

INSTITUTO DE QUÍMICA

ALCALÓIDES PEPTÍDICOS DE Scutia
buxifolia e Discária febrifuga.

ADEMIR FARIAS MOREL

Tese de Mestrado

Orientador: Prof. Dr. EDMUNDO A. RÓVEDA

CAMPINAS - São Paulo.

1978

M814a

1877/BC

UNICAMP
INSTITUTO DE QUÍMICA

A minha mãe e irmãos
minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

O autor deseja expressar seu agradecimento:

Ao Prof. Dr. Edmundo Alfredo Rúveda pela orientação deste trabalho.

A Direção do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), por proporcionar condições para que este trabalho fosse realizado.

Ao Prof. Dr. F. de A.M. Reis pela disponibilidade na obtenção dos espectros de RMN ^{13}C .

À Prof.^a Dra. Ruiess V.F. de Bravo pela disponibilidade na obtenção de espectros de massa a 70 eV e MIKES.

Ao Prof. Lawrence T. Nielsen pelo espectro de massa de alta resolução.

A Prof.^a Vera Lucia Bender Dellamea, do Departamento de Biologia da UFSM, pela identificação e localização de Scutia buxifolia e Discária febrifuga.

Aos amigos e colegas pela convivência saudável, particularmente à Carmen L.P. Silveira e ao Luis C.B. Terdiman, pelas suas valiosas contribuições na montagem deste trabalho.

Aos funcionários do Instituto de Química da UNICAMP, especialmente ao Sr. William Kalaf pelo excelente trabalho de dactilografia, e a Sônia R.B. de Moraes pelos serviços prestados no laboratório.

Ao Departamento de Química da UFSM, especialmente aos Profs. Romeo Ernesto Riegel e Waldir Lopes, e a Sra. Doroti Rocha, pela valiosa contribuição junto àquele Departamento, durante a minha ausência.

A CAPES/PICD pelo auxílio financeiro concedido, particularmente ao Prof. Zozymo Lopes dos Santos pelo apoio dispensado junto a este órgão.

ÍNDICE GERAL

	<u>Página</u>
ÍNDICE NUMÉRICO DE ESQUEMAS, TABELAS E FIGURAS	iv
SÍMBOLOS E ABREVIACÕES UTILIZADAS	vii
RESUMO	viii
SUMMARY	ix
CAPÍTULO 1. Revisão bibliográfica	
Introdução	1
1.1. Ocorrências	18
1.2. Classificação	18
1.3. Ciclopeptídeos de 14 membros	19
1.3.1. Espectrometria de massa	21
1.4. Ciclopeptídeos de 13 membros	24
1.4.1. Espectrometria de massa	25
1.5. Ciclopeptídeos de 15 membros	34
1.5.1. Espectrometria de massa	35
1.6. Bioquímica e Farmacologia	37
CAPÍTULO 2. Rhamnaceaes- <u>Scutia buxifolia</u> e <u>Discaria febrifuga</u>	
Introdução	38
2.1. Alcaloides peptídicos da <u>Scutia buxifolia</u>	38
2.1.1. Alcaloides peptídicos isolados da casca do tronco da <u>Scu-</u> <u>tia buxifolia</u>	41
Scutianina H	42
Diidroscutianina H	42
Oxodiidroscutianina H	50
Scutianina I	57
Scutianina B	60
Scutianina C	60
Scutianina D	61
Scutianina E	61
O-acetilscutianina D	63
O-acetilscutianina E	63
Scutianeno C	67
2.2. Alcaloides ciclopeptídicos da casca da raiz de <u>Discaria febrifuga</u>	
Discarina X	70
Discarina B	72
d-y	73

d-v	73
d-z	73
2.3. Síntese de substâncias de referências	
N-N-dimetil-L-isoleucina	75
N-N-dimetil-L-leucina	75
N-N-dimetil nor-leucina	75
N-N-dimetil D-L-fenilalanina	75
N-N-dimetil D-L-fenilalanina metil éster	76
O-L-diacetil β-fenilserina metil éster	77
CAPÍTULO 3. Alcaloides peptídicos - RMN de ¹³ C	80
CAPÍTULO 4. Espectro de Energia Cinética dos Íons Analisados por Massa (MIKES)	
4.1. Introdução	96
4.2. Fundamentos Gerais e Princípios de MIKES	97
4.3. Aplicação de MIKES em alcaloides peptídicos	100
CAPÍTULO 5. Parte Experimental	
<u>Scutia buxifolia</u> : isolamento dos alcaloides da casca do tronco	108
5.1.1 Materiais e métodos	108
5.1.2 Isolamento	109
5.1.3 Separação de alcaloides	110
5.1.4 Alcaloides peptídicos e derivados	113
Scutianina H	113
Diidroscutianina H	114
Oxodihidroscutianina H	117
Hidrólise ácida	118
Identificação de p-tiramina	118
Scutianina I	119
Scutianina B	122
Scutianina C	123
Scutianina D	125
Scutianina E	129
O-acetil scutianina D	134
O-acetil scutianina E	135
Scutianeno	138
Reação de degradação de Hoffmann de scutianina E	140
5.2. <u>Discaria febrifuga</u> : isolamento dos alcaloides da casca da raiz	
5.2.1. Materiais e métodos	140

5.2.2. Isolamento	140
5.2.3. Isolamento de alcaloides	141
5.2.4. Alcaloides peptídicos	142
Discarina X	142
Discarina B	145
5.3. Síntese de substâncias de referências	
N-N-dimetil-L-isoleucina	151
N-N-dimetil-L-leucina	152
N-N-dimetil nor-leucina	152
N-N-dimetil-D-L-fenilalanina	154
N-N-dimetil-D-L-fenilalanina metil éster	154
Tentativas de sínteses de β -fenil serina metil éster	159
O-N-diacetil- β -fenil serina metil éster	162
6. CONCLUSÃO	167
7. BIBLIOGRAFIA	169

	<u>página</u>
Figura 10	54
Figura 11	54
Figura 12	55
Figura 13	55
Figura 14	56
Figura 15	120
Figura 16	121
Figura 17	58
Figura 18	122
Figura 19	124
Figura 20	125
Figura 21	126
Figura 22	127
Figura 23	128
Figura 24	129
Figura 25	130
Figura 26	66
Figura 27	131
Figura 28	132
Figura 29	133
Figura 30	66
Figura 31	134
Figura 32	136
Figura 33	137
Figura 34	138
Figura 35	139
Figura 36	141
Figura 37	143
Figura 38	144
Figura 39	74
Figura 40	145
Figura 41	146
Figura 42	147
Figura 43	148
Figura 44	149
Figura 45	149
Figura 46	150
Figura 47	152

	<u>página</u>
Figura 48	101
Figura 49	153
Figura 50	101
Figura 51	153
Figura 52	101
Figura 53	155
Figura 54	156
Figura 55	157
Figura 56	158
Figura 57	160
Figura 58	161
Figura 59	161
Figura 60	163
Figura 61	163
Figura 62	165
Figura 63	166
Figura 64	166
Figura 65	89
Figura 66	90
Figura 67	91
Figura 68	92
Figura 69	93
Figura 70	94
Figura 71	95
Figura 72	99
Figura 73.a	105
Figura 73.b	105
Figura 73.c	105
Figura 74	106
Figura 75	107

SÍMBOLOS E ABREVIACÕES UTILIZADAS

AC ₂ O	Anidrido acético
C.C.D.	Cromatografia em camada delgada
C.G.	Cromatografia a gás
A.C.	Ativação colisional
E.M.	Espectro de massa
Fen	Fenilalanina
Fen ser	Fenil serina
Fig.	Figura
Hyleu	Hidroxileucina
Ile	Isoleucina
IV	Infravermelho
J	Constante de acoplamento
Leu	Leucina
M ⁺	Íon molecular
MIKES	Espectro de Energia dos Íons Analisados por Massa
P.F.	Ponto de fusão
p.p.m.	Parte por milhão
Pro	Prolina
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear Protônica
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
UV	Ultravioleta
α	Efeito, configuração ou posição relativa a um grupo funcional
β	Idem
γ	Efeito ou posição relativa a um grupo funcional
δ	Deslocamento químico em p.p.m.
Δδ	Variação de deslocamento químico
s	Sinal simples
d	Sinal duplo
ℓ	Sinal largo
m	Sinal múltiplo.

RESUMO

Do extrato metanólico da casca do tronco de Scutia buxifolia Reiss e da casca da raiz de Discaria febrifuga Mart, foram isolados os alcalóides scutianinas B, C, D, E, discarina B, todos conhecidos, e três alcalóides novos, scutianinas H, I e discarina X.

As estruturas destes alcalóides foram propostas com base, principalmente, nas fragmentações de seus espectros de massa de baixa resolução.

O Espectro de Energia Cinética dos Íons Analisados por Massa (MIKES) do pico base a m/e 114, de scutianina H, permitiu elucidar a unidade N-N-dimetil aminoácido terminal. A aplicação de RMN de ^1H a 400MHz com dupla irradiação confirmou estes resultados.

Através da análise dos espectros de RMN de ^{13}C dos alcalóides diastereoisoméricos scutianinas D e E, obteve-se informações sobre a estereoquímica da unidade β -hidroxileucina.

A estrutura proposta para discarina X também foi confirmada por RMN de ^{13}C .

SUMMARY

From the methanolic extracts of the bark of Scutia buxifolia Reiss and the root bark of Discaria febrifuga Mart, the known alkaloids scutianines B, C, D, E and discarina B, and the new ones scutianines H, I and discarina X respectively, were isolated.

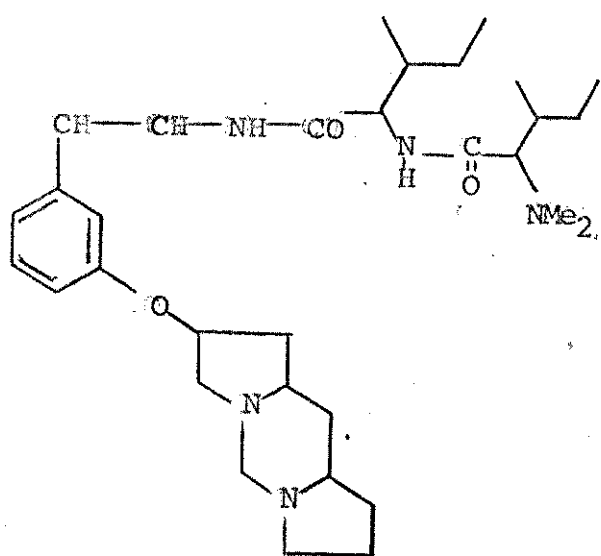
Mainly on the basis of their low resolution mass spectra the structures of these compounds were proposed.

By application of Mass Analysed Kinetic Energy Spectrum (MI-KES) of the base ion peak at m/e 114 of scutianine H, the structure of the N,N-dimethylaminoacid unit has been proposed, and further confirmed by ^1H NMR at 400MHz and double irradiation experiments.

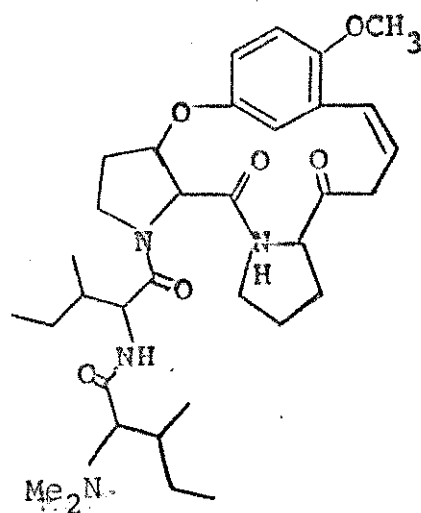
The analysis of the ^{13}C NMR spectra of the diastereoisomeric alkaloids scutianines D and E furnished valuable information regarding the stereochemistry of the β -hydroxyleucina unit of this group of peptide alkaloids.

The proposed structure for discarine X was also confirmed by analysis of its ^{13}C NMR spectrum.

tos naturais, a scutianina A(4) da Rhamnaceae Scutia buxifolia.

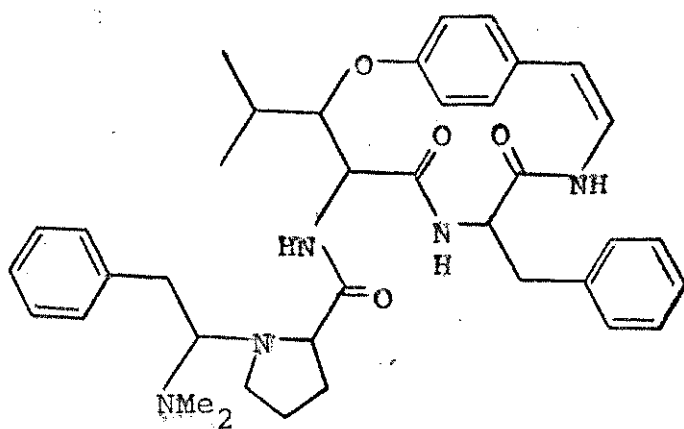


(2)



(3)

Embora a determinação das estruturas destes alcalóides fosse relativamente recente, seu número aumentou vertiginosamente, e na atualidade se eleva a mais de setenta componentes (tabelas I a IV), com várias revisões feitas sobre a química destas substâncias⁽⁶⁻¹⁰⁾.

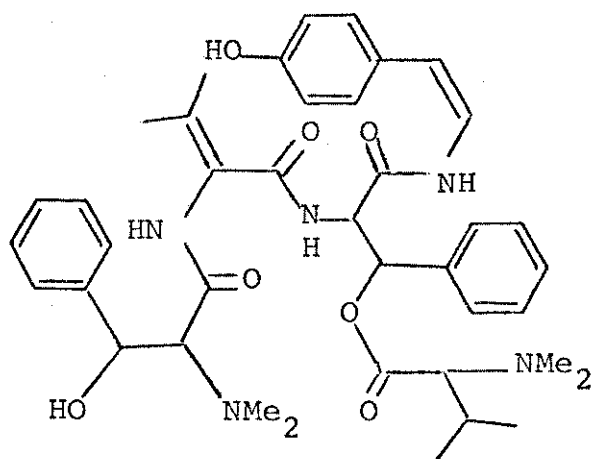


(4)

Dentre elas, sem dúvida, a mais completa, mesmo não sendo a mais recente, é a de R. Tschesche, publicada em 1975 na coleção "The Alkaloids", editada por Manske.

Como todas as estruturas estabelecidas apresentassem um ciclo, exceto a lasiodina A(5), o fato levou Tschesche⁽¹⁸⁾ a propor a expressão alcalóide ciclopeptídico para designar os componentes deste grupo de substâncias naturais.

O considerável progresso conseguido no estudo de alcalóides peptídicos deve-se, fundamentalmente, à aplicação de técnicas cromatográficas, que atualmente permitem separar e purificar eficientemente os alcalóides com auxílio simultâneo da aplicação de métodos físicos, dirigidos para a determinação de suas estruturas. Dos métodos físicos de uso mais generalizado, sem dúvida, a espectrometria de massa de baixa e alta resolução é uma ferramenta indispensável.

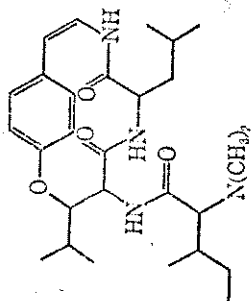


(5)

Este método ajuda a postular rapidamente a presença de certos fragmentos em um alcalóide ciclopeptídico, utilizando quantidades mínimas do produto natural. Apesar destas vantagens, a espectrometria de massa deixa de resolver alguns aspectos interessantes da química destas substâncias, por exemplo, torna-se difícil de diferenciar entre N-N-dimetil-leucina e N-N-dimetilisoleucina, quando

Tabela I. Alcalóides peptídicos de 14 membros com as unidades P-hidroxiestirilamina, β-hidroxiileucina (frangulanina); P-hidroxiestirilamina e hidroxifenilalanina (nummularina E); P-hidroxiestirilamina e trans-3-hidroxiprolina (mauritina A).

I - A Tipo Frangulanina (12)



(12)

Alcalóide F e fonte	Fórmula molecular	PM	PF°	α D°	Aminoácidos		Referencia	
					ligado ao anel	intermediário básico		
Adoutina-X b,b'	C ₂₈ H ₄₄ N ₄ O ₄	500	277-	-316	Ile	-	(1)	
			279					Me ₂ Leu
			278-					
Adoutina-Y' j,m,b'	C ₃₁ H ₄₂ N ₄ O ₄	534	280	-338	Ile	-	(21)	
			279-					
			280,5					
			289-	-305	Ile	-	(23)	
			290					Me ₂ Fen
			302	-294				

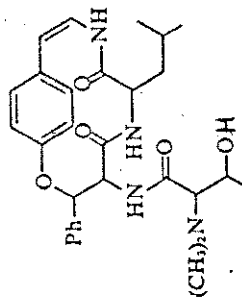
I - A Tipo Frangulanina (continuação)

								(1)
Americina b	$C_{31}H_{35}N_5O_4$	545	295- 297	-390				
					Tri			Me Val (24)
Ceanotina-A b	$C_{30}H_{40}N_4O_4$	520	256- 259	-256	Leu ou Ile			Me Fen (6,28)
Ceanotina-B b	$C_{30}H_{36}N_4O_4$	504	238- 240,5	-293	Fen			Me ₂ Ile (20,26, 27,28)
Ceanotina-C b	$C_{26}H_{38}N_4O_4$	470	223- 229	-368	Leu ou Ile			Me Pro (21,29, 37)
Discarina-A f	$C_{33}H_{43}N_5O_4$	573	229- 231	-282	Ile			Me ₂ Tri (30)
								(25)
Discarina-B f	$C_{33}H_{43}N_5O_4$	573	237- 239	-310				
					Tri			Me ₂ Ile (30)
Franganina j,o	$C_{28}H_{44}N_4O_4$	500	248	-302	Leu			Me ₂ Leu (23,31, 32)
Frangufolina j,f,o,u	$C_{31}H_{42}N_4O_4$	534	244	-299	Leu			Me ₂ Fen (22,30, 31,32)
Frangulanina j,o	$C_{28}H_{44}N_4O_4$	500	275-	-288	Leu			Me ₂ Ile (21,33)
Hovenina-A h	$C_{27}H_{42}N_4O_4$	486	215	-	Leu			Me Ile (34)
Melovanina-A l	$C_{27}H_{42}N_4O_4$	486	295	-285	Leu			Me ₂ Val (35)

I - A Tipo Frangulanina (continuação)

Melovanina-B l	$C_{30}H_{42}N_4O_5$	536	200- 206	-	Tir	-	Me ₂ Val	(35)
Miriantina-C m	$C_{27}H_{42}N_4O_4$	486	294	-288	Val	-	Me ₂ Leu	(22)
Nummularina-K x	$C_{33}H_{43}N_5O_4$	573	237- 239	- 45	Leu	-	-	(40)
Lasioidina-B i	$C_{35}H_{47}N_5O_5$	617	228	-301	Leu	-	Me Fen	(36)
Scutianina-A p	$C_{39}H_{47}N_5O_5$	665	186- 187	-399	Fen	Pro	Me ₂ Fen	(5)
Scutianina-B l,p	$C_{34}H_{40}N_4O_4$	568	248- 250	-296	Fen	-	Me ₂ Fen	(35, 37)
Scutianina-C p	$C_{31}H_{42}N_4O_4$	534	267	-231	Fen	-	Me ₂ Ile	(17) (12)
Scutianina-D p	$C_{34}H_{40}N_4O_5$	585	219- 220	-198	Fen ser (Treo,L)	-	Me ₂ Fen	(17) (38)
Scutianina-E p	$C_{34}H_{40}N_4O_5$	585	121	- 22	Fen ser (Treo,D)	-	Me ₂ Fen	(17)
Scutianina-F p	$C_{34}H_{40}N_4O_5$	584	208	-132	Fen	Pro	Me Fen	(44)
Scutianina-G	$C_{34}H_{40}N_4O_5$	585	162	-112	Fen ser	-	-	(39)
Scutianeno-C p	$C_{32}H_{33}N_3O_5$	539	232- 234	203	Fen ser	-	-	(12)

I - B. Tipo Nummularina E (13)



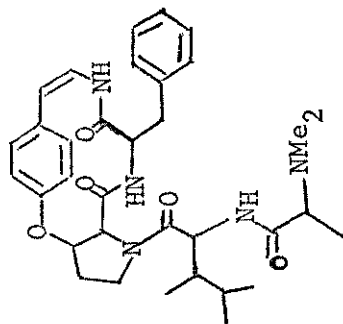
(13)

Adoutina-Y b, b'	C ₃₄ H ₄₀ N ₄ O ₄	568	292	-230	Ile	-	Me ₂ Fen	(1,41)
Adoutina-Z b'	C ₄₂ H ₄₅ N ₅ O ₅	699	140- 145	-184	Fen	Pro	Me ₂ Fen	(1,41)
Aralionina-A a	C ₃₄ H ₃₈ N ₄ O ₅	582	165- 167	82	C-benzoil-Gly	-	Me ₂ Fen	(42)
Aralionina-B a	C ₃₃ H ₃₈ N ₄ O ₄	554	103- 105	- 73	Ile	-	Me Fen	(43)
Aralionina-C a	C ₃₄ H ₄₀ N ₄ O ₅	584	95- 97	- 17	Fen ser	-	Me ₂ Ile	(44)
Ceanotina-E b	C ₃₄ H ₄₀ N ₄ O ₄	568	238- 239	-285	Leu	-	Me ₂ Fen	(37)
Centhiumina c	C ₃₃ H ₃₆ N ₄ O ₄	552	232- 233	-254	Pro	-	Me ₂ Fen	(45)
Integerrina d	C ₃₅ H ₃₉ N ₅ O ₄	592	258	-	Tri	-	Me ₂ Val	(46)
Integerrenina d	C ₃₁ H ₄₂ N ₄ O ₄	534	278	-288	Leu	-	Me ₂ Ile	(47)

I - B. Tipo Nummularina E (continuação)

Integerrissina d	$C_{33}H_{38}N_4O_4$	554	275	-164	Fen	-	Me_2Val	(47)
Myriantina-A m	$C_{31}H_{42}N_4O_4$	534	206	-263	Ile	-	Me_2Leu	(22)
Nummularina-D x	$C_{30}H_{36}N_4O_4$	520	265- 268	-186	Leu	-	Me Ile	(48)
Nummularina-E x	$C_{29}H_{38}N_4O_5$	522	278- 279	12	Leu	-	Me_2Tre	(48)
Nummularina-G x	$C_{31}H_{40}N_4O_4$	532	174- 175	-133	Leu	-	-	(40)

I - C. Tipo Mauritina (14)



(14)

I - C. Tipo Mauritina A (continuação)

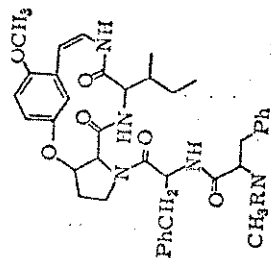
Anfhibina-B q,u	$C_{39}H_{47}N_5O_5$	665	amorfo	-181	Fen	Ile	Me ₂ Fen	(49,51)
Anfhibina-C q	$C_{36}H_{49}N_5O_5$	631	"	-224	Fen	Ile	Me ₂ Leu	(49)
Anfhibina-D q,u	$C_{36}H_{49}N_5O_5$	631	"	-203	Ile	Ile	Me ₂ Fen	(49,50)
Anfhibina-E q,u	$C_{38}H_{50}N_6O_5$	670	"	-175	Ile	Try	Me ₂ Leu	(49,50, 51)
Anfhibina-F q,u	$C_{29}H_{36}N_4O_4$	504	"	-171	Fen	-	Me Ile	(51,52)
Anfhibina-G q	$C_{32}H_{39}N_5O_4$	557	182- 185	-218	Leu	-	Me ₂ tri	(52)
Hisodricarina-A s	$C_{33}H_{43}N_5O_5$	615	93- 96	-215	Pro	Phe	Me ₂ Ile	(44)
Mauritina-A q,u,z	$C_{32}H_{41}N_5O_5$	575	104	-315	Fen	Val	Me ₂ Ala	(50)
Mauritina-B q,u	$C_{35}H_{47}N_5O_5$	617	amorfo	-151	Fen	Val	Me ₂ Ile	(50)
Mauritina-C u	$C_{28}H_{34}N_4O_4$	490	"	-224	Fen	-	Me Val	(51)
Mauritina-D u	$C_{33}H_{51}N_5O_5$	597	"	-259	Ile	Leu	Me ₂ Ile	(51)
Mauritina-E u	$C_{32}H_{41}N_5O_6$	561	"	-243	Fen	Val	Me ₂ Ala	(51)
Mauritina-F u	$C_{31}H_{39}N_5O_5$	561	222- 225	-285	Fen	Val	Me Ala	(51)

I - C. Tipo Mauritina A (continuação)

Mauritina-H u	$C_{33}H_{43}N_5O_5$	589	212- 215	-169	Fen	Ile	Me ₂ Ala	(44)
Nummularina-F x	$C_{23}H_{32}N_4O_4$	561	222- 225	-285	Fen	Val	Me Ala	(48)

Tabela II. Alcalóides peptídicos de 13 membros com a unidade β-(2-metoxi-5-hidroxifenil) vinilamina.

Tipo Jubanina A (18)



(18)

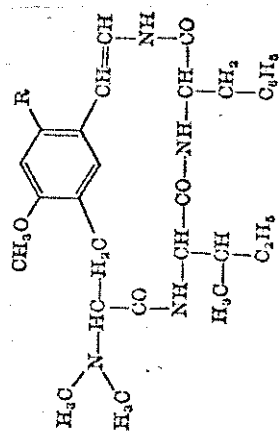
Alcalóide F e fonte	Fórmula molecular	PM	PF°	α D°	Aminoácidos		Referência
					ligado ao anel	intermediário básico	
Anfibina-H q	C ₃₃ H ₄₃ N ₅ O ₆	605	202	-570	Fen	Val	Me ₂ Ala (52)
Jubanina-A t	C ₄₀ H ₄₉ N ₅ O ₆	695	amorfo	-326	Ile	Phe	Me ₂ Fen (53)
Jubanina-B t	C ₄₃ H ₄₇ N ₅ O ₆	729	"	-218	Fen	Phe	Me ₂ Fen (53)
Mucronina-D v	C ₃₇ H ₅₁ N ₅ O ₆	661	"	-487	Ile	Leu	Me Fen (55)

II - Tipo Jubanina A (continuação)

Nummularina-A x	$C_{36}H_{49}N_5O_6$	642	235- 240	-397	Ile	Leu	Me Fen	(6)
Nummularina-B x	$C_{32}H_{41}N_5O_6$	591	230- 231	-390	Fen	Val	Me Ala	(6)
Nummularina-C x	$C_{31}H_{40}N_4O_5$	548	278- 280	-371	Leu	-	Me ₂ Fen	(6)
Nummularina-H x	$C_{39}H_{47}N_5O_6$	681	194- 196	-343	Ile	Phe	Me Fen	(40)
Zizifina-A a'	$C_{33}H_{49}N_5O_6$	611	121	-411	Pro	Ile	Me ₂ Ile	(3,4,56)
Zizifina-B f	$C_{35}H_{45}N_5O_6$	631	amorfo	-457	Pro	Ile	Me Fen	(4,56)
Zizifina-C f	$C_{36}H_{47}N_5O_6$	645	"	-331	Pro	Ile	Me ₂ Fen	(57)

Tabela III. Alcalóides peptídicos de 15 membros com a unidade 2-metoxi-5(β-aminovinil)fenil-alanina-isoleucina.

Tipo Mucronina A (19)



(19)

Alcalóide F e fonte	Fórmula molecular	PM	PF ^o	α D ^o	R	Aminoácidos	Final básico metilado	Referência
Abyssenina-A _{r,a}	C ₂₅ H ₃₈ N ₄ O ₄	458	236-239	160	H	Ile	monometilado	(54,57)
Abyssenina-B _{r,a}	C ₂₅ H ₃₈ N ₄ O ₄	458	237-239	- 58	H	Ile	"	(54,57)
Abyssenina-C _r	C ₂₄ H ₃₆ N ₄ O ₄	444	229-230	144	H	Ile	-	(54)

III - Tipo Mucronina A (continuação)

Mucronina-A V,F	$C_{29}H_{38}N_4O_4$	506	235	- 28,3	H	Fen	monometilado	(54,58)
Mucronina-B V,F	$C_{28}H_{36}N_4O_4$	492	222- 224	175	H	Fen	"	(54,58)
Mucronina-C V	$C_{26}H_{40}N_4O_4$	472	257	- 39,4	H	Leu	dimetilado	(58)
Mucronina-E V	$C_{26}H_{40}N_4O_5$	488	232- 234	- 89	OCH ₃	Leu	monometilado	(54)
Mucronina-F V	$C_{25}H_{38}N_4O_5$	474	208- 213	17,4	OCH ₃	Leu	-	(54)
Mucronina-G V	$C_{25}H_{38}N_4O_5$	474	amorfo	- 50	OCH ₃	Ile	-	(54)
Mucronina-H V	$C_{27}H_{34}N_4O_4$	478	"	5	H	Fen	-	(54)
Zizifina-D a'	$C_{25}H_{38}N_4O_4$	474	195	236	H	-OH-Ile	dimetilado	(7)
Zizifina-E a'	$C_{24}H_{36}N_4O_5$	460	-	150	H	-OH-Ile	monometilado	(7)

Tabela IV. Outros alcalóides peptídicos.

Alcalóide e fonte ^F	Fórmula molecular	PM	PF	$[\alpha]_D^{20}$	Referências
Himenocardina g	$C_{37}H_{50}N_6O_6$	674	261°	-124°	(59)
Lasiódina-A i	$C_{39}H_{40}N_5O_7$	699	195°	38°	(25)
Pandamina n	$C_{31}H_{44}N_4O_5$	552	256°	-103°	(2,61)
Pandaminina n	$C_{31}H_{42}N_4O_5$	538	272°	-117°	(2)

^F Planta - fonte de alcalóides

- a - Araliorhamnus vaginata Perrier (Rhamnaceae)
b - Ceanothus americanus L. (Rhamnaceae)
c - Centium enryoides Bull (Rubiaceae)
d - Ceanothus integgerinus (Rhamnaceae)
e - Colubrina texensis (Rhamnaceae)
f - Discaria longispina Miers (Rhamnaceae)
g - Himenocardia acida Tul (Hymenocardiaceae)
h - Hovenina dulcis (Rhamnaceae)
i - Lasiodiscus marmoratus (Rhamnaceae)
j - Melochia carchorifolia (Sterculiaceae)
l - Melochia tomentosa (Sterculiaceae)
m - Myrianthus arboreus (Urticaceae)
n - Panda oleosa Pierre (Pandaceae)
o - Rhamnus frangula (Rhamnaceae)
p - Scutia buxifolia Reiss (Rhamnaceae)
q - Ziziphus amphibia (Rhamnaceae)
r - Ziziphus abyssinica (Rhamnaceae)
s - Ziziphus hisódrica (Rhamnaceae)
t - Ziziphus jujuba (Rhamnaceae)
u - Ziziphus mauritiana (Rhamnaceae)
v - Ziziphus mucronata Willd (Rhamnaceae)

- x - Ziziphus nummularia (Rhamnaceae)
- z - Ziziphus spina Christi (Rhamnaceae)
- a' - Ziziphus oenoflia Mill (Rhamnaceae)
- b' - Waltherica americana (Sterculiaceae)

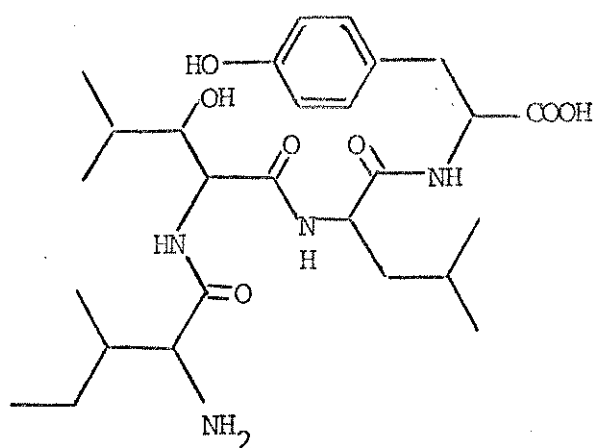
as mesmas unidades fizerem parte do alcalóide, por ambas apresentarem um fragmento a m/e 114, requerendo a aplicação de reações de degradação e separação destas unidades.

Como era de se esperar, os alcalóides ciclopeptídicos não escaparam às análises por meio de RMN ^1H e de RMN ^{13}C . O uso destas técnicas espectroscópicas em separado^(11,12) ou associadas⁽¹³⁾ permitiu obter informações em relação a características estereoquímicas e conformacionais.

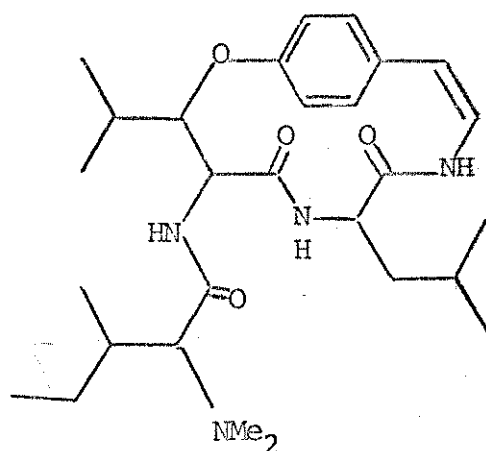
Por difração de R-X também se obtiveram informações adicionais das conformações de alguns destes alcalóides peptídicos em fase sólida^(14,9).

Pela hidrólise e isolamento de cada unidade de aminoácido, e pela medida de sua rotação ótica, se poderia, evidentemente, determinar as configurações absolutas de todos os centros assimétricos presentes nos alcalóides ciclopeptídicos. Entretanto, este enfoque apresentou dois problemas: (i) a sensibilidade de determinados aminoácidos sob condições de hidrólise, podendo alterar-se alguns centros assimétricos e (ii) a quantidade de produto natural necessário para hidrolisar o alcalóide ciclopeptídico, isolar e purificar cada um dos resíduos de aminoácidos para determinar suas rotações óticas. Com o objetivo de evitar o primeiro problema aplicaram-se degradações especiais⁽¹⁵⁻¹⁷⁾ e por meio de CG pode-se resolver o segundo⁽¹⁸⁾.

Ainda que não se tenha maior informação sobre a biogênese dos alcalóides ciclopeptídicos, a síntese do tetrapeptídio isoleucil- β -hidroxileucil-leucil tirosina⁽⁶⁾, um possível intermediário na biogênese de frangulanina⁽⁷⁾, foi recentemente estudada com êxito⁽¹⁹⁾.



(6)



(7)

1.1. Ocorrências

Alcalóides tipo ciclopeptídicos são encontrados, principalmente, em plantas da família Rhamnaceae e, ocasionalmente, em outras famílias como: Celastraceae, Himenocardiaceae, Pandaceae, Rubiaceae, Sterculaceae e Urticaceae. Os compostos estão presentes nas folhas e na casca da raiz e do tronco da planta, ocorrendo em muitos casos como uma mistura de mais de cinco constituintes dificilmente separáveis. Eles representam de 0,1 a 0,01% em relação ao total do material seco da planta. A distribuição dos alcalóides na planta depende da região da colheita, época e maturidade da planta.

1.2. Classificação

A classificação de alcalóides ciclopeptídicos em treze, quatorze e quinze membros, está baseada em seus variados componentes estruturais e a separação, em grupos, dos mesmos é feita pelo nū-

mero de átomos que fornecem o anel.

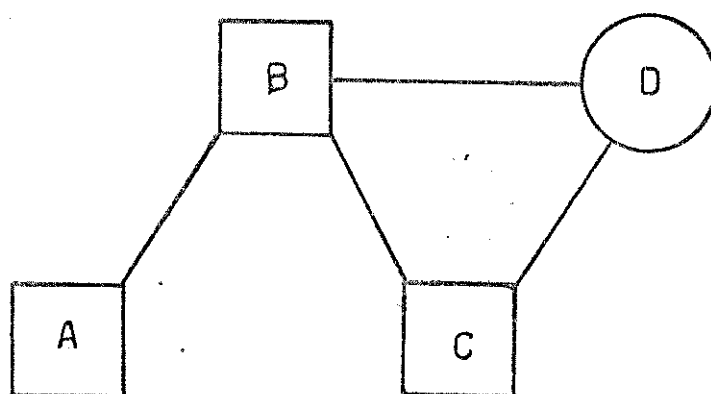
Ciclopeptídeos individuais diferem na natureza de seus aminoácidos constituintes. Aminoácidos dicarboxílicos e aminoácidos contendo enxofre não foram ainda encontrados.

Diferem, ainda, quanto à unidade básica terminal (mono ou dimetilados) e na posição do grupo ceto na molécula.

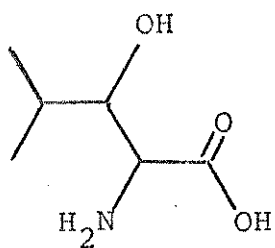
1.3. Ciclopeptídeos de 14 membros

Dentro deste grupo estão incluídos a maioria dos alcalóides peptídicos, com mais de cinquenta representantes (tabela II). Eles são subdivididos em três subgrupos, dependendo do β -hidroxiaminoácido do anel: β -hidroxileucina(8), no alcalóide tipo adoutina X(12) (1, 20, 21); β -fenilserina(9), no alcalóide tipo nummularina-E(13) (48) e uma β -hidroxiprolina(10), no alcalóide tipo mauritina-H(14) (44). Todos apresentam em comum a unidade *p*-hidroxi estirilamina(11).

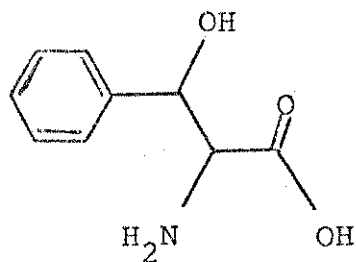
Alcalóides ciclopeptídicos de 14 membros do tipo (12) e (13) apresentam um tipo de estrutura geral representado pelo esquema 1,



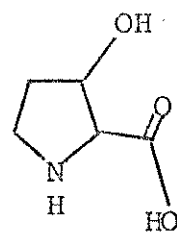
Esquema 1



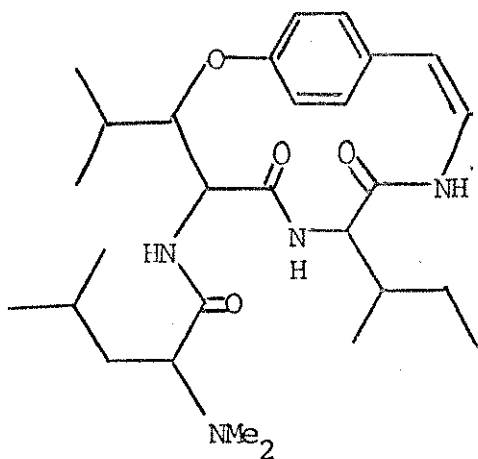
(8)



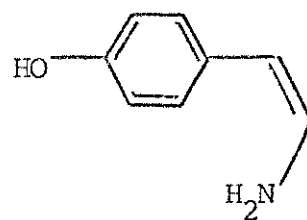
(9)



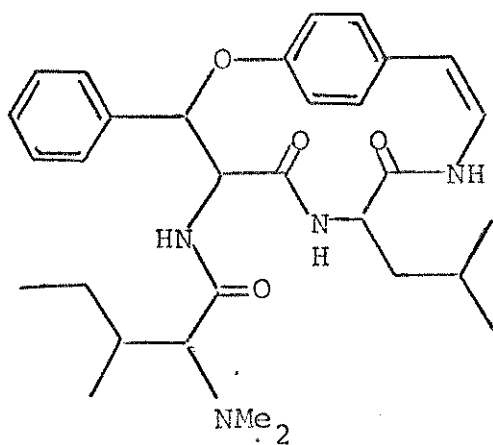
(10)



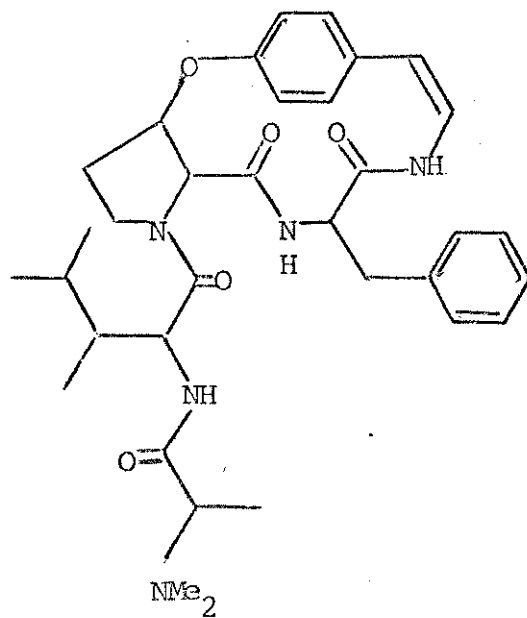
(12)



(11)



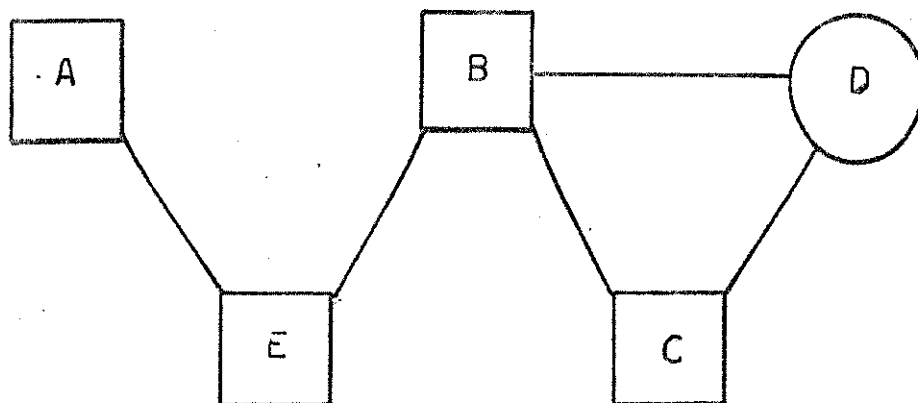
(13)



(14)

no qual o aminoácido N-mono ou dimetilado, o β -hidroxiaminoácido, o aminoácido normal e o aminofenol são representados respectivamente pelos fragmentos A, B, C e D, onde todas as uniões são peptídicas, com exceção da função éter do fenol entre B e D.

Entretanto, os do tipo (14), que apresentam um aminoácido inserido entre os fragmentos A e B, podem ser representados pelo esquema 2.



Esquema 2

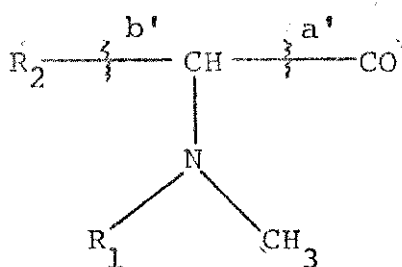
1.3.1. Espectrometria de Massa (EM)

A espectrometria de massa vem sendo o método físico mais informativo na identificação e elucidação de estruturas de alcalóides peptídicos. Existem apenas algumas dificuldades, como foi mencionado anteriormente, na determinação da unidade terminal N-N-dimetilada leucina ou isoleucina, por apresentarem o mesmo fragmento a m/e 114.

O esquema 3, a seguir, apresenta, de um modo geral, a fragmentação de um alcalóide peptídico de 14 membros, do tipo (12) e (13).

O pico base do espectro de massa, íon a, representa 40 a 60% do total de íons produzidos. Ele resulta de uma fácil quebra da ligação C-C adjacente ao grupo amínico básico. Esta ruptura pode

ocorrer de duas maneiras: a' ou b'.



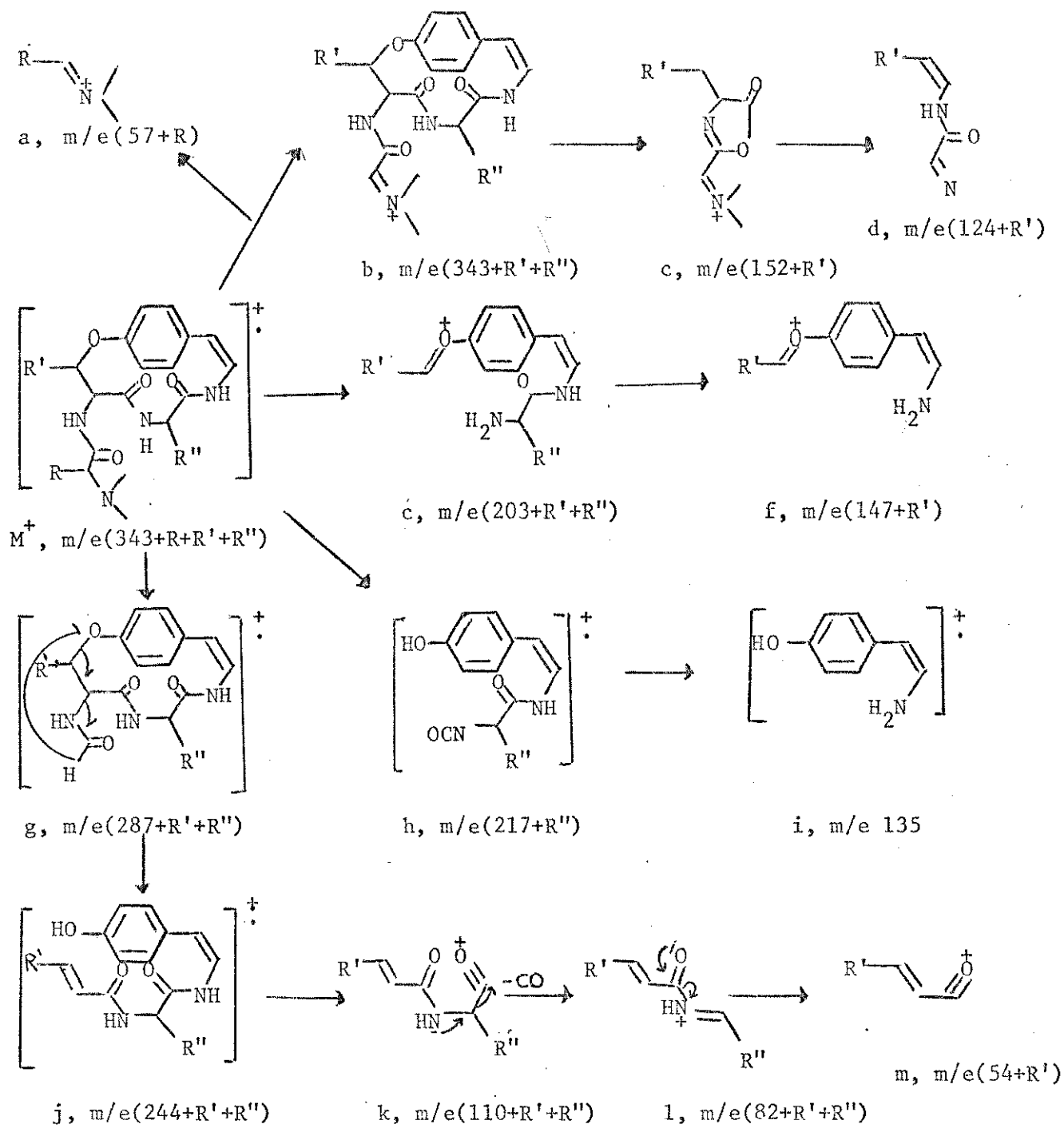
O fragmento iônico resultante da ruptura em a' se caracteriza pela alta possibilidade de formação e estabilidade, originando o fragmento iônico a. A fragmentação em b' origina o fragmento iônico b, que se decompõe termicamente em c e d. O fragmento g é formado através de várias etapas de degradação da cadeia lateral. A abertura do anel ocorre por uma cisão homolítica da ligação C-C adjacente ao éter e uma ligação do grupo amida levando aos fragmentos e e f. Uma segunda cisão do anel gera um íon fenólico, que por transposição de um hidrogênio dá o íon h, e este por sua vez sofre decomposição para dar o íon i.

A degradação por passos da cadeia lateral forma os fragmentos g e j. O fragmento j em uma série de reações secundárias origina os íons k, l e m.

O esquema 3, de fragmentação, apresentado, nos fornece certas unidades individuais da molécula como: a para o aminoácido N-mono ou dimetilado; m para o aminoácido hidroxilado; i para a p-hidroxiestirilamina; um fragmento amínico ($\text{H}_2\text{N}=\text{CH}-\text{R}:\text{m}/\text{e } 29+\text{R}''$) para o aminoácido que está formando parte do ciclo.

Os fragmentos f e h mostram que os aminoácidos estão unidos com a hidroxiestirilamina através do oxigênio e nitrogênio. Os íons k e l mostram a união dos aminoácidos simples com o β -hidro-

Esquema 3



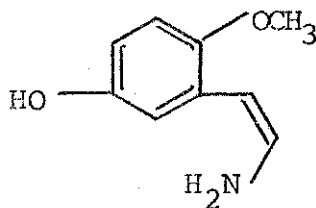
xilado e os íons c e d, a união do aminoácido N-mono ou dimetilado com o aminoácido β -hidroxilado.

Para alcalóides peptídicos de 14 membros do tipo(14) a fragmentação padrão apresentada no esquema 3 sofre modificações causadas pela inclusão de 3-hidroxi prolina na molécula, o que impede a ocorrência de uma homólise normal da ligação C-C adjacente ao oxigênio do éter⁽⁹⁾.

1.4. Ciclopeptídeos de 13 membros

Até o presente trabalho, são conhecidos onze representantes deste grupo (tabela II).

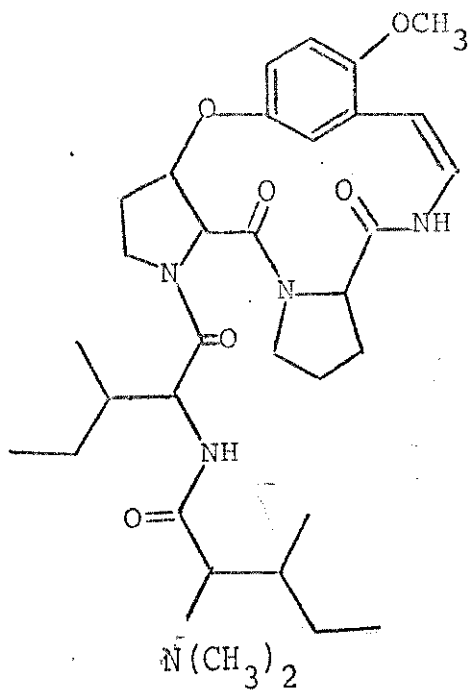
Estes alcalóides caracterizam-se pela unidade β -(2-metoxi-5-hidroxi)estirilamina(15), representada pela letra D nos esquemas 1 e 2: alcalóide tipo zizifina A(16)^(4,56).



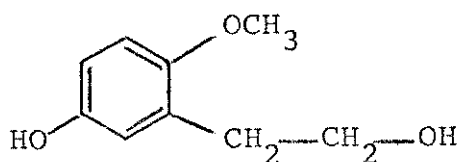
(15)

A hidrólise alcalina de alcalóide hidrogenado produz β -(2-metoxi-5-hidroxifenil)etanol(17), que permite indicar a posição da metoxila na unidade estirilamina do alcalóide⁽⁴⁾.

Uma outra característica importante destes ciclopeptídeos, é a unidade trans-3-hidroxiprolina(10) como hidroxiaminoácido encontrado em todos os alcalóides deste tipo.



(16)



(17)

1.4.1. Espectrometria de Massa (EM)

A composição dos íons destes alcalóides é estabelecida por espectrometria de massa de alta resolução. Pelos espectros de massa analisados dos alcalóides mucronina D⁽⁵⁵⁾, amfibina H⁽⁵²⁾ e nummularinas A e B⁽⁶⁾ pode-se postular um esquema geral, não muito completo, com os fragmentos que podem dar algumas informações sobre a estrutura da molécula (esquema 4).

A tabela V apresenta a composição iônica de mucronina D, esta belecida por espectrometria de massa de alta resolução⁽⁵⁵⁾.

O fragmento amínico (m/e 86) pode corresponder a leucina ou isoleucina. O íon a m/e 96 corresponde a hidroxiprolina e o íon a m/e 165 a uma hidroxil estiril amina substituída.

Os íons de k a o identificam a seqüência de aminoácidos da ca deia lateral do anel até a 3-hidroxiprolina, e os fragmentos de p a u estabelecem a estrutura do sistema do anel.

A base zizifina foi o primeiro ciclopeptídeo de 13 membros cu ja estrutura foi proposta. Pela utilização de métodos de degradação, associados com métodos físicos como UV, IR, RMN ¹H, Zbiral e colaboradores⁽³⁾, em 1965 propuseram para este alcalóide a estrutu ra acíclica⁽²⁾.

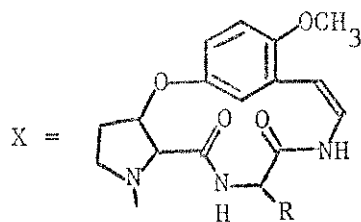
No entanto, mais tarde, R. Tschesche e colaboradores (1973) revisando a estrutura proposta anteriormente consideraram para o alcalóide a estrutura cíclica⁽³⁾⁽⁴⁾.

O espectro de massa da zizifina A apresenta um tipo de fragmentação semelhante aos alcalóides amfibina B, C, D e E^(49,50e51), mauritina A e B^(50,52) e mucronina D⁽⁵⁵⁾, o que permitiu atribuir a estrutura cíclica correta ao alcalóide. Portanto, este exemplo confirma o que já havia sido mencionado, anteriormente, quanto à importância da aplicação de espectrometria de massa na elucidação de estruturas de alcalóides peptídicos em geral.

A tabela VI apresenta as estruturas dos íons de (3), cuja com posição elementar foi determinada por espectrometria de massa de alta resolução.

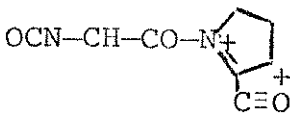
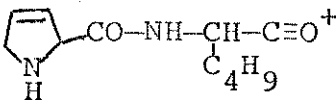
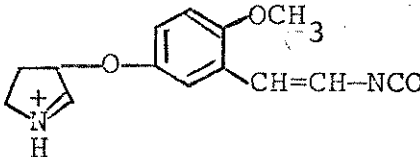
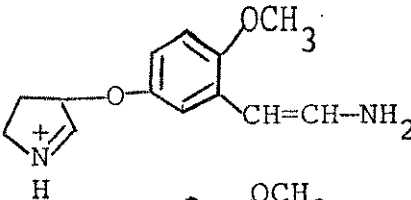
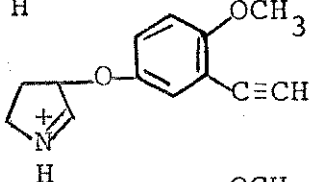
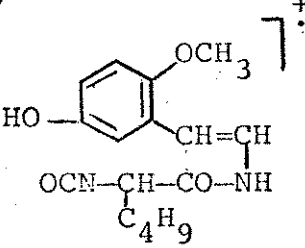
Os íons k, n e o indicam que a cadeia lateral N-N-dimetil iso leucil isoleucina⁽²⁰⁾ encontra-se unida à hidroxiprolina e não ao átomo de nitrogênio da estirilamina como era proposto para (2).

Tabela V



Íon	Estrutura	m/e
a	$(\text{CH}_3)_2\text{N}^+=\text{CH}-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$	148
b	$(\text{CH}_3)_2\text{N}^+=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\underset{\text{C}_4\text{H}_9}{\text{CH}}-\text{CO}-\text{X}$	570
c	$\text{H}-\text{CO}-\text{NH}-\underset{\text{C}_4\text{H}_9}{\text{CH}}-\text{CO}-\text{X}]^{\dagger}$	514
d	$\text{OCN}-\underset{\text{C}_4\text{H}_9}{\text{CH}}-\text{CO}-\text{X}]^{\dagger}$	512
e	$\underset{\text{C}_4\text{H}_9}{\text{HC}}-\overset{\text{OH}}{\text{CH}}-\text{X}]^{\dagger}$	471
f	$\text{HOC}-\text{X}]^{\dagger}$	401
g	$\text{O}\equiv\text{C}-\text{X}]^{\dagger}$	400
i	$\text{HX}]^{\dagger}$	373
j	X^+	372
k	$(\text{CH}_3)_2\text{N}-\underset{\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5}{\text{CH}}-\text{CO}-\text{NH}-\underset{\text{C}_4\text{H}_9}{\text{CH}}-\text{CO}-\text{N}^+$	358
l	$(\text{CH}_3)_2\text{N}-\underset{\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5}{\text{CH}}-\text{CO}-\text{NH}-\underset{\text{C}_4\text{H}_9}{\text{CH}}-\text{C}\equiv\text{O}^+$	289
m	$(\text{CH}_3)_2\text{N}-\underset{\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5}{\text{CH}}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}-\text{C}_4\text{H}_9$	261
n	$\text{HCO}-\text{NH}-\underset{\text{C}_4\text{H}_9}{\text{CH}}-\text{CO}-\text{N}^+$	209

Tabela V - Continuação

o		235
p		209
q		259
s		233
t		216
u		304

Fragmento aminico:

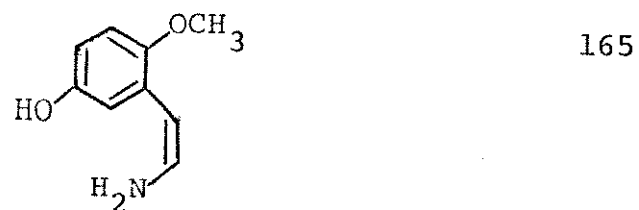
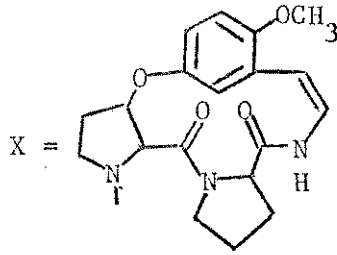
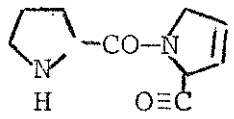
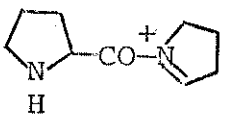
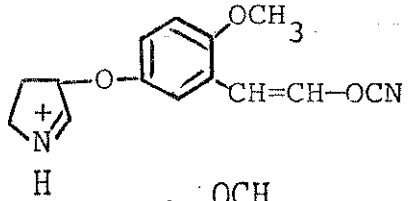
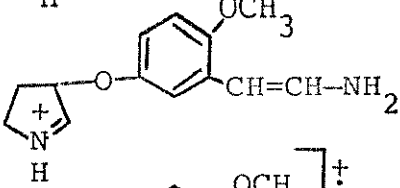
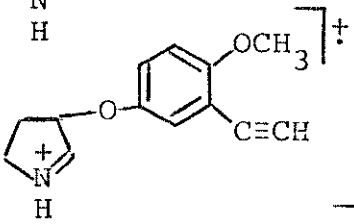
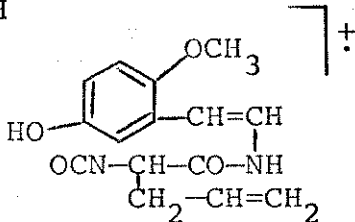


Tabela VI

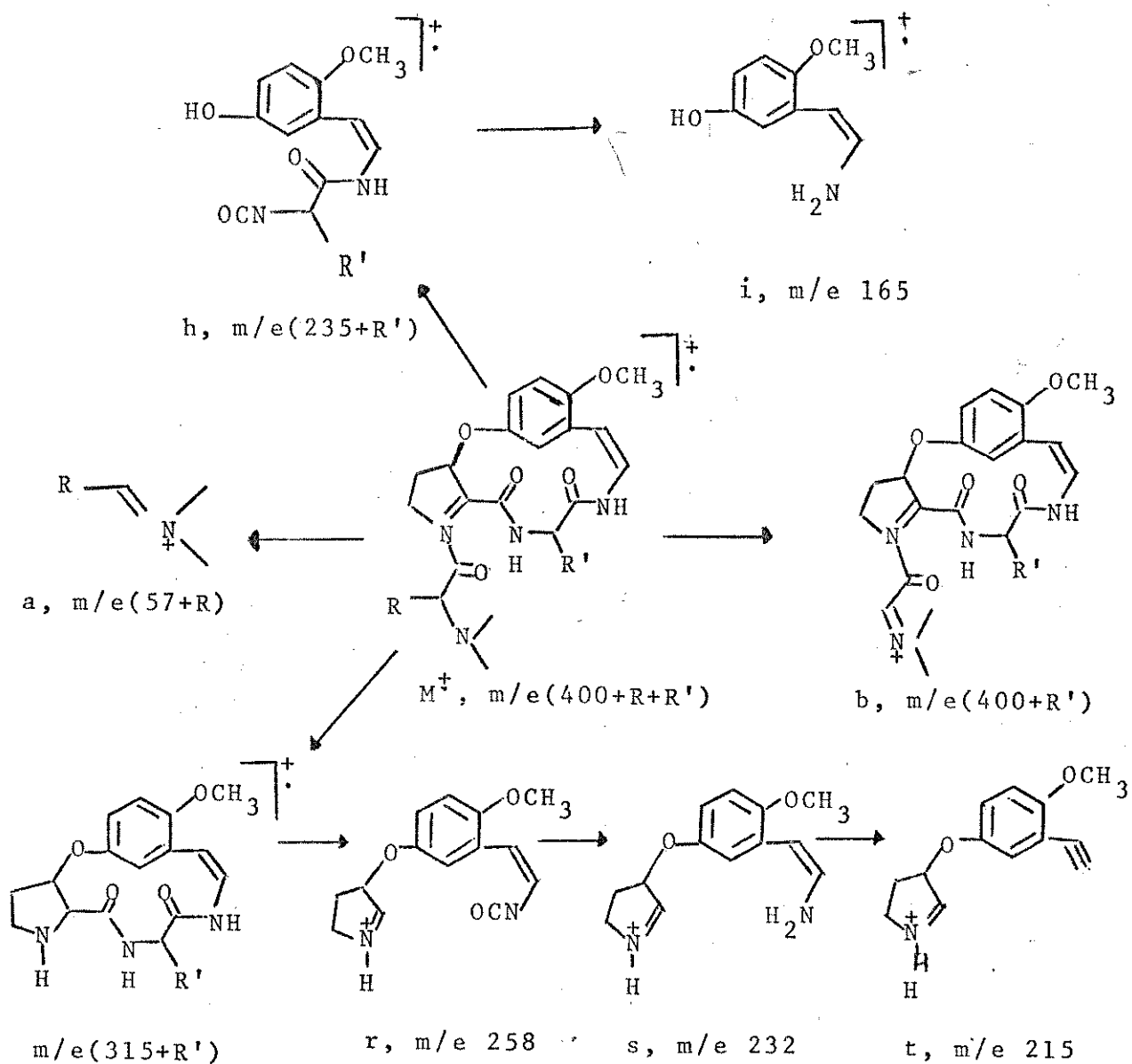


Íon	Estrutura	m/e
a	$(\text{CH}_3)_2\text{N}^+=\text{CH}-\text{C}_4\text{H}_9$	114
b	$(\text{CH}_3)_2\text{N}^+=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\underset{\text{C}_4\text{H}_9}{\text{CH}}-\text{CO}-\text{X}$	554
c	$\text{H}-\text{CO}-\text{NH}-\underset{\text{C}_4\text{H}_9}{\text{CH}}-\text{CO}-\text{X}]^{\dagger}$	498
d	$\text{OCN}-\underset{\text{C}_4\text{H}_9}{\text{CH}}-\text{CO}-\text{X}]^{\dagger}$	496
f	$\text{HOC}-\text{X}]^{\dagger}$	385
g	$\text{O}^+=\text{C}-\text{X}$	384
h	H_2X^+	385
i	$\text{H}-\text{X}]^{\dagger}$	357
j	X^+	356
k	$(\text{CH}_3)_2\text{N}-\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}-\text{CO}-\text{N}^+$	324
l	$(\text{CH}_3)_2\text{N}-\underset{\text{C}_4\text{H}_9}{\text{CH}}-\text{CO}-\text{NH}-\underset{\text{C}_4\text{H}_9}{\text{CH}}-\text{C}\equiv\text{O}^+$	255
m	$(\text{CH}_3)_2\text{N}-\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}=\text{CH}-\text{C}_4\text{H}_9$	227
n	$\text{H}-\text{CO}-\text{NH}-\underset{\text{C}_4\text{H}_9}{\text{CH}}-\text{CO}-\text{N}^+$	209
o	$\text{OCN}-\text{CH}-\text{CO}-\text{N}^+$	235

Tabela VI - Continuação

p		193
q		165
r		233
s		233
t		216
u'		288

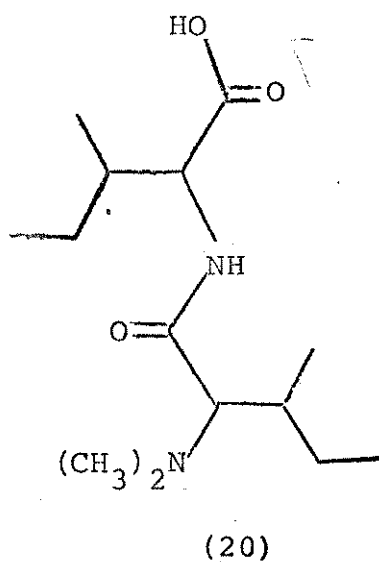
Esquema 4



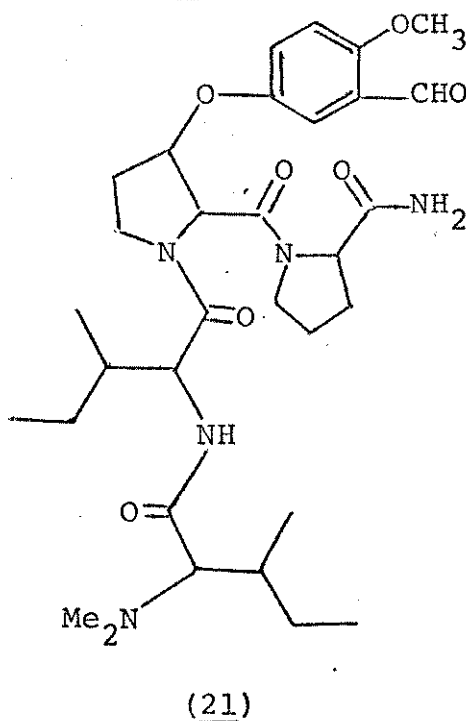
Os íons f a j mostram que o anel está formado por uma unidade estirilamina substituída com as unidades prolina e hidroxiprolina, que também podem ser constituídas dos fragmentos p a u' sendo que este último fragmento não é comum em estruturas de alcalóides análogos.

