



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
LABORATÓRIO DE PRODUTOS NATURAIS

## Estudo de metabólitos secundários de *Ruta graveolens* como inibidores da fotossíntese

**Olívia Moreira Sampaio**

\*Bolsista FAPESP

Tese apresentada ao Programa de pós-graduação como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR EM QUÍMICA, na área de concentração de QUÍMICA ORGÂNICA .

***Orientadora: Profa. Dra. Maria Fátima G. F. da Silva***  
**Co-Orientador: Prof. Dr. Thiago André Moura Veiga**

São Carlos, 09 de dezembro de 2011.

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

S192em

Sampaio, Olívia Moreira.

Estudo de metabólitos secundários de *Ruta graveolens* como inibidores da fotossíntese / Olívia Moreira Sampaio. -- São Carlos : UFSCar, 2012.  
217 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Química orgânica. 2. Produtos naturais. 3. Fotossíntese. 4. Fluorescência. I. Título.

CDD: 547 (20<sup>a</sup>)

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

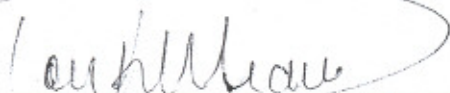
---

*Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de tese de doutorado da candidata **Olivia Moreira Sampaio**, realizada em 09 de dezembro de 2011:*



---

Profa. Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva



---

Prof. Dr. Douglas Wagner Franco



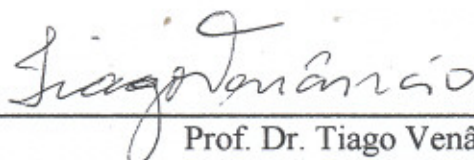
---

Prof. Dr. Alex-Alan Furtado de Almeida



---

Profa. Dra. Mônica Tallarico Pupo



---

Prof. Dr. Tiago Venâncio

*"Nos dias de hoje, cada vez mais, acentua-se a necessidade de ser forte.  
Mas não há uma fórmula mágica que nos faça chegar à força sem que  
antes tenhamos provado a fraqueza."*

*Fábio de Melo*

*Dedico esta tese às duas pessoas que fazem minha vida valer à  
pena...*

*Dedico esta tese a minha rainha e a minha princesa...*

*Dedico esta tese a minha mãe e a minha irmã...*

*Dedico esta tese a Maria e a Keila ...*

*Amo vocês!*

## *Agradecimentos*

À Deus por estar sempre presente mesmo quando não percebia sua presença, sendo fiel em todos os momentos.

A Prof. Dra Maria Fátima G. F. da Silva pela confiança, orientação, compreensão e pelo carinho com que sempre me tratou.

Ao meu Co-Orientador Thiago Veiga, por ter sido meu chefe linha dura, pelo incentivo, carinho e amizade que sempre teve por mim.

Aos professores do PN: Paulo César, João Batista, Edinho e Moacir.

Ao meu pai que mesmo longe agradeço e amo.

Ao meu namorado Lucas Curcino pela paciência, ajuda, cuidado e acima de tudo pelo amor que sempre teve por mim (S2).

A todos os meus familiares que estão na Bahia.

As minhas amigas de toda vida Neta, Manu e Flavinha, com todo amor.

As meus amigos do PN, todos que me presentearam com um sorriso e uma ajuda sempre que necessário, em especial ao Sabá e o Japa, muito obrigada por tudo.

As minhas amadas amigas: Maria Luíza (Malu), Marília (gorda), Barbara (babi), Evania (cremilda), Luciana (Lú Vizigoto), Cristina (Cris louca), Lívia (Soman) obrigada por sempre me ajudarem sendo boas amigas e também por dizer (Ámigaaaaaaaaaaaa!).

Aos meus novos e bons amigos da Federal e todos que se incluem aqui.

Às secretarias Graciele e Ariane pela paciência e carinho dispensados.

A todos os amigos e conhecidos do DQ e da UFSCar.

Ao pessoal do laboratório de RMN.

As agências de fomento CNPq, CAPES e a FAPESP pela bolsa concedida.

## **ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**

RMN	Ressonância Magnética Nuclear
ATP	Adenosinatrifosfato
ADP	Adenosinadifosfato
CC	Cromatografia em Coluna
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
RMN de <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono -13
RMN de <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
APCI	<i>Atmospheric-pressure chemical ionization</i>
gNOESY	<i>gradient- Nuclear Overhauser effect spectroscopy</i>
CG-EM	Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
CLAE/HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
Hz	Hertz
<i>J</i>	Constante de Acoplamento
DMSO	Dimetilsulfóxido
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
<i>dd</i>	Duplo Dubleto
<i>ddd</i>	Duplo Duplo Dubleto
<i>m</i>	Multiplete
<i>s</i>	Singleto
<i>t</i>	Triplete
<i>qt</i>	Quintupleto
IC <sub>50</sub>	Concentração necessária para inibição de 50% da atividade
rpm	Rotação por Minuto
FHDRF	Fração Hexano/Diclorometano Ruta Folha
FDRF	Fração Diclorometano Ruta Folhas
FHRR	Fração Hexano Ruta Raízes
Hex.	Hexano
DCM	Diclorometano

MeOH	Metanol
$\delta$	Deslocamento Químico
$\Phi$	Diâmetro
MHz	Mega-Hertz
FMRF	Fração Metanol Ruta Folhas
Chl <i>a</i>	Clorofila <i>a</i>
H	Altura da Sílica na Coluna
UV	Ultravioleta
P <sub>680</sub>	Centro de reação do fotosistema II
P <sub>700</sub>	Centro de reação do fotosistema I
PSI	Fotosistema I
PSII	Fotosistema II
Q <sub>A</sub>	Quinona <i>a</i>
Q <sub>B</sub>	Quinona <i>b</i>
DCMU	3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetiluréia
DCBQ	2,6-dicloro- <i>p</i> -benzoquinona
DBMIB	2,5-dibromo-3-metil-6-isopropil-1,4- <i>p</i> -benzoquinona
$\mu$ L	Microlitro
$\mu$ M	Micromolar
ppm	Parte por milhão
MV	Metilviologênio
Pi	Fosfato inorgânico
TMQH <sub>2</sub>	Tetrametilquinona reduzida
DCP	Difenilcarbazida
dV/dt <sub>0</sub>	Mudança da fluorescência variável relativa em função do tempo
PHI(P <sub>0</sub> )	Rendimento quântico máximo da fotoquímica primária
PSI <sub>0</sub>	Probabilidade, t=0, de um excitón aprisionado mover um elétron pela cadeia transportadora de elétrons após Qa <sup>-</sup>
PHI(E <sub>0</sub> )	Rendimento quântico do transporte de elétrons
PHI(D <sub>0</sub> )	Rendimento quântico (t=0) da energia de dissipação
Sm	Área normalizada
SunK	k <sub>p</sub> +k <sub>n</sub>



$K_n$	Constante “de-excitação” não fotoquímica
$K_p$	Constante “de-excitação” fotoquímica
$ABS/RC$	Tamanho médio do sistema antena de captura de energia
$TR_0/RC$	Fluxo de energia capturada por centro de reação
$ET_0/RC$	Transporte de elétrons por centro de reação
$RC/CS_0$	Densidades de centros de reação por seção transversal
$ABS/CS_0$	Número de fótons absorvidos por seção transversal
$TR_0/CS_0$	Taxa máxima de energia bloqueada por seção transversal
$ET_0/CS_0$	Transporte de elétrons por seção transversal
$10RC/ABS$	Número de centros de reação ativos
$PI_{(ABS)}$	Índice de desempenho
$DI_0/RC$	Dissipação de energia não fotoquímica por centro de reação

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Dados de RMN de $^1\text{H}$ para a substância <b>01 e 02</b> e comparação com a literatura.	62
TABELA 2-Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ para a substância <b>02</b> e comparação com a literatura.	63
TABELA 3- Dados de RMN $^1\text{H}$ para a substância <b>03 e 04</b> e comparação com a literatura.	64
TABELA 4- Dados de RMN $^{13}\text{C}$ para a substância <b>03 e 04</b> e comparação com a literatura.	65
TABELA 5 - Dados de RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$ para a substância <b>05</b>	73
TABELA 6 - Dados de RMN de $^1\text{H}$ para a substância <b>06</b> e comparação com a literatura.	78
TABELA 7 - Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ para a substância <b>06</b> e comparação com a literatura.	79
TABELA 8 - Dados de RMN de $^1\text{H}$ para as substâncias <b>07, 08 e 09</b> , e comparação com a literatura.	89
TABELA 9- Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ para as substâncias <b>07, 08 e 09</b> e comparação com a literatura.	90
TABELA 10- Dados de RMN de $^1\text{H}$ para a substância <b>10</b> e comparação com a literatura.	96
TABELA 11- Dados de RMN de $^1\text{H}$ para a substância <b>11</b> e comparação com a literatura.	105
TABELA 12 - Dados de RMN de $^1\text{H}$ para a substância <b>12 e 13</b> , e comparação com a literatura.	119
TABELA 13- Dados de RMN de $^1\text{H}$ para a substância <b>14 e 15</b> , e comparação com a literatura.	120
TABELA 14 - Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ para as substâncias <b>12, 13 e 15</b> e comparação com a literatura.	121
TABELA 15- Dados de RMN de $^1\text{H}$ para a substância <b>16</b> e comparação com a literatura.	124
TABELA 16- Dados de RMN de $^1\text{H}$ da estrutura <b>17</b> .	129
TABELA 17- Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ da estrutura <b>17</b> e comparação com a	130

literatura.	
TABELA 18-Dados de RMN de $^1\text{H}$ para a substância <b>18</b> e comparação com a literatura.	136
TABELA 19- Massa das frações do extrato etanólico das partes aéreas da <i>R. graveolens</i>	141
TABELA 20- Massas das frações do extrato etanólico das raízes da <i>R. graveolens</i>	141
TABELA 21- Potencial de inibição das substâncias ensaiadas	153
TABELA 22- Efeitos da substância <b>02</b> sobre o transporte fotossintético de elétrons de PSII desacoplado da $\text{H}_2\text{O}$ a DCBQ e sobre as reações parciais da $\text{H}_2\text{O}$ a SiMo e de DCP a DCPIP.	168
TABELA 23- Efeitos da substância <b>02</b> sobre o transporte fotossintético de elétrons de PSI desacoplado do $\text{DCPIP}_{red}$ a MV .	169
TABELA 24- Efeitos da substância <b>09</b> sobre o transporte fotossintético de elétrons de PSII desacoplado da $\text{H}_2\text{O}$ a DCBQ e as reações parciais da $\text{H}_2\text{O}$ a SiMo e de DCP a DCPIP.	170
TABELA 25- Efeitos da substância <b>09</b> sobre o transporte fotossintético de elétrons de PSI desacoplado do $\text{TMQH}_2$ a MV .	171
TABELA 26- Efeitos das substâncias <b>02, 06, 11, 12 e 18</b> na $\text{H}^+$ -ATPase	173
TABELA 27- Efeitos das substâncias <b>02, 07, 10 e 11</b> na produção da biomassa seca de <i>L. pereni</i> .	196
TABELA 28- Efeitos das substâncias <b>03, 06, 12, 13 e 17</b> na produção de biomassa seca de <i>L. pereni</i> .	198
TABELA 29- Efeitos das substâncias <b>08 e 09</b> na produção da biomassa seca de <i>L. pereni</i> .	199

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Processo fotossintético observado em três etapas	06
FIGURA 2. Esquema em Z da fotossíntese através dos quatro principais complexos protéicos	07
FIGURA 3. Espectro da emissão da fluorescência da Chl a e de alguns outros pigmentos.	13
FIGURA 4: Curva de indução da fluorescência da clorofila a de Kautsky	16
FIGURA 5. Curva <i>OJIP</i> de indução da fluorescência da clorofila a (adaptada STRASSER et al, 2004).	17
FIGURA 6- Relação dos processos fotossintéticos com a curva de indução da fluorescência da clorofila a ( <i>OJIP</i> ) (adaptada STRASSER et al, 2004).	18
FIGURA 7. Gráfico de radar com as variáveis e parâmetros de emissão da fluorescência para avaliação da eficiência do aparato fotossintético em plantas	19
FIGURA 8- Medidas das variáveis gerais de emissão da fluorescência da clorofila a.	24
Figura 9- Resumo esquemático dos cálculos baseados no test –JIP, adaptado de Paillon,1976	27
FIGURA 10.- Modelo simplificado dos fluxos de energia específicos em PSII.	28
FIGURA 11- Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>01</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).	49
FIGURA 12- Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>02</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).	50
FIGURA 12.1- Expansão espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>02</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).	51
FIGURA 13- Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>03</b> ( $\text{CDCl}_3$ 400 MHz).	52
FIGURA 14. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>04</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).	53
FIGURA 14.1 Expansão espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>04</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).	54
FIGURA 15- Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>02</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz).	55
FIGURA 16- Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>03</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 100	56

MHz).	
FIGURA 17- Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>04</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz).	57
FIGURA 18- Mapa de correlações HMBC da substância <b>01</b> (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	58
FIGURA 18.1- Expansão do mapa de correlações HMBC da substância <b>01</b> (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	58
FIGURA 19- Mapa de correlação do HSQC da substância <b>03</b> (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	59
FIGURA 20- Mapa de correlação do HMBC da substância <b>03</b> (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	59
FIGURA 21-Espectro de correlação de COSY da substância <b>03</b> (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	60
FIGURA 22- Mapa de correlação do HSQC da substância <b>04</b> (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	60
FIGURA 23- Mapa de correlação do HMBC da substância <b>04</b> (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	61
FIGURA 24- Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>05</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).	68
FIGURA 25- Mapa de correlação do HMBC da substância <b>05</b> (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	69
FIGURA 26- Espectro de massas da substância <b>05</b> , $m/z$ 323 (IE, 70eV).	70
FIGURA 27- Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>05</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz).	71
FIGURA 28- Espectro de isótopos da substância <b>05</b> , $m/z$ 323 (APCI)	72
FIGURA 29- Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>06</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).	76
FIGURA 30- Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz) da substância <b>06</b> .	77
FIGURA 31- Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>07</b> , (200MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	83
FIGURA 32- Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da substância <b>08</b> .	84
FIGURA 33- Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>09</b> (400MHz, d-acetona).	85
FIGURA 34- Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>07</b> (100MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	86
FIGURA 35- Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>08</b> , (100MHz, $\text{CDCl}_3$ )	87
FIGURA 36- Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>09</b> (100MHz, $d$ -	88

acetona).	
FIGURA 37- Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>10</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).	93
FIGURA 37.1- Expansão espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>10</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).	94
FIGURA 38- Mapa de correlações HSQC da substância <b>10</b> (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	95
FIGURA 39- Espectro de RMN $^1\text{H}$ da mistura de alcalóides <b>11(I, II, III)</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).	99
FIGURA 39.1- Expansões do espectro de RMN $^1\text{H}$ da mistura de alcalóides <b>11(I, II, III)</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).	100
FIGURA 40- Cromatograma de íons totais da substância <b>11</b> (IE, 70eV).	101
FIGURA 41- Espectro de massas da banda majoritária da mistura de alcalóides <b>11(I)</b> $m/z$ 313 (IE, 70eV).	102
FIGURA 42- Espectros de massas das bandas minoritárias da mistura de alcalóides <b>11(II, III)</b> , $m/z$ 327 e $m/z$ 341 ((IE, 70eV).	103
FIGURA 43-Proposta de fragmentação do alcalóide 1-metil-2-undecan-4-quinolona ( <b>11-I</b> ) $m/z$ 313.	104
FIGURA 44-Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>12</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).	110
FIGURA 45- Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>13</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).	111
FIGURA 46- Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>14</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).	112
FIGURA 47- Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>15</b> ( <i>d</i> -acetona, 400 MHz).	113
FIGURA 48- Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>12</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz).	114
FIGURA 49- Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>13</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz).	115
FIGURA 50- Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>15</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz).	116
FIGURA 51- Mapa de contorno de HSQC (400MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da substância <b>14</b> .	117
FIGURA 52- Mapa de contorno de HMBC (400MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da substância <b>14</b> .	117
FIGURA 53- Experimento de gNOESY (400MHz, $\text{CDCl}_3$ )da substância <b>14</b> e ampliações.	118
FIGURA 54- Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>16</b> (200MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	123

FIGURA 55- Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>17</b> (200MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	127
FIGURA 56- Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>17</b> (50MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	128
FIGURA 57- Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>18</b> (400MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	133
FIGURA 57.1- Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>18</b> (400MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	134
FIGURA 58- Mapa decorrelação de HSQC da substância <b>18</b> (400MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	135
FIGURA 59- Mapa de correlação de HMBC da substância <b>18</b> (400MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	135
FIGURA 60- Efeitos da substância <b>02</b> (arborinina) no transporte fotossintético de elétrons	157
FIGURA 61- Efeitos da substância <b>06</b> (N-metil-4-metoxi-2-quinolona), no transporte fotossintético de elétrons	159
FIGURA 62- Efeitos da substância <b>09</b> (evolitrina) no transporte fotossintético de elétrons	161
FIGURA 63- Efeitos da substância <b>10</b> (graveolina) no transporte fotossintético de elétrons	162
FIGURA 64- Efeitos da substância <b>11</b> (2-undecan-N-metil-4-quinolina) no transporte fotossintético de elétrons	163
FIGURA 65- Efeitos da substância <b>12</b> (bergapteno) no transporte fotossintético de elétrons	164
FIGURA 66- Efeitos da substância <b>18</b> (chalepina) no transporte fotossintético de elétrons	166
FIGURA 67. Divisão do complexo protéico ATP-sintase	174
FIGURA 68- Uso do gradiente de prótons na síntese de ATP	175
FIGURA 69- Etapas da síntese de ATP	175
FIGURA 70- Gráfico de radar dos efeitos das substâncias <b>02</b> , <b>06</b> e <b>17</b> (150 $\mu\text{M}$ ) nas variáveis da fluorescência Chl <i>a</i> em discos foliares de espinafre calculados através da curva OJIP.	177
FIGURA 71- Gráfico de radar do efeito das substâncias <b>02</b> , <b>06</b> e <b>17</b> (300 $\mu\text{M}$ ) nas variáveis da fluorescência Chl <i>a</i> em discos foliares de espinafre calculados através da curva OJIP.	177
FIGURA 72- Gráfico de radar dos efeitos da substância <b>07</b> nos	180

parâmetros/variáveis da fluorescência Chl <i>a</i> em discos foliares de espinafre calculados através da curva OJIP.	
FIGURA 73- Bandas transientes da curva de emissão de fluorescência da Chl <i>a</i> (OJIP).	181
FIGURA 74- Gráfico de radar dos efeitos da substância <b>09</b> nos parâmetros/variáveis da fluorescência Chl <i>a</i> em discos foliares de espinafre calculados através da curva OJIP.	182
FIGURA 75- Bandas transientes da curva de emissão de fluorescência da Chl <i>a</i> (OJIP) para a substância <b>09</b> .	183
FIGURA 76- Gráficos de radar do efeito da substância <b>10</b> nos parâmetros/variáveis da de emissão de fluorescência Chl <i>a</i> em discos foliares de espinafre calculados através da curva OJIP.	185
FIGURA 77- Bandas transientes da curva de emissão de fluorescência da Chl <i>a</i> (OJIP) para a substância <b>10</b> .	186
FIGURA 78- Gráfico de radar do efeito da sustância <b>11</b> nos parâmetros/variáveis da de emissão de fluorescência Chl <i>a</i> em discos foliares de espinafre calculados através da curva OJIP	187
FIGURA 79- Bandas transientes da curva de emissão de fluorescência da Chl <i>a</i> (OJIP) para a substância <b>11</b> .	188
FIGURA 80- Gráfico de radar do efeito da substância <b>12</b> nos parâmetros/variáveis da de emissão de fluorescência Chl <i>a</i> em discos foliares de espinafre calculados através da curva OJIP.	190
FIGURA 81- Bandas transientes da curva de emissão de fluorescência da Chl <i>a</i> (OJIP) para a substância <b>12</b>	191
FIGURA 82- Gráfico de radar do efeito da substância <b>18</b> nos parâmetros/variáveis da de emissão de fluorescência Chl <i>a</i> em discos foliares de espinafre calculados através da curva OJIP.	192
FIGURA 83- Bandas transientes da curva de emissão de fluorescência da Chl <i>a</i> (OJIP) para a substância <b>18</b> .	193
FIGURA 84- Gráfico de radar dos efeitos das substâncias <b>12, 18, 06, 09</b> e <b>17</b> nos parâmetros/variáveis da de emissão de fluorescência Chl <i>a</i> calculados através da curva OJIP.	194
FIGURA 85- Gráfico de radar dos efeitos das substâncias <b>11, 10, 06, 07</b> e	195



<b>02</b> nos parâmetros/variáveis da de emissão de fluorescência Chl a calculados através da curva OJIP	
---	--

## **FLUXOGRAMAS**

FLUXOGRAMA 1. Estudo da fração hexano/diclorometano (FHDRF)	142
FLUXOGRAMA 2. Estudo da fração diclorometânica (FDRF)	144
FLUXOGRAMA 3. Estudo da fração metanólica (FMRF)	146
FLUXOGRAMA 4. Estudo da fração hexânica (FHRR)	148

## **LISTA DE EQUAÇÕES**

EQUAÇÃO 1. Equação geral para um fenômeno quântico fluorescente	12
EQUAÇÃO 2. Equação de rendimento quântico para qualquer processo de disposição das moléculas de Chl <i>a</i> .	13
EQUAÇÕES 3, 4 e 5- Equações de rendimento quântico fotoquímico e da Chl <i>a</i> .	14
EQUAÇÃO 6. Reação de oxidação da molécula de água	169
EQUAÇÃO 7. Equação de quantificação de clorofila	201

## **Resumo**

Neste trabalho, foram isolados dezoito metabólitos secundários da *Ruta graveolens* (Rutaceae), sendo onze alcalóides (cinco acridônicos, cinco quinolínicos e um quinolônico,) e sete furanocumarinas. Dessas substâncias, treze tiveram seu potencial herbicida avaliado *in vitro*, semi *in vivo* e *in vivo*. A atividade inibidora da fotossíntese *in vitro* foi determinada por meio da reação de Hill e os compostos ativos foram classificados como inibidores do transporte de elétrons e os mecanismos de ação foram localizados nos fotossistemas (PSI e PSII). Estudos de emissão da fluorescência da clorofila *a* em discos foliares de *S. oreacea* (semi *in vivo*) e em plantas da espécie *Lolium pereni* (*in vivo*) confirmaram os resultados de transporte de elétrons. As variáveis de análise quantitativa da cinética de emissão da fluorescência foram mensurados e avaliados por meio dos fluxos de energia absorvida pelo complexo antena do PSII, de energia utilizada para a redução da  $Q_A$ , de energia utilizada para o transporte de elétrons; e dissipação de energia de fluxo na forma de calor, fluorescência ou transferidos para outras moléculas. Na emissão de fluorescência em disco foliar, a variável  $PI(abs)$  apresentou uma diminuição de 70% em concentração de  $150\mu M$  de 2-nonil-*N*-metil-4-quinolina, que indica um estresse no aparato fotossintético. Avaliando as outras variáveis de emissão de fluorescência, foram observadas reduções de  $PSI_0$ ,  $PHI(E_0)$  e  $ET_0/CS_0$  e  $ET_0/RC$  de 40%, 40%, 60% e 40% em  $150\mu M$  respectivamente, mostrando que em baixas concentrações os efeitos são intensificados para a substância 2-nonil-*N*-metil-4-quinolina. Foram realizados ensaios de biomassa seca utilizando uma estufa a  $65^\circ$ , e a substância 4-metoxi-7*H*-furo[3,2-*g*]cromen-7-ona, bergapteno, inibiu o crescimento da gramínea *L. pereni* em 20 e 23% nas concentrações de 150 e  $300\mu M$ , respectivamente, atuando como herbicida pós-emergente.

## **Abstract**

In this work were isolated eighteen secondary metabolites from *Ruta graveolens* (Rutaceae), eleven alkaloids (five akridonic, five quinolinics and one quinolonic) and seven furanocoumarins. Thirteen compounds had their herbicide potential evaluated *in vitro* and *in vivo*. The inhibitory activity of photosynthesis *in vitro* was determined by Hill reaction and the active compounds were classified as inhibitors of electron transport and the mechanisms of action were located in the photosystems (PSI and PSII). Studies of chlorophyll *a* fluorescence in leaf discs of *S. oreaceae* (semi *in vivo*) and in plants *Lolium pereni* (*in vivo*) confirm the electron transport results. The quantitative analysis parameters of fluorescence's kinetics were measured and evaluated by energy flows absorbed by PSII antenna system, energy used for QA reduction, energy used for electron transport, and energy dissipation of flow as heat, fluorescence or transferred to other photosystems. In fluorescence in leaf disk, the Plabs parameter showed a decrease of 70% at concentration of 150 $\mu$ M, indicating a stress on the photosynthetic apparatus. Evaluating other parameters, were observed reductions in the  $PSI_0$ ,  $PHI(E_0)$  and  $ET_0/CS_0$  and  $ET_0/RC$  of 40%, 40%, 60% and 40% at 150 $\mu$ M respectively, showing that at low concentrations the effect is intensified for the substance 2-nonyl-N-methyl-4-quinoline. Tests were performed by dry biomass, and the substance 4-methoxy-7H-furo [3,2-g] chromene-7-one (bergapten) inhibited the growth of grass *L. pereni* in 20 and 23% at concentrations of 150 and 300 $\mu$ M, acting as post-emergent herbicide. The isolated and evaluated compounds can be used as bioherbicides directly or as prototypes of new herbicides for weed control.

## Sumário

1.0 Introdução	2
1.1 Herbicidas inibidores da fotossíntese	5
1.1.2 Mecanismo do transporte fotossintético de elétrons	8
1.2 Inibidores da fotossíntese através do teste OJIP	11
1.2.1 Parâmetros gerais de medições de emissão fluorescência da clorofila <i>a</i>	22
1.2.2 Variáveis biofísicas de PSII derivadas das equações do test-OJIP - Fluorescência da Clorofila <i>a</i>	24
1.3 Herbicidas inibidores da fotossíntese em estudos pelo grupo de produtos naturais da UFSCar	29
1.4 Família Rutaceae	30
1.4.1 <i>Ruta graveolens</i>	30
2.0 Objetivos	34
3.0 Estudo fitoquímico de <i>Ruta graveolens</i>	36
3.1 Substâncias isoladas	36
3.2 Alcalóides	42
3.2.1 Identificação estrutural das substâncias <b>01-04</b>	43
3.2.2 Determinação estrutural da substância <b>05</b>	66
3.2.3 Identificação estrutural da substância <b>06</b>	74
3.2.4 Identificação estrutural das substâncias <b>07-09</b>	80
3.2.5 Identificação estrutural da substância <b>10</b>	91
3.2.6 Identificação estrutural da mistura de substâncias <b>11(I, II e III)</b>	97
3.3 Cumarinas	106
3.3.1 Identificação estrutural das substâncias <b>12-15</b>	107
3.3.2 Identificação estrutural da substância <b>16</b>	122
3.3.3 Identificação estrutural da substância <b>17</b>	125
3.3.4 Identificação estrutural da substância <b>18</b>	131
4.0 Estudo fitoquímico da espécie <i>Ruta graveolens</i>	138
4.1 Materiais	138
4.1.1 Material cromatográfico	138
4.1.2 Reveladores	139

4.1.3 Solventes utilizados para cromatografia	139
4.1.4 Equipamentos	139
4.2 Material botânico	140
4.2.1 Coleta do material botânico	140
4.2.2 Preparo do extrato vegetal	140
4.3 Isolamento dos constituintes de <i>R. graveolens</i>	142
4.3.1 Estudo químico da fração FHDRF	142
4.3.2 Estudo químico da fração FDRF	144
4.3.3 Estudo químico da fração FMRF	146
4.3.4 Estudo químico da fração FHRR	148
5 Metabólitos de <i>R. graveolens</i> e seus potenciais como inibidores do transporte fotossintético de elétrons	151
5.0 Avaliação das substâncias ensaiadas como inibidores da fotossíntese	153
5.1 Ensaio “ <i>in vitro</i> ” de inibição da fotossíntese	154
5.1.1 Resultados dos ensaios de inibição do transporte de elétrons durante a fase fotoquímica da fotossíntese em cloroplastos isolados das folhas de <i>Spinacia oleracea L.</i>	155
5.1.1.1 Efeitos da substância <b>02</b> (arborinina) no transporte fotossintético de elétrons	155
5.1.1.2 Efeitos da substância <b>06</b> ( <i>N</i> -metil-4-metoxi-2-quinolona) no transporte fotossintético de elétrons	158
5.1.1.3 Efeitos da substância <b>07</b> (dictamina) no transporte fotossintético de elétrons	160
5.1.1.4 Efeitos da substância <b>09</b> (evolitrina) no transporte fotossintético de elétrons	160
5.1.1.5 Efeitos da substância <b>10</b> (graveolina) no transporte fotossintético de elétrons	161
5.1.1.6 Efeitos da substância <b>11</b> (2-undecan- <i>N</i> -metil-4-quinolina) no transporte fotossintético de elétrons	163
5.1.1.7 Efeitos da substância <b>12</b> (bergapteno) no transporte fotossintético de elétrons	164
5.1.1.8 Efeitos da substância <b>17</b> (chalepensina) no transporte	165

fotossintético de elétrons	
5.1.1.9 Efeitos da substância <b>18</b> (chalepina) no transporte fotossintético de elétrons	165
5.1.2 Determinação do fluxo de elétrons nos fotossistemas desacoplados: Localização das substâncias no sítio de interação de PSII ou PSI e suas reações parciais	167
5.1.2.1 Sítio de interação da substância <b>02</b> em PSII e PSI	167
5.1.2.2 Sítio de interação da substância <b>09</b> em PSII e PSI	169
5.1.2.3 Efeitos das substâncias <b>06 e 07</b> em PSII e PSI	171
5.1.2.4 Efeitos das substâncias <b>10, 11, 12, 17 e 18</b> em PSII e PSI	171
5.1.3 Ensaio com o complexo H <sup>+</sup> -ATPase nas membrana tilacóides	172
5.2 Ensaio de medições de fluorescência da clorofila <i>a</i> em semi “ <i>in vivo</i> ”	176
5.2.1 Efeitos das substâncias <b>02, 06 e 17</b> na emissão de fluorescência da Chl <i>a</i> em discos foliares de espinafre	176
5.2.2 Efeitos da substância <b>07</b> na emissão de fluorescência da Chl <i>a</i> em discos foliares de espinafre	178
5.2.3 Efeitos da substância <b>09</b> na emissão de fluorescência da Chl <i>a</i> em discos foliares de espinafre	181
5.2.4 Efeitos da substância <b>10</b> na emissão de fluorescência da Chl <i>a</i> em discos foliares de espinafre	184
5.2.5 Efeitos da substância <b>11</b> na emissão de fluorescência da Chl <i>a</i> em discos foliares de espinafre	186
5.2.6 Efeitos da substância <b>12</b> na emissão de fluorescência da Chl <i>a</i> em discos foliares de espinafre	189
5.2.7 Efeitos da substância <b>18</b> na emissão de fluorescência da Chl <i>a</i> em discos foliares de espinafre	191
5.3 Ensaio “ <i>in vivo</i> ” da emissão de fluorescência da clorofila <i>a</i> e biomassa seca em <i>L. pereni</i> L.	193
5.3.1 Estudos da emissão de fluorescência da clorofila <i>a</i> (Chl <i>a</i> ) em plantas <i>Lolium pereni</i> L.	194
5.3.2 Avaliação de biomassa seca em <i>L. pereni</i>	195
6.1 Ensaio de inibição da fotossíntese “ <i>in vitro</i> ”	201



6.1.1 Fluxo de elétrons durante a fase fotoquímica da fotossíntese em cloroplastos isolados de folhas de <i>Spinacia oleracea L</i>	201
6.1.2.Determinação do fluxo fotossintético de elétrons nos fotossistemas II e I (PSII e PSI) desacoplados	202
6.1.3 Ensaio com o complexo H <sup>+</sup> -ATPase na membrana tilacóide	203
6.2 Ensaio semi “ <i>in vivo</i> ” de medidas da emissão de fluorescência da clorofila <i>a</i>	204
6.2.1 Estudos da fluorescência da clorofila <i>a</i> (Chl <i>a</i> ) em discos foliares de <i>S. oleracea L.</i>	204
6.3 Ensaio “ <i>in vivo</i> ” de medidas da fluorescência da clorofila <i>a</i>	205
6.3.1 Estudos da fluorescência da clorofila <i>a</i> (Chl <i>a</i> ) em folhas de <i>L. pereni</i>	205
6.3.2 Avaliação da biomassa seca em plantas de <i>L. pereni</i>	205
7.0 Considerações finais	206
8.0 Referências bibliográficas	207

# *Introdução*

## **1.0 Introdução**

Uma das atividades mais comuns da humanidade é o cultivo agrícola. Por vários milênios a prática dessa atividade tem sido a fonte de produção de alimentos para o ser humano. Durante a Segunda Guerra Mundial, um composto, ácido 2,4-diclorofenoxiacético, garantiu um aumento de produtividade e redução de horas de trabalho do homem de forma efetiva, eliminando plantas daninhas nos campos de culturas. Estudos posteriores levaram à um conjunto de compostos hoje conhecidos como herbicidas (KUDSK e STREIBIG, 2003). Esses compostos eliminam plantas daninhas, garantindo assim uma alta produtividade da plantação. As vantagens de se utilizar estes produtos são a rapidez de ação, custos reduzidos, efeito residual e não revolvimento do solo. Os problemas decorrentes da utilização de herbicidas vão desde a contaminação ambiental e a saúde humana chegando até o surgimento de plantas resistente a herbicidas. Dessa forma podemos citar a restrição ou inviabilização da utilização desses produtos, como os principais problemas encontrados, chegando até perdas de áreas de plantio, rendimento e qualidade dos produtos das culturas agrícolas, necessidade de reaplicação e mudanças no sistema de produção. Em alguns casos, torna-se indispensável o aumento de doses dos herbicidas, que têm como consequência um aumento no impacto ambiental e na elevação dos custos de produção, com consequente redução da competitividade na comercialização do produto final (KUDSK e STREIBIG, 2003).

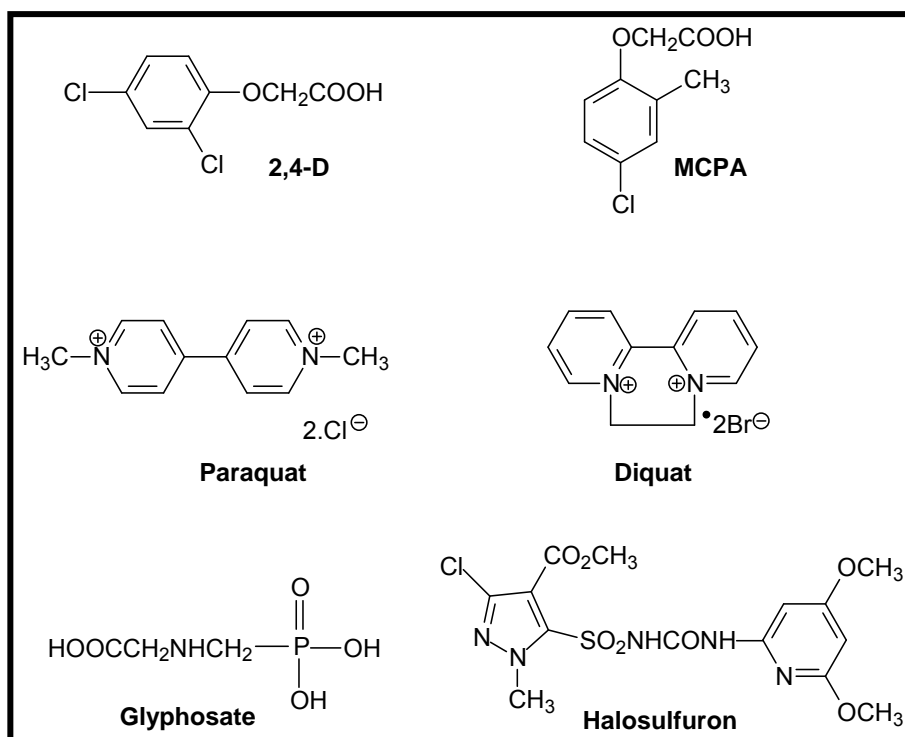
Evolução e pressão de seleção são processos que as espécies vegetais suportam constantemente ao redor do mundo. Sendo assim, muitas plantas, especialmente as daninhas, apresentam uma ampla variabilidade genética, a qual permite sobreviver numa diversidade de condições ambientais. Nos últimos anos, o controle das plantas daninhas tem sido realizado basicamente pelo uso de herbicidas. Dessa forma, tem-se observado nas últimas décadas a seleção de certas populações de plantas daninhas à partir de biótipos resistentes a alguns herbicidas (CHRISTOFFOLETI et al., 2008).

Os herbicidas não seletivos são tóxicos para a maioria das espécies, sendo a toxicidade função da dosagem, método e época de aplicação; e os

herbicidas seletivos são mais tóxicos para algumas espécies do que para outras.

Os herbicidas podem ser agrupados por atividade, uso, modo de ação, grupo químico ou tipo de vegetação controlada. Quanto à atividade, são classificados como de contato ou sistêmico; por uso, podem ser aplicados no solo, pré ou pós-emergente. No geral, a classificação pode ser atribuída de acordo com seu mecanismo de ação, sendo os principais: inibidores enzimáticos (inibidores carboxilase da acetil coenzima-A, da sintase acetolacto, da sintase 3-fosfato) e inibidores da fotossíntese (<http://pt.wikipedia.org/wiki/Herbicida>). Contudo, na fotossíntese eles também podem agir como inibidores de enzimas envolvidas nas diferentes reações do processo fotossintético.

Vários estudos sobre os primeiros compostos levaram aos herbicidas diquat e paraquat para o controle não seletivo de plantas daninhas. O paraquat é o vice-líder mundial em vendas. Contudo, o perfil toxicológico do paraquat requer maiores cuidados e hoje um produto como este provavelmente não seria desenvolvido. Diversos outros grupos de herbicidas com diferentes mecanismos de ação também foram desenvolvidos; o mais proeminente foi um inibidor da enzima glifosato-5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato (EPSP). Este produto é um herbicida não-seletivo e sistêmico, mas, ao contrário do paraquat, seu perfil toxicológico é menos drástico (KUDSK e STREIBIG, 2003). Atualmente, o glifosato é o herbicida mais consumido no mundo. Posteriormente, a descoberta seguinte nesta ciência foram as sulfonilureias, um novo grupo de herbicidas que pode ser usado para combater uma variedade de espécies vegetais daninhas em uma larga escala de culturas. Um exemplo desta classe é o halosulfurona, muito utilizado no Brasil na cultura da *Saccharum officinarum* (cana-de-açúcar) para o controle de *Cyperus rotundus* L.



O excelente clima tropical do Brasil favorece a proliferação de plantas daninhas, o que torna o país um grande consumidor de herbicidas. Em 2001, o consumo de herbicidas no Brasil chegou à U\$ 2,5 bilhões, nos quais pesa a importação, ocupando o terceiro lugar como consumidor mundial de agroquímicos (DELGADO, 2011). No entanto, esse grande consumo em 2010 foi aproximadamente de US\$ 48 bilhões no mundo, e somente no Brasil cerca de US\$ 7,1 bilhões, quase o triplo de capital em nove anos (<http://www.mundosustentavel.com.br/2011/06/control-de-agrotoxicos-no-brasil/>).

Considerando os comentários acima, os próximos 50 anos exigirão alternativas para a substituição dos herbicidas atuais, ou seja, novas tecnologias que não sejam tão agressivas e nocivas ao ambiente e a saúde humana.

## **1.1 Herbicidas inibidores da fotossíntese**

O conhecimento do mecanismo de ação de herbicidas é fundamental na avaliação de sua eficácia na agricultura e na compreensão do seu impacto ambiental.

Há uma gama muito ampla de defensivos agrícolas para o controle de pragas (insetos), doenças e plantas daninhas. Estes produtos, no Brasil, são comercializados com autorização e registro junto ao Ministério da Agricultura sob normas específicas de manipulação e cuidados, as quais controlam o impacto ambiental destes nos agroecossistemas (CRUCIANI et al., 1996).

Os herbicidas inibidores da fotossíntese são amplamente empregados na agricultura brasileira nas culturas de *Zea mays* (milho), *Saccharum officinarum* (cana-de-açúcar), *Glycine max* (soja), fruteiras, hortaliças, entre outras. Esta classe de herbicidas é uma das mais importantes em todo o mundo. Pode-se citar como características principais destes produtos a atuação sobre as espécies alvo quando: a taxa de fixação de CO<sub>2</sub> declina poucas horas após o tratamento; não apresentam problemas de volatilização e apresentam baixa toxicidade para mamíferos (COBB e KIRKWOOD, 2000; <http://www.cnpma.embrapa.br/herbicidas/>).

Todo o processo fotossintético pode ser dividido em três etapas: 1) o processo de absorção e aprisionamento de luz, até os centros de reação dos fotossistemas I e II (PSI e PSII); 2) o transporte de elétrons e prótons entre os cofatores redox através dos complexos protéicos de toda a cadeia fotossintética, permitindo, além disso, uma separação de cargas; 3) catálise redox multieletrônica gerando hidrogênio e oxigênio nos sítios enzimáticos como “clusters” metálicos de hidrogenase com o complexo de evolução de oxigênio (centro de reação silencioso/ OEC) no fotossistema II, FIGURA 1 (ANDREIADIS et al., 2011).

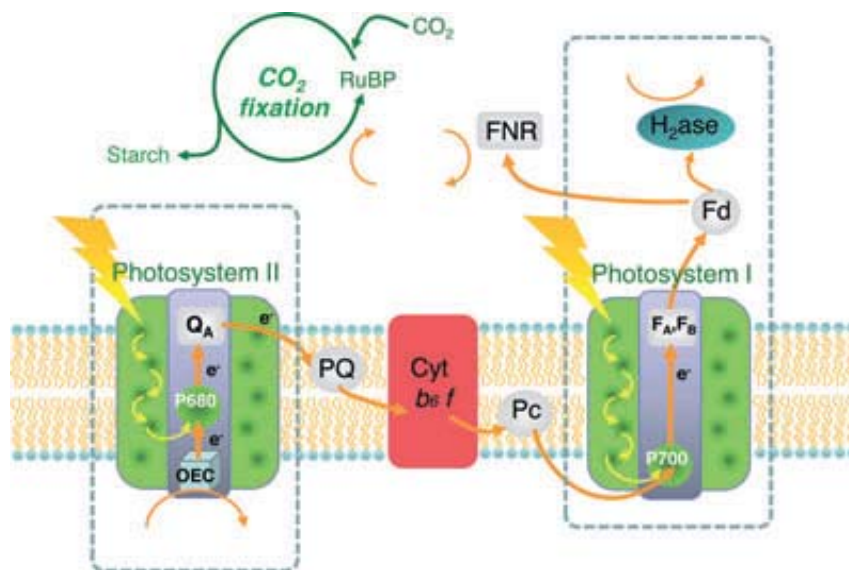


FIGURA 1. Processo fotossintético observado em três etapas (ANDREIADIS et al., 2011).

Os pigmentos, as proteínas e outras substâncias químicas envolvidas na reação da fotossíntese estão localizados nos cloroplastos. Em condições normais, sem a interferência de inibidores fotossintéticos, durante a fase fotoquímica, a energia luminosa capturada pelos pigmentos (clorofila e carotenóides) é transferida para um “centro de reação” especial (P680), gerando um elétron “excitado”. Este elétron é transferido para uma molécula de plastoquinona localizada na membrana tilacóide do cloroplasto ( $Q_A$ ). A molécula de plastoquinona “ $Q_A$ ” transfere o elétron para outra molécula de plastoquinona (PQ), que se reduz a plastoquinol, chegando no citocromo  $b_6f$ , em seguida até a plastocianina (PC) localizadas na mesma proteína (SING et al., 2008). 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 tilacoidal ao complexo citocromo  $b_6f$ , onde dois elétrons são transferidos ao complexo e dois prótons são liberados ao espaço intra-tilacóide. Consequentemente, a transferência de elétrons da molécula de água ao  $b_6f$  está associada com a geração de próton, através da membrana, devido a uma diferença de potencial eletroquímico, resultante da oxidação da água pelo PSII no lado do lumen da membrana tilacóide e a ciclo redução-

oxidação da plastoquinona. A captura de prótons envolvida na redução de  $\text{NADP}^+$  no estroma também contribuirá para a criação de uma diferença de potencial transmembrana que pode ser usada para guiar a síntese de ATP, através do fator acoplamento. A ferredoxina transfere elétrons para o  $\text{NADP}^+$ , e a reação é catalisada pela redutase de ferredoxina- $\text{NADP}^+$  uma flavoproteína solúvel, com um grupo de flavina adenina dinucleotídeo protético (FAD). O FAD oxidado aceita dois elétrons e dois prótons a partir de duas moléculas de ferredoxina reduzida para formar  $\text{FADH}_2$ , e essa enzima transfere um hidreto para  $\text{NADP}^+$  para reduzir a  $\text{NADPH}$ . De maneira simplificada, a função da plastocianina é transferir elétrons do fotossistema II (P680) para o fotossistema I (P700) FIGURA 2.

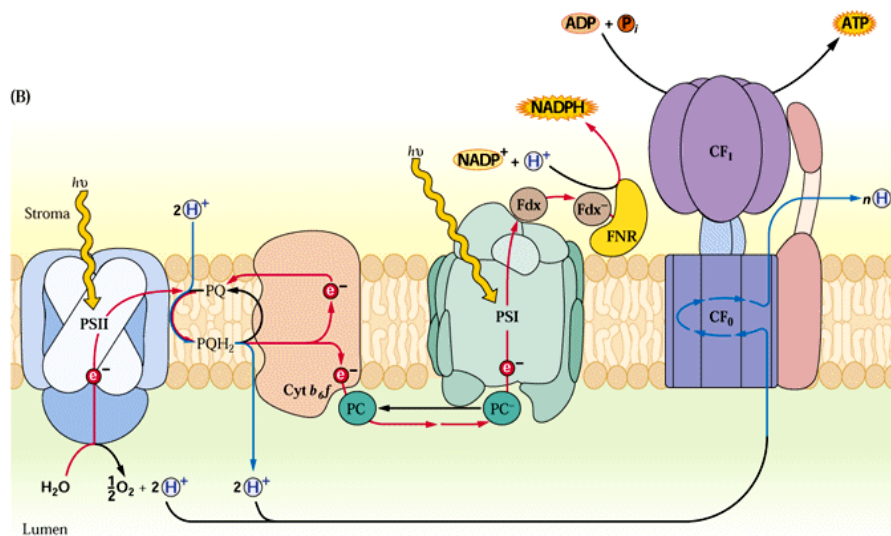


FIGURA 2. Esquema em Z da fotossíntese através dos quatro principais complexos protéicos (TAIZ E ZEIGER, 2009)

A constante busca por novas moléculas herbicidas é necessária para manter o equilíbrio da natureza, o qual há tempos vem sofrendo variações ocasionadas por atividades humanas junto à agricultura contra as plantas daninhas. O conhecimento das reações envolvidas na fotossíntese leva ao desenvolvimento de herbicidas com novo sítios e mecanismos de ação, com baixa toxicidade para seres humanos e ao meio ambiente. Hoje a busca de herbicidas ecologicamente corretos, ou seja, mais seletivos, com faixa de ação

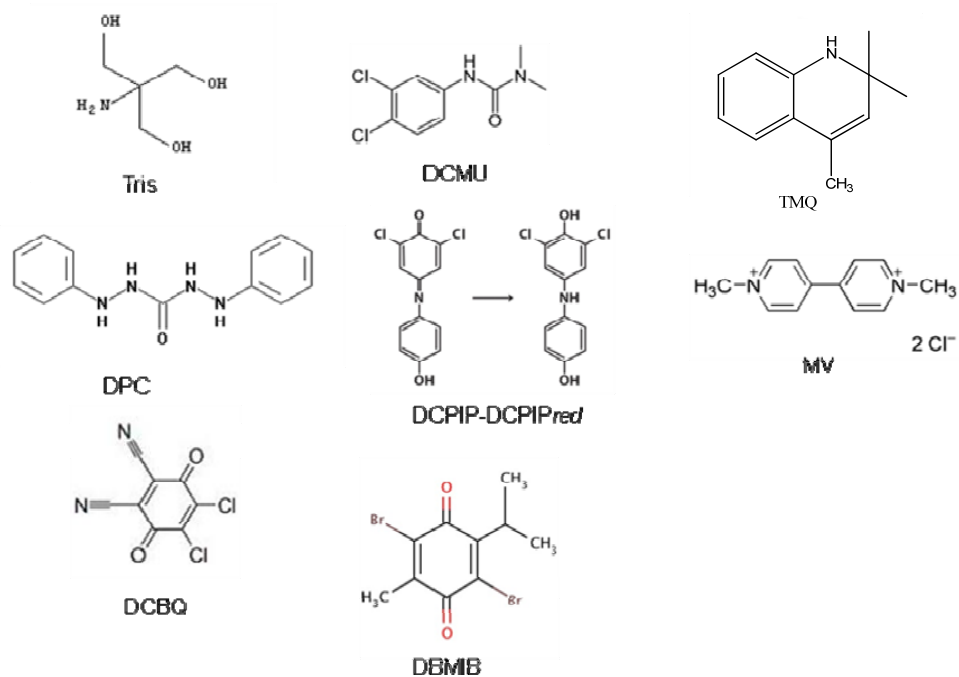


a baixas concentrações, com custos reduzidos, vêm sendo explorados a partir de ensaios de inibição das funções fotossintéticas.

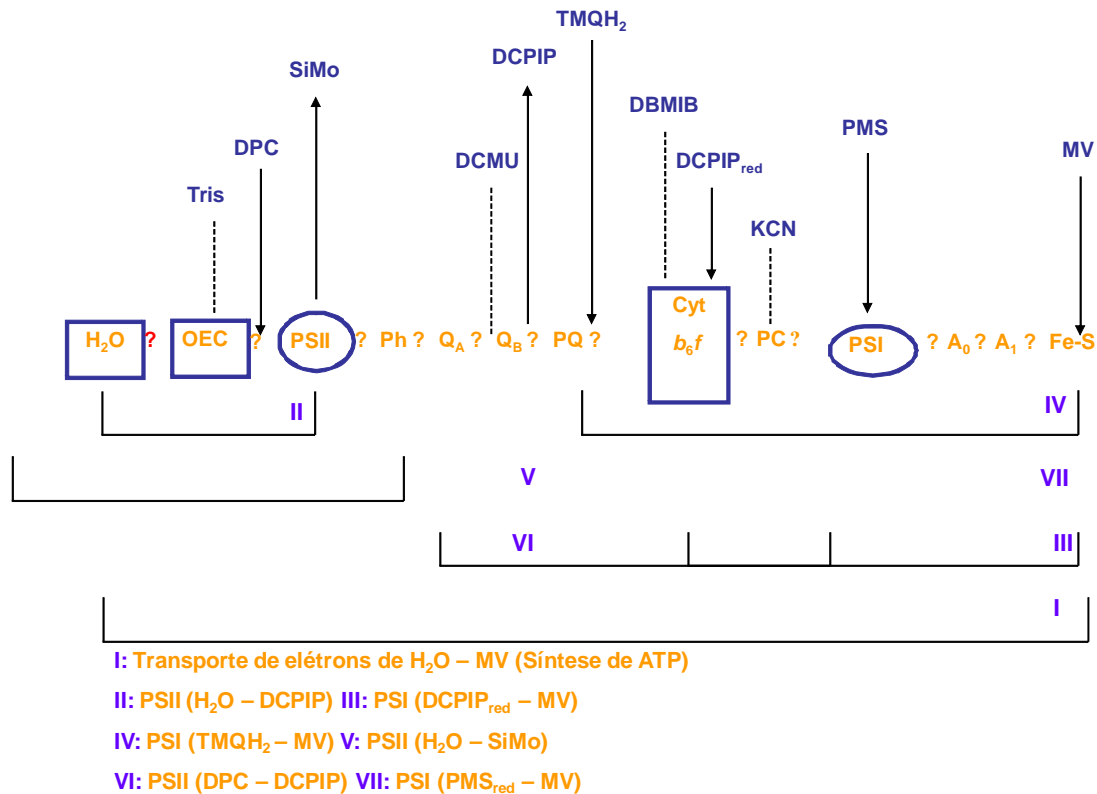
### **1.1.2 Mecanismo do transporte fotossintético de elétrons**

O mecanismo de funcionamento do transporte de elétrons dentro dos fotossistemas I e II só pode ser mensurado com a utilização de alguns reagentes químicos que se comportam como doadores ou aceptores de elétrons artificiais. Para localizar o sítio de ação de um determinado composto dentro do PSII e PSI é necessário medir o processo de transporte parcialmente, pois assim é possível sugerir onde o efeito do composto está atuando.

No PSII utiliza-se o Tris (2-amino-2-hidroximetil-propen-1,3-diol), o DPC (difenilcarbazida), o SiMo (silicomolibdato de sódio), o DCMU [3-(3',4'-diclorofenil)-1,1-dimetilureia], DCPIP (2,6-Diclorofenol indofenol) e DCBQ (2,5-dicloro-*p*-benzoquinona); e no PSI são usados o KCN (cianeto de potássio), o DBMIB (2,5-dibromo-6-isopropil-3-metil-1,4-benzoquinona), o DCPIP<sub>red</sub> (2,6-Diclorofenol indofenol), o TMQ (trimetilbenzoquinina), o MV(metil viologênio-Paraquat) e o PMS (fenilmetasulfato).



Os doadores e aceptores de elétrons artificiais, com eficiência comprovada, funcionam simulando as etapas da cadeia transportadora de elétrons, permitindo que o efeito dos compostos seja avaliado parcialmente. O esquema abaixo mostra a atuação destes doadores e aceptores na cadeia transportadora de elétrons.



Esquema 1- Representação da simulação *in vitro* do processo fotossintético.

O DCMU e o paraquat (MV) são herbicidas comerciais que têm seus mecanismos de ação esclarecidos, e atuam em diferentes partes da cadeia fotossintética: o DCMU atua bloqueando o fluxo de elétrons nos aceptores quinona do fotossistema II, competindo pelo sítio de ligação da plastoquinona que é em geral ocupado pela Q<sub>B</sub>; e paraquat age aceitando elétrons do acceptor primário do fotossistema I, reagindo com o oxigênio para formar superóxidos, O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Ambos funcionam como aceptores de elétrons nos ensaios *in vitro*, sendo o paraquat (MV) o acceptor final nas reações globais de transporte de elétrons basal, fosforilante e desacoplado (TAIZ E ZEIGER, 2009).

Essas reações quantificam, de modo geral, se uma amostra está afetando o transporte de elétrons da H<sub>2</sub>O ao MV, onde no estado basal os cloroplastos encontram-se desenergizados, no fosforilante o transporte ocorre em todo o ciclo até a fosforilação e no desacoplado mede a diminuição do fluxo de elétrons em função da desordem do gradiente de prótons (TAIZ E ZEIGER, 2009).

## **1.2 Inibidores da Fotossíntese através do Teste OJIP**

Existem muitas metodologias para o estudo da fotossíntese. A grande maioria requer o desagregamento do material fotossintético para deixá-lo em seus componentes moleculares básicos, portanto, a maioria dos estudos é *in vitro*. Contudo, existe um grupo de metodologias que nos permite estudar detalhes da fotossíntese sem destruir nenhum tecido fotossintético e está baseado na quantificação da emissão da fluorescência da clorofila *a*. Essas metodologias nos últimos anos têm chegado a uma grande variedade de estudos *in vivo* do aparato fotossintético em diversos sistemas biológicos. Este método é indireto, altamente preciso, econômico, rápido e não é destrutivo. Uma das grandes vantagens é que sua leitura oferece um grande número de informações sobre os sistemas biológicos (HOLUB et al., 2007).

A emissão de fluorescência da clorofila *a* é um fenômeno quântico do próprio aparato fotossintético (GOVINDJEE, 2004). Existem várias formas de se estudar e entender os sinais de fluorescência refletidos por um sistema biológico, no entanto será discutido somente o teste *OJIP*.

Para entender melhor essa metodologia, os conceitos básicos de fluorescência, que é uma técnica de luminescência, serão resumidos a seguir. A propriedade de uma substância em emitir luz está ligada a sua absorção de energia (SKOOG et al, 2004), uma molécula absorve um fóton de alta energia e um elétron sai do seu estado fundamental para um nível de maior energia (estado excitado). Quando esse elétron retorna ao seu estado inicial ele emite luz, e esse fenômeno de emissão é chamado de fluorescência. Existe uma diferença de energia de absorção e emissão, essa diferença de energia se dissipa em forma de calor por vibração das moléculas.

No nível quântico, as moléculas excitadas emitem luz quando os elétrons se encontram em estados energéticos mais elevados, os quais são termodinamicamente instáveis, pois possuem maior energia. A diferença da fluorescência para outro método de luminescência a fosforescência, é que o fenômeno fluorescente dura milésimos de segundos, em outras palavras o

término prático depende do estímulo causado, ou seja, do tempo que se é estimulado até o tempo que o sinal emitido é observado (SKOOG et al, 2004).

Esse fenômeno tem uma alta eficiência para que se chegue ao processo fluorescente, o qual é denominado de rendimento quântico. Rendimento quântico é a proporção de fótons emitidos sobre o número de fótons absorvidos (Equação 1). O máximo do rendimento quântico da fluorescência é esperado quando 100% de cada fóton absorvido é emitido.

$$\phi = \frac{\#hv_{emitidos}}{\#hv_{absorvidos}} \quad \begin{array}{l} hv = \text{fótons.} \\ \Phi = \text{rendimiento quântico} \end{array}$$

EQUAÇÃO 1. Equação geral para um fenômeno quântico fluorescente.

Com base em toda a teoria da fluorescência, é explicado o princípio básico de como se lê e interpreta os dados de emissão de fluorescência da clorofila a (Chl a).

A clorofila a é um pigmento verde azulada encontrado em plantas e cianobactérias, e representa o principal elemento da fotossíntese aeróbica (GOVINDJEE, 2004). A fotossíntese é um processo que converte energia luminosa em energia química. A clorofila é o cromóforo principal de sistemas de proteínas e pigmentos, e se encarrega de absorver fótons, em uma distribuição regulada de energia de excitação, e sua principal conversão é um processo redox e um gradiente de prótons (VEIGA et al., 2007a; VEIGA et al, 2007b). Quando esse processo ocorre tem-se uma alta eficiência quântica e uma pequena fração de fótons absorvida é reemitida na forma de fluorescência vermelha (FIGURA 3). Essa fração varia de acordo com o estado metabólico e fornece a base para a medida da fluorescência da fotossíntese (GOVINDJEE, 2004).

