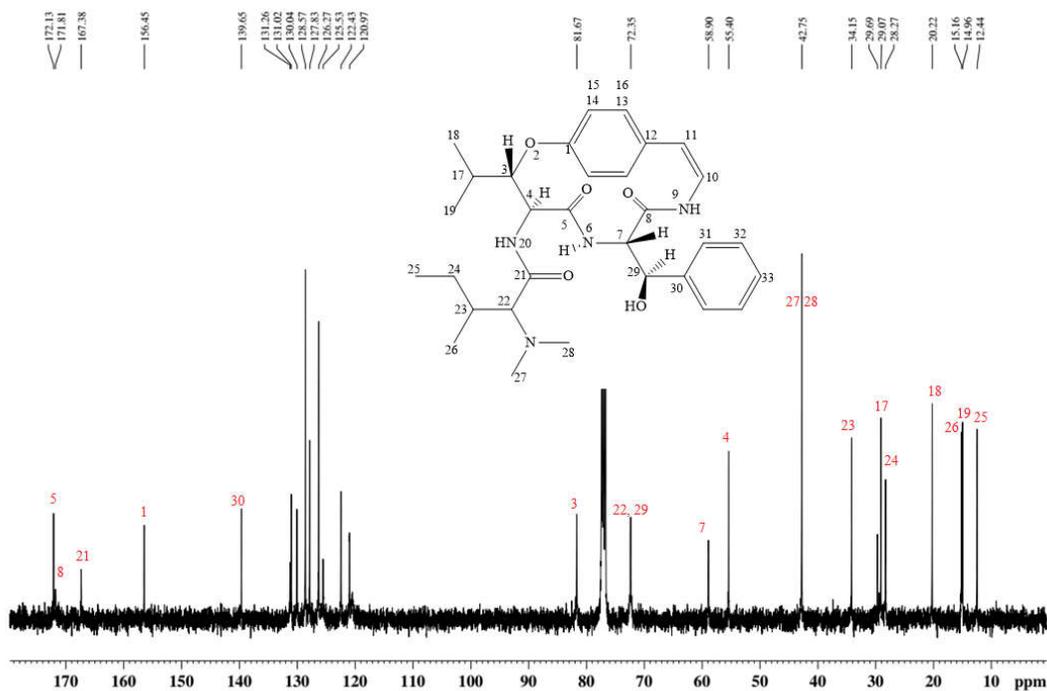
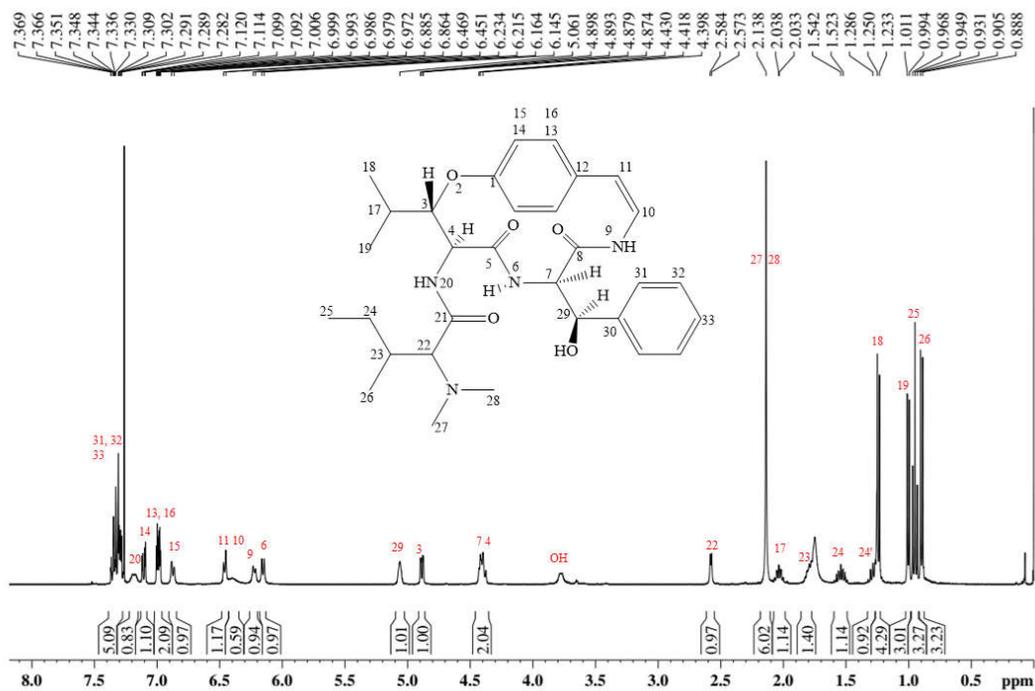
Apêndice 15: Espectros de Cosy da Frangulanina, em DMSO-d⁶ a 400MHz.Apêndice 16: Espectro de ¹³C da Frangulanina, em DMSO-d⁶ a 400 MHz.

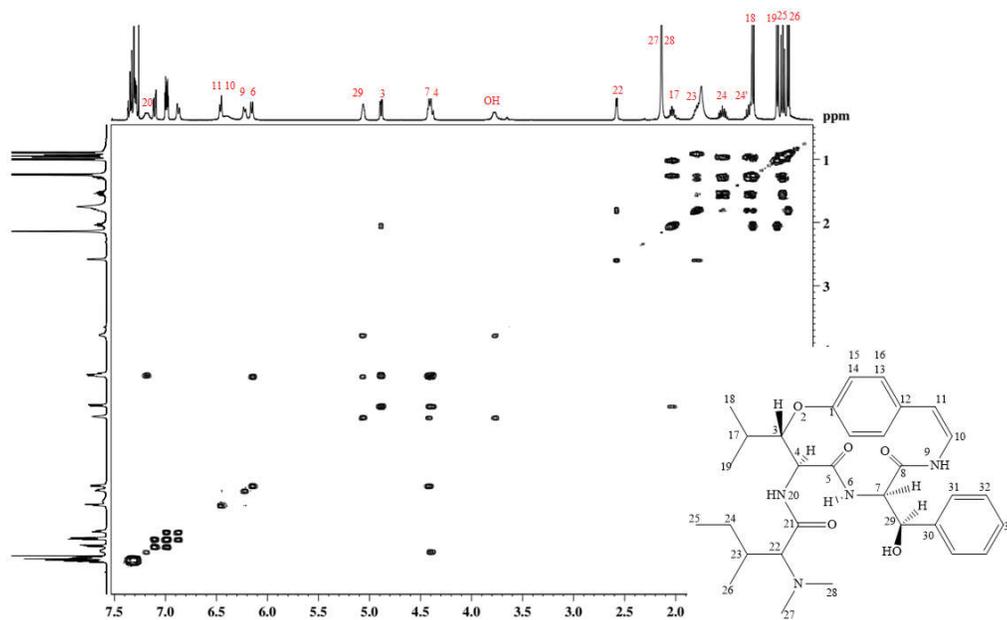
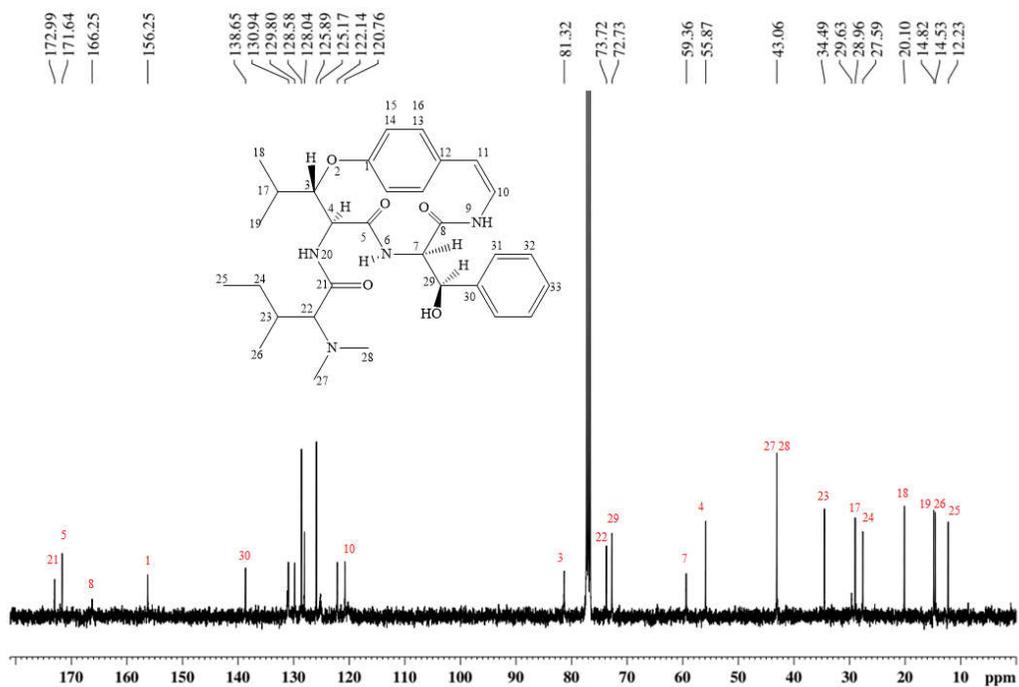
Apêndice 17: Espectro ^1H da Adouetina Y', em CDCl_3 a 400MHz.Apêndice 18: Espectro de Cosy da Adouetina Y', em CDCl_3 a 400MHz.

