

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**FITOQUÍMICA DE *Raputia praetermissa* (RUTACEAE) E BUSCA
POR CANDIDATOS A HERBICIDAS INIBIDORES DA
FOTOSSÍNTESE A PARTIR DE PRODUTOS NATURAIS**

THIAGO ANDRÉ MOURA VEIGA*

Tese apresentada como parte dos
requisitos para a obtenção do título de
DOUTOR EM CIÊNCIAS, área de
concentração: QUÍMICA ORGÂNICA

Orientadora: Prof^a. Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva

*Bolsista CNPq

São Carlos – SP

2008

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

V426fr

Veiga, Thiago André Moura.

Fitoquímica de *Raputia praetermissa* (Rutaceae) e busca por candidatos a herbicidas inibidores da fotossíntese a partir de produtos naturais / Thiago André Moura Veiga. -- São Carlos : UFSCar, 2008.
276 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2008.

1. Produtos naturais. 2. *Raputia*. 3. Rutaceae. 4. Quimiosistemática. 5. Herbicidas. 6. Fotossíntese. I. Título.

CDD: 547.3 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Doutorado

*Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de tese de doutorado do candidato **Thiago André Moura Veiga** realizado em 18 de abril de 2008:*



Profa. Dra. Maria Fatima das G. F. da Silva



Prof. Dr. Luiz Claudio de Almeida Barbosa



Prof. Dr. Pedro Luis da Costa Aguiar Alves



Prof. Dr. João Batista Fernandes



Profa. Dra. Dulce Helena Siqueira Silva

Dedico este trabalho a Terezinha de Jesus da Silva Moura, a pessoa mais importante que Deus me presenteou nesta vida, por ser uma grande Mãe, por ser minha grande incentivadora, educadora e principalmente por admitir minha ausência todos estes anos com muita compreensão e saúde. Com amor, carinho e respeito...

Thiago

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por tudo que proporcionou em minha vida, acima de tudo pela saúde e força de vontade para enfrentar as dificuldades e mudanças causadas pela carreira estudantil.

Agradeço à minha família, que mesmo longe, sempre estiveram próximos no pensamento e no coração, em especial a tia Luzia pelos ensinamentos e ainda à minha irmã Danielle pela amizade, apoio e conselhos.

À Prof^ª. Maria Fátima das G. F. da Silva, pela oportunidade, pelos ensinamentos, paciência e orientação.

Aos professores do Grupo de Produtos Naturais, João B. Fernandes, Paulo C. Vieira e Edson R. Filho pela preciosa colaboração e ensinamentos.

Aos professores do DQ/UFPa, que despertaram o meu interesse pela pesquisa e do DQ/UFV, que fizeram com que esse interesse se tornasse uma realidade.

Ao Prof^º. Blas Lotina-Hennsen por ter aberto as portas de seu laboratório durante minha permanência em seu país, pelos ensinamentos e confiança. Agradeço ainda a Beatriz King-Díaz pela amizade, paciência e pelo conhecimento transmitido.

À Lisandra V. Rosas, pela colaboração no início deste trabalho.

À Patrícia T. Baraldi por ter sido companheira, amorosa, carinhosa, verdadeira e amiga. Meu eterno agradecimento, admiração, respeito e carinho.

Ao grande amigo Sebastião da C. Silva que sempre esteve disposto a ajudar, aconselhar, ouvir, discutir e acima de tudo pela amizade de longa data.

Aos amigos do Grupo de Produtos Naturais, principalmente pela agradável convivência, amizade e por confiarem suas substâncias a mim para realização dos testes.

Aos companheiros da República Pai D'égua pela amizade e convivência e aos meus conterrâneos que viveram e vivem em São Carlos, por terem sido minha família.

A todos os colegas do DQ/UFSCar principalmente pelo companheirismo.

Ao corpo técnico do DQ/UFSCar, em especial a Luciana Vizotto e Valdir Vaz pela colaboração e amizade e às secretárias do PPGQ pela disposição em ajudar e pela responsabilidade e a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução e conclusão deste querido e estimulante projeto.

Ao CNPq pela bolsa de estudos concedida no Brasil e a CAPES pela oportunidade de realização de estágio no exterior, que foi de fundamental importância para o meu crescimento pessoal e profissional.

RESUMO

FITOQUÍMICA DE *Raputia praetermissa* (Rutaceae) E BUSCA POR CANDIDATOS A HERBICIDAS INIBIDORES DA FOTOSÍNTESE A PARTIR DE PRODUTOS NATURAIS

– A espécie *R. praetermissa* é nativa da Amazônia. Planta recentemente classificada, não apresenta dados biológicos e/ou químicos na literatura. Este fato levou a realização deste estudo, o que pode levar ao correto posicionamento quimiosistemático do gênero dentro da família Rutaceae. A partir do estudo fitoquímico das raízes de *R. praetermissa* concluído em 2005, foram encontrados principalmente alcalóides derivados do triptofano e limonóides. Nesta segunda etapa foi realizado o estudo fitoquímico de algumas frações do extrato em diclorometano das raízes e ainda os extratos do caule e folhas da espécie. Foram isolados e identificados alcalóides (indólicos, furoquinolínicos e quinolônicos), triterpenos (cicloartanos e friedelano), esteróides e um derivado do ácido cinâmico. Dentre as substâncias encontradas podemos destacar quatro substâncias não relatadas na literatura: dois alcalóides, um diterpeno e um derivado do ácido cinâmico. Uma coleção de 120 produtos naturais isolados pelo grupo de PN/UFSCar foi submetida a uma série de reações enzimáticas que esclareceram o mecanismo de ação das substâncias consideradas ativas frente à inibição da fotossíntese *in vitro* em cloroplastos isolados das folhas de espinafre. Foi possível esclarecer o mecanismo de ação de 30 substâncias, o que possibilitou até o momento, a publicação de artigos em revistas indexadas internacionais e congressos (nacionais e internacionais). As perspectivas são bastante interessantes, principalmente no que diz respeito à implantação desta nova linha de pesquisa não só no Departamento de Química (UFSCar), mas também no Brasil, para que posteriormente sejam encontrados modelos para novos herbicidas inibidores da fotossíntese.

ABSTRACT

PHYTOCHEMISTRY OF *Raputia praetermissa* (Rutaceae) AND SEARCH FOR CANDIDATES OF HERBICIDES INHIBITORS OF PHOTOSYNTHESIS FROM NATURAL PRODUCTS

– The species *R. praetermissa* is native from Amazonia. Plant recently classified, it does not give biological and/or chemical in the literature. This fact has led to this study, which can lead to the correct chemosystematic positioning of the genus within the family Rutaceae. From the phytochemical study of the roots of *R. praetermissa* concluded in 2005, mainly were found alkaloids derived from tryptophan and limonoids. The second step was the phytochemical study of some fractions of the dichloromethane extract of the roots and the extracts of the stem and leaves of the species. Alkaloids have been isolated and identified (indole, furoquinolines and quinolones), triterpenes (cycloartanes and friedelanes), steroids and a derivative of cinnamic acid. Among the substances found can highlight four substances not reported in the literature: two alkaloids, a diterpene and the derivative of cinnamic acid. A collection of 120 natural products isolated by the group of Natural Products/UFSCar was subjected to a series of enzymatic reactions that explained the mechanism of action of the substances considered active against photosynthesis in vitro in chloroplasts isolated from the leaves of spinach. It was possible to clarify the mechanism of action of 30 substances, which allowed so far, the publication of articles in indexed international journals and conferences (nationals and internationals). The prospects are quite interesting, especially as regards the implementation of this new line of research, not only in the Department of Chemistry (UFSCar), but also in Brazil, so that later are found models for new herbicides inhibitors of photosynthesis.

PRINCIPAIS ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

δ	Deslocamento químico em ppm
θ	Diâmetro
H	Altura
μL	Microlitro
μM	Micromolar
AcOEt	Acetato de Etila
CC	Cromatografia em Coluna
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CDCl_3	Clorofórmio Deuterado
CF	Coluna Filtrante
CF_0	Fator de acoplamento 0
CF_1	Fator de acoplamento 1
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
<i>d</i>	Dupleto
DCM	Diclorometano
DCPIP	Diclofenolindofenol
DPC	Difenilcarbazida
DMSO	Dimetilsulfóxido
<i>dd</i>	Duplo dupleto
<i>ddd</i>	Duplo duplo dupleto
EM	Espectrometria de Massas
eV	Elétron volts
FSI	Fotosistema I
FSII	Fotosistema II

g	Gramma
gNOESY	<i>Gradient Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
Hz	Hertz
I₅₀	Concentração necessária para inibição de 50% da atividade
IE	Ionização por impacto eletrônico
IV	Infravermelho
J	Constante de acoplamento
m	Multiplete
m/z	Relação massa carga
MeOH	Metanol
MHz	Mega Hertz
MV	Metilviologênio
nOe	<i>Nuclear Overhauser effect</i>
PDEE	Programa de Doutorado com Estágio no Exterior
P₆₈₀	Centro de reação do fotosistema II
P₇₀₀	Centro de reação do fotosistema I
Pi	Fosfato inorgânico
pH	Potencial Hidrogeniônico
PENDANT	<i>Polarization Enhancement Nurtured During Attached Nucleus Testing</i>
qui	Quintuplete
RMN¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono – 13
RMN¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
rpm	Rotações por minuto
SAM	S-Adenosil-Metionina
SiMo	Silicomolibdato de sódio

<i>s</i>	Singleto
<i>sl</i>	Singleto largo
<i>t</i>	Tripleto
<i>thep</i>	Triplo hepteto
TMQH₂	Tetrametilquinona reducida
UV	Ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I: Fitoquímica de *Raputia praetermissa* (RUTACEAE)

Figura 1.1	Espécie <i>Raputia praetermissa</i> . Recortes do livro: Flora da Reserva Ducke	08
Figura 1.2	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) da substância 14	37
Figura 1.3	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) da substância 10	38
Figura 1.4	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) da substância 13	39
Figura 1.5	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) da substância 5	40
Figura 1.6	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) da substância 12	40
Figura 1.7	Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) da substância 9	50
Figura 1.8	Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) da substância 9	51
Figura 1.9	Espectro de COSY (400 MHz, CDCl ₃) da substância 9	52
Figura 1.10	Mapa de contorno de HSQC (400 MHz, CDCl ₃) da substância 9	53
Figura 1.11	Mapas de contorno de HMBC (400 MHz, CDCl ₃) da substância 9	54
Figura 1.12	Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) da substância 11	55
Figura 1.13	Espectro de RMN ¹³ C (50 MHz, CDCl ₃) da substância 11	56
Figura 1.14	Espectro de Massas (IE, 70 eV) da substância 9	57
Figura 1.15	Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) da substância 8	65

Figura 1.16	Espectro de RMN ¹³ C (50 MHz, CDCl ₃) da substância 8	66
Figura 1.17	Espectros de COSY (CDCl ₃ , 400 MHz) da substância 8	67
Figura 1.18	Mapa de contorno de HSQC (CDCl ₃ , 400 MHz) da substância 8	68
Figura 1.19	Mapa de contorno de HMBC (CDCl ₃ , 400 MHz) da substância 8	69
Figura 1.20	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) da substância 7	80
Figura 1.21	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) da substância 7	80
Figura 1.22	Espectro de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 50 MHz) da substância 7	81
Figura 1.23	Espectros de COSY (CDCl ₃ , 400 MHz) da substância 7	82
Figura 1.24	Mapa de contorno de HSQC (CDCl ₃ , 400 MHz) da substância 7	83
Figura 1.25	Mapas de contorno de HMBC (CDCl ₃ , 400 MHz) da substância 7	84
Figura 1.26	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) da substância 2	91
Figura 1.27	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) da substância 21	91
Figura 1.28	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 50 MHz) da substância 2	92
Figura 1.29	Espectro de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 100 MHz) da substância 21	92
Figura 1.30	Espectro de COSY (CDCl ₃ , 400 MHz) da substância 21	93
Figura 1.31	Mapa de contorno de HMBC (CDCl ₃ , 400 MHz) da substância 21	94
Figura 1.32	Mapas de contorno de HSQC (CDCl ₃ , 400 MHz) da substância 21	95
Figura 1.33	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) da fração 3	98
Figura 1.34	Espectros de massas (IE, 70 eV) do sitosterol e estigmasterol	98

Figura 1.35	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) da substância 4	99
Figura 1.36	Espectro de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 50 MHz) da substância 4	99
Figura 1.37	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) da substância 19	106
Figura 1.38	Espectro de COSY (CDCl ₃ , 400 MHz) da substância 19	107
Figura 1.39	Espectro de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 100 MHz) da substância 19	107
Figura 1.40	Mapa de contorno de HSQC (CDCl ₃ , 400 MHz) da substância 19	108
Figura 1.41	Mapas de contorno de HMBC (CDCl ₃ , 400 MHz) da substância 19	109
Figura 1.42	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) da substância 15	114
Figura 1.43	Espectro de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 100 MHz) da substância 15	115
Figura 1.44	Mapa de contorno de HSQC (CDCl ₃ , 400 MHz) da substância 15	116
Figura 1.45	Mapa de contorno de HMBC (CDCl ₃ , 400 MHz) da substância 15	117
Figura 1.46	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) da substância 1	121
Figura 1.47	Espectro de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 50 MHz) da substância 1	121
Figura 1.48	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) da substância 16	128
Figura 1.49	Espectro de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 50 MHz) da substância 16	128
Figura 1.50	Espectro de COSY (CDCl ₃ , 400 MHz) da substância 16	129
Figura 1.51	Mapa de contorno de HSQC (CDCl ₃ , 400 MHz) da substância 16	129

Figura 1.52	Mapa de contorno de HMBC (CDCl ₃ , 400 MHz) da substância 16	130
Figura 1.53	Experimento de gNOESY da substância 16 e ampliações (400 MHz, CDCl ₃)	131
Figura 1.54	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) da substância 18	139
Figura 1.55	Espectro de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 50 MHz) da substância 18	140
Figura 1.56	Espectro de COSY (CDCl ₃ , 400 MHz) da substância 18	141
Figura 1.57	Mapa de contorno de HSQC (CDCl ₃ , 400 MHz) da substância 18	142
Figura 1.58	Mapa de contorno de HMBC (CDCl ₃ , 400 MHz) da substância 18	143
Figura 1.59	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) da substância 6	150
Figura 1.60	Espectro de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 100 MHz) da substância 6	151
Figura 1.61	Espectros de COSY (CDCl ₃ , 400 MHz) da substância 6	152
Figura 1.62	Mapa de contorno de HMBC (CDCl ₃ , 400 MHz) da substância 6	153
Figura 1.63	Mapa de contorno de HSQC (CDCl ₃ , 400 MHz) da substância 6	154

CAPÍTULO II: Busca por Candidatos a Herbicidas Inibidores da Fotossíntese a partir de Produtos Naturais

Figura 2.1.	Alguns dos herbicidas disponíveis no mercado	169
Figura 2.2.	Representação do esquema Z da fotossíntese na membrana tilacoidal. A transferências de elétrons e H ⁺ é feita por 4 grandes complexos protéicos: PSII, citocromo <i>b6f</i> , PSI e ATP sintase	171

Figura 2.3.	Porcentagem de vendas de defensivos agrícolas no mercado mundial	175
Figura 2.4.	Estruturas das substâncias utilizadas nos ensaios fitotóxicos	186
Figura 2.5.	Efeito dos compostos 14 (■), 17 (●), 51 (▲) e 70 (▼) sobre a síntese de ATP. Os valores dos controles foram 4613, 4153, 1610 e 2044 $\mu\text{Mol ATP} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg Chl}^{-1}$, para 14 , 17 , 51 e 70 , respectivamente	203
Figura 2.6.	Efeito dos compostos 76 (■), 78 (●) e 83 (▲) sobre a síntese de ATP. Os valores dos controles foram 3582, 2044 e 7191 $\mu\text{Mol ATP} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg Chl}^{-1}$, para 76 , 78 e 83 , respectivamente	204
Figura 2.7.	Efeito do composto 71 sobre a síntese de ATP (■), transporte de elétrons basal (●), fosforilante (▲) e desacoplado (▼) de H_2O a MV em cloroplastos de espinafre. A razão para o controle da síntese de ATP foi 1012 $\mu\text{Mol ATP} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg Chl}^{-1}$. E para o transporte de elétrons basal, fosforilante e desacoplado foram 533, 600 e 1267 $\mu\text{equiv} \cdot \text{e}^{-} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg Chl}^{-1}$, respectivamente	207
Figura 2.8.	Aumento cinético da fluorescência de cloroplastos frescos, lisos e quebrados infiltrados com siderina (71), DCMU e tilacóides tratados com Tris. Os controles dos cloroplastos são mostrados para comparação. Curvas de indução de fluorescência (Chl a) foram medidas a temperatura ambiente. Os dados são médias de três repetições	211
Figura 2.9.	Aparecimento da banda K em aproximadamente 300	

μs . Diferença de cada curva do controle com a fluorescência variável relativa normalizada na amplitude $F_j - F_0$. Siderina a 400 (\bullet), 800 (\blacktriangle) e 1000 μM (\blacktriangledown). Cloroplastos quebrados incubados com 0.8 M Tris (\blacksquare) 212

Figura 2.10. Efeito do composto **73** sobre a síntese de ATP (\blacksquare), transporte de elétrons basal (\bullet), fosforilante (\blacktriangle) e desacoplado (\blacktriangledown) de H_2O a MV em cloroplastos de espinafre. A razão para o controle da síntese de ATP foi 3582 $\mu\text{Mol ATP} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg Chl}^{-1}$. E para o transporte de elétrons basal, fosforilante e desacoplado foram 234, 267 e 335 $\mu\text{equiv} \cdot \text{e}^{-} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg Chl}^{-1}$, respectivamente 214

Figura 2.11. Aumento cinético da fluorescência de cloroplastos frescos, lisos e quebrados infiltrados com cedrelona A (**73**), DCMU e tilacóides tratados com Tris. Os controles dos cloroplastos são mostrados para comparação. Curvas de indução de fluorescência (Chl a) foram medidas a temperatura ambiente. Os dados são médias de três repetições 216

Figura 2.12. Efeito do composto **136** sobre a síntese de ATP (\blacktriangledown), transporte de elétrons basal (\blacksquare), fosforilante (\bullet) e desacoplado (\blacktriangle) de H_2O a MV em cloroplastos de espinafre. A razão para o controle da síntese de ATP foi 1276 $\mu\text{Mol ATP} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg Chl}^{-1}$. E para o transporte de elétrons basal, fosforilante e desacoplado foram 933, 1200 e 1400 $\mu\text{equiv} \cdot \text{e}^{-} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg Chl}^{-1}$, respectivamente 220

Figura 2.13. Efeito do composto **09** sobre a síntese de ATP (■), transporte de elétrons basal (●), fosforilante (▲) e desacoplado (▼) de H₂O a MV em cloroplastos de espinafre. A razão para o controle da síntese de ATP foi 2578 μMol ATP· h⁻¹·mg Chl⁻¹. E para o transporte de elétrons basal, fosforilante e desacoplado foram 356, 445 e 845 μequiv·e⁻·h⁻¹·mg Chl⁻¹, respectivamente 224

Figura 2.14. Efeito do composto **54** sobre a síntese de ATP (■), transporte de elétrons basal (●), fosforilante (▼) e desacoplado (▲) de H₂O a MV em cloroplastos de espinafre. A razão para o controle da síntese de ATP foi 2578 μMol ATP· h⁻¹·mg Chl⁻¹. E para o transporte de elétrons basal, fosforilante e desacoplado foram 600, 850 e 1000 μequiv·e⁻·h⁻¹·mg Chl⁻¹, respectivamente 225

Figura 2.15. Efeito do composto **19** sobre a síntese de ATP (■), transporte de elétrons basal (●), fosforilante (▲) e desacoplado (▼) de H₂O a MV em cloroplastos de espinafre. A razão para o controle da síntese de ATP foi 4613 μMol ATP· h⁻¹·mg Chl⁻¹. E para o transporte de elétrons basal, fosforilante e desacoplado foram 286, 343 e 400 μequiv·e⁻·h⁻¹·mg Chl⁻¹, respectivamente 227

Figura 2.16. Efeito do composto **20** sobre a síntese de ATP (■), transporte de elétrons basal (●), fosforilante (▲) e desacoplado (▼) de H₂O a MV em cloroplastos de espinafre. A razão para o controle da síntese de ATP

foi $4613 \mu\text{Mol ATP} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg Chl}^{-1}$. E para o transporte de elétrons basal, fosforilante e desacoplado foram 500, 600 e 800 $\mu\text{equiv} \cdot \text{e}^{-} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg Chl}^{-1}$, respectivamente 228

Figura 2.17. Aumento cinético da fluorescência de cloroplastos frescos, lisos e quebrados infiltrados com os compostos **19** e **20**, DCMU e tilacóides tratados com Tris. Os controles dos cloroplastos são mostrados para comparação. Curvas de indução de fluorescência (Chl a) foram medidas a temperatura ambiente. Os dados são medias de três repetições 232

Figura 2.18. Aparecimento da banda K em aproximadamente 300 μs . Diferença de cada curva do controle com a fluorescência variável relativa normalizada na amplitude $F_j - F_0$. **19** a 500 (\blacktriangle) e **20** a 100 μM (\bullet). Cloroplastos quebrados incubados com 0.8 M Tris (\blacksquare) 232

Figura 2.19. Efeito dos compostos **12**, **13**, **59** e **65** sobre a síntese de ATP em cloroplastos de espinafre. A razão para o controle da síntese de ATP foi $4613 \mu\text{Mol ATP} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg Chl}^{-1}$ 234

Figura 2.20. Efeito dos compostos **12**, **13**, **59** e **65** sobre a o transporte de elétrons desacoplado em cloroplastos de espinafre. A razão para o controle foi de 1266 $\mu\text{equiv} \cdot \text{e}^{-} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg Chl}^{-1}$ 235

Figura 2.21. Aumento cinético da fluorescência de cloroplastos frescos, lisos e quebrados infiltrados com os compostos **12**, **13** e **65**, DCMU e tilacóides tratados

com Tris. Os controles dos cloroplastos são mostrados para comparação. Curvas de indução de fluorescência (Chl a) foram medidas a temperatura ambiente. Os dados são medias de três repetições 238

Figura 2.22. Efeito do composto **60** sobre a síntese de ATP (■), transporte de elétrons basal (●), fosforilante (▲) e desacoplado (▼) de H₂O a MV em cloroplastos de espinafre. A razão para o controle da síntese de ATP foi 1011 $\mu\text{Mol ATP} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg Chl}^{-1}$. E para o transporte de elétrons basal, fosforilante e desacoplado foram 311, 378 e 667 $\mu\text{equiv} \cdot \text{e}^{-} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg Chl}^{-1}$, respectivamente 241

Figura 2.23. Efeito do composto **61** sobre a síntese de ATP (■), transporte de elétrons basal (●), fosforilante (▲) e desacoplado (▼) de H₂O a MV em cloroplastos de espinafre. A razão para o controle da síntese de ATP foi 1610 $\mu\text{Mol ATP} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg Chl}^{-1}$. E para o transporte de elétrons basal, fosforilante e desacoplado foram 225, 325 e 463 $\mu\text{equiv} \cdot \text{e}^{-} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg Chl}^{-1}$, respectivamente 242

Figura 2.24. Aumento cinético da fluorescência de cloroplastos frescos, lisos e quebrados infiltrados com os compostos **60** e **61**, DCMU e tilacóides tratados com Tris. Os controles dos cloroplastos são mostrados para comparação. Curvas de indução de fluorescência (Chl a) foram medidas a temperatura ambiente. Os dados são medias de três repetições 244

Figura 2.25. Efeito do composto **67** sobre a síntese de ATP (■),

transporte de elétrons basal (●), fosforilante (▲) e desacoplado (▼) de H₂O a MV em cloroplastos de espinafre. A razão para o controle da síntese de ATP foi 2578 $\mu\text{Mol ATP} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg Chl}^{-1}$. E para o transporte de elétrons basal, fosforilante e desacoplado foram 467, 667 e 767 $\mu\text{equiv} \cdot \text{e}^{-} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg Chl}^{-1}$, respectivamente 246

Figura 2.26. Efeito dos compostos **25, 26, 29, 30 e 33** sobre a síntese de ATP em cloroplastos de espinafre. A razão para o controle da síntese de ATP foi 2264 $\mu\text{Mol ATP} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg Chl}^{-1}$ 248

Figura 2.27. Efeito dos compostos **25, 26, 29, 30 e 33** sobre a o transporte de elétrons desacoplado em cloroplastos de espinafre. A razão para o controle foi de 900 $\mu\text{equiv} \cdot \text{e}^{-} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg Chl}^{-1}$ 249

Figura 2.28. Aumento cinético da fluorescência de cloroplastos frescos, lisos e quebrados infiltrados com os compostos **25, 26, 30 e 33**, DCMU e tilacóides tratados com Tris. Os controles dos cloroplastos são mostrados para comparação. Curvas de indução de fluorescência (Chl a) foram medidas a temperatura ambiente. Os dados são medias de três repetições 253

Figura 2.29. Efeito dos compostos **23, 75, 98, 99 e 100** sobre a síntese de ATP em cloroplastos de espinafre. A razão para o controle da síntese de ATP foi 3080 $\mu\text{Mol ATP} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg Chl}^{-1}$ 256

Figura 2.30. Efeito dos compostos **89, 90, 95 e 97** sobre a síntese de ATP em cloroplastos de espinafre. A razão para o

- controle da síntese de ATP foi $1495 \mu\text{Mol ATP} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg Chl}^{-1}$ 256
- Figura 2.31. Efeito dos compostos **23**, **75**, **98**, **99** e **100** sobre a o transporte de elétrons desacoplado em cloroplastos de espinafre. A razão para o controle foi de $950 \mu\text{equiv} \cdot \text{e}^{-} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg Chl}^{-1}$ 257
- Figura 2.32. Efeito dos compostos **89**, **90**, **95** e **97** sobre a o transporte de elétrons desacoplado em cloroplastos de espinafre. A razão para o controle foi de $1050 \mu\text{equiv} \cdot \text{e}^{-} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg Chl}^{-1}$ 258
- Figura 2.33. Aumento cinético da fluorescência de cloroplastos frescos, lisos e quebrados infiltrados com os compostos **89**, **90**, **97** e **98**, DCMU e tilacóides tratados com Tris. Os controles dos cloroplastos são mostrados para comparação. Curvas de indução de fluorescência (Chl a) foram medidas a temperatura ambiente. Os dados são medias de três repetições 262
- Figura 2.34. Aumento cinético da fluorescência de cloroplastos frescos, lisos e quebrados infiltrados com os compostos **23**, **95**, **99** e **100**, DCMU e tilacóides tratados com Tris. Os controles dos cloroplastos são mostrados para comparação. Curvas de indução de fluorescência (Chl a) foram medidas a temperatura ambiente. Os dados são medias de três repetições 263

LISTA DE TABELAS E ESQUEMAS

CAPÍTULO I: Fitoquímica de *Raputia praetermissa* (RUTACEAE)

Tabela 1.1	Rendimento dos extratos brutos de <i>Raputia praetermissa</i>	14
Tabela 1.2	Dados de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) para os alcalóides 14 , 10 e 13 , em comparação com os dados registrados na literatura	35
Tabela 1.3	Dados de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) para os alcalóides 5 e 12 , em comparação com os dados registrados na literatura	36
Tabela 1.4	Dados de RMN ¹ H e ¹³ C das substâncias 9 , 11 e (11 , literatura)	49
Tabela 1.5	Dados de RMN ¹ H e ¹³ C da substância 8 em comparação com dados da literatura	64
Tabela 1.6	Dados de RMN ¹ H e ¹³ C para a substância 7 em comparação com dados registrados na literatura	79
Tabela 1.7	Dados dos espectros de RMN ¹ H e ¹³ C das substâncias 2 e 21 (CDCl ₃ , δ, 200 e 400 MHz) em comparação com dados de RMN ¹ H relatados na literatura para 2	90
Tabela 1.8	Dados de RMN ¹ H para a substância 19 em comparação com os dados da literatura	104
Tabela 1.9	Dados de RMN ¹³ C para a substância 19 em comparação com os dados da literatura	105
Tabela 1.10	Dados de RMN ¹³ C para a substância 15 em comparação com a literatura	113
Tabela 1.11	Dados de RMN ¹³ C da substância 1 em comparação com dados da literatura	120

Tabela 1.12	Dados dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C da substância 18 (CDCl_3 , 200 MHz) em comparação com a literatura (CDCl_3 , 400 MHz)	138
Tabela 1.13	Dados de RMN ^1H e ^{13}C (CDCl_3 , 400 e 100 MHz) para a substância 6	149
Esquema 1.1	Proposta de fragmentação de massas via IE para a substância 9	57
Esquema 1.2	Biosíntese de formação do anel indólico	58
Esquema 1.3	Proposta biogenética para a formação dos alcalóides 9 e 11	58

CAPÍTULO II: Busca por Candidatos a Herbicidas Inibidores da Fotossíntese a partir de Produtos Naturais

Tabela 2.1	Vendas, em bilhões de dólares, das sete grandes companhias de defensivos agrícolas em 2001	175
Tabela 2.2	Extratos e frações testadas nos ensaios de atividade fitotóxica	198
Tabela 2.3	Efeito de extratos e frações sobre a síntese de ATP	200
Tabela 2.4a	Efeito dos compostos puros sobre a síntese de ATP	201
Tabela 2.4b	Efeito dos compostos puros sobre a síntese de ATP	202
Tabela 2.4c	Efeito dos compostos puros sobre a síntese de ATP	202
Tabela 2.5	Valores de I_{50} para inibição da síntese de ATP para os compostos 14 , 17 , 51 , 70 , 76 , 78 e 83	204
Tabela 2.6	Efeito da siderina (71) sobre o transporte de electrons do FSII desacoplado de H_2O a DCPIP, e reações parciais do FSII, de H_2O a SiMo e de DPC a DCPIP	209
Tabela 2.7	Efeito do aumento da concentração do composto 71 sobre os parâmetros da fluorescência em tilacóides previamente incubados por 5 min no escuro e com 0.8	

	M Tris, pH 8,0	212
Tabela 2.8	Efeito da siderina (73) sobre o transporte de electrons do FSII de DPC a DCPIP	215
Tabela 2.9	Efeito do aumento da concentração do composto 73 sobre os parâmetros da fluorescência em tilacóides previamente incubados por 5 min no escuro e com 0.8 M Tris, pH 8,0	217
Tabela 2.10	Efeito de 73 sobre a membrana ligada ao tilacóide de H^+ -ATPase, sobre a atividade luminosa da membrana ligada de Mg^{2+} -ATPase e sobre a atividade de Ca^{2+} -ATPase aquecido do fator de acoplamento (CF1) de cloroplastos	218
Tabela 2.11	Efeito de 136 sobre o transporte de electrons do FSII desacoplado H_2O a DCPIP, e reações parciais do FSII, de H_2O a SiMo e de DPC a DCPIP	221
Tabela 2.12	Efeito de 136 sobre a membrana ligada a tilacóide (H^+ -ATPase), sobre a membrana ligada de luz ativada (Mg^{2+} -ATPase) e sobre a atividade aquecida (Ca^{2+} -ATPase) do fator de acoplamento purificado 1 (CF ₁) de cloroplastos	222
Tabela 2.13	Efeito de 20 sobre o transporte de electrons do FSI (TMQH ₂ a MV), FSII desacoplado H_2O a DCPIP, e reações parciais do FSII, de H_2O a SiMo e de DPC a DCPIP	229
Tabela 2.14	Efeito de 19 sobre a membrana ligada a tilacóide (H^+ -ATPase), sobre a membrana ligada de luz ativada (Mg^{2+} -ATPase) e sobre a atividade aquecida (Ca^{2+} -ATPase) do fator de acoplamento purificado 1 (CF ₁) de	

	cloroplastos	231
Tabela 2.15	Efeito do aumento da concentração dos compostos 19 e 20 sobre os parâmetros da fluorescência em tilacóides previamente incubados por 5 min no escuro e com 0.8 M Tris, pH 8,0	233
Tabela 2.16	Efeito dos compostos 12 , 13 , 59 e 65 sobre a o transporte de elétrons basal e fosforilante em cloroplastos de espinafre	236
Tabela 2.17	Efeito de 12 , 13 , 59 e 65 sobre o transporte de electrons do FSI (TMQH ₂ a MV), FSII desacoplado H ₂ O a DCPIP, e reações parciais do FSII, de H ₂ O a SiMo e de DPC a DCPIP	237
Tabela 2.18	Efeito do aumento da concentração dos compostos 12 , 13 e 65 sobre os parâmetros da fluorescência em tilacóides previamente incubados por 5 min no escuro e com 0.8 M Tris, pH 8,0	239
Tabela 2.19	Efeito de 60 e 61 sobre o transporte de electrons do FSI (TMQH ₂ a MV), FSII desacoplado H ₂ O a DCPIP, e reação parcial do FSII de DPC a DCPIP	243
Tabela 2.20	Efeito do aumento da concentração dos compostos 60 e 61 sobre os parâmetros da fluorescência em tilacóides previamente incubados por 5 min no escuro e com 0.8 M Tris, pH 8,0	245
Tabela 2.21	Efeito dos compostos 25 , 26 , 29 , 30 e 33 sobre a o transporte de elétrons basal e fosforilante em cloroplastos de espinafre	250
Tabela 2.22	Efeito de 25 , 26 , 30 e 33 sobre o transporte de electrons do FSI (TMQH ₂ a MV), FSII desacoplado H ₂ O a	

	DCPIP, e reações parciais do FSII, de H ₂ O a SiMo e de DPC a DCPIP	251
Tabela 2.23	Efeito de 29 sobre a membrana ligada a tilacóide (H ⁺ - ATPase), sobre a membrana ligada de luz ativada (Mg ²⁺ -ATPase) e sobre a atividade aquecida (Ca ²⁺ - ATPase) do fator de acoplamento purificado 1 (CF1) de cloroplastos	252
Tabela 2.24	Efeito do aumento da concentração dos compostos 25, 26, 30 e 33 sobre os parâmetros da fluorescência em tilacóides previamente incubados por 5 min no escuro e com 0.8 M Tris, pH 8,0	254
Tabela 2.25	Efeito de 75, 89, 90, 97 e 98 sobre o transporte de electrons do FSI (TMQH ₂ a MV), FSII desacoplado H ₂ O a DCPIP, e reações parciais do FSII, de H ₂ O a SiMo e de DPC a DCPIP	259
Tabela 2.26	Efeito de 23, 75, 95, 99 e 100 sobre a membrana ligada a tilacóide (H ⁺ -ATPase), sobre a membrana ligada de luz ativada (Mg ²⁺ -ATPase) e sobre a atividade aquecida (Ca ²⁺ -ATPase) do fator de acoplamento purificado 1 (CF1) de cloroplastos	261
Tabela 2.27	Efeito do aumento da concentração dos compostos 23, 89, 90, 95, 97, 98, 99 e 100 sobre os parâmetros da fluorescência em tilacóides previamente incubados por 5 min no escuro e com 0.8 M Tris, pH 8,0	264
Esquema	Representação da simulação <i>in vitro</i> do processo	
2.1	fotossintético	185

SUMÁRIO

CAPÍTULO I: Fitoquímica de *Raputia praetermissa* (RUTACEAE)

1.	Introdução	03
1.1.	A família Rutaceae	03
1.2.	Características químicas e morfológicas da espécie estudada	06
2.	Objetivos	11
3.	Experimental	13
3.1.	Coleta do Material Botânico	13
3.2.	Preparação dos Extratos	13
3.3.	Fracionamento dos Extratos do Caule de <i>Raputia praetermissa</i>	15
3.3.1.	Estudo químico do extrato hexânico do caule de <i>R. praetermissa</i> (Rutaceae)	15
3.3.2.	Estudo químico do extrato DCM do caule de <i>R. praetermissa</i> (Rutaceae)	17
3.4.	Fracionamento dos Extratos das Folhas de <i>Raputia praetermissa</i>	19
3.4.1.	Estudo químico do extrato DCM das folhas de <i>R. praetermissa</i> (Rutaceae)	19
3.5.	Fracionamento dos Extratos das Raízes de <i>Raputia praetermissa</i>	21
3.5.1.	Estudo químico do extrato DCM das raízes de <i>R. praetermissa</i> (Rutaceae)	21
3.6.	Materiais e Equipamentos	23
3.6.1.	Suportes para Cromatografia	23
3.6.2.	Solventes (Prosint Química S.A.) destilados no Departamento de Química	

	da UFSCar	23
3.6.3.	Solventes deuterados (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.)	24
3.6.4.	Solventes grau cromatográfico (Tedia Brasil)	24
3.6.5.	Reveladores cromatográficos e outros aparatos	24
3.6.6.	Equipamentos	25
4.	Resultados e Discussões	27
4.1.	Substâncias isoladas	27
4.2.	Determinação estrutural	32
4.2.1.	<i>Alcalóides</i>	32
4.2.1.1.	Determinação estrutural dos alcalóides furoquinolínicos	32
4.2.1.2.	Determinação das substâncias dictamina (14), robustina (10), evolitrina (13), esquimianina (5) e maculosidina (12)	33
4.2.1.3.	Determinação estrutural dos alcalóides indólicos	41
4.2.1.4.	Determinação estrutural das substâncias 9 e 11	41
4.2.1.5.	Determinação estrutural da substância 8	59
4.2.1.6.	Determinação estrutural da substância 7	70
4.2.1.7.	Determinação estrutural dos alcalóides quinolônicos	85
4.2.1.8.	Identificação das substâncias 2 e 20	85
4.2.2.	Determinação estrutural dos esteróides,	

	terpenos e limonóide	96
4.2.2.1.	Misturas de esteróides 3 e substância 4	96
4.2.2.2.	Determinação estrutural da substância 19	100
4.2.2.3.	Determinação estrutural da substância 15	110
4.2.2.4.	Determinação estrutural da substância 1	118
4.2.2.5.	Determinação estrutural da substância 16	122
4.2.2.6.	Determinação estrutural da substância 18	132
4.2.3.	Determinação estrutural do derivado do ácido cinâmico	144
4.2.3.1.	Determinação estrutural da substância 6	144
5.	Conclusões	155
6.	Referências bibliográficas	159

CAPÍTULO II: Busca por Candidatos a Herbicidas Inibidores da Fotossíntese a partir de Produtos Naturais

1.	Introdução	167
1.1.	Os Herbicidas e a Fotossíntese	169
1.2.	A Descoberta de um herbicida e o mercado	172
2.	Justificativas	177
3.	Objetivos	179
4.	Materiais e Métodos	179
4.1.	Avaliação da fitotoxicidade sobre a síntese de ATP, fluxo de elétrons durante a fase luminosa da fotossíntese em cloroplastos isolados das folhas de espinafre	179
4.2.	Determinação do fluxo de elétrons nos fotossistemas II e I (FSII e FSI) desacoplados	182

4.3.	Estudos da fluorescência da clorofila <i>a</i> (Chl <i>a</i>)	182
4.4.	Ensaio com o complexo H ⁺ -ATPase dependente dos íons Mg ²⁺ e Ca ²⁺	183
4.4.1.	Determinação do efeito dos compostos testados sobre a atividade Ca ²⁺ -ATPase de CF1 isolado	183
4.5.	Substâncias ensaiadas	184
5.	Resultados	199
5.1.	Inibição da Síntese de ATP	199
5.2.	Efeito dos extratos e das frações de extrato sobre a síntese de ATP em cloroplastos isolados das folhas de espinafre	199
5.3.	Avaliação dos compostos puros sobre a síntese de ATP em cloroplastos isolados das folhas de espinafre	200
5.4.	Substâncias não ativas	201
5.5.	Substâncias ativas	203
5.5.1.	Efeito do composto 71 sobre a síntese de ATP	205
5.5.1.1.	Elucidação do mecanismo de ação do composto 71	206
5.5.1.2.	Localização da siderina (71) nos ambientes de interação do fotossistema II e reações parciais	208
5.5.1.3.	Efeito do composto 71 sobre a Fluorescência (Chl <i>a</i>)	209
5.5.2.	Efeito do composto 73 sobre a síntese de	

	ATP	213
5.5.2.1.	Elucidação do mecanismo de ação do composto 73	214
5.5.2.2.	Localização da Cedrelona A (73) nos ambientes de interação do fotossistema II e reações parciais	215
5.5.2.3.	Efeito do composto 73 sobre a Fluorescência (Chl a)	215
5.5.2.4.	Efeito da Cedrelona A (73) sobre o complexo H ⁺ - ATPase	217
5.5.3.	Efeito do composto 136 sobre a síntese de ATP	218
5.5.3.1.	Elucidação do mecanismo de ação do composto 136	219
5.5.3.2.	Localização da Lasiodiplodina 136 no sítio de interação do FSII e reações parciais	220
5.5.3.3.	Efeito de 136 sobre as atividades dependentes das membranes ligadas de H ⁺ -, Mg ²⁺ - e Ca ²⁺ - ATPases	221
5.5.4.	Caracterização do mecanismo de ação dos flavonóides 09 e 54	223
5.5.4.1.	Elucidação do mecanismo de ação dos compostos 09 e 54	223
5.5.5.	Caracterização do mecanismo de ação dos compostos 19 e 20	226
5.5.5.1.	Elucidação do mecanismo de ação dos compostos 19 e 20	226

5.5.5.2.	Localização dos compostos 19 e 20 no sítio de interação do FSII, FSI e suas respectivas reações parciais	228
5.5.5.3.	Efeito de 19 sobre as atividades dependentes das membranes ligadas de H ⁺ -, Mg ²⁺ - e Ca ²⁺ - ATPases	229
5.5.5.4.	Efeito dos compostos 19 e 20 sobre a Fluorescência (Chl a)	231
5.5.6.	Caracterização do mecanismo de ação dos compostos 12 , 13 , 59 e 65	233
5.5.6.1.	Elucidação do mecanismo de ação dos compostos 12 , 13 , 59 e 65	234
5.5.6.2.	Localização dos compostos 12 , 13 , 59 e 65 no sítio de interação do FSII, FSI e suas respectivas reações parciais	236
5.5.6.3.	Efeito dos alcalóides furoquinolínicos (12 , 13 , 59 e 65) sobre a Fluorescência (Chl a)	238
5.5.7.	Caracterização do mecanismo de ação dos compostos 60 e 61	240
5.5.7.1.	Elucidação do mecanismo de ação dos compostos 60 e 61	240
5.5.7.2.	Localização dos compostos 60 e 61 no sítio de interação do FSII, FSI e suas respectivas reações parciais	242
5.5.7.3.	Efeito dos alcalóides quinolônicos (60 e 61) sobre a Fluorescência (Chl a)	244
5.5.8.	Caracterização do mecanismo de ação do composto 67	245

5.5.9.	Caracterização do mecanismo de ação dos alcalóides acridônicos 25, 26, 29, 30 e 33	247
5.5.9.1.	Elucidação do mecanismo de ação dos compostos 25, 26, 29, 30 e 33	248
5.5.9.2.	Localização dos compostos 25, 26, 29, 30 e 33 no sítio de interação do FSII, FSI e suas respectivas reações parciais	250
5.5.9.3.	Efeito de 29 sobre as atividades dependentes das membranas ligadas de H ⁺ -, Mg ²⁺ - e Ca ²⁺ - ATPases	252
5.5.9.4.	Efeito dos alcalóides acridônicos (25, 26, 29, 30 e 33) sobre a Fluorescência (Chl a)	253
5.5.10.	Caracterização do mecanismo de ação dos triterpenos 23, 75, 89, 90, 95, 97, 98, 99 e 100	255
5.5.10.1.	Elucidação do mecanismo de ação dos compostos 23, 75, 89, 90, 95, 97, 98, 99 e 100	257
5.5.10.2.	Localização dos compostos 23, 75, 89, 90, 95, 97, 98, 99 e 100 no sítio de interação do FSII, FSI e suas respectivas reações parciais	258
5.5.10.3.	Efeito dos triterpenos 23, 75, 95, 99 e 100 sobre as atividades dependentes das membranas ligadas de H ⁺ -, Mg ²⁺ - e Ca ²⁺ - ATPases	260
5.5.10.4.	Efeito dos triterpenos (23, 89, 90, 95, 97, 98, 99 e 100) sobre a Fluorescência (Chl a)	262

6.	Conclusões	267
7.	Referências bibliográficas	271

Capítulo I:

Fitoquímica de *Raputia praetermissa* (Rutaceae)

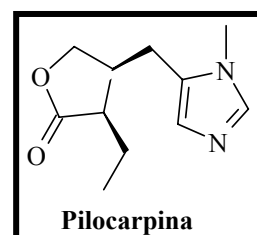
1. Introdução

1.1. A família Rutaceae

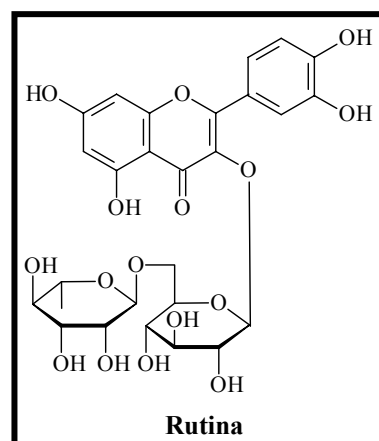
A ordem Sapindales (nova denominação de Rutales) sensu Stevens é formada pelas seguintes famílias de plantas: Anacardiaceae, Bierbersteiniaceae, Burseraceae, Kirkiaceae, Meliaceae, Nitrareaceae, Rutaceae, Sapindaceae e Simariubaceae (Stevens, 2003). O grupo de Produtos Naturais do Depto. de Química/UFSCar já vem estudando há alguns anos dentre outras, plantas pertencentes principalmente às famílias Meliaceae, Simaroubaceae e Rutaceae. Sendo assim, foi escolhida como objeto de trabalho para o desenvolvimento desta tese uma espécie pertencente às rutáceas. Dentro da ordem, Rutaceae está agrupada com as demais famílias devido a algumas características comuns: ausência de dutos de resina no tronco, as ranhuras da madeira, as nervuras das folhas e ainda devido a presença de metabólitos secundários característicos (Cronquist, 1988). As rutáceas podem ser diferenciadas das demais famílias através dos seguintes fatores: folhas glandulares, produção de limonóides e a usual presença de óleos aromáticos no perênquima e pericarpo das cavidades secretoras (Chase *et al.*, 1999).

Família essencialmente pantropical, com cerca de 150 gêneros e 1600 espécies, principalmente abundante nos trópicos e subtropicais. Na região neotropical ocorrem cerca de 52 gêneros e no Brasil 32 nativos, sendo centros de diversidade a floresta Atlântica e a Amazônia. Na reserva Ducke (Manaus – AM), está representada por 10 espécies em 7 gêneros (Pirani, 2005).

As rutáceas apresentam inúmeros representantes de interesse medicinal (Abaul *et al.*, 1994; Menezes e Menezes, 1987), como ocorre no gênero *Pilocarpus* (jaborandi) que fornece, dentre outros metabólitos, o alcalóide **pilocarpina** empregado no tratamento da calvície e glaucoma. Pode-se citar ainda a arruda

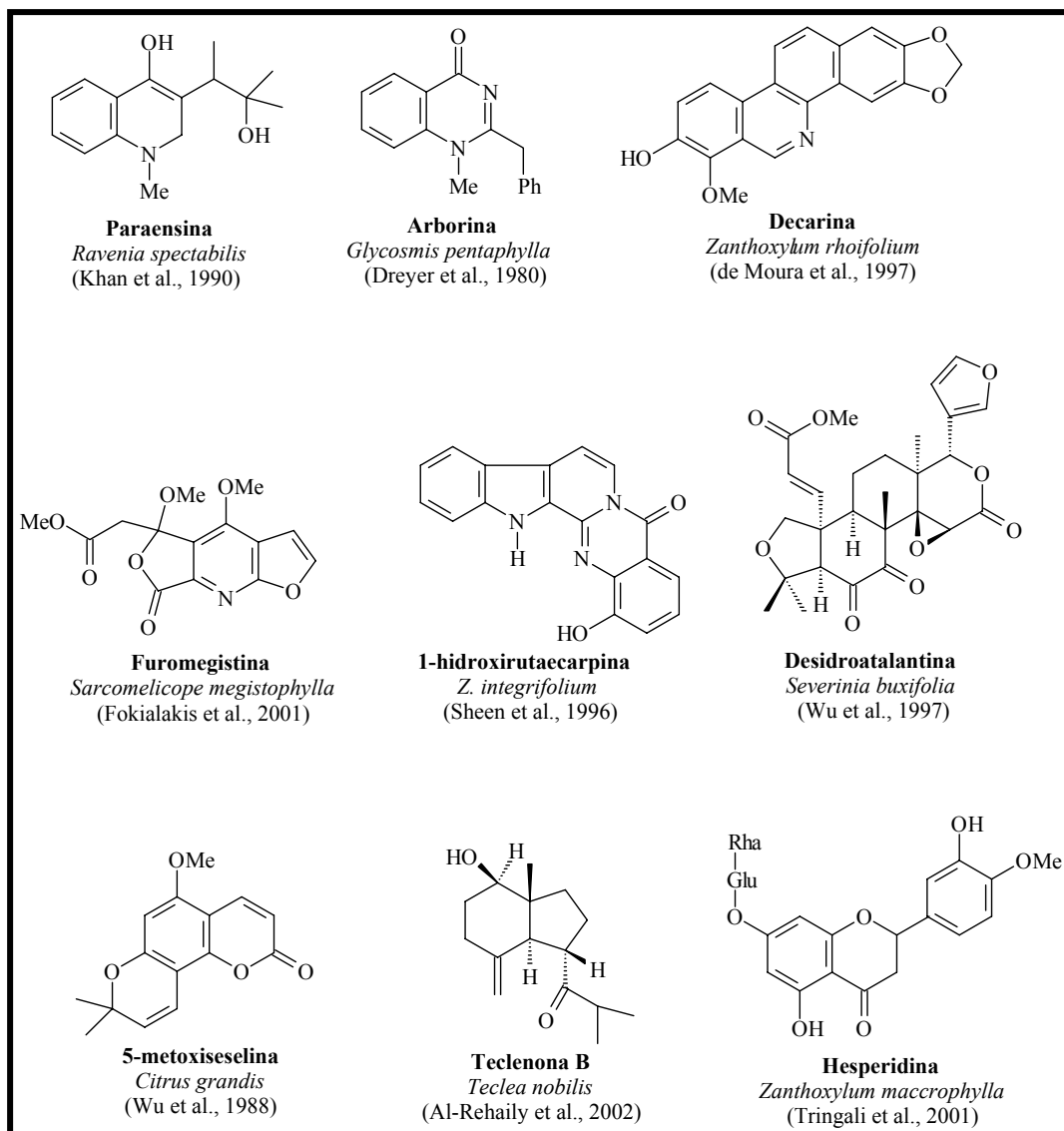


(*Ruta graveolens*), que possui como princípio ativo o flavonóide **rutina** (também conhecido como Vitamina P). Em outras espécies deste gênero, as cascas das raízes são muito utilizadas como vermífugo. A casca do tronco de *Esenbeckia febrifuga* é utilizada em substituição à quinina no tratamento de febres (Menezes e Menezes, 1987). As plantas desta família ainda apresentam muitos membros com significativa importância



econômica. As espécies do gênero *Citrus* produzem diversos tipos de frutas cítricas (laranja, limão, tangerina, etc.) e os seus óleos essenciais são usados na indústria de cosméticos. Espécies de *Boronia*, *Choisya*, *Poncirus* e *Skimmia* são usadas como plantas ornamentais (Chase *et al.*, 1999). Esta família caracteriza-se ainda pelo elevado grau de diversidade de metabólitos secundários encontrados nas espécies que constituem a mesma. São produzidos vários tipos de alcalóides (derivados da fenilalanina, tirosina, triptofano, ácido antranílico, histidina, etc), cumarinas, flavonóides, terpenóides e limonóides (Waterman, 1999), alguns exemplos podem ser visualizados no quadro 1.

Quadro 1. Metabólitos secundários encontrados em espécies pertencentes às rutáceas.



1.2. Características químicas e morfológicas da espécie estudada.

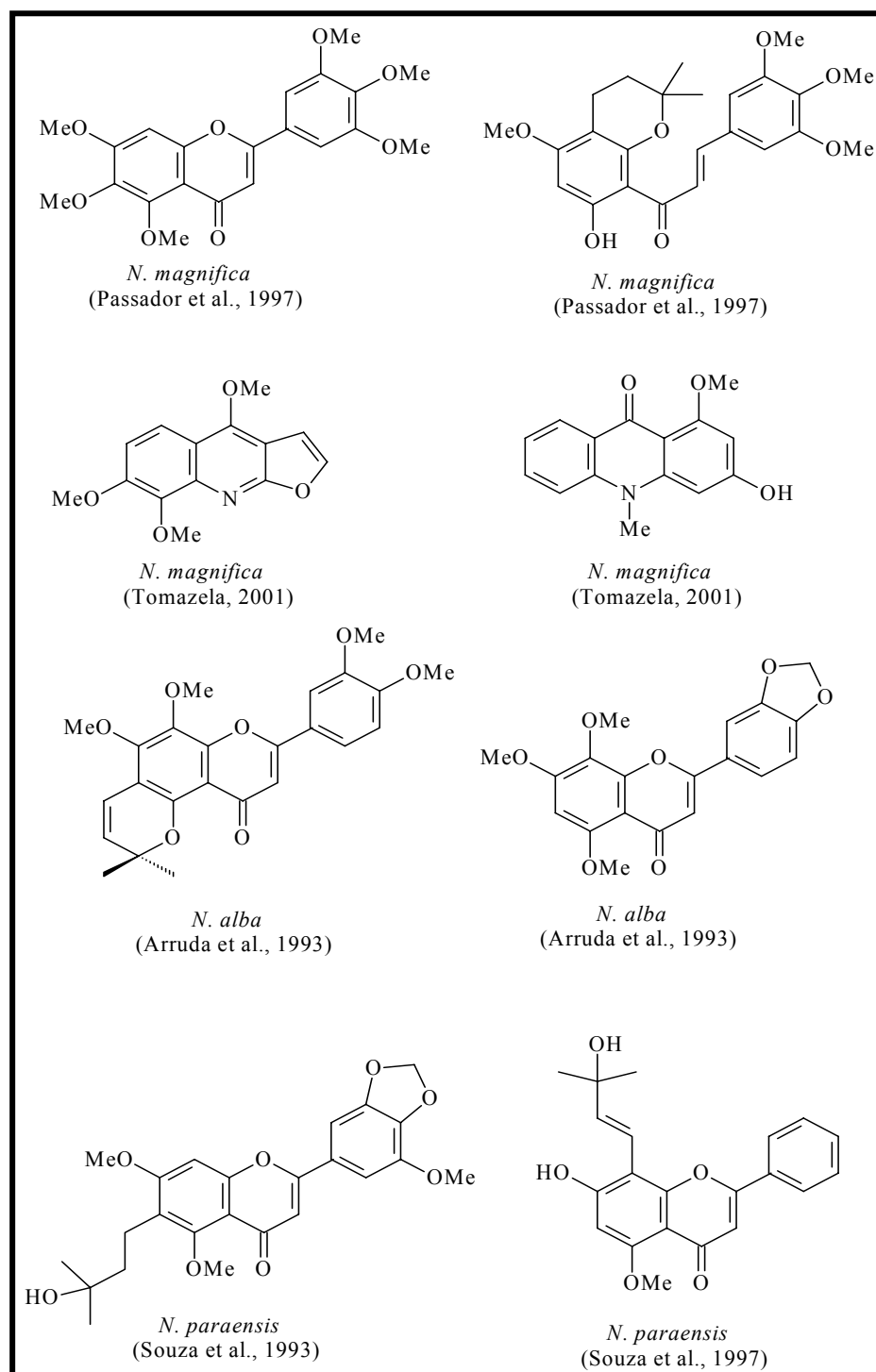
Com o intuito de se estabelecer uma continuidade no estudo de plantas pertencentes à família Rutaceae decidiu-se realizar o estudo da espécie *Raputia praetermissa*, principalmente por se tratar de uma espécie que nunca foi estudada sob o ponto de vista químico. O gênero *Raputia* foi estabelecido em 1775 por Aublet, que se baseou nas características morfológicas de *R. aromatica* Aubl. (Kalunki, 1990). Num trabalho de 1978, Emmerich observou diferenças morfológicas entre as espécies que até então constituíam o gênero em questão. Esta pesquisadora considerou como padrão de comparação a espécie *R. aromatica* Aubl., e adotou as flores das espécies como caracteres morfológicos fundamentais para organização do “complexo *Raputia*”. As constatações observadas originaram quatro gêneros: *Raputia*, *Neoraputia*, *Raputiarana* e *Sigmatanthus* (Kallunki, 1994).

O grupo de Produtos Naturais do DQ/UFSCar já estudou algumas espécies do gênero *Neoraputia*, como por exemplo *N. magnifica* (Passador *et al.*, 1997; Tomazela, 2001), *N. alba* (Arruda *et al.*, 1991 e 1993) e *N. paraensis* (Souza *et al.*, 1999), das quais foram isolados e identificados, principalmente: flavonóides e alcalóides comuns na família Rutaceae, como podem ser vistos no quadro 2.

Algumas características morfológicas do gênero *Raputia* são: arbustos ou arvoretas, possui folhas opostas, 1-3-folioladas, pecioladas, lâmina inteira (destituída de divisões), cartácea (consistência de papel) a coriácea (folhas rígidas). Inflorescências em racemos circinados, flores bissexuadas, fruto esquizocarpo (frutos secos cujos carpelos se separam na maturação) constituído por 1-5 mericarpos do tipo folículo e semente testa lisa, embrião curvo e cotilédones conduplicados (Pirani, 2005). Este gênero possui onze espécies predominantemente amazônicas, sendo apenas três de áreas fora da Bacia Amazônica (uma na tribo dos Tepuis na Venezuela, duas da Bacia do Rio Oiapoque, na Guiana Francesa e no Amapá). Esta classificação foi revisada por

Kallunki (1994), mas a espécie presente (*R. praetermissa*) na Reserva Ducke (Manaus – AM) é nova para a Ciência.

Quadro 2. Metabólitos secundários encontrados em algumas espécies do gênero *Neoraputia*.



A espécie *Raputia praetermissa* é nativa da Amazônia e foi recentemente descoberta. É um arbusto ou arvoreta delgada com folhas opostas-cruzadas, pecíolos escurecidos, lâmina elíptica coriácea (Figura 1.1). Trata-se de uma espécie rara, conhecida somente na coleção-tipo da Reserva Ducke (Pirani, 2005; Ribeiro et al., 1999). O grupo de PN da UFSCar já realizou o estudo fitoquímico das raízes de *R. praetermissa*, tendo isolado e identificado uma variedade de classes de metabólitos secundários como: alcalóides, limonóides, terpenóides e esteróides (Rosas, 2005), dos quais alguns destes são mostrados no quadro 3.

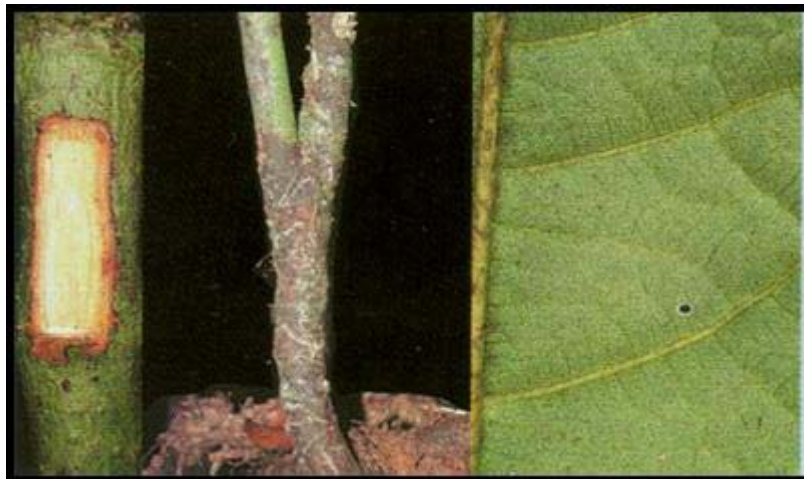
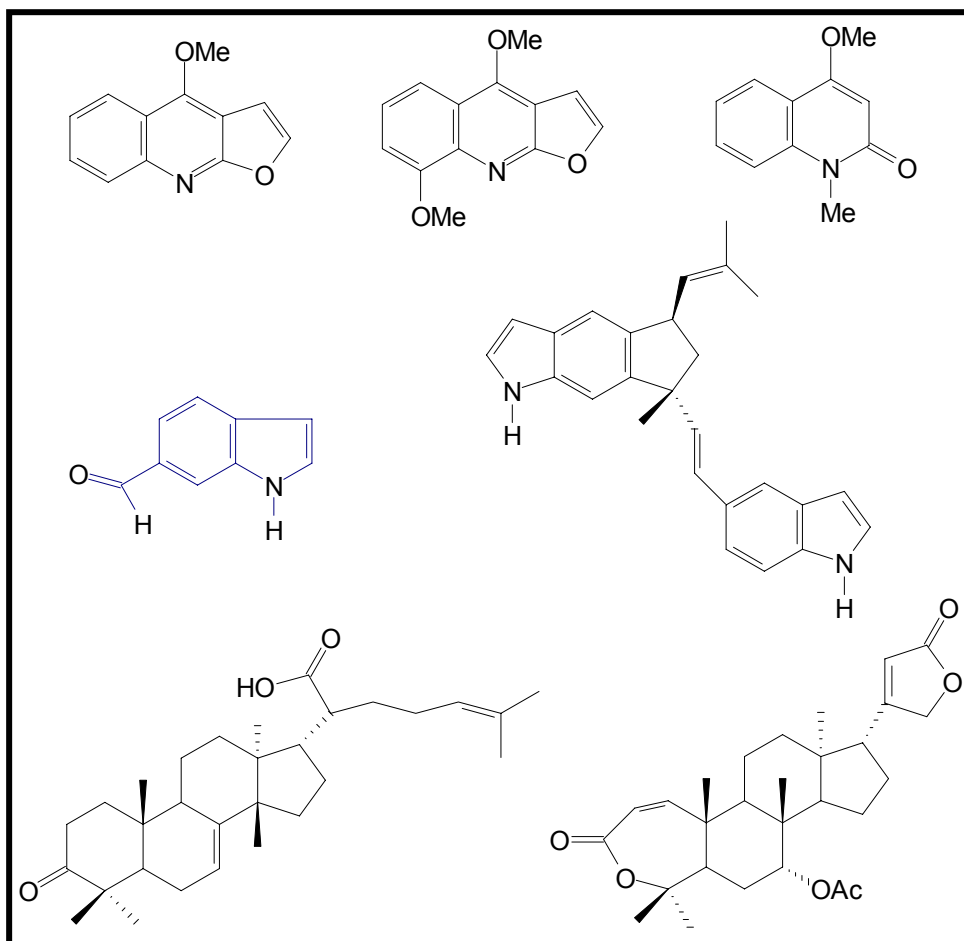


Figura 1.1. Espécie *Raputia praetermissa*. Recortes do livro: Flora da Reserva Ducke (cedidos pelos autores, Ribeiro et al., 1999).

Quadro 3. Algumas substâncias isoladas a partir das raízes de *Raputia praetermissa* (Rutaceae).



2. Objetivos

O gênero *Raputia* não apresenta relatos na literatura sob o ponto de vista químico e/ou biológico. Com base nestas informações decidiu-se realizar o estudo químico da espécie *R. praetermissa* (Rutaceae), com o objetivo de se encontrar metabólitos secundários que possam ser utilizados para a confirmação do posicionamento quimiosistemático do referido gênero. A partir dos metabólitos isolados e identificados, se estabelecer uma contribuição para o entendimento da segregação entre os gêneros *Raputia* e *Neoraputia*, que foi estabelecida por Emmerich em 1978, através da criação do “complexo” *Raputia*.

3. Experimental

3.1. Coleta do Material Botânico

O material foi obtido na Reserva Florestal Ducke–INPA, situada no km 26 da estrada Manaus–Itacoatiara. A coleta foi realizada em Latitude 2° 53’ S, Longitude 59° 58’ E, próximo ao Igarapé do Tinga. Foram coletadas raízes, caules e folhas de *Raputia praetermissa* em Janeiro de 2001. A exsicata estéril foi identificada por comparação com a exsicata INPA: 189865, pela botânica Maria de Fátima Figueiredo Melo do INPA (Instituto Nacional de Pesquisa do Amazonas).

3.2. Preparação dos Extratos

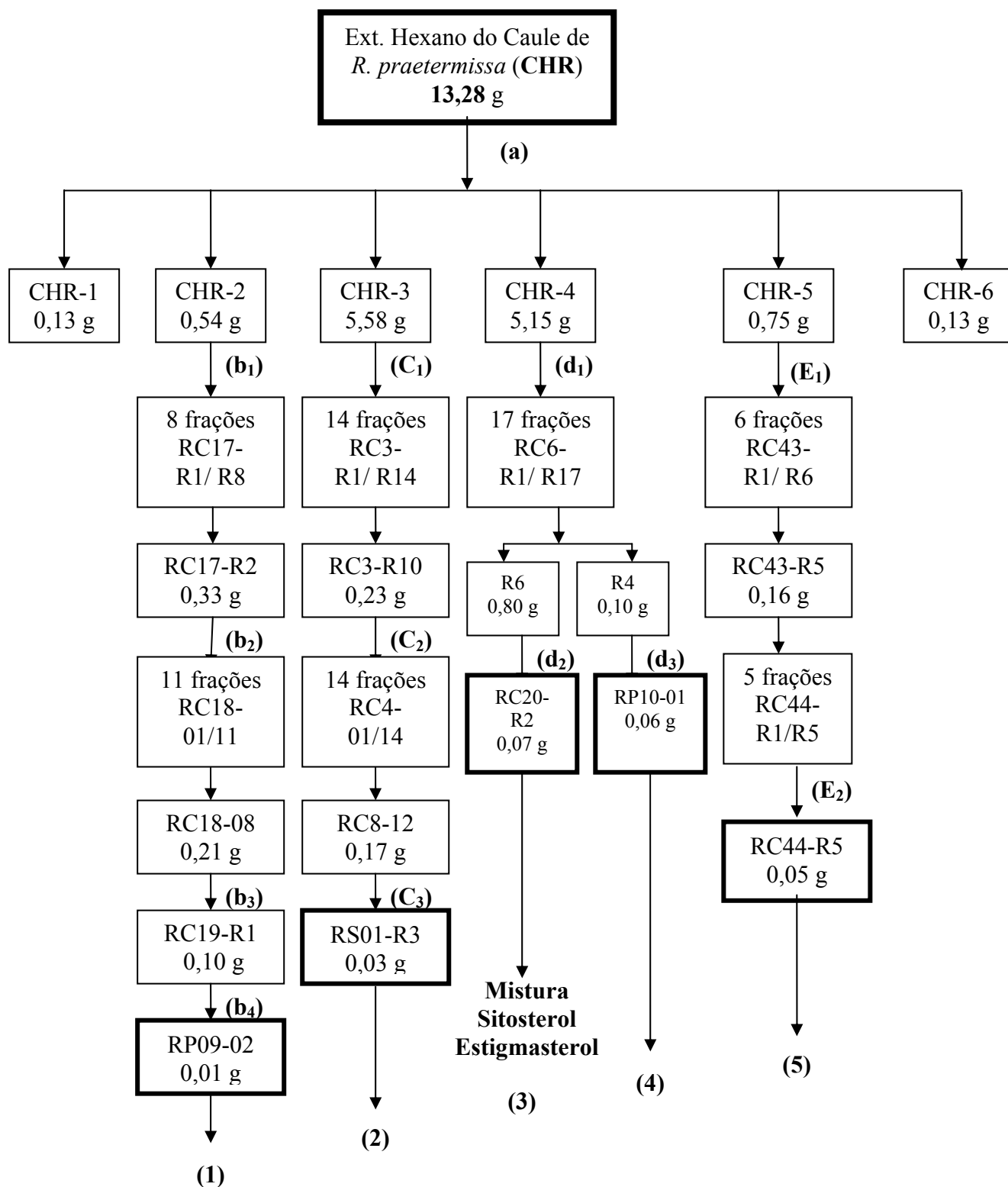
As amostras coletadas foram limpas, separadas em partes: raízes, caule e folhas; desidratadas à temperatura ambiente (28 °C) e, em seguida, moídas. Na preparação dos extratos da raiz, caule e folhas de *Raputia praetermissa* utilizou-se 1,74 kg, 4,40 kg e 0,59 kg do material seco, respectivamente. Foram extraídos com os solventes hexano, diclorometano, metanol e hidrometanólico [água/metanol (1:1 v/v)], em ordem crescente de polaridade, durante três dias, três vezes consecutivas para cada solvente (Tabela 1.1).

Tabela 1.1. Rendimento dos extratos brutos de *Raputia praetermissa*.

Material coletado	Massa seca (kg)	Extratos obtidos (gramas)			
		Hexano	Diclorometano	Metanol	Hidrometanólico (1:1 v/v)
Raízes	1,74	7,40	38,00	25,31	14,37
Caule	4,40	13,52	84,19	81,49	-
Folhas	0,59	4,45	23,70	20,40	-

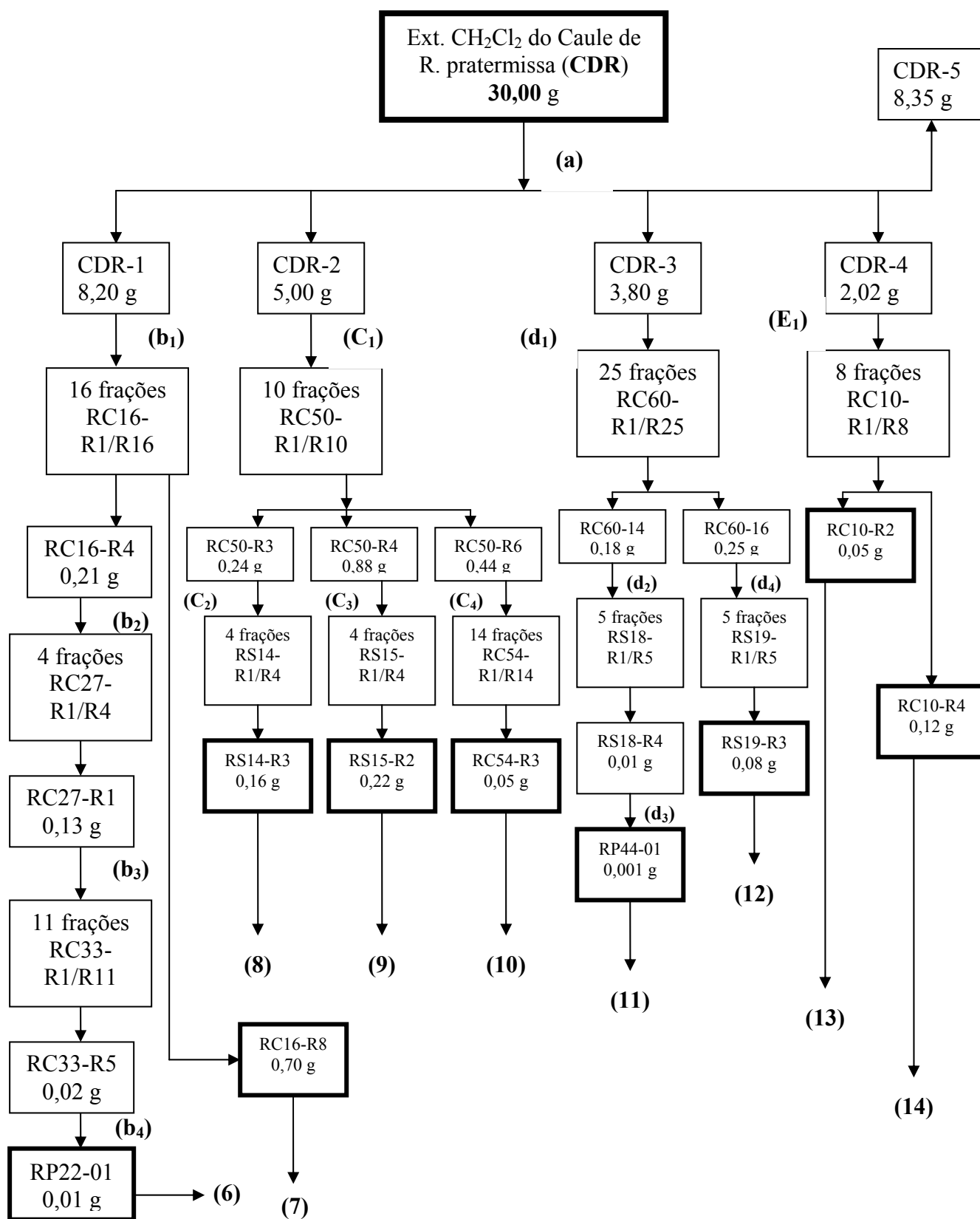
3.3. Fracionamento dos Extratos do Caule de *Raputia praetermissa*.

3.3.1. Estudo químico do extrato hexânico do caule de *R. praetermissa* (Rutaceae).



- (a) CC, $\theta \times h = 4,0 \times 20,0$ cm, sílica gel 60 (230 – 400 mesh), eluentes: Hexano; Hexano: DCM (1:1 v/v); DCM; AcOEt; AcOEt:MeOH (1:1 v/v) e MeOH.
- (b₁) CC, $\theta \times h = 3,0 \times 20,0$ cm, sílica gel 60 (230 – 400 mesh), eluentes: Hexano; Hexano: Acetona (7:1 v/v); Hexano: Acetona (6:1 v/v); Hexano: Acetona (4:1 v/v); Hexano: Acetona (2:1 v/v); Hexano: Acetona (1:1 v/v); Acetona e MeOH.
- (b₂) CC, $\theta \times h = 4,0 \times 15,0$ cm, sílica gel 60 (230 – 400 mesh), eluentes: Hexano; Hexano: Acetona (7:1 v/v); Hexano: Acetona (5:1 v/v); Hexano: Acetona (3:1 v/v); Hexano: Acetona (2:1 v/v); Hexano: Acetona (1:1 v/v); Acetona e MeOH.
- (b₃) CC, $\theta \times h = 1,5 \times 12,0$ cm, sílica gel 60 (230 – 400 mesh), eluentes: Hexano; Hexano; Hexano: Acetona (7:1 v/v); Hexano: Acetona (5:1 v/v); Hexano: Acetona (2:1 v/v); Hexano: Acetona (1:1 v/v); e Acetona.
- (b₄) CCDP; 1,0 mm, 20 x 20 cm, eluentes: Hexano:Acetona (9:1 v/v), resultando em 2 frações.
- (C₁) CC, $\theta \times h = 4,0 \times 90,0$ cm, sílica gel 60 (230 – 400 mesh), eluentes: Hexano; Hexano: AcOEt (9:1 v/v); Hexano: AcOEt (7:1 v/v); Hexano: AcOEt (4:1 v/v); Hexano: AcOEt (2:1 v/v); Hexano: AcOEt (1:1 v/v); Hexano: AcOEt (1:4 v/v); AcOEt e MeOH.
- (C₂) CC, $\theta \times h = 3,0 \times 70,0$ cm, sílica gel 60 + Florisil (1:1 m/m), eluentes: Hexano; Hexano: AcOEt (6:1 v/v); Hexano: AcOEt (3:1 v/v); Hexano: AcOEt (3:2 v/v); Hexano: AcOEt (1:1 v/v); AcOEt e MeOH.
- (C₃) Sephadex LH-20, eluentes: DCM:MeOH (2:8 v/v), resultando em cinco frações.
- (d₁) CC, $\theta \times h = 4,0 \times 90,0$ cm, sílica gel 60 + Florisil (2:1 m/m), eluentes: Hexano; Hexano: AcOEt (9:1 v/v); Hexano: AcOEt (6:1 v/v); Hexano: AcOEt (3:1 v/v); Hexano: AcOEt (2:1 v/v); Hexano: AcOEt (1:1 v/v); AcOEt e MeOH.
- (d₂) CC, $\theta \times h = 3,0 \times 15,0$ cm, sílica gel 60 (230 – 400 mesh), eluentes: Hexano; Hexano: Acetona (9:1 v/v); Hexano: Acetona (6:1 v/v); Hexano: Acetona (4:1 v/v); Hexano: Acetona (2:1 v/v) e Acetona.
- (d₃) CCDP; 1,0 mm, 20 x 20 cm, eluentes: Hexano:Acetona (9:1 v/v), resultando em três frações.
- (E₁) CC, $\theta \times h = 3,0 \times 19,0$ cm, sílica gel 60 (230 – 400 mesh), eluentes: Hexano; Hexano: DCM (9:1 v/v); Hexano: DCM (6:1 v/v); Hexano: DCM (4:1 v/v); Hexano: DCM (3:1 v/v); Hexano: DCM (2:1 v/v); Hexano: DCM (1:1 v/v); DCM; Acetona e MeOH.
- (E₂) CC, $\theta \times h = 2,5 \times 16,0$ cm, sílica gel 60 + Florisil (3:1 m/m), eluentes: Hexano; Hexano: DCM (5:1 v/v); Hexano: DCM (4:1 v/v); Hexano: DCM (3:1 v/v); Hexano: DCM (2:1 v/v); Hexano: DCM (1:1 v/v); DCM; Acetona e MeOH.

3.3.2. Estudo químico do extrato DCM do caule de *R. praetermissa* (Rutaceae).



(a) CF, $\theta \times h = 8,0 \times 25,0$ cm, sílica gel 60 (230 – 400 mesh), eluentes: Hexano; DCM; AcOEt; AcOEt:MeOH (1:1 v/v) e MeOH.

(b₁) CC, $\theta \times h = 5,5 \times 24,0$ cm, sílica gel 60 (230 – 400 mesh), eluentes: Hexano; Hexano: Acetona (9:1 v/v); Hexano: Acetona (7:1 v/v); Hexano: Acetona (6:1 v/v); Hexano: Acetona (4:1 v/v); Hexano: Acetona (2:1 v/v); Hexano:Acetona (1;1 v/v); Acetona e MeOH.

(b₂) CC, $\theta \times h = 3,0 \times 10,0$ cm, sílica gel 60 (230 – 400 mesh), eluentes: Hexano; Hexano: Acetona (7:1 v/v); Hexano: Acetona (6:1 v/v); Hexano: Acetona (4:1 v/v); Hexano: Acetona (3:1 v/v); Hexano: Acetona (2:1 v/v); Hexano: Acetona (1:1 v/v) e Acetona.

(b₃) CC, $\theta \times h = 2,0 \times 15,0$ cm, sílica gel 60 (230 – 400 mesh), eluentes: Hexano; Hexano: DCM (9:1 v/v); Hexano: DCM (7:1 v/v); Hexano: DCM (4:1 v/v); Hexano: DCM (2:1 v/v); Hexano: DCM (1:1 v/v); DCM e Acetona.

(b₄) CCDP; 1,0 mm, 20 x 20 cm, eluentes: Hexano:Acetona (6:1 v/v), resultando em 4 frações.

(C₁) CC, $\theta \times h = 6,0 \times 20,0$ cm, sílica gel 60 + Florisil 200 mesh (4:1 m/m), eluentes: Hexano; Hexano: Acetona (9:1 v/v); Hexano: Acetona (8:1 v/v); Hexano: Acetona (7:1 v/v); Hexano: Acetona (5:1 v/v); Hexano: Acetona (4:1 v/v); Hexano: Acetona (3:1 v/v); Hexano: Acetona (1:1 v/v); Acetona e MeOH.

(C₂) Sephadex LH-20, eluentes: MeOH, resultando em cinco frações.

(C₃) Sephadex LH-20, eluentes: MeOH, resultando em quatro frações.

(C₃) CC, $\theta \times h = 2,5 \times 25,0$ cm, sílica gel 60, eluentes: Hexano; Hexano: DCM (3:1 v/v); Hexano: DCM (2:1 v/v); Hexano: DCM (1:1 v/v); Hexano: DCM (1:2 v/v); Hexano: DCM (1:3 v/v); Hexano: Acetona (3:1 v/v); Hexano: Acetona (1:1 v/v); Acetona e MeOH.

(d₁) CC, $\theta \times h = 4,0 \times 27,0$ cm, sílica gel 60, eluentes: Hexano; Hexano: DCM (2:1 v/v); Hexano: DCM (1:1 v/v); Hexano: DCM (1:2 v/v); Hexano: DCM (1:4 v/v); Hexano: DCM (1:9 v/v); DCM e MeOH.

(d₂) Sephadex LH-20, eluentes: MeOH:DCM (2:8 v/v), resultando em cinco frações.

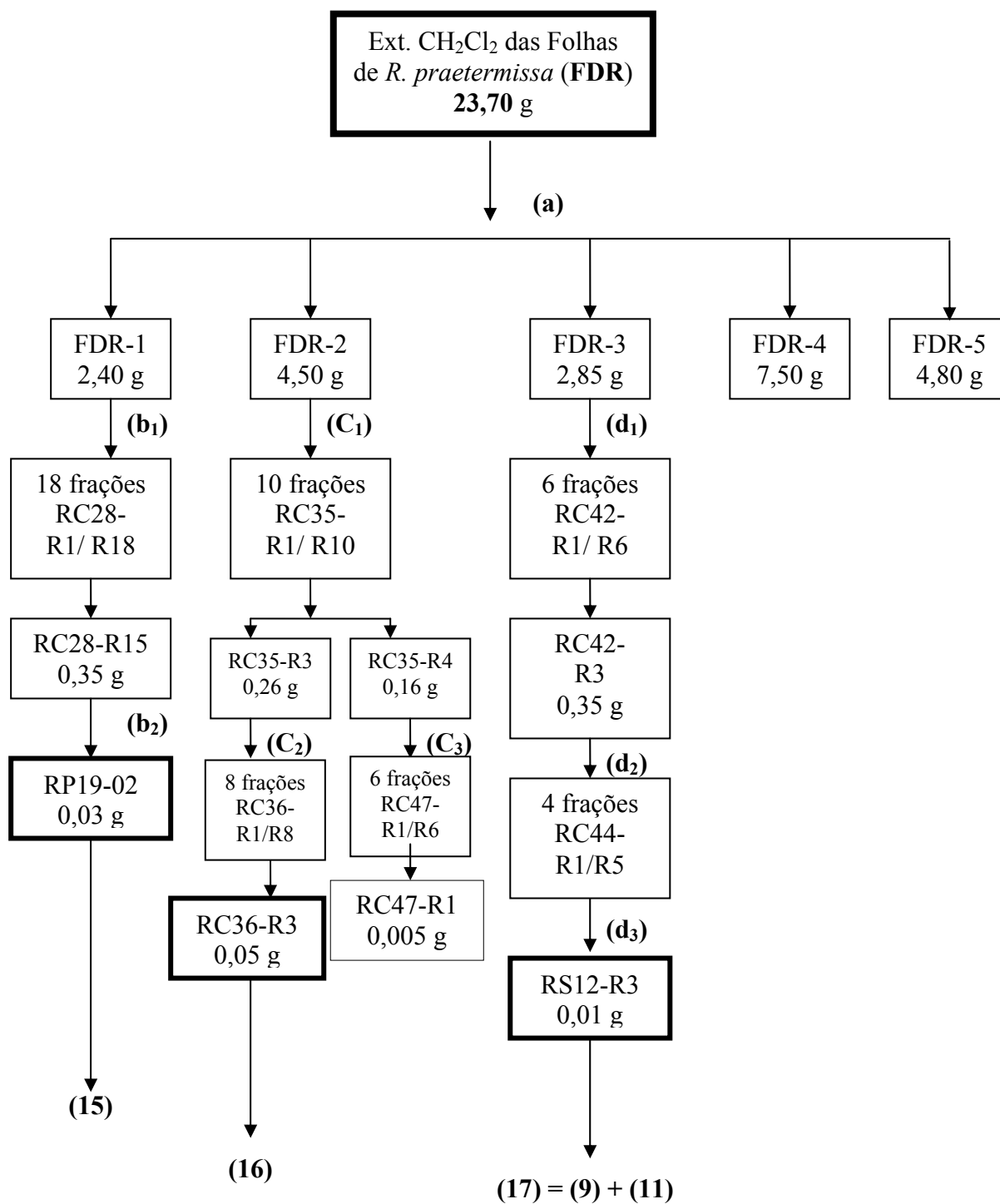
(d₃) CCDP; 1,0 mm, 20 x 20 cm, eluentes: Hexano:Acetona (5:1 v/v), resultando em duas frações.

(d₃) Sephadex LH-20, eluentes: MeOH:DCM (2:8 v/v), resultando em cinco frações.

(E₁) CC, $\theta \times h = 4,0 \times 20,0$ cm, sílica gel 60 + Florisil 200 mesh (4:1 m/m), eluentes: Hexano; Hexano: Acetona (9:1 v/v); Hexano: Acetona (7:1 v/v); Hexano: Acetona (5:1 v/v); Hexano: Acetona (3:1 v/v); Hexano: Acetona (2:1 v/v); Hexano: Acetona (1:1 v/v); Acetona e MeOH.

3.4. Fracionamento dos Extratos das Folhas de *Raputia praetermissa*.

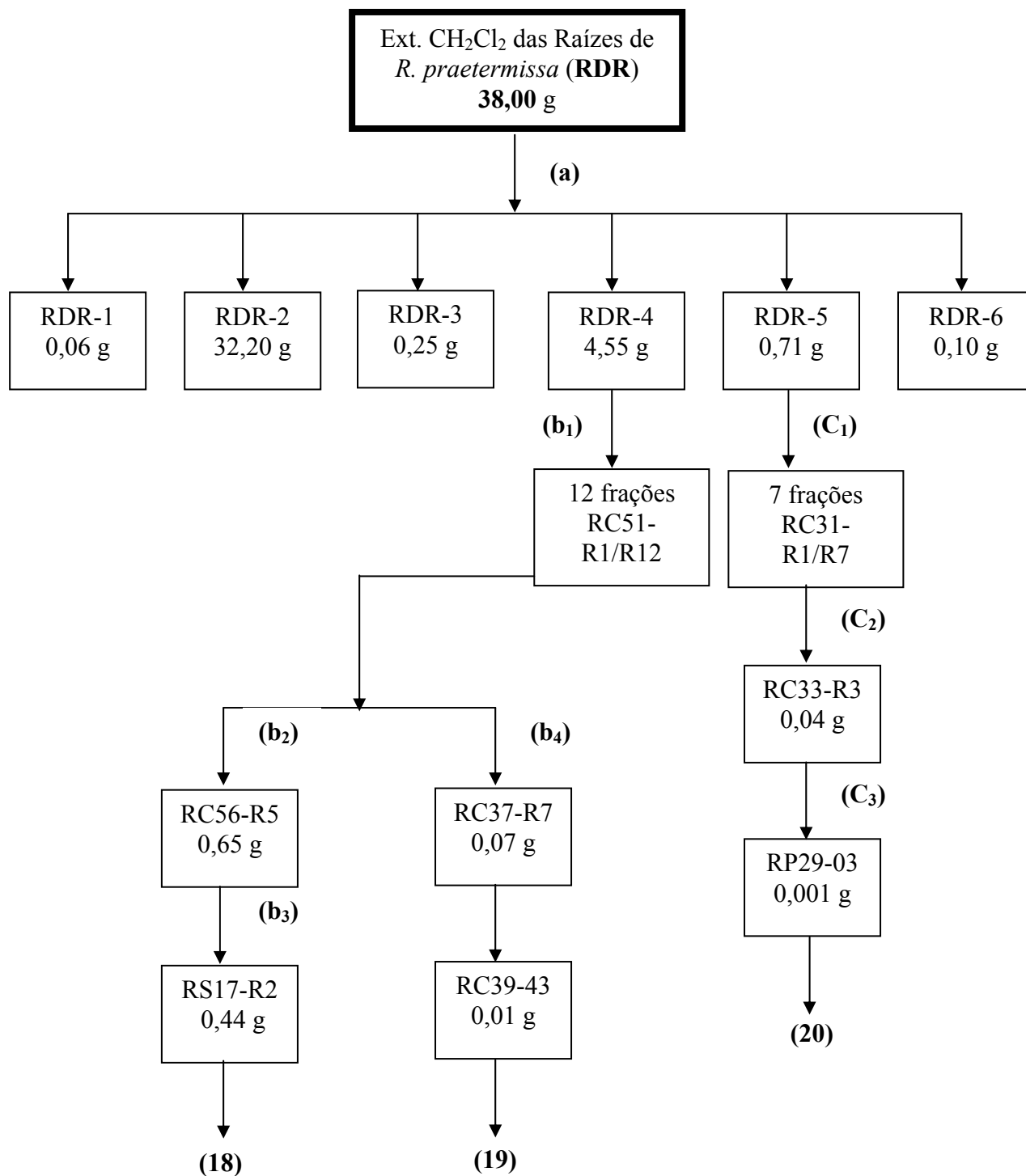
3.4.1. Estudo químico do extrato DCM das folhas de *R. praetermissa* (Rutaceae).



- (a) CF, $\theta \times h = 6,0 \times 20,0$ cm, sílica gel 60 (230 – 400 mesh), eluentes: Hexano; DCM; AcOEt; AcOEt:MeOH (1:1 v/v) e MeOH.
- (b₁) CC, $\theta \times h = 4,0 \times 25,0$ cm, sílica gel 60 (230 – 400 mesh), eluentes: Hexano; Hexano: DCM (9:1 v/v); Hexano: DCM (6:1 v/v); Hexano: DCM (5:1 v/v); Hexano: DCM (3:1 v/v); Hexano: DCM (1:1 v/v); DCM; Hexano:Acetona (2:1 v/v); Hexano:Acetona (1:1 v/v); Acetona e MeOH.
- (b₂) CCDP; 1,0 mm, 20 x 20 cm, eluentes: Hexano:DCM:Acetona (8,5:1,0:0,5 v/v), resultando em 3 frações.
- (C₁) CC, $\theta \times h = 6,0 \times 20,0$ cm, sílica gel 60 + Florisil 200 mesh, eluentes: Hexano; Hexano: Acetona (9:1 v/v); Hexano: Acetona (6:1 v/v); Hexano: Acetona (4:1 v/v); Hexano: Acetona (3:1 v/v); Hexano: Acetona (2:1 v/v); Hexano: Acetona (2:1 v/v); Hexano: Acetona (1:1 v/v); Acetona e MeOH.
- (C₂) CC, $\theta \times h = 2,5 \times 16,0$ cm, sílica gel 60 + Florisil (1:1 m/m), eluentes: Hexano; Hexano: Acetona (9:1 v/v); Hexano: Acetona (6:1 v/v); Hexano: Acetona (4:1 v/v); Hexano: Acetona (2:1 v/v); Hexano:Acetona (1:1 v/v); Acetona e MeOH.
- (C₃) CC, $\theta \times h = 3,0 \times 16,0$ cm, sílica gel 60 + Florisil (1:2 m/m), eluentes: Hexano; Hexano: DCM (9:1 v/v); Hexano: DCM (6:1 v/v); Hexano: DCM (4:1 v/v); Hexano: DCM (2:1 v/v); Hexano:DCM (1:1 v/v); Hexano:Acetona (3:1 v/v); Hexano:Acetona (1:1 v/v); Acetona e MeOH.
- (d₁) CC, $\theta \times h = 4,0 \times 25,0$ cm, sílica gel 60 + Florisil (4:1 m/m), eluentes: Hexano; Hexano: DCM (9:1 v/v); Hexano: DCM (7:1 v/v); Hexano: DCM (5:1 v/v); Hexano: DCM (3:1 v/v); Hexano:DCM (2:1 v/v); Hexano:DCM (1:1 v/v); Hexano:DCM (1:3 v/v); Hexano:Acetona (3:1 v/v); Hexano:Acetona (1:1 v/v); Acetona e MeOH.
- (d₂) CC, $\theta \times h = 2,5 \times 18,0$ cm, sílica gel + Florisil 200 mesh (3:1 m/m), eluentes: Hexano; Hexano: DCM (5:1 v/v); Hexano: DCM (4:1 v/v); Hexano: DCM (3:1 v/v); Hexano: DCM (2:1 v/v); Hexano:DCM (1:1 v/v); DCM; Hexano:Acetona (1:1 v/v); Acetona e MeOH.
- (d₃) Sephadex LH-20, eluentes: MeOH:DCM (1:1 v/v); MeOH, resultando em cinco frações.

3.5. Fracionamento dos Extratos das Raízes de *Raputia praetermissa*.

3.5.1. Estudo químico do extrato DCM das raízes de *R. praetermissa* (Rutaceae).



(a) CF, $\theta \times h = 8,0 \times 18,0$ cm, sílica gel 60 (70 – 230 mesh), eluentes: Hexano; Hexano: DCM (1:1 v/v); DCM; DCM:MeOH (1:1 v/v); MeOH e MeOH:H₂O (1:1 v/v).