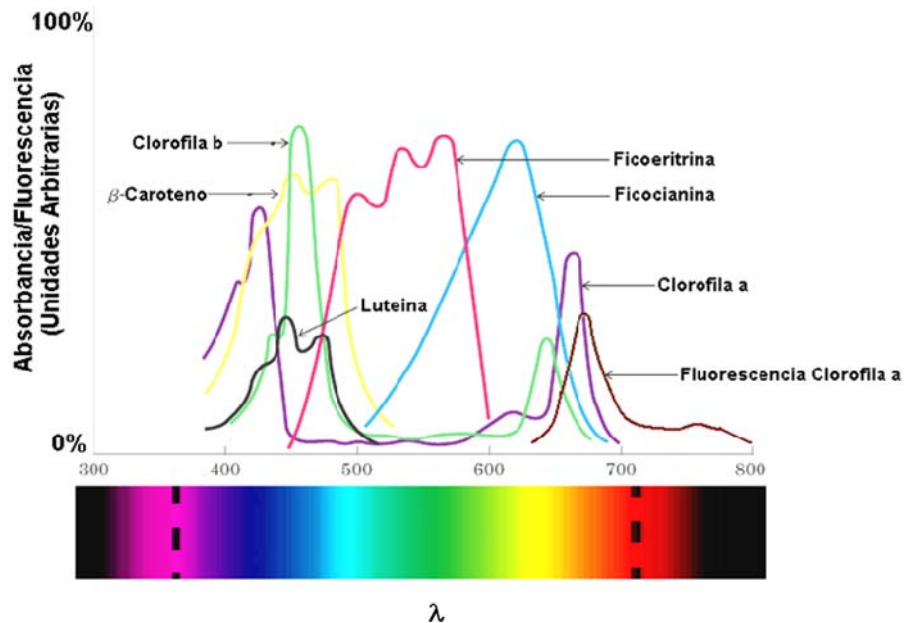


FIGURA 3. Espectro da emissão da fluorescência da Chl *a* e de alguns outros pigmentos.

A razão pela qual é utilizada a fluorescência da Chl *a* e não de outros pigmentos é que a clorofila *a* exerce um papel fundamental na fotossíntese oxigenada. Na realidade, o centro reativo é uma molécula de clorofila modificada (HOLUB et al., 2007). Alguns autores sugerem que esta propriedade da clorofila oferece vantagens para evitar danos e excesso de energia no aparato fotossintético (GOVINDJEE, 2004).

A absorção de luz pelas moléculas de clorofila do complexo antena de PSII transfere energia para o par de clorofilas especial que excita a molécula até o seu estado singleto *Chl\**, que decai até o seu estado basal de várias maneiras (GOVINDJEE, 2004). O rendimento quântico do processo de variação entre a intensidade de radiação incidente ( $I_0$ ) e a transmitida ( $I$ ) denominado “ $\phi$ ” está associado a um constante rendimento e com vários estados de excitação: (F) fluorescência, (P) fotoquímica, e outros (O) como calor (Equação 2).

$$\phi_i = \frac{k_i}{k_F + k_P + k_O}$$

EQUAÇÃO 2. Equação de rendimento quântico para qualquer processo de disposição das moléculas de Chl *a*.

Esta reação é de primeira ordem e representa o número de transições e eventos por segundo. Cada um destes rendimentos quânticos pode ser calculado para cada processo fotossintético e determinar o real rendimento quântico fotoquímico (equação 3), o rendimento quântico da fluorescência da Chl *a* (equação 4), e o rendimento quântico da máxima fluorescência da Chl *a* (equação 5), ou seja quando a fotoquímica está no nível mínimo (próximo a zero), que geralmente ocorre quando a saturação é alcançada pela excitação da luz ou na presença do DCMU como um composto que bloqueia o fluxo entre as plastoquinonas de PSII.

$$\phi_P = \frac{k_F}{k_F + k_P + k_O} \quad \phi_{F_0} = \frac{k_F}{k_F + k_P + k_O} \quad \phi_{F_M} = \frac{k_f}{k_F + k_O}$$

EQUAÇÃO 3                                      EQUAÇÃO 4                                      EQUAÇÃO 5  
*(quando  $k_P \rightarrow 0$ )*

EQUAÇÕES 3, 4 e 5- Equações de rendimento quântico fotoquímico e da Chl *a*.

Essas são algumas das equações de rendimento quântico que mostram como é possível observar o comportamento da fotossíntese por meio da fluorescência da Chl *a*. A teoria da fluorescência da clorofila *a* está baseada nos princípios básicos da mecânica quântica. Em outras palavras, é baseado na medição de toda energia que não processa a maquinaria fotossintética. A emissão de fluorescência da clorofila corresponde a uma pequena dissipação da energia do aparelho fotossintético e é amplamente aceito como informação para a compreensão e funcionalização de toda a estrutura (GOVINDJEE, 2004; OUKARROM e STRASSER, 2004).

O teste *OJIP* consiste na análise dos transientes da fluorescência da clorofila *a* traduzindo as informações que se encontram nos parâmetros biofísicos que quantificam o comportamento de PSII e PSI (STRASSER et al. 1995, TSIMILLI-MICHAEL et al., 2000; OUKARROM e STRASSER, 2004; SCHANSKER e STRASSER, 2005, TSIMILLI-MICHAEL e STRASSER, 2008). Desta maneira o teste *OJIP* fornece informações do comportamento do aparato fotossintético,

estrutura, conformação e funcionalização em qualquer estado fisiológico (STRASSER et al, 2004).

A prova está baseada em três suposições básicas: a) no estado dos centros reativos (RCs) de PSII que estão unicamente definidos pelo processo redox do acceptor primário de PSII a plastoquinona A ( $Q_A$ ); b) quando a  $Q_A$  é reduzida em um RC, o mesmo se encontra fechado e a fluorescência da Chl *a* é alta, enquanto  $Q_A$  está no estado oxidado o RC está aberto e o sinal da fluorescência da antena é atenuado; c) à temperatura ambiente a presença da clorofila *a* em plantas, algas e cianobactérias se encontra na região de 680 e 740nm e é estimulada principalmente pelo PSII (STRASSER et al., 2004).

Contudo, existem várias formas de induzir o sinal fluorescente, portanto, cada método possui uma cinética diferente. Isso depende de cada fluorímetro que se utiliza, pois cada um tem seu método próprio de captura e indução. Existem dois tipos de fluorímetro para estes estudos: um captura os sinais de indução da fluorescência de maneira contínua e o outro por excitação modulada, mas ambos medem o sinal emitido pela fluorescência do aparato fotossintético, e as informações obtidas não podem ser contraditórias (STRASSER et al., 2004).

O teste *OJIP*, requer que a excitação seja contínua e que a resolução temporal seja alta (STRASSER et al., 1995). A mais de 40 anos Strasser e colaboradores desenvolveram um conjunto de teorias entre a biofísica do aparato fotossintético e o sinal fluorescente, que levaram as formulações analíticas baseadas na teoria energética de fluxo na biomembrana e no conceito básico de que o rendimento quântico da fluorescência de PSII é determinado pelos centros de reações aberto/fechado (STRASSER, 1978).

A curva polifásica de indução contínua da fluorescência foi descrita pela primeira vez em 1931 por Kautsky e Hirsch em que foram observados três pontos: O (ponto inicial da fluorescência), P (ponto máximo do sinal) e S (o estado em que o sinal decai) (FIGURA 4). Delimitam a ocorrência dos três passos em duas fases: a fase O-P com duração menor que 1 segundo, à subsequente fase P-S, a qual descreve o declínio do sinal, ocorre em uma escala de tempo maior (segundos a minutos) com vários estágios intermediários (STRASSER et al., 2004).



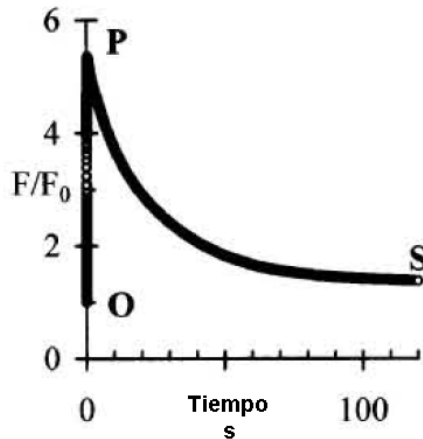


FIGURA 4: Curva de indução da fluorescência da clorofila a de Kautsky. Modificado a partir de STRASSER et al ( 2004).

Posteriormente, foi detectado que existiam mais fases dentro do transiente O-P. Com o aumento das resoluções temporais capturadas pelos instrumentos, foram encontrados outras duas bandas entre o transiente O-P: uma em 2ms e outra em 30ms, as quais foram denominadas bandas J e I, respectivamente. Assim a curva polifásica transiente da fluorescência da clorofila a ficou denominada como *O-J-I-P* (STRASSER e GOVINDJEE, 1992).

Em 1995, Strasser et al., avançaram as pesquisas e desenvolveram uma análise quantitativa da cinética dos transientes OJIP induzida por uma luz actínica vermelha com pico em 650 nm correspondente ao teste *JIP*. Com base nas informações armazenadas em cada ponto dos transientes *OJIP*, é possível determinar a informação estrutural e funcional que mede o desempenho do aparato fotossintético, o que acrescentou a partir de novas informações, outros pontos na curva polifásica *K, L, F* e *G* presentes em alguns estados fisiológicos (os dois últimos apenas em corais e foraminíferos) (STRASSER et al, 1995).

É possível associar cada fase da curva polifásica com os principais processos de fluxo de energia que ocorrem durante a fotossíntese (FIGURA 5). O primeiro transiente *O-J* contém informação relacionada com o processo de absorção (captura de fótons) e aprisionamento dessa energia (trapeamento de elétrons na forma excitada), o segundo transiente *J-I* descreve o processo de transporte de elétrons, e por último o transiente *I-P* oferece informações sobre os eventos que ocorrem na redução dos receptores finais de PSII, os quais

estão relacionados com o funcionamento inicial de PSI (STRASSER et al, 2004; SCHANSKER e STRASSER, 2005; TSIMILLI-MICHAEL e STRASSER, 2008)

A FIGURA 5 mostra a curva *OJIP* em escala logarítmica onde as diferentes cores relacionam as fases com os principais processos fotossintéticos: o parâmetro ABS (absorção de fótons), TR (aprisionamento da energia), ET (transporte de elétrons) e RE (redução dos aceptores finais de PSII). De modo geral, o ponto O é atribuído ao tempo de 50 $\mu$ s, o L em 150 $\mu$ s, o K em 300 $\mu$ s, o J em 2ms, o I em 30ms, e o P é variável e depende da análise. O ponto S é o período de decaimento total da energia, podendo levar vários minutos.

Em outras metodologias de medição da fluorescência, o sinal de PSI somente é diferenciável a baixas temperaturas, e os métodos de excitação modulada a temperatura ambiente descreve o sinal de PSII (STRASSER et al, 2004).

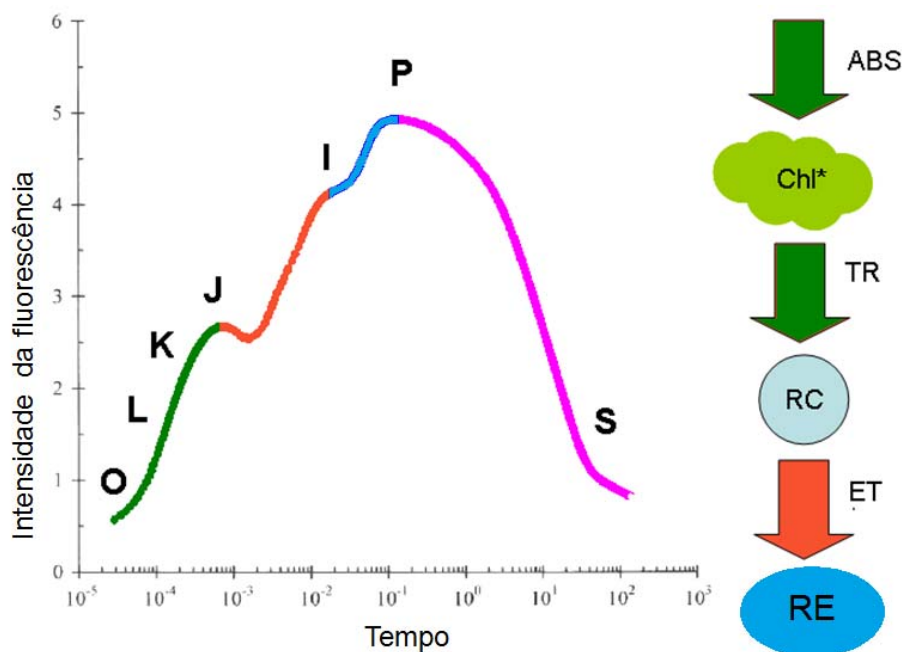


FIGURA 5. Curva *OJIP* de indução da fluorescência da clorofila *a* (adaptada STRASSER et al, 2004).

Outra forma de avaliar a curva polifásica é associando os seus eventos diretamente com o processo redox da fotossíntese. A FIGURA 6 mostra que cada um desses processos é denominado “quenching” e está ocorrendo em

função do estado de oxidação de  $Q_A$ . Cada vez que o pool de  $Q_A$  se reduz a banda aumenta, e cada vez que se oxida a banda diminui e se forma um transiente da curva *O-J-I-P*. O valor de *P* indica quando todo o sistema está saturado e chegando ao “máximo”. Neste ponto,  $Q_A$  está parcialmente oxidada e a transferência de elétrons para o PSI, via complexo citocromo  $b_6f$  e plastoquinona, ocorre. A cinética da fluorescência após o pico *P* é complexa e está relacionada com a fase bioquímica da fotossíntese (fixação de  $CO_2$ ).

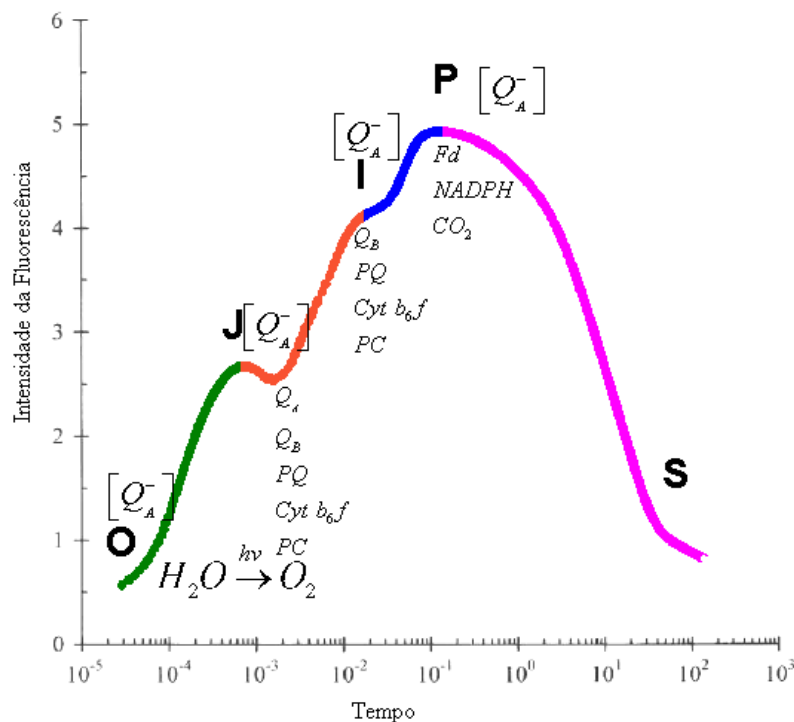


FIGURA 6- Relação dos processos fotossintéticos com a curva de indução da fluorescência da clorofila a (*OJIP*) (adaptada STRASSER et al, 2004).

Os dados de fluorescência podem oferecer informações de outros parâmetros, também envolvidos na avaliação da eficiência do aparato fotossintético. Todas as variáveis avaliadas são cálculos quânticos baseados nos quatro acontecimentos principais da fotossíntese (*ABS*, *TR*, *ET* e *RE*). A FIGURA 7, apresenta os parâmetros mais importantes para essa avaliação de desempenho fotossintético de PSII, que explica os danos em plantas por meio de cálculos com base na seção transversal da amostra (CS), nos centros de reação ativos (RC), no índice de desempenho, e nos rendimentos quânticos.

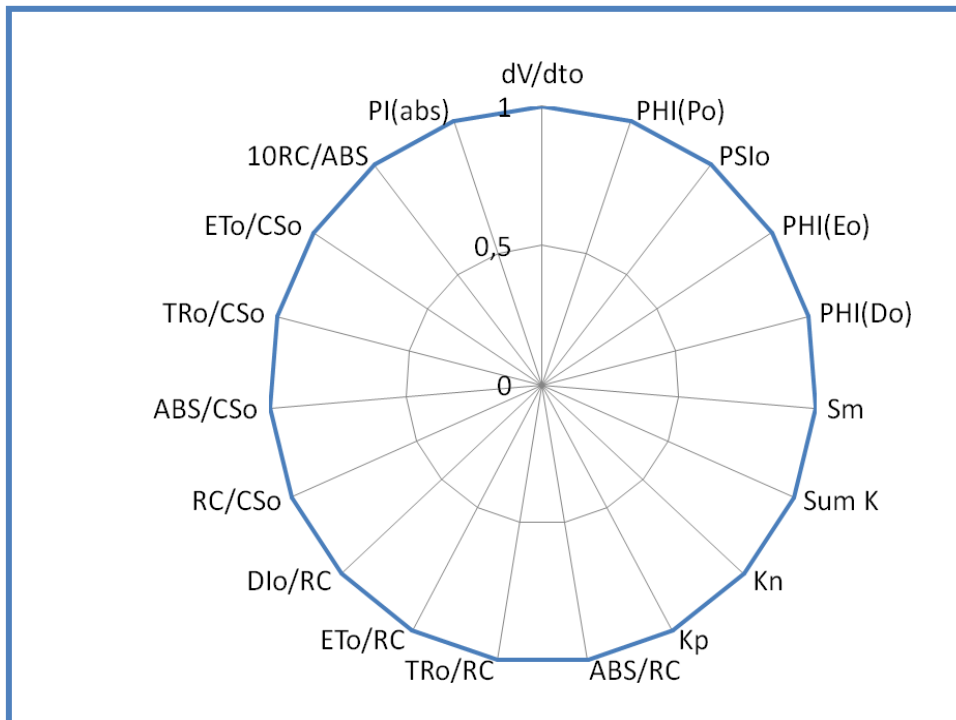


FIGURA 7. Gráfico de radar com as variáveis e parâmetros de emissão da fluorescência para avaliação da eficiência do aparato fotossintético em plantas (TSIMILLI-MICHAEL e STRASSER, 2008).

As diferentes variáveis fotossintéticas associadas ao PS II de acordo com a obtenção da curva transiente O-J-I-P, são vistas utilizando um programa o *BioLyzer*, que realiza todos os cálculos quânticos da análise quantitativa da cinética de indução da fluorescência e informa, por meio de um gráfico de radar, o efeito causado em cada parâmetro analisado. Os parâmetros da FIGURA 7 foram calculados por meio deste software e significam:

*dV/dt<sub>0</sub>*=mudança da fluorescência variável relativa em função do tempo

*PHI(P<sub>0</sub>)*=rendimento quântico máximo da fotoquímica primária

*PSI<sub>0</sub>*=probabilidade, t=0, de um excitón aprisionado mover um elétron pela cadeia transportadora de elétrons após a Q<sub>A</sub><sup>-</sup>

*PHI(E<sub>0</sub>)*=rendimento quântico do transporte de elétrons

*PHI(D<sub>0</sub>)*=rendimento quântico (t=0) da energia de dissipação

*Sm*=área normalizada

$$SunK = kp + kn$$

$Kn$  = constante "de-excitação" não fotoquímica

$Kp$  = constante "de-excitação" fotoquímica

$ABS/RC$  = tamanho médio do sistema antena de captura de energia

$TR_0/RC$  = fluxo de energia capturada por centro de reação

$ET_0/RC$  = transporte de elétrons por centro de reação

$RC/CS_0$  = densidades de centros de reação por seção transversal

$ABS/CS_0$  = número de fótons absorvidos por seção transversal

$TR_0/CS_0$  = taxa máxima de energia bloqueada por seção transversal

$ET_0/CS_0$  = transporte de elétrons por seção transversal

$10RC/ABS$  = número de centros de reação ativos

$PI(abs)$  = índice de desempenho

$DI0/RC$  = dissipação de energia não fotoquímica por centro de reação

As curvas transientes OJIP, bem como todas essas variáveis mudam com o comportamento do aparato fotossintético de PSII de acordo com muitas condições ambientais, tais como intensidade de luz, temperatura, seca ou influências químicas (KRUGER et al, 1997; CLARK et al, 2000). Para garantir que o efeito seja apenas químico é necessário um ambiente ótimo para as plantas, onde as mesmas não sofram nenhum tipo de estresse.

A fluorescência da Chl a pode ser considerada como uma investigação intrínseca do sistema de fotossíntese e da intensidade da fluorescência como medida direta das atividades de PSII. A partir de dados armazenados, durante o primeiro segundo de aquisição do experimento, os valores seguintes são selecionados para serem utilizados pelo test-OJIP (STRASSER et al, 1995) para o cálculo das várias expressões fenomenológicas e biofísicas, que conduz a descrição dinâmica de uma amostra da fotossíntese em um dado estado fisiológico. Este comportamento é quantificado por meio desses vários parâmetros funcionais e estruturais que são derivados da fluorescência transientes, sendo analisados de acordo com a teoria de fluxo de energia em biomembranas (KRUGER et al, 1997). Os parâmetros funcionais calculados por este teste, chamado de JIP-test são as específicas (centro de reação-RC) e fenomenológica (seção transversal-CS), acúmulo de energia absorvida (TR) e

conversão de energia de excitação para a cadeia transportadora de elétrons (ET) (STRASSER et al, 1995).

As proporções de fluxo ou o rendimento (o rendimento quântico máximo da fotoquímica primária,  $\phi_{P_0}$  ( $PHI(P_0)$ ), a eficiência com que um éxciton preso pode mover um elétron dentro da cadeia transportadora de eletrons,  $\Psi_0$  ( $PSI_0$ ), ou a probabilidade de um fóton absorvido mover um elétron além da cadeia transportadora,  $\phi_{E0}$ ( $PSI_0$ ), bem como uma expressão para a concentração dos centros de reação (RC/CS), são os parâmetros estruturais fornecidos por este teste. A taxa das constantes “de-excitação” fotoquímica ( $K_p$ ) e não-fotoquímica ( $K_n$ ), também são calculadas baseado na teoria de fluxos em biomembranas (KRUGER et al, 1997).

A fluorescência da clorofila a é uma medida da eficiência fotossintética e fornece informações importantes sobre a relação estrutural e funcional dos centros de reação de PSII. Essa técnica é utilizada, para avaliação de estresse em plantas ou danos causados ao aparato fotossintético, tornando uma ferramenta importante para estudos de monitoramento, sendo assim, muito utilizada em pesquisas agrônômicas, florestais, marinhas, eco toxicológicas, dentre outras (GONÇALVES et al, 2010; OLIVEIR et al, 2009).

Esse tipo de análise permite que os ensaios sejam realizados *in vivo* sem causar nenhum dano a planta. O parâmetro  $PI_{(ABS)}$ , é considerado um dos mais sensíveis para detecção e quantificação de estresse em plantas, mostrando informações sobre a absorção, aprisionamento, e liberação desses fótons energizados dentro de PSII e correlacionando essa variação da fluorescência com algum dano causado no processo de fotossíntese, consequentemente um estresse causado na planta.

Com o auxílio de novas técnicas, bem como a necessidade de se encontrar alternativas para a substituição dos herbicidas comercializados, o trabalho proposto é de essencial importância para a população e para o meio ambiente. Hoje a busca de herbicidas ecologicamente corretos, ou seja, mais seletivos, vêm sendo explorada com ensaios de inibição das funções fotossintéticas.

### **1.2.1 Parâmetros gerais de medições de emissão fluorescência da clorofila a**

A análise da fluorescência da clorofila *a* é largamente utilizada para avaliação da capacidade fotossintética alterada por estresses bióticos ou abióticos. Uma das vantagens do uso deste método é o fato da medição não ser destrutiva, sendo possível realizar tanto em laboratório quanto em campo. Vários estudos avaliaram a relação da fluorescência das clorofilas com a fotossíntese e o estado fisiológico das plantas (LICHTENTHALER, 1992; FRANKART et al, 2003; YUSUF et al, 2010).

Existem dois procedimentos para estudar a fluorescência da clorofila *a*, pulso modulado (que permite a quantificação dos coeficientes de extinção) e a cinética da emissão da fluorescência transiente (ou curva OJIP). Nas avaliações com pulso modulado são utilizados fluorômetros de luz modulada (SCHREIBER et al, 1996), cujas aplicações variam desde a rápida identificação de injúrias causadas ao aparelho fotossintético, até a análise detalhada da alteração da capacidade fotossintética da planta.

A avaliação da cinética de emissão da fluorescência transiente ou polifásica envolve equipamentos com maior resolução na detecção da intensidade da fluorescência. Com estes equipamentos pode-se identificar que a variação entre a fluorescência inicial e máxima não é linear, mas sim polifásica (LÁZAR, 2006). Com a elucidação do comportamento polifásico do aumento da fluorescência, Strasser e colaboradores em 1995, propuseram analisá-los por meio de uma série de parâmetros matemáticos denominado de teste JIP (STRASSER et al, 1995). O uso correto dos parâmetros matemáticos propostos pelo teste JIP permite quantificar o fluxo de energia absorvido e aproveitado no sistema fotossintético, podendo também avaliar o desempenho fotossintético de plantas (TSIMILLI-MICHAEL E STRASSER, 2008).

As medidas de fluorescência da clorofila *a* (Chl *a*), em geral, são realizadas utilizando-se um fluorômetro *Handy Pea*, e o rendimento da fluorescência máxima para as amostras é feito com 3 diodos com emissão vermelha em 650nm, com pulso de 2s. A emissão de fluorescência é induzida em uma área de 4 mm de diâmetro em discos de folhas (semi *in vivo*) ou em

folhas (*in vivo*), pela exposição da amostra a um pulso de luz saturante numa intensidade de  $3.000\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

As intensidades de fluorescência são determinadas a 50, 150, 300 $\mu\text{s}$ , 2ms ( $F_J$ ) e 30ms ( $F_I$ ) e  $F_M$  (fluorescência máxima). A partir das intensidades de fluorescência são calculados os parâmetros estabelecidos pelo Teste JIP (STRASSER et al, 1995), sendo que a cuidadosa interpretação das variáveis medidas e calculadas, a partir deste teste, fornece numerosas informações dos fluxos de energia através de PSII em diferentes níveis (STRASSER et al, 2004).

Para que o nível  $F_0$  de fluorescência inicial seja medido, é necessário que todo o acceptor primário de PSII ( $Q_A$ ) esteja oxidado, e isso só ocorre na ausência de luz. Assim, diz-se que quando uma planta se encontra no escuro toda a  $Q_A$  está oxidada e os centros de reação estão abertos, e o contrário ocorre no claro, a  $Q_A$  está reduzida e os centros de reação estão fechados.

A curva transiente OJIP mede exatamente a passagem da  $Q_A^+$  para a  $Q_A^-$ , ou seja, o processo de redução das quinonas. A fluorescência máxima ( $F_m$ ) é medida exatamente quando toda a  $Q_A$  encontra-se reduzida nos centros de reação. Este parâmetro  $F_m$  só pode ser denominado como fluorescência máxima se a intensidade da luz fornecida pelo fluorômetro de clorofila for totalmente saturado e contínuo para a planta e o acceptor de elétrons  $Q_A$  for totalmente reduzido (STRASSER et al, 1995).

Outro parâmetro adquirido nas medidas por meio do fluorômetro é a fluorescência variável ( $F_v$ ), que indica a variação da fluorescência e se relaciona com a capacidade máxima fotoquímica, e é calculada subtraindo-se o valor de  $F_0$  do de  $F_m$ . A eficiência quântica de PSII ( $F_v / F_m$ ), é um parâmetro amplamente utilizado para indicar a eficácia de PS II, o  $T_{fm}$  é um parâmetro usado para indicar o momento em que o valor máximo de fluorescência ( $F_m$ ) foi alcançado e a área que é a parte acima da curva de fluorescência entre  $F_0$  e o  $F_m$ , é proporcional ao tamanho do pool de  $Q_A$  no lado acceptor de PS II. Quando a transferência de elétrons dos centros de reação para o pool de quinonas é bloqueada, como o herbicida DCMU, esta área será drasticamente reduzida (Figura 8).



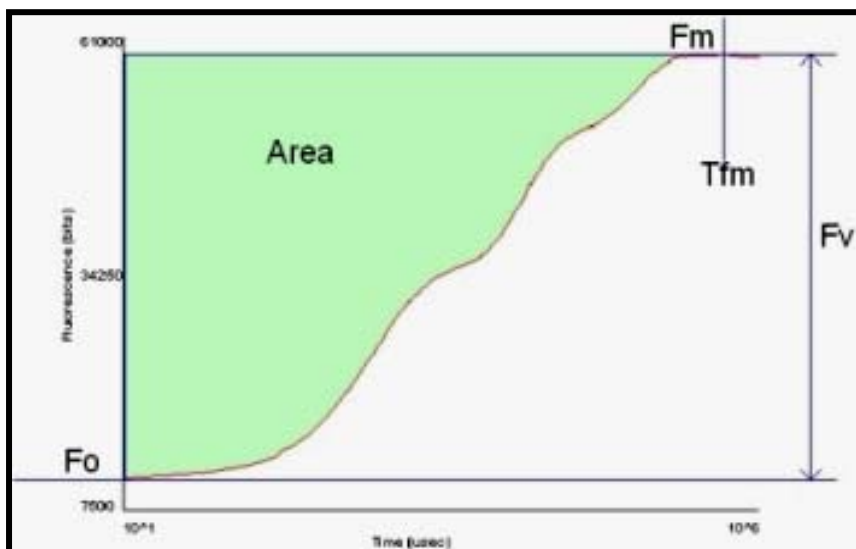


FIGURA 8- Medidas das variáveis gerais de emissão da fluorescência da clorofila a.

Para os cálculos dos parâmetros biofísicos de PSII, são utilizados os parâmetros básicos de fluorescência e com isso as equações da curva polifásica transiente OJIP podem ser adquiridas quantitativamente.

### **1.2.2 Variáveis biofísicas de PSII derivadas das equações do test-OJIP - Fluorescência da Clorofila a**

A fluorescência transiente é analisada de acordo com as equações do test-OJIP. Cada transiente é analisado e os parâmetros biofísicos de PSII são calculados para cada caso. Um esquema sucinto do test-OJIP (Figura 9) apresenta o fluxo de energia e sua bifurcação bem como a eficiência/rendimento que são definidas como razões dos fluxos de energia.

Os fluxos de energia são: absorção (ABS), aprisionamento ( $TR_0$ ) [p.e.: redução da Pheo (feofitina) e  $Q_A$  (quinona aceptora primária de elétrons)], transporte de elétrons (ET) a partir da  $Q_A^-$  para sistemas aceptores de elétrons:  $Q_B$  (quinona aceptora secundária de elétrons), PQ (plastoquinona), Cyt (citocromo  $b_6/f$ ) e PC (plastocianina), redução ( $RE_0$ ) dos aceptores finais de

elétrons de PSI: NADP (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) e Fd (ferredoxina).

A eficiência/rendimento são medidas por: eficiência quântica máxima de PSII ( $TR_0/ABS = \phi_{P_0} = 1 - F_0/F_M$ ); a eficiência ( $ET_0/TR_0 = \Psi_{E_0} = 1 - V_j$ ) com que o éxciton aprisionado pode mover um elétron na cadeia transportadora para além do sítio da  $Q_A^-$ , probabilidade de um fóton absorvido mover um elétron após  $Q_A$  ( $ET_0/ABS = \phi_{E_0} = \phi_{P_0} \cdot \Psi_{E_0}$ ); a eficiência com que um elétron pode se mover a partir de receptores de elétrons reduzidos para os aceptores finais do PSI ( $RE_0/ET_0 = \delta_{R_0} = (1 - V_i)/(1 - V_j)$ ).

As eficiências e fluxos de energia referem-se às condições iniciais (todos os RC abertos subscrito “0”) da amostra fotossintética em um definido estado fisiológico (p.e.: adaptado ao escuro). As derivações dos fluxos específicos (fluxo por RC; que inicia a condição) dos rendimentos quânticos (eficiência na base da absorção, caso contrário fluxo por ABS) também são descritas.

A Figura 9 também descreve que as eficiências estão ligadas com sinais de fluorescência selecionados a partir de seus transientes OJIP que são:  $F_0$  (fluorescência inicial; 20 ou 50 $\mu$ s),  $F_k$  (270 ou 300 $\mu$ s),  $F_j$ (2ms),  $F_i$ (30ms),  $F_M$ (fluorescência máxima) (TSIMILLI-MICHAEL E STRASSER, 2008; CLARK et al, 2000).

Além das eficiências e dos fluxos específicos, o test-OJIP também calcula fotossinteticamente o índice de desempenho ( $PI_{ABS}$ ), que é uma medida da combinação de três performances parciais, relacionadas com os centros de reações fotossintéticos e (RC/ABS), o fluxo de energia máximo que chega ao centro de reação de PSII ( $TR_0$ ) e o transporte de elétrons no início da iluminação ( $ET_0$ ):

$$PI_{ABS} = \frac{RC}{ABS} \times \frac{\phi_{P_0}}{1 - \phi_{P_0}} \times \frac{\psi_{E_0}}{1 - \psi_{E_0}} = \frac{RC}{ABS} \times \frac{TR_0}{ABS - TR_0} \times \frac{ET_0}{TR_0 - ET_0} =$$

$$= \frac{1 - (F_0/F_M)}{4(F_{300\mu s} - F_0)/(F_j - F_0)} \times \frac{(F_M - F_0)}{F_0} \times \frac{(F_M - F_j)}{(F_j - F_0)}$$

Este parâmetro tem sido o mais relevante para detecção e quantificação de estresse em plantas, pois oferece informações sobre a absorção de energia, o aprisionamento da mesma e o transporte de elétrons nos centros de reação. Este parâmetro biofísico é exclusivo de PSII.

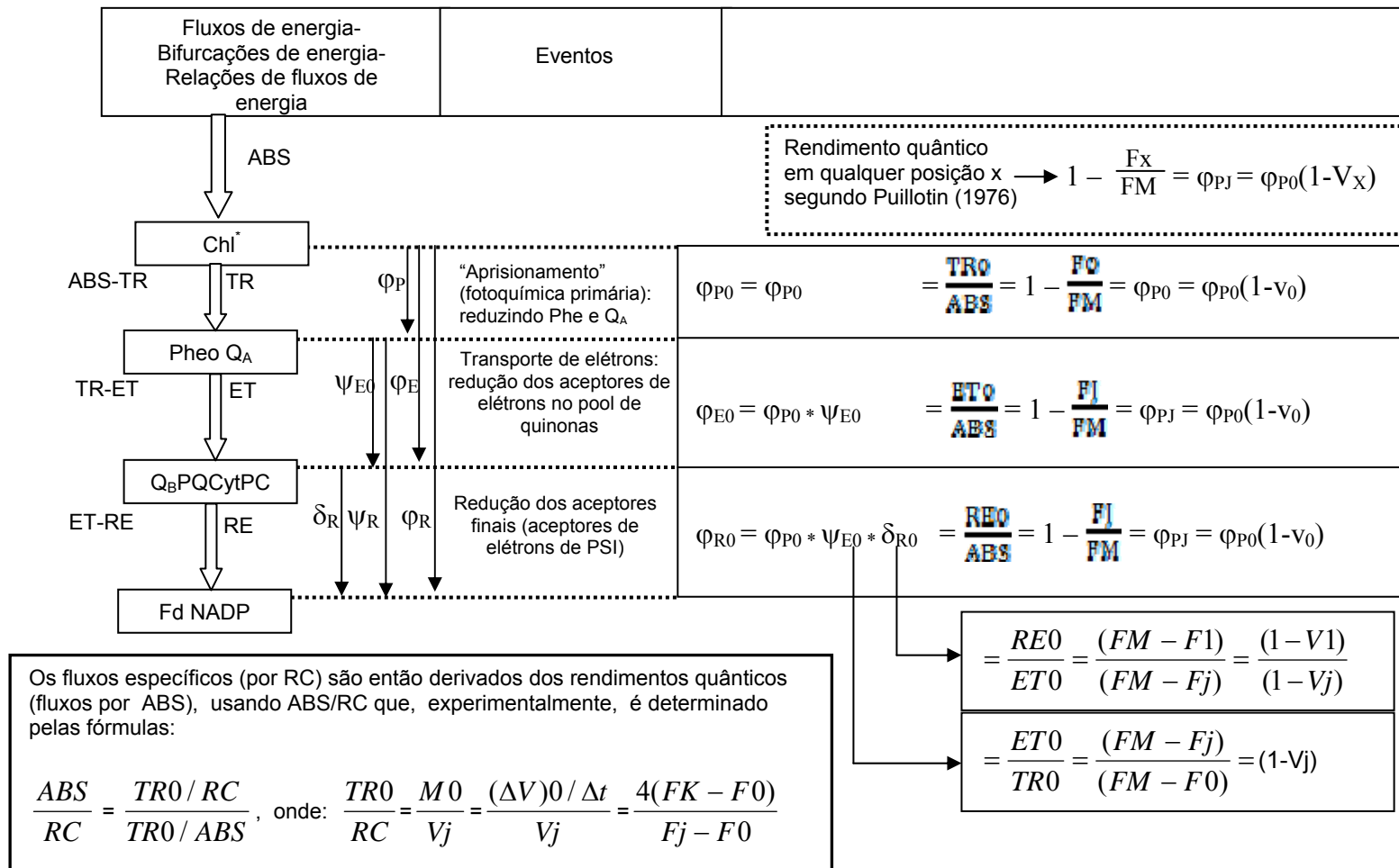


Figura 9- Resumo esquemático dos cálculos baseados no test –JIP, adaptado de Paillon,1976 (TSIMILLI-MICHAEL e STRASSER, 2008).

Outros parâmetros como os de fluxos específicos: ABS/RC (energia absorvida por centro de reação), aprisionamento ( $TR_0/RC$ ), dissipação ( $DI_0/RC$ ) e o transporte de elétrons ( $ET_0/RC$ ) podem ser calculados com as fórmulas:

$$ABS/RC = (MO/Vf) / [1 - (F0/FM)]$$

$$TR_0/RC = (MO/Vf)$$

$$DI_0/RC = (ABS/RC) - (TR_0/RC)$$

$$ET_0/RC = (MO/Vf)(1 - Vf)$$

Onde  $MO = (dV/dt)_0 \approx (\Delta V/\Delta t)_0$

Um modelo muito simplificado de trabalho dos fluxos de energia em um aparato fotossintético, pode ser observado por meio da FIGURA 10. O ABS é o fluxo de fótons absorvido pelo complexo antena  $Chl^*$ ,  $TR_t$  fluxo de excitons aprisionados no centro de reação no momento do transporte de elétrons  $ET_t$  via cadeia transportadora de elétrons, mantendo o metabolismo da reação (KRUGER et al, 1997).

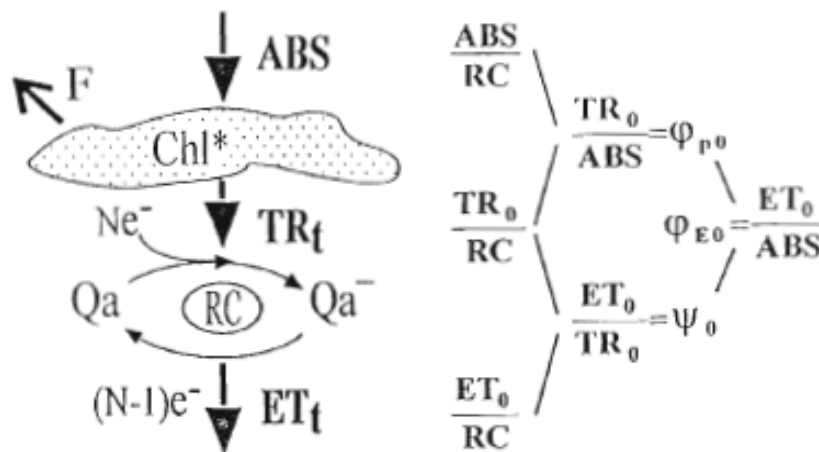


FIGURA 10.- Modelo simplificado dos fluxos de energia específicos em PSII.

Hoje para avaliar esses e outros parâmetros de fluorescência da clorofila a, não é necessário realizar manualmente todos os cálculos de rendimento quântico. Todos eles podem ser obtidos por meio do software *BioLyser HP3* versão 4.0, desenvolvido por Bioenergetics Laboratory University of Geneva Switzerland, pelo professor Dr. Strasser em 2002. Este programa utiliza a planilha de dados adquiridos pelo fluorômetro *Handy Pea*. Este software foi desenvolvido para calcular,

automaticamente, todos os parâmetros da curva *OJIP*, solicitados em função dos quatro principais fenômenos que ocorrem na fluorescência da Chl *a* (fenomenológicos, específicos, rendimentos quânticos e índices de desempenho), os quais são apresentados em forma de um gráfico de radar. Por meio deste software é possível avaliar o aparecimento de qualquer transiente O-K-L-J-I-P e informar que tipo de efeito está ocorrendo.

Neste trabalho foi utilizado o software Biolyser-HP3 disponibilizado pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Blas Lotina-Hanssen, da Universidade Autônoma do México, onde a doutoranda desenvolveu parte da sua pesquisa.

### **1.3 Herbicidas Inibidores da fotossíntese em estudo pelo Grupo de Produtos Naturais da UFSCar**

O grupo de Produtos Naturais /DQ/ UFSCar no ano de 2006 iniciou essa linha de pesquisa com um projeto em parceria com o Prof. Dr. Blas Lotina-Hanssen da Universidade Nacional Autônoma do México, que teve como objetivo principal o aprendizado das técnicas de ensaios de inibição da fotossíntese para posterior implantação no Laboratório de Produtos Naturais.

Foram realizados ensaios bioquímicos de avaliação do potencial fitotóxico de aproximadamente 160 compostos, o que possibilitou a publicação de resumos em congressos nacionais e internacionais, bem como trabalhos completos em revistas indexadas internacionais (VEIGA et al, 2007A; VEIGA et al, 2007B).

Dentre as diversas classes de produtos naturais que se mostraram ativas nos ensaios bioquímicos, podem se destacar os alcalóides (acridônicos, furoquinolínicos, quinolônicos, indólicos) e triterpenos. Entre estes, os alcalóides acridônicos apresentaram os melhores resultados.

Os resultados mostraram que os compostos ensaiados apresentaram os mais variados mecanismos de ação, indicando excelentes perspectivas para continuação deste tipo de estudo e ainda a realização de testes *in vivo* com espécies de plantas daninhas.

Considerando os resultados obtidos, foi realizada uma busca por uma planta que em sua constituição houvesse uma grande quantidade de alcalóides

acridônicos. Assim foi feito um levantamento bibliográfico e escolhida a espécie *Ruta graveolens*, uma planta da família Rutaceae com um número elevado destes alcalóides.

## **1.4 FAMÍLIA RUTACEAE**

A família Rutaceae, pertence a ordem Sapindales junto com as famílias Anacardiaceae, Bierbersteiniaceae, Burseraceae, Kirkiaceae, Meliaceae, Nitrareaceae, Sapindaceae e Simaroubaceae (PIRANI, 2010).

A família Rutaceae é formada por cerca de 150 gêneros que englobam mais de 1600 espécies, distribuídos pelas regiões tropicais de todo o mundo, com maior ocorrência nos trópicos e subtropicais. No Brasil são descritas a presença de 32 gêneros nativos (PIRANI, 2005; <http://flora.cria.org.br>).

Do ponto de vista químico, a família Rutaceae possui uma grande diversidade de metabólitos secundários, como alcalóides derivados do ácido antranílico e do triptofano, além de cumarinas, lignanas, limonóides, flavonóides e terpenóides (WATERMAN E GRUNDON, 1983). Muitos desses metabólitos possuem variadas atividades biológicas, de grande importância farmacológica, despertando o interesse na investigação fitoquímica desta família (WATERMAN E GRUNDON, 1983; REMBOLD, 1989).

### **1.4.1 *Ruta graveolens***

*Ruta graveolens* é uma espécie pertencente à família Rutaceae e ao gênero *Ruta*. É uma espécie nativa da região mediterrânea, mas cultivada em toda a Europa e muitos países asiáticos, inclusive na China, Índia, e Japão (KOSTOVA et al, 1999; CABO, 1950; RAGHAV et al, 2006; OLIVA et al, 2003).

O gênero *Ruta* contém cerca de 100 espécies hoje descritas na literatura, como: *Ruta angustifolia*, *R. chalepensis*, *R. corsica*, *R. graveolens*, *R. montana*, dentre outras. *R. graveolens* (Rue), conhecida popularmente como arruda, é

relatada como planta medicinal desde tempos antigos e atualmente usada no tratamento de várias doenças como leucoderma, vitiligo, psoríase, infecções internas, inflamações, eczema, úlceras externas dentre outras (ROBBS E BITTENCOURT, 1999; MEEPAGALA et al, 2005).

O emprego desta planta na produção de diversos medicamentos já é realizado, contudo a racionalidade de seu uso ainda é controversa. Na homeopatia, Rue (*R. graveolens*) é um importante remédio para a dor profunda e reumatismo, além de ser utilizada para a fadiga ocular, distúrbios gástricos, rigidez na nuca, tonturas, dor de cabeça e assim por diante (RAGHAV et al, 2006).

*R. graveolens* contém mais de 120 classes de produtos naturais sendo os majoritários: cumarinas, alcalóides, flavonóides, triterpenos, ácidos fenólicos, taninos e também óleos essenciais.

Os óleos essenciais estão principalmente distribuídos nas partes aéreas da planta, e os constituintes majoritários são: undecan-2-ona, nonan-2-ona, decan-2-ona e tridecan-2-ona (BURGA, 2005). Várias atividades fungicidas do óleo essencial de *R. graveolens* são relatadas, além da ação como herbicida na inibição da germinação e crescimento radical em *Raphanus sativus* (rabanete) (DAS et al, 2008).

A segunda maior classe de metabólitos são as cumarinas, com cerca de 40 derivados isolados dessa espécie, dentre elas destacam-se: bergapteno, psoraleno, xantotoxina, isopimpinellina e rutaretina. Cumarinas e furanocumarinas são usadas no tratamento de leucoderma, vitiligo e psoríase, por apresentar propriedades fotoreativas, e também, são usadas na neurologia no tratamento sintomático de doenças, particularmente escleroses múltiplas (ORLITA et al, 2008; BURGA, 2005).

Os flavonóides e os alcalóides apresentam quase a mesma porcentagem de constituição. Os flavonóides são melhores representados em *R. graveolens*, pela rutina. Além deste flavonóide, também são encontrados gossipetina, kaempferol e isoraminetina que contribuem com a cor amarela das flores do gênero *Ruta*. Já os alcalóides, são descritos em dois grupos distintos: furanoquinolínicos (skimmianina,  $\gamma$ -fagarina, dictamina, kokusagina) e acridônicos em que a arborinina é o mais comum nas partes aéreas dessa planta, e a rutacridona e gravacridondiol são encontrados nas raízes (BURGA, 2005).

Os componentes de *R. graveolens* são de grande interesse em química medicinal, e estas combinações mostram uma ampla atividade biológica. Porém,



não há dados que descrevam o uso desses alcalóides de *R. graveolens* especificamente como inibidores da fotossíntese.

Baseado na composição química desta espécie, a busca de metabólitos secundários que possam atuar como herbicidas no controle de plantas daninhas tem o grande interesse de estudo neste projeto. Essa é uma área estratégica de investigação devido às crescentes necessidades alimentares da população mundial e do controle destas. Essa busca visa desenvolver novos herbicidas com melhores características biodegradáveis, econômicas e com baixa toxicidade comparada com os herbicidas comerciais, ou seja, compostos apresentando atividade sobre a síntese de ATP, transporte de elétrons em cloroplastos isolados das folhas de espinafre durante a fase fotoquímica da fotossíntese (RICKERT et al, 1991; LOTINA-HENNSSEN et al, 1999 E 2003; VEIGA et al, 2007A; PEÑA-VALDÍVIA et al, 1991).

# *Objetivos*

## **2.0 OBJETIVOS**

A presente tese teve como objetivos:

- A busca de metabólitos secundários da espécie *Ruta graveolens*.
- Busca por modelos para herbicidas inibidores da fotossíntese por meio da realização dos ensaios:
  1. Transporte de elétrons em membrana tilacóides de cloroplastos isolados das folhas de *Spinacia oleracea* L. durante a fase fotoquímica da fotossíntese.
  2. Bioquímicos *in vitro* para elucidação do mecanismo de ação para os compostos que apresentarem atividade no transporte de elétrons, bem como os ensaios de ATPase para os compostos que se mostrarem inibidores da transferência de energia ou desacoplante.
  3. Fluorescência da clorofila a *in vivo* em folhas de plantas da espécie *Lolium pereni* e *semi vivo* em discos de folhas de *Spinacia oleracea* L.

*Resultados e  
Discussões 1*

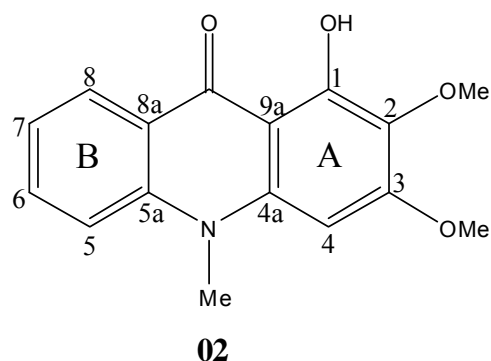
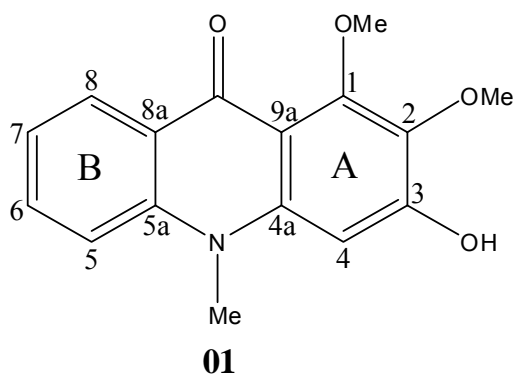
### 3.0 Estudo Fitoquímico de “Ruta graveolens”

#### 3.1 Substâncias Isoladas

O estudo fitoquímico da espécie *R. graveolens* permitiu o isolamento de substâncias pertencentes a duas classes: alcalóides (acridônicos, quinolônicos, quinolínicos, furoquinolínicos e alquilquinolínicos) e cumarinas (furanocumarinas).

#### Alcalóides:

##### Acridônicos



#### **3-hidroxi-1,2-dimetoxi-N-metilacridona**

Procedência: FDRF

Isolamento: p. 144

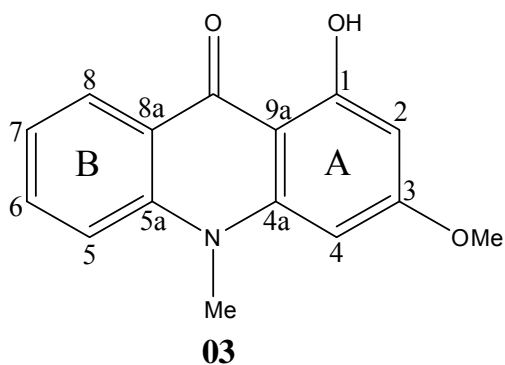
Identificação: p. 43

#### **Arborinina**

Procedência: FDRF

Isolamento: p. 144

Identificação: p. 43

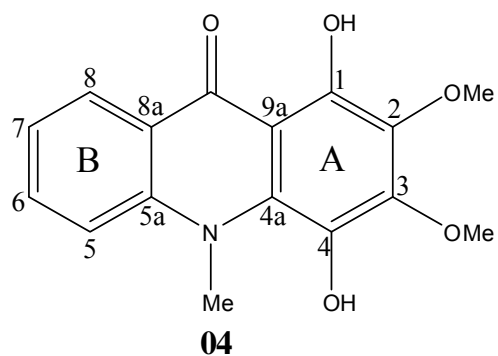


***N*-metilacridona**

Procedência: FHDRF

Isolamento: p. 142

Identificação: p. 43

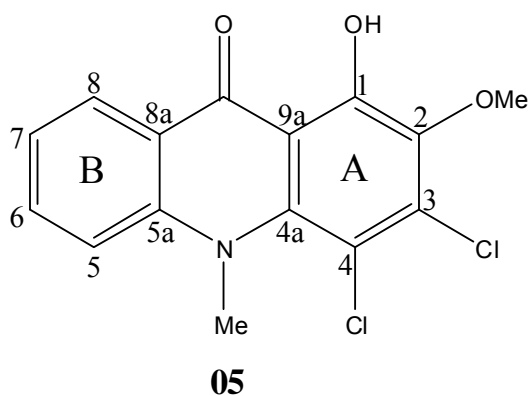


**1,4-diidroxi-2,3-dimetoxi-*N*-metilacridona**

Procedência: FDRF

Isolamento: p. 144

Identificação: p. 43



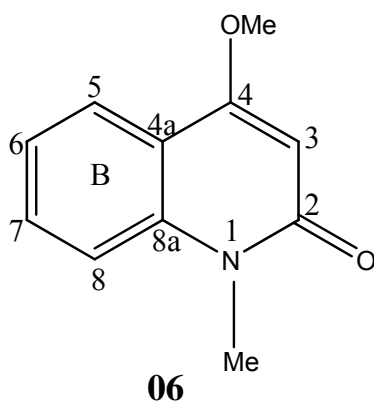
**3,4-dicloro-1-hidroxi-2-metoxi-*N*-metilacridona**

Procedência: FHRR

Isolamento: p. 148

Identificação: p. 66

## Quinolônicos



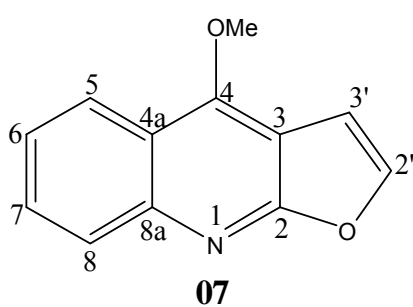
### **N-metil-4-metoxi-2-quinolona**

Procedência: FMRF

Isolamento: p. 146

Identificação: p. 74

## Furoquinolônicos

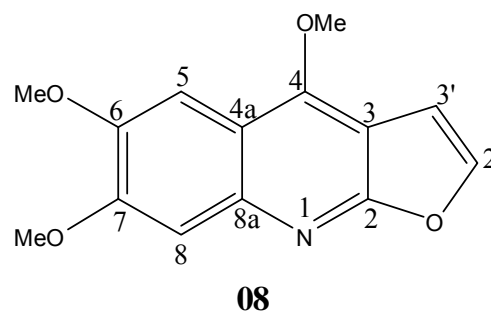


### **Dictamina**

Procedência: FDRF

Isolamento: p. 144

Identificação: p. 80

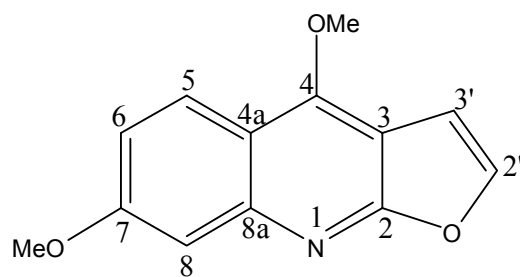


### **Kokusaginina**

Procedência: FDRF

Isolamento: p. 144

Identificação: p. 80



**09**

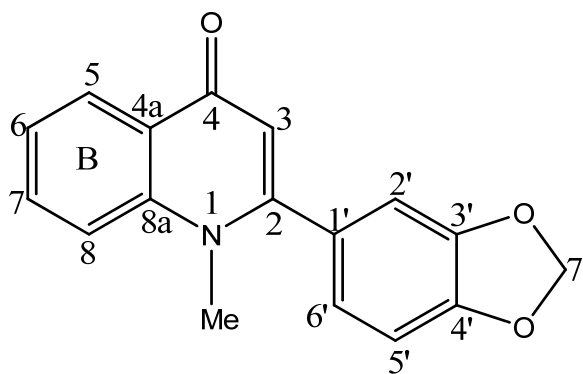
**Evolitrina**

Procedência: FHRR

Isolamento: p.148

Identificação: p.80

*Aril-quinolínicos*



**10**

**Graveolina**

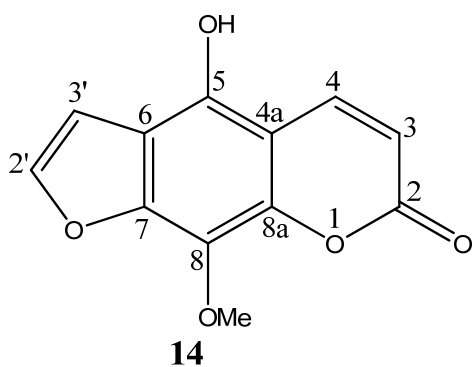
Procedência: FMRF

Isolamento: p. 146

Identificação: p.91

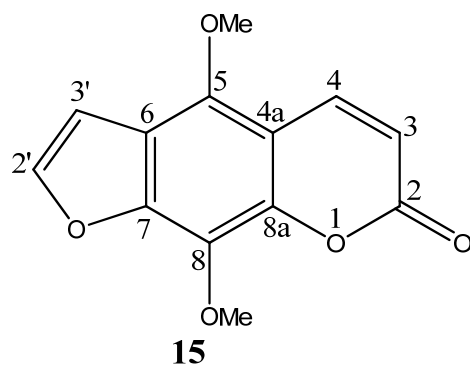






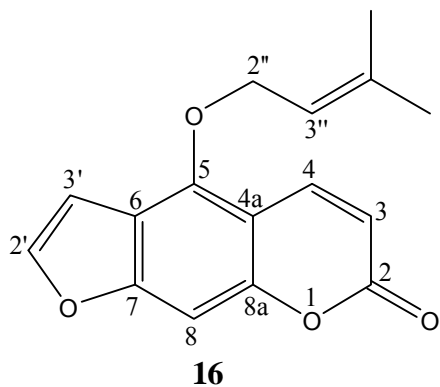
**5-hidroxi-8-metoxi-psoraleno**

Procedência: FDRF  
 Isolamento: p.144  
 Identificação: p. 107



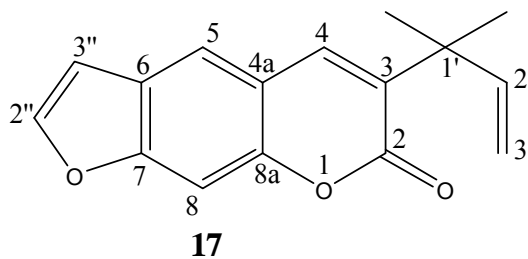
**Isopimpineline**

Procedência: FHRR  
 Isolamento: p.148  
 Identificação: p. 107



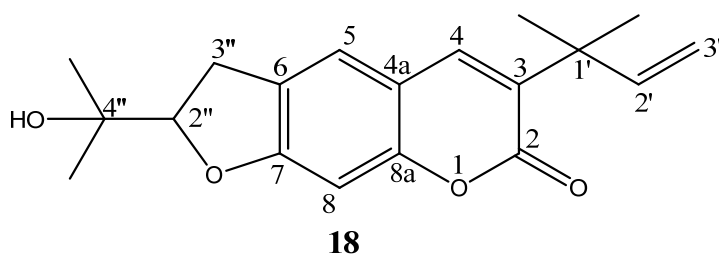
**Isoimperatorina**

Procedência: FHDRF  
 Isolamento: p. 142  
 Identificação: p.122



**Chalepentina**

Procedência: FHDRF  
 Isolamento: p.142  
 Identificação: p. 125



**Chalepina**

Procedência: FDRF  
 Isolamento: p.144  
 Identificação: p. 131

### **3.2 Alcalóides**

Alcalóide é uma classe de substâncias de caráter básico encontrado principalmente em plantas (mas não somente, podendo ser também encontrado em fungos, bactérias e até mesmo animais), contendo em sua fórmula, basicamente nitrogênio, oxigênio, hidrogênio e carbono. Os alcalóides constituem um vasto grupo de metabólitos com grande diversidade estrutural, representando cerca de 20% das substâncias naturais descritas. Os alcalóides podem ser classificados quanto à sua atividade biológica; quanto à sua estrutura química; e quanto à sua origem biossintética ( DEWICK, 2002).