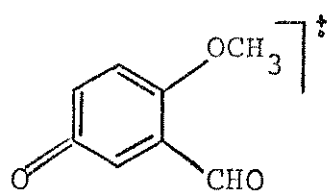
A presença de trans-3-hidroxirolina foi identificada entre os produtos da hidrólise ácida, pois os aril-éteres, nestas condições, não dão o β -hidroxiaminoácido⁽⁴⁾.

Por degradação oxidativa ($\text{OsO}_4/\text{IO}_4\text{Na}$) de (3) obteve-se o aminoaldeído (21), com seu espectro de massa apresentando os íons característicos dos aminoácidos contidos no alcalóide.



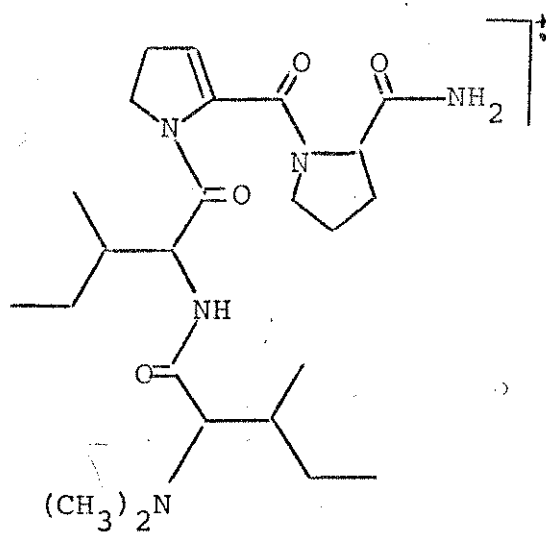
Por meio de um rearranjo de Mc.Lafferty, origina-se o íon (22) e o tetrapeptídeo (23), sendo que este último sofre degradação dando os íons (24), (25) e (26), os quais confirmam o modo de união dos aminoácidos.





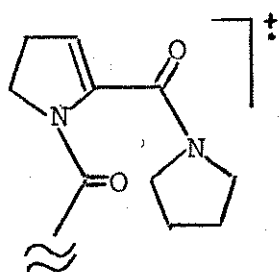
m/e 152

(22)



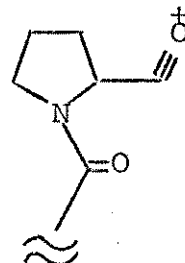
m/e 463

(23)



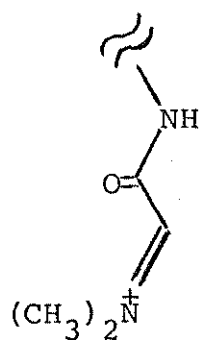
m/e 420

(24)



m/e 130

(25)



m/e 406

(26)

1.5.1. Espectrometria de massa (E.M.)

Mucronina A(19)^(54,58) é um dos representantes deste grupo de alcalóides. Apresenta uma fragmentação em seu espectro de massa (esquema 5), mostrando um íon molecular intenso e ausência dos fragmentos típicos para as unidades N-N-dimetil aminoácidos.

Espectros de massa dessas bases foram primeiro estudados por Fehlhaber, em 1972⁽⁵⁸⁾. Todos os alcalóides deste grupo que não a apresentam uma metila no nitrogênio, são examinados como derivados acetilados e como aldeídos, formados por uma cisão oxidativa da du pla ligação⁽⁵⁴⁾.

Esses ciclopeptídeos revelam um intenso pico molecular, que às vezes é o próprio pico base.

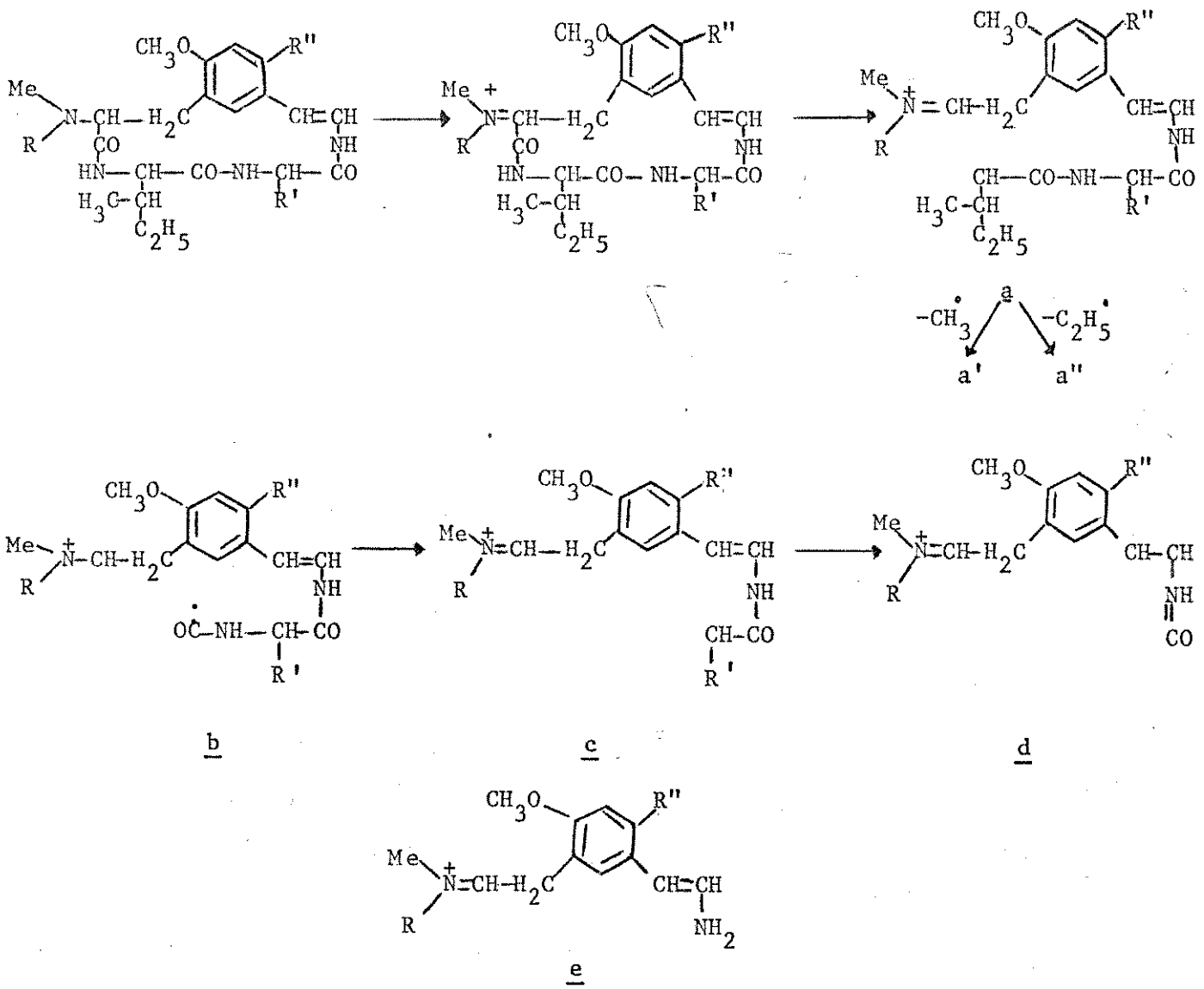
A primeira fragmentação é uma cisão α do nitrogênio básico pa ra gerar ácido isociânico e o íon radical a; uma outra etapa de de gradação da fração peptídica leva aos fragmentos b, c, d e e que evidenciam desta maneira a sequência de ambos os aminoácidos do a- nel.

Por meio de técnicas de focalização, vê-se que a perda de um radical etila e metila, é característica para reações secundárias. Desta maneira, a sequência leucina-isoleucina foi estabelecida pa- ra mucronina G(28), E(29), F(30)⁽⁵⁴⁾ e abissinina A(31), sendo a- pós confirmadas por reações químicas⁽⁵⁴⁾.

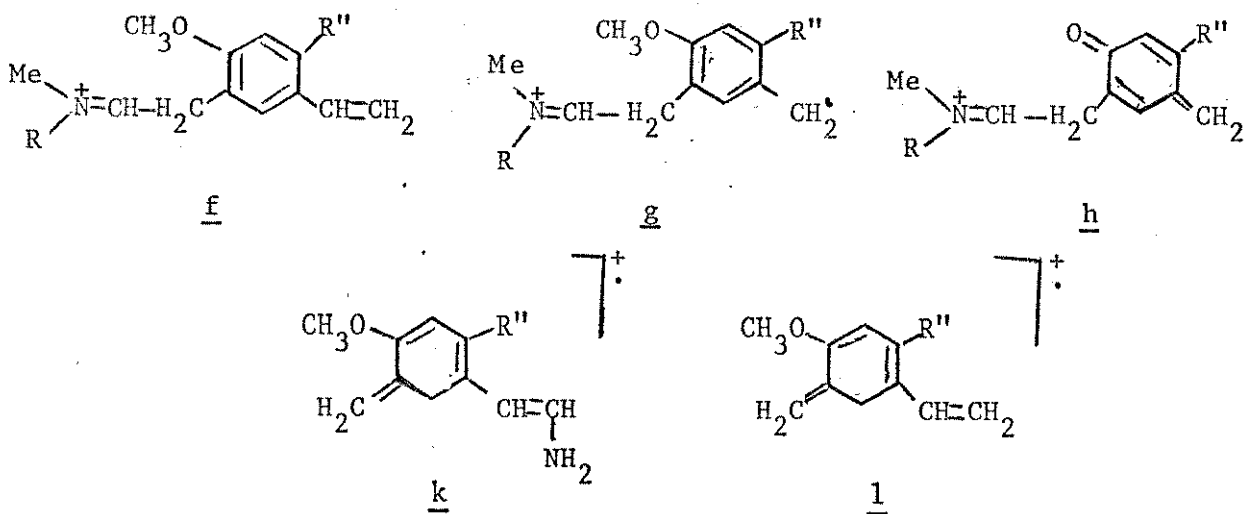
A fragmentação do diidro derivado via e, gera os fragmentos f, g e h.

Uma segunda cisão do anel ocorre quando o nitrogênio básico é monometilado (R = H). O rearranjo de Mc Lafferty depende do hidro gênio do amino grupo secundário e origina o núcleo benzênico resul tante da abertura do anel.

Esquema 5



alcalóides dihidrogenados



R = H, $-\text{CH}_3$; R' = $-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$, $-\text{CH}_2(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{C}_2\text{H}_5$; R'' = H, $-\text{OCH}_3$

O desdobramento da função enamina leva ao fragmento k (intensidade relativa de 70-100%), ou ao fragmento l (intensidade relativa 100%) com as bases diidrogenadas.

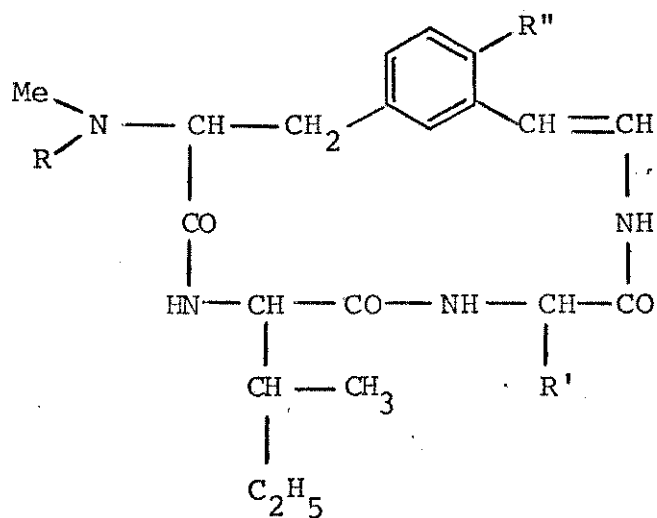
1.6. Bioquímica e farmacologia

Muito pouco é conhecido sobre a biogênese de alcalóides ciclopeptídicos⁽⁶⁾.

Recentemente encontrou-se que discarina B é um inibidor específico da transferência de energia na fotofosforilação em cloroplastos⁽⁶²⁾, em Rhodospirillum rubrum⁽⁶³⁾.

Testes realizados para provar a atividade antibacteriana e fungicida com as anfibinas F, G e H deram resultados negativos⁽⁶⁴⁾.

Muitas plantas contendo alcalóides peptídicos tem sido empregadas em medicina popular, sem entretanto ter-se conhecimento definido de suas atividades, portanto, estudos futuros serão ainda necessários para clarificar a distribuição de atividades neste novo grupo de substâncias.



	R	R'	R''
28	H	CH(CH ₃)C ₂ H ₅	OCH ₃
29	CH ₃	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	OCH ₃
30	H	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	OCH ₃
31	CH ₃	CH ₃ CH(CH ₃) ₂	H

CAPÍTULO 2

Rhamnaceae - Scutia buxifolia e Discária febrifuga Mart.

Introdução

Nosso objetivo principal neste trabalho é poder dar alguma contribuição para o estudo químico de plantas da família Rhamna - ceae, mais especificamente as espécies Scutia buxifolia Reiss e Discária febrifuga Mart, ambas muito comuns na região "fronteira" do Rio Grande do Sul e em países vizinhos, como Argentina e Uruguai.

Nossa cooperação, neste estudo, consta do isolamento de novos alcalóides ciclopeptídicos bem como da aplicação de métodos físicos mais atuais, como RMN de ^{13}C e MIKES, na determinação de suas estruturas.

2.1. Alcalóides peptídicos da Scutia buxifolia Reiss

A espécie Scutia buxifolia Reiss, comumente encontrada na região "fronteira" do Rio Grande do Sul, é conhecida pelo nome vulgar de "curunilha" e aparece como uma árvore de 2,5 a 4 metros de altura.

O primeiro estudo realizado com esta espécie foi feito por um grupo da Universidade de Bonn⁽⁵⁾, que trabalhando com a raiz da planta, isolou um alcalóide peptídico, scutianina A, para o qual propôs a estrutura (4).

Além deste alcalóide detectaram a presença de outras bases, o que serviu de incentivo para novas tentativas de isolamento.

Mais tarde, pesquisadores da Universidade de Buenos Aires⁽¹⁸⁾

determinaram todos os centros quirais de (4), com exceção da unidade de β -hidroxileucina.

O mesmo grupo, trabalhando com uma espécie coletada na Argentina, isolou e determinou a estrutura de dois novos alcalóides: scutianina D(38) e scutianina C(39), como também um composto neutro denominado scutianeno C(40) em virtude de sua semelhança estrutural com (39) (18,38).

A determinação da forma eritro da unidade β -hidroxileucina de (39) foi possível pela utilização de RMN ^1H a 220 MHz, e comprovada pela comparação com um padrão β -hidroxileucina na forma eritro.

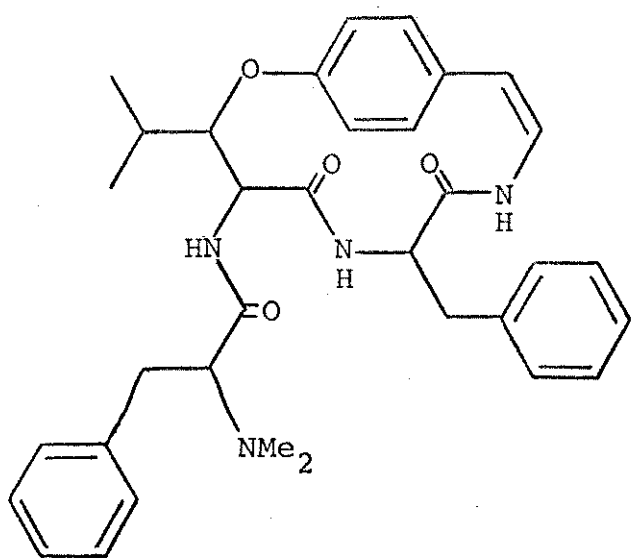
O espectro de RMN a 220 MHz de (40) mostrou que os sinais correspondentes aos prótons α e β da unidade hidroxileucina têm valores de δ diferentes dos observados para os correspondentes prótons de (39), indicando, assim, alguma troca na estereoquímica da unidade em (40) com relação a (39). Isto quer dizer que (40) pode ser originado de um alcalóide estereoisomérico com (39).

O estudo dos produtos de hidrólise do diidro (39) indicou a configuração treo para a unidade β -fenilserina.

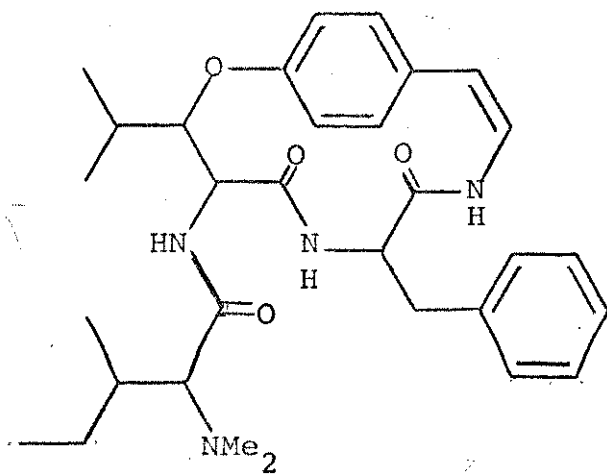
Simultaneamente, o grupo de Bonn⁽¹⁷⁾ isolou da raiz da mesma planta três alcalóides denominados como: scutianina C(38) e scutianinas D(39) e E(41), estes dois últimos, distereoisômeros.

A estereoquímica da unidade β -hidroxileucina dos dois diastereoisômeros foi determinada como sendo L-eritro em (39) e D-eritro em (41), e a unidade β -fenilserina como sendo L-treo em (39) e D-treo em (41), respectivamente.

Por comparação com dados espectrais, pode-se evidenciar que as scutianinas C e D isoladas na Universidade de Buenos Aires eram idênticas às scutianinas D e C isoladas pelo grupo de Bonn. Neste trabalho adotaremos a última denominação.

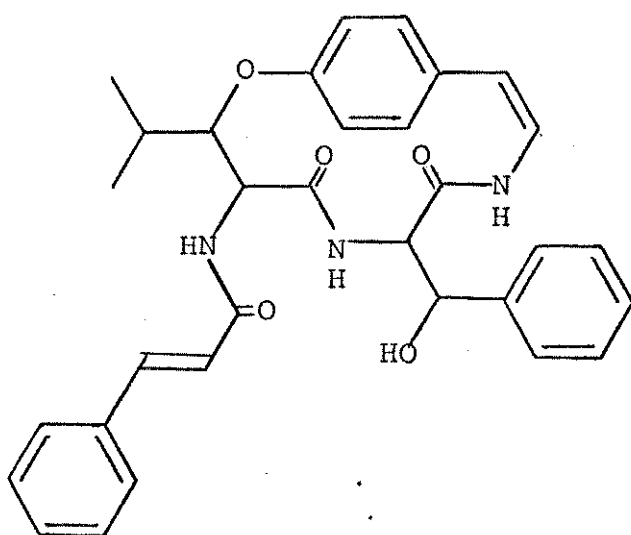


37 Scutianina B

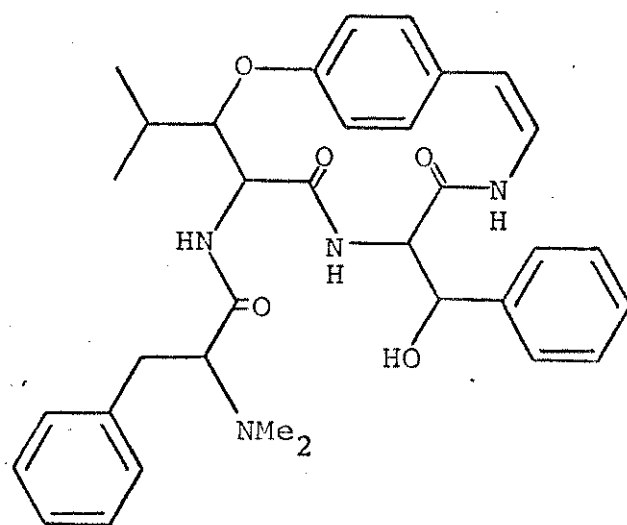


38 Scutianina D⁽¹⁸⁾

Scutianina C⁽¹⁷⁾



40 Scutianeno C

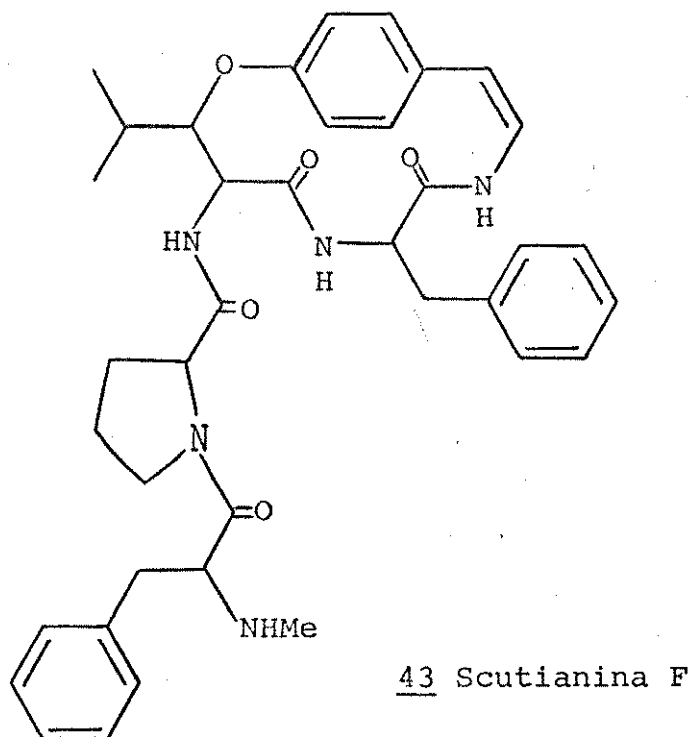


39 Scutianina C⁽³⁸⁾

Scutianina D⁽¹⁷⁾

41 Scutianina E

42 Scutianina G



Mais recentemente, dois novos alcalóides peptídicos foram isolados da mesma planta: scutianina G(42)⁽³⁹⁾ um outro diastereoisômero de (39) e (41), e um desmetil derivado de (4) denominado scutianina F(43)⁽⁴⁴⁾.

2.1.1. Alcalóides peptídicos isolados da casca do tronco da Scutia buxifolia Reiss

A casca do tronco desta planta contém substâncias que pertencem ao grupo dos alcalóides peptídicos.

Um teste preliminar da mistura crua (extrato bruto), extraída da casca do tronco, revelou a presença de várias bases, sendo duas delas em maior proporção.

A utilização de uma coluna cromatográfica, usando-se sílica H como suporte, e a mistura clorofórmio-metanol a várias concentra-

ções como sistema eluente, permitiram o isolamento de seis bases, identificadas como sendo scutianinas B(37), C(38), D(39), E(41) e dois novos alcalóides denominados como scutianina H(44), e scutianina I(48), e um composto neutro, scutianeno C(40).

Scutianina H(43)

Pela recristalização de uma das frações da coluna cromatográfica, obteve-se um produto homogêneo por CCD, que pela análise de sua estrutura tratava-se de um alcalóide inédito, o qual foi denominado scutianina H.

A determinação da estrutura de scutianina H foi conseguida por aplicação de métodos físicos usuais como: espectrometria UV, IV, massa e RMN de ^1H , em combinação com reações de hidrólises e oxidação, juntamente com uma técnica recente de espectrometria de massa (MIKES).

O espectro UV (fig. 1) deste alcalóide mostrou uma absorção aromática terminal, característica de ciclopeptídeos de 14 membros, e em seu espectro no IV (fig. 2), as bandas a 3285 cm^{-1} e a 1640 cm^{-1} foram atribuídas aos grupos NH e CO de amidas, confirmando a natureza peptídica do alcalóide. A banda a 3600 cm^{-1} sugeriu a presença de um OH na molécula.

A análise do espectro de massa de baixa resolução (fig. 3, esquema 6), mostrou a presença de um íon molecular a m/e 550, indicando uma fórmula molecular $\text{C}_{31}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_5$ para scutianina H, confirmada por espectrometria de massa de alta resolução (calculado para $\text{C}_{31}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_5$ 550,31550, observado 550,3184).

A tabela VII apresenta a relação de alguns fragmentos importantes para a atribuição da estrutura deste alcalóide.

Com base nestas análises, concluiu-se que scutianina H, provavelmente, apresenta um ciclo de 14 membros, formado pelos seguintes fragmentos: p-hidroxiestirilamina; β -hidroxileucina ou β -hidroxi-isoleucina e β -fenilserina, além de um resíduo N-terminal, cuja massa corresponde a N-N-dimetil-leucina ou N-N-dimetil-isoleucina.

O ciclo de 14 membros foi confirmado pela transformação de scutianina H em seu diidro derivado (45) com posterior hidrólise ácida e identificação cromatográfica de p-tiramina, claramente diferente dos isômeros o e m-tiraminas, conforme é discutido na parte experimental.

A fragmentação do espectro de massa de (45) (fig. 4) é encontrada na tabela VIII.

A presença de um resíduo de β -fenilserina, como unidade de aminoácido, foi confirmada por oxidação de (45) e posterior análise do espectro de massa (fig. 5) de oxodihidroscutianina H (46). Na tabela VIII de fragmentação de massa para (46), observa-se a presença do íon a m/e 105, típico de um grupo benzoilo e o desaparecimento do íon a m/e 106, presente em (44) e (45).

A análise da região alifática de espectro de RMN de ^1H a 100 MHz em CDCl_3 (figura 6), indicou a presença de vários sinais característicos de grupos metilas entre δ 0,74 - 0,98 de difícil atribuição. O sinal a δ 1,22 (d, 8 Hz), totalmente separado do restante dos outros sinais, com valores de δ e J muito semelhantes a um dos metilas diastereotópicos da unidade β -hidroxileucina de alcalóides já estudados (17), foi útil para estabelecer a presença desta unidade em (44). O singlete a δ 2,0 foi atribuído ao grupo N-N-dimetil do resíduo N-terminal.

Com o objetivo de diferenciar entre N-N-dimetil-leucina e N-N-dimetil-isoleucina, ambas possíveis baseado no pico base a m/e

Esquema 6

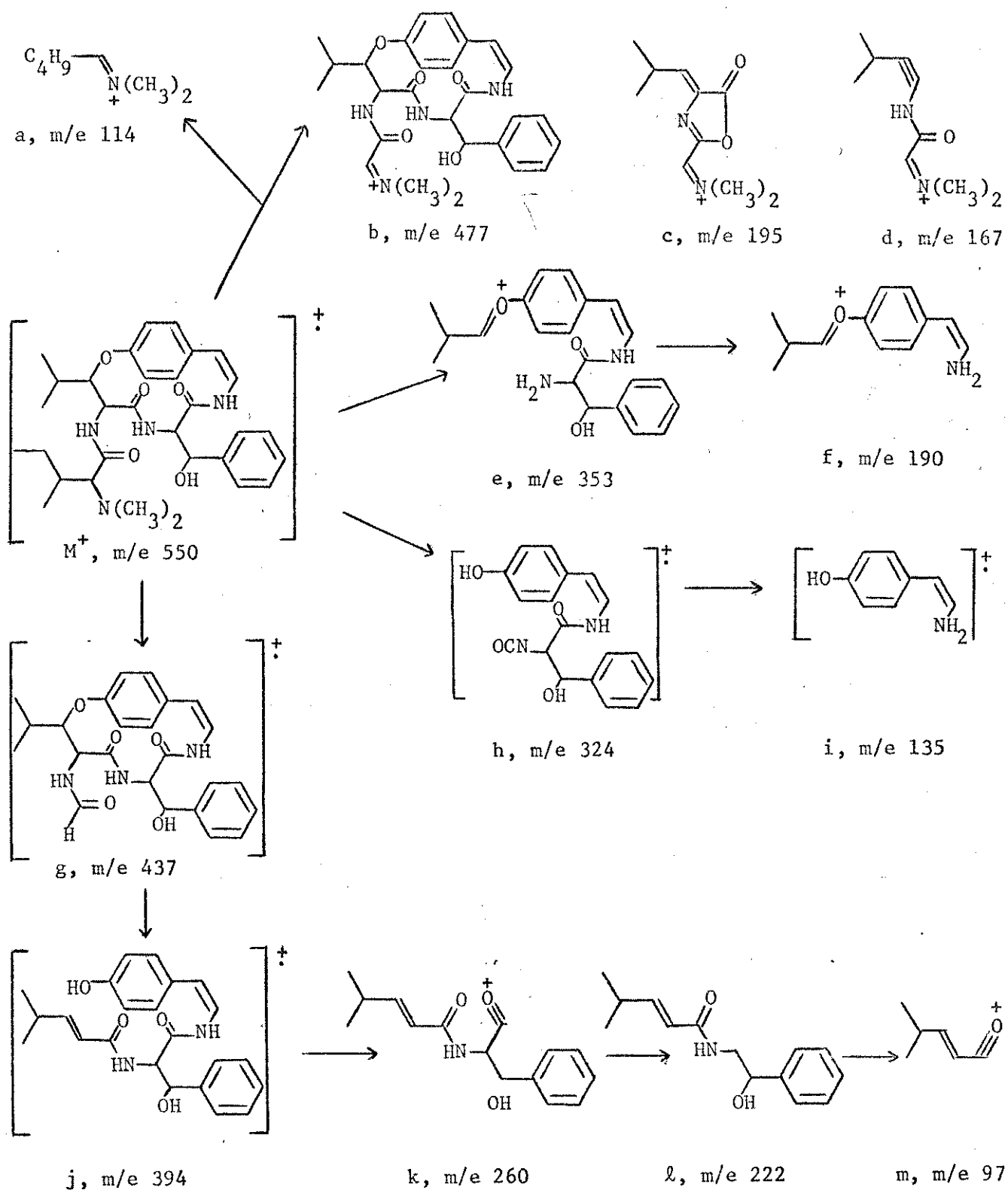
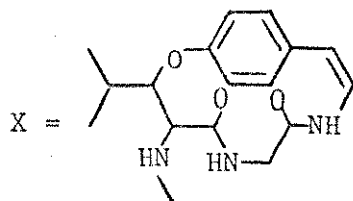


Tabela VII



Íon	Fórmula	m/e	Intensidade relativa
a	$C_7H_{16}N$	114	100
M^+	$C_{30}H_{42}N_4O_5$	550	0,17
b	$C_{27}H_{33}N_4O_5$	493	1,47
	$C_{24}H_{36}N_4O_5$	444	0,94
j	$C_{23}H_{26}N_2O_4$	394	0,42
e	$C_{21}H_{15}N_2O_2$	353	0,08
c	$C_9H_{15}N_2O_2$	195	0,2
f	$C_{12}H_9NO$	190	1,77
	$C_{12}H_{15}O$	175	0,82
d	$C_9H_{13}N_2O$	167	0,8
i	C_8H_9NO	135	10,41
	C_8H_8O	120	3,15
	C_7H_7O	107	3,15
	C_7H_6O	106	5,72

Continuação - Tabela VII

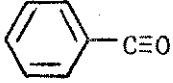
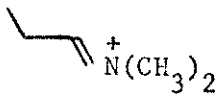
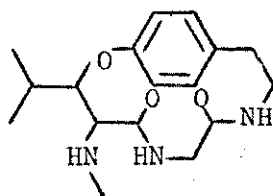
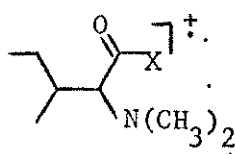
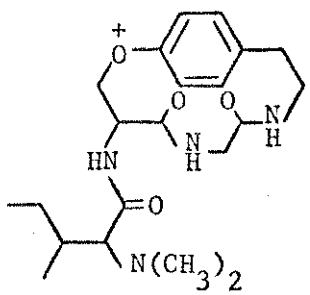
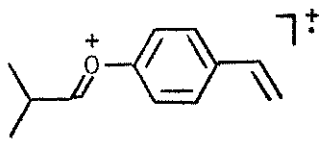
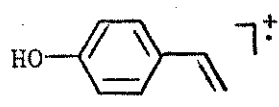
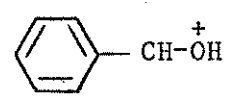
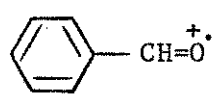
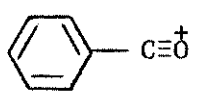
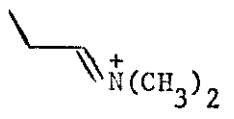
	C_7H_5O	105	6,31
m	C_6H_9O	97	10,3
	$C_5H_{12}N^+$	86	16,8
$C_6H_5^+$	C_6H_5	77	5,58

Tabela VIII



Íon	Fórmula	m/e		Intensidade relativa	
		46	47	46	47
a	$C_7H_{16}N$	114	114	100	100
M^+	$C_{31}H_{44}N_4O_5$	552		0,83	
	$C_{31}H_{42}N_4O_5$		550		1,23
b	$C_{27}H_{35}N_4O_4$	495		0,19	
	$C_{27}H_{33}N_4O_5$		493		1,07
	$C_{24}H_{38}N_4O_5$	446	446	0,69	0,21
					
g	$C_{24}H_{23}N_3O_5$	-	437	-	0,2

Continuação - Tabela VIII

	$C_{21}H_{31}N_4O_4$	403	403	0,27	0,22
e	$C_{21}H_{24}N_2O_3$	-	353	-	0,38
c	$C_9H_{15}N_2O_2$	-	195	-	0,07
f	$C_{12}H_{11}NO$	192	192	0,22	0,3
	$C_{12}H_{15}O$	175	175	0,72	2,30
	C_8H_8O	120	120	2,8	4,5
	C_7H_7O	107	107	2,5	9,23
	C_7H_6O	106	-	3,05	-
	C_7H_5O	105	105	3,33	12,40
m	C_6H_9O	97	97	2,22	5,8
	$C_5H_{12}N$	86	86	3,88	2,30
C_6H_5	C_6H_5	77	77	3,34	5,8

114, tentou-se fazer uma análise da região de metilas no espectro de RMN de ^1H , usando-se Pi-d_5 como solvente⁽⁶⁶⁾ (figura 7). Desta maneira, foi examinado que a análise desta região é facilitada, consideravelmente, com este solvente, podendo-se afirmar que, efetivamente, é possível observar um triplete a δ 0,84 ($J = 6$ Hz) e três dubletes, a δ 0,94, 1,28 ($J = 6$ Hz) e 1,20 ($J = 8$ Hz), sinais

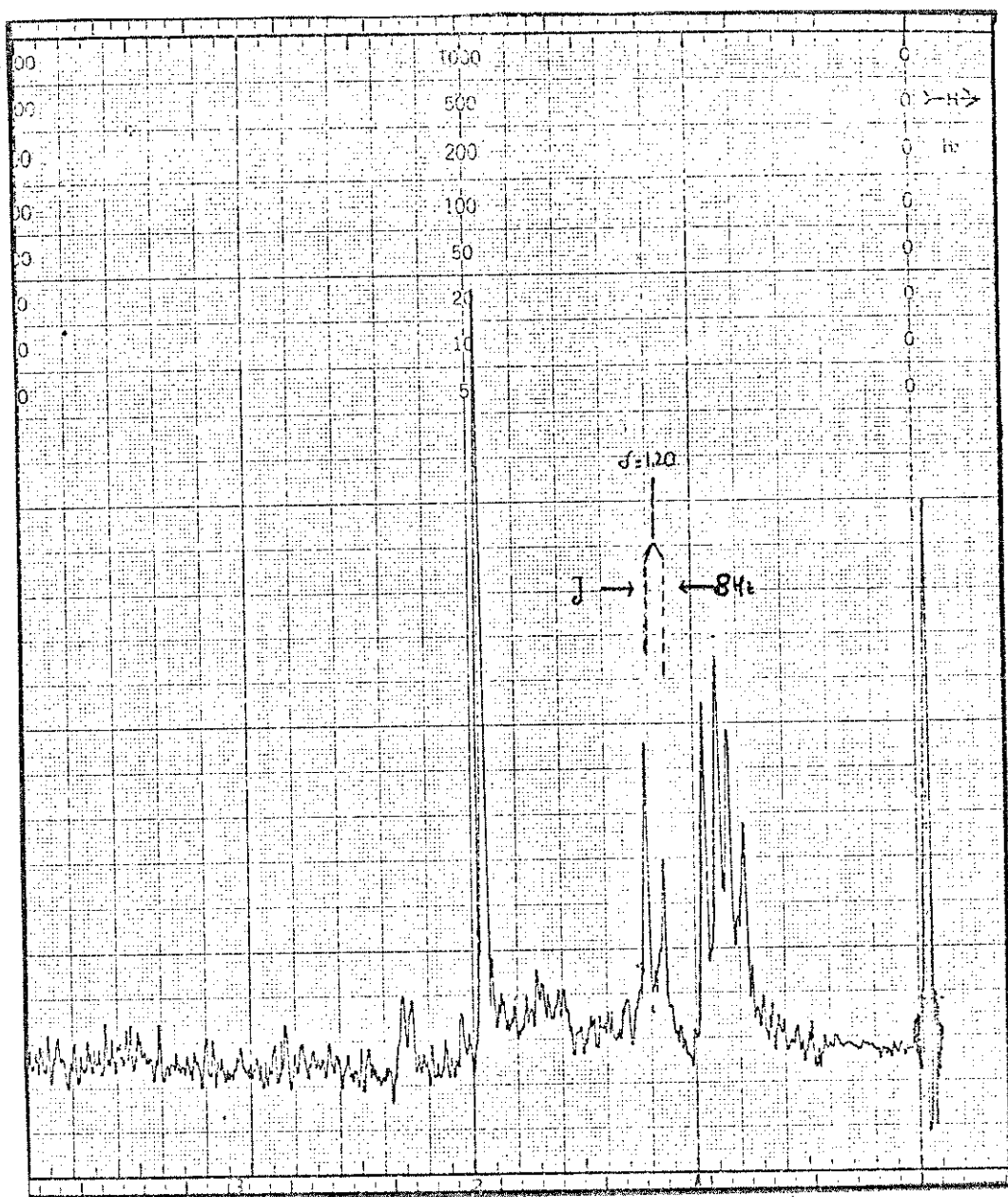


Fig. 6. RMN de ^1H a 100 MHz de scutianina H (região das metilas) em Cl_3CD .

que significam a presença de N-N-dimetil-isoleucina e que, também, confirmam a presença de β -hidroxileucina.

Objetivando a confirmação dos dados anteriores, e tratando-se de desenvolver uma metodologia que permitisse diferenciar claramente entre os possíveis resíduos N-N-dimetilados de massa 114, usando-se mínimas quantidades de produto natural, foi realizado um es-

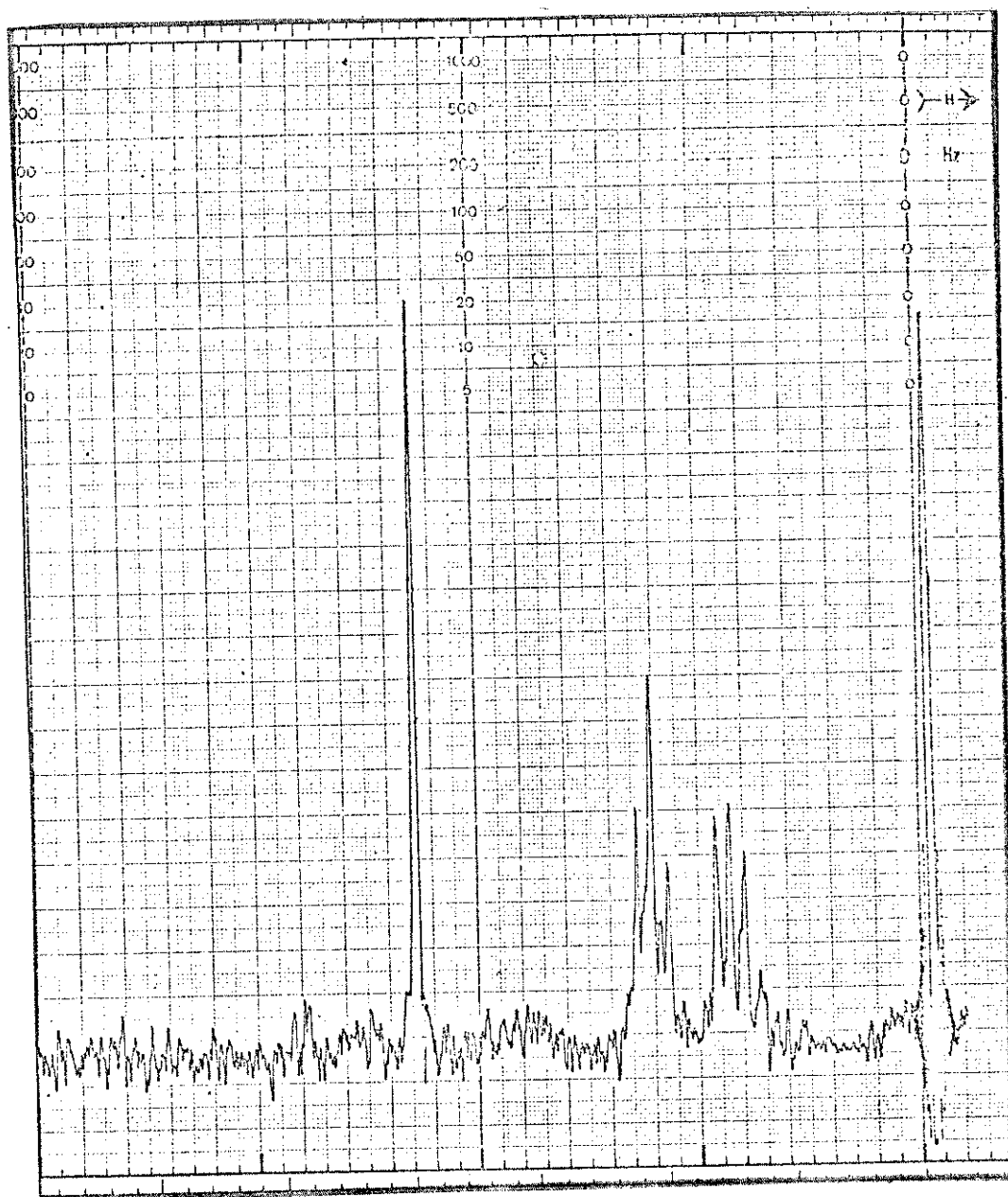
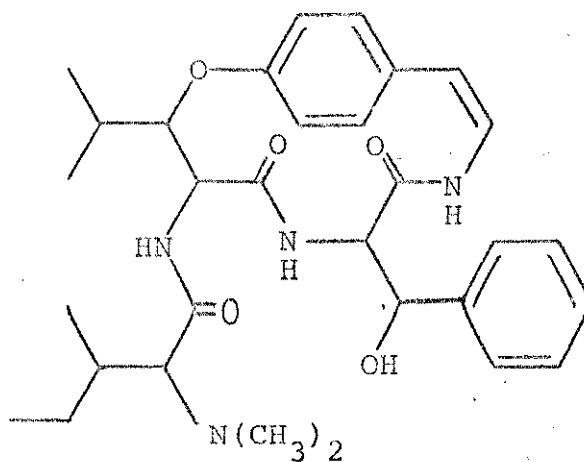


Fig. 7. RMN de ^1H a 100 MHz de scutianina H (região das metilas) em piridina- d_5 .

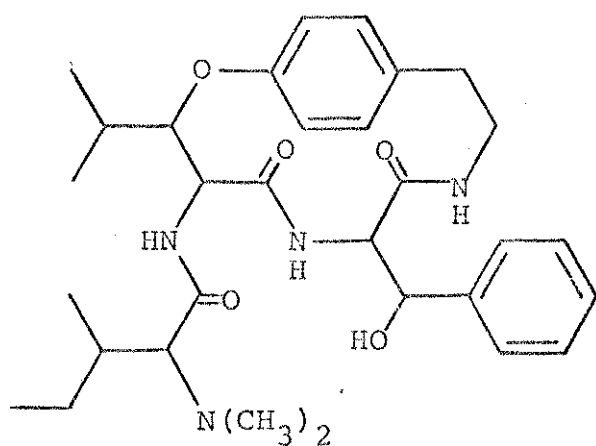
tudo de MIKES, descrito no capítulo 4.

Baseado nos dados discutidos anteriormente, sugeriu-se, então, a estrutura de scutianina H como é representada na fórmula (44),

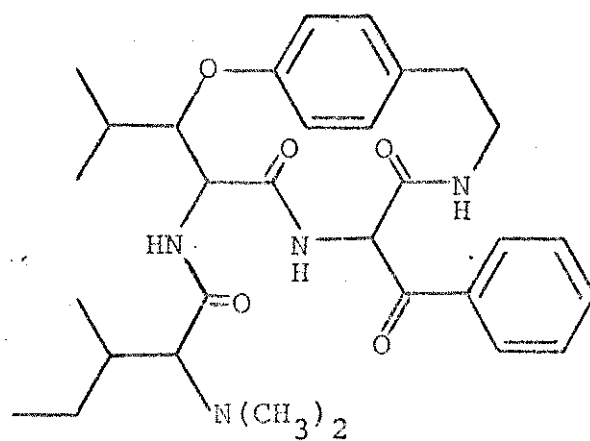


44 Scutianina H

e seus derivados diidro e oxodiidro, pelas fórmulas (45) e (46) respectivamente.

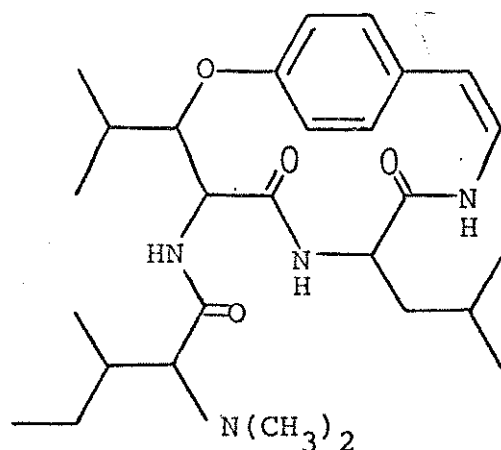


45 diidroscutianina H



46 oxodiidroscutianina H

No final de nosso trabalho, fomos impulsionados pelos resultados publicados por Haslinger⁽¹³⁾, dirigidos a resolver sinais superpostos de grupos metilas de frangulanina(47), com base nas diferenças de tempos de relaxação de cada um deles. Decidimos, então, realizar um estudo mais completo de sinais de prótons dos grupos metila, em (44), porém, usando 400 MHz em combinação com dupla irradiação.



47 Frangulanina

Podemos ver claramente, nas figuras 8 e 9, que a região dos metilas mostra, como era de se esperar, três dubletes a δ 0,86 ; 0,99; 1,23 e um triplete a 0,97 (CDCl_3) e a δ : 0,84; 1,0; 1,2 e 0,95 ($\text{CDCl}_3 + \text{D}_2\text{O}$), três dubletes e um triplete, respectivamente.

Os espectros com dupla irradiação foram feitos em $\text{CDCl}_3 + \text{D}_2\text{O}$, o que simplifica o espectro pela troca dos prótons amídicos com deutério.

A irradiação a aproximadamente δ 2,0 (F_2 b), região de absorção do próton γ da unidade β -hidroxileucina, transformou os dubletes a δ 1,0 e 1,2 em singletes, permitindo a assinalação inequívoca dos metilas diastereotópicos da β -hidroxileucina (fig. 10).

Por irradiação a δ 1,8 (F_2 c) pode-se observar a transformação do dublete a δ 0,84 em singlete, atribuindo este sinal ao C-Me da

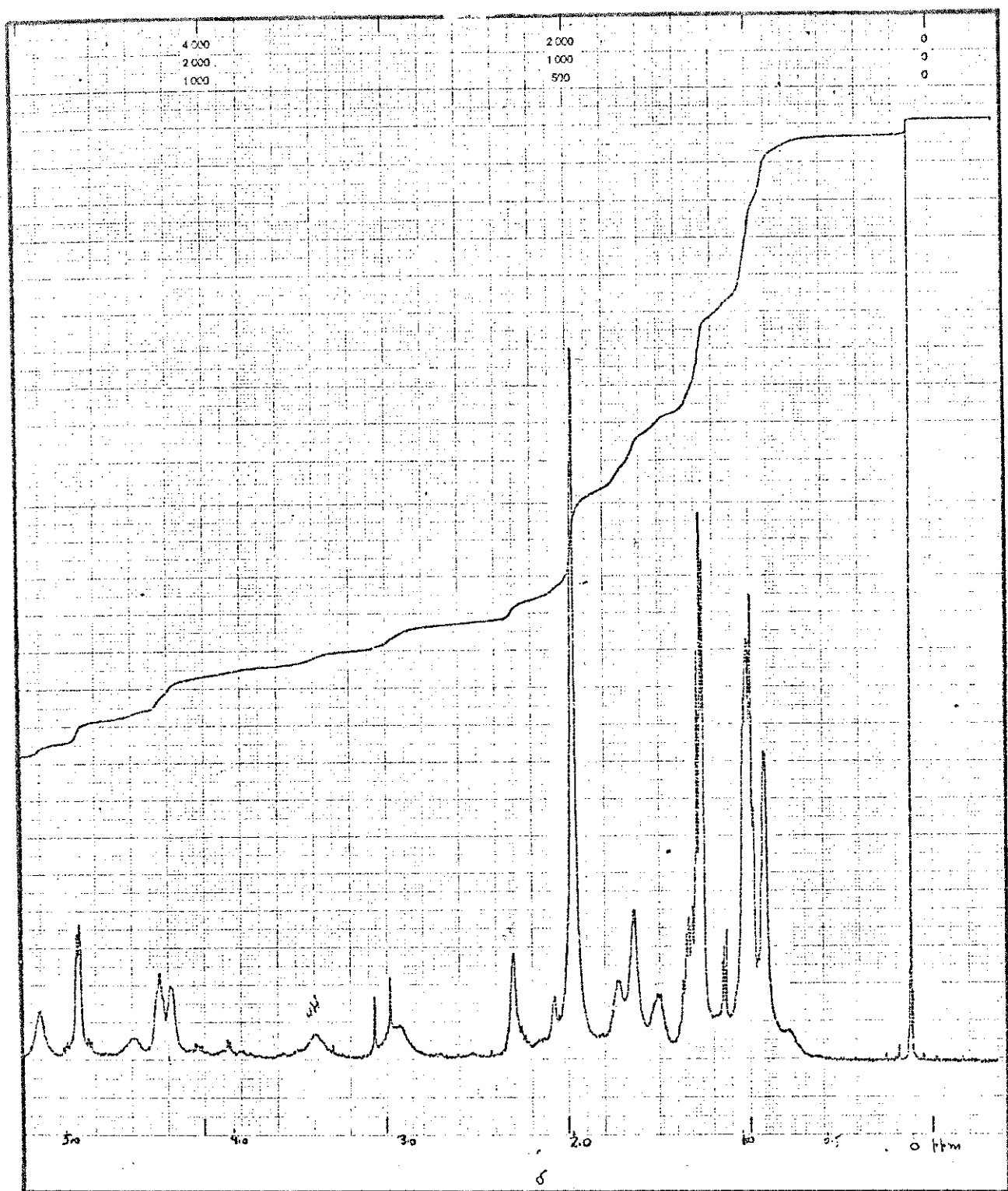


Fig. 8. RMN de ^1H a 400 MHz de scutianina H em CDCl_3 .

N-N-dimetil-isoleucina (figura 11).

As irradiações a δ 1,26 e δ 1,52 (F_2d e F_2e), frequências correspondentes aos prótons diastereotópicos do metileno, transformam

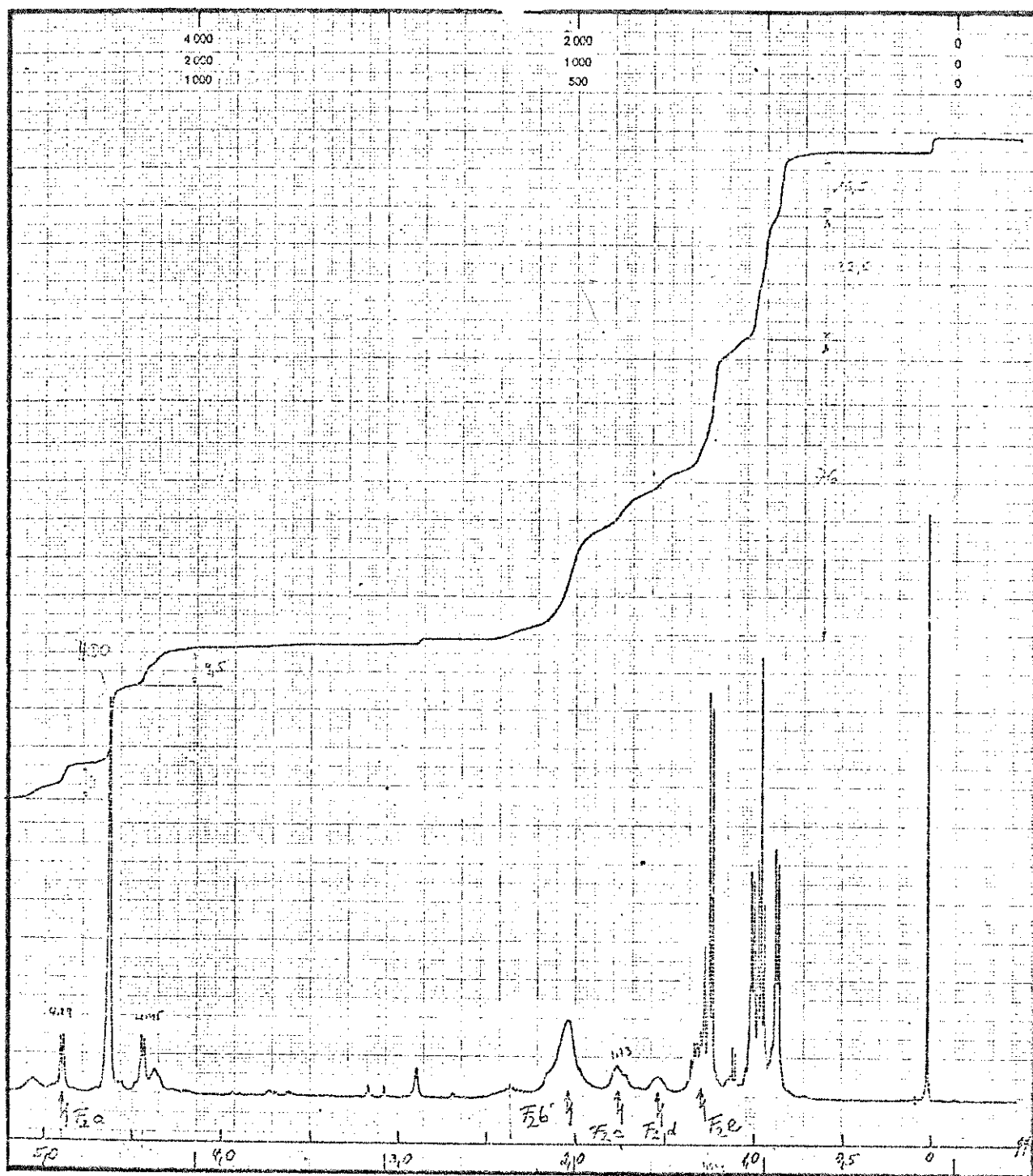


Fig. 9. RMN de ^1H a 400 MHz de scutianina H em $\text{CDCl}_3 + \text{D}_2\text{O}$.

o triplete a δ 0,95 em um dublete, o que permitiu assinalar o outro metila da N-N-dimetil-isoleucina (figuras 12 e 13).

Finalmente, a irradiação a δ 4,93 (F_2 a) fez com que o duble-

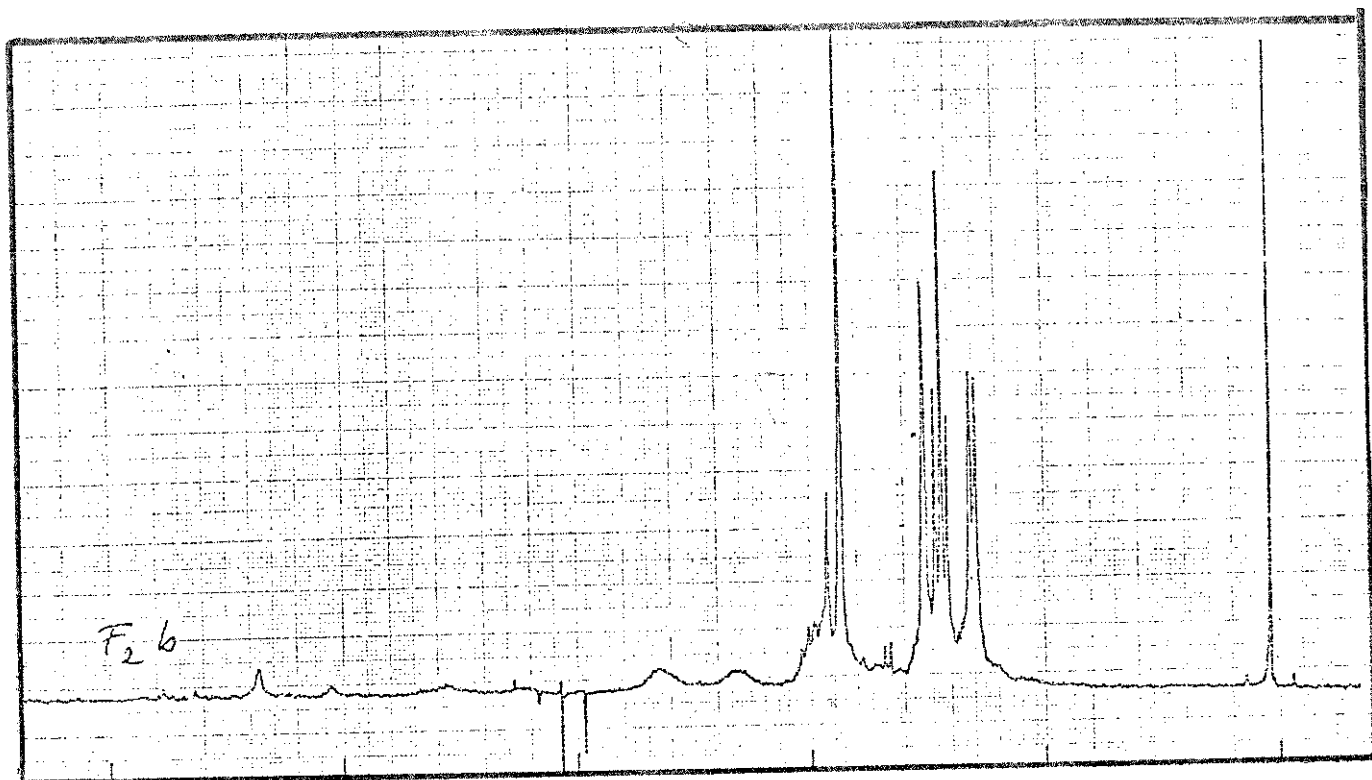


Fig. 10. RMN de ^1H a 400 MHz de scutianina H com dupla irradiação a δ 2,0 (F_{2b}) em $\text{CDCl}_3 + \text{D}_2\text{O}$.

