

AMINOÁCIDOS NÃO PROTÉICOS DE *Ateleia glazioviana* BAILLON*

Hérida Regina Nunes MARONA**
Eloir Paulo SCHENKEL***
George Gonzalez ORTEGA***
Dieter BERGENTHAL****

- RESUMO: *Ateleia glazioviana* Baillon, *Leguminosae-Papilionoideae*, árvore de ocorrência na região de Palmeira das Missões (RS), possui atividade tóxica para o gado, ictiotóxica e repelente de insetos, referida por populares do interior do estado. Do extrato de sementes e pericarpo alado, foram isolados três aminoácidos não protéicos, dois dos quais identificados como o ácido 1-aminociclobutano-1,3-dicarboxílico e δ -acetilornitina.
- UNITERMOS: *Ateleia glazioviana*; δ -acetilornitina; aminoácidos não protéicos; 1-aminociclobutano-1,3-dicarboxílico; timbó.

Introdução

Ateleia glazioviana Baillon, *Leguminosae-Papilionoideae*, de ampla ocorrência na região de Palmeira das Missões, no estado do Rio Grande do Sul, é conhecida popularmente como timbó.¹³ Atividades abortiva em herbívoros domésticos, ictiotóxica e repelente de insetos são referidas por populares e profissionais do campo.

* Trabalho elaborado com auxílio da FAPERGS. Processo nº 90.02318.0.

** Departamento de Fármacos e Medicamentos - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - 14801-902 - Araraquara - SP.

*** Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - 90610-000 - Porto Alegre - RS.

**** Instituto de Química Farmacêutica - Univ. de Münster - Alemanha.

Atividade icthiotóxica foi confirmada¹⁵ e investigações de atividades abortiva^{9,11} e alelopática¹² estão sendo realizadas.

Na revisão bibliográfica sobre espécies do gênero foram encontrados poucos trabalhos, como estudos sobre a composição química^{1,2,4,14} e ecológicos.^{5,6}

Quanto à constituição química de *Ateleia glazioviana*, Ortega et al.^{15,16,18} relataram o isolamento e a identificação dos seguintes compostos flavonoídicos: rutina, iso-ramnetina, quercetina, canferol, miricetina, afrosmosina e 5-metoxi-afrosmosina;¹⁴⁻¹⁸ foi caracterizada ainda a presença dos aminoácidos protéicos alanina, arginina, asparagina, leucina, lisina, serina, treonina e valina, e três aminoácidos não protéicos.¹⁴

O objetivo deste trabalho foi, então, realizar o isolamento e a identificação dos aminoácidos não protéicos.

Material e métodos

Material

O material botânico analisado foi coletado no município de Palmeira das Missões, estado do Rio Grande do Sul, em janeiro de 1990.

Métodos

Procedimentos gerais

Espectros de RMN foram obtidos com espectrômetro Varian-Gemini-2000; espectros de IV com Shimadzu, modelo 408 e espectros de massas com Varian MAT 44. Cromatografias em camada delgada foram realizadas em placas prontas, gel de sílica 60, Merck, com n-butanol: ácido acético: água (BAW – 12:03:05) como eluente. Nas cromatografias em coluna, realizadas em coluna de vidro de diversos tamanhos, gel de sílica 60, Merck, foi utilizado como adsorvente, e n-butanol saturado com ácido acético 1 N, como eluente. Nas cromatografias de troca iônica, foram utilizadas resinas catiônicas (Merck – ref. 4765) e aniônicas (Merck – 4766).

Isolamento dos aminoácidos não protéicos

Embora a presença dos três aminoácidos tenha sido detectada tanto em folhas como sementes e pericarpo alado, para o isolamento foram utilizadas as partes vegetais com maior teor relativo, conforme indicação de análise cromatográfica preliminar.

Isolamento de ANP₁

Quinhentos gramas (500 g) de sementes secas ao ar e moídas foram extraídas por decocção com 2.000 ml etanol:água (1:1), totalizando seis litros de extrato, que foram reunidos e concentrados a baixa temperatura sob pressão reduzida a 500 ml. Quatrocentos mililitros foram submetidos a fracionamento com solventes de polaridade crescente: diclorometano, acetato de etila e n-butanol. A fração aquosa final foi fracionada em coluna de troca iônica fortemente catiônica (Merck, art. 4765) com NH₄OH 1 N, para a obtenção da fração enriquecida de aminoácidos, que concentrada à secura em evaporador rotatório a 60°C resultou em 9,7 g. Uma amostra de 600mg desta fração foi purificada através de filtração sucessiva sobre carvão ativo e coluna de Amberlite XAD₂. Foram obtidos 220mg, que foram fracionados através de cromatografia em funil de vidro sinterizado G₁ contendo gel de sílica e eluídos com BAW (12:03:05) em frações de 5 ml. As frações 6 a 11 forneceram 79 mg de uma substância cristalina branca, codificada por ANP₁.