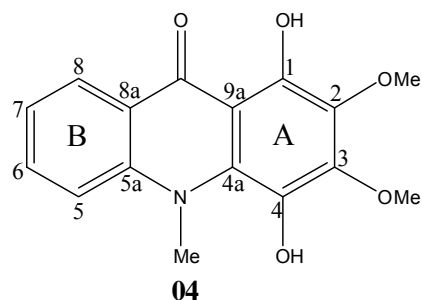
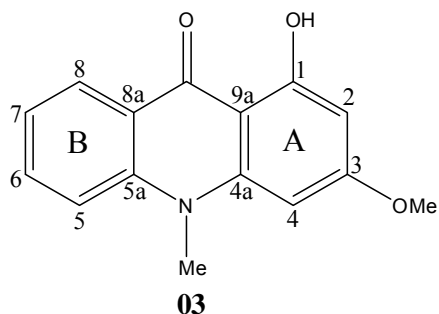
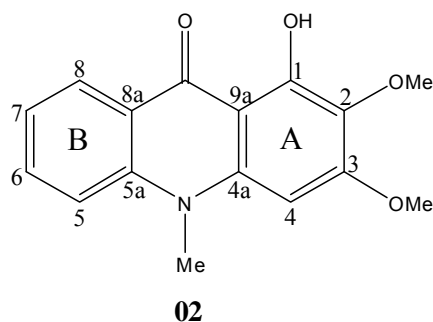
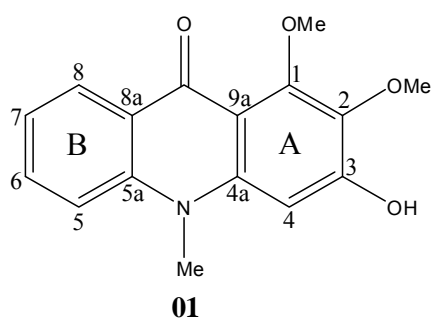
A diversidade de alcalóides é devido aos diversos caminhos biossintéticos, que podem envolver diferentes precursores como aminoácidos aromáticos e em alguns casos dois aminoácidos precursores ao mesmo tempo (SANTOS, 2005; TILLEQUIN, 2007). Na família Rutaceae ocorrem cinco tipos diferentes de alcalóides, que são classificados segundo sua biogênese: derivados da fenilalanina\tirosina, derivados do triptofano, derivados do ácido antranílico, da histidina e derivados de origem desconhecida, por exemplo, os carbazóis. No entanto, as plantas pertencentes a família Rutaceae produzem, em quase sua totalidade, alcalóides derivados do ácido antranílico: 2-quinolona, 4-quinolona, alquilquinolínicos, furoquinolínicos e acridônicos ( WATERMAN, 1999).

### 3.2.1 Identificação estrutural das substâncias 01 a 04

Os alcalóides acridônicos isolados nesse trabalho são formados a partir da condensação do ácido antranílico com três unidades de malonil-CoA, levando ao esqueleto básico. Os alcalóides acridônicos, em sua grande maioria, apresentam-se como sólidos amorfos, com absorção no UV-Vis em  $\lambda = 220\text{nm}$ ,  $254\text{nm}$ ,  $285\text{nm}$ ,  $365\text{nm}$ ,  $410\text{nm}$  o que sugere a presença de um núcleo 9-acridônico (SANTOS, 2005).

Sinais de hidrogênio quelados variando de  $\delta$  15,2-14,0 nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  sugerem a presença de hidroxilas fenólicas queladas com o grupo carbonila em C-9. A partir daí pode-se definir sua estrutura básica do tipo 1-hidroxi-9-acridônico. Os valores de RMN de  $^{13}\text{C}$  são úteis para determinar substituições no esqueleto acridônico (WU E FURUKAWA, 1993a; WU E FURUKAWA, 1993b), tais como: N-metil para os alcalóides acridônicos que não apresentam substituintes em C-4 e C-5, o deslocamento químico do carbono deste grupo é observado entre  $\delta$  33,1-35,7; já os compostos com metoxila ou hidroxila na posição C-4, os sinais N-metila encontram-se em regiões mais desblindadas do espectro. Os sinais de deslocamento químico de RMN de  $^{13}\text{C}$  das metoxilas para os que não apresentem substituição em *orto* são observadas entre  $\delta$  55,3-55,6; e quando a metila estiver em um sistema *orto*-dissubstituído o sinal de RMN  $^{13}\text{C}$  aparece entre  $\delta$  59,6-62,1. A carbonila na posição C-9 causa uma desblindagem nos núcleos dos carbonos C-1, C-3 e C4a. Quando uma metoxila está presente em C-1 o valor do deslocamento químico deste carbono é encontrado entre  $\delta$  140,1-162,2.

As substâncias **01**, **02**, **03** e **04** são alcalóides acridônicos isolados das frações FHDRF e FDRF provenientes das partes aéreas da *R. graveolens*. Estes se apresentaram como sólidos de coloração amarelada. A identificação das substâncias foi realizada através da análise dos experimentos de RMN de uma dimensão  $^1\text{H}$ , e duas dimensões HMBC, HSQC, COSY e por comparação com dados da literatura (WAFFO ET AL, 2007; KUZOVKINA ET AL, 2004).



Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (FIGURAS 11 a 14) p. 49 - 54 apresentaram 4 sinais característicos na região de hidrogênios aromáticos para as quatro substâncias em:  $\delta$  8,37 (1H, *ddd*,  $J = 8,0$ ; 1,7 e 0,6 Hz);  $\delta$  7,24 (1H, *ddd*,  $J = 8,0$ ; 6,8 e 0,6 Hz);  $\delta$  7,68 (1H, *ddd*,  $J = 8,0$ ; 6,8 e 1,7 Hz) e  $\delta$  7,45 (1H, *dl*,  $J = 8,0$  Hz) para a substância **01**; sinais em  $\delta$  8,42 (1H, *dd*,  $J = 8,0$  e 1,4 Hz);  $\delta$  7,23 (1H, *ddd*,  $J = 8,0$ ; 6,8 e 0,7 Hz);  $\delta$  7,73 (1H, *ddd*,  $J = 8,0$ ; 6,8 e 1,4 Hz);  $\delta$  7,50 (1H, *dl*,  $J = 8,0$ Hz); para a substância **02**; os sinais  $\delta$  8,44 (1H, *dd*,  $J = 8,0$  e 1,6 Hz);  $\delta$  7,30 (1H, *ddd*,  $J = 8,0$ ; 7,2 e 1,6 Hz);  $\delta$  7,73 (1H, *ddd*,  $J = 8,0$ ; 7,2 e 1,6Hz),  $\delta$  7,40 (1H, *dl*,  $J = 8,0$ Hz) e para a substância **03**, e os sinais em  $\delta$  8,37 (1H, *dd*,  $J = 8,7$ ; 1,6 Hz);  $\delta$  7,30 (1H, *ddd*, 8,0; 7,5 e 1,6Hz);  $\delta$  7,76 (1H, *ddd*,  $J = 8,7$ ; 7,5 e 1,6 Hz) e  $\delta$  7,50 (1H, *dl*,  $J = 8,7$  Hz) e para substância **04**, esses sinais foram atribuídos aos hidrogênios dos respectivos anéis *orto* dissustituídos, referentes aos hidrogênios H-8, H-7, H-6 e H-5 respectivamente (TABELAS 1 e 3) p. 62 e 63.

A partir das multiplicidades, pode-se concluir que o perfil de acoplamento para as quatro substâncias, referente ao anel B, de modo geral é H-8 acoplado em *orto* com H-7, em *meta* com H-6 e em *para* com o H-5, o H-7 mostra acoplamento em *orto* com H-8 e H-6 e em *meta* com H-5, da mesma forma o H-6 acopla em *orto* com H-7 e H-5 e em *meta* com H-8 e o H-5 acopla em *orto* com H-6. No espectro da substância **04** as constantes de acoplamento do último sinal ( $\delta$  7,30) com

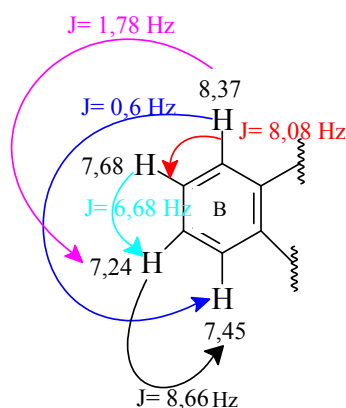
mutiplicidade *duplo duplo dubleto* não foram possíveis de ser calculadas, pois os picos se encontram no mesmo deslocamento químico do solvente deuterado  $\text{CDCl}_3$ .

Um sinal de RMN de  $^1\text{H}$  característico de alcalóides acridônicos é o sinal próximo a  $\delta$  14,00 - 14,75 (1H, s), referente a um hidrogênio de hidroxila quelada a uma carbonila encontrado em três alcalóides: **02**, **03** e **04**, sendo atribuído a posição H-1 do anel A. Para a substância **01** na posição 1 foi observado a presença de uma metoxila com sinal de deslocamento químico em  $\delta$  3,99 (3H, s), sendo este padrão de substituição confirmado por espectros de correlação bidimensionais.

O sinal em  $\delta$  6,19 (1H, s) para **01**,  $\delta$  6,23 (1H, s) para **02**, foi relacionado a hidrogênios de anel aromático referentes ao H-4 dos mesmos, e um mesmo sinal em  $\delta$  6,30 (2H, s) está relacionado a dois hidrogênios também aromáticos para **03**, referentes aos hidrogênios H-2 e H-4. A ausência desse sinal para **04** levou a conclusão que essa posição C-4 é substituída e pode ser atribuída posteriormente a uma hidroxila.

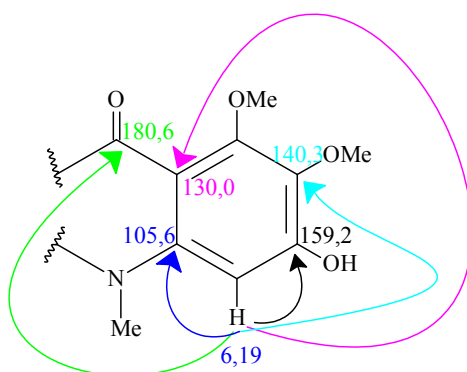
Além disso, foi possível observar sinais em  $\delta$  3,99 (3H, s);  $\delta$  3,91 (3H, s) e  $\delta$  3,78 (3H, s) para **01**, em  $\delta$  4,00 (3H, s);  $\delta$  3,92 (3H, s) e  $\delta$  3,81 (3H, s) para **02**, em  $\delta$  3,99 (3H, s); e dois sinais em  $\delta$  3,77(3H, s) e  $\delta$  3,90(3H, s) para **03**, e em  $\delta$  4,03 (3H, s);  $\delta$  3,99 (3H, s);  $\delta$  3,91 (3H, s) e  $\delta$  3,74 (3H, s) para **04** foram associados a grupos metilas ligados a heteroátomos (N ou O).

Analisando o mapa de contorno de HMBC (FIGURA 18 e 18.1) p. 58 para **01**, e as correlações apresentadas por esse experimento, pôde-se confirmar os acoplamentos do anel B e também afirmar o padrão de substituição do anel B, abaixo exemplificado.



Através do mapa de correlações HMBC, observou-se para o anel A, a metoxila em  $\delta$  3,99 uma correlação com o carbono em  $\delta$  159,28, para a metoxila em  $\delta$  3,78 uma correlação com dois carbonos em  $\delta$  141,86 e 140,38, e para a metoxila em  $\delta$  3,91 uma correlação com um carbono em  $\delta$  130,06. Com essas informações de deslocamento químico, pôde-se atribuir para o carbono C-3, um grupo OH como substituinte. A presença da carbonila na posição C-9, apresenta um efeito atrator da nuvem eletrônica e deixa o C-1 mais desblindado, e assim, o valor de deslocamento do carbono em  $\delta$  141,86; e para o carbono em  $\delta$  140,3 atribui-se a posição C-2, uma vez que a posição C-4 não é substituída. Dessa maneira, associando os dados do mapa de correlação HMBC com os resultados de RMN de  $^1\text{H}$ , é possível atribuir as posições desses hidrogênios na molécula, onde o sinal de hidrogênio em  $\delta$  3,99 (OMe) na posição C-1, o sinal em  $\delta$  3,91 é atribuído (OMe) na posição 2 e em  $\delta$  3,78 à N-Me.

Os valores de correlação do sinal de hidrogênio em  $\delta$  6,19 pelo HMBC com os carbonos em  $\delta$  105,6;  $\delta$  130,0;  $\delta$  140,3;  $\delta$  159,2 e  $\delta$  180,6 confirmam as posições de substituição do anel A como pentasubstituído, abaixo exemplificado, levando a identificação do alcalóide acridônico 3-hidroxi-1,2-dimetoxi-N-metil-acridona, substância **01**.



O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **02** (FIGURA 15) pg. 55 apresentou 16 sinais de carbono, dentre eles:  $\delta$  180,8 referente à carbonila da posição C-9,  $\delta$  34,1;  $\delta$  60,8 relativos aos N-Me e O-Me na posição 2 e O-Me na posição 3 respectivamente. Todos os outros sinais foram atribuídos aos demais carbonos aromáticos, sendo confirmados por comparação com a literatura (TABELA 2) pg 62. Com a análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  da substância **02** foi

evidenciada sua identificação como o alcalóide 1-hidroxi-2,3-dimetoxi-*N*-metil acridona (arborinina).

O mapa de correlação HSQC, para a substância **03**, (FIGURA 19) pg 59, foi possível observar correlações dos sinais de hidrogênio em  $\delta$  8,37 com carbono em  $\delta$  126,7; do  $\delta$  7,76 com  $\delta$  134,1; do  $\delta$  7,50 com  $\delta$  114,4 e do  $\delta$  7,30 com  $\delta$  121,4 podendo atribuir estes valores de deslocamento de carbono nas posições C-8, C-6, C-5 e C-7. O composto **3** também apresentou correlações dos hidrogênios em  $\delta$  6,30 com  $\delta$  94,1 e  $\delta$  90,1 sugerindo hidrogênios aromáticos nas posições C-2 e C4.

O experimento de HMBC (FIGURA 20) pg. 59, apresentou correlações de hidrogênio quelado em  $\delta$  14,82 com  $\delta$  94,1;  $\delta$  105,7;  $\delta$  166,4; do hidrogênio aromático  $\delta$  8,44 com os carbonos  $\delta$  134,1;  $\delta$  142,8 e  $\delta$  180. Os sinais dos hidrogênios  $\delta$  7,73 correlacionando com carbonos em  $\delta$  126,7;  $\delta$  142,8;  $\delta$  7,47 com  $\delta$  121,0;  $\delta$  121,4; e do hidrogênio em  $\delta$  7,30 com  $\delta$  114,4 e  $\delta$  121,0; confirmando a estrutura do anel aromático *orto* dissustituído. Os hidrogênios em  $\delta$  3,78 se correlacionaram com os carbonos em  $\delta$  142,8;  $\delta$  144,9; em  $\delta$  6,32 com  $\delta$  166,4;  $\delta$  90,1;  $\delta$  94,1;  $\delta$  105,7; e os hidrogênios da metoxila em  $\delta$  3,90 correlacionaram com o carbono em  $\delta$  166,4; o que permitiu atribuir a posição da metoxila em C-3 da substância **03**. O espectro de COSY (FIGURA 21) pg. 59, apresentou acoplamento entre H-5, H-6, H-7 e H-8 confirmando a presença do anel aromático B *orto* dissustituído do esqueleto acridônico.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (FIGURA 16) apresentou 14 sinais, onde o  $\delta$  180,0 foi atribuído à carbonila, o sinal em  $\delta$  55,6 associado a metoxila em posição livre de compressão estérica de substituintes na posição *orto* e o  $\delta$  34,3 é atribuído à N-Me (TABELA 4) pg 64.

A partir dos dados de RMN de  $^1\text{H}$ , de  $^{13}\text{C}$ , HMBC, HSQC e COSY, a substância **03** foi identificada como o alcalóide acridônico 1-hidroxi-3-metoxi-*N*-metil acridona.

Para a substância **04**, o mapa de correlação HSQC (FIGURA 22) p. 60, mostrou sinais de correlação de hidrogênios em  $\delta$  8,36;  $\delta$  7,32;  $\delta$  7,76 e  $\delta$  7,48 com carbonos em  $\delta$  126,2;  $\delta$  122,1;  $\delta$  134,6 e  $\delta$  116,6; respectivamente. Também foram observados sinais de hidrogênio em  $\delta$  3,99;  $\delta$  3,96 e  $\delta$  4,03 correlacionando-se diretamente com os carbonos em  $\delta$  44,0;  $\delta$  61,0 e  $\delta$  61,5; respectivamente. Pelo mapa de correlação HSQC, pôde-se confirmar que o anel A é totalmente substituído.



O espectro de correlação de HMBC (FIGURA 23) p. 61, apresenta correlação dos sinais de hidrogênio em H $\delta$  4,10; H $\delta$  4,00 e H $\delta$  3,96 com sinais de carbono em  $\delta$  134,6;  $\delta$  140,5 e  $\delta$  157,1; respectivamente. São observadas também correlações dos sinais em H $\delta$  8,36 com os carbonos em  $\delta$  134,6 e  $\delta$  146,1; de  $\delta$  7,76 com  $\delta$  146,1 e  $\delta$  126,1; de  $\delta$  7,48 com  $\delta$  122,1 e do  $\delta$  7,32 com  $\delta$  116,6 e  $\delta$  121,3. O sinal de hidrogênio da hidroxila quelada em  $\delta$  14,69 correlaciona-se com os carbonos em  $\delta$  109,4 (C-9a);  $\delta$  155,8 (C-1) e  $\delta$  134,6 (C-2).

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (FIGURA 17) p. 57, apresentou 16 sinais (TABELA 4) pg. 64, onde o  $\delta$  182,3 está relacionado à carbonila, e os sinais em  $\delta$  44,0;  $\delta$  61,0 e  $\delta$  61,5 são referentes ao *N*-Me e às metoxilas.

Portanto, a partir dos dados de RMN de  $^1\text{H}$ , de  $^{13}\text{C}$ , HMBC e HSQC a substância **04** foi identificada como sendo o alcalóide acridônico 1,4-dihidroxi-2,3-dimetoxi-*N*-metilacridona.

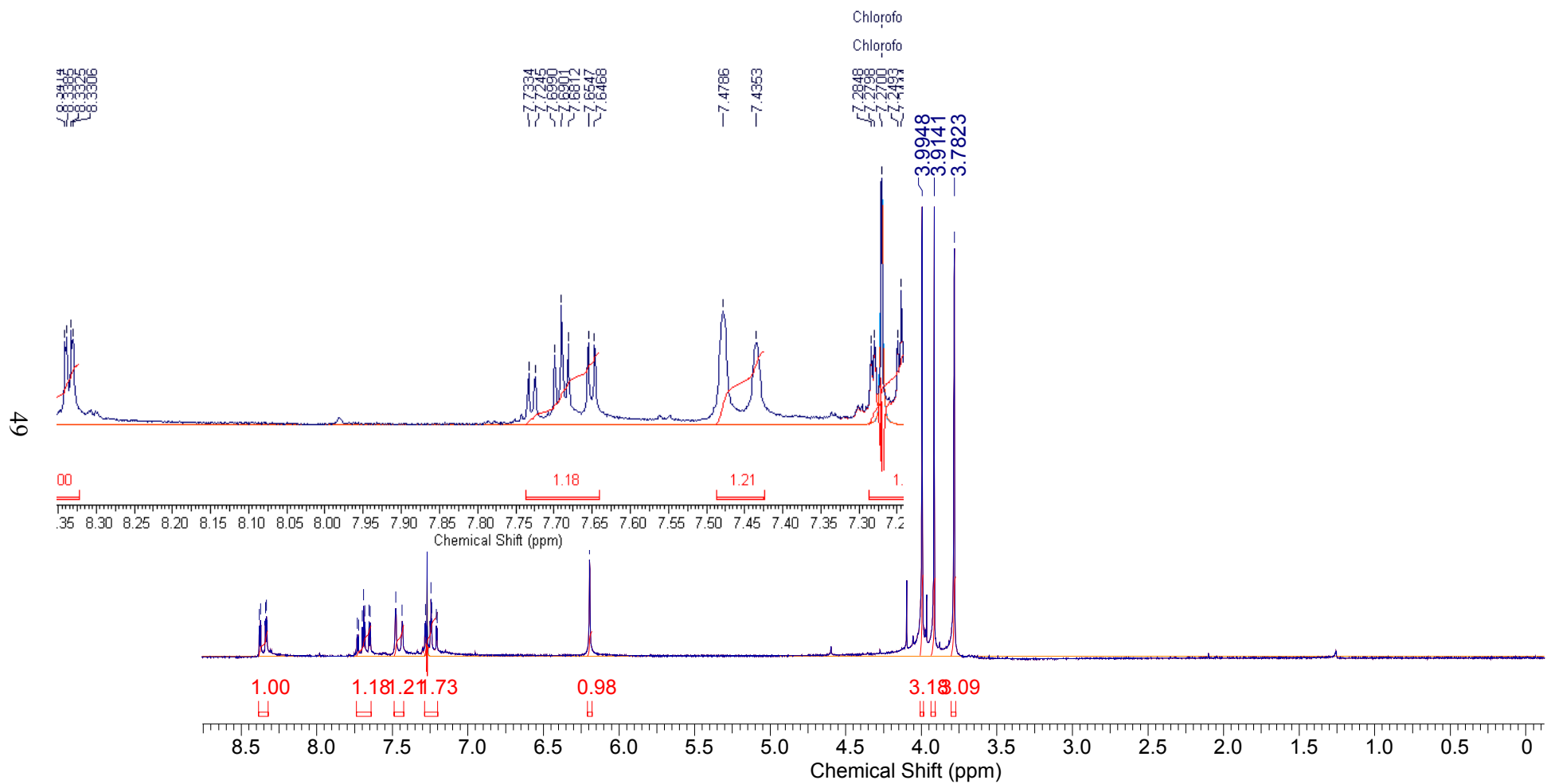


FIGURA 11- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **01** ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).

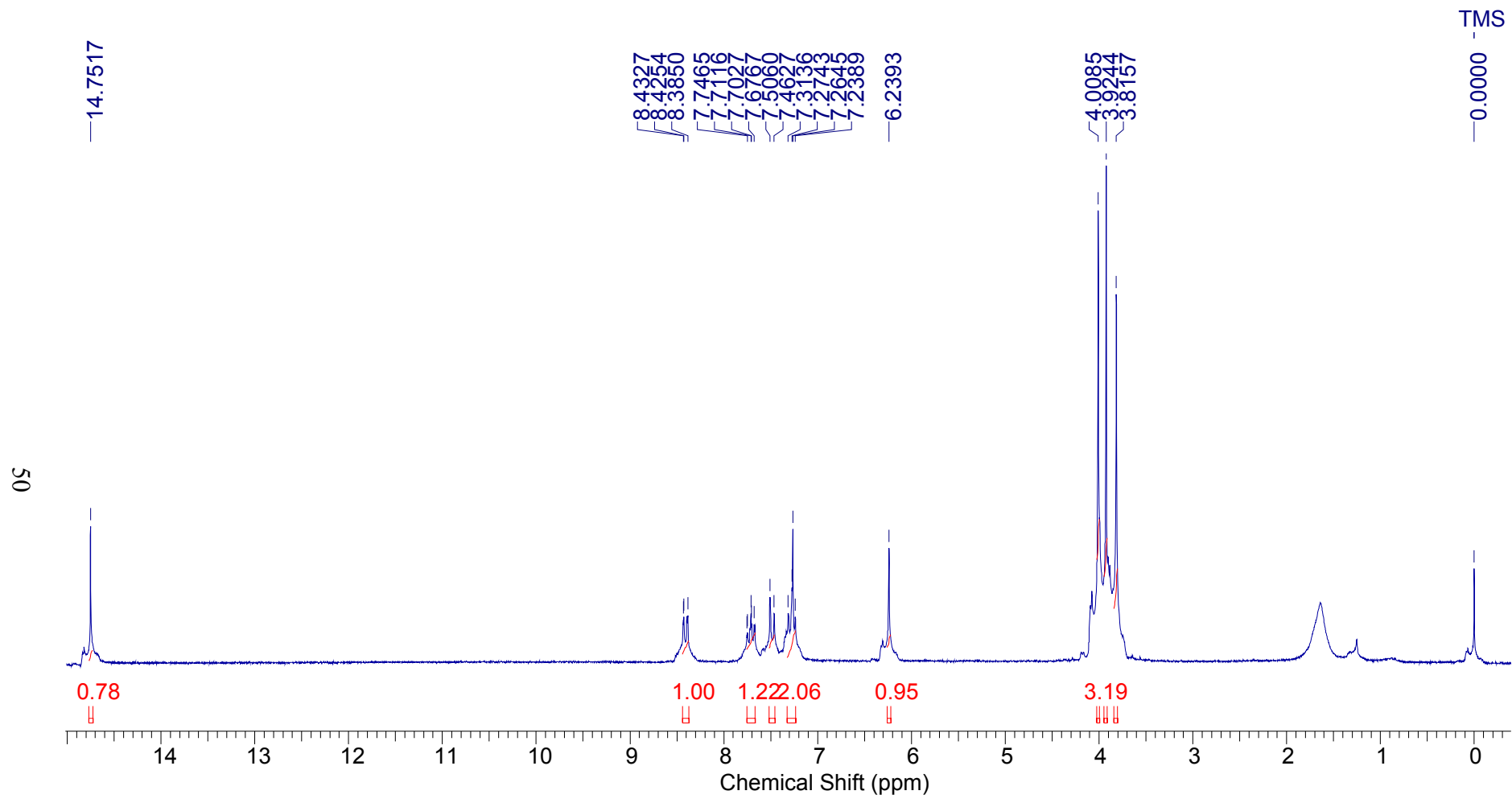


FIGURA 12- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **02** ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).

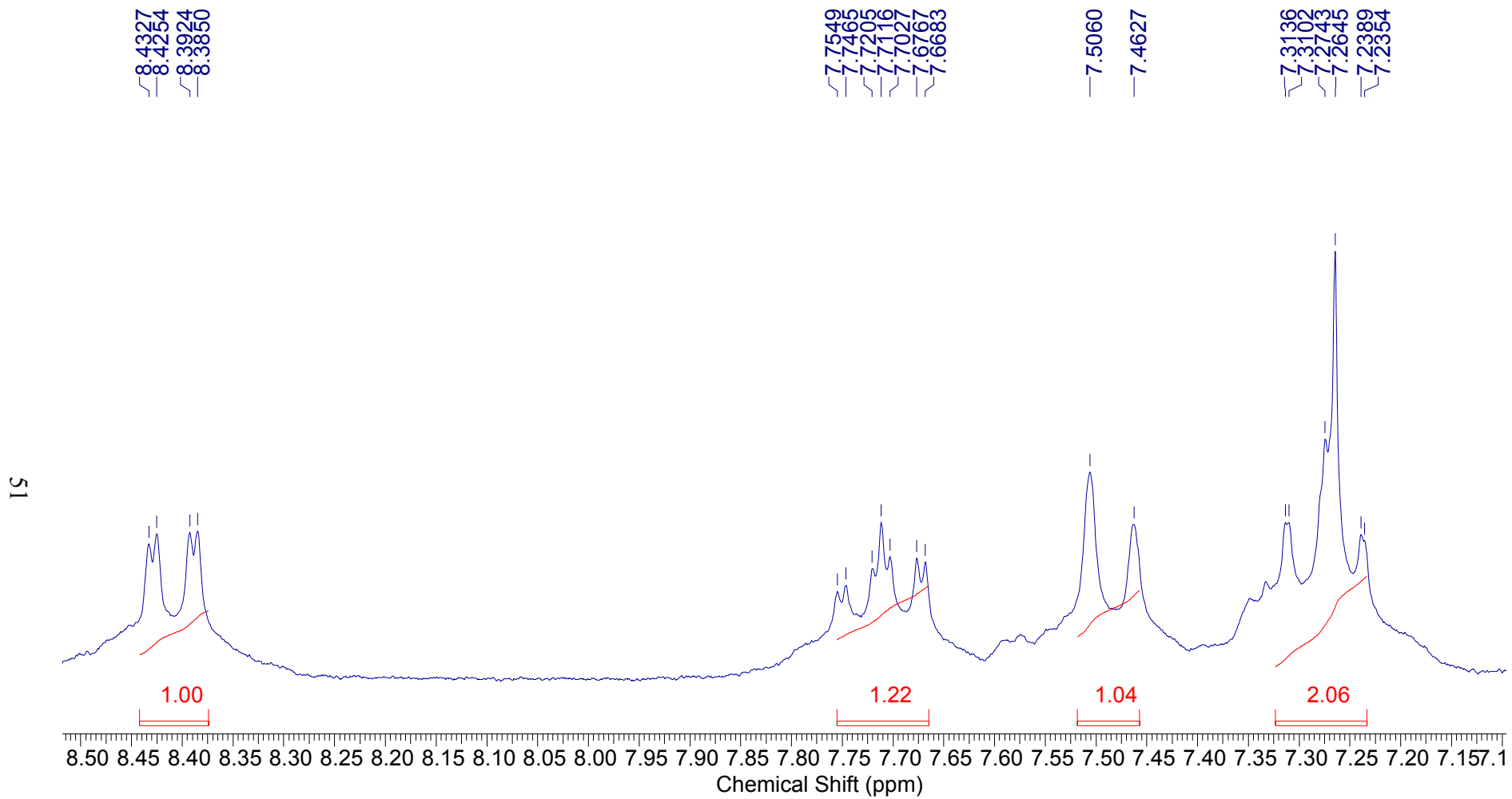


FIGURA 12.1- Expansão espectro de RMN de <sup>1</sup>H da substância **02** (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz).

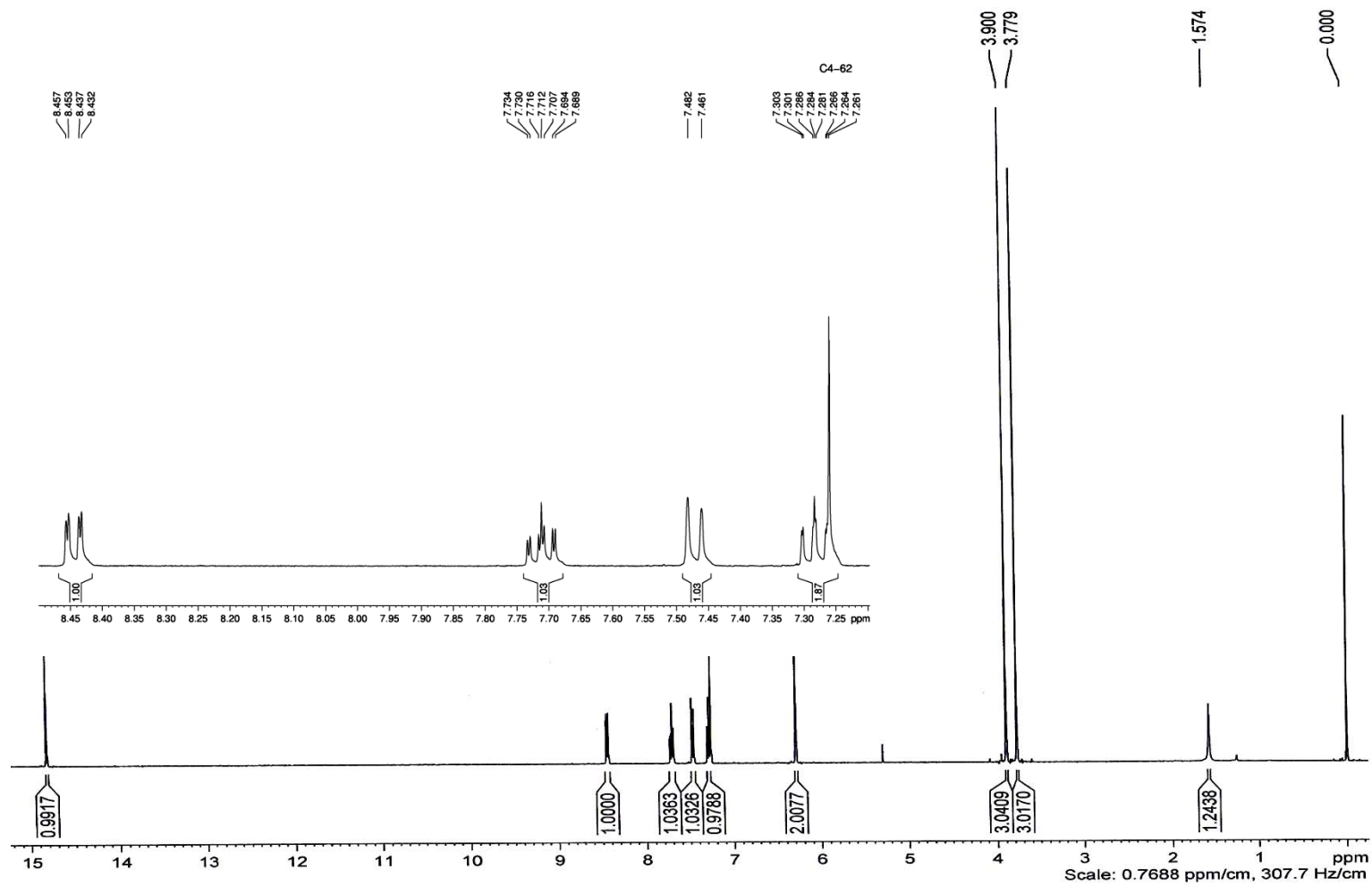


FIGURA 13- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **03** ( $\text{CDCl}_3$  400 MHz).



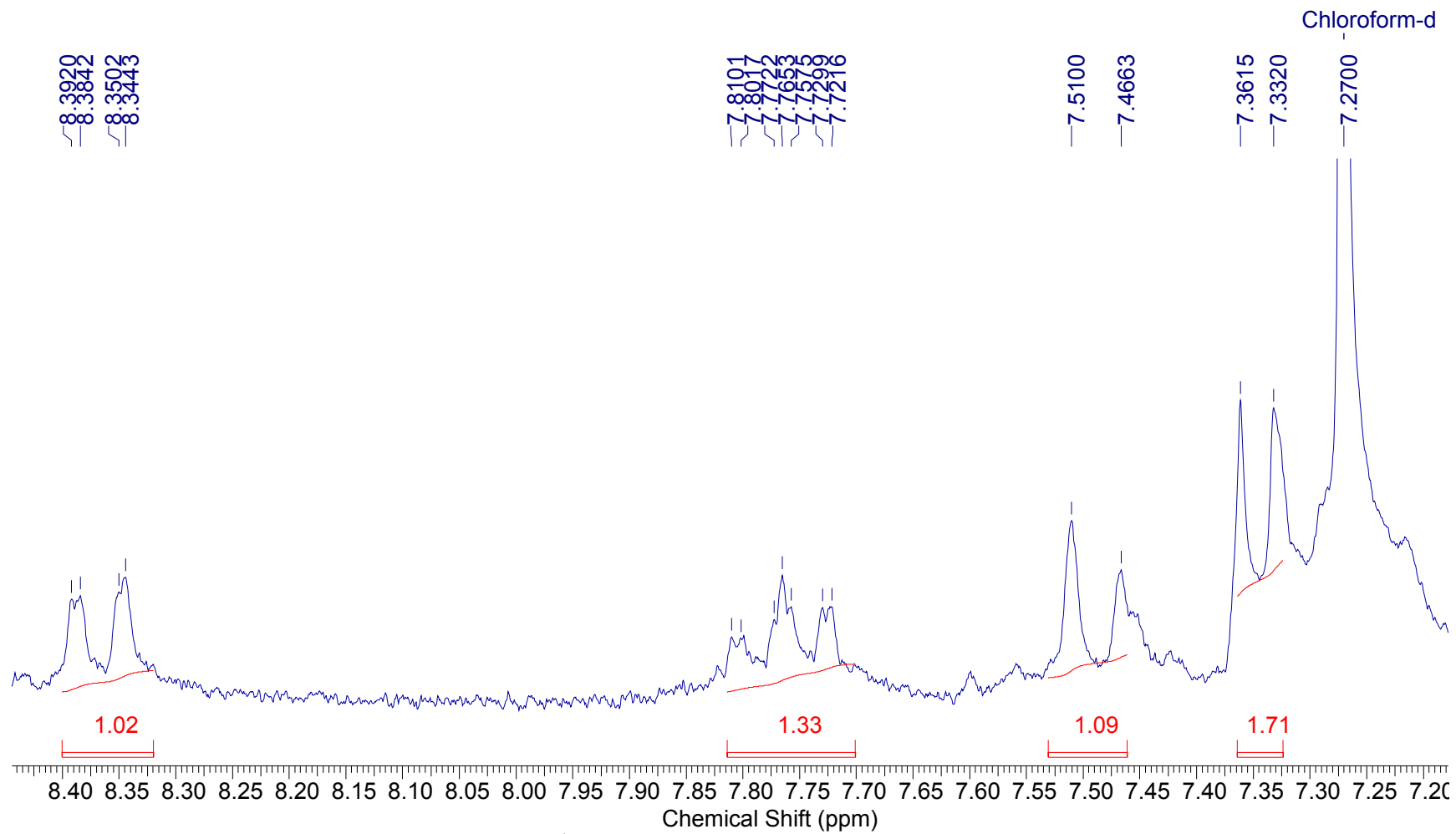


FIGURA 14.1 Expansão espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **04** ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).

SS

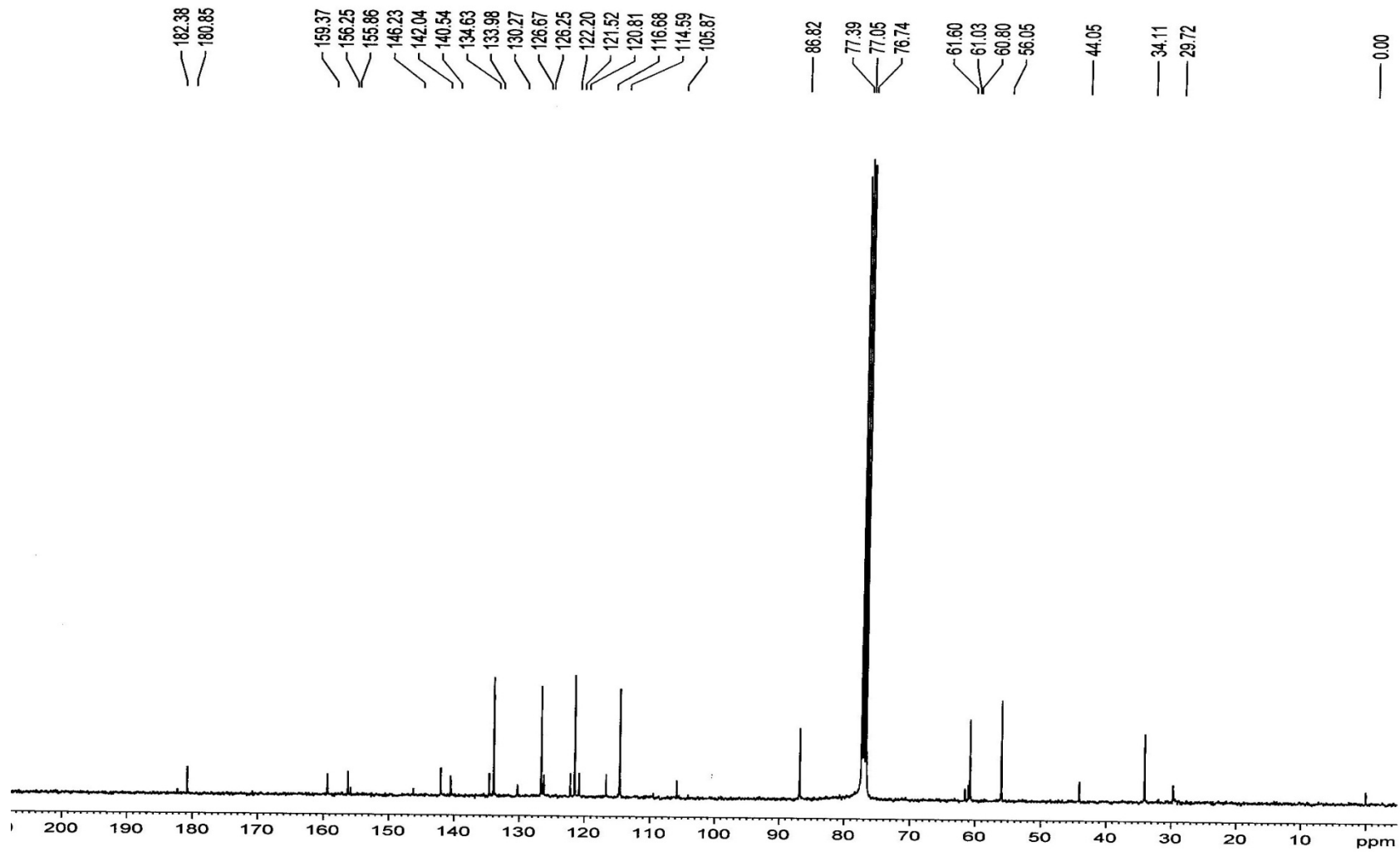


FIGURA 15- Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **02** ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz).



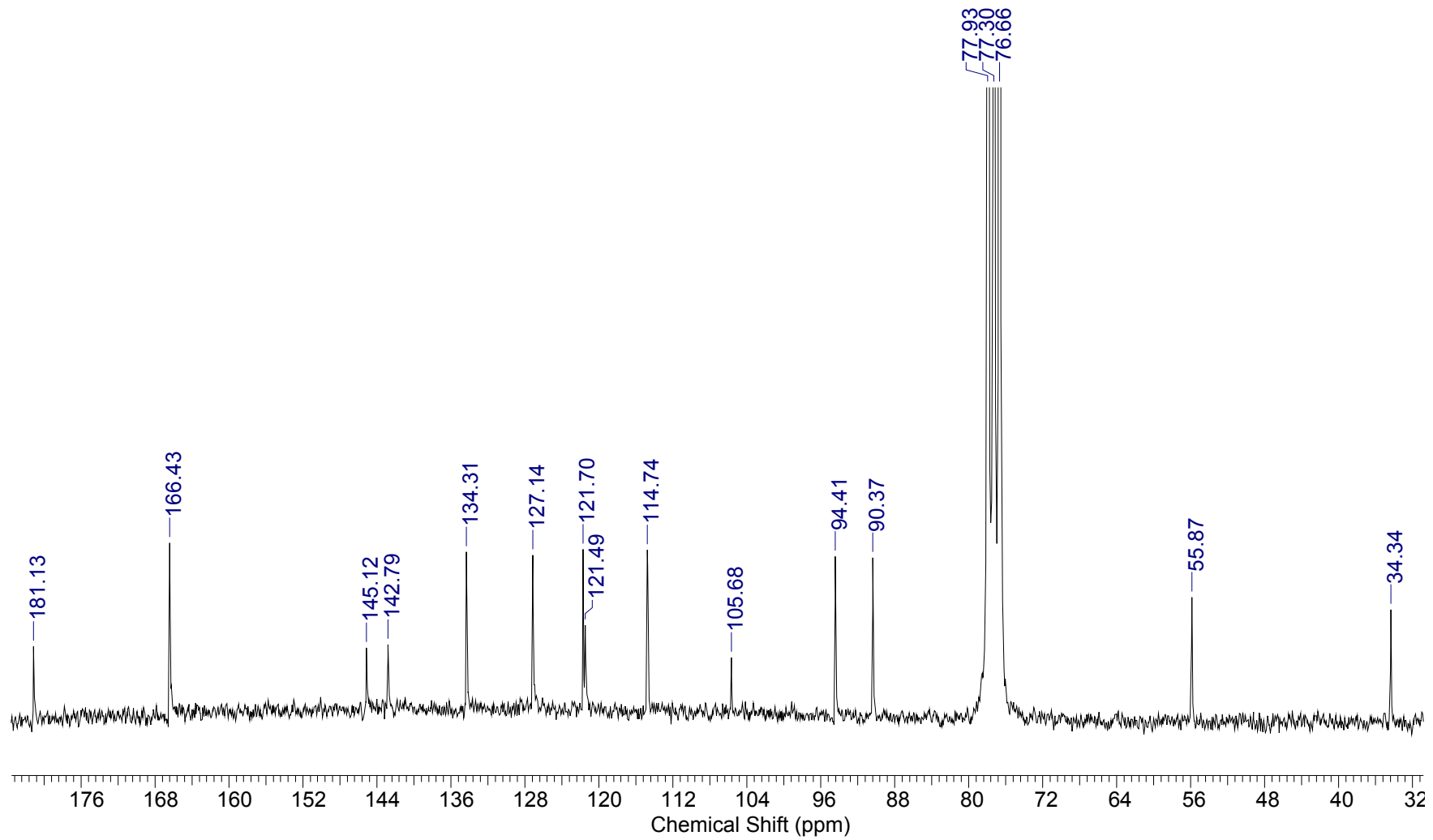


FIGURA 16- Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **03** ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz).

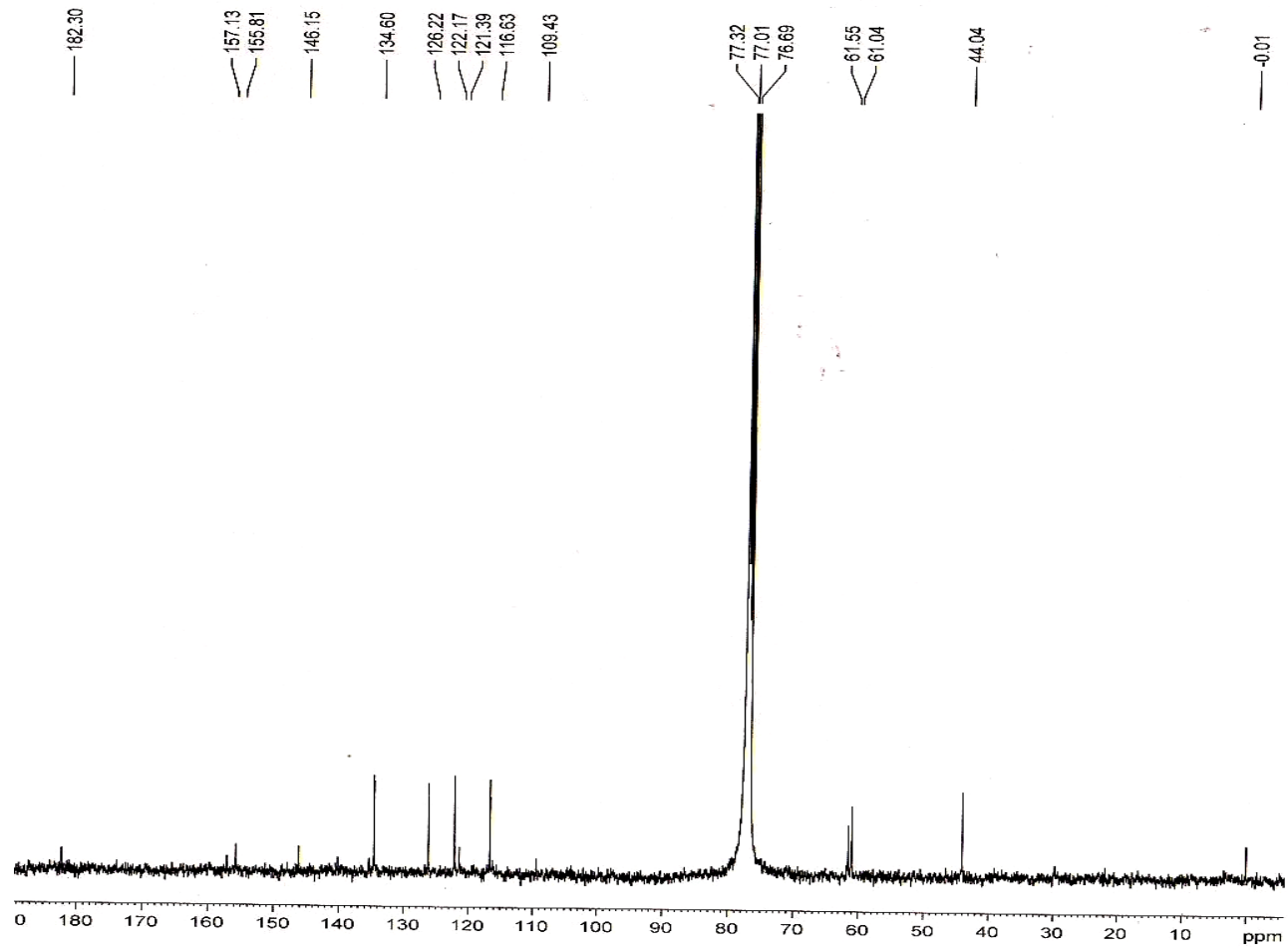


FIGURA 17- Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **04** ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz).

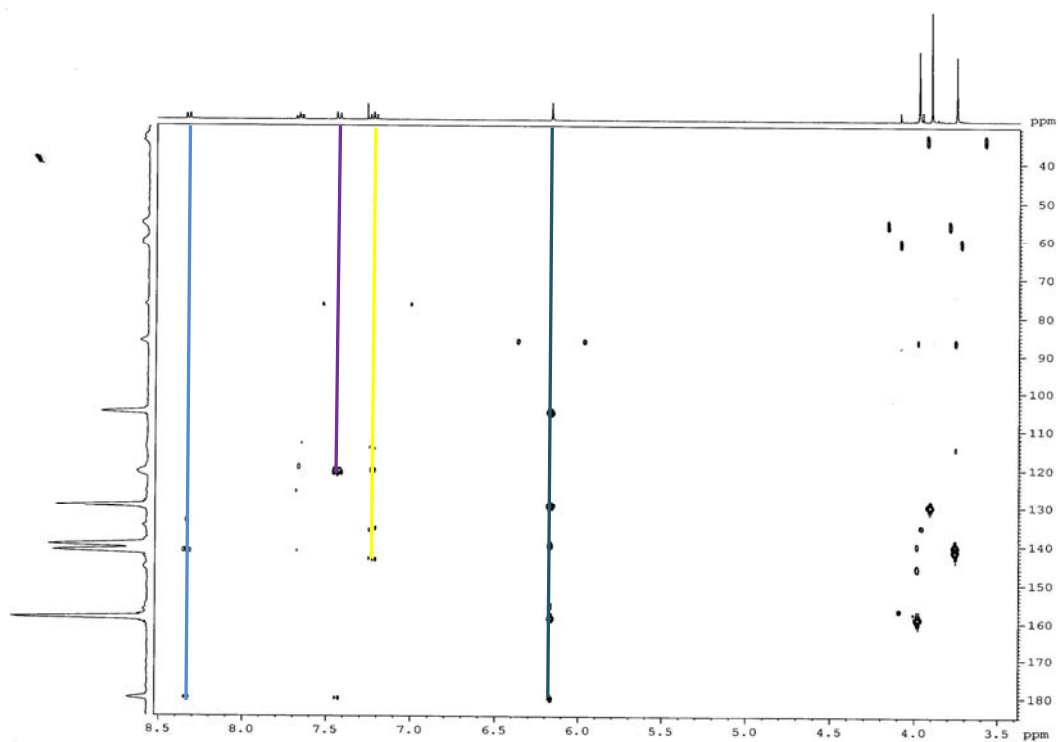


FIGURA 18- Mapa de correlações HMBC da substância **01** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

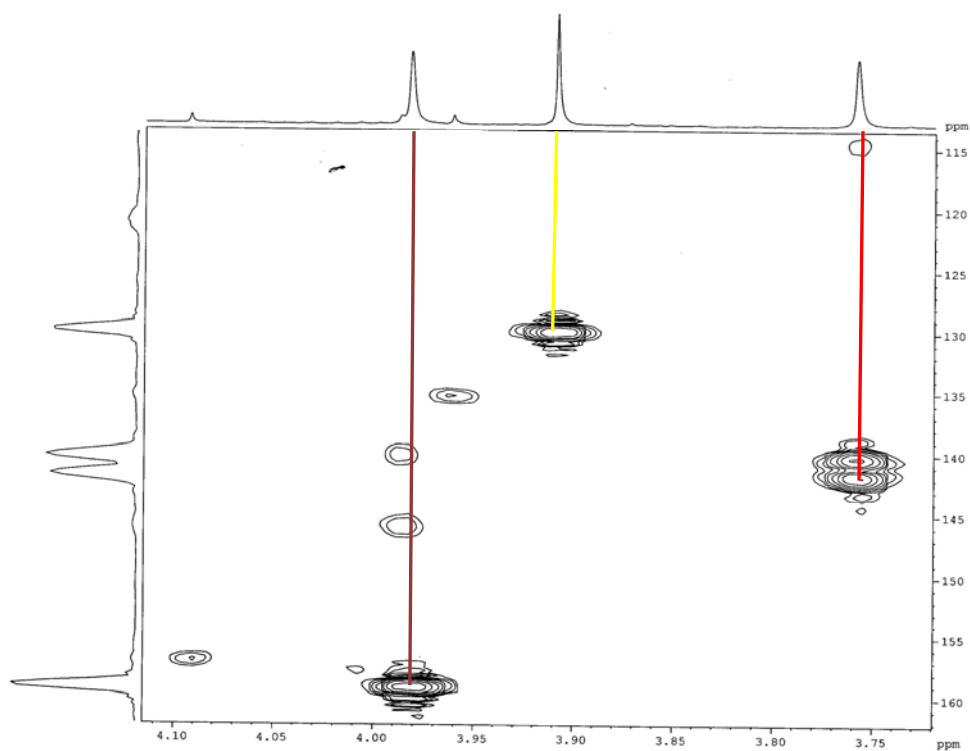


FIGURA **18.1**- Expansão do mapa de correlações HMBC da substância **01** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

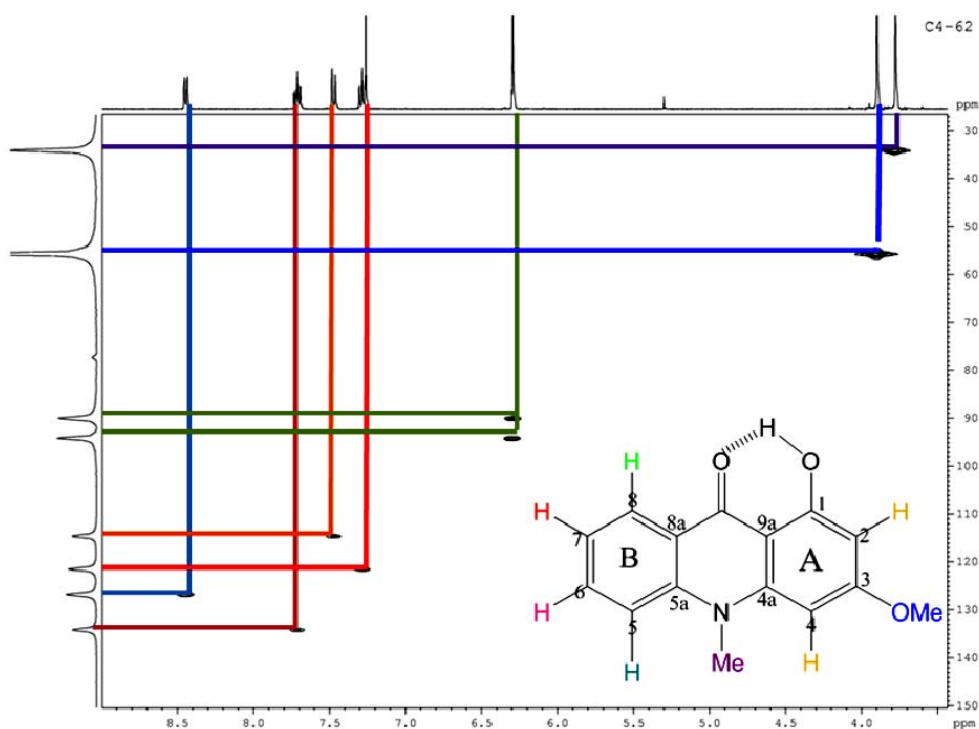


FIGURA 19- Mapa de correlação do HSQC da substância **03** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

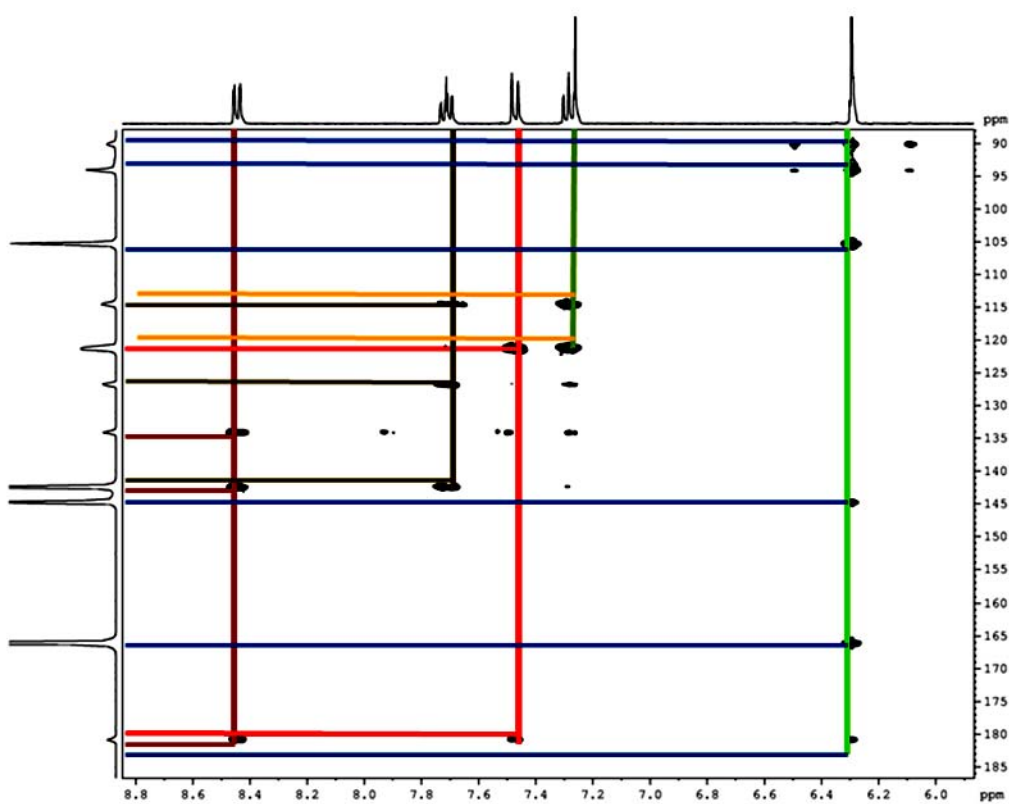


FIGURA 20- Mapa de correlação do HMBC da substância **03** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

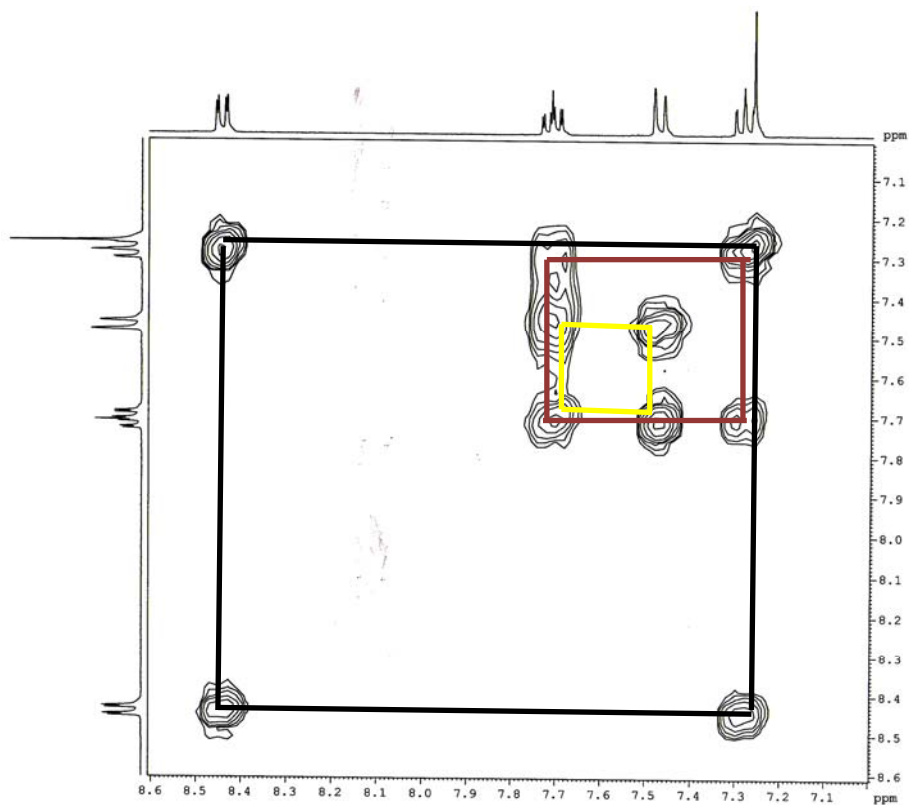


FIGURA 21-Espectro de correlação de COSY da substância **03** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

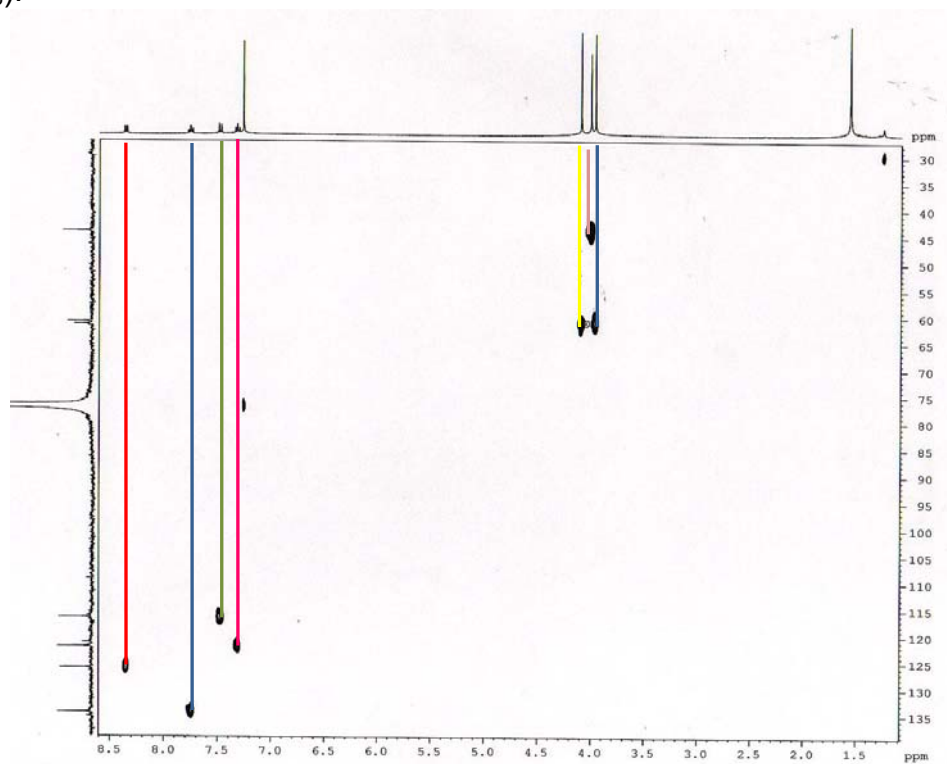


FIGURA 22- Mapa de correlação do HSQC da substância **04** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

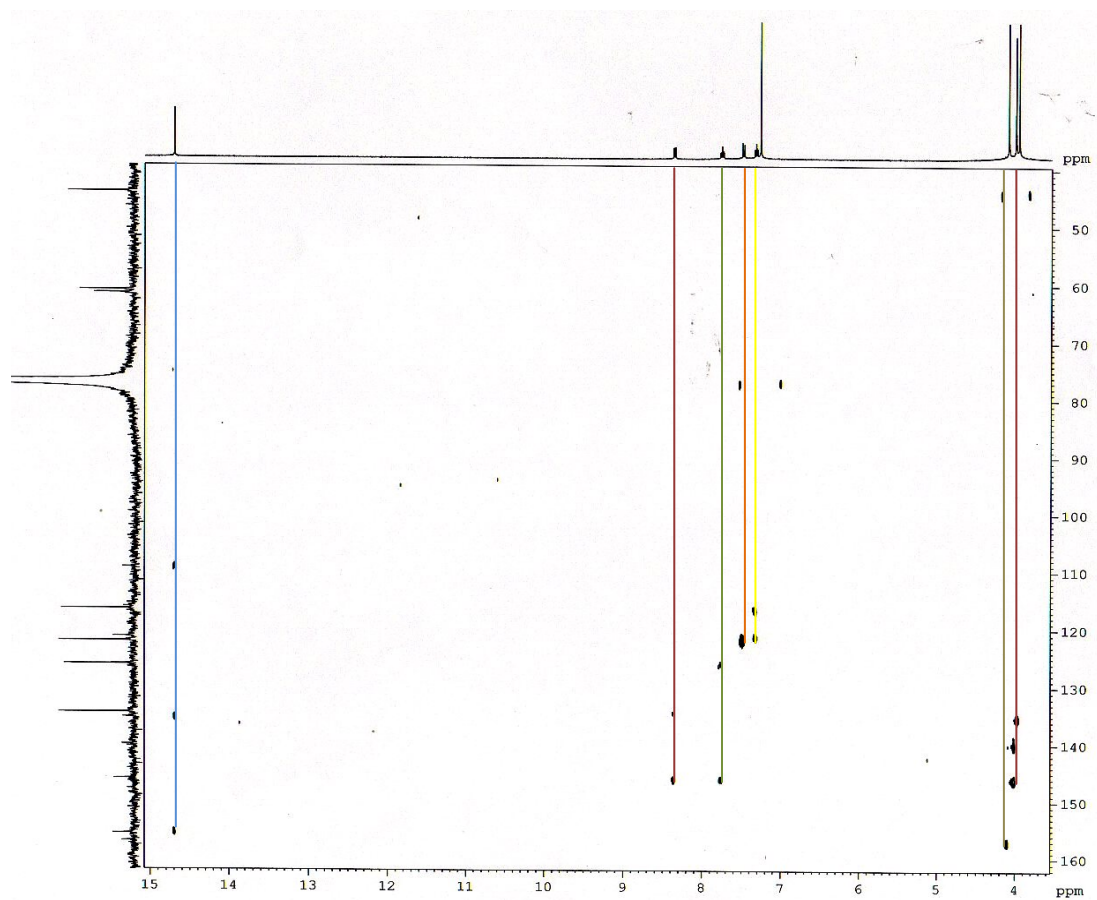


FIGURA 23- Mapa de correlação do HMBC da substância **04** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

TABELA 1 - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  para a substância **01** e **02** e comparação com a literatura.