(b₁) CC, $\theta \times h = 3,0 \times 16,0$ cm, sílica gel 60 (230 – 400 mesh), eluentes: Hexano; Hexano: DCM (4:1 v/v); Hexano: DCM (3:1 v/v); Hexano: DCM (2:1 v/v); Hexano: DCM (1:1 v/v); DCM; Acetona e MeOH.

(b₂) CC, $\theta \times h = 2,5 \times 17,0$ cm, sílica gel 60 (230 – 400 mesh), eluentes: Hexano; Hexano: Acetona (4:1 v/v); Hexano: Acetona (3:1 v/v); Hexano: Acetona (2:1 v/v); Hexano: Acetona (1:1 v/v); Acetona e MeOH.

(b₃) Sephadex LH-20, eluente: MeOH, resultando em seis frações.

(b₄) CC, $\theta \times h = 2,0 \times 18,0$ cm, sílica gel 60 (230 – 400 mesh), eluentes: Hexano: DCM (4:1 v/v); Hexano: DCM (3:1 v/v); Hexano: DCM (1:1 v/v); Hexano: Acetona (2:1 v/v); Hexano: Acetona (1:1 v/v); Acetona e MeOH.

(C₁) CC, $\theta \times h = 3,0 \times 20,0$ cm, sílica gel 60 (230 – 400 mesh), eluentes: Hexano; Hexano: Acetona (9:1 v/v); Hexano: Acetona (6:1 v/v); Hexano: Acetona (4:1 v/v); Hexano: Acetona (2:1 v/v); Hexano: Acetona (1:1 v/v); Acetona e MeOH.

(C₂) CC, $\theta \times h = 2,0 \times 14,0$ cm, sílica gel 60, eluentes: Hexano; Hexano: DCM (9:1 v/v); Hexano: DCM (7:1 v/v); Hexano: DCM (4:1 v/v); Hexano: DCM (2:1 v/v); Hexano:DCM (1:1 v/v); DCM; Acetona e MeOH.

(C₃) CCDP; 1,0 mm, 20 x 20 cm, eluentes: Hexano:Acetona (2:1 v/v), resultando em quatro frações.

3.6. Materiais e Equipamentos

3.6.1. Suportes para Cromatografia

- # Sílica gel 60 GF₂₅₄ – Merck – Cromatografia em camada delgada comparativa;
- # Sílica gel 60 (70 – 230 mesh) – Merck – Cromatografia em coluna;
- # Sílica gel 60 (230 – 400 mesh) – Merck – Cromatografia em coluna;
- # Sílica gel 60 PF₂₅₄ – Merck – Cromatografia em camada delgada preparativa;
- # Florisil (60 – 100 mesh) – Mallinckrodt;
- # Sephadex LH – 20 da Amershan Pharmacia Biotech AB;
- # Placas comerciais (20 x 20 cm) da Macherey – Nagel GmbH & Co., com 0,25 mm de sílica gel com indicador UV₂₅₄;
- # Cromatofolhas (sílica gel 60 F254, $\Phi = 0,2$ mm) da Merck.

3.6.2. Solventes (Prosint Química S.A.) destilados no Departamento de Química da UFSCar

- # Acetato de etila;
- # Acetona;
- # Água destilada
- # Clorofórmio;
- # Diclorometano;
- # Etanol;
- # Hexano;
- # Metanol.

3.6.3. Solventes deuterados (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.)

- # Acetona;
- # Benzeno;
- # Clorofórmio;
- # DMSO;
- # Metanol;
- # Piridina.

3.6.4. Solventes grau cromatográfico (Tedia Brasil)

- # Acetonitrila;
- # Diclorometano;
- # Hexano;
- # Isopropanol;
- # Metanol.

3.6.5. Reveladores cromatográficos e outros aparatos

- # Reagente de Dragendorff;
- # Solução de Vanilina ácida;
- # Câmara de Luz UV ($\lambda = 254$ e 365 nm);
- # Câmara de Iodo;
- # Pipeta automática Pipetman P – Gilson, modelo VC, vol. 200 – 1000 μ L;
- # Filtros para CLAE, Phenomenex AFO – 0415.2NY.

3.6.6. Equipamentos

Espectrômetros de RMN

- Bruker DRX 9,8T (400 MHz para ^1H , 100 MHz para ^{13}C) DQ – UFSCar;
- Bruker DRX 4,9T (200 MHz para ^1H , 50 MHz para ^{13}C) DQ – UFSCar.

Espectrofotômetro de UV

- Hewlett Packard/8452A – DQ – UFSCar.

CLAE

- LC-6AD – Shimadzu (Liquid chromatograph); detector, PD 10 AV vp – Shimadzu (UV-vis); controladora, SCL – 10A – Shimadzu (System controller); coluna polimérica semipreparativa Shodex ASAhipak.

CG – EM

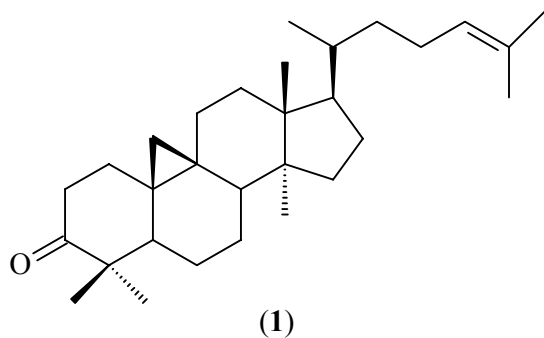
- Shimadzu QP5000 - DQ/UFSCar; coluna, DB-5 poli (5% difenil, 95% dimetilsiloxano), 15 m; 0,25 mm D.I.; 0,25 μm de filme. Ionização por impacto eletrônico a 70 eV.

Evaporadores rotatórios

- Buchi modelo ELB – 131, banho Buchi modelo B – 480 e circulador de água refrigerado NESLAB, modelo CFT – 25;
- Buchi modelo R – 114, banho Buchi modelo B – 480 e circulador de água refrigerado NESLAB, modelo CFT – 25.

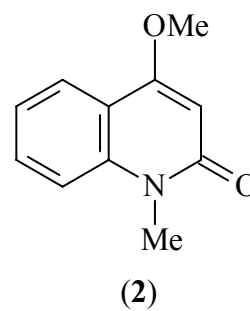
4. Resultados e Discussão.

4.1. Substâncias isoladas.



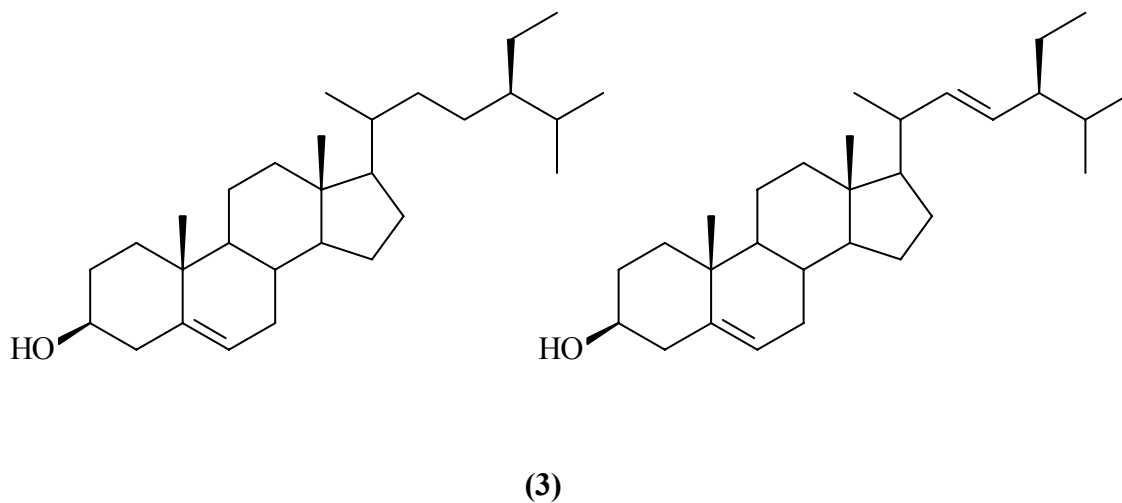
Cicloartenona

Origem: Extrato hexânico do caule
m (mg): 13,7



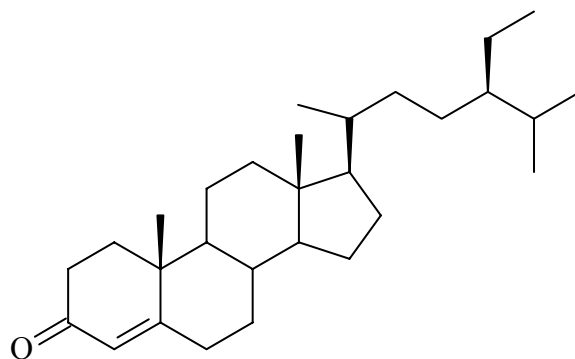
N-metil-4-metoxi-2-quinolona

Origem: Extrato hexânico do caule
m (mg): 332,0



Sitosterol + Estigmasterol

Origem: Extrato hexânico do caule
m (mg): 70,0

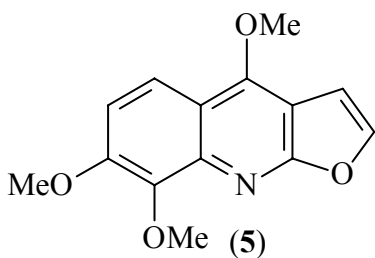


(4)

Sitostenona

Origem: Extrato hexânico do caule

m (mg): 67,7

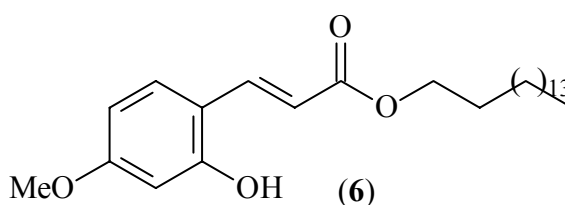


(5)

Esquimianina

Origem: Extrato hexânico do caule

m (mg): 54,0

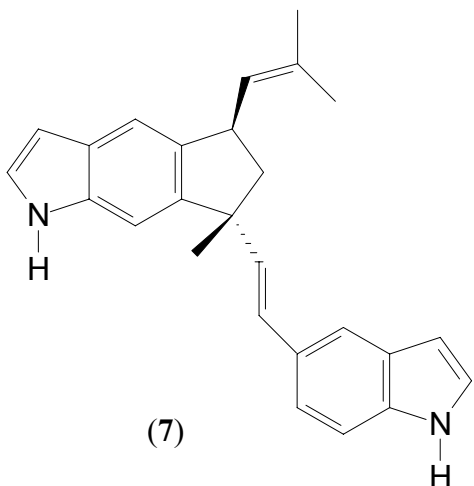


(6)

Éster-3-(2'-hidroxi-4'-metoxifenil)-hexadecanilato

Origem: Extrato DCM do caule

m (mg): 53,4

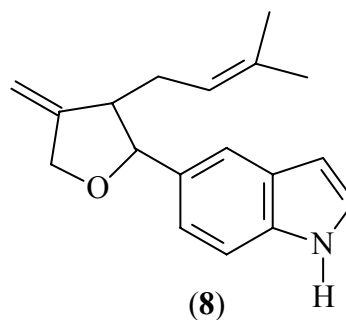


(7)

5',6'-[5-metil-5(7-indol-5''-il-eteno-6,7-diil)-3-(metilprop-2-en-2-il)]-ciclopentano-5',6'-diil-indol

Origem: Extrato DCM do caule

m (mg): 700,0

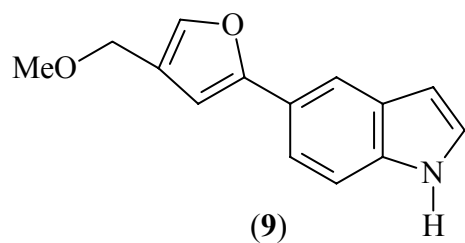


(8)

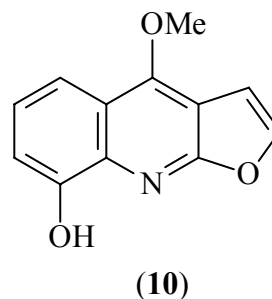
5-[(3'-demetilalil-4'-metilideno)-2'-tetrahidrofur-2'-il]-indol

Origem: Extrato DCM do caule

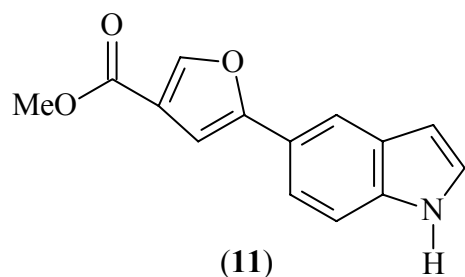
m (mg): 165,0



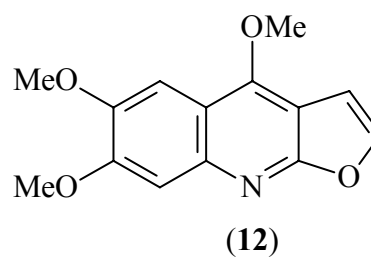
5-[(4'-metoxi-metil)-2'-fúril]-indol
Origem: Extrato DCM do caule
m (mg): 220,0



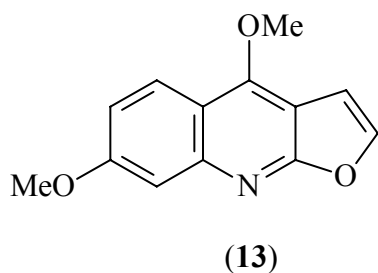
Robustina
Origem: Extrato DCM do caule
m (mg): 50,8



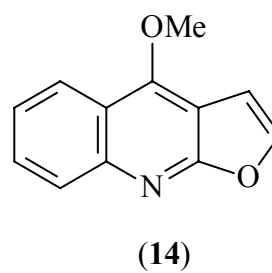
5-[(4'-carbometoxi)-2'-fúril]-indol
Origem: Extrato DCM do caule
m (mg): 1,2



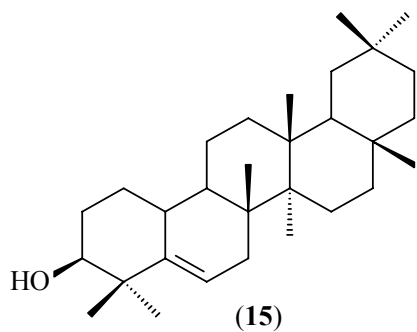
Maculosidina
Origem: Extrato DCM do caule
m (mg): 80,0



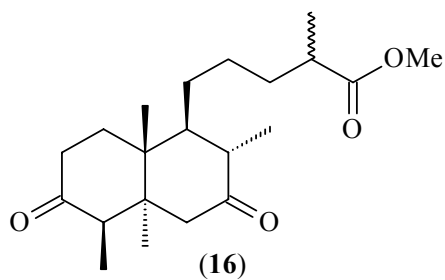
Evolitrina
Origem: Extrato DCM do caule
m (mg): 56,0



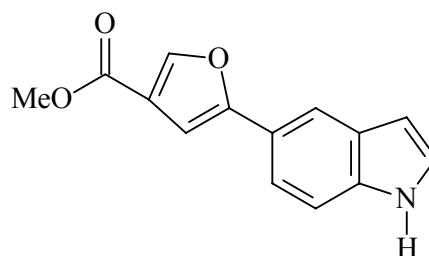
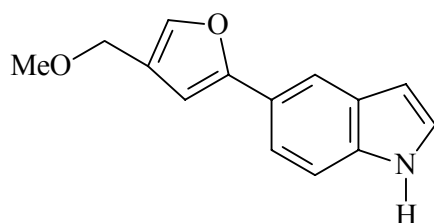
Dictamina
Origem: Extrato DCM do caule
m (mg): 120,0



3β-hidroxi-glutin-5-eno
Origem: Extrato DCM das
 folhas
m (mg): 35,0

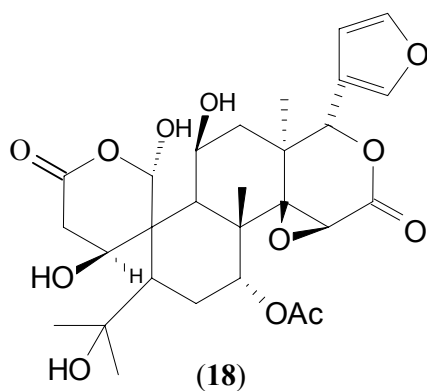


Diterpeno clerodano
Origem: Extrato DCM das folhas
m (mg): 53,8

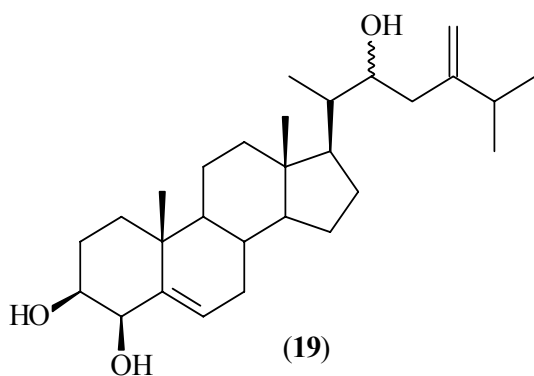


(17) = (9) + (11)

Mistura de alcalóides indólicos
Origem: Extrato DCM das folhas
m (mg): 11,0

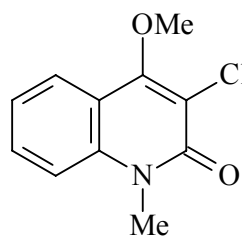


11β, 19α-diidroxi-7-deoxo-7-acetoxi-ichangina
Origem: Extrato DCM das
 raízes
m (mg): 445,0



**24-metileno-3 β , 4 β , 22-triidroxi-
colesterol**

Origem: Extrato DCM das raízes
m (mg): 445,0



**N-metil-3-cloro-4-metoxi-2-
quinolona**

Origem: Extrato DCM das raízes
m (mg): 1,0

4.2. Determinação estrutural

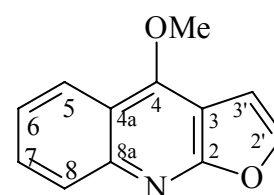
4.2.1. Alcalóides

Os alcalóides constituem um amplo grupo de metabólitos secundários com grande diversidade estrutural, representando aproximadamente 20% das substâncias naturais descritas. Esta diversidade se dá principalmente pelos diversos caminhos biossintéticos, que podem envolver diferentes precursores, como aminoácidos aromáticos, e em alguns casos dois aminoácidos precursores ao mesmo tempo (Tillequin, 2007). Pode-se citar como exemplos de aminoácidos precursores de alcalóides: fenilalanina, tirosina, triptofano, histidina e ácido antranílico.

4.2.1.1. Determinação estrutural dos alcalóides furoquinolínicos

Foram isolados cinco alcalóides do tipo furoquinolínicos a partir do estudo fitoquímico de *Raputia praetermissa* (Rutaceae).

Estes alcalóides foram isolados como sólidos amorfos e são caracterizados pela presença de um sistema furânico em suas estruturas básicas. Nos alcalóides furoquinolínicos que apresentam diversos grupos metoxílicos, uma das



Furoquinolínicos

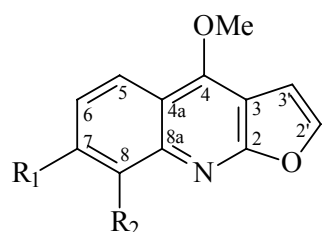
metoxilas aparece na região de δ 4,00 – 5,00, desblindada, comparando com outras que estão próximas de δ 4,00. O sinal desblindado em todos os casos é atribuído aos hidrogênios 4-OMe devido o efeito retirador de elétrons ocasionado pelo nitrogênio em hibridação sp^2 .

Na região aromática do espectro, a completa atribuição dos sinais observados pode ser feita para todos os alcalóides com pelo menos um substituinte no anel homocíclico A. Nos compostos com quatro hidrogênios aromáticos no anel A (dictamina e seus relativos) os sinais sobrepostos e os padrões de multiplicidade complexa requerem uma completa análise de seus dados (Robertson, 1963). No entanto, atualmente estes tipos de alcalóides já são amplamente difundidos na literatura; portanto, no estudo fitoquímico de *R.*

praetermissa, a identificação estrutural destes metabólitos foi realizada através de seus dados de RMN¹H e, ainda, por comparação com a literatura.

4.2.1.2. Determinação das substâncias dictamina (14), robustina (10), evolitrina (13), esquimianina (5) e maculosidina (12).

As substâncias dictamina (14), robustina (10) e evolitrina (13) apresentam algumas peculiaridades entre si. Devido a tal similaridade química, a

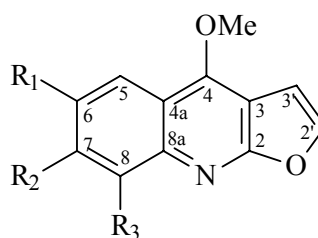


- (14) Dictamina: R₁= R₂= H
 (10) Robustina: R₁=H, R₂=OH
 (13) Evolitrina: R₁= OMe, R₂=H

determinação estrutural destes metabólitos será descrita em conjunto. A **Dictamina (14)** em seu espectro de RMN¹H (Figura 1.2, Tabela 1.2) observou-se sinais em δ 7,05 d ($J = 2,8$ Hz) e δ 7,62 d ($J = 2,8$ Hz), que sugerem a presença de anel furano na molécula. Um sinal em δ 4,47 no espectro de RMN¹H (Figura 1.2) integrando para 3H sugere a presença de uma metoxila

que caracteriza este grupo de alcalóides bastante comum nas plantas da família Rutaceae, os furoquinolínicos. A **Robustina (10)** apresenta como diferença fundamental em relação à substância anterior a presença de uma hidroxila em C-8, o que leva a uma modificação no padrão de substituição dos hidrogênios aromáticos, observados através da análise de seus dados espectrais. Em seu espectro de RMN¹H (Figura 1.3) observou-se sinais na região de hidrogênios aromáticos em δ 7,74 dd ($J = 1,4$ e 8,5 Hz), δ 7,34 dd ($J = 7,7$ e 8,5 Hz), δ 7,18 dd ($J = 1,4$ e 7,7 Hz).

A **Evolitrina (13)** apresentou em seu espectro de RMN¹H (Figura 1.4) os sinais que caracterizam o anel furânico H-2' e H-3' em δ 7,62 (*d*, $J = 2,8$ Hz) e δ 7,07 (*d*, $J = 2,8$ Hz) e ainda os sinais do sistema aromático, um duplete em δ 7,92 (*d*, $J = 8,0$ Hz), um duplo duplete em δ 7,07 (*dd*, $J = 8,0$ e 1,7



- (12) Maculosidina: R₁=R₂=OMe, R₃=H
 (5) Esquimianina: R₁= H, R₂= R₃=OMe

Hz) e um duplete em δ 7,34 (*d*, $J = 1,7$ Hz). Estes sinais são típicos de anéis aromáticos 1,2,4-substituídos. Na região mais próxima ao TMS foram observados dois singletos na região dos hidrogênios metoxílicos, ambos integrando para 3H em δ 4,46 e δ 3,95. Estes alcalóides do tipo furoquinolínicos são muito comuns. Portanto, a identificação destes compostos foi feita por meio de seus dados de RMN ^1H e, ainda, por comparação com os dados registrados na literatura.

Neste segundo bloco serão discutidos alguns aspectos químicos das substâncias esquimianina (**5**) e maculosidina (**12**). O espectro de RMN ^1H (Figura 1.5, Tabela 1.2) da substância **5** apresenta evidências de dois sistemas AX de acoplamento de *spins* na região dos hidrogênios aromáticos. O primeiro em δ 7,21/8,02 ($J = 9,4$ Hz), típico de hidrogênios *orto* relacionados, e o segundo em δ 7,02/7,57 ($J = 2,8$ Hz), o que caracteriza os hidrogênios do anel furano. Na região alifática do espectro observou-se a presença de três singletos em δ 4,44, δ 4,11 e δ 4,03, que foram associados aos grupos metoxilas ligados ao anel aromático. A Maculosidina (**12**) também apresentou os sinais H-2' e H-3' em δ 7,61 ($J = 2,7$ Hz) e δ 6,73 ($J = 2,7$ Hz) e ainda três sinais na região dos hidrogênios ligados a carbonos metoxílicos em δ 4,42; δ 4,04 e δ 3,92. E na região mais desblindada do espectro (Figura 1.6, tabela 1.2) foram observados dois singletos em δ 7,58 e δ 7,30, que foram atribuídos aos hidrogênios H-5 e H-8, respectivamente.

.Tabela 1.2. Dados de RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz, *J* em Hz) para os alcalóides **14**, **10** e **13**, em comparação com os dados registrados na literatura

H	Dictamina		Robustina		Evolitrina	
	(14)	Literatura*	(10)	Literatura**	(13)	Literatura***
2'	7,62 <i>d</i> (<i>J</i> = 2,8)	7,62 <i>d</i> (<i>J</i> = 2,8)	7,62 <i>d</i> (<i>J</i> = 2,8)	7,63 <i>d</i> (<i>J</i> = 2,7)	7,62 <i>d</i> (<i>J</i> = 2,8)	7,57 <i>d</i> (<i>J</i> = 2,7)
3'	7,08 <i>d</i> (<i>J</i> = 2,8)	7,07 <i>d</i> (<i>J</i> = 2,8)	7,08 <i>d</i> (<i>J</i> = 2,8)	7,10 <i>d</i> (<i>J</i> = 2,7)	7,07 <i>d</i> (<i>J</i> = 2,8)	7,06 <i>d</i> (<i>J</i> = 2,7)
5	8,27 <i>dl</i> (<i>J</i> = 8,4)	8,27 <i>d</i> (<i>J</i> = 8,5)	7,18 <i>dd</i> (<i>J</i> = 1,4 e 7,7)	7,19 <i>dd</i> (<i>J</i> = 1,5 e 8,0)	7,92 <i>d</i> (<i>J</i> = 8,0)	8,15 <i>d</i> (<i>J</i> = 8,3)
6	7,46 <i>ddd</i> (<i>J</i> = 1,0; 6,9 e 8,4)	7,45 <i>ddd</i> (<i>J</i> = 1,2; 7,0 e 8,5)	7,34 <i>dd</i> (<i>J</i> = 7,7 e 8,5)	7,35 <i>dd</i> (<i>J</i> = 8,0 e 8,8)	7,07 <i>dd</i> (<i>J</i> = 1,7 e 8,0)	7,09 <i>dd</i> (<i>J</i> = 1,9 e 8,3)
7	7,65 <i>ddd</i> (<i>J</i> = 1,0; 6,9 e 8,4)	7,68 <i>ddd</i> (<i>J</i> = 1,2; 7,0 e 8,5)	7,74 <i>dd</i> (<i>J</i> = 1,4 e 8,5)	7,76 <i>dd</i> (<i>J</i> = 1,5 e 8,8)	-	-
8	8,00 <i>dl</i> (<i>J</i> = 8,4)	8,01 <i>d</i> (<i>J</i> = 8,5)	-	-	7,34 <i>d</i> (<i>J</i> = 1,7)	7,33 <i>d</i> (<i>J</i> = 1,9)
4-OMe	4,47 <i>s</i>	4,46 <i>s</i>	4,46 <i>s</i>	4,47 <i>s</i>	4,46 <i>s</i>	4,43 <i>s</i>
7-OMe	-	-	-	-	3,95 <i>s</i>	3,95 <i>s</i>

* Rosas, L. V. 2005

** Robertson, A.V., 1963. Equipamento não mencionado.

*** Januário, A. H., 1995

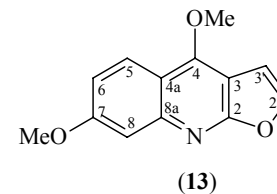
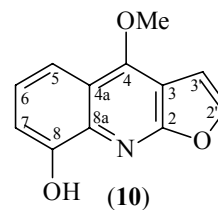
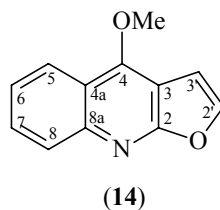
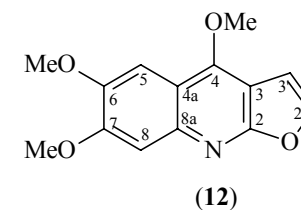
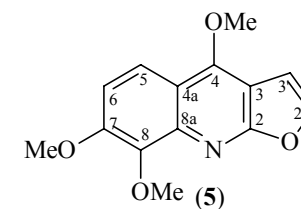


Tabela 1.3. Dados de RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz, *J* em Hz) para os alcalóides **5** e **12**, em comparação com os dados registrados na literatura.

H	Esquimianina		Maculosidina	
	(5)	Literatura [#]	(12)	Literatura ^{##}
2'	7,57 <i>d</i> (<i>J</i> = 2,8)	7,56 <i>d</i> (<i>J</i> = 2,8)	7,61 <i>d</i> (<i>J</i> = 2,7)	7,59 <i>d</i> (<i>J</i> = 2,8)
3'	7,03 <i>d</i> (<i>J</i> = 2,8)	7,00 <i>d</i> (<i>J</i> = 2,8)	6,73 <i>d</i> (<i>J</i> = 2,7)	6,81 <i>d</i> (<i>J</i> = 2,8)
5	8,02 <i>d</i> (<i>J</i> = 9,4)	8,01 <i>d</i> (<i>J</i> = 8,5)	7,58 <i>s</i>	7,52 <i>s</i>
6	7,21 <i>d</i> (<i>J</i> = 9,4)	7,20 <i>d</i> (<i>J</i> = 8,5)	-	-
7	-	-	-	-
8	-	-	-	7,33 <i>s</i>
4-OMe	4,44 <i>s</i>	4,42 <i>s</i>	4,42 <i>s</i>	4,40 <i>s</i>
6-OMe	-	-	4,04 <i>s</i>	4,02 <i>s</i>
7-OMe	4,03 <i>s</i>	4,01 <i>s</i>	3,92 <i>s</i>	4,01 <i>s</i>
8-OMe	4,11 <i>s</i>	4,11 <i>s</i>	-	-



Muller, A. H., (1994).

Robertson, A.V., 1963.

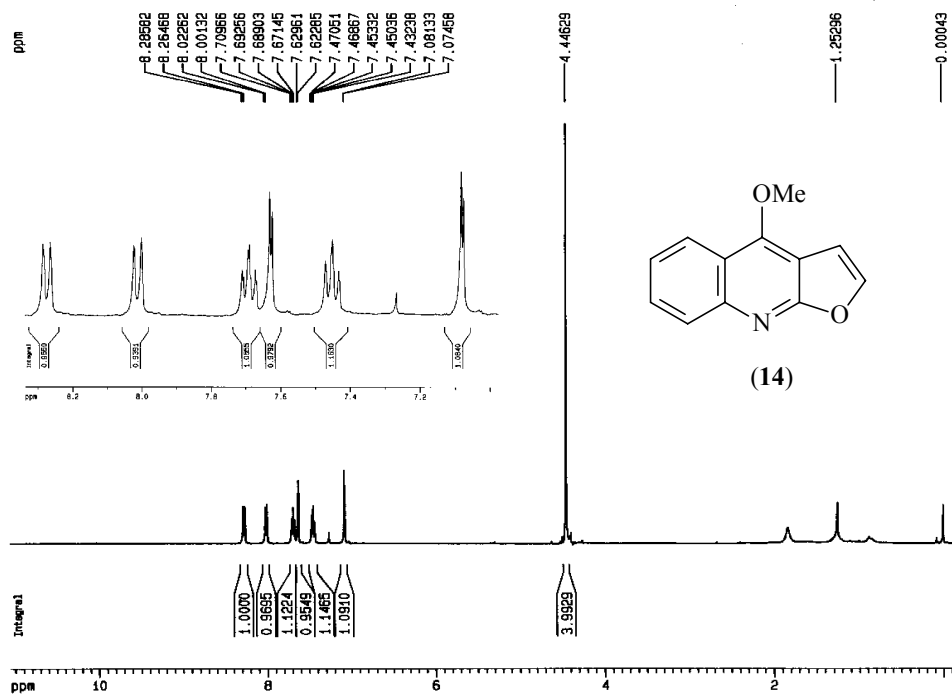


Figura 1.2. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) da substância (14).

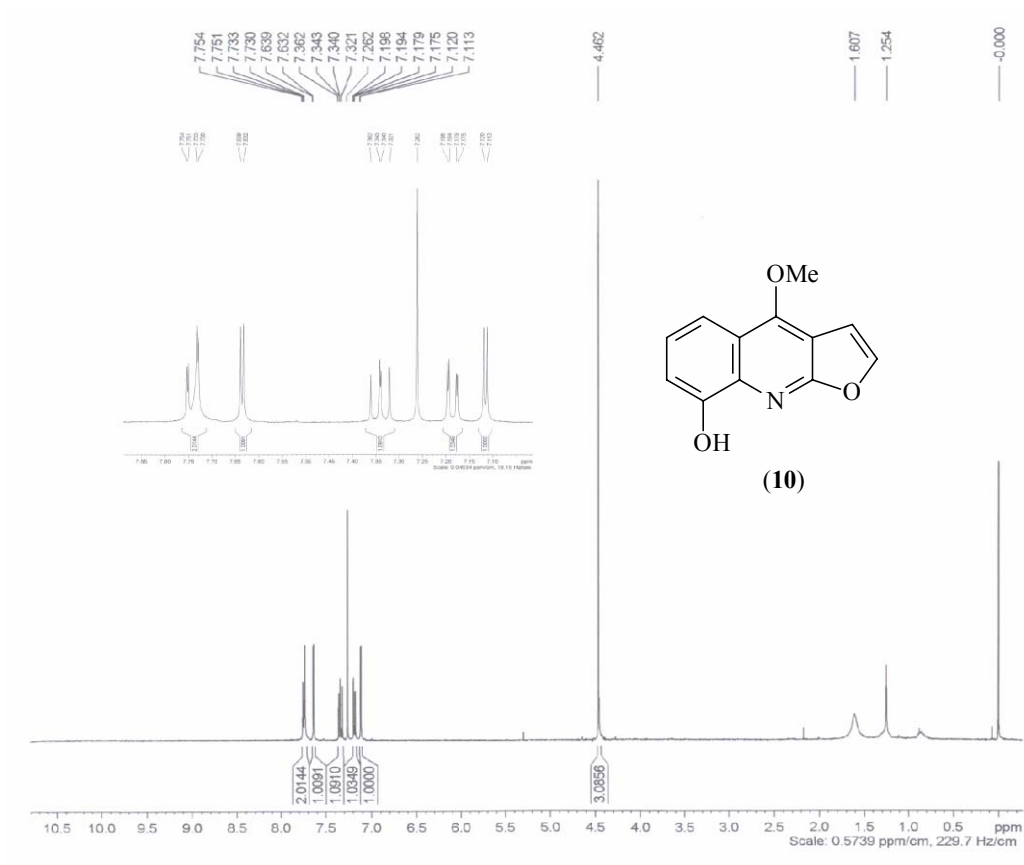


Figura 1.3. Espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz) da substância (10).

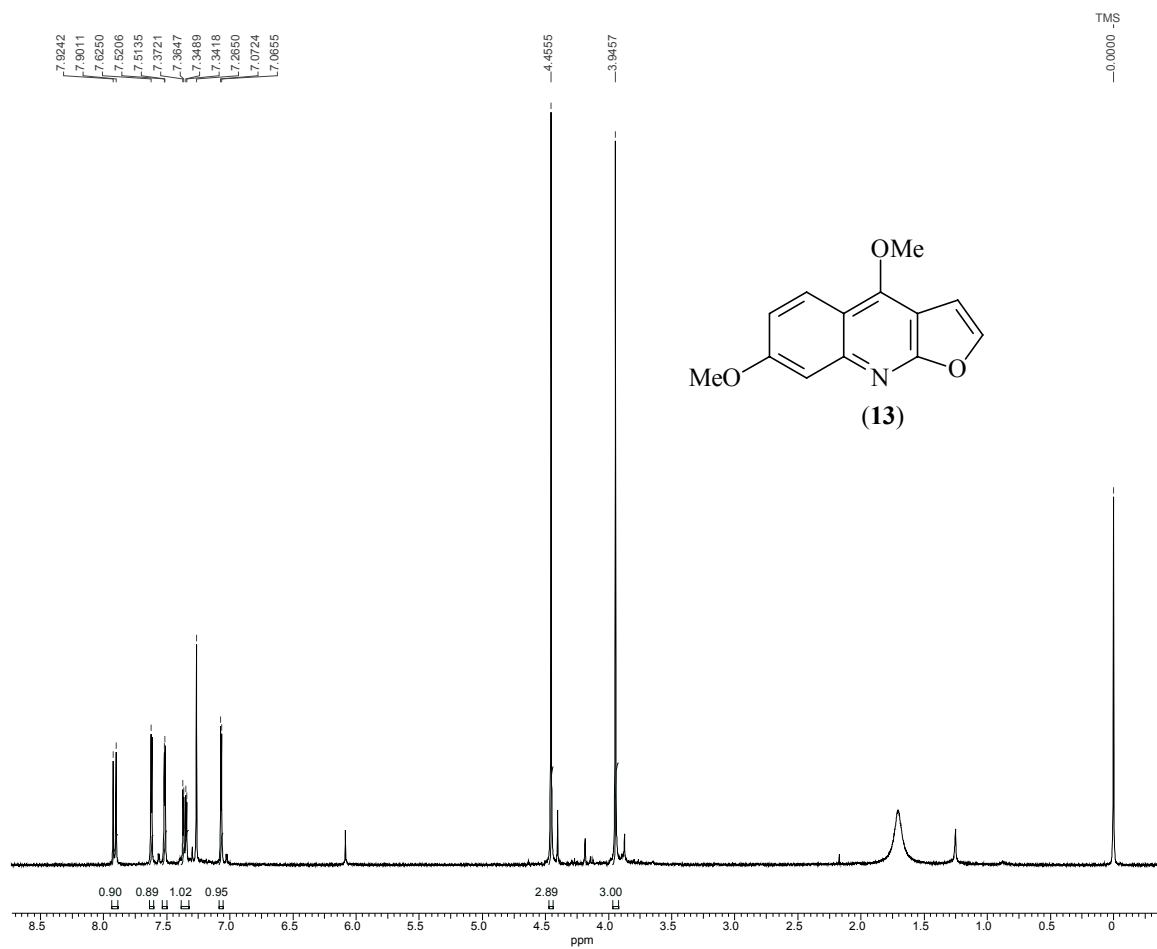


Figura 1.4. Espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz) da substância (13).

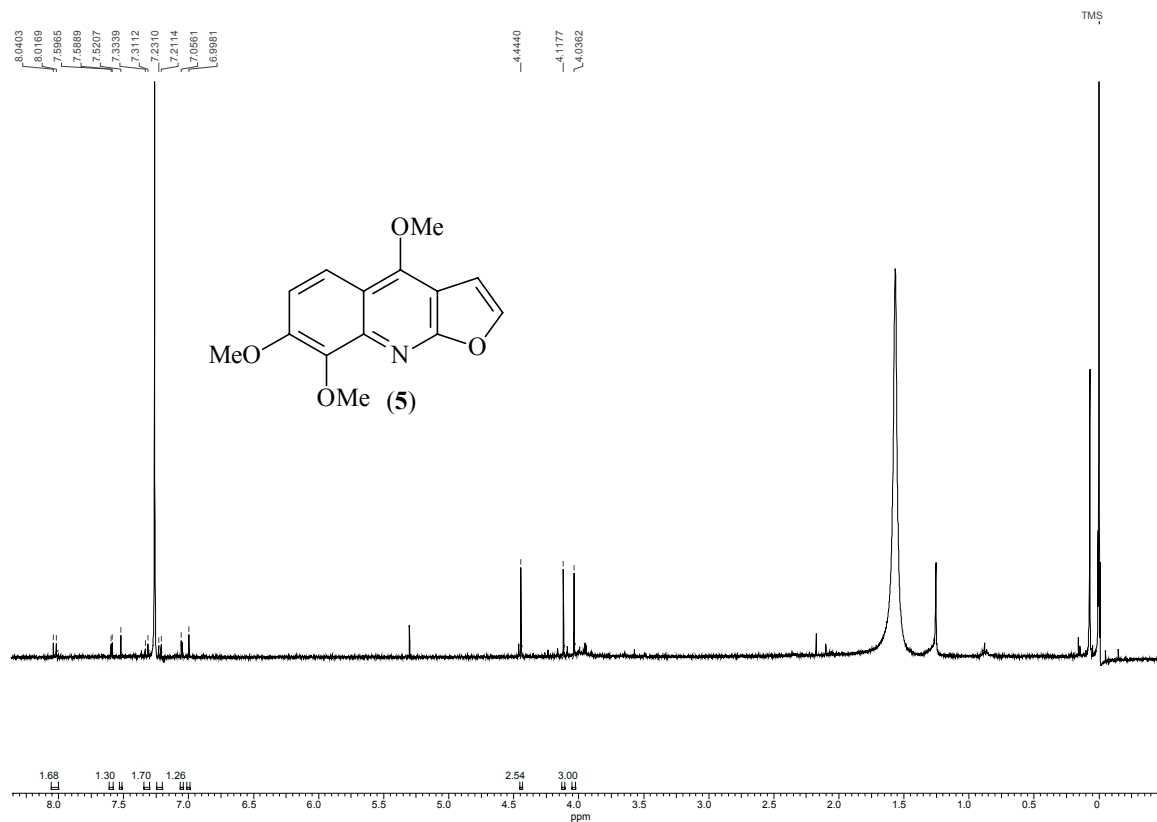


Figura 1.5. Espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz) da substância (5).

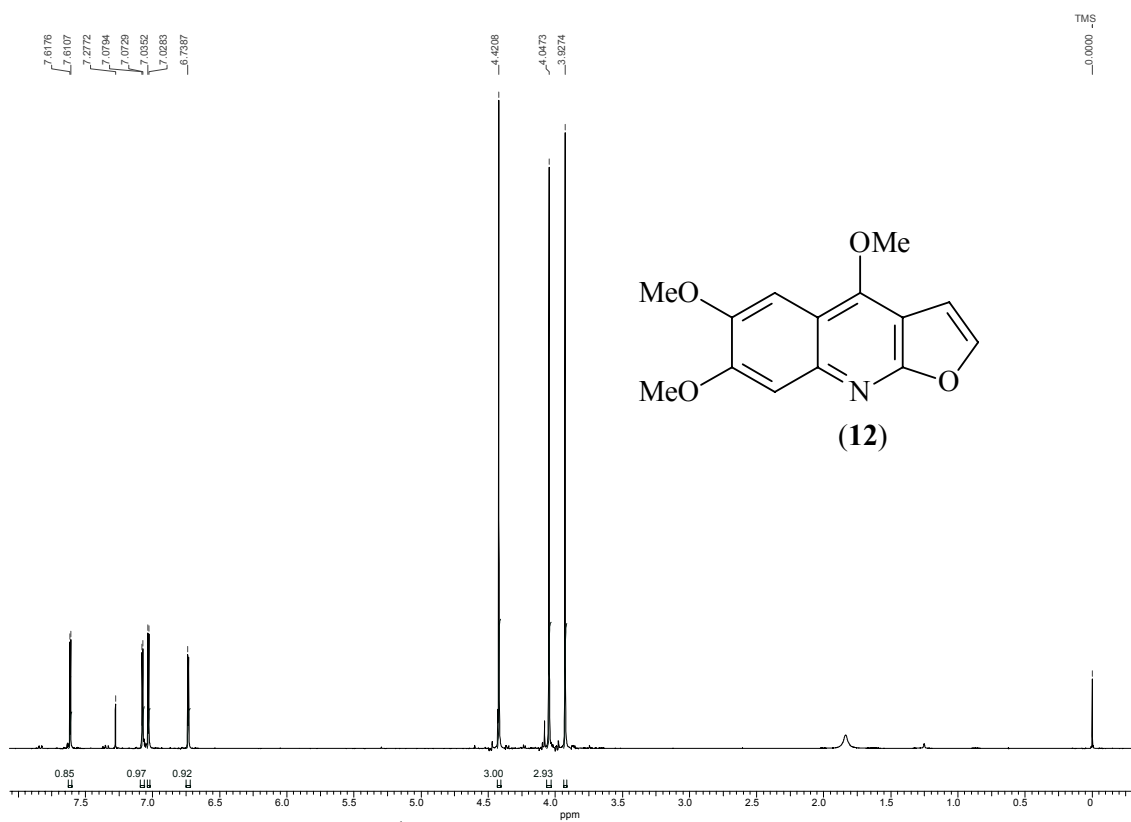


Figura 1.6. Espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz) da substância (12).

4.2.1.3. Determinação estrutural dos alcalóides indólicos.

Foram isolados quatro alcalóides indólicos a partir do estudo fitoquímico de *Raputia praetermissa* (Rutaceae). Estes alcalóides são caracterizados pela presença de um sistema indólico derivado do triptofano em suas estruturas básicas.

4.2.1.4. Determinação estrutural das substâncias 9 e 11.

A substância **9** foi isolada do extrato em CH₂Cl₂ do caule de *Raputia praetermissa* (Rutaceae). Seu espectro de RMN¹H (Figura 1.7 e

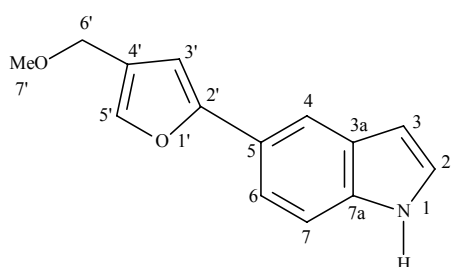
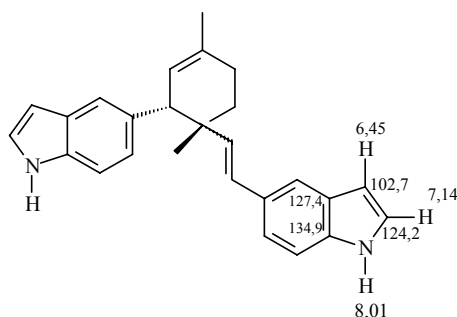


Tabela 1.4), mostrou sinais na região de hidrogênios aromáticos δ 8,00 – 6,56 e ainda um singlete largo em δ 8,35 e na região mais blindada observou-se outros dois singletos em δ 4,41 e 3,44. Em seu

espectro de RMN¹³C (Figura 1.8 e Tabela 1.4) notou-se a presença de 14 sinais.

As características químicas e espectroscópicas desta substância, aliadas ao perfil químico da família Rutaceae sugerem que esta trata-se de um alcalóide do tipo indólico, devido ao singlete largo (*sl*) em δ 8,35 que pode ser atribuído a hidrogênio ligado a nitrogênio, uma vez que através de levantamento realizado na literatura foi encontrado um modelo para sistemas indólicos relatado por Makangara *et al.* (2004), onde tem-se:

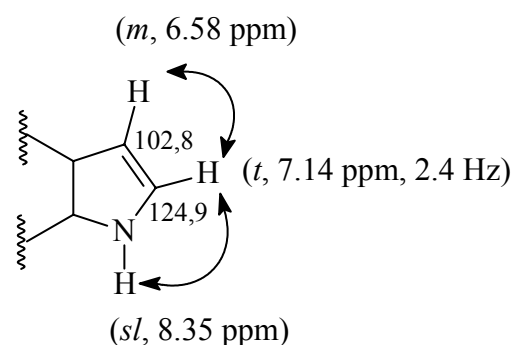


Isolona cauliflora (Annonaceae)
Makangara *et al.* (2004)

Na análise do espectro de RMN¹H, observou-se um tripleto em δ 7,14, que via COSY (Figura 1.9) acopla com o singlete largo em δ 8,35 e ainda com um multiplete em δ 6,58 ($J = 2,4$ Hz). Analisando o espectro de HSQC (Figura 1.10) os sinais de hidrogênios em δ 7,14 (H-2) e δ 6,58 (H-3) apresentaram correlações com os sinais de carbonos em δ 124,9 e δ 102,8, respectivamente. O mapa de contorno de HMBC (Figura 1.11) mostrou que H-2 possui três correlações com sinais de carbono em δ 102,8; δ 127,9 e δ 135,3; sendo estes dois últimos do tipo sp^2 totalmente substituídos. O carbono em δ 135,3 foi atribuído àquele vizinho ao nitrogênio e o carbono em δ 127,9 atribuído a C-3a. O sinal de hidrogênio referente a H-3 (δ 6,58) apresentou correlações com os carbonos em δ 124,9 (C-2) e δ 127,8.

COSY

- δ 7,14 (H-2) \leftrightarrow δ 8,35 (N-H);
- δ 7,14 (H-2) \leftrightarrow δ 6,58 (H-3).

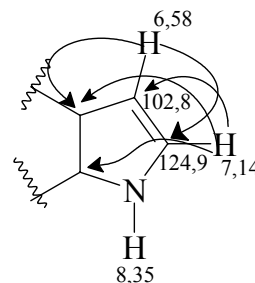


HSQC

- δ 7,14 (H-2) \rightarrow δ 124,9 (C-2);
- δ 6,58 (H-3) \rightarrow δ 102,8 (C-3).

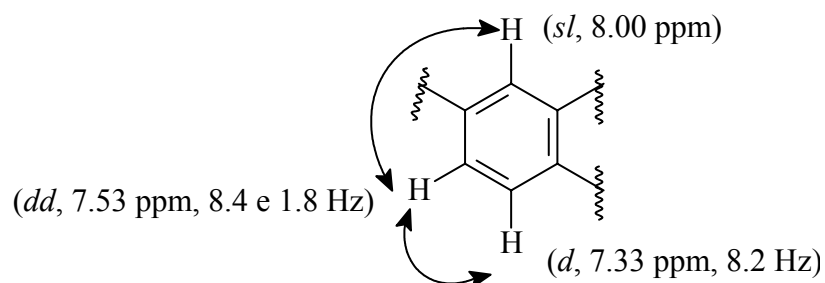
HMBC

- δ 7,14 (t , $J = 2.4$ Hz, δ 124,9), H-2
 - δ 102,8 (C-3)
 - δ 127,9 (C-3a)
 - δ 135,3 (C-7a)
- δ 6,58 (m , $J = 2.4$ Hz, δ 102,8), H-3
 - δ 124,9 (C-2)
 - δ 135,3 (C-7a)



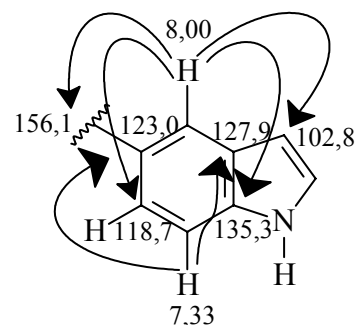
No espectro de RMN¹H, observou-se ainda na região aromática um *dd* em δ 7,53 (atribuído a H-6), que integrou para 1H, que via COSY (Figura 1.9) acopla com um duplete (*d*) em δ 7,33 ($J = 8.4$ Hz, H-7) e com um *sl* em δ 8,00 ($J = 1.8$ Hz, H-4) característicos de substituições aromáticas orto e meta, respectivamente. O espectro de HSQC (Figura 1.10) mostrou que H-4, H-6 e H-7 encontram-se ligados aos carbonos em δ 116,1: δ 118,7 e δ 111,2, respectivamente. Na análise do experimento de HMBC pode-se notar que o sinal de H-7 (*d*, δ 7.33) apresentou duas correlações com os sinais em δ 123,0 e δ 127,9 (C-3a). O sinal de H-6 (*dd*, δ 7.53) mostrou três correlações com os carbonos em δ 135,3 (C-7a), δ 116,1 (C-4) e δ 156,1. O sinal em δ 8.00 (*sl*, H-4) apresentou correlações com os carbonos em δ 102,8 (3J , C-3), δ 118,7 (3J , C-6), δ 135,3 (3J , C-7a) e δ 156,1, que acredita-se fazer parte da cadeia lateral ao sistema aromático.

COSY

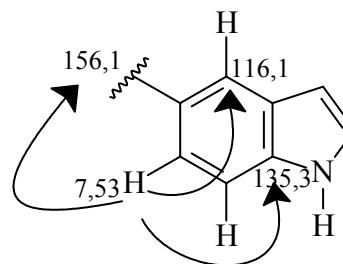


HMBC

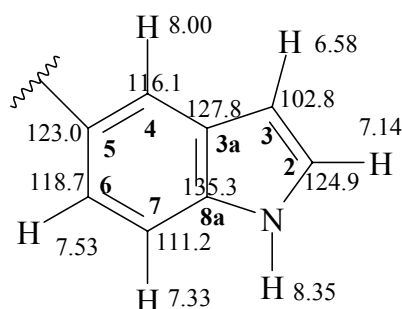
- δ 8,00 (*s*, δ 116,1), H-4
- δ 102,8 (C-3)
- δ 118,7 (C-6)
- δ 135,3 (C-7a)
- δ 156,1.



- δ 7,33 (*d*, $J = 8,2$ Hz, δ 111,2), H-7
- δ 123,0 (C-5)
- δ 127,9 (C-3a)
 - δ 7,53 (*dd*, $J = 1,8$ e $8,2$ Hz, δ 118,7), H-6
- δ 116,1 (C-4)
- δ 135,3 (C-7a)
- δ 156,1



Após a análise parcial dos dados espectrais da substância em questão tem-se até o momento:



O sinal em δ 6,65, no HSQC (Figura 1.10) apresentou correlação com δ 103,7 (carbono sp^2), sugerindo a presença de uma unidade isoprênica ligada a C-5 (aromático), que foi confirmado por HMBC (Figura 1.11), através das correlações apresentadas entre o singlete em δ 6,65 com os sinais em δ 123,0 (3J , C-5) e ainda com o carbono em δ 156,1 (carbono oxigenado sp^2 totalmente substituído). Este hidrogênio apresentou ainda duas correlações com os sinais em δ 66,0 e δ 139,2. Este último através do HSQC (Figura 1.10) encontra-se ligado a um singlete em δ 7,46. Analisando o seu espectro de HMBC (Figura 1.11), se observou correlações com os sinais de carbono em δ 103,7; δ 123,0 e δ 156,1. Estes

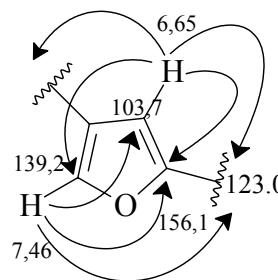
dados confirmam a presença de um anel furano na cadeia lateral ao sistema aromático.

HSQC

- δ 6,65 (H-3') \rightarrow δ 103,7 (C-3');
- δ 7,46 (H-5') \rightarrow δ 139,2 (C-5').

HMBC

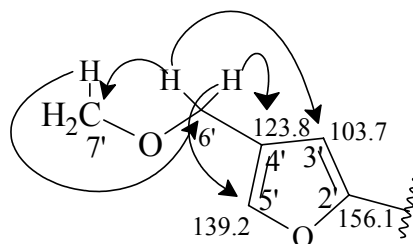
- δ 6,65 (s, δ 103,7), H-3'
- δ 66,0
- δ 123,0 (C-5)
- δ 139,2 (C-5')
- δ 156,1 (C-2')
- δ 7,46 (s, δ 139,2), H-5'
- δ 103,7 (C-3')
- δ 123,0 (C-5)
- δ 156,1 (C-2')



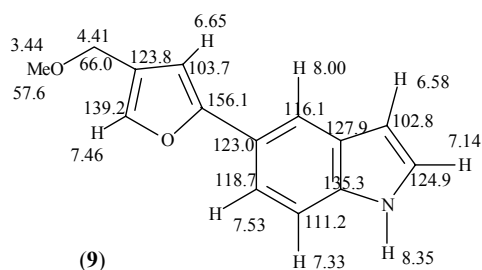
No espectro de RMN¹H (Figura 1.7) observou-se na região mais blindada, dois singletos em δ 4,41 e δ 3,44, que integraram para dois e três hidrogênios, respectivamente. O singlete em δ 3,44, característico da região de hidrogênios metoxílicos, no HSQC (Figura 1.10) encontra-se ligado um sinal de carbono em δ 57,6, e teve sua vizinhança confirmada através do experimento de HMBC (Figura 1.11), onde foi observada apenas uma correlação com o carbono oxigenado em δ 66,0. Este carbono, por sua vez correlaciona-se via HSQC (Figura 1.10) com o singlete em δ 4,41. Este sinal em δ 4,41 em seu mapa de contorno de HMBC apresentou as seguintes correlações: δ 103,7; δ 123,8; δ 139,2 e com o carbono metoxílico em δ 57,6.

HMBC

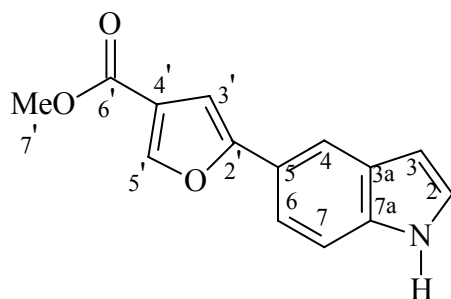
- δ 3,44 (s, δ 57,6), H-7'
- δ 66,0 (C-6')
- δ 4,41 (s, δ 66,0), H-6'
- δ 57,6 (C-7')
- δ 103,7 (C-3')
- δ 123,8 (C-4')
- δ 139,2 (C-5')



A substância **9** foi analisada por CG-EM, e o seu espectro de massas (Figura 1.14) apresentou o pico do íon molecular 227 Daltons, que também é o pico base levando à fórmula molecular $C_{14}H_{13}O_2N$. O espectro ainda apresentou os seguintes íons de m/z 197, m/z 168 e m/z 98. A análise dos dados de RMN (1D e 2D), CG-EM e ainda por levantamento bibliográfico realizado no *Chemical Abstract*, permitem dizer que o alcalóide do tipo indólico tratava-se de uma substância nova na literatura. A este alcalóide foi atribuído o nome 5-[(4-metoximetil)-2-furil]-indol.



A diferença estrutural entre as substâncias **9** e **11** é a presença de uma carbonila no carbono C-6'. Em seu espectro de RMN¹H (Figura 1.13, tabela 1.4) observou-se a ausência do singlete em δ 4,41 que era



(11)

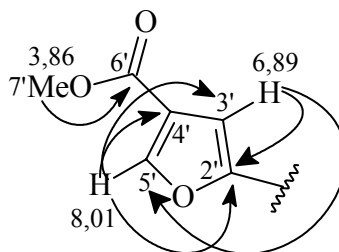
observado no espectro de RMN¹H de **(9)** e em seu espectro de RMN¹³C (Figura 1.14) observou-se a presença de um sinal na região de carbonos carboxílicos em δ 162,8. Os demais sinais observados em seu espectro de RMN¹H apresentaram grande similaridade com o espectro do alcalóide que não possui a carboxila em C-6'. Observou-se os sinais que caracterizam a presença do sistema indólico em δ 8,24 (*sl*, N-H), δ 7,25 (*dd*, H-2), δ 6,59 (*m*, H-3) e ainda do sistema aromático referentes aos hidrogênios H-4 (*sl*), H-6 (*dd*) e H-7 (*d*) em δ 7,97, δ 7,52 e δ 7,41, respectivamente.

O espectro de RMN¹H (Figura 1.13) mostrou ainda a presença de três sinais em δ 8,01 (*s*, 145,0), δ 6,89 (*s*, 101,5) e δ 3,86 (*s*, 50,5). Este último sinal (típico de hidrogênios metoxílicos) apresentou via HMBC correlação com o sinal do carbono carboxílico em δ 162,8, o que sugere a presença de um grupo carbometoxi na estrutura da molécula. E os singletos em δ 6,89 e δ 8,01 sugerem a existência de duas ligações duplas trissubstituídas conjugadas ao grupo carbometoxi, o que formariam um anel furano. Assim como para a substância **9** (discutida anteriormente), o sinal mais desblindado (δ 8,01) seria atribuído a H-5', pois este estaria ligado ao carbono oxigenado e o sinal em δ 6,89 seria atribuído a H-3'. O mapa de contorno de HMBC mostrou as correlações de H-5' com os sinais de carbono em δ 101,5 (C-3'), δ 121,1 (C-4') e δ 155,8 (C-2'). As correlações para H-3' foram com os sinais de carbono em δ 145,0 (C-5') e δ 155,8 (C-2'). A completa atribuição dos sinais foi realizada através de comparação

com dados da literatura (Rosas, 2005), bem como por comparação com os dados da substância **9**.

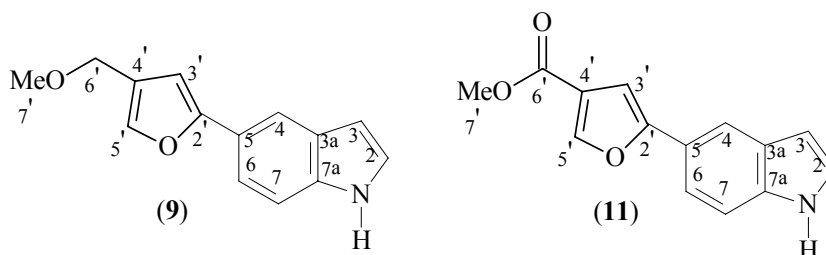
HMBC

- δ 3,86 (s, δ 50,6), H-7'
- δ 162,8 (C-6')
- δ 8,01 (s, δ 145,0), H-5'
- δ 101,5 (C-3')
- δ 121,1 (C-4')
- δ 155,8 (C-2')
- δ 6,89 (s, δ 101,5), H-3'
- δ 145,0 (C-5')
- δ 155,8 (C-2')



O Esquema 1.1 apresenta uma proposta de fragmentação de massas para a substância (**9**), em experimento realizado através da análise por Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas e o Esquema 1.2 apresenta a biosíntese de formação do anel indólico (Dewick, 1997) e o Esquema 1.3 representa a proposta biogenética para a formação dos alcalóides (**9**) e (**11**).

Tabela 1.4. Dados de RMN ^1H e ^{13}C das substâncias **(9)**, CDCl_3 , 400 MHz), **(11)**, CDCl_3 , 200 MHz) e **(11)**, CDCl_3 , 400 MHz literatura).



	(9)		(11)		(11)*	
H/C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
1	8,35 <i>sl</i>	-	8,24 <i>sl</i>	-	9,85 <i>sl</i>	-
2	7,14 <i>t</i> ($J=2,4$)	124,9	7,25 <i>t</i> ($J=2,4$)	124,1	7,25 <i>dd</i> ($J=1,2$ e 2,0)	125,5
3	6,58 <i>m</i>	102,8	6,59 <i>m</i>	102,2	6,55 <i>tl</i> ($J=2,0$)	102,4
3a	-	127,9	-	115,6	7,97 <i>sl</i>	116,6
4	8,00 <i>sl</i>	116,1	7,97 <i>sl</i>	127,0	-	128,0
5	-	123,0	-	123,0	-	123,0
6	7,53 <i>dd</i> ($J=1,8$ e 8,4)	118,7	7,52 <i>dd</i> ($J=1,4$ e 8,4)	117,9	7,50 <i>dd</i> ($J=1,6$ e 8,5)	118,6
7	7,33 <i>d</i> ($J=8,4$)	111,2	7,41 <i>d</i> ($J=8,4$)	110,4	7,43 <i>d</i> ($J=8,5$)	111,7
7a	-	135,3	-	134,6	-	136,0
1'	-	-	-	-	-	-
2'	-	156,1	-	155,8	-	156,0
3'	6,65 <i>s</i>	103,7	6,89 <i>s</i>	101,5	6,88 <i>s</i>	102,3
4'	-	123,8	-	121,1	-	121,0
5'	7,46 <i>s</i>	139,2	8,01 <i>s</i>	145,0	8,04 <i>s</i>	146,3
6'	4,41 <i>s</i>	66,0	-	162,8	-	165,0
7'	3,44 <i>s</i>	57,6	3,86 <i>s</i>	50,5	3,87 <i>s</i>	51,8

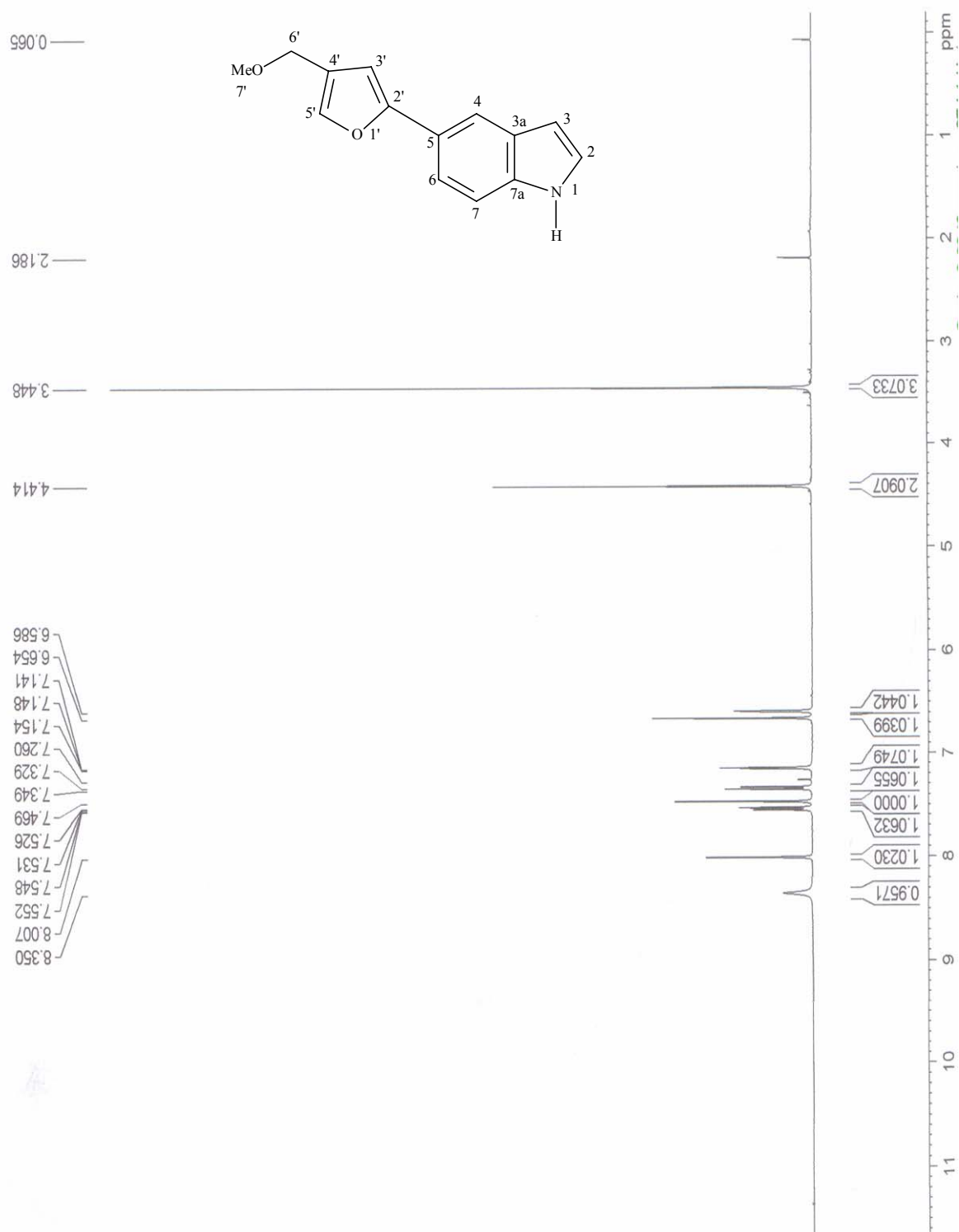


Figura 1.7. Espectro de RMN¹H (400 MHz, CDCl₃) da substância **(9)**.



Figura 1.8. Espectro de RMN¹³C (100 MHz, CDCl₃) da substância **9**.

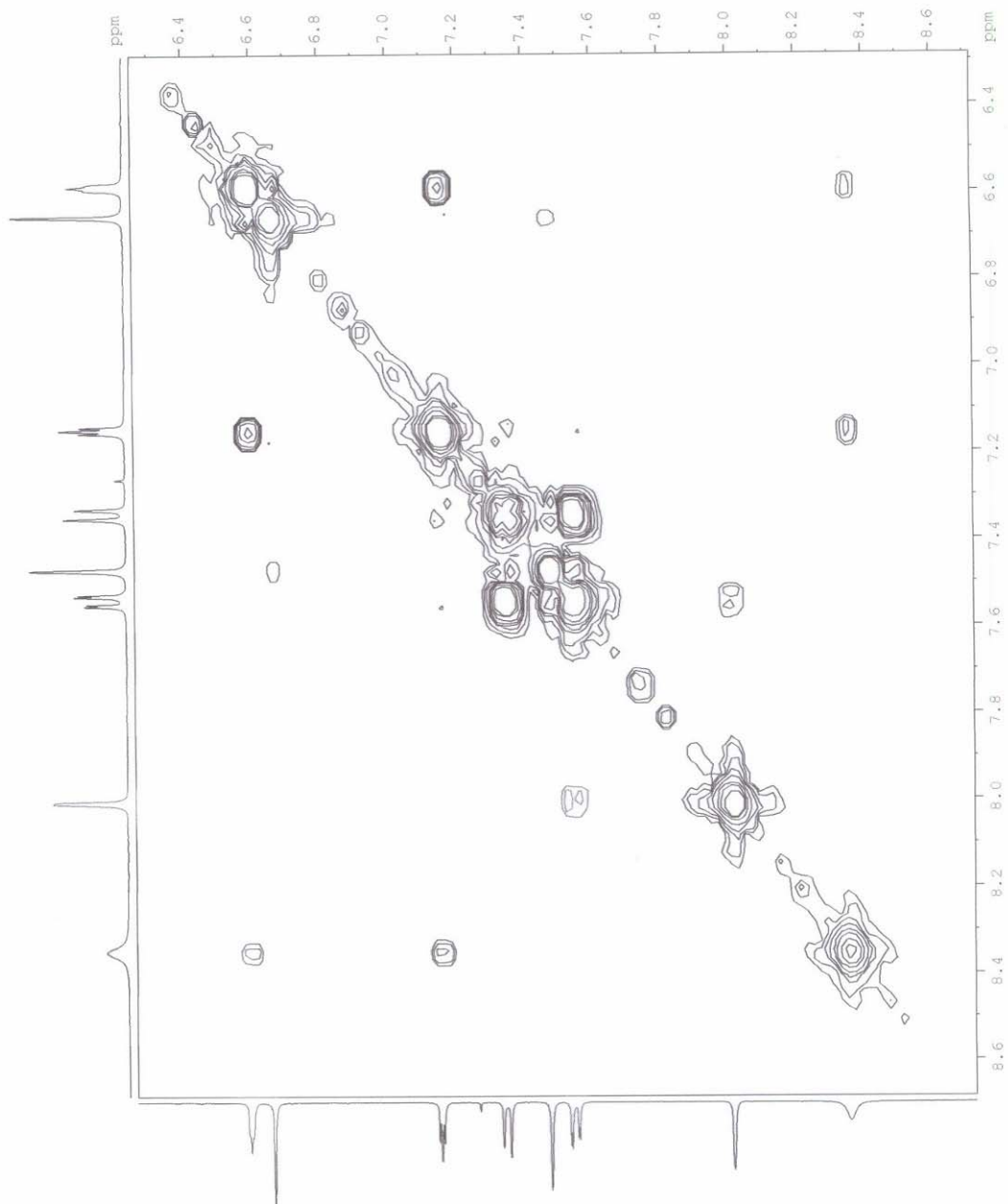


Figura 1.9. Espectro de COSY (400 MHz, CDCl₃) da substância 9.

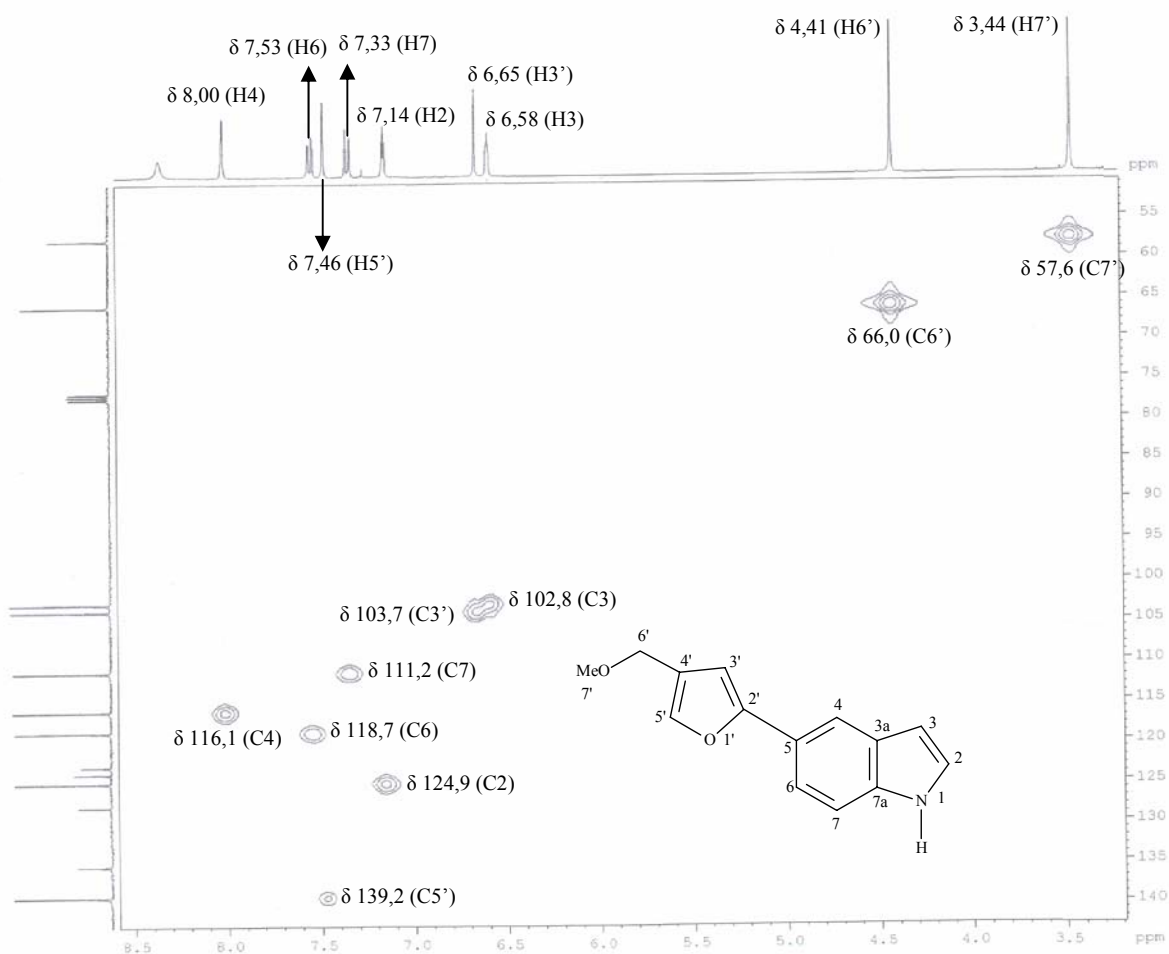


Figura 1.10. Mapa de contorno de HSQC (400 MHz, CDCl_3) da substância **9**.

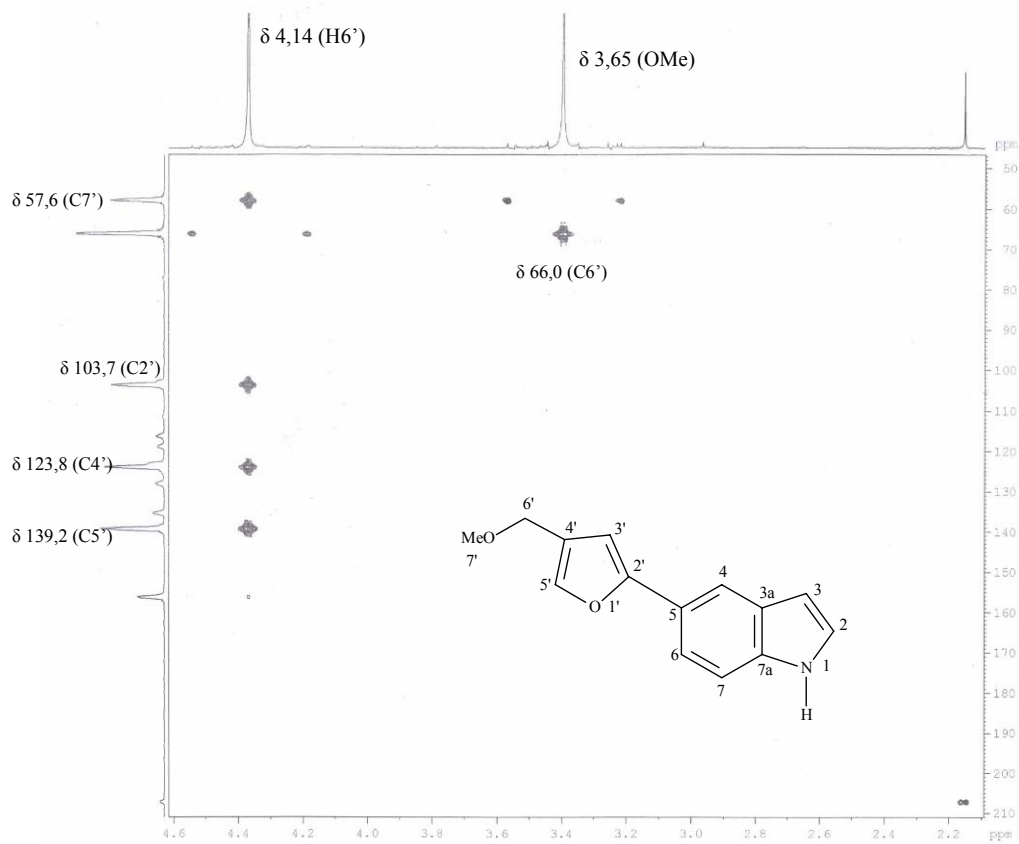
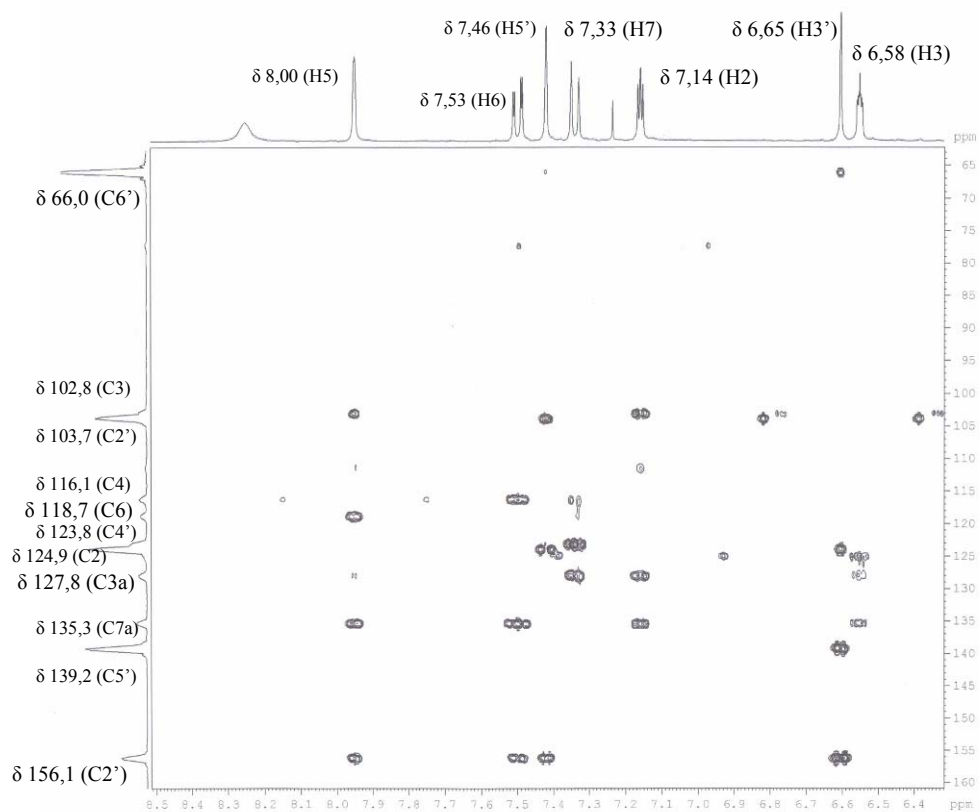


Figura 1.11. Mapas de contorno de HMBC (400 MHz, CDCl_3) da substância **9**.

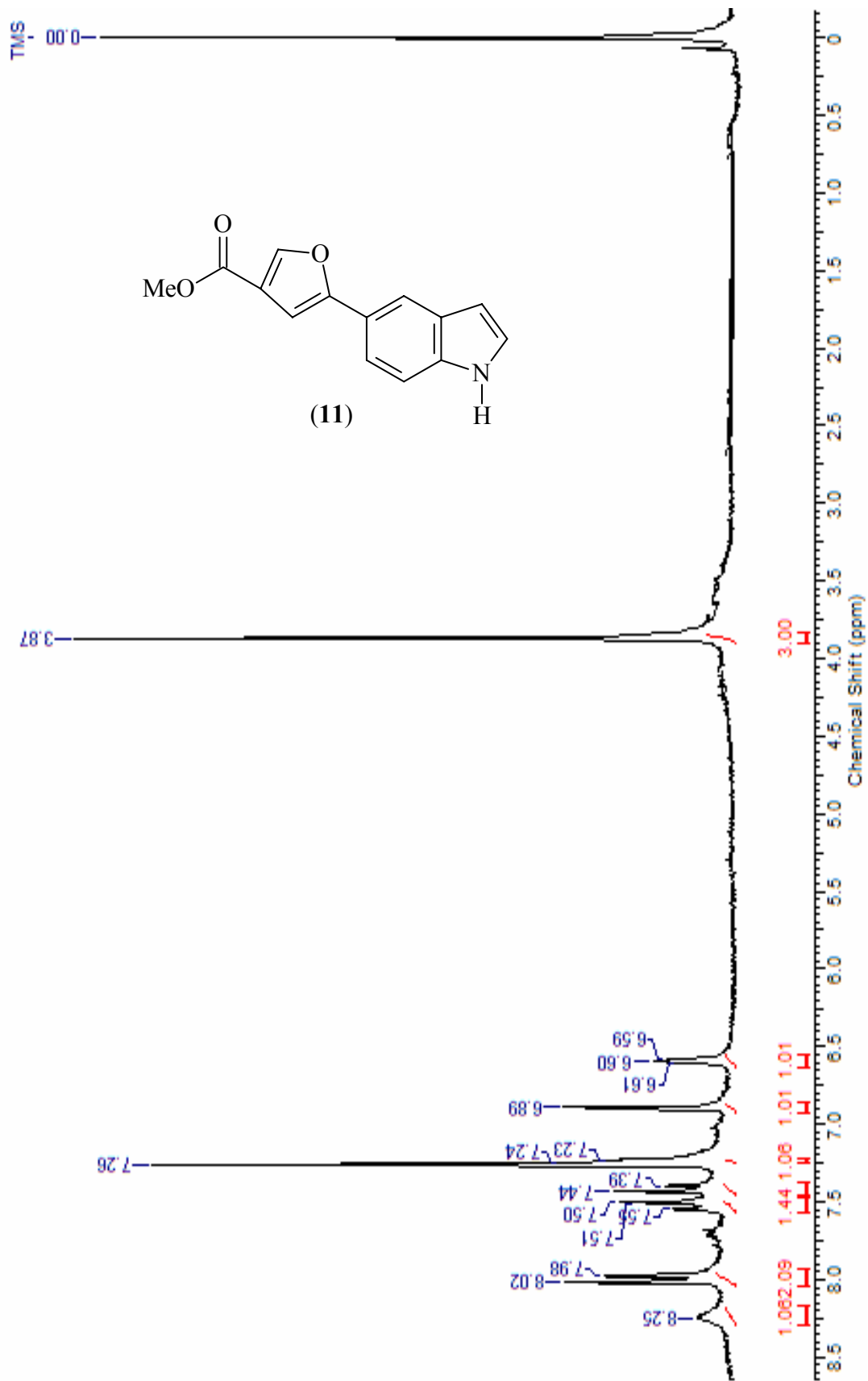


Figura 1.12. Espectro de RMN¹H (200 MHz, CDCl₃) da substância **11**.

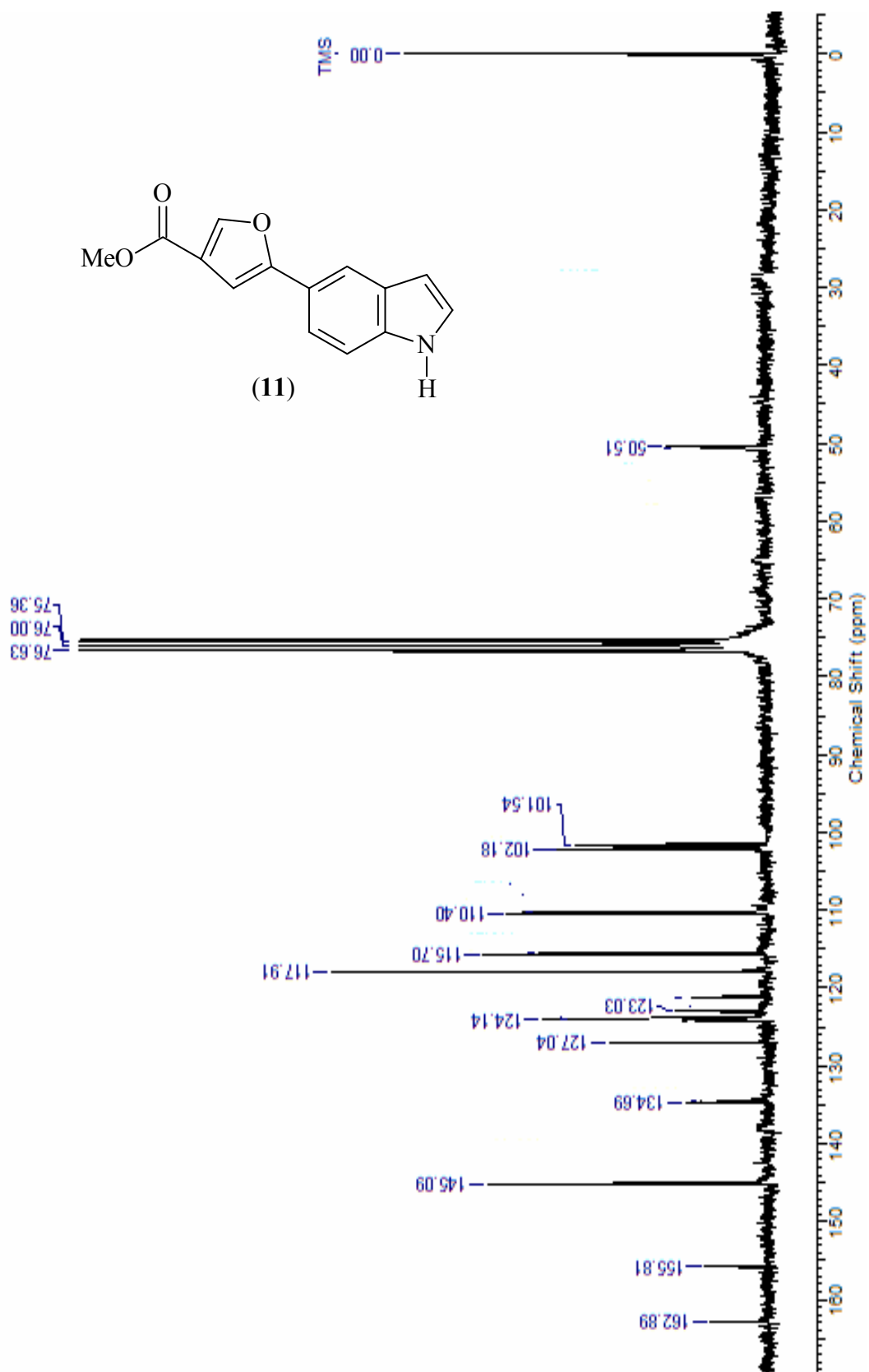


Figura 1.13. Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) da substância **11**.