Isolamento de ANP₂

Quinhentos gramas (500 g) de sementes de *Ateleia glazioviana* foram processados como descrito em Isolamento de ANP₁ até a obtenção da fração amoniacal enriquecida de aminoácidos, a qual foi filtrada sobre carvão ativado e concentrada até cerca de 100 ml, sendo então purificada através de cromatografia de coluna com 200 g de Amberlite XAD₂. A eluição com água destilada forneceu 300 ml de solução incolor, a qual resultou em 5 g de produto ainda não cromatograficamente puro. Essa amostra foi dissolvida em quantidade suficiente de água destilada e fracionada em coluna de 50 x 2 cm contendo 200 g de gel de sílica e eluída com n-butanol saturado com ácido acético 1 N. Após repetição desse processo de purificação, foram obtidos 50mg de substância cristalina branca, codificada por ANP₂.

Isolamento de ANP₃

Trezentos gramas (300 g) de pericarpo alado de *A. glazioviana* foram secos ao ar, moídos e extraídos duas vezes por maceração com etanol:água (1:1). Foram obtidos seis litros de extrato e concentrados a 500 ml. Quatrocentos mililitros foram submetidos a fracionamento com solventes de polaridade crescente: diclorometano: acetato de etila: n-butanol (Figura 1). A fração aquosa final, aplicada em coluna de troca iônica fortemente catiônica, forneceu 4,8 g da fração rica em aminoácidos. Dois gramas dessa fração foram fracionados cromatograficamente em coluna de vidro com 150 cm de comprimento e 3 cm de diâmetro interno contendo 200 g de gel de sílica. A amostra foi dissolvida em quantidade suficiente de água e eluída com n-butanol saturado com ácido acético 1N. Foram coletadas noventa frações de 100 ml, que, após análise

cromatográfica, foram reunidas e concentradas. As frações 61 a 83 forneceram 636 mg de uma substância de cor levemente amarelada, codificada como ANP₃.

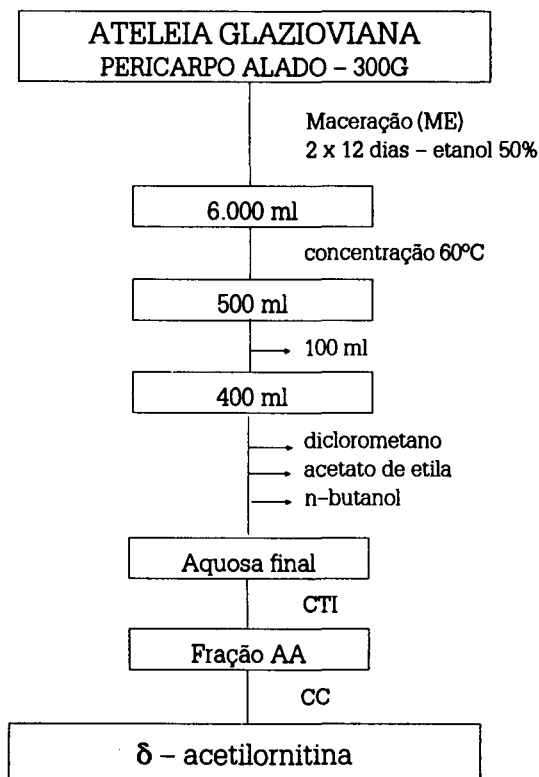


FIGURA 1 - Esquema de preparação e fracionamento do extrato de pericarpo alado de *Ateleia glazioviana*. PA = pericarpo alado; ME = maceração etanólica; CTI = coluna de troca iônica; CC = cromatografia em coluna.

Resultados e discussão

A análise cromatográfica preliminar mostrou a presença de três aminoácidos não protéicos tanto em folhas como em sementes e no pericarpo alado (Figura 2) indicando maior concentração do aminoácido codificado como ANP₃ no pericarpo alado e de ANP₁ e ANP₂ nas sementes, razão pela qual estas partes vegetais foram utilizadas para o isolamento.

Aminoácido ANP₂

Foi obtido como substância branca cristalina (50mg), funde com decomposição acima de 180°C, apresenta valor de R_f de 0,22 no sistema BAW (12:03:05). O espectro

de massas por ionização química indica M^{+1} em 160 (Figura 3). O espectro de massas por impacto eletrônico apresenta como íon principal, o fragmento $m/z = 87$ (Figura 4). Os espectros de ^{13}C -RMN ($\text{D}_2\text{O}/\text{NaOD}$ e DMSO) caracterizam a presença de cinco carbonos, os quais foram identificados pela técnica APT em $\text{D}_2\text{O}/\text{NaOD}$ como duas carbonilas (188,0 e 186,0 ppm), um carbono quaternário (59,0), dois carbonos secundários simétricos (42,0 ppm) e um grupo $-\text{CH}-$ (36,0 ppm) (Figura 5). O espectro ^1H -RMN (D_2O) indica a presença de três multipletos: 3,15 (1 H); 2,75 (2 H) e 2,44 ppm (2 H) (Figura 6). O conjunto de espectros permite propor a fórmula molecular $\text{C}_6\text{H}_9\text{NO}_4$, massa molecular 159, para esse aminoácido não protéico. A comparação com dados da literatura permite a sua identificação como ácido 1-aminociclobutano-1,3-dicarboxílico, aminoácido já relatado para outra espécie do gênero, *Ateleia herbert-smithii*.²