	3-hidroxi-1,2-dimetoxi-N-metil-acridona ( <b>01</b> )		Arborinina( <b>02</b> )
Hidrogênio	Isolada <b>01</b> (a) $\delta$ (ppm)	Isolada <b>02</b> (a) $\delta$ (ppm)	AHSAN ET AL (1994) (b) $\delta$ (ppm)
2	-	-	6,54 (1H, <i>d</i> , 2,2 Hz)
4	6,19 (1H, <i>s</i> )	6,23 (1H, <i>s</i> )	6,48 (1H, <i>s</i> )
5	7,45 (1H, <i>dl</i> , 8,0 Hz)	7,50 (1H, <i>dl</i> , <i>J</i> = 8,0Hz)	6,96 (1H, <i>d</i> , 8,4 Hz)
6	7,68 (1H, <i>ddd</i> , 8,0; 6,8; 1,7Hz)	7,73 (1H, <i>ddd</i> , <i>J</i> = 8,0; 6,8 e 1,4 Hz)	7,52 (1H, <i>dd</i> , 8,4 e 8,0 Hz)
7	7,24 (1H, <i>ddd</i> , 8,0; 6,8; 0,9 Hz)	7,23 (1H, <i>ddd</i> , <i>J</i> = 8,0; 6,8 e 0,7 Hz)	6,81 (1H, <i>d</i> , 8,0 Hz)
8	8,37 (1H, <i>ddd</i> , 8,0; 1,7; 0,9 Hz)	8,42 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 8,0 e 1,4 Hz)	13,34(1H, <i>s</i> , OH)
62 N-Me	3,78 (3H, <i>s</i> )	3,81 (3H, <i>s</i> )	-
OMe (C1)	3,99 (3H, <i>s</i> )	3,92 (3H, <i>s</i> )	3,87 (3H, <i>s</i> )
OMe (C2)	3,91 (3H, <i>s</i> )	4,00 (3H, <i>s</i> )	3,97 (3H, <i>s</i> )
OMe (C3)	-	-	3,69(3H, <i>s</i> )
OH (C1)	-	-	13,44(1H, <i>s</i> )

(a) 200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ;

(b) 400 MHz, piridina- $d^5$  substância semelhante (1,8-dihidroxi-3-metoxi-9-acridanona).

TABELA 2-Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  para a substância **02** e comparação com a literatura.

Arborinina		
Carbono	Isolada (a)	MAFEZOLI, (2002) (b)
	$\delta$ (ppm)	$\delta$ (ppm)
1	156,2	155,7
2	130,2	129,9
3	159,3	159,1
4	86,8	86,7
5	114,5	114,5
6	134,6	133,7
7	121,5	121,2
8	126,2	126,0
9	180,8	180,4
4a	140,5	140,1
9a	105,8	105,3
8a	120,8	120,3
5a	142,0	141,6
N-Me	34,1	33,8
OMe (C-2)	60,8	60,6
OMe (C-3)	56,0	55,8

(a) 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ;

(b) 50 MHz,  $\text{CDCl}_3$



TABELA 3- Dados de RMN <sup>1</sup>H para a substância **03** e **04** e comparação com a literatura.

	1-hidroxi-3-metoxi- <i>N</i> -metilacridona ( <b>03</b> )	1,4-dihidroxi-2,3-dimetoxi- <i>N</i> -metilacridona ( <b>04</b> )	
Hidrogênio	Isolada <b>03</b> (a) δ (ppm)	Isolada <b>04</b> (a) δ (ppm)	AHSAN ET AL (1994) (b) δ (ppm)
2	6,3 (2H, s)	-	6,54 (1H, <i>d</i> , 2,2 Hz)
4	6,3 (2H, s)	6,19 (1H, s)	6,48 (1H, s)
5	7,40 (1H, <i>dl</i> , <i>J</i> =8,0Hz)	7,50 (1H, <i>dl</i> , <i>J</i> =8,7Hz)	6,96 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =8,4 Hz)
6	7,73 (1H, <i>ddd</i> , <i>J</i> =8,0; 7,2; 1,6Hz)	7,76 (1H, <i>ddd</i> , <i>J</i> =8,7; 7,5; 1,6 Hz)	7,52 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =8,4 e 8,0 Hz)
7	7,30 (1H, <i>ddd</i> , 8,0; 7,2; 1,6Hz)	7,30 (1H, <i>ddd</i> , <i>J</i> = 8,7; 7,5 e 1,6Hz)	6,81 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,0 Hz)
8	8,44 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =8,0 e 1,6Hz)	8,37 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =8,7; 1,6 Hz)	13,34(1H, s, OH)
N-Me	3,7 (3H, s)	3,78 (3H, s)	-
OMe (C1)	-	3,99 (3H, s)	3,87 (3H, s)
OMe (C2)	-	3,91 (3H, s)	3,97 (3H, s)
OMe (C3)	3,9 (3H, s)	-	3,69(3H, s)
OH	14,8 (1H, s)	-	13,44(1H,s)

(a) 200 MHz, CDCl<sub>3</sub>;(b) 400 MHz, piridina-*d*<sup>5</sup> substância semelhante (1,8-dihidroxi-3-metoxi-9-acridanona).

TABELA 4- Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  para a substância **03** e **04** e comparação com a literatura.

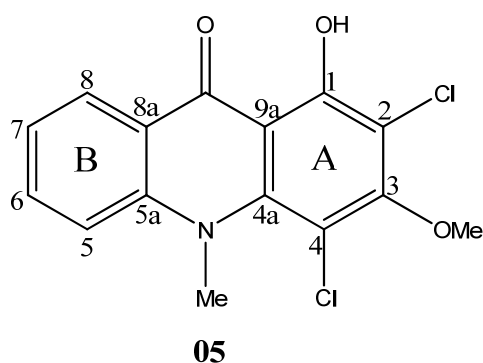
Carbono	1-hidroxi-3-metoxi- <i>N</i> -metilacridona ( <b>03</b> )		1,4-dihidroxi-2,3-dimetoxi- <i>N</i> -metilacridona ( <b>04</b> )
	Isolada <b>03</b> (a)	Isolada <b>04</b> (a)	AHSAN ET AL(1994) (b)
	$\delta$ (ppm)	$\delta$ (ppm)	$\delta$ (ppm)
1	166,0	155,8	167,2
2	94,1	134,7	96,3
3	166,1	140,0	164,5
4	90,1	151,5	90,3
5	114,4	116,6	106,6
6	134,1	134,6	136,6
7	121,4	122,1	107,6
8	126,7	126,2	162,8
9	180,0	182,3	185,1
4a	144,0	157,0	144,9
9a	105,0	109,4	104,6
8a	121,0	121,3	108,8
5a	142,0	146,1	143,3
N-Me	34,3	44,0	56,0
OMe (C-2)	-	61,0	-
OMe (C-3)	55,6	61,5	-

(a) 50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ;

(b) 100 MHz, piridina- $d^5$  substância semelhante (1,8-dihidroxi-3-metoxi-9-acridanona).

### 3.2.2 Determinação estrutural da substância 05

A substância **05** foi isolada como um sólido amarelo da fração FHRR proveniente das raízes da *R. graveolens*. A identificação da substância foi realizada através da análise dos experimentos RMN de  $^1\text{H}$ , de  $^{13}\text{C}$ , HMBC, e espectrometria de massas.



O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (FIGURA 24) p. 68, apresentou 4 sinais característicos de hidrogênios aromáticos em:  $\delta$  8,32 (1H, *dd*,  $J = 1,2$  e  $5,6$  Hz);  $\delta$  7,31 (1H, *t*,  $J = 5,6$  Hz);  $\delta$  7,74 (1H, *ddd*,  $J = 1,2$ ;  $5,6$  e  $10,0$  Hz) e  $\delta$  7,46 (1H, *d*,  $J = 5,6$  Hz) atribuídos aos hidrogênios do anel *orto* dissustituído, H-8, H-7, H-6 e H-5, respectivamente (TABELA 5) p. 73.

Foi atribuído ao hidrogênio da hidroxila em C-1 do anel A o sinal em  $\delta$  15,25 (1H, *s*) o qual se encontra quelado a carbonila em C9; o sinal em  $\delta$  3,97 (6H, *s*), referentes a OMe e a N-Me. Através do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , foi observado dois sinais de carbonos característicos de OMe e N-Me, o que confirma que o sinal de hidrogênio em  $\delta$  3,97 integrando para 6 hidrogênios. O padrão de substituição do anel A, foi confirmado pelo espectro de correlação bidimensional.

Analisando as correlações mostradas no espectro de HMBC (FIGURA 25) p 69, foi possível confirmar os acoplamentos do anel B e também afirmar o padrão de substituição do anel A.

Através do mapa de correlações HMBC, observou-se para o sinal em  $\delta$  3,97 três correlações com os carbonos em  $\delta$  142,6;  $\delta$  146,0 e  $\delta$  159,0; o sinal  $\delta$  15,25 correlaciona com os carbonos em  $\delta$  109,6;  $\delta$  159,0 e  $\delta$  181,8. Com essas informações de correlação do HMBC e com os resultados de deslocamento químico

de RMN de  $^1\text{H}$ , é possível atribuir às posições desses hidrogênios na molécula, e o sinal em  $\delta$  3,97 foi atribuído à OMe na posição 3. A substituição do anel A nas posições C-1 e C-3 podem ser confirmadas pela rota biossintética dos alcalóides acridônicos, que em Rutaceae, são derivados do ácido antranílico, onde as posições oxigenadas estão nos carbonos C-1 e C-3.

A princípio, não foi possível a determinação estrutural, analisando apenas os experimentos de RMN, devido a ausência de sinais para hidrogênios aromáticos, e assim inicialmente sugeriu-se a presença de duas hidroxilas como substituintes para as posições C-2 e C-4. Para determinar a estrutura foi realizado um experimento de CG-EM (FIGURA 26) pg. 69, a fim de observar a massa relativa e confirmar sua fórmula molecular. Entretanto, foi observado o pico do íon molecular com massa  $m/z$  323, que não correspondia a presença de duas hidroxilas na molécula. Assim, avaliando o que foi apresentado, observou-se a presença de picos  $[\text{M}+2]$  e  $[\text{M}+4]$  bem significativos, com intensidades relativas de aproximadamente 65,8% e 13,6%, respectivamente, que indicam a presença de dois átomos de cloro na molécula.

Quando observado o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (FIGURA 27) p. 71, foi possível relacionar aos carbonos desblindados da posição C-2 e C-4 a possível presença de retiradores de densidade eletrônica, como os átomos de cloro.

Por se tratar de um metabólito secundário incomum em plantas, tomou-se o cuidado de certificar-se a presença desses átomos de cloro através do espectro de massas por APCI (Ionização Química a Pressão Atmosférica) no modo positivo (FIGURA 28) p. 72, monitorando o pico referente à  $m/z$  323 $[\text{M}+\text{H}]^+$  e obtendo-se a simulação do padrão isotópico do mesmo, assim é observado no espectro um pico referente ao isótopo  $[\text{M}+\text{H}+2]$  e  $[\text{M}+\text{H}+4]$  que apresentou um *cluster* característico de  $\text{Cl}_2$ , comprovando que a estrutura apresenta dois átomos de cloro. Nesse mesmo espectro foi observado um fragmento de  $m/z$  15da que se acredita ser da metila ligada ao nitrogênio. Isso ocorreu porque a molécula sofreu ionização na fonte, o que assegura que a ionização ocorreu no átomo de nitrogênio. Portanto, a substância **05** foi identificada como 3,4-dicloro-1-hidroxi-2-metoxi-*N*-metilacridona.

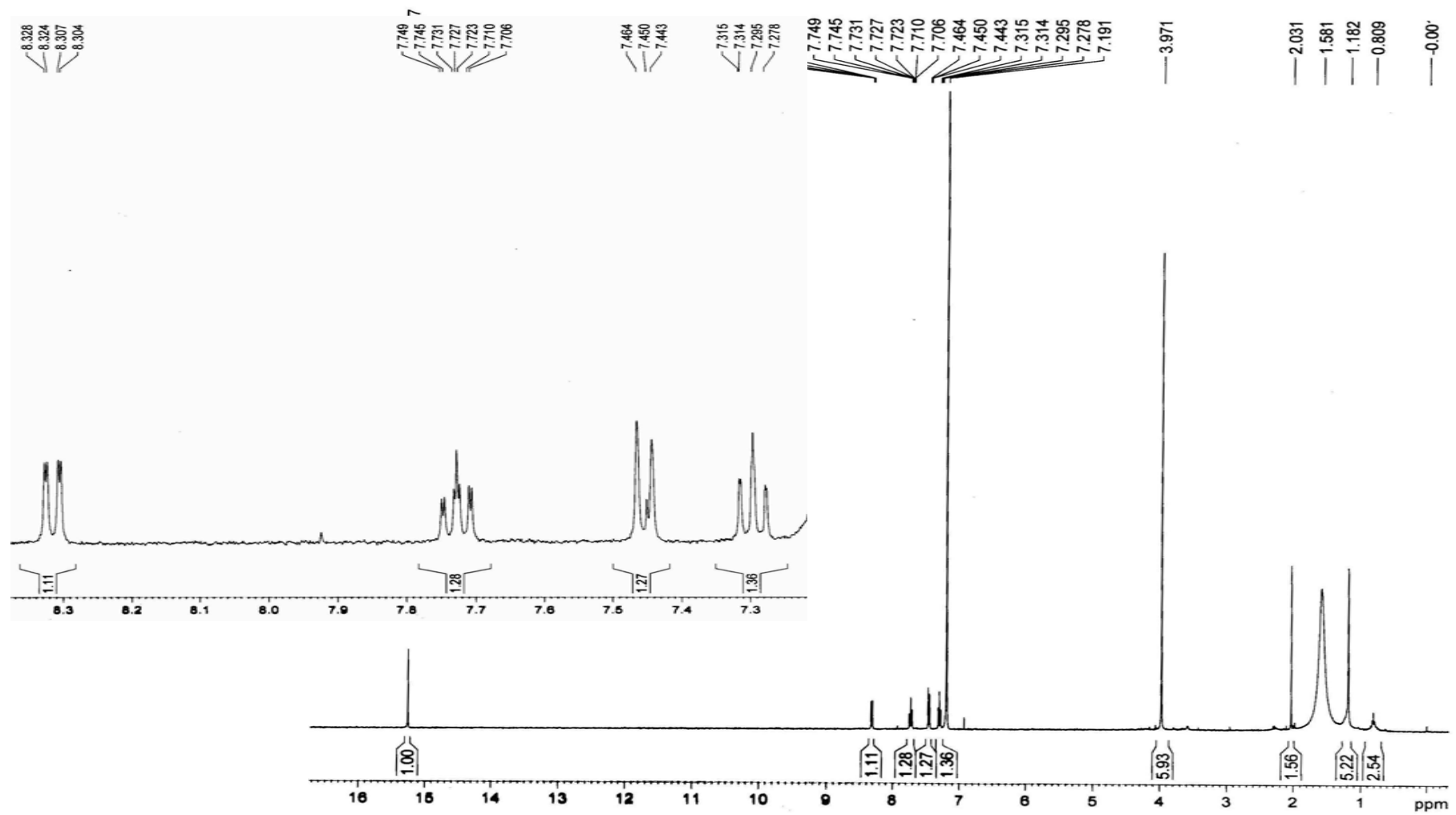


FIGURA 24- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **05** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

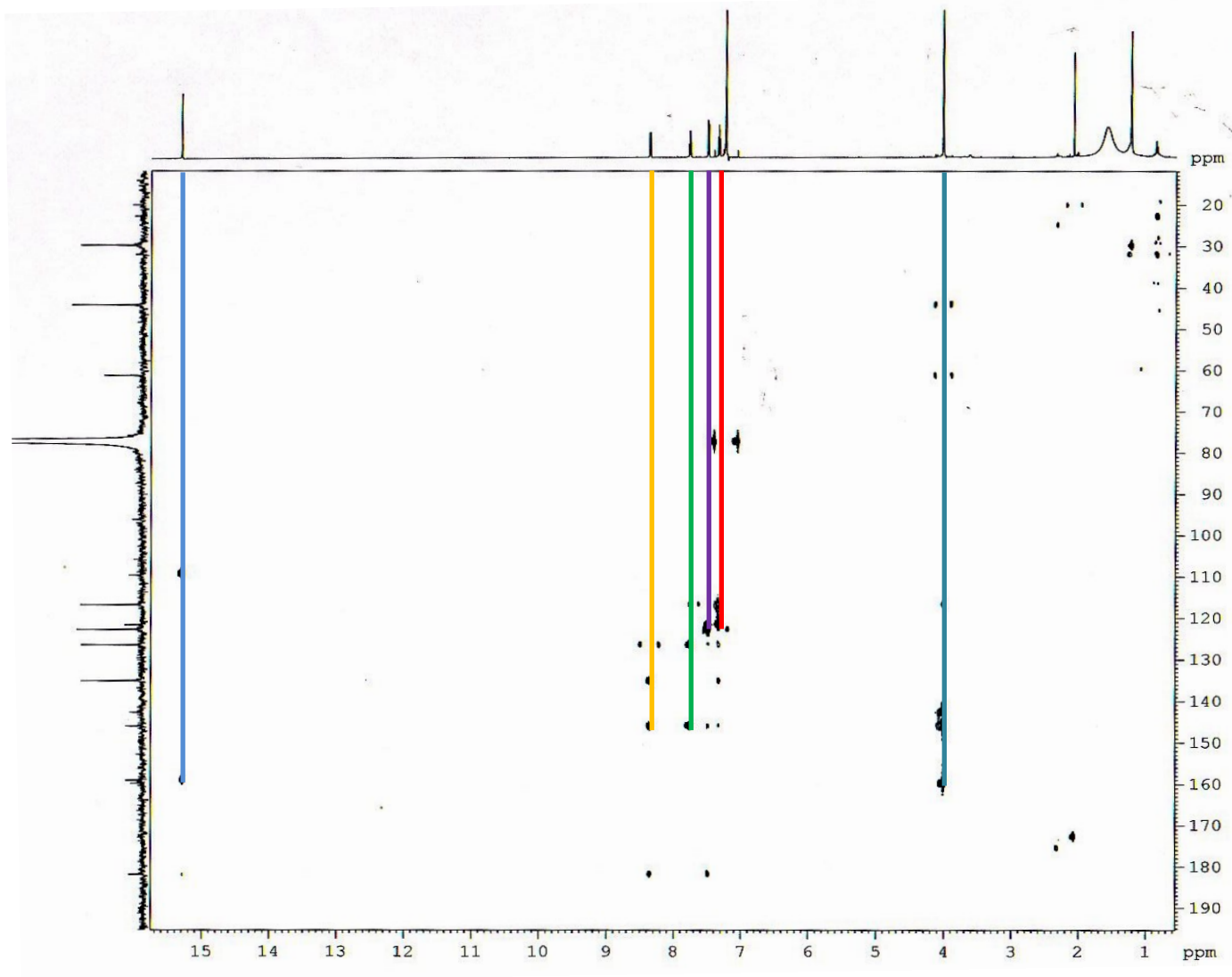


FIGURA 25- Mapa de correlação do HMBC da substância **05** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

R. Time: 16.7(Scan#:1583)  
MassPeaks:151  
Group 1 - Event 1

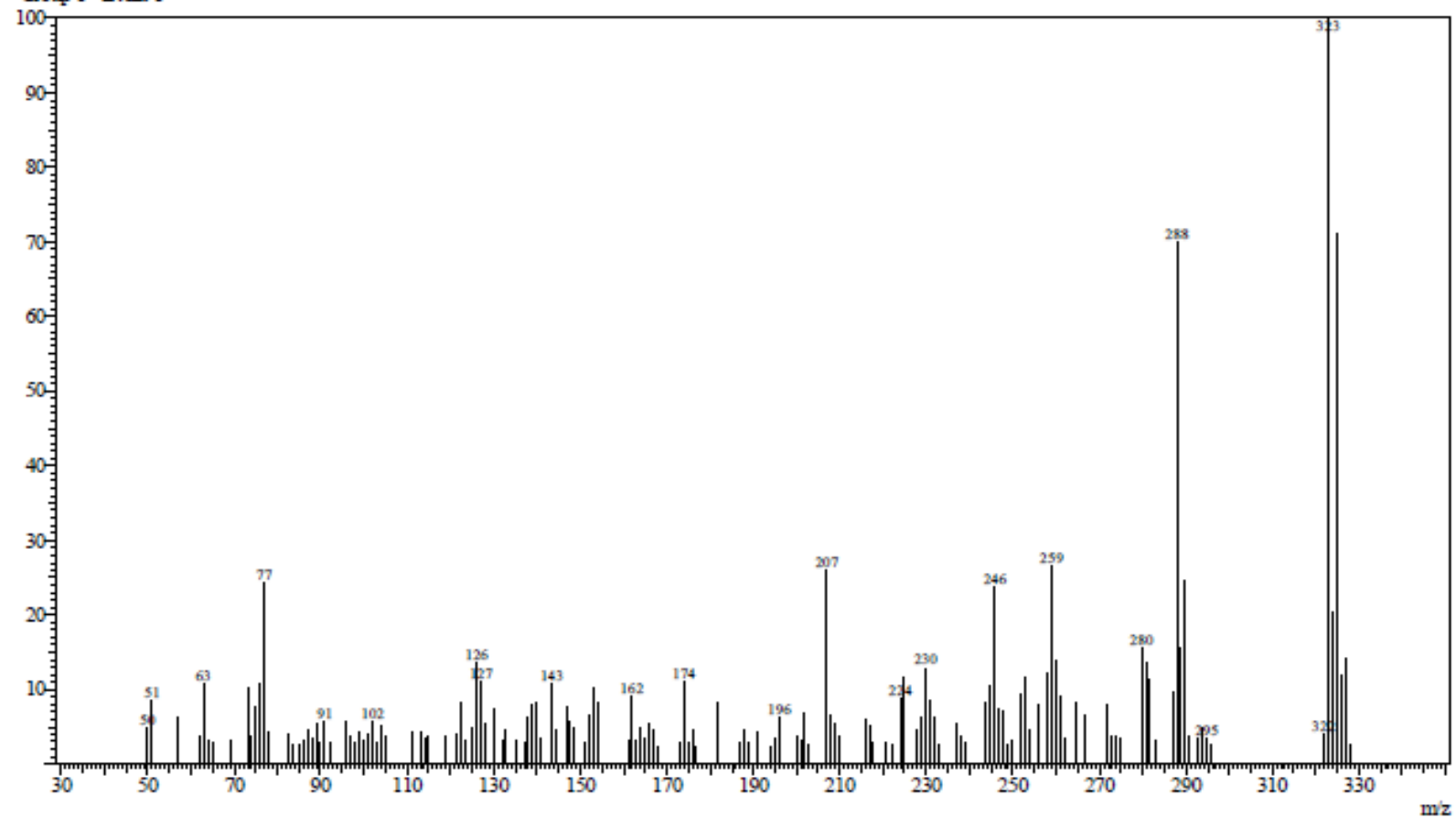


FIGURA 26- Espectro de massas da substância **05**,  $m/z$  323 (IE, 70eV).

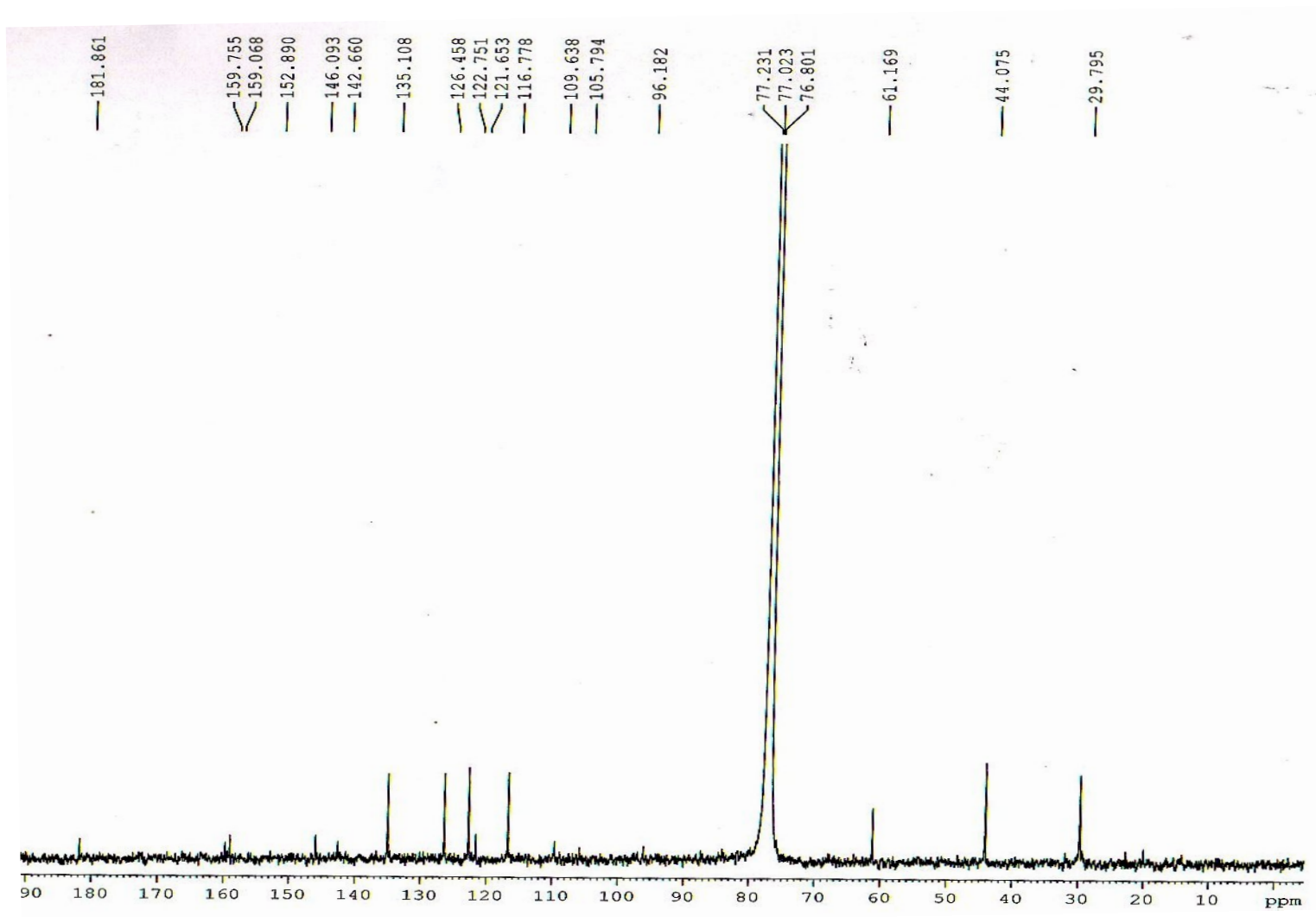


FIGURA 27- Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **05** ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz).



+Q1: 238 MCA scans from Sample 2 (alcaloide A) of alcaloide.wiff (Heated Nebulizer)

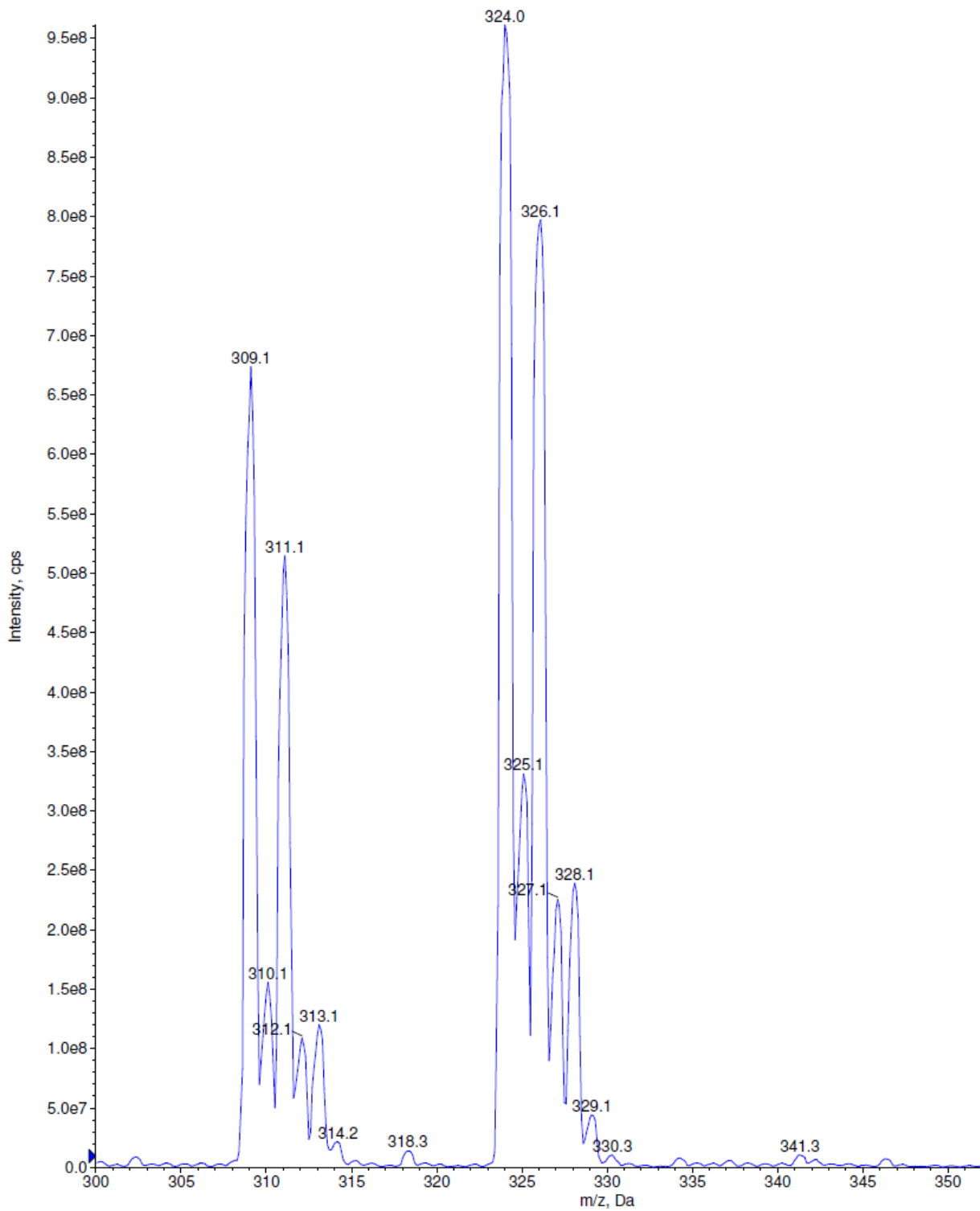


FIGURA 28- Espectro de isótopos da substância **05**,  $m/z$  323 (APCI).

TABELA 5 - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  para a substância **05**.

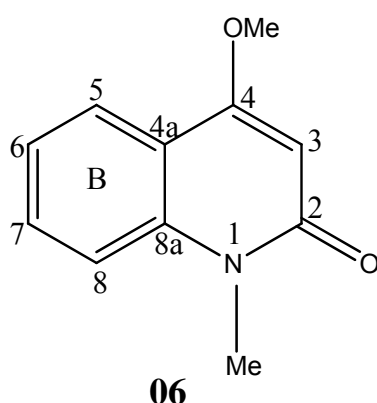
3,4-dicloro-1-hidroxi-2-metoxi- <i>N</i> -metilacridona		
Hidrogênio/ Carbono	Isolada (a)	Isolada (b)
	H $\delta$ (ppm)	C $\delta$ (ppm)
1	-	159,0
2	-	146,0
3	-	159,7
4	-	142,6
5	7,46 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 5,6 Hz)	116,7
6	7,74 (1H, <i>ddd</i> , <i>J</i> = 1,2; 5,6 e 10,0 Hz)	121,6
7	7,31 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 5,6 Hz)	135,1
8	8,32 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 1,2; e 5,6 Hz)	126,1
9	-	181,8
4a	-	105,7
9a	-	109,6
8a	-	122,7
5a	-	146,2
N-Me	3,97 (3H, <i>s</i> )	41,0
OMe (C-2)	3,97 (3H, <i>s</i> )	61,1
OH	15,25 (1H, <i>s</i> )	-

(a) 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ;

(b) 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ .

### 3.2.3 Identificação estrutural da substância 06

A substância **06** é um alcalóide quinolônico isolado como um sólido amarelo a partir da fração FDRF, proveniente das partes aéreas da *R. graveolens*. Quando submetido à radiação UV em CCDA apresentou absorção nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm. A identificação da substância foi realizada através da análise dos experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (FIGURAS 29 e 30) p. 76 e 77, e por comparação com dados da literatura (SAYED ET AL, 2000).



Analisando o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  p. 76, foi possível observar sinais de hidrogênios na região de aromáticos em  $\delta$  7,96 (1H, *dd*,  $J= 8,0$  e  $1,5$  Hz),  $\delta$  7,21 (1H, *ddd*,  $J= 8,0; 7,1$  e  $1,5$  Hz),  $\delta$  7,58 (1H, *ddd*,  $J= 8,0; 7,1$  e  $1,5$  Hz), e  $\delta$  7,34 (1H, *dl*,  $J= 8,0$  Hz) correspondendo aos hidrogênios H-5, H-6, H7 e H-8 do anel B. Os valores das constantes de acoplamento juntamente com as multiplicidades encontradas para estes sinais sugerem o acoplamento entre os hidrogênios H-5 com o H-6 e H-7 em *orto* e *meta*, respectivamente, de H-6 com H-5 e H-7 em *orto* e com H-8 em *meta*. O hidrogênio H-7 acopla com H-6 e H-8 em *orto* e com H-5 em *meta*, e o H-8 em *orto* com H-7.

Foi observado um sinal em  $\delta$  3,92 (3H, *s*) característico de metoxila, encontrado na posição C-4 de alcalóides quinolônicos, e em  $\delta$  3,64 (3H, *s*) de metila ligada a nitrogênio. O sinal em  $\delta$  6,05 (1H, *s*) foi atribuído ao H-3, e é característico de hidrogênio olefínico.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  p. 77, apresentou sinais referentes a 11 carbonos. Os sinais em  $\delta$  55,6 e em  $\delta$  28,8 confirmam a presença de uma metoxila e de uma metila ligada a nitrogênio.

Portanto, através dos dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e por comparação com a literatura, foi confirmado que a substância **06** é o alcalóide *N*-metil-4-metoxi-2-quinolona, o qual é amplamente distribuído em plantas da família *Rutaceae*.

Os dados da análise dos experimentos RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da substância **06** estão representados nas (TABELAS 6 e 7) pgs. 78 e 79.

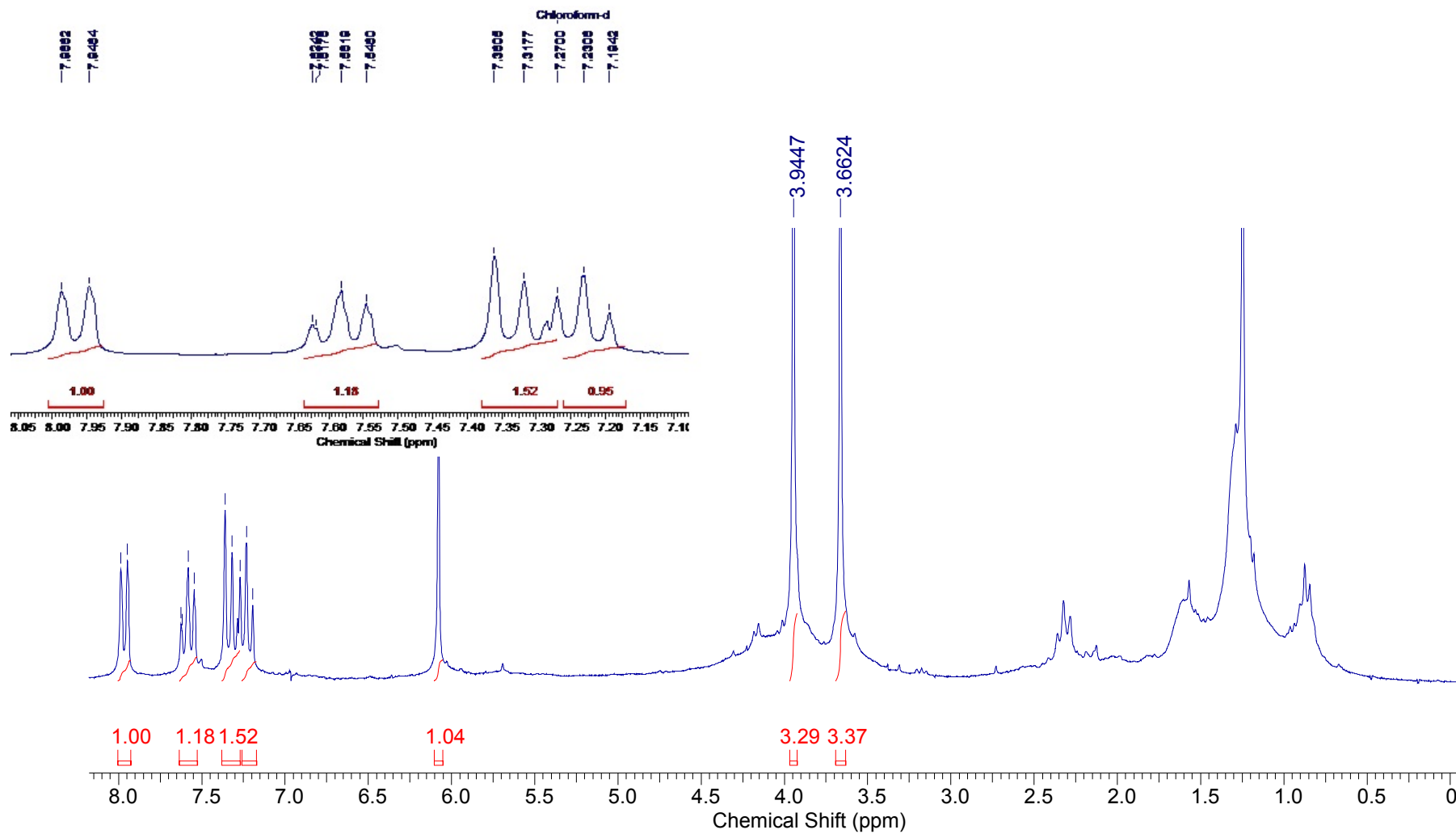


FIGURA 29- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **06** ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).

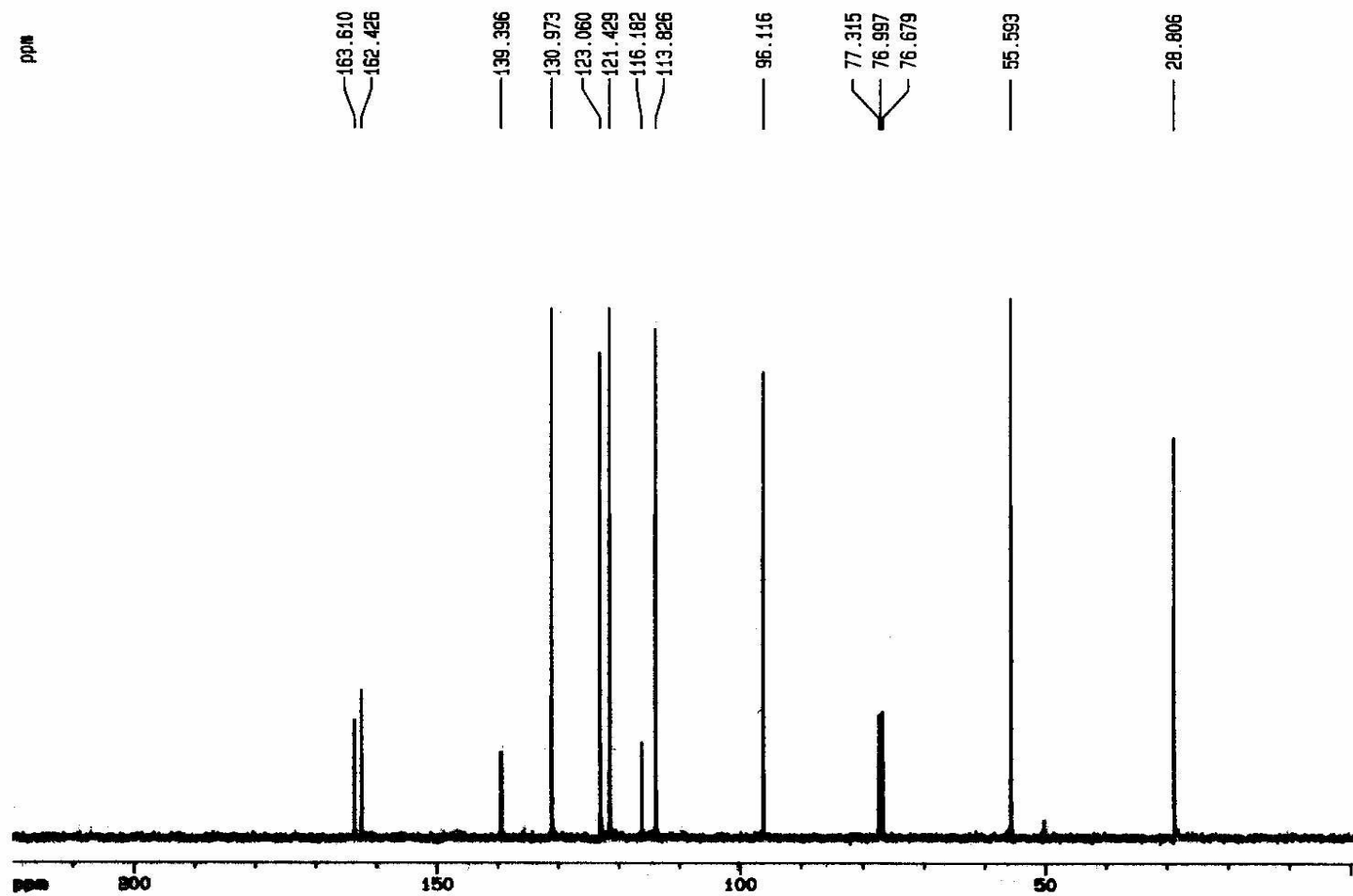


FIGURA 30- Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz) da substância **06**.

TABELA 6 - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  para a substância **06** e comparação com a literatura.

<i>N</i> -metil-4-metoxi-2-quinolona		
Hidrogênio	Isolada (a)	SAYED ET AL, 2000 (b)
	$\delta$ (ppm)	$\delta$ (ppm)
3	6,23 (1H, s)	6,64 (1H, s)
5	7,96 (1H, <i>dd</i> , $J= 8,0$ e $1,5$ Hz)	8,16 (1H, <i>dd</i> , $J= 7,5$ e $0,8$ Hz)
6	7,21 (1H, <i>ddd</i> , $J= 8,0$ ; $7,1$ e $1,5$ Hz)	7,46 (1H, <i>ddd</i> , $J= 7,0$ ; $7,2$ e $0,8$ Hz)
7	7,58 (1H, <i>ddd</i> , $J= 8,0$ ; $7,1$ e $1,5$ Hz)	7,68 (1H, <i>ddd</i> , $J= 8,3$ ; $7,0$ e $1,4$ Hz)
8	7,34 (1H, <i>dl</i> , $J= 8,0$ Hz)	8,0 (1H, <i>d</i> , $J= 7,4$ Hz)
N-Me	3,64 (3H, s)	-
OMe (C4)	3,92 (3H, s)	4,05 (3H, s)

(a) 200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ;

(b) 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , substância semelhante (2{6'-(2H-benzo[d]1",3"-dioxolen-5"-il)hexil}4-metoxi-quinolona).

TABELA 7 - Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  para a substância **06** e comparação com a literatura.

<i>N</i> -metil-4-metoxi-2-quinolona		
Carbono	Isolada (a)	ALBARICI, 2006 (b)
	$\delta$ (ppm)	$\delta$ (ppm)
2	163,6	163,8
3	96,1	96,5
4	162,4	162,7
4a	116,2	116,5
5	123,1	123,3
6	121,4	121,6
7	131,0	131,2
8	113,8	114,0
8a	139,4	139,8
N-Me	28,8	29,0
OMe (C3)	55,6	55,7

(a) 50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ;

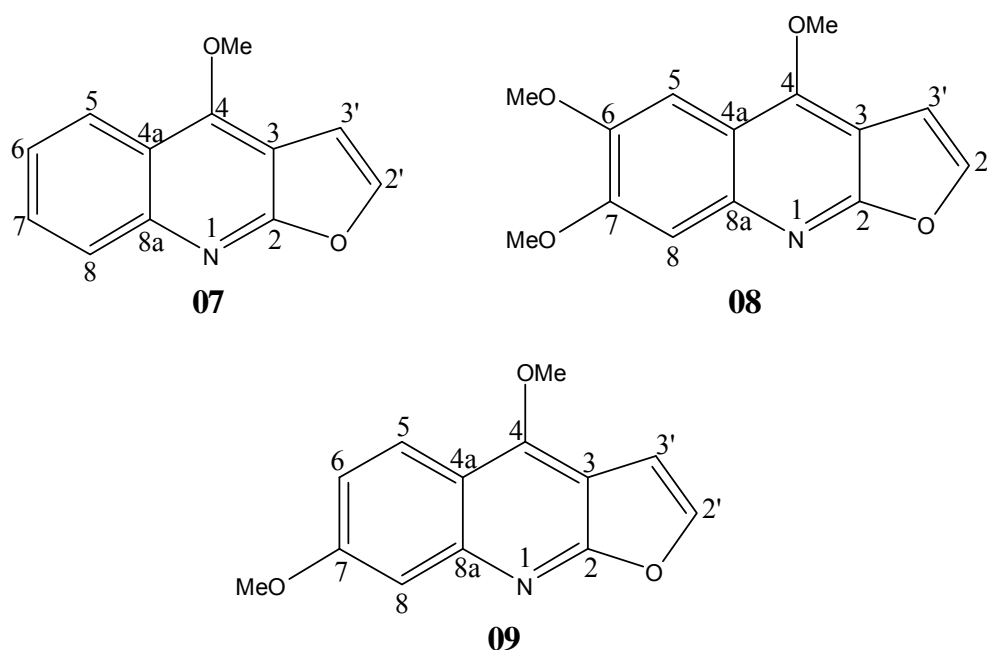
(b) 50 MHz,  $\text{CDCl}_3$



### 3.2.4 Identificação estrutural das substâncias 07 a 09

Os alcalóides furoquinolínicos quando isolados apresentam-se como sólidos amorfos e são caracterizados pela presença de um sistema furânico em sua estrutura. Nos alcalóides furoquinolínicos que apresentam mais de um grupo metoxila, uma delas aparece na região desblindada entre  $\delta$  4,00-5,00, se comparado com outras que se encontram próximas de  $\delta$  4,00. Esse sinal desblindado é atribuído aos hidrogênios 4-OMe devido ao efeito retirador de elétrons ocasionado pelo nitrogênio em hibridação  $sp^2$  (SIMOTE, 2006).

As substâncias **07** e **08** foram obtidas da fração FDRF a substância **09** obtida da fração FHRR. As substâncias foram identificadas por meio de experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  e por comparação com a literatura (TABELAS 8 e 9) pgs. 89 e 90.



Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das substâncias **07**, **08** e **09** (FIGURA 31-33) p. 83, 84 e 85, apresentaram sinais de deslocamento químico característicos de um anel furano dissustituído, dois dubletos com sinais em  $\delta$  7,63 (1H, *d*,  $J = 2,8\text{Hz}$ ) e em  $\delta$  7,09 (1H, *d*,  $J = 2,8\text{ Hz}$ ) para a substância **07**;  $\delta$  7,51 (1H, *d*,  $J = 3,2\text{Hz}$ ) e em  $\delta$  6,98 (1H, *d*,  $J = 3,2\text{Hz}$ ) para a substância **08**; em  $\delta$  7,85(1H, *d*,  $J = 2,6\text{Hz}$ ) e em  $\delta$  7,35

(1H, *d*,  $J = 2,6\text{Hz}$ ) para a substância **09**; referentes aos hidrogênios H-2'e H-3', respectivamente.

Para a substância **07**, foi observado hidrogênios aromáticos em  $\delta$  8,02 (1H, *dl*,  $J = 8,5\text{ Hz}$ ), em  $\delta$  7,69 (1H, *ddd*,  $J = 8,4; 6,8; 1,0\text{Hz}$ ) e em  $\delta$  7,45 (1H, *ddd*,  $J = 8,4; 6,8; 1,0\text{Hz}$ ), em  $\delta$  8,28 (1H, *dd*,  $J = 8,4; 1,5\text{ Hz}$ ), referente aos hidrogênios H-8, H-7, H-6 e H-5 respectivamente. O singleto em  $\delta$  4,41 (3H, *s*) foi atribuído a metoxila na posição C-4.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (FIGURA 34) p. 86, da substância **07** mostrou a presença de 12 sinais, sendo cinco carbonos quaternários (C-2, C-3, C-4, C-4a e C-8a). O sinal em  $\delta$  156,9 foi atribuído ao carbono C-4 pelo valor de deslocamento químico e o sinal em  $\delta$  59,9 ao carbono da metoxila. A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  juntamente com dados da literatura (HONGWEI ET AL, 2010), permitiu identificar a substância **07** como sendo o alcalóide dictamina.

A substância **08** apresentou um padrão de substituição diferente da substância **07** descrita anteriormente. O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  mostrou sinais em  $\delta$  7,39 (1H, *s*) e  $\delta$  7,29 (1H, *s*) atribuídos aos hidrogênios H-5 e H-8 respectivamente. Outros três sinais em  $\delta$  4,37 (3H, *s*), em  $\delta$  3,96 (3H, *s*) e em  $\delta$  3,98 (3H, *s*), característicos de metoxilas, foram atribuídos às posições C-4, C-6 e C-7, respectivamente.

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (FIGURA 35) p. 87, foram observados 13 sinais, sendo três atribuídos às metoxilas em  $\delta$  55,9;  $\delta$  56,0;  $\delta$  58,9; dois carbonos CH em  $\delta$  104,6 e  $\delta$  142,2 e os outros oito sinais são de carbonos totalmente substituídos, que somados aos dados anteriores e por comparação com a literatura, levam a concluir que a substância **08** é o alcalóide kokusaginina.

Para a substância **09**, foram observados sinais de deslocamento químico de hidrogênios aromáticos em  $\delta$  7,54 (1H, *d*,  $J = 2,96\text{ Hz}$ ),  $\delta$  7,37 (1H, *dd*,  $J = 1,0; 9,1\text{Hz}$ ) e em  $\delta$  7,83 (1H, *d*,  $J = 9,1\text{Hz}$ ), referente aos H-8, H-6 e H-5, respectivamente. A presença de dois singletos em  $\delta$  4,51 (3H, *s*) e em  $\delta$  3,92 (3H, *s*) foram atribuídos às metoxilas nas posições C-4 e C-7.

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (FIGURA 36) p. 88, foram observados 13 sinais, sendo que o  $\delta$  56,2 e  $\delta$  60,2 foram atribuídos às metoxilas e somados aos dados anteriores e ao espectro de massas, o qual apresentou o pico do íon molecular em

*m/z* 229, e por comparação com a literatura, foi concluído que a substância **09** é o alcalóide evolitrina.