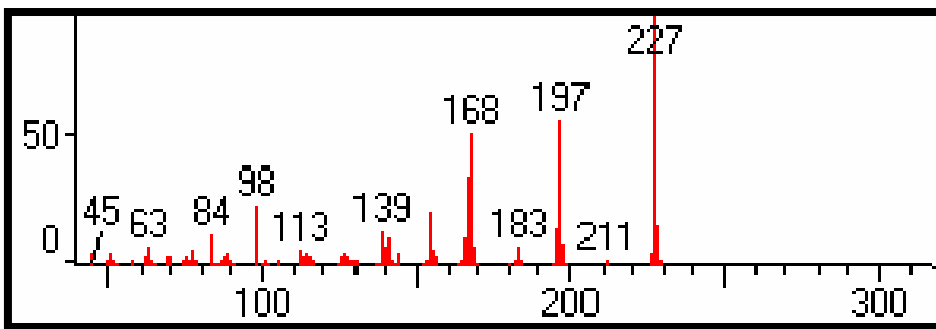
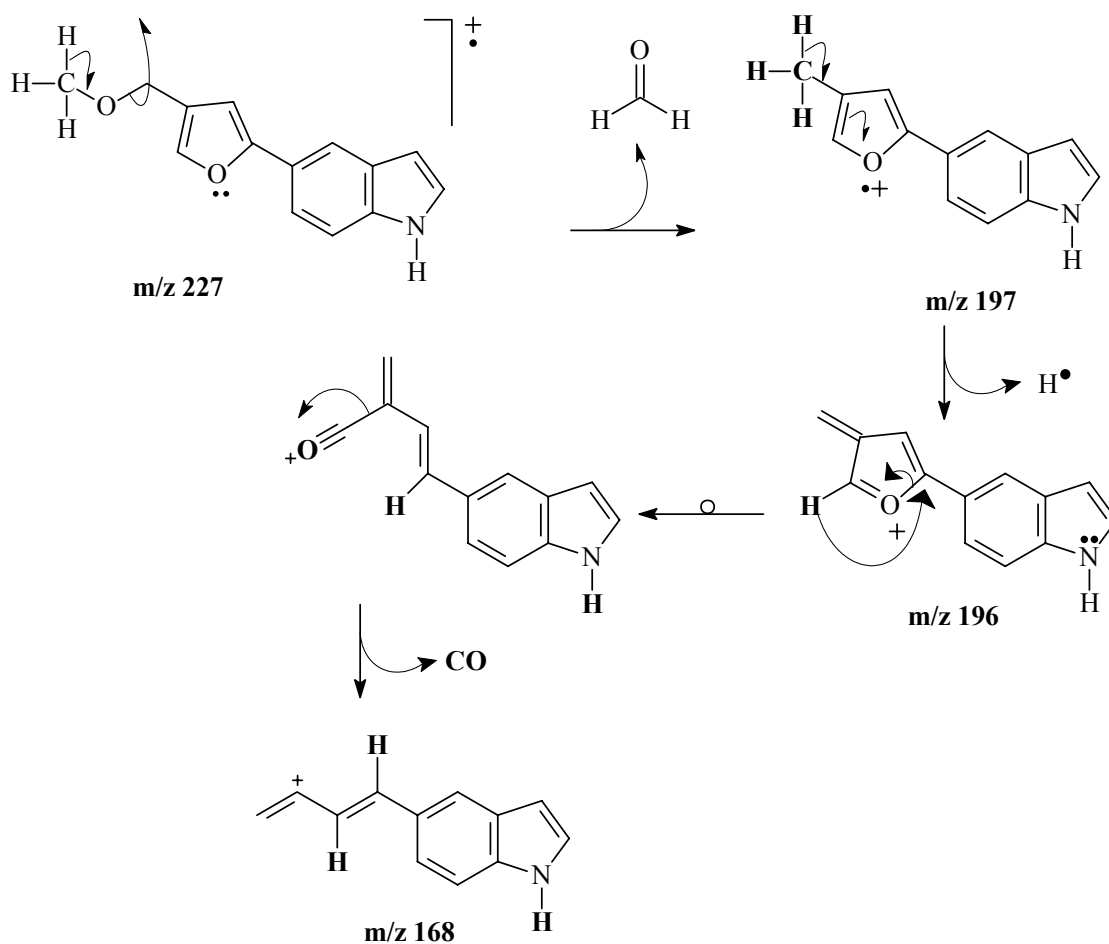
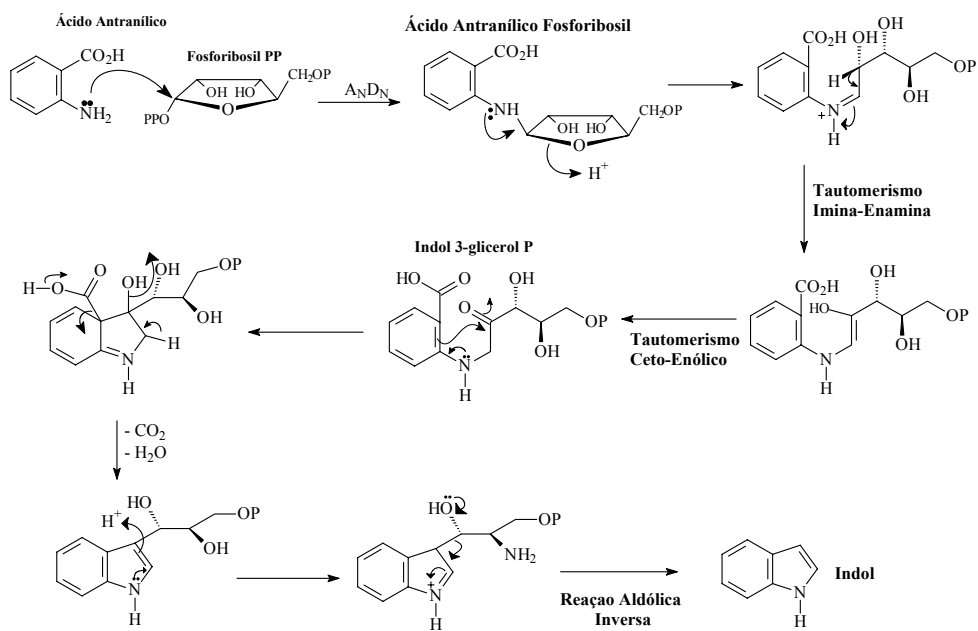


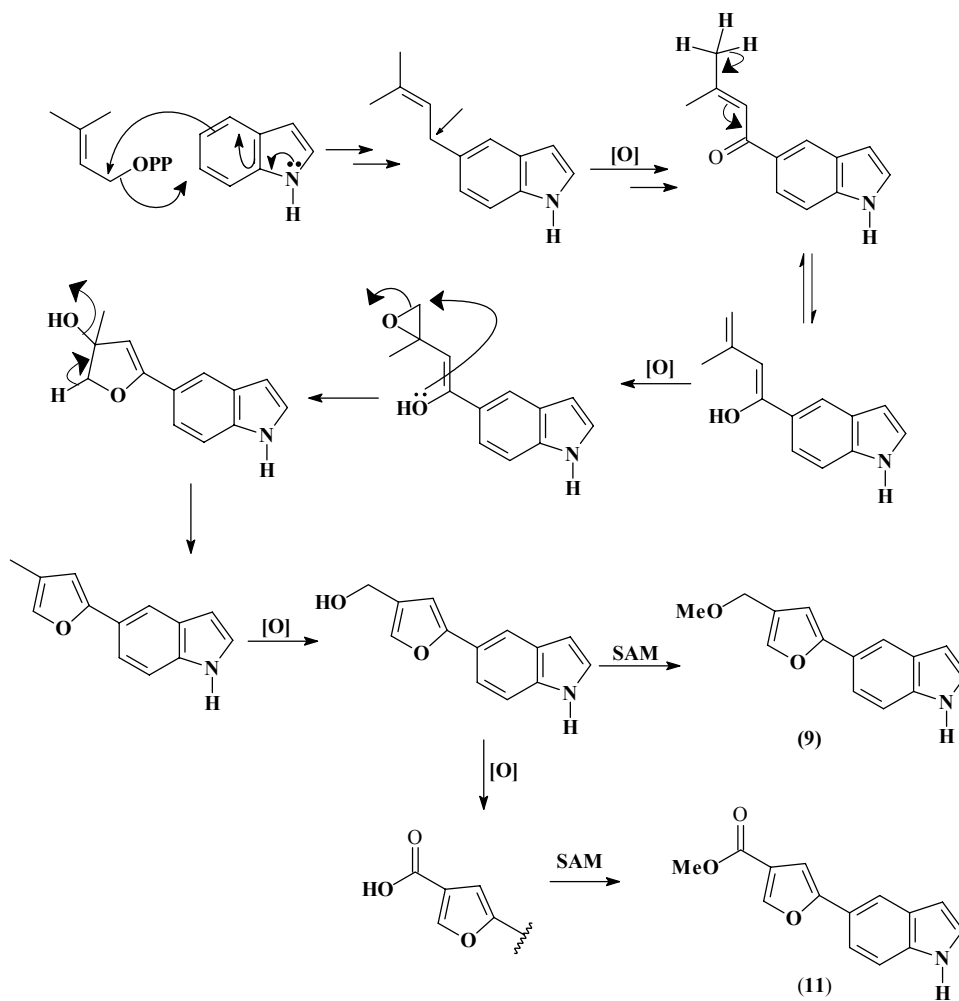
Figura 1.14. Espectro de Massas (IE, 70 eV) da substância 9.



Esquema 1.1. Proposta de fragmentação de massas via IE (70 eV) para a substância 9.



Esquema 1.2. Biosíntese de formação do anel indólico (Dewick, 1997).



Esquema 1.3. Proposta biogenética para a formação dos alcalóides (9) e (11).

4.2.1.5. Determinação estrutural da substância 8.

A substância **8** foi isolada a partir do extrato em diclorometano

do caule de *Raputia praetermissa* (Rutaceae). O

seu espectro de RMN ^1H (Figura 1.15, Tabela

1.5) apresentou sinais na região dos hidrogênios

aromáticos entre δ 7,60 e 7,16. Observou-se

também um sigleto largo (*sl*) em δ 8,29, sinal

típico de hidrogênio ligado a nitrogênio,

sugerindo a presença de um sistema indólico, o que foi confirmado através

do espectro de RMN ^{13}C (Figura 1.16), onde se observou a presença de

sinais em δ 124,6; δ 102,0; δ 127,5 e δ 135,5; que sugerem a presença de

um anel indol na molécula.

O sinal em δ 6,50 que via HSQC (Figura 1.18) aparece ligado

ao sinal de carbono δ 102,0 apresentou no espectro de COSY (Figura 1.17)

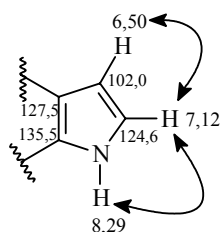
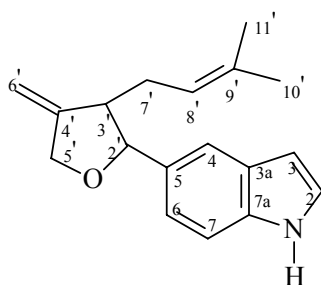
acoplamento com o sinal em δ 7,12 (*t*, $J = 2,8$ Hz). No mapa de contorno de

HSQC o sinal em δ 7,12 encontra-se ligado ao sinal de carbono em δ 124,6.

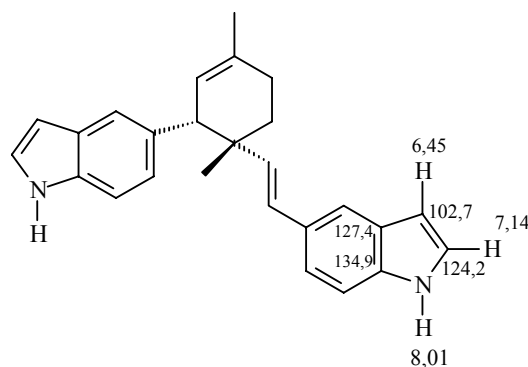
Makangara *et al.* (2004) isolaram a partir de *Isolona cauliflora*

(Annonaceae) uma substância com o sistema indólico similar ao do

alcalóide em questão. Com base nesta informação tem-se até o momento:



Raputia praetermissa (Rutaceae)

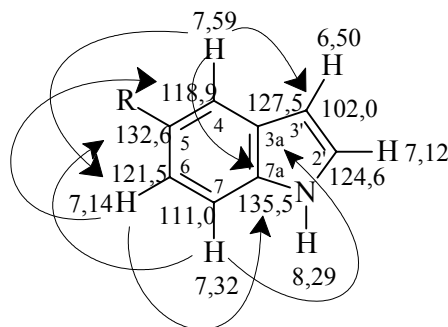


Isolona cauliflora (Annonaceae)
Makangara *et al.* (2004)

O duplo duplete (*dd*) em δ 7,14 apresentou constantes de acoplamento calculadas de 8,4 e 1,2 Hz que sugerem uma substituição aromática *orto* e *meta*, respectivamente. Este sinal pode ser atribuído a H-6 e no experimento de HMBC (Figura 1.19) observou-se a correlação deste sinal com os sinais de carbono em δ 86,8; δ 118,9 (C-4) e δ 135,5 (C-7a). O sinal em δ 7,32 (*d*, $J = 8,4$ Hz) foi atribuído a H-7 e encontra-se ligado ao carbono em δ 111,0 e pelo HMBC correlacionou-se com os sinais de carbonos em δ 127,5 (C-3a) e δ 132,6 (C-5). Observou-se ainda um singlete largo em δ 7,59 referente ao hidrogênio ligado a C-4 (δ 118,9, via HSQC). No experimento de HMBC (Figura 1.19), foi observada a correlação deste sinal com os sinais em δ 86,8; δ 102,0 (C-3'); δ 121,5 (C-6) e δ 135,5 (C-7a).

HMBC

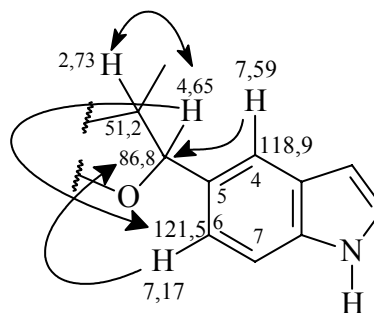
- δ 7,14 (*dd*, δ 121,5), H-6:
 - δ 118,9 (C-4);
 - δ 135,5 (C-7a).
- δ 7,32 (*d*, δ 111,0), H-7:
 - δ 127,5 (C-3a);
 - δ 132,6 (C-5).
- δ 7,59 (*d*, δ 118,9), H-4:
 - δ 121,5 (C-6);
 - δ 135,5 (C-7a);
 - δ 102,0 (C-3').



O sinal do carbono oxigenado em δ 86,8 (via HSQC correlacionou com o sinal em δ 4,65) no mapa de contorno de HMBC (Figura 1.19) apresentou correlação com os sinais dos hidrogênios H-4 (δ 7,59) e H-6 (δ 7,14). No espectro de COSY (Figura 1.17) δ 4,65 acoplou com o sinal em δ 2,73 (*m*, δ 51,2). Este último via HMBC correlacionou com δ 121,5 (C-6), δ 118,9 (C-4) e δ 28,6.

HMBC

- δ 7,14 (*dd*, δ 121,5), H-6:
 - δ 86,8.
- δ 7,59 (*sl*, δ 118,9), H-4:
 - δ 86,8
- δ 4,65 (*m*, δ 86,8):
 - δ 28,6;
 - δ 118,9 (C-4);
 - δ 121,5 (C-6).

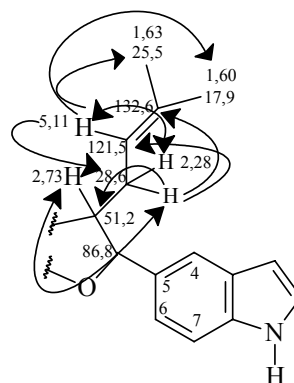


O multipletto em δ 2,73 (δ 51,2) via COSY (Figura 1.17) apresentou acoplamento com o sinal em δ 2,28 (δ 28,6), por sua vez acopla com o sinal em δ 5,11 (δ 121,5, *tl*, 7,2 e 1,2 Hz). No mapa de contorno de HMBC (Figura 1.19) o sinal em δ 2,28 apresentou correlação com δ 51,2; δ 121,5; δ 86,8 e δ 132,6. O hidrogênio em δ 5,11 mostrou correlação com δ 17,9; δ 25,5 e δ 28,6. Observou-se o acoplamento do sinal em δ 5,11 com o singletto em δ 1,63 (típico de metila sobre ligação dupla) que via HSQC encontra-se ligado ao sinal em δ 25,5. A outra metila em δ 1,60 correlaciona com o sinal em δ 17,9 (via HSQC). Estas informações sugerem que a molécula apresenta características típicas da existência de uma prenila em sua estrutura. A metila em δ 1,63 mostrou correlação no

HMBC com os sinais em δ 17,9; δ 121,5 e δ 132,6 e a metila em δ 1,60 correlacionou com os sinais em δ 25,5; δ 121,5 e δ 132,6.

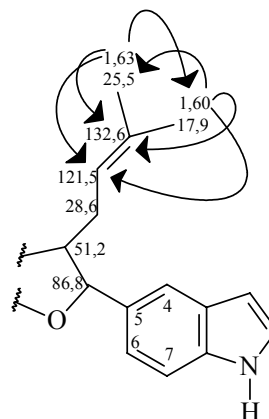
HMBC

- δ 2,28 (*m*, δ 28,6):
- δ 51,2 (C-3');
- δ 121,5 (C-6);
- δ 132,6 (C-5);
- δ 86,8 (C-2').
- δ 5,11 (*tl*, δ 121,5):
- δ 17,9 (C-10');
- δ 25,5 (C-11');
- δ 28,6 (C-7').



HMBC

- δ 1,63 (*s*, δ 25,5):
- δ 132,6 (C-5);
- δ 121,5 (C-6);
- δ 17,9 (C-10').
- δ 1,60 (*s*, δ 17,9):
- δ 132,6 (C-5);
- δ 121,5 (C6);
- δ 25,5 (C-11').

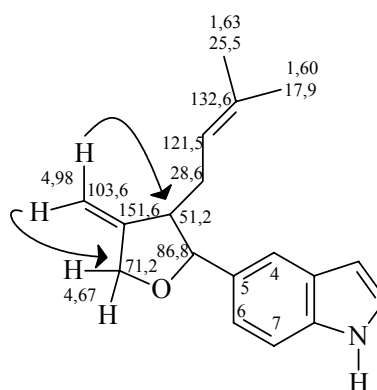


Observou-se ainda um sinal na região dos hidrogênios olefínicos em δ 4,98 (*m*) integrando para dois hidrogênios acoplando através do experimento de COSY (Figura 1.17), com os sinais dos hidrogênios em δ 4,67 e δ 2,73. No espectro de RMN ^{13}C (Figura 1.16) observou-se a presença de dois sinais na região de carbonos oxigenados em δ 86,8 e δ 71,2, o que sugere a existência de outra unidade isoprênica

oxigenada, já que estes carbonos encontram-se ligados com os sinais dos hidrogênios em δ 4,65 e δ 4,67, respectivamente. No experimento de HMBC o sinal em δ 4,98 (δ 103,6) apresentou correlação com δ 51,2 e δ 71,2.

HMBC

- δ 4,98 (*m*, δ 103,6):
- δ 71,2;
- δ 51,2.



A partir do estudo fitoquímico das raízes de *Raputia praetermissa*, Rosas (2005) isolou e identificou esta substância. A completa atribuição dos sinais deste alcalóide foi realizada por comparação de seus dados registrados na literatura (Rosas, 2005 & Makangara *et al.*, 2004). A este alcalóide foi atribuído o nome 5-[(3'-demetilalil-4'-metilideno)-2'-tetrahydrofur-2'-il]-indol

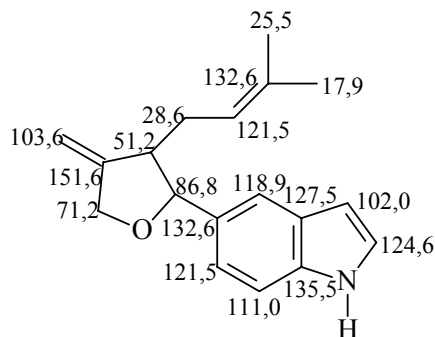
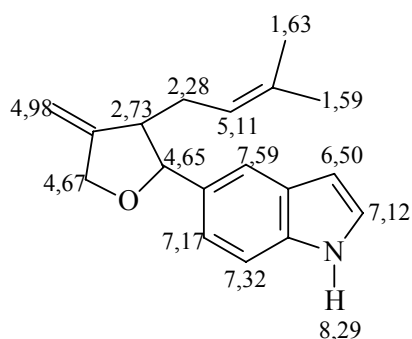


Tabela 1.5. Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância **8** em comparação com dados da literatura (Rosas, 2005).

H/C	(8)		Literatura	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
1	8,29 <i>sl</i>	-	8,15 <i>sl</i>	-
2	7,12 <i>t</i> ($J= 2,8$)	124,6	7,19 <i>d</i> ($J= 3,3$)	124,4
3	6,50 <i>m</i>	102,0	6,53 <i>m</i>	102,8
3a	-	127,5	-	127,7
4	7,59 <i>sl</i>	118,9	7,60 <i>d</i> ($J= 0,8$)	119,1
5	-	132,6	-	132,7
6	7,17 <i>dd</i> ($J= 1,2$ e $8,4$)	121,5	7,20 <i>dd</i> ($J= 2,0$ e $8,5$)	121,0
7	7,32 <i>d</i> ($J= 8,4$)	111,0	7,32 <i>d</i> ($J= 8,4$)	111,0
7a	-	135,5	-	135,5
2'	4,65 <i>m</i>	86,8	4,64 <i>m</i>	86,6
3'	2,73 <i>m</i>	51,2	2,73 <i>m</i>	51,6
4'	-	156,1	-	152,1
5'	4,67 <i>m</i>	71,2	4,67 <i>m</i>	71,5
6'	4,98 <i>m</i>	103,6	4,99 <i>m</i>	103,6
7'	2,28 <i>m</i>	28,6	2,28 <i>m</i>	29,0
8'	5,11 <i>tl</i> ($J= 8,4$ e $1,2$)	121,5	5,11 <i>m</i>	121,7
9'	-	132,6	-	132,7
10'	1,59 <i>s</i>	17,9	1,60 <i>s</i>	18,1
11'	1,63 <i>s</i>	25,5	1,59 <i>s</i>	25,7

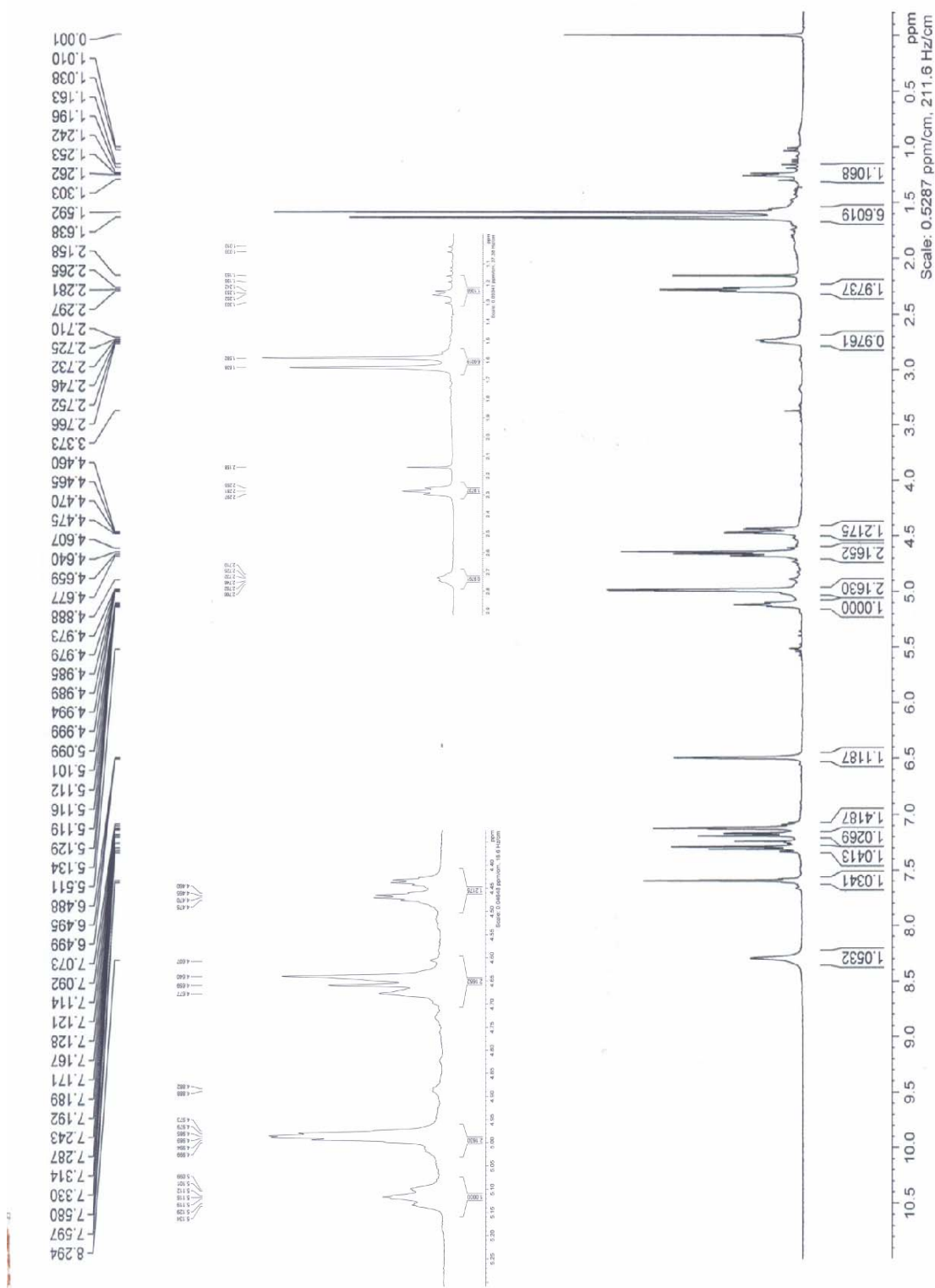


Figura 1.15. Espectro de RMN¹H (400 MHz, CDCl₃) da substância **8**.

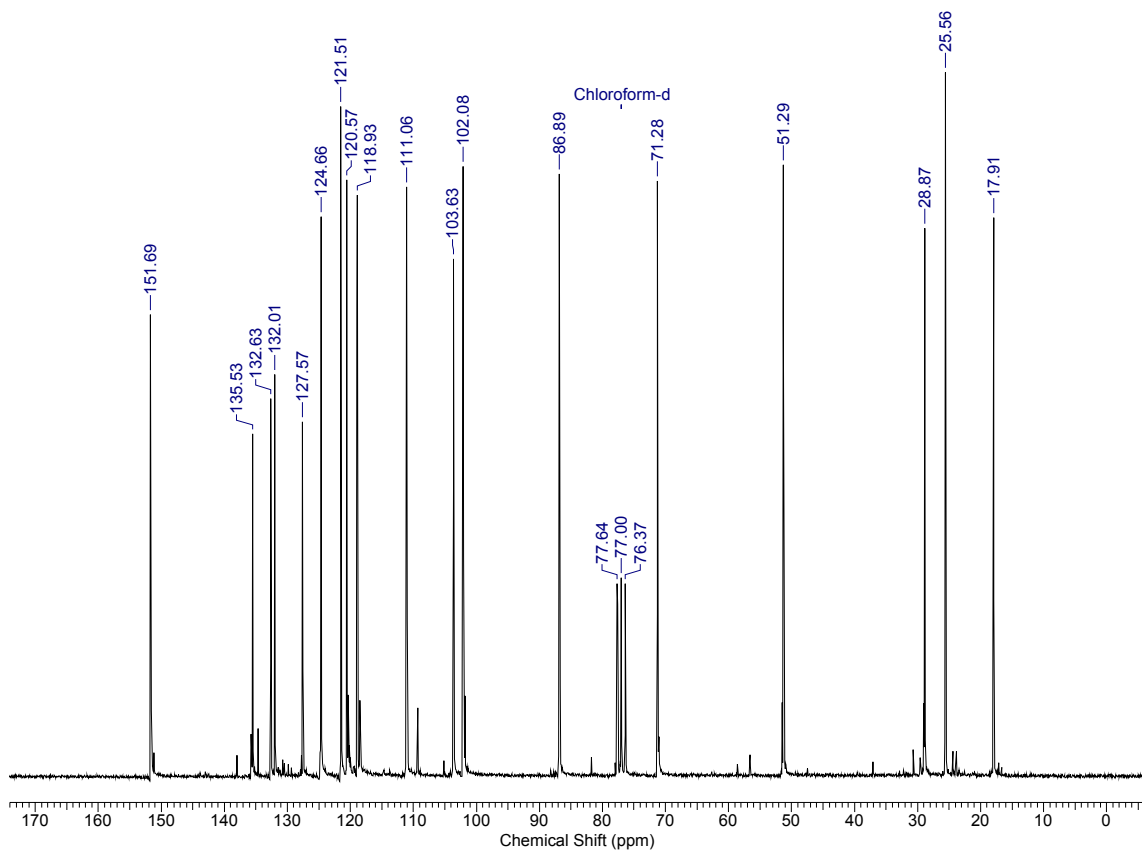
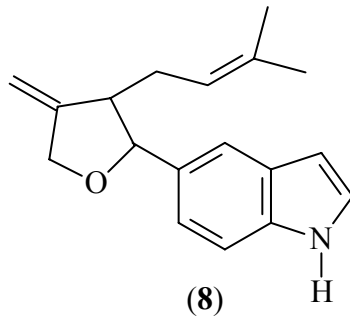


Figura 1.16. Espectro de RMN¹³C (50 MHz, CDCl₃) da substância **8**.

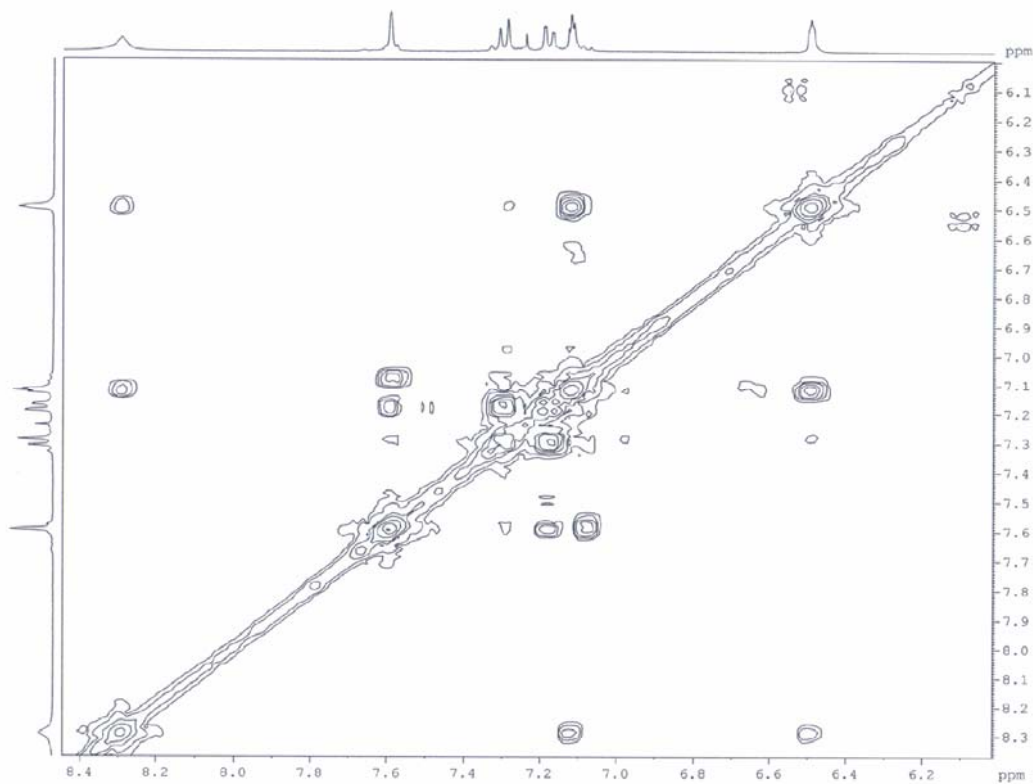
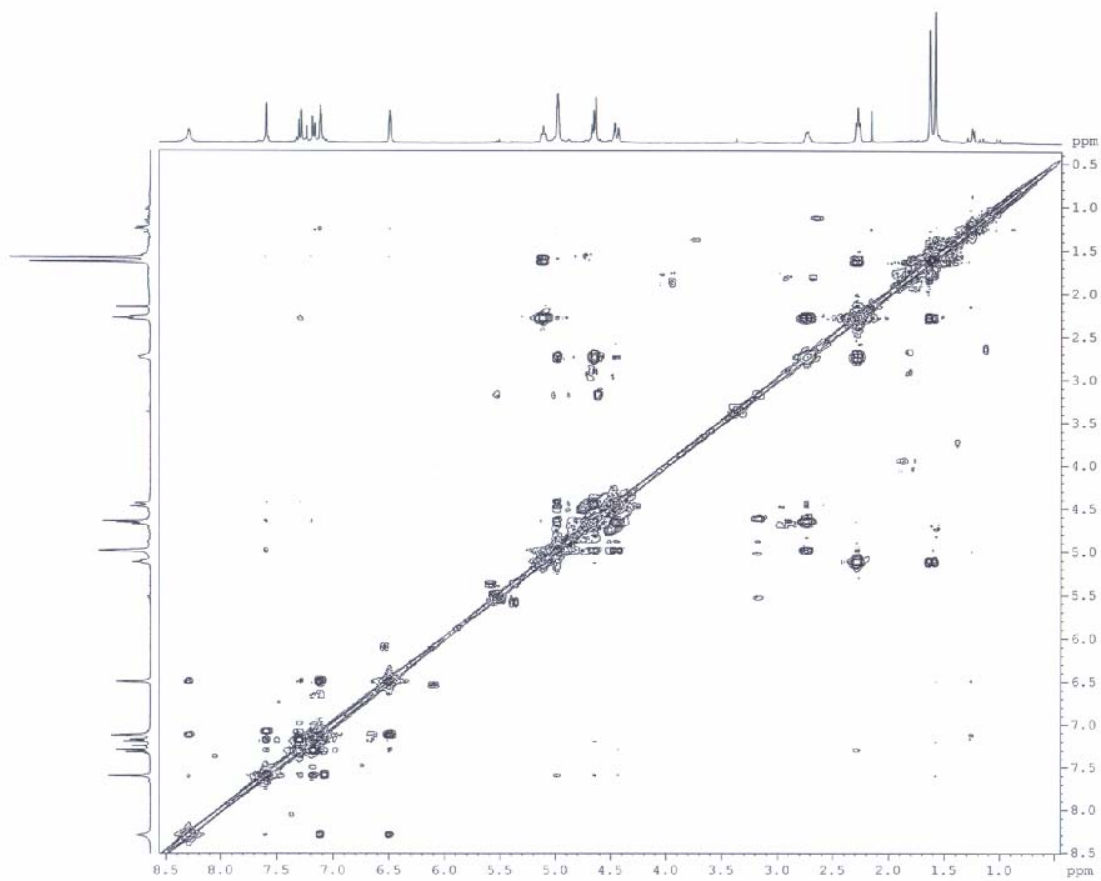


Figura 1.17. Espectros de COSY (CDCl₃, 400 MHz) da substância **8**.

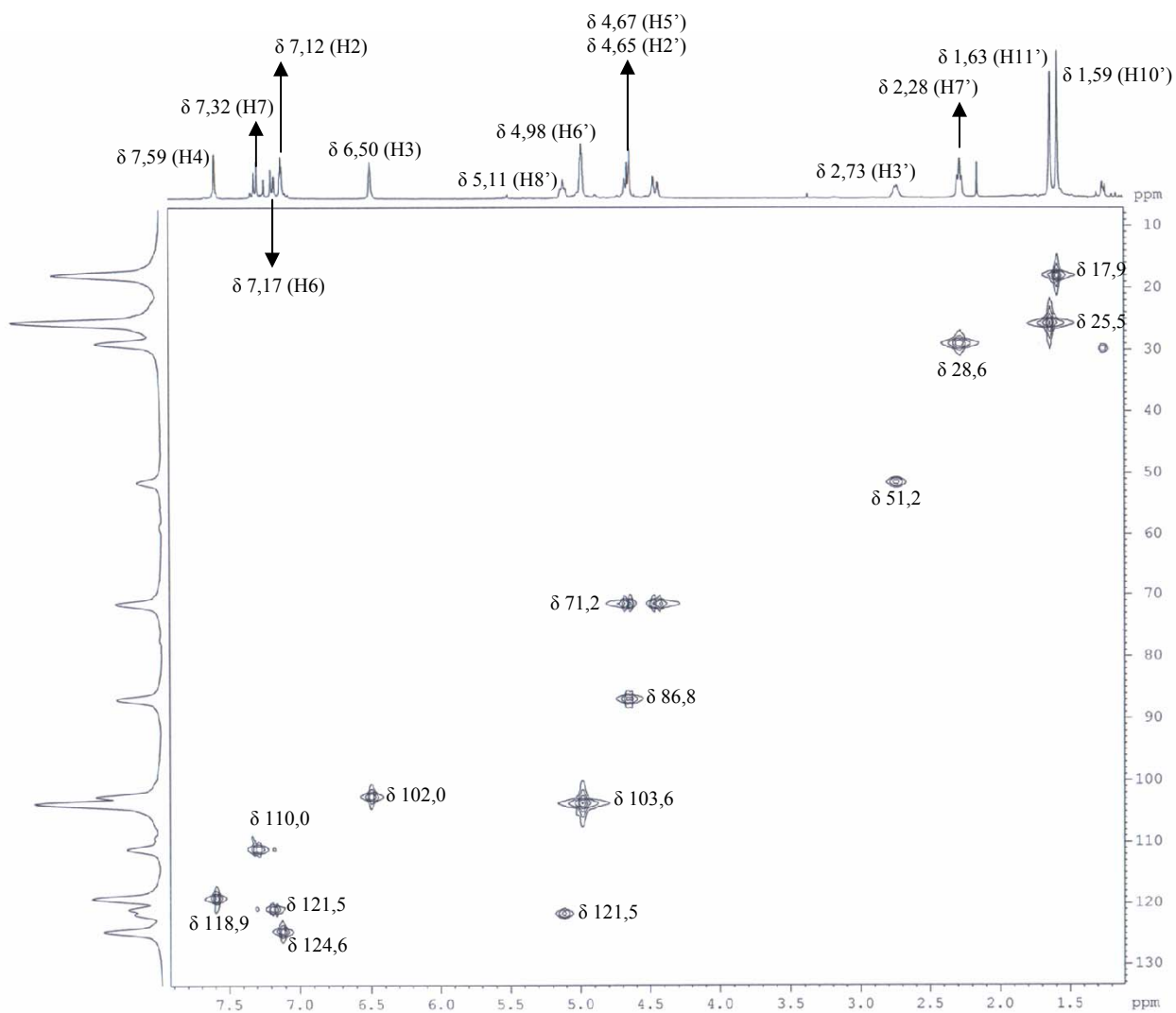


Figura 1.18. Mapa de contorno de HSQC (CDCl₃, 400 MHz) da substância **8**.

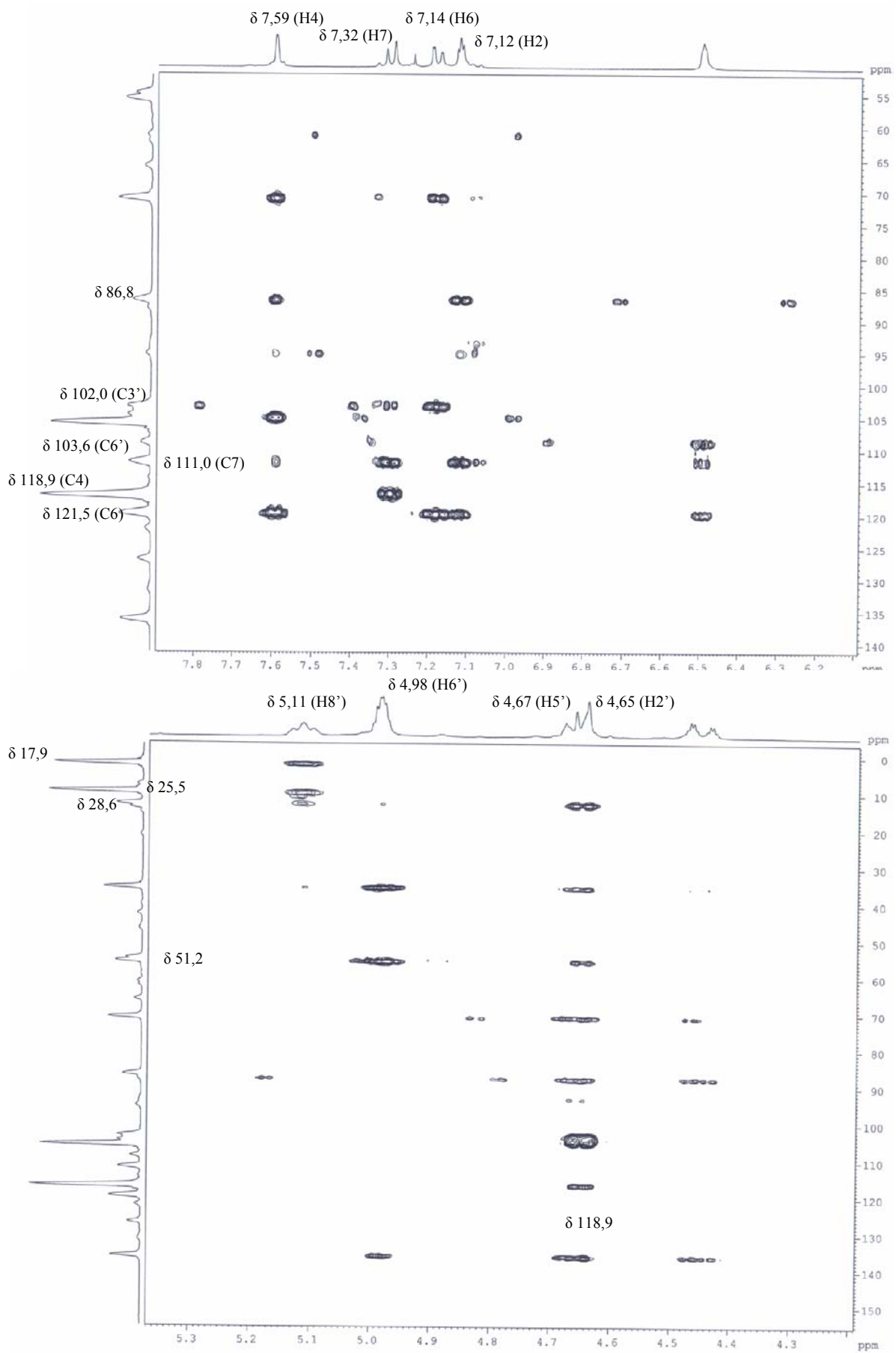
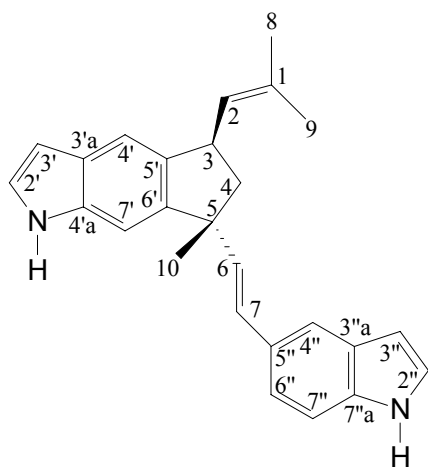


Figura 1.19. Mapa de contorno de HMBC (CDCl₃, 400 MHz) da substância **8**.

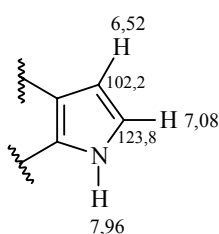
4.2.1.6. Determinação estrutural da substância 7.

A substância 7 foi isolada a partir do extrato em diclorometano do caule de *R. praetermissa*. A análise inicial de seu espectro de RMN¹H a

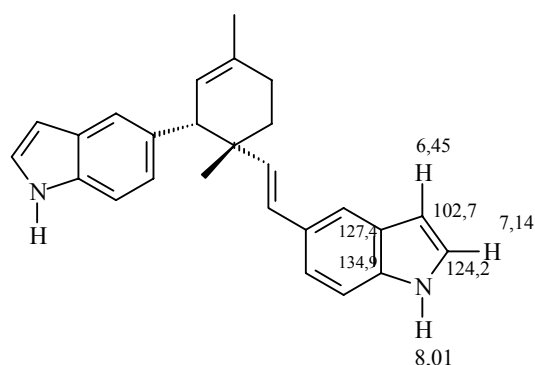
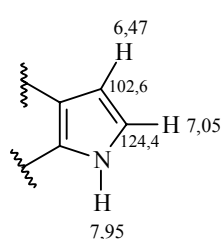


200 MHz (Figura 1.20) indicou que esta substância também tratava-se de um alcalóide indólico, pois foi observado um singlete largo em δ 8,04 (N-H). No entanto, quando esta substância foi analisada no equipamento ARX 400 (RMN 400 MHz), observou-se no espectro de RMN¹H (Figura 1.21, Tabela

1.6) o aparecimento de dois singletos largos em δ 7,96 e δ 7,95, sugerindo então a presença de dois sistemas indólicos na molécula. Esta suspeita é reforçada pela presença de sinais no espectro de RMN¹H (Figura 1.21) que caracterizam os demais hidrogênios do anel indol em δ 7,14 (*t*), δ 7,10 (*t*), δ 6,52 (*m*) e δ 6,47 (*m*) e ainda pelos sinais característicos de anel indólico no espectro de RMN¹³C (Figura 1.22) em δ 123,8; δ 124,4; δ 102,2 e δ 102,6, de acordo com o modelo proposto por Makangara *et al.* (2004).



Raputia praetermissa (Rutaceae)



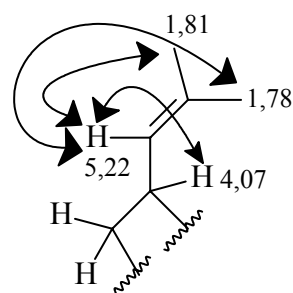
Isolona cauliflora (Annonaceae)
Makangara *et al.* (2004)

Observou-se também a presença de sinais referentes a três metilas em δ 1,81, δ 1,78 e δ 1,58; sinais na região de hidrogênios aromáticos entre δ 7,48 e δ 6,36, bem como a presença de sinais de hidrogênios olefínicos entre δ 6,15 e δ 4,04. No espectro de RMN ^1H (Figura 1.21) verificou-se um sinal em δ 5,22 que apresentou acoplamento através do espectro de COSY (Figura 1.23) com duas metilas (provavelmente vinílicas) em δ 1,81 e δ 1,78 e acopla ainda com o multiplete em δ 4,07 que está ligado ao carbono em δ 40,7. Este sinal em δ 4,07 correlaciona-se via HMBC (Figura 1.22) com os sinais em δ 49,7; δ 128,6 e δ 139,4 (sp^2 totalmente substituído). O duplo duplete em δ 2,42 também apresentou correlação com o carbono em δ 139,4 e ainda com outro carbono olefínico em δ 144,3. Outro sinal em δ 1,81 (δ 49,7) apresentou correlação com o sinal de carbono em δ 48,5 (quaternário) via HMBC.

A análise do mapa de contornos de HMBC (Figura 1.25), revelou a correlação entre o sinal da metila em δ 1,58 (δ 27,1) com os sinais em δ 144,3 (sp^2 totalmente substituído); δ 48,3; δ 49,7 e δ 136,1 (olefínico). Este carbono em δ 136,1 encontra-se ligado ao hidrogênio em δ 6,38 (d , $J = 16,0$), que através do COSY (Figura 1.23) acopla com um duplete em δ 6,12 ($J = 16,0$; δ 126,8), esta constante de acoplamento sugere a presença de uma ligação dupla *trans*. O sinal em δ 6,38 no experimento de HMBC apresentou correlação com os carbonos em δ 48,3; δ 129,8; δ 144,3 e δ 27,1 (CH_3) e o sinal do hidrogênio em δ 6,12 correlacionou com os carbonos em δ 48,3 e δ 118,6.

COSY

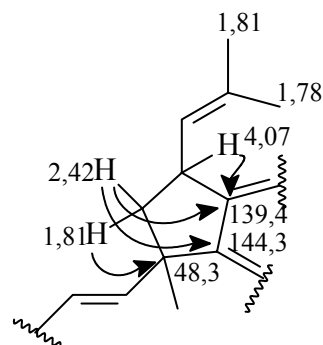
- δ 5,22 (δ 128,6) \leftrightarrow δ 4,07 (δ 40,7);
- δ 5,22 (δ 128,6) \leftrightarrow δ 1,81 (δ 25,8);



- δ 5,22 (δ 128,6) \leftrightarrow δ 1,78 (δ 18,3).

HMBC

- δ 2,42 (*dd*, δ 49,7)
- δ 139,4 (C-5')
- δ 144,3 (C-6')
- δ 1,81 (*s*, δ 49,7)
- δ 48,3 (C-5)
- δ 4,07 (*m*, δ 40,7)
- δ 139,4 (C-5')

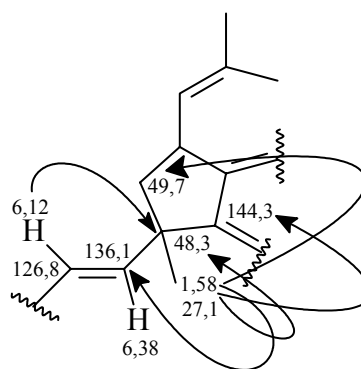
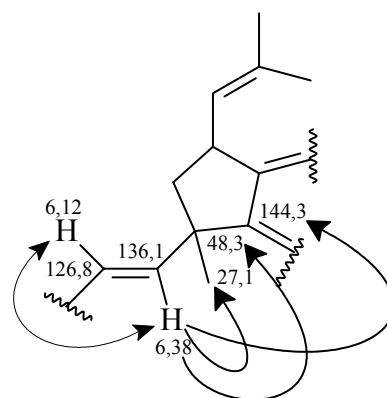


COSY

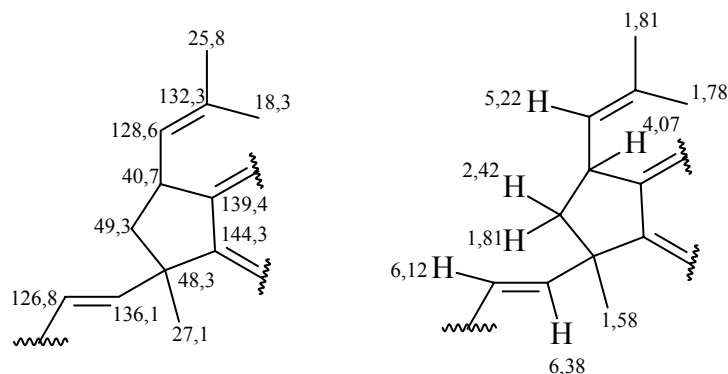
- δ 6,38 (δ 136,1) \leftrightarrow δ 6,12 (δ 126,8)

HMBC

- δ 6,38 (*d*, δ 136,1)
- δ 27,1 (Me-10);
- δ 48,3 (C-5);
- δ 144,3 (C-6').
- δ 6,12 (*d*, δ 126,8)
- δ 48,3 (C-5).
- δ 1,58 (*s*, δ 27,1)
- δ 49,7 (C-4);
- δ 48,3 (C-5);
- δ 144,3 (C-6');
- δ 136,1 (C-6).



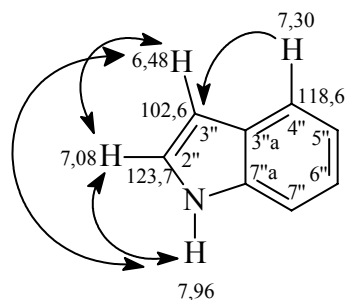
A porção alifática da molécula foi esclarecida através da análise dos espectros de RMN (1D e 2D):



O grande número de átomos de carbono (26 carbonos) e a análise da substância **7** por CG-EM, que forneceu o íon de m/z 366, e juntamente com a duplicação dos sinais que caracterizam os sistemas indólicos em δ 123,8; δ 102,2; δ 127,3; δ 115,4; δ 124,4; δ 102,6; δ 128,0 e δ 135,1, permitem sugerir a presença de dois sistemas indólicos, denominados aqui **sistema I** e **sistema II**. Para o sistema I, o espectro de COSY (Figura 1.23) mostrou acoplamento entre δ_{NH} 7,96 (*sl*) e δ 7,08 (*t*, $J = 3,2$ Hz) e ainda com δ 6,48 (*tl*, $J = 2,0$ Hz). Observou-se também que os sinais δ 7,08 e δ 6,48 acoplam entre si. O sinal em δ 7,08 (δ 123,7) foi atribuído a H-2'', e não apresentou correlações no mapa de contorno de HMBC (Figura 1.25). O sinal em δ 6,48 que se encontra ligado ao carbono em δ 102,2 foi atribuído a H-3'' e também não mostrou correlação no HMBC. Pode-se mencionar ainda um sinal em δ 7,30 (*sl*, δ 118,6) que via HMBC correlacionou com o sinal de carbono em δ 102,6, o que permite sugerir que este se trata de H-4'' (aromático).

COSY

- δ 6,48 (δ 102,6) \leftrightarrow δ 7,08 (δ 123,7);
- δ 7,08 (δ 123,7) \leftrightarrow δ 7,96.



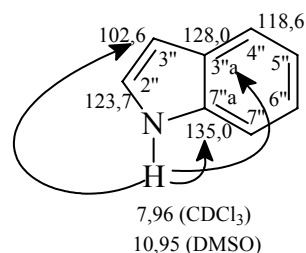
HMBC

- δ 7,30 (*sl*, δ 118,6)
- δ 102,6

Foram realizados experimentos em 2D em DMSO com o intuito de obter-se os sinais de N-H e suas correlações no HMBC. Observaram-se sinais distintos em δ 10,95 e δ 10,87, sendo o primeiro atribuído à ligação N – H do sistema I, correspondente ao sinal em δ 7,96 do experimento realizado em CDCl_3 . O sinal em δ 10,95 no experimento de HMBC apresentou correlação com os sinais em δ 135,0 (C-7''a); δ 128,0 (C-3''a) e δ 102,6 (C-3''). A partir destes experimentos pode-se confirmar as atribuições para os hidrogênios 2'' e 3'', bem como para C3''a e C7''a.

HMBC

- δ 7,96 (δ 10,95)
- δ 102,6 (C-3'')
- δ 135,0 (C-7''a)
- δ 128,0 (C-3''a)

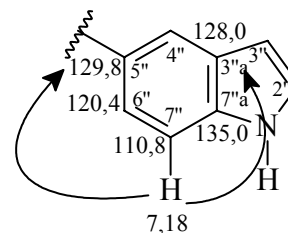
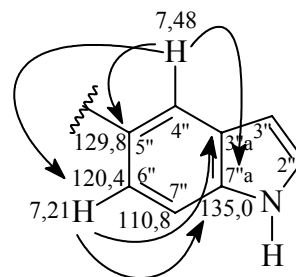


O sinal em δ 7,48 (atribuído a H-4'') apresentou no HMBC correlação com δ 120,4 (CH); δ 126,9 (CH); δ 129,8 (sp^2 totalmente substituído) e δ 135,0 (sp^2 totalmente substituído). No espectro de COSY (Figura 1.23) este sinal acoplou com δ 7,21 (*sl*). No HMBC (Figura 1.25) o sinal em δ 7,21 (δ 120,4) apresentou correlações com δ 128,0 e δ 135,0. Já o sinal em δ 7,18 (δ 110,8) mostrou correlação com δ 128,0 e δ 129,8. O

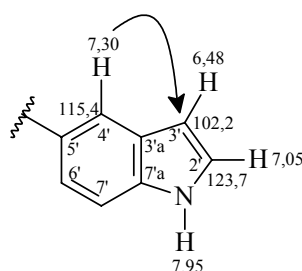
sinal em δ 118,6 foi atribuído a C-4'', discutido anteriormente. Isto sugere que o sinal em δ 7,21 corresponde a H-6''. O sinal em δ 128,0 foi atribuído a C-3''a, portanto a correlação do sinal em δ 7,18 com δ 128,0 permitiu atribuí-lo a H-7''.

HMBC

- δ 7,48 (δ 118,6) – H-4''
- δ 120,4 (C-6'')
- δ 129,8 (C-5'')
- δ 135,0 (C-7''a)
- δ 7,21 (δ 120,4) – H-6''
- δ 128,0 (C-3''a)
- δ 135,0 (C-7''a)
- δ 7,18 (δ 110,6) – H-7''
- δ 129,8 (C-5'')
- δ 128,0 (C-3''a)



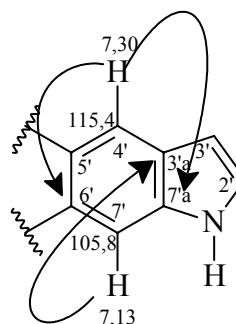
No espectro de RMN ^1H (Figura 1.21) para o sistema II observou-se sinais em δ 7,95 (*sl*), δ 7,05 (*t*, $J = 2,4$ Hz) e δ 6,48 (*tl*, $J = 2,4$ Hz), que foram atribuídos a N-H, H-2' e H-3', respectivamente. No experimento de HSQC (Figura 1.24) observou-se que H-2' e H-3' encontram-se ligados aos carbonos em δ 123,7 e δ 102,2, respectivamente. Nenhum destes sinais apresentou correlação no HMBC. Observou-se ainda um sinal em δ 7,30 (*sl*) que correlacionou com o sinal em δ 102,2 através do HMBC, sugerindo que este se trata de H-4'.



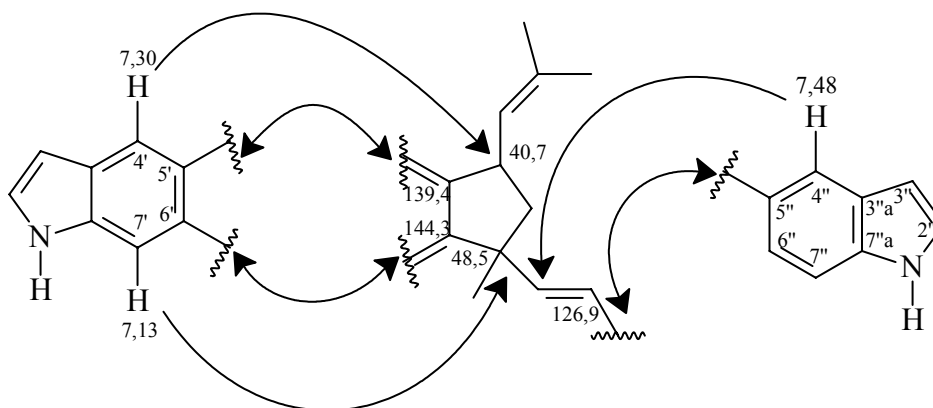
No HMBC (Figura 1.25), um sinal em δ 7,13 (s) mostrou correlação com δ 127,3, permitindo atribuí-lo a H-7', que via HSQC (Figura 1.24) encontra-se ligado ao δ 105,8. Os sinais de H-4' e H-7' são singletos, indicando a existência de substituintes em C-5' e C-6'. O sinal em δ 7,30 ainda correlacionou com os sinais em δ 135,6 (sp^2 totalmente substituído), δ 144,3 (sp^2 totalmente substituído) e δ 40,7 (CH).

HMBC

- δ 7,30 (δ 115,4) – H-4'
- δ 144,3 (C-6')
- δ 135,6 (C-7'a)
- δ 40,7 (C-3)
- δ 7,13 (δ 105,8) – H-7'
- δ 127,3 (C-3'a)



O sinal de H-7' (δ 7,13) no HMBC (Figura 1.25) apresentou também correlação com δ 139,4 (sp^2 totalmente substituído) e δ 48,5. Com base em todas estas informações, obteve-se duas unidades indólicas e uma alifática.



HMBC

- δ 7,30 (H-4')
- δ 40,7 (C-3)
- δ 102,2 (C-3')
- δ 144,3 (C-6')
- δ 135,6 (C-7'a)

- δ 7,13 (H-7')
- δ 48,5 (C-5)
- δ 127,3 (C-3'a)

- δ 7,48 (H-4'')
- δ 102,6 (C-3'')
- δ 120,4 (C-6'')
- δ 126,9 (C-7)
- δ 129,8 (C-5'')
- δ 135,0 (C-7''a)

O sinal de H-4'' (δ 118,6) correlaciona-se com o carbono em δ 126,9, o que permite uni-lo a C-5'' (δ 129,8). Considerando que H-7' (δ 7,13) correlaciona-se com o sinal em δ 48,5, pode-se unir o carbono em δ 144,3 a C-5, sugerindo que o sinal em δ 144,3 refere-se a C-6', o que explica a correlação de H-4' com δ 144,3. O sinal de H-4' (δ 7,30) correlaciona ainda com δ 40,7, permitindo ligar este carbono (δ 40,7) a C-5' (δ 139,4), atribuindo assim o sinal em δ 139,4 a C-5'. Rosas (2005), por meio de experimentos de NOE propôs a configuração relativa para este alcalóide. A proposta estrutural desta substância está de acordo com o modelo encontrado na literatura (Makangara *et al.*, 2004). Este alcalóide

bisindólico recebeu o nome 5',6'-[5-metil-5(7-indol-5''-il-eteno-6,7-diil)-3-(metilprop-2-en-2-il)]-ciclopentano-5',6'-diil-indol.

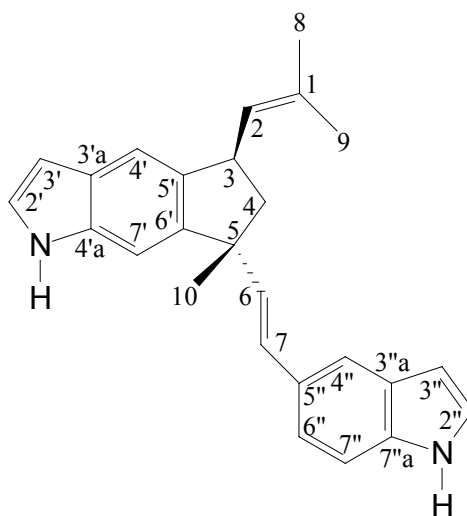
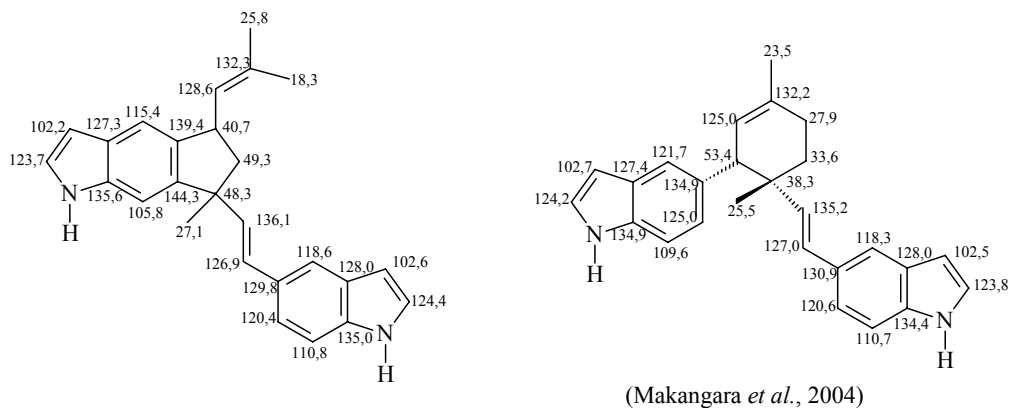


Tabela 1.6. Dados de RMN ^1H e ^{13}C para a substância **7** em comparação com dados registrados na literatura (Rosas, 2005).

H/C	(7, CDCl_3 , 400 MHz)		Literatura (CDCl_3 , 400 MHz)	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
1	-	132,3	-	132,4
2	5,22 <i>dt</i> ($J = 8,8$)	128,6	5,22 <i>dt</i> ($J = 9,0$)	128,5
3	4,07 <i>m</i>	40,7	4,08 <i>m</i>	40,7
4	1,81 <i>s</i> ; 2,42 <i>dd</i> ($J = 6,7$ e 12,0)	49,7	1,82 <i>s</i> ; 2,43 <i>dd</i> ($J = 6,8$ e 12,1)	50,0
5	-	48,3	-	48,5
6	6,38 <i>d</i> ($J = 16,0$)	136,1	6,40 <i>d</i> ($J = 15,9$)	136,0
7	6,12 <i>d</i> ($J = 16,0$)	126,9	6,13 <i>d</i> ($J = 15,9$)	126,8
8	1,81 <i>s</i>	25,8	1,82 <i>s</i>	25,9
9	1,78 <i>s</i>	18,3	1,79 <i>s</i>	18,3
10	1,58 <i>s</i>	27,1	1,59 <i>s</i>	27,1
1'	7,95 <i>sl</i>	-	8,00 <i>sl</i>	-
2'	7,08 <i>t</i> ($J = 3,2$)	123,7	7,14 <i>dd</i> ($J = 2,5$ e 3,2)	123,8
3'	6,48 <i>tl</i> ($J = 2,0$)	102,2	6,50 <i>ddd</i> ($J = 1,0$; 2,5 e 3,2)	102,3
3'a	-	127,3	-	127,3
4'a	7,30 <i>sl</i>	115,4	7,30 <i>t</i> ($J = 0,7$)	115,4
5'	-	139,4	-	139,4
6'	-	144,3	-	144,3
7'	7,13 <i>s</i>	105,8	7,18 <i>s</i>	105,8
7'a	-	135,6	-	135,5
1''	7,96 <i>sl</i>	-	8,04 <i>sl</i>	-
2''	7,05 <i>t</i> ($J = 2,8$)	124,4	7,11 <i>dd</i> ($J = 2,5$ e 3,0)	124,4
3''	6,42 <i>dd</i> ($J = 2,0$ e 3,2)	102,6	6,44 <i>ddd</i> ($J = 1,0$; 2,5 e 3,0)	102,7
3''a	-	128,0	-	128,0
4''	7,48 <i>s</i>	118,6	7,50 <i>d</i> ($J = 0,7$)	118,7
5''	-	129,8	-	129,8
6''	7,21 <i>sl</i>	120,4	7,23 <i>dd</i> ($J = 8,4$)	120,4
7''	7,18 <i>sl</i>	110,6	7,22 <i>dd</i> ($J = 8,4$)	110,9
7''a	-	135,0	-	135,1

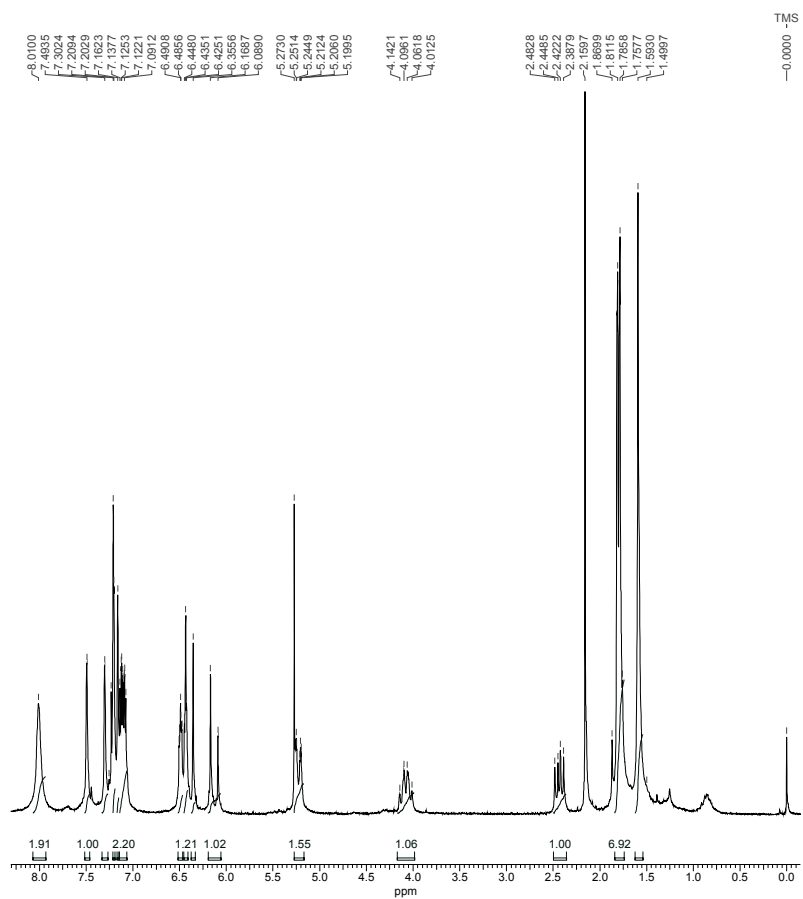


Figura 1.20. Espectro de RMN¹H (CDCl₃, 200 MHz) da substância 7.

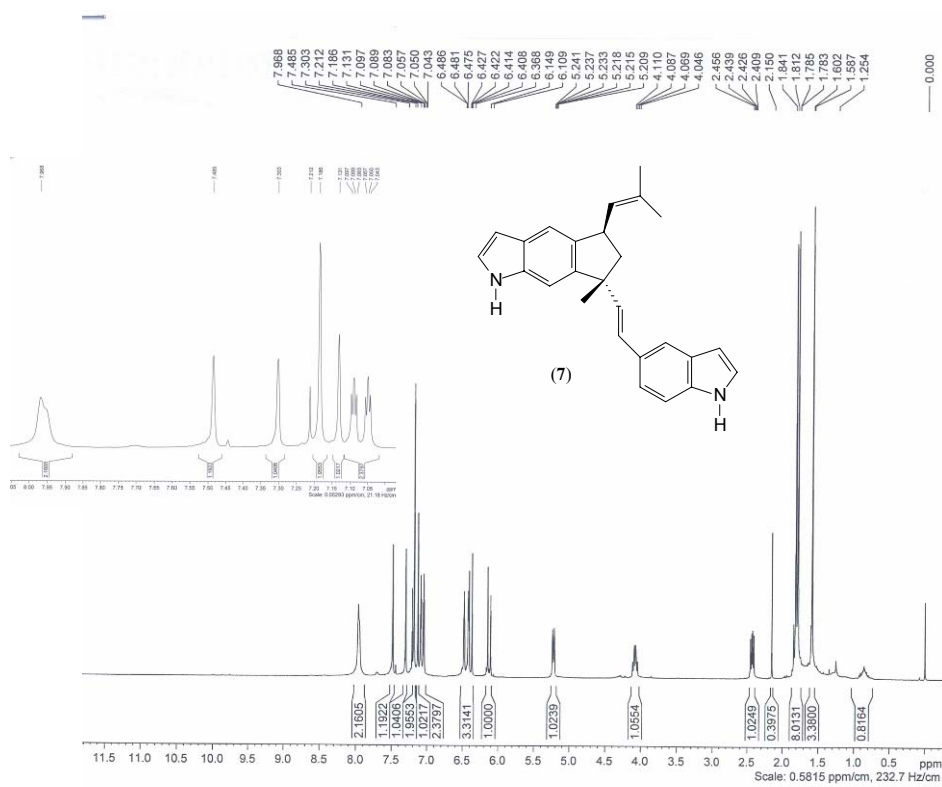


Figura 1.21. Espectro de RMN¹H (CDCl₃, 400 MHz) da substância 7.

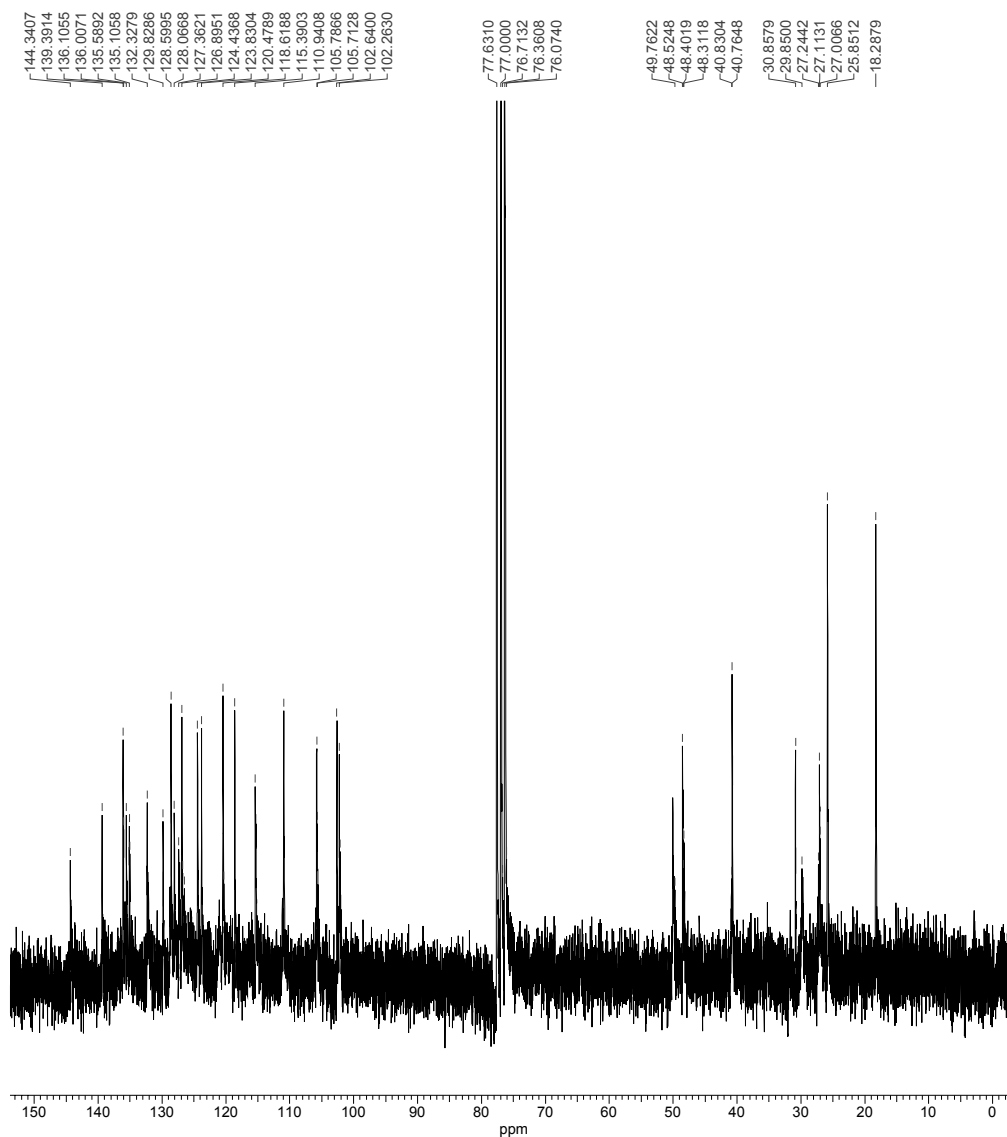


Figura 1.22. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) da substância 7.

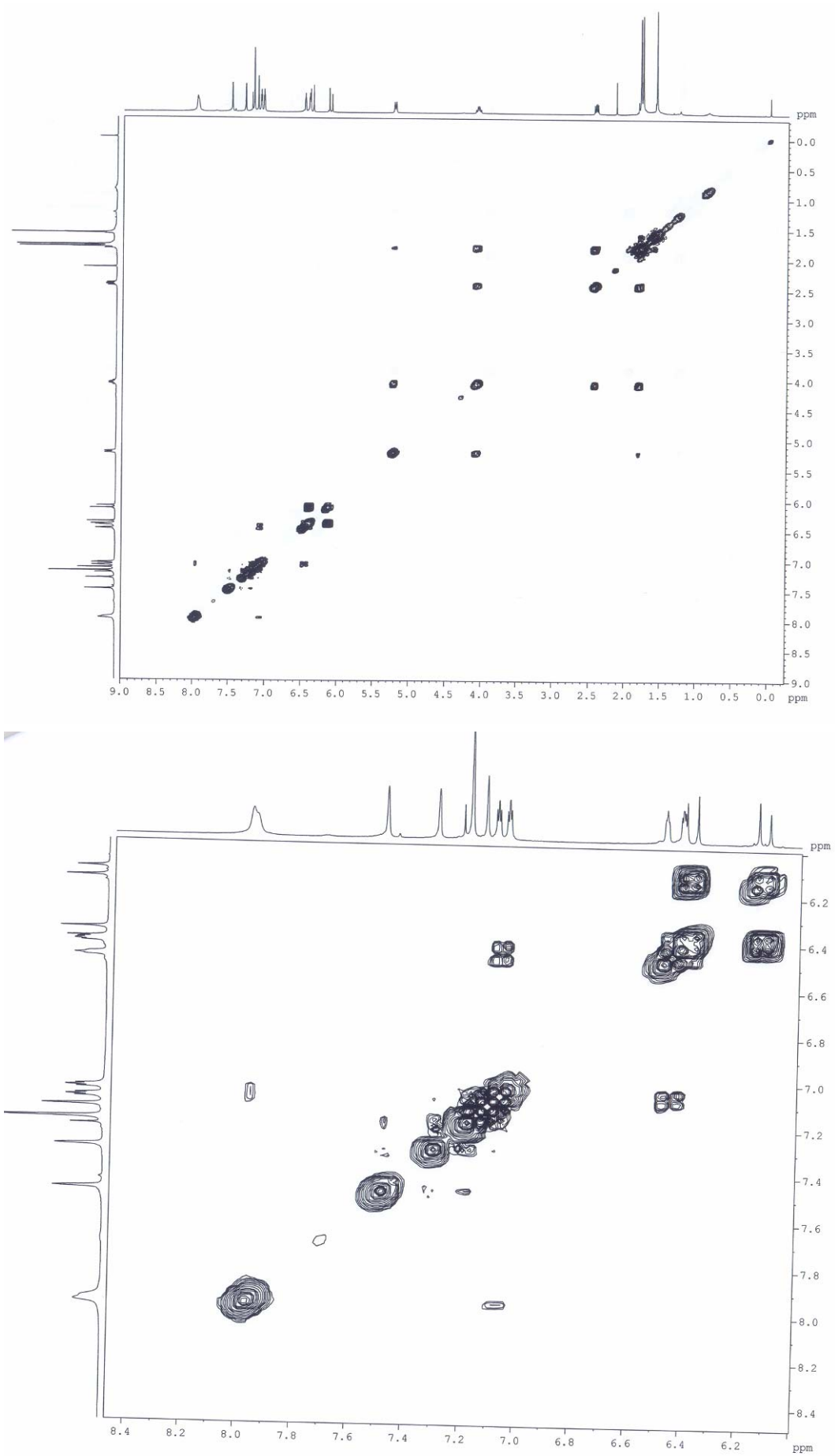


Figura 1.23. Espectros de COSY (CDCl_3 , 400 MHz) da substância 7.

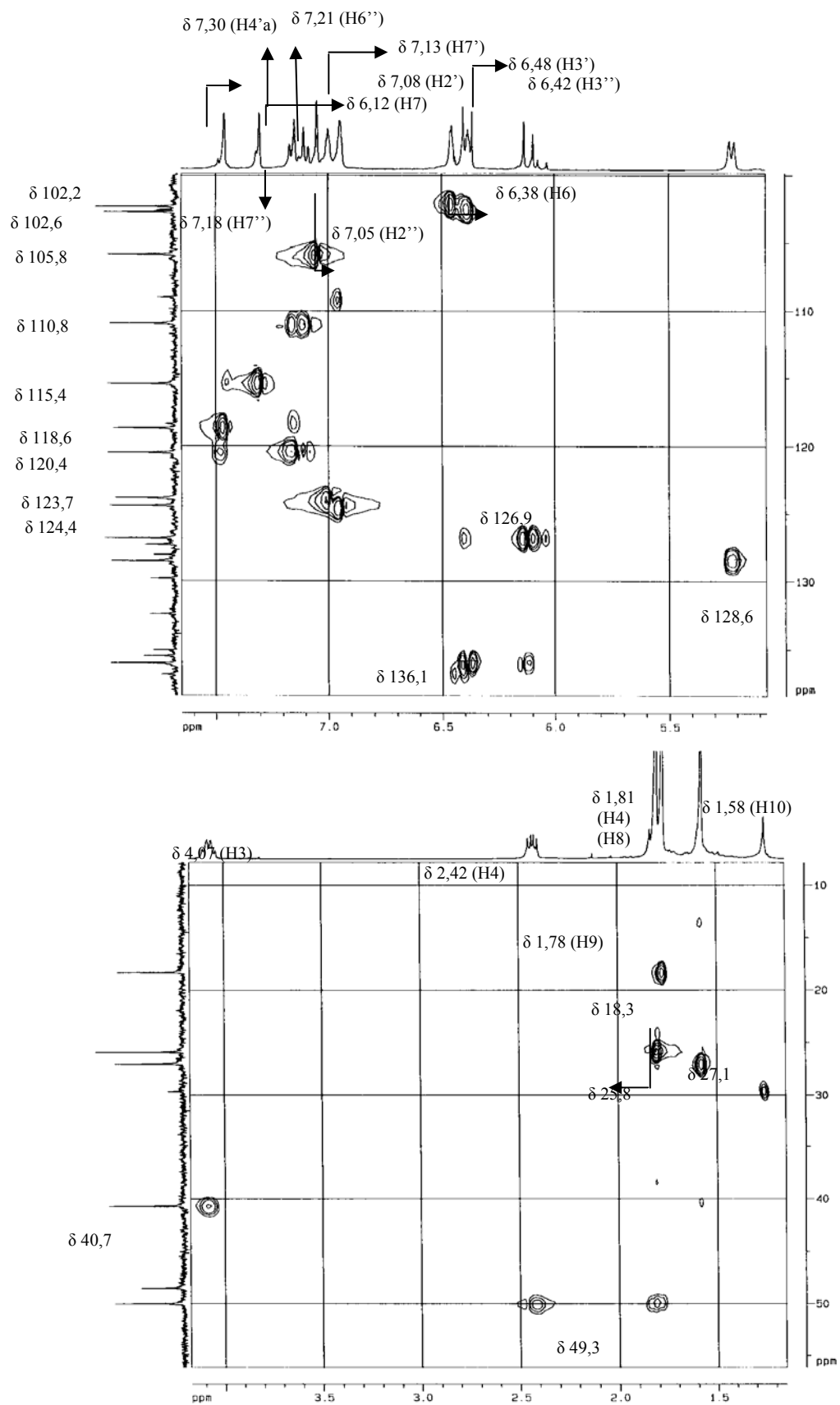


Figura 1.24. Mapa de contorno de HSQC (CDCl₃, 400 MHz) da substância 7.

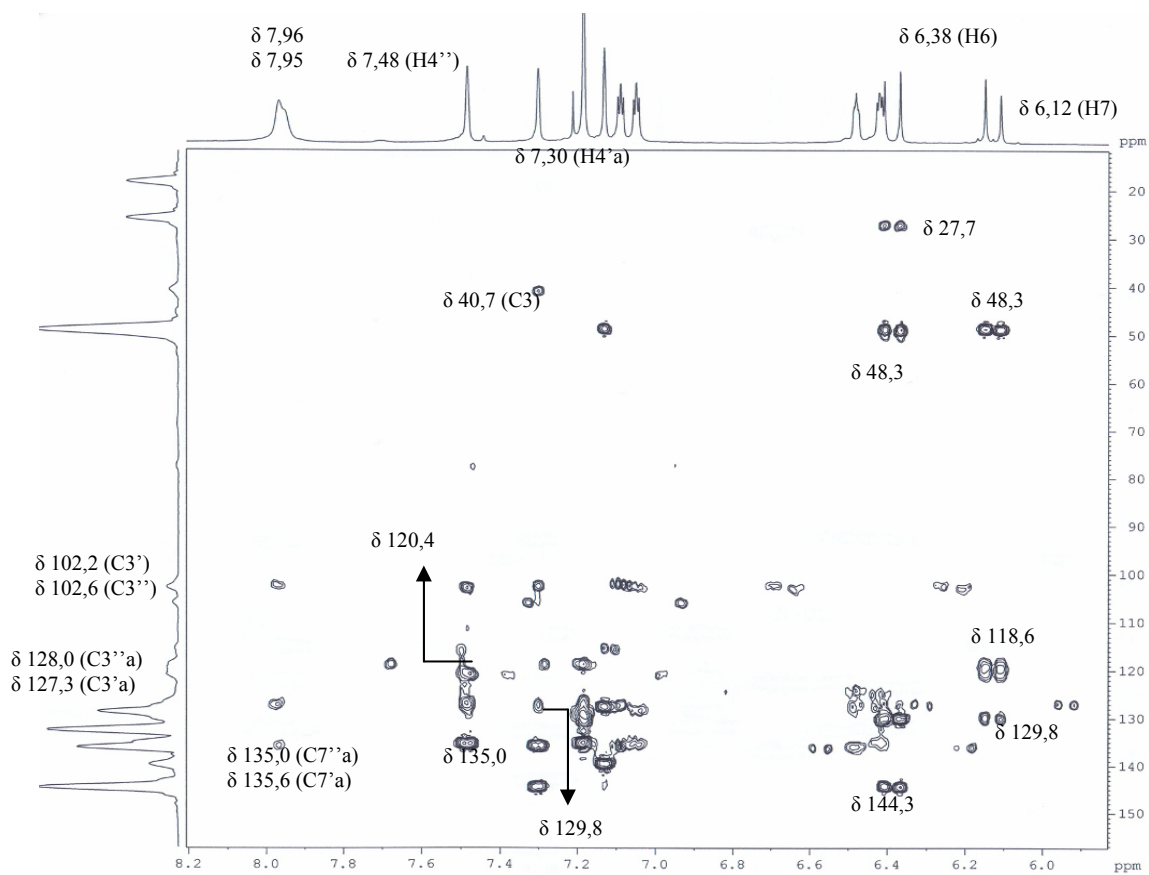
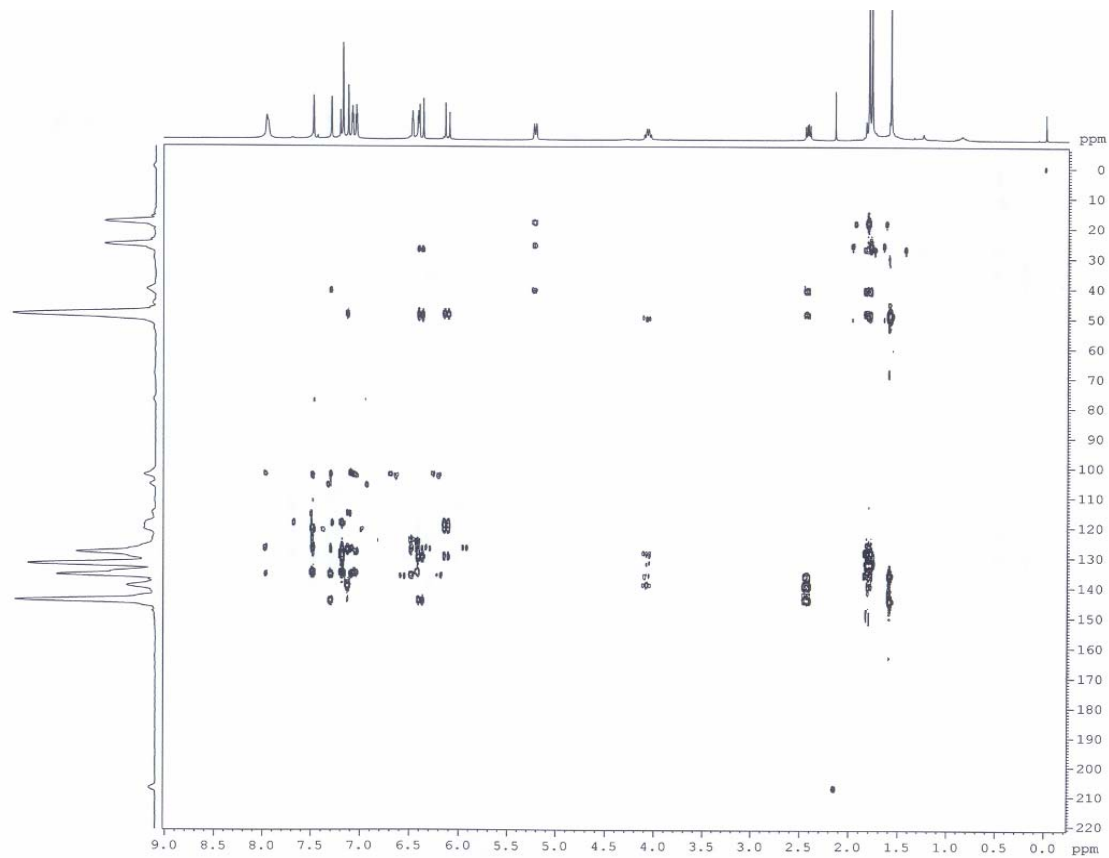
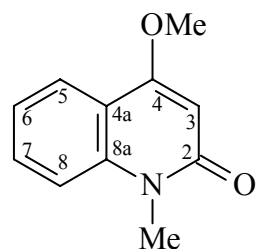


Figura 1.25. Mapas de contorno de HMBC (CDCl₃, 400 MHz) da substância 7.

4.2.1.7. Determinação estrutural dos alcalóides quinolônicos

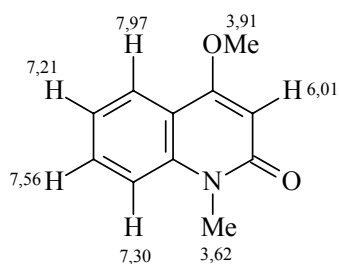
4.2.1.8. Identificação das substâncias (2) e (20).



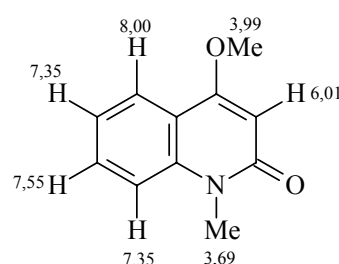
A substância **2** isolada do extrato hexânico do caule de *Raputia praetermissa*, é um alcalóide do tipo 2-quinolona. Seu espectro de RMN ^1H (Figura 1.26, Tabela 1.7) mostrou quatro sinais relativos a hidrogênios aromáticos em δ 7,94 *dd* ($J= 1,6$ e $8,0$, H-5), δ 7,21 *ddd* ($J= 1,6$, $7,2$ e $8,0$, H-6), δ 7,56 *ddd* ($J= 1,6$, $7,2$ e $8,6$, H-7) e δ 7,30 *d* ($J= 8,6$, H-8). Estes sinais acoplam entre si de acordo com os valores calculados das constantes de acoplamento, e indicam a presença de um anel aromático orto-dissubstituído. A presença de um sinal em δ 6,01 (*s*, 1H), o que sugere que este esqueleto trata-se de um alcalóide 4-R-2-quinilônico, pois este sinal é típico do H-3, nesta classe de metabólitos secundários. Verificou-se, ainda, a presença de dois singletos em δ 3,62 (N-Me), δ 3,91 (O-Me). O espectro de RMN ^{13}C (Figura 1.28 e Tabela 1.7) mostrou a presença de onze sinais, seis referentes a carbonos aromáticos, sendo o sinal em δ 163,6 referente a carbonila de sistema α,β -insaturada; dois carbonos olefínicos e dois carbonos metílicos (δ 55,5 e δ 28,8).

Esta substância é bastante conhecida na literatura e pelo grupo de Produtos Naturais da UFSCar, onde já foi isolada a partir de diversas plantas que fazem parte das rutáceas como *Almeidea macrocarpa*, *Angostura cuneifolia*, *Esenbeckia grandiflora*, *Helietta puberula*, *Hortia arborea*, *Pilorcapus riedelianus*, *P. spicatus*, *Rauia resinosa*, *Spathelia excelsa* e *Swinglea glutinosa*. Por este motivo, sua identificação foi feita ainda com base nos dados de RMN (^1H e ^{13}C) registrados na literatura

(Nayar *et al.*, 1971; Mafezoli, 2001). Este alcalóide é conhecido como 1-metil-4-metoxi-2-quinolona.

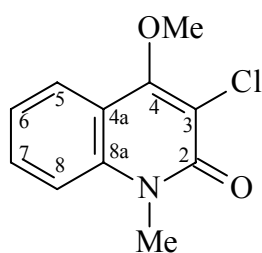


Raputia praetermissa (CDCl₃, 200 MHz)



Nayar *et al.*, 1971 (CDCl₃, 200 MHz)

A substância **20** isolada do extrato em diclorometano das raízes de *R. praetermissa*, também é um alcalóide do tipo 2-quinolona. Seu

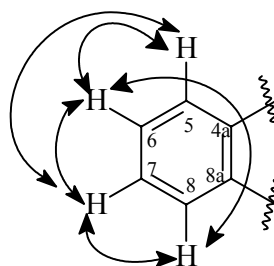


espectro de RMN ¹H (Figura 1.27, tabela 1.7) mostrou sinais em δ 7,93 *dd* ($J= 1,1$ e 8,0, H-5), δ 7,32 *ddd* ($J= 1,0, 7,2$ e 8,0, H-6), δ 7,63 *ddd* ($J= 1,0, 7,2$ e 8,0, H-7), δ 7,40 *d* ($J= 8,5$, H-8). Este padrão de sinais, de acordo com os valores calculados das

constantes de acoplamento e pela análise do espectro de COSY (Figura 1.30), sugere a presença de um sistema aromático *orto*-dissubstituído. Observou-se, ainda, a presença de singletos em δ 4,14 (O-Me) e δ 3,80 (N-Me). Comumente, espera-se a presença de um singlete de hidrogênio olefínico na região de δ 6,00 que caracterizaria o H-3, que faz parte do esqueleto típico de um alcalóide 2-quinolona. No entanto, este sinal não foi observado, o que sugere a presença de um substituinte em C-3.

COSY

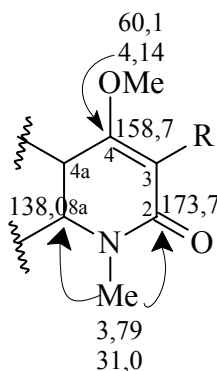
- δ 7,93 \leftrightarrow δ 7,32
- δ 7,32 \leftrightarrow δ 7,63
- δ 7,63 \leftrightarrow δ 7,40



O singlete em δ 4,14 no mapa de contorno do HSQC (Figura 1.32) apresentou-se ligado ao carbono em δ 60,1 e apresentou no experimento de HMBC (Figura 1.31) correlação com o sinal de carbono em δ 158,7 (3J) que foi atribuído a C-4, confirmando que a metoxila encontra-se em C-4. O singlete em δ 3,79 que está ligado ao carbono em δ 31,0 (ver figura 1.26, HSQC) apresentou através do experimento de HMBC (Figura 1.31), as seguintes correlações: δ 138,0 (C-8a) e δ 173,7 que foi atribuído a C-2 (3J). Estas correlações confirmam a presença de um esqueleto N-metil-4-metoxi-2-quinolona.

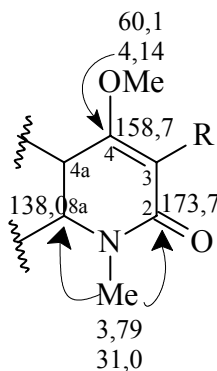
HSQC

- δ 4,14 (4-OMe) \rightarrow δ 60,1;
- δ 3,79 (N-Me) \rightarrow δ 31,0.



HMBC

- δ 4,14 (*s*, δ 60,1)
- δ 158,7 (C-4)
- δ 3,79 (*s*, δ 31,0)
- δ 173,7 (C-2)
- δ 138,0 (C-8a)



Na região dos hidrogênios aromáticos observou-se que o sinal em δ 7,32 (H-6), no HSQC (Figura 1.32) está ligado ao carbono em δ 121,6 (C-6), apresentou através do mapa de contornos de HMBC (Figura 1.31) duas correlações com os sinais de carbono em δ 117,5 e δ 113,3, que foram atribuídos a C-4a e C-8, este último no HSQC (Figura 1.32) encontra-se

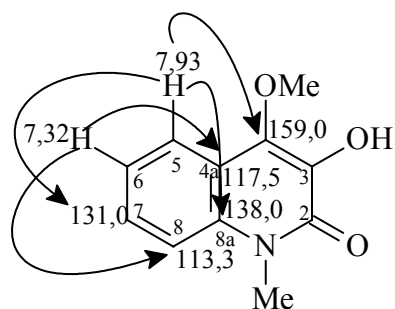
ligado ao hidrogênio em δ 7,40 que via HMBC (Figura 1.31), correlaciona-se com os carbonos C-6 (δ 121,6) e C-4a (δ 117,5). O sinal em δ 7,63 atribuído a H-7 está ligado ao carbono em δ 130,3 (HSQC, figura 1.32) está correlacionando via HMBC com os sinais de carbonos em δ 138,0; δ 113,3 e δ 122,6, os quais podem ser atribuídos aos C-8a, C-8 e C-5, respectivamente. O carbono cinco apresentou via HSQC (Figura 1.32) correlação com o sinal de hidrogênio em δ 7,93, e pelo HMBC correlaciona-se com os carbonos em δ 158,7 (C-4), δ 138,0 (C-8a) e δ 130,7 (C-7).