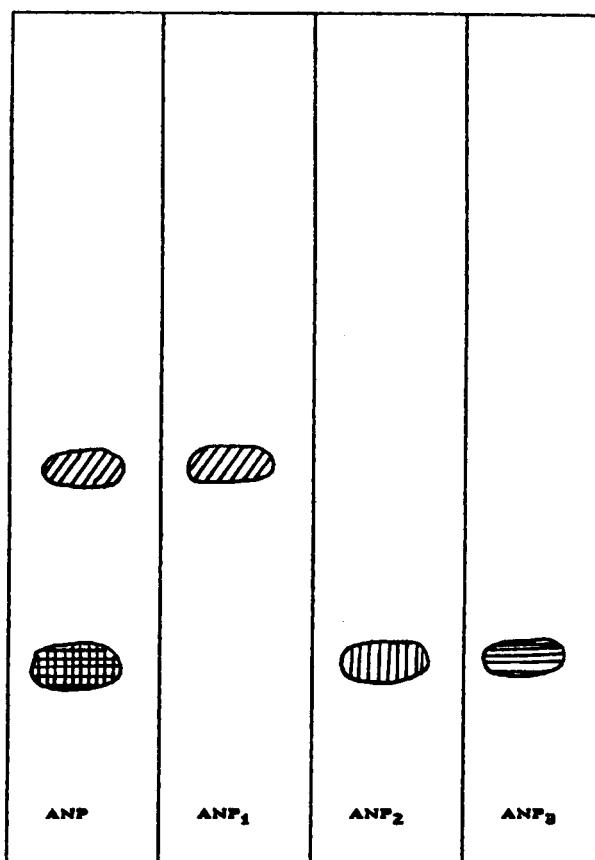


FIGURA 2 - Cromatograma comparativo dos aminoácidos não protéicos isolados de *Ateleia glazioviana*. ANP = mistura dos aminoácidos não protéicos.

Eluente: BAW (12:03:05);

Adsorvente: gel de sílica G;

Revelador: solução etanólica de ninidrina 0,5%;

Tempo de saturação: 12 h; aquecimento: 100°C, dez minutos.

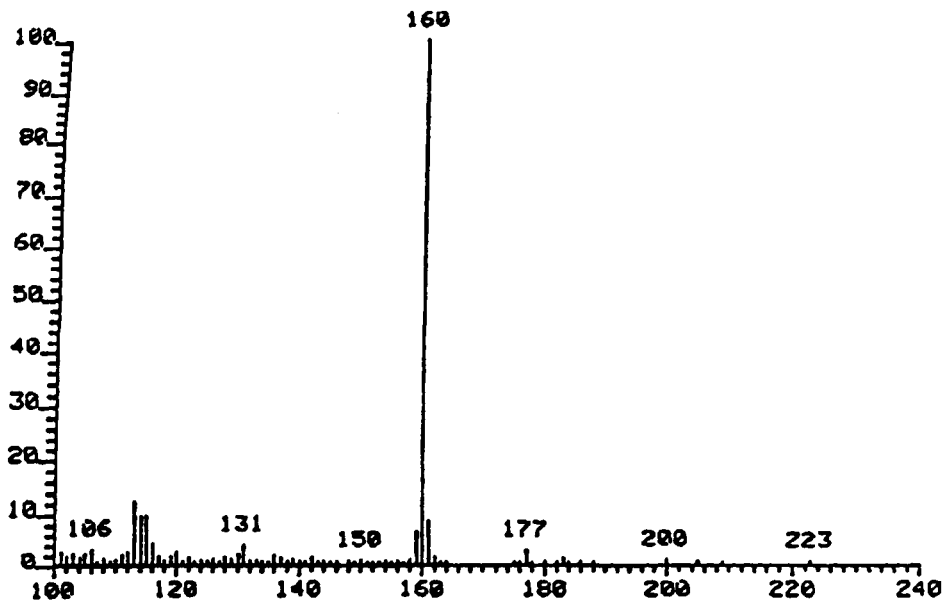


FIGURA 3 - Espectro de massas por ionização química do aminoácido não protéico ANP₂ isolado de *Ateleia glazioviana*.