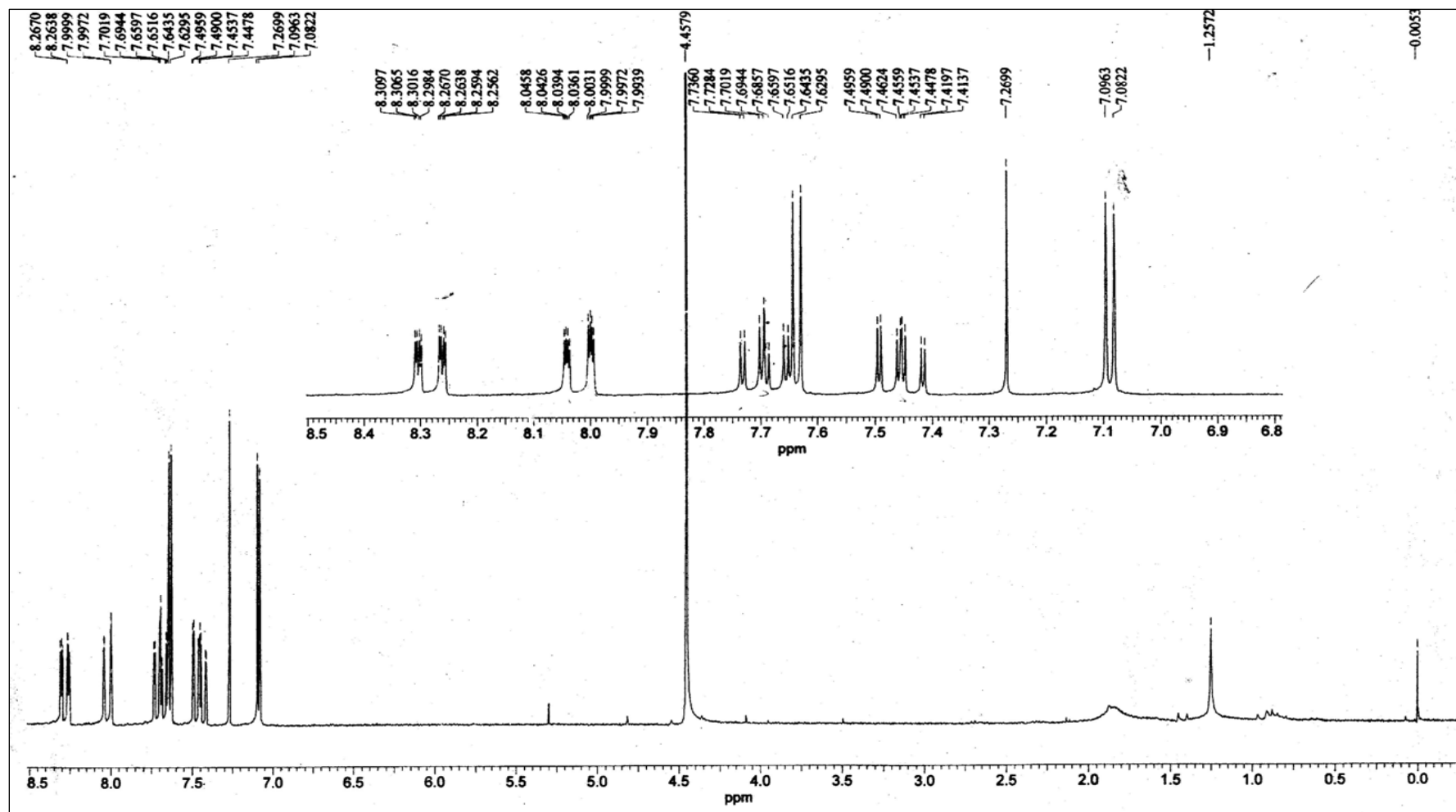


FIGURA 31- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **07**, (200MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

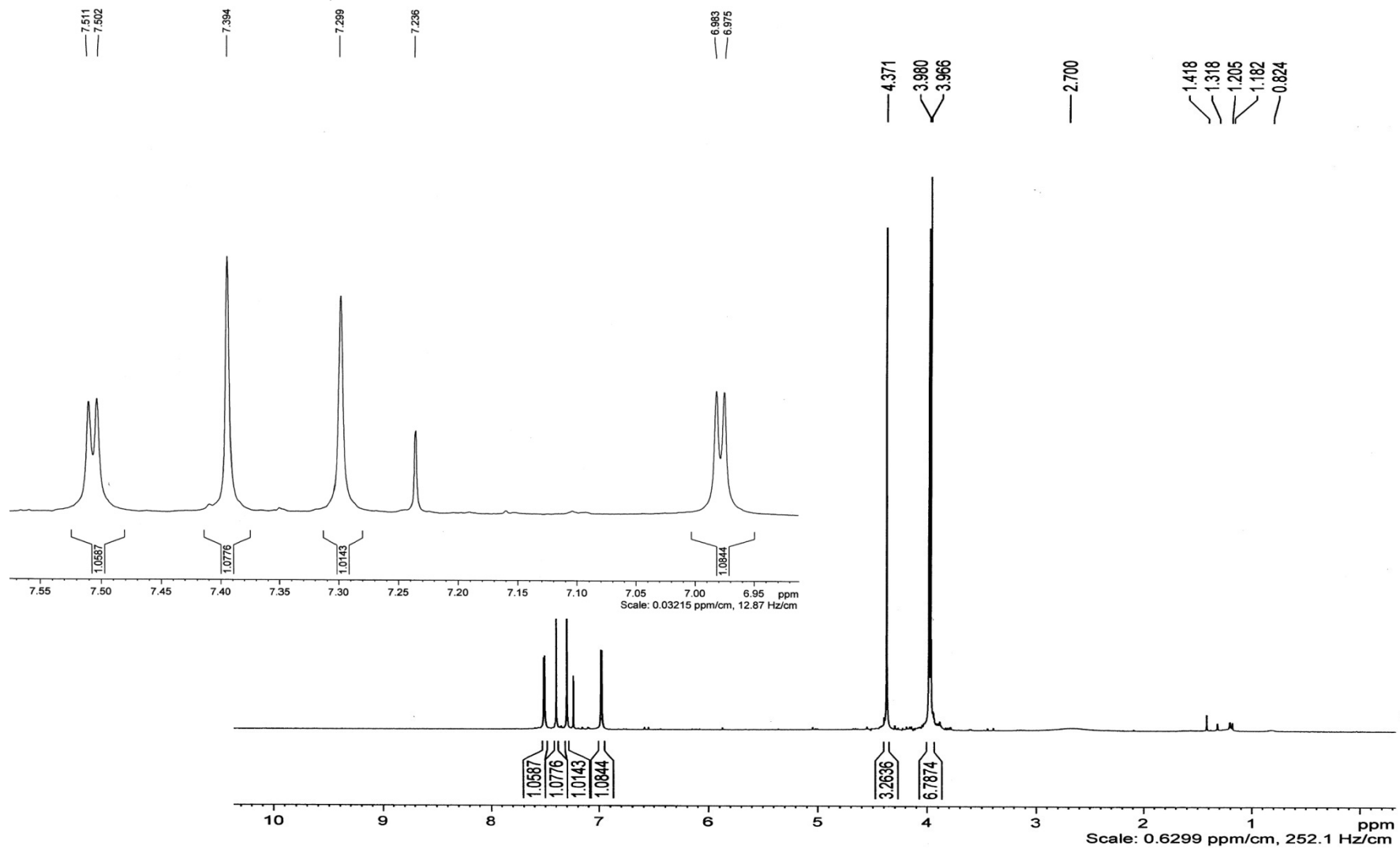


FIGURA 32- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância **08**.

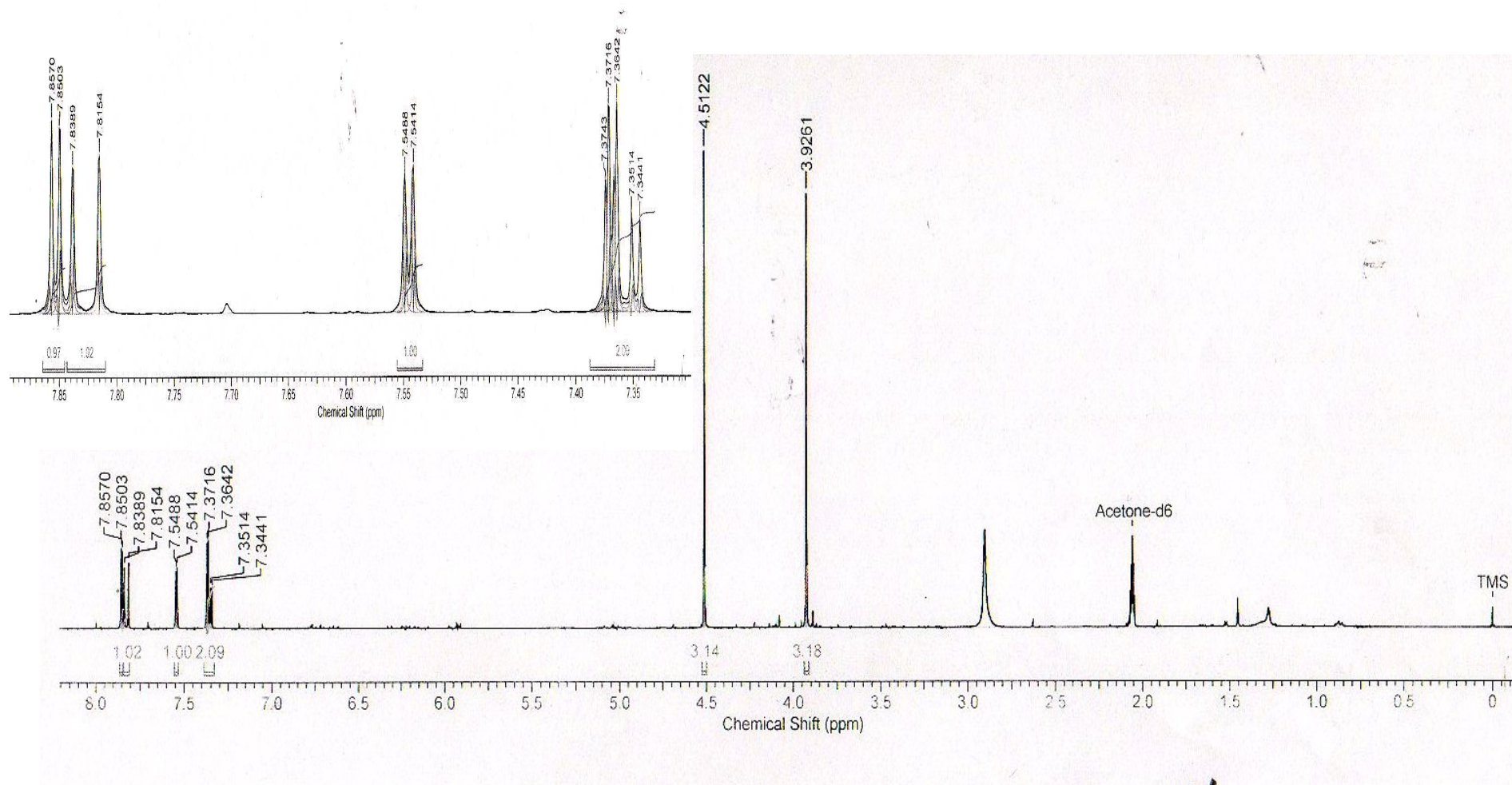


FIGURA 33- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **09**(400MHz,  $d$ -acetona).

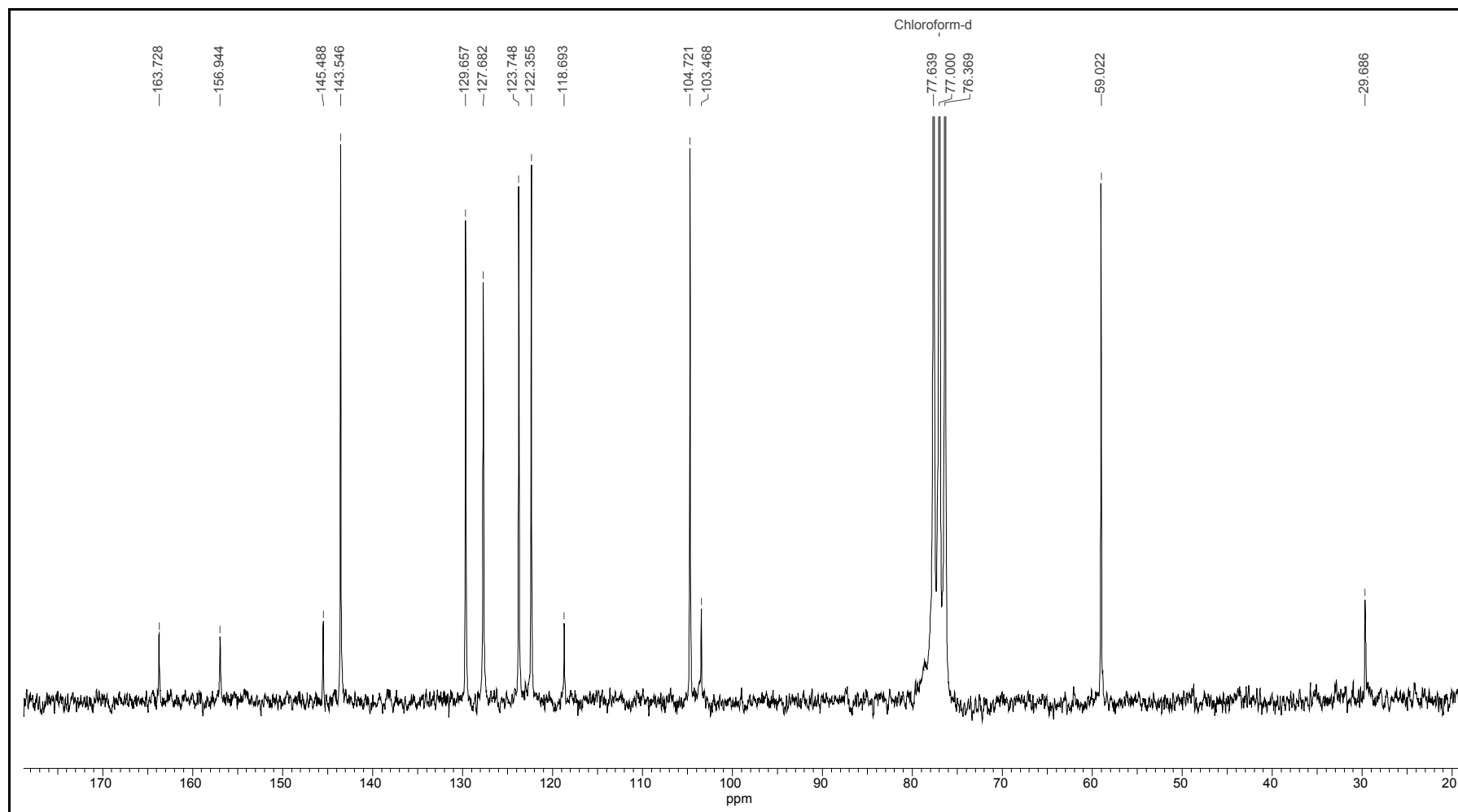


FIGURA 34- Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **07** (100MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

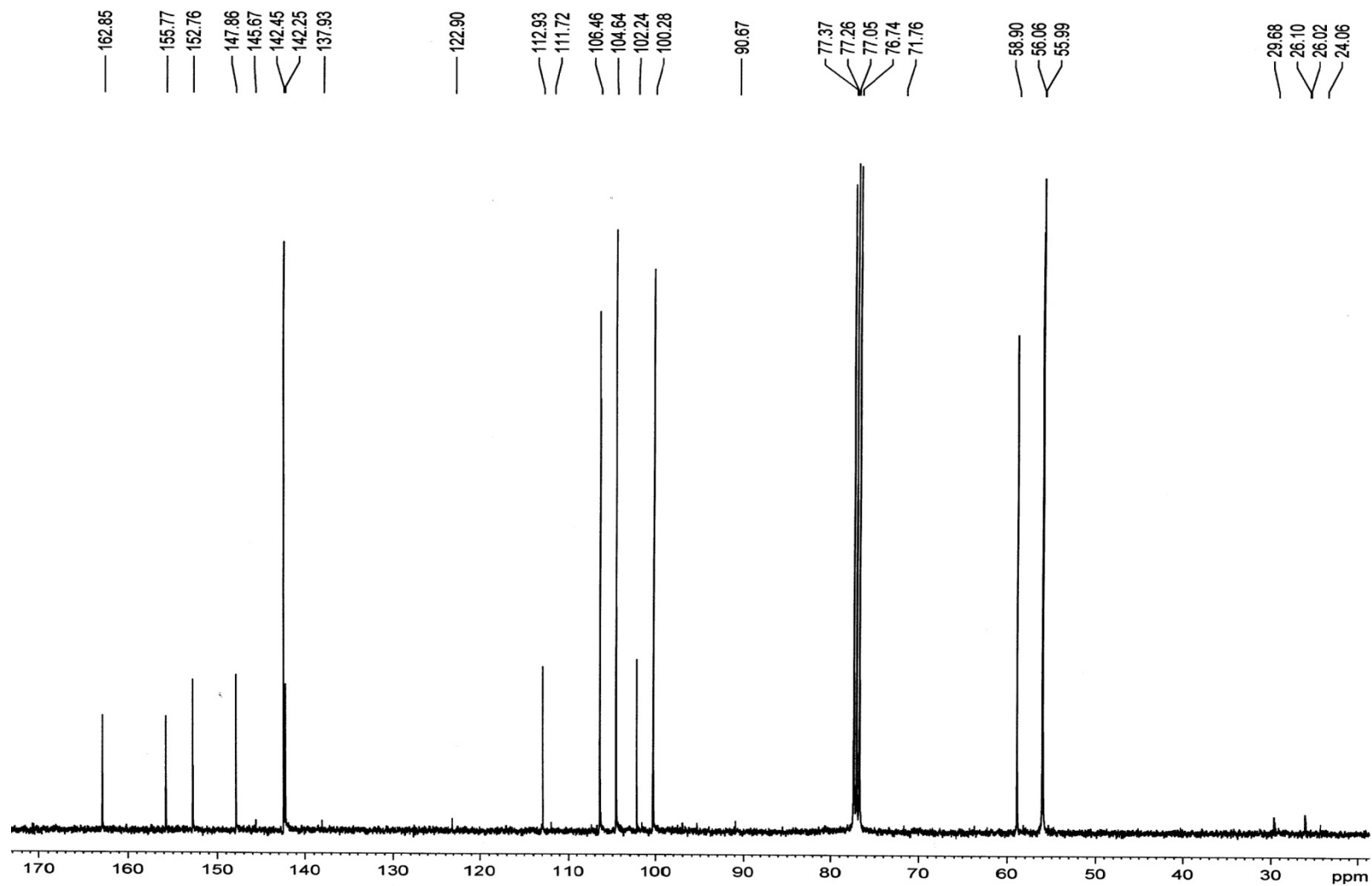


FIGURA 35- Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **08**, (100MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



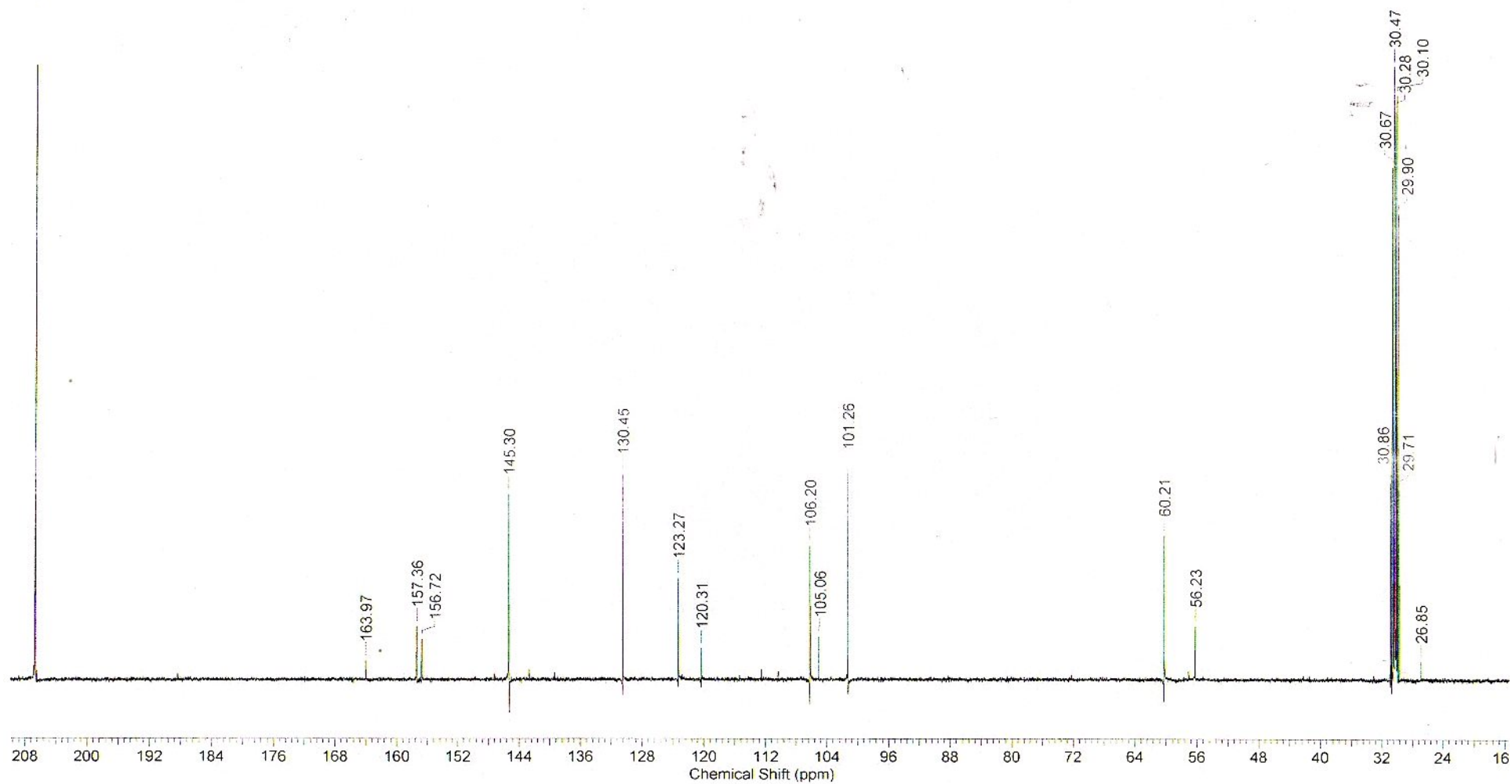


FIGURA 36- Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **09** (100MHz, *d*-acetona).

TABELA 8 - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  para as substâncias **07**, **08** e **09**, e comparação com a literatura.

	Dictamina( <b>07</b> )	Kokusaginina ( <b>08</b> )	Evolitrina ( <b>09</b> )	
Hidrogênio	Isolada <b>06*</b> (a) $\delta$ (ppm)	Isolada <b>07</b> (a) $\delta$ (ppm)	Isolada <b>08</b> (b) $\delta$ (ppm)	HONGWEI ET AL, 2010* (c) $\delta$ (ppm)
2'	7,63 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 2,8 Hz)	7,51(1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 3,2 Hz)	7,85 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 2,6 Hz)	7,68 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 2,6 Hz)
3'	7,09 ( <i>d</i> , <i>J</i> =2,8 Hz)	6,98 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 3,2 Hz)	7,35 ( <i>d</i> , <i>J</i> =2,6 Hz)	7,01 ( <i>d</i> , <i>J</i> =2,7 Hz)
5	8,28 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 8,4; 1,5 Hz)	7,39 (1H, <i>s</i> )	7,83 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =9,1Hz)	8,22 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 8,3 Hz)
6	7,45 ( <i>ddd</i> , <i>J</i> =8,4; 6,8; 1,0 Hz)	-	7,37 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =1,0; 9,1Hz)	7,54 ( <i>t</i> , <i>J</i> = 7,2 Hz)
7	7,69 ( <i>ddd</i> , <i>J</i> =8,4; 6,8; 1,0Hz)	-	-	7,54 ( <i>t</i> , <i>J</i> = 7,4Hz)
8	8,02 ( <i>dl</i> , <i>J</i> = 8,5; 1,0 Hz)	7,29 (1H, <i>s</i> )	7,54 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,96 Hz)	8,09 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 8,5 Hz)
4-OMe	4,41 (3H, <i>s</i> )	4,37 (3H, <i>s</i> )	4,51 (3H, <i>s</i> )	4,48 ( <i>s</i> )
6-OMe	-	3,96 (3H, <i>s</i> )	-	-
7-OMe	-	3,98 (3H, <i>s</i> )	3,92 (3H, <i>s</i> )	-

(a) 200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ;  
 (b) 400 MHz, acetona-*d*;  
 (c) 600 MHz,  $\text{CDCl}_3$

TABELA 9- Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  para as substâncias **07**, **08** e **09** e comparação com a literatura.

Carbono	Dictamina( <b>07</b> )	Kokusaginina ( <b>08</b> )	Evolitrina ( <b>09</b> )	
	Isolada <b>07</b> (a)	Isolada <b>08</b> (a)*	Isolada <b>09</b> (b)	PAULINI ET AL, 1989 (c)*
	$\delta$ (ppm)	$\delta$ (ppm)	$\delta$ (ppm)	$\delta$ (ppm)
2	163,7	162,8	163,9	163,0
3	118,3	112,9	123,3	112,9
4	156,9	155,7	157,3	155,6
4a	103,4	102,2	105,0	102,2
5	122,3	100,2	130,4	100,1
6	123,7	147,8	123,2	147,8
7	129,6	152,7	156,7	152,6
8	127,6	106,4	101,2	106,7
8a	145,5	142,4	120,3	142,5
2'	143,5	142,2	145,3	142,4
3'	104,7	104,6	106,2	104,6
4-OMe	59,9	58,9	60,2	58,8
6-OMe	-	56,0	-	56,0
7-OMe	-	55,9	56,2	55,9

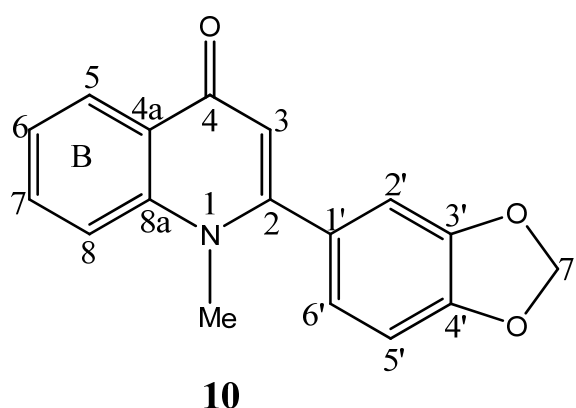
(a)100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ;

(b)100 MHz, acetona-*d*

(c) 50 MHz,  $\text{CDCl}_3$

### 3.2.5 identificação estrutural da substância 10

A substância **10** foi isolada como um sólido amarelo da fração FMRF das partes aéreas da *R. graveolens*. Em CCDA, quando revelado em vanilina, apresentou coloração amarela e em reagente de Dragendorff apresentou coloração alaranjada. Sua identificação foi realizada através da análise dos experimentos RMN de  $^1\text{H}$  e HSQC (FIGURAS 37 e 38) pg. 93, 94 e 95, e por comparação com dados da literatura.



O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **10** apresentou um sinal em  $\delta$  5,99 (2H, s) indicando a presença de um grupo metilenodioxí, referente aos hidrogênios na posição 7', um sinal em  $\delta$  6,26 (1H, s) indicando a presença de um hidrogênio olefínico desblindado por ser  $\alpha$ -carbonílico e outro sinal em  $\delta$  3,59 (3H, s) característico de metila ligada a heteroátomo, determinando a presença do *N*-Me.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (TABELA 10) p. 96, ainda apresentou sinais em  $\delta$  8,37 (1H, *dd*,  $J = 8,0; 1,6$  Hz), e  $\delta$  7,34 (1H, *ddd*,  $J = 8,0; 6,8$  Hz),  $\delta$  7,64 (1H, *ddd*,  $J = 8,4; 6,8$  e  $1,6$  Hz), e  $\delta$  7,49 (1H, *dl*,  $J = 8,4$  Hz). Essas multiplicidades sugerem que o anel aromático B é *orto* dissustituído e os hidrogênios foram atribuídos às posições 5 a 8. Os sinais de  $\delta$  6,78 (1H, *dd*,  $J = 1,6$  e  $0,4$  Hz) referente a H-2';  $\delta$  6,82-6,80 (1H, *dd*,  $J = 8,0$  e  $1,6$  Hz) H-6' e  $\delta$  6,85-6,83 (1H, *dd*,  $J = 8,0$  e  $0,4$  Hz) H-5'. A partir das multiplicidades dos hidrogênios, é observado que o H-2' acopla em *meta* com o H-6' e em *para* com H-5'; o H-5' acopla em *orto* com H-6' e em *para* com H-2'; e H-6' acopla em *orto* com H-5' e em *meta* com H-2'.

O espectro de correlação HSQC apresentou sinais de correlação dos hidrogênios em  $\delta$  7,69; em  $\delta$  7,55 e em  $\delta$  7,35 com os carbonos em  $\delta$  132,48; em  $\delta$  116,21 e em  $\delta$  123,92 respectivamente. Os hidrogênios em  $\delta$  6,85 correlacionam com um único sinal de carbono em  $\delta$  108,83 e o  $\delta$  6,80 com  $\delta$  122,63. Ainda foi possível observar que os carbonos em  $\delta$  126,27;  $\delta$  101,55;  $\delta$  112,15 e  $\delta$  37,45 correlacionam com os hidrogênios  $\delta$  8,41;  $\delta$  6,02;  $\delta$  6,26 e  $\delta$  3,60 (*N*-Me), respectivamente.

Portanto, de acordo com os dados de RMN de  $^1\text{H}$  e HSQC e comparação com a literatura, a substância **10** foi identificada como sendo o alcalóide quinolínic 1-metil-2[3',4'-(metilendioxi)fenil]-4-quinolona (graveolina).

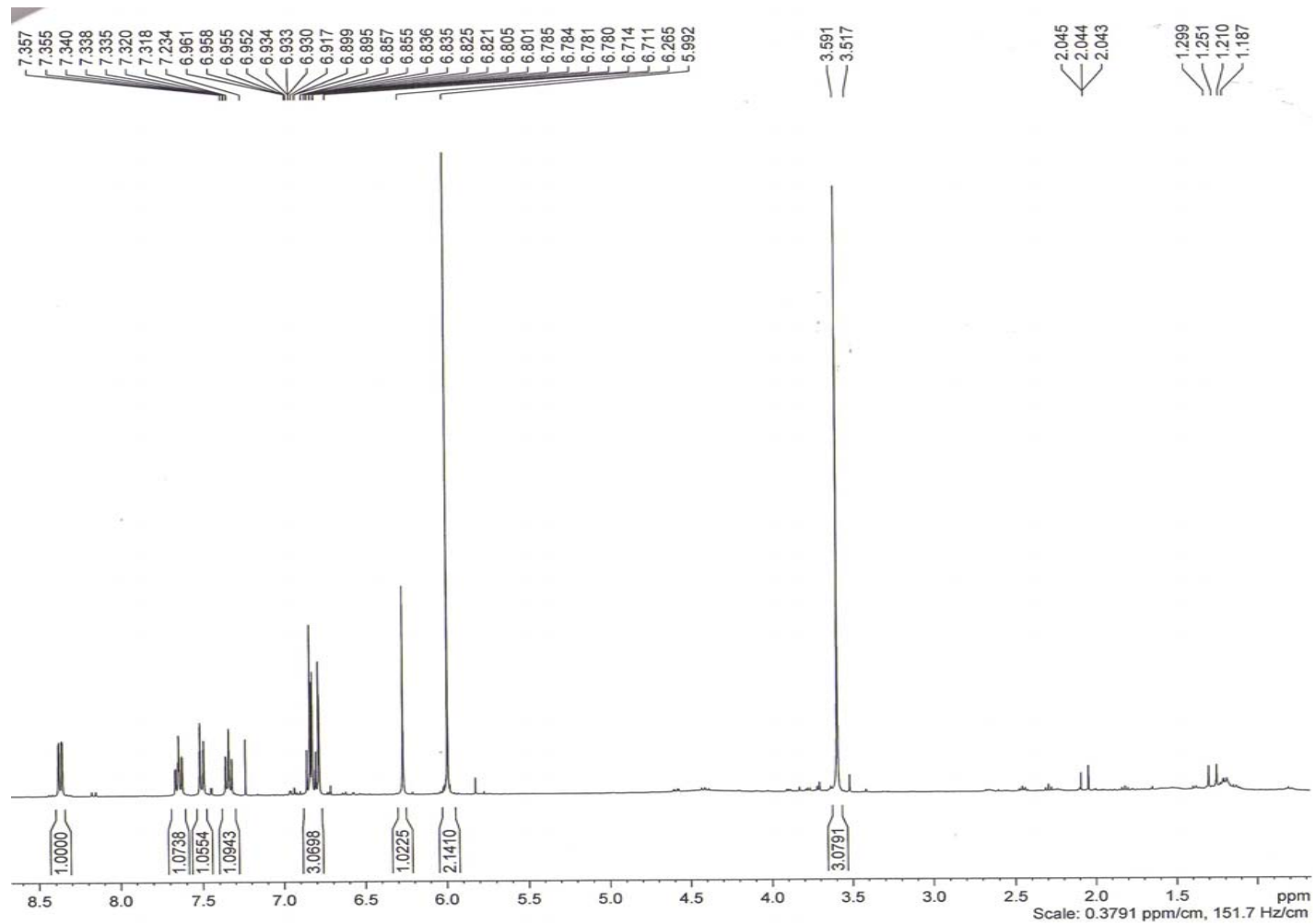


FIGURA 37- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **10** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

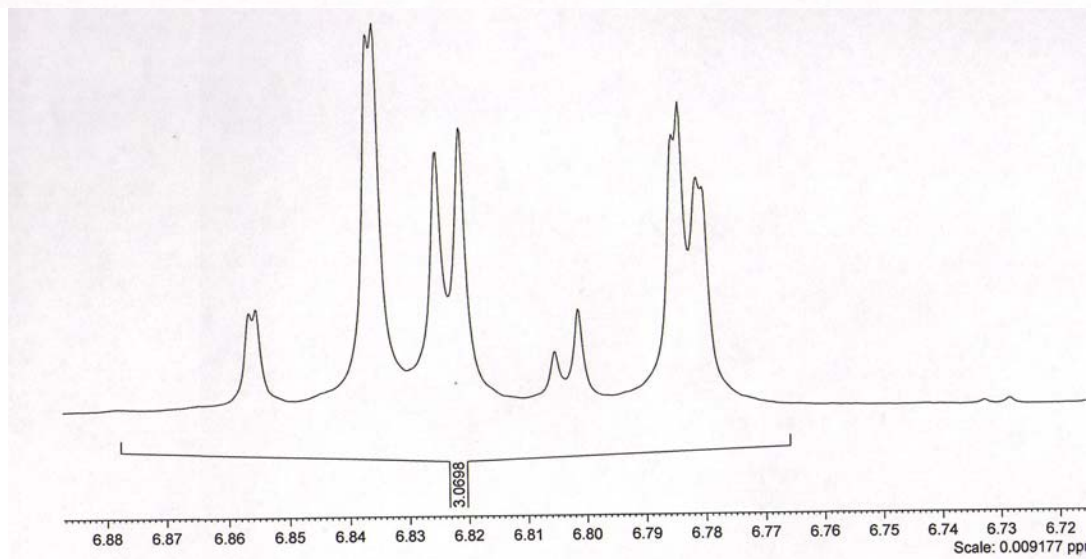
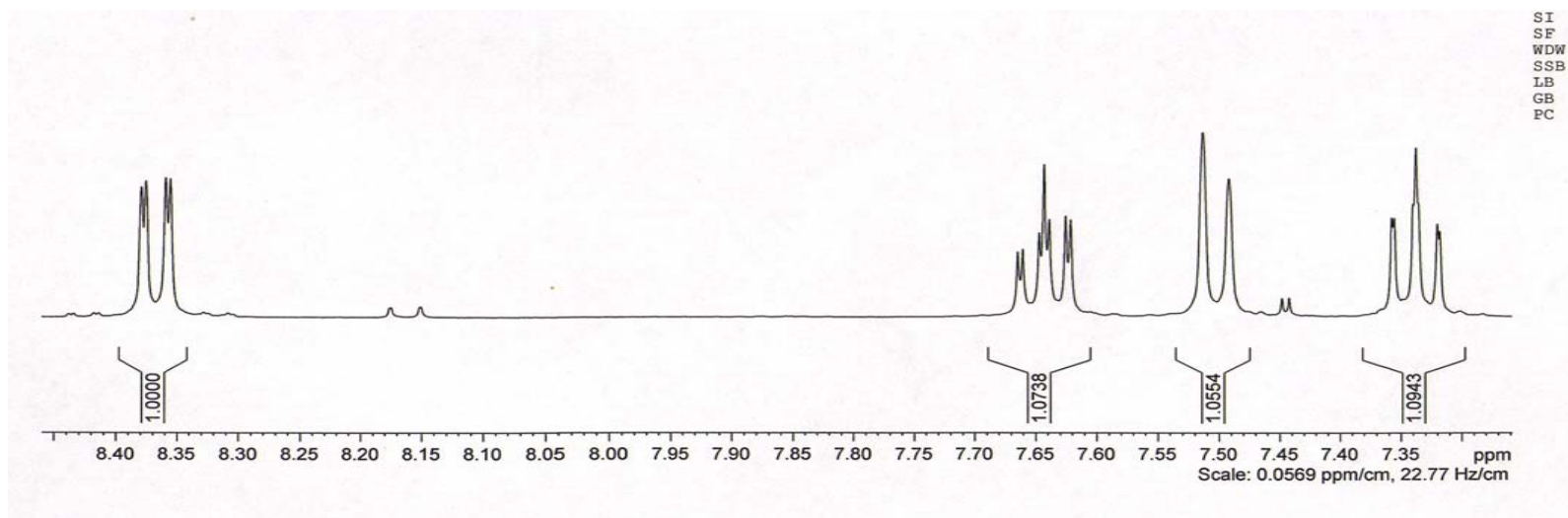


FIGURA 37.1- Expansão espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **10** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

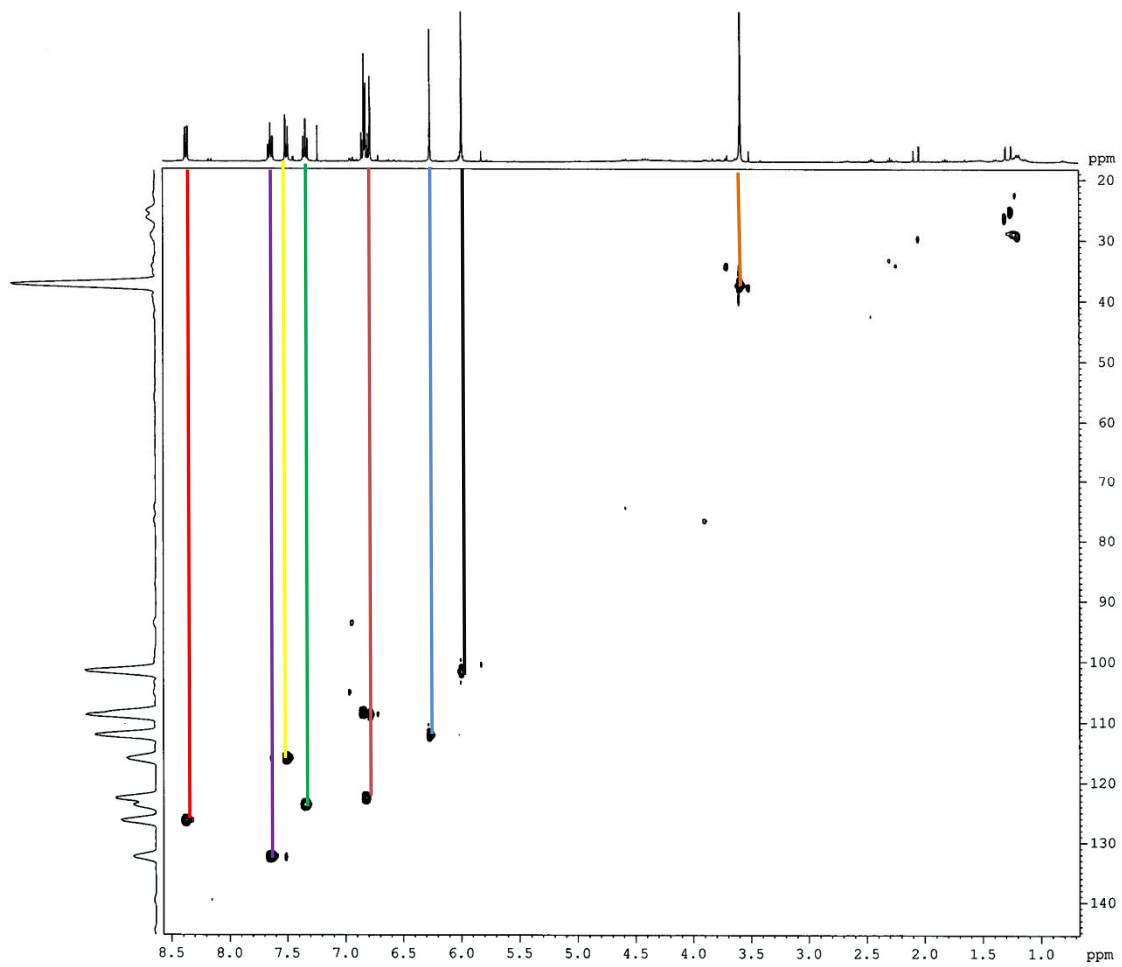


FIGURA 38- Mapa de correlações HSQC da substância **10** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



TABELA 10- Dados de RMN de  $^1\text{H}$  para a substância **10** e comparação com a literatura.

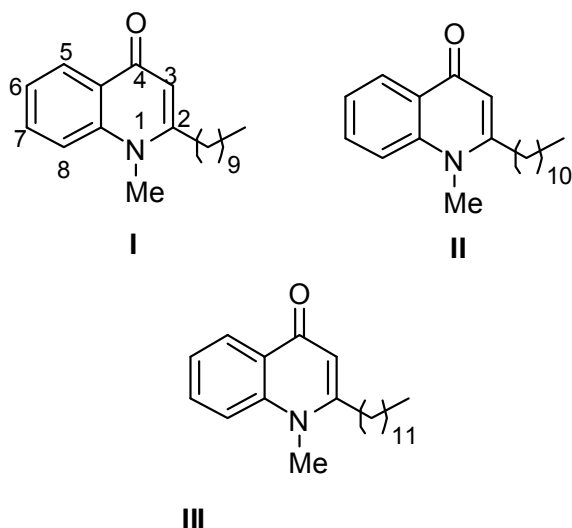
Graveolina		
Hidrogênio	Isolada (a) $\delta$ (ppm)	OLIVEIRA ET AL, 1996 (b) $\delta$ (ppm)
3	6,26 (1H, s)	6,30 (1H, s)
5	8,37(1H, <i>dd</i> , $J= 8,0; 1,6$ Hz)	8,49 (1H, <i>dd</i> , 8,0 e 1,5 Hz)
6	7,34 (1H, <i>ddd</i> , $J= 8,0; 6,8$ Hz)	7,42 (1H, <i>dt</i> , $J=8,0$ e 0,9 Hz)
7	7,64 (1H, <i>ddd</i> , $J= 8,4; 6,8$ e 1,6Hz)	7,71 (1H, <i>dt</i> , 8,0 e 1,5 Hz)
8	7,49 (1H, <i>dl</i> , $J= 8,4$ Hz)	8,41 (1H, <i>dd</i> , 8,06; 1,18 Hz)
2'	6,78 (1H, <i>dd</i> , $J=1,6$ e 0,4Hz)	6,57 (1H, <i>d</i> , 1,5 Hz)
5'	6,85-6,83 (1H, <i>dd</i> , $J= 8,0$ e 0,4Hz)	3,93 (3H, s) 5'OMe
6'	6,82-6,80 (1H, <i>dd</i> , $J= 8,0$ e 1,6Hz)	6,52 (1H, s)
7'	5,99 (2H, s)	6,07 (2H, s)
N-Me	3,59 (3H, s)	3,64 (3H, s)

(a) 200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ;

(b) 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$  substância semelhante (2-aril-quinilina-4-ona).

### 3.2.6 Identificação estrutural da mistura de substâncias 11 (I, II, III)

As substâncias **11(I, II, III)** referem-se a alcalóides quinolínicos e foram isoladas em mistura como um sólido amarelo obtido a partir da fração FHRR proveniente das raízes da *R. graveolens*. Em CCDA, quando submetido à radiação UV apresentou fluorescência nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm. A identificação da mistura foi realizada através da análise dos experimentos RMN de  $^1\text{H}$  e Espectrometria de Massas, e por comparação com dados da literatura (KOSTOVA ET AL, 1999).



Analisando o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (FIGURAS 39) p. 99 da mistura, foi possível observar sinais na região de hidrogênios aromáticos em  $\delta$  8,19 (1H, *tl*,  $J= 8,0$  Hz), em  $\delta$  7,77 (1H, *tl*), em  $\delta$  8,19 (1H, *tl*,  $J= 8,0\text{Hz}$ ), e em  $\delta$  7,54 (1H, *tl*,  $J= 8,0\text{Hz}$ ) atribuídos aos H-5, H-6, H7 e H-8 do anel aromático *orto* dissubstituído. A partir das multiplicidades e das constantes de acoplamento foi possível afirmar correlações entre os hidrogênios H-5 e H-6 em *orto*, e H-7 em *meta*; do H-6 com H-5 e H-7 em *orto*; do H-7 acoplado com H-6 e H-8 em *orto*, e do H-8 em *orto* com H-7, e em *meta* com H-6. Os deslocamentos químicos do H-5 e H-7 são muito semelhantes por se encontram em um mesmo sinal.

Foi observado um sinal de hidrogênio em  $\delta$  4,12 (3H, s) característico de metila ligada a heteroátomo (N-Me), e um sinal em  $\delta$  6,70 (1H, s) atribuído ao hidrogênio olefínico H-3.

O RMN  $^1\text{H}$  ainda apresentou sinais na região mais blindada do espectro em  $\delta$  3,05 (2H, *qt*,  $J= 8,0$ );  $\delta$  2,37 (4H, *qt*,  $J= 8,0$ );  $\delta$  1,84 (2H, *qt*,  $J= 8,0$ );  $\delta$  1,63 (6H, *m*);  $\delta$  1,47-1,26 (*m*) todos referentes à  $\text{CH}_2$  de cadeia alquílica, e  $\delta$  0,87 (9H, *t*) referente à metila terminal dos 3 isômeros (TABELA 11) pg 103. Esses sinais indicam a presença de cadeia lateral, sendo sua determinação facilitada através da análise dos espectros de massa, uma vez que suas multiplicidades não são tão nítidas.

Para todos os sinais, tanto na região aromática quanto os da região alquílica, as integrações não ficaram exatas. Dessa forma, concluiu-se que o composto não se encontrava de forma pura, mas sim com uma mistura de substâncias análogas que apresentaria uma estrutura semelhante em quantidade minoritária.

O cromatograma de íons totais (TIC) (FIGURA 40) p. 101 apresentou uma banda majoritária e duas minoritárias na proporção (8:1:1), onde a banda majoritária mostrou um espectro de massa (FIGURA 41) pg. 102 com o pico do íon molecular  $m/z$  313 e as duas bandas minoritárias (FIGURA 42) p. 103,  $m/z$  327 e 341, variando em uma unidade  $\text{CH}_2$  ( $m/z$  14) para o íon  $m/z$  313 (FIGURA 43) pg 104, confirmando a presença de uma série homóloga. O experimento de cromatografia gasosa foi realizado em um Shimadzu QP 5000- Ionização por Impacto Eletrônico (70eV). A rampa utilizada foi 150/1/10/300/20.

Assim a mistura dos alcalóides **11 (I, II, III)** refere-se a uma série homóloga de alcalóides alquil-*N*-metil-4-quinolínicos: 1-metil-2-undecan-4-quinolona (**I**), 1-metil-2-dodecan-4-quinolona (**II**), 1-metil-2-tridecan-4-quinolona (**III**).

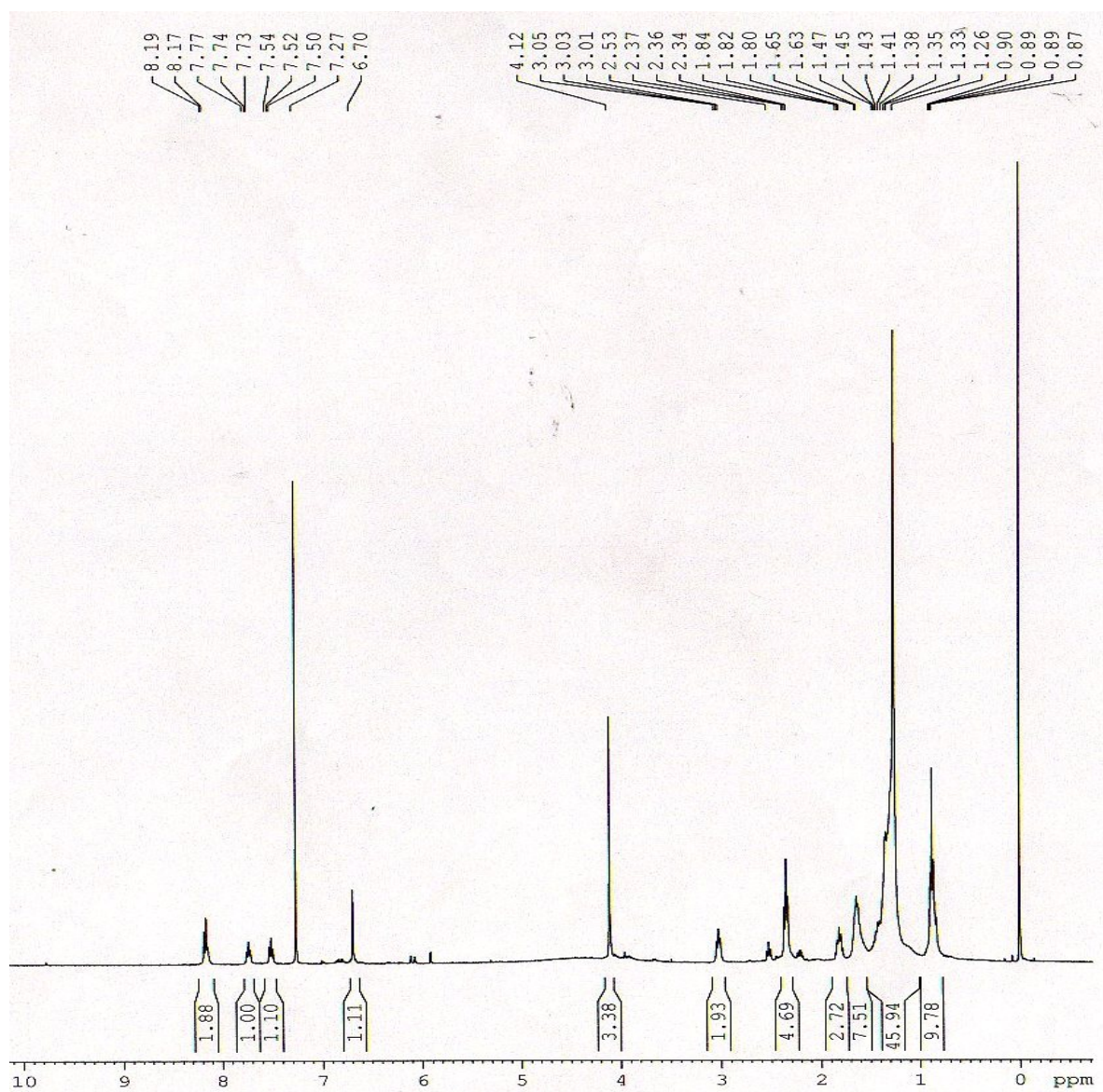


FIGURA 39- Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da mistura de alcalóides **11(I, II, III)** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

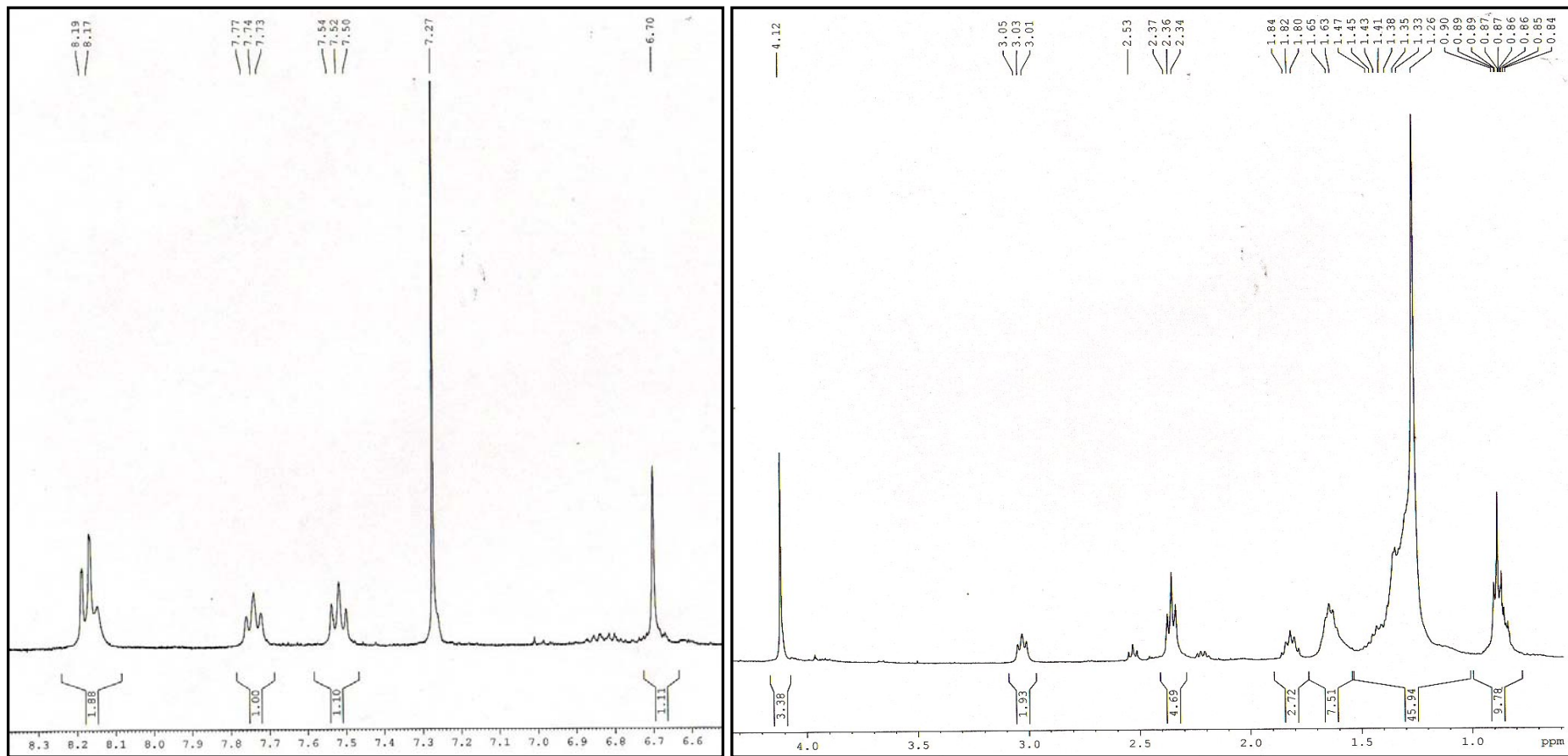


FIGURA 39.1- Expansões do espectro de RMN  $^1\text{H}$  da mistura de alcalóides **11(I, II, III)** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

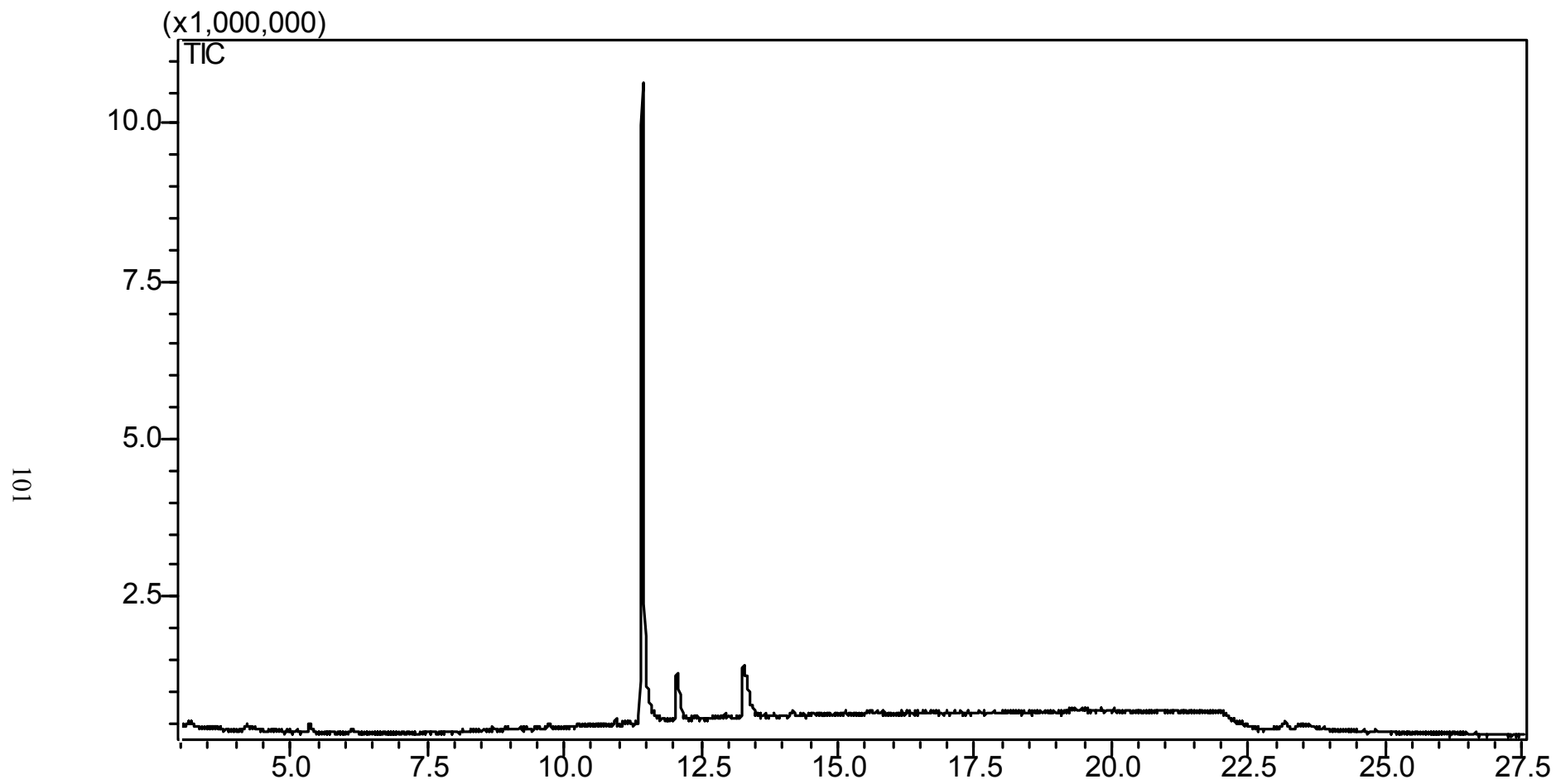


FIGURA 40- Cromatograma de íons totais da substância 11 (IE, 70eV).