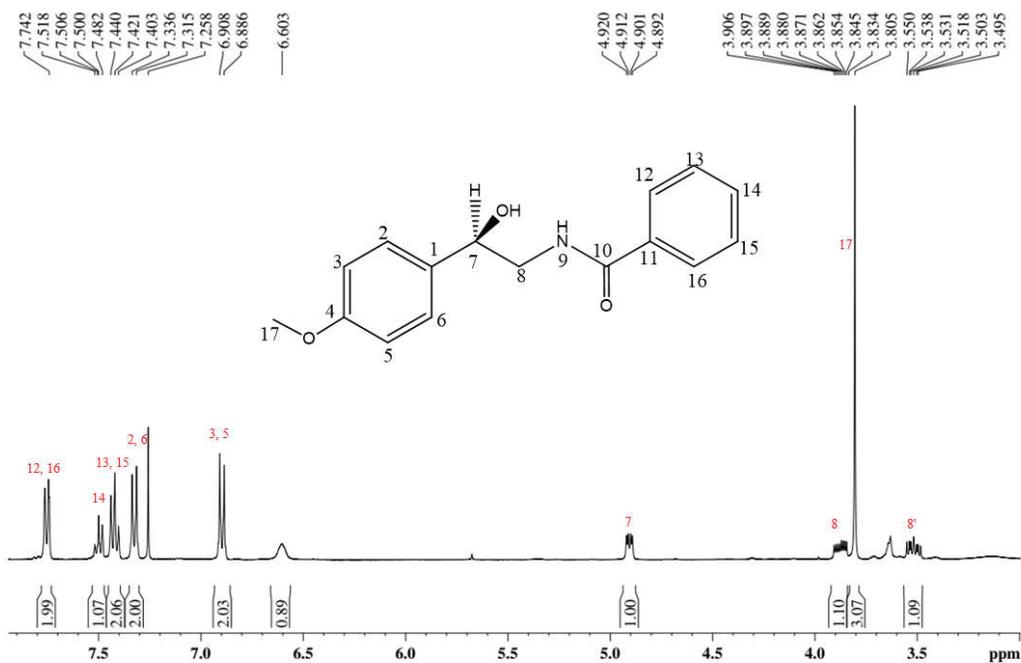
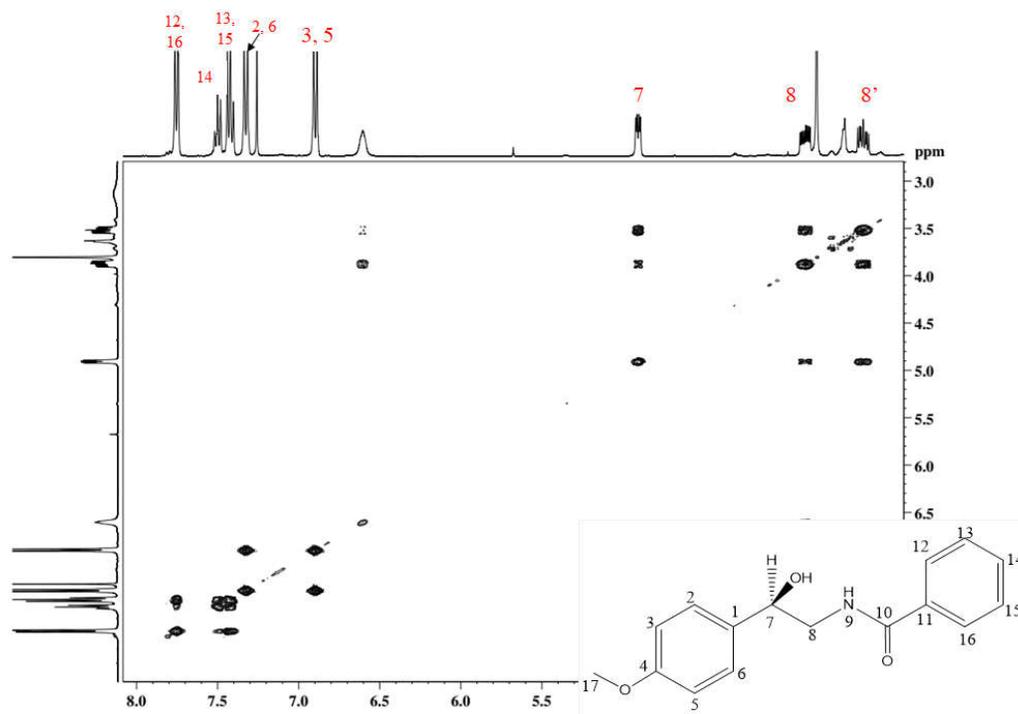
Apêndice 19: Espectro de ^{13}C da Adouetina Y', em CDCl_3 a 400MHz.Apêndice 20: Espectro de ^1H do Discareno C, em CDCl_3 a 400MHz.

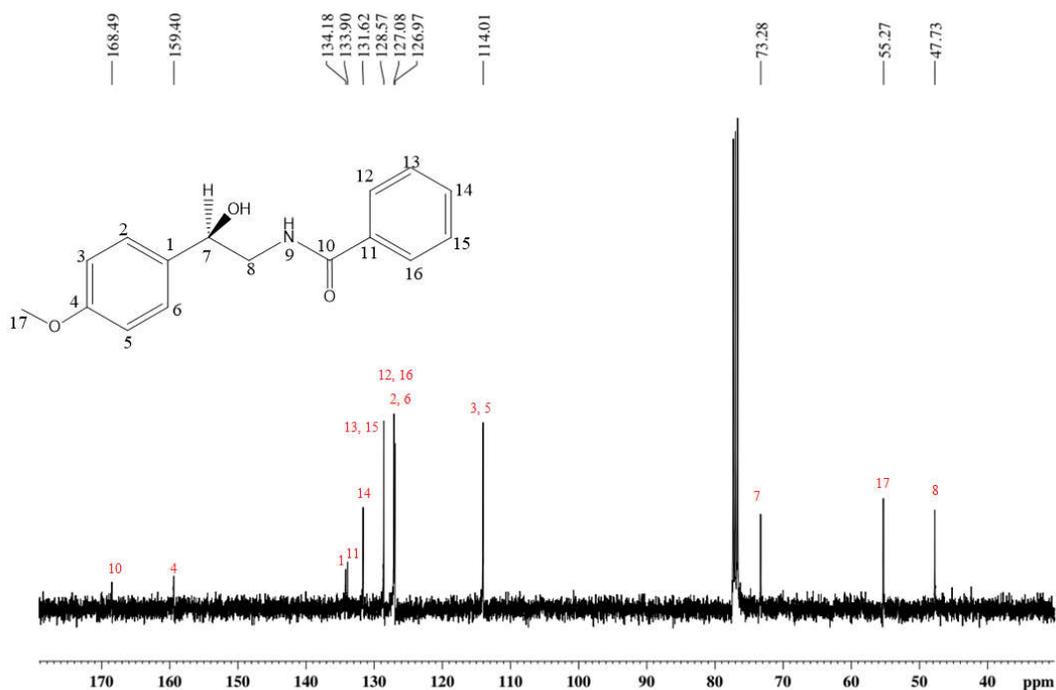
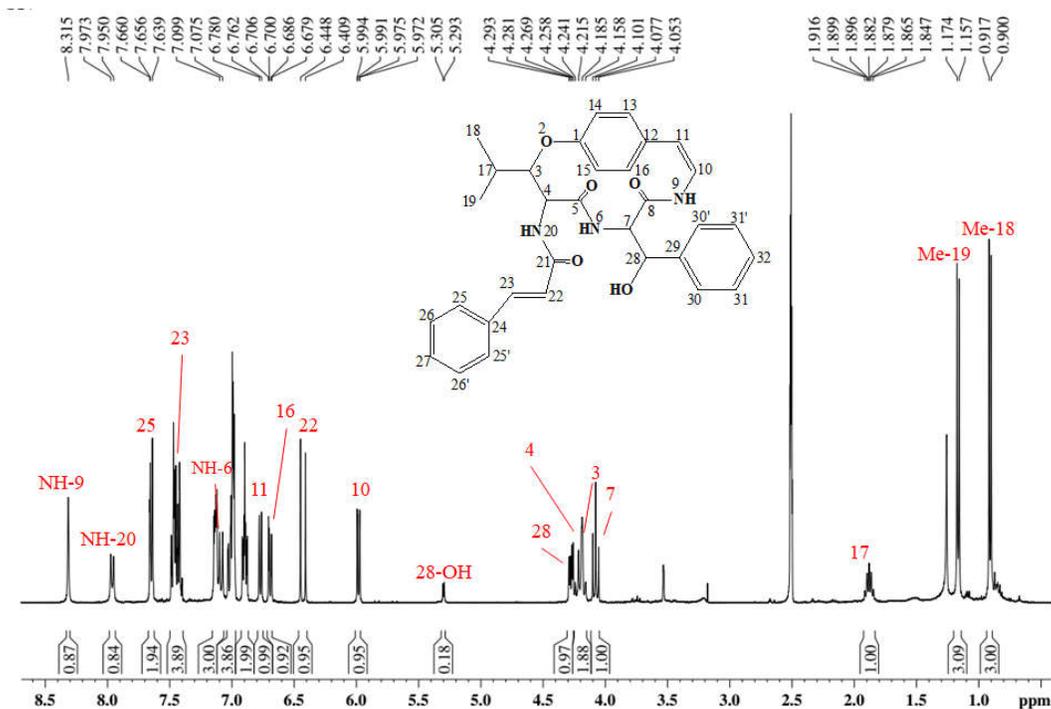
Apêndice 21: Espectro de Cosy do Discareno C, em CDCl_3 a 400 MHz.Apêndice 22: Espectro de ^{13}C do Discareno C, em CDCl_3 a 400 MHz.