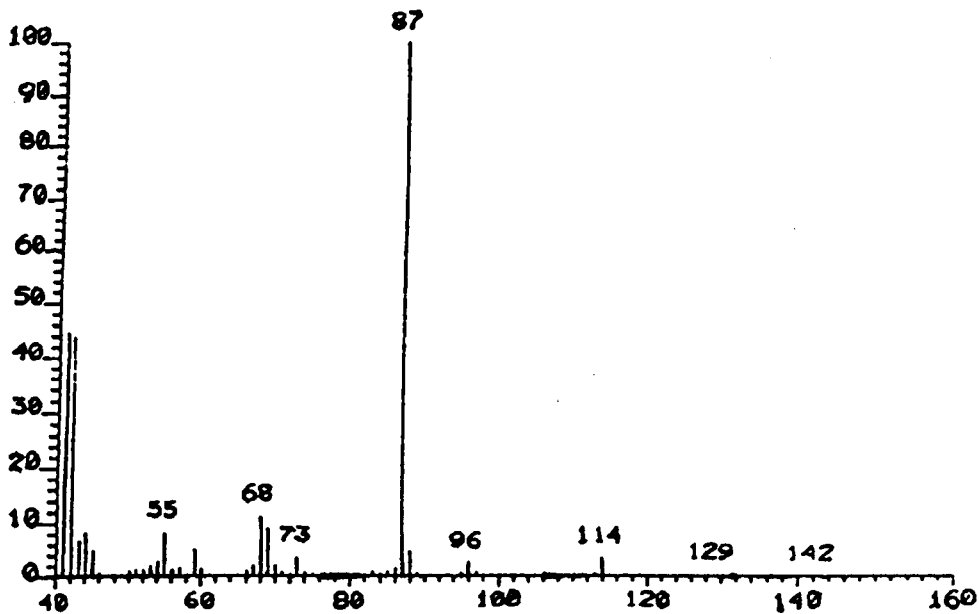


FIGURA 4 - Espectro de massas por impacto eletrônico do aminoácido não protéico ANP₂ isolado de *Ateleia glazioviana*.

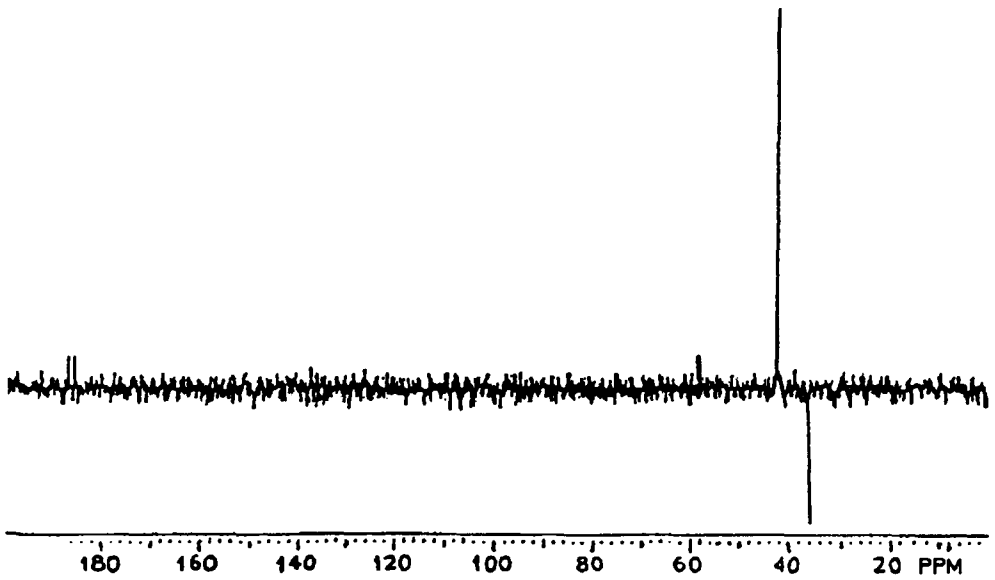


FIGURA 5 - Espectro de RMN de ^{13}C , APT em D_2O do aminoácido não protéico ANP₂ isolado de *Ateleia glazioviana*.