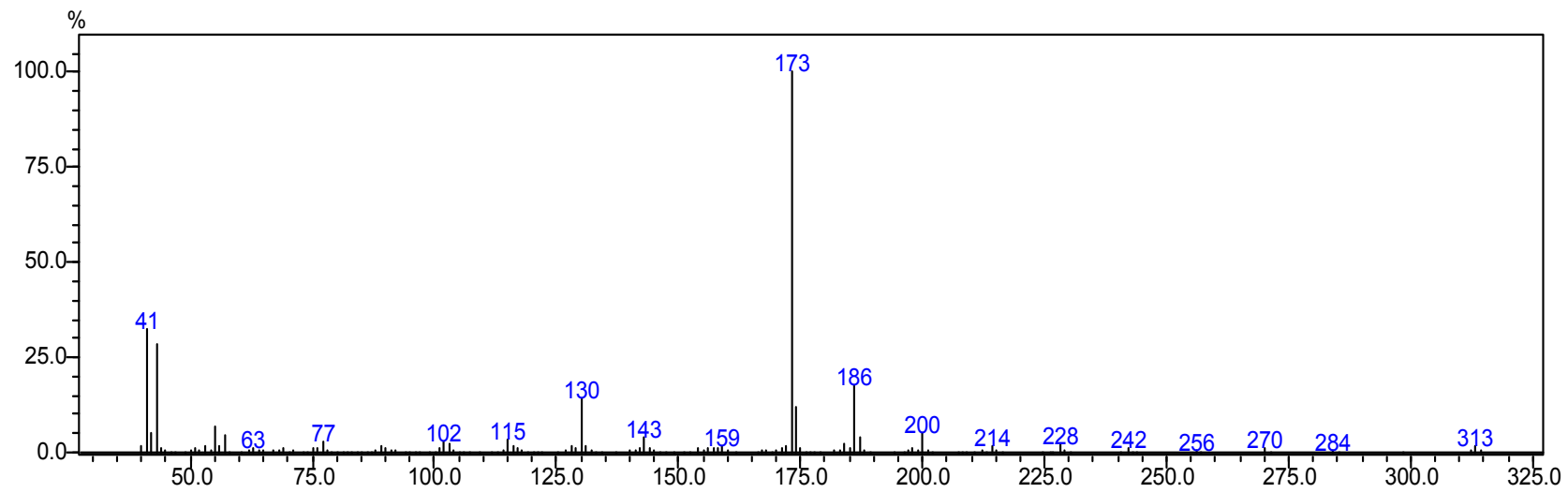


FIGURA 41- Espectro de massas da banda majoritária da mistura de alcalóides **11(I)**  $m/z$  313 (IE, 70eV).

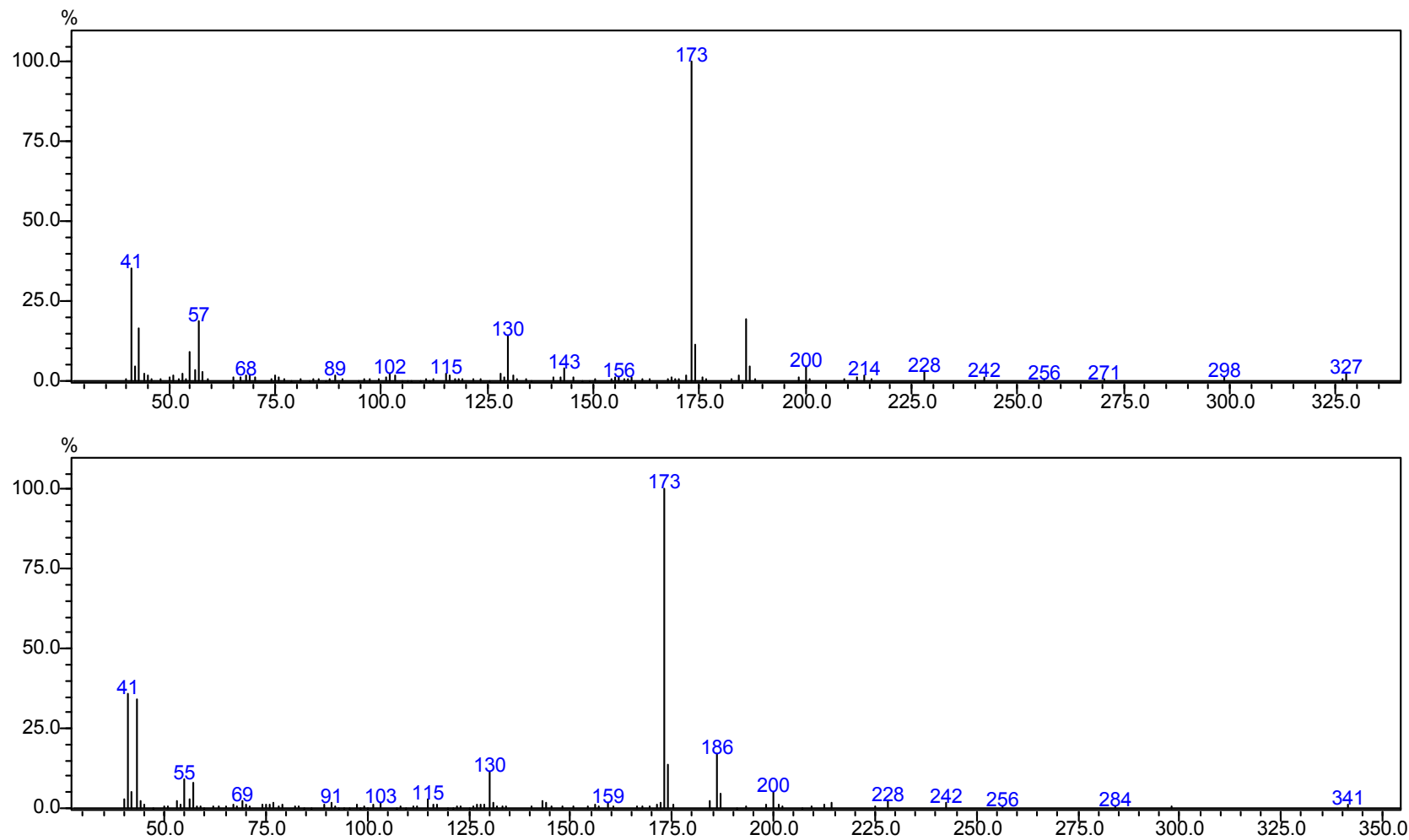


FIGURA 42- Espectros de massas das bandas minoritárias da mistura de alcalóides **11(II, III)**,  $m/z$  327 e  $m/z$  341 ((IE, 70eV).



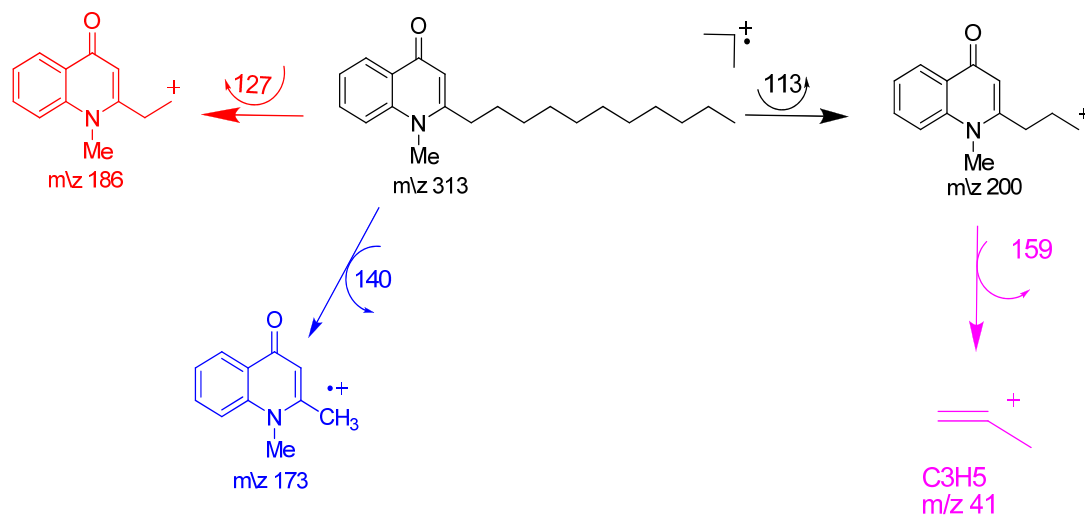


FIGURA 43-Proposta de fragmentação do alcalóide 1-metil-2-undecan-4-quinolona (11-I)  $m/z$  313.

TABELA 11- Dados de RMN de  $^1\text{H}$  para a substância **11** e comparação com a literatura.

2-undecan- <i>N</i> -metil-4-quinolina		
Hidrogênio	Isolada (a) $\delta$ (ppm)	KOSTOVA ET AL, 1999 $\delta$ (ppm)
3	6,70 (1H, s)	6,42 (1H, s)
5	8,19 (1H, <i>tl</i> , $J=8,0$ Hz)	8,48 (1H, <i>tl</i> , $J=9,0$ Hz)
6	7,77 (1H, <i>tl</i> )	7,80 a 7,40 (1H, <i>m</i> )
7	8,19 (1H, <i>tl</i> , $J=8,0$ Hz)	7,80 a 7,40 (1H, <i>m</i> )
8	7,54 (1H, <i>tl</i> , $J=8,0$ Hz)	7,80 a 7,40 (1H, <i>m</i> )
1'	3,05(2H, <i>qt</i> , $J= 8,0$ Hz)	2,76 (2H, <i>t</i> , $J= 8,0$ Hz)
2'e 3'	2,37(4H, <i>qt</i> , $J= 8,0$ Hz)	1,50-2,0 ( <i>m</i> )
4' a 6'	1,47-1,26 ( <i>m</i> )	1,50-2,0 ( <i>m</i> )
7'	1,63 (2H, <i>m</i> )	1,50-2,0 ( <i>m</i> )
8'	1,84 (2H, <i>t</i> , $J=8$ Hz)	1,50-2,0 ( <i>m</i> )
9'	0,87 (3H, <i>tl</i> )	0,87 (3H, <i>t</i> , $J=8,0$ Hz)
N-Me	4,12 (3H, s)	3,80 (3H, s)

(a) 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ;

(b) 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ .( 2-undecan-*N*-metil-4-quinolina)

### **3.3 Cumarinas**

Furanocumarinas são metabólitos secundários encontrados em plantas caracterizados por um anel furano fundido a benzopirano-2-ona. A posição da substituição furano distingue dois grandes grupos de compostos, o linear (psoralenos) e angular (angelicina e derivados).

Os psoralenos em particular são conhecidos pelos seus efeitos fotossensibilizantes e fitotóxicos. Eles têm sido utilizados na fitoquimioterapia da pele no tratamento de doenças como psoríase, vitiligo e micoses (MURRAY E JORGE, 1984; MASUDA ET AL, 1998; ORLITAL ET A, 2008; LARBAT ET AL, 2009).

Inúmeras outras aplicações têm sido atribuídas as furanocumarinas, embora o seu potencial mutagênico fosse reconhecido durante muitos anos atrás. Essa classe de cumarinas é encontrada apenas em quatro famílias de plantas: Fabaceae, Apiaceae, Rutaceae e Moraceae (LARBAT ET AL, 2009).

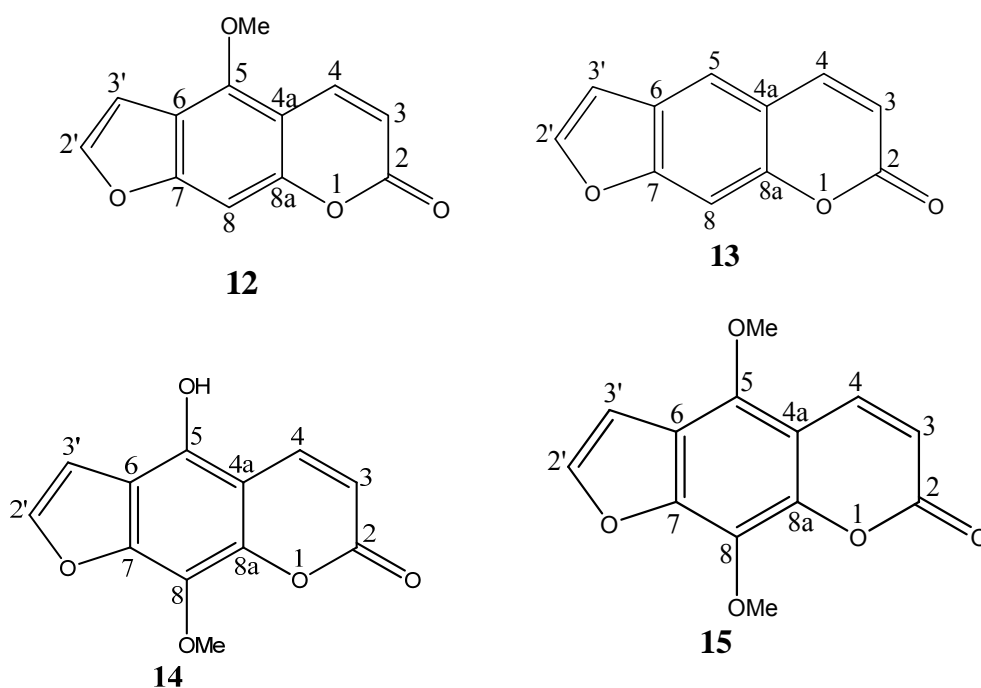
Nas Rutaceae, as cumarinas são isoladas em várias partes vegetais. A maior característica na diversificação das cumarinas tanto em Rutaceae quanto em Apiaceae está na incorporação de grupos prenila nos esqueletos estruturais (BRAGA, 2005; LARBAT ET AL, 2009).

As cumarinas têm origem biossintética no ácido *p*-hidroxi-cinâmico (*p*-cumárico). Sua grande diversidade estrutural é devida principalmente a incorporação da unidade prenila. As prenilações ocorrem nas posições 6 e 8 devido a presença da hidroxila na posição 7, que é *orto* orientador formando uma furanocumarina, por meio de uma reação de epoxidação na ligação dupla olefínica, gerando as piranocumarinas. Uma vez incorporado ao esqueleto cumárico, o grupo prenila pode sofrer um grande número de modificações (BRAGA, 2005; LARBAT ET AL, 2009). Para a formação das furanocumarinas simples, um fragmento hidroxiisopropil da marmesina é eliminado enzimaticamente, levando a formação dos psoralenos (DEWICK, 2002).

Várias cumarinas foram isoladas da *R. graveolens* tais como: umbeliferona, chalepensina, bergapteno, bergaptol, chalepina, escopoletina, isopimpenelina, psoraleno, xantotoxina dentre outras (ORLITA ET AL, 2008). Foi possível observar que algumas das cumarinas isoladas seguem uma sequência biossintética, por exemplo: as cumarinas preniladas geram o psoraleno, o qual leva aos compostos substituídos nas posições 5 ou 8.

### 3.3.1 Identificação estrutural das substâncias 12 a 15

As furanocumarinas **12** e **13** foram isoladas da fração FHDRF, a **14** isolada da fração FDRF e a **15** da fração FHRR, todas das partes aéreas da *R. graveolens*. As substâncias tiveram suas estruturas identificadas com base em experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  (TABELAS 12, 13 e 14) pg. 119-121, com exceção da substância **14**, em que foram realizados além dos espectros de RMN 1D, experimentos de RMN 2D HMBC, HSQC e gNOESY além de espectrometria de massas. Todas as substâncias tiveram suas identificações comparadas com dados da literatura.



Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (FIGURAS 44 a 47) p. 100-113 apresentaram sinais característicos do esqueleto cumarínico, *doubletos* do anel lactônico em  $\delta$  8,13 (1H, *d*,  $J=9,8$  Hz) e em  $\delta$  6,24 (1H, *d*,  $J=9,8$  Hz) para a substância **12**; em  $\delta$  7,81 (1H, *d*,  $J=9,6$  Hz) e  $\delta$  6,39 (1H, *d*,  $J=9,6$  Hz) para a substância **13**, em  $\delta$  8,13 (1H, *d*,  $J=10,0$  Hz) e em  $\delta$  6,43 (1H, *d*,  $J=10,0$  Hz) para a substância **14**; e em  $\delta$  8,20 (1H, *d*,  $J=10,0$  Hz) e em  $\delta$  6,28 (1H, *d*,  $J=10,0$  Hz) para a substância **15**; referentes aos hidrogênios H-4 e H-3 de cada substância, respectivamente.

Outros sinais observados são pertencentes aos anéis furânicos dissubstituídos em  $\delta$  7,57 (1H, *d*,  $J=2,6$  Hz) em  $\delta$  7,05 (1H, *dd*,  $J=2,6$  e 1,0 Hz) para a substância **12**, em  $\delta$  7,67 (1H, *sl*) e em  $\delta$  6,83 (1H, *dd*,  $J = 2,1$  e 0,8 Hz) para a substância **13**, em  $\delta$  7,68 (1H, *d*,  $J = 2,8$  Hz) e em  $\delta$  6,80 (1H, *d*,  $J = 2,8$  Hz) para a substância **14**, e em  $\delta$  7,91 (1H, *d*,  $J = 2,4$  Hz) e em  $\delta$  7,29 (1H, *d*,  $J = 2,4$  Hz) para a substância **15**, referentes aos hidrogênios H-2' e H-3' de cada substância, respectivamente.

O sinal do H-4, que normalmente aparece em  $\delta$  7,60 encontra-se mais desblindado, em torno de  $\delta$  8,15 no espectro da substância **12**, indicando que a posição C-5 é substituída. As cumarinas que apresentam substituintes oxigenados na posição C-5, tem o valor do deslocamento químico do H-4 bem desblindado em torno de  $\delta$  8,00 devido ao efeito anisotrópico da ligação C-O na posição 5, e também devido ao fato de se encontrar na posição  $\beta$  carboxila do anel lactônico. O sinal da metoxila se mostra desblindado, o que sugere que essa cumarina seja linear. Segundo Murray et al (1984), grupos metoxilas que apresentem sinais que absorvem acima de  $\delta$  4,15 indicam que as furanocumarinas são lineares e que as que absorvem abaixo de  $\delta$  4,15 caracterizam furanocumarinas angulares.

O espectro apresenta também um sinal em  $\delta$  4,25 (3H, *s*) que é relativo à metoxila da estrutura.

A multiplicidade observada para H-3' (*dd*,  $J= 2,6$  e 1,0 Hz) é justificada pelo acoplamento a longa distância com H-8 em  $\delta$  7,10 (*s*) uma constante de acoplamento bem pequena com  $J=1,0$ , chamado acoplamento em *zig-zag*, comum nas cumarinas. Esses acoplamentos a longa distância também justificam a metoxila em C-5, pois se caso ela estivesse em C-8 estes acoplamentos a longa distancia não seriam observados.

Os dados de RMN de  $^1\text{H}$  associado aos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (FIGURA 48) p. 114, comparados com os dados encontrados na literatura, permitiram identificar a substância **12** como a furanocumarina, Bergapteno.

Para a substância **13**, a multiplicidade do sinal em  $\delta$  7,67 atribuído ao H-2' deveria ser um *dubleto*, contudo esse sinal H-5 coaleceu com o sinal de, fazendo com que sua multiplicidade não pudesse ser observada. A multiplicidade observada para H-3' é justificada pelo acoplamento *zig-zag* a longa distância com H-8  $\delta$  7,47 (*sl*,  $J =0,8$  Hz). O sinal no espectro de hidrogênio com deslocamento  $\delta$  7,69 (1H, *s*)

refere-se ao H-5, característico de hidrogênio aromático. Por comparação dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e associado aos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (FIGURA 49) p.115 com a literatura pode-se concluir que a substância **13** é o psoraleno.

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **14**, observa-se um sinal intenso em  $\delta$  4,24 (3H, s) característico de metoxila ligada a anel aromático. O fato do sinal da metoxila aparecer tão desblindado sugere que essa cumarina seja linear (MURRAY ET AL,1984). Para a confirmação do segundo substituinte, foi realizado o experimento de CG-EM, que apresentou o pico do íon molecular  $m/z$  232, confirmando assim a presença de um grupo hidroxila na molécula.

No experimento de HSQC (FIGURA 51) p. 117 os hidrogênios com deslocamento em  $\delta$  4,24;  $\delta$  6,43 e  $\delta$  6,89 correlacionam com os carbonos em  $\delta$  63,1;  $\delta$  115,8 e  $\delta$  105,9 respectivamente. Ainda foi possível observar as correlações dos hidrogênios em  $\delta$  7,68 e  $\delta$  8,13 com os carbonos em  $\delta$  147,3 e  $\delta$  140,1.

O mapa de HMBC (FIGURA 52) p. 117 apresenta correlação dos hidrogênios H-4 e H-3 com o carbono em  $\delta$  160, 0. O sinal de hidrogênio H-4 também apresentou correlação com os carbonos em  $\delta$  115,8 e  $\delta$ 114,0. Ainda foi possível observar correlações dos sinais de hidrogênio em  $\delta$  6,89 e  $\delta$  7,68 com o carbono em  $\delta$ 147,3; e do sinal em  $\delta$  4,24 com o carbono em  $\delta$  133,2.

Para atribuir a posição dos substituintes oxigenados na molécula foi realizado o experimento de gNOESY (FIGURA 53) pg. 118. O sinal em  $\delta$  8,13 referente ao H-4, ao ser irradiado, não apresentou efeito NOE com o sinal em  $\delta$  4,25 referente à metoxila. Dessa forma, pode-se inferir que a metoxila encontra-se na posição C-8 do anel aromático, restando assim à posição C-5 do anel para a hidroxila.

Os dados de RMN de  $^1\text{H}$ , HMBC e HSQC, junto com os dados de gNOESY, confirmam a estrutura da furanocumarina do 5-hidroxi-8-metoxi-psoraleno, substância **14**.

A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **15** mostrou dois sinais em  $\delta$  4,10 (3H, s) e  $\delta$  4,24 (3H, s) característico de metoxilas atribuídas a as posições C-8 e C-5. Assim os dados de RMN de  $^1\text{H}$ , associado aos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (FIGURA 50) p.116 , permitiram identificar a substância **15** como a isopimpinina.

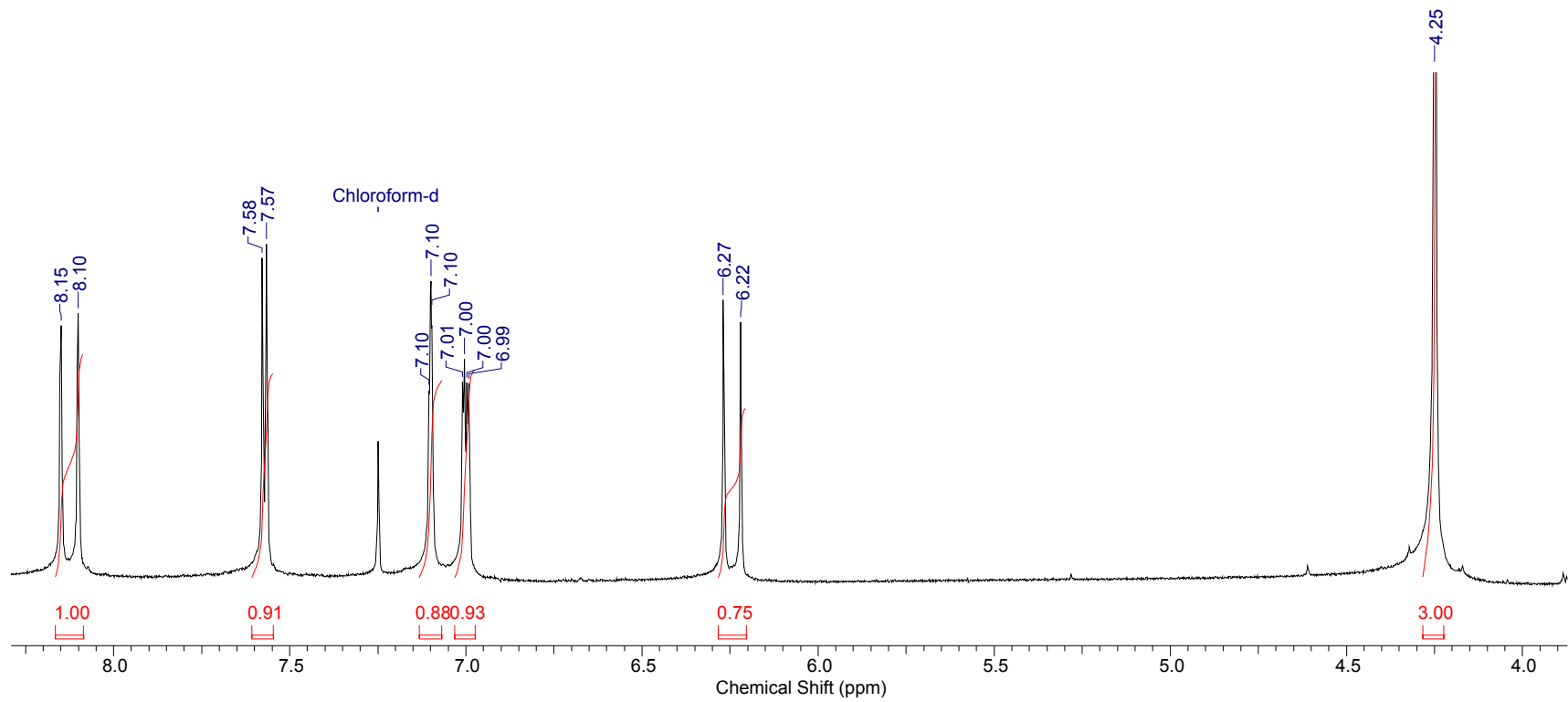


FIGURA 44-Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **12** ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).

III

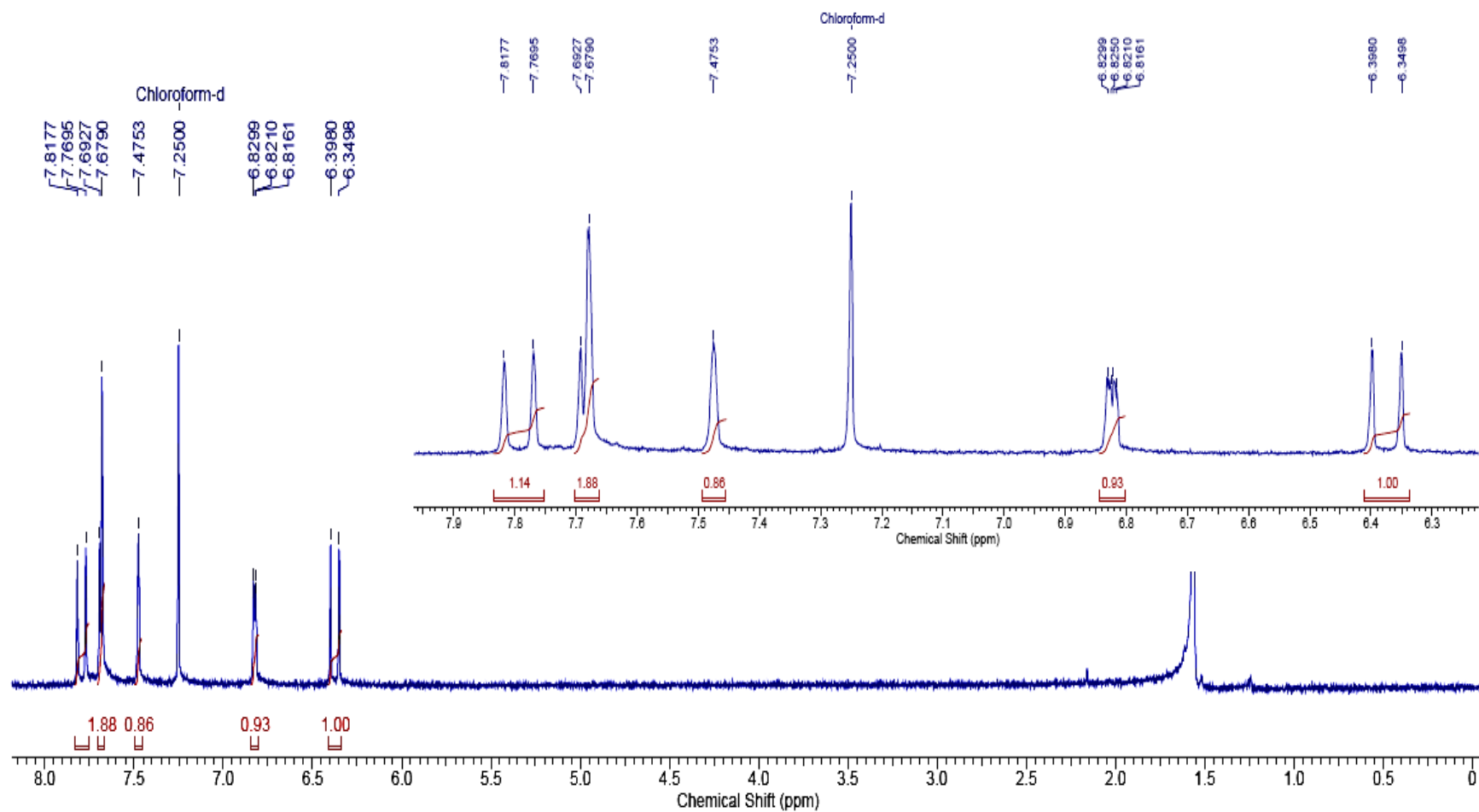


FIGURA 45- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **13** ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).



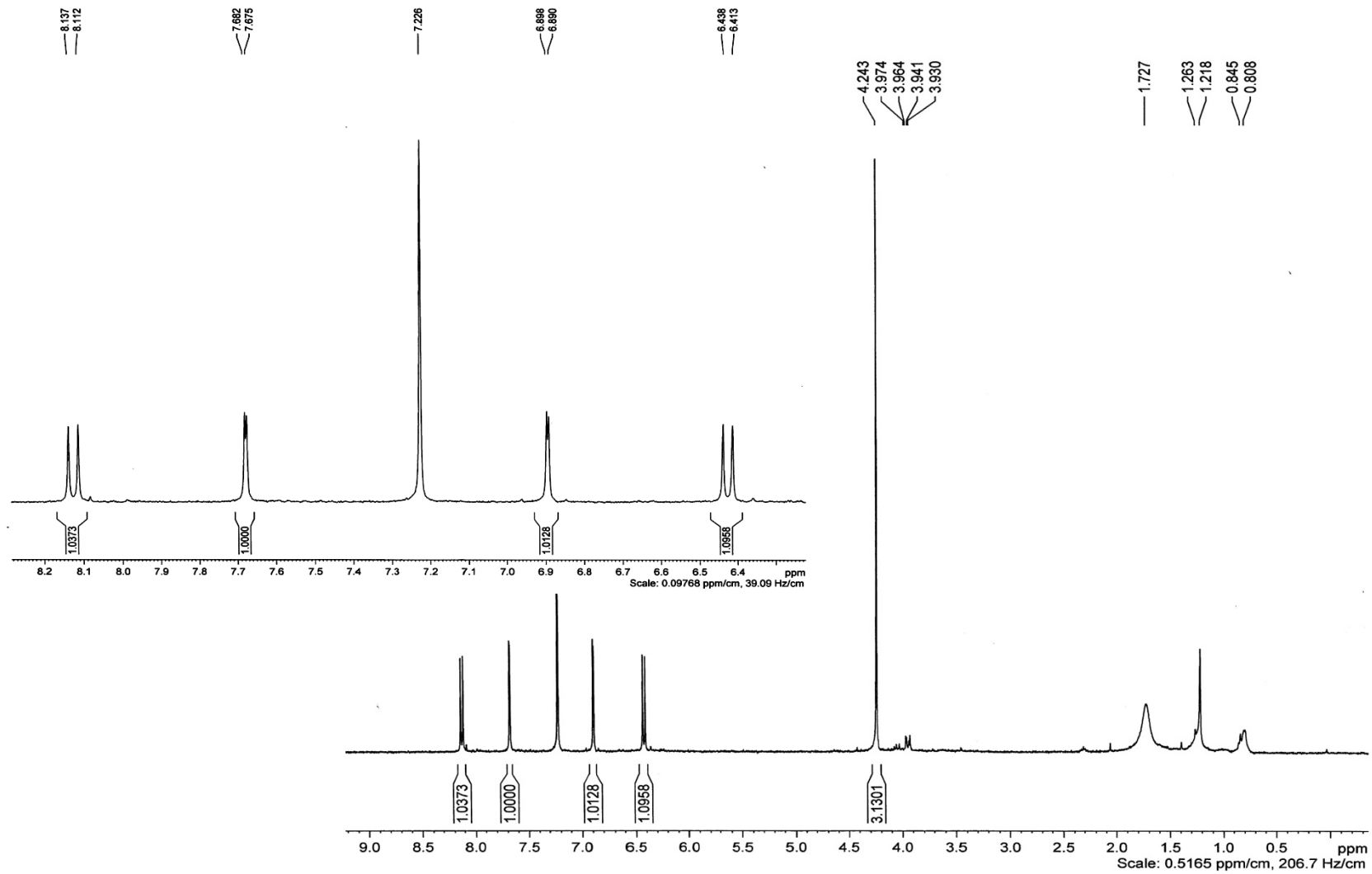


FIGURA 46- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **14** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

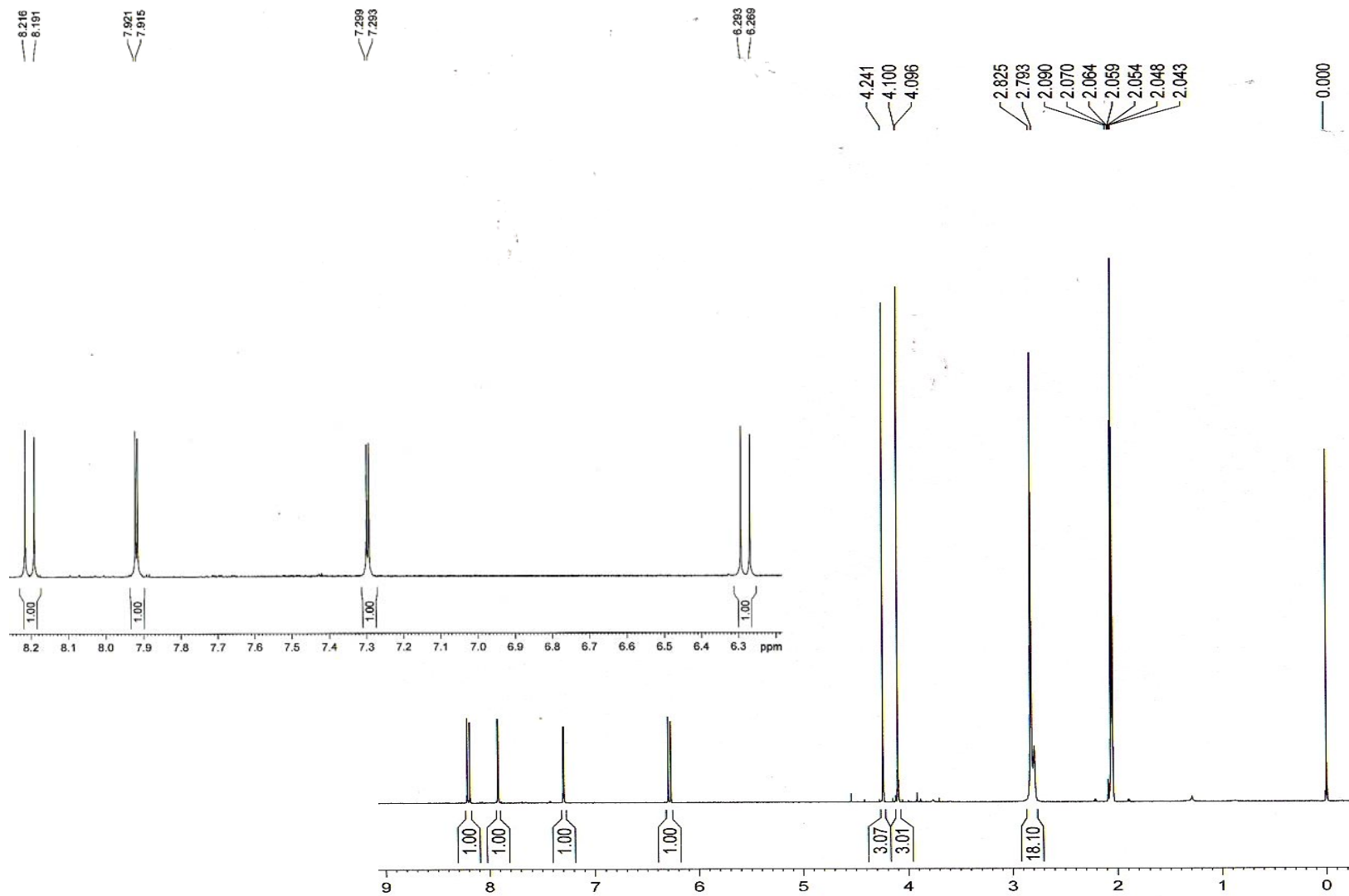


FIGURA 47- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **15** ( $d$ -acetona, 400 MHz).

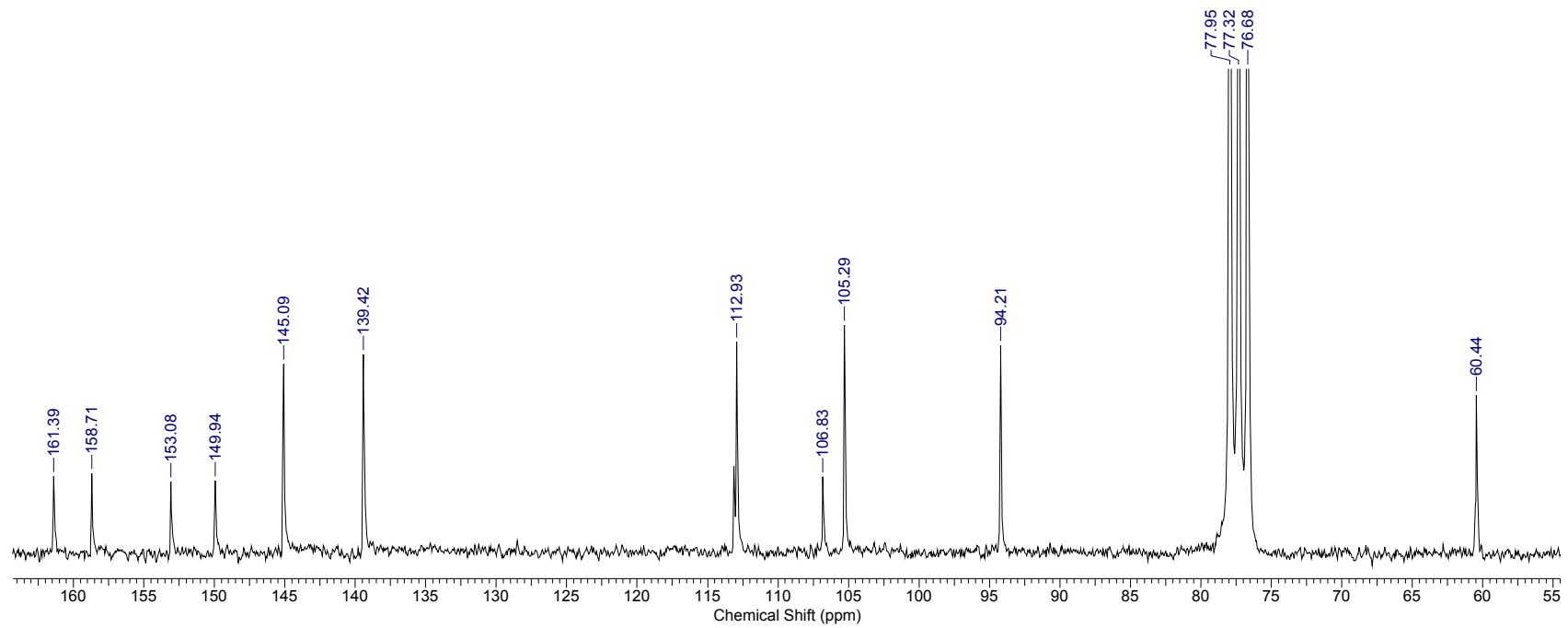


FIGURA 48- Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **12** ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz).

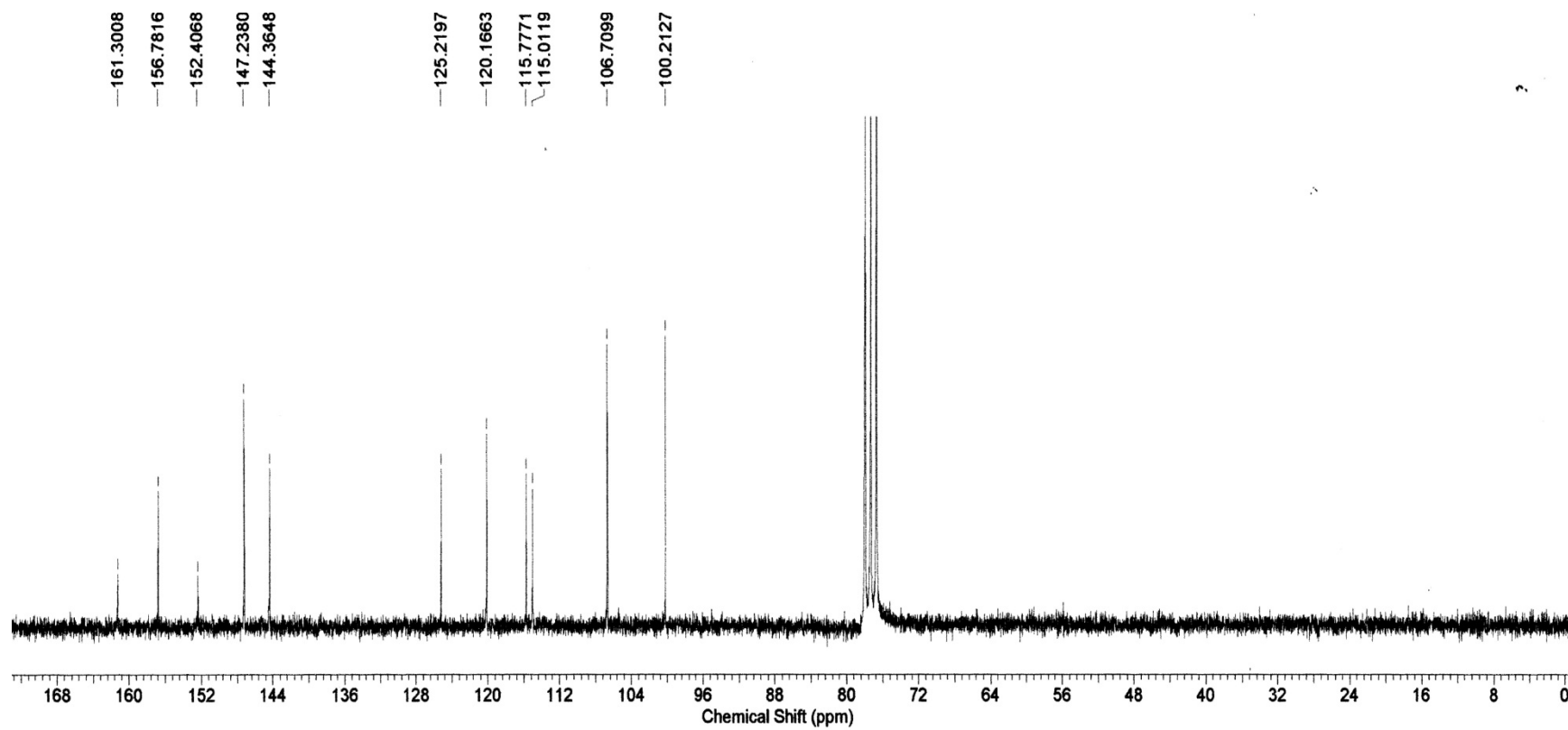


FIGURA 49- Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **13** ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz).

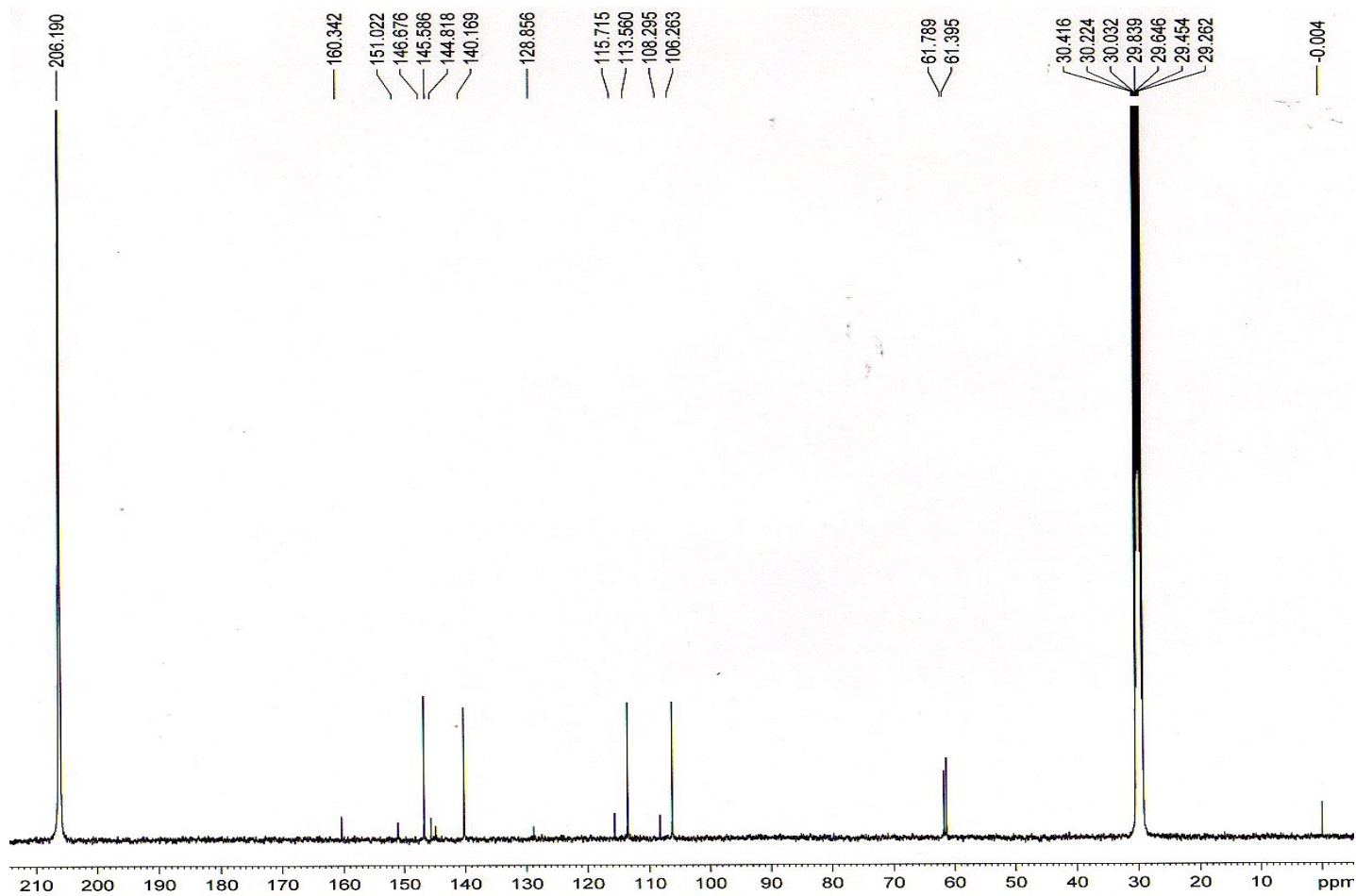


FIGURA 50- Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **15** ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz).

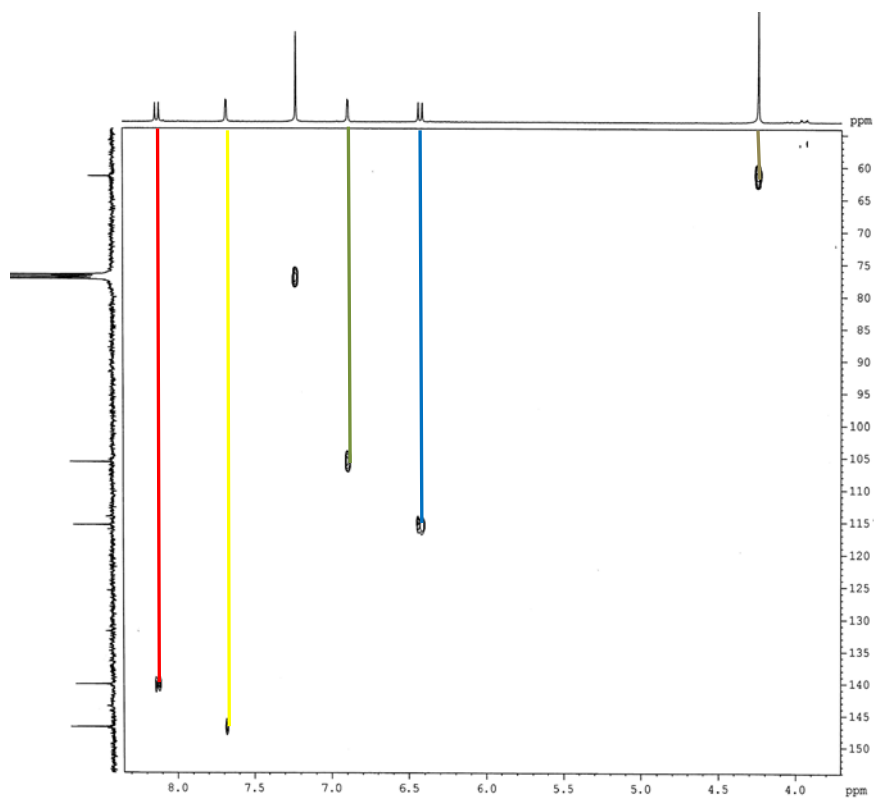


FIGURA 51- Mapa de contorno de HSQC (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) da substância **14**.

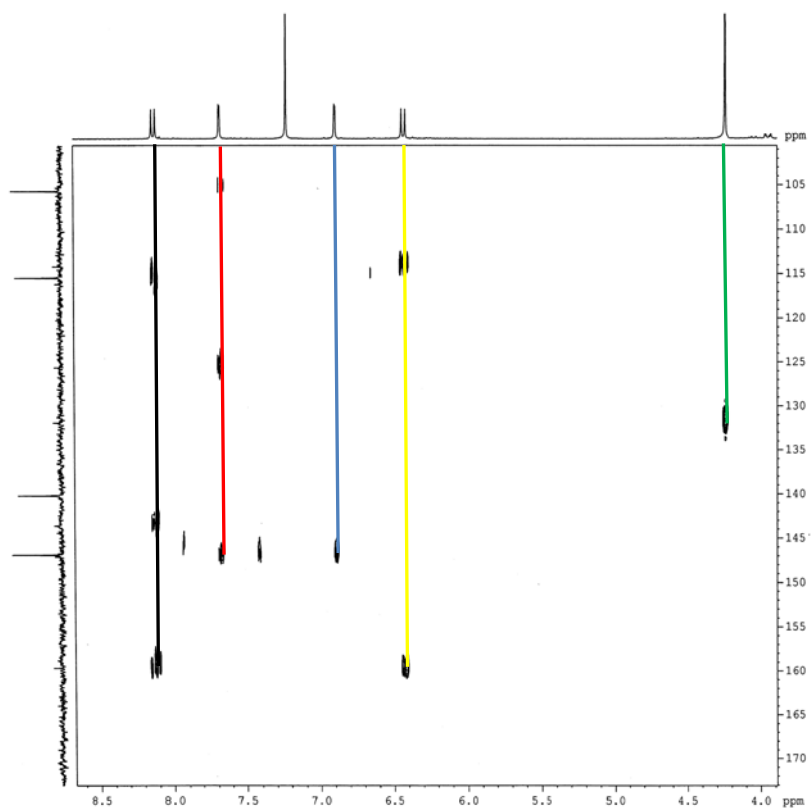


FIGURA 52- Mapa de contorno de HMBC (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) da substância **14**.

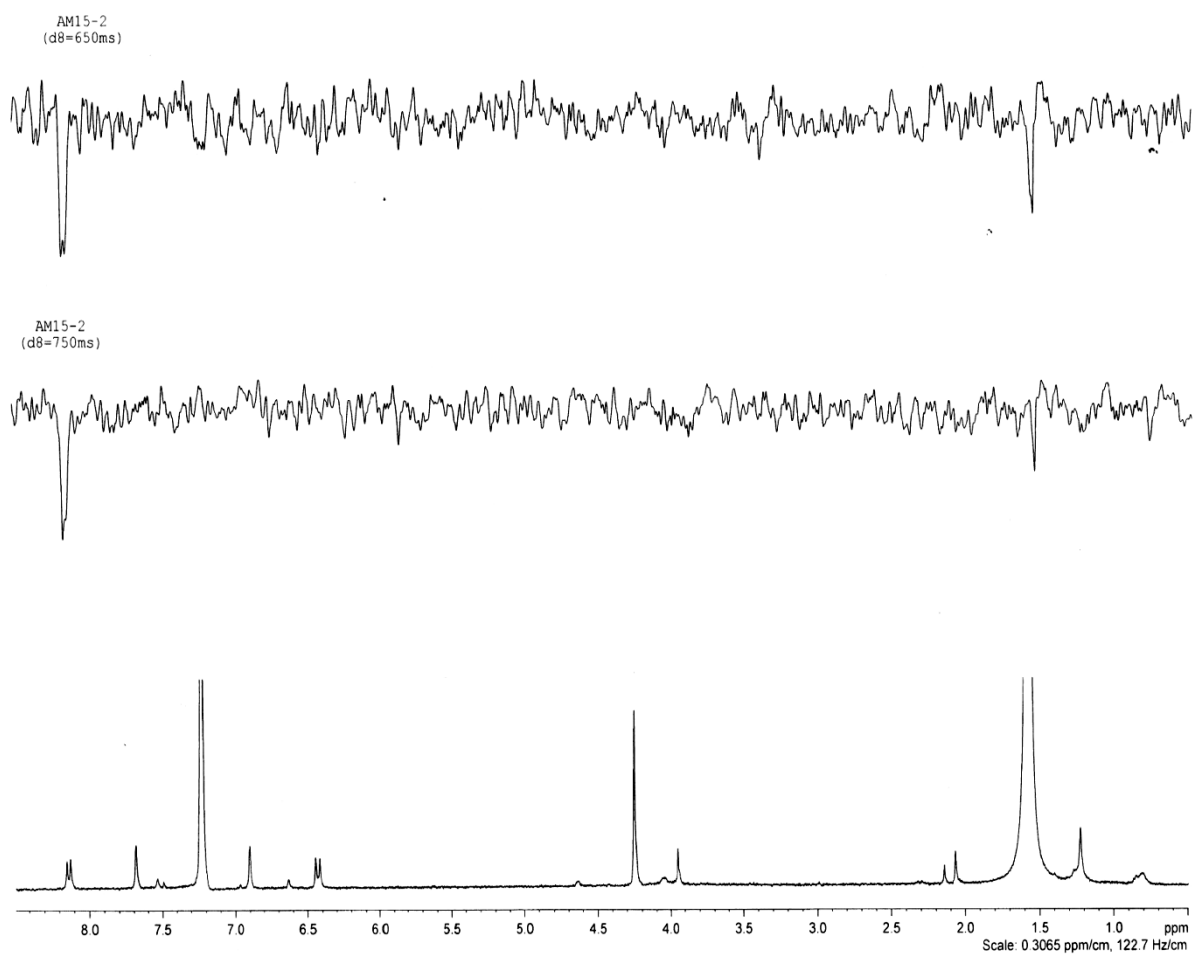


FIGURA 53- Experimento de gNOESY (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância **14** e ampliações.

TABELA 12 - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  para a substância **12** e **13**, e comparação com a literatura.

Hidrogênio	Bergapteno ( <b>12</b> )		Psoraleno ( <b>13</b> )	
	Isolada <b>12</b> (a) $\delta$ (ppm)	MASSUDA, 1998 $\delta$ (ppm)	Isolada <b>13</b> (a) $\delta$ (ppm)	NGADJUI ET AL, 1998 (b) $\delta$ (ppm)
3	6,24 (1H, <i>d</i> $J=9,8$ Hz)	6,26 ( <i>d</i> , $J=9,8$ Hz)	6,39 (1H, <i>d</i> , $J = 9,6$ Hz)	6,39 (1H, <i>d</i> , $J = 9,8$ Hz)
4	8,13 (1H, <i>d</i> , $J=9,8$ Hz)	8,15 ( <i>d</i> , $J=9,8$ Hz)	7,81 (1H, <i>d</i> , $J =9,6$ Hz)	7,81 (1H, <i>d</i> , $J = 9,8$ Hz)
5	-	-	7,69 (1H, <i>s</i> )	7,70 (1H, <i>s</i> )
8	7,10 (1H, <i>s</i> )	7,12 ( <i>s</i> )	7,47 (1H, <i>sl</i> )	7,49 (1H, <i>sl</i> )
2'	7,57 (1H, <i>d</i> , $J=2,6$ Hz)	7,59(1H, <i>d</i> , $J=2,5$ Hz)	7,67 (1H, <i>sl</i> )	7,70 (1H, <i>d</i> , $J =2,3$ Hz)
3'	7,05 (1H, <i>dd</i> , $J=2,6$ e $1,0$ Hz)	7,02 (1H, <i>d</i> , $J=2,5$ Hz)	6,83 (1H, <i>dd</i> , $J =2,1$ ; $0,8$ Hz)	6,84 (1H, <i>dd</i> , $J =0,8$ ; $2,2$ Hz)
5-OMe	4,25 ( <i>s</i> )	4,27 ( <i>s</i> )	-	-

(a) 200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ;

(b) 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ .



TABELA 13- Dados de RMN de  $^1\text{H}$  para a substância **14** e **15**, e comparação com a literatura.

Hidrogênio	5-hidroxi-8-metoxi-psoraleno ( <b>14</b> )	Isopimpineline ( <b>15</b> )	HONGWEI ET AL, 2010
	Isolada <b>14</b> (a)	Isolada <b>15</b> (b)	(c)
	$\delta$ (ppm)	$\delta$ (ppm)	$\delta$ (ppm)
3	6,43 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 10,0 Hz)	6,28 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 10,0Hz)	6,29 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9,7Hz)
4	8,13 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =10,0 Hz)	8,20 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =10,0 Hz)	8,12 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9,7Hz)
2'	7,68 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =2,8 Hz)	7,91 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =2,4Hz)	7,62 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =1,8Hz)
3'	6,89 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =2,8 Hz)	7,29 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =2,4Hz)	6,99 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =1,8Hz)
5-OMe	4,24 (3H, <i>s</i> )	4,24 (3H, <i>s</i> )	4,16(3H, <i>s</i> )
8-OMe	-	4,10 (3H, <i>s</i> )	4,16(3H, <i>s</i> )

(a) 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$

(b) 400 MHz, acetona-*d*

(c) 600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ .(Isopimpineline)

TABELA 14 - Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  para as substâncias **12**, **13** e **15** e comparação com a literatura.