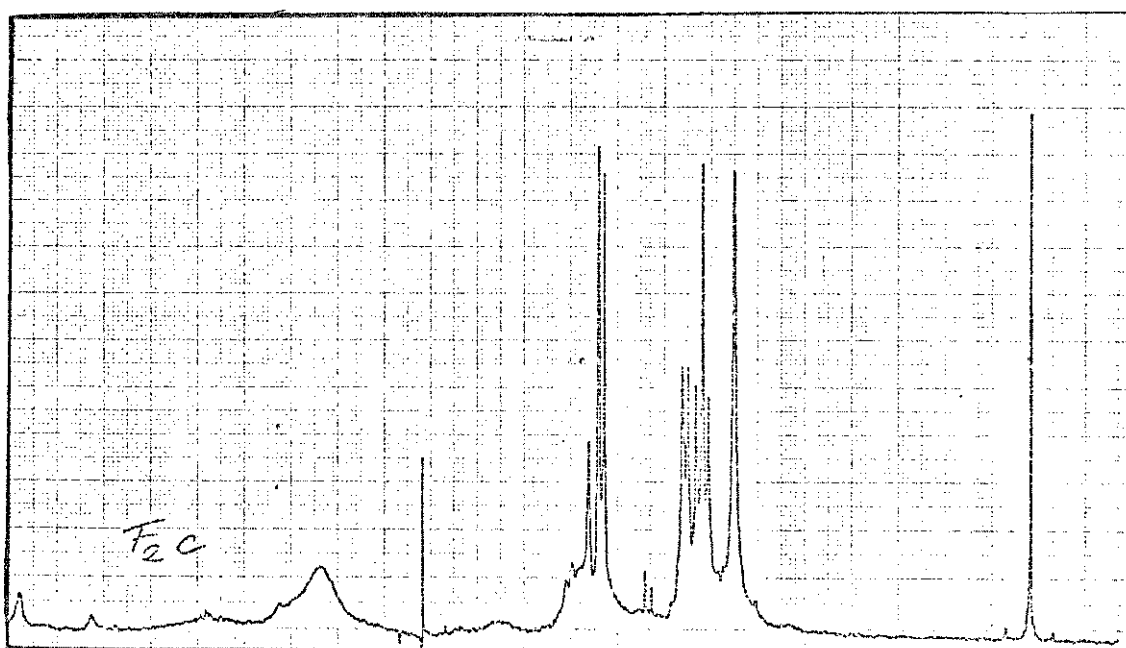


Fig. 11. RMN de ^1H a 400 MHz de scutianina H com dupla irradiação a δ 1,8 (F_{2c}) em $\text{CDCl}_3 + \text{D}_2\text{O}$.

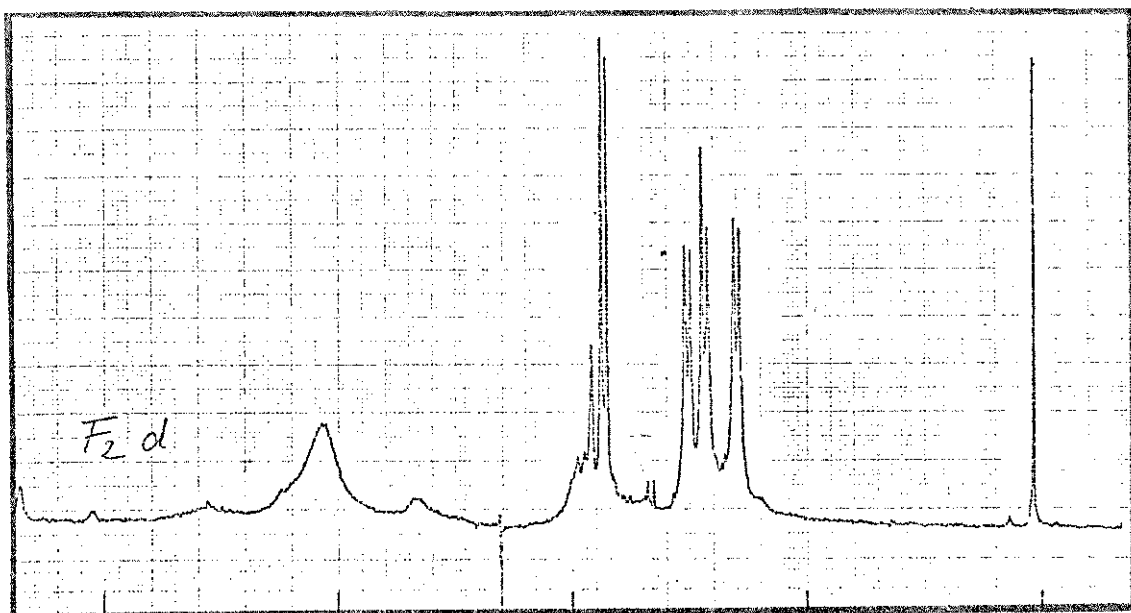


Fig. 12. RMN de ^1H a 400 MHz de scutianina H com dupla irradiação a δ 1,26 (F_2d) em $\text{CDCl}_3 + \text{D}_2\text{O}$.

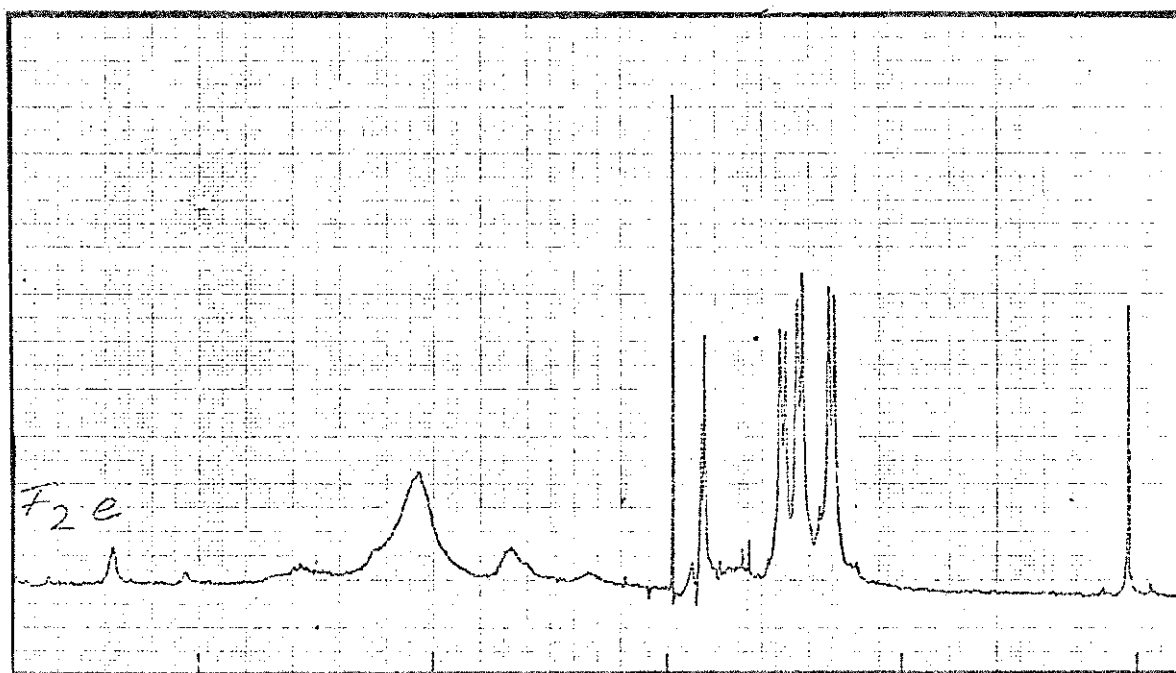


Fig. 13. RMN de ^1H a 400 MHz de scutianina H com dupla irradiação a δ 1,52 (F_2c) em $\text{CDCl}_3 + \text{D}_2\text{O}$.

te a δ 4,45 desaparecesse completamente, permitindo, desta maneira, assinalar os dois prótons metínicos (α e β) da unidade β -hidroxi-leucina (figura 14).

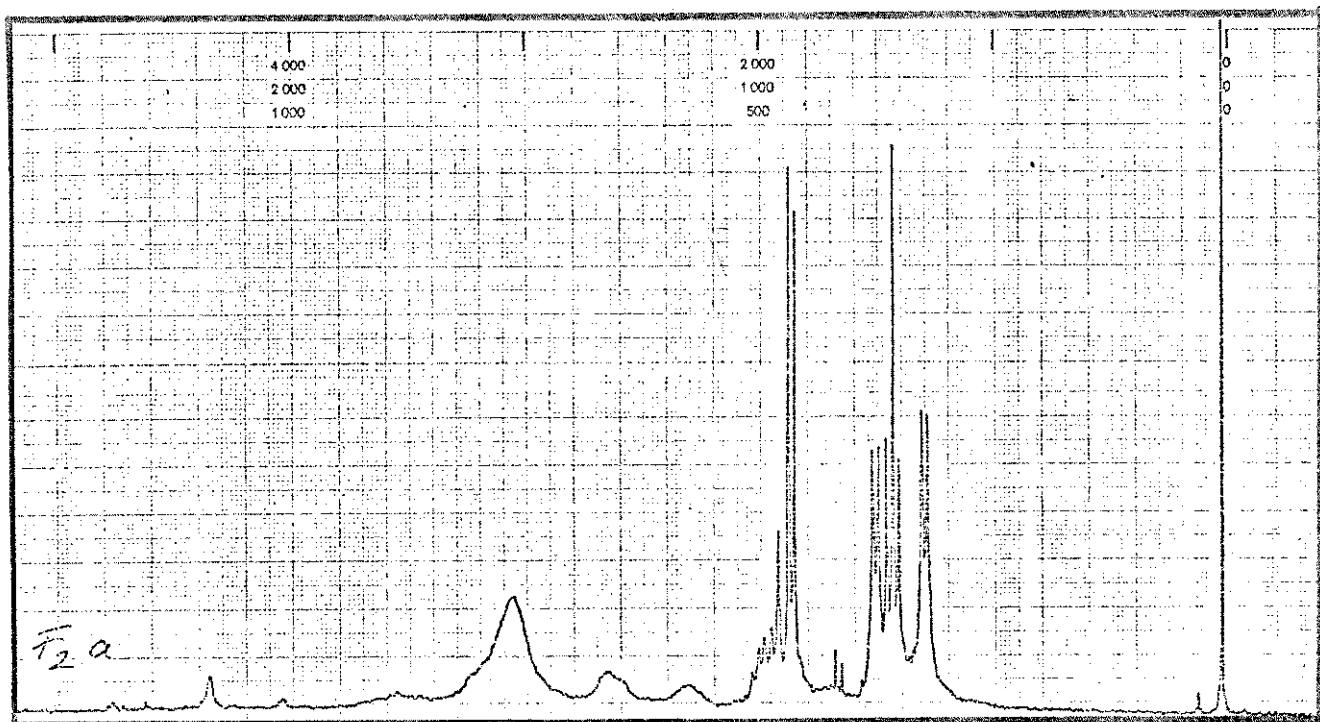
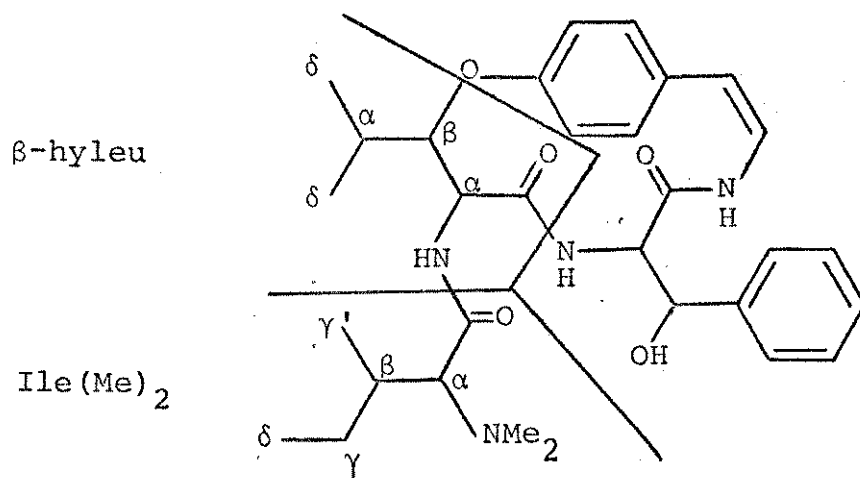


Fig. 14. RMN de ^1H a 400 MHz de scutianina H com dupla irradiação a δ 4,93 (F_2a) em $\text{CDCl}_3 + \text{D}_2\text{O}$.



Esta análise confirmou plenamente nossos resultados anteriores, e a estrutura (44), proposta para o alcalóide scutianina H, foi plenamente confirmada.

Scutianina I(48)

A estrutura deste alcalóide foi possível pela utilização dos métodos físicos usuais (UV, IV, EM e RMN de ^1H), da mesma maneira que para scutianina H.

Os espectros nas regiões UV (fig. 15) e IV (fig. 16) deram as informações características para alcalóides ciclopeptídicos de 14 membros: absorção aromática terminal e bandas correspondentes a NH e CO.

O espectro de ressonância magnética protônica a 100 MHz em CDCl_3 (figura 17) permitiu apenas identificar os sinais dos grupos metilas. O N-N-dimetil-aminoácido aparece como um singlete a δ 2,1, e os dois metilas do grupo isopropila do β -hidroxiaminoácido, como dois singletes a δ 0,95 ($J = 6$ Hz) e a δ 1,2 ($J = 6$ Hz).

A interpretação do espectro de massa de baixa resolução (fig. 18) mostrou um íon molecular a m/e 584, sugerindo $\text{C}_{34}\text{H}_{40}\text{N}_4\text{O}_5$ como fórmula molecular para scutianina I(48).

A fragmentação do espectro de massa deste alcalóide é típica para alcalóides peptídicos de 14 membros (esquema 3). O pico base a m/e 148 (a) revela N-N-dimetil-fenilalanina como aminoácido básico terminal.

Os fragmentos a m/e 135 (i) e m/e 97 (m) se originam, respectivamente, das unidades hidroxiestirilamina e hidroxiaminoácido. O fragmento a m/e 106 e os íons a m/e 105 e 107 sugerem β -fenilserina como unidade α -aminoácido do anel, e os demais fragmentos,

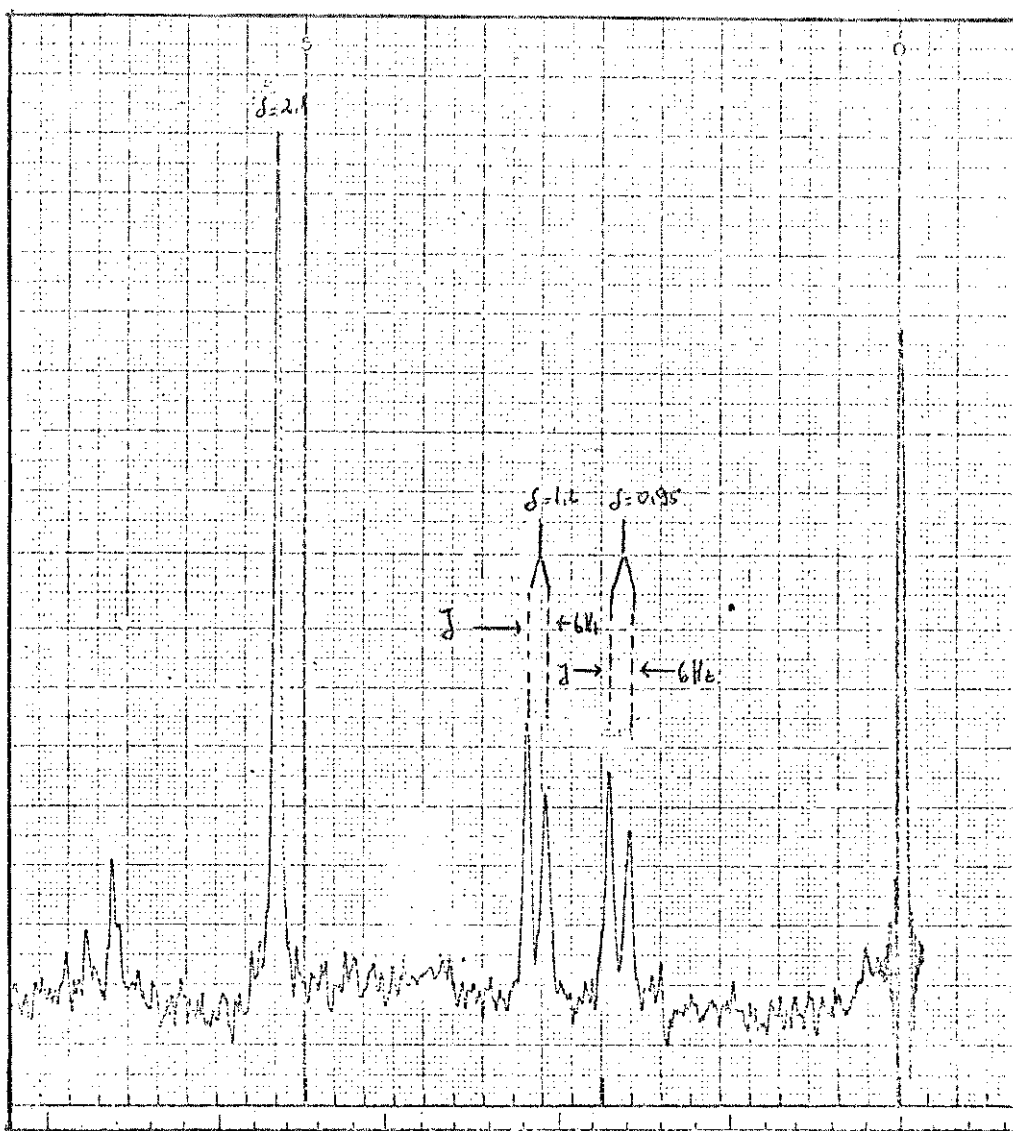
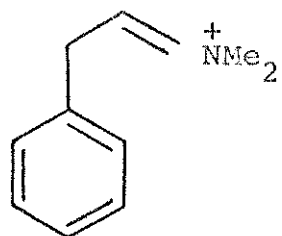


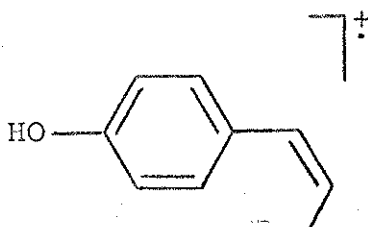
Fig. 17. RMN de ^1H a 100 MHz de scutianina I (região das metilas) em CDCl_3 .

que permitem tirar algumas conclusões com relação à estrutura do composto, são encontrados na tabela XII.

Baseando-se nas análises de todos os dados físicos mencionados, principalmente o espectro de massa que é o mais informativo, estabeleceu-se a estrutura (48) para a scutianina I, que por comparação de seu R_f com os alcalóides (40) (42) e seus dados de Ponto de Fusão e rotação ótica, confirmou ser um outro diastereoisômero de (39), (41) e (42).



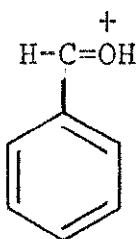
a, m/e 148



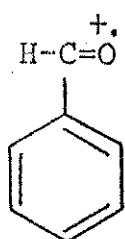
i, m/e 135



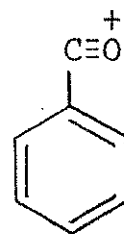
m, m/e 97



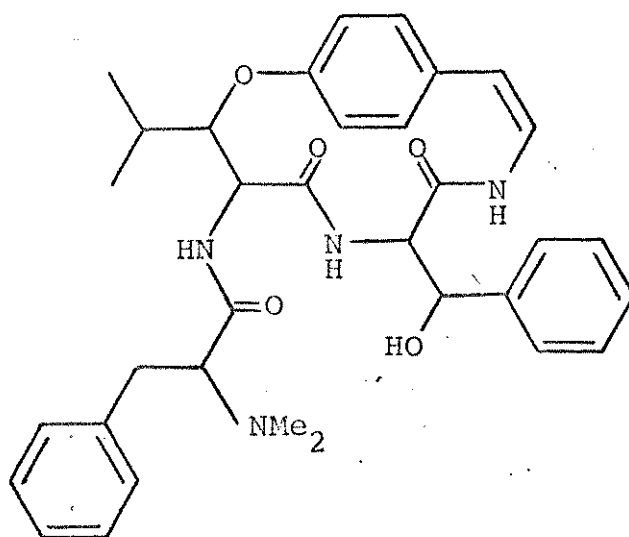
m/e 107



m/e 106



m/e 105



(48) Scutianina I

Não foi feito um estudo da estereoquímica das unidades assimétricas deste alcalóide, mas a semelhança do espectro de RMN de ^1H , região dos metilas, com (39), sugere a forma eritro para a unidade β -hidroxileucina de (48).

Scutianina B(37)

A estrutura deste alcalóide foi confirmada por comparação em CCD com uma amostra autêntica (38).

O espectro de absorção no IV (fig. 19), apresentou bandas características para ciclopeptídeos de 14 membros, enquanto que o espectro de massa de baixa resolução (fig. 20) não apresentou íon molecular, mas sim alguns fragmentos bem característicos, como o fragmento a m/e 148 (100%) revelando N-N-dimetil-fenilalanina como aminoácido básico terminal e o fragmento a m/e 135 que se origina da unidade hidroxiestirilamina. Outros fragmentos característicos deste tipo de alcalóide estão relacionados na tabela IX.

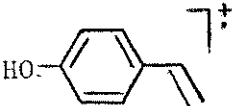

Scutianina C(38)

Os espectros UV (fig. 21) e IV (fig. 22) deste alcalóide deram as informações características para ciclopeptídeos de 14 membros: absorção aromática terminal e presença de bandas de NH e CO.

A análise da fragmentação fornecida pelo espectro de massa de baixa resolução (fig. 23) e a comparação em CCD com uma amostra autêntica (18), confirmaram o alcalóide como sendo scutianina C(38).

A tabela X apresenta uma relação dos principais fragmentos, revelados pela análise do espectro de massa de baixa resolução, de (38).

Tabela IX

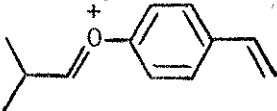
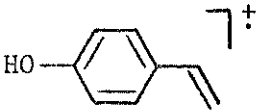
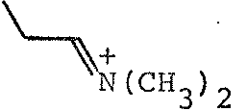
Íon	Fórmula	m/e	Intensidade relativa
a	$C_{10}H_{14}N$	148	100
b	$C_{27}H_{33}N_4O_4$	477	22,36
c	$C_{21}H_{24}N_2O_2$	337	2,63
f	$C_{12}H_{15}NO$	190	22,3
i	C_8H_9NO	135	6,5
	C_8H_8O	120	7,8
m	C_6H_9O	97	1,3
	C_7H_7	91	2,8

Scutianinas D(39) e E(41)

Estas duas bases constituíram-se nos principais produtos isolados da casca do tronco de Scutia buxifolia Reiss.

Os espectros de UV (figuras 24 e 28) e IV (figuras 25 e 29) deram as informações características da natureza peptídica destes alcalóides: absorção aromática final e presença de bandas para NH e CO.

Tabela X

Íon	Fórmula	m/e	Intensidade relativa
a	$C_7H_{16}N$	114	100
M^+	$C_{31}H_{42}N_4O_4$	534	1,33
b	$C_{27}H_{33}N_4O_4$	477	3,33
J	$C_{23}H_{26}N_2O_3$	378	0,86
h	$C_{18}H_{16}N_2O_3$	308	0,47
k	$C_{15}H_{18}NO_2$	244	0,75
L	$C_{14}H_{18}NO$	216	2,08
c	$C_{10}H_{15}N_2O_2$	195	1,16
f	$C_{12}H_{16}NO$	190	
	$C_{12}H_{14}O^+$	175	1,0
d	$C_9H_{13}N_2O$	167	1,02
i	C_8H_9NO	135	19,16
	$C_8H_8O^+$	120	20,8
m	C_6H_9O	97	27,7
	$C_5H_{12}N^+$	86	30,5

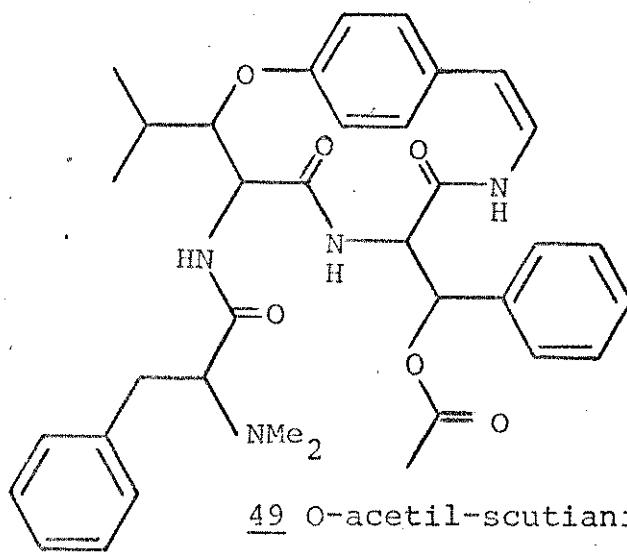
A análise dos espectros de RMN de ^1H em CDCl_3 , a 100 MHz de (39) e (41) (figuras 26 e 30) permitiram estabelecer os sinais dos grupos metilas, entretanto não foi possível uma análise completa do resto do espectro, devido à complexidade dos sinais (tabela XI). Estes dados de RMN de ^1H , em adição aos dados de pontos de fusão e rotações óticas, que estão de acôrdo com os dados obtidos por R. Tschesche⁽¹⁷⁾, nos permitiram confirmar estas duas bases como scutianina D(39) e scutianina E(41)

Por acetilação de 39 se obteve um acetato cristalino (49) de ponto de fusão definido, ao contrario do acetato correspondente obtido por R. Tschesche⁽¹⁷⁾ que é amorfo. O poder rotatório deste acetato está em concordância com a literatura mencionada.

O acetato derivado de 41, O-acetil scutianina E(50), apresentou uma rotação ótica igualmente em concordância com a literatura⁽¹⁷⁾, mas de ponto de fusão marcadamente diferente.

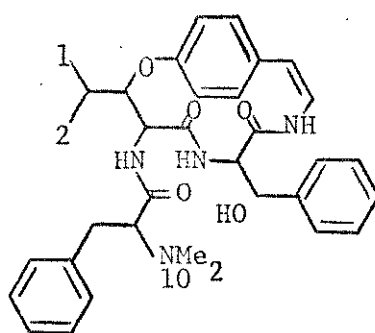
O acetato de E(50) por nós isolado forneceu um espectro de massa (fig. 33) de acôrdo com sua estrutura (m/e 626 (M^+) correspondendo a fórmula $\text{C}_{30}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_6$).

Ambos acetatos foram analisados por RMN de ^{13}C como é explicado no capítulo 3.



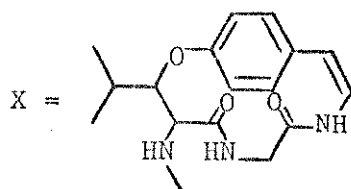
O íon molecular M^+ m/e 584 permitiu atribuir a (39) e a (41) a fórmula comum $C_{34}H_{40}N_4O_5$, e o pico base a m/e 148 confirma a unidade N-N-dimetil-fenilalanina como fragmento básico terminal. Os fragmentos a m/e 135 e 97 são originados das unidades hidroxiestirilamina e hidroxiaminoácido respectivamente, e os fragmentos a m/e 107, 106 e 105 confirmam a unidade β -fenilserina como aminoácido do anel, (tabela XII).

Tabela XI



Próton	D		E	
	δ	J	δ	J
1	0,98	d, 6	1,11	d, 6
2	1,24	d, 6	1,11	d, 6
10	2,23	s	2,24	s

Tabela XII



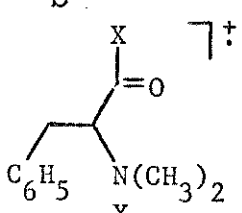
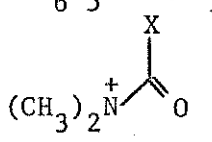
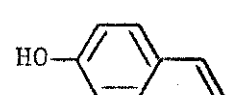
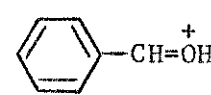
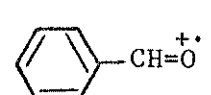
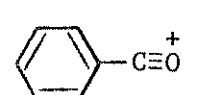
Íon	Fórmula	m/e	Intensidade relativa		
			(39)	(41)	(48)
a	$C_{10}H_{14}N$	148	100	100	100
M^+	$C_{34}H_{40}N_4O_5$	584	0,02	0,054	0,04
b	$C_{27}H_{33}N_4O_5$	493	4,35	4,05	3,33
	$C_{27}H_{34}N_4O_4$	478	0,7	1,24	0,8
	$C_{20}H_{27}N_4O_4$	387	1,35	1,29	12,7
f	$C_{12}H_{16}NO$	190	0,57	0,97	3,3
i	C_8H_9NO	135	2,14	4,05	8,62
	C_8H_8O	120	0,64	1,54	0,3
	C_7H_7O	107	1,0	3,24	13,7
	C_7H_6O	106	4,57	21,8	74,5
	C_7H_5O	105	4,78	20,5	74,0
m	C_6H_9O	97	1,14	2,7	3,3

Tabela XII (continuação)

Íon	Fórmula	m/e	Intensidade relativa		
			(39)	(41)	(48)
+	C_7H_7	91	2,42	5,1	10,0
$C_6H_5^+$	C_6H_5	77	4,14	18,37	78,4

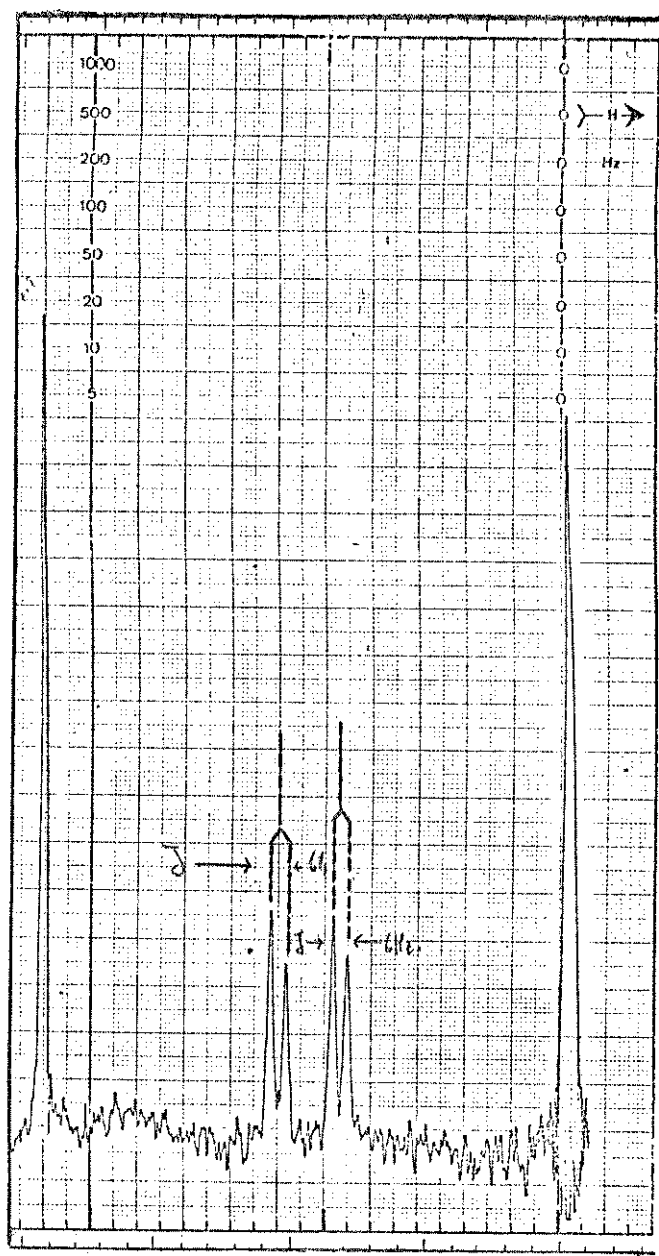


Fig. 26. RMN de 1H a 100 MHz de scutianina D (região das metilas) em $CDCl_3$.

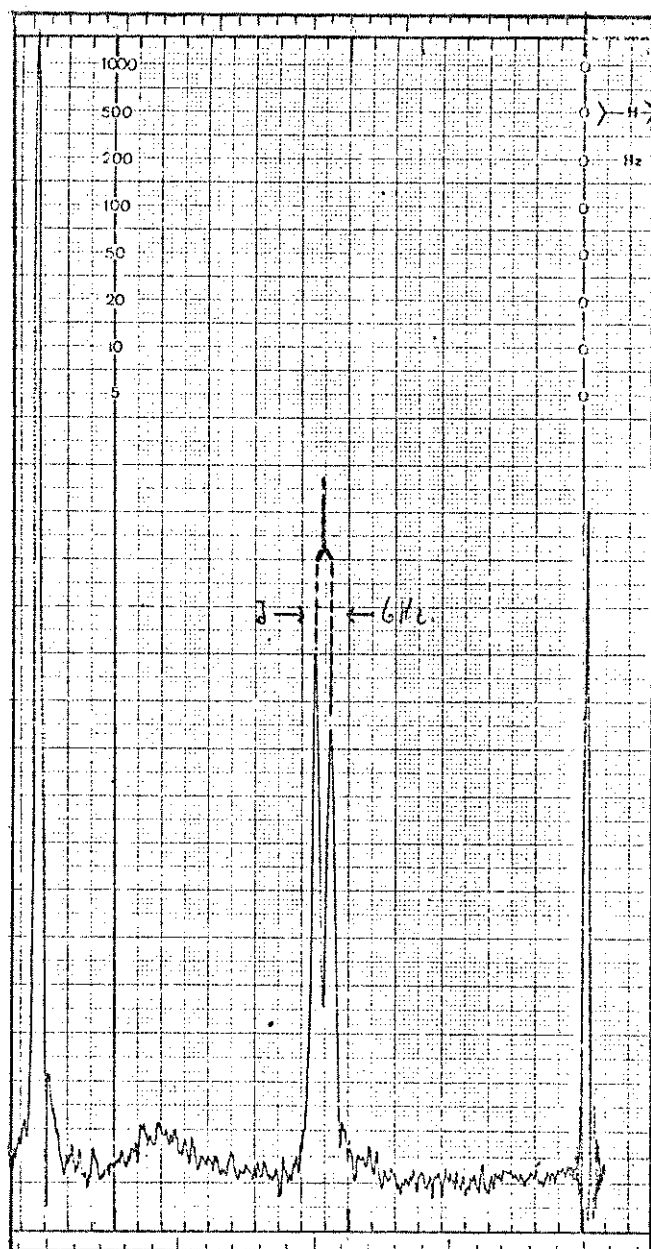
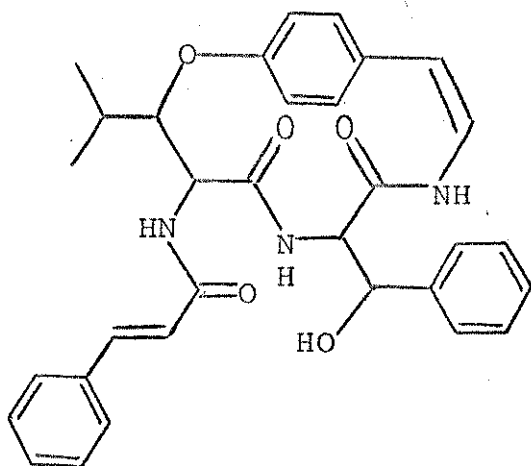


Fig. 30. RMN de 1H a 100 MHz de scutianina E (região das metilas) em $CDCl_3$.

Scutianeno C(40)

Das últimas frações da coluna cromatográfica, foi isolado um produto cristalino, que por suas características espectroscópicas, UV (fig. 34) e IV (fig. 35), pensou-se que poderia corresponder a um dos produtos neutros, previamente isolados da *S. buxifolia*^(15,65) e denominados de Scutianenos C e D⁽⁴⁰⁾.

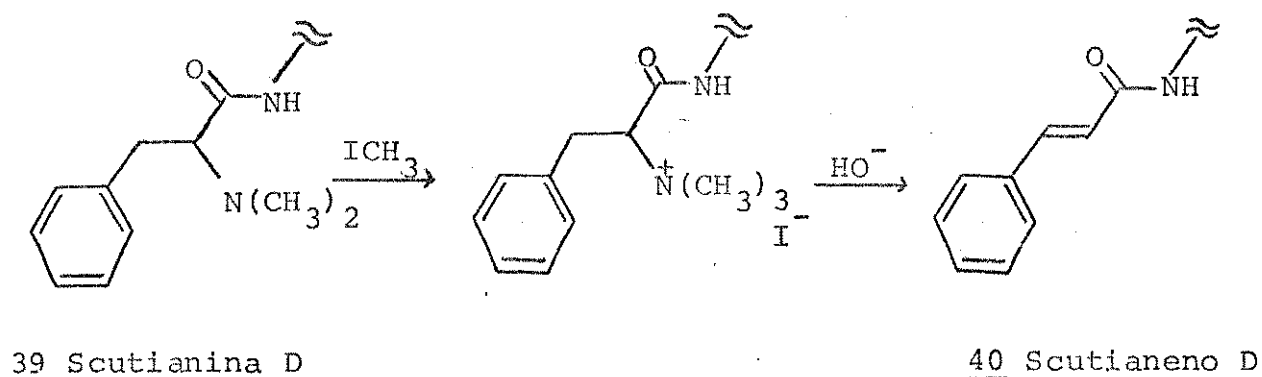


40 Scutianenos C e D

Ainda que as estruturas propostas para ambos Scutianenos fossem as mesmas, suas diferentes propriedades físicas (R_f em CCD, rotação ótica e ponto de fusão) indicaram que, evidentemente, eram produtos diastereoisômeros. A comparação direta do produto isolado por nós permitiu confirmar que se tratava, com efeito, de Scutianeno C.

A comparação dos espectros de RMN de ^1H dos Scutianenos⁽⁶⁵⁾, mostrou que existia uma diferença muito sugestiva entre sinais correspondentes aos carbonos α e β da unidade β -hidroxileucina, entre tanto, os valores para Scutianina D e Scutianeno D eram muito semelhantes, significando que, em ambos produtos, a configuração da unidade β -hidroxileucina é a mesma.

Os resultados obtidos por RMN de ^1H foram confirmados pela transformação de Scutianina D (39) em Scutianeno D, através de uma reação de degradação de Hofmann.



O produto desta reação foi identificado, por comparação em CCD, como Scutianeno D, confirmando deste modo os dados obtidos por RMN de ^1H .

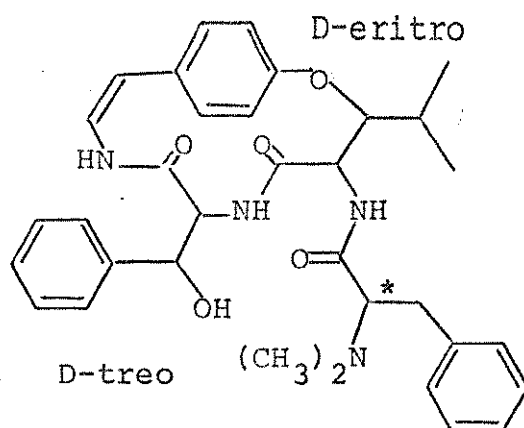
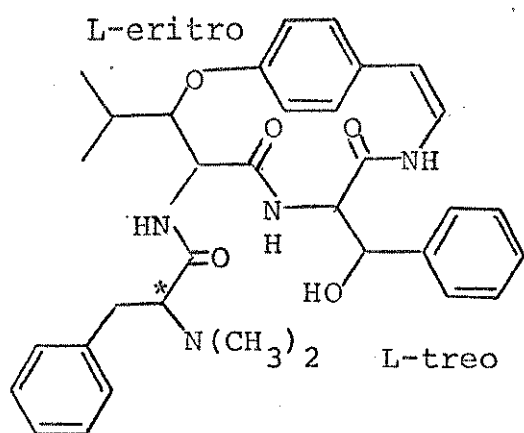
Estas comparações permitiram resolver o problema da estereoquímica para Scutianeno D, entretanto a estereoquímica do Scutianeno C ficou ainda sem solução.

A tentativa, por nós realizada, de correlacionar Scutianeno C com Scutianina E, através de uma reação de degradação de Hofmann⁽⁶⁷⁾ conforme é descrito na parte experimental, não trouxe nenhuma contribuição para este problema, já que o scutianeno produto da reação e Scutianeno C, eram diferentes em CCD. Este resultado, entretanto, já era esperado, desde que a estereoquímica dos alcalóides (39) e (41) estivesse plenamente correta.

Se (39) e (41) são diastereoisômeros, a configuração da unidade de N,N-dimetil-fenilalanina deve ser a mesma em ambos alcalóides, portanto, seus scutianenos, produtos de uma reação de degradação

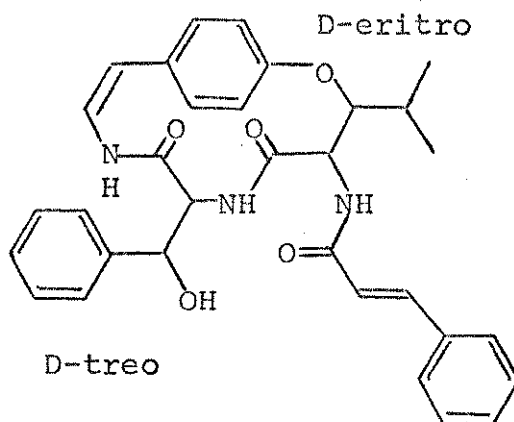
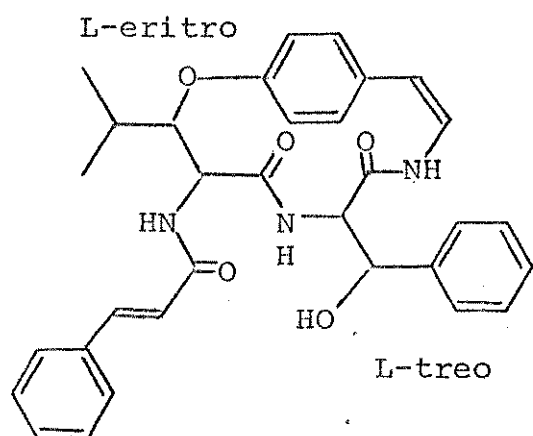
de Hofmann, devem ser enantiômeros, isto é, com o mesmo Rf em CCD e os valores da rotação ótica iguais em valor absoluto, mas de sinais contrários.

Possivelmente então, Scutianeno C esteja relacionado com um dos outros dois diastereoisômeros de (39) e (41) conhecidos: Scutianina G (43) e Scutianina I (48). Não foi possível realizarmos um estudo incluindo estes dois alcalóides, já que o primeiro não



diastereoisômeros

se * = *



enantiômeros

Scutianeno X

foi por nós isolado, enquanto que o segundo foi isolado, porém, em pequena quantidade.

2.2. Alcalóides ciclopeptídicos da casca da raiz de *Discária febrifuga* Mart

Com o objetivo de aplicar, ao menos em parte, a experiência adquirida no estudo dos alcalóides isolados de *Scutia buxifolia* a outros membros desta classe de produtos naturais, decidimos analisar a casca da raiz de *Discária febrifuga* Mart, planta também pertencente à família Rhamnaceae e da qual não existem estudos prévios registrados na literatura.

Descrição botânica: A *Discária febrifuga* Mart é um sub-arbusto pertencente à família das Rhamnaceas, que cresce, principalmente, na região "fronteira" do RS, e em países vizinhos como Uruguai e Argentina. Uma descrição botânica mais detalhada foi realizada por Reisser, S. (68).

Em uma análise preliminar da mistura de alcalóides, obtida como se descreve na parte experimental, pudemos detectar a presença de pelo menos cinco componentes principais, com Rf muito próximos. Usando-se uma coluna cromatográfica com Sílica H como suporte, semelhante ao que foi descrito para isolar os alcalóides de *S. buxifolia*, isolou-se os cinco alcalóides, sendo que um deles foi identificado como discarina B (52), composto previamente isolado de *Discária longispina* (30) e um outro alcalóide, que por não estar totalmente identificado, foi denominado discarina X.

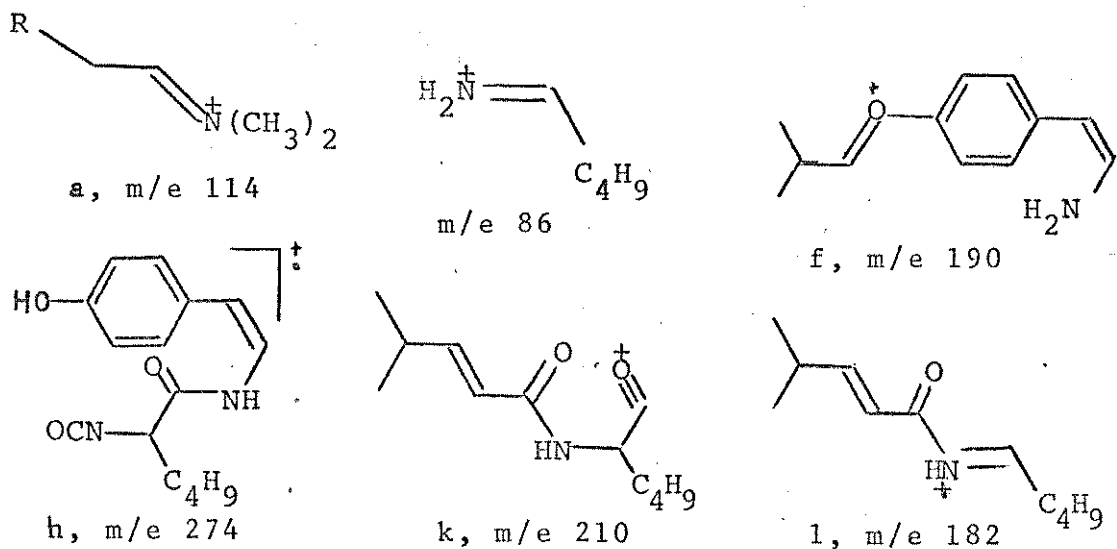
Discarina X(51)

É um sólido cristalino e homogêneo por CCD (três sistemas de

solventes) com espectro de UV (fig. 37) típico de alcalóides ciclopeptídicos de 14 membros, isto é, tem apenas absorção aromática terminal, e as bandas a 3280 e a 1640 cm^{-1} no espectro IV (fig. 38), atribuídas aos grupos NH e CO, confirmam que discarina X é um alcalóide ciclopeptídico.

O espectro de massa de baixa resolução (fig. 40) mostrou a presença de um íon molecular (M^+) a m/e 550, sugerindo a fórmula molecular $C_{28}H_{44}N_4O_4$ para discarina X.

O fragmento iônico a m/e 114, pico base do espectro, corresponde ao fragmento N-N-dimetilado leucina ou isoleucina, e o fragmento amina a m/e 86 indica leucina ou isoleucina como aminoácido simples ligado ao anel. Os íons a m/e 190 (f), m/e 274 (h), indicam que a P-hidroxiestirilamina é ligada com ambos; β -hidroxileucina e o aminoácido simples do anel (leucina ou isoleucina), e em adição, o íon a m/e 210 (k) e m/e 182 (l) provam que estes dois aminoácidos estão ligados entre si, estabelecendo a presença do anel de 14 membros.



Os demais fragmentos, que poderão fornecer algumas indicações na elucidação da estrutura da discarina X, são encontrados na tabela XIII.

A análise da região alifática do espectro de RMN de 1H a 100

MHz em $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$ (fig. 39) nos indicou a presença de vários sinais característicos para grupos metilas entre δ 0,6 - 1,05 difíceis de serem atribuídos. O sinal a δ 1,28 (d, 6 Hz) separado do resto das metilas, como já havíamos observado para Scutianina H (43), foi útil para estabelecer a presença da unidade β -hidroxileucina em discarina X.

Os valores de deslocamentos químicos para os carbonos α e β da unidade β -hidroxileucina, a δ 4,5 (dd, 10 e 8 Hz) e 5,0 (dd, 8 e 2 Hz) respectivamente, permitiram atribuir, em comparação com os dados da literatura já mencionados (18,38), a configuração eritro para esta unidade.

O singlete a δ 2,28 (6H) foi atribuído ao grupo N-N-dimetila do resíduo terminal.

A análise de todos os resultados obtidos, associados com os dados de RMN de ^{13}C discutidos no próximo capítulo, nos permitiram estabelecer a estrutura (51) para a discarina X.

Discarina B (52)

Este alcalóide foi identificado por comparação (PF, poder rotatório, CCD) com uma amostra autêntica (30).

O espectro UV (fig. 41) deste alcalóide apresenta uma absorção acima de 270 nm coincidente em máximo e mínimo com o espectro de indóis, como no alcalóide americana (24). No espectro IV (fig. 42) observam-se as bandas características dos alcalóides peptídicos: bandas para NH e CO, evidenciando desta maneira o ciclo de 14 membros.

O espectro de massa de baixa resolução (fig. 40) de discarina B mostrou a presença de um ion molecular (M^+) a m/e 573, correspon

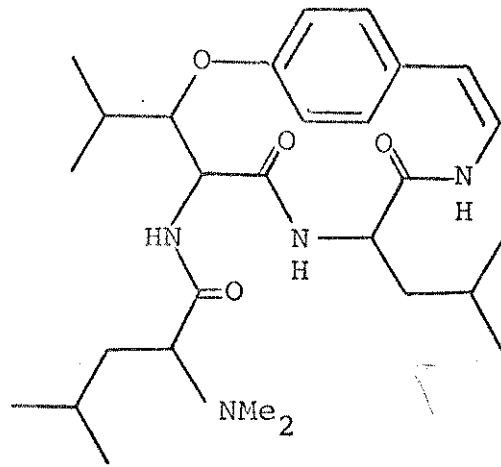
Tabela XIII

Íon	Fórmula	m/e	Intensidade relativa
a	$C_7H_{16}N$	114	1,00
M^+	$C_{28}H_{44}N_4O_4$	550	0,09
$M^+ - CH_3$	$C_{27}H_{41}N_4O_4$	485	0,18
h	$C_{15}H_{16}N_2O_3$	274	0,5
k	$C_{12}H_{20}NO_2$	210	0,15
f	$C_{12}H_{11}NO$	190	0,55
l	$C_{11}H_{11}NO_2$	182	0,56
i	C_8H_9NO	135	2,27
m	C_6H_9O	97	3,40
$H_2N^+ = C_4H_9$	$C_5H_{12}N$	86	2,5
$\text{---}N^+(CH_3)_2$ H	$C_4H_{10}N$	72	3,0

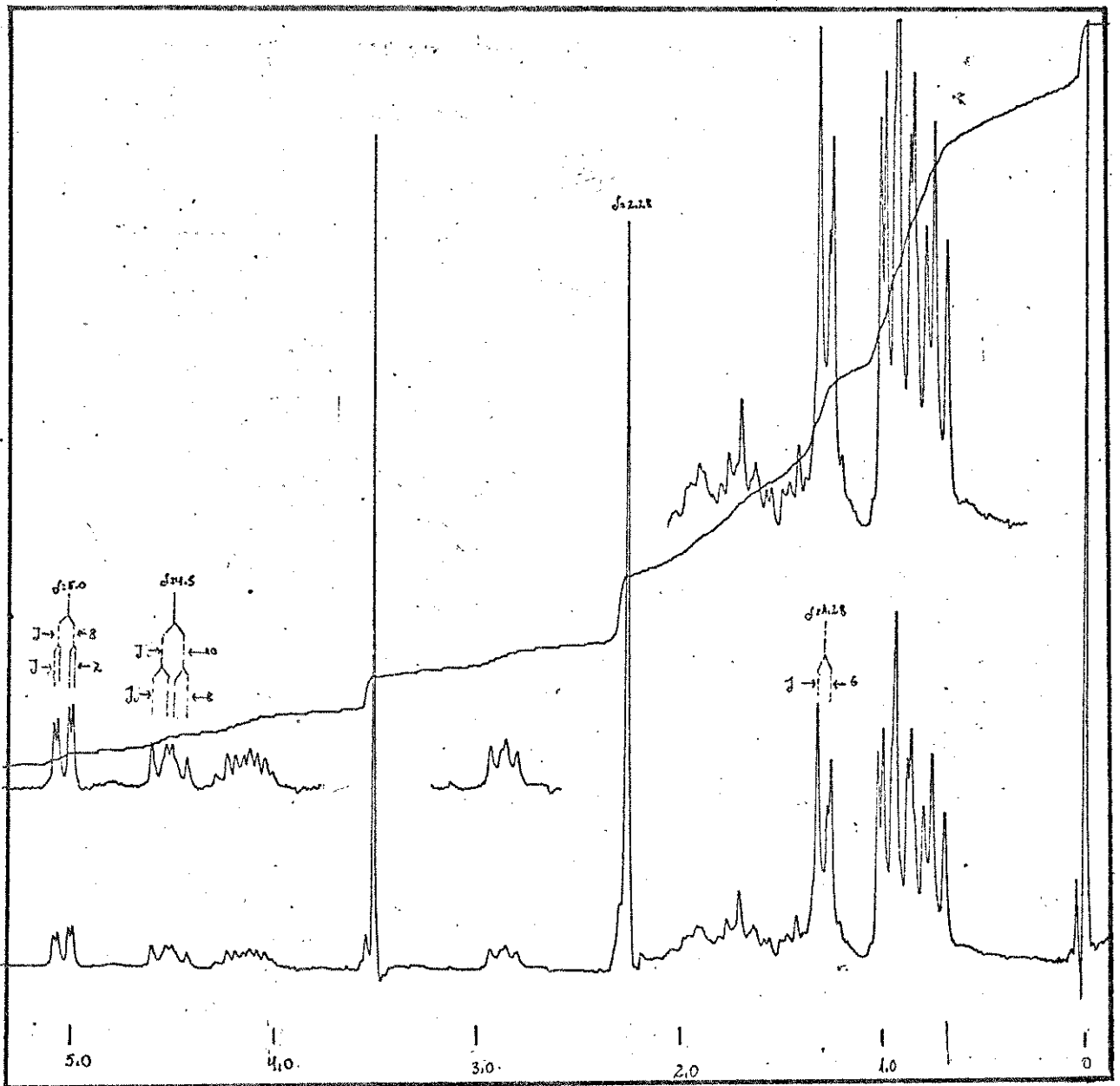
dendo a fórmula $C_{33}H_{43}N_5O_4$, cuja estrutura (52) foi proposta⁽¹¹⁾.

O fragmento iônico a m/e 114, pico base do espectro, corresponde a unidade N-N-dimetil-isoleucina.

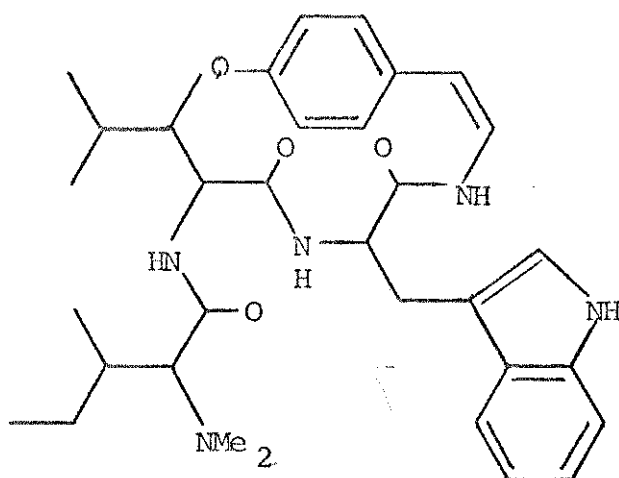
Três outras bases foram isoladas e purificadas (d-y, d-v e d-z) da mesma maneira descrita para os alcalóides anteriores. Como os dados obtidos (PF e espectro de massa) eram insuficientes para se propor uma possível estrutura para estas bases, as mesmas apenas serão citadas neste trabalho, porém, futuramente, pensamos realizar um estudo completo com a finalidade de elucidar suas es-



51 - Discarina-X

Fig. 39. RMN de ^1H a 100 MHz de discarina X em $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$.

truturas corretamente.



52 - Discarina B

2.3. Síntese de substâncias de referências

Síntese de N-N-dimetil aminoácidos

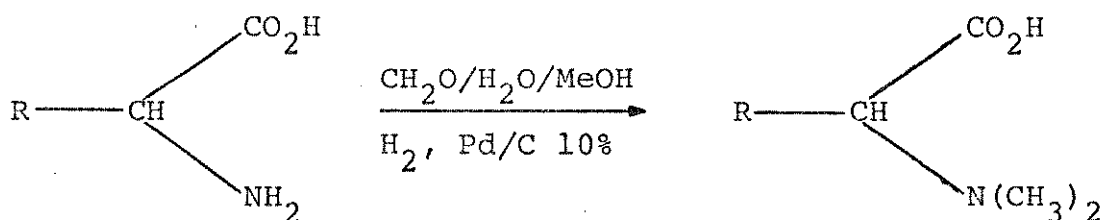
N-N-dimetil-L-isoleucina

N-N-dimetil-L-leucina

N-N-dimetil norleucina

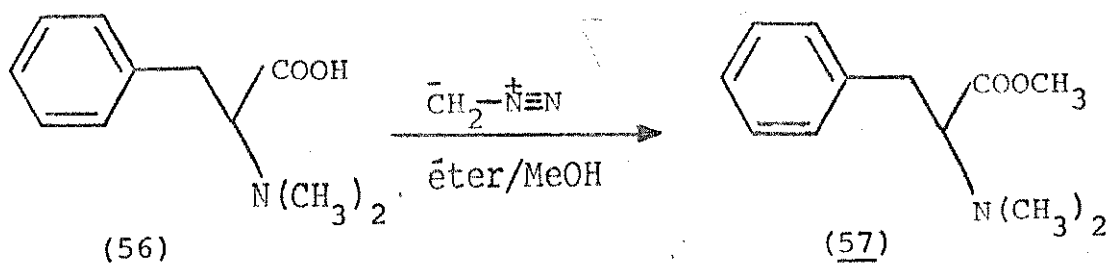
N-N-dimetil-D-L-fenilalanina

Estes derivados N-N-dimetilados foram preparados por metilação redutiva dos correspondentes aminoácidos, segundo um procedimento geral descrito por Bowman e Strond⁽⁸¹⁾. Pela reação do aminoácido com formaldeído, em presença de hidrogênio e catalizador, obteve-se bom rendimento do produto N-N-dimetil derivado. A identidade de cada um destes compostos foi provada por métodos físicos (PF, RMN de ^1H e espectros de massa).



Síntese de N-N-dimetil-D-L-fenilalanina metil éster

Esterificação: A esterificação de N-N-dimetil-D-L-fenilalanina (56) com diazometano⁽⁸²⁾ resultou, com muito bom rendimento, no éster correspondente (57), o que foi confirmado pelo seu espectro IV (fig. 55) e por RMN de ^1H a 60 MHz (fig. 56).