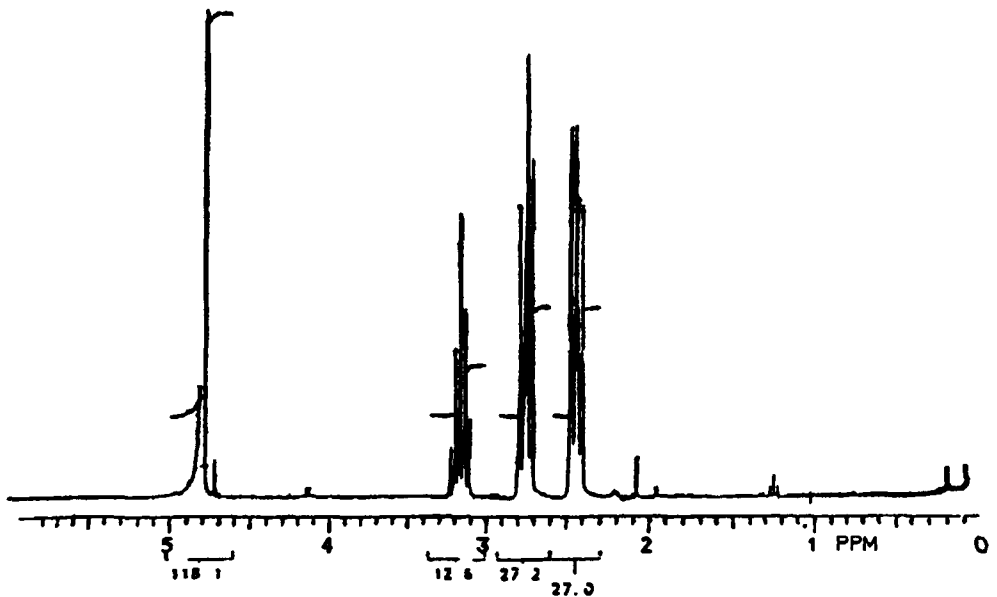
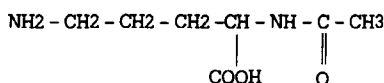


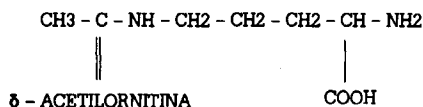
FIGURA 6 - Espectro de RMP em D_2O do aminoácido não protéico ANP₃ isolado de *Ateleia glazioviana*.

Aminoácido ANP₃

Foi obtido como substância levemente amarelada (636 mg), com fusão com decomposição a partir de 220°C e valor de 0,23 no sistema BAW (12:03:05). O espectro por ionização química indica massa molecular 174 (Figura 7), e o espectro de massas por impacto eletrônico apresenta como íon de maior massa o fragmento $m/z = 129$, devido à perda do grupo carboxila (Figura 8). O espectro de ^{13}C -RMN (D_2O) indica a presença de duas carbonilas (177,6 e 177,5 ppm), um grupo $-\text{CH}-$ (57,0 ppm), três grupamentos $-\text{CH}_2-$ (41,9; 31,0 e 27,4 ppm) e um grupamento $-\text{CH}_3-$ (25,1 ppm) (Figura 9), o que permite, juntamente com o espectro de massas, propor a fórmula molecular $\text{C}_7\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3$. O espectro RMN (D_2O) (Figura 10) permite as atribuições da Figura 9. Os espectros de correlação próton-próton e próton-carbono indicam a conexão entre os grupos metileno (Figuras 11 e 12). A análise do conjunto de espectros permite propor como estruturas possíveis:



α - ACETILORNITINA



Spectrum # 47 Filename: WSCS1891 Acquired: Jan-10-1991 13:03:15 + 1:18
 Comment: SCHENKEL FO1 CI NY AMONIAK
 Base Pk: 189 Int: 38583 Range: 81-399 RIC: 1570 100.00% = 38583
 AGC time: 52840

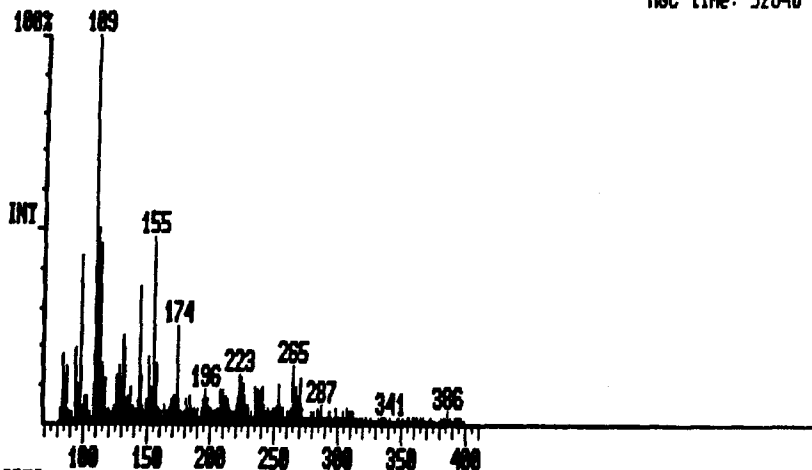


FIGURA 7 - Espectro de massas por ionização química do aminoácido não protéico ANP₃ isolado de *Ateleia glazioviana*.