HSQC

- δ 7,93 (H-5) \rightarrow δ 122,6 (C-5);
- δ 7,32 (H-6) \rightarrow δ 121,6 (C-6).

HMBC

- δ 7,93 (*dd*, δ 122,6) – H-5
 - δ 158,7 (C-4)
 - δ 130,3 (C-7)
 - δ 138,0 (C-8a)
- δ 7,32 (*ddd*, δ 121,6) – H-6
 - δ 117,5 (C-4a)
 - δ 113,3 (C-8)

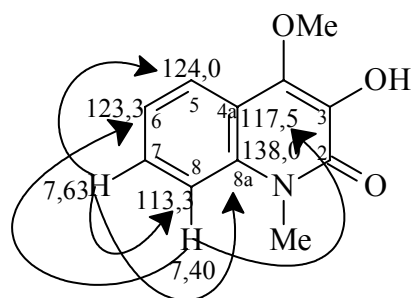


HSQC

- δ 7,63 (H-7) \rightarrow δ 130,3 (C-7);
- δ 7,40 (H-8) \rightarrow δ 113,3 (C-8).

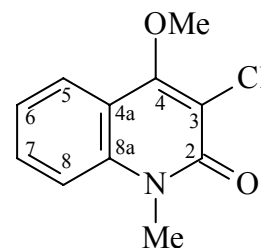
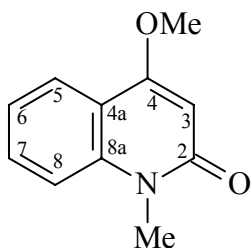
HMBC

- δ 7,63 (*ddd*, δ 130,3)
- δ 122,6 (C-5)
- δ 121,6 (C-6)
- δ 138,0 (C-8a)
- δ 7,40 (*dd*, δ 113,3)
- δ 118,0 (C-4a)
- δ 123,3 (C-6)



A substância **20** foi submetida a análise por CG-EM para que se determinasse o substituinte em C-3. A princípio suspeitou-se que este grupo fosse uma hidroxila e, portanto, esperava-se um íon molecular de m/z 205. No entanto, após a obtenção do espectro de massas desta substância, observou-se a presença do pico do íon molecular de m/z 223 $[M]^+$ e, ainda, a presença de m/z 225 $[M+2]^+$, com aproximadamente 30% da intensidade do íon molecular. No mesmo espectro ainda observou-se situação semelhante para os íons de m/z 208; m/z 210 e m/z 180; m/z 182. Este fato sugere a presença dos isótopos de cloro (35 e 37); visto que a substância apresentou íon molecular de m/z 223, levando à fórmula molecular $C_{11}H_{10}NO_2Cl$. Após a análise dos dados de RMN de 1D/2D e CG-EM, realizou-se levantamento bibliográfico no *Chemical Abstract*, mas não foram encontrados dados registrados, sugerindo que o alcalóide do tipo 2-quinolona é uma substância não relatada na literatura. A este alcalóide atribuiu-se o nome 1-metil-3-cloro-4-metoxi-2-quinolona.

Tabela 1.7. Dados dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C das substâncias **(2)** e **(20)** (CDCl_3 , δ , 200 MHz) em comparação com dados de RMN ^1H relatados na literatura para **(2)**.



H/C	(2)		Literatura		(20)	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
2	-	163,6	-	163,8	-	173,7
3	6,01 <i>s</i>	96,1	6,05 <i>s</i>	96,5	-	160,0
4	-	162,4	-	162,7	-	158,7
4a	-	116,2	-	116,5	-	117,5
5	7,94 <i>dd</i> ($J=$ 8,0; 1,3)	123,1	7,98 <i>dd</i> ($J=$ 8,0; 1,0)	123,4	7,93 <i>dd</i> ($J=$ 8,3; 1,2)	122,6
6	7,21 <i>ddd</i> ($J=$ 8,0; 7,2; 1,6)	121,4	7,23 <i>t</i> ($J=$ 8,0)	121,7	7,32 <i>ddd</i> ($J=$ 8,3; 7,2; 1,2)	121,6
7	7,56 <i>ddd</i> ($J=$ 8,4; 7,2; 1,6)	131,0	7,59 <i>dt</i> ($J=$ 8,0; 1,0)	131,2	7,63 <i>ddd</i> ($J=$ 8,3; 7,2; 1,2)	130,3
8	7,30 <i>d</i> ($J=$ 8,4)	139,4	7,35 <i>d</i> ($J=$ 8,0)	139,8	7,40 <i>d</i> ($J=$ 8,3)	113,3
8a	-	113,8	-	114,1	-	138,0
OCH_3	3,91 <i>s</i>	55,6	3,95 <i>s</i>	55,8	4,14 <i>s</i>	60,1
NCH_3	3,62 <i>s</i>	28,8	3,68 <i>s</i>	29,1	3,80 <i>s</i>	31,0

*Mafezoli (2001), Solvente: CDCl_3 (400 MHz).

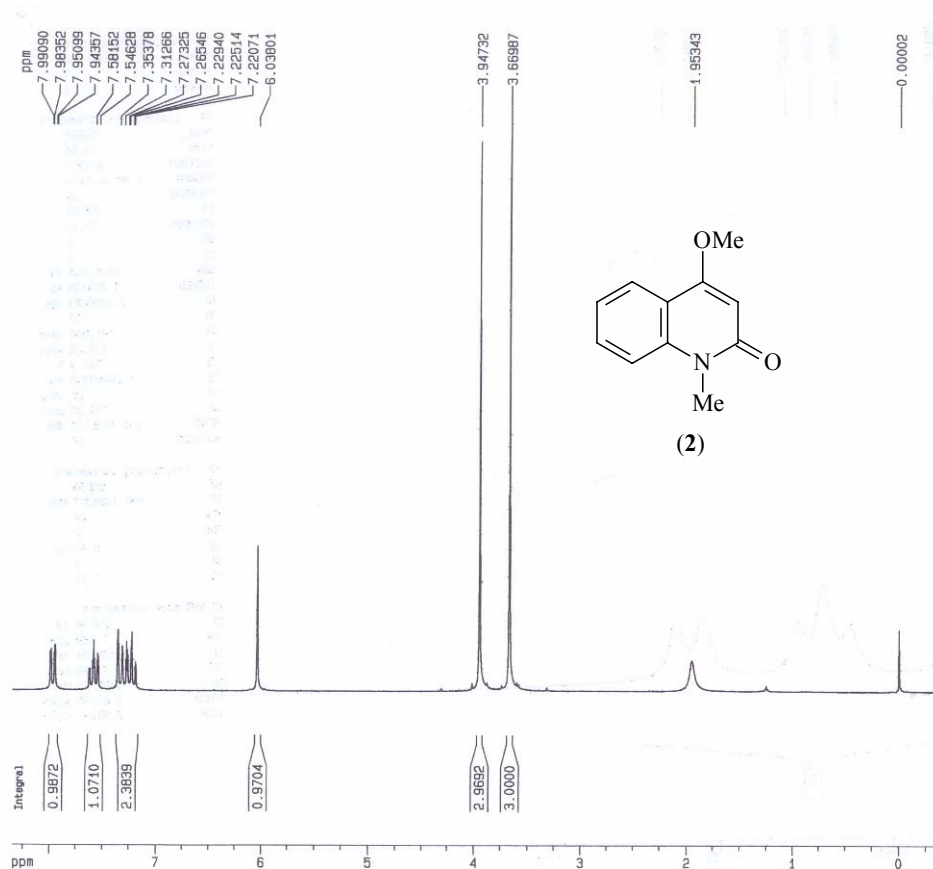


Figura 1.26. Espectro de RMN¹H (CDCl₃, 200 MHz) da substância 2.

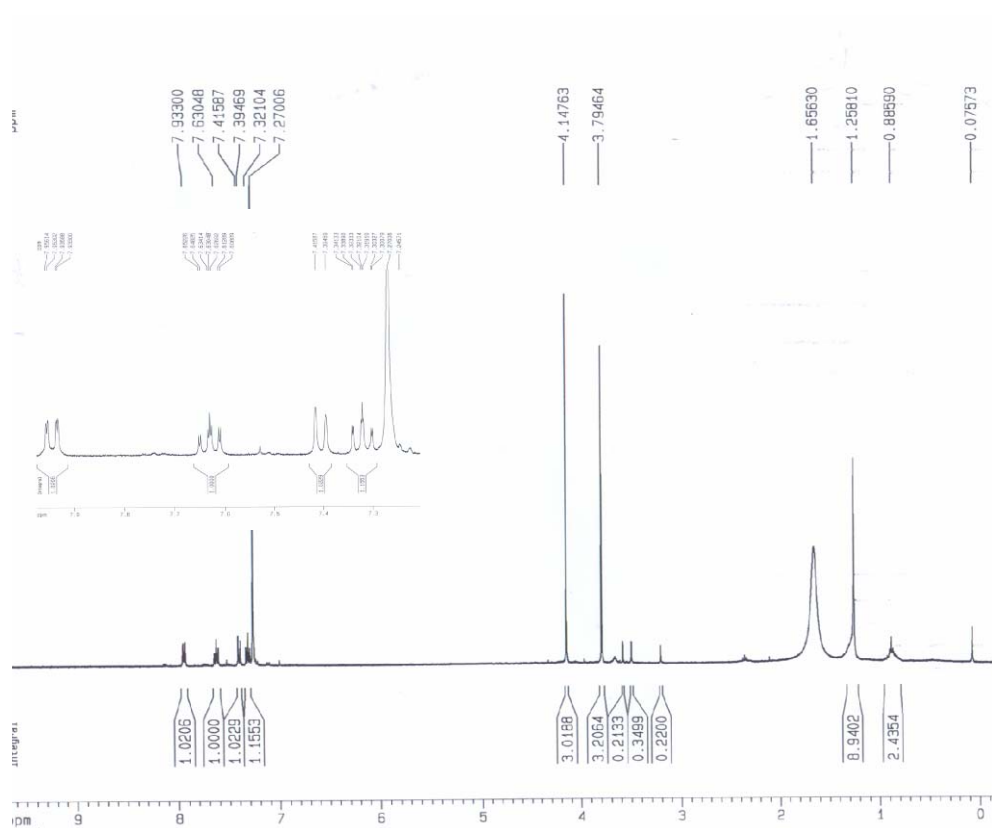


Figura 1.27. Espectro de RMN¹H (CDCl₃, 400 MHz) da substancia (20).

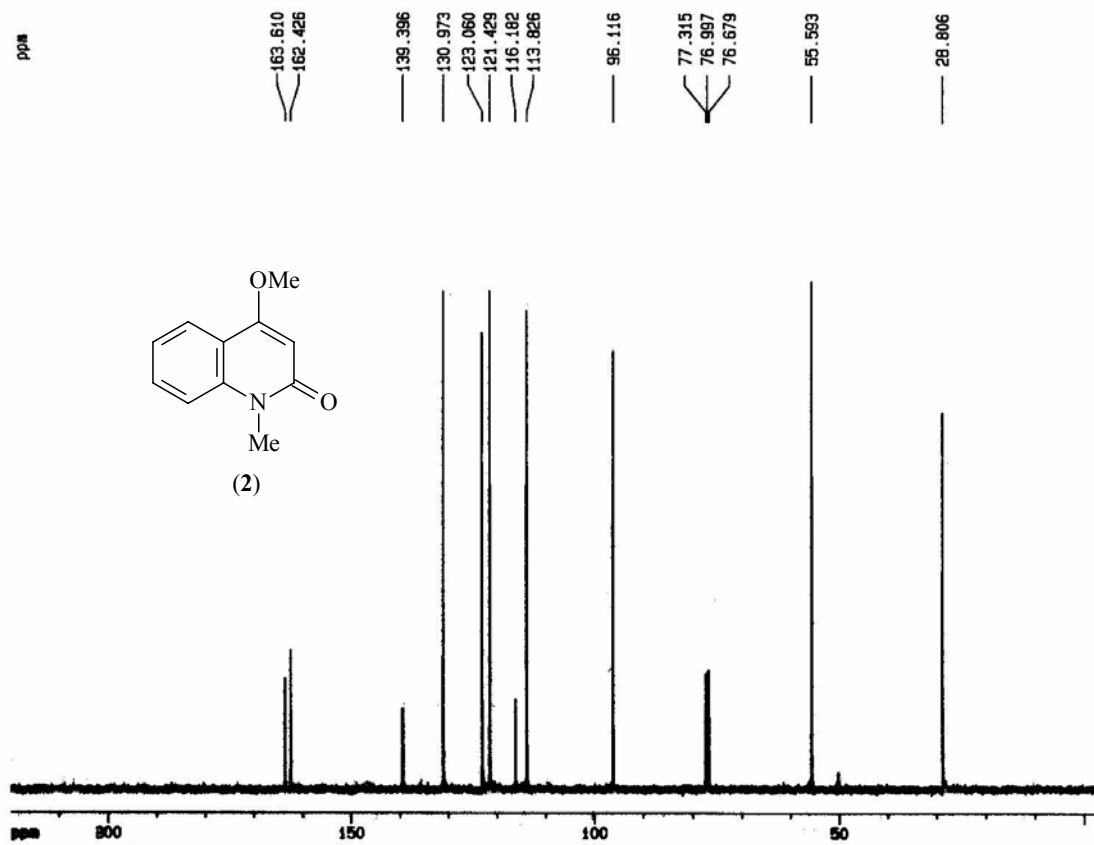


Figura 1.28. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) da substância **2**.

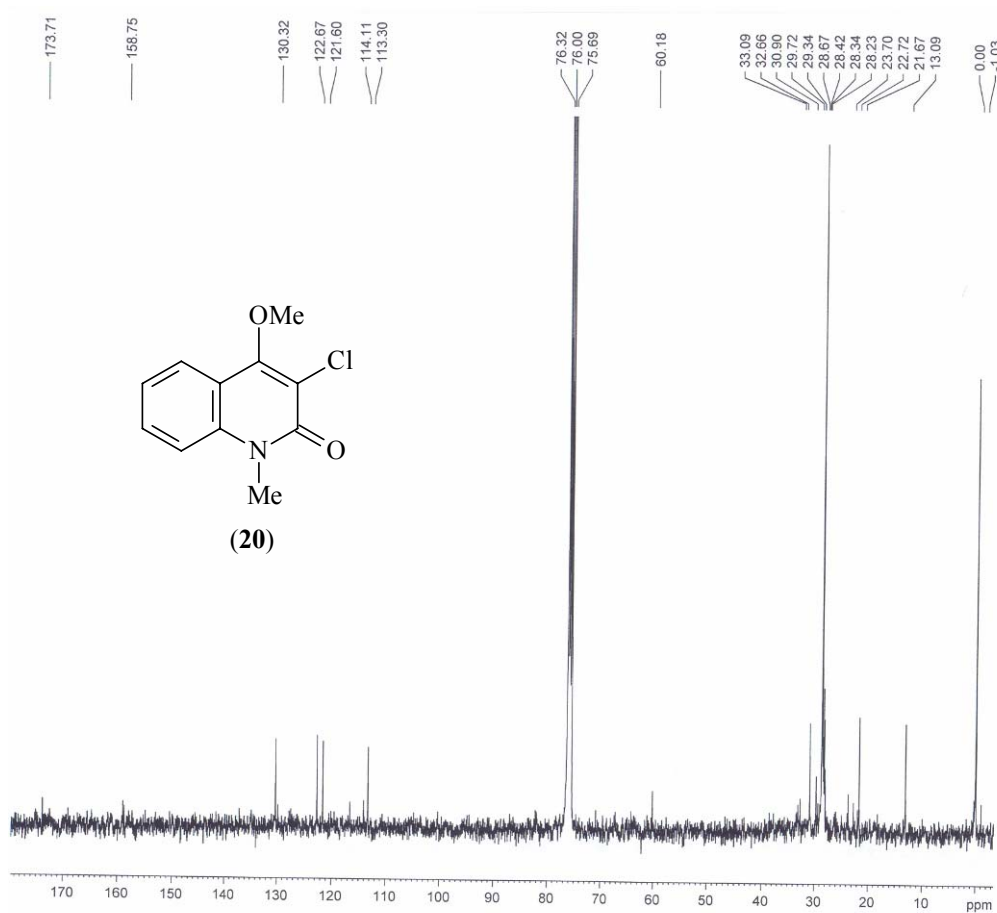


Figura 1.29. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) da substância **20**.

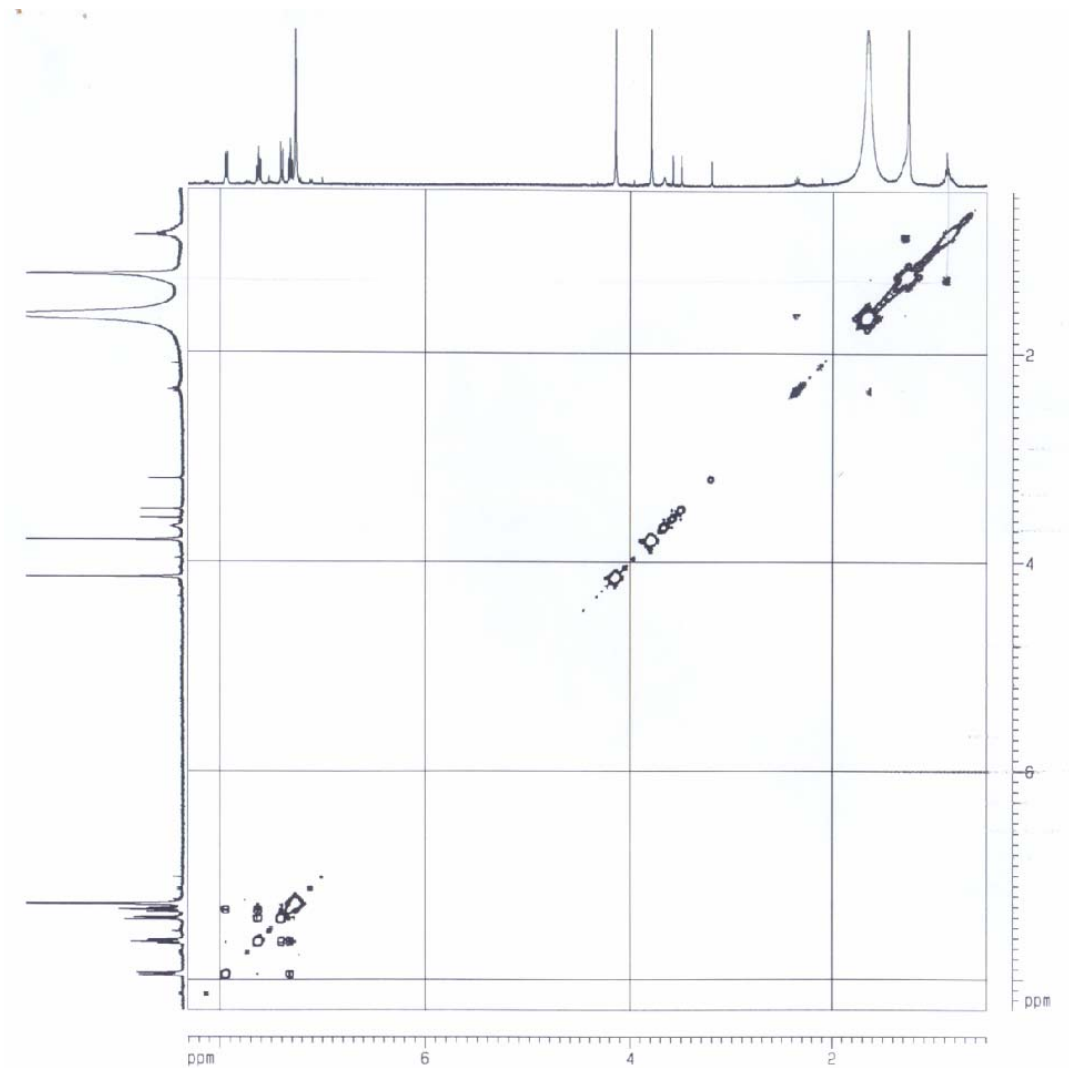


Figura 1.30. Espectro de COSY (CDCl_3 , 400 MHz) da substância **20**.

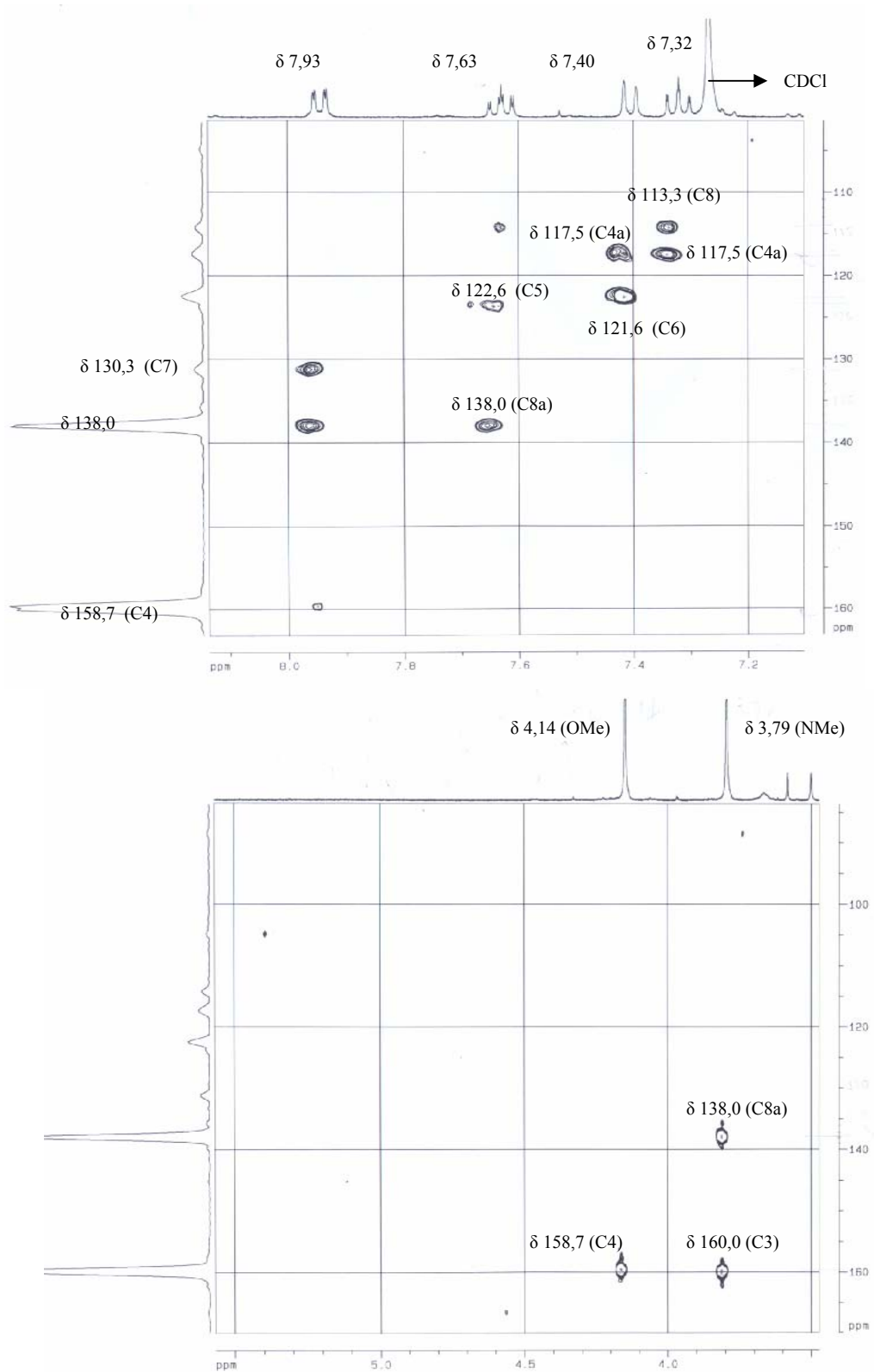


Figura 1.31. Mapas de contorno de HMBC (CDCl₃, 400 MHz) da substância **20**.

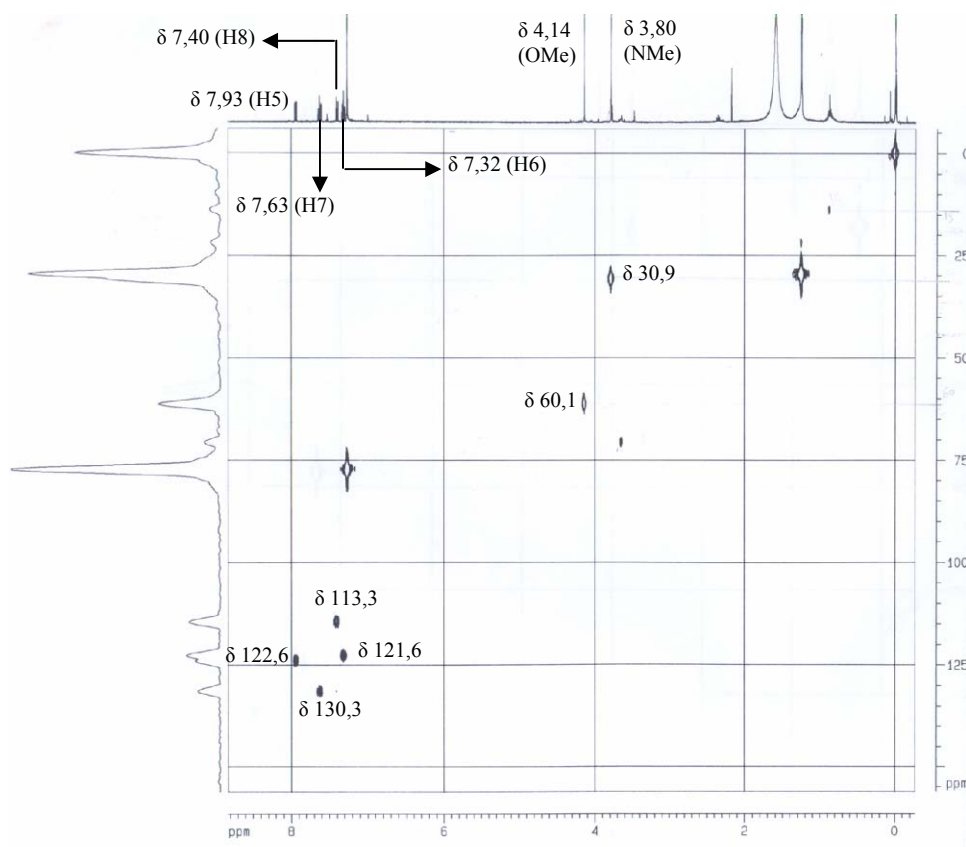
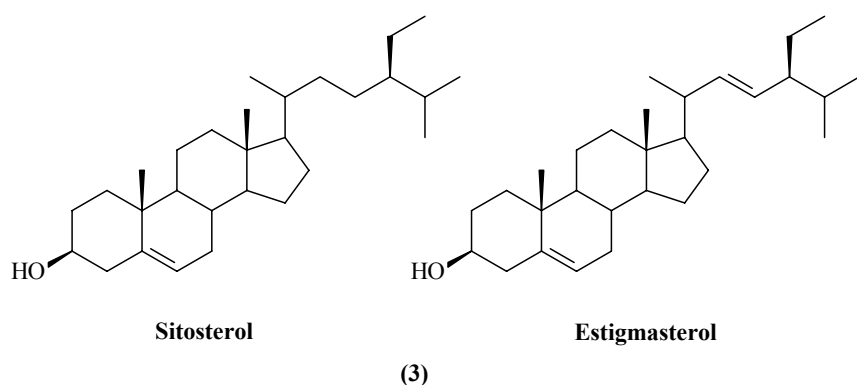


Figura 1.32. Mapa de contorno de HSQC (CDCl_3 , 400 MHz) da substância **20**.

4.2.2. Determinação estrutural dos esteróides, terpenos e limonóide.

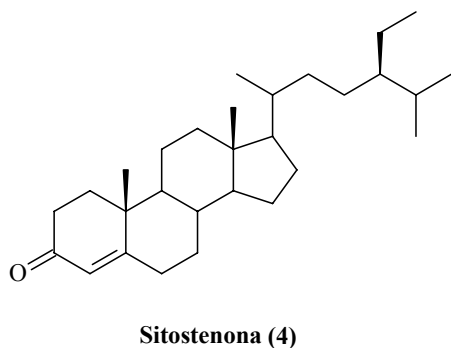
4.2.2.1. Misturas de esteróides (3) e substância (4).

A fração 3, mistura de esteróides separada do extrato em hexano do caule de *Raputia praetermissa* (Rutaceae), foi identificada



através de seu espectro de RMN ^1H (Figura 1.33) que apresentou duplete largo em δ 5,34 d ($J= 4,0$ Hz) e um

multiplete em δ 3,51, característicos dos hidrogênios H-6 e H-3 dos esteróides sitosterol e estigmasterol; observou-se, também, dois duplos dupletos em δ 5,15 dd ($J= 8,0$ e 16,0 Hz) e δ 4,99 dd ($J= 8,0$ e 16,0 Hz) característicos de hidrogênios olefínicos, sugerindo a presença do estigmasterol. Observou-se, ainda, um grande número de sinais sobrepostos na região de δ 0,67 a δ 2,27 referentes a vários grupos de hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos que caracterizam o esqueleto esteroidal.



Na análise por CG/EM, observou-se dois picos no cromatograma, confirmando a presença das duas substâncias. Os padrões de fragmentação mostraram-se compatíveis com os dados para as substâncias sitosterol, pico do íon molecular M^+ 414 (Figura 1.34), estigmasterol, pico do íon molecular M^+ 412 (Figura 1.34).

No espectro de RMN ^1H (Figura 1.35) a substância 4 não apresentou o

multiplete na região de δ 3,50 que caracteriza H-3 do esqueleto esteroidal. No entanto, observou-se um singlete largo em δ 5,72 atribuído a H-4 da substância sitostenona. Observou-se, também, um acúmulo de sinais intensos na região dos hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos entre δ 0,71 e δ 2,50. O espectro de RMN ^{13}C (Figura 1.36) desta substância apresentou um sinal de carbono carbonílico em δ 199,5 e ainda os sinais em δ 125,4 e δ 171,6 característicos de C-3, C-4 e C-5, respectivamente.

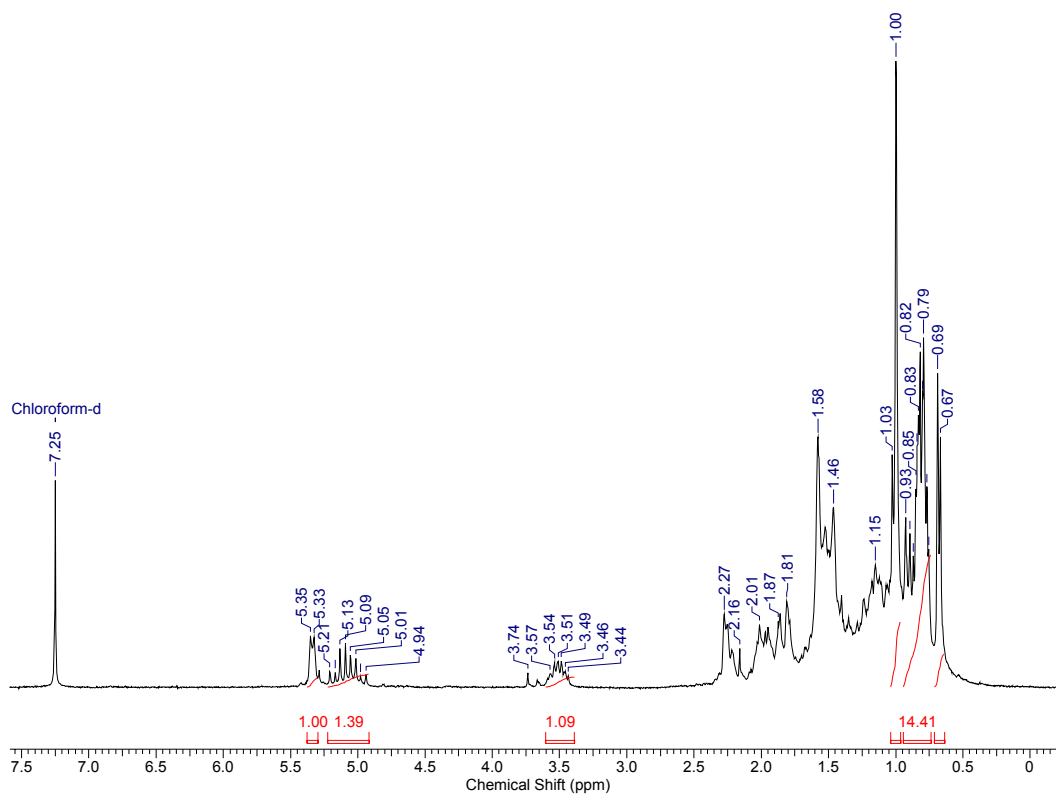


Figura 1.33. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) da fração 3.

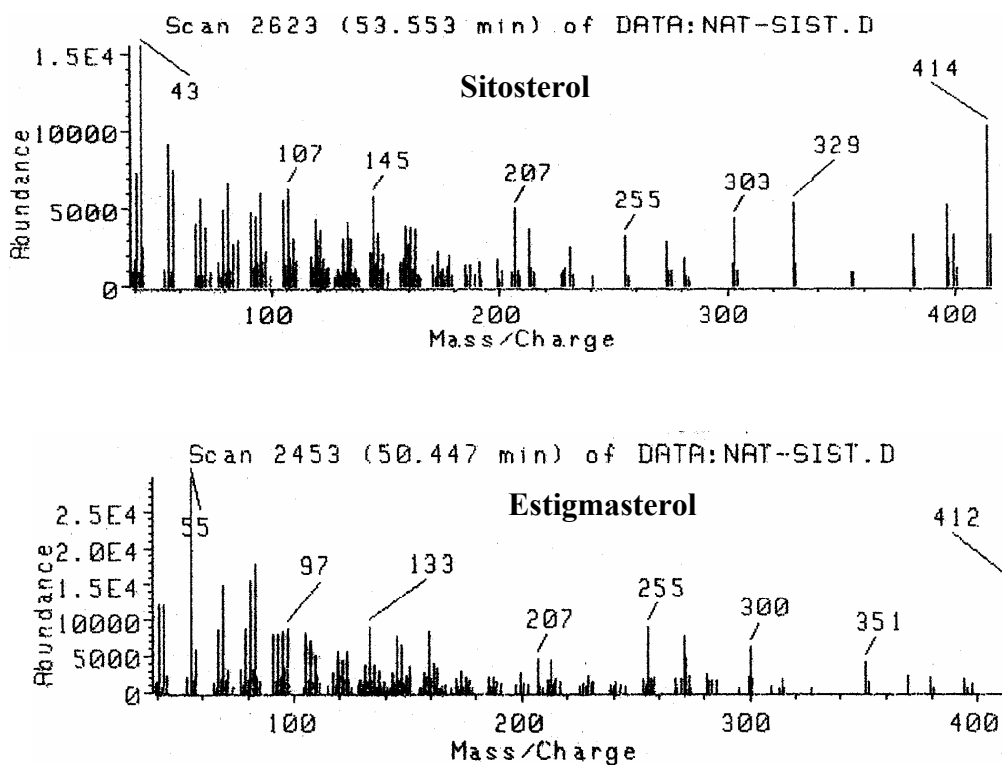


Figura 1.34. Espectros de massas (IE, 70 eV) do sitosterol e estigmasterol.

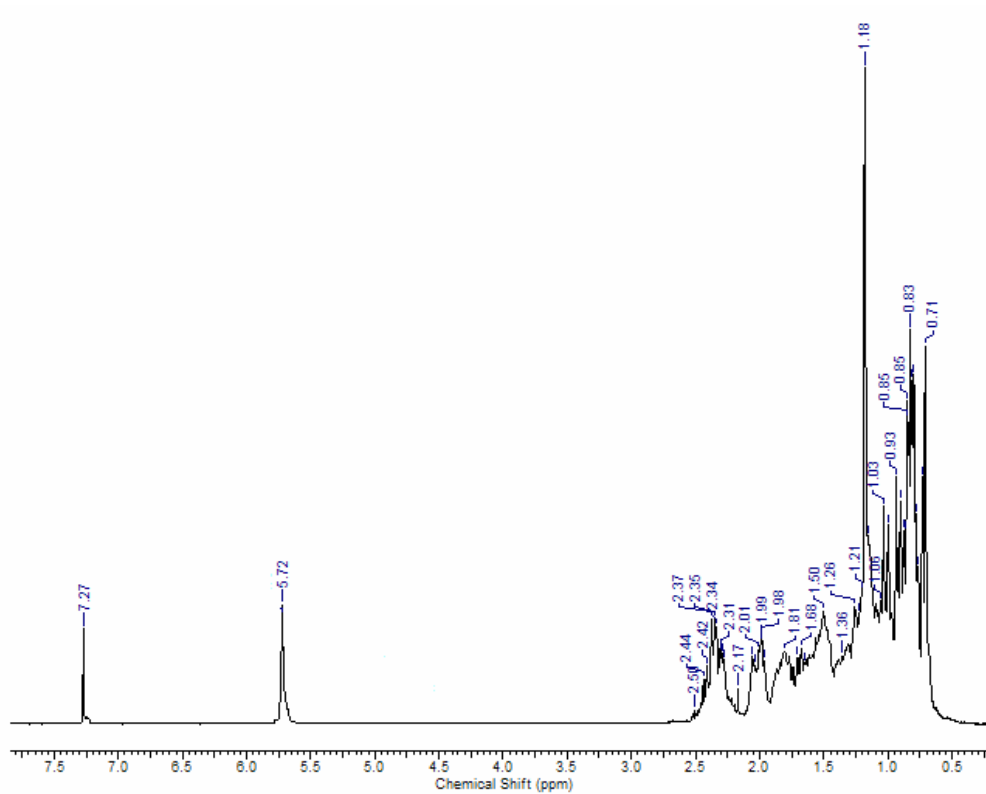


Figura 1.35. Espectro de RMN¹H (CDCl₃, 200 MHz) da substância 4.

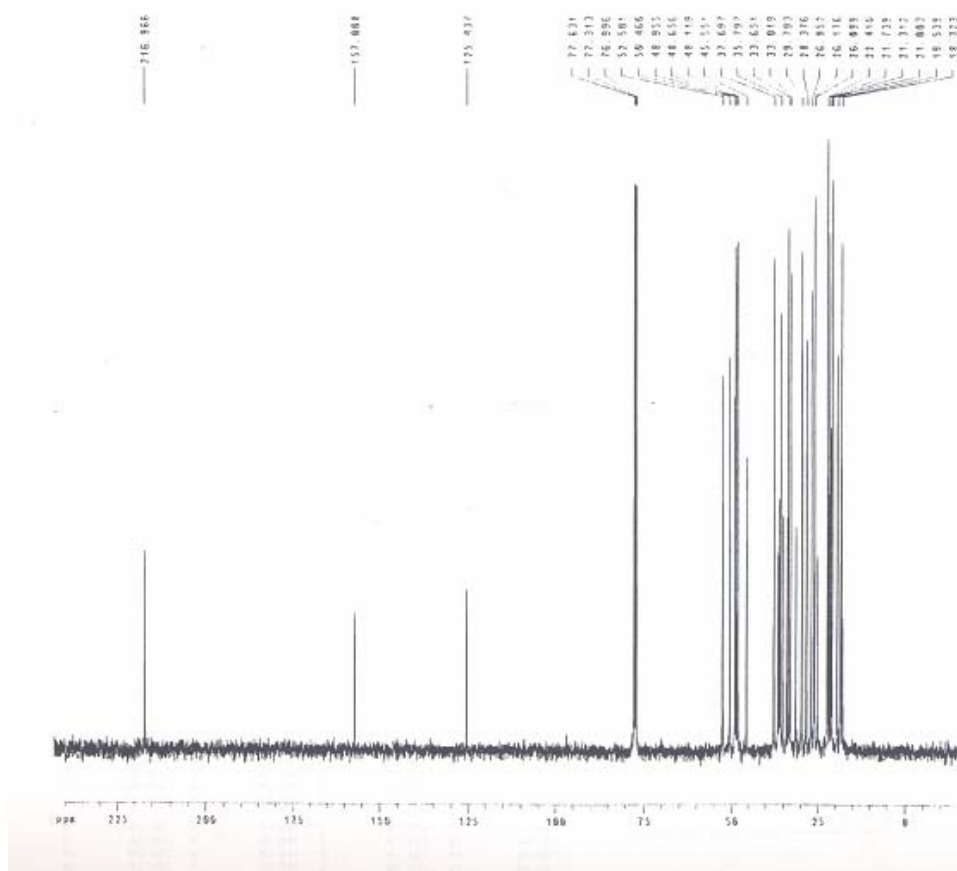
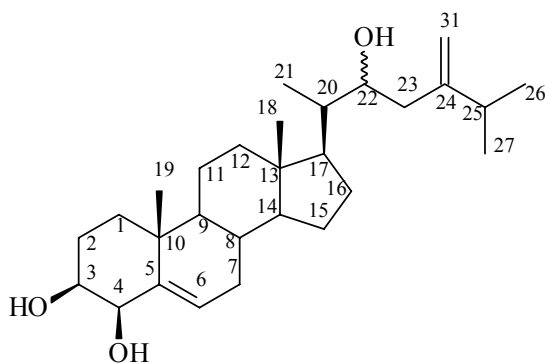


Figura 1.36. Espectro de RMN ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) da substância 4.

4.2.2.2. Determinação estrutural da substância 19.

A substância **19** foi isolada como um sólido cristalino branco a partir do extrato em diclorometano das raízes de *Raputia praetermissa*

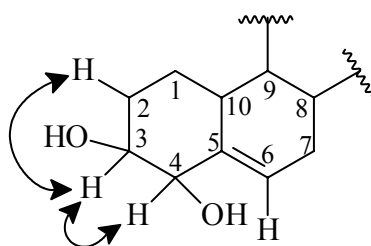


(Rutaceae). O seu espectro de RMN ^1H (Figura 1.37 e tabela 1.8) apresentou sinais típicos de esteróides do tipo colestano. Na região mais blindada observou-se a presença de cinco metilas, sendo dois singletos que integraram para três

hidrogênios cada, em δ 1,18 e δ 0,72 e ainda três dupletos de metila em δ 1,07 (3H, $J = 6,7$ Hz), δ 1,04 (3H, $J = 6,7$ Hz) e δ 0,95 (3H, $J = 6,7$ Hz). No mesmo espectro pode-se observar em δ 3,56 um duplo triplete (1H, dt , $J = 3,1$ e $12,0$ Hz), um duplete em δ 4,13 (1H, d , $J = 3,1$ Hz), que através do experimento de COSY (Figura 1.38) apresentou acoplamento com o sinal em δ 3,56. Estes dois últimos sinais sugerem a presença de hidroxilas ligadas aos carbonos C-3 e C-4. Observou-se, ainda, um duplo duplo duplete em δ 3,75 (1H, ddd , $J = 2,0$; $3,1$ e $12,0$ Hz). Na região mais desblindada do espectro foram observados dois singletos em δ 4,93 (1H) e δ 4,82 (1H) e ainda um duplo duplo duplete em δ 5,67 (1H, dd , $J = 2,0$ e $4,9$ Hz).

COSY

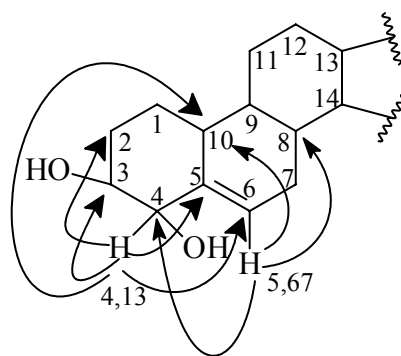
- δ 3,56 (H-3) \leftrightarrow δ 4,13 (H-4);



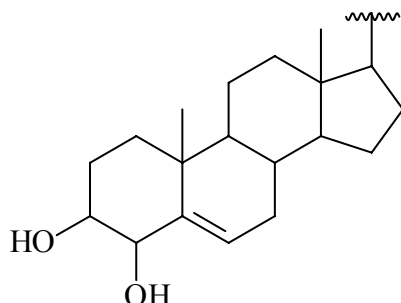
No espectro de RMN¹³C (Figura 1.39 e tabela 1.9) foram observados 28 sinais, sendo que o sinal em δ 109,7 pode ser atribuído ao grupo metileno terminal em C-31. E os sinais em δ 142,7 e δ 128,6 referem-se à ligação dupla endocíclica Δ^5 . Através do experimento de PENDANT foi possível observar a presença de nove carbonos metilênicos, cinco metílicos, dez carbonos metínicos e quatro quaternários. No espectro de HSQC (Figura 1.40) foram observadas as correlações dos sinais dos hidrogênios em δ 3,56 e δ 4,13 com os sinais dos carbonos em δ 72,4 e δ 77,2, respectivamente. Analisando o experimento de HMBC (Figura 1.41) foram observadas correlações para H-3 (δ 3,56) e para H-4 (δ 4,13), com os sinais de carbono em δ 25,3 (C-2), δ 35,9 (C10), δ 72,4 (C3), δ 128,6 (C6) e δ 142,7 (C5). O sinal de H-6 em δ 5,67 apresentou três correlações com os sinais de carbono em δ 31,8 (C7), δ 35,9 (C10) e δ 77,2 (C4).

HMBC

- δ 4,13 (*d*, δ 77,2) – H-4
- δ 25,3 (C2)
- δ 35,9 (C10)
- δ 72,4 (C3)
- δ 128,6 (C6)
- δ 142,7 (C5)
- δ 5,67 (*dd*, δ 128,6) – H-6
- δ 31,8 (C8)
- δ 35,9 (C10)
- δ 77,2 (C4)



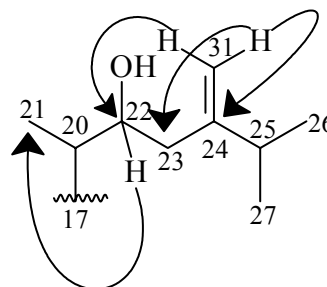
Partindo do princípio de que a substância em questão trata-se de um esteróide do tipo colestano e com base nas informações analisadas até o momento pode-se propor parte da estrutura do esteróide.



O objetivo seguinte foi a determinação da cadeia lateral deste esteróide, sendo que pela análise do espectro de RMN¹³C (Figura 1.39) devem fazer parte desta cadeia três metilas (sendo que duas estão ligadas ao mesmo carbono), o carbono da ligação dupla terminal e ainda um terceiro carbono carbinólico. Analisando o mapa de correlações do HSQC (Figura 1.40), pode-se observar que o sinal em δ 3,75 encontra-se ligado ao carbono em δ 69,9 (oxigenado). Este sinal em δ 3,75 no experimento de HMBC (Figura 1.41) apresentou apenas uma correlação com um sinal de carbono metílico em δ 12,4, provavelmente a Me-21. Os sinais dos hidrogênios da ligação dupla terminal apresentaram correlações com os carbonos em δ 69,9 (C22), δ 39,6 (C23) e δ 153,5 (C24). Assim, pode-se propor a cadeia lateral do esteróide como sendo:

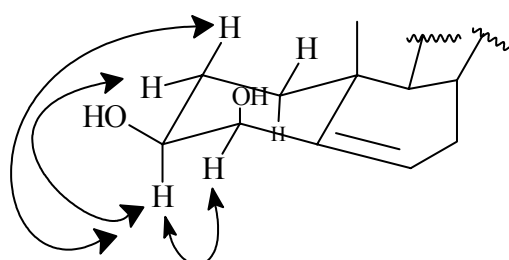
HMBC

- δ 3,75 (H-22, *ddd*, δ 69,9)
- δ 12,4 (Me-21)
- δ 4,82 (H-31a, *s*, δ 109,7)
- δ 35,8 (C23)
- δ 69,9 (C22)
- δ 153,5 (C24)
- δ 4,93 (H-31b, *s*, δ 109,7)
- δ 35,8 (C23)
- δ 69,9 (C22)
- δ 153,5 (C24)



A proposta para estereoquímica relativa do esteróide foi determinada através do cálculo dos valores das constantes de acoplamento em anéis de seis membros.

Normalmente, os valores observados para constantes de acoplamento entre hidrogênios axial/axial está entre 8,0 e 10,0 Hz e para



hidrogênios axial/equatorial e equatorial/equatorial são de 2,0 a 3,0 Hz. No espectro de RMN ^1H foram observados os seguintes valores para as constantes de acoplamento para H-3 (δ 3,56, *dt*) de 3,2 e 11,6 Hz e para H-4 (δ 4,14, *d*) de 3,0 Hz. Sendo assim, foi possível atribuir a configuração β para o grupo hidroxila ligado ao carbono 4. Este esteróide já foi isolado em trabalho realizado pelo grupo de produtos naturais da UFSCar a partir do estudo fitoquímico de *Trichilia rubra* (Rocha, 2005), sendo conhecido como 24-metileno-3 β , 4 β ,22-triidroxi-colesterol. Utilizou-se ainda este modelo como parâmetro de comparação para confirmação dos dados espectroscópicos (Tabelas 1.8 e 1.9).

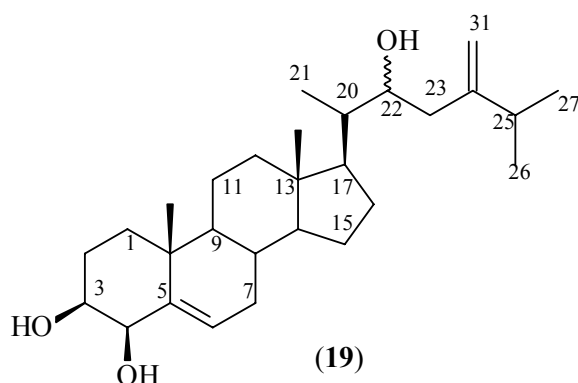


Tabela 1.8. Dados de RMN ^1H para a substância **19** em comparação com os dados da literatura (Rocha, 2005).

Hidrogênio	<i>Trichilia rubra</i> (CDCl_3 , 400 MHz)	19 (CDCl_3 , 400 MHz)
3	3,56 (1H, <i>dt</i> , 12,0 Hz)	3,56 (1H, <i>dt</i> , 12,0 e 3,1 Hz)
4	4,01 (1H, <i>d</i> , 4,0 Hz)	4,13 (1H, <i>d</i> , 3,1 Hz)
6	5,68 (1H, <i>dd</i> , 2,0 e 4,0 Hz)	5,67 (1H, <i>dd</i> , 1,9 e 4,9 Hz)
22	3,76 (1H, <i>ddd</i> , 2,0; 4,0 e 12,0 Hz)	3,75 (1H, <i>ddd</i> , 2,0; 3,1 e 12,0 Hz)
31a	4,82 (1H, <i>s</i>)	4,82 (1H, <i>s</i>)
31b	4,93 (1H, <i>s</i>)	4,93 (1H, <i>s</i>)
Me-18	0,72 (3H, <i>s</i>)	0,72 (3H, <i>s</i>)
Me-21	0,95 (3H, <i>d</i> , 6,8 Hz)	0,95 (3H, <i>d</i> , 6,7 Hz)
Me-26	1,04 (3H, <i>d</i> , 6,8 Hz)	1,04 (3H, <i>d</i> , 6,8 Hz)
Me-27	1,08 (3H, <i>d</i> , 6,8 Hz)	1,07 (3H, <i>d</i> , 6,8 Hz)
Me-19	1,18 (3H, <i>s</i>)	1,18 (3H, <i>s</i>)

Tabela 1.9. Dados de RMN ^{13}C para a substância **19** em comparação com os dados da literatura (Rocha, 2005).

Carbono	<i>Trichilia rubra</i> [CDCl ₃ , 100 MHz]	19 [CDCl ₃ , 100 MHz]
1	36,9	36,8
2	25,3	25,3
3	72,9	72,4
4	77,2	77,2
5	142,8	142,7
6	128,6	128,6
7	32,0	31,8
8	31,8	31,8
9	50,2	50,1
10	36,0	35,9
11	20,5	20,4
12	35,9	35,8
13	42,7	42,6
14	56,5	56,4
15	24,3	24,3
16	27,4	27,4
17	52,9	52,9
18	11,8	11,8
19	21,0	20,9
20	40,5	40,4
21	12,4	12,4
22	69,9	69,9
23	39,6	39,6
24	153,3	153,5
25	33,1	33,1
26	22,5	22,3
27	22,4	21,5
31	109,7	109,7

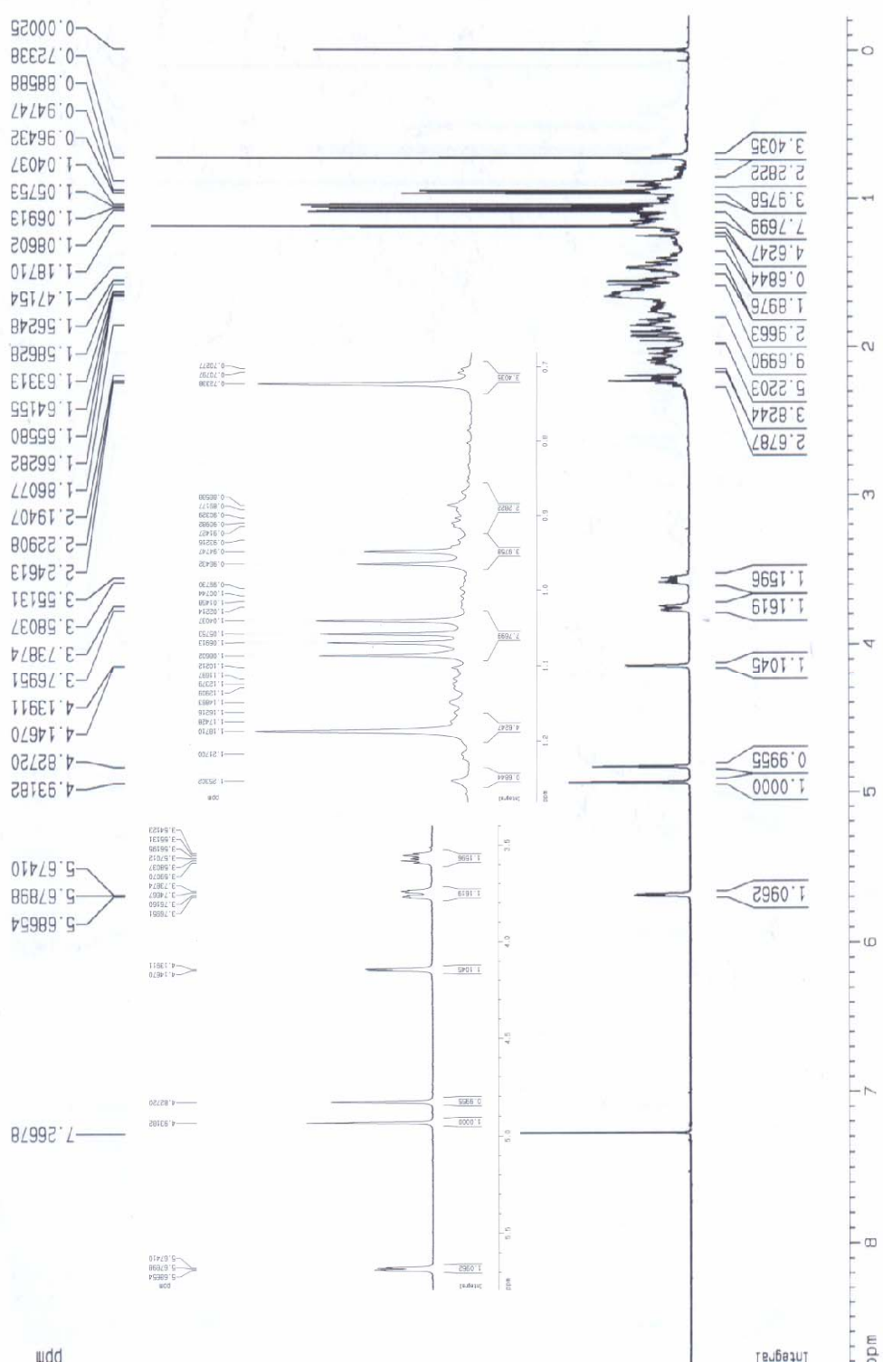


Figura 1.37. Espectro de RMN¹H (CDCl₃, 400 MHz) da substância **19**.

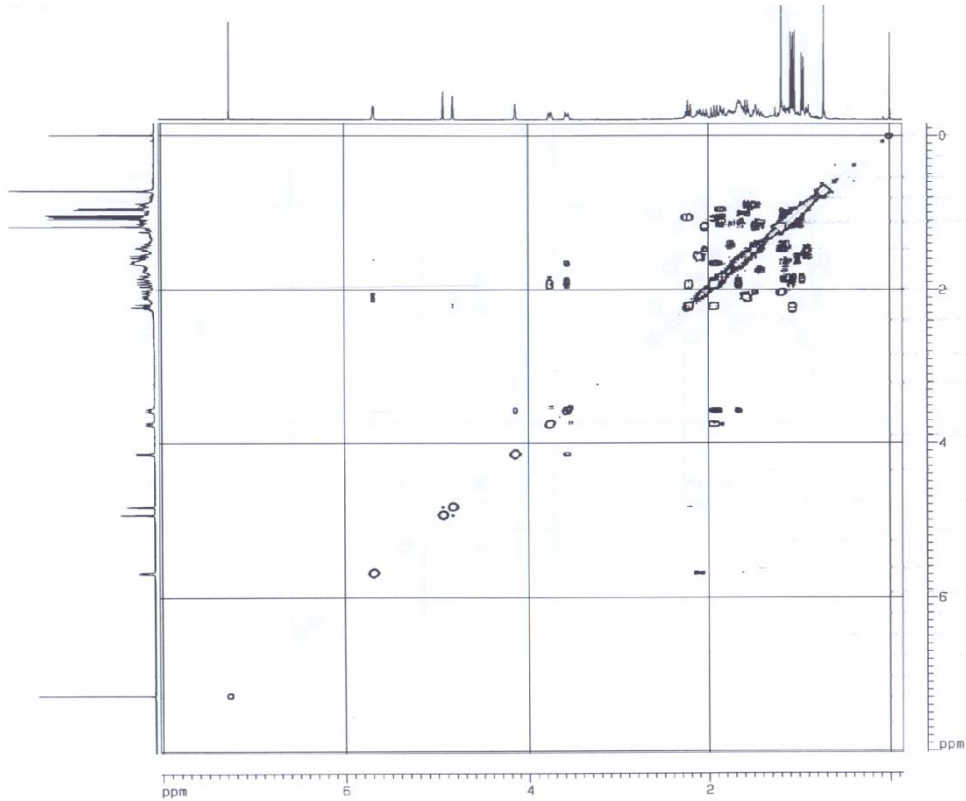


Figura 1.38. Espectro de COSY (CDCl_3 , 400 MHz) da substância **19**.

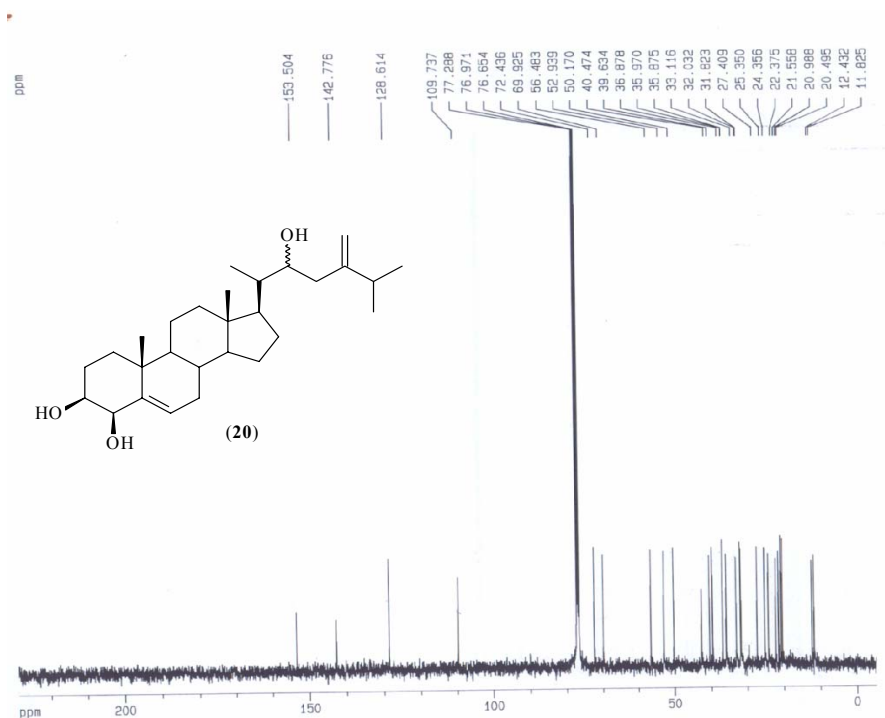


Figura 1.39. Espectro de RMN^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) da substância **19**.

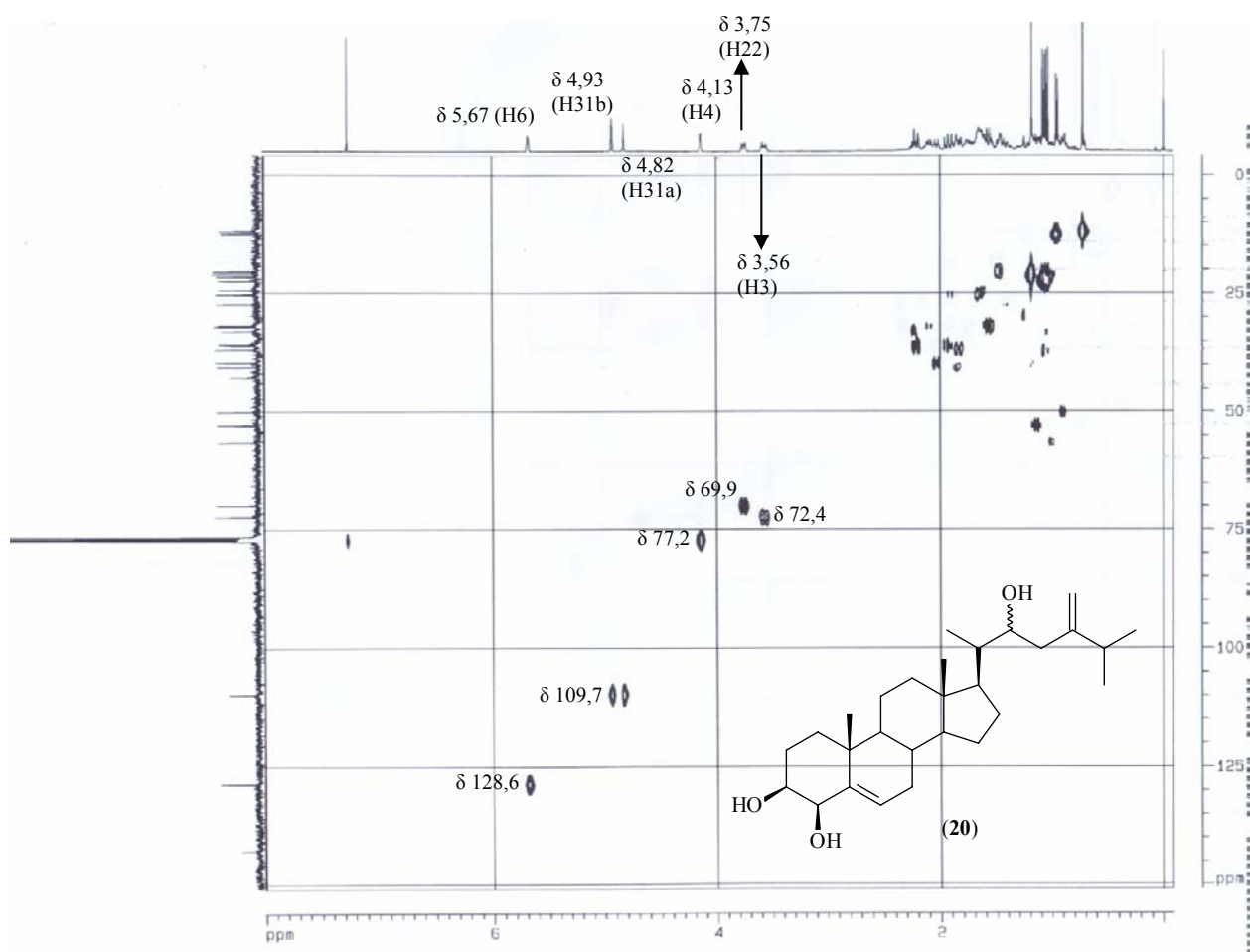


Figura 1.40. Mapa de contorno de HSQC (CDCl_3 , 400 MHz) da substância **19**.

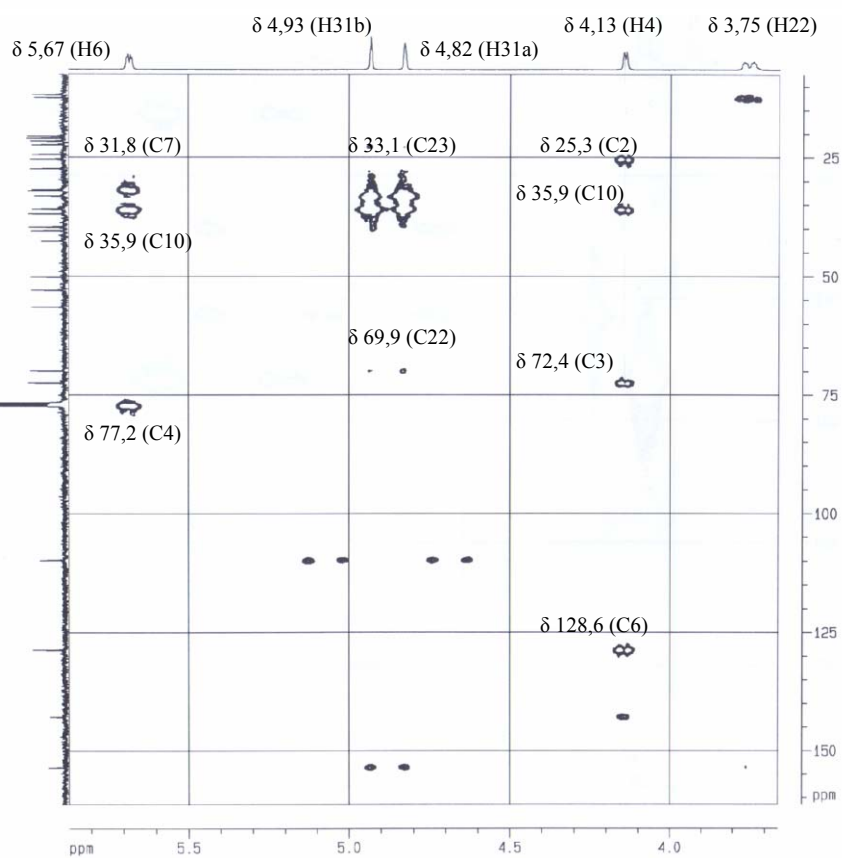
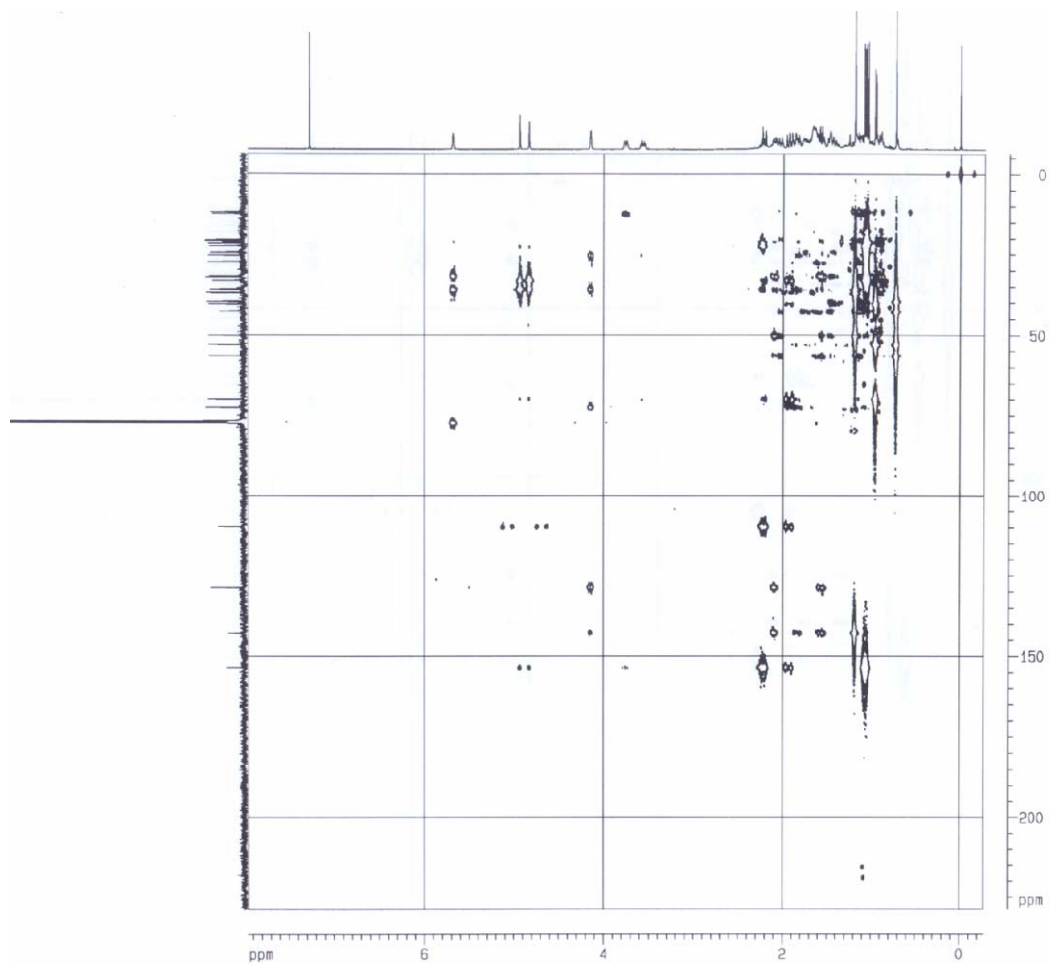
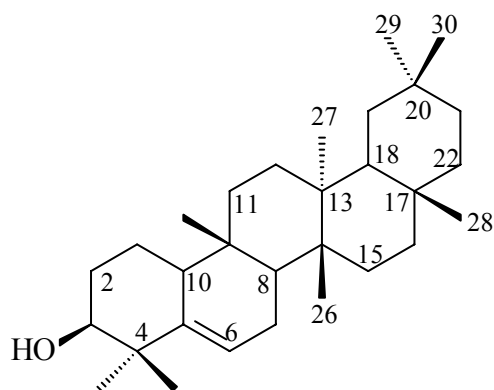


Figura 1.41. Mapas de contorno de HMBC (CDCl_3 , 400 MHz) da substância **19**.

4.2.2.3. Determinação estrutural da substância 15.

A substância **15** foi isolada como um sólido amarelo a partir do extrato em diclorometano das folhas de *Raputia praetermissa*



(Rutaceae). Seu espectro de RMN ^1H (Figura 1.42) apresentou características de um triterpeno do tipo oleanano.

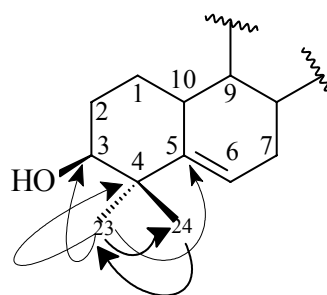
Observou-se a presença de oito metilas em δ 1,16; δ 1,14; δ 1,09; δ 1,04; δ 1,00; δ 0,98; δ 0,95; δ 0,88 e δ 0,85. Na região mais desblindada do espectro pode-se observar um singlete largo em δ 3,46 (*sl*), típico de hidrogênio na posição três, que possui OH ligado ao C-3. Na região dos hidrogênios olefínicos observou-se um duplete largo integrando para 1H em δ 5,63 (*dl*, $J = 6,4$ Hz).

No espectro de RMN ^{13}C (Figura 1.43 e Tabela 1.10) foram observados 30 sinais. Na região dos carbonos olefínicos foram observados apenas dois sinais em δ 141,6 e δ 122,0. Através da análise do experimento de PENDANT pode-se perceber que o carbono em δ 141,6 tratava-se de um carbono do tipo sp^2 totalmente substituído e obviamente aquele em δ 122,0 sendo um carbono metínico. No espectro de HSQC (Figura 1.44) observou-se as correlações dos sinais dos hidrogênios em δ 3,46 e δ 5,63 com os sinais dos carbonos em δ 77,0 e δ 122,0, respectivamente. Observou-se ainda a correlação dos sinais dos hidrogênios das metilas: δ 1,16 (δ 32,0), δ 1,14 (δ 25,4); δ 1,09 (δ 19,6); δ 1,04 (δ 28,9); δ 1,00 (δ 18,4); δ 0,98 (δ 32,3); δ 0,95 (δ 34,5) e δ 0,85 (δ 16,2). Analisando o experimento de HMBC (Figura 1.45) não foram observadas correlações para H-3 (δ 3,46) e nem para o hidrogênio olefínico em δ 5,63. No entanto foram observadas correlações dos hidrogênios metílicos em δ 1,04 com os

sinais dos carbonos em δ 25,4 (Me), δ 40,8 (quaternário), δ 77,0 (C3) e δ 141,6 (sp^2 totalmente substituído) e o sinal em δ 1,14 apresentou as mesmas correlações exceto a correlação com o sinal de carbono metílico em δ 28,9. Os sinais referentes às metilas em δ 0,98 e δ 0,95, através do mapa de contornos de HMBC (Figura 1.45) correlacionam-se entre si e ainda apresentam outras duas correlações com os sinais dos carbonos em δ 28,2 e δ 33,1.

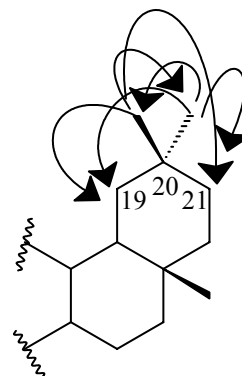
HMBC

- δ 1,04 (Me-23, *s*, δ 28,9)
- δ 25,4 (Me)
- δ 40,8 (C4)
- δ 77,0 (C3)
- δ 141,6 (C5)



- δ 1,14 (Me-24, *s*, δ 25,4)
- δ 28,9 (Me)
- δ 40,8 (C4)
- δ 77,0 (C3)
- δ 141,6 (C5)

- δ 0,98 (Me-29, *s*, δ 32,0)
- δ 34,5 (Me-30)
- δ 33,1 (C19)
- δ 28,2 (C21)



- δ 0,95 (Me-30, *s*, δ 34,5)
- δ 32,0 (Me-29)
- δ 33,1 (C19)
- δ 28,2 (C21)

Após levantamento bibliográfico realizado na literatura verificou-se que esta substância tratava-se do triterpeno pentacíclico do tipo oleanano conhecido como 3 β -hidroxiglutin-5-eno, já tendo sido isolado a partir de *Maytenus horrida* (González *et al.*, 1987) e *Tripetalum cymosum* (Leong *et al.*, 1999). Sendo assim sua identificação foi realizada através da análise de seus dados espectroscópicos e por comparação com a literatura (González *et al.*, 1987).

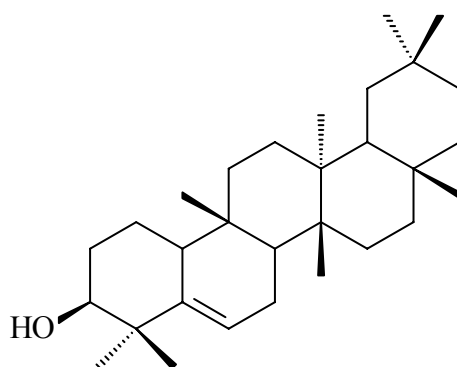


Tabela 1.10. Dados de RMN ^{13}C para a substância **15** em comparação com a literatura (González *et al.*, 1987, equipamento não informado).

Carbono	15 (CDCl ₃ , 200 MHz)	Literatura (CDCl ₃)
1	18,1	18,3
2	28,2	27,9
3	77,0	76,4
4	40,7	40,9
5	141,6	141,7
6	122,0	122,1
7	23,6	23,7
8	47,3	47,5
9	34,8	34,9
10	49,7	49,8
11	33,1	33,2
12	30,8	30,4
13	37,8	37,9
14	39,2	39,4
15	34,5	34,7
16	36,0	35,1
17	30,3	30,1
18	43,0	43,2
19	35,0	35,1
20	28,9	28,3
21	32,1	32,2
22	38,9	39,0
Me-23	30,0	29,0
Me-24	25,4	25,5
Me-25	16,1	16,2
Me-26	18,3	18,4
Me-27	19,5	19,6
Me-28	32,3	32,4
Me-29	32,0	32,1
Me-30	34,4	34,6

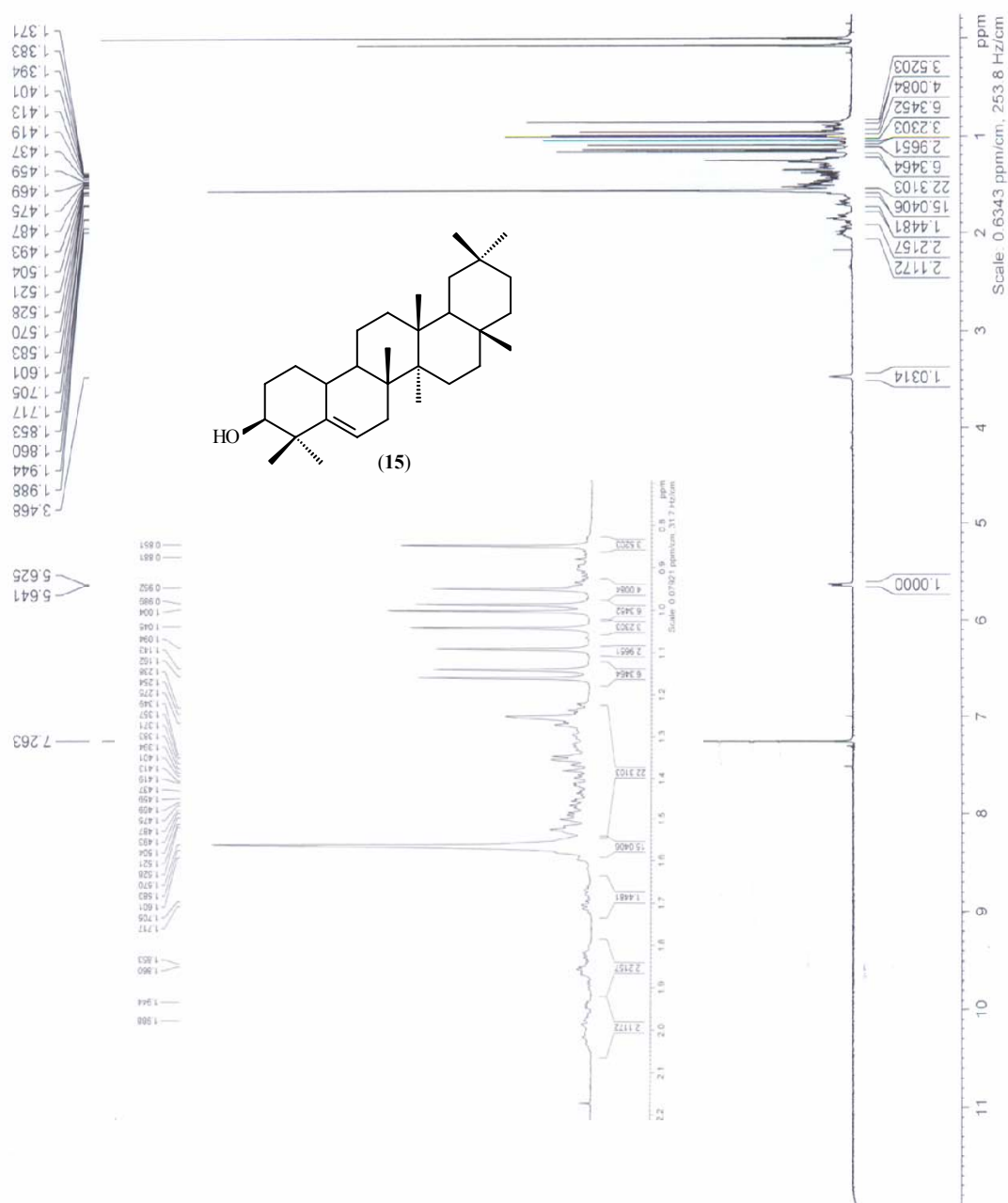


Figura 1.42. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da substância **15**.

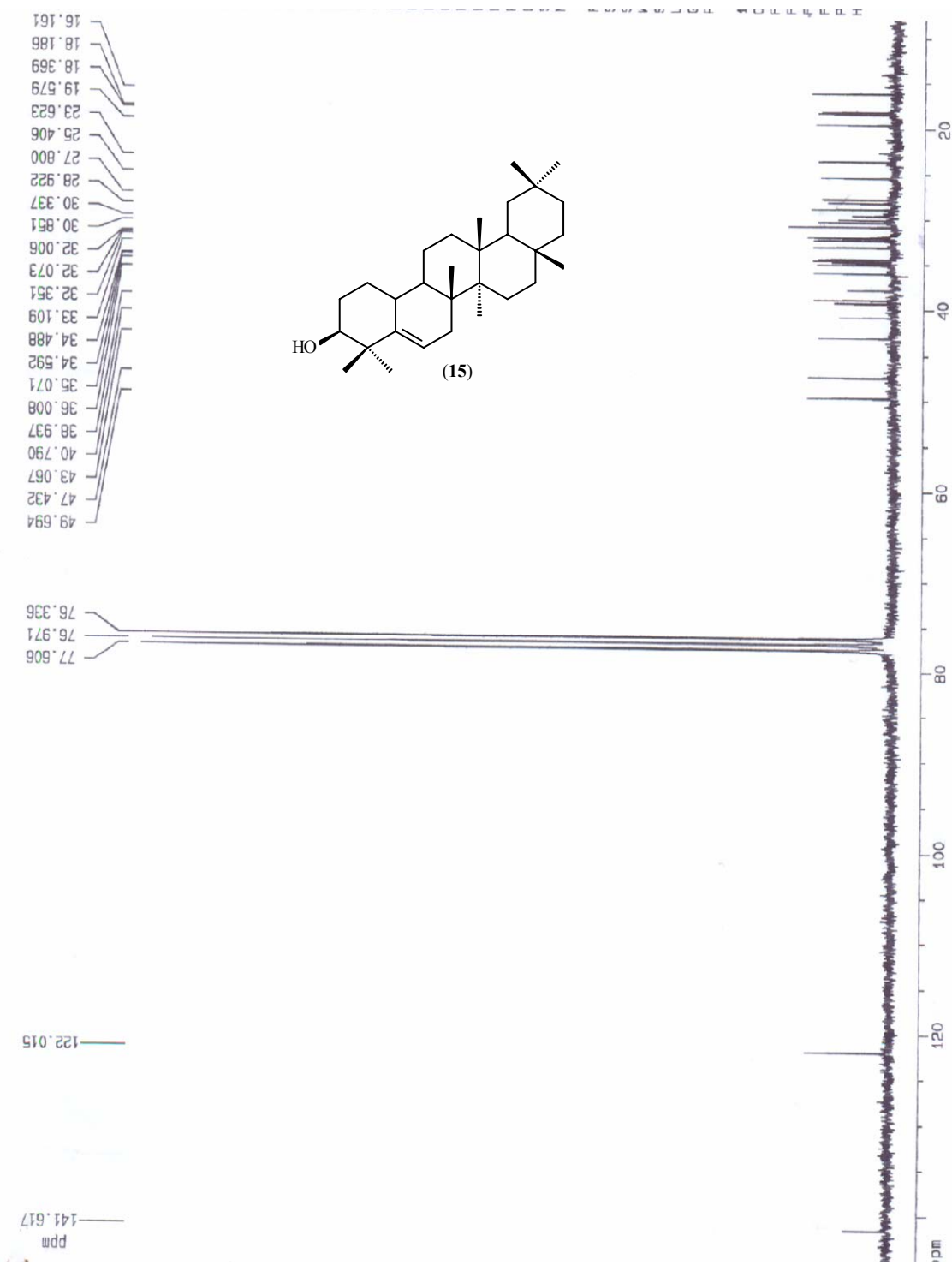


Figura 1.43. Espectro de RMN¹³C (CDCl₃, 100 MHz) da substância 15.

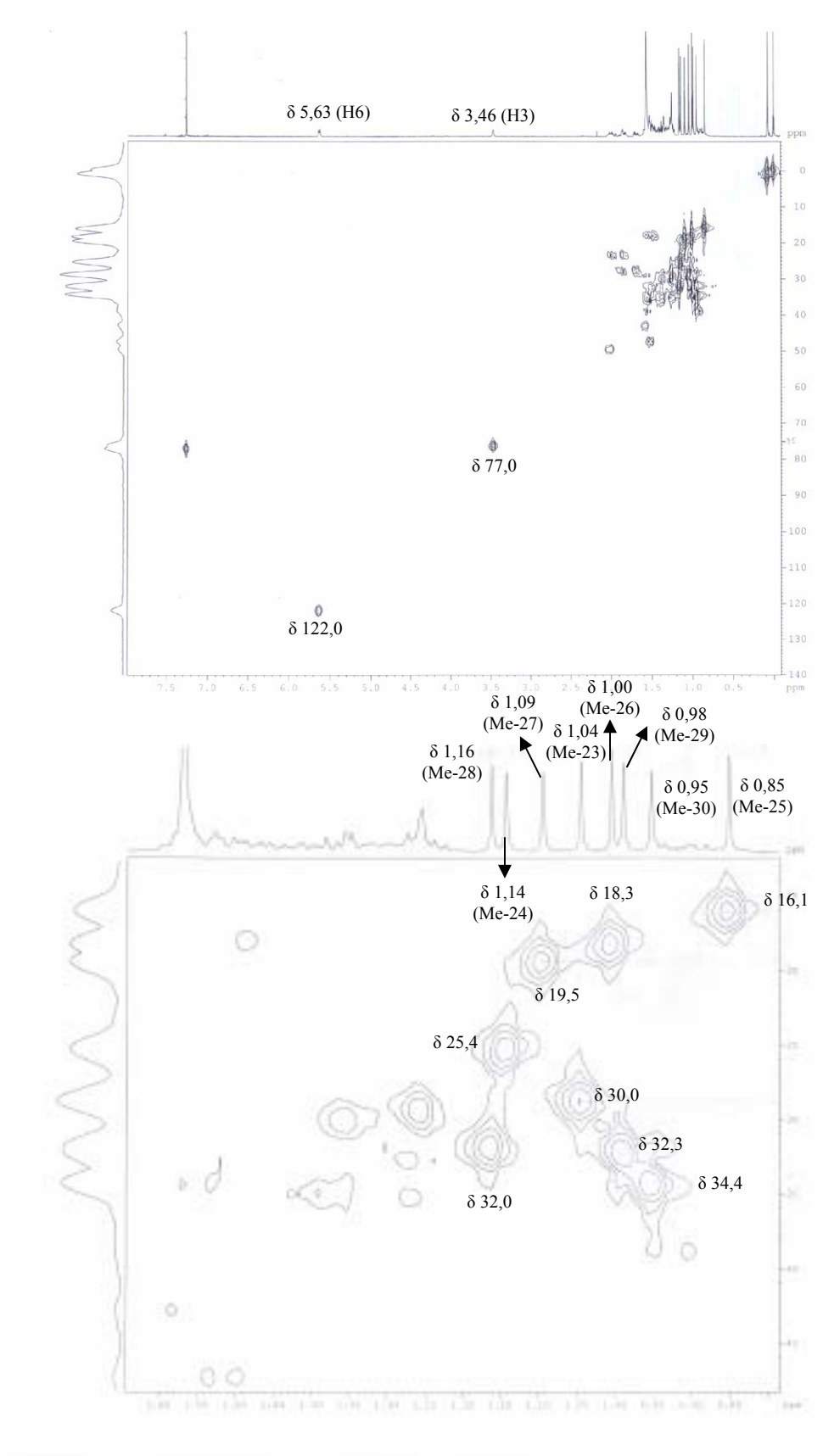


Figura 1.44. Mapas de contorno de HSQC (CDCl_3 , 400 MHz) da substância **15**.

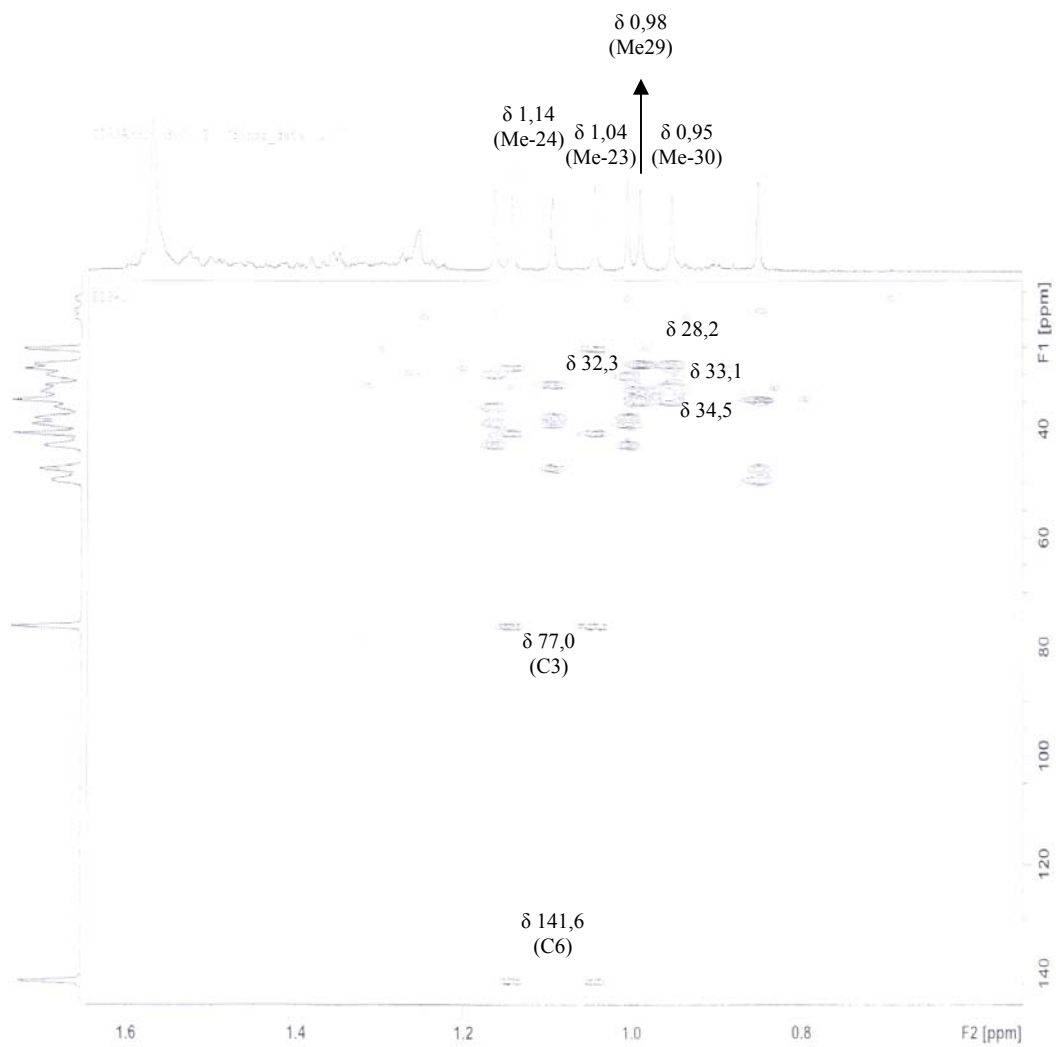
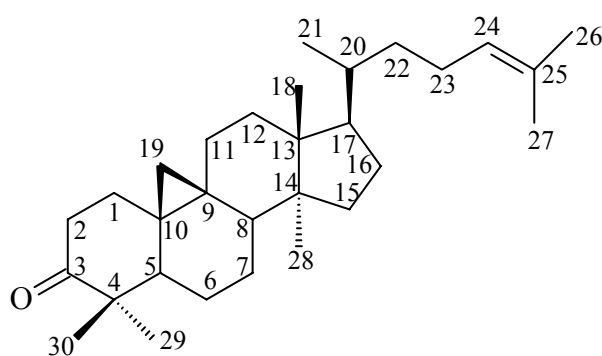


Figura 1.45. Mapas de contorno de HMBC (CDCl_3 , 400 MHz) da substância **15**.