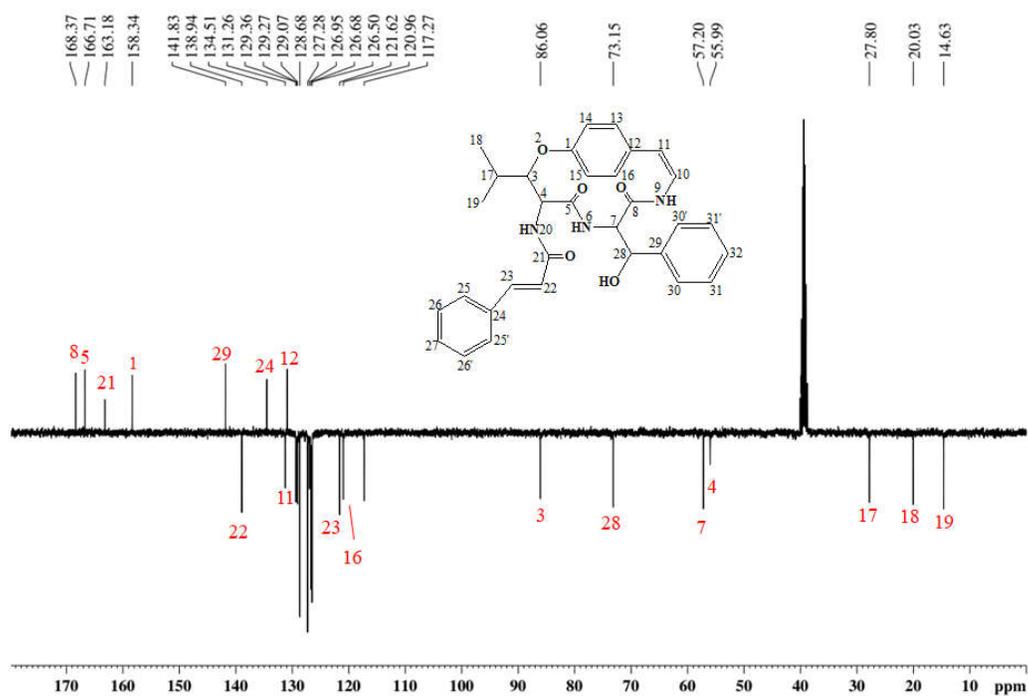
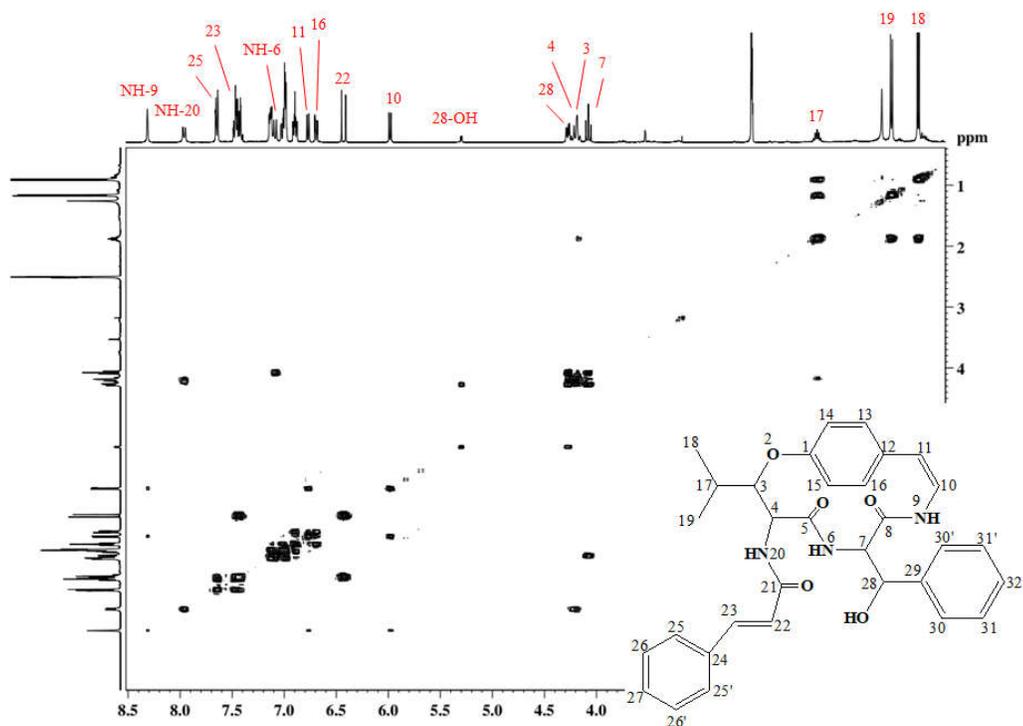
Apêndice 23: Espectro de ^1H de Scutianina P, em CDCl_3 a 400 MHz.Apêndice 24: Espectro de Cosy de Scutianina P, em CDCl_3 a 400 MHz.

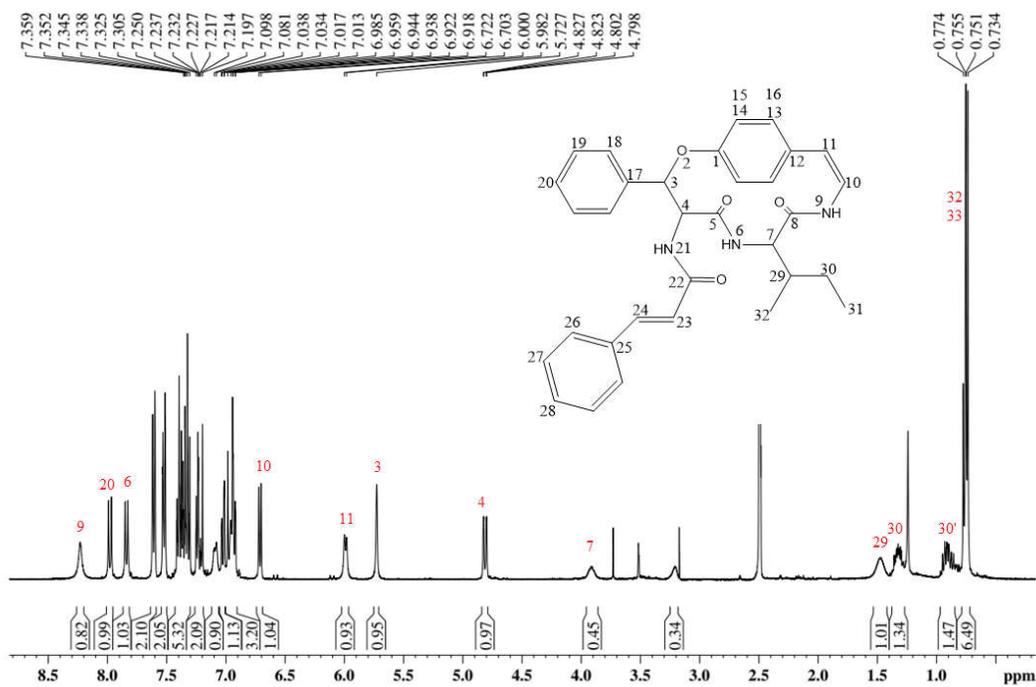
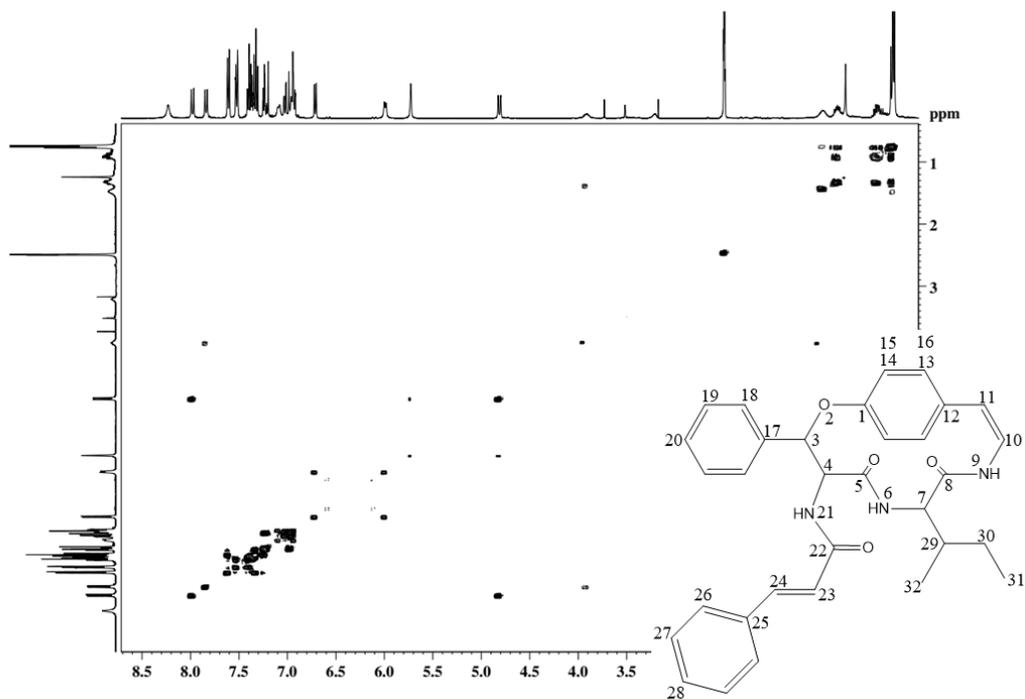
Apêndice 25: Espectro de ^{13}C de Scutianina P, em CDCl_3 a 400 MHz.Apêndice 26: Espectro de ^1H de Scutianina N, em CDCl_3 a 400 MHz.