Spectrum # 21 File name: USC11881 Acquired: Jan-18-1991 09:48:55 + 0.42
Comment: SCHENKEL T61=ANP1 CI MIT AMMONIAK
Base Pk: 154 Int: 194171 Range: 82-391 RIC: 2776 100.00% = 194171
RCC time: 52840

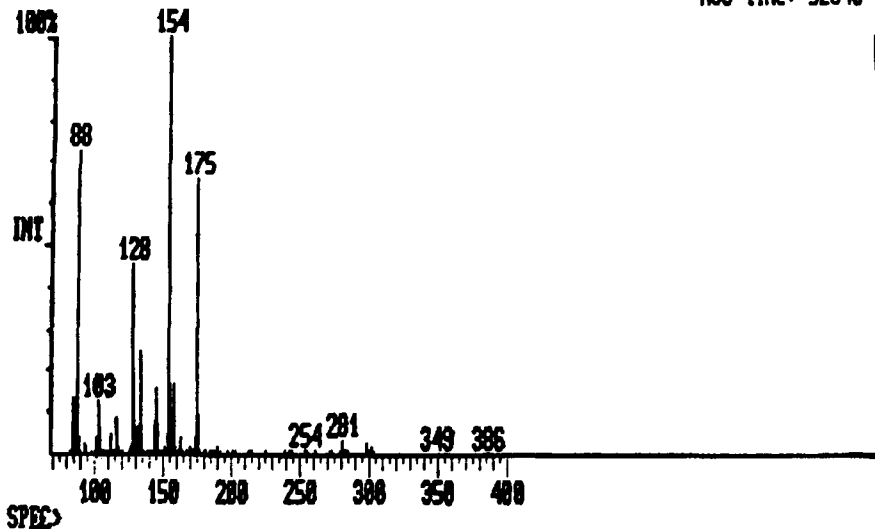


FIGURA 8 - Espectro de massas por impacto eletrônico do aminoácido não protéico ANP₃ isolado de *Ateleia glazioviana*.

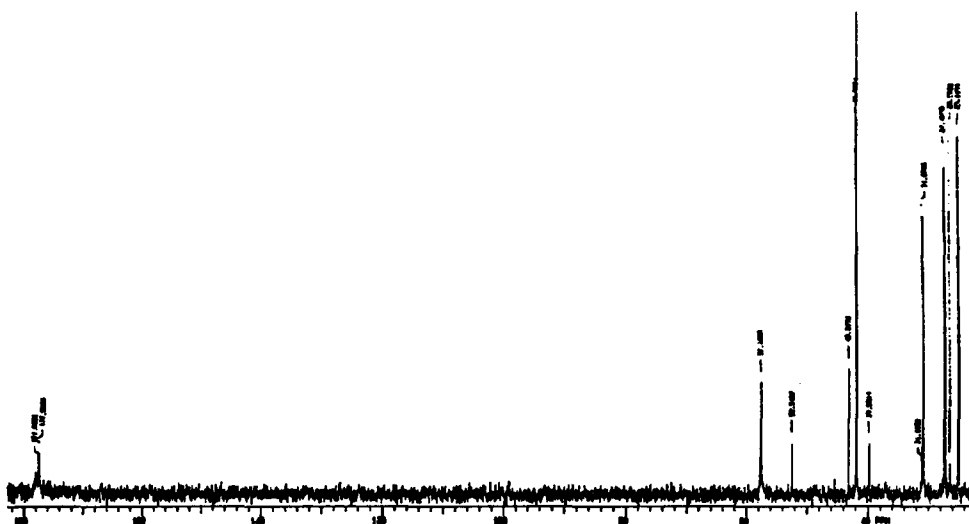


FIGURA 9 - Espectro de RMN de ¹³C em D₂O do aminoácido não protéico ANP₃ isolado de *Ateleia glazioviana*

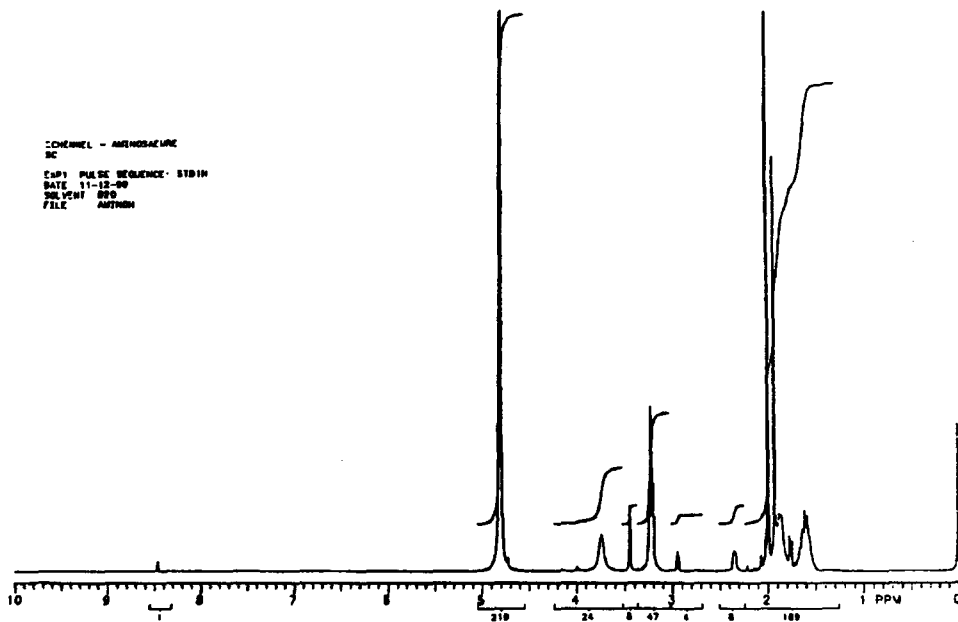


FIGURA 10 - Espectro de RMP em D₂O do aminoácido não protéico ANP₃ isolado de *Ateleia galzioviana*.