4.2.2.4. Determinação estrutural da substância 1.

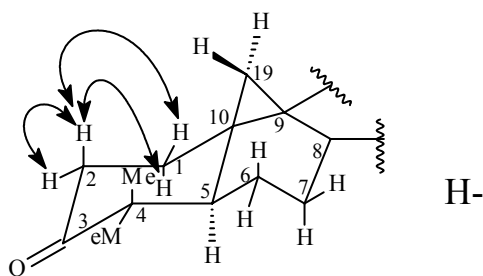
A substância **1** foi isolada a partir do extrato em hexano do caule de *R. praetermissa* (Rutaceae). Observou-se em seu espectro de



RMN¹H (Figura 1.46) na região dos hidrogênios metílicos a presença de sete sinais compreendidos entre δ 1,68 e δ 0,87. Sendo que os sinais em δ 1,68 e δ 1,60 podem ser

atribuídos a metilas sobre ligação dupla. Foram observados ainda a presença de dois dupletos em δ 0,79 e δ 0,57, ambos com constante de acoplamento de 4,0 Hz. Na região dos hidrogênios olefínicos observou-se a presença de um multipletto em δ 5,10, atribuído ao hidrogênio olefínico ligado a C-24. Estes sinais sugerem que a substância trata-se de um triterpeno do tipo cicloartano com carbonila em C-3.

O espectro de RMN¹H (Figura 1.46) mostrou ainda a presença de um duplo tripleto (*dt*) em δ 2,71, típico de hidrogênio α -carbonílico e sendo o H-2 β devido ao acoplamento geminal com H-2 α e pseudo-diaxial com 1 α com $J = 13,7$ Hz e ao acoplamento pseudo-axial-equatorial com H-1 β com $J = 6,4$ Hz conforme a estrutura conformacional ao lado.



O espectro de RMN¹³C (Figura 1.47 e tabela 1.11) mostrou um sinal em δ 216,5 que foi atribuído à carbonila em C-3 e os sinais em δ 130,8 e δ 125,2 estão de acordo com os valores encontrados na literatura para a ligação dupla entre C-24 e C-25 para o triterpeno do tipo cicloartano conhecido como cicloartenona (de Paula, 1996; Khuong-Huu *et al.*, 1975).

A tabela 1.8 apresenta os dados de RMN¹³C da substância **1** e ainda do modelo encontrado na literatura.

Tabela 1.11. Dados de RMN¹³C da substância **1** em comparação com os modelos da literatura.

Carbono	(1) (δ, CDCl ₃ , 50 MHz)	Lit. (δ, CDCl ₃ , 22,63 MHz)*
1	32,8	33,3
2	37,4	37,2
3	216,5	215,1
4	50,2	50,0
5	48,4	48,3
6	21,5	21,5
7	28,1	27,9
8	47,8	47,7
9	21,1	21,0
10	25,9	26,0
11	25,8	26,0
12	35,5	35,5
13	45,3	45,2
14	48,7	48,5
15	33,3	32,8
16	26,7	26,7
17	52,2	52,2
18	18,0	18,1
19	29,5	29,5
20	36,3	36,0
21	18,2	18,1
22	34,9	36,4
23	24,9	24,1
24	125,2	39,4
25	130,8	27,9
26	17,6	22,5
27	25,6	22,7
28	19,2	19,3
29	22,1	26,0
30	20,7	20,6

*Khuong-Huu *et al.*, 1975

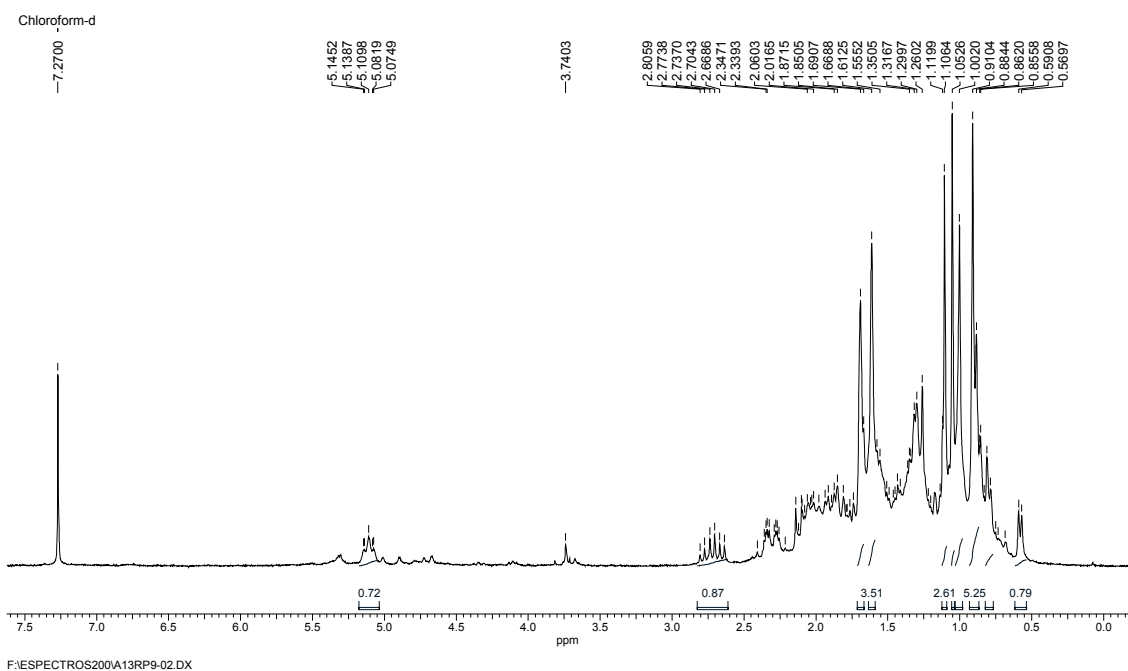


Figura 1.46. Espectro de RMN¹H (CDCl₃, 200 MHz) da substância **1**.

22 Jan 2008

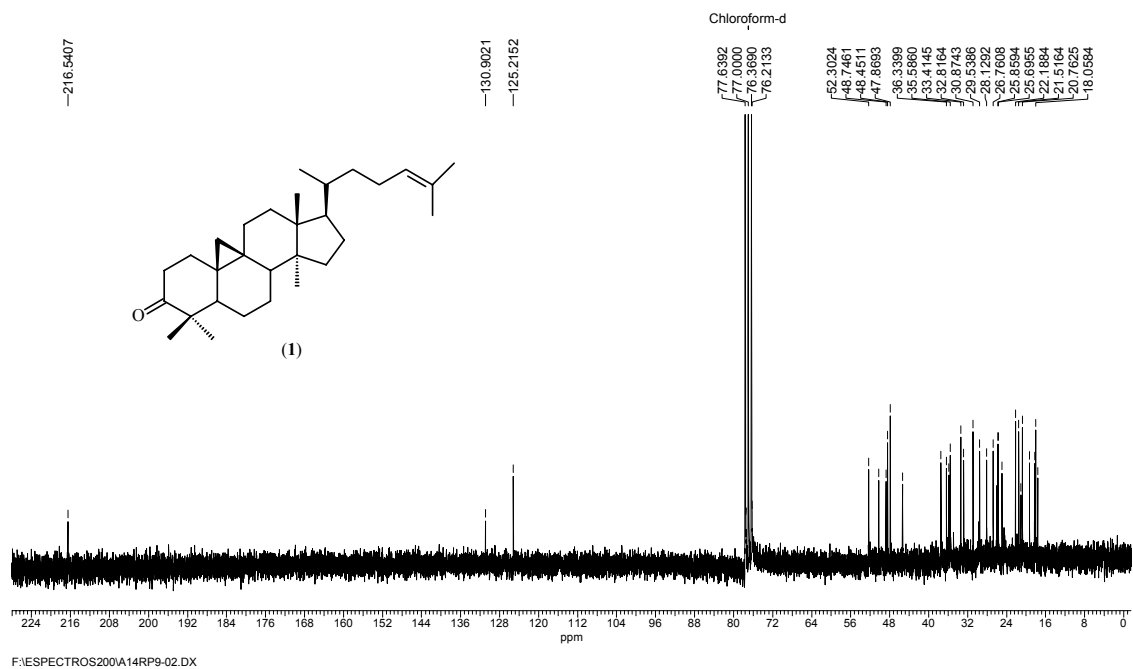
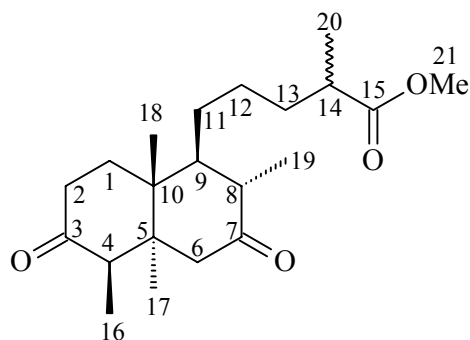


Figura 1.47. Espectro de RMN¹³C (CDCl₃, 50 MHz) da substância **1**.

4.2.2.5. Determinação estrutural da substância (16).

A substância (16) foi isolada como um óleo amarelo a partir do extrato em diclorometano das folhas de *Raputia praetermissa*



(Rutaceae). Observou-se em seu espectro de RMN ^1H (Figura 1.48) na região mais próxima ao TMS a presença de sinais que caracterizaram a presença de cinco metilas. Observou-se um singlete em δ 1,14 que integrou para 6H sugerindo a presença de duas metilas. Observou-se ainda a presença de três dupletos de metila em δ 1,23 ($J = 6,7$ Hz), δ 1,03 ($J = 7,0$ Hz) e δ 1,13 ($J = 6,9$ Hz). A presença destas metilas foi confirmada pela análise do espectro de RMN ^{13}C (Figura 1.49) e ainda pela análise do mapa de contorno de HSQC (Figura 1.51), onde pode-se verificar a correlação dos sinais dos hidrogênios metílicos δ 1,23 (δ 18,2); δ 1,03 (δ 19,8); δ 1,13 (δ 17,0); δ 1,14 (δ 16,9) e δ 1,14 (δ 11,1).

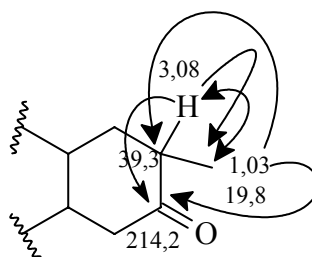
No espectro de COSY (Figura 1.50) observou-se o acoplamento entre o sinal de da metila em δ 1,03 com o sinal em δ 3,08 (α -carbonílico). Este último encontra-se ligado ao carbono em δ 39,3 (HSQC, figura 1.51) e por meio do HMBC (Figura 1.52), apresentou correlação com um sinal de carbono carbonílico em δ 214,2. A metila em δ 1,03 apresentou através do HMBC (Figura 1.52) correlação com os sinais em δ 214,2 (C = O); δ 39,3 e δ 31,7. Assim, pode-se sugerir até o momento:

COSY

- δ 3,08 (*m*) \leftrightarrow δ 1,03 (*d*, $J = 7,0$).

HMBC

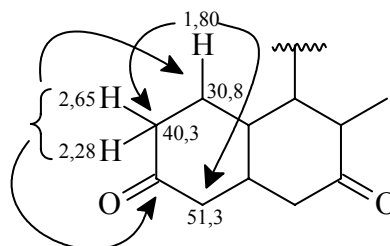
- δ 3,08 (δ 39,3) – H-8
- δ 214,2 (C-7);
- δ 19,8 (Me-19).
- δ 1,03 (δ 19,8) – Me-19
- δ 214,2 (C-7);
- δ 39,3 (C-8).



O sinal da carbonila em δ 214,2 ainda apresentou através do HMBC (Figura 1.52) correlação com os sinais dos hidrogênios diastereotópicos em δ 2,65 e δ 2,28, que através do mapa de contornos de HSQC (Figura 1.51) encontram-se ligados ao carbono em δ 40,8. Os sinais destes hidrogênios ainda apresentaram correlação com os sinais de carbono em δ 51,3 e δ 30,3 (CH e CH₂, respectivamente). O sinal em δ 51,3 correlacionou-se no HSQC com o sinal em δ 1,88 (*m*), que por sua vez apresentou correlação no HMBC com os sinais dos carbonos em δ 40,8 e δ 51,3. No espectro de COSY (Figura 1.50) observou-se o acoplamento entre os hidrogênios diastereotópicos, e ainda destes com o sinal em δ 1,88. Na figura 1.50 (COSY) observa-se ainda o acoplamento entre os sinais dos hidrogênios em δ 1,88 (H-9) e δ 3,08 (H-8).

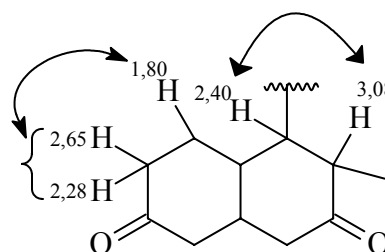
HMBC

- δ 2,65 (*dd*) e δ 2,28 (*m*) (δ 40,3) – H-2
- δ 211,2 (C-3);
- δ 30,8 (C-1);
- δ 1,80 (H-1)
- δ 51,3 (C-4);
- δ 40,3 (C-2).



COSY

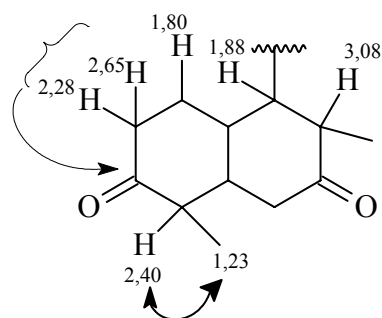
- δ 3,08 (H-8, *m*) \leftrightarrow δ 1,88 (H-9, *m*);
- δ 2,65 (H-2a, *dd*) e δ 2,28 (H-2b, *m*)
 \leftrightarrow δ 1,80 (H-1, *m*).



Na análise do espectro de RMN ^{13}C (Figura 1.49), observou-se a presença de 21 sinais de carbono, e o padrão do espectro de RMN ^1H permitem dizer que a substância **16** trata-se de um diterpeno. Observou-se ainda no experimento de RMN ^{13}C a presença de outro sinal de carbono carbonílico em δ 211,2 e um carboxílico em δ 177,0 (região característica de carbonila de éster). O sinal em δ 211,2 apresentou correlação com o sinal da metila em δ 1,23 (ligada ao carbono em δ 18,2). Partindo dos princípios biossintéticos, onde em sua maioria os terpenóides são oxidados em C-3, podemos sugerir que a carbonila em δ 211,2 encontra-se na posição três. No experimento de HMBC foi observada ainda a correlação do sinal da carbonila com o multiplete em δ 1,88 que pode ser atribuído a H-2, que está sobreposto a H-9.

COSY

- δ 2,40 (H-4, *m*) \leftrightarrow δ 1,23 (Me-16, *d*).



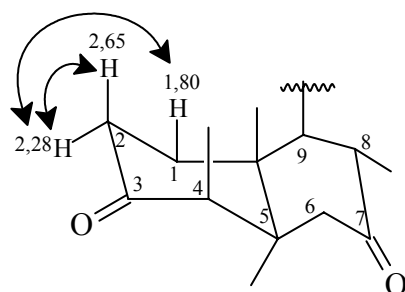
HMBC

- δ 2,28/2,65, H-2 (δ 40,3, C-2)
- δ 211,2 (C-3).

Os sinais das metilas que se sobrepuseram em δ 1,14 não apresentaram correlação via HMBC e no HSQC apresentaram correlação com os sinais de carbono em δ 16,9 e δ 11,1. Estes sinais foram atribuídos às metilas Me-17 e Me-18, respectivamente. No espectro de COSY foi observado o acoplamento entre os sinais de H-2 (equatorial) e H-2 (axial) e ainda de H-2 (equatorial) com H-1 (axial), com $J = 1,6$ Hz.

COSY

- δ 2,65 (H-2ax) \leftrightarrow δ 2,28 (H-2eq)
- δ 2,28 (H-2eq) \leftrightarrow δ 1,80 (H-1ax)

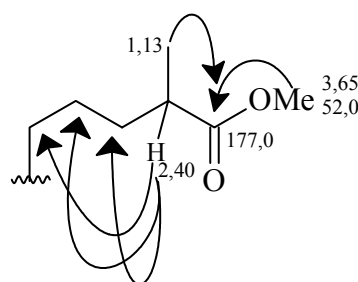


Na figura 1.48 (RMN ^1H) observou-se ainda a presença de uma metoxila em δ 3,65, que via HSQC (Figura 1.51) encontra-se ligada ao carbono em δ 52,0. No mapa de contorno de HMBC o sinal em δ 3,65 apresentou correlação com o sinal de um carbono carboxílico em δ 177,0 confirmando assim a existência de um grupo éster na molécula. A metila em δ 1,13 (*d*, $J = 6,9$ Hz, ligada ao carbono em δ 17,0) no espectro de COSY acoplou com o multipletto em δ 2,40 e no experimento de HMBC correlacionou com a carboxila em δ 177,0, permitindo sugerir que esta

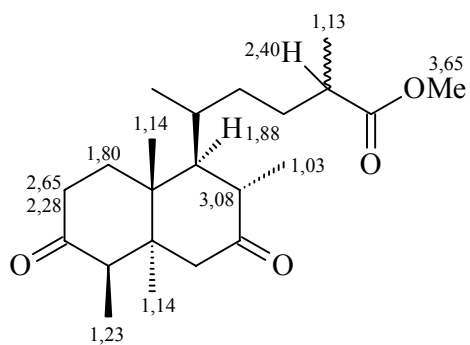
metila seja vizinha ao grupo éster. O sinal em δ 2,40 apresentou ainda correlação via HMBC com os sinais em δ 23,9 (CH₂), δ 33,6 (CH₂) e δ 40,8 (CH₂). Comparando-se os dados da substância **16** com um modelo mais próximo obtido na literatura (Zdero *et al.*, 1991), isolado a partir de *Chrysocoma coma-aurea* pode-se sugerir que o diterpeno do tipo clerodano (**16**) trata-se de uma substância nova na literatura.

HMBC

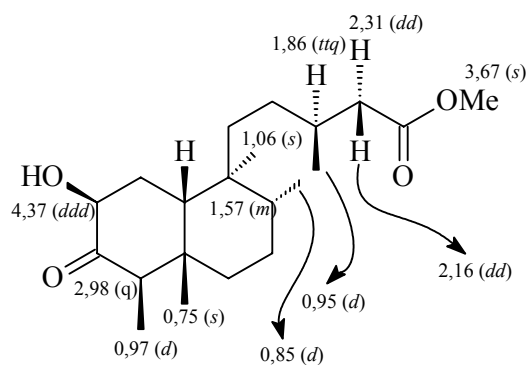
- δ 1,13 (δ 17,0): Me-20
- δ 177,0 (C-15).
- δ 3,65 (δ 52,0)
- δ 177,0 (C-15).
- δ 2,40 (δ 39,2): H-14
- δ 23,9 (C-13).
- δ 33,6 (C-12).
- δ 43,2 (C-11).



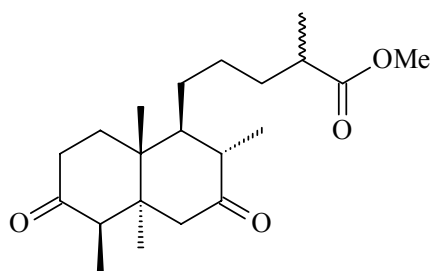
Realizou-se ainda experimentos de NOE (Figura 1.53). O sinal em δ 3,08 (H-9) foi irradiado causando nOe nos sinais dos hidrogênios em δ 1,03 (Me-19) e δ 2,28 (H-6eq). A irradiação do sinal em δ 2,65 (H-6ax) causou nOe no sinal em δ 2,28. O sinal em δ 2,28 quando irradiado provocou nOe nos hidrogênios em δ 2,65 e δ 1,88. A metila em δ 1,23 também teve seu sinal irradiado e foi observado nOe com o sinal em δ 2,65. Com base nos experimentos de NOE pode-se propor a configuração relativa para o diterpeno (**16**). Foi realizado ainda o experimento de CG-EM o obteve-se o íon molecular de m/z 350, levando à fórmula molecular C₂₁H₃₄O₄.



Raputia praetermissa (Rutaceae)



Chrysocoma coma-aurea (Zdero et al., 1991)



(16)

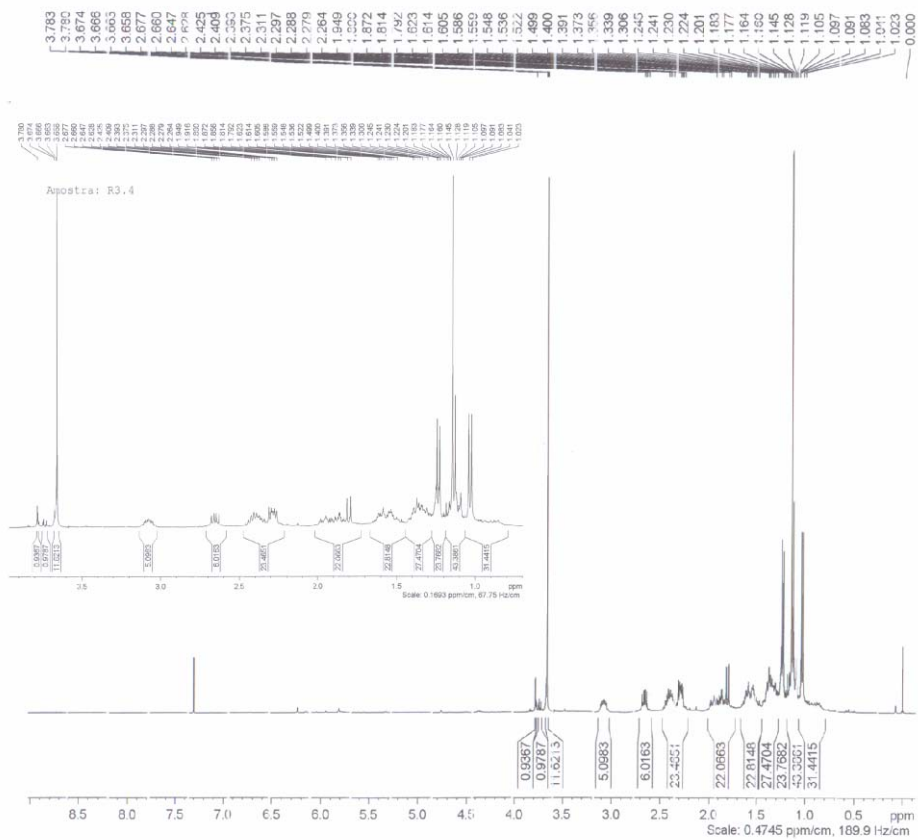


Figura 1.48. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da substância 16.

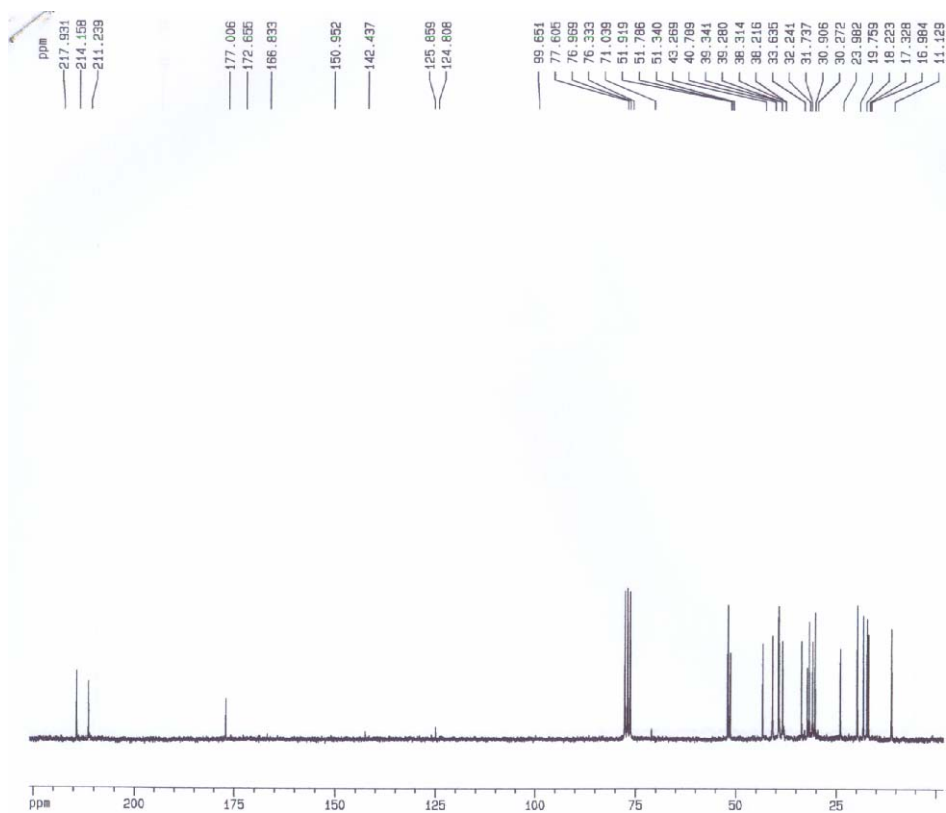


Figura 1.49. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) da substância 16.

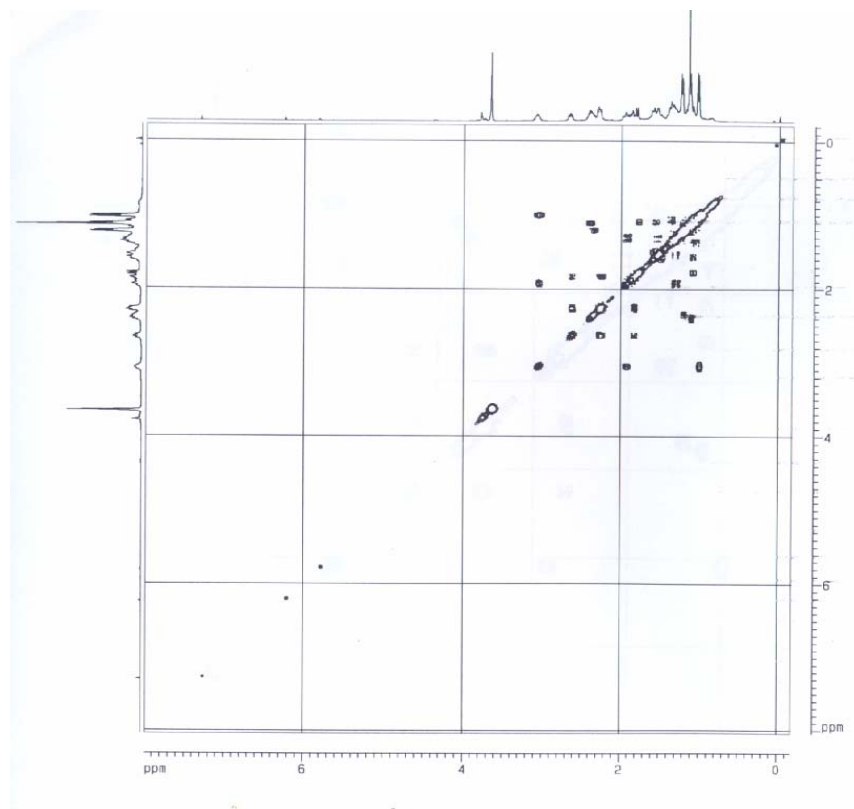


Figura 1.50. Espectro de COSY (CDCl₃, 400 MHz) da substância **16**.

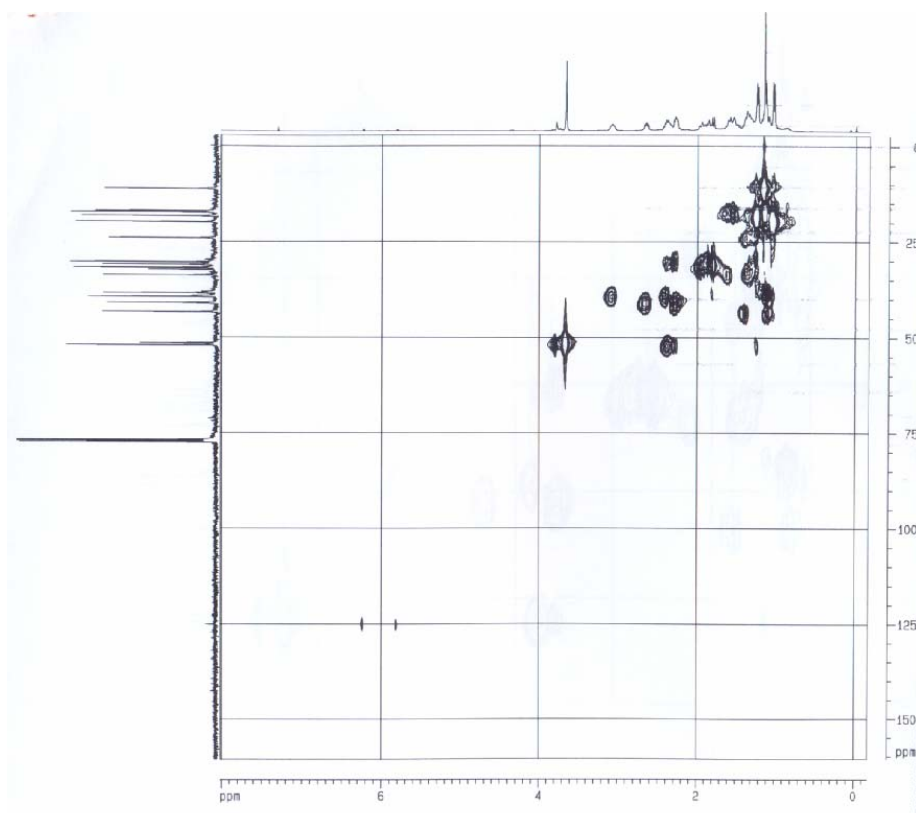


Figura 1.51. Mapa de contorno de HSQC (CDCl₃, 400 MHz) da substância **16**.

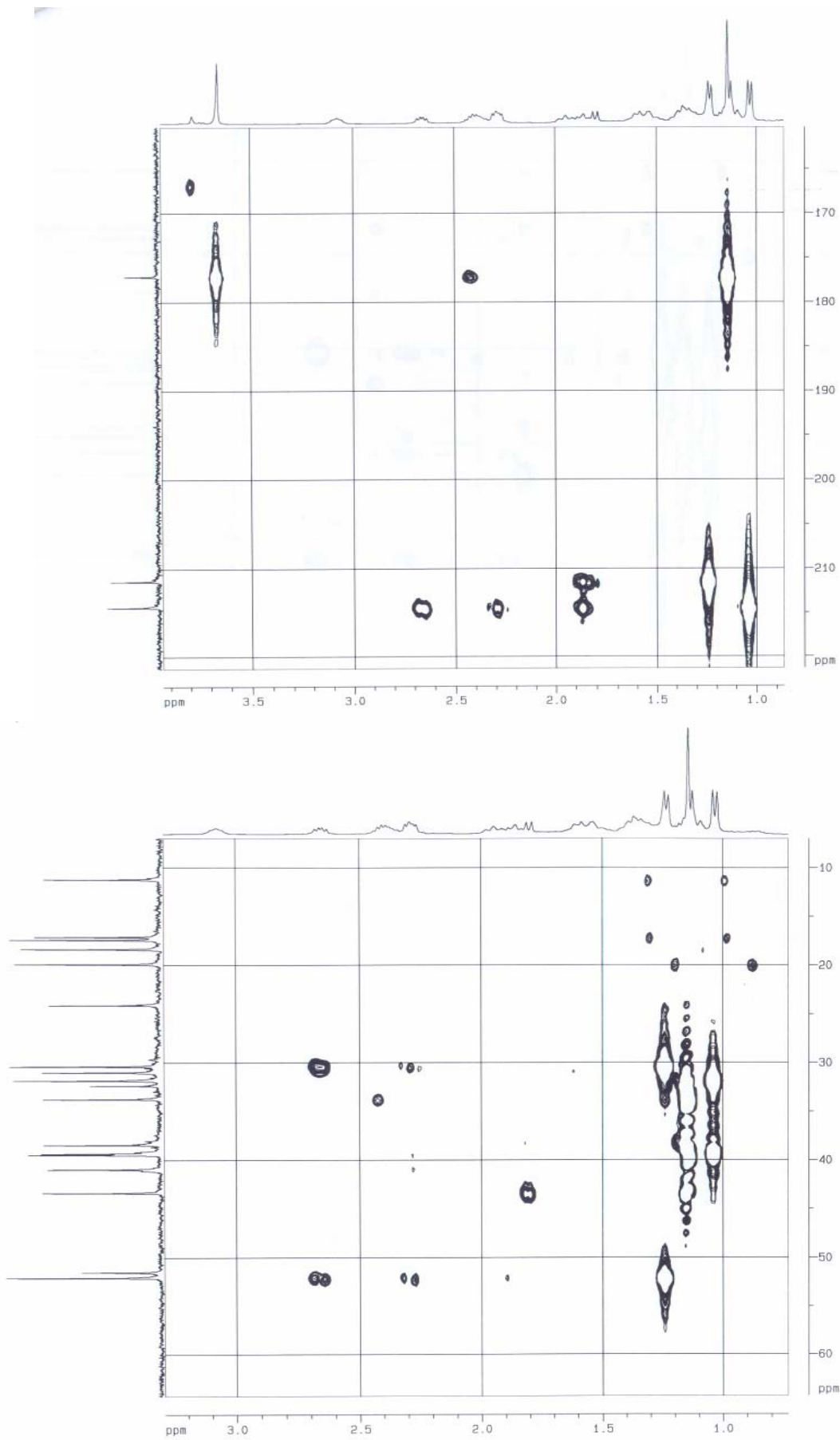


Figura 1.52. Mapas de contorno de HMBC (CDCl_3 , 400 MHz) da substância 16.

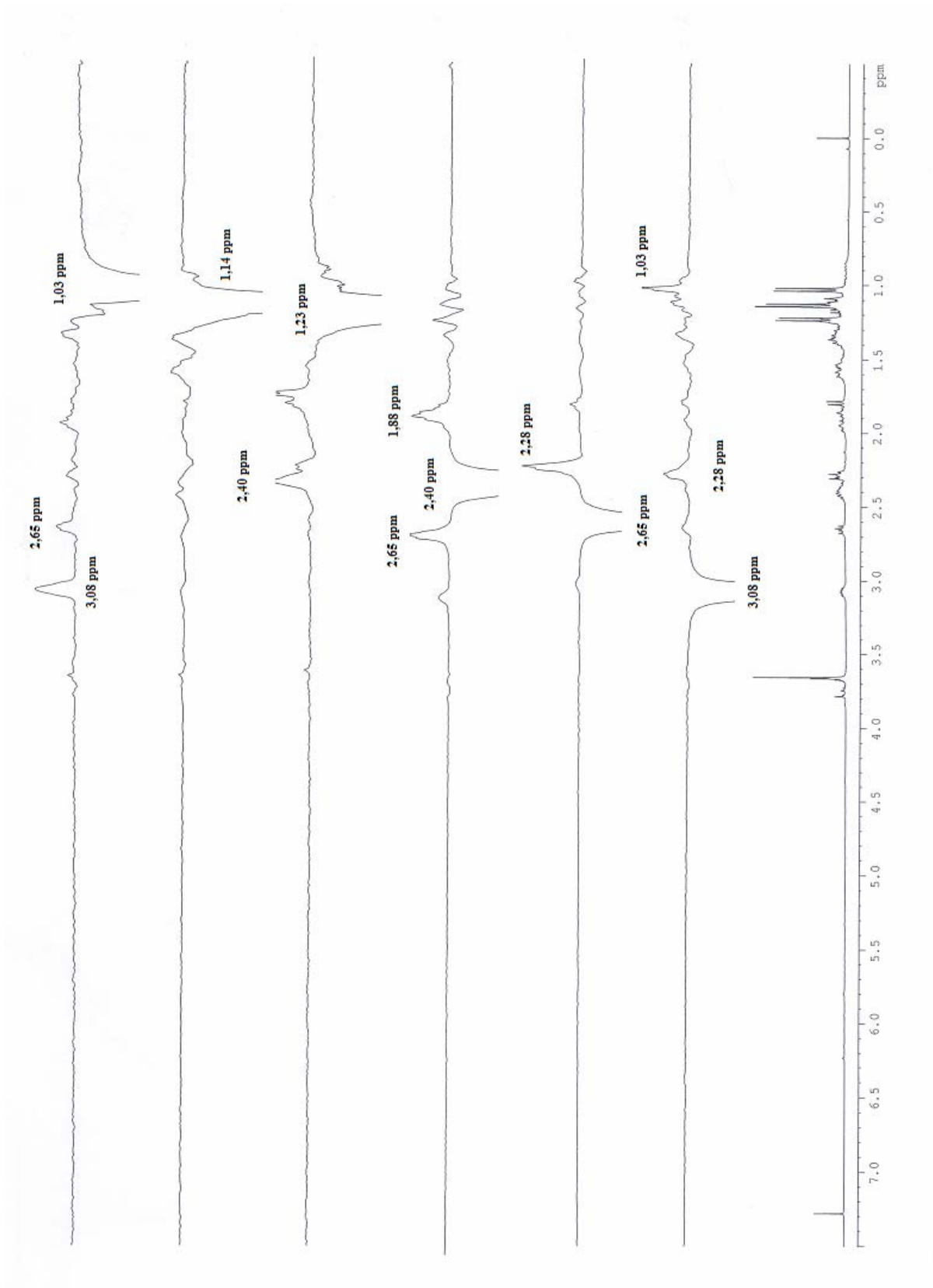
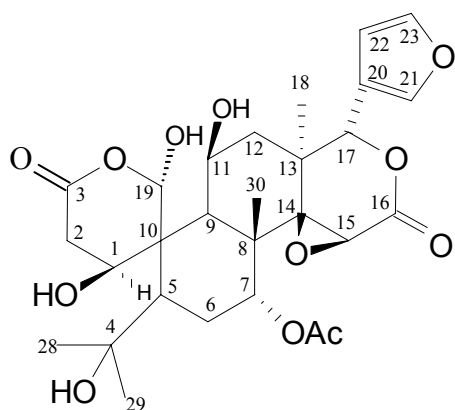


Figura 1.53. Experimento de NOE da substância **16** e ampliações (400 MHz, CDCl₃).

4.2.2.6. Determinação estrutural da substância 18.

A substância **18** foi isolada a partir do extrato em diclorometano das raízes de *Raputia praetermissa* (Rutaceae). O espectro

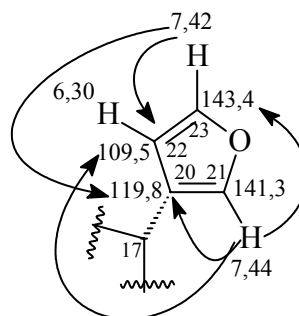


de RMN¹H (Figura 1.54 e Tabela 1.12) revelou a presença de quatro metilas em δ 1,48; δ 1,26; δ 1,16 e δ 1,10, e ainda um sinal de metila de grupo acetato em δ 2,16. Foram observados ainda sinais dos hidrogênios H-21 (δ 7,43), H-22 (δ 6,30) e H-23 (δ 7,44), característicos da presença

de anel furano de limonóide. No espectro de RMN ¹³C (Figura 1.55 e Tabela 1.12) foi possível observar sinais de carbonos lactônicos e do grupo acetato em δ 166,7; δ 167,7 e δ 169,5 e também sinais de carbonos oxigenados em δ 58,9; δ 69,4; δ 70,8; δ 73,9; δ 77,6; δ 78,9 e δ 79,5. A presença dos sinais dos hidrogênios furânicos e ainda o elevado número de átomos de carbono no espectro de RMN ¹³C sugerem que esta substância trata-se de um limonóide. O experimento de HMBC (Figura 1.58) revelou as correlações de H-21 (δ 7,44, δ 141,3) com C-22 (δ 109,5), C-23 (δ 143,4) e C-20 (δ 119,8); H-23 (δ 7,42, δ 143,4) com C-22, C-20 e C-21.

HMBC

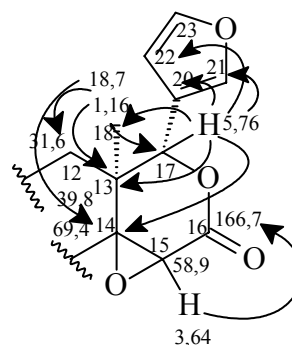
- δ 7,42 (δ 143,4), H-23:
 - δ 119,8 (C-20);
 - δ 109,5 (C-22).
- δ 7,44 (δ 141,3), H-21:
 - δ 119,8 (C-20);
 - δ 109,5 (C-22);
 - δ 143,4 (C-23).



O sinal em δ 5,76 atribuído a H-17, no HSQC (Figura 1.57) correlacionou com o sinal de carbono em δ 77,6 (C-17). No experimento de HMBC este sinal (δ 5,76) apresentou correlações com a Me-18 (δ 18,7); C-13 (δ 39,8), C-14 (δ 69,4), C-22, C-20 e C-21. O sinal em δ 1,16, (Me-18) apresentou correlação no HMBC com C-12 (δ 31,6), C-13 (δ 39,8), C-14 (δ 69,4) e C-17 (δ 77,6). A grande quantidade de carbonos oxigenados observados no RMN ^{13}C permite supor a presença de epóxido. Isto pode ser confirmado pelo espectro de RMN ^1H (Figura 1.54) que apresenta um sinal em δ 3,64 (*s*) que foi atribuído a H-15 e, segundo o HMBC (Figura 1.58), este sinal correlacionou com δ 166,7. Este sinal em δ 166,7 sugere a presença de lactona no anel D, sendo, portanto atribuído a C-16.

HMBC

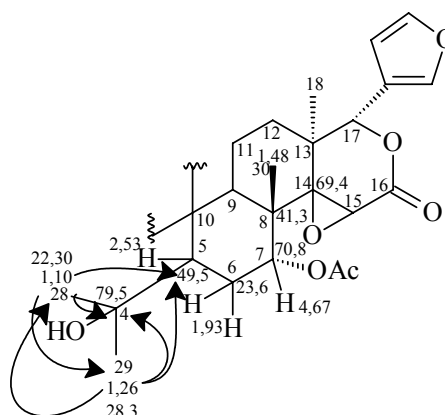
- δ 5,76 (δ 77,6), H-17:
 - δ 18,7 (Me-18);
 - δ 39,8 (C-13);
 - δ 69,4 (C-14);
 - δ 119,8 (C-20);
 - δ 141,3 (C-21);
 - δ 109,5 (C-22).
- δ 1,16 (δ 18,7), Me-18:
 - δ 31,6 (C-12);
 - δ 39,8 (C-13);
 - δ 69,4 (C-14);
 - δ 77,6 (C-17).
- δ 3,64 (δ 58,9), H-15:
 - δ 166,7 (C-16).



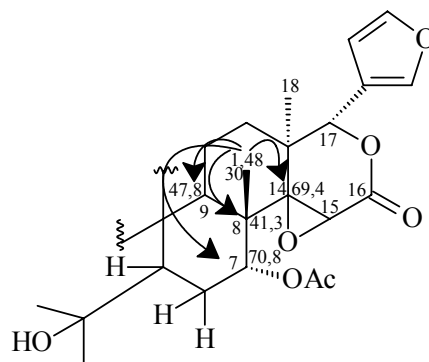
O sinal em δ 1,48 (δ 22,33) atribuído a Me-30, através do HMBC (Figura 1.58) apresentou correlações com C-8 (δ 41,3), C-9 (δ 47,8), C-7 (δ 70,8), C-14 (δ 69,4). As correlações com C-7 e C-14 garantem que o sinal em δ 1,48 (*s*) foi atribuído corretamente a Me-30. Os princípios biossintéticos permitem sugerir que este limonóide é oxigenado em C-7. Desta forma atribuiu-se a C-7 o sinal em δ 70,8, que via HSQC encontra-se ligado ao hidrogênio em δ 4,67 (*m*) sugerindo um oxigênio esterificado pelo grupo acetila. No HMBC o sinal de H-7 não apresentou correlações. Por outro lado no espectro de COSY (Figura 1.56), verificou-se seu acoplamento com o sinal em δ 1,93 (*m*), o qual pelo HSQC (Figura 1.57) e PENDANT trata-se de um carbono metilênico (δ 23,6), sendo atribuído a H-6. Observou-se pelo COSY (Figura 1.56) que H-6 acoplou com δ 2,53 (*dd*, $J = 2,7$ e $10,5$ Hz), que via HSQC correlaciona-se com δ 49,5 (CH no PENDANT), a este se atribuiu C-5. O HMBC mostra C-5 correlacionando com o hidrogênio de duas metilas. A Me-29 (δ 1,26, δ 28,3) correlacionou via HMBC com C-4 (δ 79,5), Me-28 (δ 22,30), C-5 (δ 49,5); a Me-28 mostrou correlação com a Me-29, C-5 e C4.

HMBC

- δ 1,26 (δ 28,3), Me-29:
 - δ 49,5 (C-5);
 - δ 22,30 (Me-28);
 - δ 79,5 (C-4).
- δ 1,10 (δ 22,30), H-15:
 - δ 49,5 (C-5);
 - δ 28,3 (Me-29);
 - δ 79,5 (C-4).



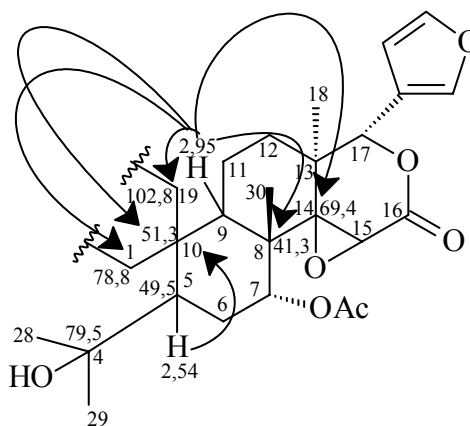
- δ 1,48 (δ 22,33), Me-30:
- δ 41,3 (C-8);
- δ 47,8 (C-9);
- δ 70,8 (C-7);
- δ 69,5 (C-14).



O sinal em δ 79,5 sugere a existência de um oxigênio em C-4, indicando anel A-seco. O sinal do carbono em δ 51,3, o qual correlaciona com H-5 (δ 2,53) foi atribuído a C-10. Outro sinal em δ 2,95 d ($J = 4,0$ Hz) correlaciona-se com δ 51,3 (C-10), C-14 (δ 69,4), C-8 (δ 41,3), C-1 (δ 78,8) e C-19 (δ 102,8), sugerindo ser este H-9.

HMBC

- δ 2,54 (δ 49,5), H-5:
- δ 51,3 (C-10).
- δ 2,95 (δ 47,3), H-9:
- δ 51,3 (C-10);
- δ 69,4 (C-14);
- δ 41,3 (C-8);
- δ 78,8 (C-1);
- δ 102,8 (C-19).

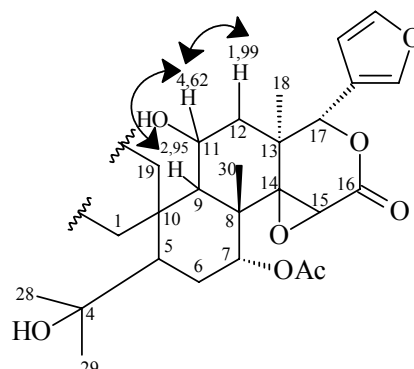


No espectro de COSY (Figura 1.56), verificou-se o acoplamento de H-9 (δ 2,95) com δ 4,62 (H-11, *sl*, δ 73,9), que foi atribuído a H-11. Este sinal acoplou com δ 1,99 d ($J = 7,9$ Hz), que no HSQC encontra-se ligado ao sinal em δ 31,6, que já foi atribuído a C-12,

devido à correlação com a Me-18. Este valor de δ 73,9 atribuído a C-11 permite que se adicione uma hidroxila nesta posição.

COSY

- δ 2,95 (H-9) \leftrightarrow δ 4,62 (H-11)
- δ 4,64 (H-11) \leftrightarrow δ 2,00 (H-12)



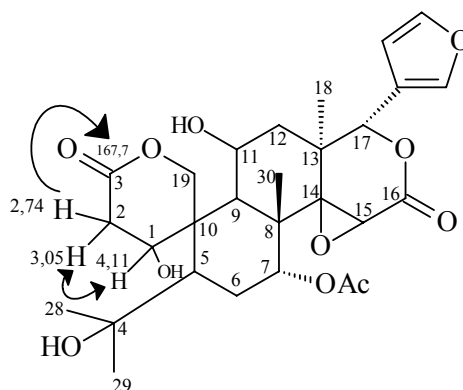
O carbono em δ 78,8 (C-1) via HSQC correlacionou-se ao sinal em δ 4,11 e via COSY mostrou acoplamento com H-2 (δ 2,74, $J = 1,5$ Hz). No entanto, não foi verificado acoplamento geminal entre H-2a e H-2b (δ 3,05 e δ 2,74). No experimento de HMBC, o sinal em δ 3,05 não mostrou correlação, porém o sinal em δ 2,74 correlacionou com um sinal de lactona em δ 167,7. Estas correlações sugerem uma hidroxila localizada em C-1 (δ 78,8), uma lactona em C-3 (167,7), e os sinais em δ 3,05 e δ 2,74 correspondem a H-2 (δ 35,8).

HMBC

- δ 2,74 (δ 35,8), H-2a:
- δ 167,7 (C-3).

COSY

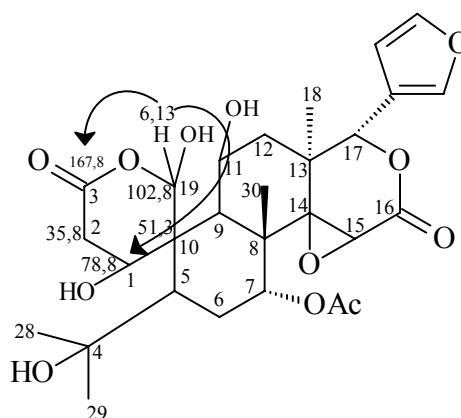
- δ 4,11 (H-1) \leftrightarrow δ 3,05 (H-2b)



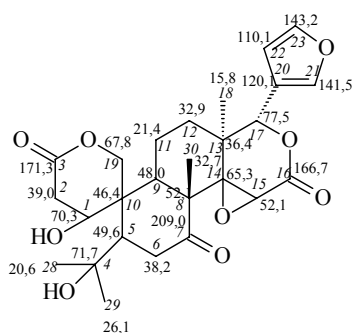
O sinal em δ 102,8 é um CH (através do PENDANT) e como não existe sinal de hidrogênios olefínicos correspondente, este provavelmente trata-se de um hemeacetal. Este sinal de carbono encontra-se correlacionado ao sinal de hidrogênio em δ 6,13, via HSQC. Assim, estes sinais de ^1H e ^{13}C só podem ser atribuídos a H-19 e C-19, o que explica as correlações no HMBC de H-19 com a lactona em δ 167,7 (C-3) e o carbono carbinólico em δ 78,8 (C-1).

HMBC

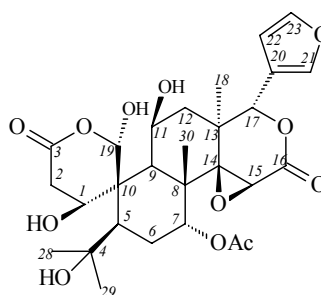
- δ 6,13 (δ 102,8), H-19:
- δ 167,7 (C-3);
- δ 78,8 (C-1).



Através de levantamento bibliográfico realizado verificou-se que a substância **18** apresenta esqueleto similar ao de outro limonóide isolado a partir de *Citrus reticulata* (Jayaprakasha *et al.*, 1997) conhecida como ichangina. Rosas (2005), através de experimentos de gNOESY, estabeleceu a configuração relativa para a substância **18**. Este A-seco limonóide isolado a partir de *Raputia praetermissa* recebeu o nome 11 β ,19 α -diidroxí-7-deoxo 7-acetoxi-ichangina.



Ichangina (Jayaprakasha *et al.*, 1997)
DMSO-d₆



11 β ,19 α -diidroxí-7-deoxo 7-acetoxi-ichangina (**19**)

Tabela 1.12. Dados dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C da substância **18** (CDCl_3 , 200 MHz) em comparação com a literatura (CDCl_3 , 400 MHz).

H/C	(18)		Literatura (Rosas, 2005)	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
1	4,11 <i>sl</i>	78,8	4,12 <i>sl</i>	78,8
2	2,74 <i>d</i> ($J = 1,5$) 3,05 <i>d</i> ($J = 3,3$)	35,8	2,71 <i>dd</i> ($J = 1,6; 17,0$) 3,00 <i>dd</i> ($J = 3,5$ e $17,0$)	35,8
3	-	167,7	-	167,8
4	-	79,5	-	79,5
5	2,53 <i>dd</i> ($J = 2,7$ e $10,5$)	49,5	2,54 <i>dd</i> ($J = 5,9$ e $12,5$)	49,5
6	1,93 <i>t</i> ($J = 2,7$)	23,6	1,92 <i>m</i>	23,7
7	4,67 <i>m</i>	70,8	4,67 <i>sl</i>	70,8
8	-	41,3	-	41,3
9	2,95 <i>d</i> ($J = 4,0$)	47,8	2,94 <i>d</i> ($J = 4,5$)	47,8
10	-	51,3	-	51,3
11	4,62 <i>sl</i>	73,9	4,64 <i>m</i>	73,9
12	1,99 <i>d</i> ($J = 7,9$)	31,6	2,00 <i>d</i> ($J = 8,0$)	31,6
13	-	39,8	-	39,8
14	-	69,4	-	69,5
15	3,64 <i>s</i>	58,9	3,64 <i>s</i>	58,9
16	-	166,7	-	166,8
17	5,76 <i>s</i>	77,6	5,76 <i>s</i>	77,5
18	1,16 <i>s</i>	18,7	1,17 <i>s</i>	18,8
19	6,13 <i>sl</i>	102,8	6,13 <i>s</i>	102,8
20	-	119,8	-	119,8
21	7,44 <i>sl</i>	141,3	7,44 <i>sl</i>	141,3
22	6,30 <i>sl</i>	109,5	6,31 <i>sl</i>	109,5
23	7,42 <i>d</i> ($J = 1,5$)	143,4	7,43 <i>d</i> ($J = 1,8$)	143,4
28	1,10 <i>s</i>	22,30	1,10 <i>s</i>	22,3
29	1,26 <i>s</i>	28,3	1,26 <i>s</i>	28,3
30	1,48 <i>s</i>	22,33	1,48 <i>s</i>	22,4
7-OAc	2,16 <i>s</i>	169,5 e 21,0	2,17 <i>s</i>	169,6 e 21,2

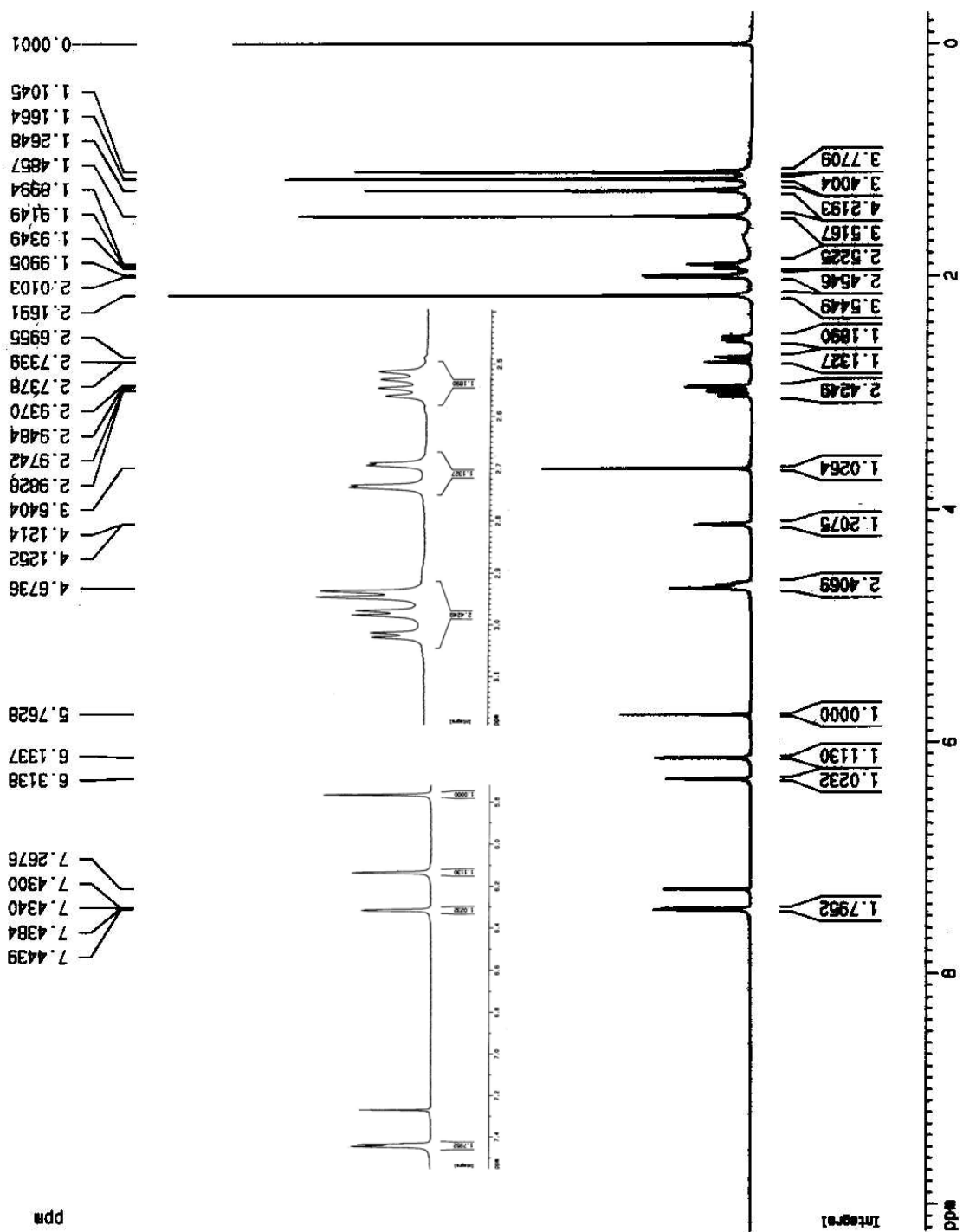


Figura 1.54. Espectro de RMN^1H (CDCl_3 , 200 MHz) da substância **18**.

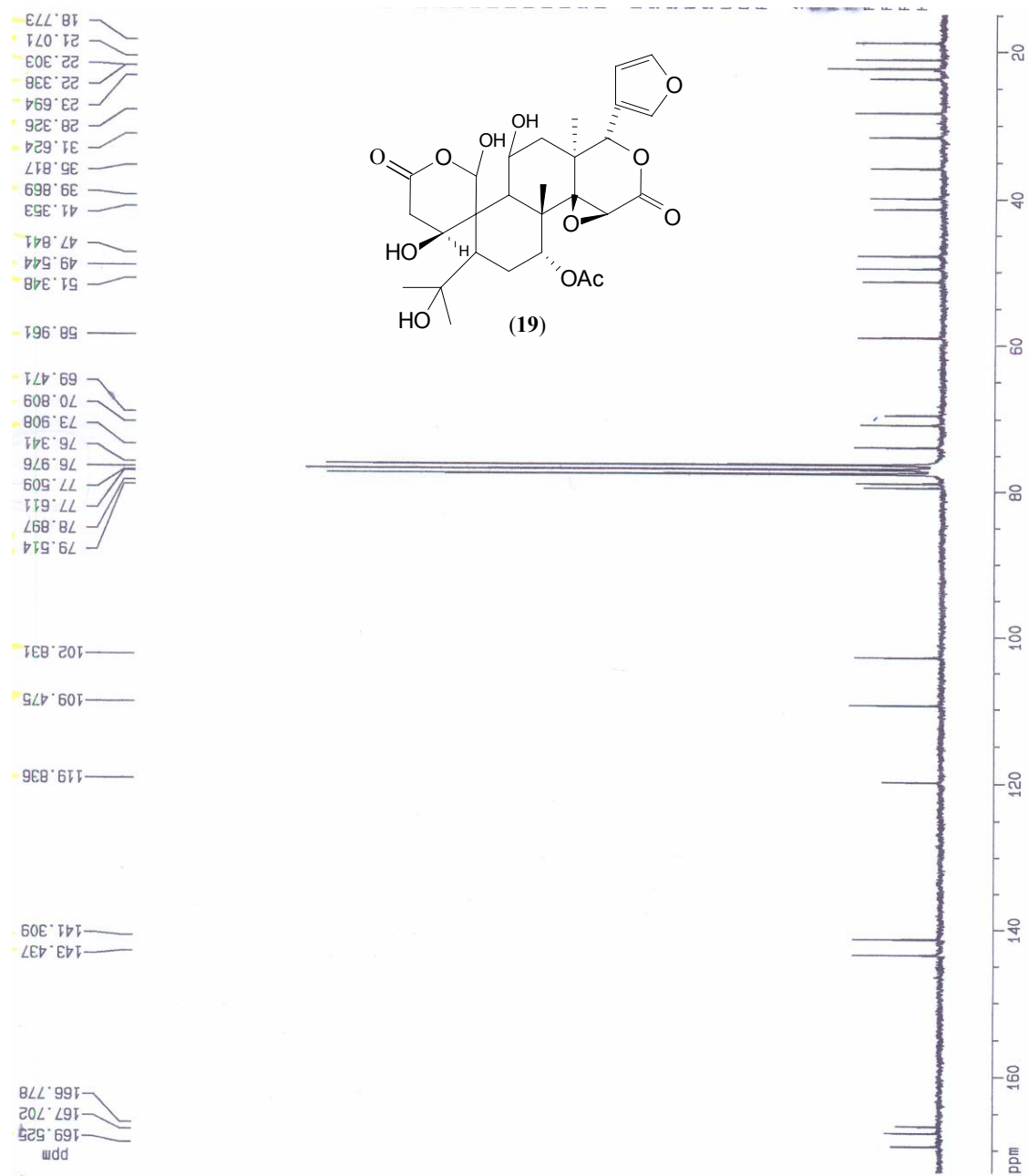


Figura 1.55. Espectro de RMN¹³C (CDCl₃, 50 MHz) da substância **18**.

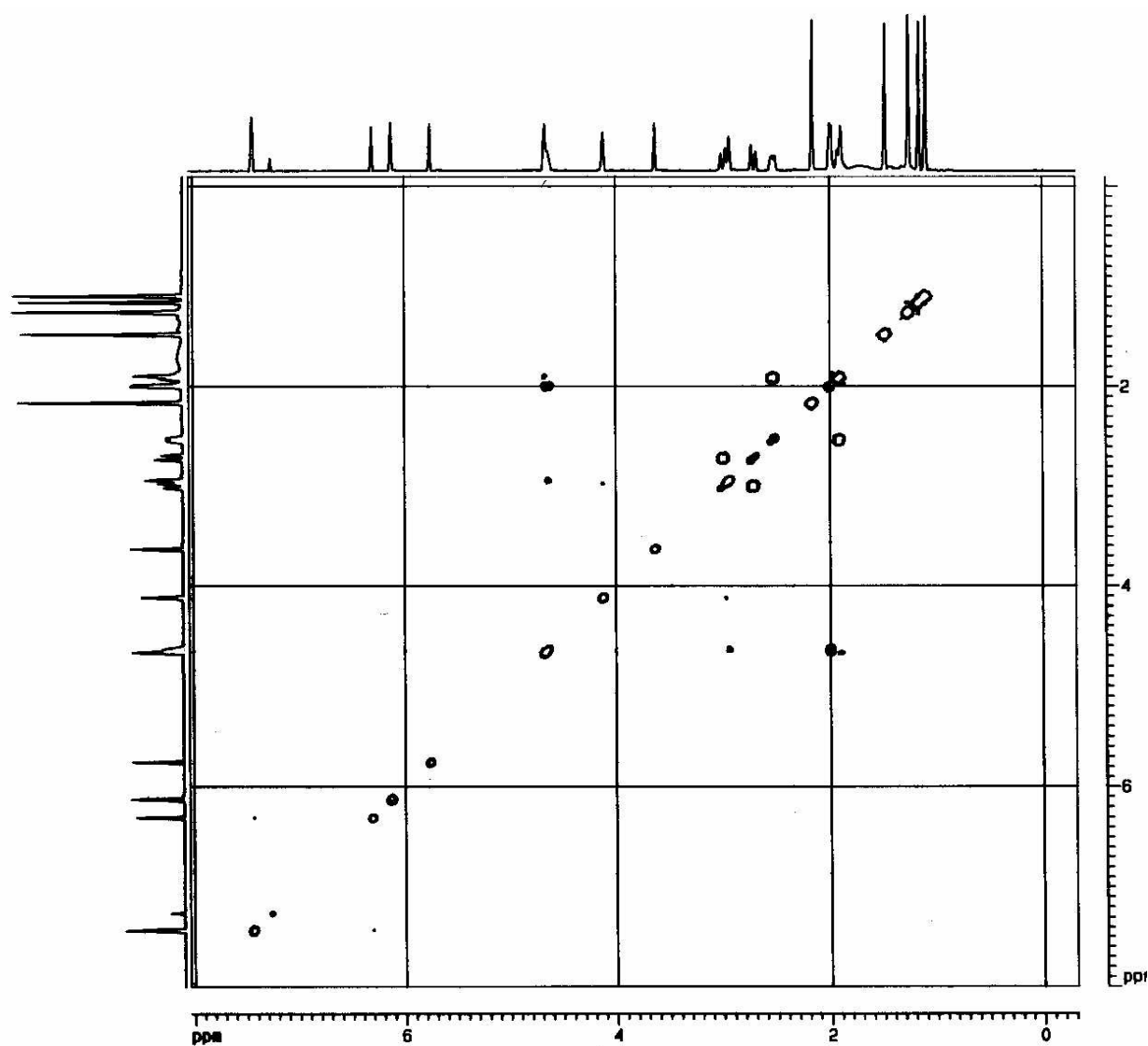


Figura 1.56. Espectro de COSY (CDCl_3 , 400 MHz) da substância **18**.

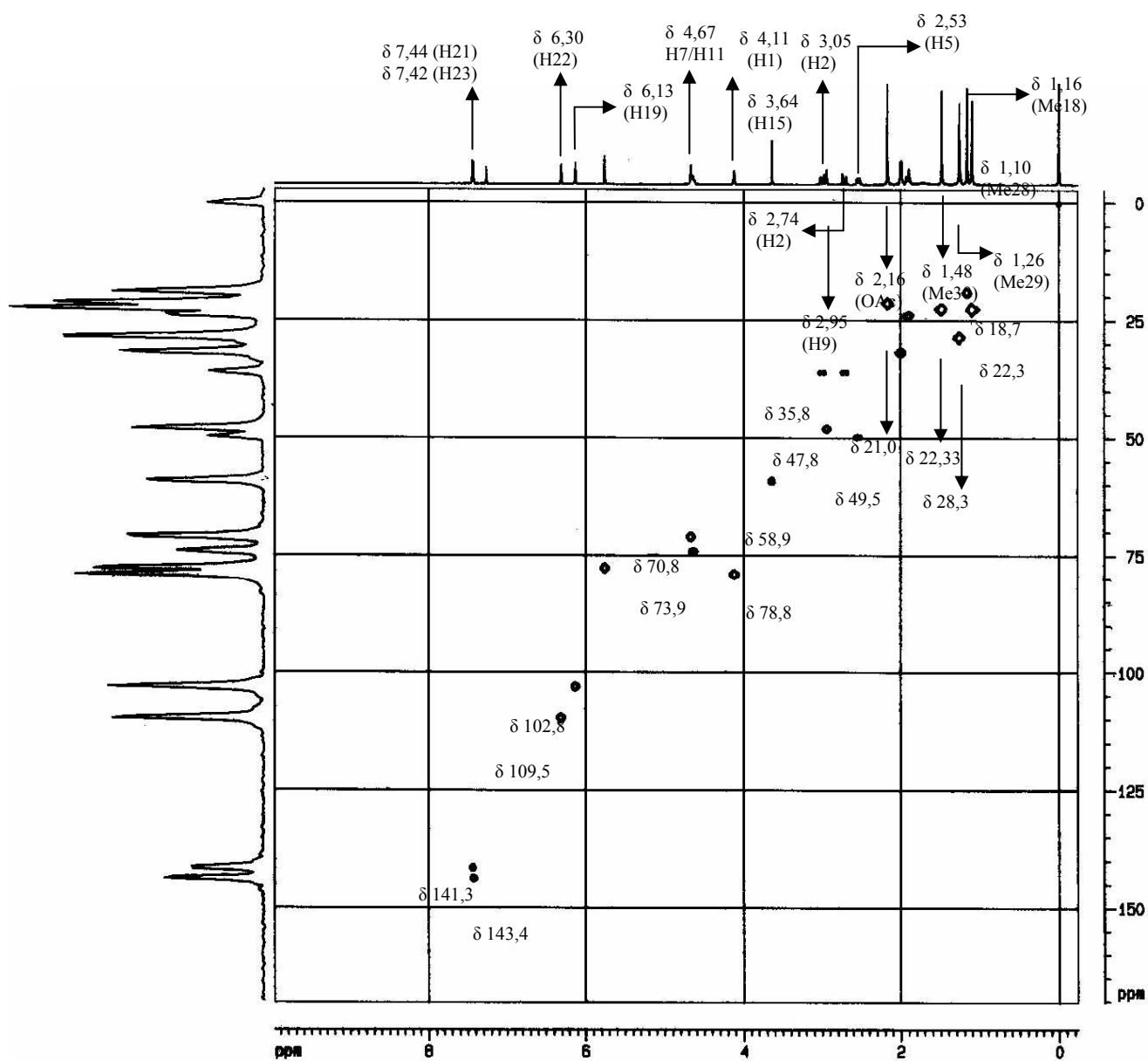


Figura 1.57. Mapa de contorno de HSQC (CDCl_3 , 400 MHz) da substância 18.

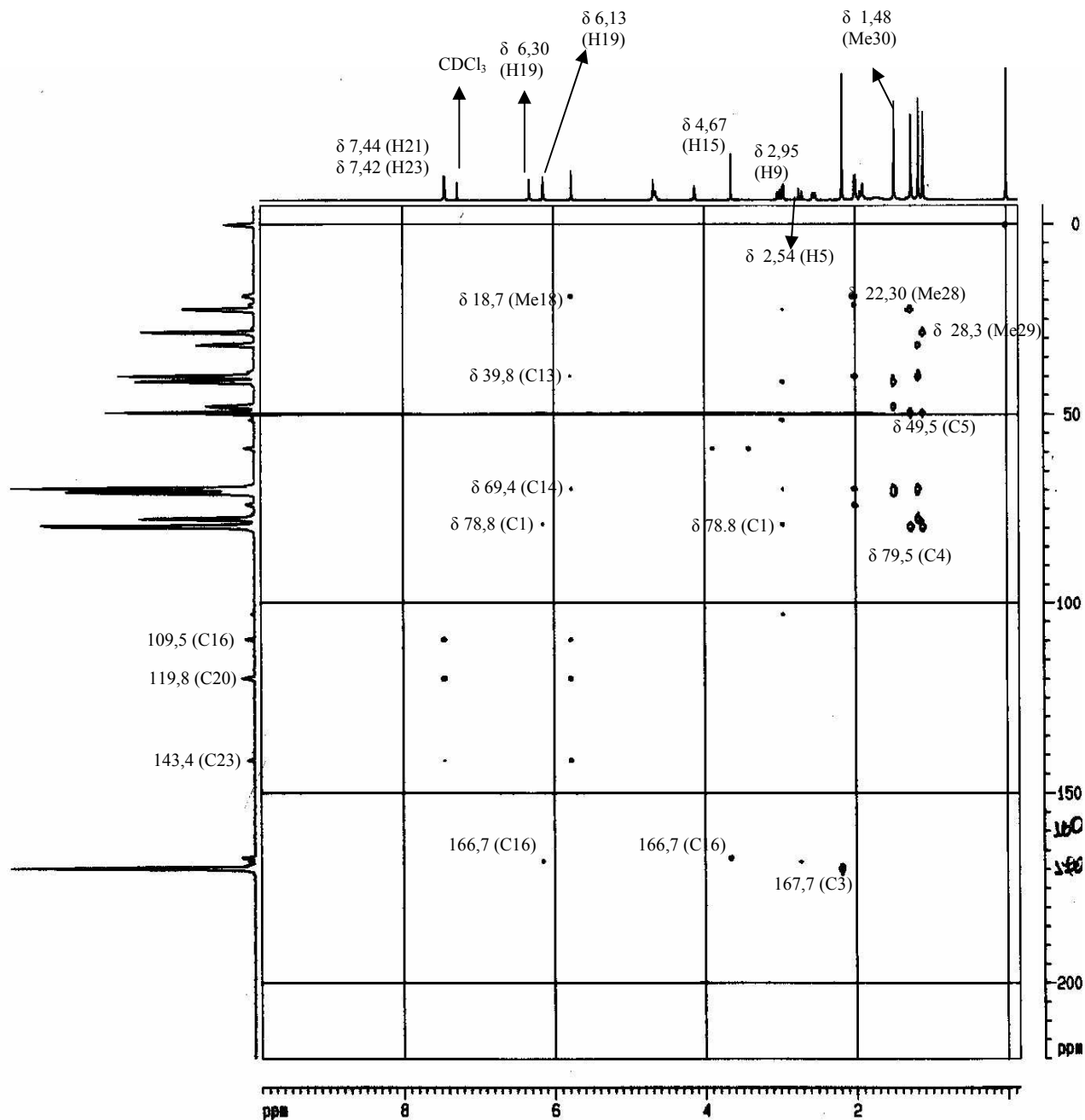
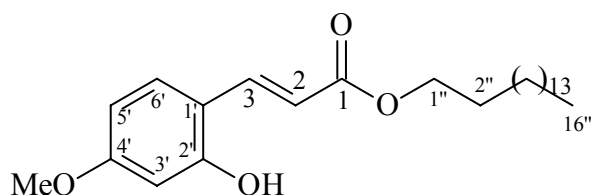


Figura 1.58. Mapa de contorno de HMBC (CDCl_3 , 400 MHz) da substância **18**.

4.2.3. Determinação estrutural do derivado do ácido cinâmico

4.2.3.1. Determinação estrutural da substância 6.



A substância **6** foi isolada a partir do estudo fitoquímico do extrato em diclorometano do caule de *R. praetermissa* (Rutaceae). Na análise de seu espectro de RMN ^1H (Figura 1.59 e Tabela 1.13) observou-se sinais na região mais desblindada do espectro, um duplete em δ 7,61 (d , $J = 15,8$), um duplo duplete em δ 7,07 (dd , $J = 1,7$ e $8,1$), e três dupletos em δ 7,03 (d , $J = 1,7$) δ 6,91 (d , $J = 8,1$) e δ 6,29 (d , $J = 15,8$). Os sinais em δ 7,61 e δ 6,29 são típicos de hidrogênios de ligação dupla em isomeria *trans*. Em seu espectro de RMN ^{13}C (Figura 1.60 e Tabela 1.13) foram observados sinais na região dos carbonos aromáticos entre δ 147,9 e δ 109,3 e também um sinal de uma carboxila de éster em δ 167,3 e na região dos carbonos oxigenados observou-se dois sinais em δ 64,5 e δ 55,9. Na região mais blindada do espectro foram observados um conjunto de sinais compreendidos entre δ 31,8 e δ 14,0.

O duplete em δ 6,91 via HSQC (Figura 1.63) apresenta-se ligado ao sinal de carbono em δ 114,6 e no experimento de COSY (Figura 1.61) acoplou com o duplo duplete em δ 7,07. Via o mapa de contorno do HMBC (Figura 1.62) observou-se a correlação de δ 6,91 com os sinais em δ 127,0 (C-2') e δ 146,7 (C-4'). O sinal em δ 7,07 está ligado ao carbono em δ 123,0 (C-5'), apresentou no experimento de HMBC correlações com os sinais de carbono em δ 109,3 (C-3'); δ 144,5 (C-3) e δ 147,9 (C-1'). O outro hidrogênio aromático em δ 7,03 (δ 109,3) correlaciona-se via HMBC com os sinais em δ 123,0 (C-5'); δ 144,5 (C-3); δ 146,7 (C-4') e δ 147,8 (c-

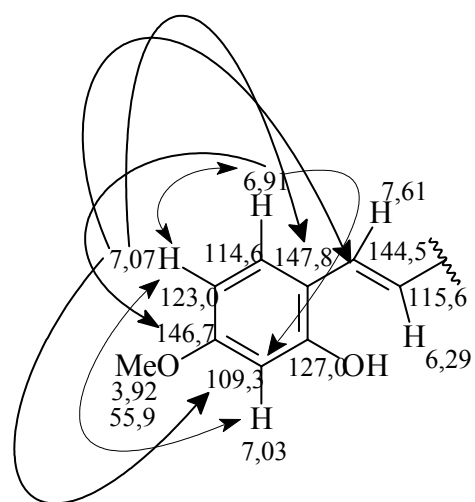
1'). O experimento de PENDANT nos permite sugerir que os sinais de carbono em δ 146,7 e δ 127,0 tratam-se de carbonos contendo oxigênios como substituintes, que supostamente fazem parte do anel aromático. No espectro de HMBC o sinal de carbono em δ 146,7 apresentou correlação com o sinal dos hidrogênios da metoxila em δ 3,92. O sinal δ 127,0 correlacionou com o sinal em δ 6,91 e com os sinais dos hidrogênios da ligação dupla *trans* em δ 7,61 e δ 6,29. O sinal em δ 7,61 que via HSQC (Figura 1.63) apresenta correlação com o sinal em δ 144,6, apresentou no experimento de COSY (Figura 1.61) acoplamento com o sinal em δ 6,29. No mapa de contorno de HMBC o sinal em δ 7,61 apresentou correlações com os sinais de carbonos em δ 109,3; δ 115,7; δ 123,0; δ 127,0 e com o sinal da carbonila em δ 167,3.

COSY

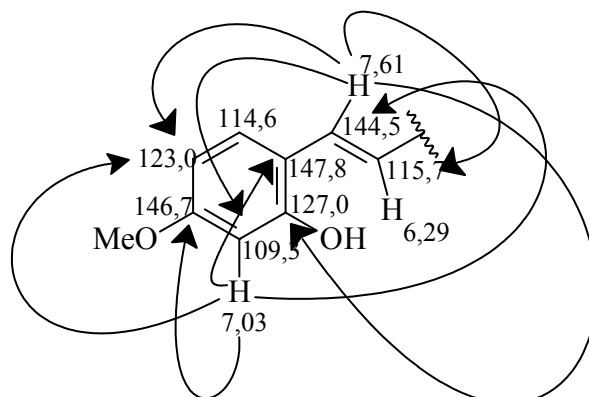
- δ 6,91 (*d*, $J = 8,1$) \leftrightarrow δ 7,07 (*dd*, $J = 8,1$);
- δ 7,07 (*dd*, $J = 1,7$) \leftrightarrow δ 7,03 (*d*, $J = 1,7$).

HMBC

- δ 6,91 (δ 114,6)
 - δ 127,0 (C-2');
 - δ 146,7 (C-4').
- δ 7,07 (δ 123,0)
 - δ 109,3 (C-3');
 - δ 144,5 (C-3);
 - δ 147,8 (C-1').



- δ 7,03 (δ 109,3)
- δ 123,0 (C-5');
- δ 144,5 (C-3);
- δ 146,7 (C-4');
- δ 147,8 (C-1').



- δ 7,61 (δ 144,5)
- δ 123,0 (C-5');
- δ 109,3 (C-3');
- δ 115,7 (C-2);
- δ 127,0 (C-2');
- δ 167,3 (C-1).

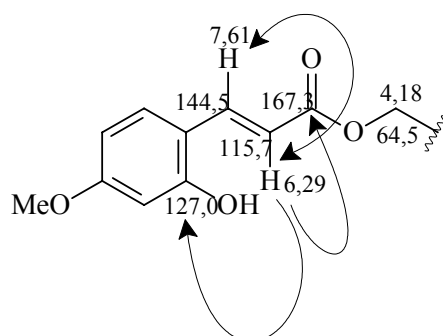
O sinal em δ 6,29 (δ 115,7) apresentou duas correlações via HMBC (Figura 1.63) com os sinais dos carbonos em δ 127,0 e δ 167,3. Esta última correlação sugere que a carbonila de éster pode ser vizinha a ligação dupla *trans*, o que explicaria a presença do carbono oxigenado em δ 64,5 que via HSQC (Figura 1.63) encontra-se ligado ao sinal de hidrogênio em δ 4,18, o qual no espectro de RMN¹H (Figura 1.59) integrou para 2H.

COSY

- δ 7,61 (*d*, $J = 15,9$) \leftrightarrow δ 6,29 (*d*, $J = 15,9$).

HMBC

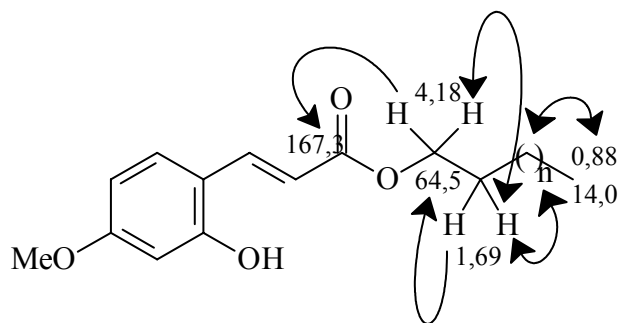
- δ 6,29 (C-2, δ 115,7)
- δ 127,0 (C-2');
- δ 167,3 (C-1).



No experimento de COSY (Figura 1.61) observou-se o acoplamento entre o sinal em δ 4,18 e o multiplete em δ 1,69 (m , $J = 6,8$). Este último sinal por sua vez apresentou acoplamento com um sinal bastante intenso em δ 1,25 sugerindo a presença de uma cadeia alquílica extensa que no espectro de RMN¹³C (Figura 1.60) pode ser observada por um conjunto de sinais entre δ 29,6 e δ 29,2. Este sinal em δ 1,25 via COSY (Figura 1.56) acoplou com um tripleto em δ 0,88, com constante de acoplamento de 6,6 Hz, o que pode ser atribuído a um grupo metil terminal que no HSQC (Figura 1.63) observou-se sua correlação com o sinal de carbono em δ 14,0. A substância **6** foi submetida a análise por CG-EM e obteve-se a massa molecular de 418 Da, levando à seguinte fórmula molecular C₂₆H₄₂O₄.

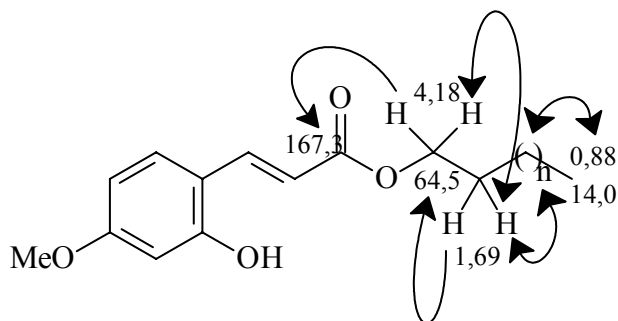
COSY

- δ 4,18 (t , $J = 6,8$) \leftrightarrow δ 1,69 (m , $J = 6,8$);
- δ 1,69 (m) \leftrightarrow δ 1,25 (m),
- δ 1,25 (m) \leftrightarrow δ 0,88 (t , $J = 6,6$).



HMBC

- δ 4,18 (δ 64,5)
- δ 167,3 (C-1);
- δ 25,9 (C-2');
- δ 28,7.
- δ 1,69
- δ 64,5;
- δ 25,9;
- δ 28,7.



Comparando-se os dados da substância **6** com um modelo obtido na literatura (Tang *et al.*, 1982) isolado a partir de *Hemarthria altissima* e ainda a partir de sua proposta sintética (Chen *et al.*, 2007) pode-se sugerir que **6** trata-se de uma substância classificada como nova na literatura. A esta substância atribuiu-se o nome 2'-hidroxi-4'-metoxicinamato de hexadecanila.

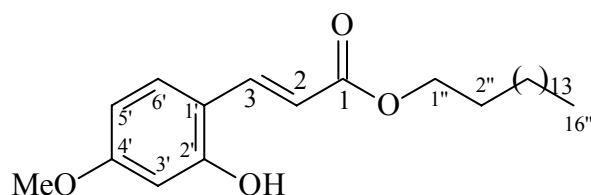
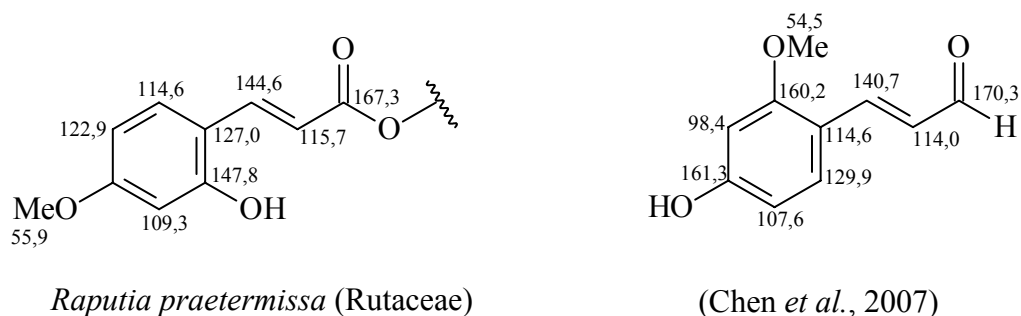


Tabela 1.13. Dados de RMN ^1H e ^{13}C (CDCl_3 , 400 e 100 MHz) para a substância **6**.

H/C	^1H	^{13}C
1	-	167,3
2	6,29 <i>d</i> ($J = 15,8$ Hz)	115,7
3	7,61 <i>d</i> ($J = 15,8$ Hz)	144,5
1'	-	147,9
2'	-	127,0
3'	7,03 <i>d</i> ($J = 1,7$ Hz)	109,3

4'	-	146,7
5'	7,07 <i>dd</i> ($J = 1,7$ e $8,1$ Hz)	123,0
6'	6,91 <i>d</i> ($J = 8,1$ Hz)	114,6
6'-OMe	3,92 <i>s</i>	55,9
1''	4,18 <i>t</i> ($J = 6,7$ Hz)	64,5
2''	1,69 <i>qui</i> ($J = 6,8$ Hz)	25,9
3'' – 15''	1,25 <i>sl</i>	29,6 – 28,7
16''	0,88 <i>t</i> ($J = 6,6$ Hz)	14,0

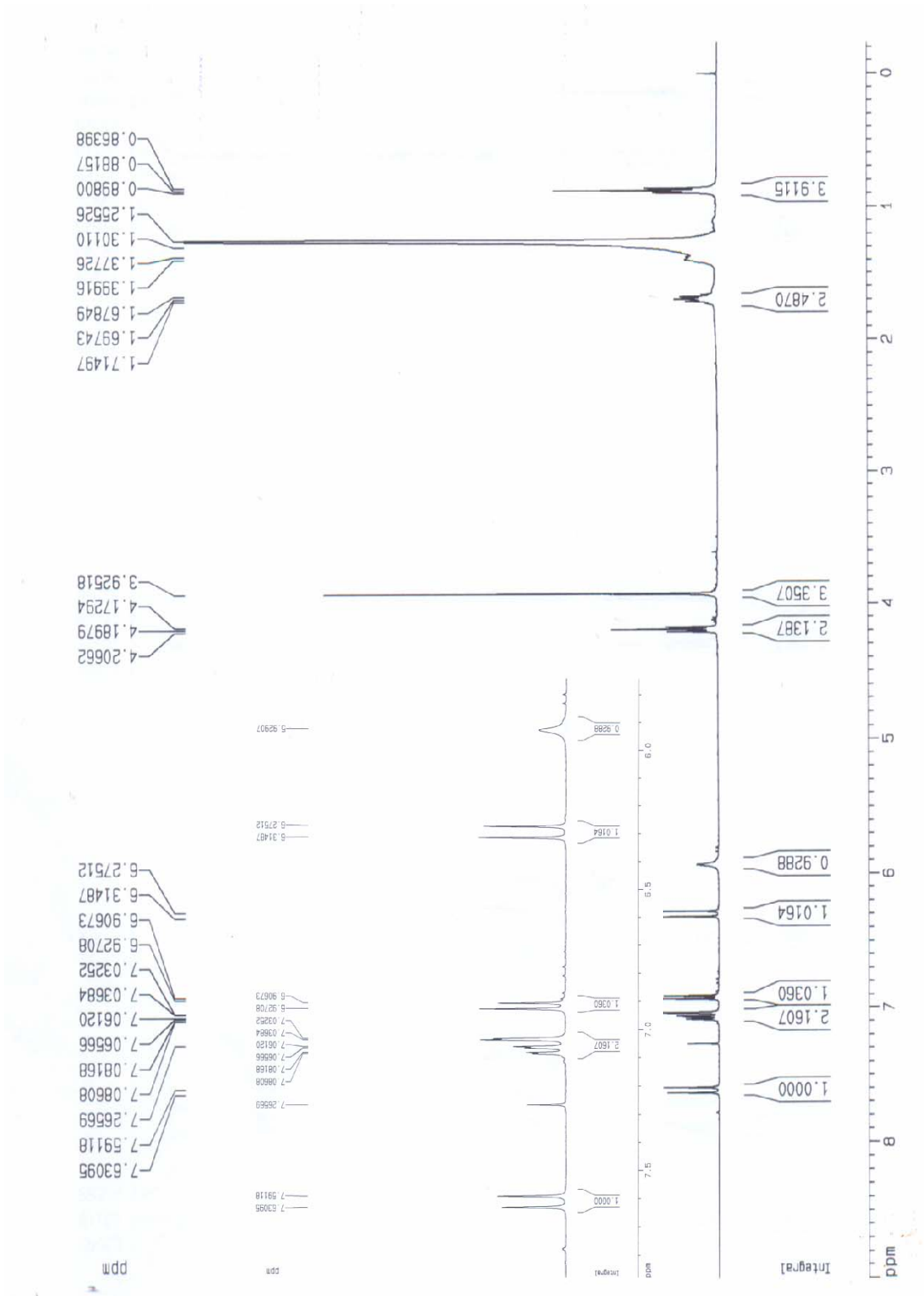


Figura 1.59. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da substância 6.