Carbono	Bergapteno ( <b>12</b> )	Psoraleno ( <b>13</b> )	Isopimpineline ( <b>15</b> )	HONGWEI ET AL, 2010 (c) $\delta$ (ppm)
	Isolada <b>12</b> (a) $\delta$ (ppm)	Isolada <b>13</b> (a) $\delta$ (ppm)	Isolada <b>15</b> (b) $\delta$ (ppm)	
2	161,2	161,3	160,3	160,4
3	112,6	115,0	113,5	112,9
4	139,2	144,5	145,5	139,3
4a	149,6	115,7	144,8	143,7
5	106,5	120,1	145,0	144,3
6	112,8	125,2	115,7	114,8
7	158,4	156,7	151,0	150,0
8	93,9	100,2	128,8	128,3
8a	152,8	152,4	108,2	107,1
2'	144,8	147,2	146,6	145,1
3'	105,0	106,7	106,2	105,0
5-OMe	60,1	-	61,3	60,8
8-OMe	-	-	61,7	61,7

(a) 50 MHz,  $\text{CDCl}_3$

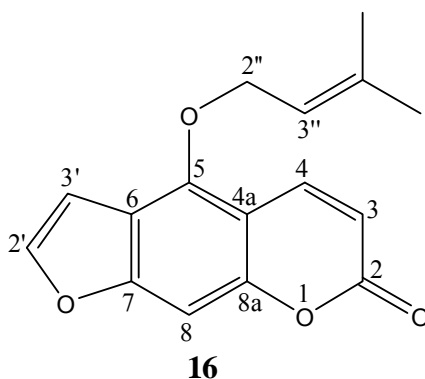
(b) 100 MHz, acetona-*d*

(c) 150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ (isopimpineline)

### 3.3.2 Identificação estrutural da substância 16

A substância **16** foi isolada como um sólido branco a partir da FHDRF das raízes da *R. graveolens* e identificada por RMN de  $^1\text{H}$  (FIGURA 54) p. 123.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , (TABELA 15) p. 124 apresentou sinais de deslocamentos químicos característicos de esqueleto benzofurânico, dois sinais em  $\delta$  7,58 (1H, *d*,  $J = 2,2$  Hz) e  $\delta$  6,94 (1H, *d*,  $J = 2,2$  Hz) referentes ao H-2' e H-3', respectivamente. Foram observados os sinais do H-4 e H-3 do anel lactônico em  $\delta$  8,17 (1H, *d*,  $J=9,7$  Hz) e  $\delta$  6,28 (1H, *d*,  $J=9,7$  Hz). O sinal do H-4, que normalmente aparece em  $\delta$  7,60 encontra-se desblindado, em  $\delta$  8,17; o que indica que a posição 5 do anel aromático é oxidada.



As cumarinas que apresentam substituintes oxigenados na posição C-5, têm o valor do deslocamento químico do H-4 bem desblindado em torno de  $\delta$  8,00 devido ao efeito anisotrópico da ligação C-O na posição 5, e por se encontrar na posição  $\beta$  carboxilica do anel lactônico.

Um *singleto* em H $\delta$  7,14 (1H, *s*) indica a presença de um hidrogênio aromático, que se concluiu ser o H-8. O espectro apresenta também outros sinais em:  $\delta$  1,78 (3H, *s*)  $\delta$  1,68 (3H, *s*) característicos de metilas de prenila, que são confirmados com os sinais em  $\delta$  5,55 (1H, *t*,  $J=6,9$  Hz) do H-3'' e em  $\delta$  4,92 (2H, *d*,  $J=6,9$  Hz) do H-2'', que é relativo ao grupo O-prenila na posição 5.

A partir da análise comparativa dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  com os dados da literatura, pode-se concluir que a substância **16** trata-se da furanocumarina 5-O-3,3-dimetilalil-6,7-furanocumarina (isoimperatorina).

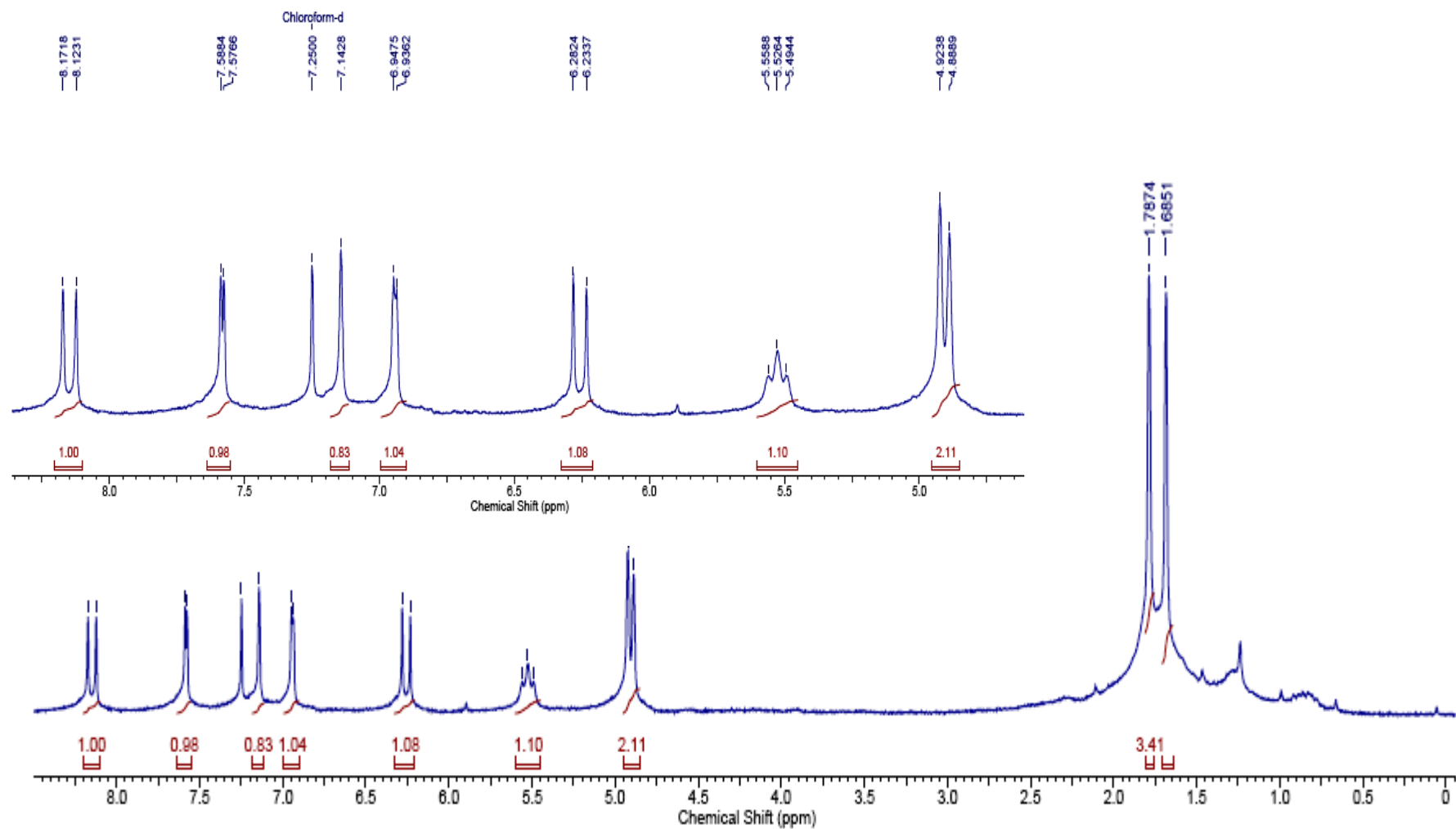


FIGURA 54- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **16** (200MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

TABELA 15- Dados de RMN de  $^1\text{H}$  para a substância **16** e comparação com a literatura.

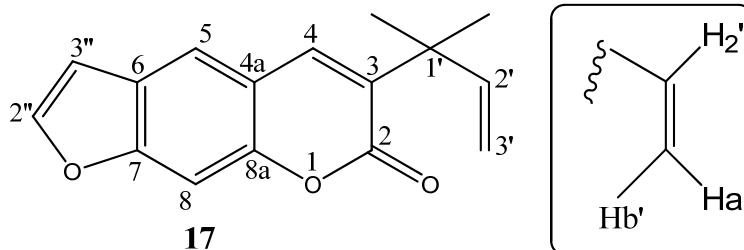
Isoimperatorina		
Hidrogênio	Isolada (a)	THANH ET AL, 2004 (b)
	$\delta$ (ppm)	$\delta$ (ppm)
3	6,28 (1H, <i>d</i> , $J = 9,7$ Hz)	6,29 (1H, <i>d</i> , $J = 9,6$ Hz)
4	8,17 (1H, <i>d</i> , $J = 9,7$ Hz)	8,17 (1H, <i>d</i> , $J = 9,6$ Hz)
8	7,14 (1H, <i>s</i> )	7,17 (1H, <i>sl</i> )
2'	7,58 (1H, <i>d</i> , $J = 2,2$ Hz)	7,61 (1H, <i>d</i> , $J = 2,1$ Hz)
3'	6,94 (1H, <i>d</i> , $J = 2,2$ Hz)	6,97 (1H, <i>dd</i> , $J = 0,9 ; 2,1$ Hz)
2''	4,92 (2H, <i>d</i> , $J = 6,9$ Hz)	4,94 (2H, <i>d</i> , $J = 6,9$ Hz)
3''	5,55 (1H, <i>t</i> , $J = 6,9$ Hz)	5,56 (1H, <i>tl</i> , $J = 6,9$ Hz)
Me-1	1,78 (3H, <i>s</i> )	1,82 (3H, <i>s</i> )
Me-2	1,68 (3H, <i>s</i> )	1,72 (3H, <i>s</i> )

(a) 200 MHz,  $\text{CDCl}_3$

(b) 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$

### 3.3.3 Identificação estrutural da substância 17

A substância **17** é uma furanocumarina isolada da fração FHDRF proveniente das partes aéreas da *R. graveolens*. Sua estrutura foi identificada através dos experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  (FIGURAS 55 e 56) p. 127 e 128, CG-EM e por comparação com a literatura (KOZAWA ET AL., 1974; KUMARET AL., 1995).



No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (TABELA 16) p. 129 não foram observados os *doublets* correspondentes aos hidrogênios olefínicos H-3 e H-4 do esqueleto cumarínico. Sinais de deslocamento químico de hidrogênios em  $\delta$  7,68 (1H, s) foi atribuído ao hidrogênio H-4, indicando uma substituição na posição C-3, que foi confirmada pela presença dos sinais em  $\delta$  1,51 (6H, s), em  $\delta$  5,08 (2H, *d*,  $J = 10,0$  Hz) H-3'a;  $\delta$  5,12 (2H, *d*,  $J = 18,0$  Hz) H-3'b e em  $\delta$  6,26 (1H, *dd*,  $J = 10,0$  e 18,0 Hz) H-2', e um sinal de hidrogênio em  $\delta$  7,43 (1H, s), atribuído ao H-8 da cumarina.

A identificação da substância **17** foi dificultada pela multiplicidade dos sinais não ficarem totalmente definidas, contudo, por ser uma furano cumarina conhecida, foi possível sua identificação comparando com os dados da literatura.

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , (TABELA 17) pg.130 pôde-se observar a presença dos sinais em  $\delta$  40,0;  $\delta$  145,0;  $\delta$  112,5 e  $\delta$  26,0 referentes aos carbonos do grupo prenila C-1', C-2', C-3', C-4' e C-5', respectivamente.

Os sinais característicos do anel furânico são observados no espectro de hidrogênio em  $\delta$  7,65 (1H, *d*,  $J = 2,6$  Hz) referente ao H-2'' e  $\delta$  6,82 (1H, *dd*,  $J = 2,6$  e 1,0 Hz) referente ao H-3''. A mutiplicidade observada para H-3' é justificada pelo acoplamento a longa distância com H-8 em  $\delta$  7,43; uma constante de acoplamento bem pequena com  $J = 1,0$ , chamado acoplamento em *zig-zag*, comum nas cumarinas.

Esses dados, associados com a informação do espectro de massas, e ao pico do íon molecular  $m/z$  254, foi possível confirmar que a substância **17** é a furanocumarina chalepensina.

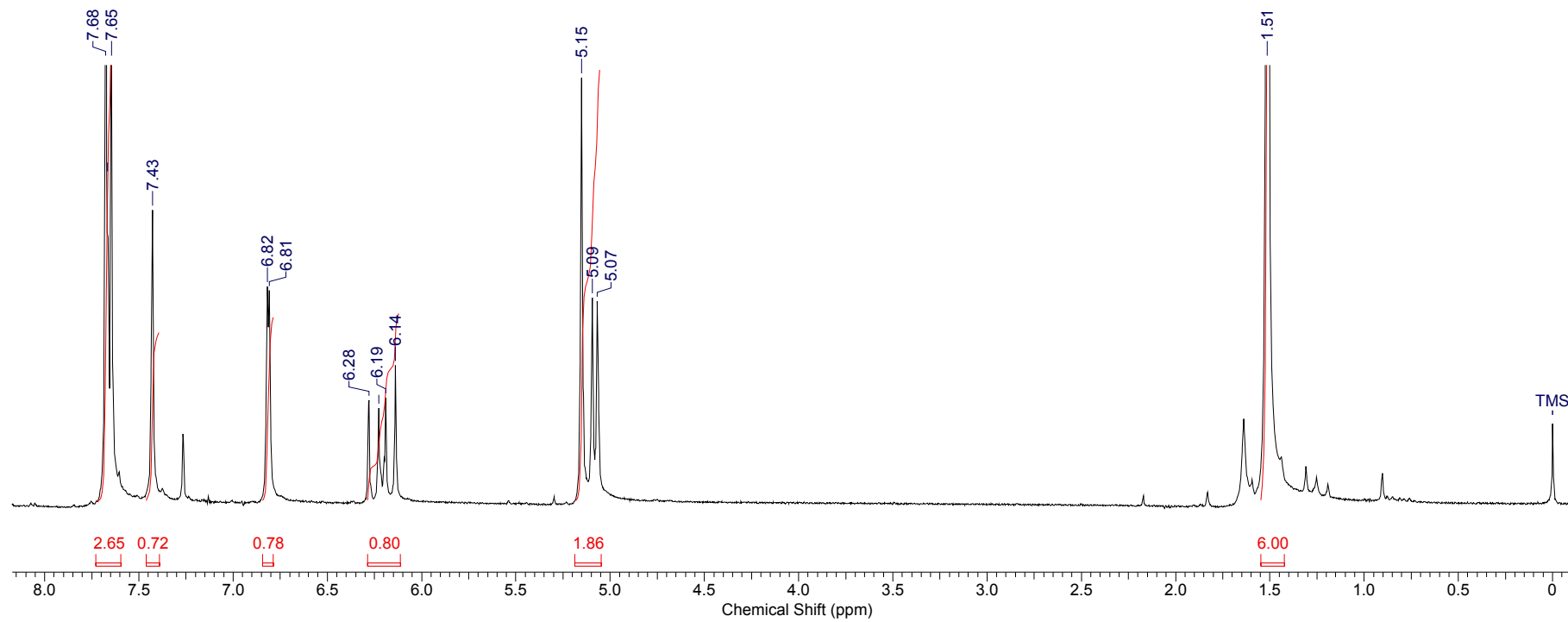


FIGURA 55- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância 17 (200MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



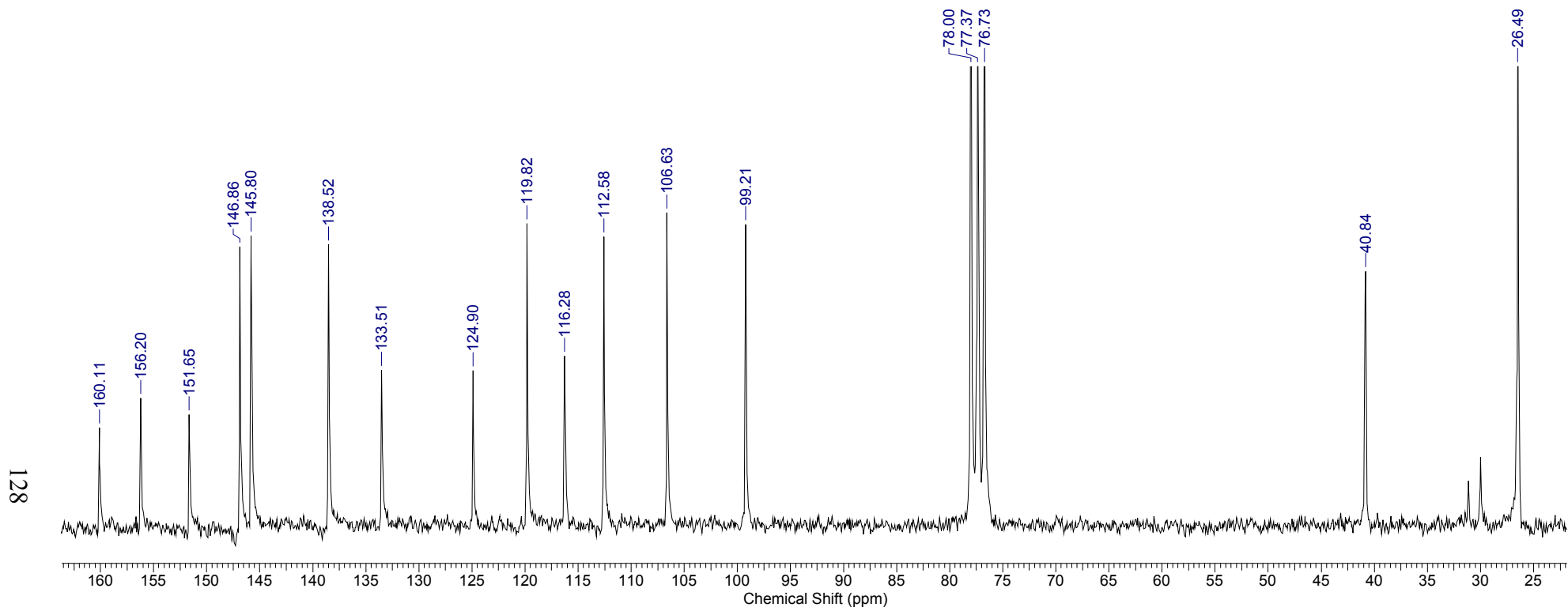


FIGURA 56- Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **17** (50MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

TABELA 16- Dados de RMN de  $^1\text{H}$  da estrutura **17**.

Chalepensina	
Hidrogênio	Isolada (a)
	$\delta$ (ppm)
4	7,68 (1H, s)
5	7,63 (1H, s)
8	7,43 (1H, s)
2'	6,26 (1H, <i>dd</i> , $J = 10,0$ e $18,0$ Hz)
3'a	5,08 (1H, <i>d</i> , $J = 10,0$ Hz)
3'b	5,12 (2H, <i>d</i> , $J = 18,0$ Hz)
2''	7,65 (1H, <i>d</i> , $J = 2,6$ Hz)
3''	6,82 (1H, <i>dd</i> , $J = 2,6$ e $1,0$ Hz)
4'	1,51 (s)
5'	1,51 (s)

(a) 200 MHz,  $\text{CDCl}_3$

TABELA 17- Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  da estrutura **17** e comparação com a literatura.

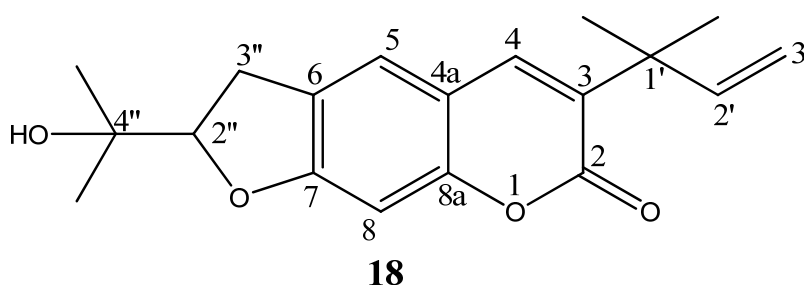
Chalepensina		
Carbono	Isolada (a)	KUMAR ET AL., 1995
	$\delta$ (ppm)	$\delta$ (ppm)
2	160,1	159,9
2'	138,5	138,3
3	133,5	133,2
3'	112,5	112,3
4	145,8	146,6
4'	26,5	26,2
4a	151,6	151,3
8a	116,3	115,9
5	119,8	119,5
5'	26,5	40,5
6	124,9	124,6
7	156,2	155,9
8	99,2	99,0
2''	146,9	145,5
3''	106,6	106,3

(a) 50 MHz,  $\text{CDCl}_3$

(b) 50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ .

### 3.3.4 Identificação estrutural da substância 18

A substância **18** foi isolada da fração FDFR das partes aéreas da *R. graveolens*. Esta apresentou fluorescência azul sob radiação UV em CCDA e sua identificação foi realizada através de espectros de RMN  $^1\text{H}$ , HSQC e HMBC (FIGURAS 57- 59) pg. 134-135.



O espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , da substância **18** apresentou sinais de deslocamento químico de hidrogênios em  $\delta$  7,43 (1H, s) para o H-4 (por estar na forma de *singleto* indica haver um substituinte na posição C-3) e hidrogênios característicos de um sistema vinílico com acoplamentos *cis*, *trans* e *geminal* em  $\delta$  4,98-5,02 (2H, *m*) referente ao H-3' e em  $\delta$  6,10 (1H, *dd*,  $J=11,6$  e  $17,2$  Hz) referente ao H-2'. Estes sinais, junto com o sinal de  $\delta$  1,40 (6H, s) referente a dois grupos metila geminais, evidenciam a presença do substituinte 1', 1'-dimetilalila na posição 3 do anel lactônico da substância **18**.

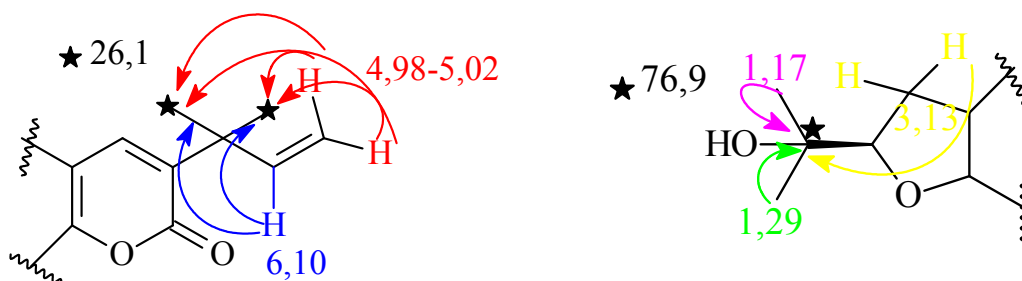
Outros sinais de deslocamento de hidrogênio foram observados em  $\delta$  7,17 (1H, *s*) e 6,61(1H, s), referentes a hidrogênios aromáticos nas posições C-5 e C-8 respectivamente.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ainda apresentou sinais em  $\delta$  4,67 (1H, *t*,  $J=9,2$ Hz), referente ao H-2'', e em  $\delta$  3,13 (2H, *m*) referente ao H-3'', característicos de hidrogênios carbinólico e benzílico respectivamente. Foram também observados sinais em  $\delta$  1,17 (3H, s) e em  $\delta$  1,29 (3H, s) relativos a grupos metila. Dessa forma, foi possível afirmar a presença de um grupo hidroxi-isopropílica ligado ao C-2'' do anel diidrofuranocumarínico.

No espectro de correlação HSQC, observou-se que os sinais em  $\delta$  1,40;  $\delta$  1,29 e  $\delta$  1,17 correlacionam-se com os sinais de carbono em  $\delta$  26,1 e  $\delta$  24,4; respectivamente. Foram também observados sinais de hidrogênio em  $\delta$  4,98-5,02;  $\delta$

6,61;  $\delta$  7,17;  $\delta$  7,43 correlacionando-se com sinais de carbono em  $\delta$  112,1;  $\delta$  96,8;  $\delta$  123,3;  $\delta$  137,5; respectivamente.

O mapa de contorno do HMBC apresentou muitas correlações, entretanto, as mais importantes foram às correlações dos sinais de hidrogênio em  $\delta$  4,98-5,02 e  $\delta$  6,10 com carbono em  $\delta$  26,1; e  $\delta$  1,29;  $\delta$  3,13 e  $\delta$  1,17 com o carbono em  $\delta$  76,9. Ainda, foi possível observar que o hidrogênio em  $\delta$  6,61 correlaciona-se com os carbonos em  $\delta$  112,4 e  $\delta$  140,0; e  $\delta$  7,42 correlaciona com o carbono em  $\delta$  160,3.



O espectro de massa mostrou o pico íon molecular  $m/z$  314, confirmando a cumarina proposta. Dessa forma, através da análise comparativa dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  com a literatura (TABELA 18) pg 136, juntamente com os experimentos de RMN 2D e dados de espectrometria de massas, permitiu-se concluir que a substância **18** trata-se da furanocumarina chalepina.

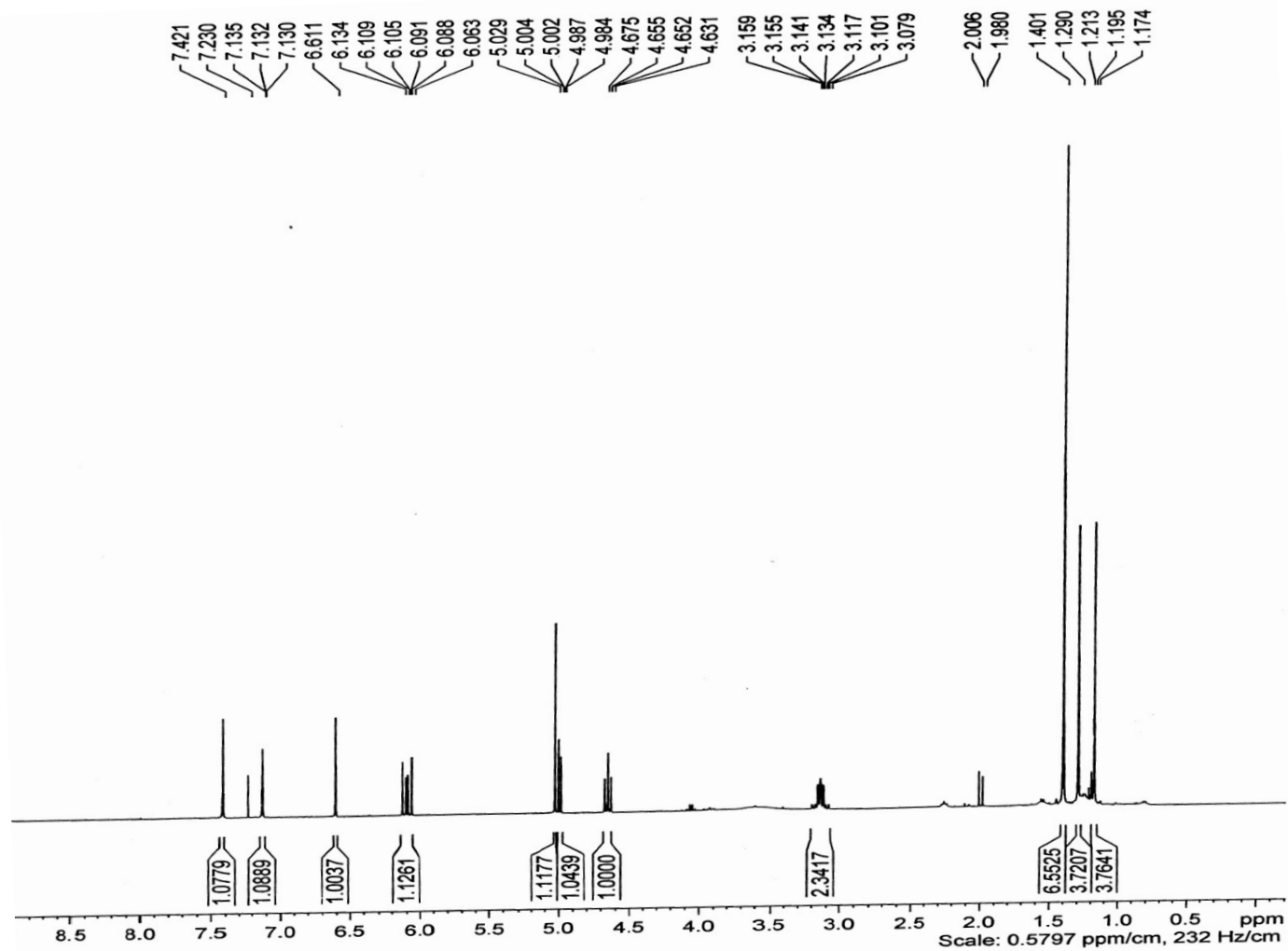


FIGURA 57- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **18** (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

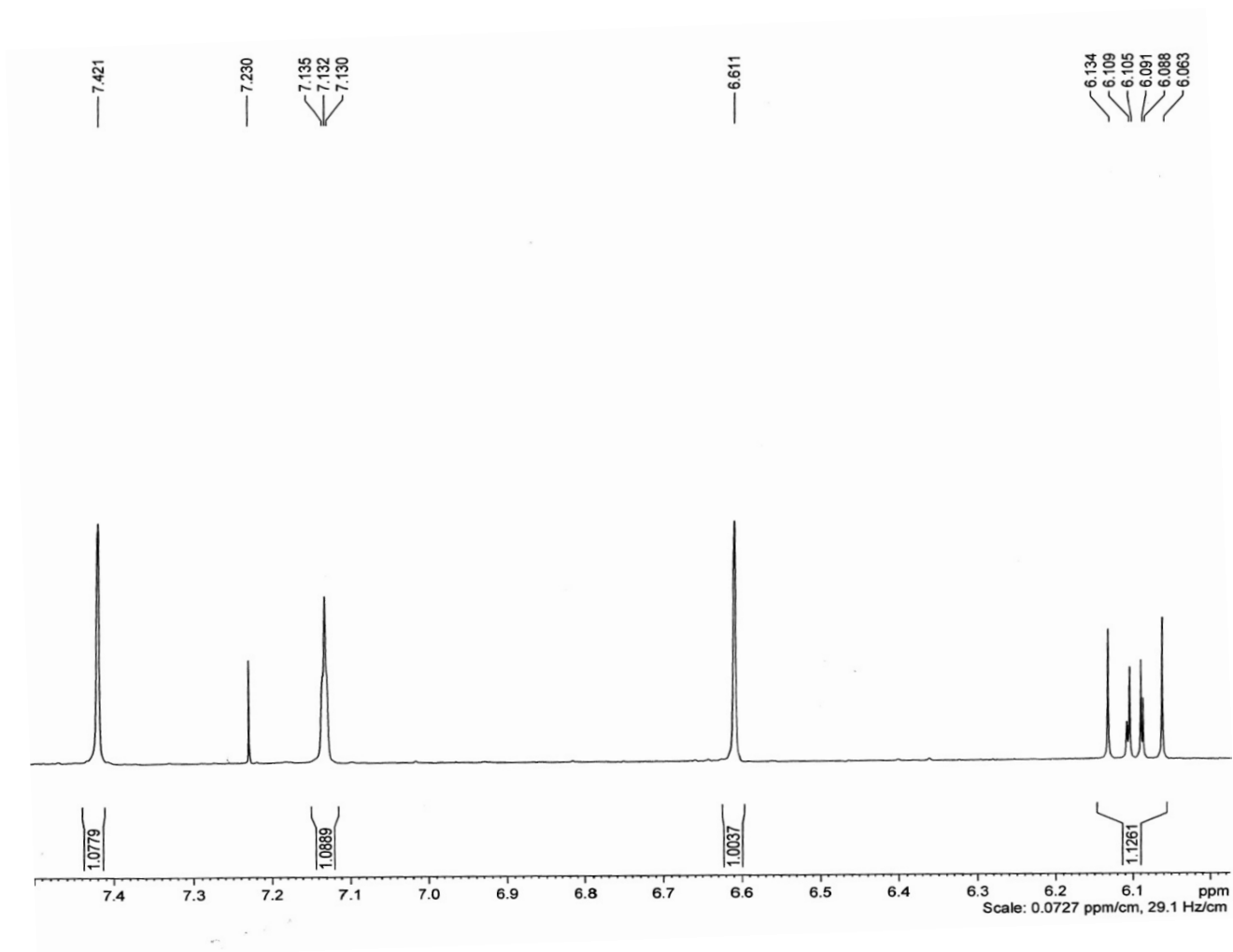


FIGURA 57.1- Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **18** (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

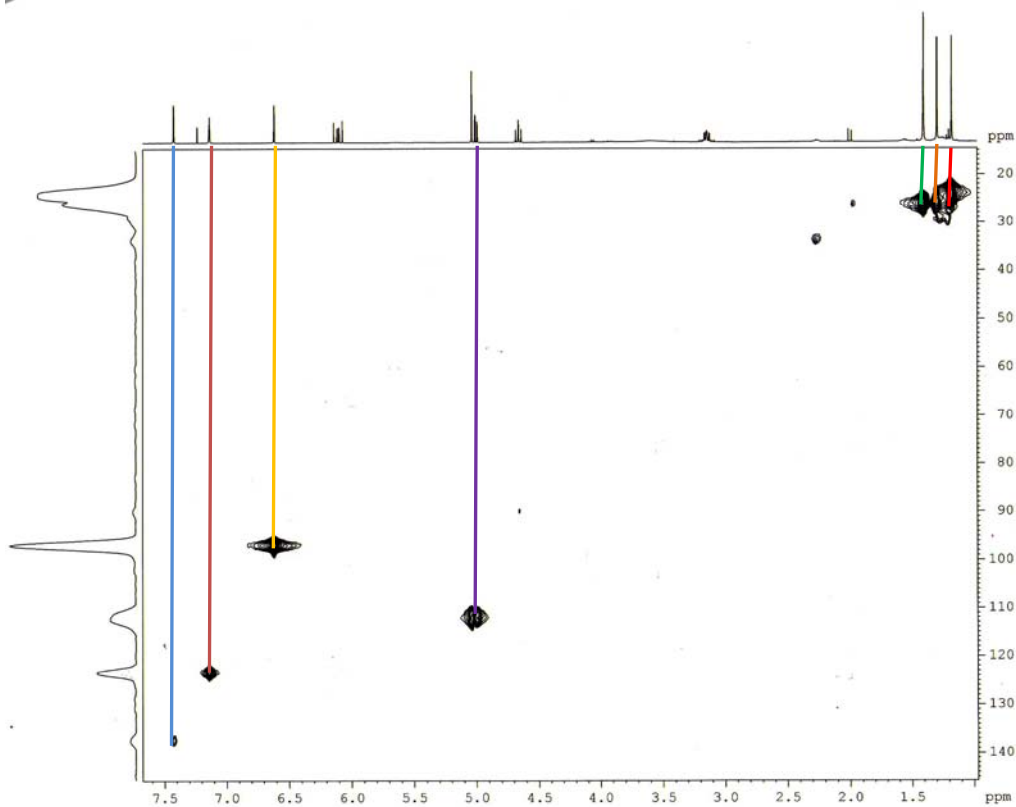


FIGURA 58- Mapa decorrelação de HSQC da substância **18** (400MHz, CDCl<sub>3</sub>).

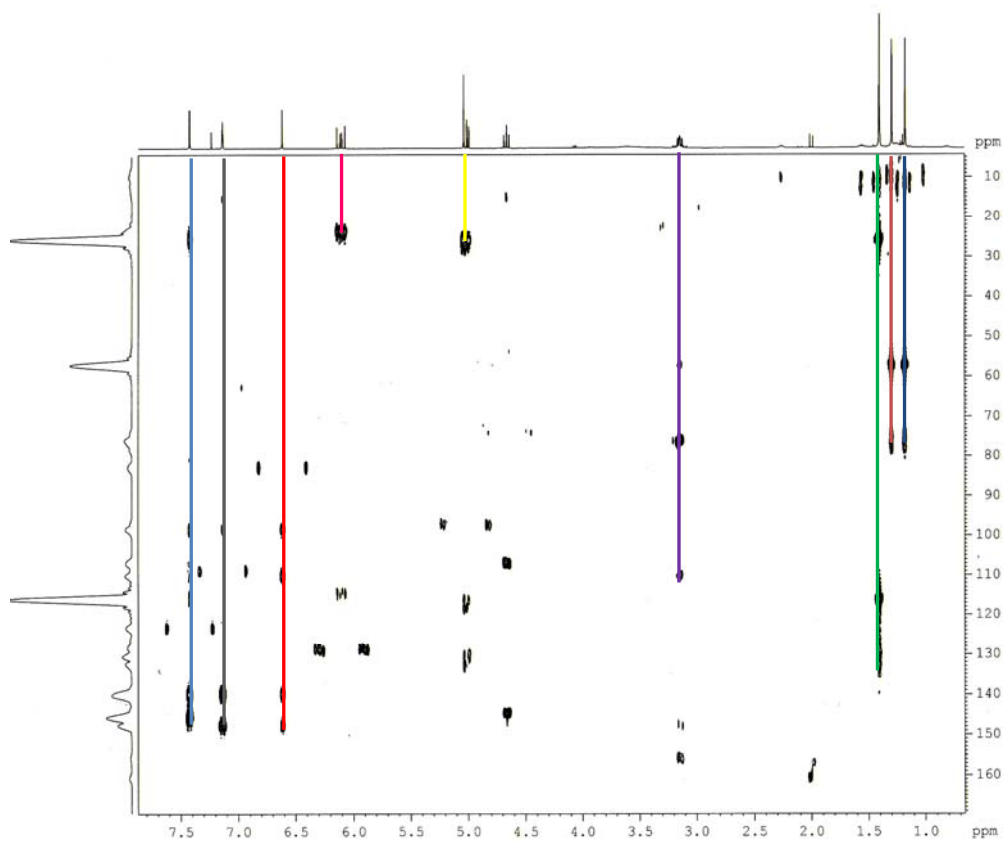


FIGURA 59- Mapa de correlação de HMBC da substância **18** (400MHz, CDCl<sub>3</sub>).



TABELA 18-Dados de RMN de  $^1\text{H}$  para a substância **18** e comparação com a literatura.

Chalepina		
Hidrogênio	Isolada (a)	OLIVEIRA, 1996 (b)
	$\delta$ (ppm)	$\delta$ (ppm)
4	7,43 (1H, s)	7,45 (1H,s)
5	7,17 (1H,s)	7,17 (1H,s)
8	6,61 (1H, s)	6,68 (1H,s)
2'	6,10 (1H, <i>dd</i> , $J=11,6$ e $17,2$ Hz)	6,14 (1H, <i>dd</i> , $J=10,0$ e $18,0$ Hz)
3'	4,98-5,02 (2H, <i>m</i> , 2H)	5,07-5,00 (2H, <i>m</i> , 2H)
2''	4,67 (1H, <i>t</i> , $J =9,2$ Hz)	4,69 (1H, <i>t</i> , $J =8,6$ Hz)
3''	3,13 (2H, <i>m</i> , 2H)	3,18 (2H, <i>dl</i> , $J=8,6$ ; 2H)
Me-1'	1,40 (6H, s)	1,44 (6H, s)
Me-4''	1,29; 1,17 ( 2s)	1,34; 1,20 (2s)

(a) 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$

(b) 200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ .

# *Parte Experimental*

*1*

## **4.0 Estudo fitoquímico da espécie *Ruta graveolens***

O estudo fitoquímico foi realizado no Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais (PN) do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

### **4.1 Materiais**

#### **4.1.1 Material cromatográfico:**

##### **❖ Cromatografia por adsorção**

- ✓ Cromatografia em coluna (CC) utilizando como fase estacionária: Sílica Gel 60 (70-230 mesh) e 60 (230-400 mesh) da Merck.
- ✓ Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE): Semi-Preparativa com fase estacionária propil-diol (30 X 0,78cm), diâmetro de partícula 10µm, preparativa e analítica octadecilsilano (31 x 1,0cm) e (25 x 0,46cm), Semi-Preparativa com fase estacionária Fenil-Hexil (0,7 x 30cm), diâmetro de partícula 10µm.

##### **❖ Cromatografia por exclusão**

- ✓ Sephadex LH-20 de procedência Amersham Pharmacia Biotech AB.
- ✓ Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando fase estacionária: polimérica preparativa Shodex Asahipak (45 X 2,5cm) e diâmetro de partícula de 5µm.

##### **❖ Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDA):**

- ✓ Cromatoplasas- Sílica gel 60 F<sub>254</sub>, AL TLC 20 x 20cm da Merck.

#### 4.1.2 Reveladores:

- ✓ Câmara de luz UV (254 e 365 nm)
- ✓ Reagente de Dragendorff
- ✓ Solução de Vanilina em ácido sulfúrico

#### 4.1.3 Solventes utilizados para cromatografia:

- ✓ Solventes comerciais destilados no DQ/UFSCar
- ✓ Solventes P.A. da Merck, Synth, Vetec e Labsynth
- ✓ Solventes de grau cromatográfico da JTB e Tedia para análise em CLAE
- ✓ Solventes deuterados da Merck, Aldrich (TMS 0,03%) e Isotec Inc.

#### 4.1.4 Equipamentos

#### ❖ **Espectrômetros de Ressonância Magnética Nuclear, Massas, UV e Oxímetro**

- ✓ Bruker DRX 9,8 T (400 MHz para RMN  $^1\text{H}$  e 100 MHz para  $^{13}\text{C}$ )
- ✓ Bruker ARX 4,9 T (200 MHz para RMN  $^1\text{H}$  e 50 MHz para RMN  $^{13}\text{C}$ )
- ✓ CG-EM: Shimadzu QP 5000- Ionização por Impacto Eletrônico
- ✓ FEMTO (D2), espectrofotômetro 700 plus- DQ/UFSCar
- ✓ Oxímetro: Oxygraph YSI, modelo 5300.
- ✓ MS (triplo quadrupolo) equipado com fonte ESI/APCI (API 2000, applied bio system) e gás de arraste argônio, utilizado em inserção direta e acoplado ao cromatografo líquido Agilent 1200.

#### ❖ **Evaporadores rotativos**

BUCHI, rotavapor R-114 equipado com banho BUCHI B-480 e recirculador refrigerado NESLAB, modelo CFT-25 mantido a 5 °C.

BUCHI, rotavapor R-200 equipado com banho BUCHI B-490 e recirculador refrigerado NESLAB, modelo CFT-25 mantido a 5 °C.

#### ❖ **Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

- ✓ Shimadzu modelo SCL-10A VP com válvula para reciclo, com injetor Rheodyne modelo 7725i e bomba Shimadzu modelo LC-10AD. Detector UV-Vis.

## 4.2 Material Botânico

### 4.2.1 Coleta do Material Botânico

O material vegetal foi coletado em 27 de fevereiro de 2008 no Sítio Akai, localizado na Rodovia Dom Pedro I, Km 83, no município de Atibaia-SP.

### 4.2.2 Preparo do Extrato Vegetal

As partes aéreas e as raízes da *R. graveolens* foram secas em estufa de ar circulante a 35°C e, em seguida, pulverizadas em moinho de bolas. Com o material vegetal seco, foi realizado o processo de extração com etanol a frio, utilizando um homogenizador (Ultra-Turrax), com rotação constante de 1.000rpm por 3 dias. Em seguida, o mesmo foi filtrado e concentrado sob vácuo em evaporador rotativo com temperatura máxima de 35°C. A completa secagem do material foi realizada através do seu armazenamento em frascos de vidro, parcialmente tampados, para permitir a evaporação do solvente à temperatura ambiente em uma capela de exaustão de gases. Posteriormente, realizou-se um fracionamento dos extratos etanólicos, utilizando a técnica de cromatografia em coluna via seca, fracionando com os solventes hexano, diclorometano e metanol, em ordem crescente de polaridade (TABELA 1) para as partes aéreas, e utilizando a técnica de partição líquido/líquido, fracionando com os solventes hexano, diclorometano, acetato de etila e água, em

ordem crescente de polaridade (TABELA 2) para as raízes. Todo solvente utilizado para o preparo dos extratos foi previamente destilado.

TABELA 19- Massa das frações do extrato etanólico das partes aéreas da *R. graveolens*

Massa do extrato(g)	Frações*	Massa das frações(g)	Código
203,6	HEX	4,0	FHRF
	HEX/DCM	9,8	FHDRF
	DCM	14,6	FDRF
	DCM/MEOH	10,4	FDMRF
	MEOH	95,0	FMRF

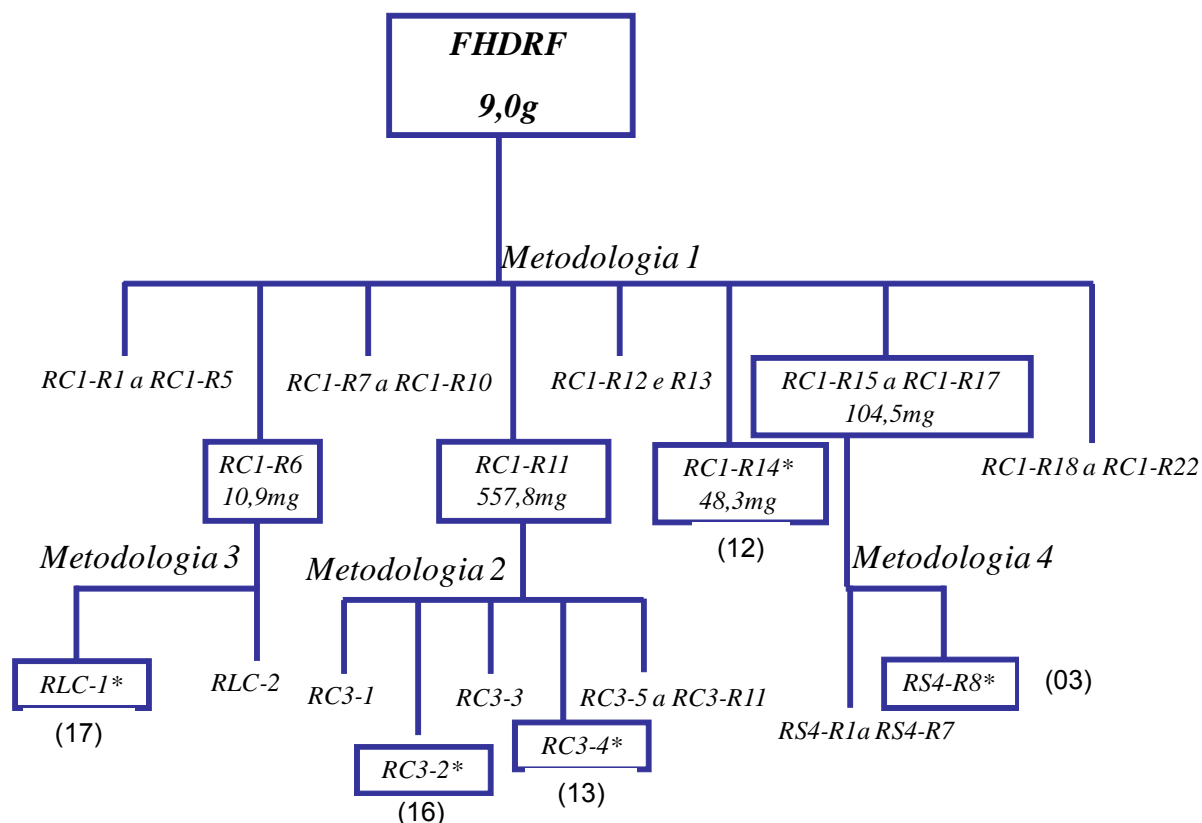
\*HEX(hexano), DCM (diclorometano), MEOH (metanol)

TABELA 20- Massas das frações do extrato etanólico das raízes da *R. graveolens*

Massa do extrato(g)	Frações	Massa das frações(g)	Código
7,0	Hexano	1,53	FHRR
	Diclorometano	1,55	FDRR
	Acetato de Etila	1,87	FAcRR
	Água	1,98	FAqRR

### 4.3 Isolamento dos constituintes de *R. graveolens*

#### 4.3.1 Estudo Químico da Fração FHDRF



FLUXOGRAMA 1. Estudo da fração hexano/diclorometano (FHDRF)

Metodologia 1:

# Coluna em sílica gel (70-230 mesh),  $\phi = 5,3$  cm e  $h = 21,0$  cm

# Gradiente de eluição: Hexano, diclorometano, acetona, metanol (ordem crescente de polaridade)

Metodologia 2:

# Coluna Sephadex (70-230 mesh),  $\phi = 2,0$  cm e  $h = 20,0$  cm

# Modo isocrático de eluição: DCM : MeOH (1:1)

Metodologia 3:

# CLAE-UV-Vis ( $\lambda = 254$  e  $365$  nm)

# Coluna Semi-preparativa: Polimérica Preparativa Shodex Asahipak (45 X 2,5 cm) e diâmetro de partícula de  $5\mu\text{m}$

# Solvente: Metanol/diclorometano (7:3 v/v) (Modo isocrático)

# Fluxo: de 5mL/min

# Loop:  $200\mu\text{L}$

Metodologia 4:

# Coluna Sephadex (70-230 mesh),  $\phi = 2,0$  cm e  $h = 20,0$  cm

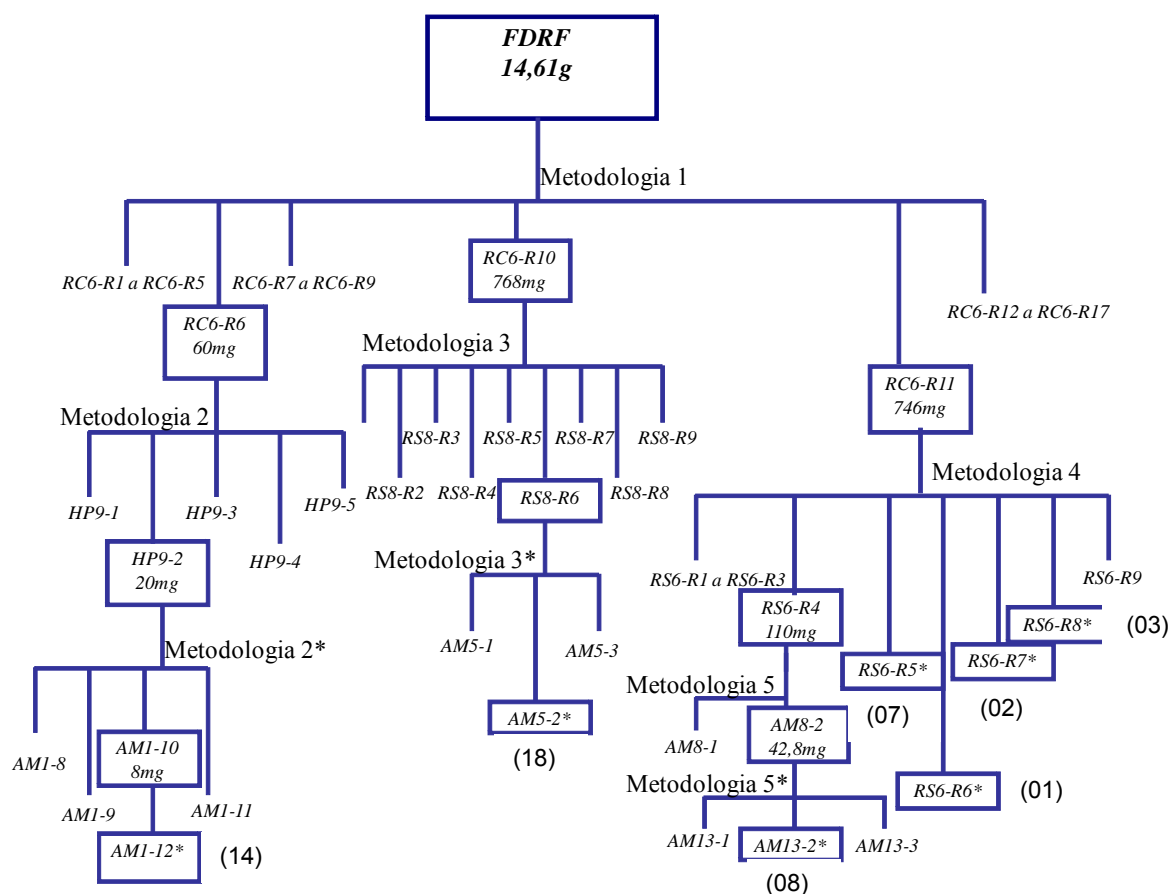
# Modo isocrático de eluição: DCM : MeOH (1:1)

Código: FHDRF (Fração hexano/diclorometano Ruta Folhas)

O estudo da fração *FHDRF* (FLUXOGRAMA 1) levou ao isolamento de cinco substâncias, sendo elas RC1-R14 bergapteno (**12**), RC3-2 isoimperatorina (**16**), RC3-4 psoraleno (**13**), RLC-1 chalepentina (**17**) e RS4-R8 *N*-metilacridona (**03**).



### 4.3.2 Estudo Químico da Fração FDRF



FLUXOGRAMA 2. Estudo da fração diclorometânica (FDRF)

Metodologia 1:

# Coluna em sílica gel (70-230 mesh),  $\phi = 5,3\text{cm}$  e  $h = 33\text{cm}$

# Gradiente de eluição: hexano, diclorometano, acetona, metanol (ordem crescente de polaridade)

Metodologia 2:

# CLAE-UV-Vis ( $\lambda = 254$  e  $365$  nm)

# Coluna Semi-preparativa: Polimérica Preparativa Shodex Asahipak (45 X 2,5 cm) e diâmetro de partícula de  $5\mu\text{m}$

# Solvente: Metanol/diclorometano (1:1 v/v) (Modo isocrático)

# Fluxo: de  $5\text{mL}/\text{min}$

# Loop:  $200\mu\text{L}$

Metodologia 2\* e 3\*:

CLAE-UV-Vis ( $\lambda = 254$  e  $365$  nm)

# Coluna: Semi-Preparativa Fenil-Hexil (30 X 0,7) e diâmetro de partícula de  $10\mu\text{m}$

# Fluxo: 3 mL/min

# Loop:  $200\mu\text{L}$

# Solvente: MeOH:DCM (Modo isocrático)

Metodologia 3:

# Coluna Sephadex LH-20,  $\phi = 10,5\text{cm}$  e  $h = 68,0\text{cm}$

# Modo isocrático de eluição: MeOH/DCM (1:1)

Metodologia 4:

# Coluna Sephadex LH-20,  $\phi = 10,5\text{cm}$  e  $h = 68,0\text{cm}$

# Modo isocrático de eluição: MeOH/DCM (1:1)

Metodologia 5 e 5\*:

CLAE-UV-Vis ( $\lambda = 254$  e  $365$  nm)

Coluna: Semi-Preparativa Fenil-Hexil (30 X 0,7) e diâmetro de partícula de  $10\mu\text{m}$

# Fluxo: 3 mL/min

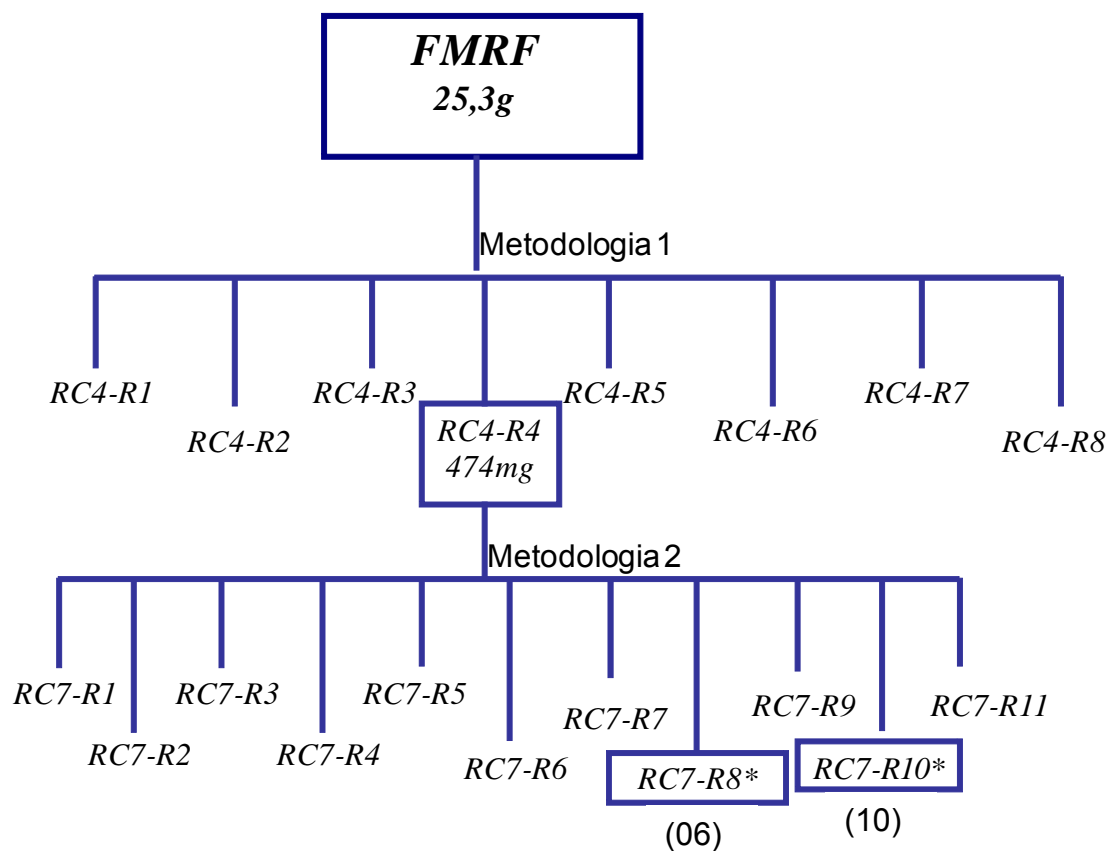
# Loop:  $200\mu\text{L}$

# Solvente: MeOH:DCM (8:2) (Modo isocrático)

Código: FDRF (Fração diclorometânica Ruta Folhas)

O estudo da fração *FDRF* (FLUXOGRAMA 2) levou ao isolamento de sete substâncias: AM1-12 a 5-hidroxi-8-metoxi-psoraleno (**14**), AM5-2 a chalepina (**18**), RS6-R5 a dictamina (**07**), RS6-R6 a 3-hidroxi-1,2-dimetoxi-*N*-metil-acridona (**01**), RS6-R7 a arborinina (**02**), RS6-R8 a 1,4-dihidroxi-2,3-dimetoxi-*N*-metilacridona (**04**), AM13-2 a kokusaginina (**08**).

### 4.3.3 Estudo Químico da Fração FMRF



FLUXOGRAMA 3. Estudo da fração metanólica (FMRF)

Metodologia 1:

# Coluna em sílica gel (70-230 mesh),  $\phi = 5,5\text{cm}$  e  $h = 39\text{cm}$

# Gradiente de eluição: hexano, diclorometano, acetona, metanol (ordem crescente de polaridade)

Metodologia 2:

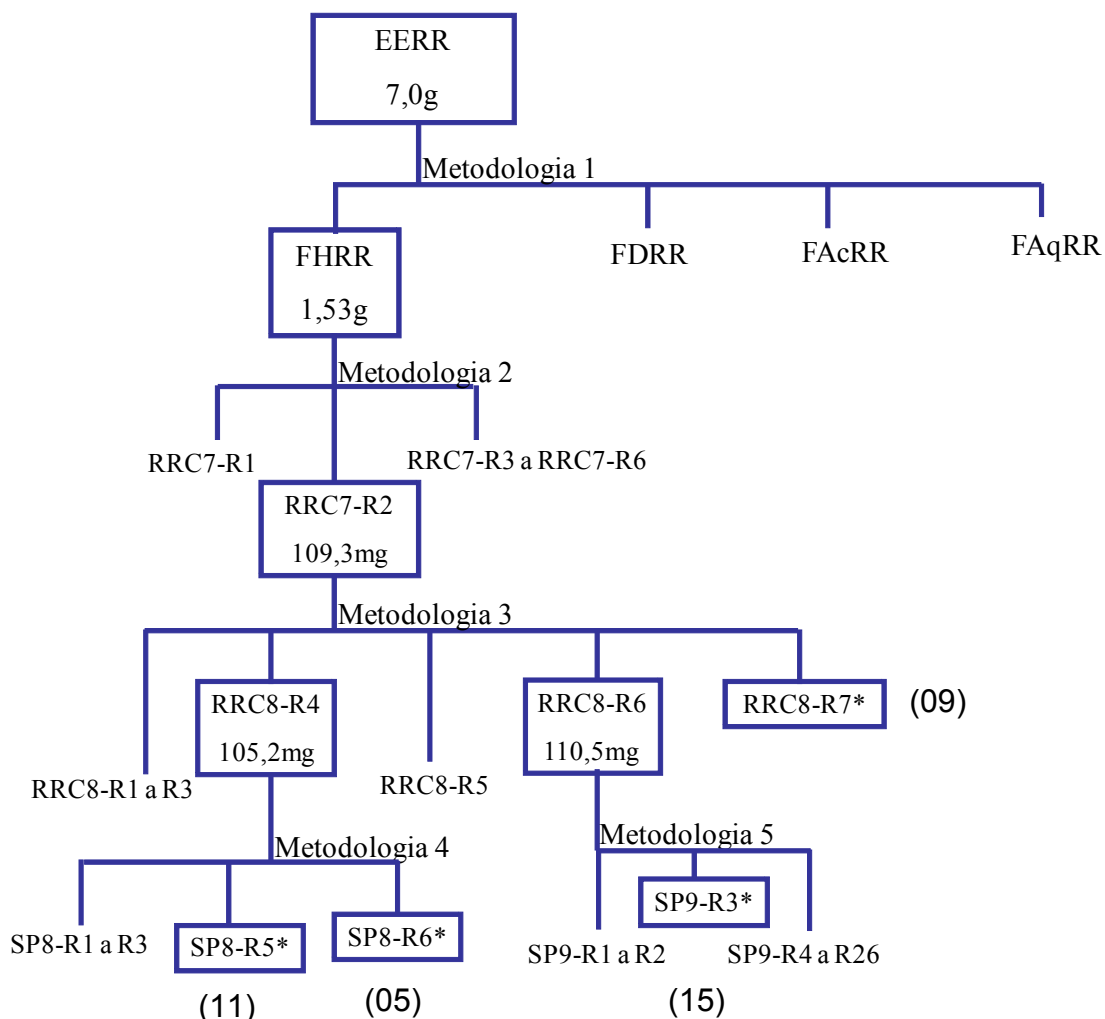
# Coluna em sílica gel (70-230 mesh),  $\phi = 3,0\text{cm}$  e  $h = 25\text{cm}$

# Gradiente de eluição: hexano, diclorometano, acetona, metanol (ordem crescente de polaridade)

Código: FMRF (Fração Metanólica Ruta Folhas)

O estudo da fração *FMRF* (FLUXOGRAMA 3) levou ao isolamento de duas substâncias: RC7-8 *N*-metil-4-metoxi-2-quinolona (**06**) e RC7-10 a graveolina (**10**).