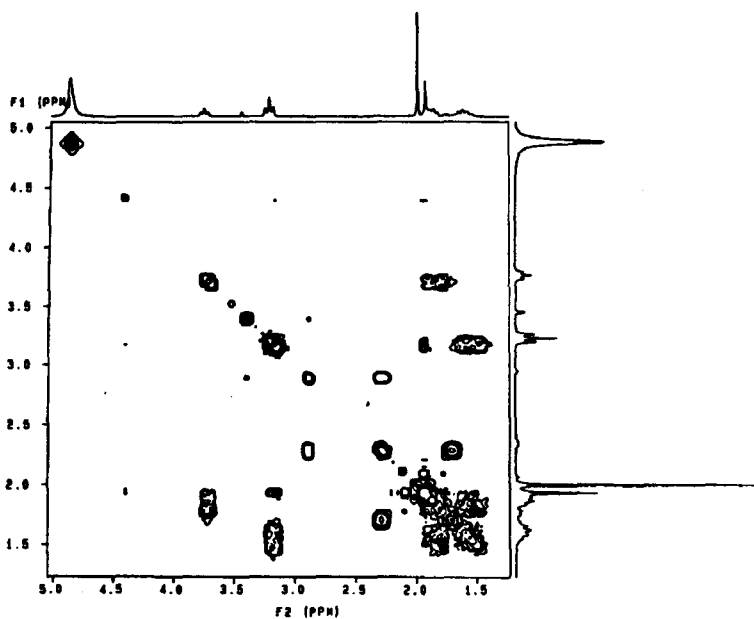


FIGURA 11 - Espectro de correlação próton-próton em D₂O do aminoácido não protéico ANP₃ isolado de *Ateleia galzioviana*.

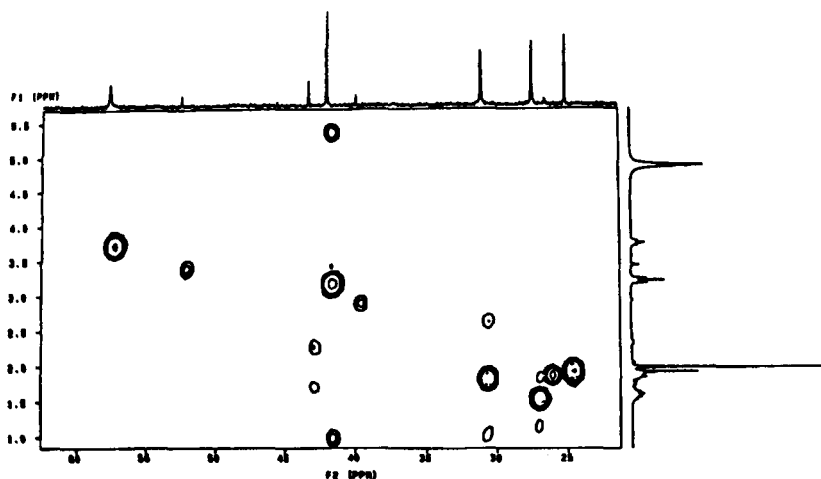


FIGURA 12 - Espectro de correlação próton-carbono em D₂O do aminoácido não protéico ANP₃ isolado de *Ateleia glazioviana*.

A distinção das duas estruturas foi possível através da reação com ninidrina após complexação com cobre. Os α -aminoácidos formam um complexo com Cu⁺⁺, aspergido sobre o cromatograma antes da revelação com ninidrina.¹⁰ Através desses cromatogramas observou-se uma diminuição na intensidade de coloração com a revelação com ninidrina, o que indica tratar-se da δ -acetilornitina. Tal estrutura também foi confirmada através de comparação com dados espectrais constantes na literatura.⁷ Esse aminoácido já foi descrito para outras espécies como *Cucumaria frondosa*, *Fagus silvatica* e *Azelia bella*.^{3,8,19}

Do aminoácido ANP₁ foram obtidos 79 mg. O comportamento cromatográfico indica tratar-se de aminoácido neutro. Foram obtidos espectros de ressonância magnética protônica e de ¹³C que sugerem tratar-se de substância cíclica: no entanto, os dados obtidos não permitem ainda a proposição de uma estrutura.

Conclusões

Dos extratos hidroetanólicos de pericarpo alado e de sementes de *Ateleia glazioviana* Baillon, *Leguminosae-Papilionoideae*, foram isolados três aminoácidos não protéicos, dos quais dois foram identificados como ácido 1-aminociclobutano-1, 3-dicarboxílico e δ -acetilornitina.