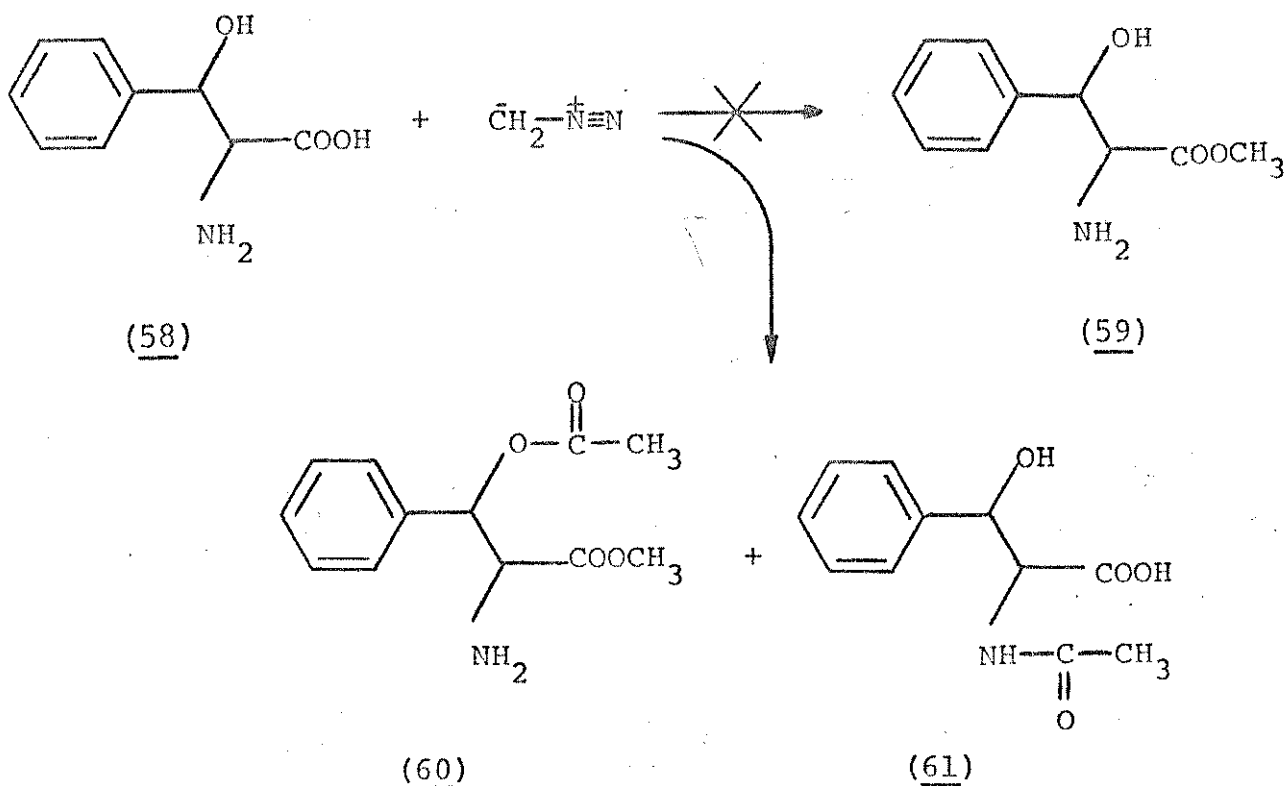
β -fenil serina metil éster (59)

Esterificação: A esterificação de aminoácidos pelo método do sulfito de metila e metanol saturado com ácido clorídrico gasoso⁽⁸³⁾ não deu bons resultados com β -fenil serina (58). O produto desta reação resultou em uma mistura de vários produtos, de Rf muito próximos em CCD e difíceis de serem purificados, tanto por cromatografia em coluna como por placas preparativas.

Uma segunda tentativa de esterificação foi realizada, agora através de diazometano⁽⁸²⁾, como é descrito na parte experimental. Neste caso, igualmente resultou em mistura de produtos, todos difíceis de serem isolados pelos mesmos métodos cromatográficos anteriores. Pode-se obter através de uma placa preparativa, feita com pequena quantidade da mistura, o isolamento de duas manchas que se encontravam em maior proporção.

O espectro de massa para estes dois produtos (figuras 58 e 59) apresentaram o mesmo íon molecular a m/e 237, mas diferenciavam-se nos demais fragmentos, o que nos fez pensar, embora difícil de ex-

plicar e sem confirmar, tratar-se de dois derivados acetilados: O-acetil- β -fenil serina metil éster (60) e N-acetil- β -fenil serina metil éster (61).



Possivelmente, o espectro de massa da figura 58 corresponde ao produto (60), pois o fragmento a m/e 177 se deve à perda de uma molécula de ácido acético ($M^+ - 60$) (84), possível somente com o derivado O-acetilado.

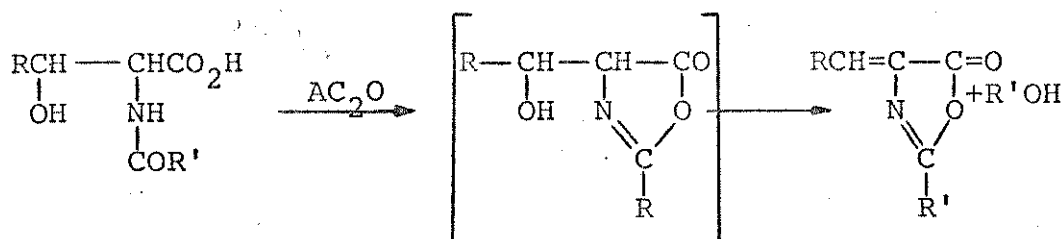
Síntese de O-N-diacetil- β -fenil serina metil éster (63)

A finalidade de se sintetizar o éster da β -fenil serina era de usá-lo como modelo em RMN de ^{13}C com o objetivo de assinalar os carbonos da unidade β -fenil serina dos alcalóides (39) e (41), e posteriormente como produto de partida na síntese de (63).

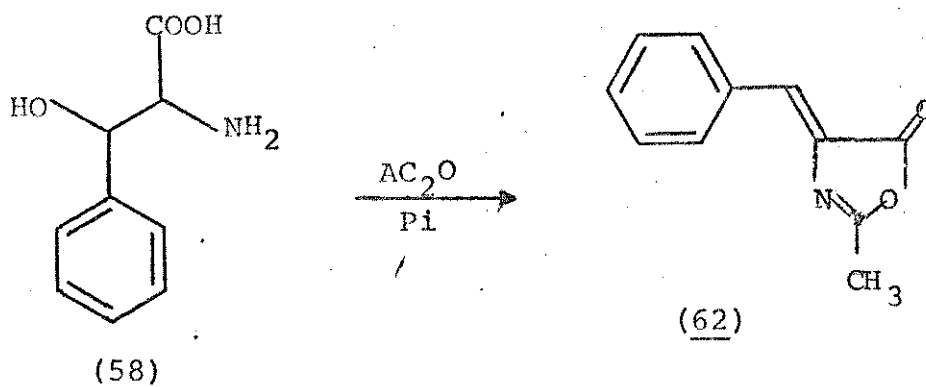
Baseados nos resultados negativos anteriores de obtenção do éster derivado de (58) tentamos uma acetilação das duas funções, álcool e amina, usando piridina e anidrido acético, que servi-

ria para posterior esterificação.

Obteve-se, desta maneira, um produto amarelo cristalino de PF = 142 - 143°. Numa análise de seus espectros (RMN de ^1H - fig. 60 e massa - fig. 61) observamos que o produto obtido desta reação não correspondia ao esperado. Em uma revisão na literatura encontramos que o anidrido acético atua sobre um α -acilamino- β -hidroxi-ácido, produzindo uma azolactona insaturada, em que a primeira etapa da reação seria a conversão do acil derivado na correspondente azolactona saturada⁽⁸⁵⁾. A azolactona saturada possui um hidrogênio α extremamente ativo, que é eliminado com o substituinte β , mesmo em condições brandas.

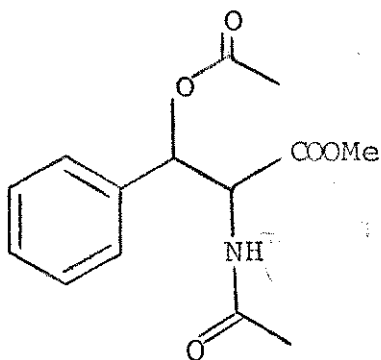


Portanto, o produto da reação de acetilação de (58) em piridina e anidrido acético trata-se de uma azolactona (62), cuja estrutura foi confirmada por métodos físicos (RMN de ^1H , (fig. 60) e espectro de massa (fig. 61)).



Finalmente, a acetilação em piridina e anidrido acético da mistura anteriormente obtida, contendo os produtos 60 e 61, resultou em um produto cristalino de PF = 145°. A análise de seus espectros IV (fig. 62), RMN de ^1H (fig. 63), e espectro de massa

(fig. 64), identificaram o produto como sendo O-N-diacetil- -fenil serina metil éster (63).

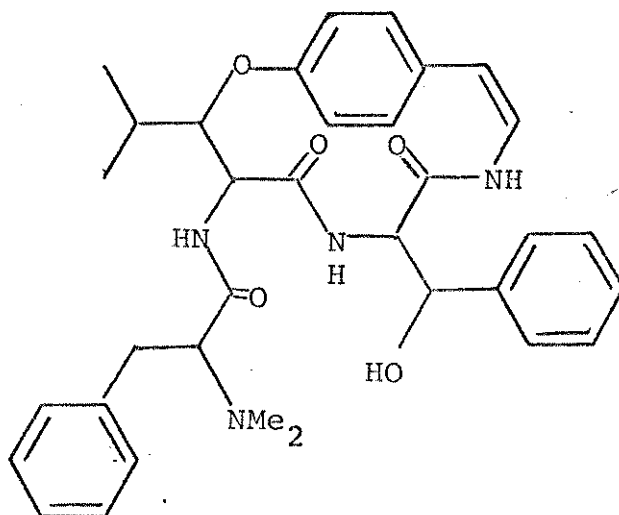


(63)

CAPÍTULO 3

3.1. Alcalóides Peptídicos - RMN de ^{13}C

Como foi mencionado anteriormente, os alcalóides ciclopeptídicos presentes em maior proporção no extrato da casca do tronco da Scutia buxifolia Reiss são Scutianinas D(39) e E(41). Como ambos alcalóides apresentam as configurações de seus fragmentos β -hidroxileucina e β -fenilserina conhecidos, nos pareceu interessante estudá-los por RMN de ^{13}C , com o fim de obter dados que facilitassem a assinalação das configurações dos fragmentos mencionados em outros alcalóides, futuramente.

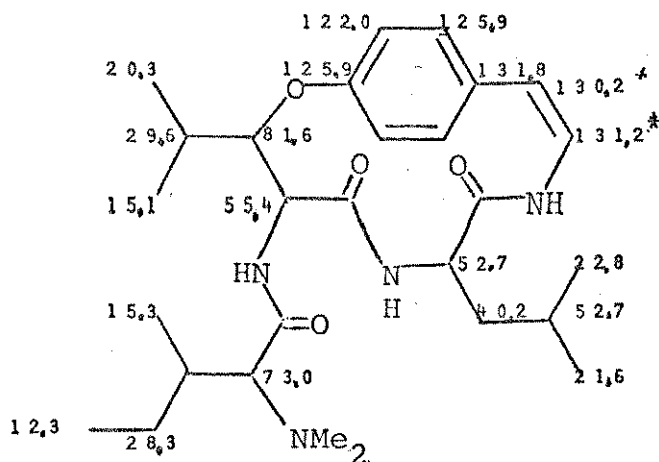


- (39) Scutianina D | L-eritro- β -hidroxileucina - L-treo- β -fenilserina |
 (41) Scutianina E | D-eritro- β -hidroxileucina - D-treo- β -fenilserina |

Existem poucos trabalhos sobre RMN de ^{13}C de alcalóides peptídicos. Em uma publicação recente⁽¹³⁾, com a finalidade de se obter algumas informações sobre a conformação preferida da frangulina, foi realizada uma análise de seu espectro de RMN de ^{13}C em

solução de CDCl_3 , e com quantidades crescentes de CD_3OD .

A atribuição dos sinais deste alcalóide realizada em comparação com valores de δ obtidos na literatura, espectros de FDFE e ir radiações específicas, esta representadas na fórmula (47) abaixo.

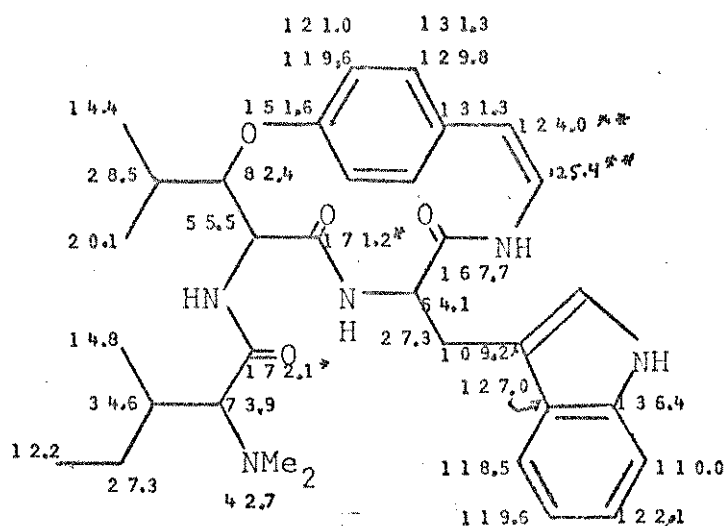


(47) Frangulanina

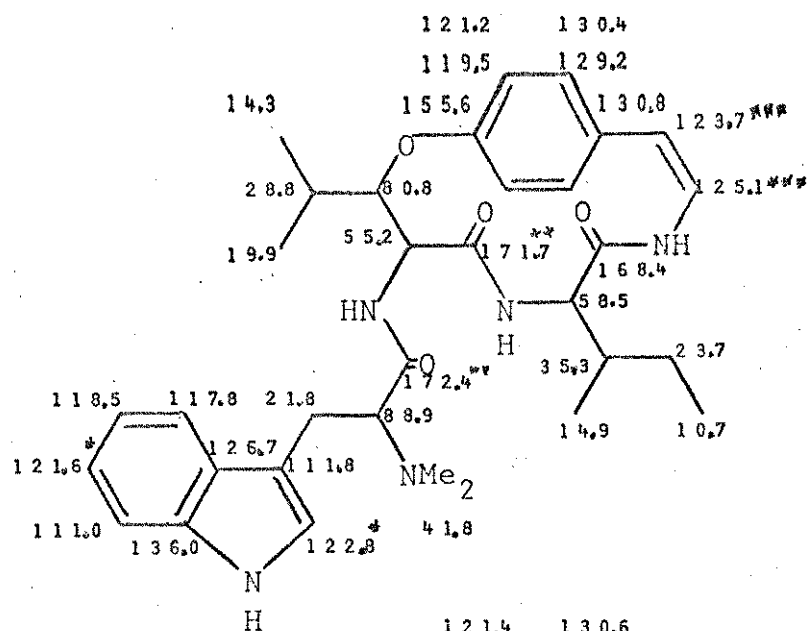
Em um outro trabalho, ainda não publicado⁽¹²⁾, foi realizada uma análise de outros membros desta série de produtos naturais: discarinas A(53) e B(52); lasiodina A(55) e lasiodina B(54) sendo a lasiodina A o único alcalóide não cíclico conhecido.

As atribuições realizadas, baseadas nas análises de modelos especialmente sintetizados e análises de espectros FDFE, mostram que o ciclo produz trocas nos deslocamentos químicos comparados com peptídeos abertos.

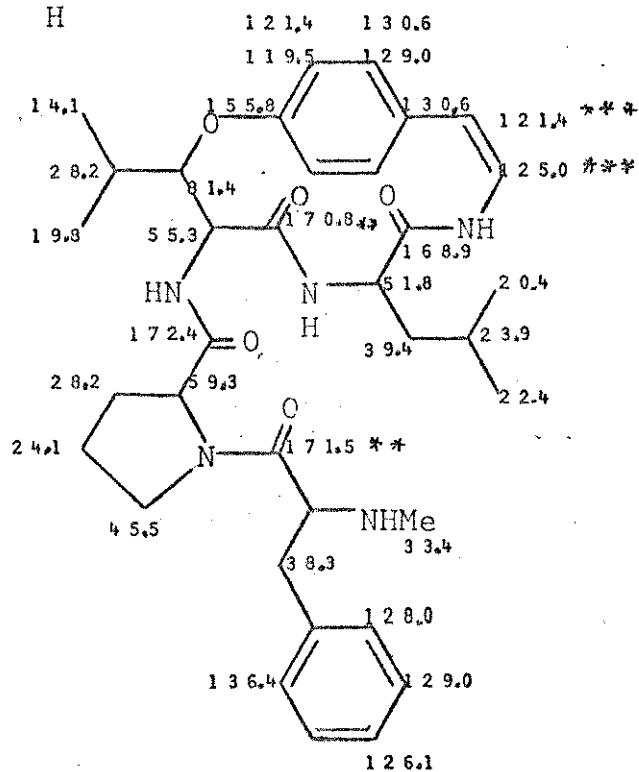
Para a análise dos espectros de RMN de ^{13}C das scutianinas D e E, respectivamente, fixamos nossa atenção, principalmente, nos deslocamentos químicos dos carbonos sp^3 e suas atribuições estão baseadas nos trabalhos já mencionados, nas análises de seus espec-



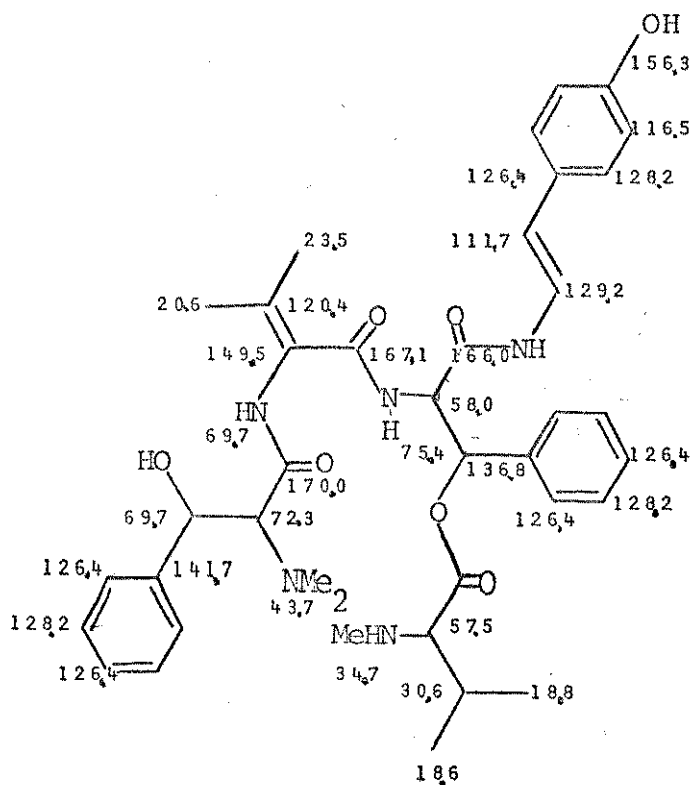
(52) discarina B



(53) discarina A



(54) lasiodina B



(55) Lasiodina A

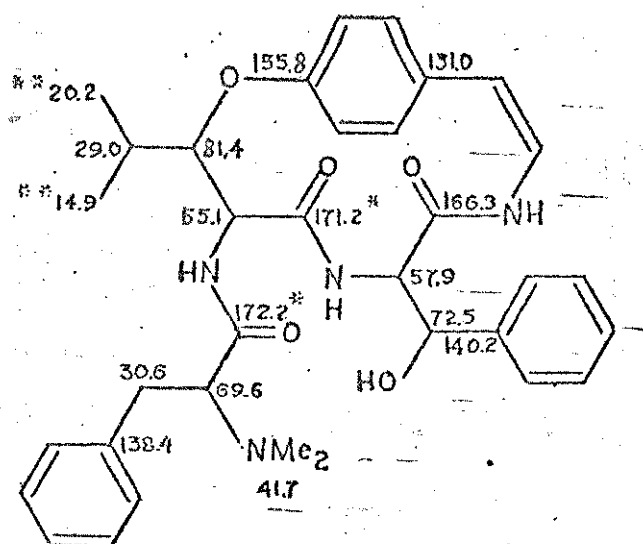
tros de FDFP, e na comparação com modelos sintetizados.

Os deslocamentos químicos dos grupos metilas de (39), suas não equivalências ($\Delta\delta = 5,3$ ppm) e os valores de δ dos carbonos α , β e γ da unidade β -hidroxileucina (figura 65), são coincidentes com os observados em alcalóides semelhantes, como frangulanina (47), discarinas A(52) e B(51) e lasiodina B(53), e desta maneira, facilmente atribuídos. Os carbonos α e β da unidade β -fenilserina e os correspondentes ao resíduo N-N-dimetil-fenilalanina foram atribuídos por comparação com os modelos (57) e (62) (figuras 70 e 71).

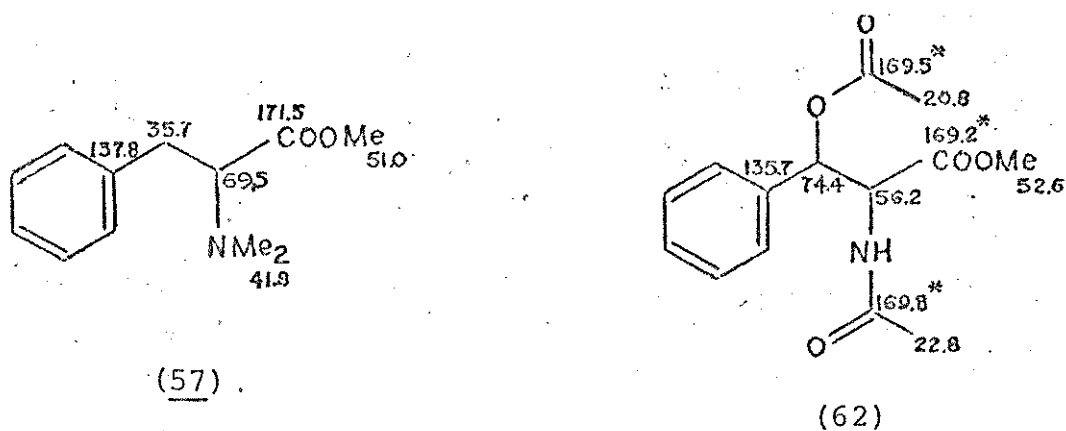
Baseando-se nestas considerações, pode-se observar que todos os carbonos de (39) apresentam valores de δ muito semelhantes aos modelos (57) (62), com exceção do metileno benzílico da unidade fenilalanina. Este carbono apresenta uma clara diferença entre o al

calóide (39) e o modelo (57). Dado que a atribuição do mesmo em (39) é totalmente certa, já que é o único triplete de possível observação no espectro FDFP, pensamos que essa diferença pode ser devida a um efeito γ resultante de uma conformação preferida da unidade N-N-dimetil-fenilalanina em (39).

No espectro RMN de ^{13}C de (41) (figura 66) pode-se observar deslocamentos químicos muito semelhantes a (39), com exceção da unidade β -hidroxileucina.



(39) Scutianina D



(57)

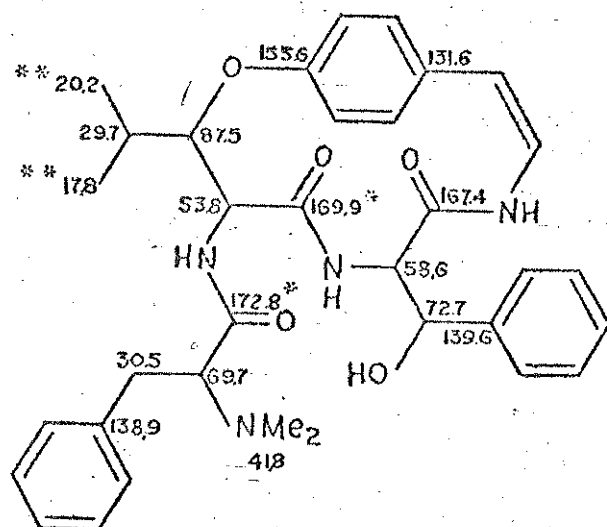
(62)

A diferença entre os metilas ($\Delta\delta = 2,4$ ppm) é menor que em (39), e enquanto o carbono α encontra-se protegido ($\Delta\delta = -1,2$ ppm)

o carbono β é desprotegido ($\Delta\delta = 6,1$ ppm) respectivamente, em relação a (39).

A diferença, em estereoquímica, da unidade β -fenilserina em (39) e (41) não afeta de maneira significativa os deslocamentos químicos dos carbonos α e β .

Os produtos de acetilação de (39) e (41), O-acetil-scutianina D(49) e O-acetil-scutianina E(50), apresentaram efeitos muito pouco pronunciados sobre os carbonos α e β da unidade fenilserina (figuras 67 e 68).



(41) Scutianina E

Esta transformação afeta, como era de se esperar, o carbono aromático não protonado e também, ainda que em menor intensidade um dos grupos carbonila.

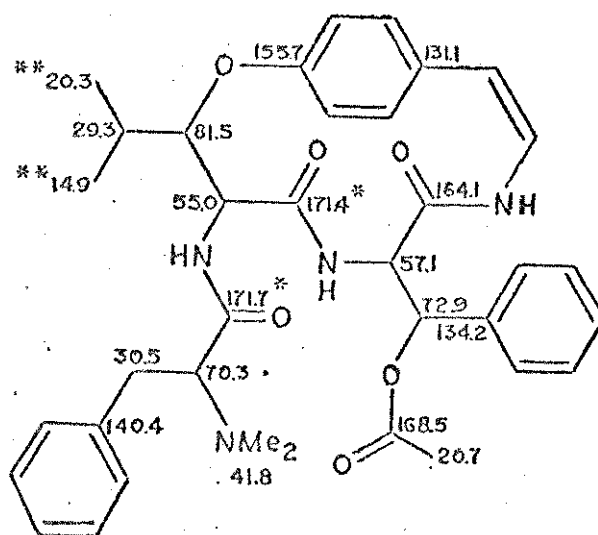
Em O-acetil scutianina E também observam-se efeitos nos carbonos α e β da unidade hidroxileucina.

A clara diferença em deslocamento químico dos carbonos β e o valor de $\Delta\delta$, também diferente dos grupos metilas dos resíduos hidroxileucina em ambos alcalóides, (39) e (41), complementam os da-

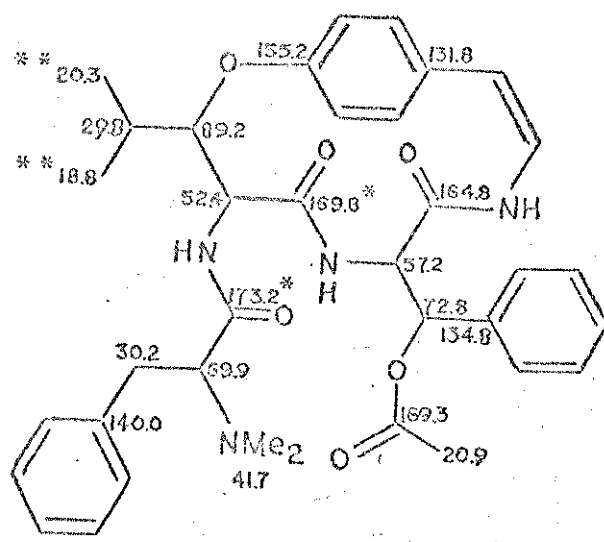
dos obtidos por RMN de ^1H (17), e podem ser usados como uma indicação da configuração desta unidade (L-eritro em (39) e D-eritro em (41)).

Assim, por exemplo, nos alcalóides discarina A(53) e B(52), que por RMN de ^1H demonstrou-se que a unidade β -hidroxileucina pertence a serie eritro (30), pelos sinais a 82,4 ppm e $\Delta\delta = 5,7$ ppm e a 80,8 ppm e $\Delta\delta = 5,6$ ppm para os carbonos β e para os deslocamentos químicos de seus metilas, respectivamente, se pode demonstrar que ele possui a configuração L-eritro.

Dada a pequena quantidade de scutianina H(43) e I(48), isoladas da Scutia buxifolia, não foi possível estudá-los por RMN de ^{13}C . No caso particular de scutianina I, isto é particularmente lamentável, já que de acordo aos dados apresentados, este alcalóide deveria ser um novo diastereoisômero, diferente dos já conhecidos scutianinas D, E e G, e seu estudo poderia fornecer maiores informações sobre a estereoquímica de suas unidades de aminoácidos.

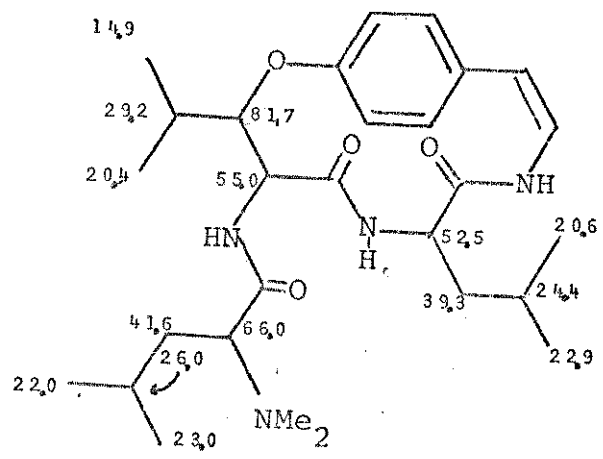


(49) O-acetil Scutianina D



(50) O-acetil Scutianina F

Uma análise preliminar do espectro de RMN de ^{13}C de discarina X permitiu obter alguns dados adicionais sobre a estrutura deste alcalóide. Analisamos os sinais dos carbonos sp^3 conforme apresentados na fórmula (51), (figura 69).



(51) Discarina X

É possível confirmar a presença da unidade β -hidroxileucina e, além disso, baseado nos deslocamentos químicos dos carbonos α e β a 55,0 e 81,7 ppm, respectivamente, no $\Delta\delta$ dos grupos metila ($\Delta\delta = 5,5$ ppm), e nos J de acoplamento dos prótons α e β , previamente analisados, pode-se estabelecer que esta unidade possui a configuração L-eritro.

Frangulanina (47) e lasiodina B(54) serviram como modelo para atribuir os sinais do aminoácido leucina, e pela ausência de um sinal entre 10-12,5 ppm, típico do grupo C-metila de isoleucina, é possível supor que o resíduo N-terminal é N-N-dimetil-leucina. É importante ressaltar que seria necessário confirmar a presença desta unidade por aplicação, por exemplo, de espectros MIKES, como no caso de scutianina H, e além disso por preparação e análise do espectro RMN ^{13}C do modelo N-N-dimetil-leucina, já que os deslocamentos químicos deste fragmento são ligeiramente diferentes aos correspondentes de leucina.

Outro ponto importante a considerar é que a estrutura proposta para discarina X é precisamente a mesma que franganina, alcalóide isolado de Rhamnus frangula pelo grupo de R. Tschesche^(23,31). Como as constantes físicas de ambos alcalóides são apreciavelmente diferentes |PF = 227°; $[\alpha]_D^{20} -225$ (c = 0,1 CHCl₃) para discarina X e PF = 248°; $[\alpha]_D^{20} -302$ (c = 0,1 CHCl₃) para franganina|, e ante a possibilidade que sejam estereoisômeros é aconselhável uma comparação direta de ambas amostras.

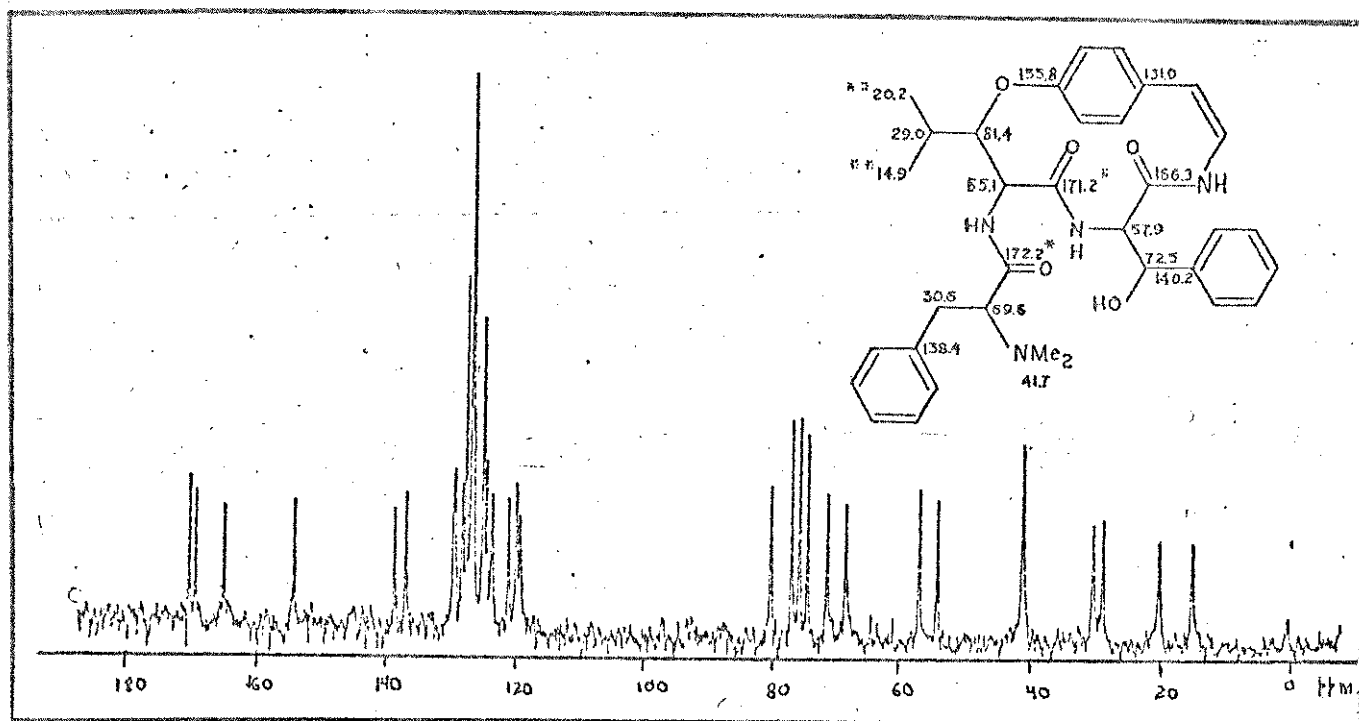
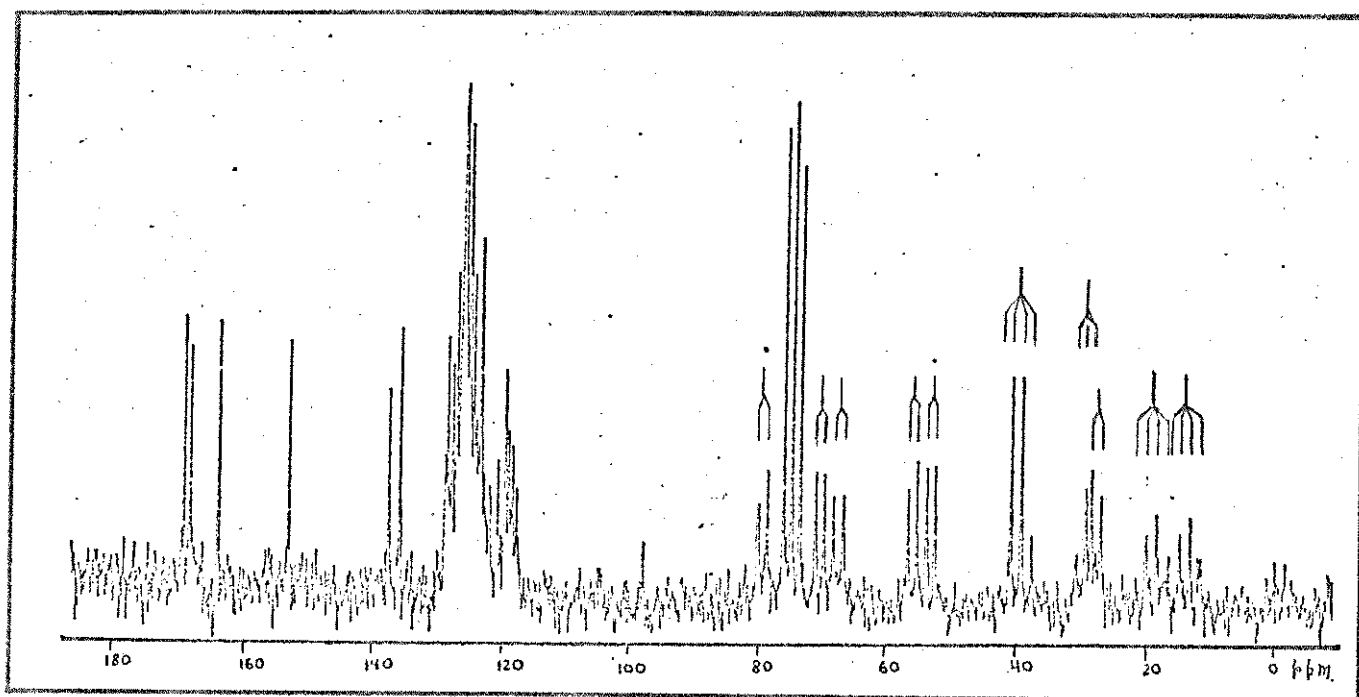


Fig. 65. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3) de Scutianina D.



Espectro -FDFE-

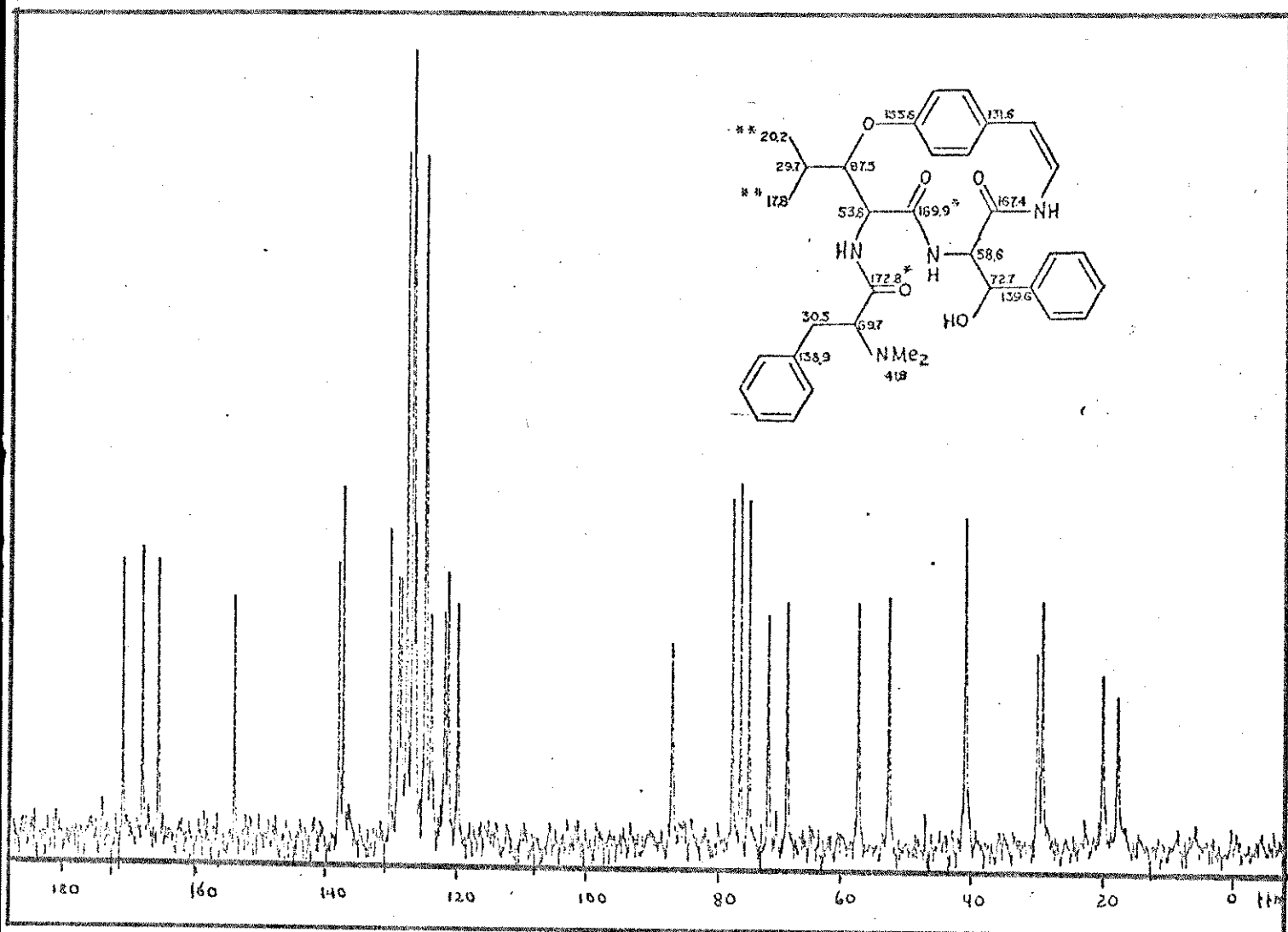


Fig. 66. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3) de scutianina E.

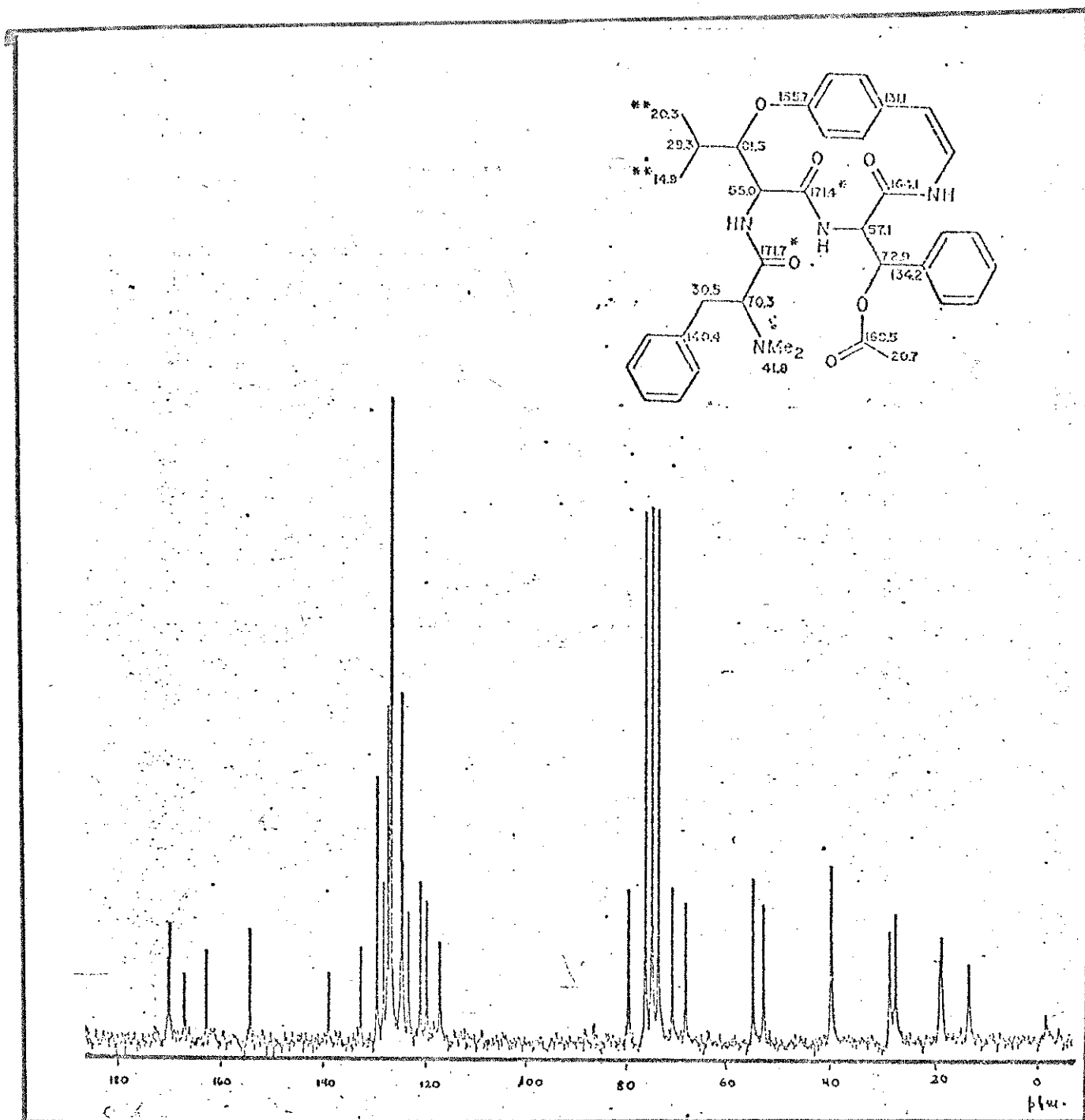


Fig. 67. Espectro de RMN- ^{13}C (CDCl_3) de O-acetil Scutianina D.

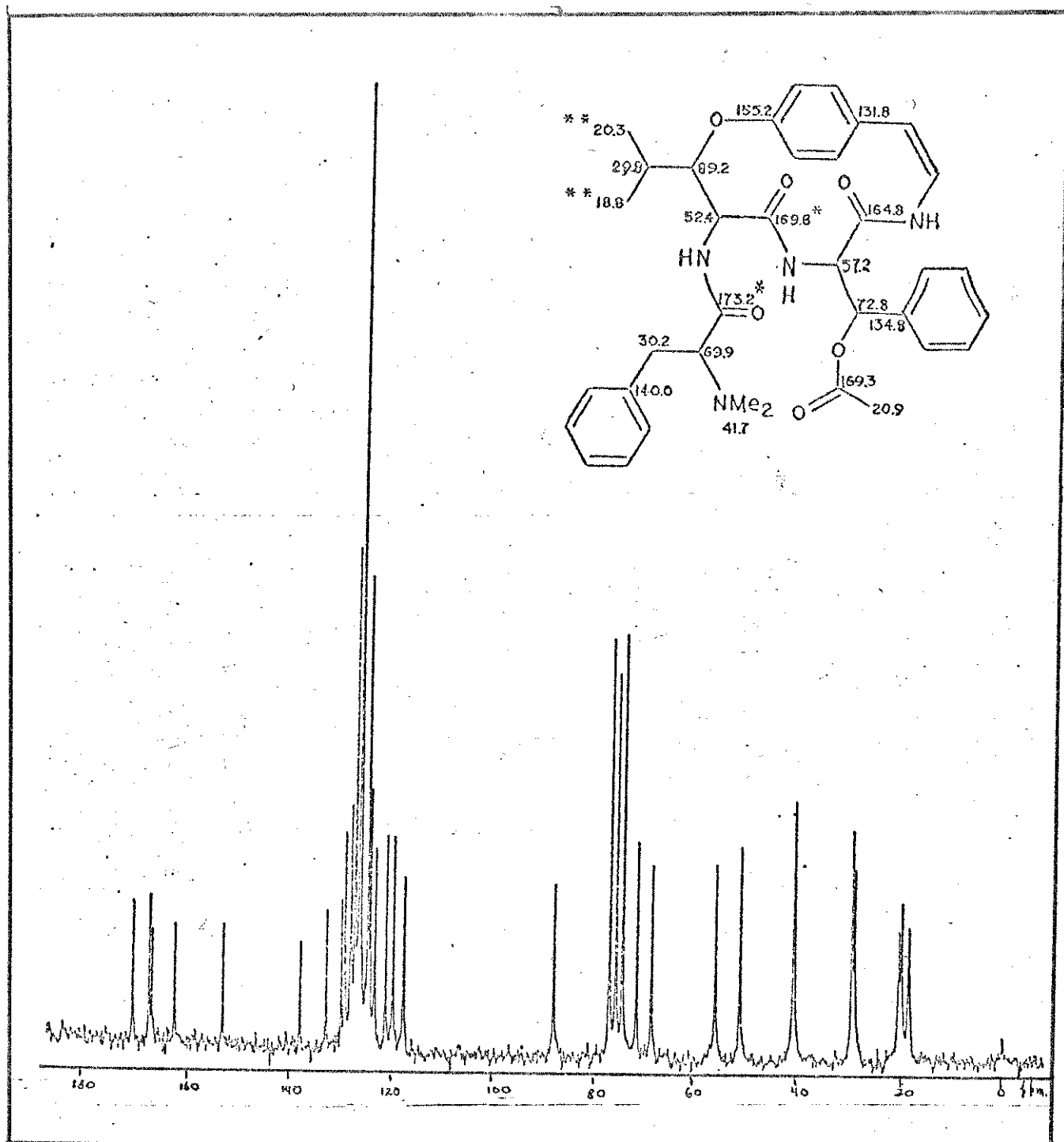


Fig. 68. Espectro de RMN ^{13}C de O-acetil scutianina E.

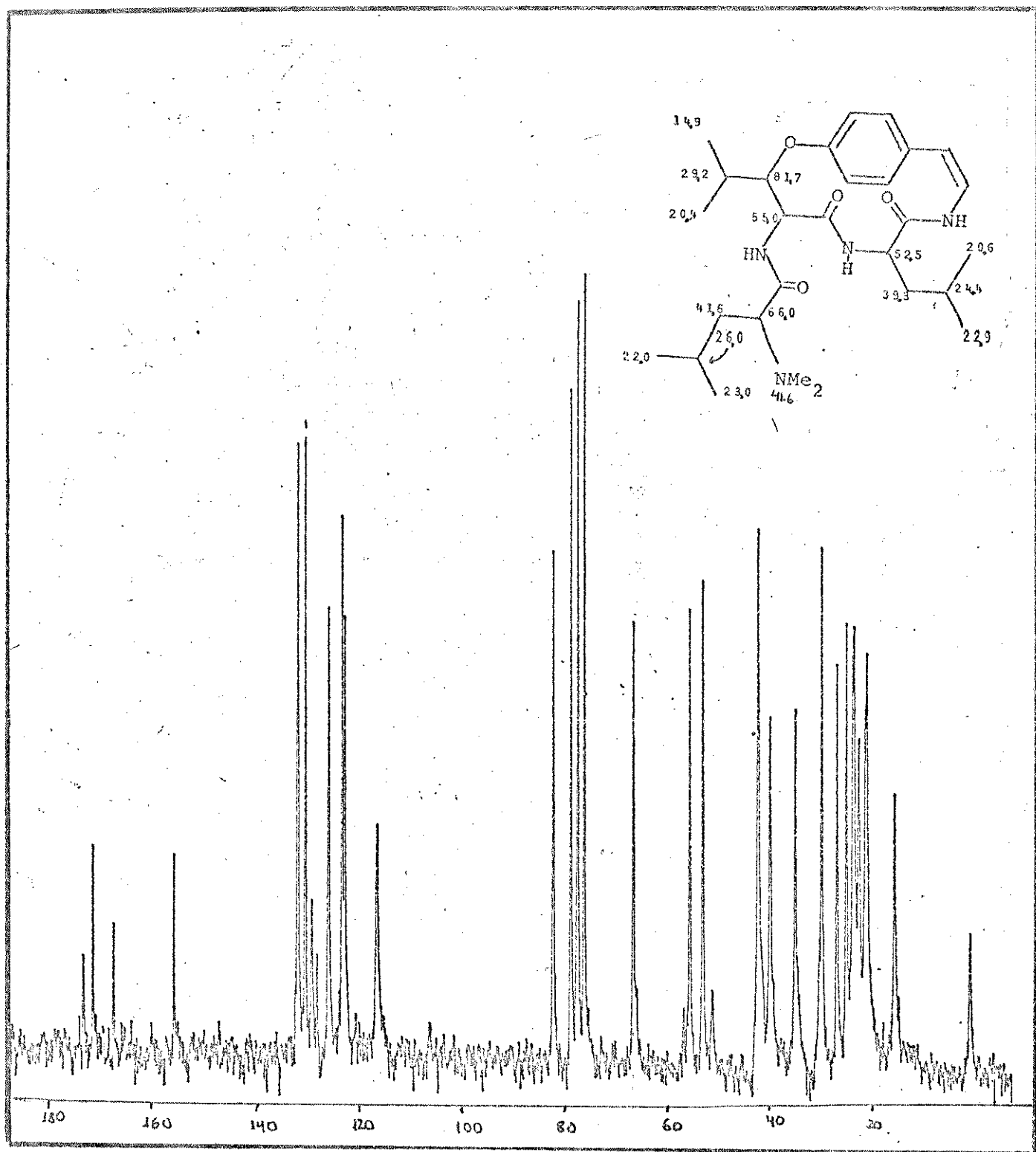


Fig. 69. Espectro de RMN ^{13}C ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{O}$) de discarina X.

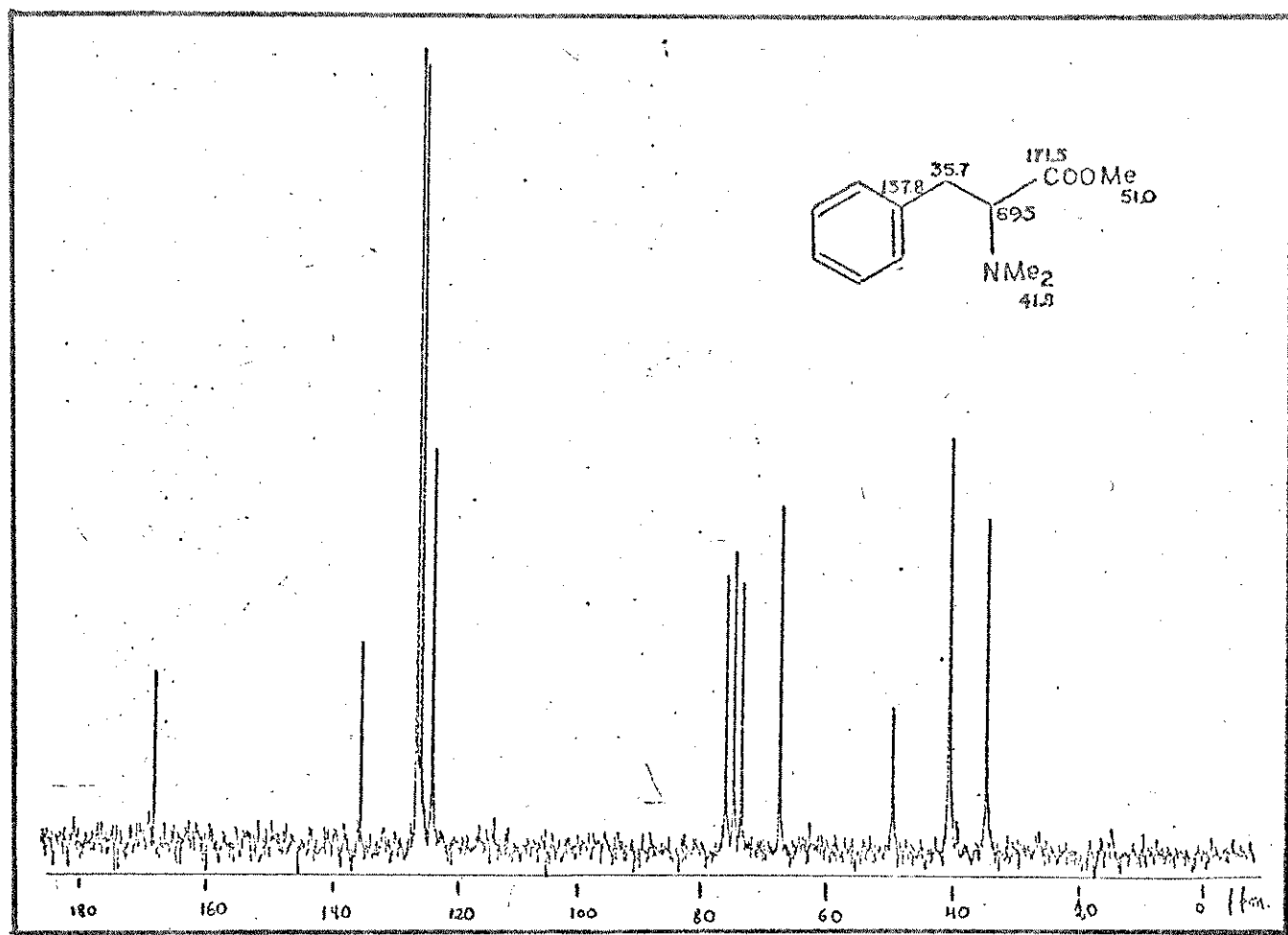
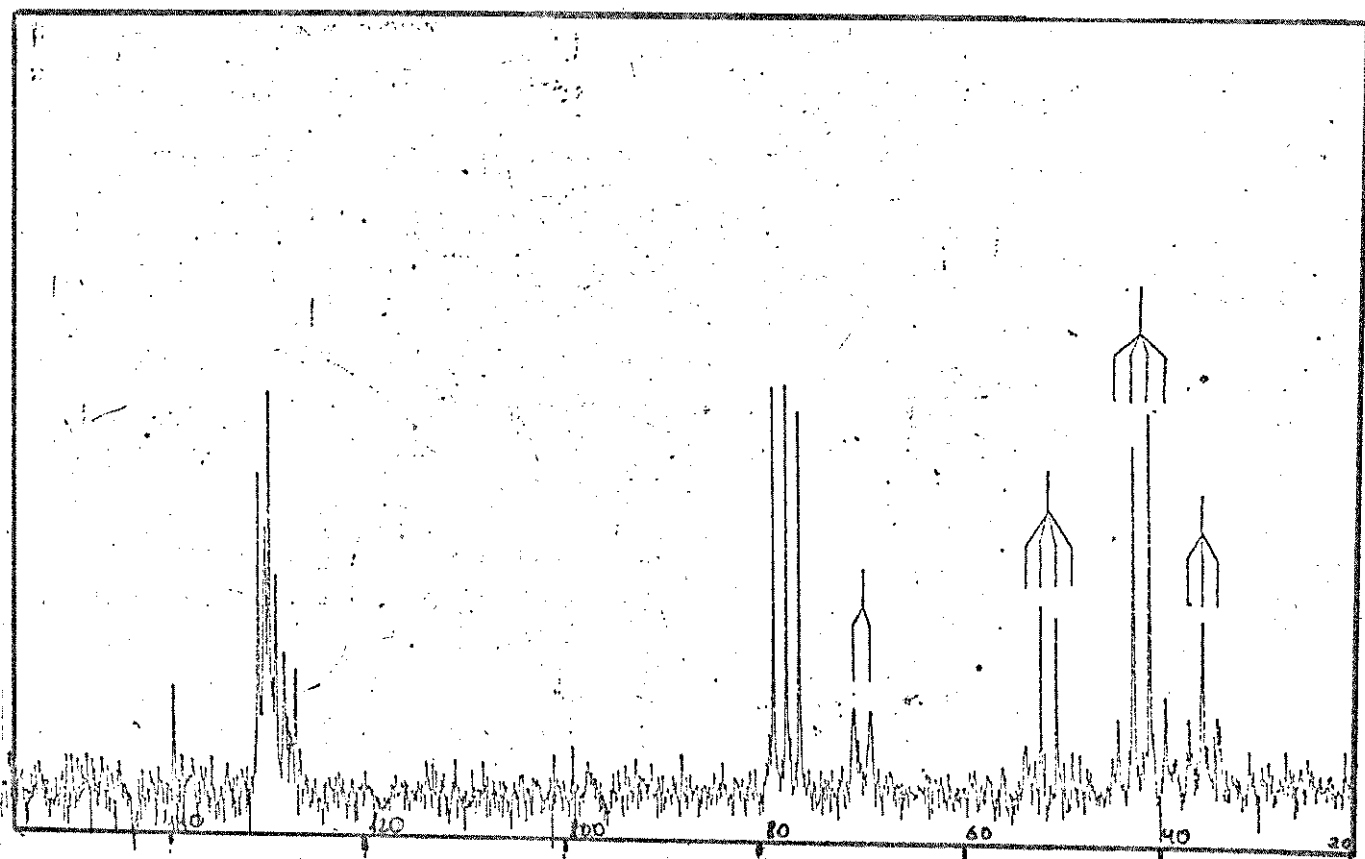


Fig. 70. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3) de N-N-dimetil D-L-fenilalanina metil éster.



Espectro-FDFF-

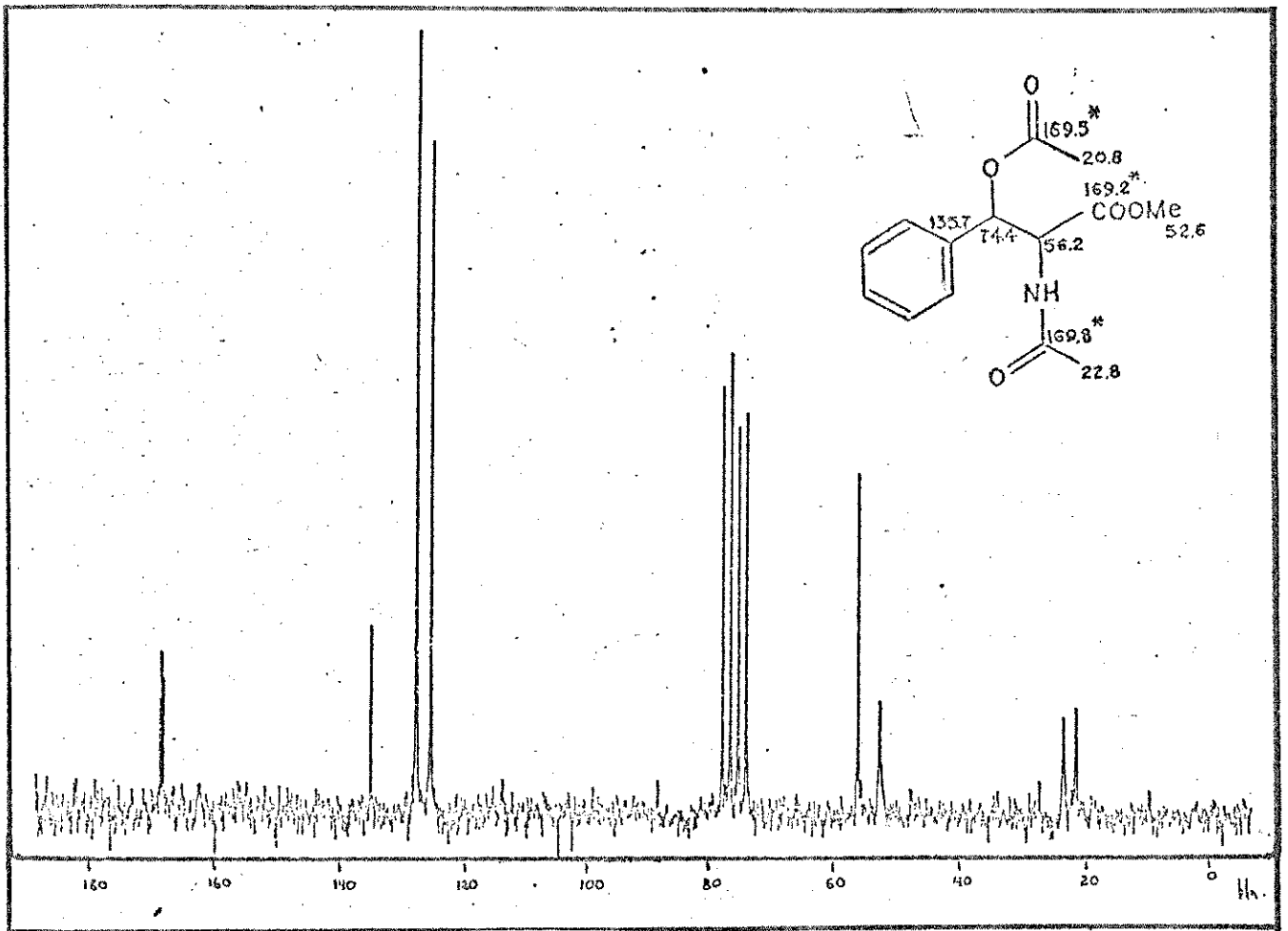


Fig. 71. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3) de O-N-diacetil β -fenil serina

CAPÍTULO 4

Espectro de Energia Cinética dos Íons Analisados por Massa (MIKES)

4.1. Introdução

O desenvolvimento da espectrometria de massa e, em particular, sua aplicação em química orgânica ocorreu na medida em que os instrumentos tornam-se mais sensíveis e aprimorados.