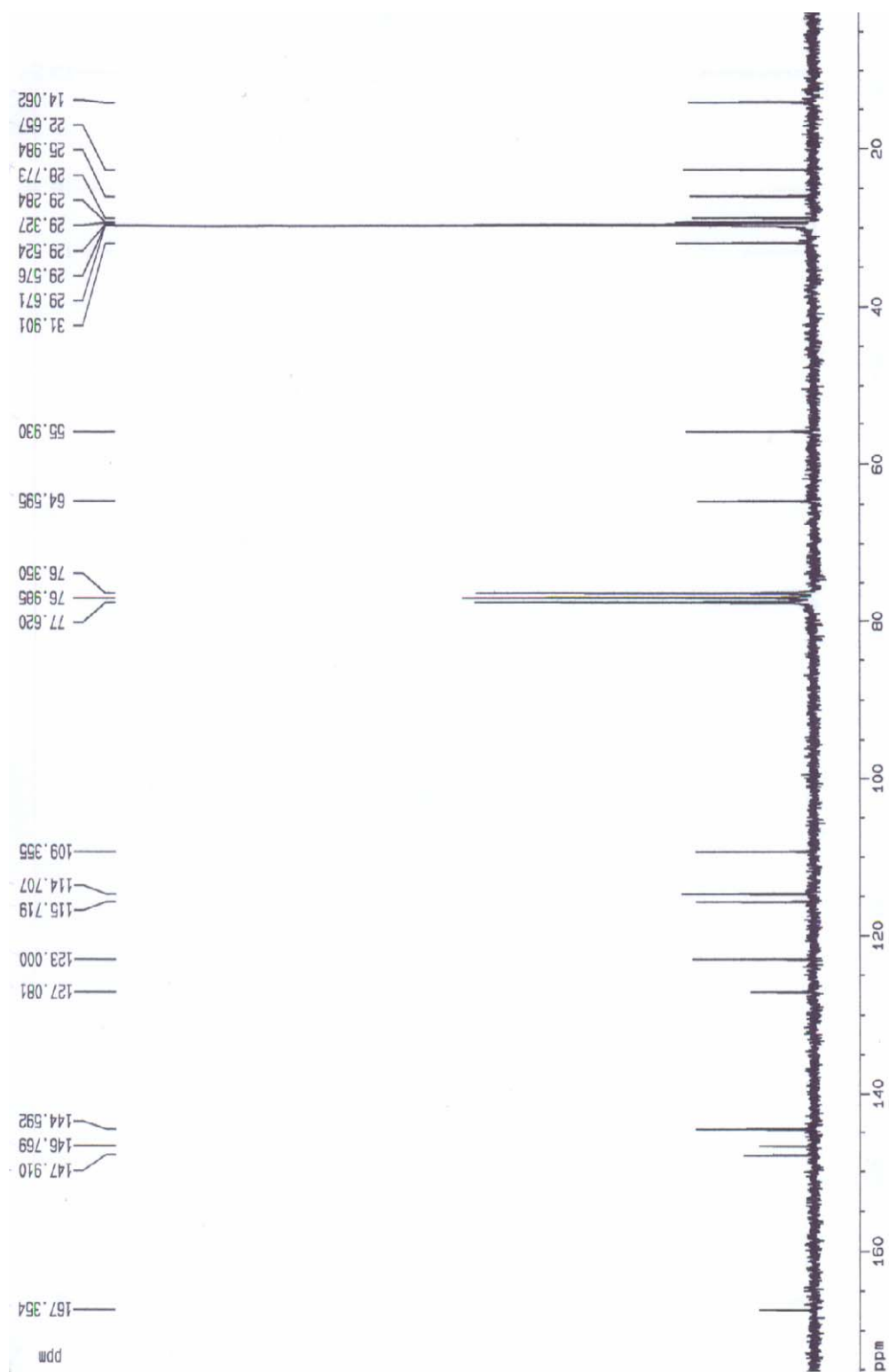


Figura 1.60. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) da substância 6.

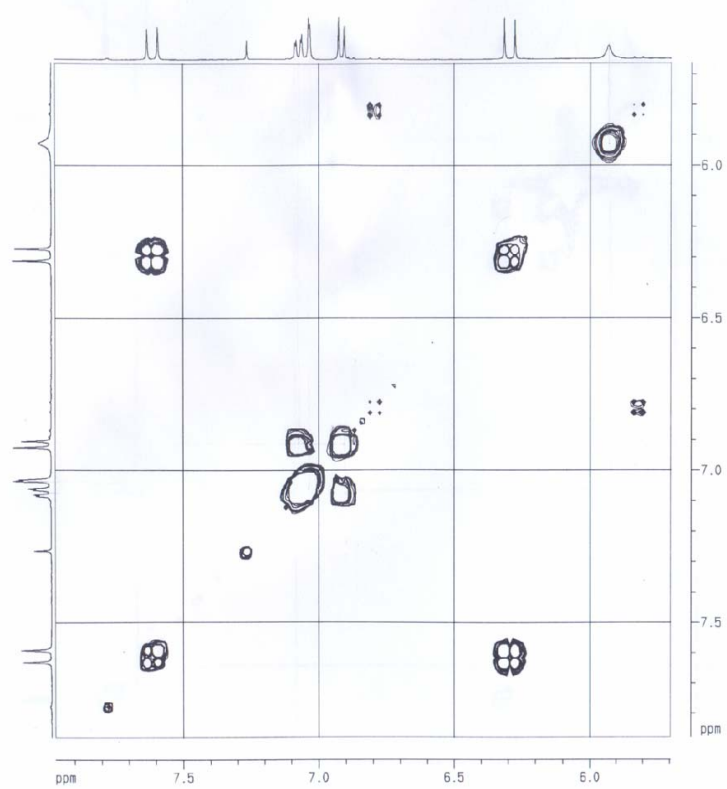
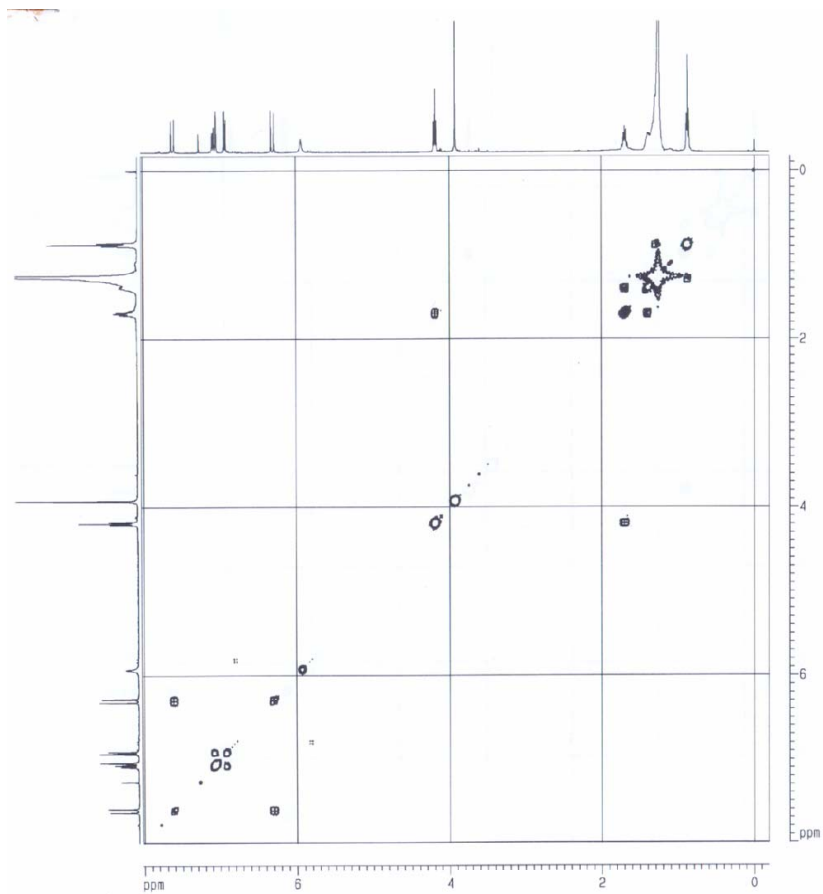


Figura 1.61. Espectros de COSY (CDCl₃, 400 MHz) da substância 6.

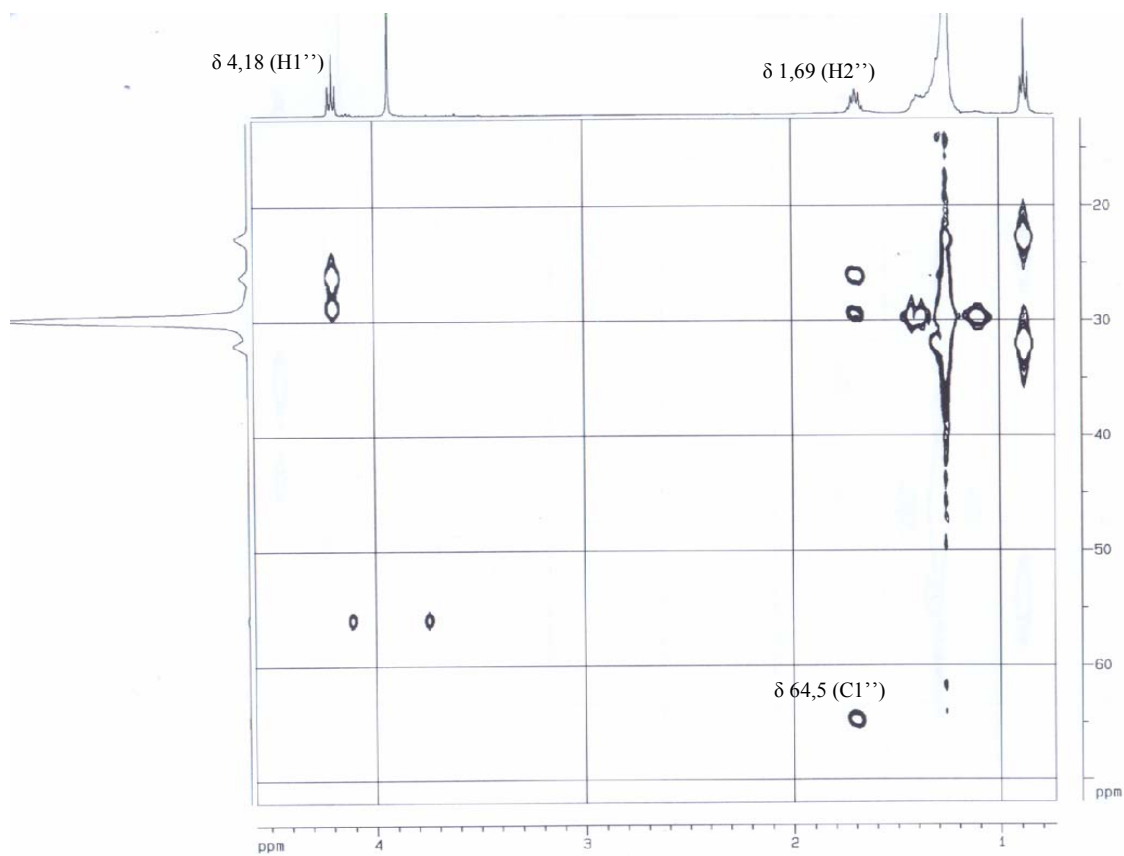
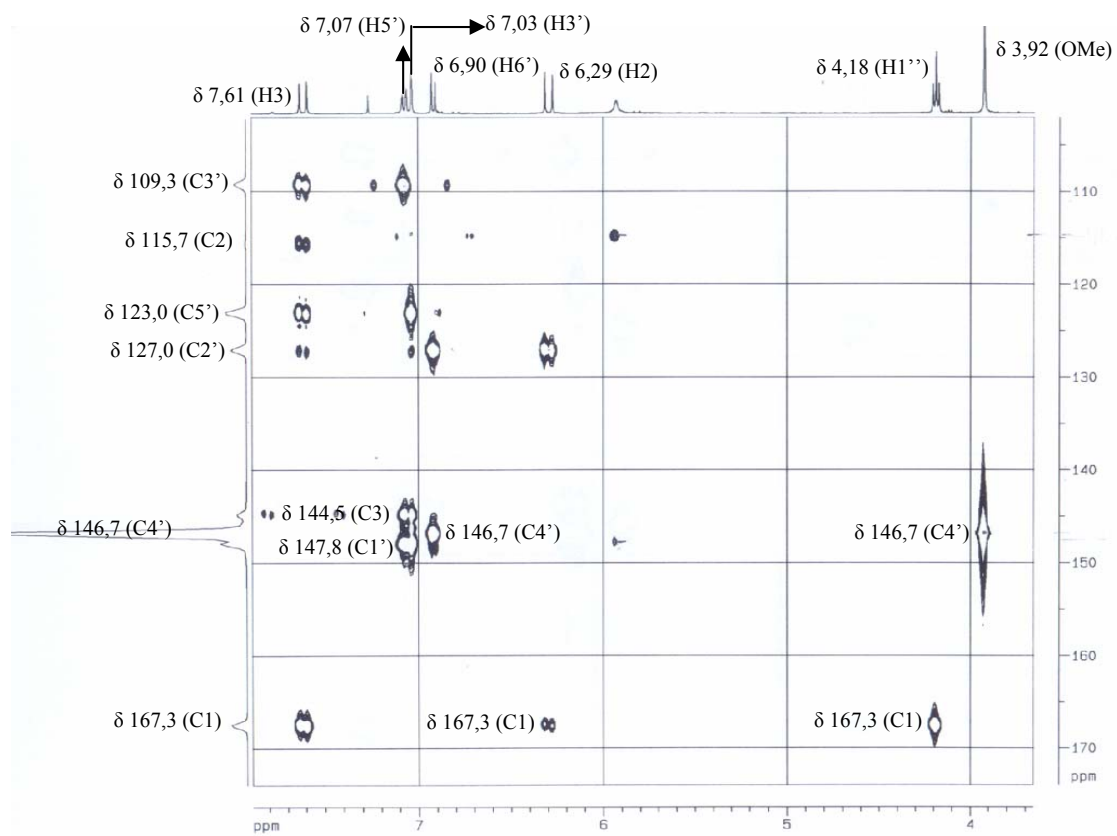


Figura 1.62. Mapas de contorno de HMBC (CDCl_3 , 400 MHz) da substância 6.

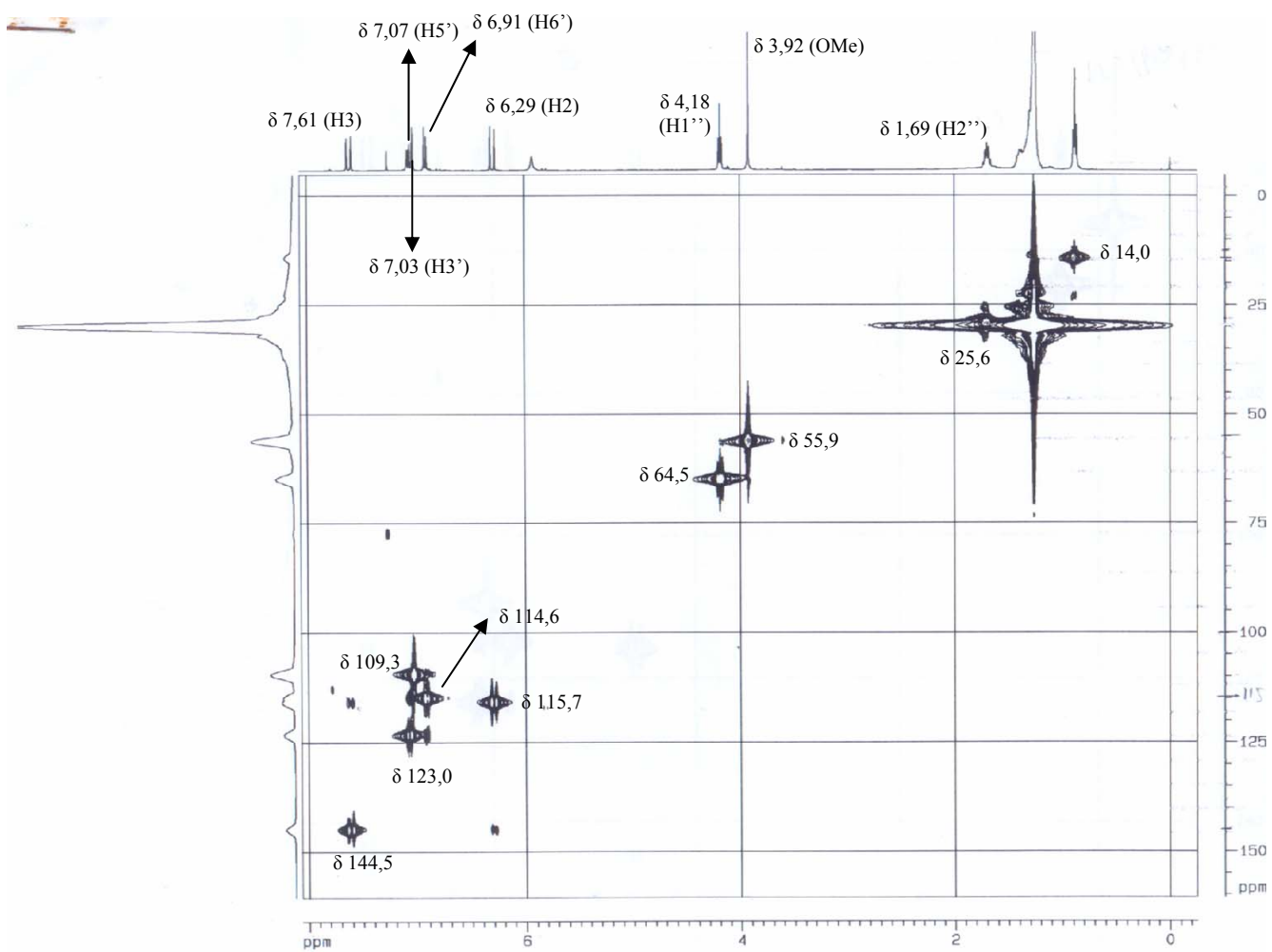


Figura 1.63. Mapa de contorno de HSQC (CDCl₃, 400 MHz) da substância **6**.

5. Conclusões

O estudo fitoquímico do gênero *Raputia*, através da espécie *R. praetermissa* (Engler) Emerich, foi iniciado por Rosas (2005), tendo como parâmetro de avaliação as raízes desta planta. Este estudo está sendo concluído, o que levou ao isolamento e identificação estrutural, dentre outras, de oito substâncias não relatadas na literatura, sendo quatro alcalóides indólicos (**7**, **8**, **9** e **11**), um alcalóide quinolônico (**20**), um limonóide (**18**), um diterpeno (**16**) e um derivado do ácido cinâmico (**6**).

O completo estudo químico de *R. praetermissa* (raízes, caule e folhas) levou ao isolamento e identificação de cerca de trinta substâncias, sendo dez substâncias inéditas. O quadro a seguir mostra todas as substâncias isoladas e identificadas a partir destes estudos. O caule de *R. praetermissa* mostrou uma composição rica em alcalóides, o que condiz para o esperado para uma espécie pertencente à família Rutaceae. O estudo das folhas levou ao isolamento de triterpenos e alcalóides e um fato bastante interessante que deve ser mencionado é que não foram encontrados limonóides nas folhas e no caule. No estudo das raízes realizado em 2005 foram encontrados e isolados três limonóides, sendo que um destes foi reisolado neste trabalho em outra fração de extrato das raízes que não havia sido estudada.

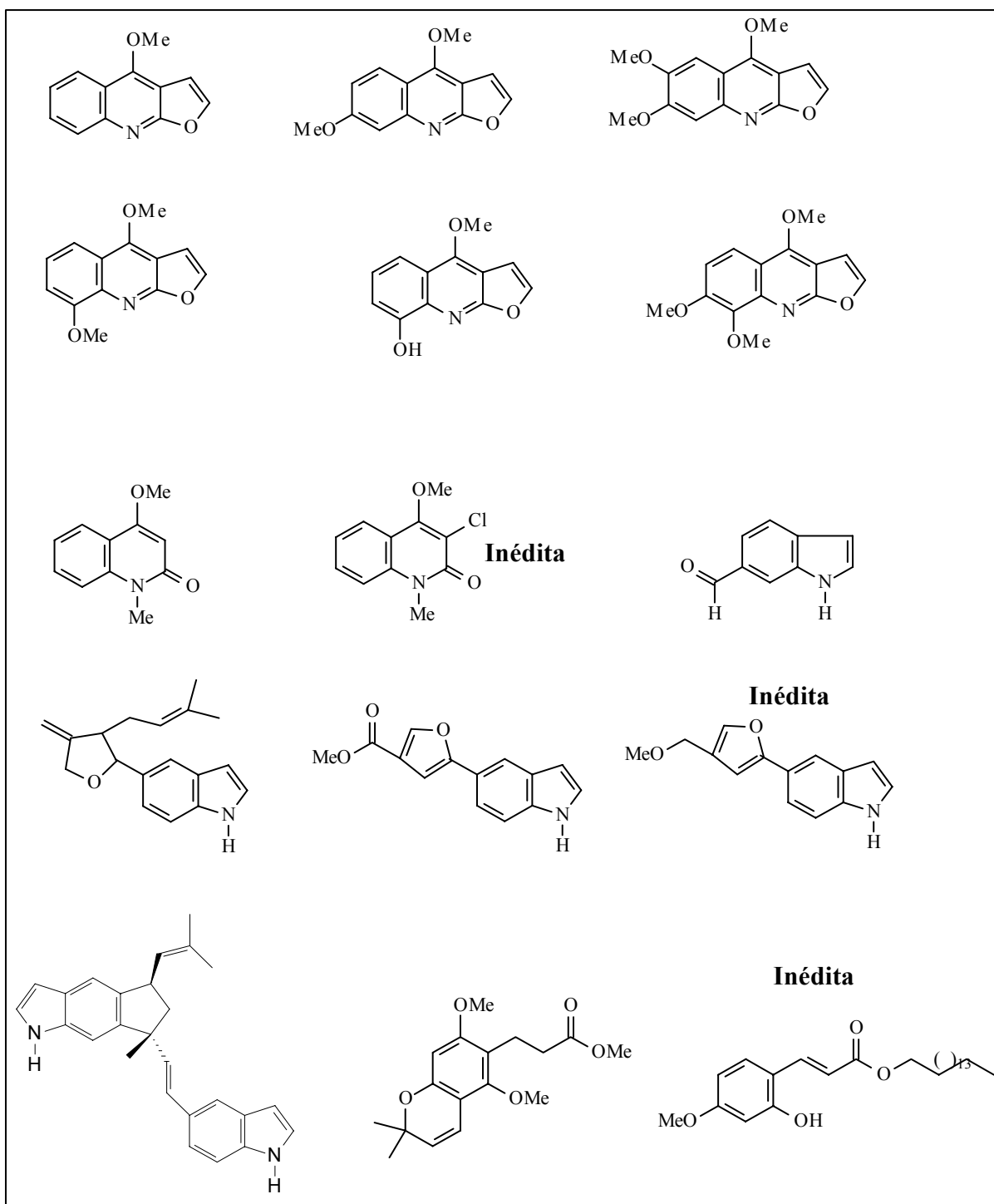
Os derivados do ácido cinâmico encontrados em *Raputia praetermissa* também podem ser encontrados em outras rutáceas estudadas por nosso grupo de pesquisa, como nos gêneros *Citrus*, *Glycosmis* e *Hortia*. Os alcalóides furoquinolínicos e quinolônicos são comuns nos gêneros *Almeidea*, *Esenbeckia*, *Phellodendron* e *Zanthoxylum*. Por outro lado, os alcalóides indólicos são pouco conhecidos nos trabalhos do grupo de PN/DQ/UFSCar. No entanto podem ser encontrados em vários gêneros pertencentes à família Rutaceae como, por exemplo, *Evodia*, *Flindersia*,

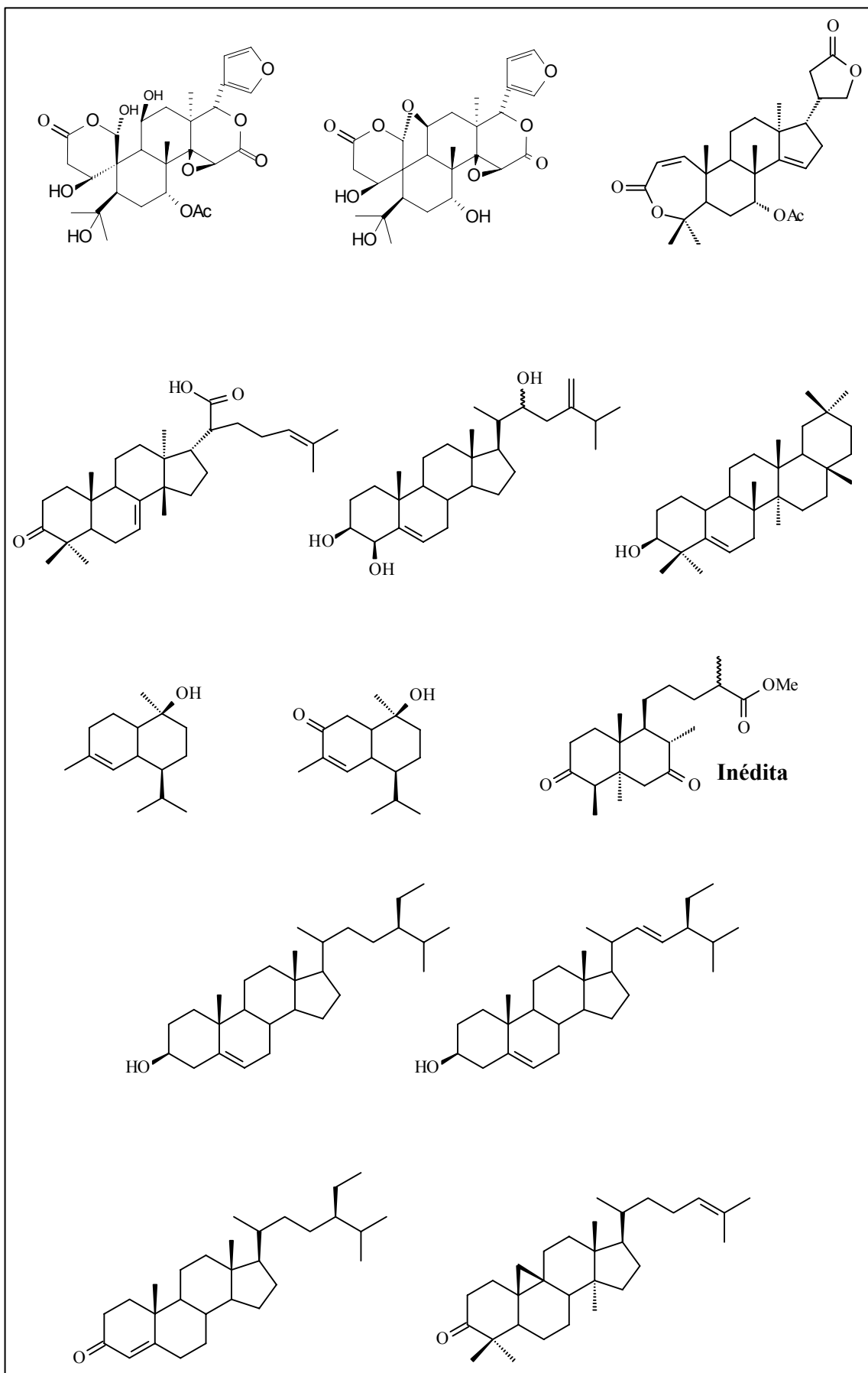
Glycosmis, *Limonia* e *Phellodendron*. Os limonóides podem ser encontrados nos gêneros *Citrus*, *Severinia*, *Spatholea*, *Raulinoa*, etc. A ocorrência de alcalóides, limonóides e derivados do ácido cinâmico em *R. praetermissa*, já havia sido descrita em outros estudos com plantas da família Rutaceae sendo esta, uma característica marcante da mesma.

Este trabalho também é muito importante no ponto de vista do conhecimento químico do gênero *Raputia*, visto que não são encontrados na literatura registros sobre o mesmo por se tratar de um gênero novo. Desta forma, as substâncias encontradas estão dentro do perfil químico da família Rutaceae. As evidências químicas constatadas neste trabalho reforçam a classificação de Emmerich (1978), na qual os gêneros *Raputia* e *Neoraputia* foram segregados. Estudos anteriores de nosso grupo de pesquisa com espécies pertencentes ao gênero *Neoraputia* (*N. alba*, *N. magnifica* e *N. paraensis*) levaram ao isolamento e identificação quase que exclusivamente de flavonóides. Há uma nítida diferença na composição química dos dois gêneros, visto que foram encontrados em *Raputia praetermissa* uma grande variedade de metabólitos secundários.

Ao final do estudo fitoquímico da espécie *R. praetermissa* pode-se dizer que os objetivos propostos foram alcançados, uma vez que não foram encontrados flavonóides em nenhum dos órgãos da planta. Desta forma, sugere-se inicialmente que os dados químicos obtidos estão de acordo com as características morfológicas que levaram a separação entre os gêneros. No entanto, outras espécies do gênero *Raputia* ainda serão estudadas pelo grupo de produtos naturais, para que se tenha um conjunto de evidências químicas que sejam úteis para o correto posicionamento quimiosistemático do gênero *Raputia* na tribo Cuspariae.

Substâncias isoladas de *Raputia praetermissa* (Rutaceae)





6. Referências Bibliográficas

- ABAUL, J.; PHILOGENE, E.; BOURGEOIS, P.; POUPAT, C.; AHOND, A.; POTIER, P. American Rutaceae : study of leaves of *Triphasia trifolia*. *J. Nat. Prod.*, **57**: 846, 1994.
- AL-REHAILY, A. J.; AHMAD, M. S.; MOSSA, J. S.; MUHAMMAD, I. New axane and oppositane sesquiterpenes from *Teclea nobilis*. *J. Nat. Prod.*, **65**: 1374, 2002.
- ARRUDA, A.C.; VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J.B.; SILVA, M.F.G.F. Further pyrano flavones from *Neoraputia alba*. *J. Braz. Chem. Soc.*, **4**: 80, 1993.
- ARRUDA, A.C.; VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J.B.; SILVA, M.F.G.F.; FRANCISCO, R.H.P.; RODRIGUES, A.M.G.D.; LECHAT, J.R. Two pyrano flavones from *Neoraputia alba*. *Phytochemistry*, **30**: 3157, 1991.
- CHASE, M. W.; MORTON, C. M.; KALLUNKI, J. A. Phylogenetic relationships of Rutaceae : a cladistic analysis of the subfamilies using evidence from rbcL and atpB sequence variation. *Am. J. Botany*, **86**: 1191, 1999.
- CHEN, H.; JIANG, H.; MORGAN, J. A. Non-natural cinnamic acid derivatives as substrates of cinnamate 4-hydroxylase. *Phytochemistry*, **68**: 306, 2007.
- CRONQUIST, A. *The evolution and classification of flowering plants*, 2a. ed. New York Botanical Gardens, Bronx, NY. **1988**.
- DE MOURA, N. F.; RIBEIRO, H. B.; MACHADO, E. C. S.; ETHUR, E. M.; ZANATTA, N.; MOREL, A. F. Benzophenanthridine alkaloids from *Zanthoxylum rhoifolium*. *Phytochemistry*, 46(8), 1443-1446, **1997**.
- DE PAULA, J. R. *Estudo Fitoquímico do enxerto de Cedrela odorata sobre Toona ciliata (Meliaceae)*. Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 1996. Tese de Doutorado, 331 p.
- DEWICK, P. M. *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. Chichester: John Wiley, **1997**, 466 p.

DREYER, D. L.; BRENNER, R. C. Chemotaxonomy of the Rutaceae. Part XIII. Alkaloids of some Mexican *Zanthoxylum* species. *Phytochemistry*, **19**: 935, 1980.

FERRACIN, R. J. *Estudo fitoquímico de Hortia arborea: uma contribuicao a quimiosistemática de cusparieae*. Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 1992. Dissertação de Mestrado, 135 p.

FOKIALAKIS N; MAGIATIS P; ALIGIANNIS N; MITAKU S; TILLEQUIN F; SEVENET T Furomegistines I and II, two furanopyridine alkaloids from the bark of *Sarcomelicope megistophylla*. *Phytochemistry*, **57**: 593, 2001.

GONZÁLEZ, A.G.; FERRO, E.A.; RAVELO, A.G. Triterpenes from *Maytenus horrida*. *Phytochemistry*, **26**: 2785, 1987.

GUERREIRO, G. *Estudo fitoquímico de Pilocarpus riedelianus e sua acao sobre diferentes microorganismos*. Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2001, Dissertação de Mestrado, 117 p.

JANUÁRIO, A. H. *Estudo Fitoquímico de Esenbeckia grandiflora e Almeidea rubra (Rutaceae)*. Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 1995. Tese de Doutorado, 200 p.

JAYAPRAKASHA, G.K.; SINGH, R.P.; PEREIRA, J.; SAKARIAH, K.K. Limonoids from *Citrus reticulata* and their moulting inhibiting activity in mosquito *Culex quinquefasciatus* larvae. *Phytochemistry*, **44**: 843, 1997.

KALLUNKI, J. A. *Revision of Raputia Aubl. (Cuspariinae, Rutaceae)*. *Brittonia*, **46**: 279, 1994.

KALUNKI, J. A. *An Emended Description and New Combinations in Raputia Aubl. (Cuspariinae, Rutaceae)*. *Brittonia*, **42**: 175, 1990.

KHAN, M. A.; WATERMAN, P. G. *Constituents of Ravenia spectabilis*. *Fitoterapia*, **61**: 282, 1990.

KHUONG-HUU, F.; SANGARE, M.; CHARI, V.M.; BEKAERT, A.; DEVYS, M.; BARBIER, M.; LUKACS, G. *Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectral Analysis of Cycloartenol and Related Compounds*. *Tetrahedron Let.*, 1787, 1975.

LEONG, Y.W.; HARRISON, L.J. (20R,23E)-Eupha-8,23-diene-3 β , 25-diol from *Tripetalum cymosum*. *Phytochemistry*, **50**: 849, 1999.

MAFEZOLI, J. *Atividade tripanocida e antimicrobiana de plantas da familia Rutaceae*. Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar 2002. Tese de Doutorado, 240 p.

MENEZES e MENEZES, M. M.; PEREIRA, N. A. Obtenção de Alcalóides Farmacologicamente Ativos de Tinguaciba (*Fagara tinguoassuiba*). *Rev. Bras. Farm.*, **68**: 71, 1987.

MULLER, A. H. *Constituintes Químicos de Metrodorea e Pilocarpus: Contribuição à Quimiosistemática de Pilocarpinae*. Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 1994. Tese de Doutorado, 187 p.

NAYAR, M.N.S.; SUTAR, C.V.; BHAN, M.K. Alkaloids of the stem bark of *Hesperethysa crenulata*. *Phytochemistry*, **10**: 2843, 1971.

PASSADOR, E.A.P.; SILVA, M.F.G.F.; RODRIGUES-FO, E.; FERNANDES, J.B.; VIEIRA, P.C.; PIRANI, J.R. A pyrano chalcone and a flavanone from *Neoraputia magnífica*. *Phytochemistry*, **45**: 1533, 1997.

PIRANI, J. R. Flora da Reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Rutaceae. *Rodriguesia*, **56**: 189, 2005.

RIBEIRO, J.E.L.S; HOPKINS, M.J.G.; VICENTIN, A.; SOTHERS, C.A.; COSTA, M.A.S.; BRITO, J.M.S.; SOUZA, M.A.D.; MARTINS, L.H.P.; LOHMANN, L.G.; ASSUNÇÃO, P.A.C.L.; PEREIRA, E.C.; SILVA, C.F.; MESQUITA, M.R.; PROCÓPIO, L.C. *Flora da Reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central*. 1a ed. DFID, Manaus, 1999, 816 p.

ROBERTSON, A.V. The proton magnetic resonance of furoquinoline alkaloids and related compounds. *Aust. J. Chem.*, **16**: 451, 1963.

ROCHA, W. C. *Busca de substancias bioativas em plantas amazonicas: Adiscanthus fusciflorus (Rutaceae), Trichilia pallida e T. rubra (Meliaceae)*. Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2005. Tese de Doutorado, 221 p.

ROSAS, L. V. *Fitoquímica, quimiosistemática e busca de novos fármacos antichagásicos e antileishmanioses: estudo de Raputia praetermissa*

(*Rutaceae*). Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2005. Tese de Doutorado, 280 p.

SHEEN, WINE-SHOW; TSAI, IAN-LIH; TENG, CHE-MING; KO, FENG-NIEN; CHEN, IH-SHENG. Indolopyridoquinazoline alkaloids with antiplatelet aggregation activity from *Zanthoxylum integrifoliolum*. *Planta Medica*, **62**: 175, 1996.

SOUZA, J.P.I; ARRUDA, A.C.; MUNOZ, G.D.; ARRUDA, M.S.P.; MULLER, A.H.. Prenylated flavones from *Neoraputia paraensis*. *Phytochemistry*, **52**: 1705, 1999.

STEVENS P. F. New Botanic Classification. www.mobot.org/MOBOT/Research/APweb/orders/sapindalesesweb.htm. 2003.

TANG, C.S.; YOUNG, C.C. Collection and identification of allelopathic compounds from the undisturbed root system of bigalta limpgrass (*Hemarthria altissima*). *Plant Physiol.*, **69**: 155, 1982.

TILLEQUIN, F. Rutaceous alkaloids as models for the design of novel antitumor drugs. *Phytochem. Rev.*, **6**: 65, 2007.

TOMAZELA, D.M. *Estudo fitoquímico de Neoraputia magnífica e Neoraputia paraensis e suas substâncias ativas frente a enzima Gliceraldeído-3fosfato-desidrogenase de Trypanosoma cruzi*. Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2001. Tese de Doutorado, 199 p.

TRINGALI, C.; SPATAFORA, C.; CALI, V.; SIMMONDS, M. S. J. Antifeedant constituents from *Fagara macrophylla*. *Fitoterapia*, **72**: 538, 2001.

WATERMAN, P. G. The chemical systematic of alkaloids: a review emphasizing the contribution of Robert Hegnauer. *Biochem. Syst. Ecol.*, **26**: 395, 1999.

WU, T. S. Alkaloids and coumarins of *Citrus grandis*. *Phytochemistry*, **27**: 3717, 1988.

WU, T. S.; LEU, Y.L.; CHAN, Y.Y.; WU, P.L.; KUOH, C.S.; WU, S.J.; WANG, Y. Tetranortriterpenoid insect antifeedants from *Severinia buxifolia*. *Phytochemistry*, **45**: 1393, 1997.

ZDERO, C.; BOHLMANN, F. Clerodanes from *Chrysocoma* species.
Phytochemistry, **30**: 607, 1991.

Capítulo II:

**Busca por Candidatos a Herbicidas Inibidores da Fotossíntese a partir
de Produtos Naturais**

1. Introdução

Após a segunda guerra mundial, a descoberta da seletividade de duas auxinas mudou as perspectivas do controle de plantas daninhas, dando origem a uma nova era da ciência de plantas daninhas. Posteriormente, estas duas auxinas, ácidos 2-metil-4-clorofenoxiacético (*MCPA*) e 2,4-diclorofenoxiacético (*2,4-D*) (Figura 2.1), tornaram-se comerciais para o controle de espécies problemáticas, principalmente em culturas de cereais. O sucesso destes herbicidas se deu quando urgia aumentar a produção de alimentos, devido à baixa produtividade das culturas após a guerra (Kudsk, 2003).

Em 1951 surgiu o primeiro herbicida não derivado dos ácidos fenólicos, o qual derivou do produto natural, uréia, o 3-(*p*-clorofenil)-1,1-dimetiluréia (monuron). Vários outros surgiram, como o 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetiluréia (diuron), e ainda têm o uso agrícola autorizado para aplicação em pós-plantio e em pré e pós-emergência das plantas daninhas em diversas culturas (Cobb & Kirkwood, 2000).

Em meados dos anos 1950, uma nova família de herbicidas foi descoberta, os bipyridílios (Calderbank & Slade, 1976). Vários estudos levaram a herbicidas, para o controle não seletivo de plantas daninhas, *diquat* e *paraquat*, sendo este último o vice-líder mundial em vendas (Figura 2.1). Contudo, o perfil toxicológico do *paraquat* requer maiores cuidados e hoje, um produto como este provavelmente não seria registrado. Diversos outros grupos de herbicidas com diferentes mecanismos de ação também foram desenvolvidos; o mais proeminente foi o glyphosato (Figura 1), um inibidor da EPSP sintase. Este produto é um herbicida não-seletivo e sistêmico, mas, ao contrário do *paraquat*, seu perfil toxicológico é menos impactante (Kudsk, 2003). Atualmente, o glyphosato é o número 1 em vendas no mundo. Posteriormente, foram desenvolvidas as sulfoniluréias,

um novo grupo de herbicidas que pode ser usado para combater uma variedade de espécies daninhas em várias culturas. Um exemplo desta classe é o *halosulfuron* (Figura 2.1), muito utilizado no Brasil na cultura da cana-de-açúcar para o controle de *Cyperus rotundus* L. (Tiririca).

Assim, o mercado de novos herbicidas teve um crescimento de quase 7% ao ano desde a segunda guerra mundial (Cobb & Kirkwood, 2000). Por volta de 1980, ele entrou em declínio, representando a face de um mercado estático com um crescimento anual de apenas 0,1 % (Cobb & Kirkwood, 2000). A química “fácil” foi explorada na preparação dos exemplos acima. A política de conservação da biodiversidade exige novos modelos de herbicidas mais seletivos, ao contrario dos objetivos anteriores. O registro de um novo produto requer um trabalho cada vez mais detalhado em pesquisas de toxicologia e ecotoxicologia, tornando mais lento o crescimento do mercado de novos herbicidas, mas, com menor impacto ambiental. Por último, mas não menos importante, o emprego da técnica de modificação genética que levou à introdução de culturas resistentes e/ou tolerantes a herbicidas não seletivos como o glyphosato, mudou completamente o mercado em algumas partes do mundo, mais notavelmente nos Estados Unidos (Cobb & Kirkwood, 2000).

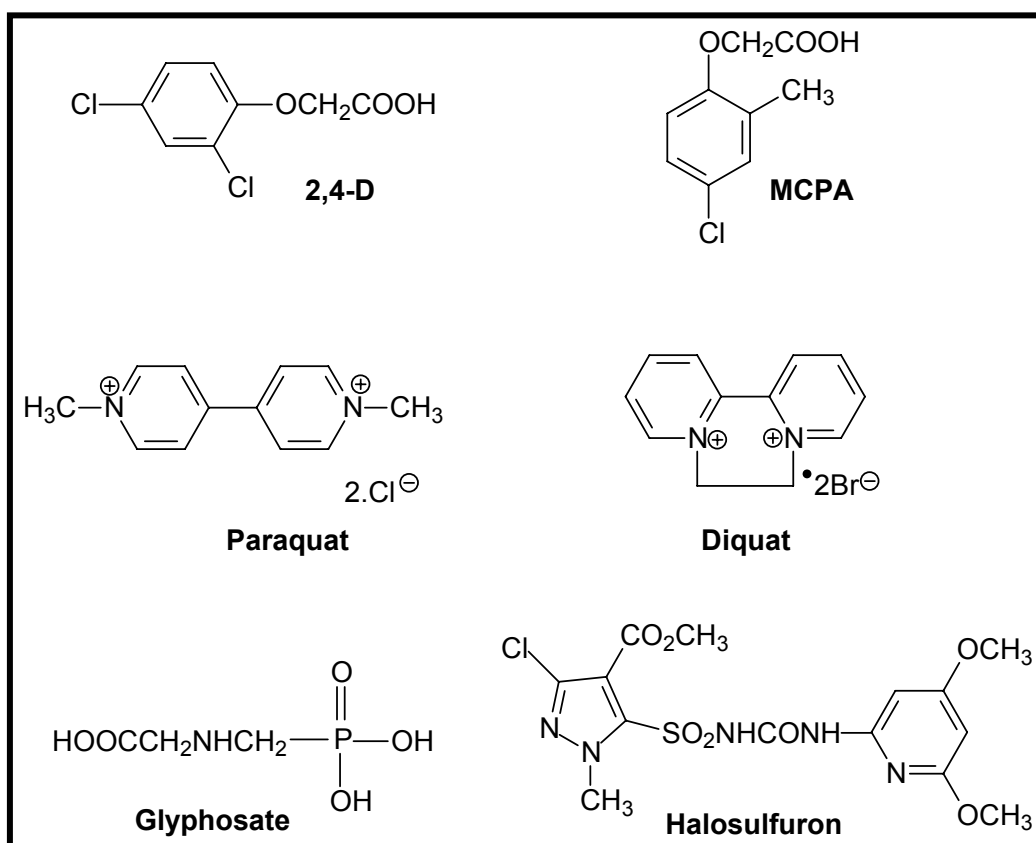
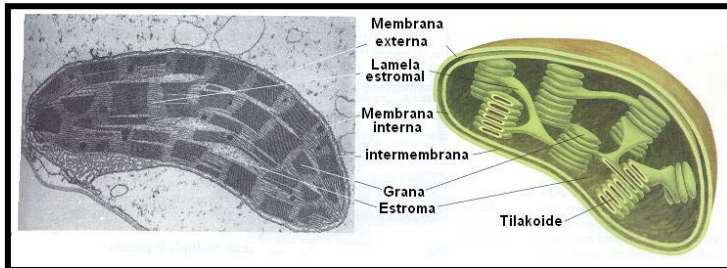


Figura 2.1. Alguns dos herbicidas disponíveis no mercado.

1.1. Os Herbicidas e a fotossíntese.

A fotossíntese é essencial para o desenvolvimento autotrófico das plantas. Tradicionalmente, ela é convencionalmente dividida em dois processos: o não dependente de luz (para assimilação de carbonos), que ocorre no estroma do cloroplasto, e o dependente de luz (de transdução de energia), que está associado com as membranas de tilacóide, responsável pelo fornecimento de ATP e redutor (NADPH) para assimilação de carbono (Percival & Baker, 1991).

O metabolismo assimilatório fotossintético é dependente da transdução de energia química luminosa (ATP) e a liberação de elétrons para a redução química pelas membranas de tilacóide (**quadro abaixo**). Foi provado que a inibição dos sistemas de transporte de elétrons fotossintético



e de transporte de prótons é o modo de ação de mais de 50% dos herbicidas conhecidos.

Os tilacóides de plantas superiores contêm quatro complexos intrínsecos supramoleculares (FSII, FSI, o complexo citocromo *b₆f* e o complexo protéico ATPase) e são associados com um número extrínseco de proteínas, tais como a plastocianina, ferridoxina e o complexo CF₁ do fator de acoplamento (Figura 2.2). A luz é capturada pelos pigmentos antena dos dois fotossistemas, e transferida aos respectivos centros de reação de FSI e FSII (P₇₀₀ e P₆₈₀). Em seguida, se produz uma separação de carga primária, que resulta na redução de aceptores de elétrons secundários e, conseqüentemente, oxidação de água e redução do terminal de aceptores de elétrons (ferridoxina, NADP e O₂). A transferência do FSII ao complexo citocromo *b₆f* é mediada pela plastoquinona. A plastoquinona é reduzida através de um processo de transferência de dois elétrons resultante de dois fotoatos sequenciais dentro do FSII.

A captura de dois prótons a partir do estroma é também requerida para a formação do plastoquinol. A difusão do plastoquinol ocorre através da camada lipídica da membrana do tilacóide ao complexo citocromo *b₆f*, onde 2 elétrons são transferidos ao complexo e 2 prótons são liberados ao espaço intra-tilacóide. Conseqüentemente, a transferência de elétrons de água ao *b₆f* é associada com a geração de próton através da membrana devido a uma diferença de potencial eletroquímico, resultante da

oxidação de água pelo FSII no lado lumen da membrana de tilacóide e o ciclo redução-oxidação da plastoquinona. A captura de prótons envolvida na redução de NADP no estroma também contribuirá para a criação de uma diferença de potencial de prótons transmembrana, que pode ser usada para promover a síntese de ATP através do fator acoplamento (CF_0 e CF_1).

O processo do complexo físico-químico (Figura 2.2) dos tilacóides específico para transdução de energia luminosa pelas plantas é objeto atrativo para a ação direta de herbicidas (Percival & Baker, 1991). Os principais sítios perturbativos da fotoquímica de tilacóide acessíveis aos inibidores se enquadram em três categorias: (i) inibição do transporte dentro da membrana; (ii) desvio do transporte de elétrons por aceptores biológicos naturais aos aceptores de elétrons artificiais; (iii) interrupção da síntese de ATP. A busca de herbicidas ecologicamente corretos, ou seja, mais seletivos, vem explorando as funções fotossintéticas com ensaios de inibição dos mesmos.

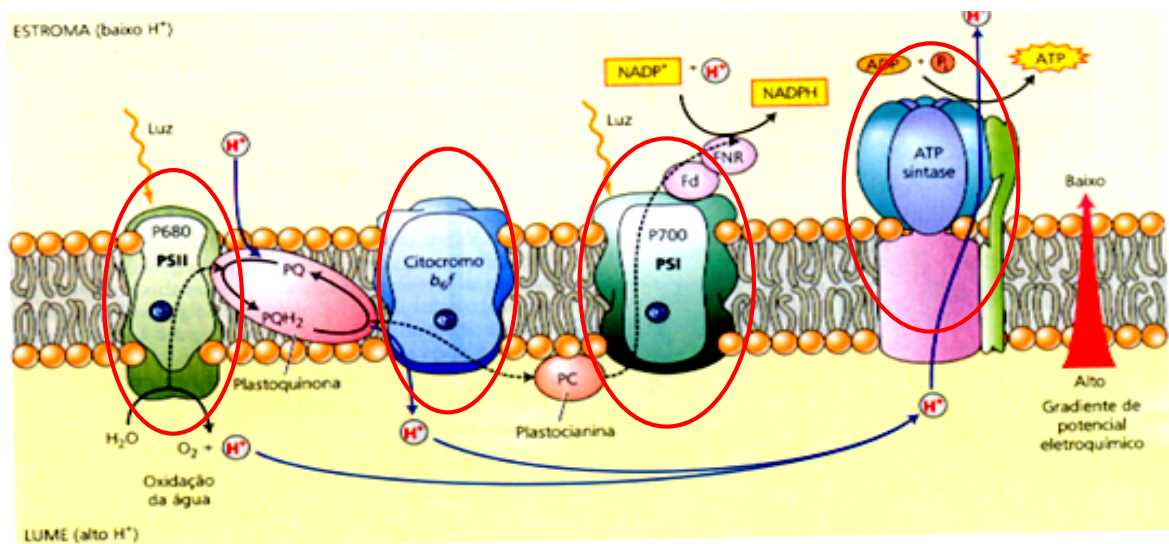


Figura 2.2. Representação do esquema Z da fotossíntese na membrana tilacoidal. A transferência de elétrons e H^+ é feita por quatro grandes complexos protéicos: PSII, citocromo b_6f , PSI e ATP sintase.

1.2.A Descoberta de um herbicida e o mercado.

Muito dinheiro é necessário para se colocar novos herbicidas no mercado (Cobb & Kirkwood, 2000). Aproximadamente 33% dos custos de desenvolvimento são dedicados à toxicologia e ecotoxicologia, o que contrasta com o princípio do desenvolvimento entre os anos 40 e 50, quando a regulação estrita não foi o limite para o registro de herbicidas (Cobb, 1992).

Inicialmente, a investigação ao acaso foi a regra. Milhares de produtos químicos foram testados contra um conjunto de plantas daninhas e culturas. Apesar da resistência de investigação ao acaso, isto levou a descoberta de várias classes de herbicidas com um número limitado de ação, mais seletivos. Dentre os mais importantes pode-se destacar: auxinas, inibidores do FSII e FSI, da EPSP sintase, da acetolactato sintase, da acetil-CoA carboxilase e da protoporfirinogênio oxidase (Cobb & Kirkwood, 2000). As técnicas de investigação convencional são ainda importantes e continuarão a produzir novos herbicidas, assim eles foram produzidos nos últimos 50 anos.

Com o advento da automação e tecnologia em pequena escala, a síntese *high-throughput* é agora a investigação para se descobrir novos produtos para o controle de plantas daninhas. A técnica que foi baseada nas descobertas farmacêuticas, e também foi aplicada à descoberta de herbicidas. Um dos caminhos é preparar uma larga biblioteca combinatória que pode conter de 10.000 a 1 milhão de compostos que podem ser investigados facilmente. Outra possibilidade é o emprego de técnicas que utilizam bibliotecas químicas desenvolvidas racionalmente, que são muito pequenas, ou seja, como se fossem otimizadas e derivadas das bibliotecas convencionais (Cole & Rodgers, 2000; Hess *et al.*, 2001). No entanto, existem limitações. Frequentemente há uma pequena correlação entre a

habilidade relativa para inibir um sítio e a ação em vivo para matar uma planta. Os herbicidas devem ser absorvidos através da cutícula ou raízes, translocados aos tecidos de crescimento, para então penetrarem nas organelas e assim exercerem sua função. Assim, muitos dos compostos ativos em alguns ensaios necessitam de modificações estruturais que os permitam atingirem o sítio provável a inibirem. Com isto, vários herbicidas no mercado são “pró-herbicidas” que são mais ou menos biologicamente inertes quando absorvidos pela planta e ativos apenas no sítio de ação. Pode-se citar como exemplo, os ariloxifenoxipropionatos, que são formulados como ésteres (Duke, 1988) para facilitar sua absorção e translocação nas plantas alvo.

Outro ponto importante na área de herbicidas foi a técnica genômica que vem fornecendo plantas resistentes ou tolerantes a herbicidas não seletivos. Contudo, nenhuma das técnicas mencionadas indica um grande sucesso no futuro. A química combinatória já demonstrou falha na farmacologia, pois os modelos de origem natural mostram-se mais diversificados, complexos e com melhores atividades biológicas. A genômica não é de aceitação ampla tanto entre leigos como cientistas, estes últimos preocupados com a conservação na biodiversidade.

Nas últimas três décadas a produção *per capita* de alimentos cresceu aproximadamente 20%; apesar disso um número considerável de pessoas morre anualmente de fome. No entanto, essa situação não se deve exclusivamente à escassez de alimentos e sim está relacionada a problemas de má distribuição de renda e administração pública. Estes problemas tendem a se agravarem, uma vez que estimativas sugerem que no ano de 2050 a população mundial atingirá a marca de 11 bilhões de pessoas. Dessa forma, tona-se necessário aumentar a produção de alimentos pelo menos em duas vezes da quantidade que se produz hoje. Outro fator importante que deve ser mencionado é que a área destinada para a agricultura

atualmente dará lugar a complexos habitacionais. Uma projeção da FAO (*Food Agricultural Organization*) mostra que em 40 anos a área cultivada por habitante em 1960 passou de 0,50 para cerca de 0,22 ha/habitante em 2000 (Zambolim, 1999 citado por Barbosa, 2004). Sendo assim, em relação ao mercado de herbicidas pode-se concluir momentaneamente que alimentar o mundo sem o uso de defensivos agrícolas permanece ilusório, especialmente quando existem 800 milhões de pessoas desnutridas.

Dados da Associação Nacional de Defesa Vegetal (ANDEF, 1999) indicam que o consumo de defensivos agrícolas no Brasil permaneceu constante de 1988 a 1993, com vendas em torno de U\$ 1 bilhão, e a partir do ano seguinte estas vêm crescendo, já tendo ultrapassado U\$ 2 bilhões. Esses dados fazem com que o Brasil detenha aproximadamente 6% do mercado mundial. As vendas totais de agrotóxicos variam com a categoria. Os herbicidas representam 48%, os inseticidas 28%, os fungicidas 19% e os demais produtos 5% (Figura 2.3). Aproximadamente 90% das vendas de defensivos agrícolas são controladas por apenas 25 companhias multinacionais. A Tabela 2.1 lista as sete maiores que monopolizam 76% do mercado desses produtos. Estes dados sugerem que somente as grandes companhias conseguem se manter no mercado. Nos últimos anos aconteceram várias fusões de algumas empresas, bem como a compra de outras de menor porte pelas maiores, em decorrência do grande investimento que se faz necessário para a descoberta e produção em larga escala de novos produtos e ainda com os custos com *marketing*.

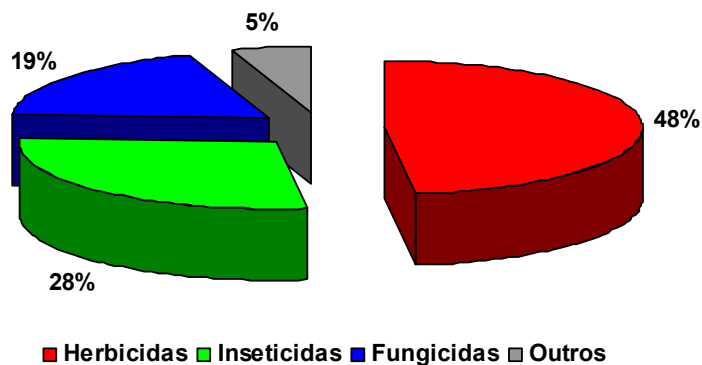


Figura 2.3. Porcentagem de vendas de defensivos agrícolas no mercado mundial.

Tabela 2.1: Vendas, em bilhões de dólares, das sete grandes companhias de defensivos agrícolas em 2001.

Multinacional	US\$ bilhões
<i>Syngenta</i>	5,39
<i>Sanofi-Aventis</i>	3,84
<i>Monsanto</i>	3,76
<i>Basf</i>	3,11
<i>Dow AgroSciences</i>	2,61
<i>Bayer</i>	2,42
<i>DuPont</i>	1,92

Fonte: Agrow World Crop Protection News, Março/2002 (Citado por Barbosa,2004).

2. Justificativas

O crescimento da população e a fome em vários países mostram que o uso de herbicidas é uma necessidade, ou seja, alimentar o mundo sem o uso de defensivos agrícolas permanece ilusório, especialmente quando existem milhões de pessoas abaixo da linha da pobreza.

A necessidade de novos herbicidas, com diferentes mecanismos de ação, possuindo espectro mais amplo para o controle de plantas daninhas com menor impacto ambiental é um fato real. Isto porque a cada dia, novas espécies de plantas daninhas tolerantes ou resistentes aos herbicidas atuais surgem nos campos (Duke *et al.*, 2000).

Produtos naturais, em geral, têm se mostrado como uma das fontes mais ricas e promissoras de novos compostos com atividade fitotóxica e reguladora do crescimento de plantas (Kimura *et al.*, 1997, 1998 e 2002; Pillmoor, 1998 e Greaves, 1996). Contudo, o uso de produtos naturais como herbicidas ou como protótipos para conduzir programas de descoberta de herbicidas é uma alternativa, que não tem sido tão explorada quanto foi para inseticidas e fungicidas. Produtos naturais fitotóxicos são, em geral, estruturalmente mais complexos que herbicidas sintéticos e eles não são economicamente obtidos por metodologias sintéticas tradicionais. Esta área está sendo explorada lentamente (Duke *et al.*, 2000), talvez pela pequena quantidade de pesquisadores envolvidos na área, falta de trabalhos em biotecnologia de produção de herbicidas naturais, ou mesmo escassez de testes que permitam conhecer o modo de ação do composto.

3. Objetivos

- 3.1. Busca de metabólitos secundários de espécies de plantas estudadas pelo grupo de Produtos Naturais do Depto. Química da UFSCar, visando elucidar seus mecanismos de ação frente a inibição da fotossíntese;
- 3.2. Implantação das técnicas dos ensaios bioquímicos no Departamento de Química-UFSCar;

4. Materiais e Métodos

4.1. Avaliação da síntese de ATP, transporte de elétrons durante a fase fotoquímica da fotossíntese em cloroplastos isolados das folhas de espinafre.

Os ensaios foram realizados na *Facultad de Química, Conjunto E, Departamento de Bioquímica da Universidad Nacional Autónoma de México*, México-D.F. no período de 14.05.2006 a 06.11.2006, sob a orientação do Prof^o. Dr. Blas Lotina-Hennsen, durante um estágio tipo PDEE-CAPES.

As folhas de espinafre foram obtidas diariamente em supermercados da Cidade do México. Em seguida foram lavadas e secas, para posterior seleção das folhas com maior grau de uniformidade. Para extração dos cloroplastos de espinafre (*S. oleracea* L.), as folhas já livres da nervura central e das extremidades basal e apical (25 g) foram trituradas em liquidificador e submetidas à extração com 100 mL do seguinte meio: sacarose (400 mmol L⁻¹), MgCl₂ (5 mmol L⁻¹), KCl (10 mmol L⁻¹) e K⁺-tricina (30 mmol L⁻¹) em pH 8,0 (1 mol L⁻¹ KOH). O meio foi homogeneizado e filtrado com o auxílio de um funil e camadas de gaze cirúrgica. O filtrado foi centrifugado (4000 rpm, 4°C e 5 min), o sobrenadante foi eliminado e o precipitado contendo os cloroplastos foi

dissolvido em 1 mL do mesmo meio usado no isolamento (Lotina-Hennsen *et al.*, 1999).

Para determinar a concentração de clorofila total, duas alíquotas de 20 µL da suspensão de cloroplastos foram transferidas para dois tubos de centrífuga contendo 5 mL de acetona cada. A amostra permaneceu no escuro por cinco minutos e, depois, foi submetida à centrifugação (4000 rpm e 5 min). Em seguida foram feitas medidas de absorvâncias em espectrofotômetro do sobrenadante nos comprimentos de onda de 645 e 663 nm, e a concentração de clorofila total foi determinada de acordo com a equação abaixo (Romagni *et al.*, 2002).

$$\text{Clorofila } (\mu\text{g mL}^{-1}) = 20,2 (A_{645}) + 8,02 (A_{663})$$

Para os ensaios foram utilizadas soluções dos compostos puros. As soluções das amostras foram preparadas em varias concentrações, usando DMSO como solvente. A síntese de ATP em fotofosforilação e a captura de prótons foram determinadas em triplicata, utilizando-se a combinação de um microeletrodo tipo Clark, conectado a um potenciômetro de escala expandida, com pH ajustado entre 8,00 e 8,05. Foi utilizado o seguinte meio reacional: clorofila (20 µg mL⁻¹), sacarose (100 mmol L⁻¹), MgCl₂.6H₂O (5 mmol L⁻¹), KCl (10 mmol L⁻¹) e K₃[Fe(CN)₆] (K⁺-tricina) 1 mmol L⁻¹, pH 8 (1 mmol L⁻¹ KOH) na presença de ADP (1 mmol L⁻¹) e K₂HPO₄ (3 mmol L⁻¹). A reação iniciou com iluminação saturante de 350 Watts durante 1 minuto. Como acceptor de elétrons para a síntese de ATP, utilizou-se 100 µM de MV [dicloreto de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridínio (dicloreto de paraquat)]. Para avaliar a ação das amostras na inibição da síntese de ATP, estas foram adicionadas ao

meio reacional em concentrações que variavam de 1 a 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e as medidas foram comparadas com o controle (Achinine, *et al.*, 1999).

O fluxo de elétrons fotossintético foi determinado pela captura de oxigênio, utilizando-se um microeletrodo de Clark (Orion modelo 8103) conectado a um potenciômetro *Corning* modelo 12, com escala expandida, e registrador Gilson. O transporte de elétrons basal foi determinado com um *oxygraph* YSI modelo 5300. Cada cubeta, durante a reação luminosa constituiu-se de 20 mg de Chl mL^{-1} , assim como nas condições para captura de prótons, exceto nas concentrações de K^+ -tricina que foram de 15 mmol L^{-1} , com um tempo de reação de 3 minutos, sob condições aeróbicas, e luz branca saturante de 350 Watts (González-Bernardo *et al.*, 2003).

O transporte de elétrons fosforilante foi determinado de forma semelhante ao do transporte de elétrons basal, adicionando-se à mistura uma solução 1 mmol L^{-1} de ADP e 3 mmol L^{-1} de K_2HPO_4 . KCN (0,1 mmol L^{-1}) para inibir a atividade catalítica. O transporte de elétrons desacoplado foi determinado da mesma forma que o transporte de elétrons basal, adicionando-se à mistura uma solução 5 mmol L^{-1} de NH_4Cl . As reações parciais na cadeia de transporte de elétrons foram medidas utilizando-se inibidores específicos como o 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetiluréia (DCMU; 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$), 2,5-dibromo-3-metil-6-isopropil-1,4-*p*-benzoquinona (DBMIB; 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$), e os seguintes doadores e aceptores de elétrons: silicomolibdato de sódio (SiMo; 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$), difenilcarbazida (DPC 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$), diaminodureno (DAD; 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e metilviologênio (MV; 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Quando um composto inibe o fotossistema II, o sitio de inibição será comprovado utilizando-se a técnica de fluorescência transiente da clorofila *a* do fotossistema II.

4.2. Determinação do fluxo de elétrons nos fotossistemas II e I (FSII e FSI) desacoplados.

O transporte de elétrons nos FSII e FSI foi medido assim como no ensaio para o transporte de elétrons desacoplado. O FSII foi medido de H₂O a DCPIP (reduzido), suportado pela evolução de O₂. O meio reacional foi constituído por 1 µM de DBMIB, 100 µM de DCPIP, 500 µM de K₃[Fe(CN)₆] e 6 mM de NH₄Cl (Garza-Ortíz et al., 2004). O transporte de elétrons parciais do FSII desacoplado de H₂O a SiMo foi determinado como adotado para o FSII, com exceção de 1 µM de DBMIB, 100 µM de DCPIP, 500 µM de K₃[Fe(CN)₆], que foram omitidos e, 200 µM de SiMo e 10 µM de DCMU foram adicionados (Giaquinta *et al.*, 1974). O transporte de elétrons do FSII (DPC a DCPIP_{oxidado}) foi medido através da redução da razão de DCPIP_{ox} com um espectrofotômetro Beckman DU 650 e determinado em tilacóides previamente tratados com Tris 0,8 M (pH 8,0) e incubados por 30 min a 4° C (Vernon *et al.*, 1969).

A razão do transporte de elétrons do FSI foi determinada através do consumo de O₂ de uma maneira similar à razão do transporte de elétrons basal não-cíclico com 10 µM DCMU, 100 µM DCPIP reduzido com 300 µM ácido ascórbico, 50 µM MV e 6 mM NH₄Cl, que foram utilizados como meio reacional (Allen & Holmes, 1986).

4.3. Estudos da fluorescência da clorofila a (Chl a).

As curvas de indução da Chl *a* foram medidas a temperatura ambiente com um Hansatech Handy PEA (*Plant Efficient Analyzer*) como previamente descrito por Strasser *et al.* (1995). O rendimento máximo da fluorescência das amostras foi gerado usando três diodos que emitiam luz (650 nm). A duração do pulso foi de 1 s. O meio de reação utilizado foi o mesmo utilizado para as medidas do transporte de elétrons basal. Para

monitorar os transientes da fluorescência da Chl *a*, alíquotas de tilacóides adaptados ao escuro contendo 20 µg de Chl foram transferidas a um papel de filtro por gravidade. Para gerar uma homogeneidade e reprodutibilidade dos tilacóides no papel de filtro. O material foi adicionado imediatamente em 3 mL do meio e, ainda, em diferentes concentrações dos compostos testados. As amostras foram mantidas no escuro por 5 min e, em seguida, foram realizadas as leituras dos parâmetros cinéticos. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.4. Ensaio com o complexo H^+ -ATPase dependente dos íons Mg^{2+} e Ca^{2+} .

Cloroplastos intactos isolados das folhas de espinafre foram suspensos em 0,35 M sorbitol, 2 mM EDTA, 1 mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 1 mM $MnCl_2$ e 50 mM Hepes (pH 7,6). A atividade Mg^{2+} -ATPase ligada as membranas de tilacóide foi medida de acordo com metodologia descrita por Mills *et al.* (1980). Utilizou-se NH_4Cl como controle positivo. Em cada reação, um experimento em branco foi realizado com os cloroplastos isolados no meio de reação.

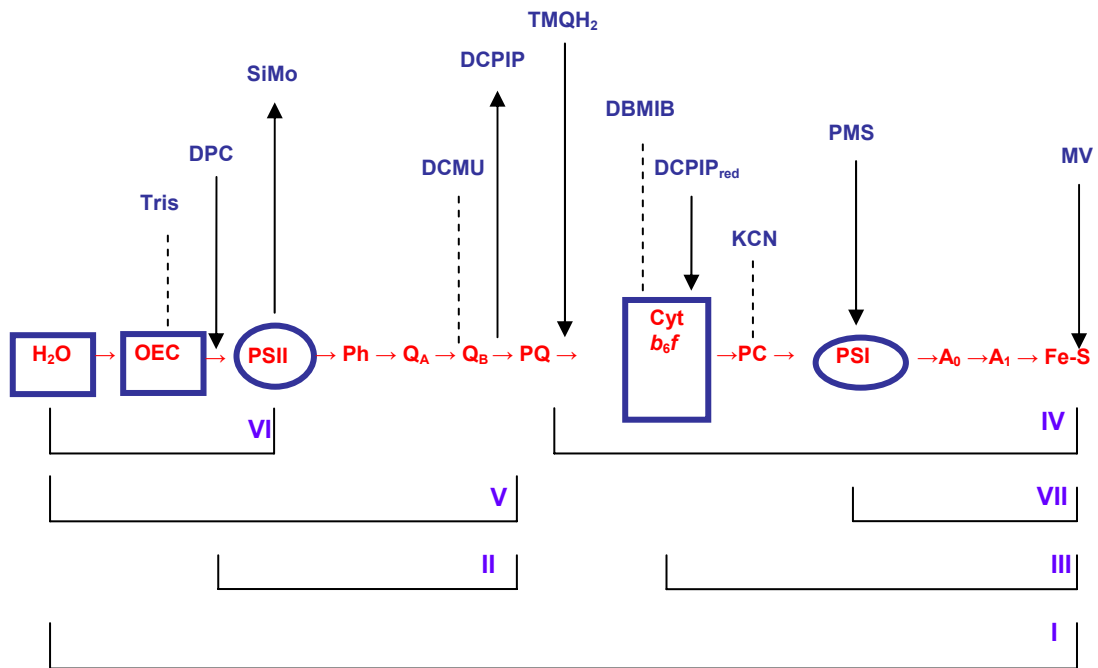
4.4.1. Determinação do efeito dos compostos testados sobre a atividade Ca^{2+} -ATPase de CF1 isolado.

Para obtenção de CF1 purificado, uma alíquota de cloroplastos frescos foi diluída com 0,75 mM EDTA (pH 7,6), incubada por 10 min ao abrigo da luz a 20 °C e centrifugada (1 min, 10000 rpm e 4 °C). Este extrato em EDTA (que continha o complexo CF1), foi resuspenso com 600-1000 µL de meio de isolamento de cloroplastos para ATPase. Deste retirou-se uma alíquota de 500 µL, que foi unida a 500 µL de 20 mM tricina (pH 8,0), 0,2 mM EDTA, 10 mM DTT e 40 mM ATP. Este sistema foi aquecido a 60 °C por 4 min. Desta mistura ativada, 100 µL foi incubada por 20 min a 37

°C com 900 µL de um meio constituído por 50 mM Tris (pH 8,4), 5 mM CaCl₂ e 5 mM ATP (Sumner, 1944). A reação foi interrompida pela adição de TCA 2 %, e, após 20 min de repouso, foi efetuada a medida de Pi (fostato inorgânico) liberado no espectrofotômetro.

4.5. *Substâncias Ensaçadas*

Uma coleção de compostos sintéticos e naturais pertencentes à várias classes de produtos naturais, originadas a partir de plantas e fungos, estudados pelo grupo de Produtos Naturais do Departamento de Química (UFSCar), foi submetida aos ensaios de atividade tóxica sobre a fotossíntese em cloroplastos isolados das folhas de espinafre. Nestes ensaios *in vitro* utilizou-se uma série de doadores e aceptores artificiais de elétrons com eficiência comprovada, como pode ser visto no Esquema 1, que representa as diversas etapas da cadeia transportadora de elétrons durante a fotossíntese. A Figura 2.4 e a Tabela 2.2 representam as substâncias e as frações de extratos testados, respectivamente.



- I: Transporte de elétrons de H₂O – MV (Síntese de ATP)
- II: PSII (H₂O – DCPIP)
- III: PSI (DCPIP_{red} – MV)
- IV: PSI (TMQH₂ – MV)
- V: PSII (H₂O – SiMo)
- VI: PSII (DPC – DCPIP) VII: PSI (PMS_{red} – MV)

Esquema 2.1. Representação da simulação *in vitro* do processo fotossintético.

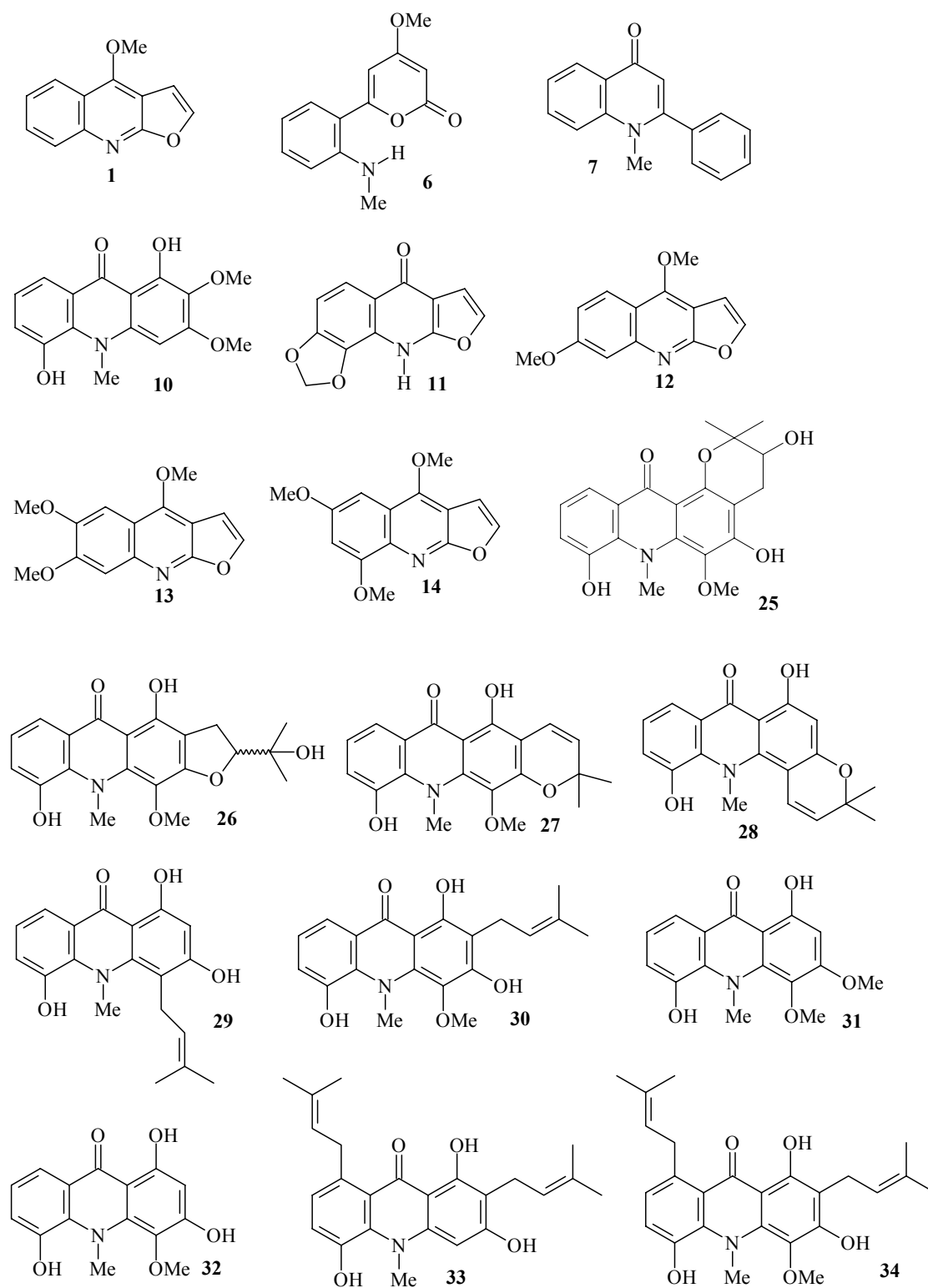


Figura 2.4. Estruturas das substâncias utilizadas nos ensaios fitotóxicos.

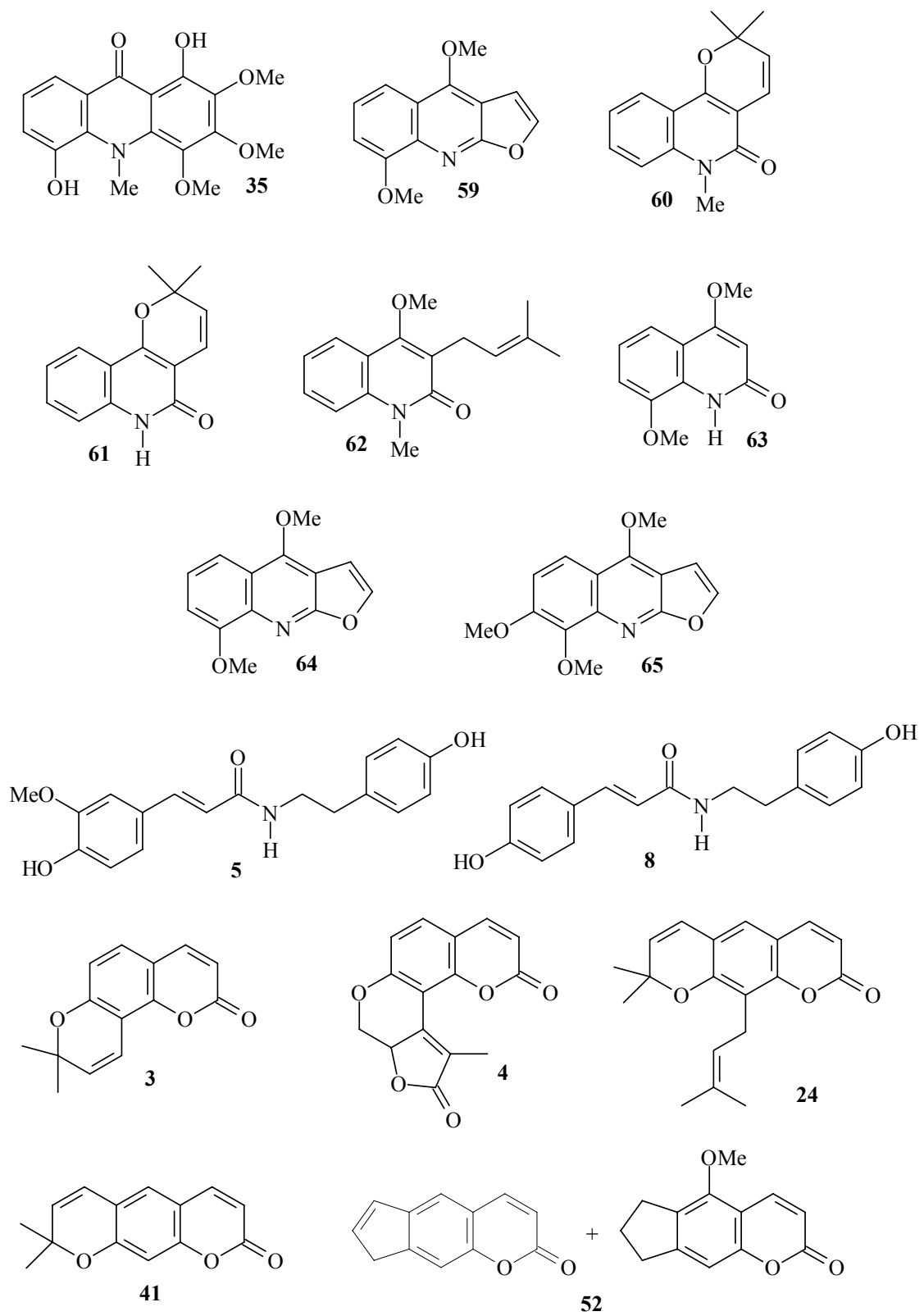


Figura 2.4. Continuação.

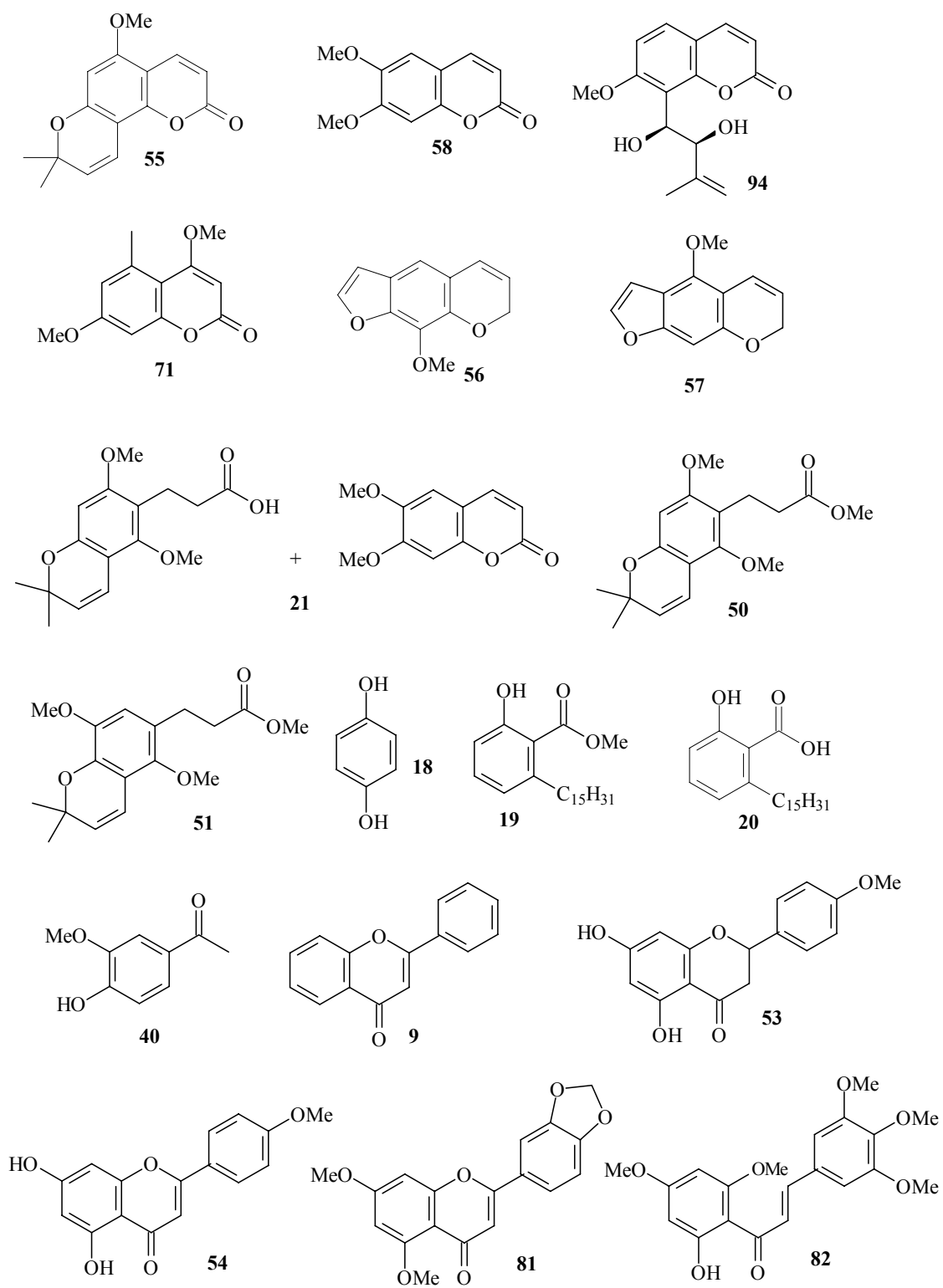


Figura 2.4. Continuação.

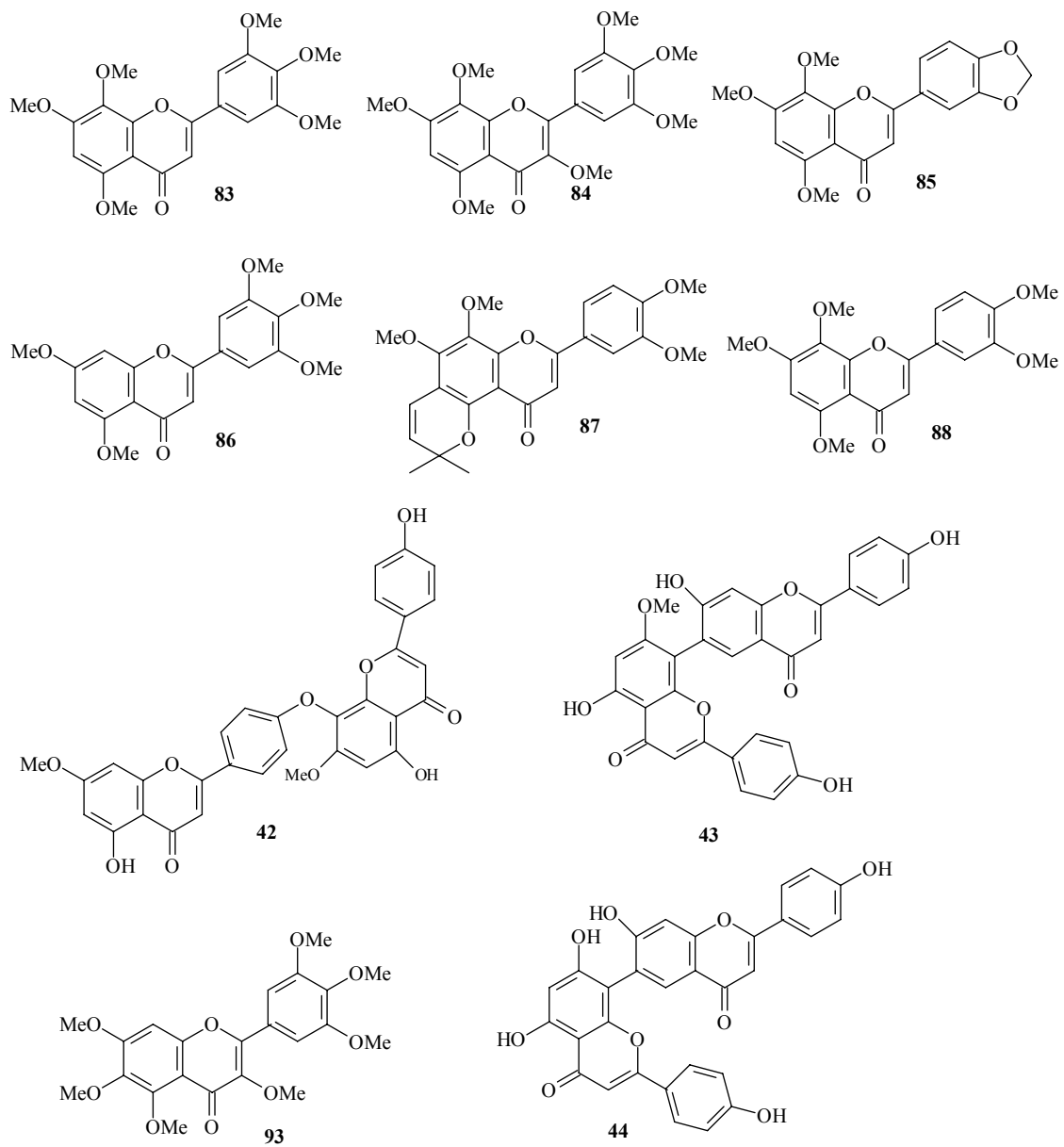


Figura 2.4. Continuação

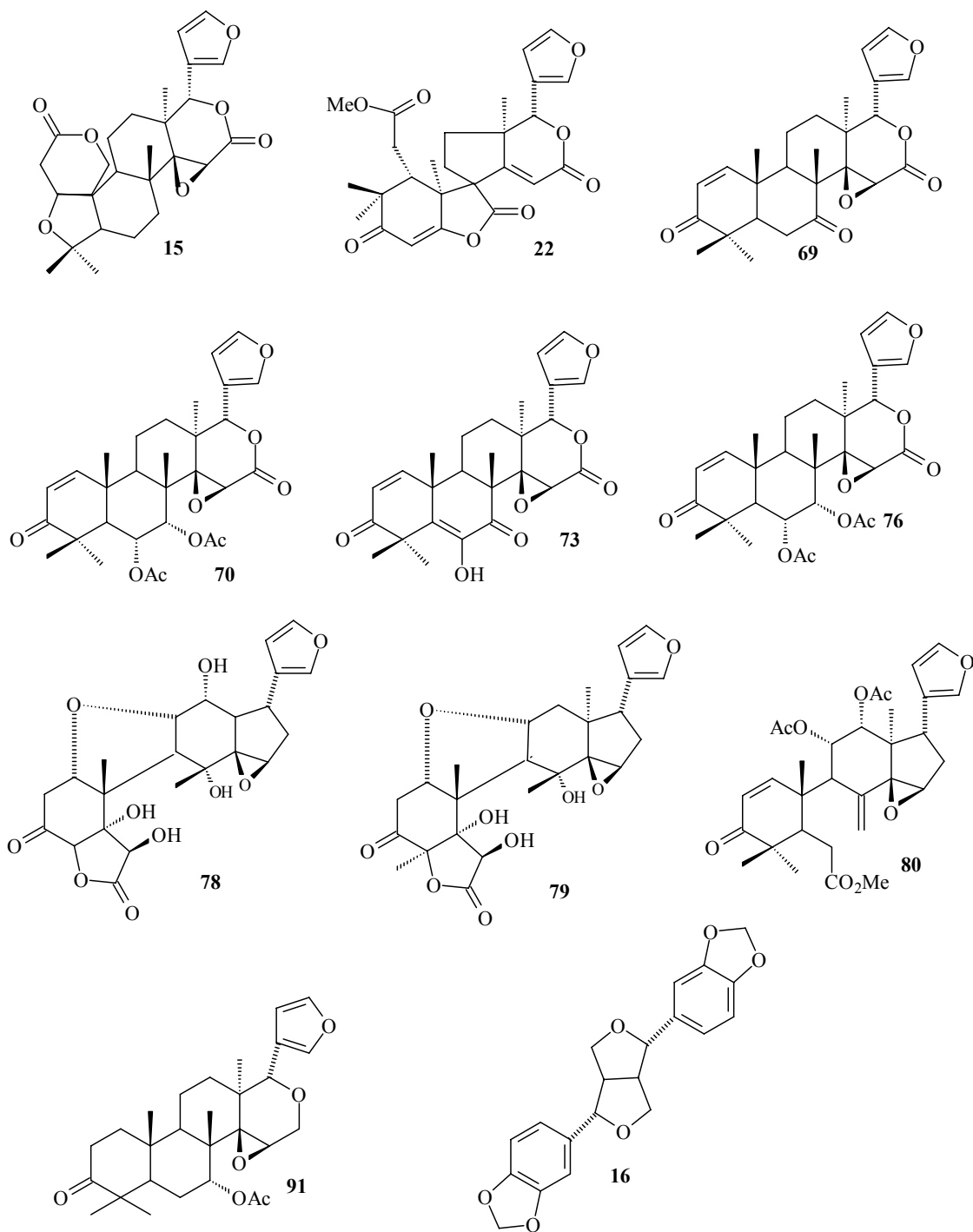


Figura 2.4. Continuação.

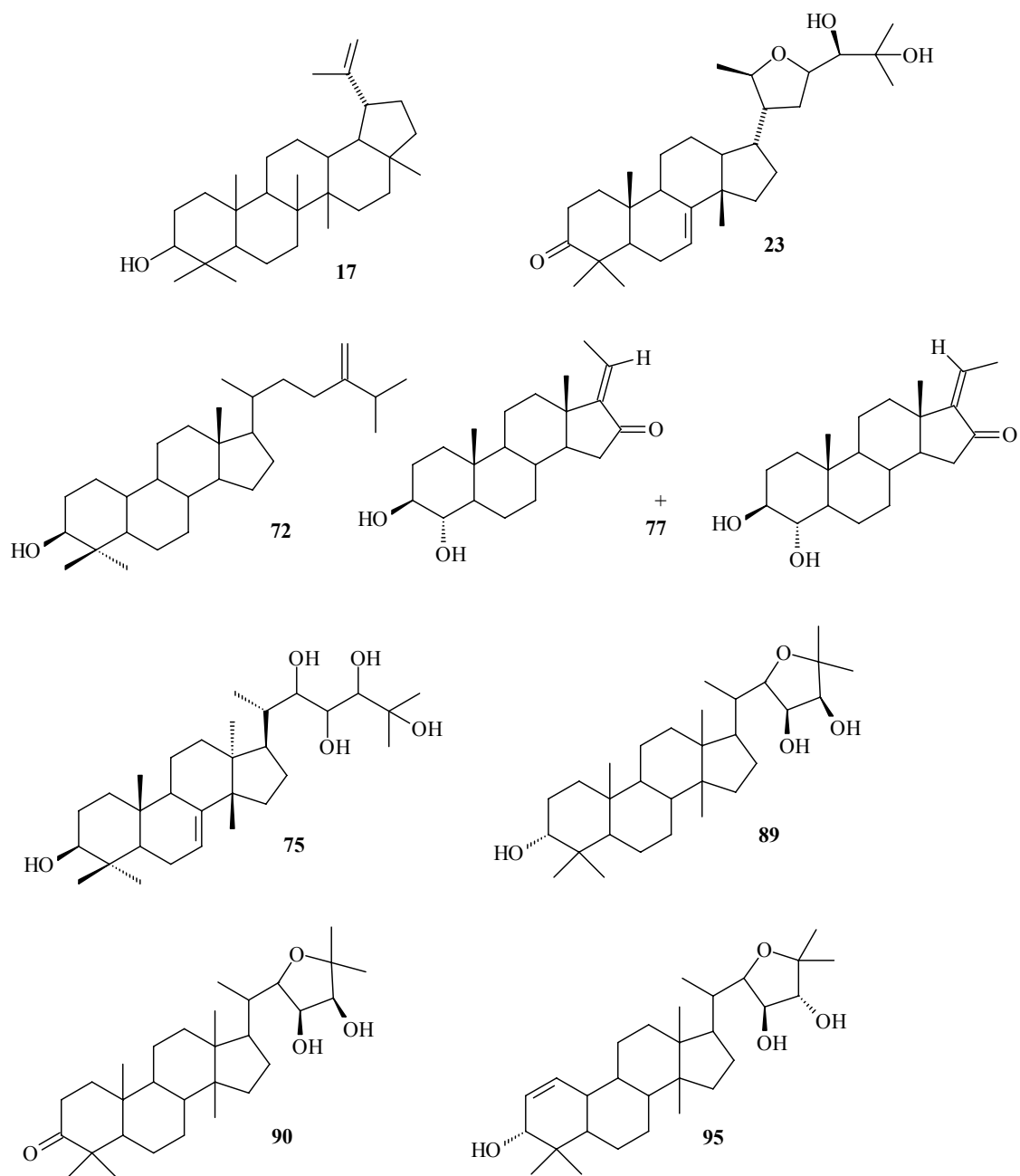


Figura 2.4. Continuação.