- **ABSTRACT:** *Ateleia glazioviana* Baillon, Leguminosae-Papilionoideae, is a tree widespread in the state of Rio Grande do Sul. It is reputed to be toxic to cattle, fish and repellent to insects. In this work, two of the main non proteinogenic amino acids were identified through spectroscopic methods as 1-aminociclobutane-1,3-dicarboxylic and δ -acetylornithine.
- **KEYWORDS:** *Ateleia glazioviana*; δ -acetylornithine; 1-aminociclobutane-1,3-dicarboxylic; non-proteinogenic amino acids; "timbó".

Referências bibliográficas

1. AUSTIN, G. N. et al. Isolation from *Ateleia herbert-smithii* Pittier (Sophoreae, Leguminosae) and X-ray structure of cis-1-amino 3-hydroxymethylcyclobutane-1-carboxylic acid, an achiral non-protein amino acid. *Tetrahedron*, v. 43, p. 1857-61, 1987.
2. BELL, E. A. et al. 2,4-Methanoproline-(2-carboxy-2, 4-methanopyrrolidine) and 2,4-methanoglutamic acid (1-amino-1, 3-dicarboxycyclobutane) in seeds of *Ateleia herbert-smithii* Pittier (Leguminosae). *J. Am. Chem. Soc.*, v. 102, p. 1409-14, 1980.
3. FINDLAY, J. A. et al. Constituents of the sea cucumber *Cucumaria frondosa*. *J. Nat. Prod.*, v. 47, p. 560, 1984.
4. HUGHES, P., CLARDY, J. Total synthesis of cyclobutane amino acids from *Ateleia herbert-smithii*. *J. Org. Chem.*, v. 53, p. 4793-6, 1988.
5. JANZEN, D. H. Interand intra-crop variation in seed weight of Costa Rican *Ateleia herbert-smithii* Pitt. (Leguminosae). *Brenesia*, v. 14, p. 311-23, 1978.
6. JANZEN, D. H. et al. Toxicity of secondary compounds to the seed-eating larvae of the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus*. *Phytochemistry*, v. 16, p. 223-7, 1977.
7. KASAI, T. et al. γ -Glutamyl peptides of *Vigna radiata* seeds. *Phytochemistry*, v. 25, p. 679-82, 1986.
8. KRISTENSEN, I. et al. Free amino acids and γ -glutamyl peptides in seeds of *Fagus silvatica*. *Phytochemistry*, v. 13, p. 2803-11, 1974.
9. LANGELOH, A. et al. Potencial abortivo e infertilizante de plantas brasileiras contaminantes ocasionais de pastagens de bovinos e outros herbívoros de interesse econômico. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 11, p. 81-3, 1991.
10. LARSEN, P. O., KJAER, A. Paper-chromatographic differentiation between α -monoamino acids and other ninhydrin-positive substances. *Biochi. Biophys. Acta*, v. 38, p. 148-50, 1960.
11. MARONA, H. R. N. et al. Atividade abortiva de *Ateleia glazioviana* Baillon (Leguminosae-Papilionoideae). *Pesq. Vet. Bras.*, v. 12, p. 81-3, 1992.
12. MARONA, H. R. N., et al. Phytotoxic activity of *Ateleia glazioviana* Baillon on lettuce seeds. *Acta Bot. Bras.*, 1993. (no prelo)
13. MURÇA PIRES, J. I. Plantas ictiotóxicas: aspectos da botânica sistemática. *Ciência e Cultura*, v. 32, p. 37-41, 1978. (Suplemento V Simpósio)

14. ORTEGA, G. G. *Sobre a química e a toxicidade do "timbó" Ateleia glazioviana Baill. (Leguminosae-Papilionoideae)*. Porto Alegre, 1985. 135p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
15. ORTEGA, G. G., SCHENKEL, E. P. Ichthyotoxic activities of *Ateleia glazioviana* and *Thinouia coriacea* Britt. *J. Ethnopharmacol.*, v. 20, p. 81-4, 1987.
16. _____. Isoflavonas de *Ateleia glazioviana* Baillon. *Cad. Farm.*, v. 2, p. 153-61, 1986.
17. ORTEGA, G. G. et al. Las isoflavonas C-5-metoxilado y su significado quimiotaxonomico en *Papilinoideae*. *Rev. Latinoam. Quim.*, v. 20, p. 53-6, 1989.
18. _____. Rutina em folhas de *Ateleia glazioviana* Baillon. *Rev. Soc. Bras. Farmacognosia*, v. 1, p. 136-42, 1986.
19. WELTER, A. et al. Nouveaux acides amines libres de *Afzelia bella*: trans-hydroxy-4-L-proline et transcarboxy-4-L-proline. *Phytochemistry*, v. 17, p. 131-4, 1978.