Desde as últimas três décadas, a aplicação da espectrometria de massa tem alcançado uma rápida expansão aumentando, deste modo, o interesse pelo método.

Para diversas classes de compostos orgânicos, tem sido possível correlacionar, através da espectrometria de massa, a fragmentação padrão do íon orgânico com a estrutura do material de partida.

Por isso, esse método tem sido de grande utilidade na elucidação de estruturas de muitos compostos orgânicos, inclusive de produtos naturais.

Mais recentemente, uma nova técnica dentro da espectrometria de massa foi introduzida por Maurer e colaboradores (1971) com o nome DADI (Direct Analysis of Daughter Ions)⁽⁶⁹⁾. No mesmo ano, Beynon e Cooks publicaram o mesmo método com o nome abreviado MIKES (Mass Analyzed Ion Kinetic Energy Spectrometry)⁽⁷⁰⁾, sendo esta última denominação a preferida neste trabalho.

Espectros de MIKES podem ser utilizados na análise de misturas, como descreve o trabalho de Smith, Maurer e Rapp⁽⁷¹⁾. Ainda recentemente foi demonstrada a utilização de MIKES para distinguir vários tipos de barbituratos⁽⁷²⁾ e identificação de alcalóides em extratos brutos de plantas⁽⁷³⁾.

Uma revisão completa deste método, bem como a aplicação em benzenosulfonilhidrazinas e cloretos de benzenosulfonilas, encontra-se num trabalho de tese de Doutorado, recentemente realizado em nossos laboratórios⁽⁷⁴⁾.

Todos os exemplos mencionados acima mostram a potencialidade da técnica, e a importância que a mesma vem assumindo dentro da química orgânica, tornando-se um complemento muito útil dentro da espectrometria de massa.

4.2. Fundamentos Gerais e Princípios de MIKES

Em um espectrômetro de massa comum, a ionização e fragmentação de moléculas orgânicas ocorre em qualquer parte do aparelho, mas só são observados os fragmentos que se formam na fonte de íons. Aos íons que se fragmentam fora da fonte de íons, denomina-se de "íons metaestáveis".

Muitos destes íons, quando se decompõem nas regiões onde há um campo magnético ou elétrico, colidem com as paredes do aparelho e não chegam ao detector. Porém, quando a fragmentação ocorre nas regiões livres de campo, os produtos dos íons metaestáveis são influenciados igualmente pelo próximo campo, e podem ser focalizados no detector, resultando "picos metaestáveis".

A velocidade v de um íon é dada pela relação:

$$v = \sqrt{\frac{2 e U}{m}}$$

onde:

e = carga

U = potencial de aceleração

m = massa

Exemplo:

Em um espectrômetro de massa com um potencial de aceleração de 3.000 V e uma partícula $m = 100$ unidades de massa, esta alcança uma velocidade de 7×10^4 m/s. Se o caminho até o detector for igual a 1,5 metros, isto quer dizer que o íon precisa de 10^{-5} s para percorrê-lo⁽⁷⁵⁾.

A energia cinética do íon precursor ($1/2 m v^2$) alcançada durante a aceleração na fonte de íons é agora dividida entre os produtos (íon produto e partícula neutra), quando ela se decompõe depois da aceleração. Portanto, as condições que regem esses produtos, durante o percurso do espectrômetro, são diferentes das condições do íon precursor.

Por exemplo, eles não atravessam o setor elétrico na sua posição normal de operação, isto porque o setor elétrico só deixa atravessar os íons com energia cinética inteira de aceleração.

Espectros de MIKES são obtidos apenas em aparelhos de geometria de Nier-Johnson inversa (fonte de íons/ setor magnético/ setor eletrostático/ detector) (figura 72), onde o setor magnético precede o elétrico. Os íons precursores são analisados por massa no primeiro campo de deflexão (M) e, em seguida, os produtos de decomposição entre o imã e o setor elétrico (E) são analisados por suas energias cinéticas. Consegue-se isto desacoplando e varrendo a voltagem do campo elétrico.

A massa dos íons produto analisados pelo setor eletrostático é dada pela relação:

$$M_2 \text{ íon produto} = M_1 \text{ íon precursor} \frac{U_2}{U_1}$$

onde:

U_1 - potencial de deflexão do condensador quando o íon precursor é focalizado no detector.

U_2 - potencial de deflexão do condensador quando o íon fragmento é focalizado no detector.

Aparelhos de dupla focalização de geometria Nier-Johnson (fonte de íons/setor eletrostático/setor magnético/detector) não dão espectros MIKES, porque em aparelhos com esta geometria os íons acelerados na fonte passam primeiro pelo campo eletrostático, para serem subsequentemente separados por massa⁽⁷⁵⁾.

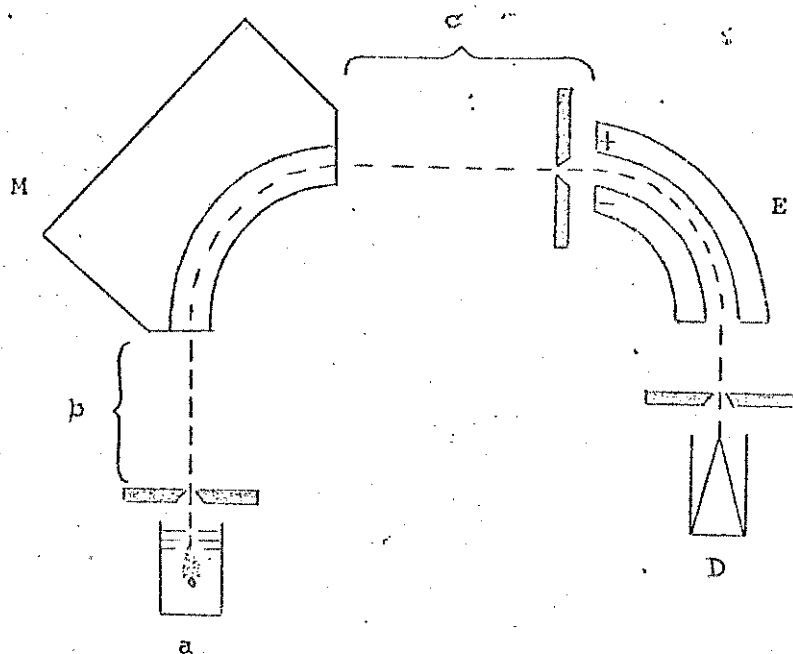


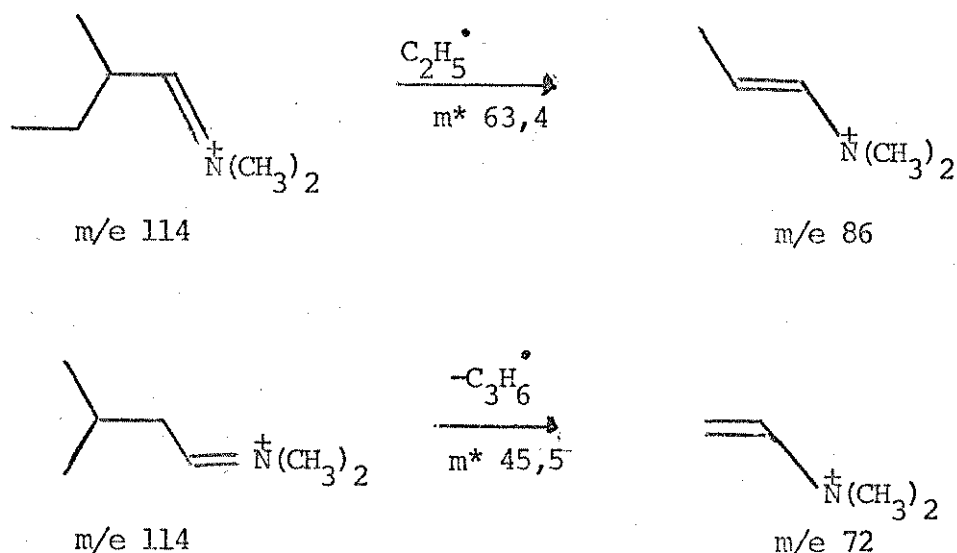
Fig. 72. Estrutura esquemática de espectrômetro de massa (geometria Nier-Johnson inversa). a: fonte de íons. b: primeira região de campo livre. M: analisador magnético. c: segunda região de campo livre (região MIKES). E: analisador eletrostático de energia (filtro). D: detector⁽⁷⁵⁾.

4.3 Aplicação de MIKES em Alcalóides Peptídicos

A fragmentação fornecida pelo espectro de massa de certos alcalóides peptídicos inclusive scutianina H, apresenta um fragmento a m/e 114 (pico base), correspondente à unidade N-N-dimetil amino-ácido terminal, provavelmente leucina ou isoleucina.

Este fragmento, segundo a estrutura do aminoácido N-N-dimetilado, sofre uma cisão secundária que se revela pela presença de um pico metaestável.

Em um aminoácido ramificado em β (isoleucina), há formação de um radical $-C_2H_5^\bullet$. No caso da leucina, que é ramificada em γ , ou norleucina que não é ramificada, ocorre eliminação de propeno.



Os espectros de massa desses aminoácidos N-N-dimetilados, isoladamente, são bem diferentes, conforme pode-se perceber na análise das figuras 48, 50 e 52. Quando os mesmos fragmentos amínicos constituem parte do alcalóide como unidade N-N-dimetilada terminal os mesmos aparecem com intensidades comparativamente muito baixas. Portanto, estas reações secundárias não podem ser reconhecidas com certeza, o que dificulta a identificação da unidade N-N-dimetilada.

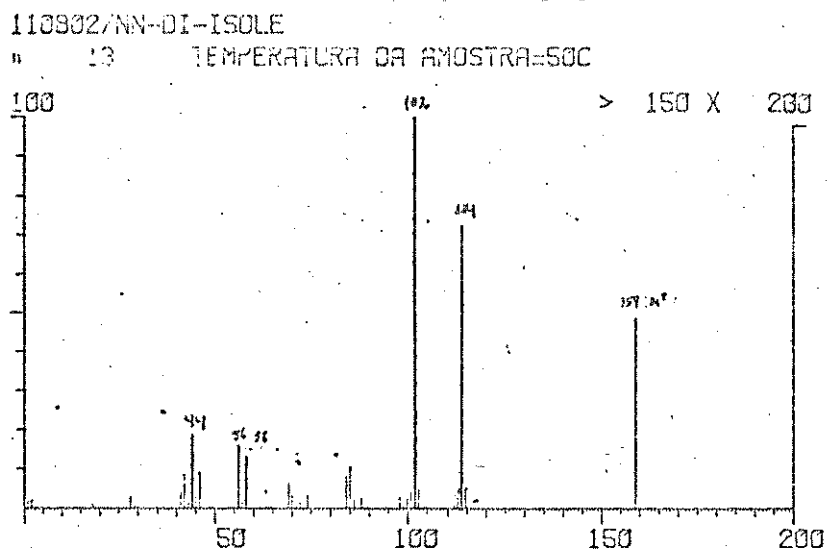


Fig. 48. Espectro de massa de N-N-dimetil-L-isoleucina.

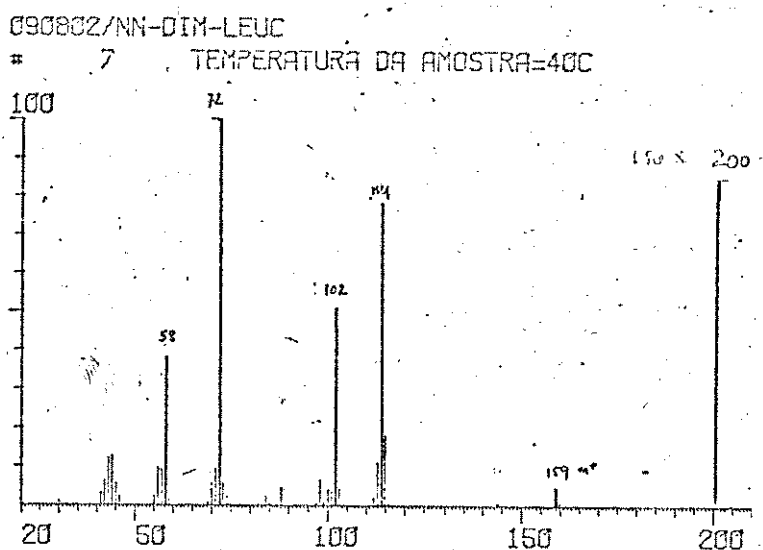


Fig. 50. Espectro de massa de N-N-dimetil-L-leucina.

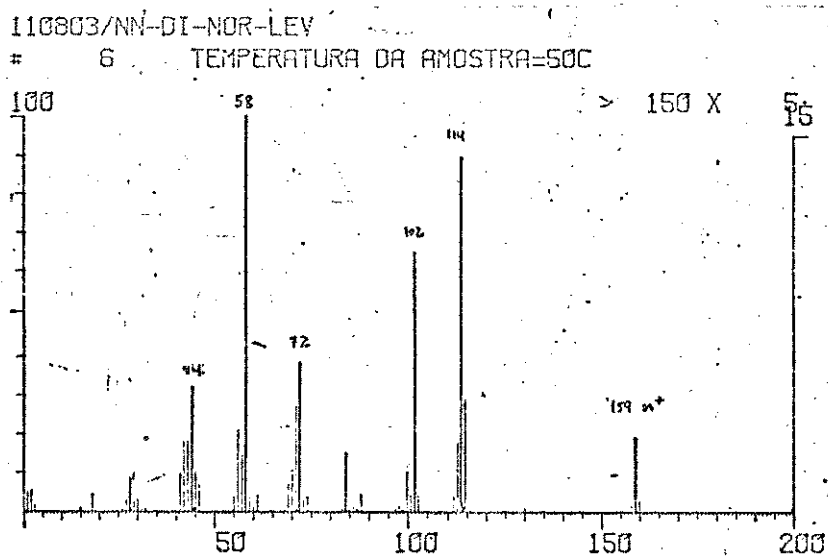


Fig. 52. Espectro de massa de N-N-dimetil-nor-leucina.

terminal.

Em 1974, Mc Lafferty e colaboradores descreveram a aplicação de espectros de Íon Metaestável (MI) e Ativação Colisional (C.A.) na determinação dos resíduos leucina e isoleucina em peptídeos⁽⁷⁷⁾. Neste capítulo, transcreveremos a aplicação de MIKES, um método muito semelhante a MI, na determinação da estrutura do fragmento a m/e 114 em alcalóides ciclopeptídicos. Os aminoácidos leucina, isoleucina e norleucina N-N-dimetilados são usados como padrões.

Realmente, MIKES do pico m/e 114 de N-N-dimetil-isoleucina (fig. 73a), de N-N-dimetil-leucina (fig. 73b) e N-N-dimetil-norleucina (fig. 73c) são distintos, mostrando que não existe equilíbrio de estruturas para os íons, e que as fragmentações desses íons são muito dependentes das estruturas.

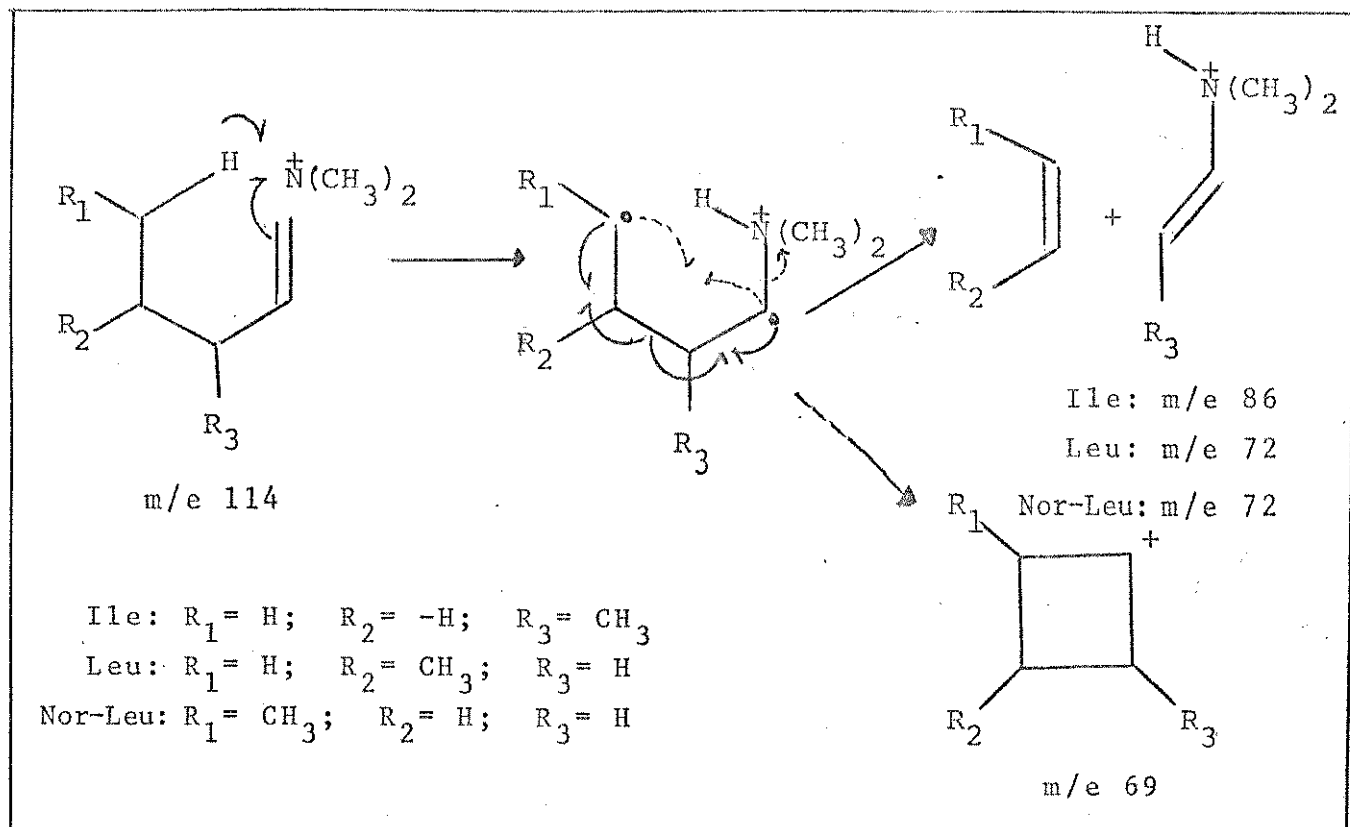
Rearranjo com perda de uma olifina, leva a m/e 72 para N-N-dimetil-leucina e nor-leucina, e m/e 86 para N-N-dimetil-isoleucina (esquema 7). Esta reação torna-se menos importante para os dois últimos aminoácidos N-N-dimetilados, o que pode ser devido a uma competição com o íon de m/e 69.

Um outro rearranjo, comum para aminas, leva ao fragmento de m/e 58 para os três isômeros (esquema 8).

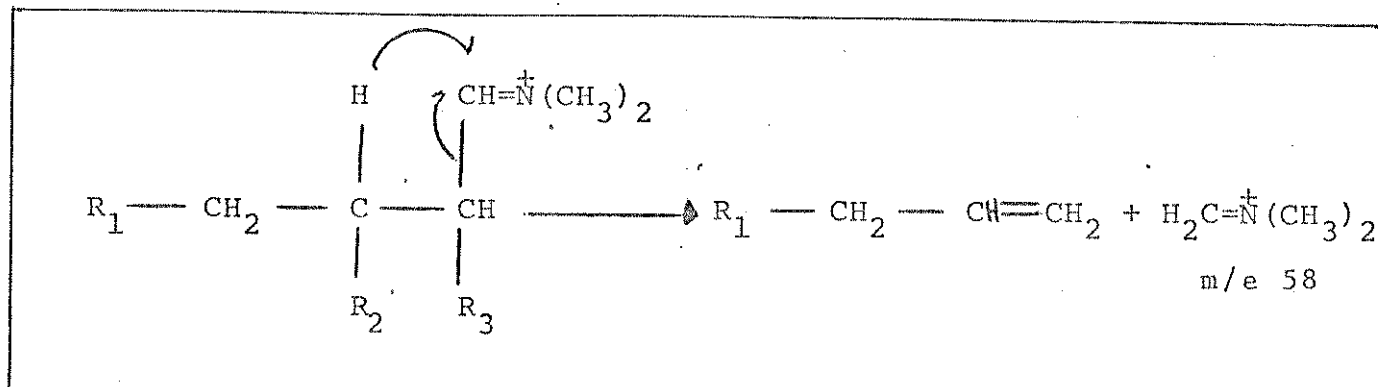
Segundo Mc Lafferty e colaboradores⁽⁷⁷⁾, a transferência de um hidrogênio terciário da leucina é aparentemente favorecida sobre o hidrogênio secundário da isoleucina, o que explicaria a diferença de intensidade dos picos a m/e 58 para os dois isômeros. Porém numa análise da figura 73c para nor-leucina, pode-se notar que o pico a m/e 58 é igualmente intenso, embora neste aminoácido N-N-dimetilado ocorreria uma transferência de um hidrogênio secundário, como em N-N-dimetil-isoleucina.

Desde que o aminoácido básico terminal de scutianina C tinha

Esquema 7



Esquema 8



sido determinado como sendo N-N-dimetil-isoleucina⁽¹⁸⁾, este alcalóide foi usado como modelo e o MIKES de seu íon a m/e 114, mostrado na figura 74.

Embora a presença de picos no espectro devido a efeitos térmicos, e interferências de fragmentos da primeira região de campo livre, o aspecto do espectro é o mesmo que o espectro da figura 73a. Nota-se significativa diferença dos espectros mostrados nas figuras 73b e 73c.

Então, podemos ver que independente de sua interpretação o MIKES pode ser muito útil na química de produtos naturais, como instrumento de impressões digitais semelhante à espectroscopia no IV.

Baseado nos comentários anteriores, submetemos a scutianina H a uma análise de seu pico base a m/e 114 por MIKES. A figura 75 mostra que o resíduo N-N-dimetil-aminoácido terminal de scutianina H é isoleucina.

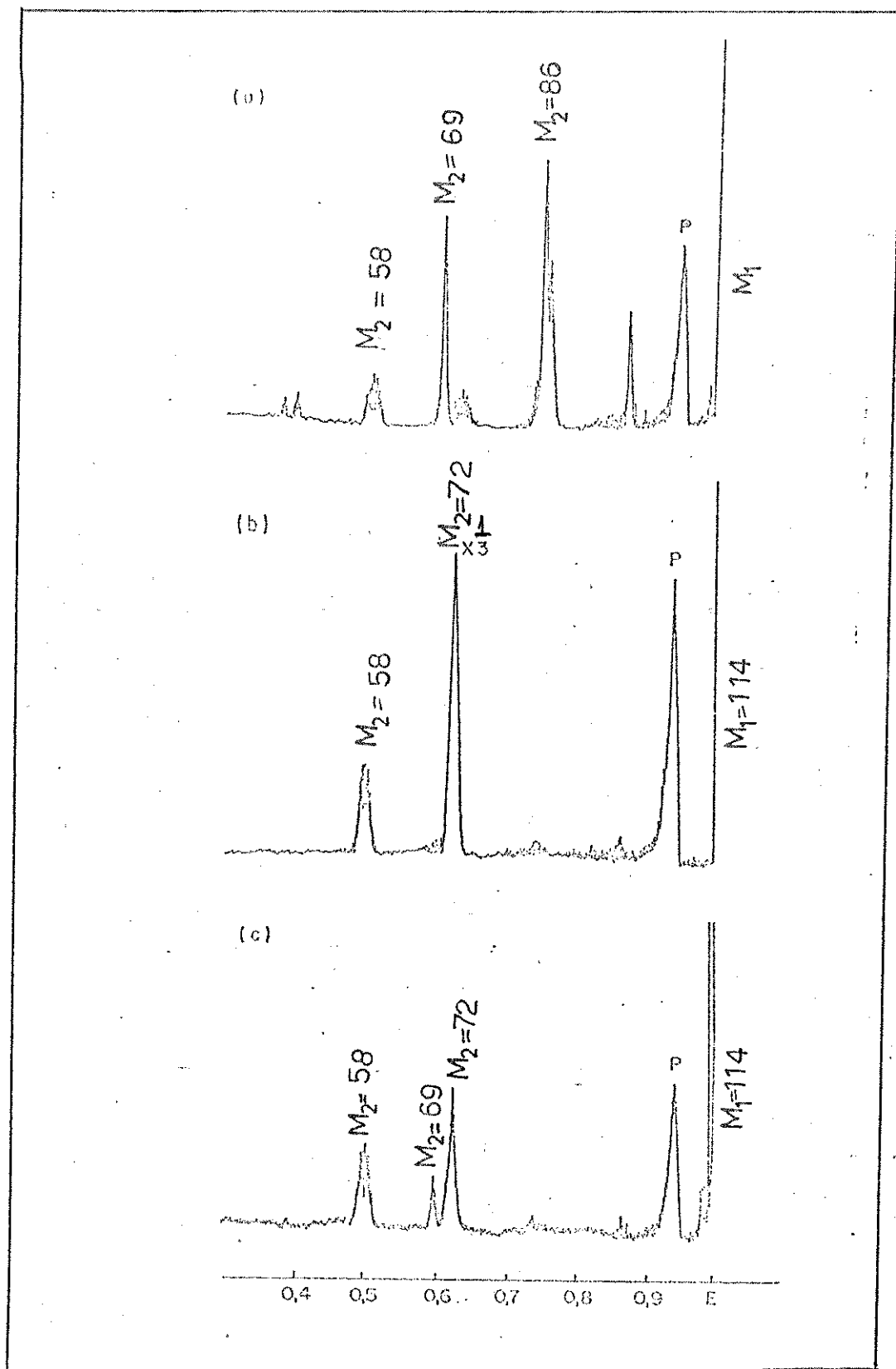


Fig. 73. (a) Espectro MIKES de N-N-dimetil-L-isoleucina.
 (b) Espectro MIKES de N-N-dimetil-L-leucina.
 (c) Espectro MIKES de N-N-dimetil-nor-leucina.

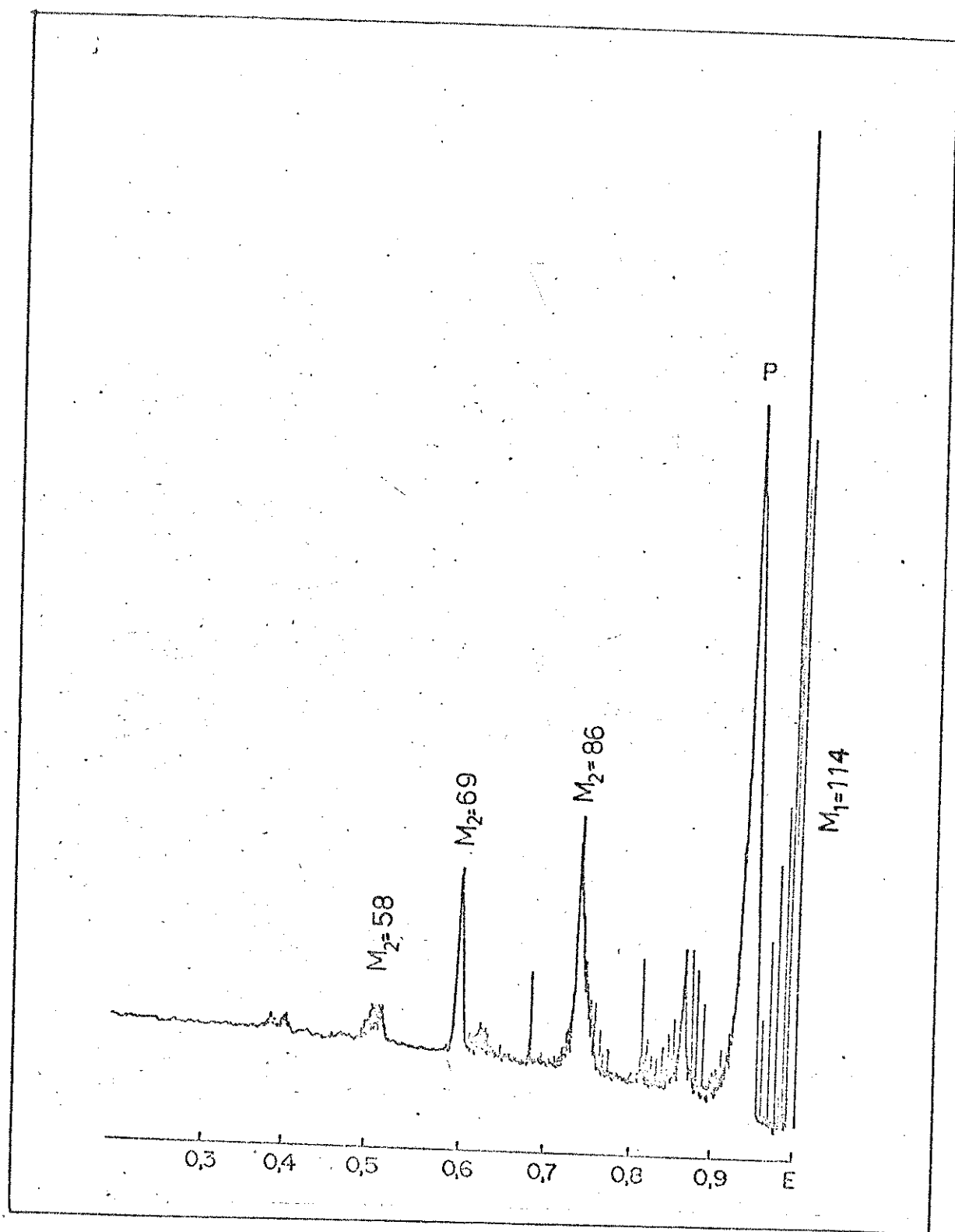


Fig. 74. Espectro MIKES de Scutianina C.

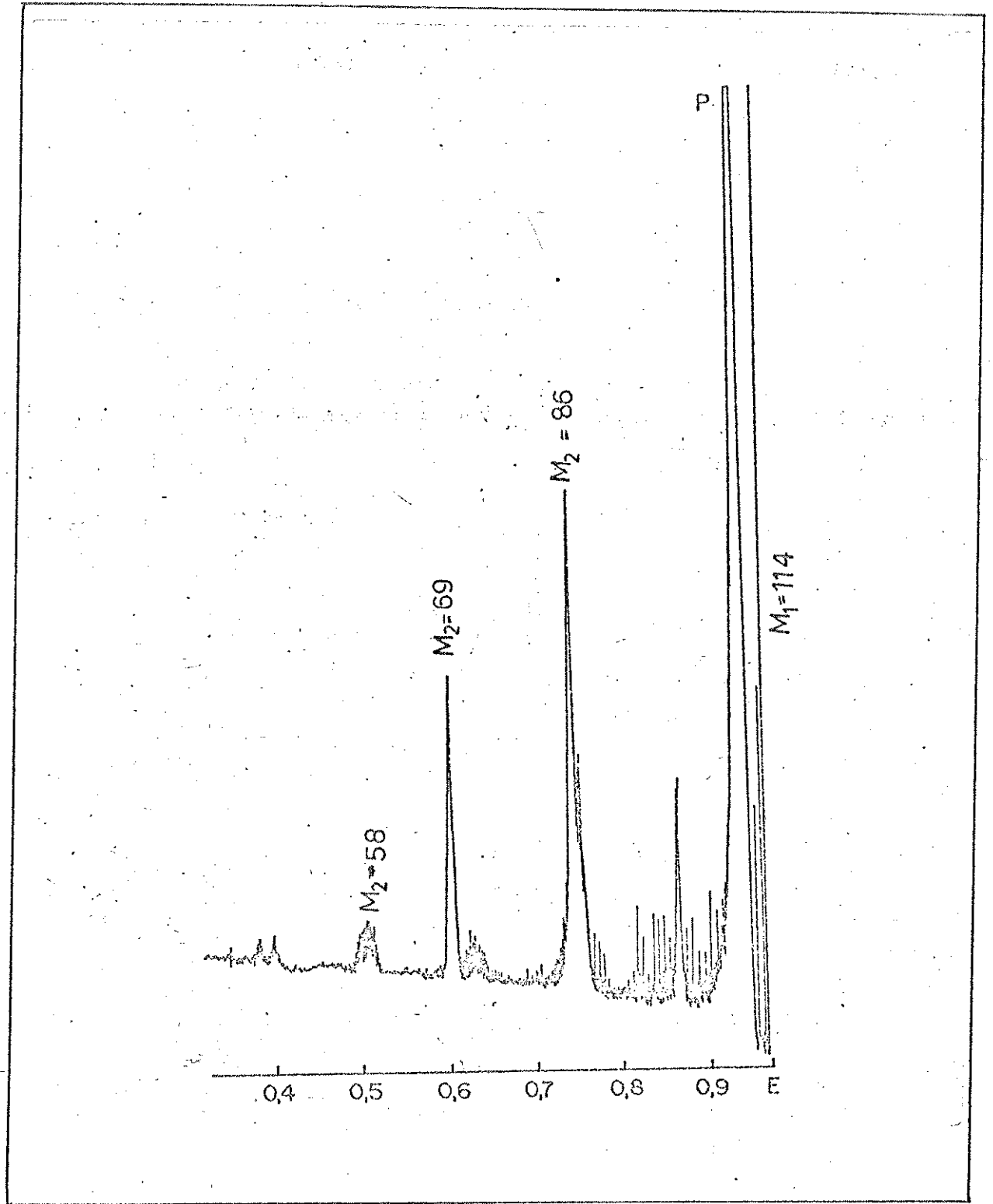


Fig. 75. Espectro MIKES de Scutianina H.

CAPÍTULO 5

1. Scutia buxifolia Reiss: Isolamento dos alcalóides da casca do tronco.

1.1. Materiais e Métodos

Cromatografias em coluna foram feitas utilizando sílica H (Kieselger Hnach Stahl) da Merck.

Cromatografias em camada delgada foram feitas utilizando sílica gel GF 254, da Merk AG, suspensa em água destilada e distribuída em camada de 0,25 mm sobre placas de vidro de 5 x 20 cm, 10 x 20 cm e 20 x 20 cm, em aparelho Quickfit.

As cromatografias foram desenvolvidas em solventes apropriados e reveladas utilizando-se lâmpada ultravioleta Geman-Camag 254, 350 nm, iodo ressublimado e reativo de Dragnendorff, modificado segundo Munier e Macheboeuf⁽⁷⁸⁾.

Os reagentes e solventes utilizados foram analiticamente puros da marca Fischer, Baker, Merk, Carlo Erba e Fluka AG.

Os alcalóides isolados foram purificados por recristalização ou cromatografias em placas preparativas, até que em CCD mostrassem única mancha em vários sistemas de solventes.

Os pontos de fusão foram determinados em um aparelho Mettler FP 52 - CARL ZEISS.

As rotações óticas ($|\alpha|$) foram determinadas em CHCl_3 , num polarímetro fotoelétrico da CARL ZEISS, de precisão 0,005°.

Os espectros de absorção no infravermelho (IV) foram determinados em pastilhas de KBr (1% da amostra) ou película em NaCl, utilizando-se aparelho da Perkin-Elmer, modelo 337, e como referências, as absorções a 1601 e 1028 cm^{-1} de um filme de poliestireno.

Os espectros de ressonância magnética protônica (RMN de ^1H) foram determinados em um espectrômetro Varian T-60, em um Varian XL-100-FT (100 MHz) e num Bruker spectrosin 400 (400 MHz). Os solventes utilizados foram clorofórmio, piridina e água deuterados, utilizando-se o tetrametil silano (TMS) como referência interna.

Os espectros de ressonância nuclear magnética de C-13 (RMN de ^{13}C) foram obtidos no espectrômetro da Varian XL-100 15-FT (25,2 MHz). O solvente utilizado foi clorofórmio deuterado e tetrametil silano como referência interna.

Os espectros de massa foram determinados em um instrumento 1015/SL da Finnigan e em um instrumento Varian MAT-311 A, dupla focalização reverso geometria de Nier-Johnson. As medidas foram efetuadas a uma energia de 70 eV, e a temperatura da fonte de 100-120 °C, com potencial de aceleração de 3 KV.

Os espectros de MIKES foram conseguidos em um espectrômetro de massa Varian MAT-311A, dupla focalização, reverso geometria de Nier-Johnson.

1.2. Isolamento

Coleta: O material foi coletado pessoalmente, no município de Santana do Livramento, RS, durante o mês de julho de 1976.

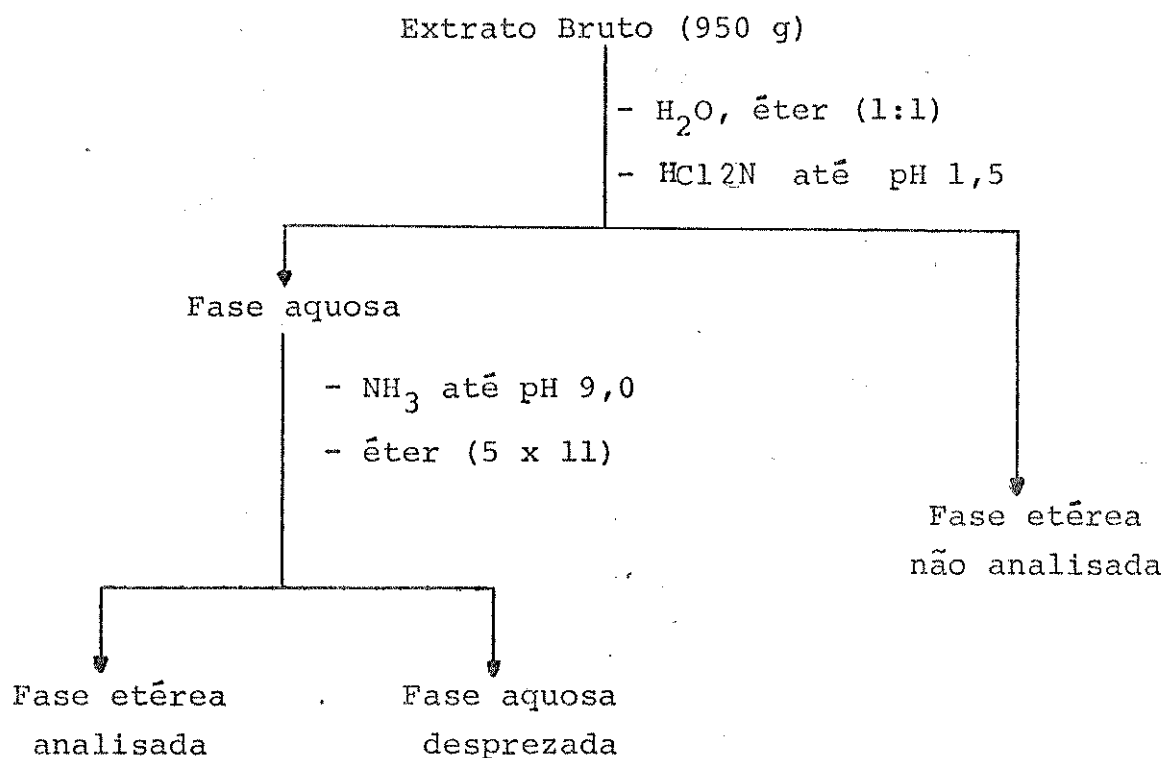
Extração: A casca do tronco da Scutia buxifolia Reiss seca a 60° em estufa e moída a fino grão em moinho Wiley (5 Kg) foi extraída em um extrator tipo Soxlet durante 48 horas, com metanol a quente (20 litros). O solvente foi evaporado à pressão reduzida em um evaporador rotativo, resultando em 950 g (19%) de um resíduo oleoso escuro, denominado extrato bruto. Este resíduo foi suspenso em uma mistura de água e éter 1:1 (2 litros) e acidificada com

HCl 2N até pH \approx 1,5. A fase etérea foi separada e a aquosa remanescente voltou-se a extrair com éter (5 x 1 litro). A solução etérea não foi analisada.

A fase aquosa foi alcalinizada com amoníaco até pH \approx 9,0 e extraída exaustivamente com éter (5 x 1 litro). Os extratos etéreos reunidos foram lavados com água (2 x 200 ml), sêcos com sulfato de sódio anidro e evaporados a pressão reduzida, resultando 4,1 g (0,09% em relação à casca e 0,5% em relação ao extrato bruto) de um sólido amarelado constituído de várias bases.

O esquema 9⁽⁷⁶⁾ mostra o fracionamento a que o extrato bruto foi submetido.

Esquema 9



1.3. Separação dos Alcalóides

A mistura de alcalóides isolada da casca do tronco da S. bu-

xifolia (4,1 g) foi cromatografada em coluna de vidro, usando-se como suporte sílica H (410 g). O sistema de solvente eluente foi clorofórmio-metanol a várias concentrações, e em algumas frações, adicionando-se gotas de amônia conforme a tabela XIV.

Usou-se um coletor de frações automático Buckler e as frações, de 15 ml cada, eram coletadas em tubos de ensaio.

As frações foram comparadas por CCD e juntadas conforme suas semelhanças em Rf. Desta maneira totalizou-se 38 frações, que juntas pesaram 3.719 g, correspondendo a 90% do material colocado na coluna (tabela XIV).

As frações coletadas que não apresentaram testes positivos para alcalóides (Dragendorff) não foram analisadas, com exceção das frações 31 e 32, facilmente identificáveis por comparação em CCD com uma amostra autêntica, como sendo Scutianeno C.

As frações puras semelhantes em CCD foram juntadas e recristalizadas no solvente adequado. As frações impuras foram purificadas em cromatografia de placas preparativas com posterior recristalização.

A seguir, apresentamos os sistemas de solvente utilizados em CCD e em placas preparativas.

1. Clorofórmio-metanol (95:5) ⁽⁵⁾
2. Clorofórmio-metanol-NH₄OH (95:5:gotas)
3. Clorofórmio-metanol (90:10) ⁽³³⁾
4. Clorofórmio-metanol-éter (90:1:30)
5. Clorofórmio-éter-metanol (90:30:2) ⁽³¹⁾
6. Clorofórmio-acetona (85:5)
7. Clorofórmio-éter-acetato de etila (1:10:10) ⁽⁵⁾
8. Clorofórmio-éter-acetato de etila (1:20:10)
9. Clorofórmio-acetato de etila-acetona (20:10:2)

Tabela XIV

Cromatografia do material contendo alcalóides (4,1 g).

Frações	Sistema eluente	Frações combinadas	Compostos isolados (scutianinas)	Peso (g)
1-5	clorofórmio	1-5	-	0,255
6-12	clorofórmio	6-10	B	0,050
	metanol 0,5%	11-12	B, I	0,030
13-17	clorofórmio	13-15	I	0,030
	metanol 1%	16-17	I e C	0,140
18	clorofórmio metanol 2%	18	H	0,050
19-20	clorofórmio metanol 3%	19-20	D	0,350
21-24	clorofórmio metanol 4%	21-24	D + E	0,105
25-29	clorofórmio metanol 5%	25-29	E	0,400
31-32	clorofórmio metanol 5% com gotas de amônia	31-32	Scutianeno C	0,065
33-34	clorofórmio metanol 10%	33-34	-	0,270
35-38	acetona	35-38	-	1,974

10. Clorofórmio-acetato de etila-acetona (20:10:20).

Os sistemas 1 a 3 foram úteis para identificação e junção das frações semelhantes em CCD, e os demais sistemas foram mais eficientes na separação das impurezas em CCD e placas preparativas.

1.4. Alcalóides peptídicos e derivados

Scutianina H(43)

O sólido cristalino (50 mg) correspondendo à fração 18, de Rf 0,46 no sistema de solvente 1, foi recristalizado de clorofórmio-éter, resultando em 45 mg de um produto homogêneo em CCD (10 sistemas de solventes). PF = 242-243^o. Com este composto fez-se as seguintes determinações:

Rotação ótica

$$[\alpha]_D^{20} - 233^{\circ} \quad (C= 0,1 \text{ CHCl}_3)$$

Espectro UV em ETOH (fig. 1)

Absorção aromática terminal.

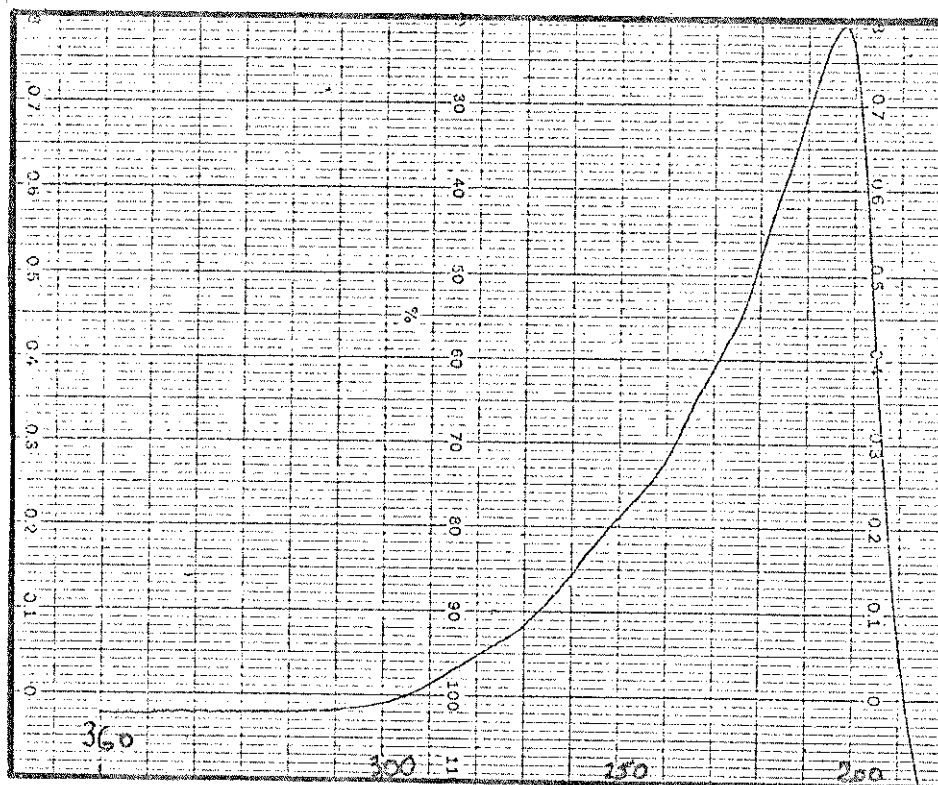


Fig. 1. Espectro de absorção no UV de scutianina H.

Espectro IV (KBr) (fig. 2)

3600 cm^{-1} (OH), 3280 (N-H), 2800 (N-CH₃), 1650 (C=O), 1625 (C=C), 1250 (Fenol-éter).

Espectro de RMN de ¹H a 100 MHz (CDCl₃) (fig. 6)

δ (ppm): 0,74-0,98 (9 H, m); 1,22 (3H, d, j = 8 Hz); 2,0 (6H, s).

Espectro de RMN de ¹H a 100 MHz (Pi-d₅) (fig. 7)

δ (ppm): 0,84 (3H, t, j = 6 Hz); 0,94 (3H, d, j = 6 Hz); 1,20 (3H, d, j = 8Hz); 1,28 (3H, d, j = 6 Hz); 2,32 (6H, s).

Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz (CDCl₃) (fig. 8)Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz (CDCl₃ + D₂O) (fig. 9)Espectros de RMN de ¹H a 400 MHz (CDCl₃ + D₂O) com dupla irradiação a:

δ (ppm): 2,0 (fig. 10); 1,8 (fig. 11); 1,26 (fig. 12); 1,52 (fig. 13); 4,93 (fig. 14).

Espectro de massa de alta resolução

Calculado para C₃₁H₄₂N₄O₅ 550,31550, observado 550,3184.

Espectro de massa de baixa resolução (70 eV) (fig. 3)

m/e 550 (M⁺), 535, 507, 493, 444, 401, 394, 353, 342, 331, 329, 190, 175, 120, 114 (100%), 107, 106, 105, 97, 85, 77.

Espectro MIKES (fig. 75)Hidrogenação catalítica (30)Diidroscutianina H(45)

20 mg de Scutianina H em 12 ml de metanol foram hidrogenadas a temperatura ambiente em presença de Pd/C a 10% (12 mg) em atmosfera de hidrogênio até pressão constante (7 h). O produto hidrogenado de Rf 0,32 no sistema de solvente 1, foi filtrado através de

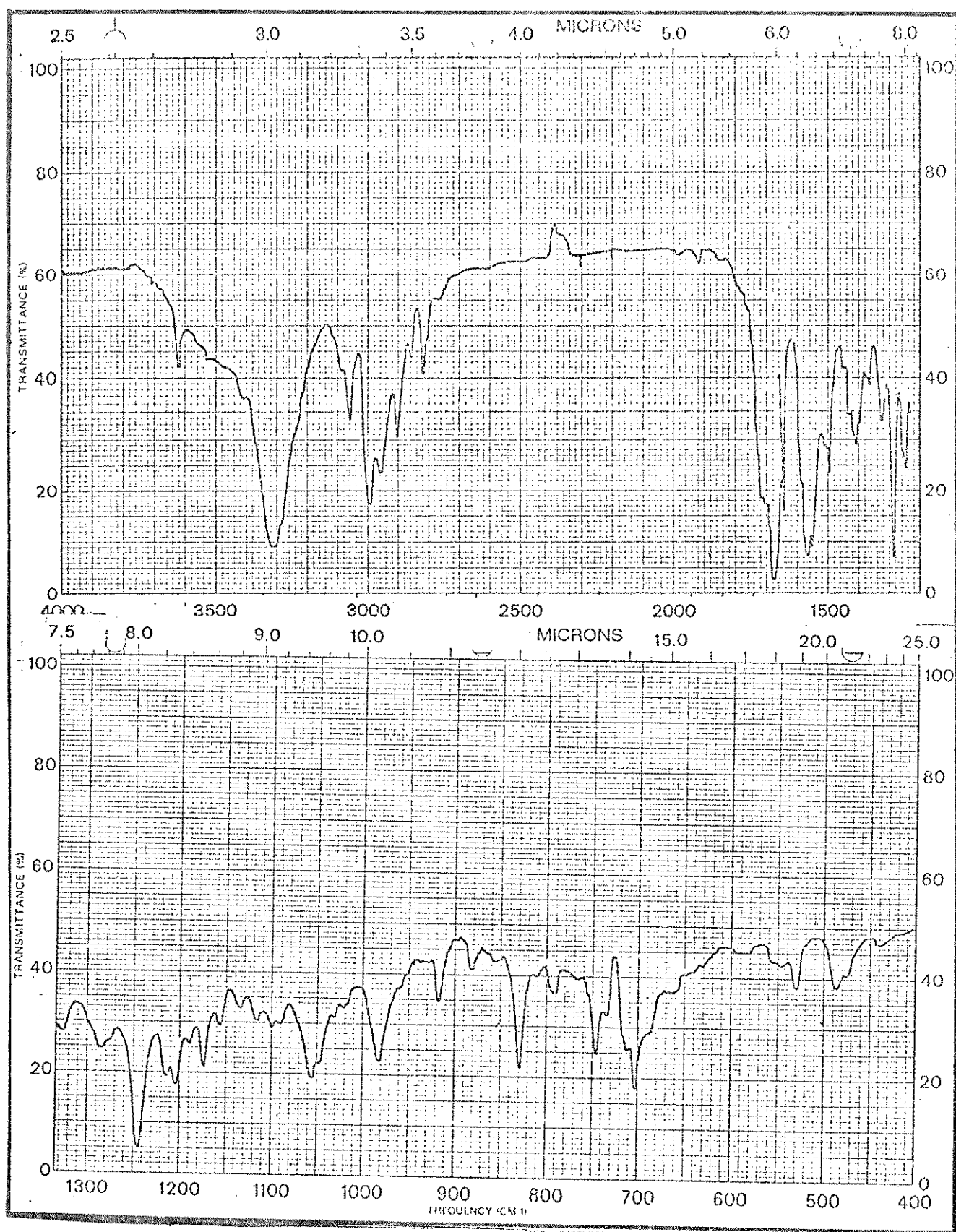


Fig. 2. Espectro de absorção no IV de Scutianina H.

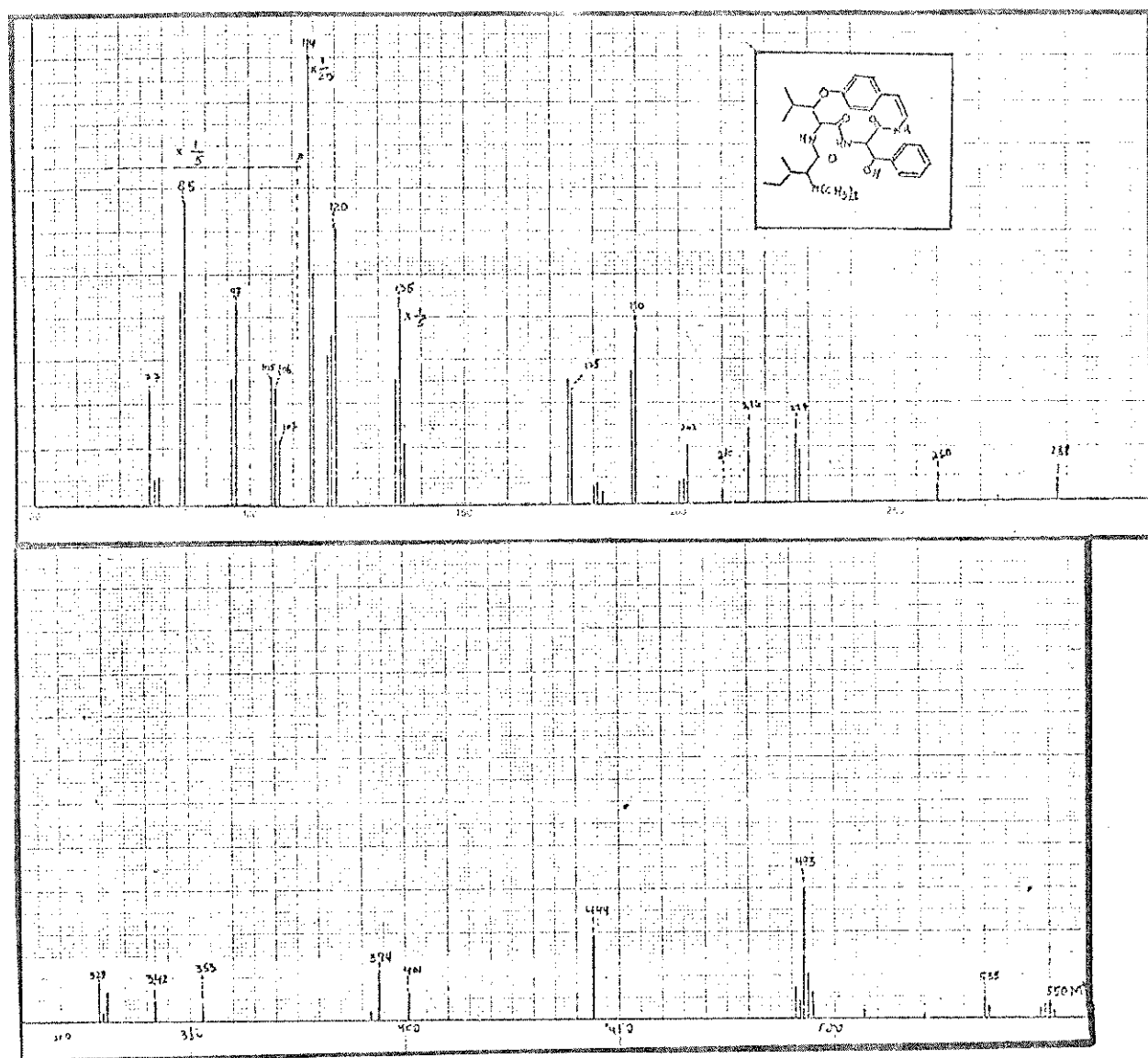


Fig. 3. Espectro de massa de Scutianina H.

uma camada de celite e o solvente evaporado a pressão reduzida, resultando um produto cristalino, que recristalizado de acetona apresentou-se homogêneo em CCD (sistemas de solvente 1, 7 e 8). PF = 276-277°.

Espectro de massa (70 eV) (fig. 4)

m/e 552 (M^+), 495, 446, 403, 344, 333, 192, 175, 137, 114 (100%), 107, 106, 105, 97, 85, 77.

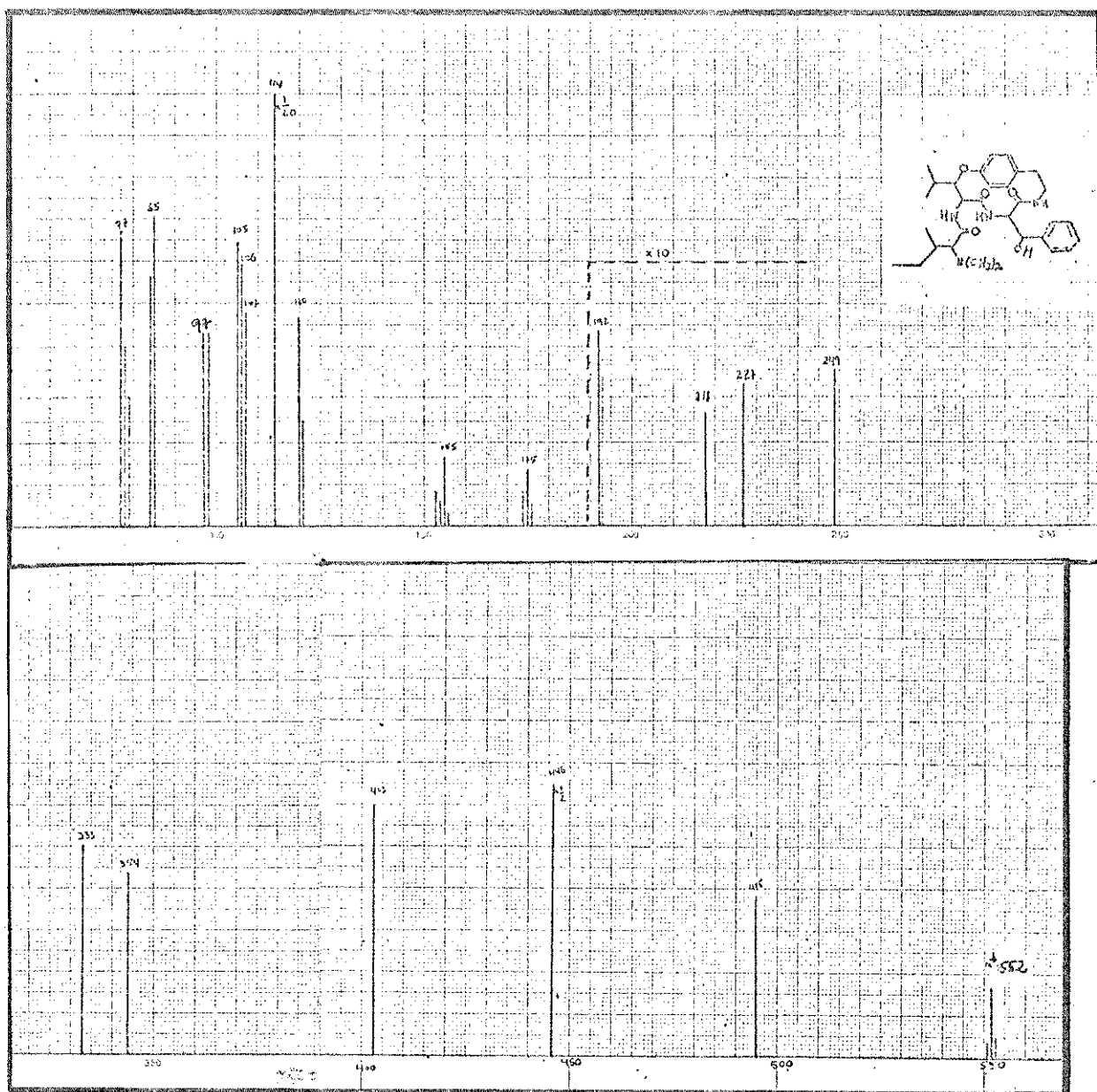


Fig. 4. Espectro de massa de diidroscutianina H.

Oxidação (38)

Oxodihidroscutianina H (46)

10 mg de diidroscutianina H foram oxidadas na presença de 0,03 ml de agente oxidante (27,6 g de CrO_3 e 23 ml de H_2SO_4 em 100

ml de água) em 3,40 ml de acetona. A reação foi deixada a temperatura ambiente por 10 minutos. Adicionou-se água à mistura e amônia até pH básico.

O produto de oxidação foi extraído com éter exaustivamente. O extrato etéreo foi lavado com água, seco com sulfato de sódio, e evaporado a pressão reduzida. O sólido resultante, oxodihidroscutianina H, de Rf 0,35 no sistema de solvente 1, foi recristalizado de acetona e apresentou-se homogêneo em CCD (sistema de solventes 1, 7 e 8). PF = 288-290°.