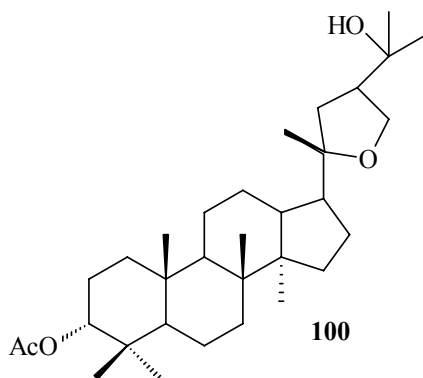
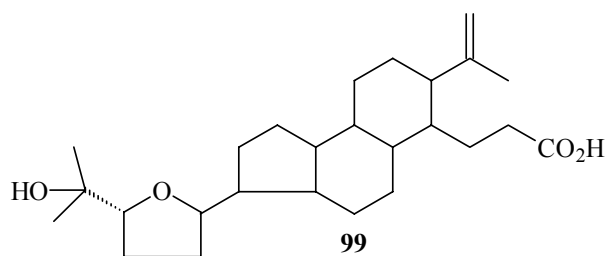
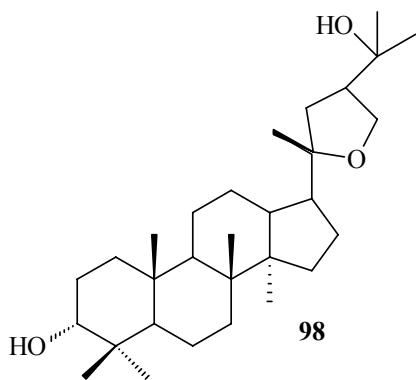
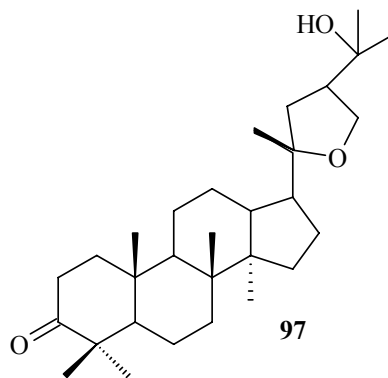
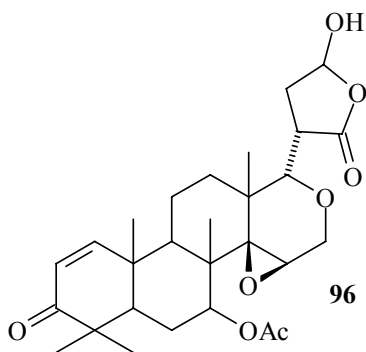


Figura 2.4. Continuação.

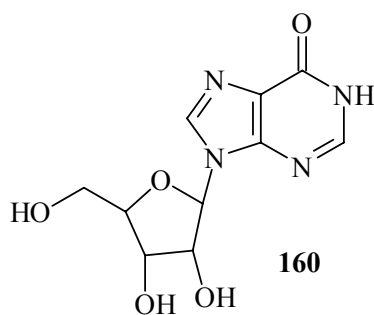
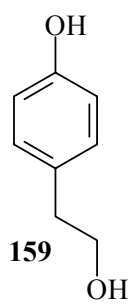
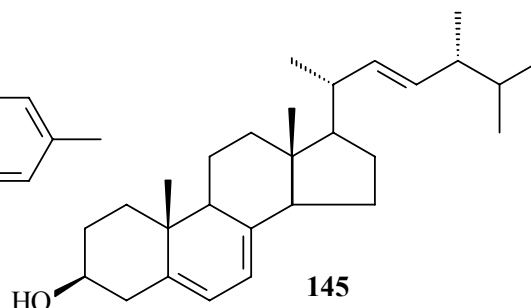
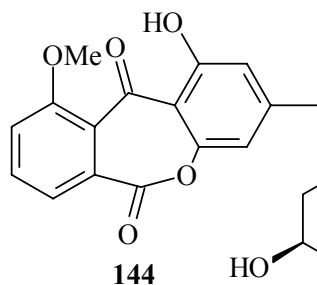
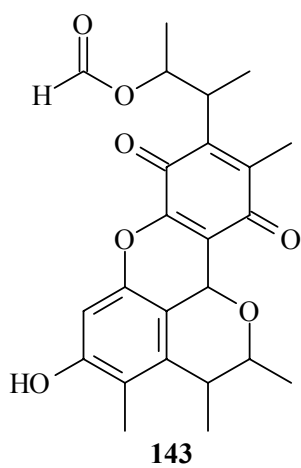
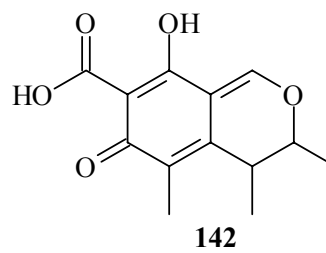
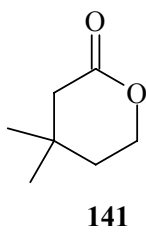
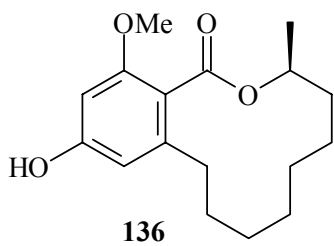


Figura 2.4. Continuação.

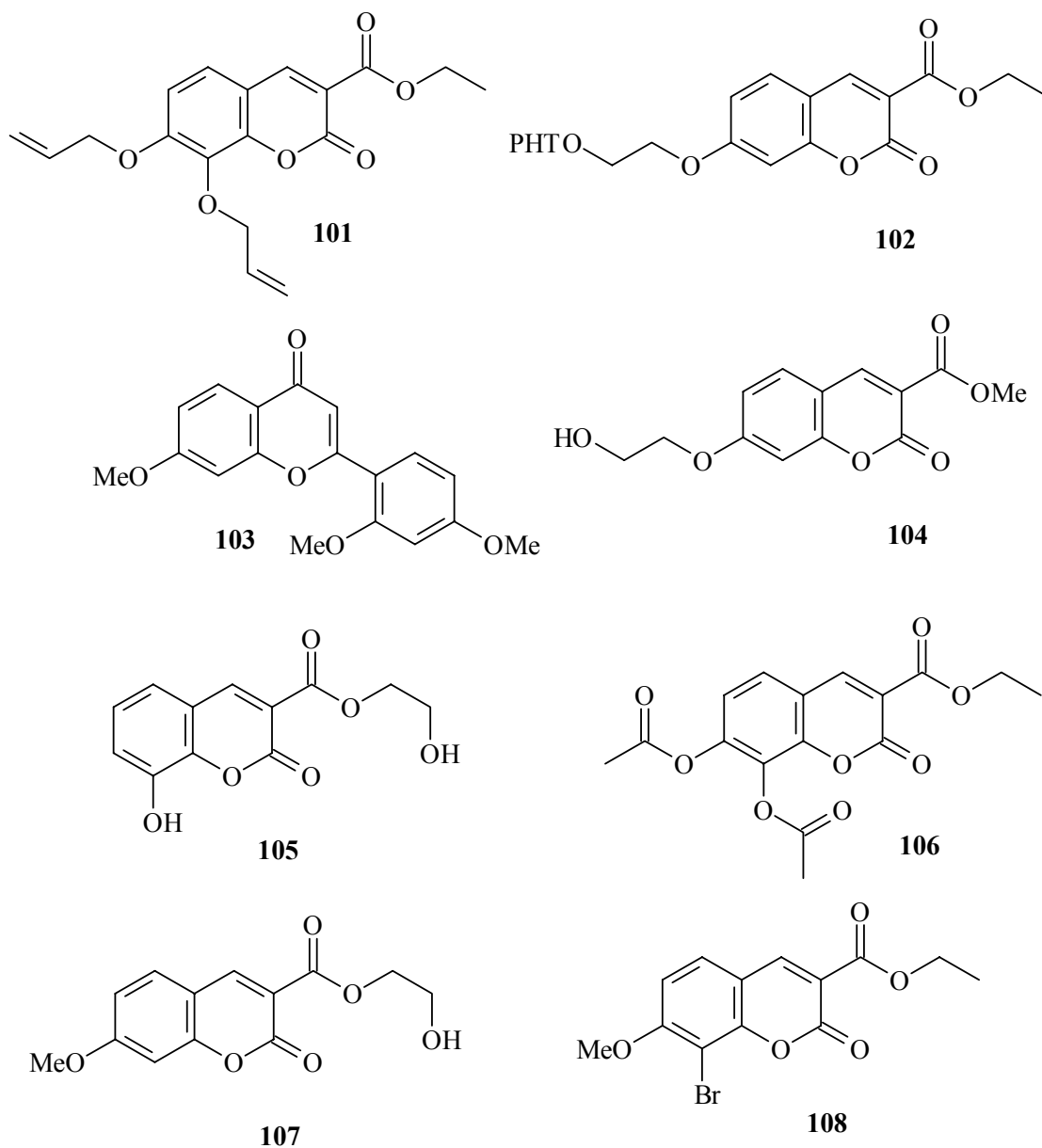


Figura 2.4. Continuação.

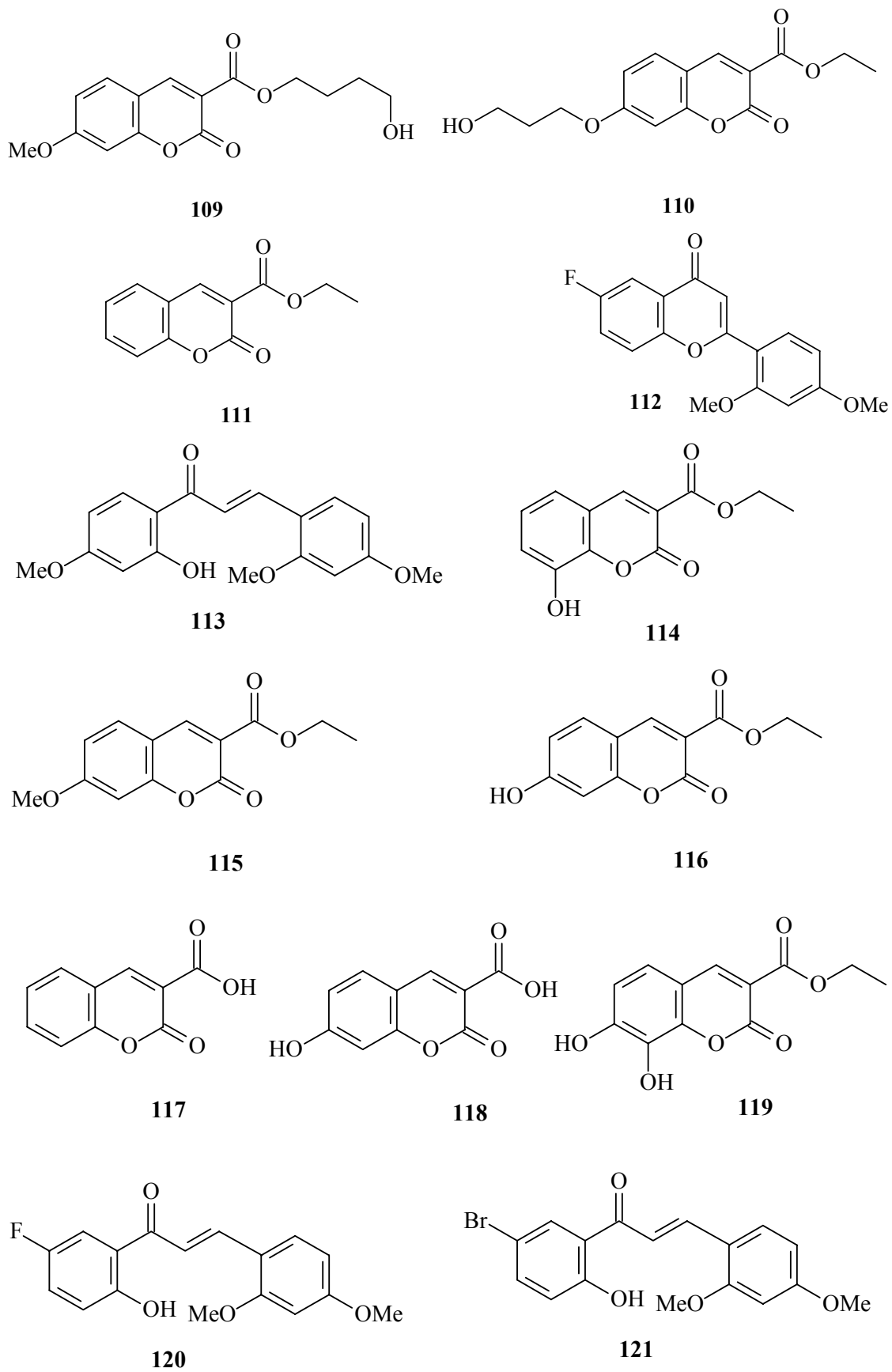


Figura 2.4. Continuação.

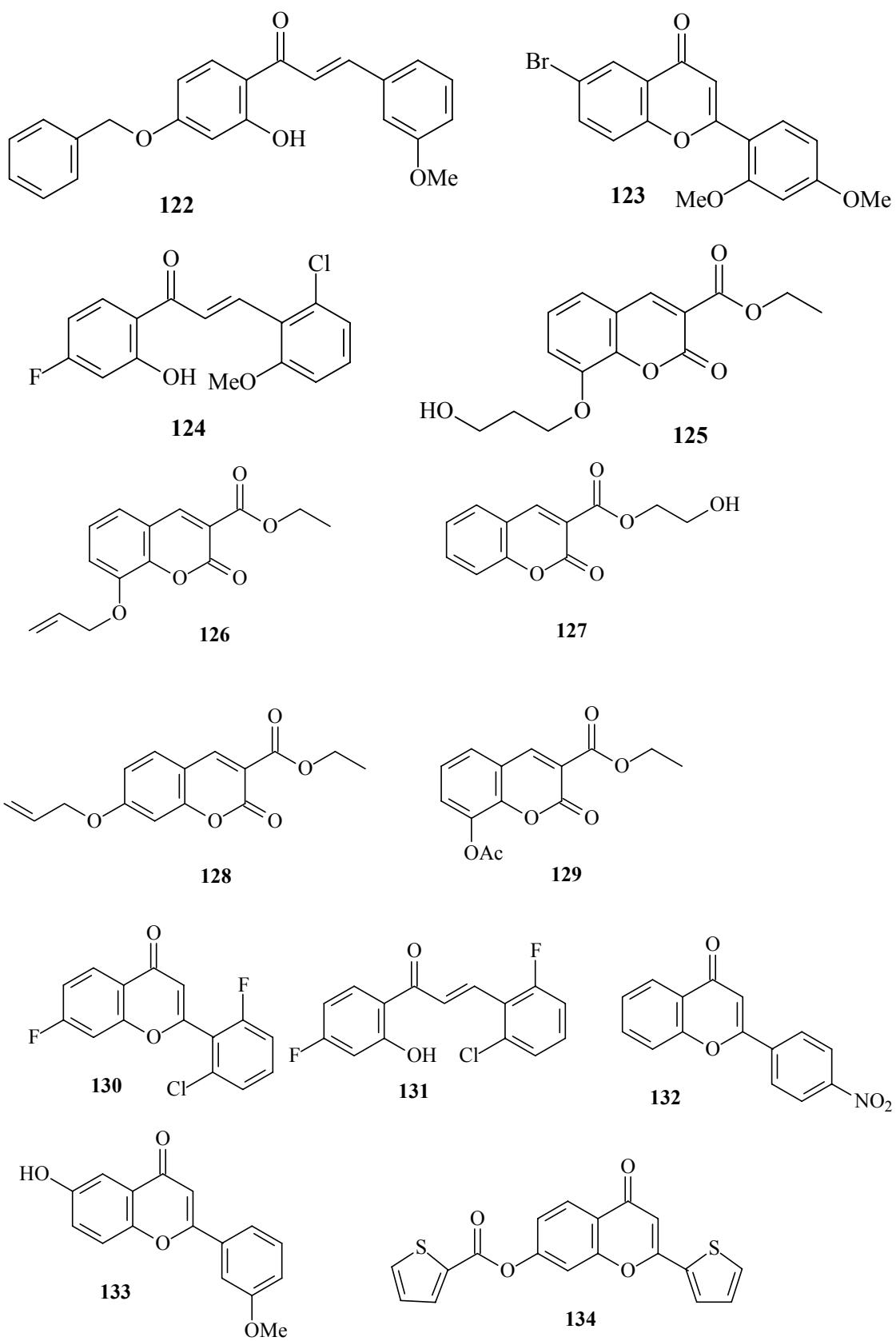


Figura 2.4. Continuação.

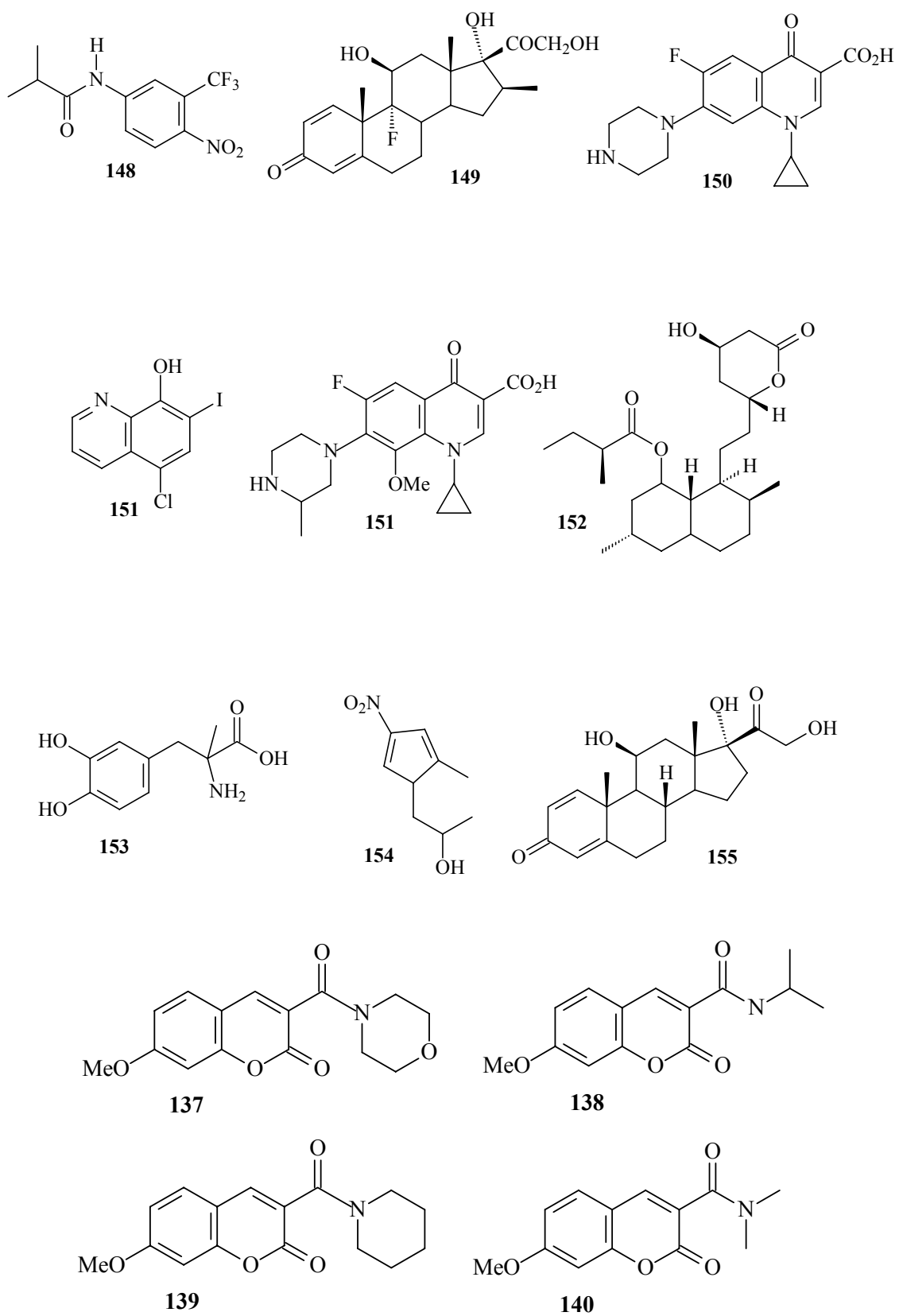


Figura 2.4. Continuação.

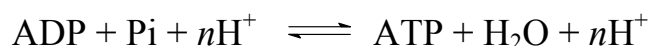
Tabela 2.2. Extratos e frações testadas nos ensaios de atividade fitotóxica.

Código	Identificação
36	Fração Hexano do extrato EtOH <i>Ipomoea batatas</i>
37	Fração CH ₂ Cl ₂ do extrato EtOH <i>Ipomoea batatas</i>
38	Fração AcOEt do extrato EtOH <i>Ipomoea batatas</i>
46	Extrato MeOH de <i>Ouratea hexasperma</i>
47	Extrato MeOH de <i>Pfaffia glomerata</i>
48	Extrato EtOH de <i>Caesalpineia peltophoroides</i>
49	Extrato MeOH de <i>Trichoderma oralisporum</i>
66	Fração AcOEt do extrato MeOH de <i>Trichoderma oralisporum</i>
147	Fração hidroalcóolica do extrato EtOH <i>Ipomoea batatas</i>

5. Resultados

5.1. Inibição da Síntese de ATP.

A síntese de ATP em cloroplastos está acoplada ao fluxo de elétrons dependente de luz devido a um gradiente eletroquímico de prótons (Peña-Valdivia et al., 1991). Os reagentes que fornecem a formação deste gradiente (inibidores do fluxo de elétrons) ou promovem sua dissipação (desacoplantes) inibem a fotofosforilação. A fotofosforilação pode também ser inibida por reagentes que bloqueiam a fosforilação, isto é, inibidores da transferência de energia, através da inibição de qualquer uma das etapas da cadeia redox, pela direta inibição do complexo H⁺ - ATPase ou pelo desacoplamento da síntese de ATP do transporte de elétrons (Achnine et al., 1999).



5.2. Efeito dos extratos e das frações de extrato sobre a síntese de ATP em cloroplastos isolados das folhas de espinafre.

Com o objetivo de conhecer o potencial fitotóxico dos extratos e as frações de extrato de plantas e fungos, os mesmos foram submetidos ao teste de inibição da síntese de ATP. A Tabela 2.3 mostra os resultados obtidos.

Tabela 2.3: Efeito de extratos e frações sobre a síntese de ATP.

Código	Identificação	Resultado
36	Fração em Hexano do extrato EtOH <i>Ipomoea batatas</i>	NI
37	Fração em CH ₂ Cl ₂ do extrato EtOH <i>Ipomoea batatas</i>	NI
38	Fração em AcOEt do extrato EtOH <i>Ipomoea batatas</i>	NI
46	Extrato em MeOH de <i>Ouratea hexasperma</i>	NI
47	Extrato em MeOH de <i>Pfaffia glomerata</i>	NI
48	Extrato em EtOH de <i>Caesalpineia peltophoroides</i>	NI
49	Extrato em MeOH de <i>Trichoderma oralisporum</i>	NI
66	Fração em AcOEt do extrato MeOH de <i>Trichoderma oralisporum</i>	NI
147	Fração hidroalcóolica do extrato EtOH <i>Ipomoea batatas</i>	NI

*NI: Não inibiu a síntese de ATP. Valores para o controle de 2716 $\mu\text{Mol ATP mg}^{-1} \cdot \text{Chl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$

5.3. Avaliação dos compostos puros sobre a síntese de ATP em cloroplastos isolados das folhas de espinafre.

Para a descrição dos resultados obtidos com os compostos puros, os mesmos foram divididos em dois grupos: substâncias não ativas e substâncias ativas.

5.4. Substâncias não ativas

As tabelas 2.4a, 2.4b e 2.4c mostram os resultados obtidos para estes compostos. Estes compostos, posteriormente serão submetidos a testes de inibição da germinação de sementes de espécies de plantas daninhas mexicanas. As diferenças entre os valores obtidos para os controles mostrados nas tabelas são justificadas por diversos fatores: quantidade e qualidade de folhas de espinafre utilizadas para a extração dos cloroplastos, quantidade de meio de isolamento empregada, etc., uma vez que o isolamento dos cloroplastos de espinafre foi realizado diariamente.

Tabela 2.4a: Efeito dos compostos puros sobre a síntese de ATP.

Composto	Resultado	Composto	Resultado	Composto	Resultado
01	NI	15	NI	32	NI
03	NI	16	NI	34	NI
04	NI	18	NI	35	NI
05	NI	21	NI	40	NI
06	NI	22	NI	41	NI
07	NI	24	NI	42	NI
08	NI	27	NI	43	NI
10	NI	28	NI	44	NI
11	NI	31	NI	45	NI

*NI: Não inibiu. Valores para o controle de 2044 $\mu\text{Mol ATP mg}^{-1}.\text{Chl}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para os compostos 01-11, 838 $\mu\text{Mol ATP mg}^{-1}.\text{Chl}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para os compostos 15-31 e 1276 $\mu\text{Mol ATP mg}^{-1}.\text{Chl}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para 32-45.

Tabela 2.4b: Efeito dos compostos puros sobre a síntese de ATP.

Composto	Resultado	Composto	Resultado	Composto	Resultado
50	NI	64	NI	81	NI
52	NI	66	NI	82	NI
53	NI	68	NI	84	NI
55	NI	69	NI	85	NI
56	NI	72	NI	86	NI
57	NI	74	NI	87	NI
58	NI	77	NI	88	NI
62	NI	79	NI	91	NI
63	NI	80	NI	93	NI

*NI: Não inibiu. Valores para o controle de 3582 $\mu\text{Mol ATP mg}^{-1}.\text{Chl}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para os compostos 50-63, 2040 $\mu\text{Mol ATP mg}^{-1}.\text{Chl}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para os compostos 64-80 e 950 $\mu\text{Mol ATP mg}^{-1}.\text{Chl}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para 81-93.

Tabela 2.4c: Efeito dos compostos puros sobre a síntese de ATP.

Composto	Resultado	Composto	Resultado
94	NI	144	NI
96	NI	145	NI
136	NI	146	NI
141	NI	159	NI
142	NI	160	NI

*NI: Não inibiu. Valores para o controle de 3211 $\mu\text{Mol ATP mg}^{-1}.\text{Chl}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para os compostos 94-142 e 2741 $\mu\text{Mol ATP mg}^{-1}.\text{Chl}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para 144-160.

5.5. Substâncias ativas

A síntese de ATP foi medida numa faixa de pH compreendida entre 8,00 e 8,05. Utilizou-se como acceptor de elétrons artificial o MV (metilviologênio). Os resultados são expressos em função de I_{50} (Concentração mínima necessária para redução de 50% da atividade). Para representação dos resultados, os compostos ativos foram divididos em dois grupos: (i) os que apresentaram $I_{50} > 100 \mu\text{M}$ e (ii) os que apresentaram $I_{50} < 100 \mu\text{M}$. Deve-se ressaltar que todos os testes bioquímicos foram conduzidos em triplicata.

(i) Substâncias que apresentaram $I_{50} > 100 \mu\text{M}$.

A figura 2.5 corresponde ao gráfico de inibição da síntese de ATP para os compostos **14**, **17**, **51** e **70** e a figura 2.6 para os compostos **76**, **78** e **83**. A tabela 2.5 mostra os valores dos I_{50} para todas estas substâncias.

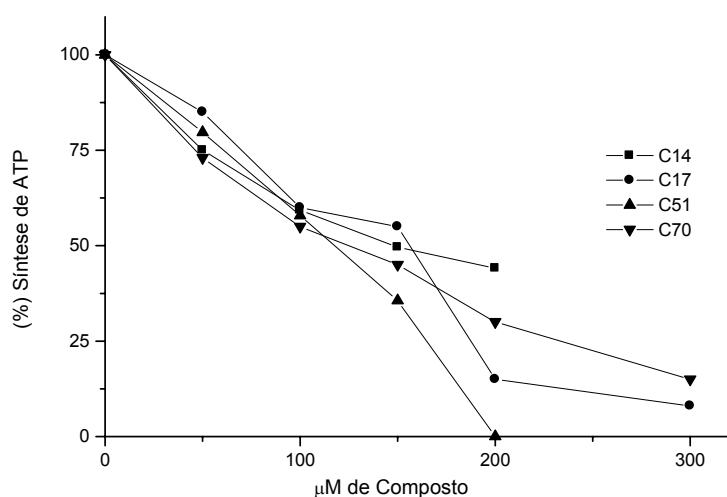


Figura 2.5. Efeito dos compostos **14** (■), **17** (●), **51** (▲) e **70** (▼) sobre a síntese de ATP. Os valores dos controles foram 4613, 4153, 1610 e 2044 $\mu\text{mol ATP} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg Chl}^{-1}$, para **14**, **17**, **51** e **70**, respectivamente.

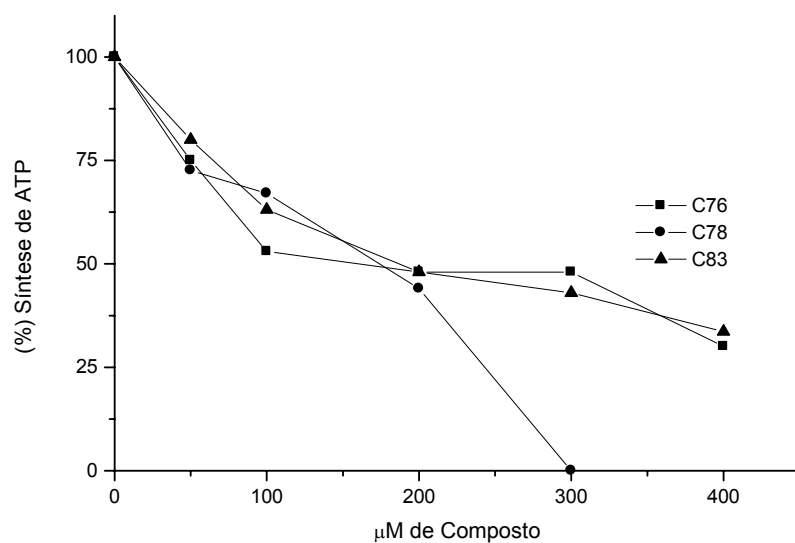


Figura 2.6. Efeito dos compostos **76** (■), **78** (●) e **83** (▲) sobre a síntese de ATP. Os valores dos controles foram 3582, 2044 e 7191 $\mu\text{mol ATP} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg Chl}^{-1}$, para **76**, **78** e **83**, respectivamente.

Tabela 2.5: Valores de I_{50} para inibição da síntese de ATP para os compostos **14**, **17**, **51**, **70**, **76**, **78** e **83**.

Composto	I_{50} (μM)
14	185,1
17	138,0
51	117,6
70	125,0
76	211,0
78	150,0
83	189,2

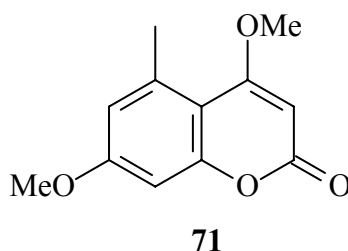
Estas substâncias serão analisadas com o intuito de se fazer modificações em suas estruturas químicas, na tentativa de aumentar o potencial fitotóxico das mesmas.

(ii) Compostos que apresentaram $I_{50} < 100 \mu\text{M}$.

Estes compostos foram agrupados de acordo com a similaridade química. Sendo assim, foram formados 11 grupos de compostos. Os grupos são constituídos pelas seguintes classes de compostos: cumarina, limonóide, policetídeos (isolados de fungos), flavonóides, compostos fenólicos, alcalóides furoquinolínicos, alcalóides quinolônicos, alcalóides acridônicos e triterpenos.

5.5.1. Efeito do siderina (71) sobre a síntese de ATP

O composto **71**, isolado da planta *Toona ciliata* (Oiano Neto, 2000) é a cumarina Siderina, comum na família Meliaceae. A figura 2.7 representa o efeito deste composto sobre a síntese de ATP em cloroplastos isolados de folhas de espinafre durante a fase luminosa da fotossíntese. Observou-se que a siderina inibiu a produção de energia luminosa (ATP), com um valor de I_{50} de $55,8 \mu\text{M}$ (Veiga, *et al.*, 2007b).



5.5.1.1. Elucidação do mecanismo de ação da siderina (71).

De acordo com Mitchell (1966), a formação de ATP pode ser inibida em qualquer uma das etapas da cadeia transportadora. Dessa forma, para conhecer o efeito da siderina sobre a síntese de ATP, seu mecanismo de ação em várias atividades de transporte de elétrons foi investigado. Os resultados mostraram que a evolução de oxigênio em cloroplastos iluminados, tendo metilviologênio (MV) como acceptor de elétrons foi inibida na presença de ADP e fosfato inorgânico (Pi). Observou-se, que inibição foi completamente realizada pela presença de NH_4Cl como desacoplante (Figura 2.7).

Os reagentes que bloqueiam o transporte de electrons também inibem a síntese de ATP desde a formação de um gradiente eletroquímico transmembrana, a força de saída para a síntese de ATP é dependente do fluxo de elétrons. Os compostos que aumentam a permeabilidade de prótons nas membranas de tilacóide desacoplam a fosforilação do fluxo de elétrons. Os agentes desacoplantes inibem a síntese de ATP pela diminuição do gradiente de prótons, porém o transporte de elétrons pode ocorrer a altas razões. Em contraste, os inibidores diretos da fosforilação oxidativa, bloqueiam tal fenômeno e a porção do transporte de elétrons que é consequência do fluxo de prótons ligado a fosforilação (Izawa and Good, 1972). Assim, a inibição descrita da fosforilação produzida pela siderina pode ser explicada pelo seu efeito em cada uma das etapas da cadeia transportadora através de reações de transferência de energia.

Dentro deste contexto, decidiu-se analisar o mecanismo de ação da siderina para determinar o seu efeito nas razões de transporte de elétrons em diferentes condições (basal, fosforilante e desacoplado). Na ausência ou presença de ADP, Pi, ou NH_4Cl e usando MV como acceptor de

elétrons, o siderina (**71**) inibiu a captura de oxigênio em cloroplastos iluminados (Figura 2.7). Observou-se que todas as condições do fluxo de elétrons foram inibidas por **71**, com valores de I_{50} de 153,0; 70,0 e 125,0 μM para os transportes basal, fosforilante e desacoplado, respectivamente. Dessa forma, conclui-se que a siderina pode ser classificada como um inibidor da reação de Hill.

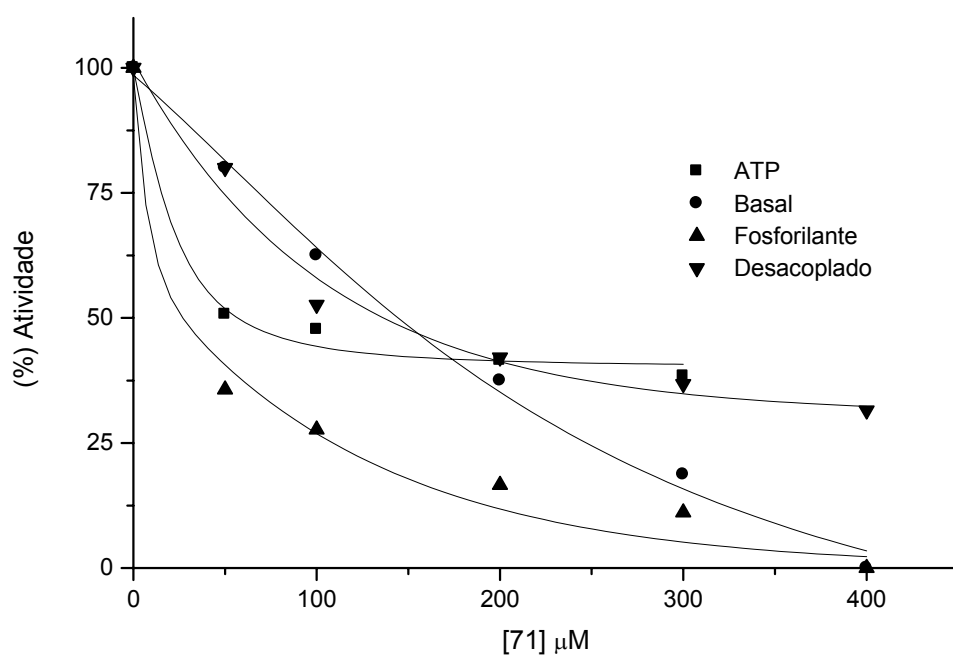


Figura 2.7. Efeito do composto **71** sobre a síntese de ATP (■), transporte de elétrons basal (●), fosforilante (▲) e desacoplado (▼) de H_2O a MV em cloroplastos de espinafre. A razão para o controle da síntese de ATP foi $1012 \mu\text{mol ATP} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg Chl}^{-1}$. E para o transporte de elétrons basal, fosforilante e desacoplado foram 533 , 600 e $1267 \mu\text{equiv} \cdot \text{e}^{-} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg Chl}^{-1}$, respectivamente.

5.5.1.2. Localização da siderina (71) nos ambientes de interação do fotossistema II e reações parciais.

Com o objetivo de determinar o sítio de inibição na cadeia de transporte de electrons nos tilacóides, o efeito da siderina sobre o FSII desacoplado, FSI e suas respectivas reações parciais foi determinado usando doadores, aceptores e inibidores de elétrons artificiais (King-Díaz et al., 2006). A siderina inibiu o fluxo de electrons desacoplado do FSII de H₂O a DCPIP (Tabela 5), de H₂O a SiMo e de DPC a DCPIP (Tabela 2.6). A siderina inibiu 100 %, as razões da atividade do transporte de electrons do FSII e as reações parciais do FSII a 400 µM. Inibiu também 57 % a 200 µM de DPC a DCPIP (Tabela 2.6). A medida polarográfica indica que o transporte de electrons do FSII possui dois sítios de inibição para o composto **71**. O primeiro sobre a enzima que fotoliza a molécula de água, e o outro se prendendo ao sítio da ação da quinona A (Q_A), impedindo a transferência de elétrons entre o centro reacional do FSII (P₆₈₀) e Q_A.

Tabela 2.6. Efeito da siderina (**71**) sobre o transporte de electrons do FSII desacoplado de H₂O a DCPIP, e reações parciais do FSII, de H₂O a SiMo e de DPC a DCPIP.

Conc. (μM)	FSII		FSII		FSII	
	H ₂ O a DCPIP		H ₂ O a SiMo		DPC a DCPIP	
	a	b	a	b	c	b
0	354	100	267	100	345	100
50	–	–	–	–	285	83
100	277	78	200	75	200	58
200	246	70	134	50	196	57
300	185	52	34	12	–	–
400	0	0	0	0	–	–

a valores em μequiv e⁻ mg⁻¹ Chl⁻¹.

b valores em porcentagem

c valores em μM DCPIP_{red} mg⁻¹ Ch h⁻¹.

5.5.1.3. Efeito da siderina sobre a fluorescência da clorofila a (Chl a).

No intuito de colaborar para o esclarecimento do (s) sítio (s) de interação da siderina no FSII, cloroplastos frescos e lisos foram incubados por 5 min no escuro a temperatura ambiente com três concentrações de **71** (400, 800 e 1000 μM), DCMU 10 μM e Tris 0,8 M, os quais foram usados como controle positivo (Figura 2.8). O controle dos tilacóides mostrou uma curva de fluorescência polifásica com uma sequência OJIP de transientes similares àqueles previamente publicados por Strasser et al. (1995). A adição de 10 μM do herbicida DCMU induz um rápido aumento do rendimento da fluorescência durante os primeiros 2 ms (milisegundos) de iluminação; isto transforma a sequência regular OJIP

numa curva OJ (Strasser et al., 1995). Quando os cloroplastos são tratados com Tris, o conhecido lado doador inibidor do FSII (Rickert et al., 1991), a forma da curva de indução de fluorescência é reduzida. Isto resulta numa redução no rendimento máximo da fluorescência, e a banda-K aparece e consiste de um rápido aumento ao máximo (a 300 μ s) seguido por uma redução no rendimento da fluorescência a um nível próximo a F_0 (todos os níveis, J e I estão ausentes do transiente, segundo, Strasser, 1997 & 2004). As condições dos tilacóides tratados com Tris são mostradas também por cloroplastos tratados-aquecidos onde as perdas da OEC ocorrem.

A análise da diferença de cada curva do controle da fluorescência relativa variável, quando a fase O – J foi normalizada entre $F_j - F_0$, $W_t = F_{v,t}/(F_j - F_0)/(F_j - F_0)$, mostra um aumento na supressão do nível J (a 2 ms), e um rápido aumento a aproximadamente 300 μ s aparece quando a concentração de siderina aumenta, indicando claramente a criação de uma banda K (Figura 2.9). De acordo com Strasser (1997), o aparecimento da banda K surge a partir de um desequilíbrio no fluxo de elétrons entre os doadores e aceptores de elétrons do sítio do FSII. Nesta condição, o fluxo de elétrons do OEC ao Z é mais lento que o fluxo de elétrons do P_{680} a Q_A . O rápido aumento da fluorescência inicial é devido a redução de Q_A a Q_A^- seguida pela redução de P_{680}^+ por Z sem a participação direta do complexo OEC (Strasser, 1997). Assim, a análise do transiente da fluorescência (Chl a) claramente indica que o complexo de evolução de oxigênio (OEC) foi inibida pelo composto 71. Quando o OEC é inibido, este não pode doar elétrons ao Y_z , que por sua vez não pode reduzir P_{680}^+ ; dentro deste contexto, uma máxima acumulação de P_{680}^+ , $Pheo^+$ e Q_A^- ocorre (Lazár et al., 1999). Strasset et al. (2004) propuseram o termo "centro de reação silencioso" como os centros que não podem nem reduzir Q_A e nem voltar a transferir sua energia de excitação a antena; portanto, as unidades correspondentes ao FSII não contribuem para a

fluorescência variável e seus rendimentos de fluorescência são menores. Os valores de F_0 foram quase constantes e de F_M diminuíram com o aumento da concentração de **71**, e os valores mais baixos da área sobre a curva entre F_0 e F_M (Tabela 2.7) indicam que a transferência de elétrons ao sítio da quinona é bloqueado. Assim, Q_A do FSII não é reduzida, e estes resultados indicam a criação dos centros de reação silenciosos (Strasset et al., 2004).

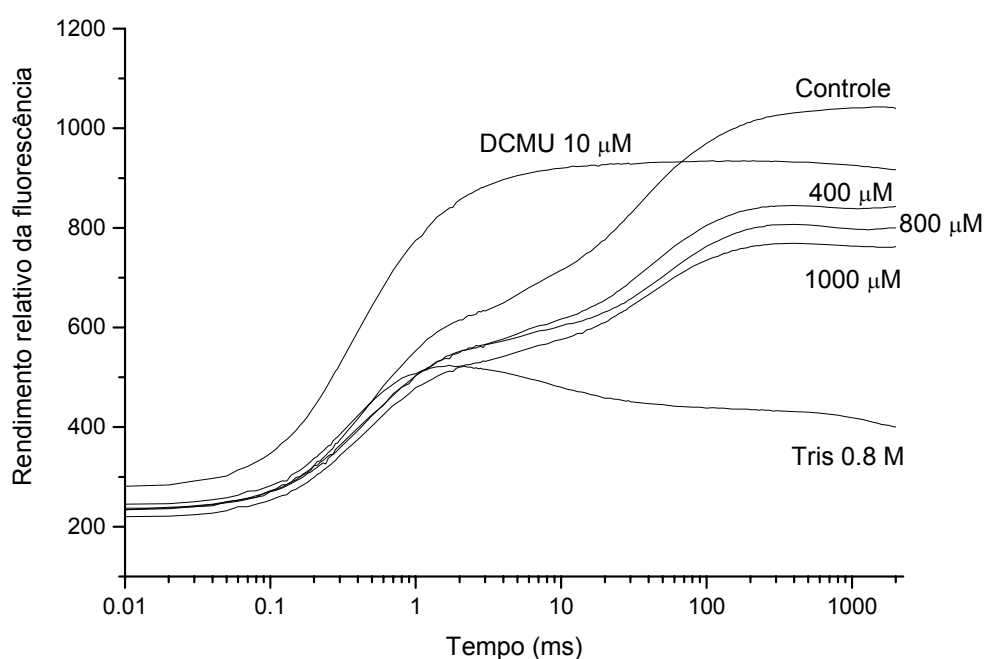


Figura 2.8. Aumento cinético da fluorescência de cloroplastos frescos e lisos infiltrados com siderina, DCMU e tilacóides tratados com Tris. Os controles dos cloroplastos são mostrados para comparação. Curvas de indução de fluorescência (Chl a) foram medidas a temperatura ambiente. Os dados são médias de três repetições.

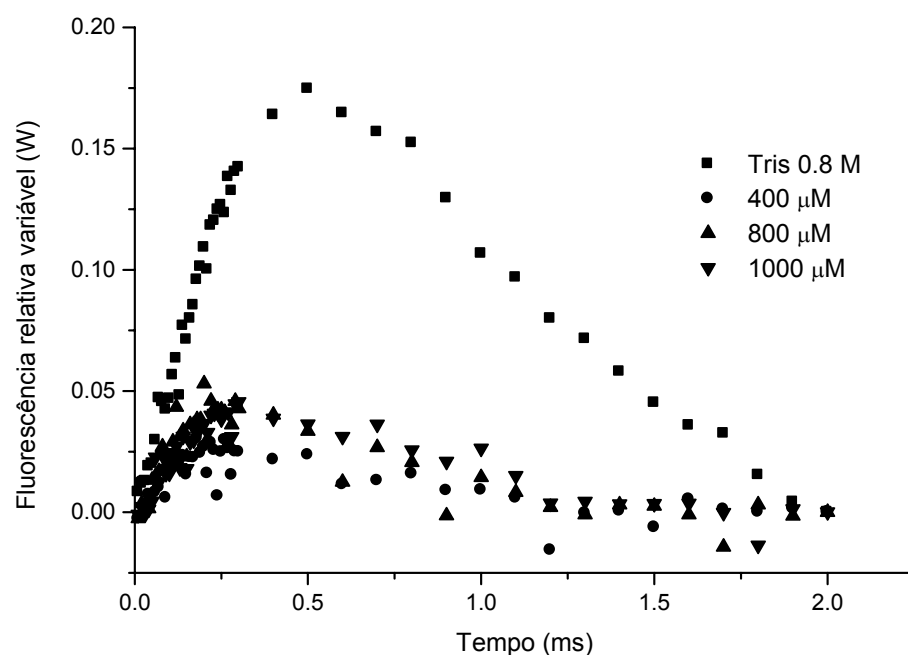


Figura 2.9. Aparecimento da banda K em aproximadamente 300 μ s. Diferença de cada curva do controle com a fluorescência variável relativa normalizada na amplitude $F_j - F_0$. Siderina a 400 (\bullet), 800 (\blacktriangle) e 1000 μ M (\blacktriangledown). Cloroplastos incubados com 0.8 M Tris (\blacksquare).

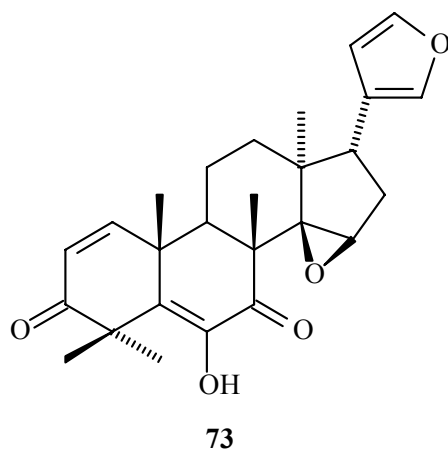
Tabela 2.7. Efeito do aumento da concentração da siderina sobre os parâmetros da fluorescência em tilacóides previamente incubados por 5 min no escuro e com 0,8 M Tris, pH 8,0.

Composto	F_0	F_M	F_j/F_M	área
Controle	198	953	0,792	30400
10 μ M DCMU	226	920	0,754	3000
0,8 M Tris	225	460	0,511	0
		71		
400 (μ M)	224	844	0,735	13400
800 (μ M)	224	806	0,722	13400
1000 (μ M)	210	769	0,727	11600

Pode-se concluir que a siderina atua como inibidor da reação de Hill. As medidas polarográficas e medidas de fluorescência (Chl a) indicam que este composto causa dano ao complexo OEC e tem seu sítio de ação localizado principalmente sobre o FSII, prendendo-se ao ambiente de ação de Q_A .

5.5.2. Efeito do composto **73** sobre a síntese de ATP

O composto **73**, isolado da planta *Toona ciliata* (Oiano Neto, 2000), é o limonóide Cedrelona A, comum na família Meliaceae. Observa-se que a Cedrelona inibiu a produção de energia luminosa (ATP), com um I_{50} de 19,0 μM (Figura 2.10).



5.5.2.1. Elucidação do mecanismo de ação da Cedrelona.

Ao contrário da siderina (71), a cedrelona (73) não atua como inibidor da reação de Hill, já que para o transpote de elétrons basal não atingiu o I_{50} a uma concentração de 200 μM e para os transportes fosforilante e desacoplado obteve para ambos um I_{50} de 199,0 μM , como pode ser visto na figura 2.10. Estes resultados sugerem que este composto atua como inibidor da transferência de energia, possuindo outro mecanismo de ação que deve ser esclarecido.

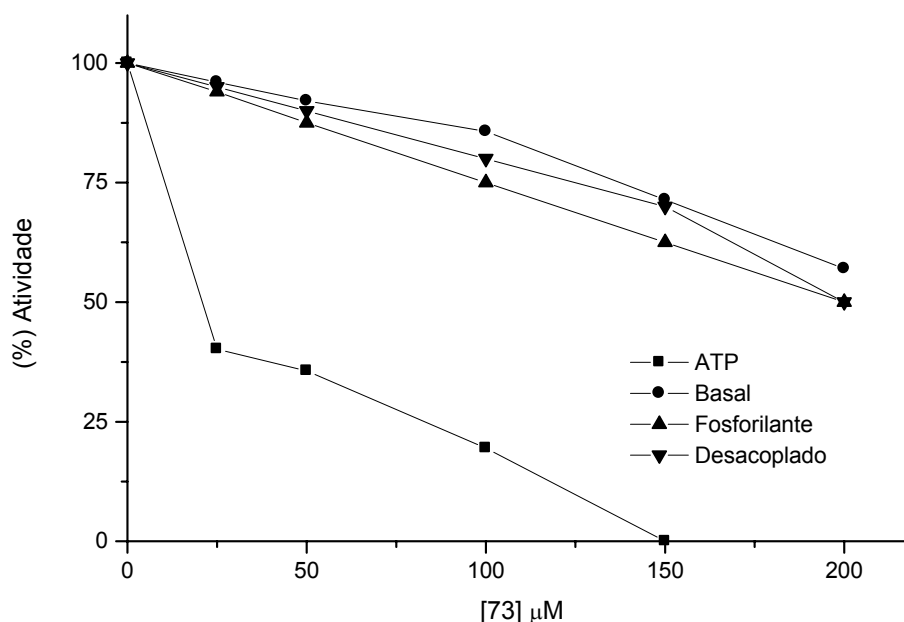


Figura 2.10. Efeito da cedrelona sobre a síntese de ATP (■), transporte de elétrons basal (●), fosforilante (▲) e desacoplado (▼) de H_2O a MV em cloroplastos de espinafre. A razão para o controle da síntese de ATP foi $3582 \mu\text{mol ATP} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg Chl}^{-1}$. E para o transporte de elétrons basal, fosforilante e desacoplado foram 234, 267 e 335 $\mu\text{equiv} \cdot \text{e}^{-} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg Chl}^{-1}$, respectivamente.

5.5.2.2. Localização da Cedrelona A nos ambientes de interação do fotossistema II e reações parciais.

Para determinar o sítio de inibição na cadeia de transporte de electrons nos tilacóides, o efeito de **73** sobre o FSII desacoplado, FSI e reações parciais foi determinado sob as mesmas condições usadas para o composto **71**. O composto **73** não inibiu o fluxo de electrons desacoplado do FSII de H₂O a DCPIP e inibiu de DPC a DCPIP (Tabela 2.8). Este composto inibiu 65 % da atividade enzimática a 400 µM de DPC a DCPIP (Tabela 2.8).

Tabela 2.8. Efeito da siderina (**73**) sobre o transporte de electrons do FSII de DPC a DCPIP.

Conc. (µM)	FSII	
	DPC a DCPIP	
	a	b
0	322	100
50	283	88
200	250	78
400	209	65

a valores em µM DCPIP_{red} mg⁻¹ Ch h⁻¹.

b valores em porcentagem.

5.5.2.3. Efeito da cedrelona sobre a Fluorescência (Chl *a*).

O estudo da fluorescência deste limonóide foi realizado no intuito de contribuir para o esclarecimento do mecanismo de interação deste composto como doador no sítio do FSII. Utilizou-se a concentração de 400 µM de cedrelona, DCMU 10 µM e Tris 0,8 M, que atuaram como controles (Figura 2.11). Após este estudo pode-se inferir que a Cedrelona A apresenta um de seus mecanismos de ação semelhante ao apresentado pelo

composto **71**. Observa-se que os valores de F_0 são quase constantes e os de F_M diminuíram com a concentração crescente de **73**, e os valores mais baixos da área sobre a curva entre F_0 e F_M (Tabela 2.9) indicam que a transferência de elétrons ao sítio da quinona foi parcialmente bloqueado.

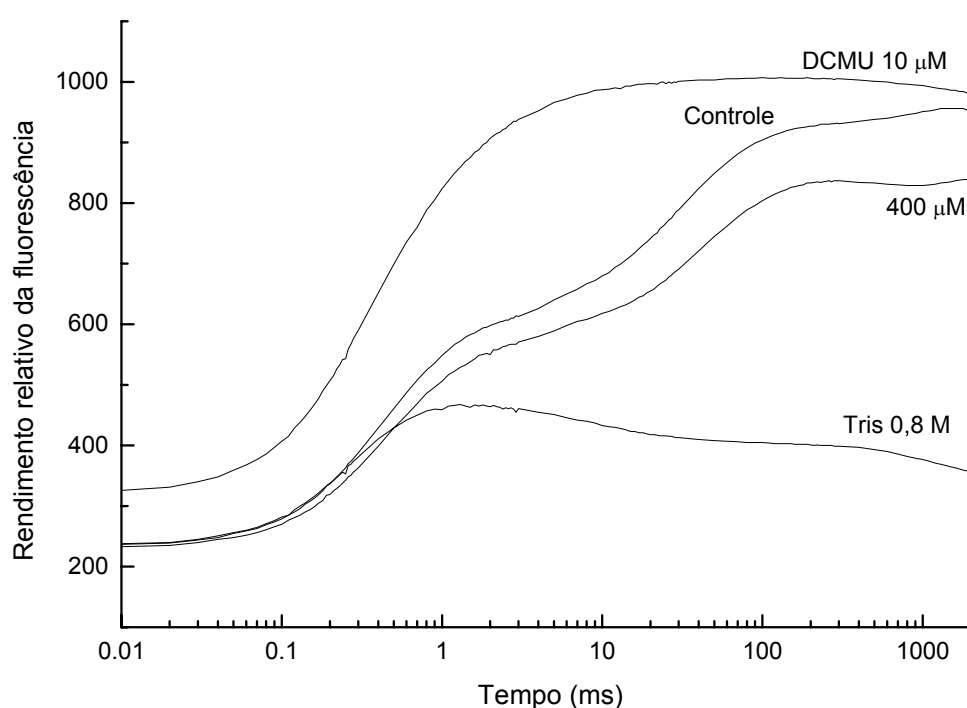


Figura 2.11. Aumento cinético da fluorescência de cloroplastos frescos e lisos infiltrados com cedrelona A (**73**), DCMU e tilacóides tratados com Tris. Os controles dos cloroplastos são mostrados para comparação. Curvas de indução de fluorescência (Chl a) foram medidas a temperatura ambiente. Os dados são médias de três repetições

Tabela 2.9. Efeito do aumento da concentração da cedrelona sobre os parâmetros da fluorescência em tilacóides previamente incubados por 5 min no escuro e com 0.8 M Tris, pH 8,0.

Composto	F_0	F_M	F_V/F_M	área
Controle	226	956	0,764	29200
10 μ M DCMU	307	1006	0,695	1000
0.8 M Tris	227	468	0,515	0
Cedrelona				
400 (μ M)	224	839	0,733	22200

5.5.2.4. Efeito da Cedrelona A sobre o complexo H^+ - ATPase.

Para verificar se a cedrelona interage com a unidade catalítica do complexo H^+ -ATPase quando este atua como inibidor da fotofosforilação (inibidor do transporte de elétrons fosforilante), seu efeito sobre H^+ -, Mg^{2+} - e Ca^{2+} - ATPases foi investigado. A tabela 2.10 mostra que com o aumento da concentração de **73** as três atividades são consideravelmente inibidas, sendo Mg^{2+} - ATPase de CF1 isolado a mais inibida (quase 53 % a 100 μ M). Este resultado está de acordo com o que foi verificado no teste de inibição da velocidade de transferência de elétrons (ver item 5.5.2.1), isto é, a Cedrelona A atua como inibidor da transferência de energia durante o processo fotossintético.

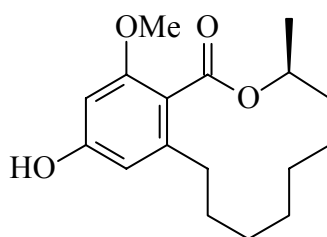
Tabela 2.10. Efeito da cedrelona sobre a membrana ligada ao tilacóide de H^+ -ATPase, sobre a atividade luminosa da membrana ligada de Mg^{2+} -ATPase e sobre a atividade de Ca^{2+} -ATPase aquecido do fator de acoplamento (CF1) de cloroplastos.

Composto	H^+ -ATPase (%)	Ca^{2+} -ATPase (%)	Mg^{2+} -ATPase (%)
Cedrelona A (μM)			
0	100	100	100
25	81.9	75.8	94.0
50	68.3	72.7	84.5
100	56.7	65.1	52.8

Valores do controle para Mg^{2+} - e Ca^{2+} - ATPases foram 47,3 μ moles Pi crescente/mg Chl.h. e 55,4 mmol Pi/mg de proteína, respectivamente. E para H^+ -ATPase de 91,7 μ moles Pi crescente/mg.

5.5.3. Efeito do composto **136** sobre a síntese de ATP.

O composto **136**, isolado do fungo *Botryosphaeria rhodina* (Matsuura et al., 1998), é um policetídeo conhecido como Lasiodiplodina. A figura 2.12 representa o efeito deste composto sobre a produção de ATP durante a fase fotoquímica da fotossíntese. O aumento da concentração deste composto provoca uma diminuição da síntese de ATP com um I_{50} de 35,6 μM .



136

5.5.3.1. Elucidação do mecanismo de ação da lasiodiplodina.

Com base no resultado do ensaio de inibição da síntese de ATP, decidiu-se identificar o modo de ação da lasiodiplodina. Para determinar seu efeito, foram medidas as razões de transporte de elétrons em diferentes condições (basal, fosforilante e desacoplado). Na ausência ou presença de ADP, Pi, ou NH₄Cl e tendo MV como acceptor de elétrons artificial, a lasiodiplodina inibiu o transporte de elétrons em cloroplastos iluminados (Figura 2.12). Todas as condições do fluxo de elétrons foram inibidas por **136**. Sendo assim, este é um composto que também pode ser classificado como inibidor da reação de Hill. O transporte de electrons desacoplado foi o mais inibido (100% a 300 μM). Entretanto, comparando-se com a inibição da síntese de ATP (100 % at 150 μM), ou seja, uma quantidade duas vezes maior de lasiodiplodina é requerida para inibir o fluxo de elétrons desacoplado e, por outro lado, o transporte basal foi o menos afetado. Portanto, a lasiodiplodina possui mais de um mecanismo de ação, talvez o de inibição do complexo H⁺-ATPase (Veiga *et al.*, 2007a).

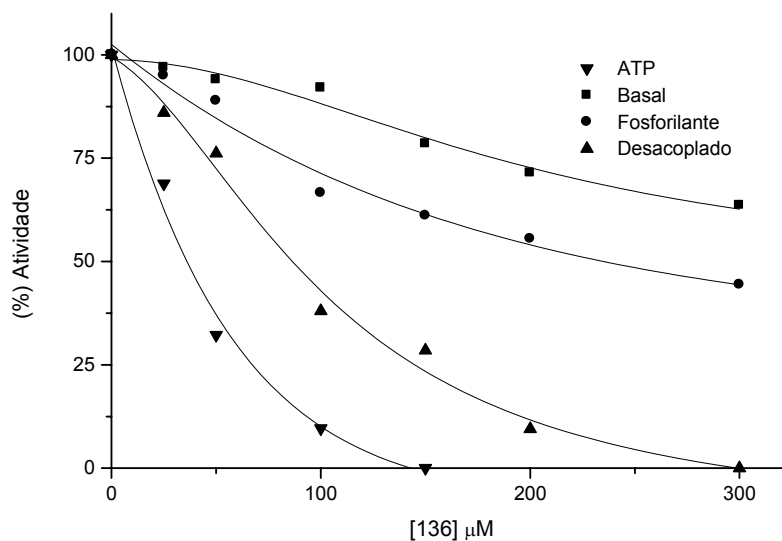


Figura 2.12. Efeito da lasiodiplodina sobre a síntese de ATP (▼), transporte de elétrons basal (■), fosforilante (●) e desacoplado (▲) de H₂O a MV em cloroplastos de espinafre. A razão para o controle da síntese de ATP foi 1276 μmol ATP · h⁻¹ · mg Chl⁻¹. E para o transporte de elétrons basal, fosforilante e desacoplado foram 933, 1200 e 1400 μequiv · e⁻ · h⁻¹ · mg Chl⁻¹, respectivamente.

5.5.3.2. Localização da Lasiodiplodina no sítio de interação do FSII e reações parciais.

O sítio de inibição da lasiodiplodina sobre a cadeia de transporte de electrons de tilacóides, foi determinada usando os inibidores, doadores e aceptores artificiais apropriados (King-Díaz et al., 2006). A Lasiodiplodina inibiu o fluxo de electrons do FSII de H₂O a DCPIP (Tabela 2.11), de H₂O a SiMo e de DPC a DCPIP (Tabela 10). A lasiodiplodina inibiu em 100 % todas as atividades da razão do transporte de elétrons do FSII e suas reações parciais a 400 μM, exceto na etapa de DPC a DCPIP. A medida polarográfica indica que a cadeia de transporte de elétrons possui dois sítios de inibição para **136**. Um deles pode ser sobre a enzima que

fotoliza a molécula de água ou ainda sobre o caminho de transferência eletrônica entre P₆₈₀ a Q_A.

Tabela 2.11. Efeito de **136** sobre o transporte de electrons do FSII desacoplado H₂O a DCPIP, e reações parciais do FSII, de H₂O a SiMo e de DPC a DCPIP.

Conc. (µM)	FSII		FSII		FSII	
	H ₂ O a DCPIP		H ₂ O a SiMo		DPC a DCPIP	
	a	b	a	b	c	b
0	433	100	400	100	449	100
50	–	–	–	–	–	–
100	266	62	320	80	389	87
200	200	46	280	70	336	75
300	133	31	160	40	120	27
400	0	0	0	0	–	–

a valores em µequiv e⁻ mg⁻¹ Chl⁻¹.

b valores em porcentagem

c valores em µM DCPIP_{red} mg⁻¹ Ch h⁻¹.

5.5.3.3. Efeito de **136** sobre as atividades dependentes das membranes ligadas de H⁺ -, Mg²⁺ - e Ca²⁺ - ATPases.

Para determinar se **136** interage com a unidade catalítica do complexo H⁺-ATPase quando este inibiu a fotofosforilação, seus efeitos sobre H⁺-, Mg²⁺- e Ca²⁺- ATPases foram investigados. A tabela 2.12 mostra que com o aumento da concentração de **136**, as três atividades foram parcialmente reduzidas, sendo que Mg²⁺-ATPase de CF1 isolado a mais inibida (51 % a 150 µM). Este último resultado indica que a lasiodiplodina possui outro sítio de interação e inibição com CF1, quando atua como inibidor da transferência de energia.

Tabela 2.12. Efeito de **136** sobre a membrana ligada a tilacóide (H^+ - ATPase), sobre a membrana ligada de luz ativada (Mg^{2+} -ATPase) e sobre a atividade aquecida (Ca^{2+} -ATPase) do fator de acoplamento purificado 1 (CF1) de cloroplastos.

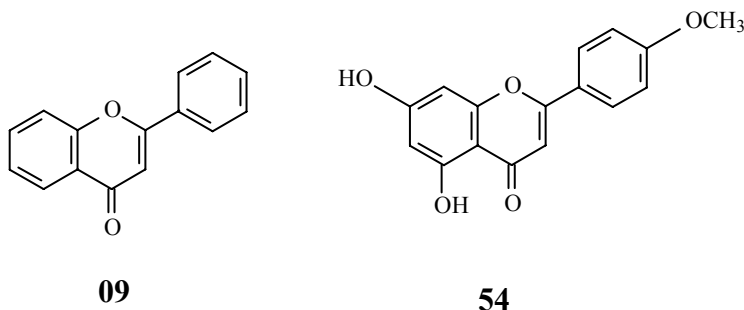
Composto	H^+ -ATPase (%)	Ca^{2+} - ATPase (%)	Mg^{2+} - ATPase (%)
Lasiodiplodina (μM)			
0	100	100	100
25	-	95.6	62.3
50	95.0	87.5	54.5
150	98.5	84.1	49.4
200	97.7	-	-

Controle para Mg^{2+} - e Ca^{2+} - ATPases foram 47,3 μ moles Pi crescente/mg Chl.h. e 55,4 mmol Pi/mg de proteína, respectivamente. E para H^+ -ATPase foi de 48,0 μ moles Pi crescente/mg Chl.h.

Com base nas informações obtidas, pode-se afirmar que a lasiodiplodina apresenta três mecanismos de ação distintos: (i) inibidor da reação de Hill; (ii) inibidor da transferência de energia, causando dano ao complexo de evolução de oxigênio (fotolize a água); (iii) e ainda atua sobre o FSII, prendendo-se no sítio de ação de Q_A (Veiga *et al.*, 2007a).

5.5.4. Caracterização do mecanismo de ação dos flavonóides **09** e **54**.

Os compostos **09** e **54**, isolados de plantas pertencentes à família Rutaceae (Ambrozin, 2004 e Braga, 2005), são flavonóides, pertencentes ao sub-grupo das flavonas. As figuras 2.13 (**09**) e 2.14 (**54**) representam o efeito dos compostos sobre a produção de ATP durante a fase luminosa da fotossíntese. Com o aumento da concentração destes compostos foi possível observar uma pequena diminuição da síntese de ATP com um I_{50} de 99,5 e 82,5 μM , para **09** e **54**, respectivamente.



5.5.4.1. Elucidação do mecanismo de ação dos compostos **09** e **54**.

Após estas substâncias terem sido submetidas ao teste preliminar de inibição da síntese de ATP para verificação de seus potenciais fitotóxicos, as mesmas foram avaliadas nos testes de inibição da velocidade transportadora de elétrons. O composto **09** apresentou maior potência sobre o transporte de elétrons desacoplado, já que obteve I_{50} de 160 μM , por outro lado foi pouco ativo sobre os transportes de elétrons basal e fosforilante, já que observou-se valores de I_{50} de 400 e 300 μM , respectivamente (Figura 2.13).

A Acacetina (**54**) foi mais ativa que o composto **09**, pois inibiu os transportes basal e desacoplado com I_{50} de 101,0 e 79,0 μM , respectivamente (Figura 2.14). No entanto, não inibiu a etapa fosforilante da cadeia transportadora de elétrons. Porém, devido a pequena quantidade

isolada desta flavona, não foi possível realização dos experimentos que ajudariam a esclarecer seu modo de ação.

A flavona **09** passará por reações para modificação de sua estrutura, já que através dos resultados parciais obtidos para **54** sugere-se que a adição de grupos substituintes na estrutura básica da flavona aumentará o potencial de ação da mesma.

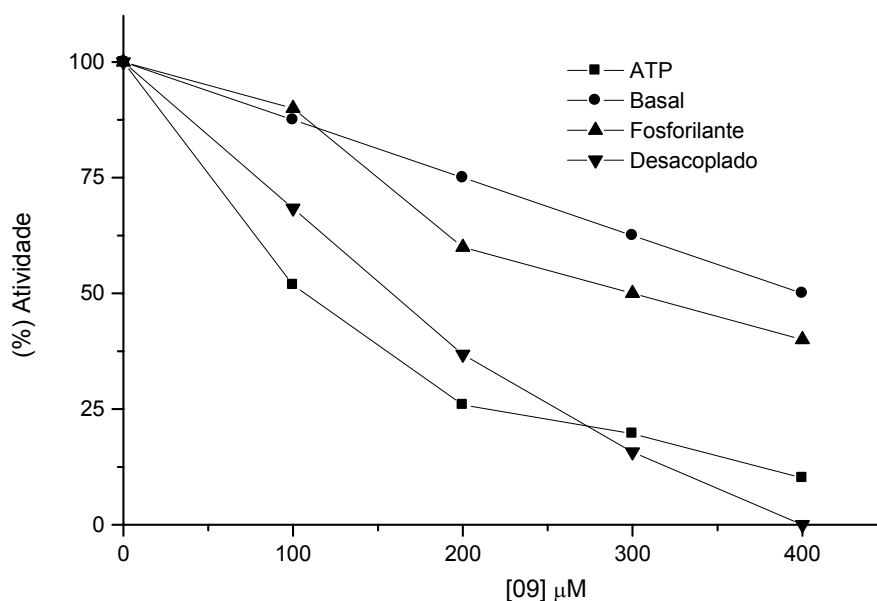


Figura 2.13. Efeito do composto **09** sobre a síntese de ATP (■), transporte de elétrons basal (●), fosforilante (▲) e desacoplado (▼) de H_2O a MV em cloroplastos de espinafre. A razão para o controle da síntese de ATP foi $2578 \mu\text{Mol ATP} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg Chl}^{-1}$. E para o transporte de elétrons basal, fosforilante e desacoplado foram 356, 445 e $845 \mu\text{equiv} \cdot \text{e}^{-} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg Chl}^{-1}$, respectivamente.

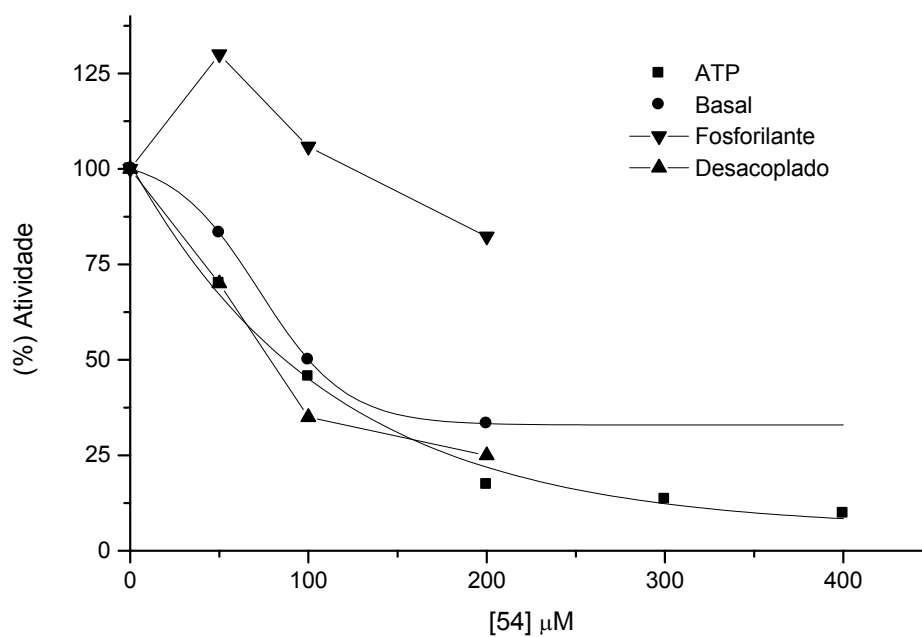
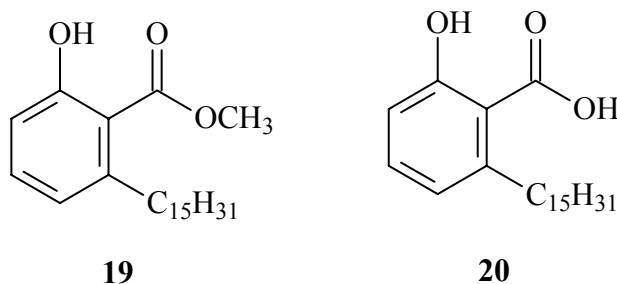


Figura 2.14. Efeito da acetina **54** sobre a síntese de ATP (■), transporte de elétrons basal (●), fosforilante (▼) e desacoplado (▲) de H₂O a MV em cloroplastos de espinafre. A razão para o controle da síntese de ATP foi 2578 $\mu\text{Mol ATP} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg Chl}^{-1}$. E para o transporte de elétrons basal, fosforilante e desacoplado foram 600, 850 e 1000 $\mu\text{equiv} \cdot \text{e}^{-} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg Chl}^{-1}$, respectivamente.

5.5.5. Caracterização do mecanismo de ação dos compostos **19** e **20**.

Os compostos **19** e **20**, isolados da planta *Anacardium occidentale* L. (Anacardiaceae), tiveram seus dados químicos relatados pela primeira vez por Gallerma & Schlenk (1968). Estes são compostos fenólicos, conhecidos como ácido anacárdico (**20**) e seu éster metílico (**19**). As figuras 2.15 (**19**) e 2.16 (**20**) representam o efeito de concentrações crescentes destes compostos sobre a síntese de ATP de cloroplastos isolados de folhas de espinafre. Os dois compostos foram ativos neste ensaio já que obtiveram como valores de I_{50} 78,1 e 38,1 μM , para **19** e **20**, respectivamente.



5.5.5.1. Elucidação do mecanismo de ação dos compostos **19** e **20**.

Foi medido o efeito destes compostos sobre as razões de transporte de elétrons basal, fosforilante e desacoplado. Como resultado, observou-se que o composto **20** foi o mais ativo, já que inibiu as três condições de transporte com I_{50} de 11,8; 6,6 e 2,8 μM , para basal, fosforilante e desacoplado, respectivamente (Figura 2.15). Dessa forma pode-se inferir que o ácido anacárdico atua como inibidor da reação de Hill. Por outro lado o composto **19** não apresentou uma atividade similar ao **20**, pois não inibiu com a mesma eficiência a cadeia transportadora de elétrons, já que apresentou os seguintes valores de I_{50} 230,0 (basal), 200,0 (fosforilante) e 250,0 (desacoplado) μM (Figura 2.16). A partir destes resultados preliminares pode-se afirmar que o grupo ácido livre é fundamental para o aumento expressivo desta atividade.

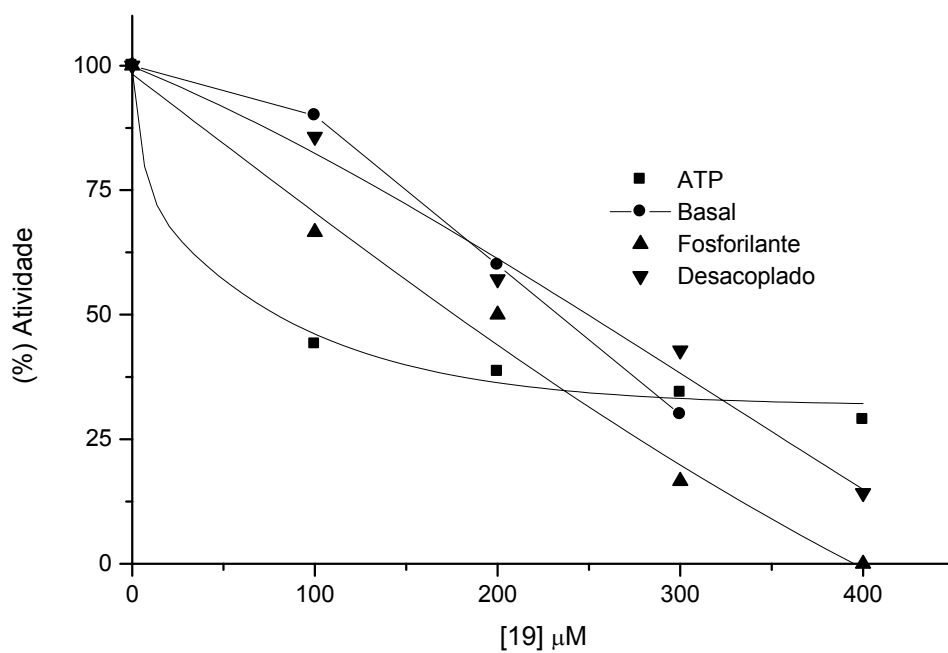


Figura 2.15. Efeito do composto **19** sobre a síntese de ATP (■), transporte de elétrons basal (●), fosforilante (▲) e desacoplado (▼) de H₂O a MV em cloroplastos de espinafre. A razão para o controle da síntese de ATP foi 4613 $\mu\text{Mol ATP} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg Chl}^{-1}$. E para o transporte de elétrons basal, fosforilante e desacoplado foram 286, 343 e 400 $\mu\text{equiv} \cdot \text{e}^{-} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg Chl}^{-1}$, respectivamente.

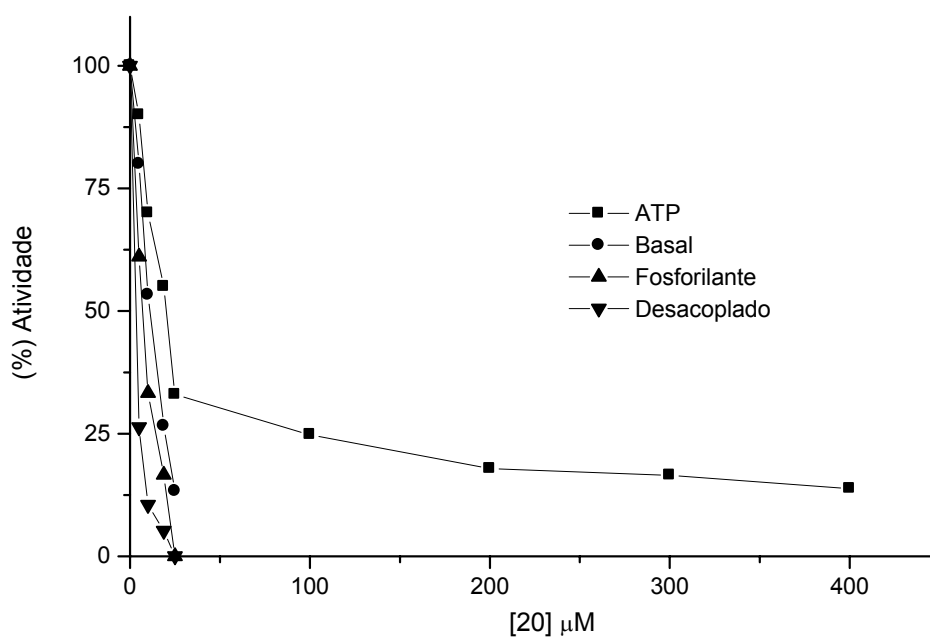


Figura 2.16. Efeito do composto **20** sobre a síntese de ATP (■), transporte de elétrons basal (●), fosforilante (▲) e desacoplado (▼) de H₂O a MV em cloroplastos de espinafre. A razão para o controle da síntese de ATP foi 4613 $\mu\text{Mol ATP} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg Chl}^{-1}$. E para o transporte de elétrons basal, fosforilante e desacoplado foram 500, 600 e 800 $\mu\text{equiv} \cdot \text{e}^{-} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg Chl}^{-1}$, respectivamente.

5.5.5.2. Localização dos compostos **19** e **20** no sítio de interação do FSII, FSI e suas respectivas reações parciais.

O sítio de ação de **19** e **20** sobre a cadeia de transporte de electrons de tilacóides foi investigado usando os inibidores, doadores e aceptores artificiais apropriados (King-Díaz et al., 2006). O composto **19** não inibiu o FSII de H₂O a DCPIP e nem o FSI de TMQH₂ a MV. O composto **20** inibiu o fluxo de electrons do FSII de H₂O a DCPIP, de H₂O a SiMo e de DPC a DCPIP (Tabela 2.13). A 100 μM , **20** inibiu 100 % da atividade da razão do transporte de elétrons do FSII (H₂O a DCPIP). Na reação parcial de H₂O a SiMo obteve-se I₅₀ de 33,0 μM , e de DPC a DCPIP a 50 μM , **20** inibiu

aproximadamente 90 % da atividade. Por outro lado, este composto não inibiu a atividade do FSI (DCPIP_{reduzido} a MV), e a 250 μM inibiu 100 % da atividade do FSI de TMQH₂ a MV com um I₅₀ 81 μM .

Tabela 2.13. Efeito de **20** sobre o transporte de electrons do FSI (TMQH₂ a MV), FSII desacoplado H₂O a DCPIP, e reações parciais do FSII, de H₂O a SiMo e de DPC a DCPIP.

[μM]	FSII		FSII		FSII		FSI	
	H ₂ O a DCPIP		H ₂ O a SiMo		DPC a DCPIP		TMQH ₂ a MV	
	a	b	a	b	c	b	a	b
0	480	100	400	100	448	100	367	100
10	-	-	-	-	210	48	-	-
25	-	-	-	-	80	18	-	-
50	200	42	100	25	42	9	267	73
75	120	25	50	12,5	-	-	-	-
100	0	0	0	0	-	-	134	36
200	-	-	-	-	-	-	67	18
250	-	-	-	-	-	-	0	0

a valores em $\mu\text{equiv e}^- \text{mg}^{-1} \text{Chl}^{-1}$.

b valores em porcentagem

c valores em $\mu\text{M DCPIP}_{\text{red}} \text{mg}^{-1} \text{Ch h}^{-1}$.

5.5.5.3. Efeito de **19** sobre as atividades dependentes das membranes ligadas de H⁺ -, Mg²⁺ - e Ca²⁺ - ATPases.

Para determinar se **19** interage com a unidade catalítica do complexo H⁺-ATPase quando este inibiu a fotofosforilação, seus efeitos sobre H⁺ -, Mg²⁺ - e Ca²⁺ - ATPases foram investigados. A atividade sobre o complexo H⁺-ATPase foi parcialmente reduzida a partir do aumento da concentração do composto **19** (Tabela 2.14). Observa-se o aumento da atividade de Ca²⁺ - e Mg²⁺ -ATPase, já que a 400 μM suas atividades aumentam em 374 e 363 %, respectivamente. Este resultado sugere que este composto atua como desacoplante entre os FSII e FSI, uma vez que se

comporta como o desacoplante artificial NH_4Cl , utilizado como controle positivo.

O fator de acoplamento de cloroplastos 1 (CF_1) é a porção hidrofóbica da ATP sintase de cloroplastos. O CF_1 consiste de cinco diferentes sub-unidades chamadas α , β , γ , δ , e ϵ , com uma relação estequiométrica de α_3 , β_3 , γ , δ , e ϵ (Suess, 1982 e Moroney, 1983). Por outro lado, outros fatores solúveis tais como aqueles isolados de mitocôndria (MF_1) ou *E. Coli* (EF_1) a ATPase é latente, já que necessita ser ativada por diferentes tratamentos, que incluem a incubação com agentes redutores tais como DTT (ditiotreitól) ou limitantes da proteólise com tripsina (Iraburu *et al.*, 1994). A ativação da ATPase pode estar relacionada à redução da ligação dissulfito na sub-unidade γ . O tratamento da enzima com agentes ativantes provoca a clivagem desta ligação resultando no surgimento de dois grupos SH, e conseqüentemente o aumento da atividade da ATPase (Arana, 1982; Nalin, 1984 e Moroney, 1984).

Tabela 2.14. Efeito de **19** sobre a membrana ligada a tilacóide (H^+ - ATPase), sobre a membrana ligada de luz ativada (Mg^{2+} -ATPase) e sobre a atividade aquecida (Ca^{2+} -ATPase) do fator de acoplamento purificado 1 (CF_1) de cloroplastos.

Composto	H^+ -ATPase (%)	Ca^{2+} - ATPase (%)	Mg^{2+} - ATPase (%)
19 (μ M)			
0	100	100	100
60	79.1	-	-
100	-	106	124
120	75.0	-	-
200	-	253	224
240	74.0	-	-
400	-	374	363

Controle para Mg^{2+} - e Ca^{2+} - ATPases foram 47,3 μ moles Pi crescente/mg Chl.h. e 55,4 mmol Pi/mg de proteína, respectivamente. E para H^+ -ATPase foi de 72,0 μ moles Pi crescente/mg Chl.h.

5.5.5.4. Efeito dos compostos **19** e **20** sobre a Fluorescência (Chl a).

O estudo da fluorescência destes compostos foi realizado no intuito de contribuir para o esclarecimento do mecanismo de interação destes compostos como doadores de elétrons no sítio do FSII. Utilizaram-se as concentrações de 500 μ M (**19**) e 100 μ M (**20**), DCMU 10 μ M e Tris 0,8 M, que atuaram como controles (Figura 2.17). Após este estudo, pode-se afirmar que estes compostos possuem mecanismo de ação semelhante. Observa-se que os valores de F_0 são quase constantes e os de F_M diminuíram, e os valores mais baixos da área sobre a curva entre F_0 e F_M (Figura 2.18 e Tabela 2.15) indicam que a transferência de elétrons ao sítio da quinona foi bloqueado pela ação dos mesmos.

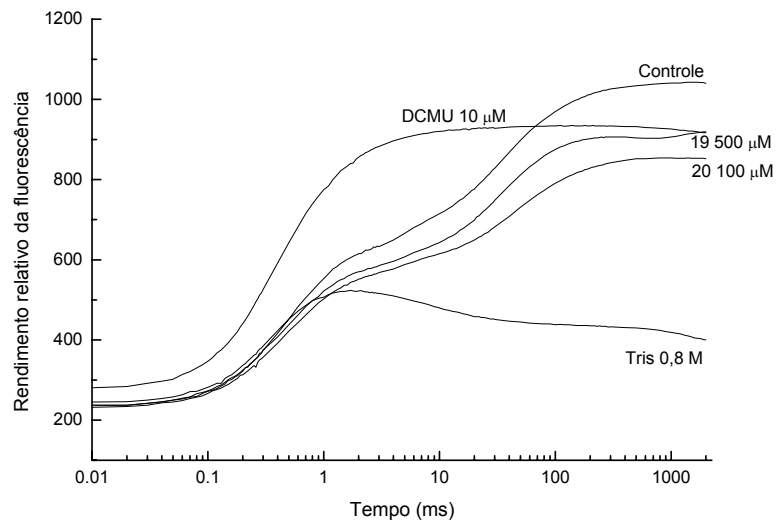


Figura 2.17. Aumento cinético da fluorescência de cloroplastos frescos e lisos infiltrados com os compostos **19** e **20**, DCMU e tilacóides tratados com Tris. Os controles dos cloroplastos são mostrados para comparação. Curvas de indução de fluorescência (Chl a) foram medidas a temperatura ambiente. Os dados correspondem às medias de três repetições.

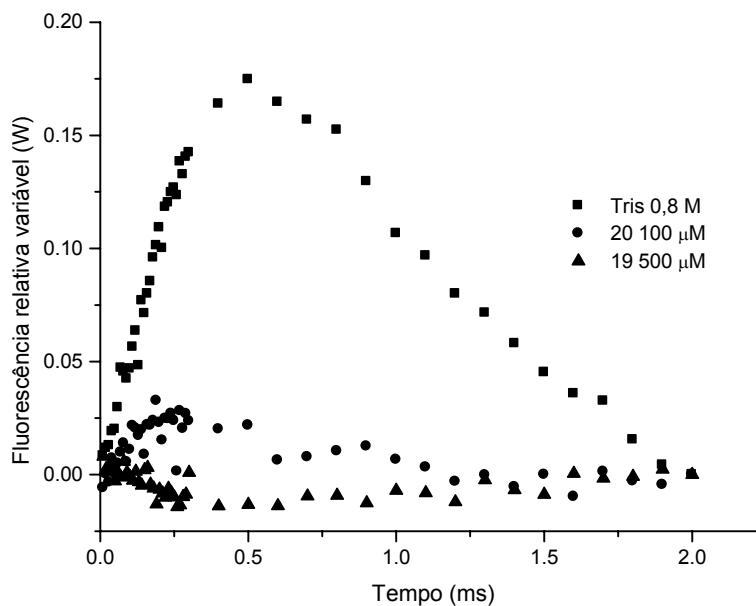


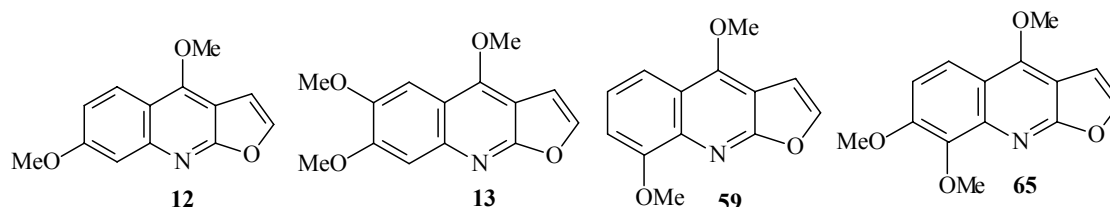
Figura 2.18. Aparecimento da banda K em aproximadamente 300 μs. Diferença de cada curva do controle com a fluorescência variável relativa normalizada na amplitude $F_j - F_0$. **19** a 500 (▲) e **20** a 100 μM (●). Cloroplastos quebrados incubados com 0,8 M Tris (■).

Tabela 2.15. Efeito do aumento da concentração dos compostos **19** e **20** sobre os parâmetros da fluorescência em tilacóides previamente incubados por 5 min no escuro e com 0.8 M Tris, pH 8,0.

Composto	F_0	F_M	F_V/F_M	área
Controle	224	1043	0,785	28600
10 μ M DCMU	258	934	0,724	800
0.8 M Tris	233	524	0,555	0
		19		
400 (μ M)	224	919	0,756	31400
		20		
100 (μ M)	223	854	0,739	20200

5.5.6. Caracterização do mecanismo de ação dos compostos **12**, **13**, **59** e **65**.

Os compostos **12**, **13**, **59** e **65**, isolados de plantas da família Rutaceae (Andrade, 2003), são alcalóides furoquinolínicos, conhecidos como Evolitrina (**12**), Maculosidina (**13**), γ -Fagarina (**19**) e Esquimianina (**65**). A figura 2.19 representa o efeito de concentrações crescentes destes compostos sobre a síntese de ATP em cloroplastos isolados de folhas de espinafre. Estes compostos inibiram a atividade enzimática na produção de ATP, apresentando os seguintes valores de I_{50} 77,4; 43,5; 18,0 e 38,4 μ M, para **12**, **13**, **59** e **65**, respectivamente.