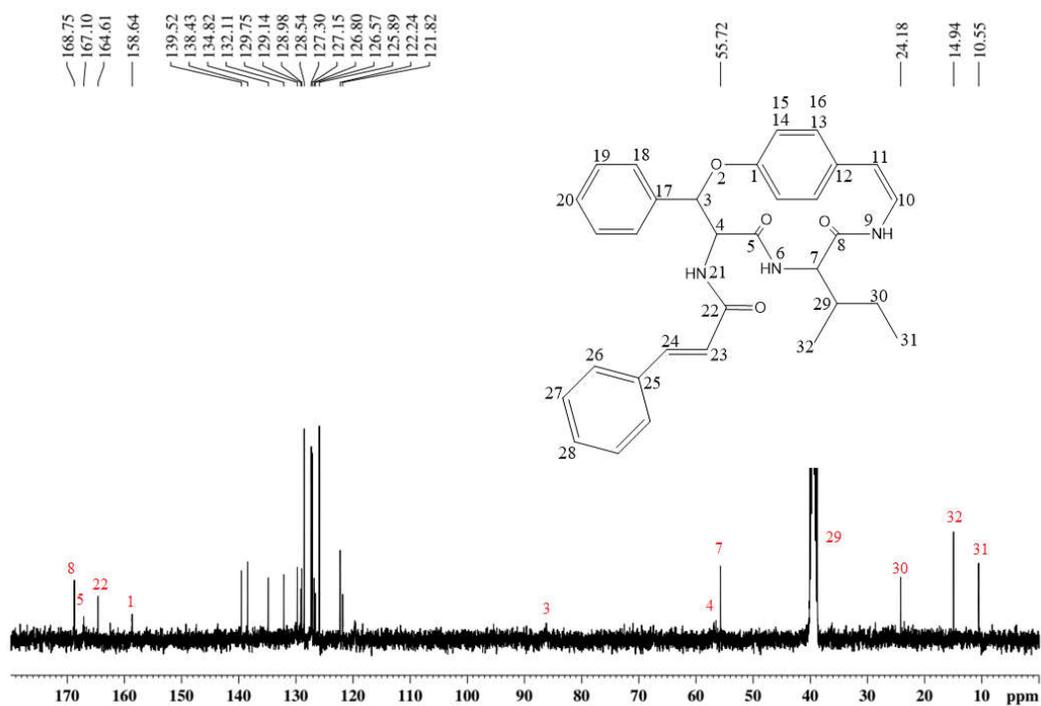
Apêndice 27: Espectro de Cosy de Scutianina N, em CDCl_3 a 400 MHz.Apêndice 28: Espectro de ^{13}C de Scutianina N, em CDCl_3 a 400 MHz.

Apêndice 29: Espectro de ^1H de Tembamida, em CDCl_3 a 400 MHz.Apêndice 30: Espectro de Cosy de Tembamide, em CDCl_3 a 400 MHz.

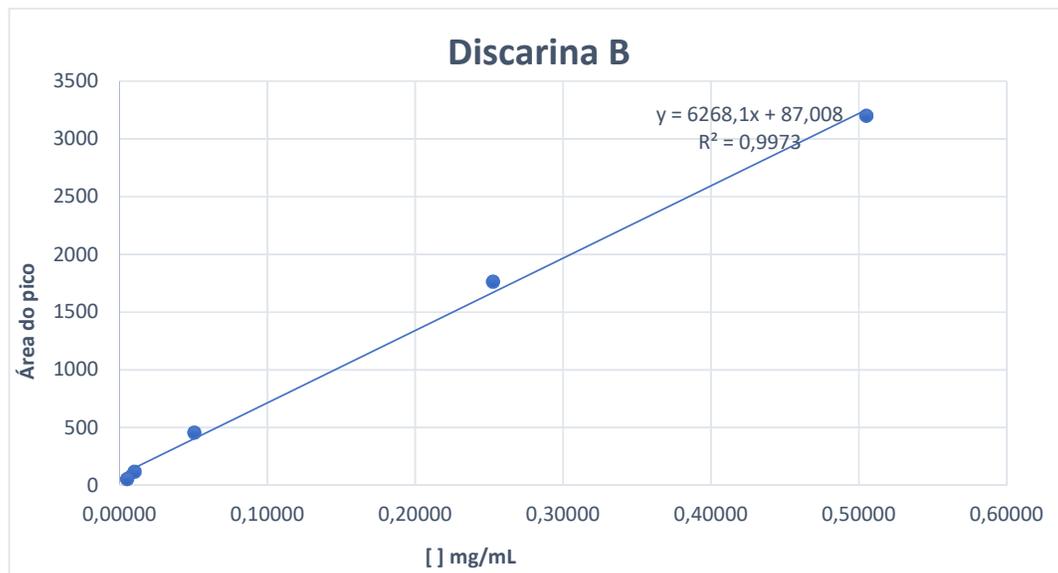
Apêndice 31: Espectro de ^{13}C de Tembamida, em CDCl_3 a 400 MHz.Apêndice 32: Espectro de ^1H de Scutianeno X, DMSO-d_6 a 400 MHz.

Apêndice 33: Espectro APT de Scutianeno X, DMSO-d⁶ a 400 MHz.Apêndice 34: Espectro de Cosy de Scutianeno X, DMSO-d⁶ a 400 MHz.

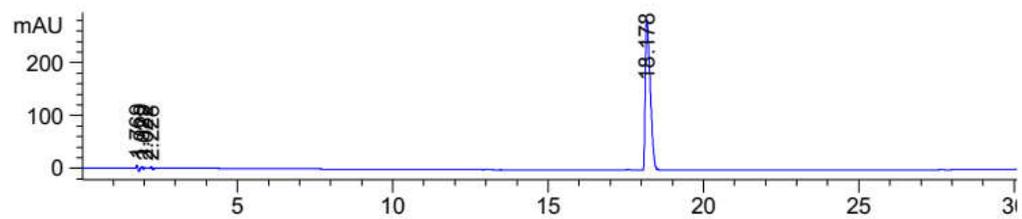
Apêndice 35: Espectro de ^1H de Scutianeno Z, DMSO-d^6 a 400 MHz.Apêndice 36: Espectro de Cosy de Scutianeno Z, DMSO-d^6 a 400 MHz.

Apêndice 37: Espectro de ^{13}C de Scutianeno Z, DMSO- d_6 a 400 MHz.