Espectro de massa (70 eV) (fig. 5)

m/e 550 (M^+), 535, 521, 507, 493, 446, 353, 218, 195, 190, 175, 155, 135, 114 (100%), 107, 105, 97, 85, 77.

Hidrólise ácida⁽³⁰⁾

Uma suspensão de diidroscutianina H (10 mg) em HCl 6N (5 ml) em um tubo pirex selado a vácuo, foi aquecida a 110° durante 24 horas. A solução foi evaporada a pressão reduzida, resultando 8 mg do produto hidrolizado.

Identificação de P-tiramina

Uma parte do resíduo hidrolizado foi dissolvida em água e cromatografada em papel Whatman nº 1, previamente tratado de acordo com Mc Farren⁽⁷⁹⁾, usando tampão de pH = 4,0 (15,42 ml de uma solução 0,067 M de fosfato dissódico e 12,92 ml de uma solução 0,067 M de ácido cítrico) e desenvolvido de forma descendente com a fase superior em n-butanol. Tampão de pH = 4,0. Como referências foram usados o, m, p-tiraminas, e como revelador ácido diazobenzeno sulfônico⁽⁸⁰⁾, identificando-se desta maneira p-tiramina como uni-

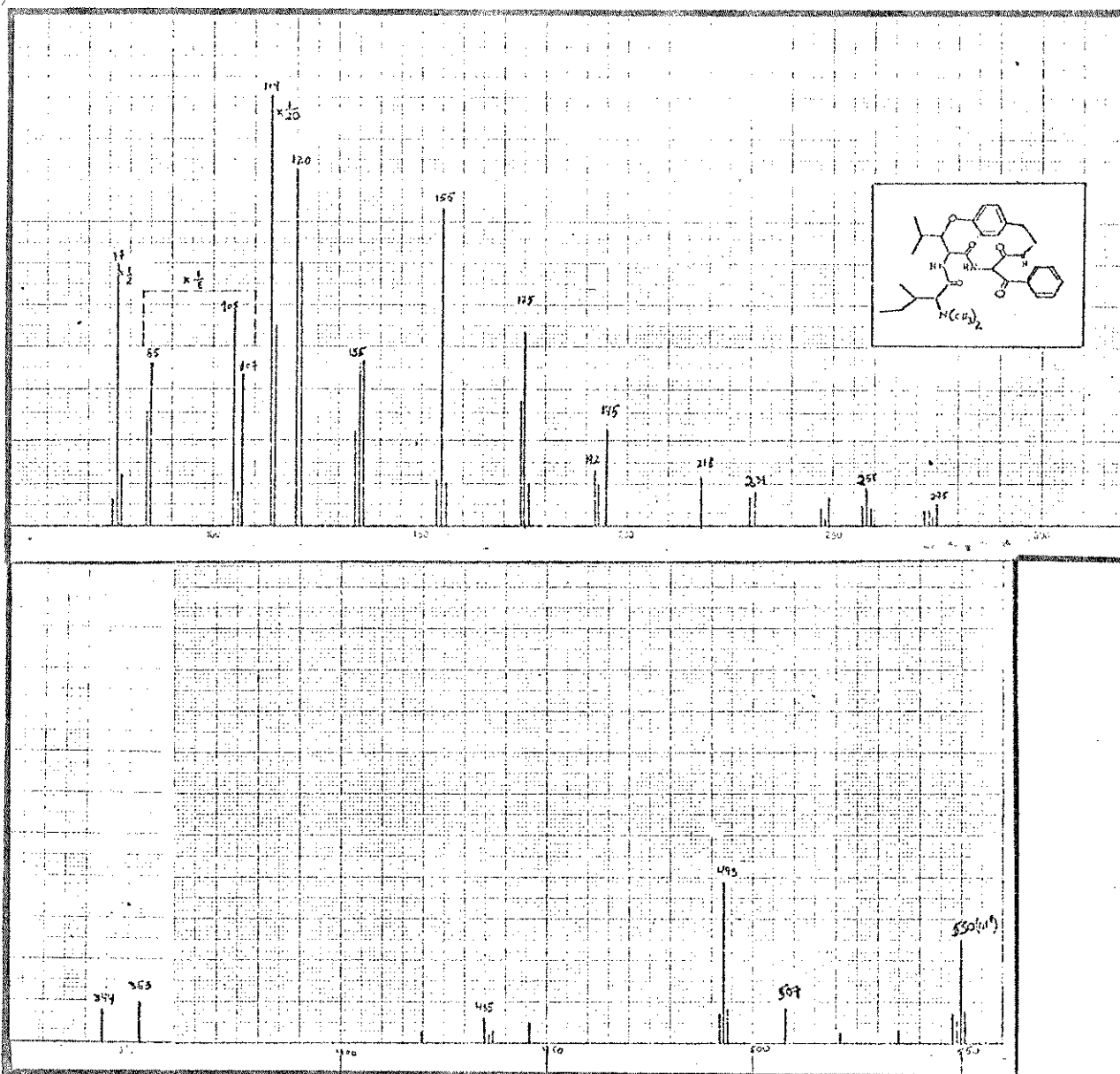


Fig. 5. Espectro de massa de oxodihidroscutianina H.

dade estirilamina.

Scutianina I(48)

As frações 13 a 15 (30 mg) resultaram em um produto cristalino (30 mg) de Rf 0,56, no sistema de solvente 1. Foi recristalizado de clorofórmio-éter e apresentou-se homogêneo em CCD (10 siste-

mas de solventes). PF = 215,2-216,5. Com o mesmo fez-se as seguintes determinações:

Rotação ótica

$$|\alpha|_D^{20} - 266 \quad (C = 0,1, \text{CHCl}_3)$$

Espectro UV em EtOH (fig. 15)

Absorção aromática terminal.

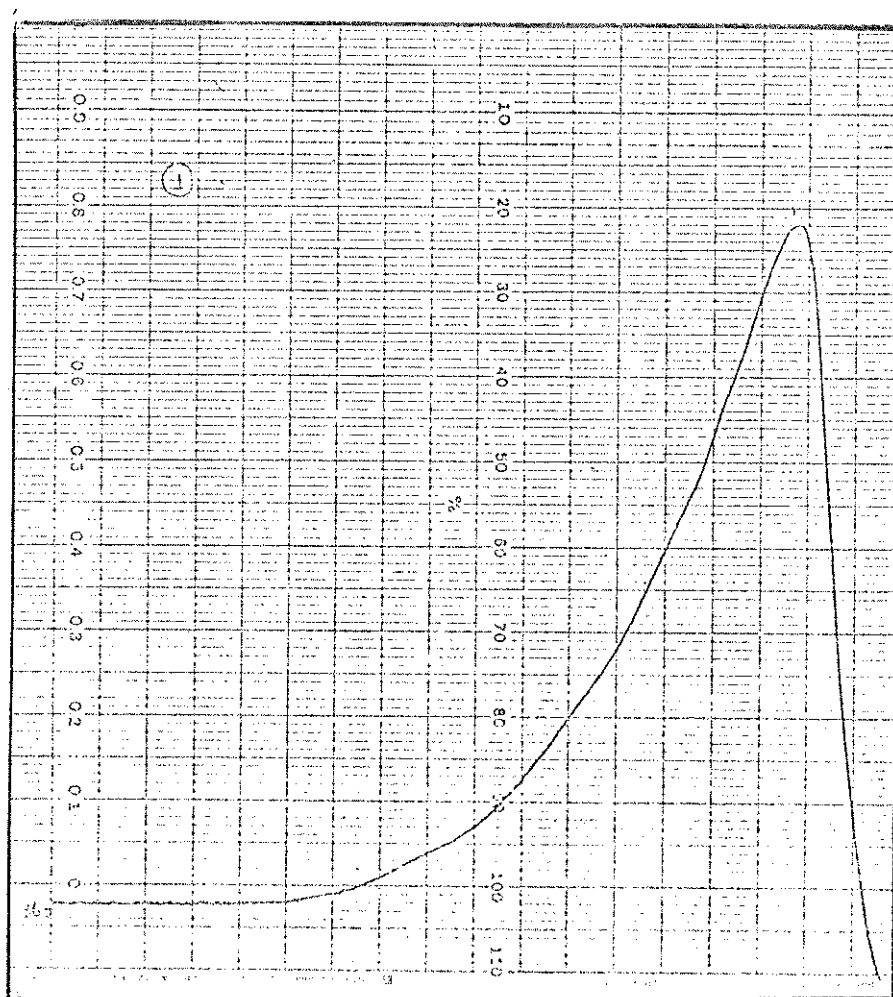


Fig. 15. Espectro de absorção no UV de scutianina I.

Espectro IV (KBr) (fig. 16)

3300 cm^{-1} (NH), 2800 (N-CH₃), 1650 (C=O), 1625 (C=C), 1250 (Fenol-éter).

Espectro de RMN de ¹H a 100 MHz (CDCl₃) (fig. 17)

(ppm): 0,95 (3H, d, j = 6 Hz); 1,2 (3H, d, j = 6 Hz); 2,1

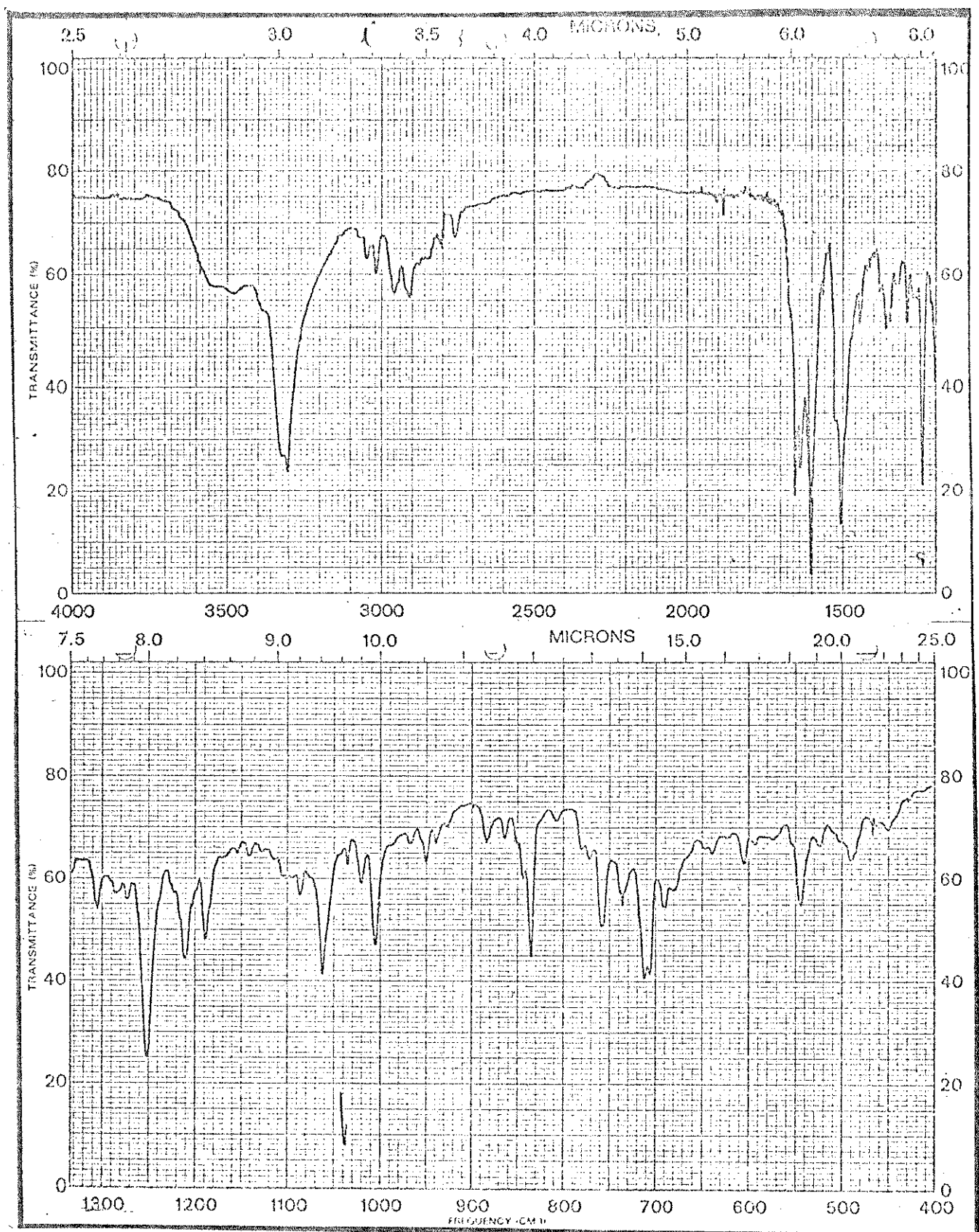


Fig. 16. Espectro de absorção no IV de Scutianina I.

(6H, s).

Espectro de massa (70 eV) (fig. 18)

m/e 584 (M^+), 493, 478, 435, 387, 342, 190, 148 (100%), 135, 120, 107, 106, 105, 77.

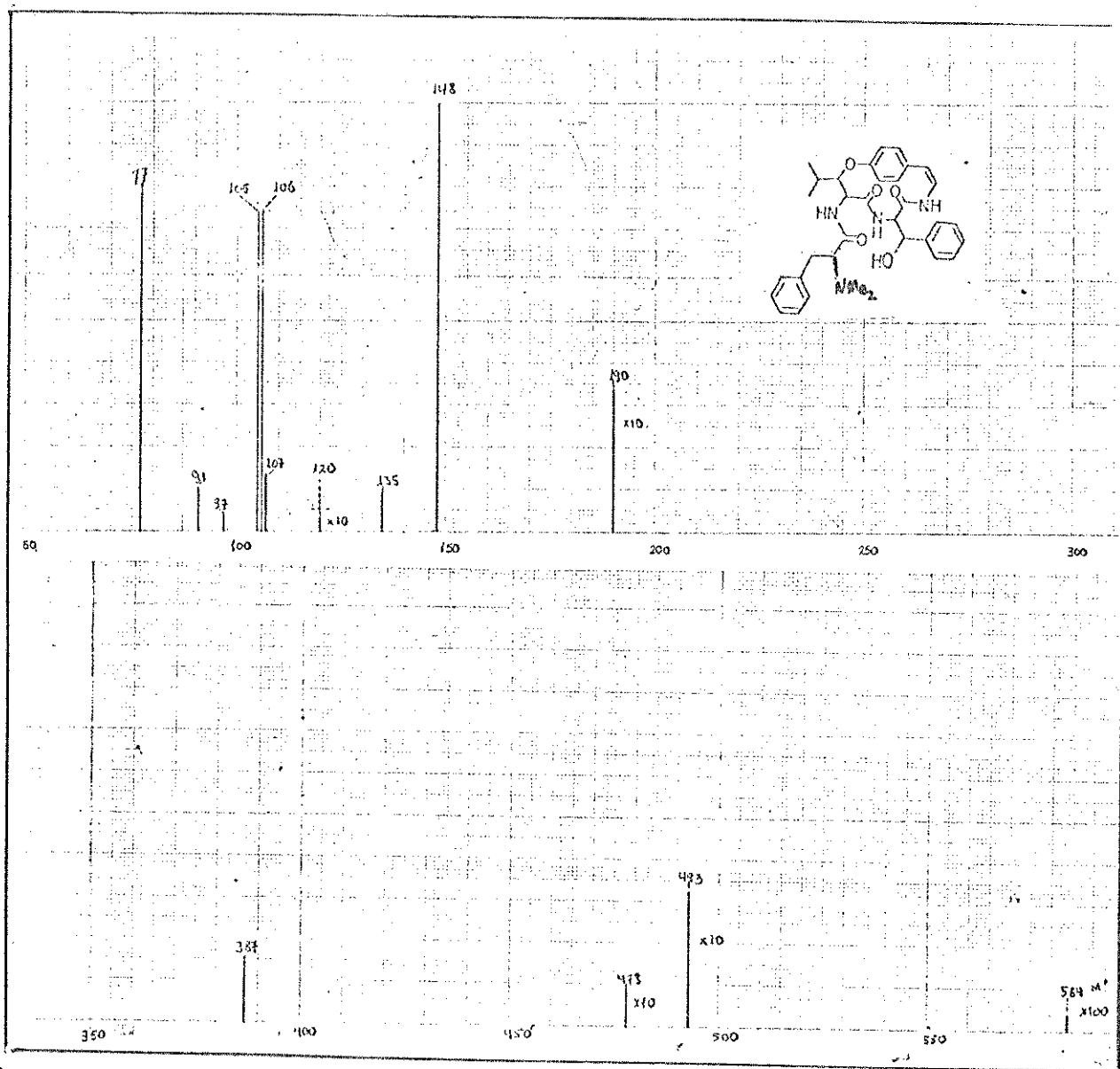


Fig. 18. Espectro de massa de Scutianina I.

Scutianina B(37)

As frações 6 a 10 (50 mg) resultaram em um sólido de Rf 0,70 no sistema de solvente 1. Foi recristalizado de clorofórmio-hexa-

no resultando em 40 mg de um produto cristalino de PF = 248°. A estrutura do alcalóide foi elucidada por comparação em CCD com uma amostra autêntica de PF = 235-236°(38).

Rotação ótica

$$[\alpha]_D^{20} - 290^\circ \text{ (C = 0,1, CHCl}_3\text{)}$$

Espectro IV (KBr) (fig. 19)

3250 cm^{-1} (N-H), 2780 (N-CH₃), 1680 (C=O), 1620 (C=C), 1230 (Fenol-éter).

Espectro de massa (fig. 20)

m/e 477, 404, 337, 190, 148 (100%), 135, 120, 91.

Scutianina C(38)

As frações 16-17 (140 mg) da coluna cromatográfica apresentaram uma mistura de dois alcalóides de Rf muito próximo. A separação por meio de placa preparativa resultou em 70 mg de um alcalóide de Rf 0,65 (sistema de solvente 1), que foi recristalizado de clorofórmio-éter. PF = 263-265°.

A comparação em CCD com uma amostra autêntica de PF = 255-256°(12), associado com os métodos físicos usuais, confirmou o alcalóide como sendo Scutianina C.

Rotação ótica

$$[\alpha]_D^{20} - 182^\circ \text{ (C = 0,1, CHCl}_3\text{)}$$

Espectro UV em EtOH (fig. 21)

Absorção aromática terminal.

Espectro IV (KBr) (fig. 22)

3260 cm^{-1} (N-H), 2780 (N-CH₃), 1640 (C=O), 1250 (Fenol-éter).

Espectro de massa (70 eV) (fig. 23)

m/e 534 (M⁺), 477, 419, 378, 308, 244, 216, 195, 190, 167, 161, 145, 120, 114 (100%), 97, 85.

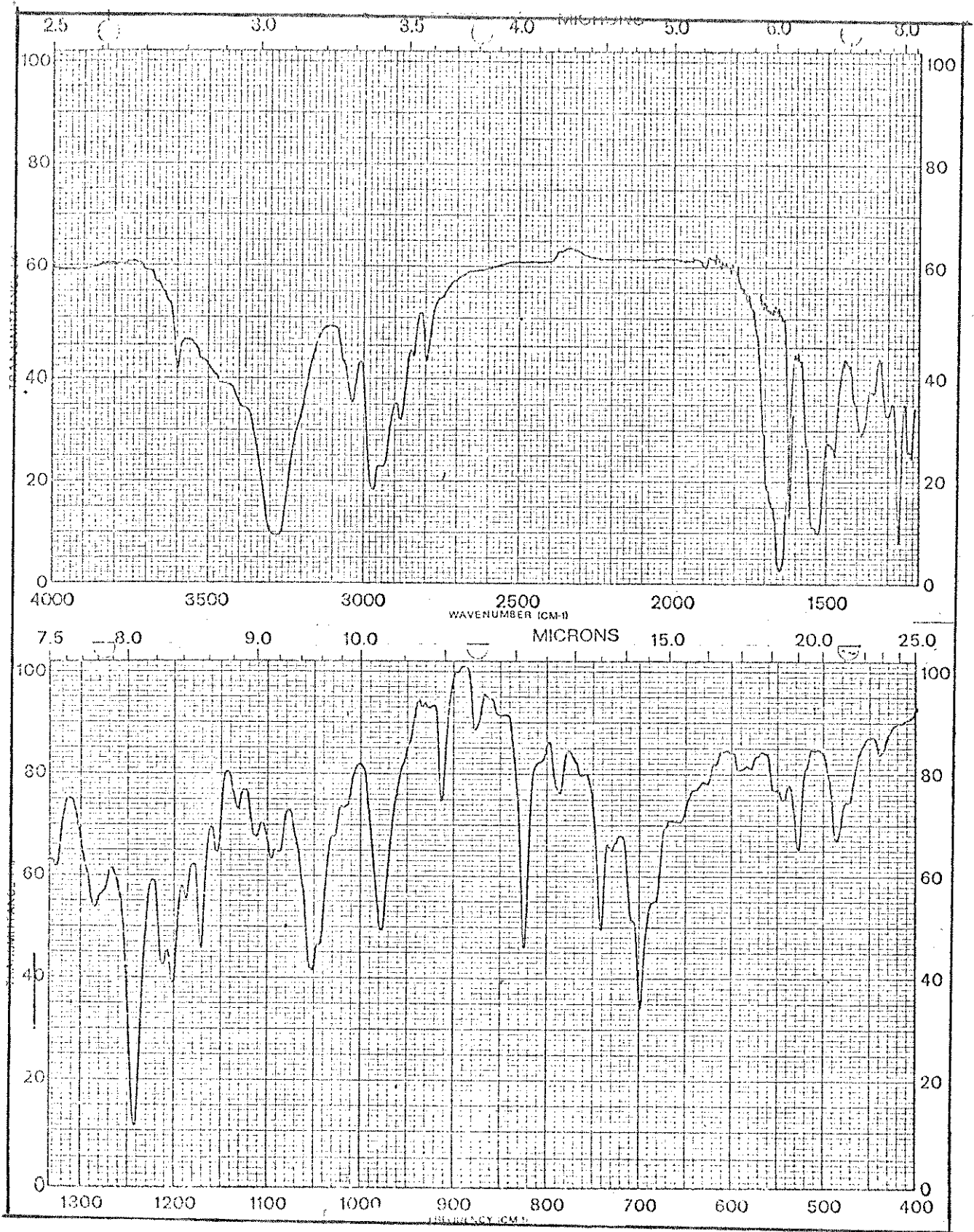


Fig. 19. Espectro de absorção no IV (KBr) de Scutianina B.

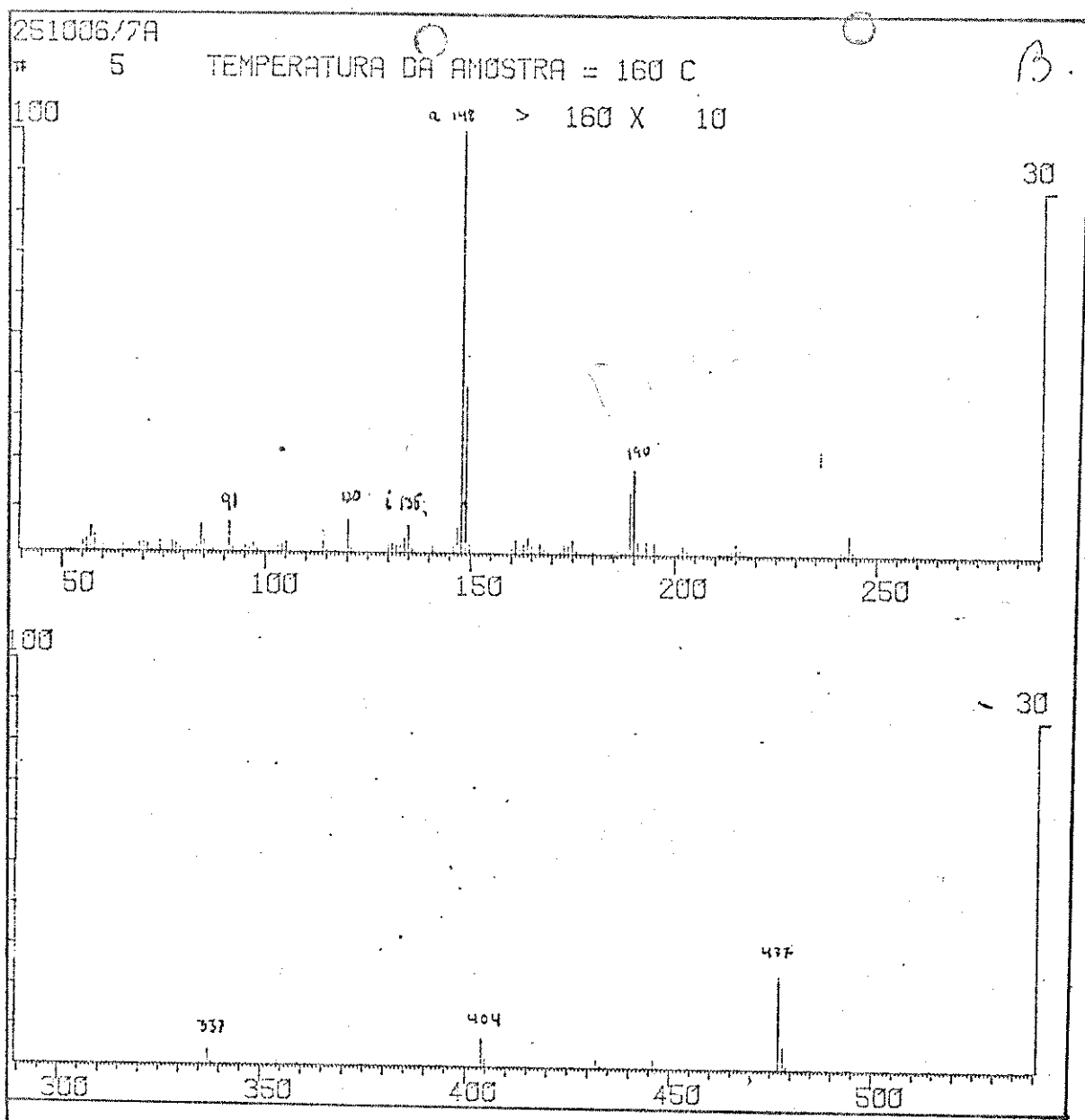


Fig. 20. Espectro de massa de Scutianina B.

Espectro de MIKES (fig. 74)

Scutianina D(39)

As frações 19-20 (350 mg) eram formadas de um sólido de Rf 0,37, no sistema de solvente 1, que recristalizado de clorofórmio-éter resultou um produto cristalino (340 mg) homogêneo em CCD (sistemas de solvente 1, 2, 6, 7 e 8). PF = 217-218°C. A comparação

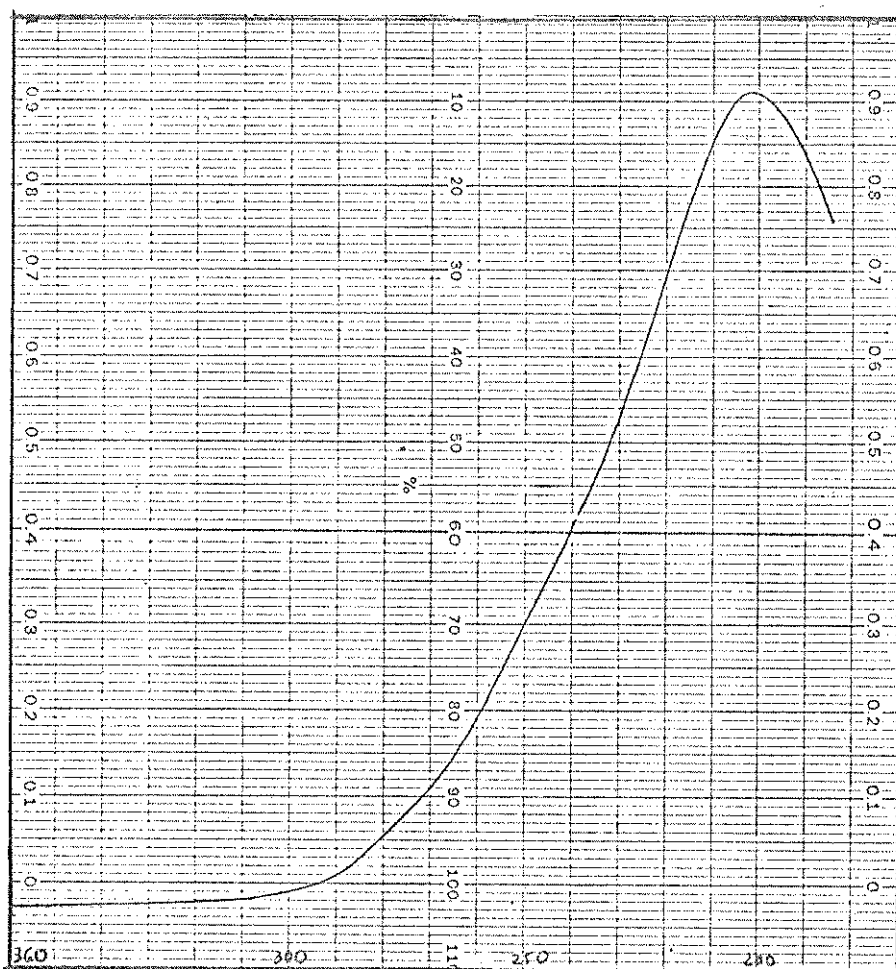


Fig. 21. Espectro de absorção no UV de Scutianina C.

em CCD com uma amostra autêntica de PF = 202-204°C⁽³⁸⁾, associada com os métodos físicos relacionados, confirmou o alcalóide como sendo Scutianina D.

Poder rotatório

$|\alpha|_D^{20}$ - 196° (C = 0,1, CHCl₃).

Espectro de UV em EtOH (fig. 24)

Absorção aromática terminal.

Espectro IV (KBr) (fig. 25)

3600 cm⁻¹ (OH), 3285 (N-H), 2795 (N-CH₃), 1650 (C=O), 1625 (C=C), 1250 (Fenol-éter).

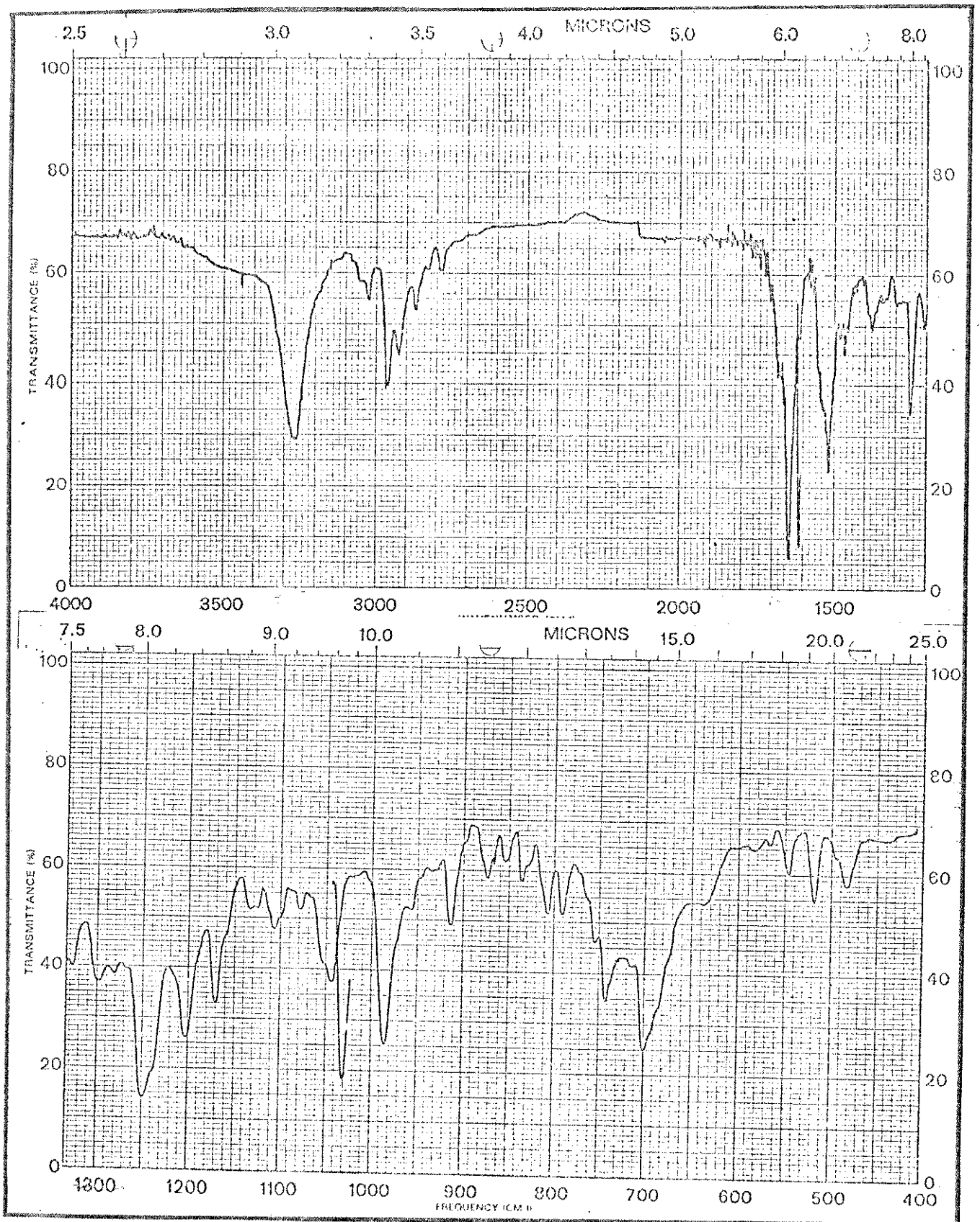


Fig. 22. Espectro de absorção no IV (KBr) de Scutianina C.

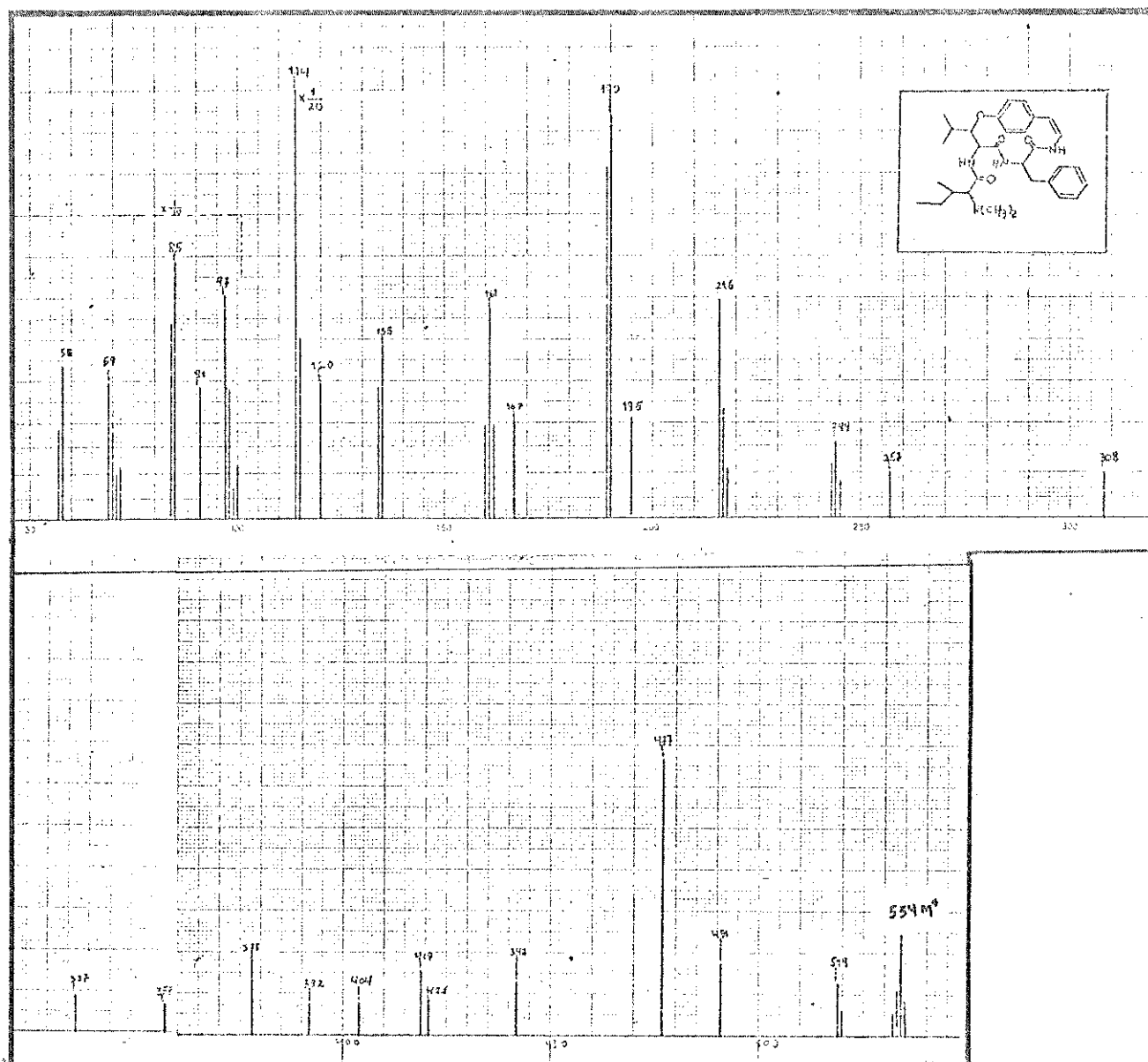


Fig. 23. Espectro de massa de Scutianina C.

Espectro de RMN de ^1H a 100 MHz (CDCl_3) (fig. 26)

δ (ppm): 0,98 (3H, d, $J = 6$ Hz); 1,24 (3H, d, $J = 6$ Hz); 2,23 (6H, s).

Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3) (fig. 65)

δ (ppm) $\left| \text{sp}^2 \right| \text{CH}$: 120,7; 121,2; 122,4; 125,0; 126,0; 126,4; 127,9; 128,2; 129,6; 130,7.

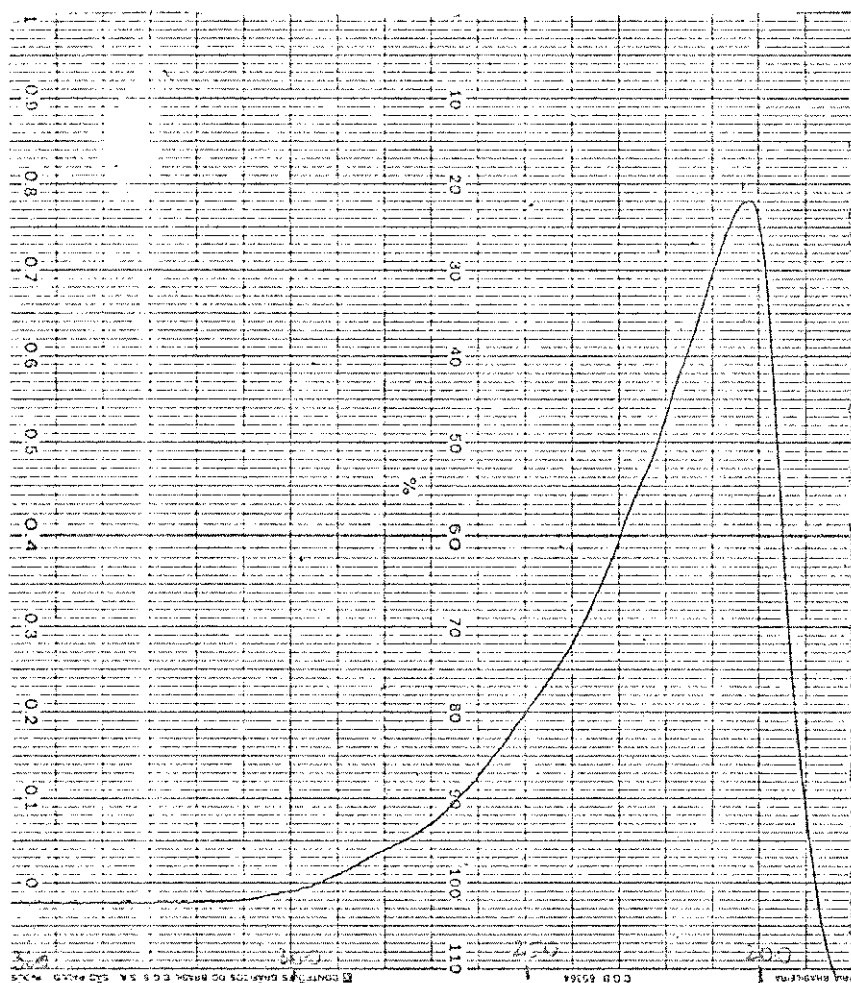


Fig. 24. Espectro de absorção no UV de Scutianina D.

Espectro de massa (70 eV) (fig. 27)

m/e 584 (M^+), 493, 478, 387, 353, 190, 148 (100%), 135, 120, 107, 106, 105, 97, 91, 77.

Scutianina E(41)

A junção das frações 25 a 29, de mesmos Rf, resultou em um óleo amarelado (400 mg), que cristalizado e recristalizado de etanol-água deu um produto (390 mg) de Rf 0,25 no sistema de solvente 1. PF = 110-110,2°. Apresentou-se homogêneo em CCD (sistemas de solventes 1, 2, 6, 7 e 8).

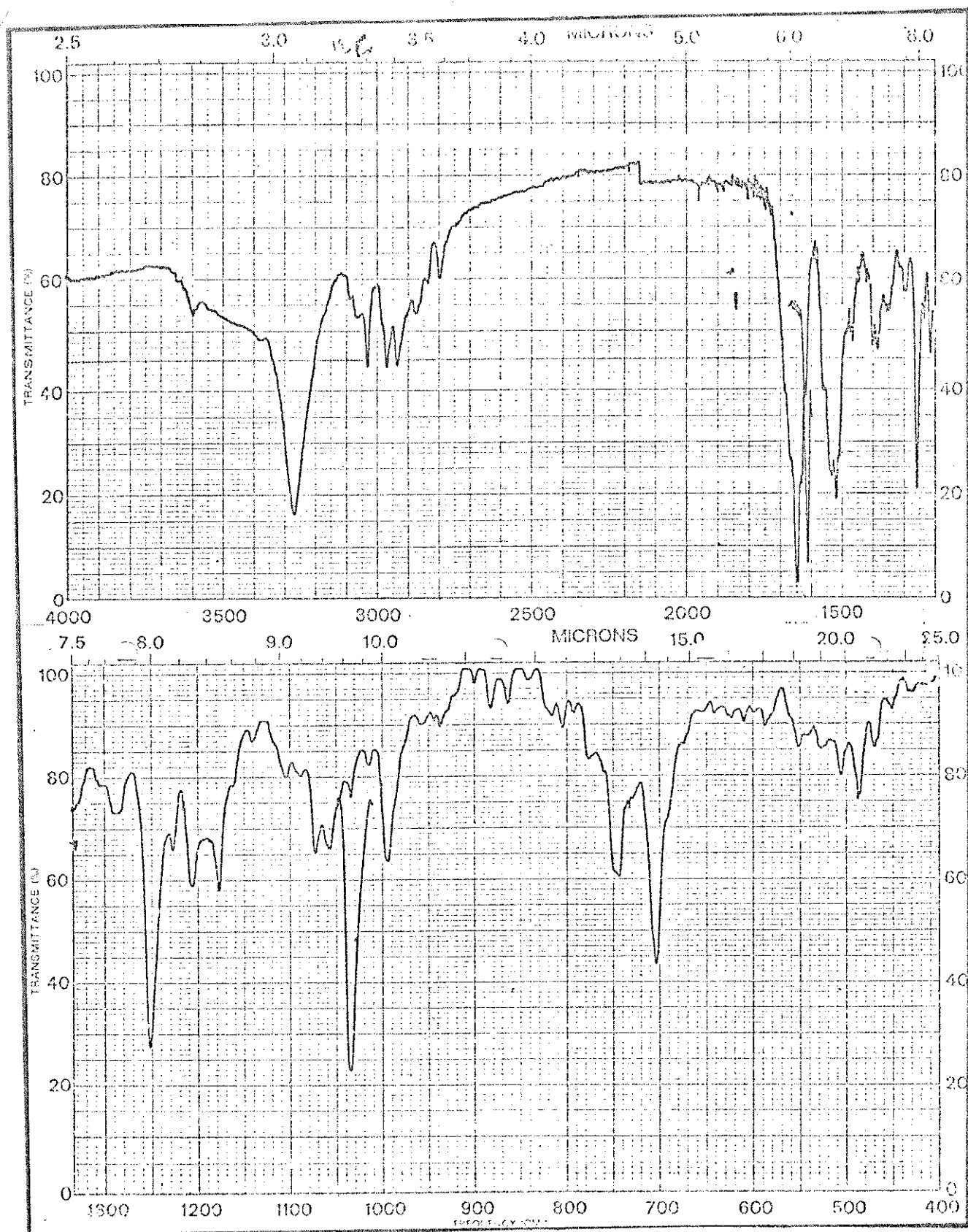


Fig. 25. Espectro de absorção no IV de Scutianina D.

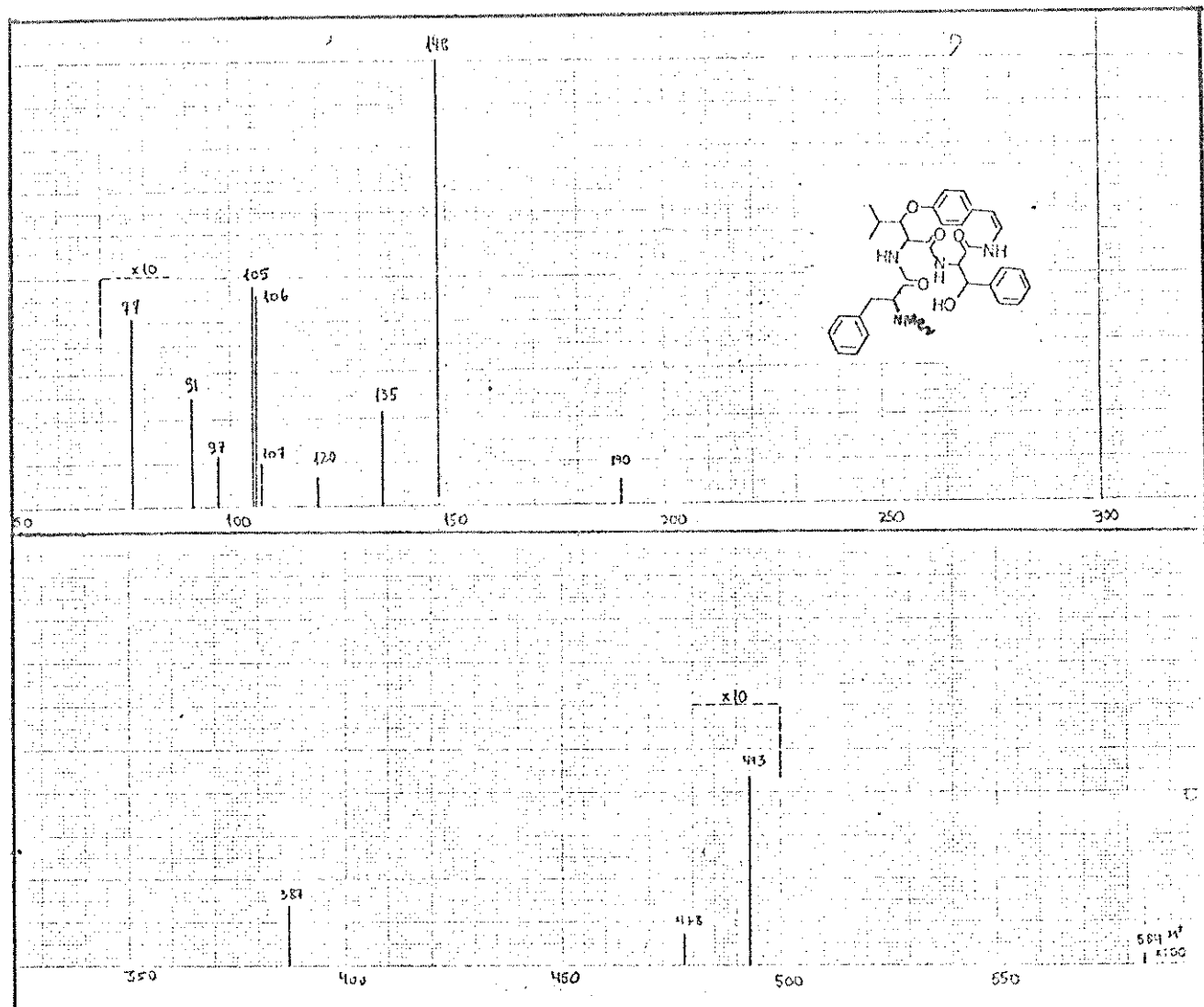


Fig. 27. Espectro de massa de Scutianina D.

A análise dos métodos físicos, abaixo relacionados, permitiu identificar o alcalóide como Scutianina E.

Rotação ótica

$$[\alpha]_D^{20} - 21 \text{ (C = 0,1, HCl}_3\text{)}$$

Espectro UV em EtOH (fig. 28)

Espectro IV (KBr) (fig. 29)

3280 cm^{-1} (N-H); 2800 (N-CH₃); 1650 (C=O); 1625 (C=C); 1250 (fenol-éter).

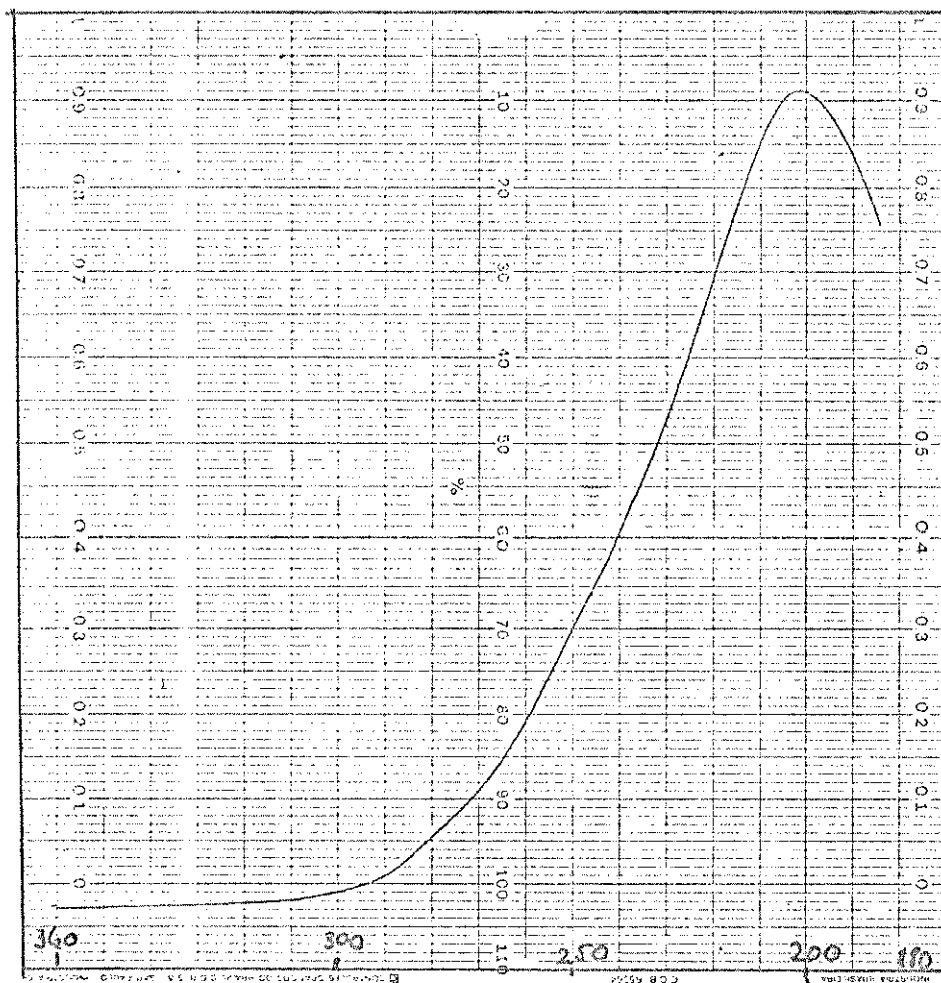


Fig. 28. Espectro de absorção no UV de Scutianina E.

Espectro de RMN de ^1H a 100 MHz em CDCl_3 (fig. 30)

δ (ppm): 1,11 (6H, d, $J = 6\text{Hz}$); 2,34 (6H, s).

Espectro de RMN de ^{13}C em CDCl_3 (fig. 66)

δ (ppm) $\left| \text{sp}^2 \right|$ CH: 121,0; 122,5; 123,1; 125,2; 126,2; 127,7;
128,1; 128,2; 129,2; 130,0; 131,1.

Espectro de massa (70 eV) (fig. 31)

m/e 584 (M^+), 493, 478, 387, 353, 190, 148 (100%), 135, 120,
107, 106, 105, 77.

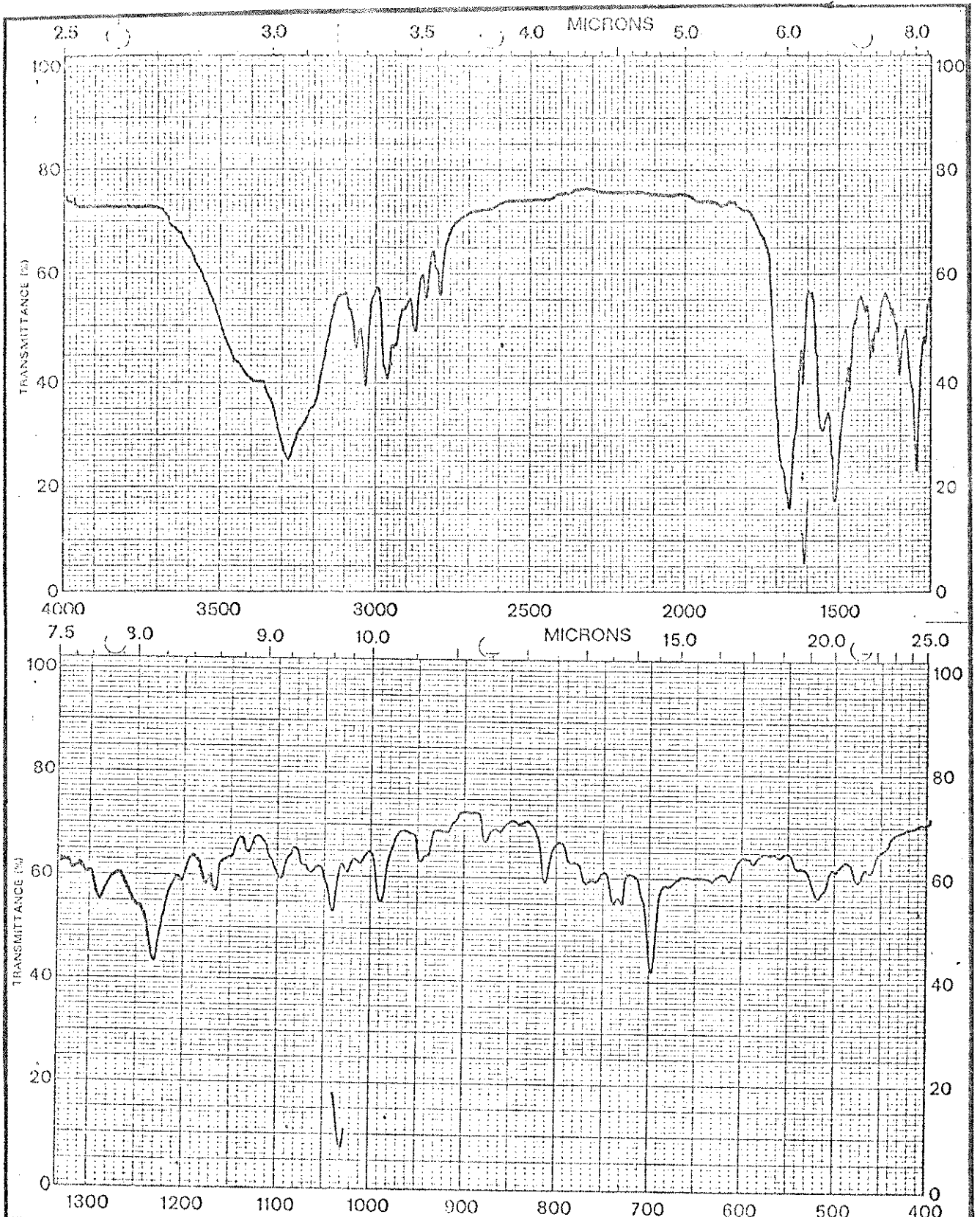


Fig. 29. Espectro de absorção no IV de Scutianina E.

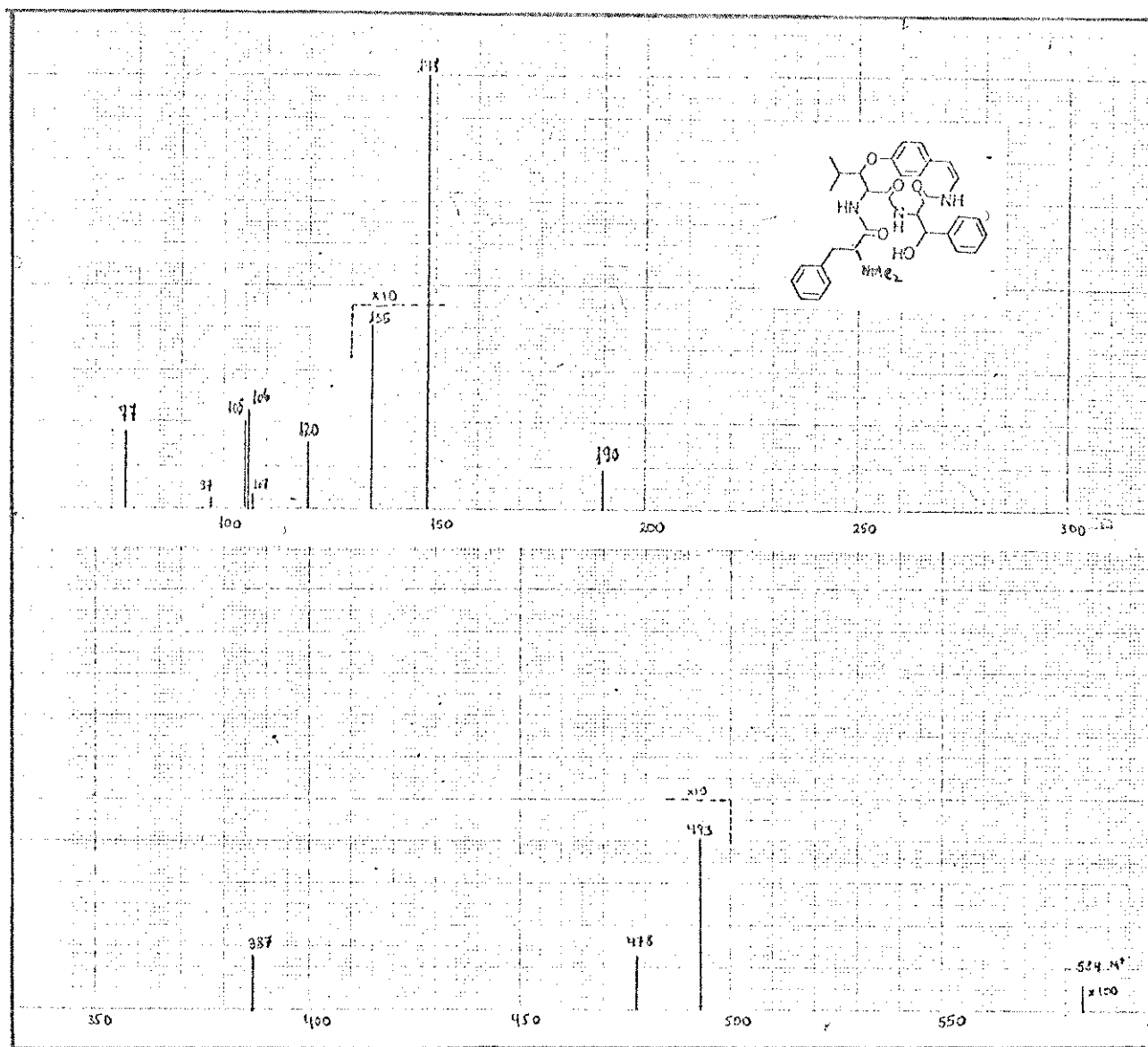


Fig. 31. Espectro de massa de Scutianina E.

Acetilação (17)

O-acetil scutianina D (49)

A 150 mg de scutianina D (39) juntou-se 18 ml de piridina e 18 ml de anidrido acético. Deixou-se 24 horas em repouso a temperatura ambiente. Após a reação ter-se completado, o que se veri-

ficou por CCD, adicionou-se 30 ml de água e o produto acetilado foi extraído exaustivamente com éter. A solução etérea foi lavada com água (2 x 20 ml) e sêca sobre sulfato de sódio. A piridina e o ácido acético residuais foram eliminados por sucessivas adições e evaporações de etanol a vácuo.

O resíduo resultante (112 mg) de Rf 0,45 no sistema de solvente 1, foi recristalizado de etanol-água e apresentou-se homogêneo em CCD (sistemas de solventes 1, 6, 7 e 8). PF = 236°.

Poder rotatório

$$[\alpha]_D^{20} = -163 \text{ (C = 0,1, CHCl}_3\text{)}$$

Espectro de IV (KBr) (fig. 32)

3320 cm^{-1} (N-H), 2780 (N-CH₃), 1750 (acetato), 1650 (C=O), 1620 (C=C), 1230 (fenol-éter).

Espectro de RMN de ¹³C em CDCl₃ (fig. 67)

δ (ppm) $\left| \text{sp}^2 \right|$ CH: 118,9; 121,4; 122,6; 124,9; 126,4; 128,4; 129,0; 129,8.

O-acetil scutianina E(50)

150 mg de scutianina E (41) foram acetilados nas mesmas condições descritas anteriormente. O produto acetilado, cristalino (105 mg), de Rf 0,35 no sistema de solvente 1, foi recristalizado de etanol-água e apresentou-se homogêneo em CCD (sistemas de solventes 1, 2, 6, 7 e 8). PF = 105°.