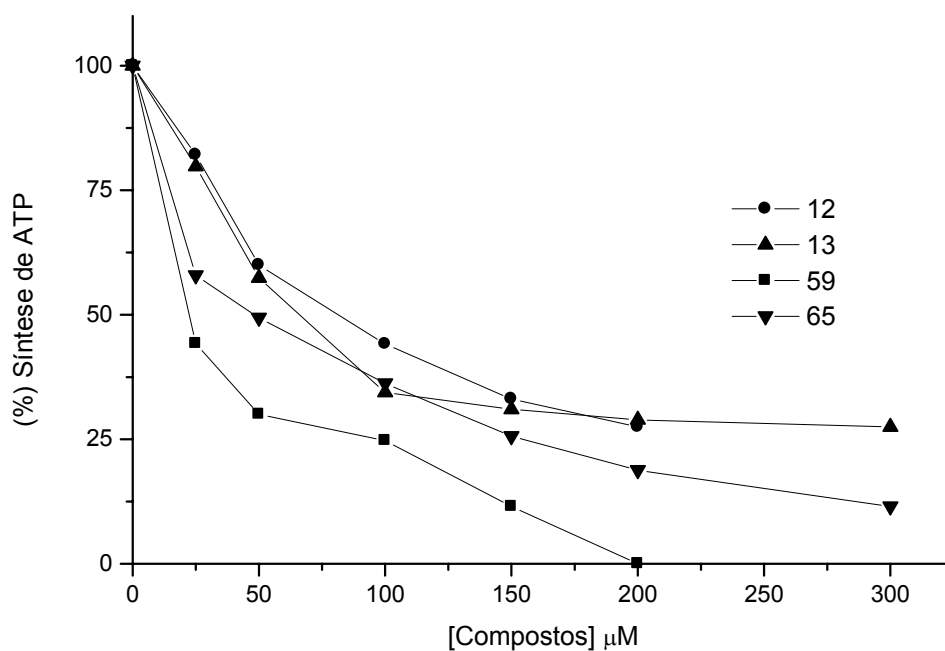


Figura 2.19. Efeito dos compostos **12**, **13**, **59** e **65** sobre a síntese de ATP em cloroplastos de espinafre. A razão para o controle da síntese de ATP foi $4613 \mu\text{Mol ATP} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg Chl}^{-1}$.

5.5.6.1. Elucidação do mecanismo de ação dos compostos **12**, **13**, **59** e **65**.

Observou-se que estes alcalóides inibiram as três condições de transporte de elétrons. Para o transporte de elétrons desacoplado obteve-se os seguintes valores de I_{50} 21,0; 15,0; 17,1 e 18,7 μM , para **12**, **13**, **59** e **65**, respectivamente (Figura 2.20). Pode-se notar que estes compostos atuam significativamente sobre as etapas basal e fosforilante da cadeia transportadora de elétrons (tabela 2.16). Desta forma, sugere-se que estes alcalóides furoquinolínicos atuam como inibidores da reação de Hill.

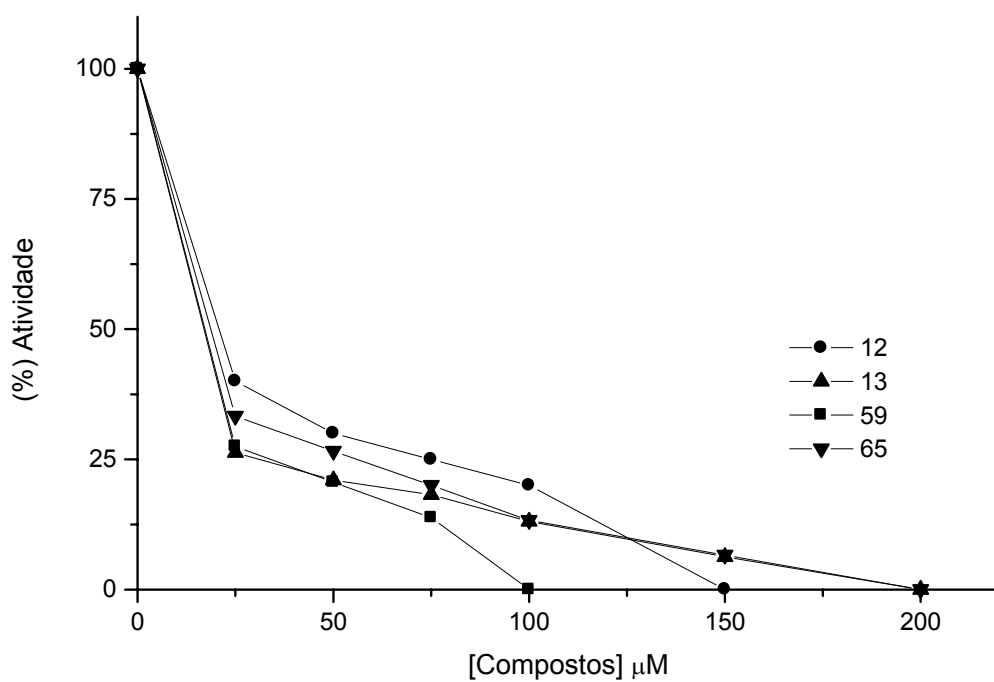


Figura 2.20. Efeito dos compostos **12**, **13**, **59** e **65** sobre a o transporte de elétrons desacoplado em cloroplastos de espinafre. A razão para o controle foi de $1266 \mu\text{equiv}\cdot\text{e}^{-}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg Chl}^{-1}$.

Tabela 2.16. Efeito dos compostos **12**, **13**, **59** e **65** sobre a o transporte de elétrons basal e fosforilante em cloroplastos de espinafre.

	12		13		59		65	
[μ M]	Basal (%)	Fosforil. (%)	Basal (%)	Fosforil. (%)	Basal (%)	Fosforil. (%)	Basal (%)	Fosforil. (%)
0	100	100	100	100	100	100	100	100
10	-	-	50	56	-	-	-	-
25	50	57	31	34	50	44	57	59
50	30	43	0	0	34	25	29	29
75	-	-	-	-	17	12	-	-
100	0	0	-	-	0	0	0	0

5.5.6.2. Localização dos compostos **12**, **13**, **59** e **65** no sítio de interação do FSII, FSI e suas respectivas reações parciais.

O composto **12** (evolitrina) inibiu o fluxo de electrons do FSII de H₂O a DCPIP, de H₂O a SiMo e de DPC a DCPIP (Tabela 2.17). A 250 μ M, **12** inibiu 100 % da atividade da razão do transporte de elétrons do FSII (H₂O a DCPIP), e na reação parcial de H₂O a SiMo obteve I₅₀ de 100,0 μ M, e de DPC a DCPIP a 150 μ M inibiu aproximadamente 75 % da atividade. A 400 μ M, inibiu 86 % da atividade do FSI de TMQH₂ a MV com um I₅₀ 162,5 μ M. A Maculosidina (**13**) não apresentou atividade sobre o FSII (H₂O a DCPIP) e nem sobre suas reações parciais. No entanto, reduziu a atividade do FSI (TMQH₂ a MV) em 72 % (400 μ M).

A γ -Fagarina (**59**) não inibiu o FSII de H₂O a DCPIP, nem o FSI, assim como a sua reação parcial (TMQH₂ a MV). O composto **65** (Esquimianina) inibiu parcialmente o FSII de H₂O a DCPIP com I₅₀ de 199,0 μ M, e a 400 μ M inibiu completamente esta atividade. Na reação de DPC a DCPIP reduziu em aproximadamente 52 % (200 μ M) da atividade

(Tabela 2.17). Este composto não apresentou efeito sobre o FSI e sua reação parcial.

Tabela 2.17. Efeito de **12**, **13**, **59** e **65** sobre o transporte de electrons do FSI (TMQH₂ a MV), FSII desacoplado H₂O a DCPIP, e reações parciais do FSII, de H₂O a SiMo e de DPC a DCPIP.

Composto	[μM]	FSII		FSII		FSII		FSI	
		H ₂ O a DCPIP		H ₂ O a SiMo		DPC a DCPIP		TMQH ₂ a MV	
		a	b	a	b	c	b	a	b
12	0	367	100	400	100	538	100	560	100
	50	334	91	350	87	524	97	-	-
	100	234	64	200	50	506	94	360	64
	150	200	54	50	12	402	75	-	-
	200	67	18	0	0	-	-	240	43
	250	0	0	-	-	-	-	-	-
	300	-	-	-	-	-	-	160	28
	400	-	-	-	-	-	-	80	14
13	0							560	100
	100							360	64
	200							240	43
	300	NI		NI		-		200	36
	400							160	29
59	0	367	100						
	50	334	91						
	100	234	64						
	150	200	55	-		-		NI	
	200	67	18						
65	0	480	100			500	100		
	50	-	-			414	83		
	100	280	58			331	66		
	200	240	50	NI		241	48	NI	
	300	160	34			-	-		
	400	0	0			-	-		

a valores em μequiv e⁻ mg⁻¹ Chl⁻¹.

b valores em porcentagem

c valores em μM DCPIP_{red} mg⁻¹ Ch h⁻¹.

5.5.6.3. Efeito dos alcalóides furoquinolínicos (**12**, **13**, **59** e **65**) sobre a Fluorescência (Chl *a*).

Utilizou-se a concentração de 400 μM dos compostos **12**, **13** e **65**, DCMU 10 μM e Tris 0,8 M, atuando como controles (Figura 2.21). Devido a pequena quantidade isolada, a γ -fagarina **59** não foi submetida a este ensaio. Após este estudo pode-se inferir que estes compostos apresentam um de seus mecanismos de ação semelhante. Observa-se que os valores de F_0 são quase constantes e os de F_M diminuíram, e os valores mais baixos da área sobre a curva entre F_0 e F_M (Tabela 2.18) indicam que a transferência de elétrons ao sítio da quinona foi bloqueado pela ação dos mesmos.

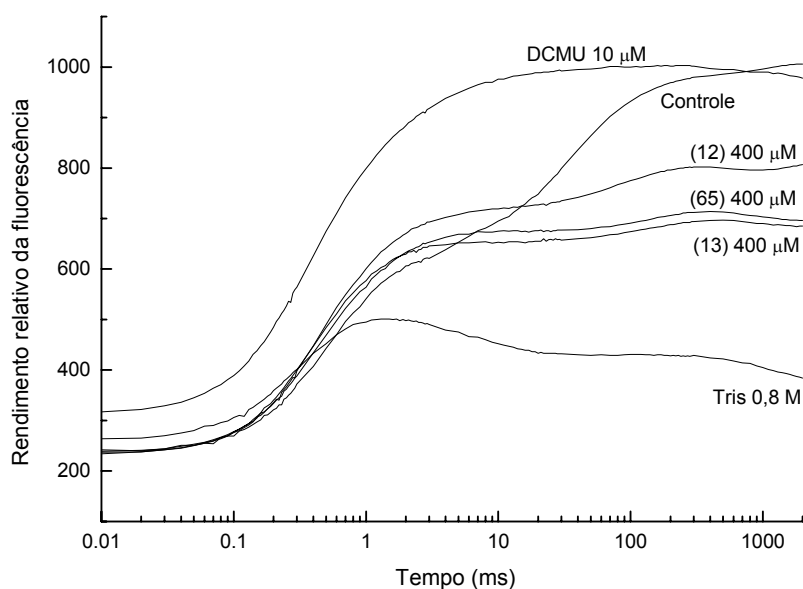


Figura 2.21. Aumento cinético da fluorescência de cloroplastos frescos e lisos infiltrados com os compostos **12**, **13** e **65**, DCMU e tilacóides tratados com Tris. Os controles dos cloroplastos são mostrados para comparação. Curvas de indução de fluorescência (Chl *a*) foram medidas a temperatura ambiente. Os dados são médias de três repetições.

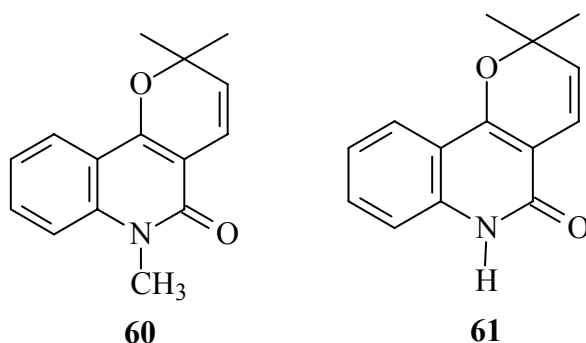
Tabela 2.18. Efeito do aumento da concentração dos compostos **12**, **13** e **65** sobre os parâmetros da fluorescência em tilacóides previamente incubados por 5 min no escuro e com 0.8 M Tris, pH 8,0.

Composto	F_0	F_M	F_V/F_M	área
Controle	229	1006	0,772	38600
10 μ M DCMU	297	1003	0,704	1600
0.8 M Tris	255	501	0,491	0
12				
400 (μ M)	221	806	0,726	18400
13				
400 (μ M)	219	697	0,686	5600
65				
400 (μ M)	225	714	0,685	5200

Pode-se inferir que todos os quatro alcalóides atuam como inibidores da reação de Hill e que os ensaios da fluorescência da Chl *a* mostraram que **12**, **13** e **65** atuam inibindo pelo doador de elétrons do FSII, causando dano ao complexo de evolução de oxigênio (OEC). No entanto, os demais testes mostraram os variados modos de ação de cada um dos produtos naturais testados. A evolitrina (**12**) possui ambientes de interação localizados tanto sobre o FSII quanto sobre o FSI. A maculosidina (**13**) atua ainda sobre o FSI, prendendo-se ao sítio de ação de Q_B , ocupando o lugar da proteína D-1. A γ -fagarina (**59**) tem outro ambiente de interação localizado no FSII, impedindo a passagem de elétrons para a quinona B (Q_B) e a esquimianina (**65**) localiza-se nos ambientes de interação do FSII, prendendo-se ao *pool* das quinonas (Q_A).

5.5.7. Caracterização do mecanismo de ação dos compostos **60** e **61**.

Os compostos **60** e **61**, isolados de *Hortia* sp. (Braga, 2005), são alcalóides quinolônicos, conhecidos como N-Metil-flindersina e Flindersina, respectivamente. As figuras 2.22 (**60**) e 2.23 (**61**) representam o efeito de concentrações crescentes destes compostos sobre a síntese de ATP em cloroplastos isolados de folhas de espinafre. Os dois compostos foram ativos neste ensaio, já que apresentaram como valores de I_{50} 49,7 e 26,0 μM , para **60** e **61**, respectivamente (Veiga *et al.*, 2008).



5.5.7.1. Elucidação do mecanismo de ação dos compostos **60** e **61**.

Foi medido o efeito destes compostos sobre as razões de transporte de elétrons basal, fosforilante e desacoplado. Como resultado observou-se que o composto **61** foi o mais ativo, já que inibiu as três condições de transporte com I_{50} de 7,5; 3,6 e 4,3 μM , para basal, fosforilante e desacoplado, respectivamente (Figura 2.22). Desta forma, pode-se sugerir que a flindersina atua como inibidor da reação de Hill. O composto **60** apresentou um comportamento similar ao **61**, pois também inibiu as três condições de transporte, porém, em concentrações maiores, já que apresentou os seguintes valores de I_{50} 8,8 (basal), 34,8 (fosforilante) e 98,8 (desacoplado) μM (Figura 2.23). A partir destes resultados preliminares pode-se sugerir que a presença do grupo metil diminui a atividade.

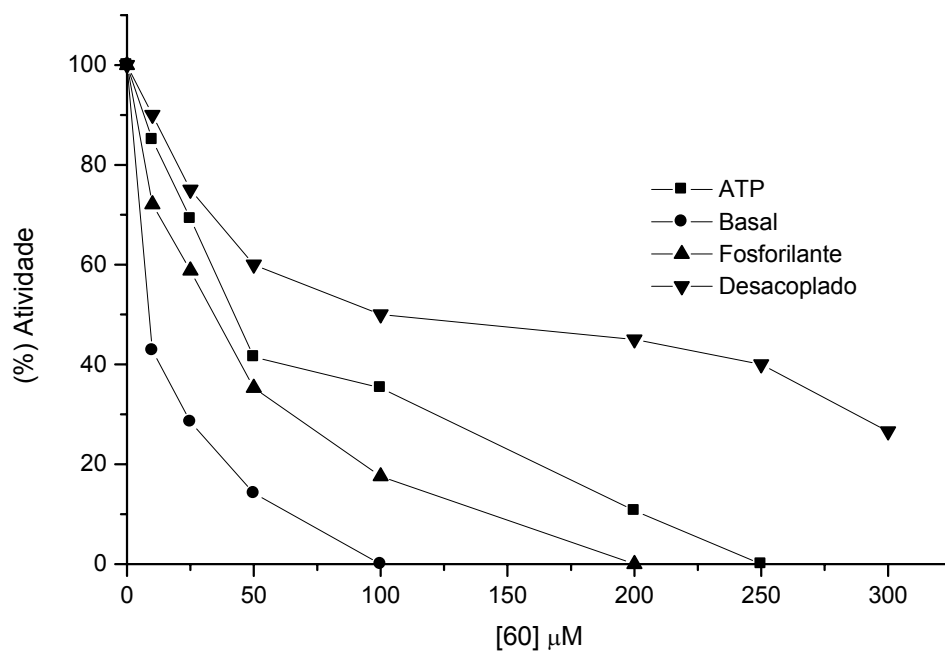


Figura 2.22. Efeito do composto **60** sobre a síntese de ATP (■), transporte de elétrons basal (●), fosforilante (▲) e desacoplado (▼) de H₂O a MV em cloroplastos de espinafre. A razão para o controle da síntese de ATP foi 1011 $\mu\text{Mol ATP} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg Chl}^{-1}$. E para o transporte de elétrons basal, fosforilante e desacoplado foram 311, 378 e 667 $\mu\text{equiv} \cdot \text{e}^{-} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg Chl}^{-1}$, respectivamente.

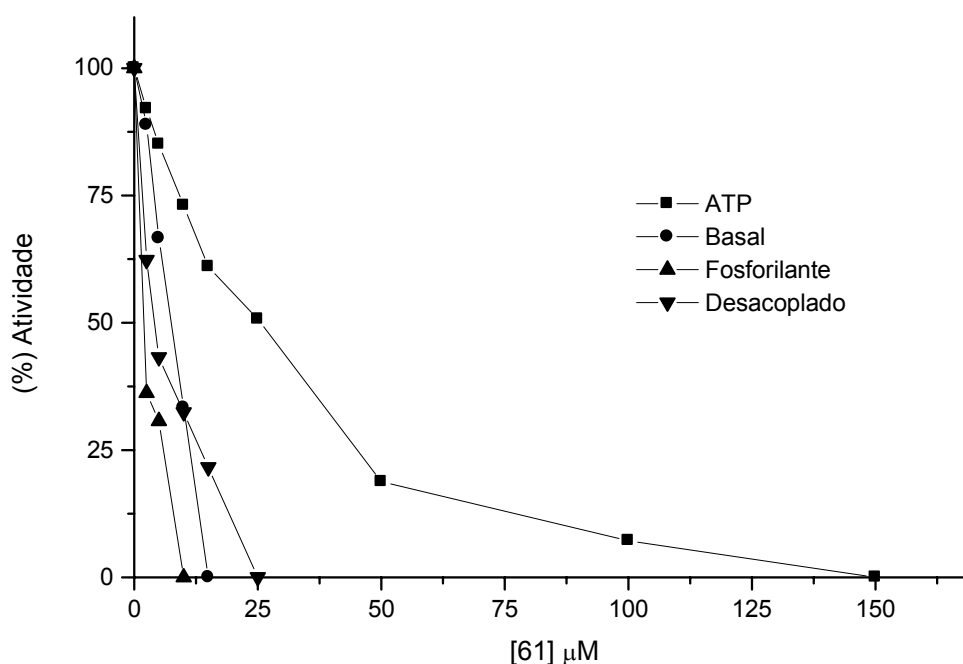


Figura 2.23. Efeito do composto **61** sobre a síntese de ATP (■), transporte de elétrons basal (●), fosforilante (▲) e desacoplado (▼) de H₂O a MV em cloroplastos de espinafre. A razão para o controle da síntese de ATP foi 1610 $\mu\text{Mol ATP} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg Chl}^{-1}$. E para o transporte de elétrons basal, fosforilante e desacoplado foram 225, 325 e 463 $\mu\text{equiv} \cdot \text{e}^{-} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg Chl}^{-1}$, respectivamente.

5.5.7.2. Localização dos compostos **60** e **61** no sítio de interação do FSII, FSI e suas respectivas reações parciais.

O composto **60** inibiu parcialmente o FSII de H₂O a DCPIP com I₅₀ 199,0 μM , e reduziu aproximadamente 56 % da atividade do FSII (DPC a DCPIP). Pode-se perceber que a 500 μM este composto impediu 100 % da passagem dos elétrons no FSI (TMQH₂ a MV), impossibilitando a conversão de ADP em ATP (Tabela 2.19). O composto **61** atuou de maneira semelhante ao **60**, mas em concentrações menores, já que inibiu o fluxo de electrons do FSII de H₂O a DCPIP, com I₅₀ 42,3 μM , e a 100 μM

inibiu 62 % da atividade do FSII de DPC a DCPIP (Tabela 2.19). Por outro lado, este composto não inibiu a atividade do FSI de TMQH₂ a MV.

Tabela 2.19. Efeito de **60** e **61** sobre o transporte de electrons do FSI (TMQH₂ a MV), FSII desacoplado de H₂O a DCPIP, e reação parcial do FSII de DPC a DCPIP.

Composto	[μM]	FSII		FSII		FSI	
		H ₂ O a DCPIP		DPC a DCPIP		TMQH ₂ a MV	
		a	b	c	b	a	b
60	0	480	100	500	100	367	100
	50	-	-	-	-	-	-
	100	280	58	422	85	300	82
	200	240	50	360	72	267	73
	300	160	33	-	-	167	45
	400	0	0	280	56	134	37
	500	-	-	-	-	0	0
	0	480	100	313	100		
61	50	200	41	204	65		
	100	120	25	195	62		
	150	80	16	-	-		NI
	200	0	0	-	-		
				-	-		

a valores em μequiv e⁻ mg⁻¹ Chl⁻¹.

b valores em porcentagem

c valores em μM DCPIP_{red} mg⁻¹ Ch h⁻¹.

5.5.7.3. Efeito dos alcalóides quinolônicos (**60** e **61**) sobre a Fluorescência (Chl a).

Foram empregadas as concentrações de 400 e 200 μM dos compostos **60** e **61**, respectivamente, e como controles positivos foram utilizados, DCMU 10 μM e Tris 0,8 M (Figura 2.24). Após este estudo pode-se dizer que estes compostos possuem mecanismo de ação semelhantes. Observa-se que os valores de F_0 são quase constantes e os de F_M diminuíram, e os valores mais baixos da área sobre a curva entre F_0 e F_M (Tabela 2.20) indicam que a transferência de elétrons ao sítio da quinona foi bloqueado pela ação dos mesmos.

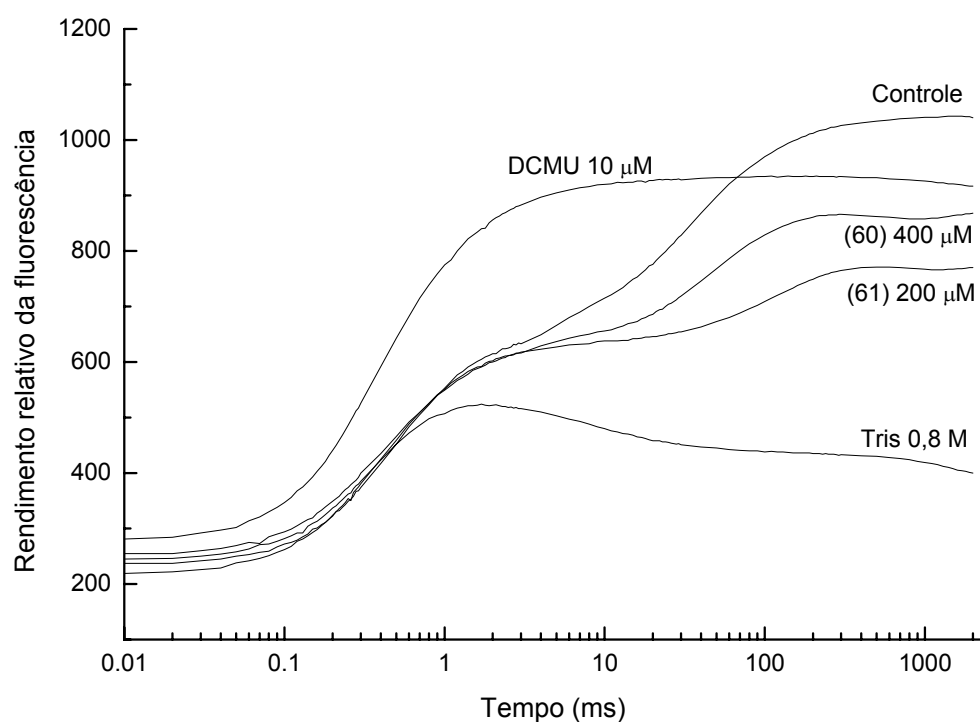


Figura 2.24. Aumento cinético da fluorescência de cloroplastos frescos, lisos e quebrados infiltrados com os compostos **60** e **61**, DCMU e tilacóides tratados com Tris. Os controles dos cloroplastos são mostrados para comparação. Curvas de indução de fluorescência (Chl a) foram medidas a temperatura ambiente. Os dados correspondem às médias de três repetições.

Tabela 2.20. Efeito do aumento da concentração dos compostos **60** e **61** sobre os parâmetros da fluorescência em tilacóides previamente incubados por 5 min no escuro e com 0.8 M Tris, pH 8,0.

Composto	F_0	F_M	F_F/F_M	área
Controle	224	1043	0,785	28600
10 μ M DCMU	258	934	0,724	800
0,8 M Tris	233	524	0,555	0
60				
400 (μ M)	241	867	0,722	21200
61				
200 (μ M)	206	771	0,733	14800

5.5.8. Caracterização do mecanismo de ação do composto **67**.

O composto **67**, isolado de *Hortia* sp. (Braga, 2005), é um alcalóide indólico conhecido como Hortiacina. A figura 2.25 representa o efeito deste composto em concentrações crescentes sobre a síntese de ATP de cloroplastos isolados de folhas de espinafre. A Hortiacina foi considerada ativa neste ensaio, pois apresentou I_{50} de 75,9 μ M. Um fato interessante que pode ser mencionado é que um outro alcalóide (**68**) muito semelhante a Hortiacina não interferiu na produção de ATP. A diferença estrutural entre estes compostos é que **67** possui uma metoxila em C_{10} .

O mecanismo de ação da hortiacina não foi totalmente esclarecido devido a pequena quantidade de composto isolada. No entanto, foi possível determinar seu efeito nas razões de transporte de elétrons em diferentes condições (basal, fosforilante e desacoplado). Na ausência ou presença de ADP, Pi, ou NH_4Cl e usando MV como acceptor de elétrons, o composto **67** inibiu a a velocidade do transporte de elétrons em cloroplastos iluminados (Figura 2.25). Observou-se que todas as condições do fluxo de elétrons foram inibidas por **67**, com I_{50} de 37,0; 51,0 e 22,0 μ M para os

transportes basal, fosforilante e desacoplado, respectivamente. Dessa forma, conclui-se que a hortiacina pode ser classificada como um inibidor da reação de Hill.

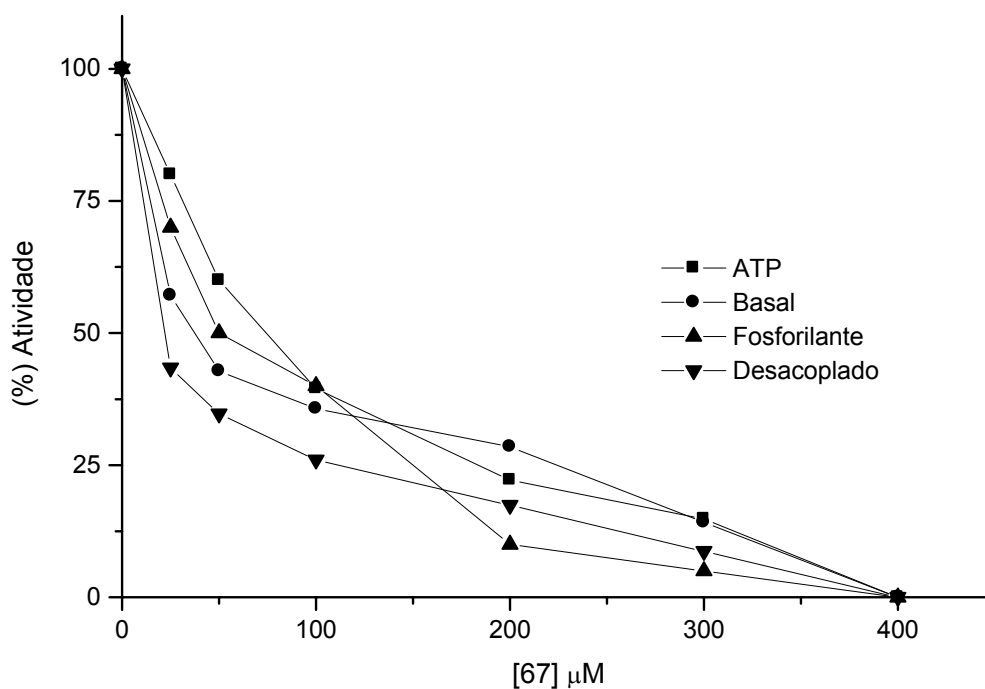
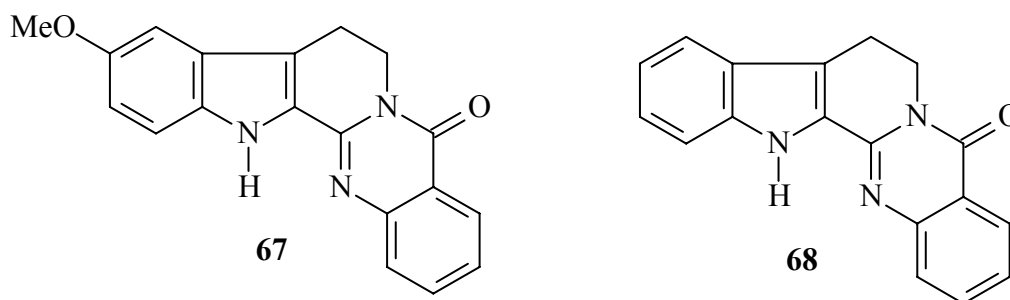
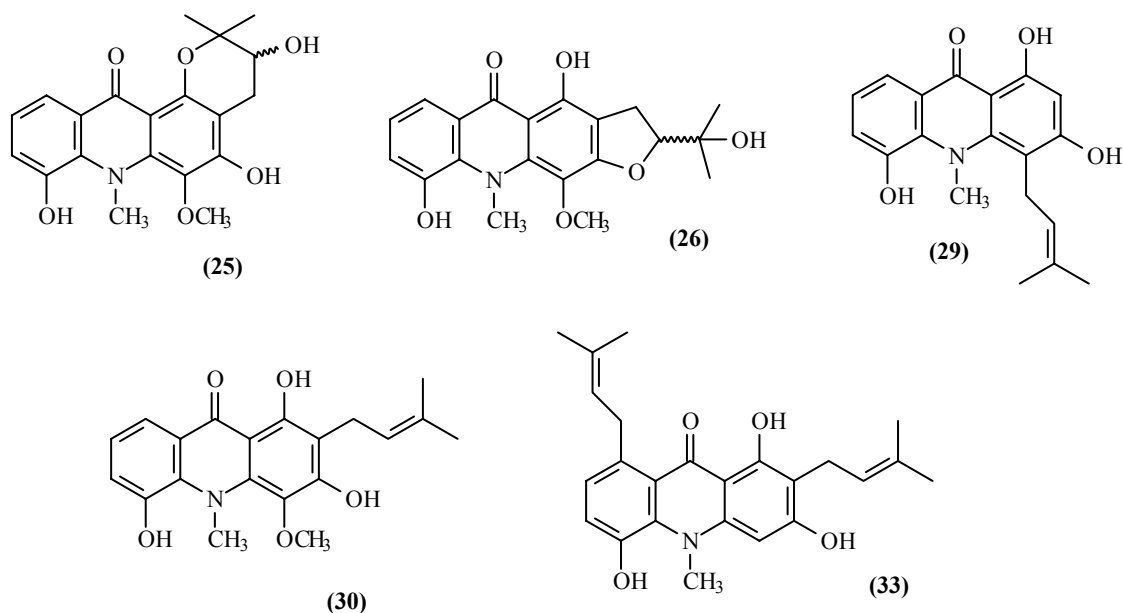


Figura 2.25. Efeito do composto **67** sobre a síntese de ATP (■), transporte de elétrons basal (●), fosforilante (▲) e desacoplado (▼) de H_2O a MV em cloroplastos de espinafre. A razão para o controle da síntese de ATP foi $2578 \mu\text{Mol ATP} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg Chl}^{-1}$. E para o transporte de elétrons basal, fosforilante e desacoplado foram 467, 667 e 767 $\mu\text{equiv} \cdot \text{e}^{-} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg Chl}^{-1}$, respectivamente.

5.5.9. Caracterização do mecanismo de ação dos alcalóides acridônicos **25**, **26**, **29**, **30** e **33**.

Os compostos **25**, **26**, **29**, **30** e **33**, isolados da planta *Swinglea glutinosa* (BL) MERR. (Rutaceae) (Santos, 2005), conhecidos como 3,5-dihidroxi-1-(2'-hidroxi-3',3'-dimetilcromeno)-4-metoxi-10-metil-9-acridona;
1,5-dihidroxi-4-metoxi-2,3-dihidrofurano-10-metil-2'-hidroxiisopropil-acridona; 1,3,5-triidroxi-4-prenil-9-acridona; glicocitrina IV e 1,3,5-triidroxi-2,8-di-(3-metil-butenil-2)-10-metil-9-acridona, respectivamente. A figura 2.26 representa o efeito de concentrações crescentes destes compostos sobre a síntese de ATP. Estes compostos inibiram a atividade enzimática na produção de ATP, já que apresentaram os seguintes valores de I_{50} 6,5 (**25**); 3,3 (**26**); 43,4 (**29**); 33,0 (**30**) e 24,0 (**33**) μM .



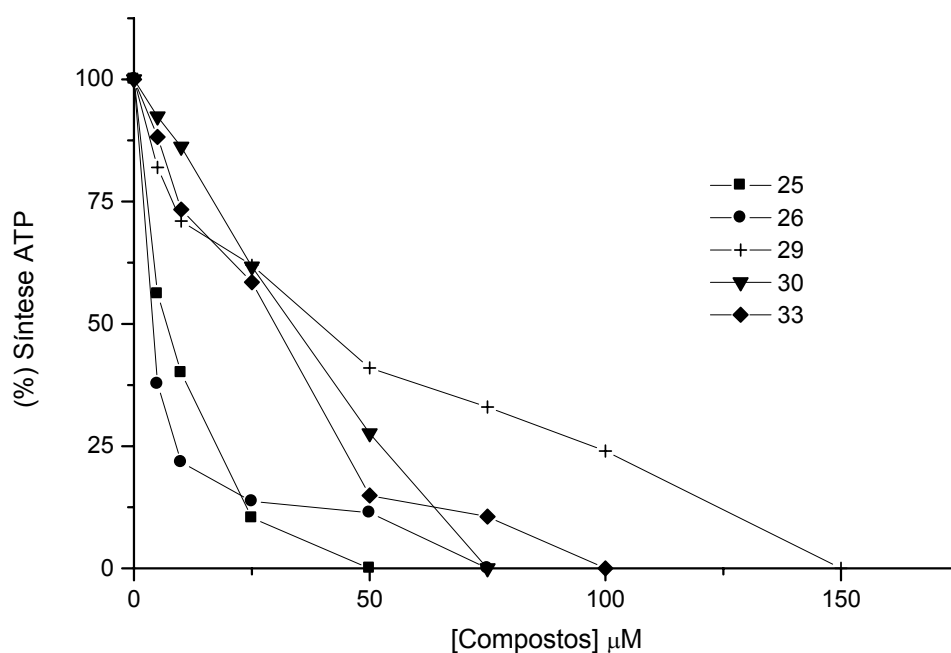


Figura 2.26. Efeito dos compostos **25**, **26**, **29**, **30** e **33** sobre a síntese de ATP em cloroplastos de espinafre. A razão para o controle da síntese de ATP foi $2264 \mu\text{Mol ATP} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg Chl}^{-1}$.

5.5.9.1. Elucidação do mecanismo de ação dos compostos **25**, **26**, **29**, **30** e **33**.

Observou-se que os alcalóides **25**, **26**, **30** e **33** são inibidores da reação de Hill, já que interferiram nas três condições de transporte, enquanto o composto **29** inibiu apenas o transporte de elétrons desacoplado. Os valores de I_{50} calculados para a condição desacoplada foram $9,2$ (**25**); $5,3$ (**26**); $157,6$ (**29**); $18,2$ (**30**) e $8,2$ (**33**) μM (Figura 2.27).

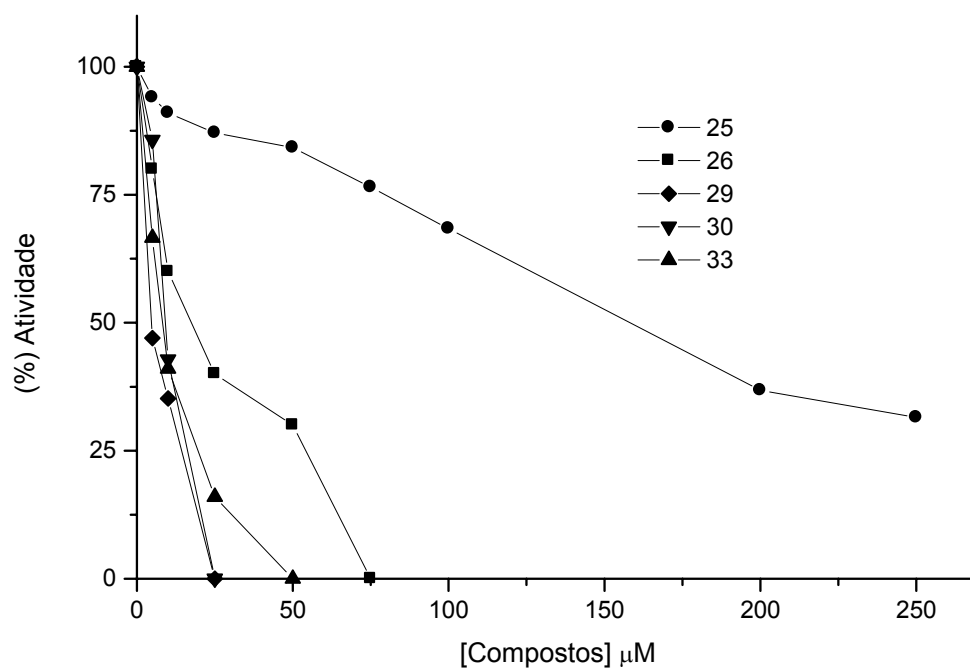


Figura 2.27. Efeito dos compostos **25**, **26**, **29**, **30** e **33** sobre o transporte de elétrons desacoplado em cloroplastos de espinafre. A razão para o controle foi de $900 \mu\text{equiv}\cdot\text{e}^{-}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg Chl}^{-1}$.

Tabela 2.21. Efeito dos compostos **25**, **26**, **29**, **30** e **33** sobre a o transporte de elétrons basal e fosforilante em cloroplastos de espinafre.

[μ M]	25		26		29		30		33	
	Bas. (%)	Fosforil. (%)	Basal (%)	Fosforil. (%)	Basal (%)	Fosforil. (%)	Basal (%)	Fosforil. (%)	Basal (%)	Fosforil. (%)
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
5	60	49	56	84	-	-	67	95	80	90
10	30	34	45	50	-	-	58	77	50	80
25	0	0	0	34	-	-	50	62	0	0
50				0	82	93	34	31		
75					-	-	0	0		
100					73	87				
200					64	80				
250					55	67				

5.5.9.2. Localização dos compostos 25, 26, 29, 30 e 33 no sítio de interação do FSII, FSI e suas respectivas reações parciais.

Os compostos **25**, **26** e **29** não inibiram o fluxo de electrons do FSII de H₂O a DCPIP (Tabela 2.22). Os alcalóides **30** e **33** inibiram esta mesma reação, pois apresentaram I₅₀ de 182,8 e 23,0 μ M, respectivamente, e ainda interferiram consideravelmente no FSII de DPC a DCPIP (Tabela 2.22). Os únicos compostos que apresentaram atividade sobre o FSI de TMQH₂ a MV foram **25** e **26**, como pode ser visto na tabela 2.22.

Tabela 2.22. Efeito de **25**, **26**, **30** e **33** sobre o transporte de electrons do FSI (TMQH₂ a MV), FSII desacoplado H₂O a DCPIP, e reações parciais do FSII, de H₂O a SiMo e de DPC a DCPIP.

Composto	[μM]	FSII		FSII		FSII		FSI	
		H ₂ O a DCPIP		H ₂ O a SiMo		DPC a DCPIP		TMQH ₂ a MV	
		a	b	a	B	c	b	a	b
25	0							560	100
	25							480	86
	50	NI		-			-	320	57
	100							240	43
	200							200	38
26	0							560	100
	25							400	72
	50	NI		-			-	320	57
	75							160	29
	100							120	22
30	0	372	100			313	100		
	10	-	-			192	61		
	25	-	-			184	58		
	50	-	-	NI		146	46		NI
	100	257	69			-	-		
	200	171	46			-	-		
	300	0	0			-	-		
33	0	372	100			313	100		
	5	-	-			292	93		
	10	-	-			273	87		
	25	172	46	NI		72	23		NI
	50	143	38			-	-		
	100	115	31			-	-		
	150	0	0			-	-		

a valores em μequiv e⁻ mg⁻¹ Chl⁻¹.

b valores em porcentagem

c valores em μM DCPIP_{red} mg⁻¹ Ch h⁻¹.

5.5.9.3. Efeito de **29** sobre as atividades dependentes das membranas ligadas de H^+ -, Mg^{2+} - e Ca^{2+} - ATPases.

Como o composto **29** não apresentou efeito sobre o transporte de elétrons basal e fosforilante e nem sobre o FSII, decidiu-se verificar se este interage com a unidade catalítica dos complexos H^+ -ATPase, H^+ -, Mg^{2+} - e Ca^{2+} - ATPases. A tabela 2.23 mostra que com o aumento da concentração de **29**, as três atividades foram inibidas, sendo que Mg^{2+} - ATPase de CF1 isolado a mais inibida (64 % a 100 μ M). Este resultado indicou que este alcalóide possui outro sítio de interação e inibição com CF1, quando atua como inibidor da transferência de energia.

Tabela 2.23. Efeito de **29** sobre a membrana ligada a tilacóide (H^+ - ATPase), sobre a membrana liagada de luz ativada (Mg^{2+} -ATPase) e sobre a atividade aquecida (Ca^{2+} -ATPase) do fator de acoplamento purificado 1 (CF1) de cloroplastos.

Composto	H^+ -ATPase (%)	Ca^{2+} - ATPase (%)	Mg^{2+} - ATPase (%)
29 (μ M)			
0	100,0	100,0	100,0
25	-	68,6	65,5
50	68,7	61,3	37,8
100	77,4	57,7	36,7
200	85,2	-	-

Valores do controle para Mg^{2+} - and Ca^{2+} -dependente ATPasa foram 47.3 μ moles Pi crescente/mg Chl.h. e 55.4 mmol Pi/mg proteína, respectivamente.

5.5.9.4. Efeito dos alcalóides acridônicos (**25**, **26**, **29**, **30** e **33**) sobre a Fluorescência (Chl *a*).

Neste experimento foram utilizadas as seguintes concentrações dos compostos: 100 μM (**25**, **26** e **30**) e 200 μM (**33**). Devido a pequena quantidade isolada, o composto **29** não foi submetido ao teste. E ainda foram empregados DCMU 10 μM e Tris 0,8 M, como controles (Figura 2.28). O estudo revelou que este grupo de alcalóides possui mecanismo de ação semelhante. Os valores de F_0 são quase constantes e os de F_M diminuíram, e os valores mais baixos da área sobre a curva entre F_0 e F_M (Tabela 2.24) indicam que a transferência de elétrons ao sítio da quinona é bloqueado pela ação dos mesmos.

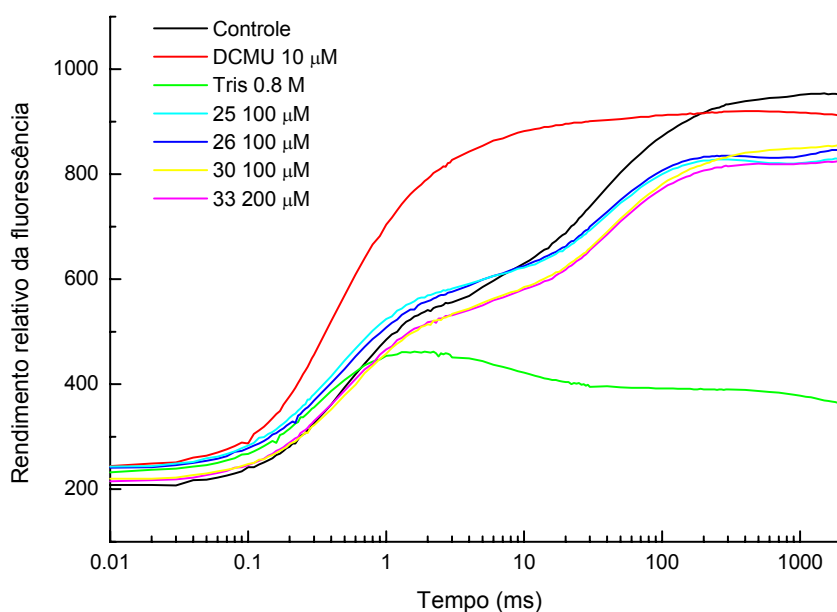


Figura 2.28. Aumento cinético da fluorescência de cloroplastos frescos e lisos infiltrados com os compostos **25**, **26**, **30** e **33**, DCMU e tilacóides tratados com Tris. Os controles dos cloroplastos são mostrados para comparação. Curvas de indução de fluorescência (Chl *a*) foram medidas a temperatura ambiente. Os dados são médias de três repetições.

Tabela 2.24. Efeito do aumento da concentração dos compostos **25**, **26**, **30** e **33** sobre os parâmetros da fluorescência em tilacóides previamente incubados por 5 min no escuro e com 0.8 M Tris, pH 8,0.

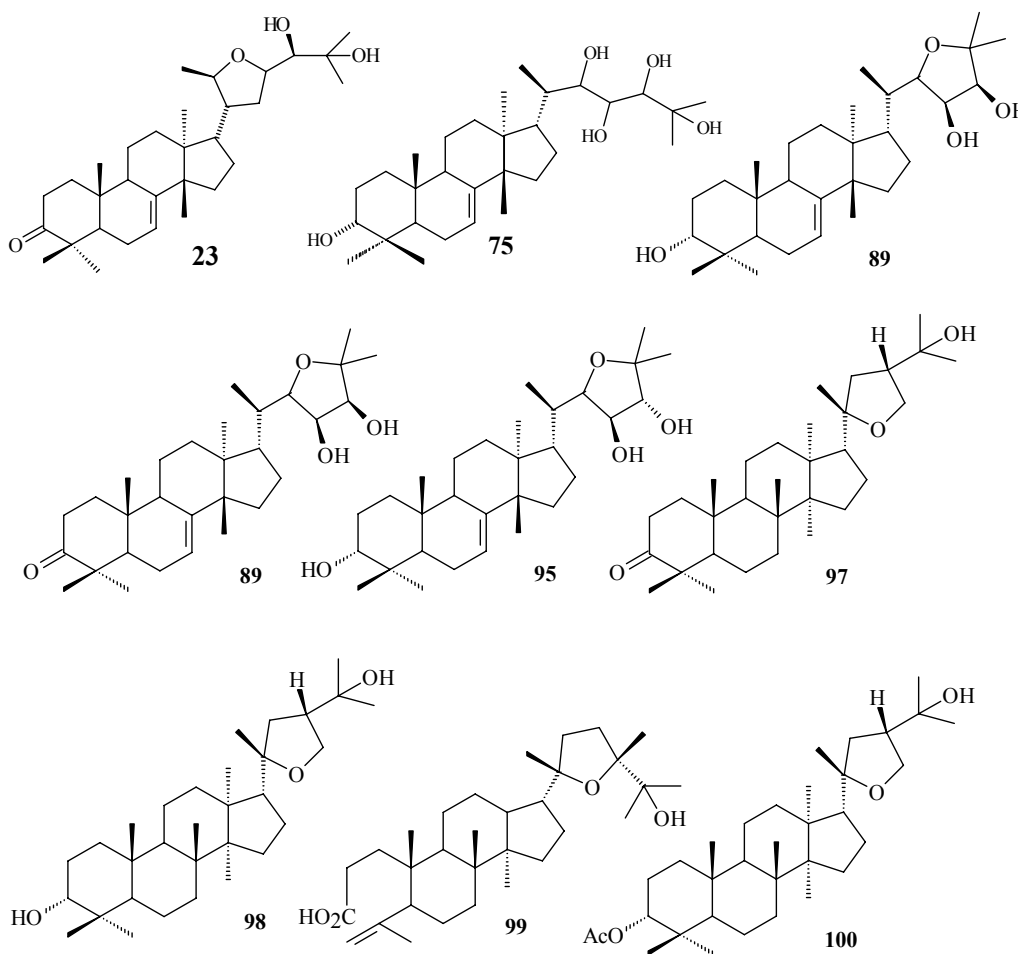
Composto	F_0	F_M	F_F/F_M	área
Controle	248	953	0,792	30400
10 μ M DCMU	226	920	0,754	3000
0.8 M Tris	225	460	0,511	0
25				
100 (μ M)	231	829	0,721	19000
26				
100 (μ M)	230	846	0,728	27400
30				
100 (μ M)	212	855	0,752	31600
33				
200 (μ M)	206	825	0,750	23600

Estes resultados sugerem que os compostos **25**, **26**, **30** e **33** se comportam como inibidores da reação de Hill. O estudo do mecanismo de ação dos compostos **25** e **26** mostra que seus sítios de ação se encontram ao nível do *pool* de plastoquinonas. Os compostos **30** e **33** inibem o FSII, sendo que o composto **33** pelo lado doador de elétrons e o **30** pelo lado doador de elétrons. Estes dados foram corroborados através dos estudos de fluorescência da clorofila *a*.

O composto **29** se comporta como um inibidor da transdução de energia, ao inibir a baixas concentrações a síntese de ATP (150 μ M) e inibir a altas concentrações as reações do transporte de elétrons. Ao se avaliar o efeito deste composto sobre a H⁺-ATPase unida a membrana (CF₀) e ainda sobre Ca²⁺-ATPase e Mg²⁺-ATPase em CF₁ isolado, observou-se que a maior inibição ocorreu sobre Mg²⁺-ATPase de CF₁, o que indica que o sítio de inibição deste composto se encontra em CF₁.

5.5.10. Caracterização do mecanismo de ação dos triterpenos **23**, **75**, **89**, **90**, **95**, **97**, **98**, **99** e **100**.

Os compostos **23** (Melianodiol), **75** (Pentaol), **89** (Odorato), **90** (Odorato), **95** (Isodorato), **97** (Ocotilona), **98** (Cabraleadiol), **99** (ácidos shoreico e eichleriano) e **100** (Cabraleadiol monoacetato), foram isolados de plantas da família Meliaceae (Paula, 1996 e Soares, 2006). As figuras 2.29 e 2.30 representam o efeito de concentrações crescentes destes compostos sobre a síntese de ATP. Estes compostos inibiram a atividade enzimática na produção de ATP, já que apresentaram os seguintes valores de I_{50} 13,1 (**23**); 59,5 (**75**); 70,0 (**89**); 22,7 (**90**); 30,3 (**95**); 16,7 (**97**); 35,1 (**98**); 44,0 (**99**) e 6,8 (**100**) μM .



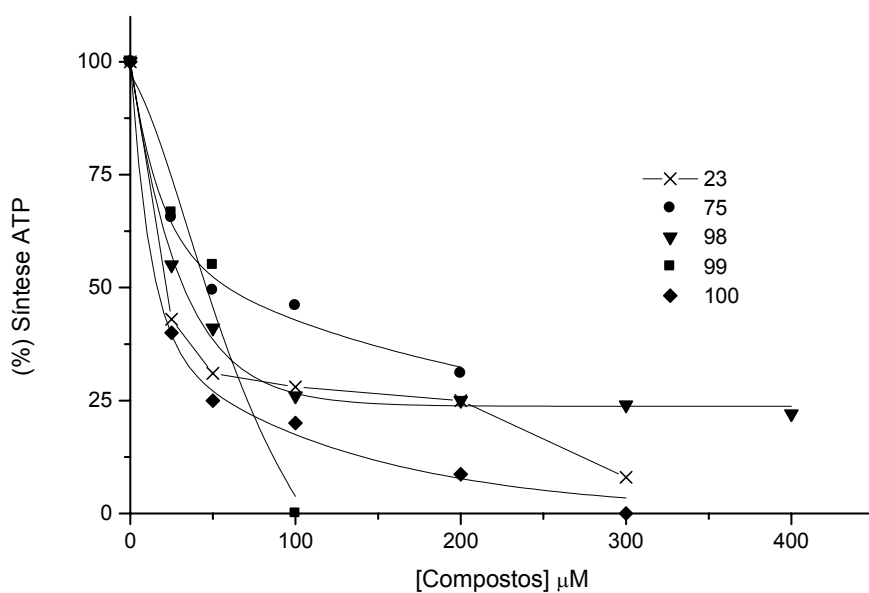


Figura 2.29. Efeito dos compostos **23**, **75**, **98**, **99** e **100** sobre a síntese de ATP em cloroplastos de espinafre. A razão para o controle da síntese de ATP foi $3080 \mu\text{Mol ATP} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg Chl}^{-1}$.

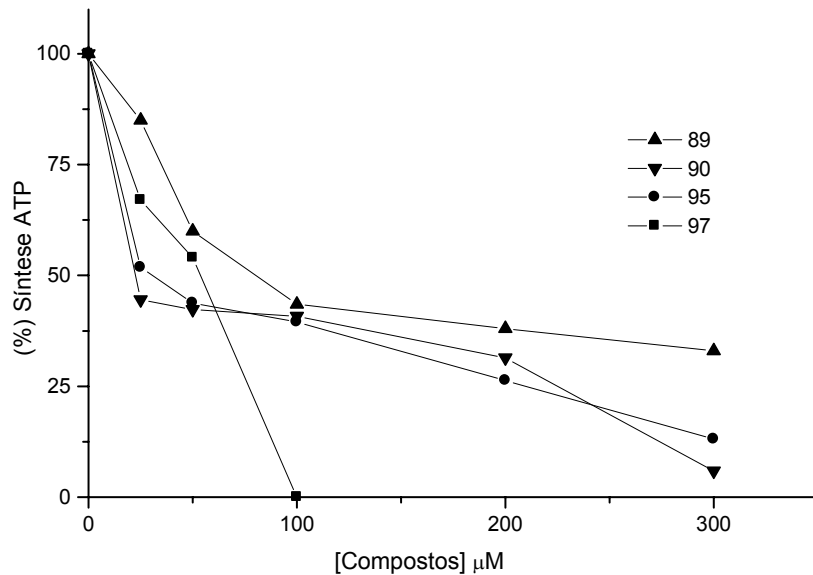


Figura 2.30. Efeito dos compostos **89**, **90**, **95** e **97** sobre a síntese de ATP em cloroplastos de espinafre. A razão para o controle da síntese de ATP foi $1495 \mu\text{Mol ATP} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg Chl}^{-1}$.

5.5.10.1. *Elucidação do mecanismo de ação dos compostos 23, 75, 89, 90, 95, 97, 98, 99 e 100.*

Observou-se que os triterpenos **75, 89, 90, 97, 98, 99 e 100** são inibidores da reação de Hill, já que interferiram nas três condições de transporte. Os valores de I_{50} calculados destes compostos para a condição desacoplada foram 166,1; 64,0; 25,2; 10,1; 36,8; 24,8 e 149,0 μM , respectivamente (Figuras 2.31 e 2.32). O composto **23** inibiu apenas o transporte de elétrons desacoplado com I_{50} de 160,0 μM . O Isodoratol (**95**), obteve I_{50} 100 μM (desacoplado). Na tabela 2.25 observa-se o efeito de todos estes compostos sobre as etapas basal e fosforilante da cadeia transportadora de elétrons.

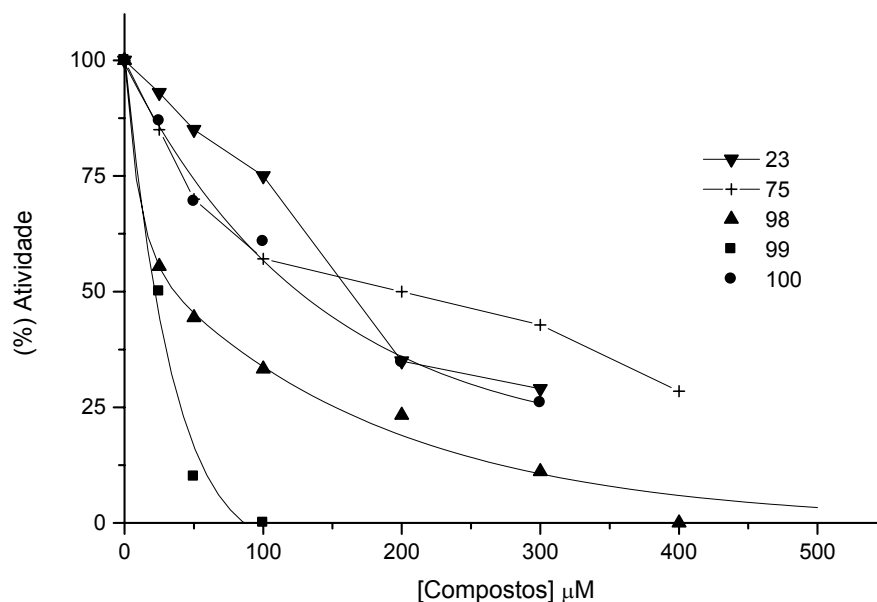


Figura 2.31. Efeito dos compostos **23, 75, 98, 99 e 100** sobre a o transporte de elétrons desacoplado em cloroplastos de espinafre. A razão para o controle foi de $950 \mu\text{equiv}\cdot\text{e}^{-}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg Chl}^{-1}$.

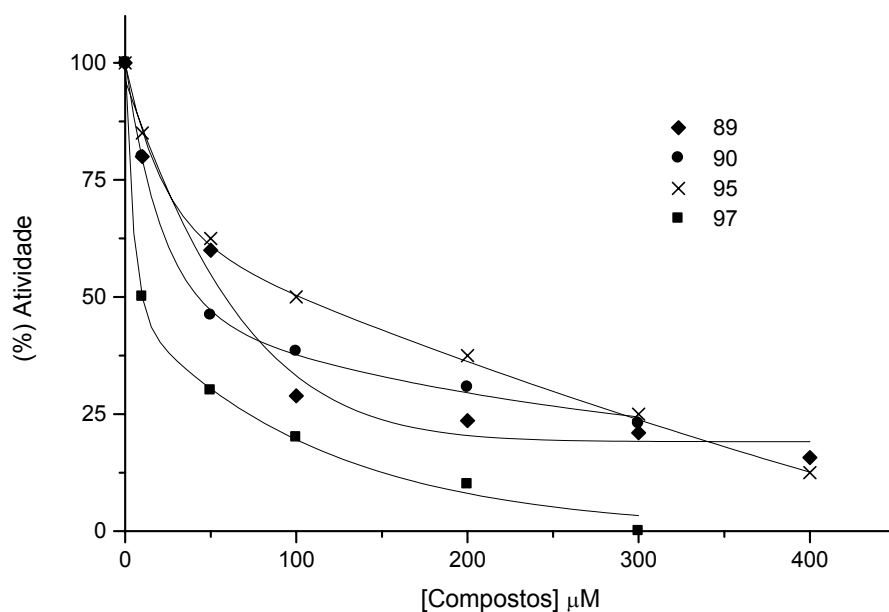


Figura 2.32. Efeito dos compostos **89**, **90**, **95** e **97** sobre a o transporte de elétrons desacoplado em cloroplastos de espinafre. A razão para o controle foi de $1050 \mu\text{equiv}\cdot\text{e}^{-}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg Chl}^{-1}$.

5.5.10.2. Localização dos compostos **23**, **75**, **89**, **90**, **95**, **97**, **98**, **99** e **100** no sítio de interação do FSII, FSI e suas respectivas reações parciais.

Os únicos compostos que inibiram o fluxo de electrons do FSII de H_2O a DCPIP foram **75**, **89**, **90**, **97** e **98** com I_{50} de 207,0; 262,0; 325,0; 92,8 e 216,0 μM , respectivamente (Tabela 2.25). Os compostos **90**, **97** e **98** inibiram a reação parcial do FSII (H_2O a SiMo) com I_{50} 350,0; 200,0 e 200,0 μM , respectivamente. E na reação parcial FSII (DPC a DCPIP), os compostos **89**, **90** e **97** interferiram sobre esta atividade (Tabela 2.25). O único triterpeno que apresentou atividade sobre o FSI de TMQH_2 a MV foi o Cabraleadiol (**98**), já que este composto inibiu 100 % da atividade a 400 μM .

Tabela 2.25. Efeito de **75**, **89**, **90**, **97** e **98** sobre o transporte de electrons do FSI (TMQH₂ a MV), FSII desacoplado H₂O a DCPIP, e reações parciais do FSII, de H₂O a SiMo e de DPC a DCPIP.

Composto	[μM]	FSII		FSII		FSII		FSI	
		H ₂ O a DCPIP		H ₂ O a SiMo		DPC a DCPIP		TMQH ₂ a MV	
		a	b	a	b	c	b	a	b
75	0	354	100						
	100	246	70						
	200	185	52	NI		-			-
	300	92	26						
	400	0	0						
89	0	354	100			345	100		
	10	-	-			322	93		
	25	-	-			279	81		
	50	-	-			210	61		
	100	246	70	NI		-	-		NI
	200	216	61						
	400	0	0						
90	0	367	100	400	100	322	100		
	50	-	-	-	-	243	76		
	100	267	73	360	90	173	54		
	200	234	64	320	80	152	47		NI
	300	200	54	240	60	-	-		
	400	133	36	160	40				
97	0	372	100	533	100	322	100		
	50	-	-	-	-	264	82		
	100	172	46	400	75	237	74		
	200	114	31	267	50	214	66		NI
	400	-	-	0	0	-	-		
98	0	372	100	533	100			367	100
	100	229	62	400	75			334	91
	200	200	54	267	50	NI		234	64
	300	114	31	200	38			167	45
	400	0	0	0	0			0	0

a valores em μequiv e⁻ mg⁻¹ Chl⁻¹.

b valores em porcentagem

c valores em μM DCPIP_{red} mg⁻¹ Ch h⁻¹.

5.5.10.3. Efeito dos triterpenos 23, 75, 95, 99 e 100 sobre as atividades dependentes das membranas ligadas de H⁺ -, Mg²⁺ - e Ca²⁺ - ATPases.

Com o aumento da concentração dos compostos **23**, **75**, **99** e **100**, ocorreu um aumento da atividade do complexo H⁺ -ATPase, o que permite inferir que estes atuam como desacoplantes (Tabela 2.26). O composto **95** atua de maneira oposta, já que inibe H⁺ -ATPase (23 % a 100 μM), e inibe ainda Mg²⁺ - e Ca²⁺ - ATPases, sendo que Mg²⁺ -ATPase de CF1 isolada a mais inibida (58 % a 400 μM). Este resultado indicou que **95** possui outro sítio de interação e inibição com CF1, quando atua como inibidor da transferência de energia.

Tabela 2.26. Efeito de **23**, **75**, **95**, **99** e **100** sobre a membrana ligada a tilacóide (H⁺ -ATPase), sobre a membrana ligada de luz ativada (Mg²⁺ -ATPase) e sobre a atividade aquecida (Ca²⁺ -ATPase) do fator de acoplamento purificado 1 (CF1) de cloroplastos.

Composto	H ⁺ -ATPase (%)	Ca ²⁺ - ATPase (%)	Mg ²⁺ - ATPase (%)
23 (μM)			
0	100		
10	87,0	–	–
50	105,3		
100	103,4		
75 (μM)			
0	100		
100	93,6	–	–
200	103,4		
300	104,8		
95 (μM)			
0	100	100	100
25	90,5	-	-
50	98,6	-	-
100	77,3	93,8	58,2
200	-	86,6	45,8
400	-	85,7	41,8
99 (μM)			
0	100		
80	97,2	–	–
160	107,2		
240	102,4		
100 (μM)			
0	100		
100	64,1	–	–
200	106,5		
300	79,3		

Valores do controle para Mg²⁺ - and Ca²⁺ -dependente ATPasa foram 47.3 μmoles Pi crescente/mg Chl.h. e 55.4 mmol Pi/mg proteína, respectivamente.

5.5.10.4. Efeito dos triterpenos (**23**, **89**, **90**, **95**, **97**, **98**, **99** e **100**) sobre a Fluorescência (Chl *a*).

Neste experimento foram utilizadas as seguintes concentrações dos compostos: 100 μM (**99**), 200 μM (**97**), 400 μM (**23**, **89**, **90**, **95** e **100**) e 1000 μM (**98**). Devido a pequena quantidade isolada, o composto **75** não foi submetido ao teste. Assim como para as demais substâncias empregou-se DCMU 10 μM e Tris 0,8 M como controles.

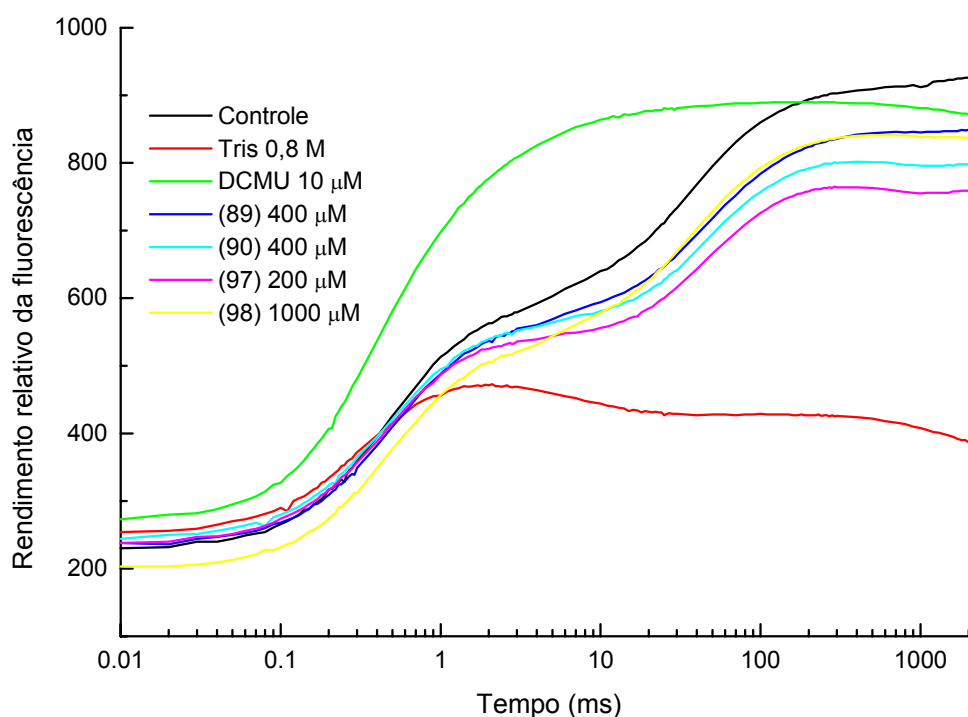


Figura 2.33. Aumento cinético da fluorescência de cloroplastos frescos e lisos infiltrados com os compostos **89**, **90**, **97** e **98**, DCMU e tilacóides tratados com Tris. Os controles dos cloroplastos são mostrados para comparação. Curvas de indução de fluorescência (Chl *a*) foram medidas a temperatura ambiente. Os dados são médias de três repetições.

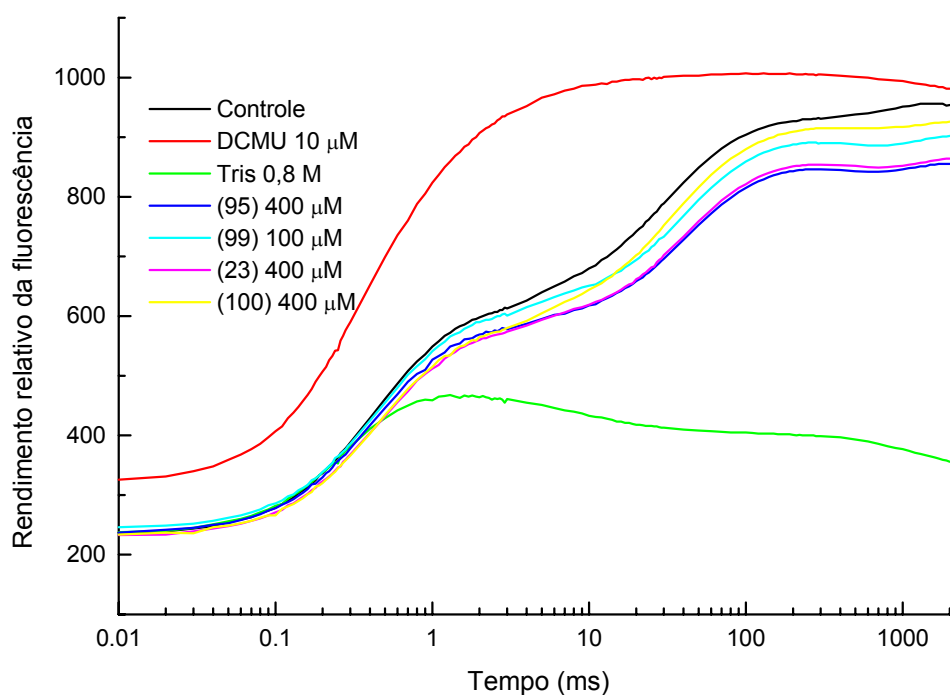


Figura 2.34. Aumento cinético da fluorescência de cloroplastos frescos, lisos e quebrados infiltrados com os compostos **23**, **95**, **99** e **100**, DCMU e tilacóides tratados com Tris. Os controles dos cloroplastos são mostrados para comparação. Curvas de indução de fluorescência (Chl a) foram medidas a temperatura ambiente. Os dados são medias de três repetições.

Tabela 2.27. Efeito do aumento da concentração dos compostos **23**, **89**, **90**, **95**, **97**, **98**, **99** e **100** sobre os parâmetros da fluorescência em tilacóides previamente incubados por 5 min no escuro e com 0.8 M Tris, pH 8,0.

Composto	F_0	F_M	F_V/F_M	Área
Controle	220	926	0,762	35800
10 μ M DCMU	256	890	0,712	1200
0.8 M Tris	247	471	0,476	0
89				
400 (μ M)	229	848	0,730	23000
90				
400 (μ M)	237	802	0,704	14400
97				
200 (μ M)	229	765	0,701	12800
98				
1000 (μ M)	193	841	0,771	16600
Controle	226	956	0,764	29200
10 μ M DCMU	307	1006	0,695	800
0.8 M Tris	227	468	0,515	0
23				
400 (μ M)	222	864	0,743	22800
95				
400 (μ M)	228	855	0,733	25000
99				
100 (μ M)	236	901	0,738	28600
100				
400 (μ M)	225	925	0,757	26000

Observou-se a respeito do estudo deste grupo de triterpenos pode-se dizer que os compostos **75**, **89**, **90**, **97**, **98**, **99** e **100** atuam como inibidores da reação de Hill. O estudo do mecanismo de ação do composto **98** mostrou ainda que seu sítio de ação se encontra ao nível de plastoquinonas. Os compostos **89**, **90** e **97** inibem o FSII, sendo que o composto **97** atua pelo lado doador de elétrons e **89** e **90** pelo lado receptor e doador de elétrons ao nível de Q_A e complexo OEC* (onde ocorre a fotólise da água). Estes resultados foram confirmados através da análise de seus dados de fluorescência da clorofila *a*, onde foi verificado que estes compostos são inibidores da fotólise da água.

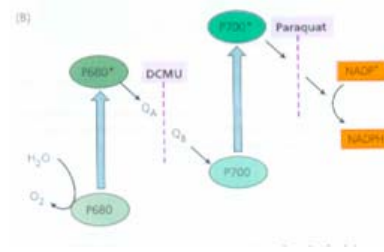
Os compostos **23**, **75** e **95** atuam como inibidores da transdução de energia, já que inibem a baixas concentrações a síntese de ATP e a altas concentrações as etapas do transporte de elétrons. Sendo que o composto **23** atua como inibidor do complexo *b₆f*. Analisando o efeito do composto **95** sobre H^+ -ATPase unida a membrana, Ca^{2+} -ATPase e Mg^{2+} -ATPase em CF1 isolado, observa-se que a maior inibição ocorreu sobre Mg^{2+} -ATPase de CF1, o que indica que o sítio de inibição deste composto se encontra em CF1. Já o triterpeno **75**, atua como um desacoplante tal como amônia (desacoplante artificial), o que foi verificado por meio dos experimentos de H^+ -ATPase. Os terpenos **99** e **100** apresentam mecanismos de ação semelhantes ao terpeno **75**.

6. Conclusões

Uma coleção de 120 produtos naturais foi submetida a testes fitotóxicos em cloroplastos isolados de espinafres obtidos no Laboratório de Produtos Naturais do DQ-UFSCar. Os resultados mostraram-se bastante promissores uma vez que quase 35 % das substâncias ensaiadas foram ativas, inibindo a síntese de ATP, a cadeia transportadora de elétrons, o FSII, FSI e suas reações parciais. Foram realizados ainda com estas substâncias estudos de fluorescência da clorofila *a* e atividade sobre o complexo enzimático H⁺ - ATPase.

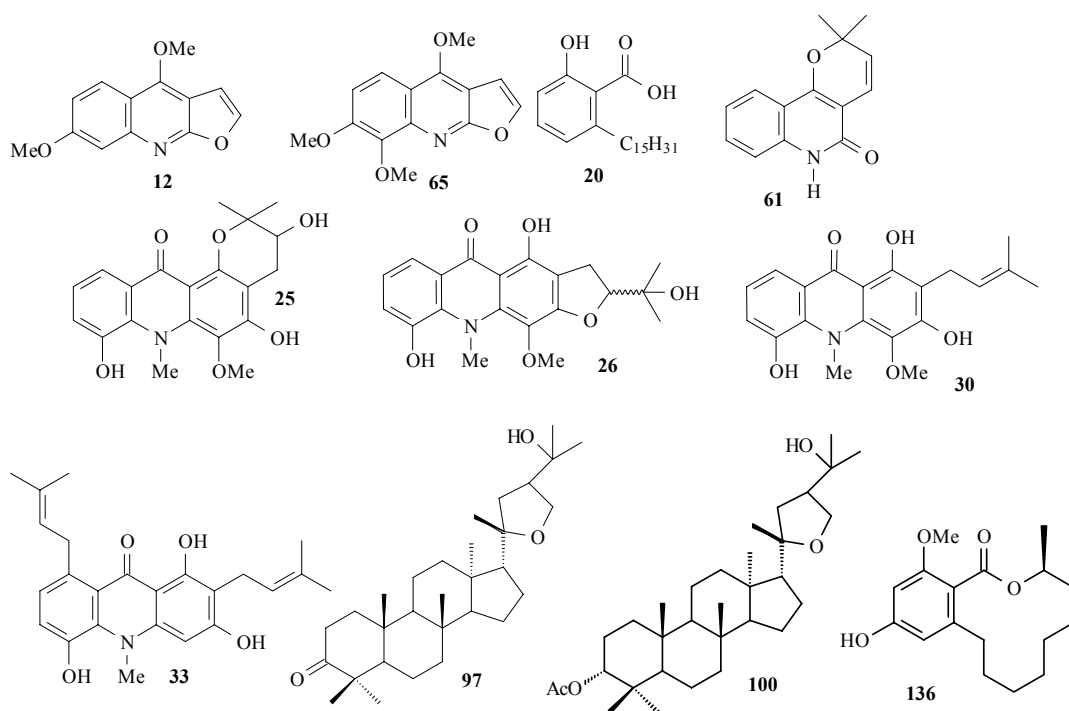
Estes experimentos sugerem que a possibilidade de obtenção de modelos para herbicidas inibidores da fotossíntese a partir de produtos naturais é possível, uma vez que alguns dos compostos ensaiados foram bastante ativos, como, por exemplo, Evolitrina (**12**), Esquimianina (**65**) e Flindersina (**61**) (inibidores da reação de Hill e inibidores do FSII pelo lado doador e aceptor de elétrons), Glicocitrina IV (**30**) e 1,3,5-triidroxi-2,8-di-(3-metil-butenil-2)-10-metil-9-acridona (**33**) (inibidores do FSII pelo lado doador de elétrons), Ocotilona (**97**) (inibidores da reação de Hill e do FSII pelo lado doador de elétrons), ácido anacárdico (**20**) (potente inibidor da reação de Hill, do FSII pelo lado doador de elétrons e da fotólise da água e inibidor do FSI) e ainda 3,5-dihidroxi-1-(2'-hidroxi-3',3'-dimetilcromeno)-4-metoxi-10-metil-9-acridona (**25**) e 1,5-dihidroxi-4-metoxi-2,3-dihidrofurano-10-metil-2'-hidroxiisopropil-acridona (**26**) que são inibidores da reação de Hill e do FSI. As substâncias **25**, **26** e o Cabraleadiol monoacetato (**100**) apresentaram I₅₀ de 6,5; 3,3 e 6,8 µM, respectivamente. Estes valores são menores que o I₅₀ do herbicida comercial utilizado como controle positivo nos testes, o DCMU, que apresenta I₅₀ na ordem de 10 µM para a inibição da síntese de ATP em cloroplastos das folhas de espinafre.

Alguns herbicidas como o DCMU bloqueiam o fluxo de elétrons fotossintético. O DCMU atua bloqueando o fluxo de elétrons nos aceptores quinona do FSII, competindo pelo sítio de ligação da plastoquinona (Proteína D1) que geralmente é ocupado pela quinona B (Q_B), provocando a saída da plastoquinona e interrompendo o fluxo de elétrons entre os fotossistemas. Neste momento, a clorofila, em seu estado de energia simples, sem poder transferir elétrons para P680 (fotossistema II), torna-se ainda mais carregada e reativa, constituindo um estado de energia tríplice. O sistema de proteção dado pelos carotenóides é enfraquecido, devido ao excesso de clorofila no estado de energia tríplice, causando a peroxidação dos lipídeos (ácidos graxos), e conseqüentemente, da membrana celular do cloroplasto, provocando o aparecimento de clorose foliar e quando o processo atinge a parede celular, surge a necrose foliar. A morte das plantas sensíveis ocorre devido à falta de carboidratos, em decorrência da inibição da reação luminosa da fotossíntese. Muitas substâncias apresentaram mecanismos de ação semelhantes ao herbicida DCMU como, por exemplo, **12, 20, 30, 33, 61 e 136** (Lasiodiplodina).



Estes resultados representam excelentes perspectivas, uma vez que estas substâncias possuem os mais variados mecanismos de ação, principalmente no que diz respeito à implantação desta nova linha de pesquisa em nosso país, para que posteriormente sejam encontrados modelos para novos herbicidas inibidores da fotossíntese baseados em produtos naturais. Posteriormente, estabelecer-se-á a relação estrutura atividade entre as substâncias consideradas ativas, mas, para isto, se faz necessário correlacionar várias propriedades teóricas e experimentais, para que se tenham indicativos de quais propriedades físicas e/ou químicas

influenciam na atividade destas substâncias, o que pode ser estabelecido através de análises quimiométricas.



7. Referências Bibliográficas

ACHNINE, L; MORENO-SÁNCHEZ, R.; IGLESIAS-PRIETO, R.; PEREDA-MIRANDA, R.; LOTINA-HENNSSEN, B.. Tricolorin A, a potent natural uncoupler and inhibitor of photosystem II acceptor side of spinach chloroplasts. *Physiol. Plant.*, **106**: 246, 1999.

ALLEN, J.F.; HOLMES, N.G. *Electron transport partial reactions*. In: *Photosynthesis, Energy Transduction. A Practical Approach*; Hipkinns, M.F. , Baker, N.R., Eds.; IRL Press: Oxford, United Kingdom, **1986**.

AMBROZIN, A. R. P. *Estudo fitoquímico de plantas das famílias Rutaceae e Meliaceae visando o isolamento de substâncias prototipos para o desenvolvimento de novos fármacos antichagásicos e antileishmanioses*. Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2004. Tese de Doutorado, 241 p.

ANDRADE, M. R. *Alcaloides de Rutaceae: química e atividade biológica*. Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2003. Tese de Doutorado, 200 p.

ARANA, J. L.; VALLEJOS, R. H. Involvement of sulfhydryl groups in the activation mechanism of the ATPase activity of chloroplast coupling factor 1. *J. Biol. Chem.*, **257**: 1125, 1982.

BARBOSA, L. C. A. *Os pesticidas, o homem e o meio ambiente*. Editora UFV, Viçosa, Minas Gerais, Brasil, **2004**.

BRAGA, P. A. C. *Estudo fitoquímico de espécies de Hortia (Rutaceae), importância quimiosistemática e atividades biológicas dos constituintes isolados*. Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2005, 269 p.

CALDERBANK, A; SLADE, P. *Diquat and Paraquat*. In: *Herbicides Chemistry, Degradation and Mode of Action*, Vol. 2 (eds. PC Kerney & DD Kaufman), 2nd edn, Marcel Dekker, New York, USA, **1976**.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Química Nova*, **21**: 99, 1998.

COBB, A. H. *Herbicides and Plant Physiology*. Chapman & Hall, London, UK, **1992**.

COBB, A. H. & KIRKWOOD, R. C. *Challenges for herbicide development*. In: *Herbicides and Their Mechanisms of Action* (eds AH Cobb & RC Kirkwood), Sheffield Academic Press, Sheffield, UK, **2000**.

COLE, D. J. & RODGERS, M. W. *Plant Molecular Biology for Herbicide-Tolerant Crops and Discovery of New Herbicide Targets*. In: *Herbicides and Their Mechanisms of Action* (eds AH Cobb & RC Kirkwood). Sheffield Academic Press, Sheffield, UK, **2000**.

DUKE, S. O. *Polycyclic Alkanoic Acids*. In: *Herbicides Chemistry, Degradation and Mode of Action*, Vol. 3 (eds. PC Kerney & DD Kaufman), Marcel Dekker, New York, USA, **1988**.

DUKE, S. O.; ROMAGNI, J. G.; DAYAN, F. E. Natural products as sources for new mechanisms of herbicidal action. *Crop Protection*, **19**: 583, 2000.

GARZA-ORTÍZ, A.; KING-DÍAZ, B.; SOSA-TORRES, M.E.; LOTINA-HENNSEN, B. Interference of ruthenium red analogues at photosystem II of spinach thylakoids. *J. Photochem. Photobiol., B*, **76**: 85, 2004.

GELLERMA, J. L.; SCHLENK, H. Methods for Isolation and Determination of Anacardic Acids. *Analyt. Chem.*, **40**: 739, 1968.

GIAQUINTA, R. T.; SELMAN, B. R.; ANDERSON, B. J.; DILLEY, R. A. Inhibition of coupling factor activity of chloroplast membrane by diazonium compounds. *J. Biol. Chem.*, **249**: 2873, 1974.

GONZÁLEZ-BERNARDO, E.; KING-DÍAZ, B.; DELGADO, G.; AGUILAR, M. A.; LOTINA-HENNSEN, B.. Photosynthetic electron transport interaction of xanthorrhizol isolated from *Iostephane heterophylla* and its derivatives. *Physiol. Plant.*, **119**: 598, 2003.

GREAVES, M. P. *Microbial herbicides: Factors in development*. In: COPPING, L. G. *Crop Protection Agents from Nature: Natural Products and Analogues*, Cambridge, RCS, 501, **1996**.

HESS F. D.; ANDERSON, R. J. & REAGAN, J. D. High Throughput synthesis and screening: the Partner of Genomics for Discovery of New Chemicals for Agriculture. *Wedd Science*, **49**: 249, 2001.

IRABURU, M. J.; LOPEZ-ZABALBA, M. J.; SAENZ, M.; SANTIAGO, E. Molecular Aspects of Activation Mechanisms of CF1. *Phytochemistry*, **36**: 559, 1994.

IZAWA, S.; WINGET, C. D.; GOOD, N. E. Phlorizin, a specific inhibitor of photophosphorylation coupled electron transport in chloroplasts. *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **22**: 223, 1972.

KIMURA, Y.; MISUNO, T.; SHIMADA, A. Penedione and penihydrone, new plant growth regulators produced by the fungus *Penicillium sp, no 13*, *Tetrahedron*, **38**: 469, 1997.

KIMURA, Y.; MISUNO, T.; SHIMADA, A.; KAWANO, T.; Penidienone, a plant growth regulator produced by fungus, *Penicillium sp, no 13*. *Phytochemistry*, **47**: 323, 1998.

KIMURA, Y.; SHIMADA, A.; KUSANO, M.; YOSHII, K.; MORITA, A.; NISHIBE, M.; FUJIOKA, S.; KAWANO, T. Myxostiolide, myxostiol, and clavatoic acid, plant growth regulators from the fungus *Myxotrichum stipitatum*. *J. Nat. Prod.*, **65**: 621, 2002.

KING-DÍAZ, B.; MACIAS-RUVALCABA, N.; AGUILAR-MARTINEZ, M.; CALAMINICI, P.; LOTINA-HENNSEN. 2-[(R-phenyl)amine]-1,4-naphthalendiones as photosystem I electron acceptors. Structure-activity relationship of m- and p-PAN compounds with QSAR analysis. *J. Photochem. Photobiol.*, **83**: 105, 2006.

KOROLKOVAS, A.; FERREIRA, E. I. Planejamento Racional de Fármacos. *Química Nova*, **11**: 320, 1988.

KUDSK, P; STREIBIG, J. C. Herbicides – a two-edged sword. *Weed Research*, **43**: 90, 2003.

LAZÁR, D.; POSPÍSIL, P.; NAUS, J. Decrease of fluorescence intensity after the K step in chlorophyll a fluorescence induction is suppressed by electron acceptors and donors to photosystem 2. *Photosynthetica*, **37**: 255, 1999.

LOTINA-HENNSEN, B.; MORENO-SÁNCHEZ, R.; IGLESIAS-PRIETO, R.; PEREDA-MIRANDA, R.; ACHNINE, L. Tricolorin A, a potent natural uncoupler and inhibitor of photosystem II acceptor side of spinach chloroplasts. *Physiol. Plant.*, **106**: 246, 1999.

- MORONEY, J. V.; LOPRESTI, L.; MCEWEN, B. F.; MCCARTY, R. E.; HAMMES, G. G. The Mr value of chloroplast coupling factor 1. *FEBS Letters*, **158**: 58, 1983.
- MORONEY, J. V.; FULLMER, C. S.; MCCARTY, R. E. Characterization of the cysteinyl-containing peptides of the α subunit of coupling factor 1. *J. Biol. Chem.*, **259**: 7281, 1984.
- NALIN, C. M.; MCCARTY, R. E. Role of a disulfide bond in the γ subunit in activation of the ATPase of chloroplast coupling factor 1. *J. Biol. Chem.*, **259**: 7275, 1984.
- MATSUURA, H.; OBARA, N.; CHISAKA, N.; ICHIHARA, A.; YOSHIHARA, T. Novel Cyclohexene Compound from *Lasiodiplodia theobromae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**: 2460, 1998.
- MILLS, J. D.; MITCHELL, P.; SCHURMANN, P. Modulation of coupling ATPase activity intact chloroplasts. *FEBS Lett.*, **191**: 144, 1980.
- MITCHELL, P. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, **41**: 445, 1966.
- OIANO NETO, J. *Estudo fitoquímico de Toona ciliata: uma contribuicao a quimiosistemática do gênero e a ecologia da interacao Hypsipyla-Meliaceae*. Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, Tese de Doutorado. 2000. 287 p.
- DE PAULA, J. R. *Estudo Fitoquímico do enxerto de Cedrela odorata sobre Toona ciliata (MELIACEAE)*. Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar. Tese de Doutorado. 1996. 331 p.
- PEÑA-VALDÍVIA, C. B.; RODRIGUEZ-FLORES, L.; LOTINA-HENNSEN, B. Inhibition of photophosphorylation and electron transport by N,N-dimethylformamide. *Biophys. Chem.*, **41**: 169, 1991.
- PERCIVAL, M. P.; BAKER, N. R. *Weed Physiology*, vol. 2 (eds. SO Duke), CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, USA, **1991**.
- PILLMOOR, J. B. Carbocyclic coformycin: a case study of the opportunities and pitfalls in the industrial search for new agrochemicals from nature. *Pestic. Sci.*, **52**: 75, 1998.

RICKERT, K.W.; SEARS, J.; BECK, W.F.; BRUDVIG, G.W. Mechanism of irreversible inhibition of O₂ evolution in photosystem II by Tris (hydroxymethyl)aminomethane. *Biochemistry*, **30**: 7888, 1991.

ROMAGNI, J. G.; NANAYAKKARA, N. P. D.; ROSELL, R.; DAYAN, F. E. *Ecophysiological Roles of Selected Lichen Secondary Compounds*. In: REIGOSA, M. J.; PEDROL, N. *Allelopathy from Molecules to Ecosystems*. Enfield: Science Publishers, 316, **2002**.

SANTOS, D. A. P. *Busca de metabólitos bioativos em plantas, da família Bignoniaceae e Rutaceae contra parasitas causadores de doenças tropicais*. Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar. Tese de Doutorado. **2005**, 231 p.

Soares, M. S. **2006**. Estudo fitoquímico dos frutos de *Cabralea canjerana* canjerana (VELL) Mart. Uma contribuição à quimiosistemática do gênero e avaliação da atividade biológica dos compostos isolados. Dissertação de Mestrado. São Carlos: UFSCar. 161 p.

STRASSER, R. J.; SRIVASTAVA, A. GOVINDJEE, Polyphasic chlorophyll *a* fluorescence transients in plants and cyanobacteria. *Photochem. Photobiol.*, **61**: 32, 1995.

STRASSER, R. J. Donor site capacity of photosystem II probed by chlorophyll *a* transients. *Photosynth. Res.*, **52**: 147, 1997.

STRASSER, R.J.; SRIVASTAVA, A.; TSIMILLI-MICHAEL, M. *Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient*. In *Advances in Photosynthesis and Respiration. Chlorophyll Fluorescence a Signature of photosynthesis*; Papageorgiou, G., Govindjee, Eds.; Kluwer Academic Publishers: The Netherlands, **2004**.

SUMNER, J. B. Method for the colorimetric determination of P. *Science* **100**: 413, 1944.

SUESS, K. H.; SCHMIDT, O. Evidence for an α 3, β 3, γ , δ , I, II, ϵ , III 5 subunit stoichiometry of chloroplast ATP synthetase complex (CF1-CF0). *FEBS Letters*, **144**: 213, 1982.

VEIGA, T. A. M.; SILVA, S. C.; ARCHUNDIA-CAMACHO, F.; VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J.B.; RODRIGUES F_o, E.; MULLER, M.W.; SILVA, M.F.G.F; HENSENN, B. L. Inhibition of Thylakoid

Electron Transport Chain by Lasiodiplodin, a Natural Product from *Botryosphaeria rhodina*. *J. Agric. Food Chem.*, **55**: 4217, 2007a.

VEIGA, T. A. M.; GONZALEZ-VAZQUEZ, R.; OIANO NETO, J.; SILVA, M.F.G.F.; DIAZ, B. K.; HENSENN, B. L. Siderin from *Toona ciliata* (Meliaceae) as water-splitting enzyme inhibitor on thylakoids. *Arc. Biochem. Biophys.*, **465**: 38, 2007b.

VEIGA, T. A. M., GONZALEZ-VAZQUEZ, R.; BRAGA, P.A.C.; SILVA, M.F.G.F, DIAZ, B. K., HENSENN, B. L. Effects of Alkaloids from *Hortia superba* (Rutaceae) on Thylakoid Electron Transport and Photophosphorylation in Isolated Spinach Chloroplasts. *Allelopathy Journal*, **21**: 133, 2008.

VERNON, L. P.; SHAW, E.R. Photoreduction of 2,5-dichlorophenol indophenol by diphenylcarbazide: A photosystem 2 reaction Catalysed by Tris-washed chloroplast subchloroplast fragments. *Plant Physiol*, **44**: 1645, 1969.

ZAMBOLIM, L. Fungicidas: beneficios versus riscos. *Ação ambiental*, **5**: 24, 1999.