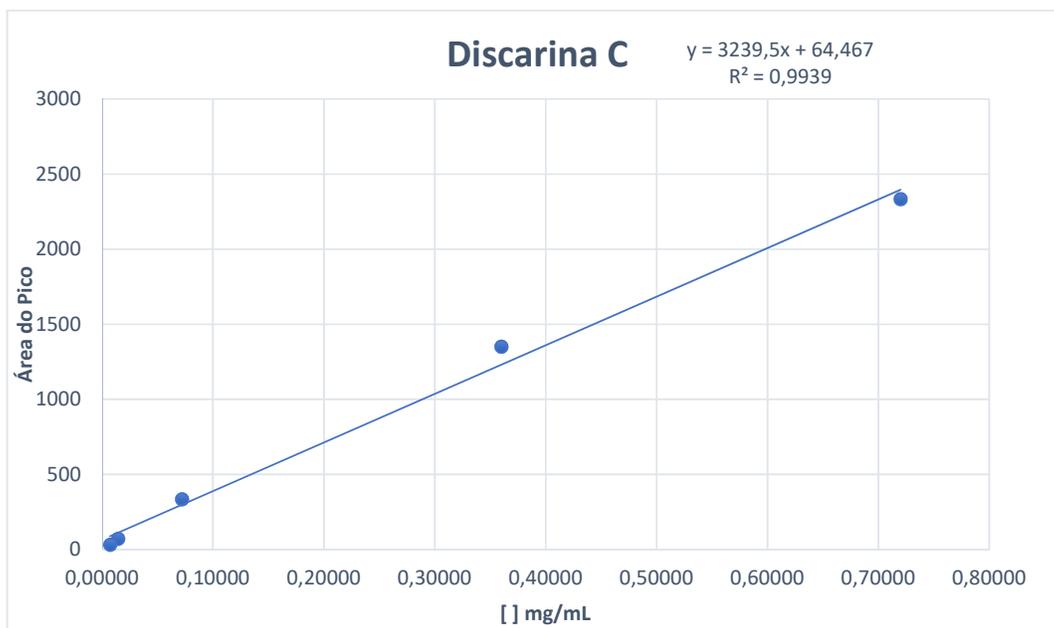
Apêndice 38: Gráfico da equação da reta de Discarina B



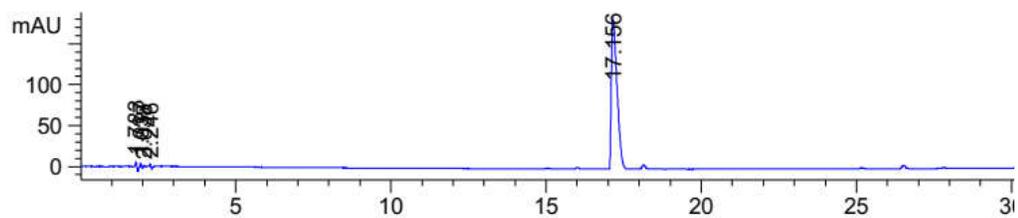
Apêndice 39: CLAE de Discarina B.



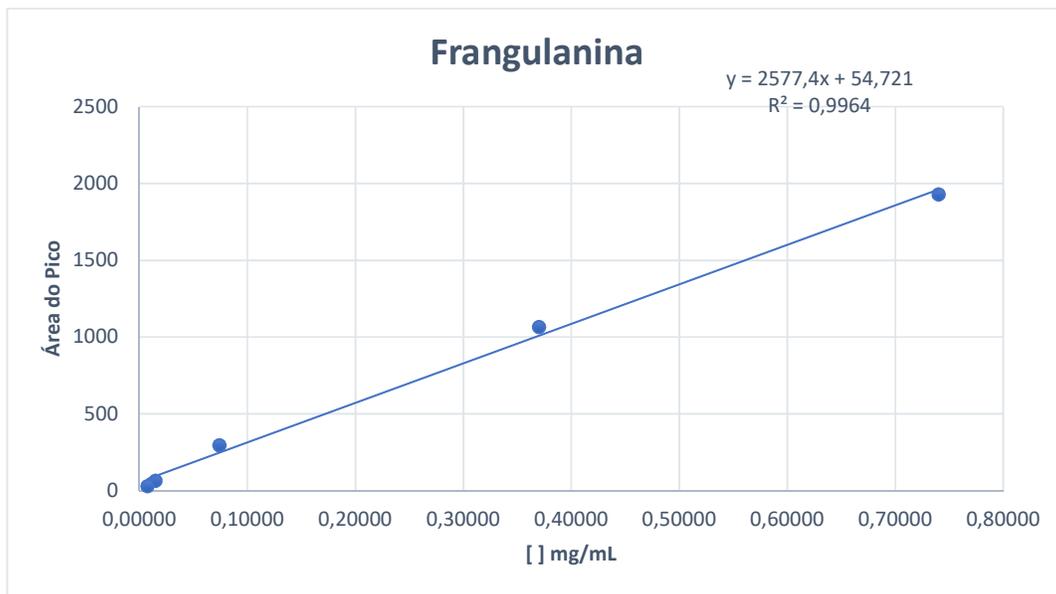
Apêndice 40: Gráfico da equação da reta de Discarina C



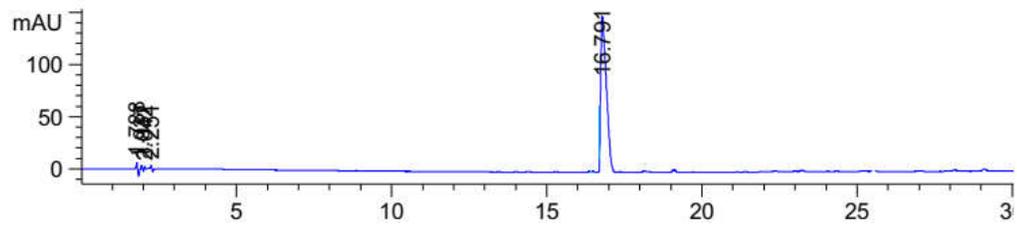
Apêndice 41: CLAE de Discarina C



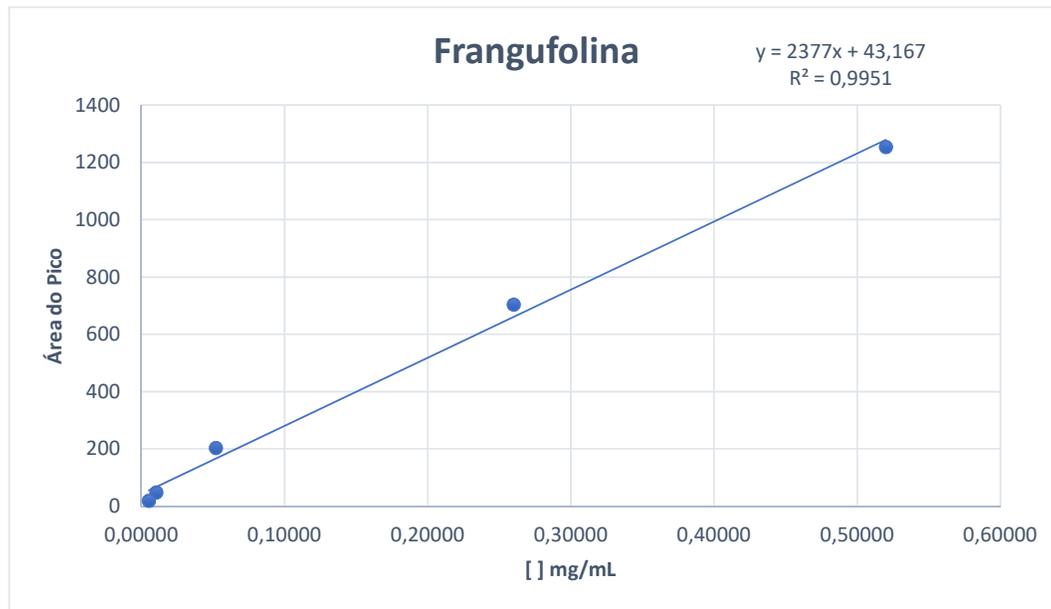
Apêndice 42: Gráfico da equação da reta de Frangulanina



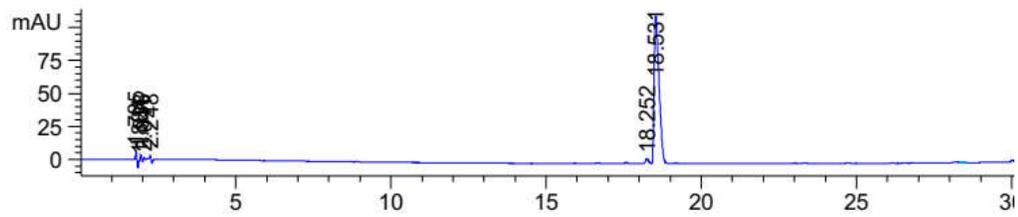
Apêndice 43: CLAE de Frangulanina



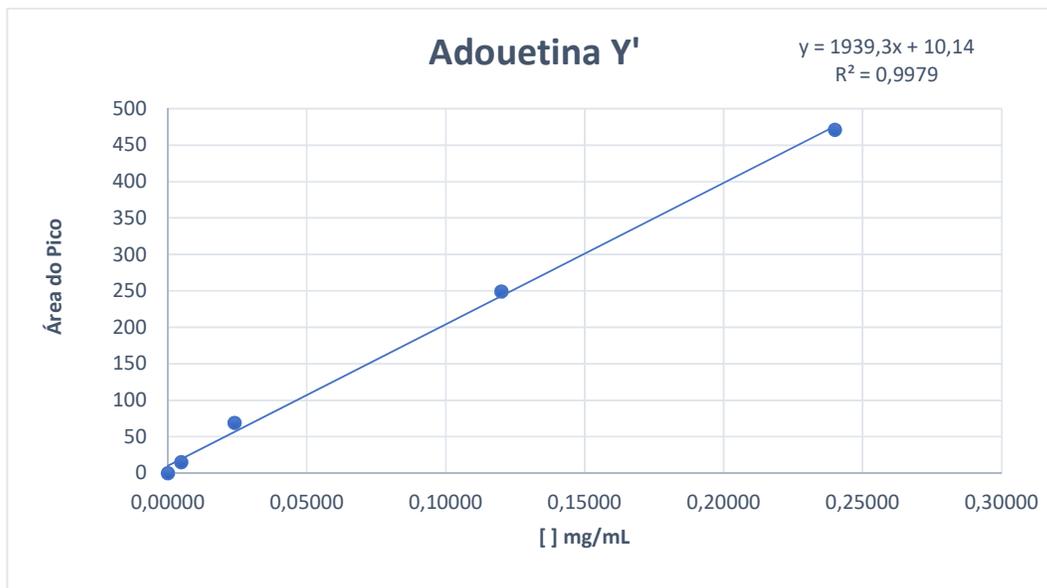
Apêndice 44: Gráfico da equação da reta de Frangufolina