Rotação Ótica

$$[\alpha]_D^{20} + 57,9 \text{ (C = 0,1, CHCl}_3\text{)}.$$

Espectro de RMN de ¹³C em CDCl₃ (fig. 68)

δ (ppm) $\left| \text{sp}^2 \right|$ CH: 119,4; 121,5; 123,0; 125,2; 126,8; 127,8; 128,3; 129,2; 130,0; 131,1.

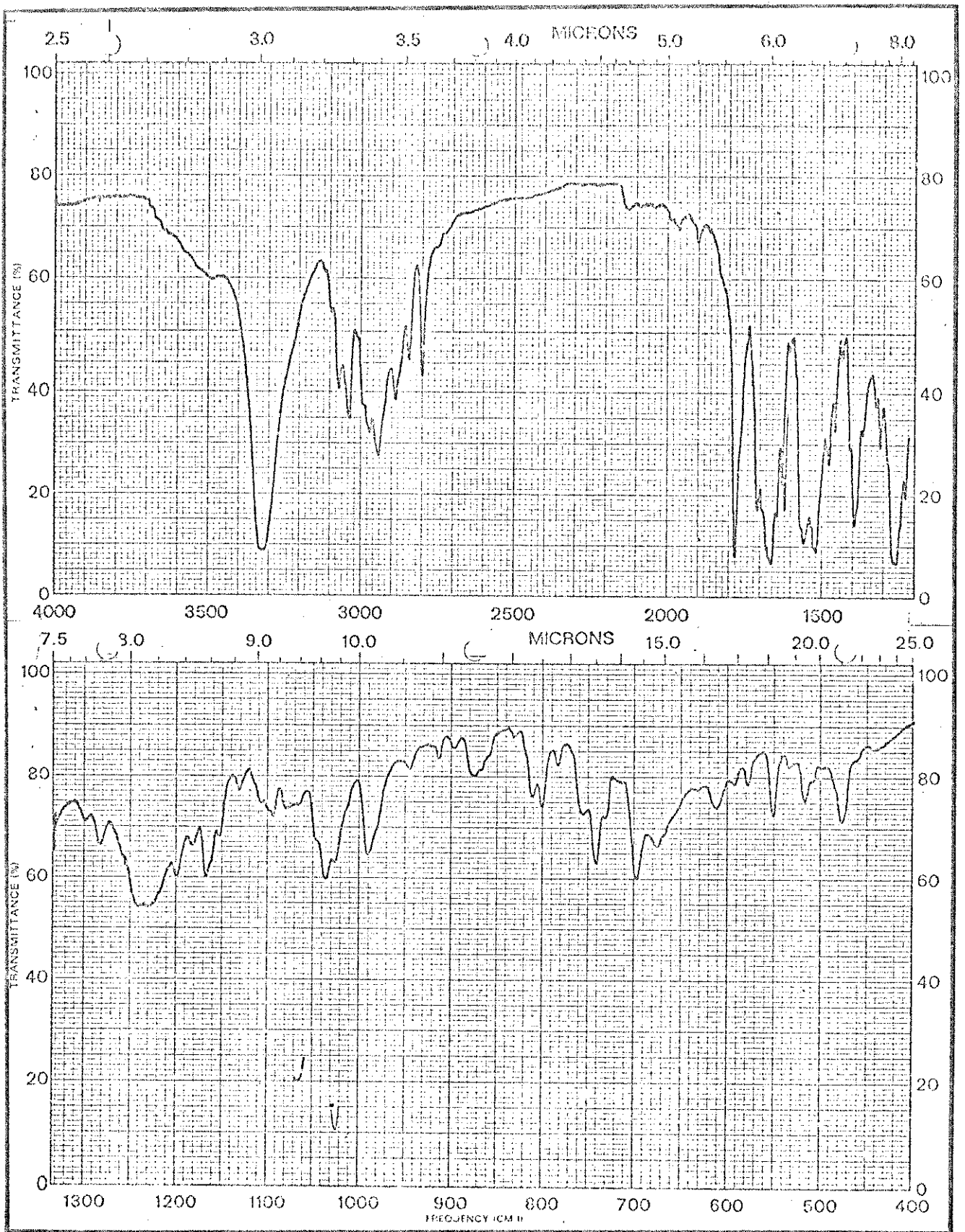


Fig. 32. Espectro de absorção no IV de O-acetil scutianina D.

Espectro de massa (70 eV) (fig. 33)

m/e 626 (M^+), 583, 567, 535, 475, 190, 148 (100%), 135, 120, 107, 97, 91, 77.

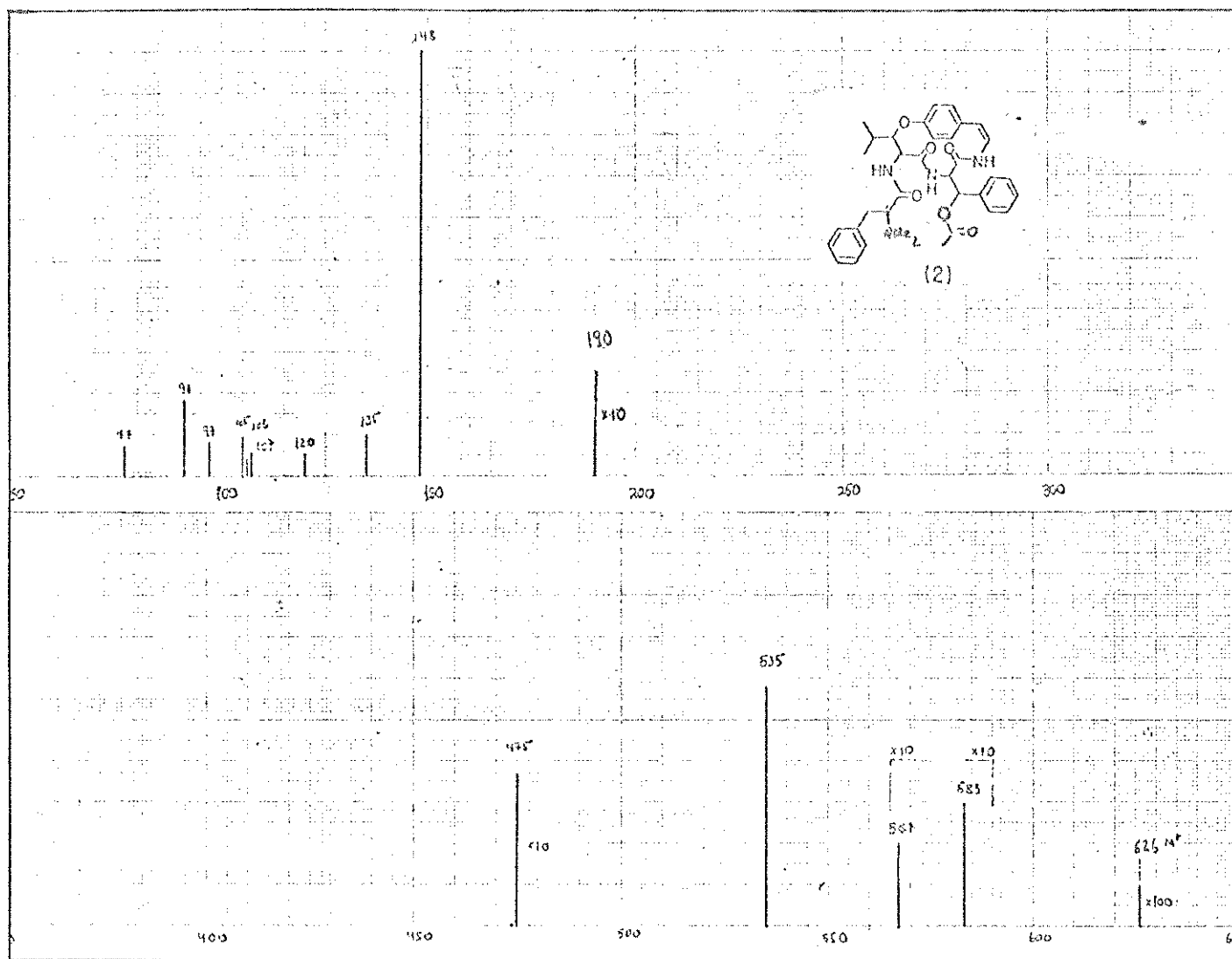


Fig. 33. Espectro de massa de O-acetil scutianina E.

Scutianeno C (40)

As frações 31-32 resultaram em um composto cristalino (65 mg) de Rf 0,19 no sistema de solvente 1. Foi recristalizado de etanol-água e apresentou-se homogêneo em CCD (sistemas de solventes 1, 3 e 8). PF = 236,2-237,1^o. A comparação com uma amostra autêntica⁽¹⁸⁾ confirmou o composto como sendo Scutianeno C (40).

Espectro de UV em EtOH (fig. 34)

λ max. 207 nm (log ϵ 4,7); 218 (4,68); 223 (4,64); 2,80 (4,66)

Espectro de IV (KBr) (fig. 35)

3380 cm⁻¹, 3350, 3300, 1640.

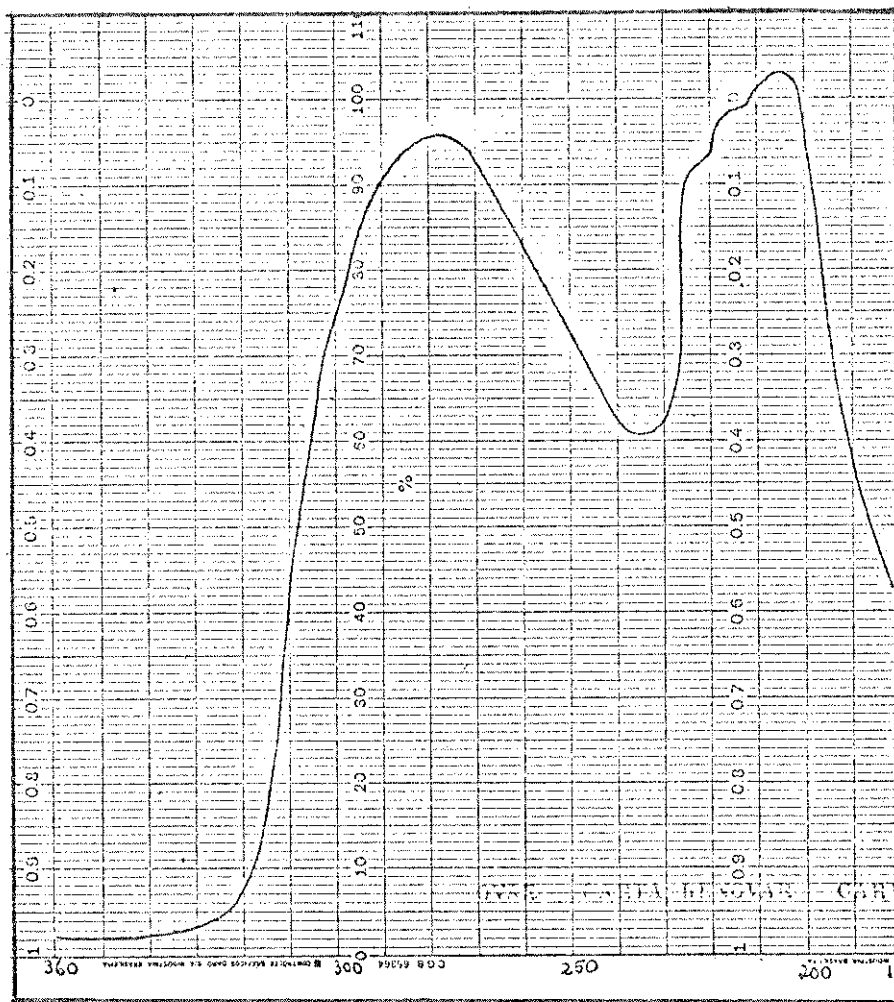


Fig. 34. Espectro de absorção no UV de Scutianeno C.

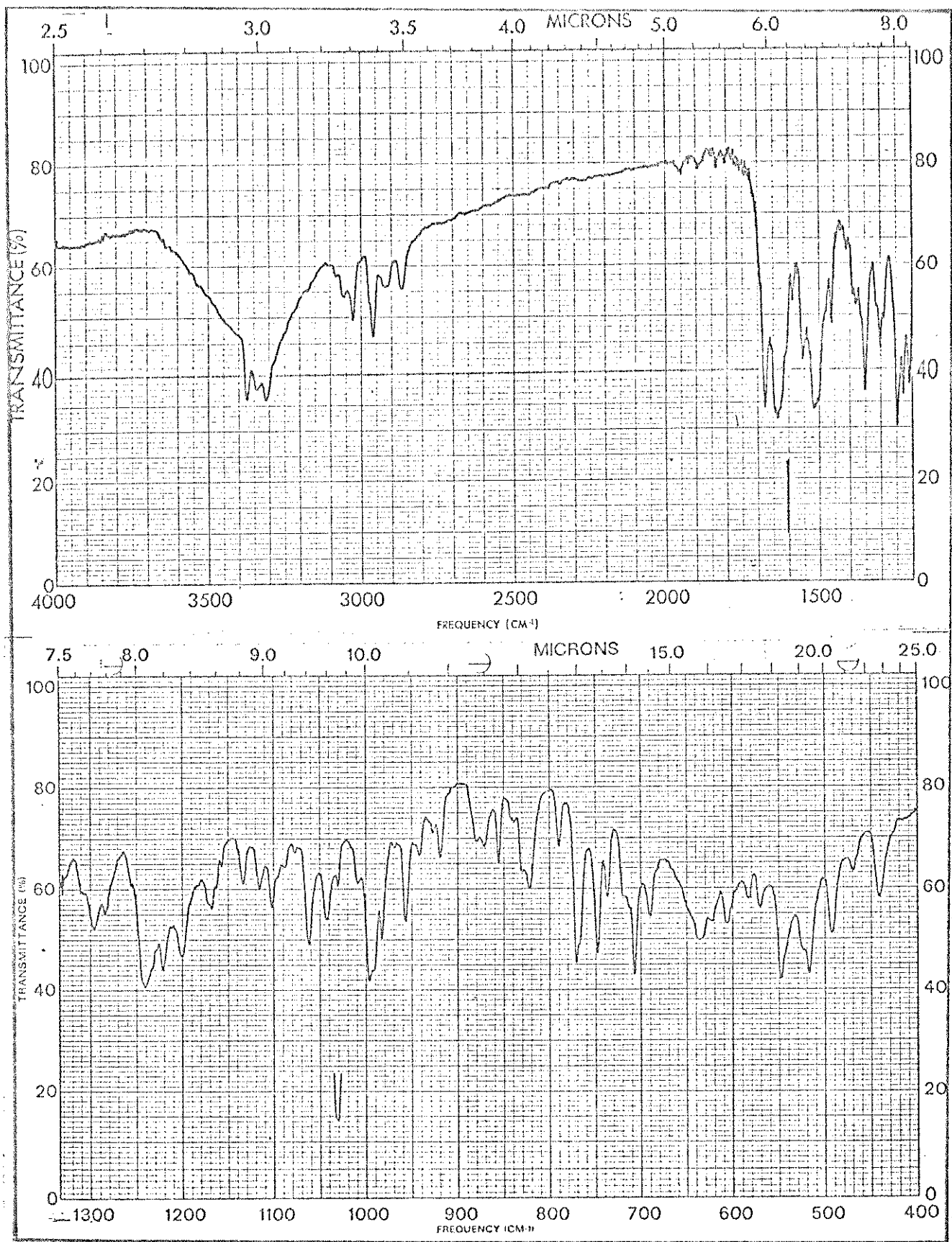


Fig. 35. Espectro de absorção no IV de Scutianeno C.

Reação de degradação de Hoffmann de Scutianina E

5 mg de Scutianina E (41) foram dissolvidas em 5 ml de acetona. Adicionou-se 0,1 ml de iodeto de metila e aqueceu-se a temperatura de refluxo durante 4 horas. Após este tempo, a solução foi resfriada, o solvente evaporado a pressão reduzida e o resíduo resultante foi dissolvido em metanol-água (1:1) (2,5 ml) sendo transferido para uma coluna de resina de troca iônica Amberlite Ira-400, tratada segundo a literatura⁽⁶⁷⁾. A coluna foi eluída com uma mistura de metanol-água (1:1) e as frações coletadas (4 x 1 ml) foram juntadas, concentradas a pressão reduzida (~1 ml) e a seguir mantidas em banho a 80°, durante três horas. O produto foi resfriado e extraído com éter (2 x 3 ml). Os extratos etéreos foram evaporados a pressão reduzida. O resíduo resultante (4,5 mg) foi cromatografado em CCD juntamente com Scutianeno C, revelando-se desta maneira que eram diferentes.

Espectro UV em EtOH (fig. 36)

5.2. Discária febrífuga Mart: Isolamento dos alcalóides da casca da raiz.

5. 2.1. Materiais e Métodos

Foram os mesmos já mencionados para o estudo da S. buxifolia.

5. 2.2. Isolamento

Coleta: A casca da raiz da D. febrífuga Mart foi igualmente coletada pessoalmente, no município de Santana do Livramento, RS, durante o mês de julho de 1976.

Extração: O material seco rendeu 1200 g, que sofrendo o mesmo método de extração descrito para S. buxifolia, resultou em 330 g

(27%) de extrato bruto.

O processamento de extrato bruto, conforme o esquema 9 apresentado anteriormente, resultou em 1,570 g de um sólido branco, constituído por cinco bases principais, reveladas com reativo de Dragendorff.

5. 2.3. Isolamento de alcalóides

Neste caso, usamos igualmente cromatografia em coluna para separar os alcalóides, utilizando-se como suporte sílica H, e o mesmo sistema eluente descrito para S. buxifolia.

As frações, em número de 45, coletadas da coluna cromatográfica, estão relacionadas na tabela XV.

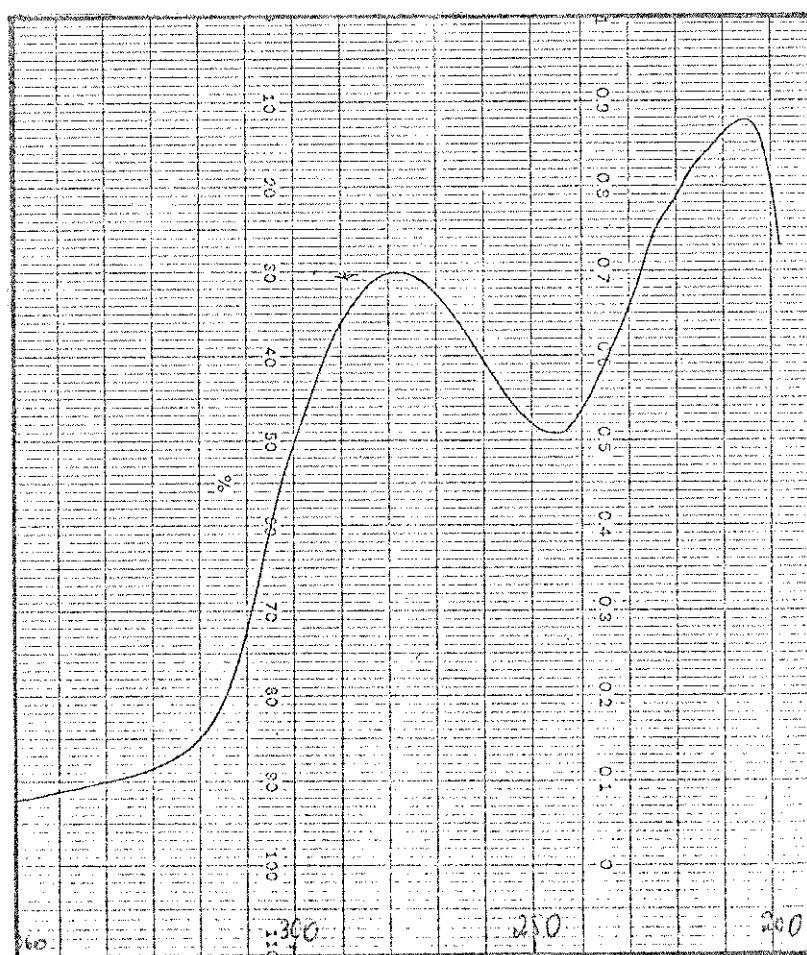


Fig. 36. Espectro de absorção no UV do produto da reação de Hoffmann de Scutianina E.

Tabela XV

Cromatografia do material contendo alcalóides (1,570 g).

Frações	Sistema eluente	Frações combinadas	Alcaloides	Pêso (g)
1-5	clorofórmio	1-5	-	0,120
6-20	clorofórmio- metanol 0,5%	6-10	D ₆₋₁₀	0,30
		11-20	D ₆₋₁₀ + D _{-y}	0,110
21-30	clorofórmio- metanol 1%	21-23	D _{-y} + Discarina X	0,120
		24-30	Discarina X	0,160
31-34	clorofórmio- metanol 2%	31-34	D _v	0,105
35-38	clorofórmio- metanol 3%	35-38	Discarina B	0,085
39-40	clorofórmio- metanol 5%	39-40	D _z	0,040
41-45	acetona	41-45	-	0,350
Total:				1,400

5.24 Alcalóides peptídicos

Discarina X

As frações 24-30 (160 mg) constituiram-se de um sólido cristalino de R_f 0,63 no sistema de solvente I. Foi recristalizado de etanol-água, resultando em 150 mg de um produto homogêneo em CCD (10 sistemas de solventes). PF = 228-229,5°. Fez-se as seguintes determinações:

Rotação ótica

$[\alpha]_D^{20} = -225^\circ$ (C = 0,1, CHCl_3)

Espectro Uv em EtOH (fig. 37)

Absorção aromática terminal.

Espectro IV (KBr) (fig. 38)

3270 cm^{-1} (N-H), 2270 cm^{-1} (N- CH_3), 1640 cm^{-1} (C=O), 1240 cm^{-1} (fenol-éter)

Espectro de RMN de ^1H a 100MHz em $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$ (fig. 39)

$\delta(\text{ppm})$: 0,6 - 1,05 (15 H, m); 1,28 (3 H, d, 6Hz); 2,28 (6 H,s)

Espectro de RMN de ^{13}C em $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$ (fig. 69)

$\delta(\text{ppm})$ / sp^2 / CH: 122,3; 122,8; 125,5; 128,8; 130,5; 131,5.

Espectro de massa (70 eV) (fig. 40)

m/e 550 (M^+); 485, 274, 210, 190, 182, 135, 114 (100%), 97, 86, 72.

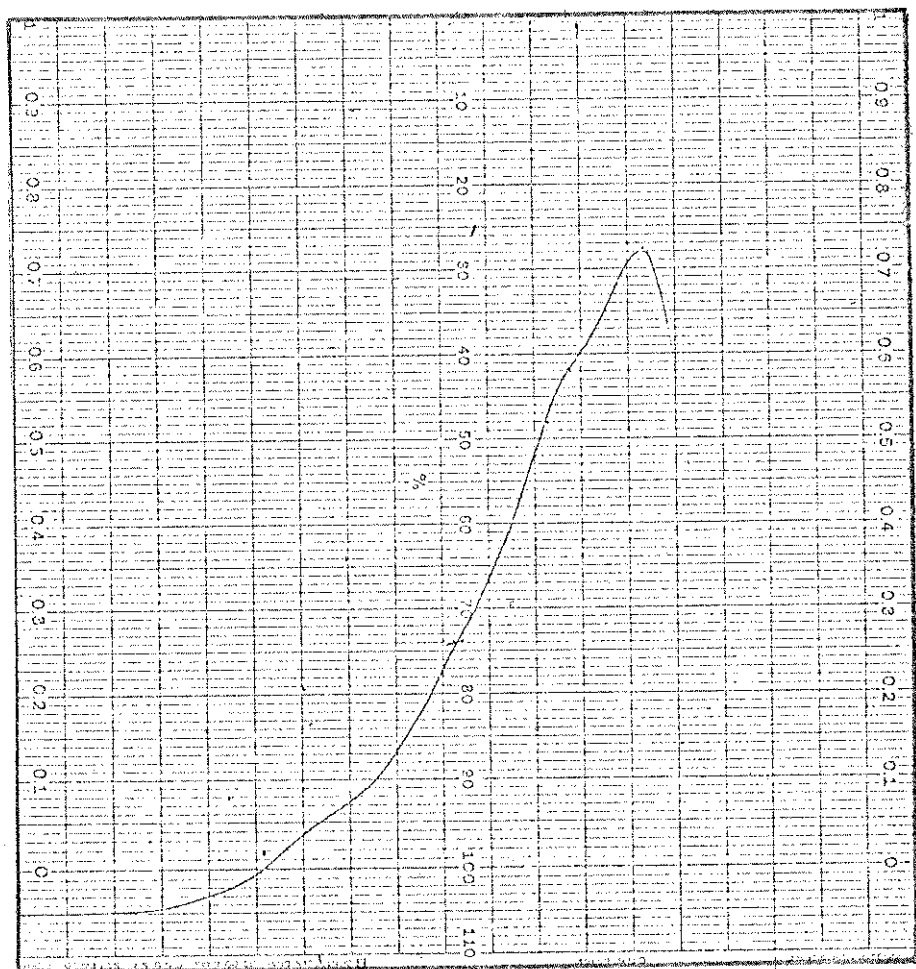


Fig. 37. Espectro de absorção no UV de discarina X.

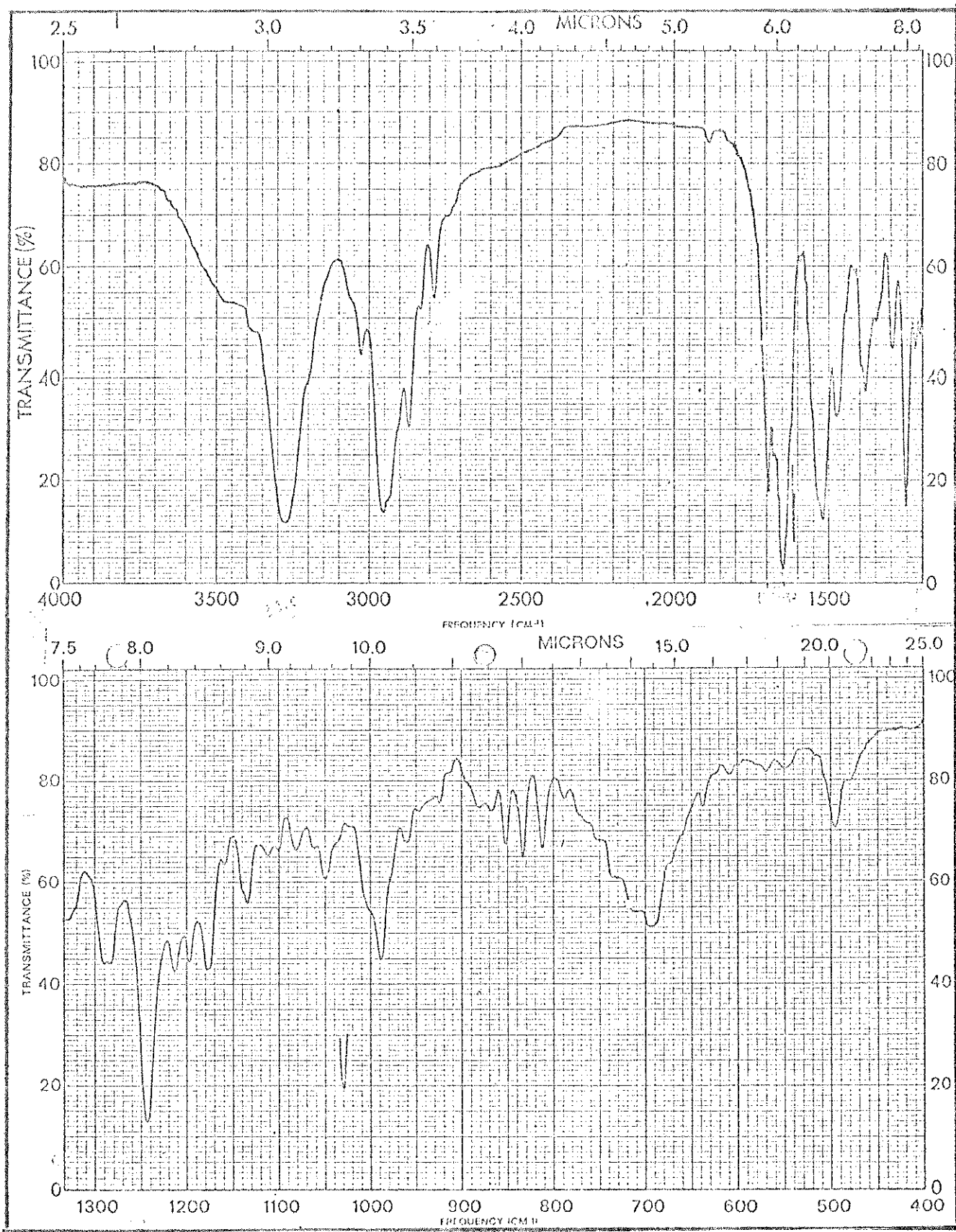


Fig. 38. Espectro de absorção no IV de discarina X.

Discarina B(52)

As frações 35-38 (85 mg) eram constituídas por um sólido de Rf 0,36 no sistema de solvente 1. Foi recristalizado com clorofórmio-éter e apresentou-se homogêneo em CCD (sistemas de solventes 1, 4, 5 e 8). PF = 238-240°.

A comparação em CCD com uma amostra autêntica⁽³⁰⁾ confirmou o alcalóide como Discarina B (52).

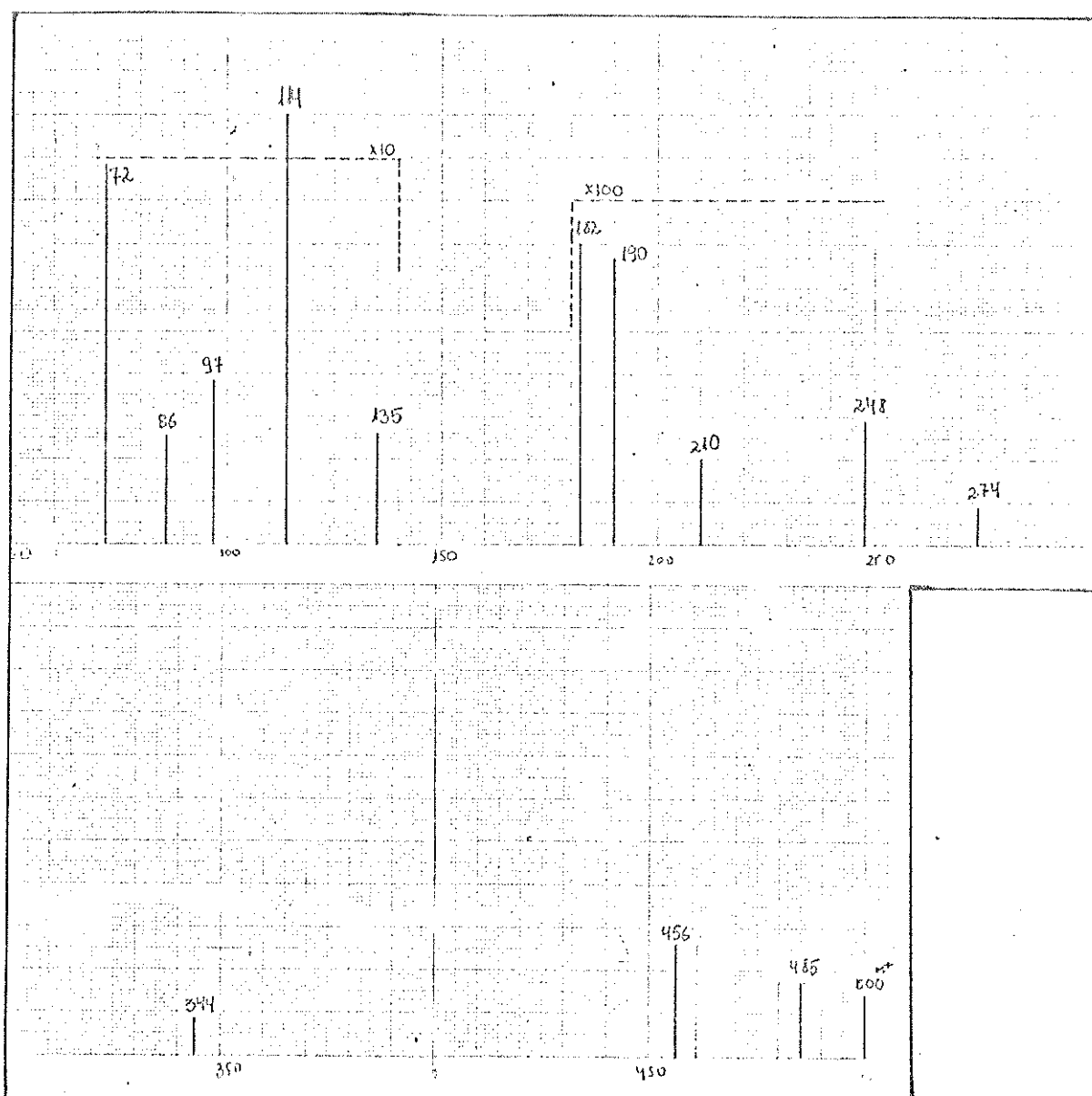


Fig. 40. Espectro de massa de discarina X.

Rotação Ótica

$$|\alpha|_D^{20} = -172,8 \quad (C = 0,1, \text{CHCl}_3)$$

Espectro de UV em EtOH (fig. 41)

λ max 226 nm (log ϵ 4,75); 272 (4,43); 281 (4,42); 288 (4,34).

Espectro IV (KBr) (fig. 42)

3280 cm^{-1} (N-H), 2780 (N-CH₃), 1640 (C=O), 1240 (fenol-éter).

Espectro de massa (20 eV) (fig. 43)

m/e 573 (M⁺), 114 (100%).

Alcaloide D₋Y

PF = 297-298°.

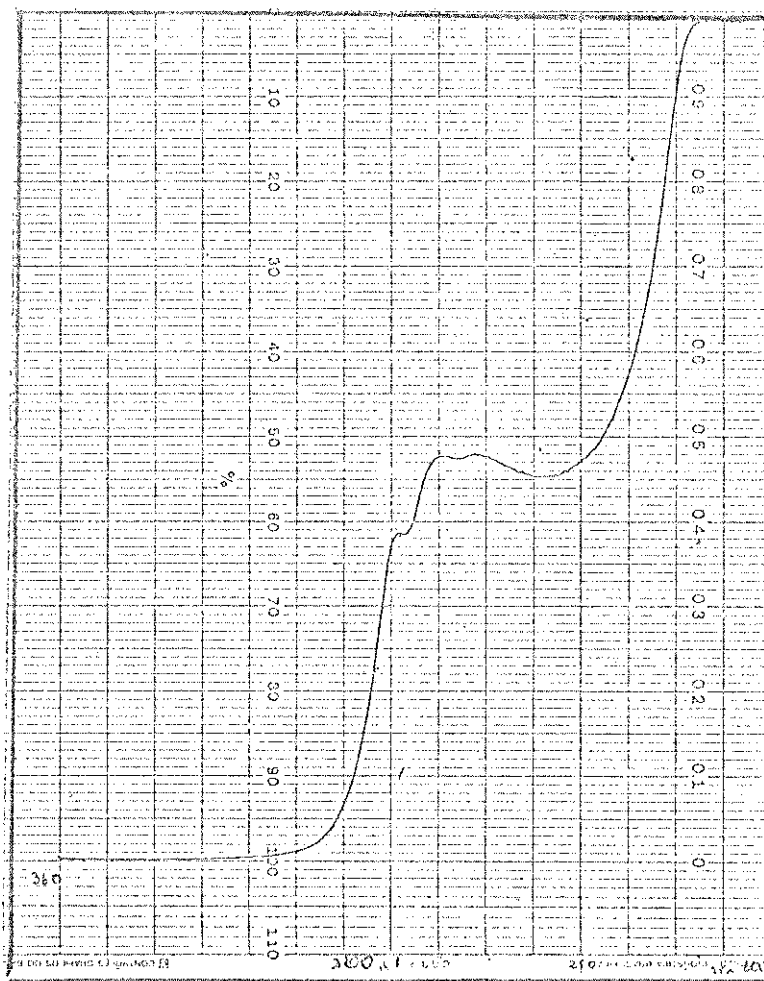


Fig. 41. Espectro de absorção no UV de discarina B.

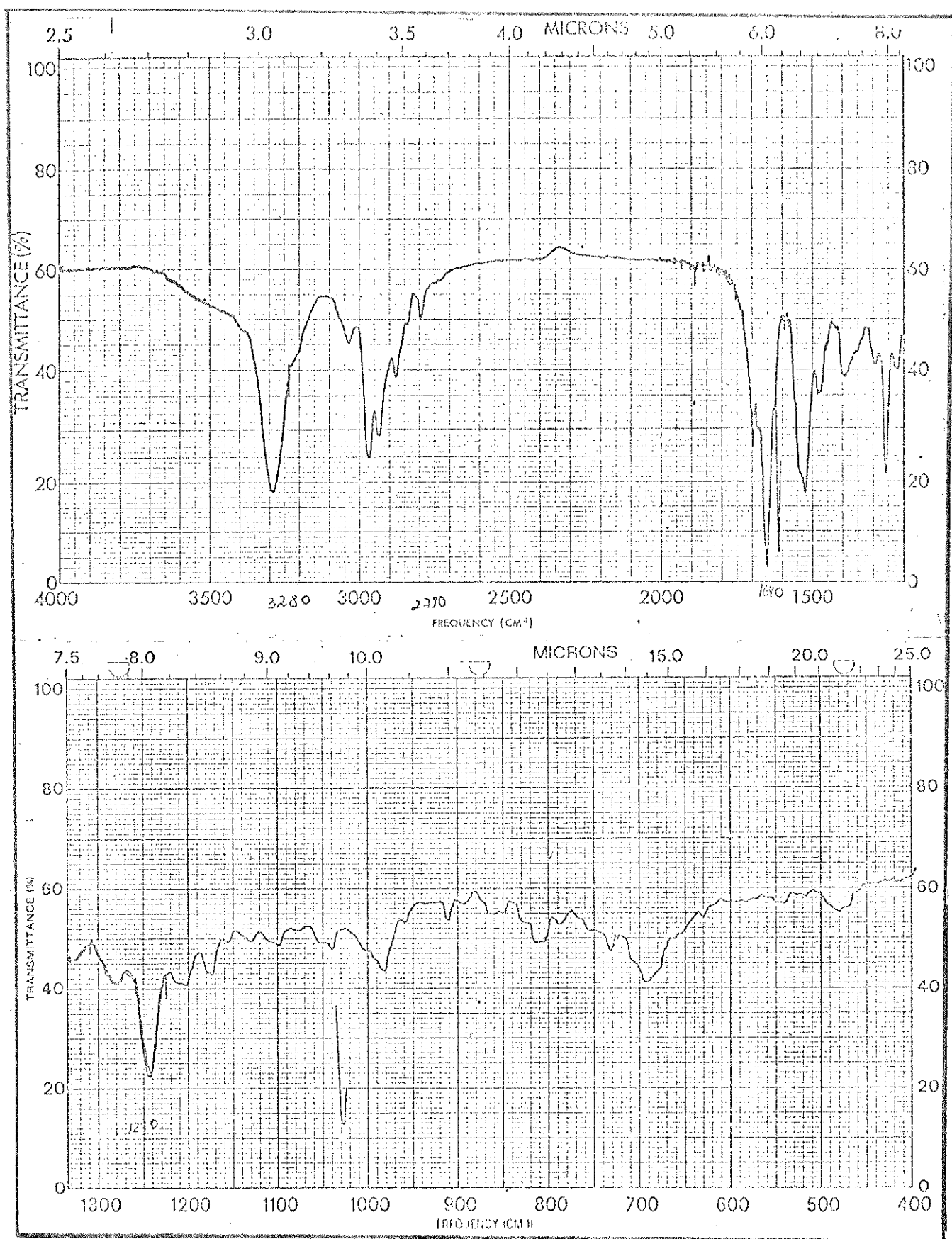


Fig. 42. Espectro de absorção no IV de discarina B.

Espectro de massa (20 eV) (fig. 44)

m/e 195, 190, 148 (100%).

Alcaloide D_v

PF = 225-227^o.

Espectro de massa (20 eV) (fig. 45)

m/e 568 (M⁺), 114 (100%).

Alcaloide D_z

PF = 160-162^o.

Espectro de massa (20 eV) (fig. 46)

m/e 534 (M⁺), 520, 499, 485, 477, 190, 135, 114 (100%), 100,
86, 72.

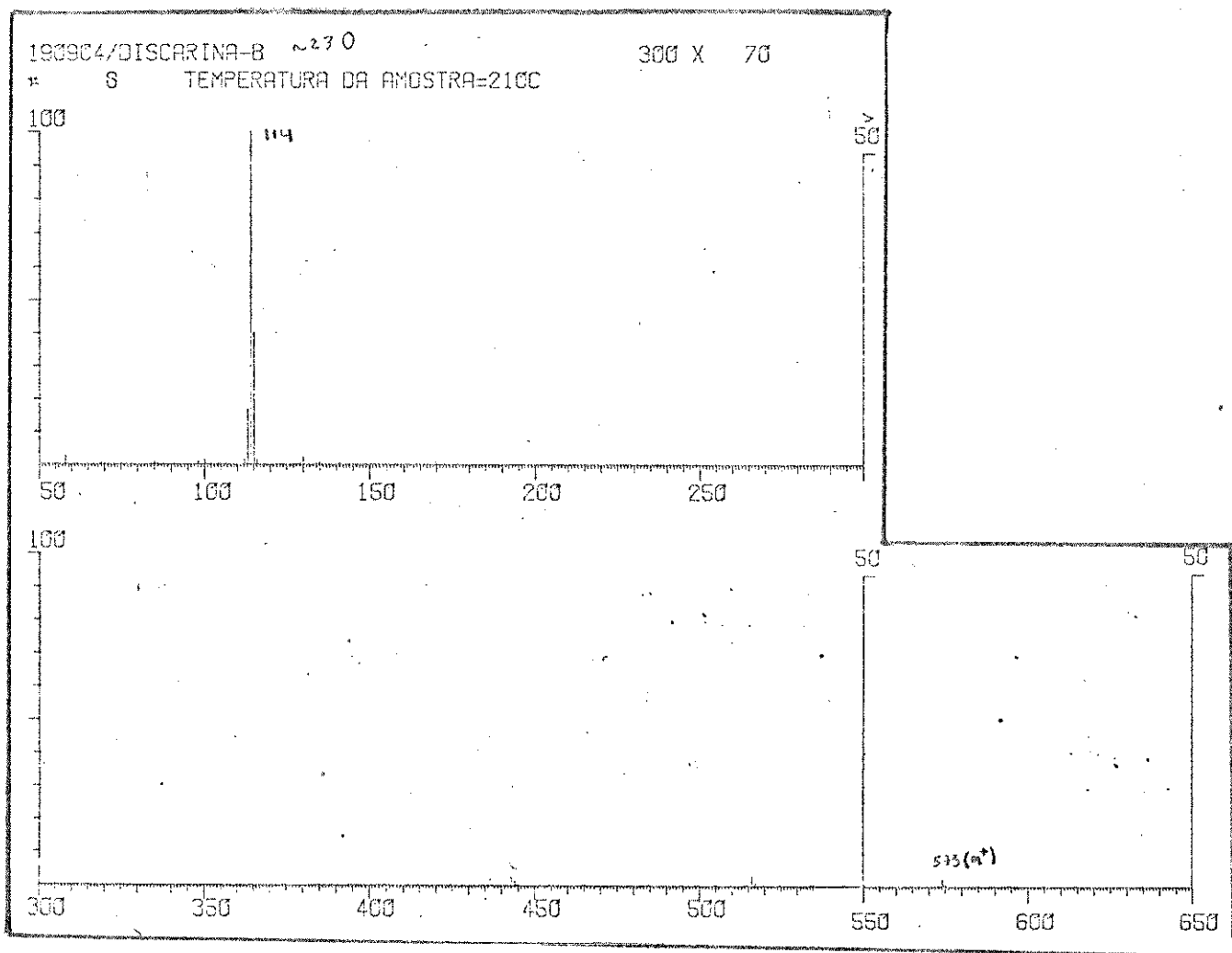


Fig. 43. Espectro de massa de discarina B.

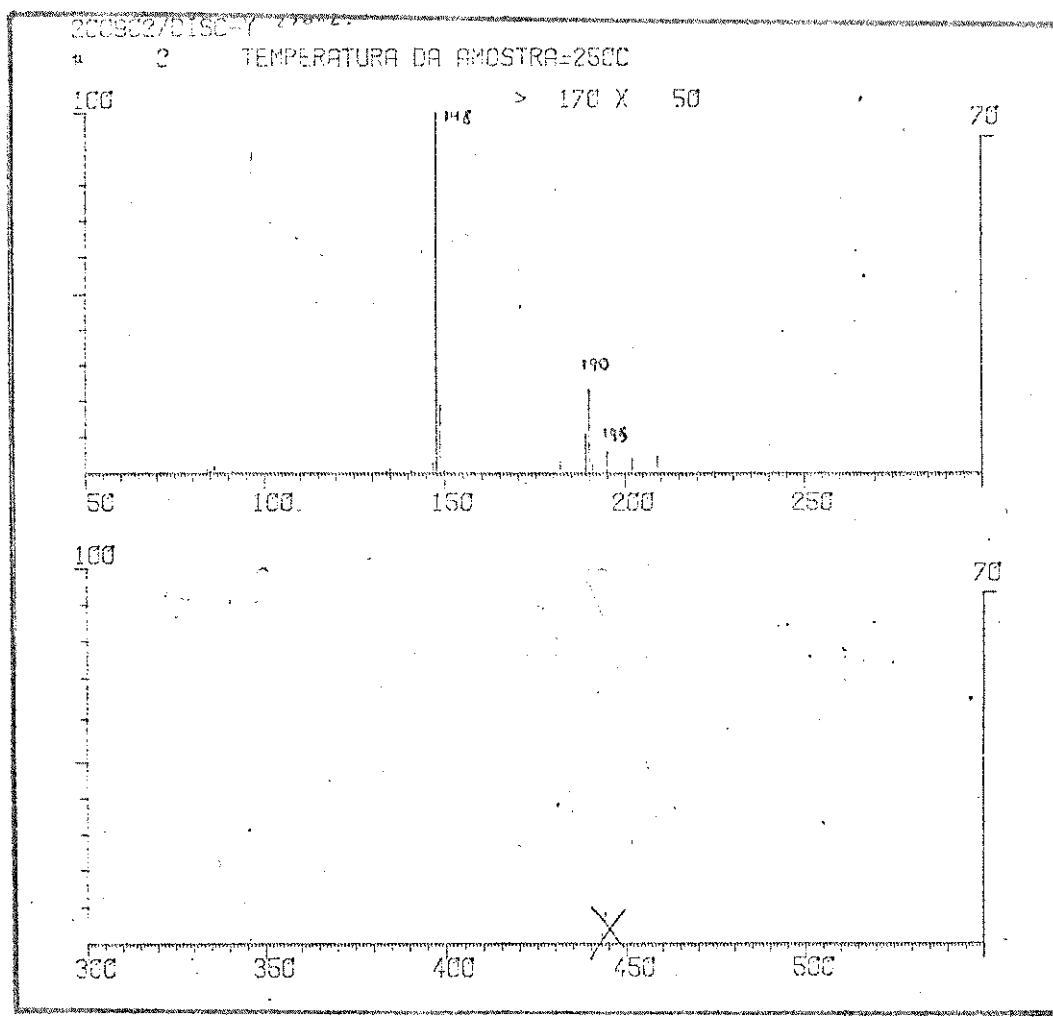
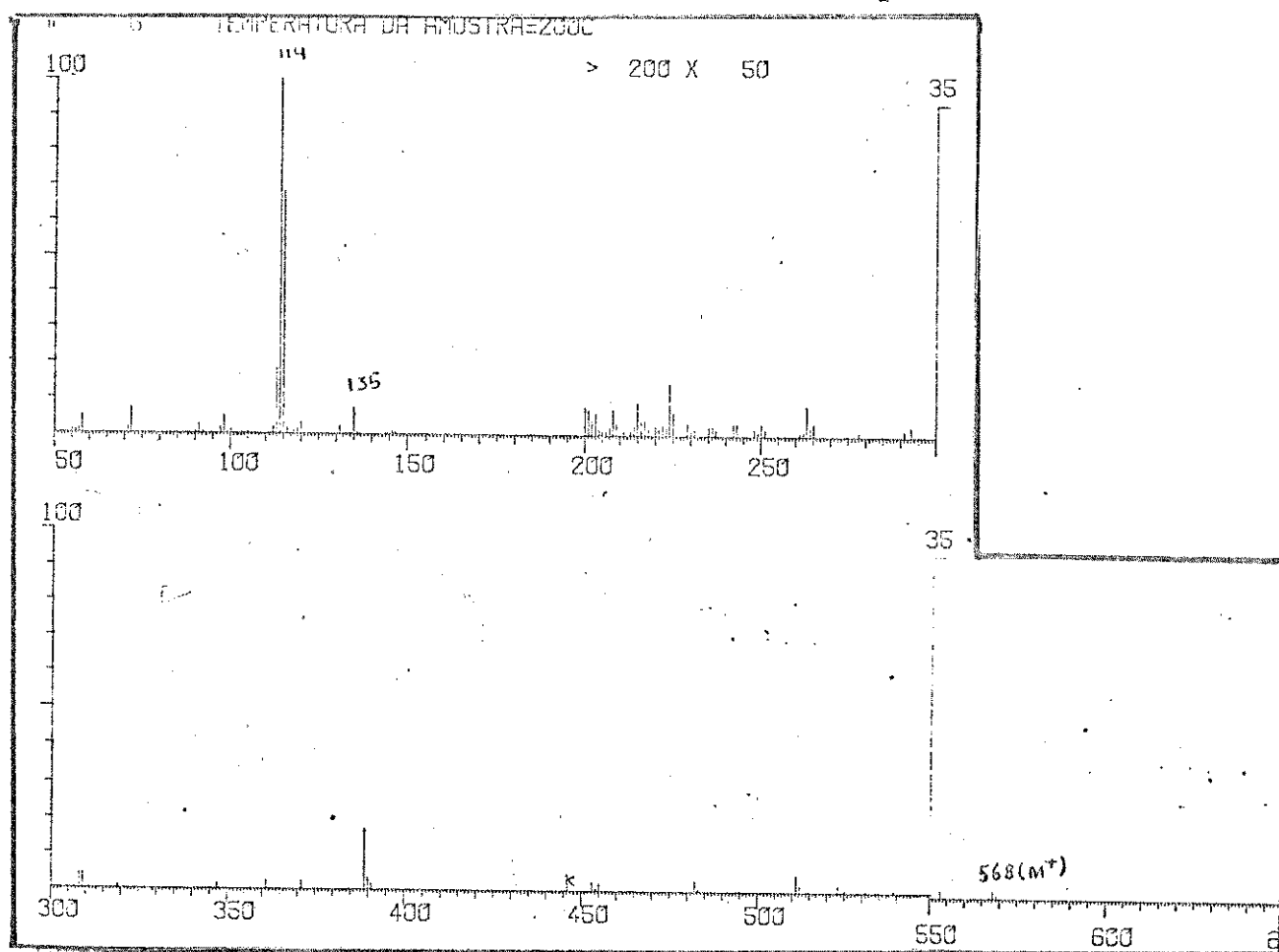
Fig. 44. Espectro de massa de d- γ .

Fig. 45. Espectro de massa de d-v.

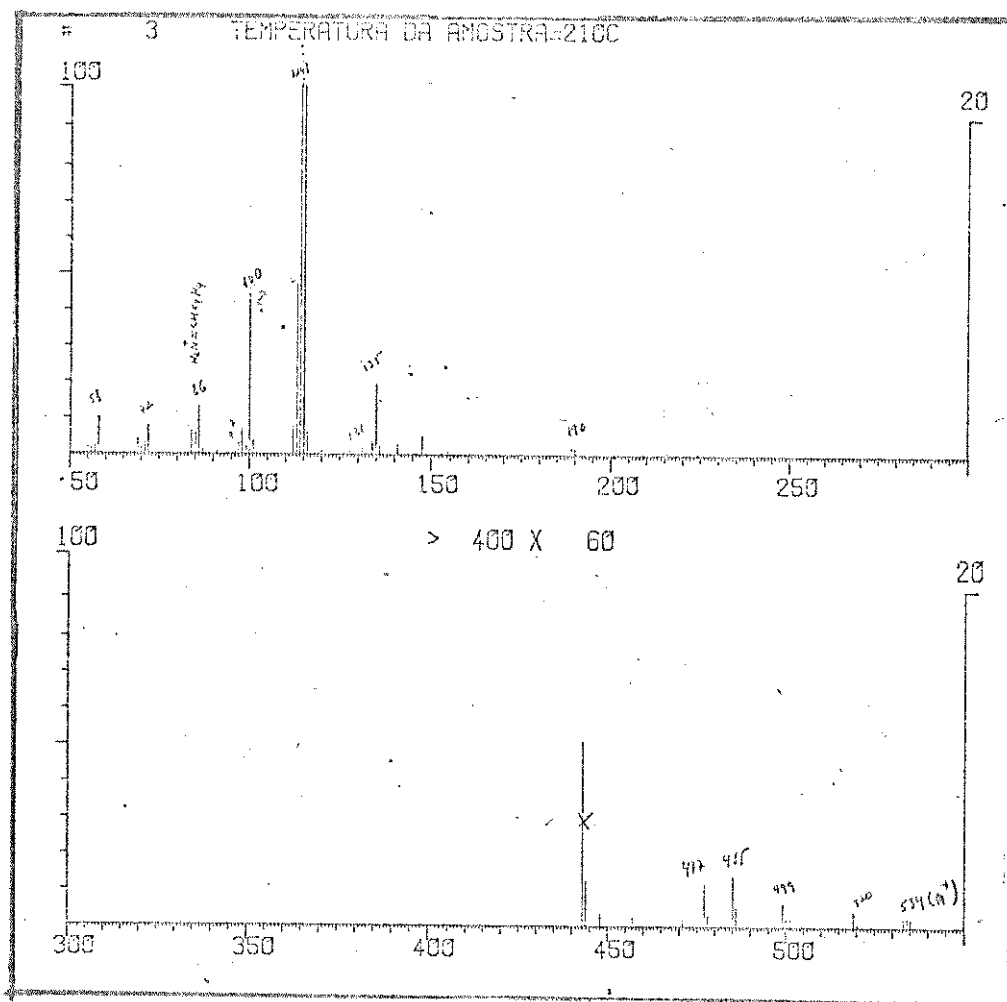


Fig. 46. Espectro de massa de d₂.

5.3. Sínteses de Substâncias de Referências

N-N-dimetil aminoácidos

Os derivados N-N-dimetilados de leucina, isoleucina, nor-leucina e fenilalanina foram preparados de acordo com o procedimento de Bowman e Stroud⁽⁸¹⁾.

O aminoácido (18) foi suspenso em uma mistura de metanol-água (1:1) (50 ml), solução de formaldeído a 37% (5 ml) e hidrogenado à pressão normal em temperatura ambiente, na presença de Pd/C a 10% (500 mg) até consumo constante de hidrogênio (3 a 7 horas). Por filtração através de uma camada de celite, à pressão reduzida, obteve-se um resíduo, com forte cheiro de formaldeído que foi eliminado por sucessivas adições e evaporações de água. O produto N-N-dimetilado foi recristalizado em solvente adequado.

N-N-dimetil-L-isoleucina

A partir de isoleucina (250 mg) obteve-se o derivado correspondente, que recristalizado de etanol, deu PF = 168-169^o.

Espectro de RMN de ¹H (60 MHz) em D₂O (fig. 47)

δ ppm: 0,80-1,10 (6H, t.d., hidrogênios de Cδ e γ'); 1,18-1,64 (2H, m, metileno γ); 1,8-2,32 (1H, m, hidrogênio do C β); 3,85 (6H, s, N-metilas); 3,45 (1H; d, J = 4,5 Hz), hidrogênio do C_α.

Espectro de massa (20 eV) (fig. 48)

M⁺ 159.

Espectro de MIKES (fig. 73a)

N-N-dimetil L-leucina

A partir de L-leucina (200 mg) obteve-se o derivado correspondente (150 mg), que recristalizado de etanol-acetona, deu PF = 197°.

Espectro de RMN de ^1H (60 MHz) em D_2O (fig. 49)

δ ppm: 0,9-1,05 (6H, d.d., metilas de $\text{C}\delta$ e $\text{C}\delta'$); 1,65-1,9 (3H, m, hidrogênios de $\text{C}\alpha$ e $\text{C}\beta$); 2,9 (6H, N-metilas); 3,5-3,8 (1H, m, hidrogênios do $\text{C}\alpha$).

Espectro de massa (20 eV) (fig. 50)

M^+ 159.

Espectro de MIKES (fig. 73b).

N-N-dimetil nor-leucina

A partir de nor-leucina (100 mg) obteve-se o correspondente derivado, que recristalizado de etanol-acetona-éter, deu PF = 165,6-

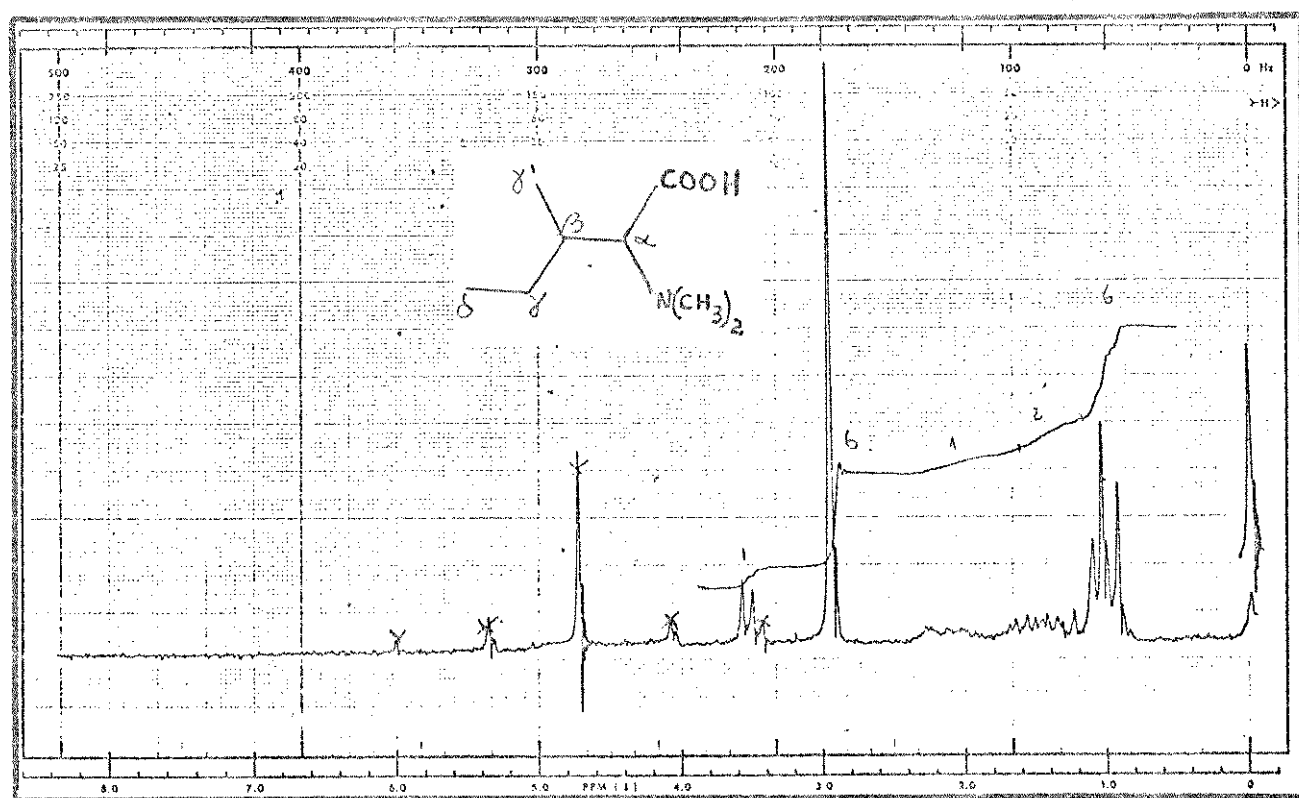


Fig. 47. Espectro de RMN de H a 60 MHz de N-N-dimetil-L-isoleucina em D_2O .