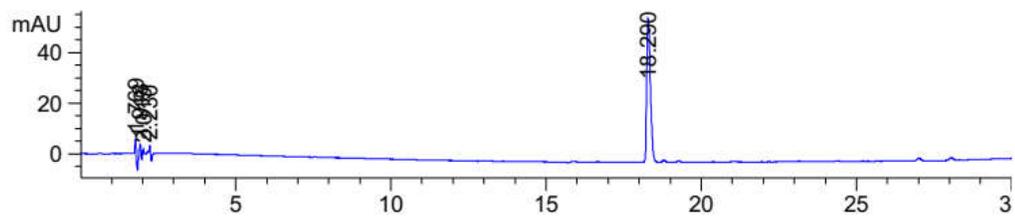
Apêndice 45: CLAE de Frangufolina



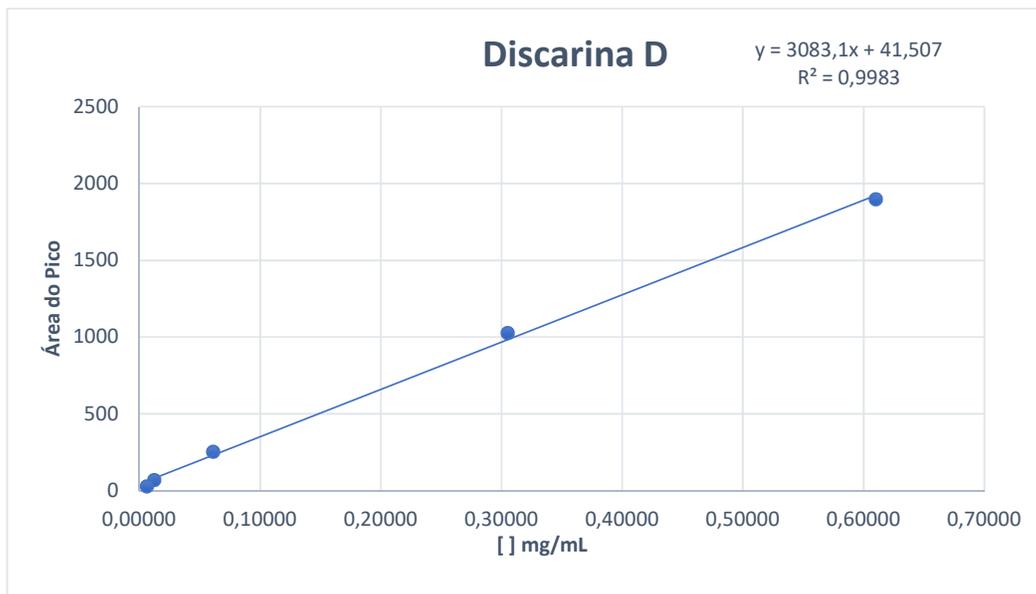
Apêndice 46: Gráfico da equação da reta de Adouetina Y'



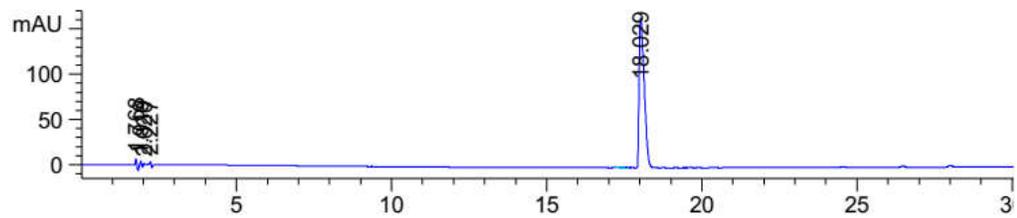
Apêndice 47: CLAE de Adouetina Y'



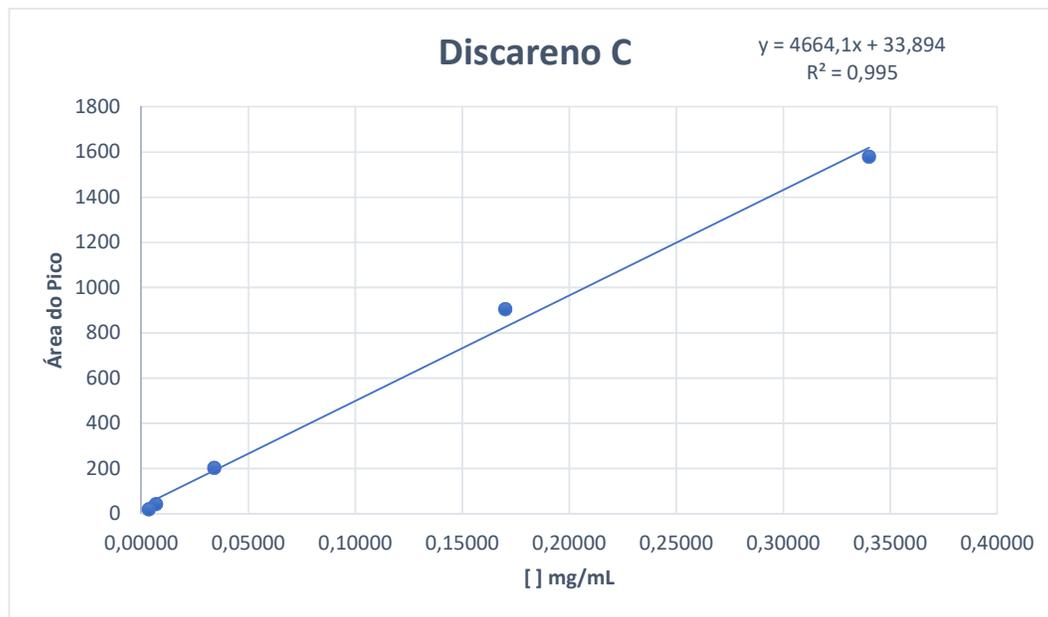
Apêndice 48: Gráfico da equação da reta de Discarina D



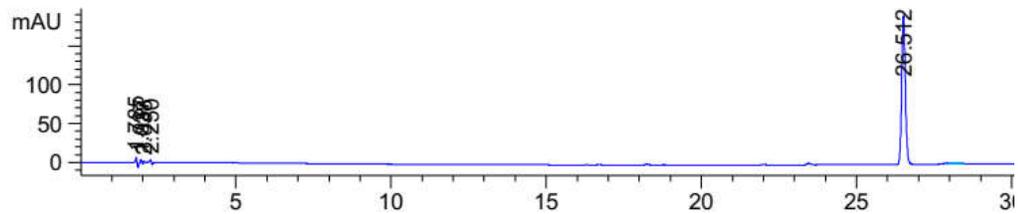
Apêndice 49: CLAE de Discarina D



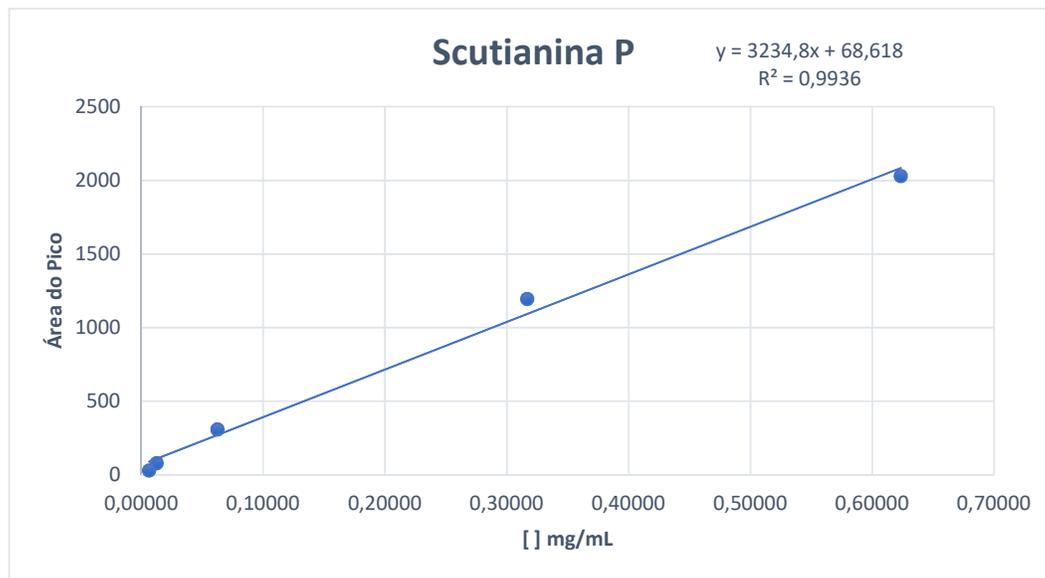
Apêndice 50: Gráfico da equação da reta de Discareno C



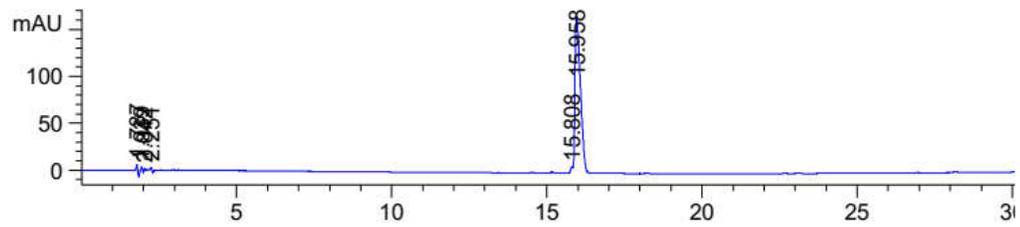
Apêndice 51: CLAE de Discareno C



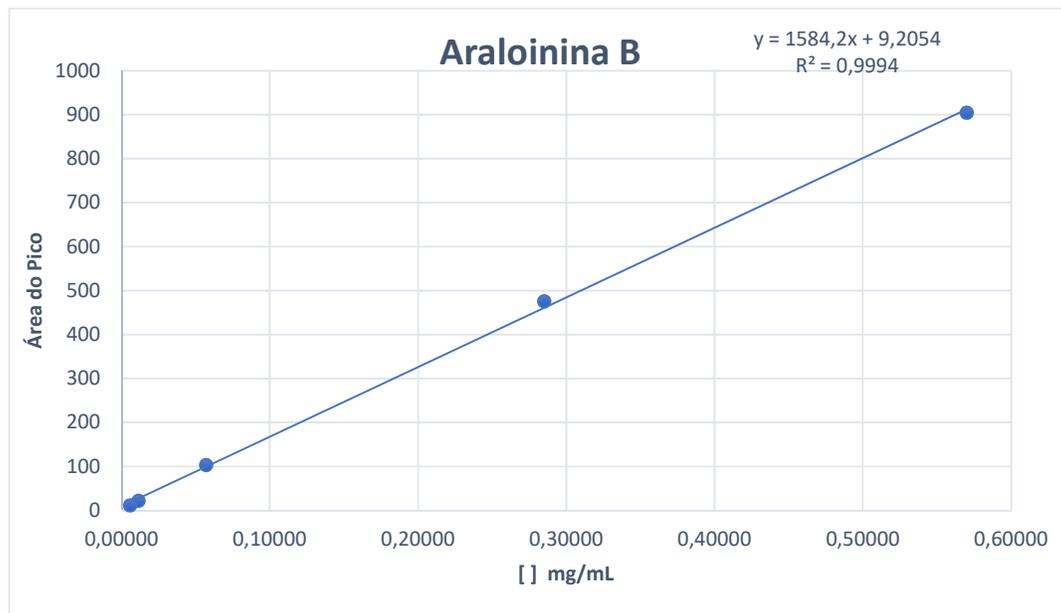
Apêndice 52: Gráfico da equação da reta de Scutianina P



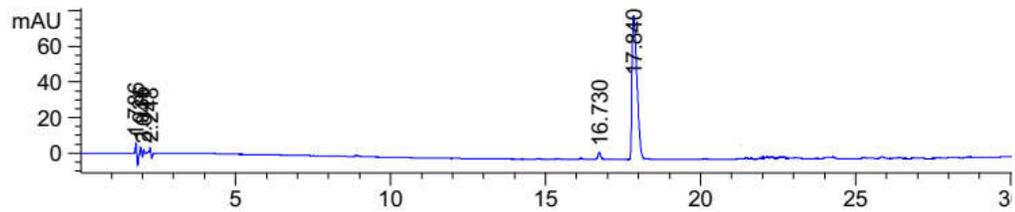
Apêndice 53: CLAE de Scutianina P



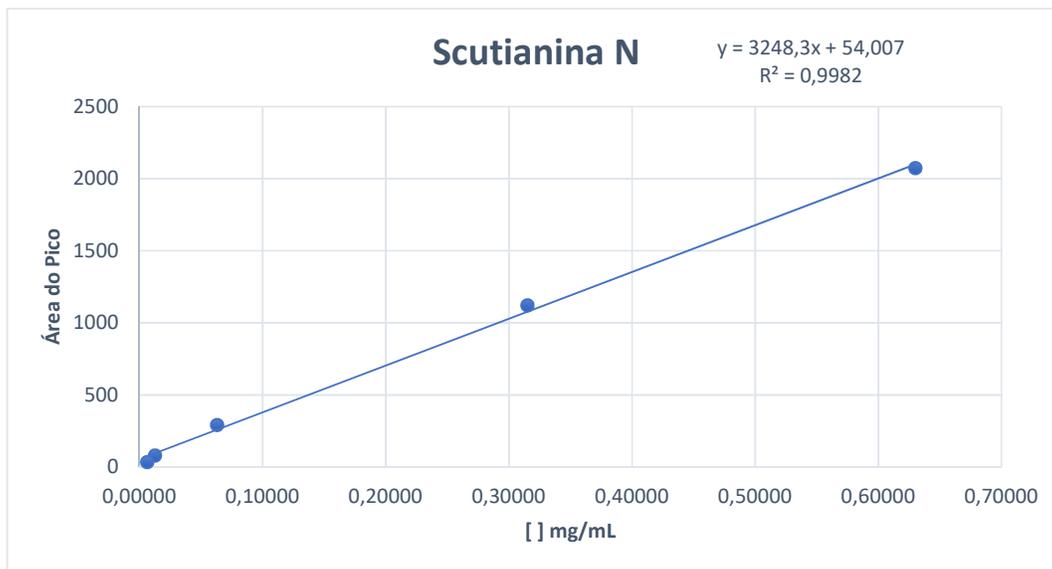
Apêndice 54: Gráfico da equação da reta de Aralionina B



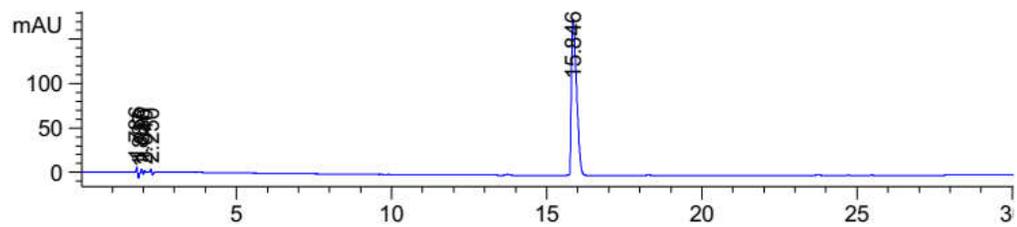
Apêndice 55: CLAE de Aralionina B



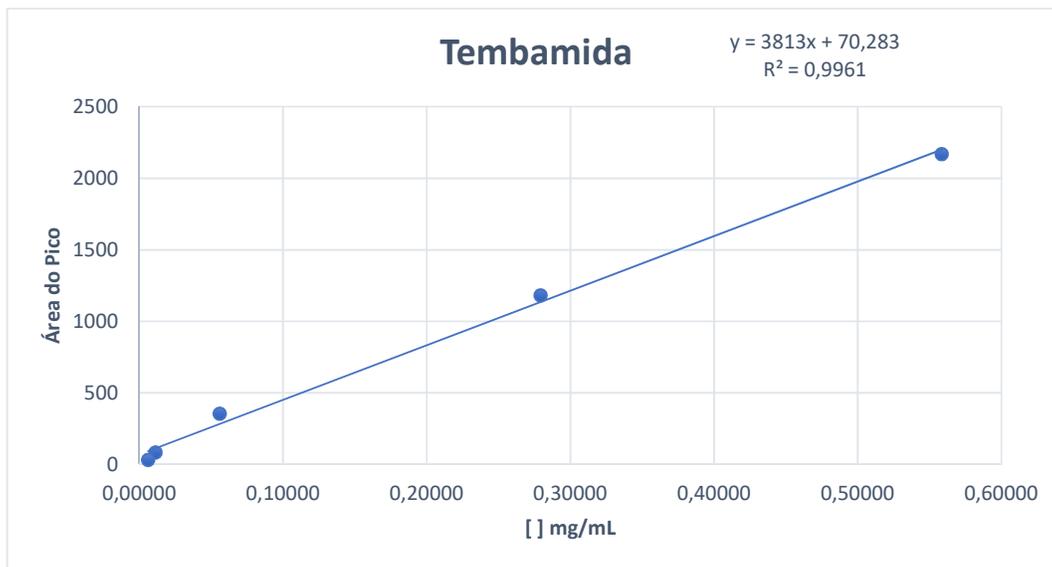
Apêndice 56: Gráfico da equação da reta de Scutianina N