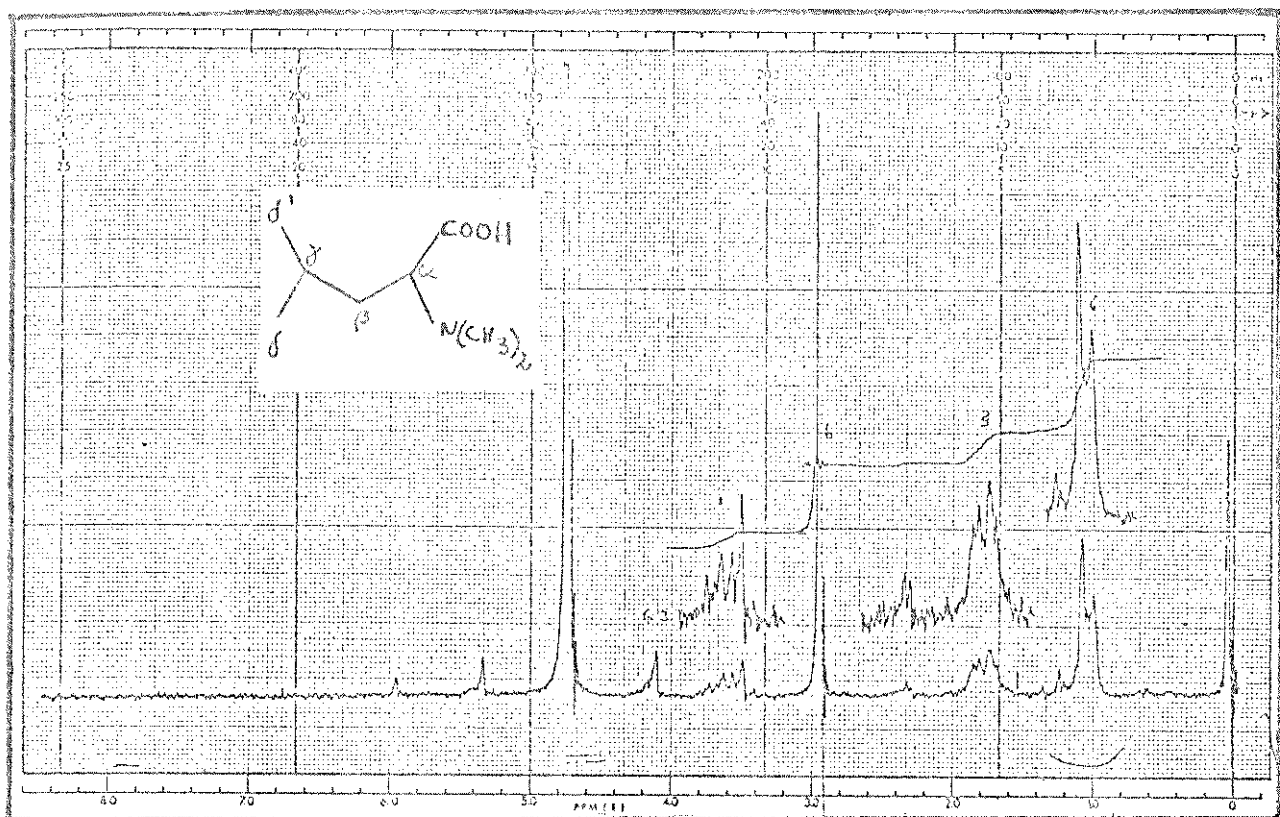


Fig. 49. Espectro de RMN de ^1H a 60 MHz de N,N-dimetil L-leucina em D_2O .

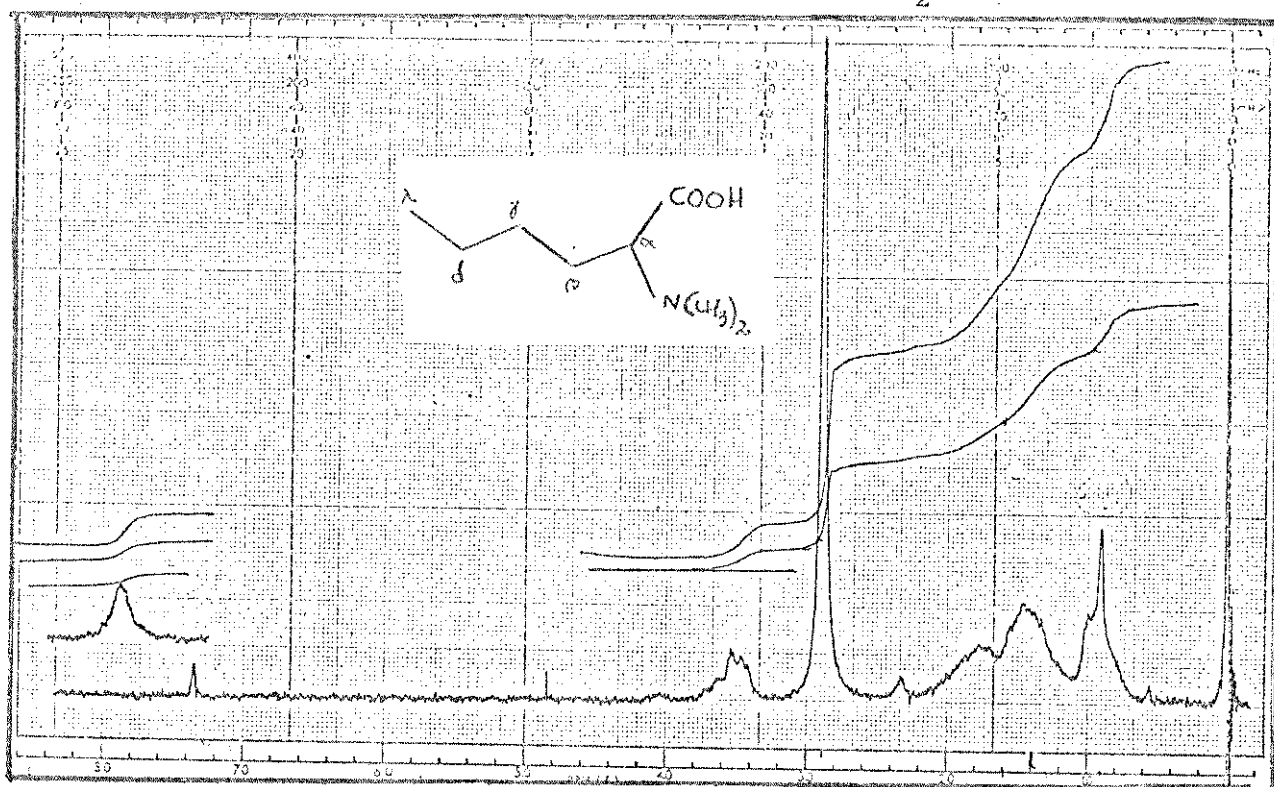


Fig. 51. Espectro de RMN de ^1H a 60 MHz de N,N-dimetil nor-leucina em CDCl_3 .

-167,3.

Espectro de RMN de ^1H (60 MHz) em CDCl_3 (fig. 51)

δ ppm: 0,95 (3H, t não resolvido, metila do Cl); 1,2-1,6 (6H, m, metilenos β , γ , δ); 2,95 (6H, s, N-metilas); 3,5 (1H, hidrogênio do $\text{C}\alpha$).

Espectro de massa (fig. 52)

M^+ 159.

Espectro de MIKES (fig. 73b)

N-N-dimetil-D-L-fenilalanina

A partir de D-L-fenil alanina obteve-se o correspondente derivado (650 mg), que cristalizado de etanol-acetona, deu PF = 218-219°.

Espectro de IV (KBr) (fig. 53)

2780 cm^{-1} (N- CH_3); 1630 (carboxilato); 1550 (aromático).

Espectro de RMN de ^1H (60 MHz) em D_2O (fig. 54)

δ ppm: 2,9 (6H, s, N-metilas); 2,94-3,28 (2H, m, metileno); 3,55-3,88 (1H, d.d., hidrogênio do $\text{C}\alpha$); 7,28 (5H, s, hidrogênios aromáticos).

N-N-dimetil-D-L-fenilalanina metil éster

A esterificação de N-N-dimetil-D-L-fenilalanina (250 mg) foi efetuada em presença de excesso de diazometano, à temperatura ambiente por 8 horas⁽⁸²⁾. O produto oleoso resultante foi purificado em coluna cromatográfica, usando como suporte sílica H e eluente hexano-éter a 50%. O óleo incolor resultante (220 mg) apresentou-se homogêneo em C.D.D. (dois sistemas de solventes: hexano-éter (50%) e benzeno-acetato de etila (20%)).

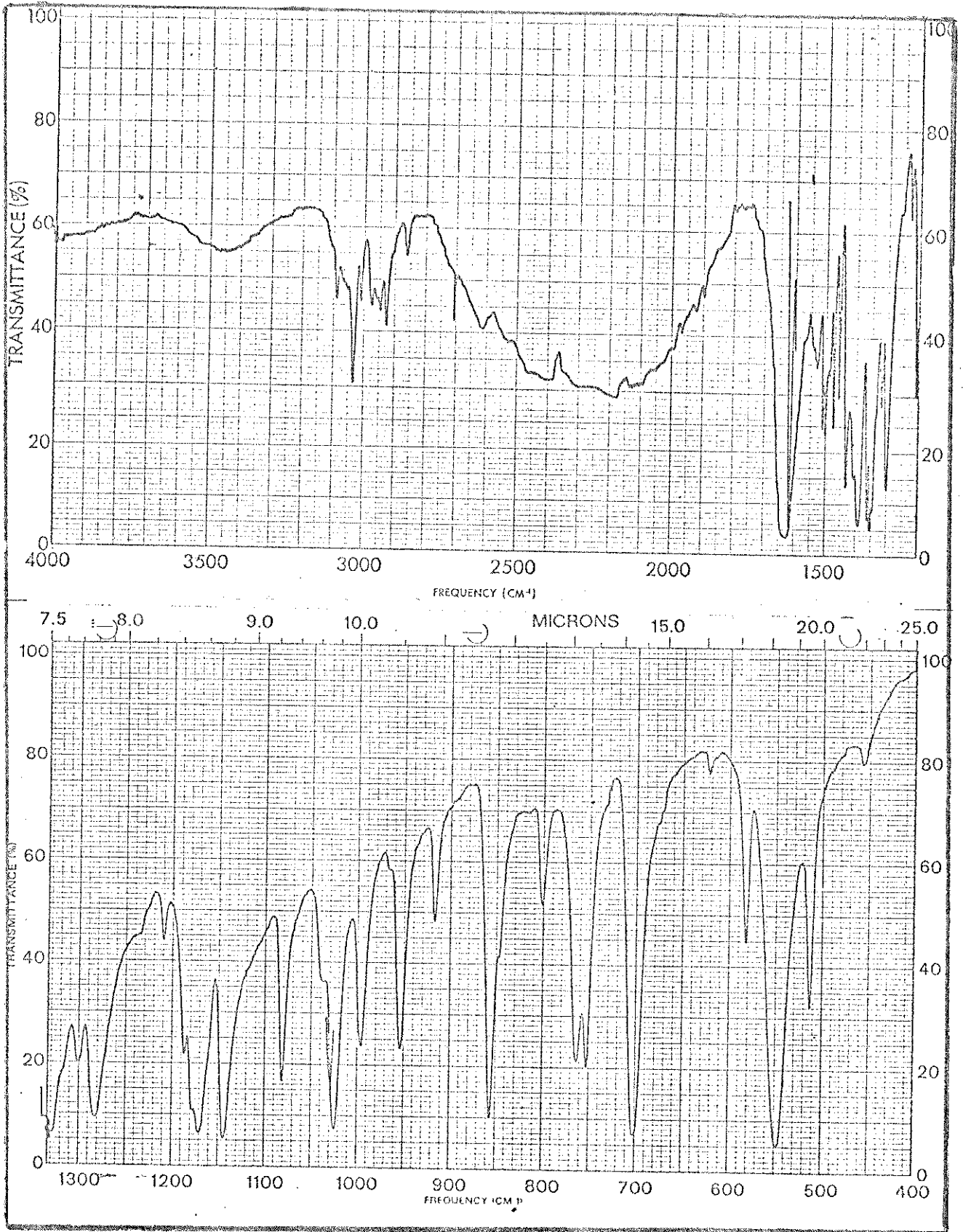


Fig. 53. Espectro de absorção no IV de N-N-dimetil D-L-fenilalanina.

Espectro de IV (filme) (fig. 55)

2780 cm^{-1} (N-CH₃); 1750 (éster); 1500 (aromático).

Espectro de RMN de ¹H (60 MHz) em CDCl₃ (fig. 56)

δ ppm: 2,2 (6H, s, N-metilas); 2,8-3,5 (3H, m); 3,55 (3H, s, metoxila); 7,35 (5H, s, hidrogênios aromáticos).

Espectro de RMN de ¹³C em CDCl₃ (fig. 70)

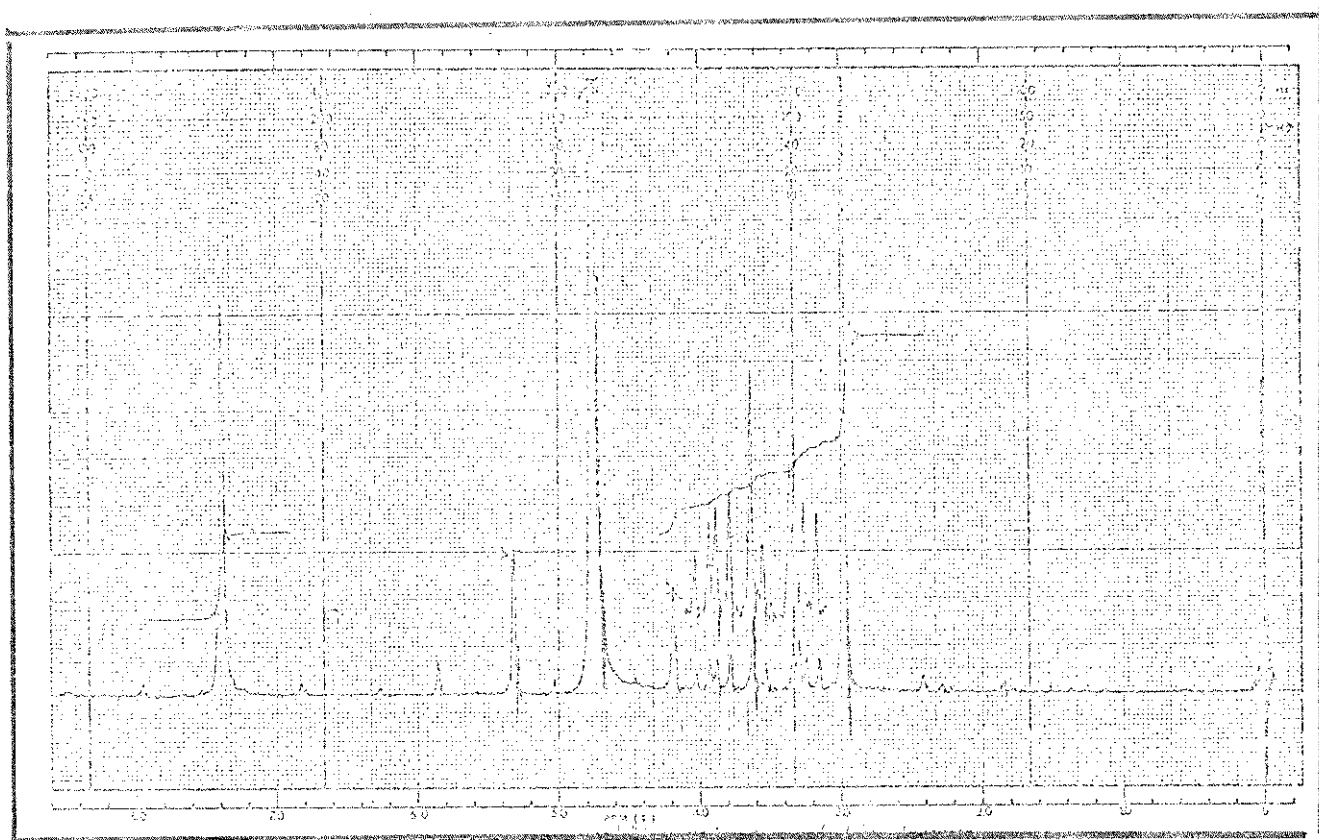


Fig. 54. Espectro de RMN de ¹H a 60 MHz de N,N-dimetil fenilalanina em D₂O

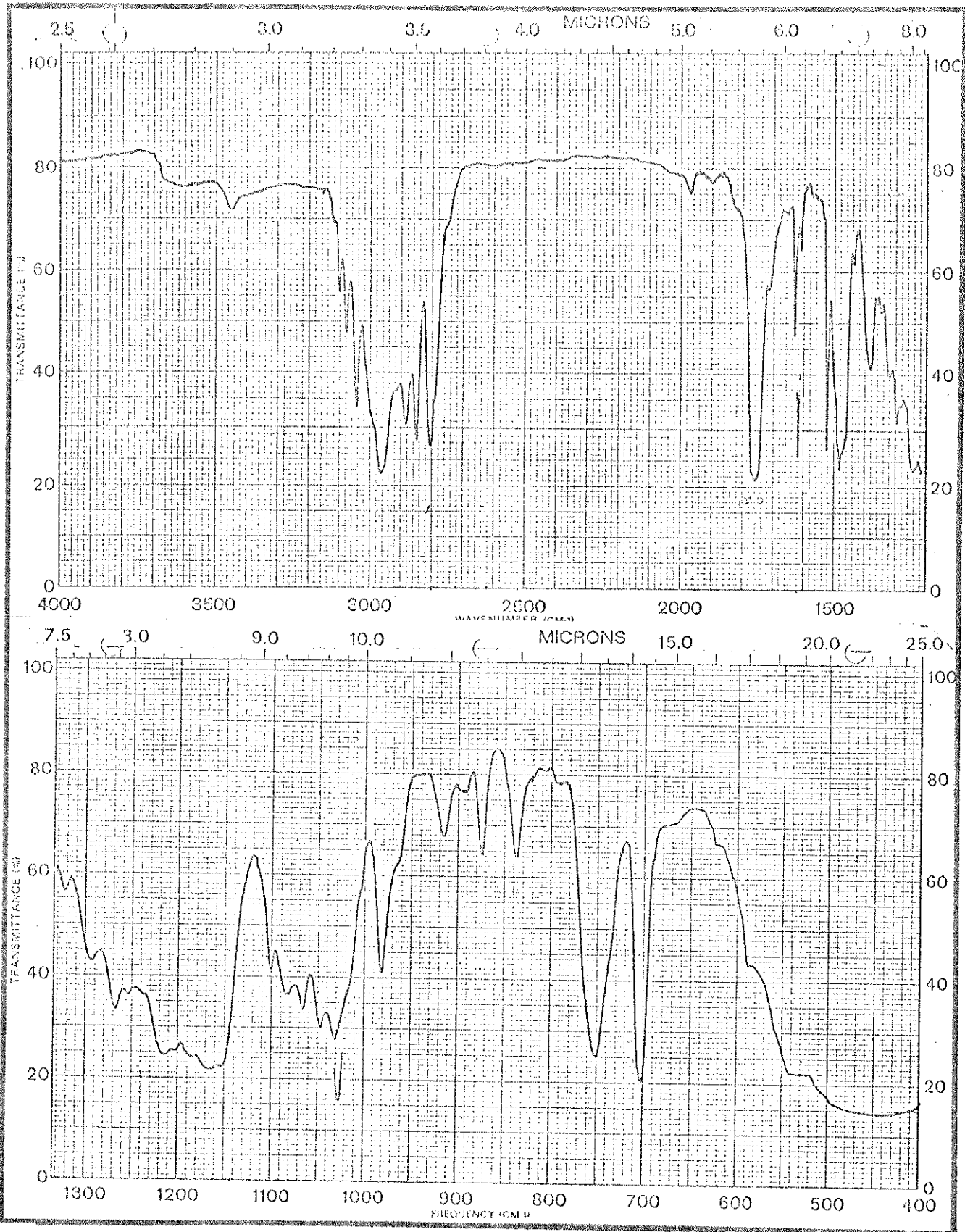


Fig. 55. Espectro de absorção no IV de N-N-dimetil fenilalanina metil éster.

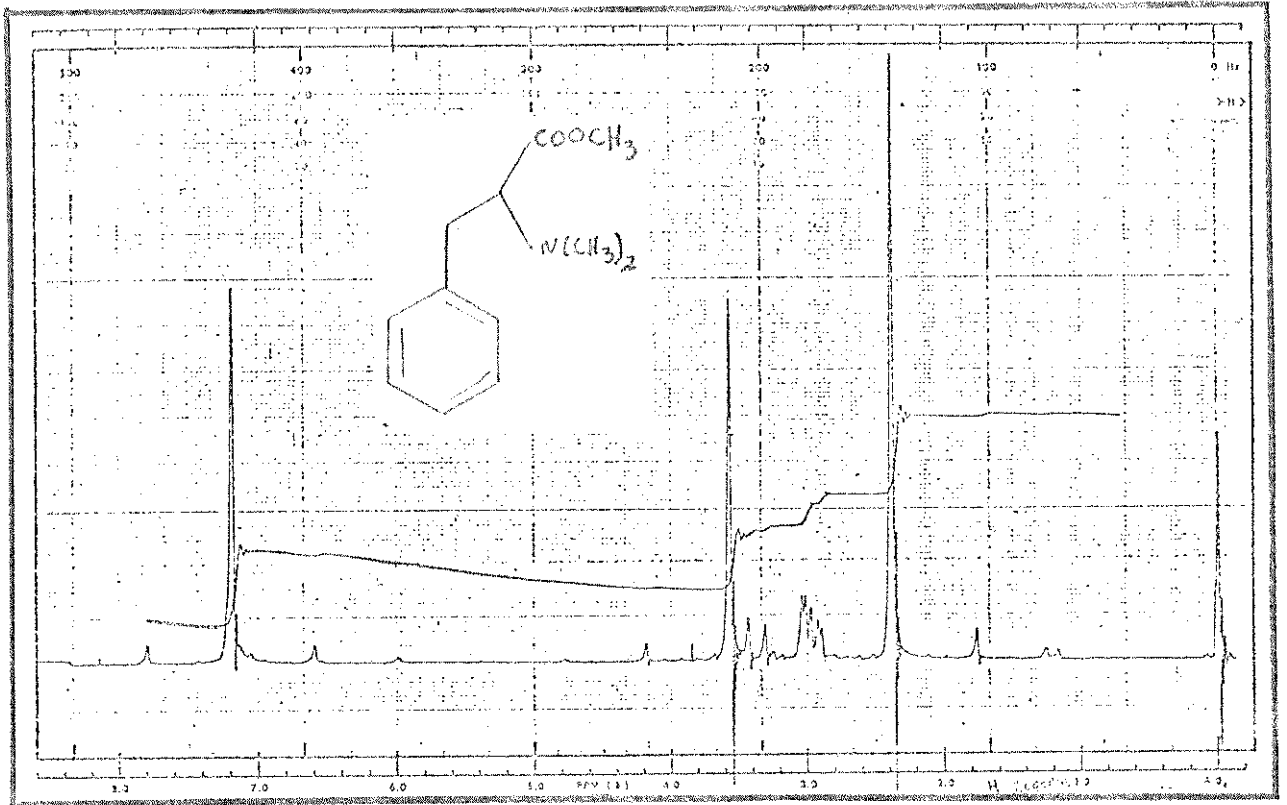


Fig. 56. Espectro de RMN de ^1H a 60 MHz de N-N-dimetil fenilalanina metil éster em CDCl_3 .

Tentativas de síntese de β -fenilserina metil éster1a. tentativaEsterificação com sulfito de metila⁽⁸³⁾

Aproximadamente 100 mg de 58 (mistura eritro-treo, com maior proporção de treo, de acordo com os dados de RMN de ^1H (fig. 57) encontrados na literatura⁽⁸⁶⁾, foram dissolvidos em 20 ml de metanol anidro saturado com ácido clorídrico gasoso. A esta solução adicionou-se 1,5 ml de sulfito de metila, aquecendo-se em banho de óleo a 100° durante uma hora. O solvente foi eliminado à pressão reduzida, e o resíduo seco em dessecador.

O líquido amarelo obtido, 85 mg, foi dissolvido em 5 ml de água, que após resfriamento em banho de gelo e água, foi adicionado de 20 ml de éter etílico e hidróxido de sódio (~ 2N) até $\text{pH} \approx 7.0$. Saturou-se a solução até formar uma pasta com carbonato de sódio. A camada etérea foi decantada, e a fase aquosa foi extraída exaustivamente com éter. Os extratos etéreos reunidos foram secados sobre sulfato de sódio anidro e evaporados à pressão reduzida. Resultou em um resíduo amarelo oleoso, constituído de mistura de produtos, de R_f muito próximos, difíceis de serem separados por métodos cromatográficos (colunas cromatográficas e placas preparativas).

2a. tentativaEsterificação com diazometano

Cerca de 1 g de 58 foi suspensa em mistura de metanol-éter (1:1) e adicionada de excesso de diazometano, permanecendo em con-

tato à temperatura ambiente durante 4 horas. O solvente foi evaporado e, o resíduo oleoso resultante (850 mg), por C.C.D. era constituído de várias substâncias de Rf muito próximos. Tentativas de separação destes compostos por métodos cromatográficos (coluna cromatográfica e placas preparativas) não deram bons resultados. De uma das placas preparativas, em que foi aplicada pequena quantidade da mistura, conseguiu-se isolar em pequenas proporções, o O-acetil-β-fenil serina metil éster 60 e N-acetil-β-fenil serina metil éster 61.

O-acetil-β-fenil serina metil éster

Espectro de massa (20 eV) (fig. 58)

M⁺ 237.

N-acetil-β-fenil serina metil éster

Espectro de massa (20 eV) (fig. 59)

M⁺ 237.

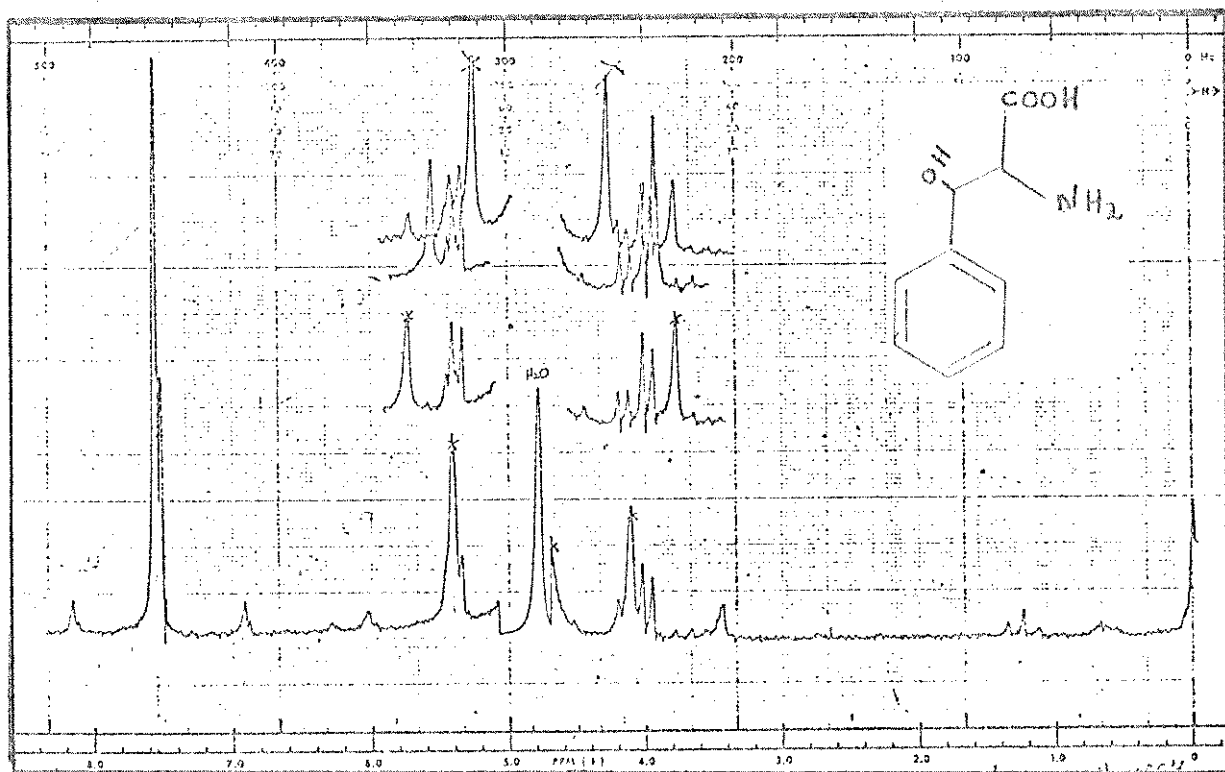


Fig. 57. Espectro de RMN de ¹H a 60 MHz de β-fenil serina (eritro-treo) em D₂O.

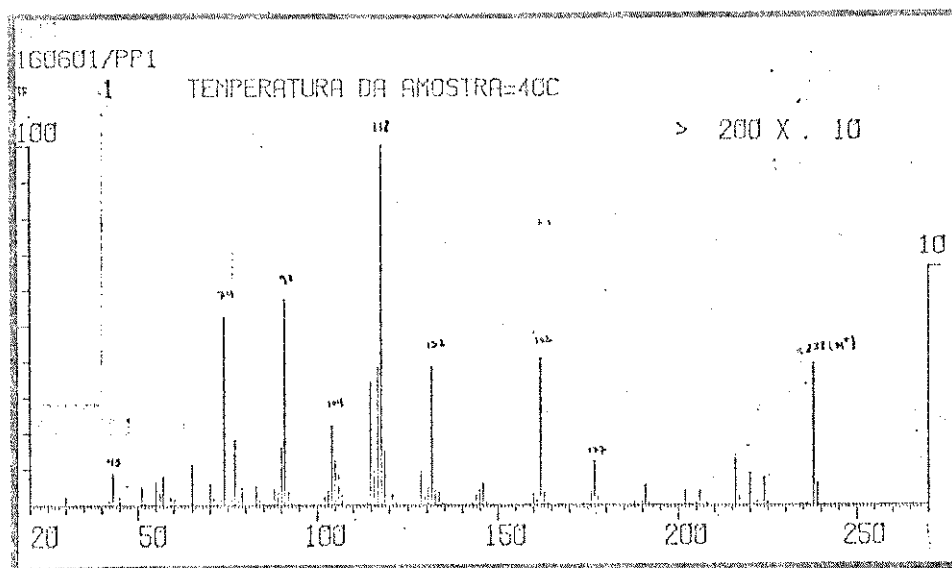


Fig. 58. Espectro de massa de O-acetil β -fenil serina metil éster (possível).

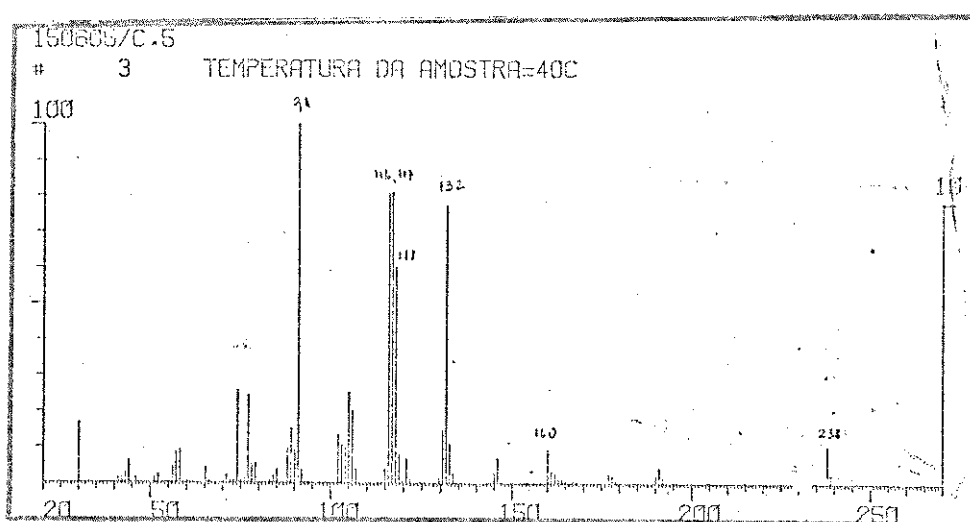


Fig. 59. Espectro de massa de N-acetil β -fenil serina metil éster (possível).

Tentativas de síntese de O-N-diacetil- β -
fenil serina metil éster (63).

1a. tentativa

Dissolveu-se 320 mg de 58, em piridina e anidrido acético (0,8 ml de cada). A reação foi completada em 15 minutos (acompanhando-se o desenvolvimento por C.C.D.), à temperatura ambiente e em seguida diluída com água. A solução foi extraída com éter e a fase orgânica lavada com ácido clorídrico (7%) até pH \approx 3,0, neutralizada com bicarbonato de sódio (10%) e secada com sulfato de sódio. O solvente foi evaporado à pressão reduzida, resultando 225 mg de um produto amarelo cristalino, homogêneo em C.C.D. (hexano-acetato de etila 20% e hexano-éter 50%), com PF = 134-145°.

Espectro de RMN de ^1H (60 MHz) em CDCl_3 (fig. 60).

δ ppm: 2,4 (3H, s); 7,15 (1H, s); 7,4 (3H, m); 8,1 (2H, m).

Espectro de massa (20 eV) (fig. 61)

M^+ 187.

2a. tentativa

A mistura contendo os produtos 60 e 61 foi dissolvida em piridina e anidrido acético (1,5 ml de cada), e deixou-se em repouso à temperatura ambiente durante 24 horas. A piridina e o anidrido acético residuais foram eliminados por sucessivas evaporações de etanol a quente. O óleo amarelado, 835 mg, resultante foi deixado em repouso durante 4 horas, à frio, em presença de mistura clorofórmio-éter. Desta maneira precipitou um produto cristalino incolor (120 mg), que foi lavado com éter e secado à pressão reduzida, apresentou-se homogêneo em C.C.D. (hexano-acetato de etila (8:2);

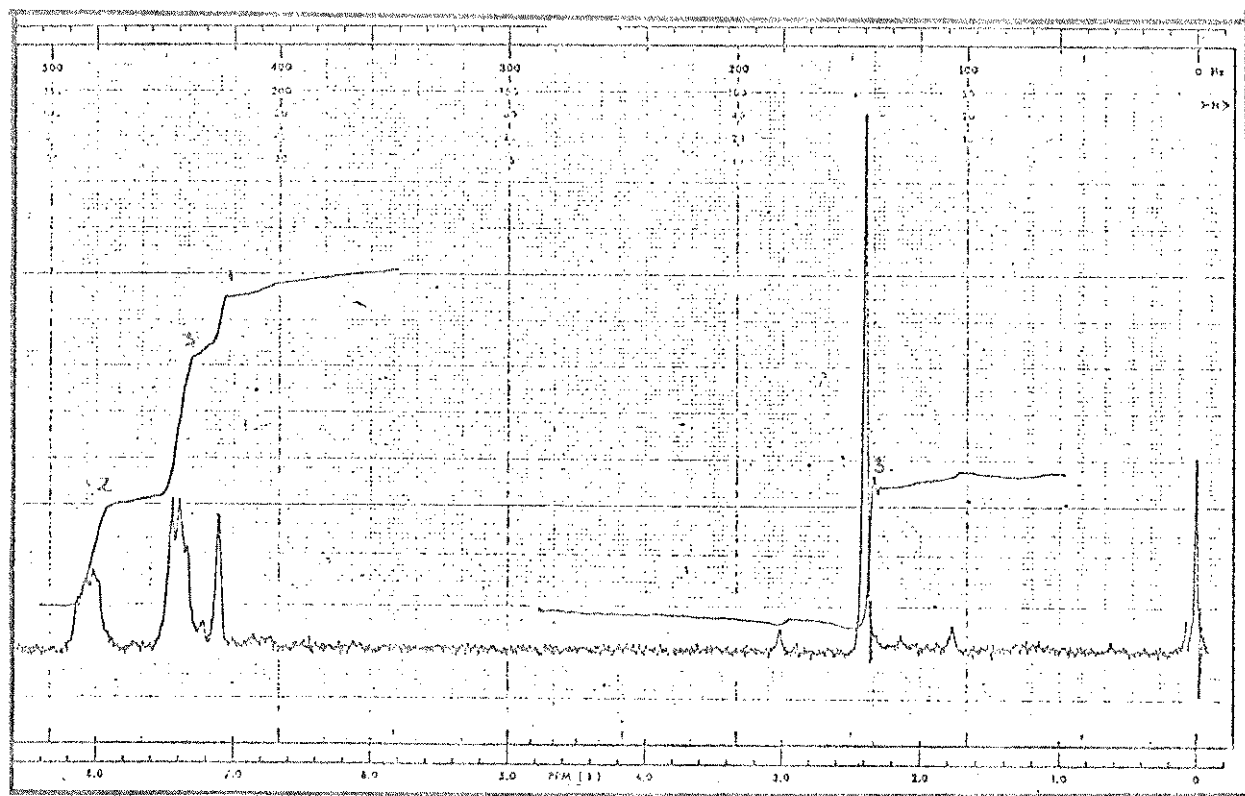


Fig. 60. Espectro de RMN de ^1H a 60 MHz da azolactona 62 em CDCl_3 .

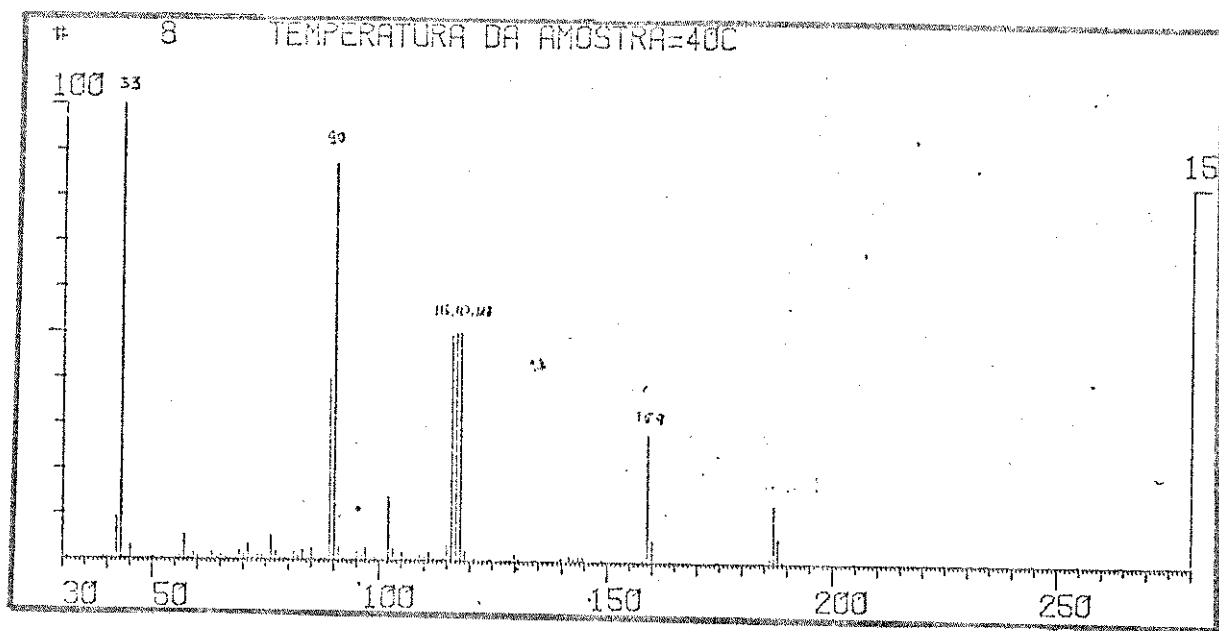


Fig. 61. Espectro de massa da azolactona 62.

éter-acetato de etila (9:1)), com PF = 245°.

Espectro de IV (KBr) (fig. 62)

3280 cm^{-1} (N-H); 1760 (acetato); 1750 (acetato); 1680 (éster).

Espectro de RMN de ^1H (60 MHz) em CDCl_3 (fig. 63)

δ ppm: 1,9 (3H, s); 2,15 (3H, s); 3,6 (3H, s); 5,1 (2H, m);

6,2 (1H, d); 7,3 (5H, s).

Espectro de RMN de ^{13}C (fig. 71)

Espectro de massa (20 eV) (fig. 64)

M^+ 279.

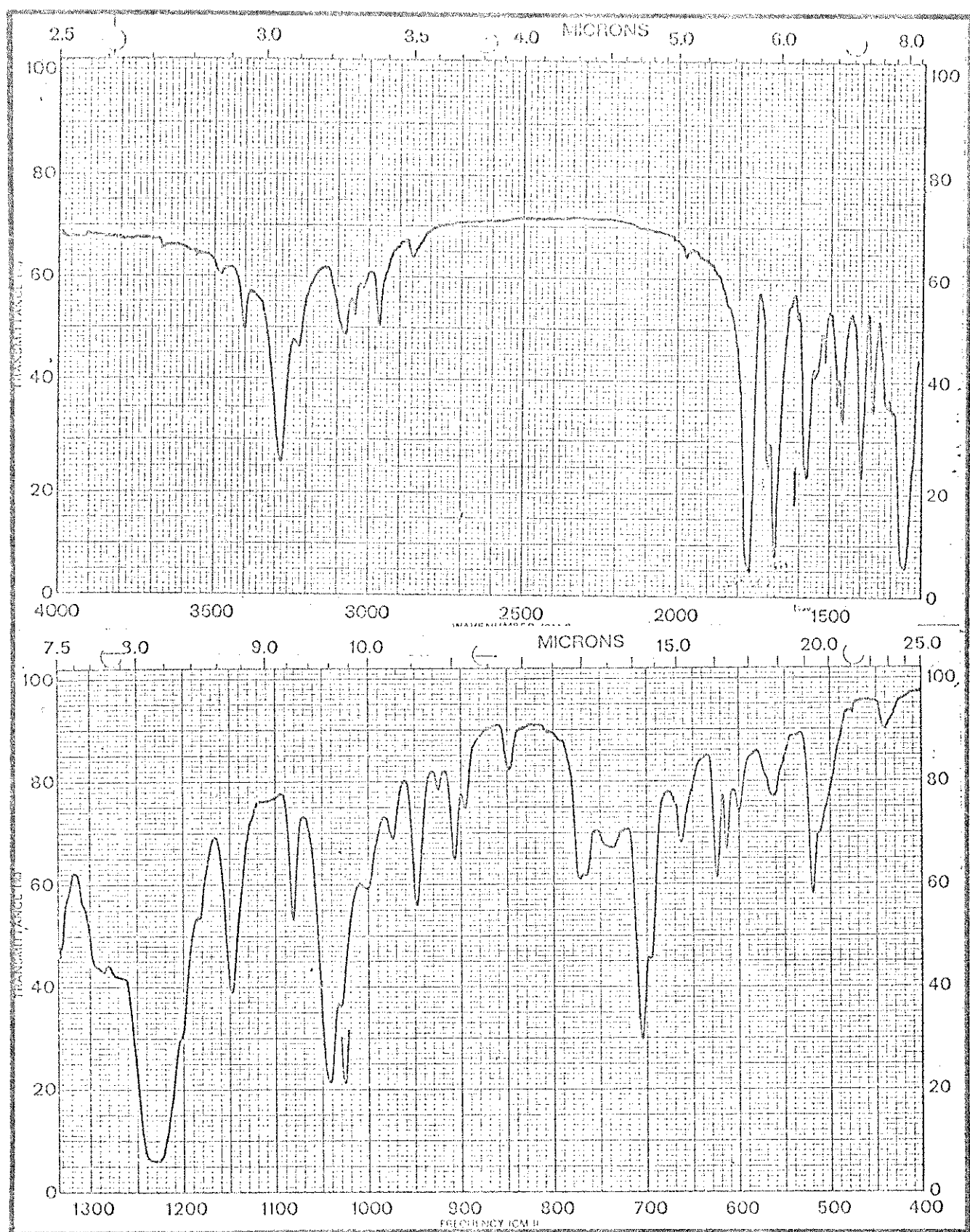


Fig. 62. Espectro de absorção no IV de O-N-diacetil β -fenil serina metil éster.

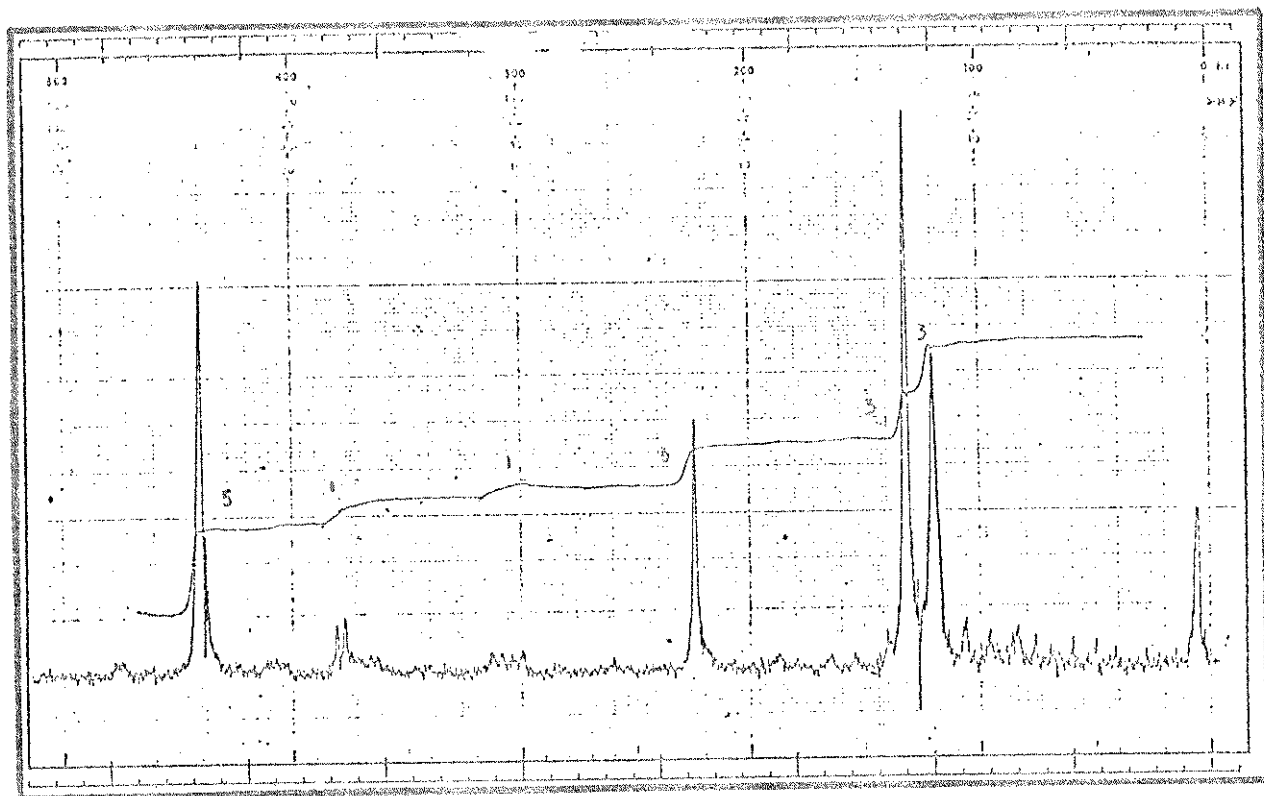


Fig. 63. Espectro de RMN de ^1H a 60 MHz de O-N-diacetil β -fenil serina metil éster.

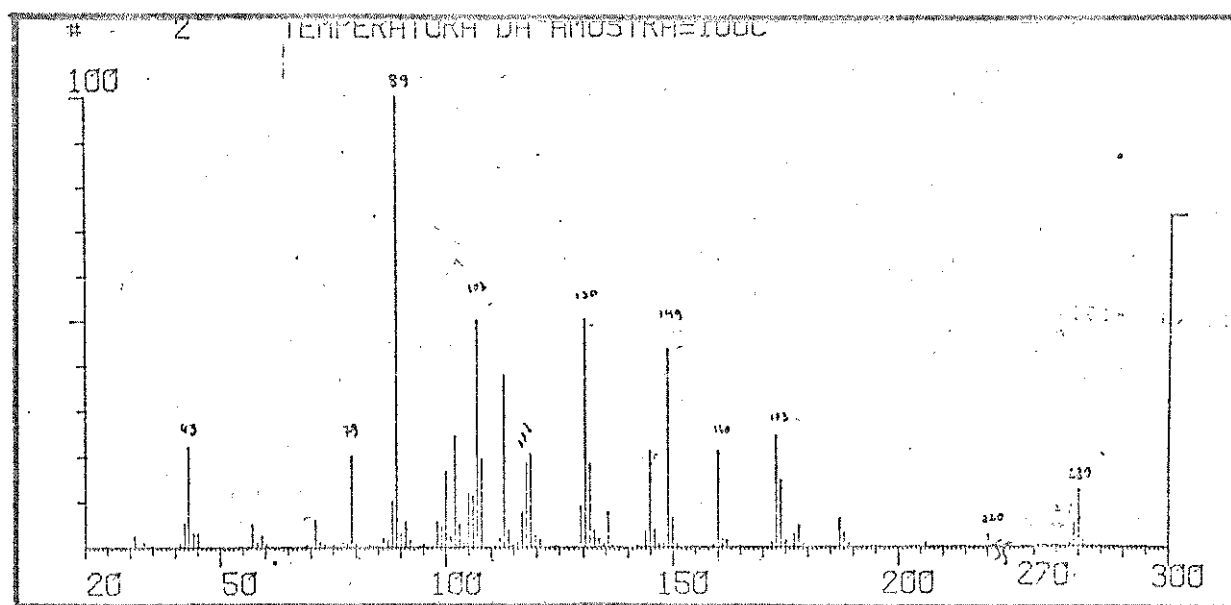


Fig. 64. Espectro de massa de O-N-diacetil β -fenil serina metil éster.

6. CONCLUSÃO

A casca do tronco de Scutia buxifolia Reiss e a casca da raiz de Discaria febrifuga Mart apresentaram alcalóides pertencentes a um grupo de substâncias naturais denominadas "alcalóides ciclopeptídicos".

Através de métodos espectroscópicos usuais como UV, IV, EM e RMN de ^1H , e, em alguns casos, pela comparação direta com uma amostra autêntica, foi possível identificar os seguintes alcalóides: scutianinas B, C, D, E e discarina B, todos conhecidos, e tres alcalóides inéditos: scutianinas H, I e discarina X.

A determinação da estrutura da scutianina H foi feita pela aplicação de espectrometria de massa de baixa e alta resolução, RMN de ^1H a 100MHz e métodos de degradação, como hidrólise ácida.

Pela utilização de métodos especiais, como RMN de ^1H a 400 MHz com dupla irradiação e Espectros de Energia Cinética dos Ions Analisados por Massa (MIKES), foi possível confirmar a unidade N-N-dimetil aminoácido como sendo N-N-dimetil isoleucina.

O espectro de massa de baixa resolução de scutianina I apresentou uma fragmentação semelhante à dos alcalóides, previamente isolados, scutianinas D, E e G, porém diferenciava-se nas suas constantes físicas (PF, rotação ótica, Rf em CCD), sugerindo assim, ser um novo diastereoisômero.

Discarina X, isolada de Discaria febrifuga Mart, teve sua estrutura estabelecida pela análise de sua fragmentação em espectrometria de massa de baixa resolução associada com RMN de ^1H a 100MHz e RMN de ^{13}C .

Embora a estrutura proposta para a discarina X fosse a mesma da franganina, alcalóide isolado de Rhamnus frangula pelo grupo de R.Tschesche (23, 31), suas constantes físicas (PF, rota -

tação ótica) foram apreciavelmente diferentes. A possibilidade de confirmação de estes serem diastereoisômeros só seria possível através de uma constatação direta de ambos os alcalóides, porém, infelizmente, não pudemos concretizar isto.

Pela análise de RMN de ^{13}C de discarina X juntamente com RMN de ^1H a 100MHz confirmou-se a unidade β -hidroxileucina, e se estabeleceu sua configuração como sendo L-eritro.

Scutianinas D e E foram os alcalóides encontrados em maior proporção na casca do tronco de Scutia buxifolia. Em um estudo de RMN de ^{13}C destes dois alcalóides diastereoisoméricos, bem como de seus respectivos acetatos, foi possível observar uma clara diferença nos valores de δ dos carbonos β , e também um diferente $\Delta\delta$ entre os metilas do resíduo hidroxileucina permitindo atribuir a configuração L-eritro a esta unidade em outros alcalóides descritos na literatura.

7. BIBLIOGRAFIA

1. M.Pais, J.Mainil e R.Goutarel. Ann.Pharm.Fr., 21, 139 (1965).
2. M.Pais, X.Monseur, X.Lusinchi e R.Goutarel. Bull.Soc.Chim.Fr. 817 (1964).
3. E.Zbiral, E.L.Menard e J.M.Muller. Helv.Chim.Acta., 48, 404 (1965).
4. R.Tschesche, E.U.Kaussmann e G.Eckhard. Tetrahedron Letters., 25, 77 (1973).
5. R.Tschesche, R.Welters e H.W.Fehlhaber. Ber., 100, 323 (1970)
6. E.W.Warnhoff. Fortsch.Chem.Org.Naturst., 28, 162 (1970).
7. M.Pais e F.X.Jarreau, em "Chemistry and Biochemistry of Amino Acids Peptides and Proteins" ed. B.Weinstein, M.Dekker, New York, 27 (1971).
8. R.Tschesche, E.U.Kaussmann, em "The Alkaloids" editado por R. H.F.Manske, Academic Press, New York, 15, 165 (1975).
9. R.Tschesche. Heterocycles., 4, 107 (1976).
10. Y.Ogihara, Nagoya Shiritsu Daigaku.Yakugakubu Kenkyu Nempo ., 22, 1(1974). Citado em: Specialist Periodical Reports, The Alkaloids, vol.7. The Chemical Society (1977).
11. C.J.Chang, E.W.Wagaman, E.Wenkert, M.Gonzales Sierra, O.A.Mascaretti, V.M.Merkuza e E.A.Rueda. Phytochemistry., 13, 1273 (1974).
12. M.Pais, F.X.Jarreau, M.Gonzales Sierra, O.A.Mascaretti, E.A. Rueda, C.J.Chang, E.W.Hagman e E.Wenkert, trabalho não publicado.
13. H.Haslinger. Tetrahedron., 34, 685 (1971).
14. M.Takai, K.I.Kawai, Y.Ogihara, Y.Iitaka e S.Shibata. J.C.S. Chem. Commun. 653 (1974).

15. M.Gonzales Sierra, O.A.Mascaretti, F.J.Diaz, E.A.Ruveda, C.J. Chang, E.W.Hagman e E.Wenkert. J.C.S.Chem.Commun. 915 (1972).
16. J.Marchand, F.Rocchiccioli, M.Pais e F.X.Jarreau. Bull.Soc. Chim.France., 3742 (1971).
17. R.Tschesche e R.Ammermann. Ber., 107, 2274 (1974).
18. M.Gonzales Sierra, O.A.Mascaretti, V.M.Merkuza, E.L.Tosti, E. A.Ruveda e C.J.Chang. Phytochemistry., 13, 2865 (1974).
19. M.Takai, Y.Ogihara, Y.Iitaka e S.Shibata. Chem.Pharm.Bull., 23 2556 (1975).
20. R.E.Srevis, A.I.Kosak, R.Tschesche, E.Frohberg e H.W.Fehlhaber. J.Am.Chem.Soc., 91, 5619 (1969).
21. E.W.Warnhoff, S.K.Pradhan e J.C.N.Ma. Can.J.Chem., 43, 2594 (1965).
22. J.Marchand, X.Monseur e M.Pais. Ann.Pharm.Fr., 26, 771 (1968)
23. R.Tschesche e T.Reutel. Tetrahedron Letters, 3817 (1968).
24. F.K.Klein e H.Rapport. J.Am.Chem.Soc., 20, 2398 (1968).
25. R.Tschesche, E.U.Kaussmann e H.W.Fehlhaber. Tetrahedron Letters, 9, 865 (1972).
26. F.K.Klein e H.Rapport. J.Am.Chem.Soc., 90, 3576 (1968).
27. R.E.Servis e A.I. Kosak. J.Am.Chem.Soc., 90, 4179 (1968).
28. E.W.Warnhoff, J.C.N.Ma e P.Reinolds-Warnhoff. J.Am.Chem.Soc., 87, 4198 (1965).
29. H.W.Fehlhaber, Z. Anal.Chem., 91; 235 (1968).
30. O.A.Mascaretti, V.M.Merkuza, G.E.Ferrara, E.A.Ruveda, C.J. Chang e E.Wenkert. Phytochemistry, 11, 1133 (1972).
31. R.Tschesche e H.Last. Tetrahedron Letters, 2993 (1968).
32. R.Tschesche, H.Wilhelm e H.W.Fehlhaber. Tetrahedron Letters, 2609 (1972).
33. R.Tschesche, H.Last e H.W.Fehlhaber. Ber., 100, 3937 (1967).

34. C.F.B.M. Abe. Int.Symp.Biochem.Physiol.Alkaloid, 4th,p411 (1972).
35. Govind, J.Kapadia, Y.N.Shukla, J.F.Morton e H.A.Lloyd. Phytochemistry, 16, 1431 (1977).
36. J.Marchand, M.Pais, X.Monseur e F.X.Jarreau. Tetrahedron, 25 937 (1969).
37. R.Tschesche, E.Ammermann e H.W.Fehlhaber. Tetrahedron Letters 4405 (1971).
38. V.M.Merkuza, M.Gonzales Sierra, O.A.Mascaretti, E.A.Ruveda , C.J.Chang e E.Wenkert. Phytochemistry, 13, 1239 (1974).
39. R.Tschesche, D.Hillebrand. Phytochemistry, 16, 1817 (1977).
40. R.Tschesche, M.Elgamal e G.Eckhardt. Chem.Ber., 110, 2655 (1977).
41. M.Pais, J.Marchand, F.X.Jarreau e R.Goutarel. Bull.Soc.Chim. Fr., 1145 (1968).
42. R.Tschesche, L.Behrendt e H.W.Fehlhaber. Ber., 102, 50 (1969)
43. R.Tschesche, E.Frohberg e H.W.Fehlhaber. Ber., 103, 2501 (1970).
44. R.Tschesche, D.Hillebrand, H.Wilhelm, E.Ammermann e G.Eckhardt. Phytochemistry, 16, 1028 (1977).
45. G.Boulvin, R.Ottinger, M.Pais e G.Chiurdoglu. Bull.Soc.Chem. Belg., 78, 583 (1969).
46. R.Tschesche, E.Frohberg e H.W.Fehlhaber. Tetrahedron Letters 1311 (1968).
47. R.Tschesche, J.Rheigans, H.W.Fehlhaber e G.Legler. Ber., 100 3924 (1967).
48. R.Tschesche, M.Elgamal, G.A.Miana e G.Eckhardt. Tetrahedron, 31, 2944 (1975).
49. R.Tschesche, E.U.Kaussmann e H.W.Fehlhaber. Ber., 105, 3094 (1972).

50. R.Tschesche, H.Wilhelm e H.W.Fehlhaber. Tetrahedron Letters, 2609 (1972).
51. R.Tschesche, H.Wilhelm, E.U.Kaussmann e G.Eckhardt. Ann., 1964 (1974).
52. R.Tschesche, Ch.Spilles e G.Eckhardt. Ber., 107, 686 (1974).
53. R.Tschesche, I.Khokhar, H.Wilhelm e G.Eckhardt. Phytochemistry, 15, 541 (1976).
54. R.Tschesche, S.T.David, R.Zerbes, G.Eckhardt e E.U.Kaussmann Ann., 1915 (1974).
55. R.Tschesche, S.T.David, J.Uhlendorf e H.W.Fehlhaber. Ber., 105, 3106 (1972).
56. E.L.Menardi, J.M.Muller, A.F.Thomas, S.S.Bhatnagar e N.J.Dastoor. Helv.Chim.Acta, 46, 1801 (1963).
57. B.K.Cassels, G.Eckhardt, E.U.Kaussmann e R.Tschesche. Tetrahedron, 30, 2461 (1974).
58. H.W.Fehlhaber, J.Uhlendorf, S.T.David e R.Tschesche. Ann. 759 195 (1972).
59. M.Pais, J.Marchand, G.Ratle e F.X.Jarreau. Bull.Soc.Chim.Fr., 2979 (1968).
60. J.Marchand, M.Pais, X.Monseur e F.X.Jarreau. Tetrahedron. 25 937 (1969).
61. M.Pais, X.Monseur, X.Lusinchi e R.Goutarel. Bull.Soc.Chim.Fr 837 (1964).
62. C.S.Andreo e R.H.Vallejos. FEBS Letters, 33, 201 (1973).
63. R.H.Vallejos e C.S.Andreo. Biochim.Biophysic.Acta, 333, 141 (1974).
64. R.Tschesche, I.Khokhar e Ch.Spilles. Phytochemistry, 13, 1633 (1974).
65. M.Gonzales Sierra. Tese de Doutoramento. Universidade de Buenos Aires (1977).

66. P.V.Demarco, E.Farkas, D.Doddrell, B.L.Mylari e E.Wenkert. J. Amer. Chem.Soc., 90, 5480 (1968).
67. C.Kaiser e J.Weinstock. Org.Syntheses, 55, p3 (1976).
68. S.Reissek. Rhamnaceae In. Martius CFR Flora Brasiliensis, 11, part 1, p100.
69. Conferência dada por K.H.Maurer, C.Brunner, G.Kappus, K.Hab--fast, U.Schröder e P.Schulze (Varian Mat.Bremen). 19th Annual Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics (U.S.A.) , Maio 1971.
70. J.H.Beynon e R.G.Cooks. Res.Dev., 22, 26 (1971).
71. D.H.Smith, C.Djerassi, K.H.Maurer e U.Rapp. J.Am.Chem.Soc., 96 3482 (1974).
72. E.Soltero-Rigau, L.Kruger e R.G.Cooks. Anal.Chem., 49, 435 (1977).
73. T.L.Kruger, R.G.Cooks, J.L.McLaughlin e R.L.Ranieri. J.Org. Chem., 42, 4161 (1977).
74. Concetta Kascheres. Tese de Doutorado. UNICAMP.(1978).
75. U.P.Schlunegger. Angew. Chem.Internat.Edit., 14, 679 (1975).
76. O.A.Mascaretti. Tese de Doutorado. Universidade de Buenos Aires (1975).
77. K.Levsen, H.K.Wipf e F.W.McLafferty. Org.Mass Spectrom, 2,117 (1974).
78. R.Munier e Macheboeuf. Bull.Soc.Chim.Biol., 33, 846 (1951).
79. E.F.Mc.Farren. Anal Chem., 23, 168 (1951).
80. E. Stahl. Thin Layer Chromatography, pp747 e 889. Springer - Verlang Berlin (1969).
81. R.E.Bawman e H.H.Strond. J.Chem.Soc., 1342 (1950).
82. L.F.Fieser e M.Fieser. "Reagents for Organic Sinthesis".vol.1 Wiley, New York.N.Y., p 192 (1967).
83. P.A.Cruickshank e Sheenan. J.C.Anal.Chem., 36, 1191 (1964).

84. H.Budzikiewicz, C.Djerassi e D.H.Williams, Mass Spectrometry of Organic Compounds. ed.Holden-Day, Inc (U.S.A.),p,468 (1967)
85. H.S. Carter, Org. Reactions, capitolo 5, p. 213 (1947).
86. J.Marchand, R.Rocchiccioli, M.Pais e F.X.Jarreau. Bull. Soc. Chim.France, 4699 (1972).