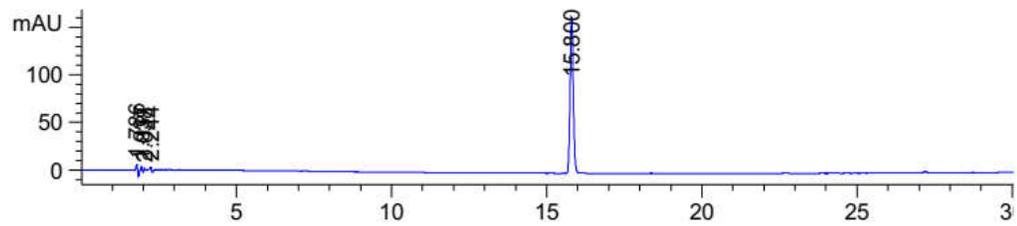
Apêndice 57: CLAE de Scutianina N



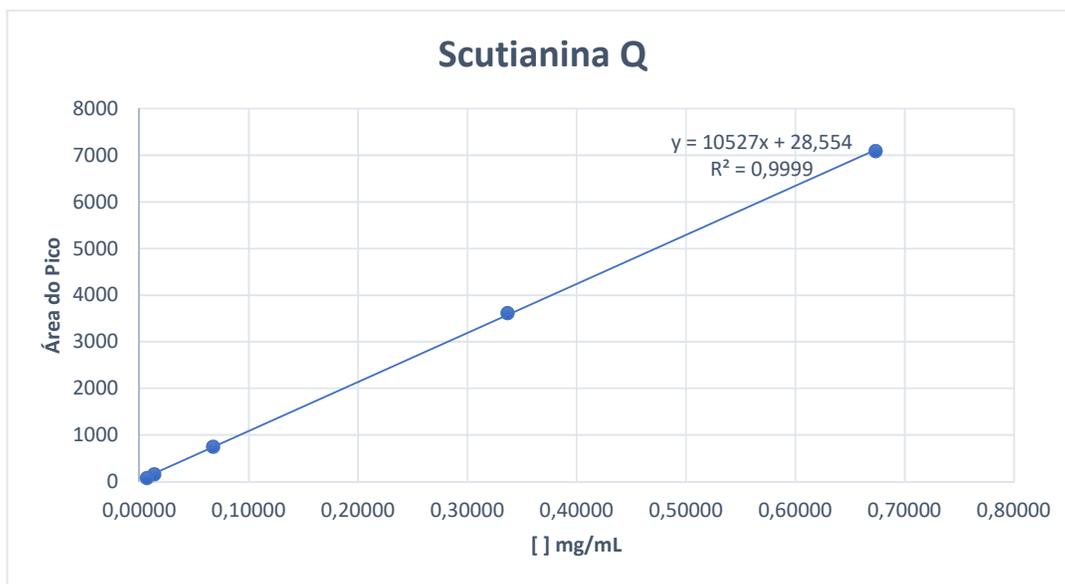
Apêndice 58: Gráfico da equação da reta de Tembamide



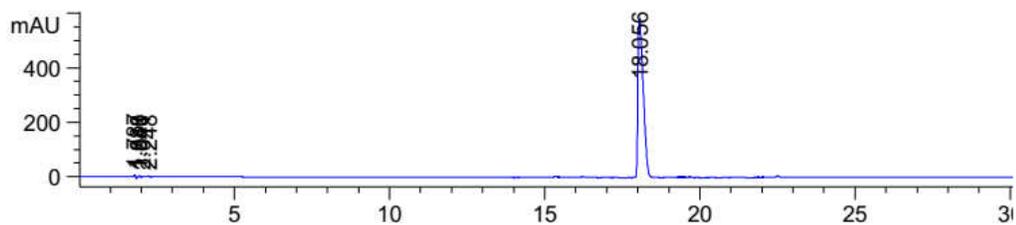
Apêndice 59: CLAE de Tembamide



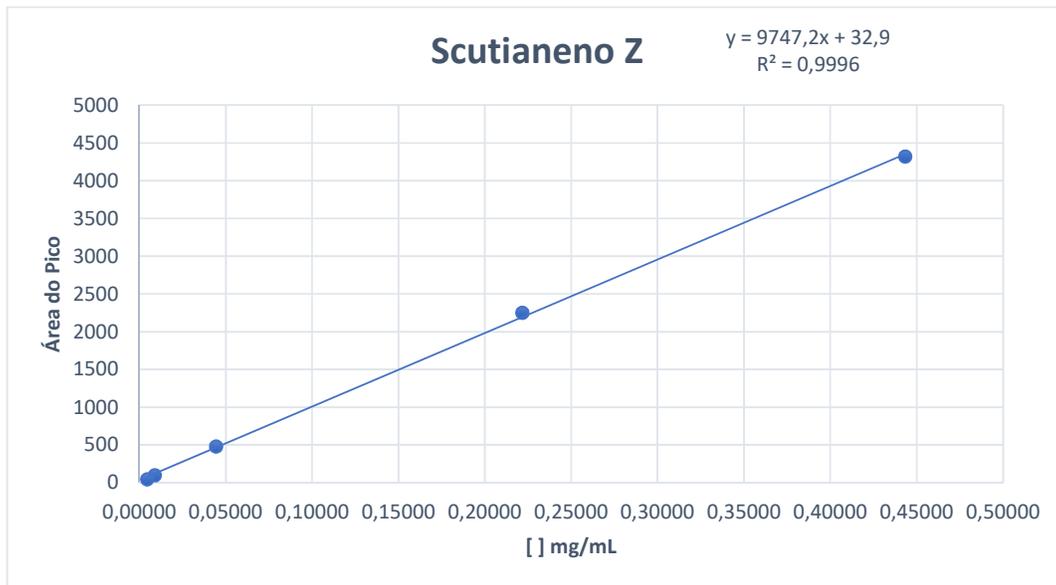
Apêndice 60: Gráfico da equação da reta de Scutianina Q



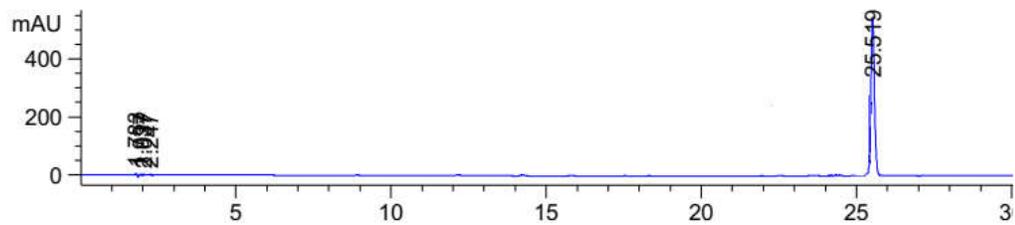
Apêndice 61: CLAE de Scutianina Q



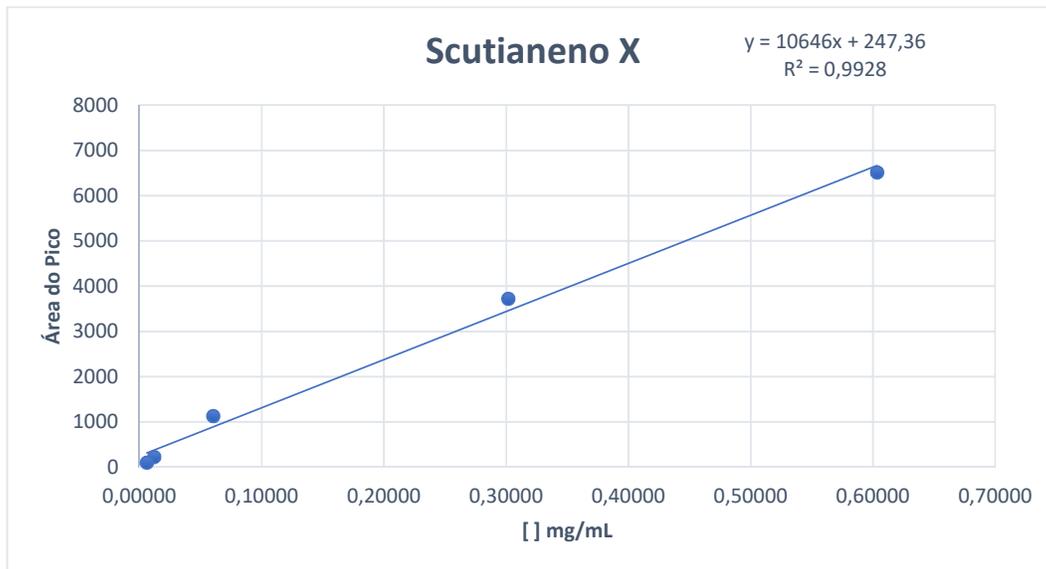
Apêndice 62: Gráfico da equação da reta de Scutianeno Z



Apêndice 63: CLAE de Scutianeno Z



Apêndice 64: Gráfico da equação da reta de Scutianeno X



Apêndice 65: CLAE de Scutianeno X