### 4.3.4 Estudo Químico da fração FHRR



FLUXOGRAMA 4. Estudo da fração hexênica (FHRR)

Metodologia 1:

# Partição líquido-líquido (MeOH:H<sub>2</sub>O fase aquosa) passando solventes orgânicos (hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol) em ordem crescente de polaridade.

Metodologia 2:

# Coluna em sílica gel (70-230 mesh),  $\phi = 12\text{cm}$  e  $h = 78\text{cm}$

# Gradiente de eluição: hexano, diclorometano, acetona, metanol (ordem crescente de polaridade)

Metodologia 3:

# Coluna em sílica gel (70-230 mesh),  $\phi = 2,5\text{cm}$  e  $h = 46\text{cm}$

# Gradiente de eluição: hexano, diclorometano, acetona, metanol (ordem crescente de polaridade)

Metodologia 4 e 5:

# Coluna Sephadex (70-230 mesh),  $\phi = 2,0\text{ cm}$  e  $h = 20,0\text{ cm}$

# Modo isocrático de eluição: DCM : MeOH (3:7)

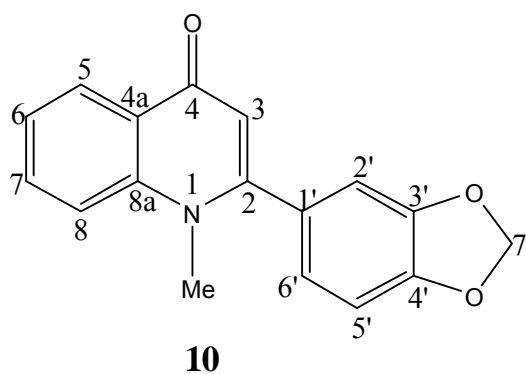
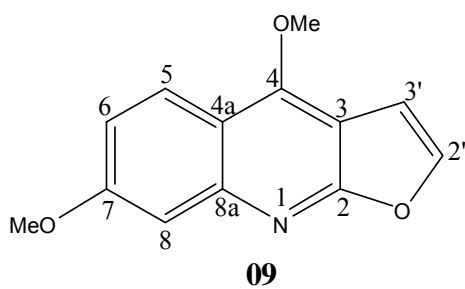
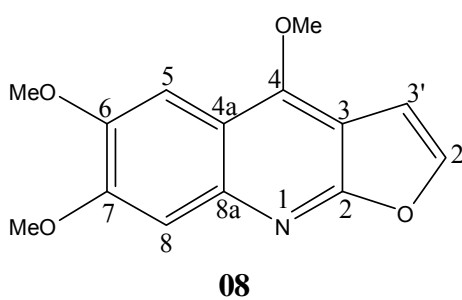
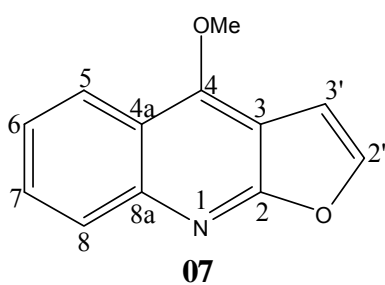
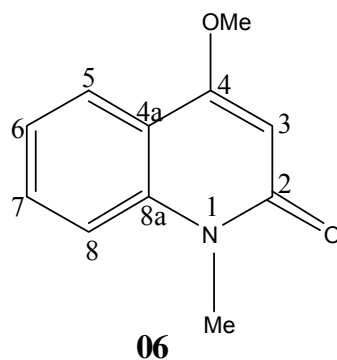
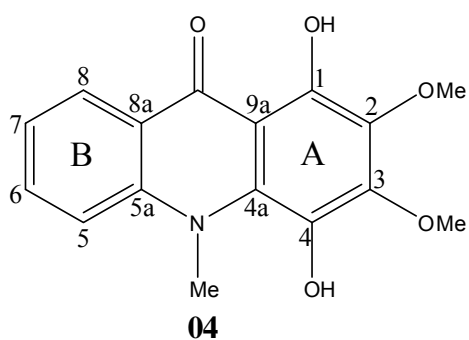
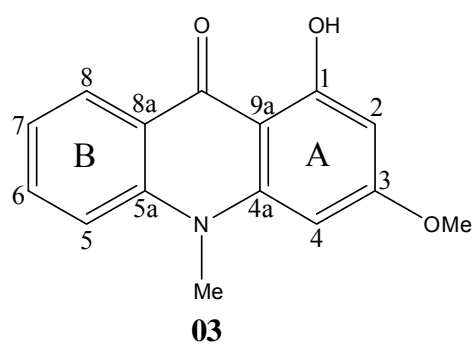
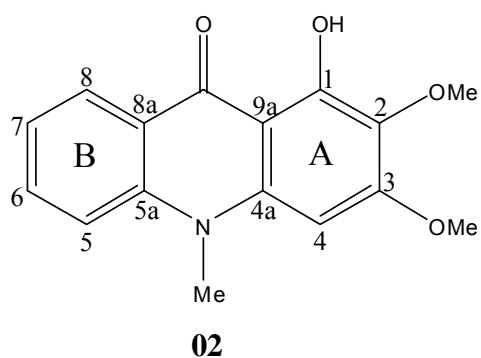
Código: EERR (Extrato Etanólico Ruta Raíces)

FHRR (Fração Hexânica Ruta Raíces)

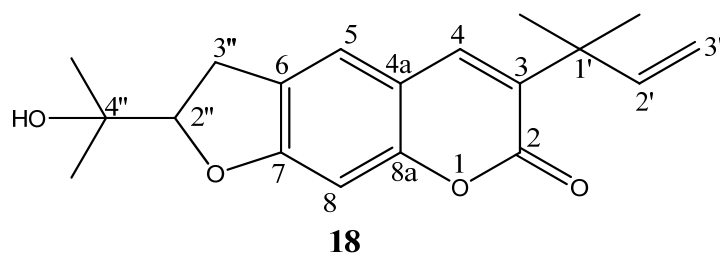
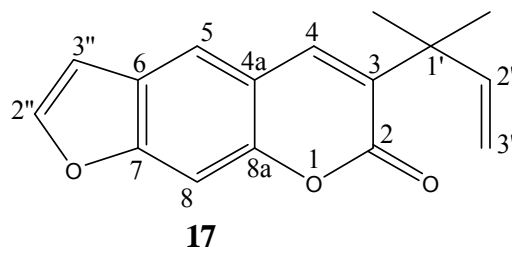
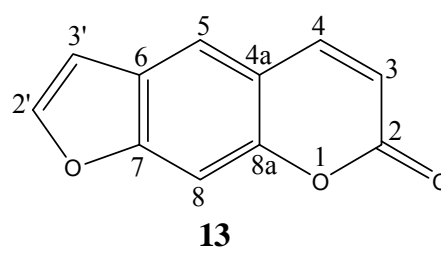
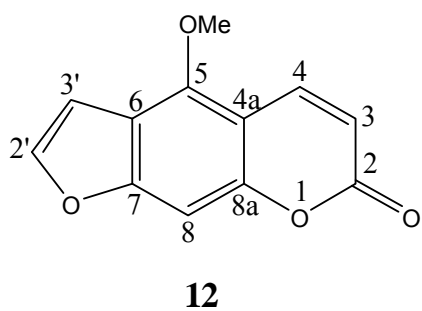
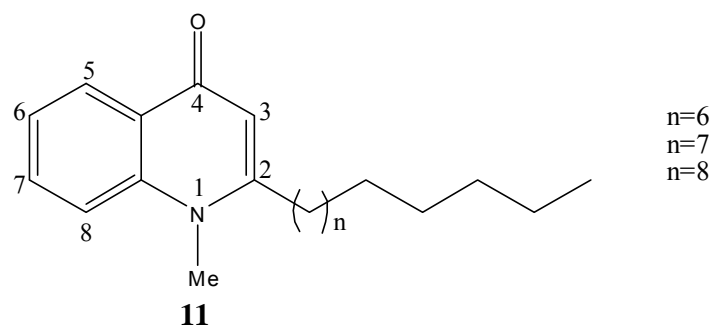
O estudo da fração *FHRR* (FLUXOGRAMA 4), levou ao isolamento de 4 substâncias: RRC8-R7 a evolitrina (**09**), SP8-R5 alquilquinolínico (**11**), SP8-R6 a 3,4-dicloro-1-hidroxi-2-metoxi-*N*-metilacridona (**05**) e SP9-R3 a isopimpineline (**15**).

*Resultados e  
Discussões 2*

**5- Metabólitos de *R. graveolens* e seus potenciais como inibidores do transporte fotossintético de elétrons**







## **5.0 Avaliação das substâncias ensaiadas como inibidores da fotossíntese**

Primeiramente foram realizados ensaios preliminares de transporte de elétrons e emissão da fluorescência em disco foliar, a fim de avaliar o potencial de inibição das substâncias ensaiadas (TABELA 21).

TABELA 21- Potencial de inibição das substâncias ensaiadas.

Composto	Resultado*
02	A
03	N
04	N
06	A
07	A
08	N
09	A
10	A
11	A
12	A
13	N
17	A
18	A

\*(A) composto ativo (N) composto não ativo

Dentre as 18 substâncias isoladas, 13 foram ensaiadas como inibidoras da fotossíntese, e apenas as substâncias **03**, **04**, **08** e **13** não apresentaram atividade significativa (<5%) nos ensaios. Sendo assim, foi realizada a elucidação dos mecanismos de ação das substâncias ativas e, também, a avaliação do seu efeito sobre o sítio de ação de PSII por meio da emissão de fluorescência da clorofila *a* (Chl *a*).

## **5.1 Ensaios “in vitro” de inibição da fotossíntese**

Os ensaios realizados *in vitro* foram:

1) O transporte de elétrons que remete informações da possível ação de um composto como inibidor de Hill, ou seja, como um inibidor do fluxo de elétrons nas reações basal, fosforilante e desacopladora, ou ainda se o composto pode se comportar como um desacoplante do gradiente de prótons ou inibidor da transferência de energia diretamente no complexo ATP sintase (ACHNINE ET AL., 1999; GONZÁLEZ-IBARRA ET AL., 2005). O transporte de elétrons ocorre nas membranas tilacóides, através dos quatro principais complexos protéicos participantes da fotossíntese: o PSII, PSI, citocromo  $b_6f$  e complexo ATPsintase. O transporte de elétrons inicia com a oxidação da molécula de água e liberação de prótons e elétrons no meio. A molécula de feofitina aceita os elétrons, no PSII, e, logo em seguida transfere para o primeiro aceptoro de PSII, uma plastoquinona, que se reduz e transfere os mesmos para outras moléculas de quinona. O citocromo  $b_6f$  transfere os elétrons da quinona para a plastocianina, uma proteína móvel, que reduz o centro de reação de PSI o P700. Este após reduzir-se, transfere para uma molécula  $A_0$ , esta para  $A_1$  chegando até a ferredoxina, que transfere estes elétrons para o FAD (flavoproteína solúvel- redutase ferredoxina-NADP) que reduz o  $NADP^+$  a NADPH, e os outros elétrons são transferidos para o citocromo  $b_6f$ . A função do fluxo cíclico é realizar o gradiente de prótons entre o lumem e o estroma dos tilacóides e produzir ATP. Todo este ciclo pode ser medido *in vitro* com a utilização de doadores e aceptores artificiais, através de um oxímetro, que mede a velocidade do consumo de oxigênio dissolvido no meio reacional.

2) Ensaios de localização no PSII ou PSI: quando um composto apresenta efeito sobre o transporte de elétrons, o seu mecanismo de ação é elucidado entre os PS I e II através de outras reações que também medem o transporte de elétrons. Porém, são adicionados a este meio reacional, doadores e aceptores de elétrons artificiais para que sua localização seja mais precisa (VEIGA ET AL., 2008);

3) Ensaios de ATPase que informa, precisamente, o efeito do composto como desacoplante do movimento de  $H^+$  no  $CF_0$  ou inibidor da transferência de energia no  $CF_1$ , bloqueando a síntese de ATP (KING-DÍAZ ET AL., 2006).

### 5.1.1 Resultados dos ensaios de inibição do transporte de elétrons durante a fase fotoquímica da fotossíntese em cloroplastos isolados das folhas de *Spinacia oleracea* L.

Alguns metabólitos secundários isolados de plantas afetam o metabolismo energético de outras plantas, incluindo o processo da fotossíntese. Compostos como cumarinas e alcalóides apresentam atividade inibitória da fotossíntese em baixas concentrações, e com resultados próximos àqueles de herbicidas comerciais (VEIGA ET AL., 2007b; LOTINA-HENNSEN ET AL., 2003; VEIGA ET AL., 2007a; GONZALEZ-IBARRA ET AL., 2005).

Para se ter o conhecimento de que um produto natural afeta a fotossíntese como um mecanismo de fitotoxicidade *in vitro*, é necessário saber se o mesmo tem efeito sobre o transporte de elétrons acíclico em cloroplastos isolados do espinafre (*Spinacia oleracea* L). Assim, é indispensável avaliar sua capacidade de inibir o transporte de elétrons na etapa global da fotossíntese. O fluxo fotossintético de elétrons é medido em função de três reações chamadas de transporte de elétrons basal, desacoplado e fosforilante. Essas três reações indicam o transporte de elétrons que flui da H<sub>2</sub>O até o metilviologênio (MV) no processo de redução do NADP<sup>+</sup>. Quando um composto inibe o fluxo de elétrons nas três reações, esse é chamado de inibidor da reação de Hill. O MV é utilizado aqui como acceptor final de elétrons, pois quando medidas as reações de transporte de elétrons, é observado todo o fluxo cíclico através da quantificação, representada pela inibição do processo de transporte de elétrons.

#### 5.1.1.1 Efeitos da substância 02 (arborinina) no transporte fotossintético de elétrons

A FIGURA 60, mostra a inibição do transporte de elétrons acíclico da H<sub>2</sub>O a MV em cloroplastos isolados de *Spinacia oleracea* L. Na reação basal encontra-se somente os cloroplastos adicionados ao meio, para a reação fosforilante acrescenta-

se ADP e fosfato inorgânico (Pi), e para a desacoplante o  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , onde o MV atua como acceptor de elétrons artificial para todas as três reações.

A substância **02** inibiu o fluxo de elétrons fosforilante e desacoplado nas concentrações de  $\text{IC}_{50}$  de  $11,6\mu\text{M}$  e  $9,8\mu\text{M}$ ; respectivamente. Para um composto ser considerado inibidor de Hill, este deve inibir as três reações de transporte de elétrons. Entretanto, este composto inibiu apenas duas reações, e pode ser considerado um inibidor do transporte de elétrons. Com isto, os mecanismos de ação do composto 2 sobre as reações parciais de PSII e PSI e a fluorescência da clorofila *a* foram avaliados para localizar precisamente o sítio de inibição na cadeia de transporte de elétrons e observar o efeito estressante causado ao PSII. Os resultados destes estudos serão discutidos mais à frente.

A substância **02**, ao invés de diminuir, acelera o transporte de elétrons basal no início da iluminação variando de 100% a 167% do fluxo de elétrons, ou seja, em baixas concentrações o composto acelera o transporte de elétrons, mas em concentrações acima de  $25\mu\text{M}$ , começa a diminuir, ou seja, inibe o transporte chegando a uma condição de inibição do fluxo de elétrons em 20% a  $100\mu\text{M}$  (Figura 60). Entretanto, nas fases desacoplada e fosforilante, observou-se a completa inibição do transporte de elétrons a  $100\mu\text{M}$ .

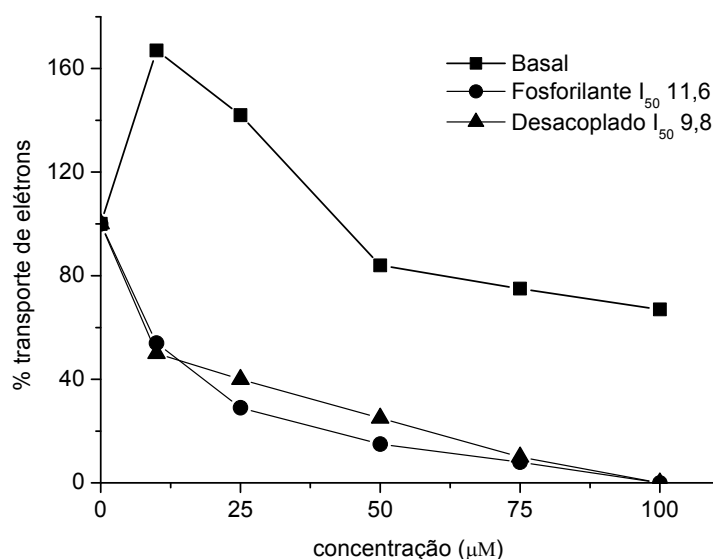


FIGURA 60- Efeitos da substância **02** (arborinina) no transporte fotossintético de elétrons basal (■), fosforilante (●) e desacoplado (▲) de H<sub>2</sub>O a MV em cloroplastos isolados de folhas de *Spinacia oleracea* L. As razões para o controle do transporte de elétrons basal, fosforilante e desacoplado foram 185, 1020 e 728 μequiv. e<sup>-</sup>.h<sup>-1</sup>. mg<sup>-1</sup> Chl<sup>-1</sup>, respectivamente.

King-Díaz et al. (2006) mostram que os resultados encontrados para a reação do transporte de elétrons: basal aumentando, fosforilante e desacoplado diminuindo, indicam que a substância **02** exibe um efeito duplo, ou seja, um primeiro efeito de inibir a transferência de energia ou desacoplar e um segundo efeito como inibidor do transporte de elétrons.

O transporte de elétrons desacoplado acíclico e o fosforilante tiveram 50% do seu fluxo reduzido indicando que a substância **02** se comporta como um potente inibidor do transporte de elétrons. O transporte basal não inibiu 50% do fluxo de elétrons da H<sub>2</sub>O ao MV até 100μM, o que significa que a substância em questão se liga ao complexo CF<sub>1</sub>CF<sub>0</sub> – ATPase exercendo uma inibição direta da atividade de síntese de ATP (KING-DÍAZ ET AL., 2006). Quando é observado um aumento significativo no transporte de elétrons da reação basal, é indício de que o composto está atuando no complexo ATP-sintase (KING-DÍAZ ET AL., 2006). Na reação basal, observa-se o comportamento dos cloroplastos no meio reacional, ou seja, se o transporte cíclico está acontecendo de modo normal. O seu comportamento vai

depende da ação que o composto causa, nesse caso, o aumento na porcentagem da curva da reação basal é observado, pois se o efeito está ocorrendo no complexo ATPsintase, a reação basal entende que algum dano está sendo causado e por isso ele trabalha mais para compensar esse dano, desta forma aumenta a velocidade de ação.

#### 5.1.1.2 Efeitos da substância 06 (N-metil-4-metoxi-2-quinolona) no transporte fotossintético de elétrons

A inibição do transporte fotossintético de elétrons acíclico da H<sub>2</sub>O a MV da substância **06** difere da substância **02**, pois não inibiu 100% em nenhuma das reações de transporte de elétrons (FIGURA 61). Entretanto, foi observada a aceleração do transporte de elétrons basal e fosforilante em concentrações inferiores a 80μM. O transporte desacoplado foi inibido a baixas concentrações e depois, quando a concentração aumenta, começa a recuperar o transporte mantendo-se constante até o final. O transporte de elétrons basal e fosforilante foram aumentados em 80% e 40%, respectivamente, desde o início da iluminação, diminuindo a concentrações superiores a 80μM.

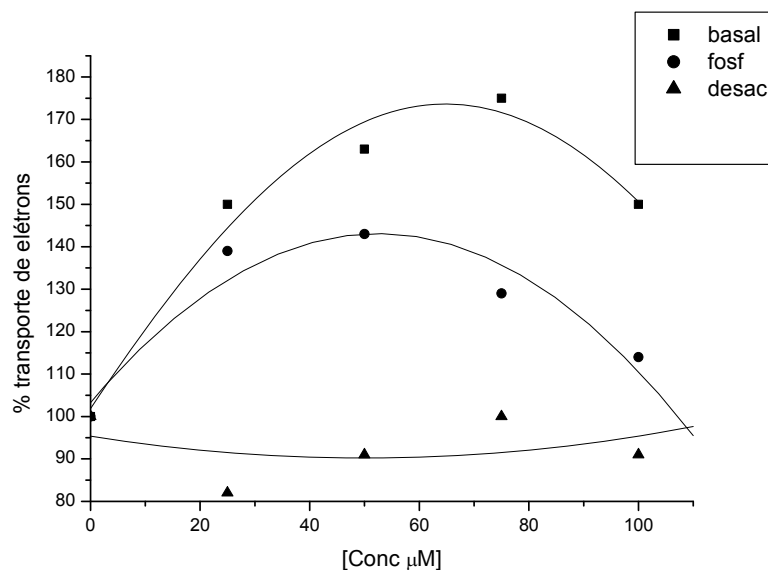


FIGURA 61- Efeitos da substância **06** (N-metil-4-metoxi-2-quinolona), no transporte fotossintético de elétrons basal (■), fosforilante (●) e desacoplado (▲) de H<sub>2</sub>O a MV em cloroplastos isolados de folhas de *S. oreacea* L.. As razões para o controle do transporte de elétrons basal, fosforilante e desacoplado foram 400, 600 e 1.100  $\mu\text{equiv. e}^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{Chl}^{-1}$ , respectivamente.

Portanto, a substância **06** não se apresentou como um inibidor do transporte de elétrons, entretanto, foi observado que a mesma se comporta como um desacoplante. Os ensaios das reações parciais de PSII e PSI não foram realizados, pois não houve inibição do transporte de elétrons, mas foram realizados ensaios de medições de emissão de fluorescência da clorofila a para observar o dano causado ao PSII, bem como a análise de ATPase para confirmar se o composto interfere no complexo CF<sub>1</sub>CF<sub>0</sub> – ATPase exercendo uma inibição direta na síntese de ATP. Os resultados destes dois últimos ensaios encontram-se mais a frente.



#### 5.1.1.3 Efeitos da substância 07 (dictamina) no transporte fotossintético de elétrons

Para avaliação da atividade de inibição do transporte fotossintético de elétrons, foram realizadas com a substância **07**, apenas as medidas de emissão de fluorescência da clorofila *a*. Essa decisão, de avaliação do efeito estressante causado ao PSII por meio de emissão de fluorescência, foi adotada mediante a massa reduzida da substância isolada. Os resultados serão discutidos posteriormente.

#### 5.1.1.4 Efeitos da substância 09 (evolitrina) no transporte fotossintético de elétrons

A substância **09** inibiu o fluxo de elétrons basal, fosforilante e desacoplado com  $IC_{50}$  26,1 $\mu$ M, 35,8 $\mu$ M e 20,5 $\mu$ M; respectivamente (FIGURA 62). Assim o mecanismo de ação sobre as reações parciais de PSII e PSI e medições de fluorescência da clorofila *a* foram realizados, para localizar precisamente o sítio de inibição dentro da cadeia transportadora de elétrons nos tilacóides e para observar a eficiência de PSII. Os resultados destes ensaios serão vistos mais à frente.

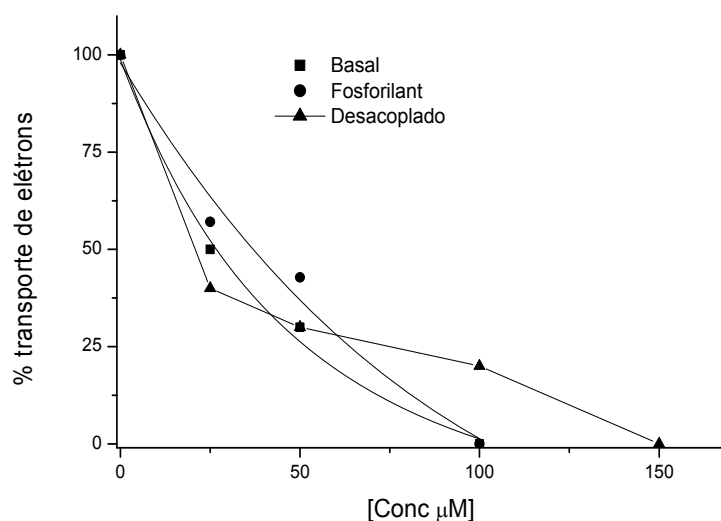


FIGURA 62- Efeitos da substância **09** (evolitrina) no transporte fotossintético de elétrons basal (■), fosforilante (●) e desacoplado (▲) de H<sub>2</sub>O a MV em cloroplastos isolados de *S. oreacea L.* As razões para o controle do transporte de elétrons basal, fosforilante e desacoplado foram 533, 600 e 1.267 μequiv. e<sup>-</sup>.h<sup>-1</sup>. mg<sup>-1</sup> Chl<sup>-1</sup>, respectivamente.

Com base nos resultados de transporte fotossintético de elétrons, foi concluído que a substância **09** atua como inibidor de Hill a baixas concentrações, chegando a inibir 100% dos transportes basal e fosforilante em concentrações de 100 μM e de 150 μM para o desacoplado.

#### 5.1.1.5 Efeitos da substância **10** (graveolina) no transporte fotossintético de elétrons

A substância **10** inibiu 40% do fluxo de elétrons basal, fosforilante e desacoplado na concentração de 300 μM (FIGURA 63). Assim, as reações parciais

de PSII e PSI, bem como a fluorescência da clorofila *a*, foram realizados para localização do sítio de inibição na cadeia de transporte fotossintético de elétrons nos tilacóides, além de observar os efeitos estressantes causados ao PSII. Estes, serão apresentados posteriormente.

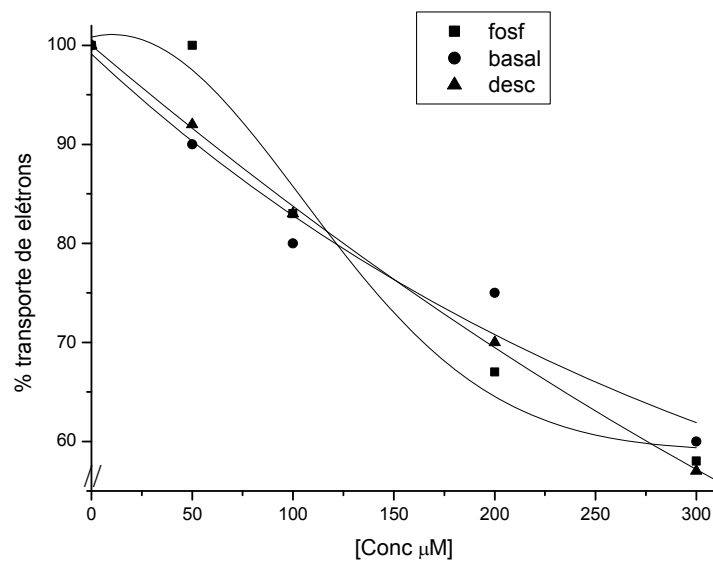


FIGURA 63- Efeitos da substância **10** (graveolina) no transporte fotossintético de elétrons basal (■), fosforilante (●) e desacoplado (▲) de H<sub>2</sub>O a MV em cloroplastos isolados de folhas de *S. oreacea* L.. As razões para o controle do transporte de elétrons basal, fosforilante e desacoplado foram 450, 620 e 1.400 µequiv. e<sup>-</sup>.h<sup>-1</sup>. mg<sup>-1</sup> Chl<sup>-1</sup>, respectivamente.

Analisando os transportes de elétrons, foi possível observar uma tendência de inibição da substância **10**, semelhantemente aos três transportes, o que sugere que este composto é um inibidor de Hill em altas concentrações.

### 5.1.1.6 Efeitos da substância 11 (2-undecan-N-metil-4-quinolina) no transporte fotossintético de elétrons

A substância **11** atuou diretamente na inibição da transferência de energia em baixas concentrações e apresentou uma leve tendência como inibidor das reações de transporte de elétrons em concentrações elevadas (FIGURA 64).

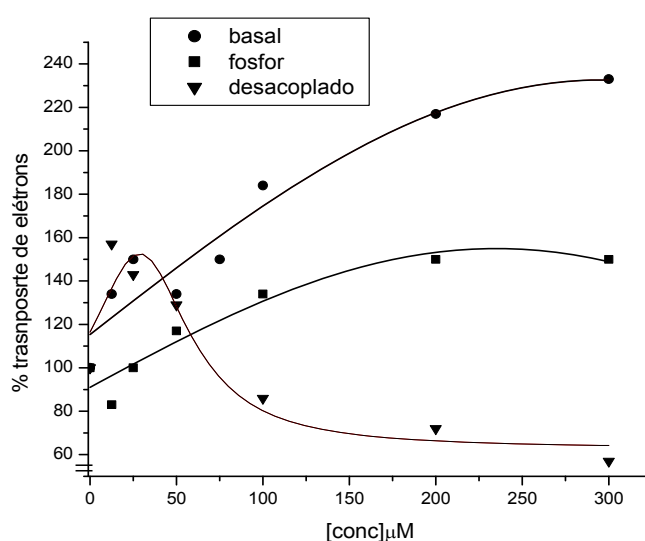


FIGURA 64- Efeitos da substância **11** (2-undecan-N-metil-4-quinolina) no transporte fotossintético de elétrons basal (■), fosforilante (●) e desacoplado (▲) de H<sub>2</sub>O a MV em cloroplastos isolados de folhas de *S. oreacea L.* As razões para o controle do transporte de elétrons basal, fosforilante e desacoplado foram 480, 480 e 560  $\mu\text{equiv. e}^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{Chl}^{-1}$ , respectivamente.

A substância **11** acelerou o transporte de elétrons basal e fosforilante em até 230% e 140%, respectivamente. O transporte de elétrons desacoplado apresentou um pequeno aumento em concentrações inferiores a 100 μM. Portanto, foi possível concluir que o composto comportou, prioritariamente, como um inibidor da transferência de energia, mas poderia também apresentar-se como um inibidor do

transporte de elétrons em altas concentrações, pelo fato de os transportes fosforilante e desacoplado apresentarem esse tipo de variação.

### 5.1.1.7 Efeitos da substância 12 (bergapteno) no transporte fotossintético de elétrons

A substância **12** aumentou o transporte de elétrons basal em baixas concentrações, aumentando até 450% a concentração de 100 $\mu$ M e, subsequentemente, chegando a estabilizar no final (FIGURA 65). O transporte de elétrons fosforilante teve um aumento de 20% e depois estabilizou até a concentração máxima de 300  $\mu$ M. O transporte desacoplado diminuiu em aproximadamente 10% e se manteve estável até a máxima concentração.

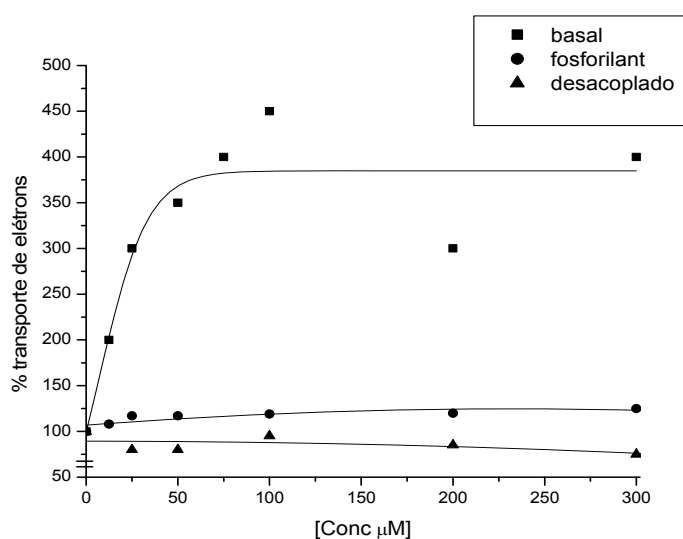


FIGURA 65- Efeitos da substância **12** (bergapteno) no transporte fotossintético de elétrons basal (■), fosforilante (●) e desacoplado (▲) de H<sub>2</sub>O a MV em cloroplastos isolados de *S. oreacea* L.. As razões para o controle do transporte de elétrons basal, fosforilante e desacoplado foram 100, 600 e 1142  $\mu$ equiv. e<sup>-</sup>.h<sup>-1</sup>. mg<sup>-1</sup> Chl<sup>-1</sup>, respectivamente.

Os resultados apresentados indicam que a substância **12** comporta-se como um desacoplante ou um inibidor da transdução de energia. Quando é observado um aumento significativo, para valores acima de 100%, no transporte de elétrons da reação basal, é indício de que o composto está atuando no complexo ATP-sintase. Este aumento pode ser considerado como bloqueio da transferência de energia ou como desacoplamento do gradiente de prótons. Por meio das medições de atividade ATPase, pode-se afirmar se este composto atua como desacoplante ou inibidor da transferência de energia. Estes resultados serão apresentados à frente. É possível também, supor que o mesmo apresentaria uma pequena tendência em se comportar como inibidor do transporte de elétrons, mas como o efeito de interferência no gradiente de prótons foi muito intensificado, os demais efeitos não foram evidenciados.

#### 5.1.1.8 Efeitos da substância 17 (chalepensina) no transporte fotossintético de elétrons

A substância **17** teve como ensaio preliminar para avaliação da atividade de inibição do transporte fotossintético de elétrons, apenas a fluorescência da clorofila *a* para se observar o efeito estressante causado ao PSII. Esse composto já teve seu mecanismo de ação entre PS II e I elucidado e publicado (MACIAS ET AL., 1999).

#### 5.1.1.9 Efeitos da substância 18 (chalepina) no transporte fotossintético de elétrons

Para a substância **18**, foi possível observar que a altas concentrações apresentou um comportamento de desacoplante do gradiente de prótons, verificado através do transporte basal, o qual aumentou rapidamente chegando a 125% na

concentração de 500 $\mu$ M. Avaliando os demais transportes fosforilante e desacoplado, foi evidenciado que a substância **18** apresentou uma tendência em ser um inibidor do transporte de elétrons, pois, com o aumento da concentração, observou-se uma diminuição acima de 50% para o transporte fosforilante e desacoplado com IC<sub>50</sub> 343,3  $\mu$ M e 135,9  $\mu$ M; respectivamente (FIGURA 66).

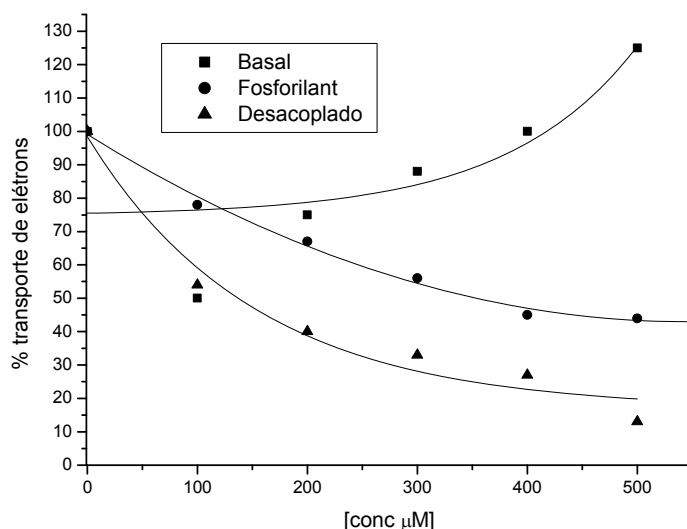


FIGURA 66- Efeitos da substância **18** (chalepina) no transporte fotossintético de elétrons basal (■), fosforilante (●) e desacoplado (▲) de H<sub>2</sub>O a MV em cloroplastos isolados de *S. oreacea* L.. As razões para o controle do transporte de elétrons basal, fosforilante e desacoplado foram 246, 554 e 923  $\mu$ equiv. e<sup>-</sup>.h<sup>-1</sup>. mg<sup>-1</sup> Chl<sup>-1</sup>, respectivamente.

Avaliando os resultados obtidos, pode-se inferir que a substância **18** atua como um desacoplante e também como um inibidor do transporte fotossintético de elétrons em altas concentrações. Por apresentar inibição em elevadas concentrações e chegar somente a aproximadamente 50% de inibição para a reação fosforilante, não foram realizados os ensaios para o mecanismo de ação sobre PSII e PSI, mas sim os ensaios de fluorescência da clorofila *a*, bem como de ATPase para confirmar se o composto interfere no complexo CF<sub>1</sub>CF<sub>0</sub> – ATPase, exercendo

uma inibição direta da atividade de síntese de ATP como desacoplante. Os resultados serão discutidos mais à frente.

### **5.1.2 Determinação do fluxo de elétrons nos fotossistemas desacoplados: Localização das substâncias no sítio de interação de PSII ou PSI e suas reações parciais**

Para especificar a ação de cada substância como inibidor do transporte de elétrons, dentro dos fotossistemas, foram realizados ensaios nas reações globais e específicas com doadores e aceptores de elétrons artificiais de PSII e de PSI em separado, a fim de elucidar o mecanismo de ação entre os dois fotossistemas (CASTELO-BRANCO ET AL., 2008; KING-DÍAZ ET AL., 2006).

#### **5.1.2.1 Sítio de interação da substância 02 em PSII e PSI**

Para localizar o sítio de interação onde a substância **02** inibiu a cadeia transportadora de elétrons nas membranas tilacoidais nos cloroplastos, a ação sobre PSII e PSI desacoplados, e suas respectivas reações parciais, foram monitoradas de forma semelhante ao transporte de elétrons acíclico desacoplado, usando doadores, aceptores e inibidores de elétrons artificiais (CASTELO-BRANCO ET AL., 2008; KING-DÍAZ ET AL., 2006).

A TABELA 22 mostra a inibição do transporte de elétrons desacoplado de PSII da H<sub>2</sub>O a DCBQ e sobre as reações parciais da H<sub>2</sub>O a SiMo, e de DPC a DCPIP, o qual inibiu aproximadamente 60% do transporte para as duas reações a 400µM, enquanto nenhum resultado significativo (<4%) foi verificado para a reação do DCP a DCPIP.

A medida polarográfica indicou que a substância **02** inibe dentro do intervalo da H<sub>2</sub>O a Q<sub>A</sub>, nos dois sítios de ação do transporte de elétrons de PSII. A primeira



inibição (H<sub>2</sub>O a SiMo) ocorre na enzima onde ocorre a fotooxidação da molécula de água, e o outro (DPC a DCPIP) se prende ao sítio de ação da Q<sub>A</sub>, impedindo a transferência de elétrons entre o centro reacional de PSII (P<sub>680</sub>) e Q<sub>A</sub> (TABELA 22).

TABELA 22- Efeitos da substância **02** sobre o transporte fotossintético de elétrons de PSII desacoplado da H<sub>2</sub>O a DCBQ e sobre as reações parciais da H<sub>2</sub>O a SiMo e de DCP a DCPIP.

Conc [μM]	PSII					
	H <sub>2</sub> O a DCBQ		H <sub>2</sub> O a SiMo		DPC a DCPIP	
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>b</i>
0	547,5	100	511,0	100	256	100
50	-	-	-	-	283	110,6
100	401,5	74	328,5	65	268	104,5
200	292,0	54	255,5	50	268	104,5
300	255,5	47	237,3	47	-	-
400	219,0	40	219,0	43	-	-

*a* (valores em μequiv. e<sup>-</sup> . h<sup>-1</sup> . mg<sup>-1</sup> Chl<sup>-1</sup>)

*b* (valores em porcentagem)

*c* (valores em μM DCPIP<sub>red</sub> mg<sup>-1</sup> Chl<sup>-1</sup>)

O transporte de elétrons desacoplado do PSI do DCPIP<sub>red</sub> a MV apresentou um efeito de baixa inibição, com IC<sub>50</sub> de 200μM (TABELA 23). No entanto, não foi possível realizar as reações parciais de PSI, uma vez que a quantidade do composto isolado foi insuficiente. Foi possível concluir que a substância **02** atua em PSII no lado doador de elétrons e de forma significativa também em PSI.

TABELA 23- Efeitos da substância **02** sobre o transporte fotossintético de elétrons de PSI desacoplado do  $DCPIP_{red}$  a  $MV$ .

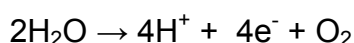
Conc [ $\mu$ M]	PSI	
	$DCPIP_{red}$ a $MV$	
	<i>a</i>	<i>b</i>
0	1467,4	100
100	867,1	59,1
200	733,7	50
400	667	46

*a* (valores em  $\mu$ equiv.  $e^- \cdot h^{-1} \cdot mg^{-1} Chl^{-1}$ )  
*b* (valores em porcentagem)

### 5.1.2.2 Sítio de interação da substância **09** em PSII e PSI

A substância **09**, inibiu aproximadamente 100% do transporte na reação global na concentração de  $250\mu$ M e para a reação parcial  $H_2O$  a  $SiMo$  inibiu 100% a  $200\mu$ M enquanto a reação do DPC a  $DCPIP$  não foi observada inibição significativa nas mesmas concentrações (TABELA 24).

Com os resultados de transporte de elétrons de PSII, pode-se afirmar que a substância **09** inibe dentro do intervalo da  $H_2O$  a  $SiMo$ , no sítio de ação do lado doador de elétrons do PSII, que ocorre sobre a enzima que oxida da molécula de água. A molécula de água inicialmente é oxidada liberando  $O_2$ ,  $H^+$  e elétrons no lúmen dos tilacóides (Equação 6) (KARP, 2005). Esse processo ocorre a partir da absorção fótons catalisado por um complexo protéico contendo Mn. A reação global catalisada pelo PSII, na qual Q é uma molécula de plastoquinona e o  $QH_2$  é o plastoquinol.



EQUAÇÃO 6. Reação de oxidação da molécula de água (KARP, 2005.).

O centro de Mn, na sua forma reduzida, oxida duas moléculas de água formando uma única molécula de O<sub>2</sub>. A cada etapa, a absorção de um fóton conduz um elétron para fora do centro de reação de PSII (P680), então o par de clorofilas especial com carga positiva extrai um elétron do centro de Mn. Essa ação, dentro da fotossíntese, ocorre no centro de reação silencioso, e é chamada de complexo de evolução do oxigênio (OEC). Desta forma, quatro etapas fotoquímicas são necessárias para extrair os elétrons e reduzir completamente o centro de Mn. Esses quatro elétrons são utilizados para reduzir duas moléculas de plastoquinona a plastoquinol.

TABELA 24- Efeitos da substância **09** sobre o transporte fotossintético de elétrons de PSII desacoplado da H<sub>2</sub>O a DCBQ e as reações parciais da H<sub>2</sub>O a SiMo e de DCP a DCPIP.

Conc [μM]	PSII					
	<i>H<sub>2</sub>O a DCBQ</i>		<i>H<sub>2</sub>O a SiMo</i>		<i>DPC a DCPIP</i>	
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>b</i>
0	367	100	400	100	538	100
50	334	91	350	88	524	97
100	234	64	200	50	506	94
150	200	55	50	123	402	75
200	67	18	0	0	-	-
250	0	0	-	-	-	-

*a* (valores em μequiv. e<sup>-</sup> . h<sup>-1</sup> . mg<sup>-1</sup> Chl<sup>-1</sup>)

*b* (valores em porcentagem)

*c* (valores em μM DCPIP<sub>red</sub> mg<sup>-1</sup> Chl<sup>-1</sup>)

O transporte de elétrons desacoplado de PSI do TMQH<sub>2</sub> a MV apresentou um efeito de inibição em altas concentrações (TABELA 25). Devido ao seu efeito ser evidenciado apenas a altas concentrações, atribuiu-se que o mesmo não seria um bom inibidor de PSI.

TABELA 25- Efeitos da substância **09** sobre o transporte fotossintético de elétrons de PSI desacoplado do  $TMQH_2$  a MV .

Conc [ $\mu$ M]	PSI	
	$TMQH_2$ a MV	
	<i>a</i>	<i>b</i>
0	560	100
100	360	64
200	240	43
300	160	29
400	80	14

*a* (valores em  $\mu$ equiv.  $e^- \cdot h^{-1} \cdot mg^{-1} Chl^{-1}$ )  
*b* (valores em porcentagem)

### 5.1.2.3 Efeitos das substâncias **06** e **07** em PSII e PSI

Para as substâncias **06** e **07**, não foi possível realizar os ensaios de localização do sítio de ação dentro da cadeia transportadora de elétrons nas membranas tilacóides dos cloroplastos, devido à pequena quantidade isolada. Sendo assim, preferiu-se realizar os ensaios em semi *in vivo* e *in vivo* com os compostos, pois esses ensaios são considerados mais conclusivos, já que se assemelha com a planta em seu estado normal. Estes resultados serão discutidos mais à frente.

### 5.1.2.4 Efeitos das substâncias **10**, **11**, **12**, **17** e **18** em PSII e PSI

Para as substâncias **10**, **11**, **12** e **18**, não foram realizados os ensaios específicos de PSII e PSI, pois os mesmos não foram considerados inibidores da cadeia transportadora de elétrons. As substâncias **10** e **18** inibiram somente em

altas concentrações, a substância **11** apresentou um efeito inibidor da transferência de energia, deixando assim o efeito do transporte de elétrons minimizado por ele, ou seja, o primeiro efeito foi mais pronunciado que o segundo, assim a substância **12** não indicou nenhuma tendência a inibir o fluxo fotossintético de elétrons.

### 5.1.3 Ensaios com o complexo $H^+$ -ATPase nas membrana tilacóides

Para confirmar se as substâncias **02**, **11** e **12** atuam como inibidores da transferência de energia e as substâncias **06** e **18** agem como desacoplantes, foram realizados ensaios de  $H^+$ -ATPase para verificar o efeito desses compostos na unidade catalítica do complexo  $H^+$  ATPase ( $CF_0$ - $CF_1$ ) (KING-DÍAZ ET AL., 2006).

Quando um composto apresenta atividade inibidora do fluxo energético ou do acoplamento do gradiente de prótons, esses comportamentos são verificados através dos efeitos sobre as membranas tilacóides ativadas pela luz, onde é medida a variação da concentração de fosfato inorgânico (Pi) presente na amostra. Para esse experimento, o cloreto de amônio é utilizado como controle positivo. A concentração de Pi aumenta ou diminui de acordo com o efeito que o compostos causa. Se este desacopla o gradiente de prótons, indica que ele está atuando mais precisamente na síntese de ATP, ou seja, se ele bloqueia a produção de ATP a partir de ADP + Pi, conseqüentemente, a concentração de Pi aumentará, como foi observado para os desacoplantes. O efeito inibidor da transferência de energia é o contrário, ele permite a formação de ATP, no entanto, bloqueia exatamente a passagem de ATP para o processo da fase bioquímica, por isso a diminuição na concentração de Pi.

A TABELA 26 mostra a ação de todas as substâncias ensaiadas. Aquelas que apresentaram inibição da transferência de energia, **02**, **11** e **12**, tiveram suas concentrações de fosfato inorgânico (Pi) no meio de reação, diminuídas em aproximadamente 25, 25 e 10% em 100, 300 e 75 $\mu$ M; respectivamente, corroborando com os dados de transporte de elétrons, agindo como inibidores do sítio enzimático  $CF_0$ - $CF_1$  do complexo ATPase. As substâncias **06** e **18** tiveram suas concentrações de Pi aumentadas em 18 e 35% em concentração de 100  $\mu$ M,

confirmando o potencial desacoplante do gradiente de prótons (TORRES-ROMERO ET AL., 2010).

TABELA 26- Efeitos das substâncias **02**, **06**, **11**, **12** e **18** na H<sup>+</sup>-ATPase

Composto	Concentração (µM)	Fosfato Inorgânico (Pi, %)
<b>Controle</b>	0	100
<b>02</b>	25	90
	50	78
	100	77
<b>06</b>	25	104
	50	108
	100	118
<b>11</b>	100	93
	200	88
	300	77
<b>12</b>	25	94
	75	89
	150	91
<b>18</b>	100	135
	200	128
	300	93

O complexo ATP-sintase é formado de duas partes, o F<sub>0</sub> e o F<sub>1</sub> como mostra a FIGURA 65. Esses polipeptídeos se encontram inseridos na membrana tilacoidal, formando no seu interior um canal de prótons, através do qual ocorre o fluxo de prótons do lúmen até o estroma, onde são encontrados sítios catalíticos para a síntese de ATP.

A energia do gradiente de prótons, criado durante o transporte de elétrons entre os fotossistemas, é utilizada para a síntese de ATP por meio de um mecanismo quimiosmótico (<http://pt.wikipedia.org/wiki/herbicida>). Durante o transporte de elétrons, nos dois fotossistemas, estes vão liberando energia gradativamente e esta é aproveitada para transportar prótons de fora para dentro do

tilacóide, reduzindo o pH do interior deste. A redução do pH ativa o complexo protéico "ATP sintase". O fluxo de prótons através do complexo gera, em seu interior, uma espécie de "turbina protéica", que promove a fosforilação de moléculas de adenosina difosfato dando origem à adenosina trifosfato (<http://pt.wikipedia.org/wiki/herbicida>).

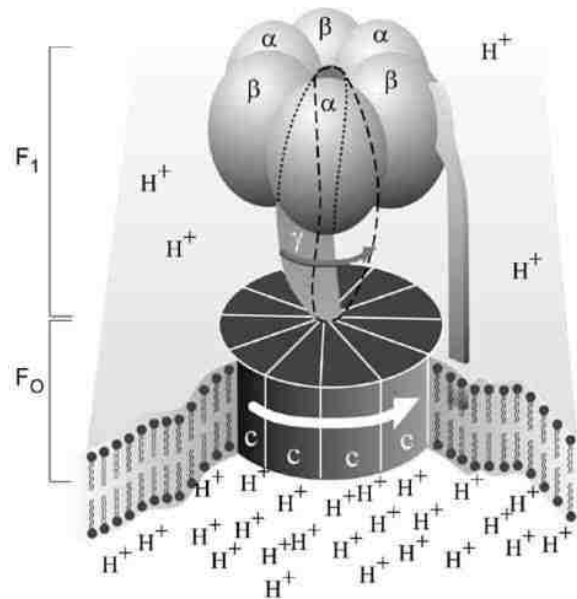


FIGURA 67. Divisão do complexo protéico ATP-sintase (<http://pt.wikipedia.org/wiki/herbicida>).

Quando encontrado excesso de fosfato inorgânico no meio, indica que a produção de ATP foi interrompida. Esse fato pode ser causado pelo distúrbio provocado no gradiente de prótons, uma vez que é necessário  $H^+$  para que ocorra a hidrólise da molécula de ADP e, sucessivamente, a fosforilação, gerando ATP (FIGURA 68). Portanto, quando um composto atua como desacoplante, ele diretamente inibe a formação de ATP e, dessa forma, é observado um aumento da concentração de fosfato inorgânico no meio.

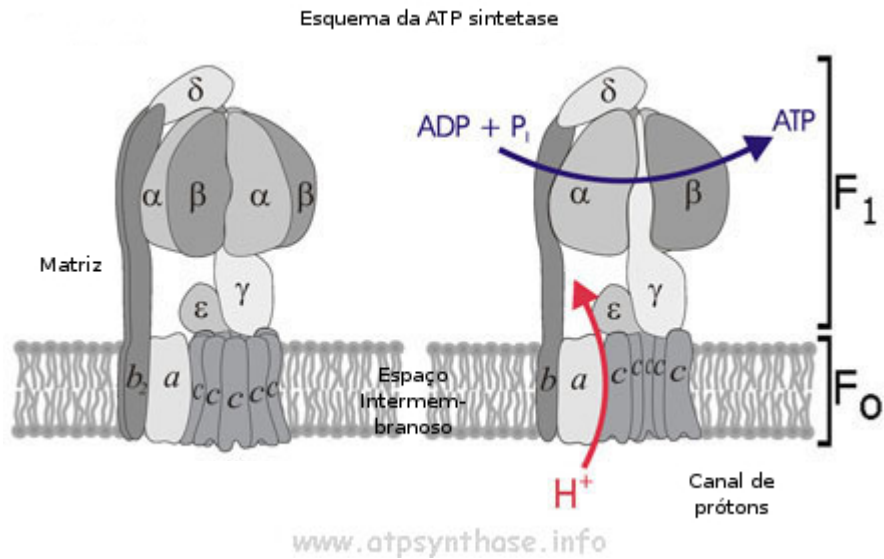


FIGURA 68- Uso do gradiente de prótons na síntese de ATP ([http://www.atpsynthase.info/images/ATP\\_synthesis1.jpg](http://www.atpsynthase.info/images/ATP_synthesis1.jpg)).

O ATP gerado serve como principal doador de energia livre em sistemas vegetais e não como uma forma de armazenamento a longo prazo de energia livre. O ATP gerado é utilizado no ciclo de fixação de  $\text{CO}_2$  para produção de glicose. Quando um composto age como inibidor da transferência de energia, ele bloqueia exatamente a passagem dessa molécula de ATP para o processo da fase bioquímica, impedindo assim que a segunda etapa da fotossíntese ocorra. A FIGURA 67, mostra as etapas A, B, C e D do processo de produção de ATP, um inibidor da transferência de energia bloqueia a transferência da etapa B-C.

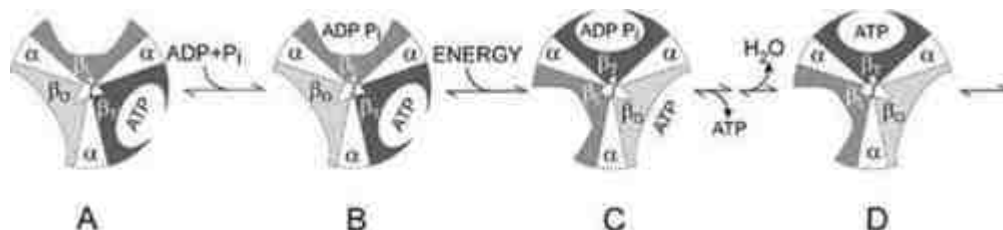


FIGURA 69- Etapas da síntese de ATP (<http://pt.wikipedia.org/wiki/herbicida>).



## **5.2 Ensaio de medições de fluorescência da clorofila a em semi “in vivo”**

A fluorescência da clorofila *a* tem sido uma ferramenta muito utilizada para avaliar o aparelho fotossintético em plantas submetidas a diferentes estresses, bem como oferecer informações detalhadas sobre a estrutura e função do aparato fotossintético, especialmente de PS II. O ensaio realizado e chamado de semi “*in vivo*”, foi o estudo da emissão de fluorescência da clorofila *a* (Chl *a*) em discos foliares de *S. oreacea L.*. Esse experimento foi caracterizado como “*semi*”, pois foram feitos discos de folhas vivas de *S. oreacea L.*, mas como foi rompida a parede celular, os discos não poderiam mais ser chamados de espécies vivas (AGUILAR ET AL, 2008; TORRES-ROMERO ET AL, 2010; GONÇALVES ET AL., 2010).

### **5.2.1 Efeitos das substâncias 02, 06 e 17 na emissão de fluorescência da Chl a em discos foliares de espinafre**

As substâncias **02**, **06** e **17** não apresentaram resultados significativos (>20%) nesse ensaio, variando aproximadamente 20% se comparados com o controle. Os compostos foram infiltrados nos discos foliares de *S. oreacea L.*, em concentrações de 150 e 300µM e comparado com o controle na ausência dos mesmos (FIGURAS 70 e 71). O tempo de incubação dos compostos foi de 12 h e adaptado no escuro por 30 min.

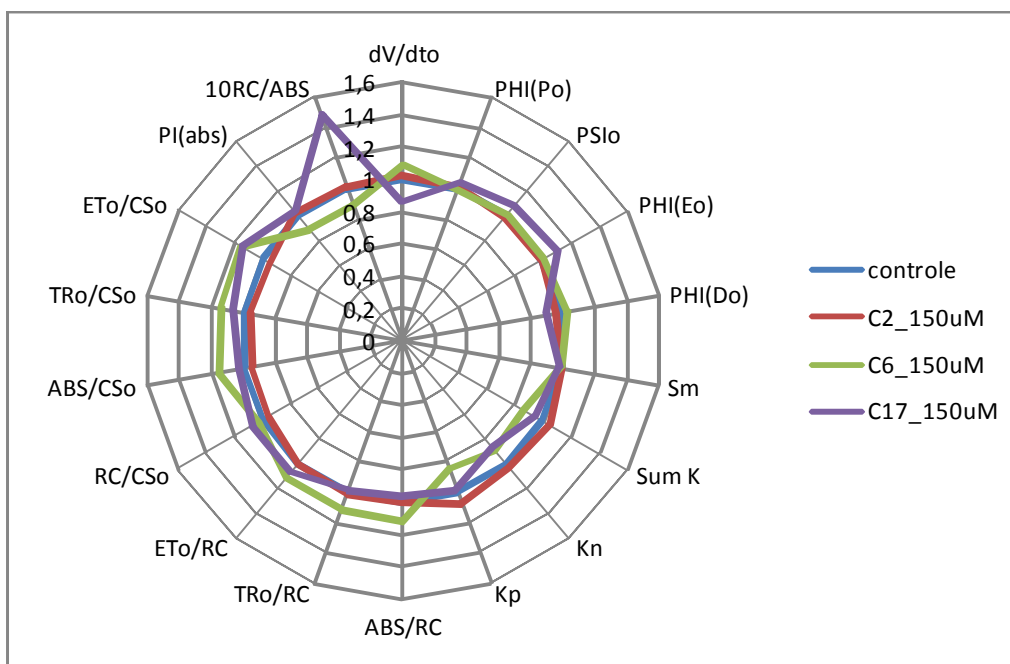


FIGURA 70- Gráfico de radar dos efeitos das substâncias **02**, **06** e **17** (150µM) nas variáveis da fluorescência Chl *a* em discos foliares de espinafre calculados através da curva OJIP.

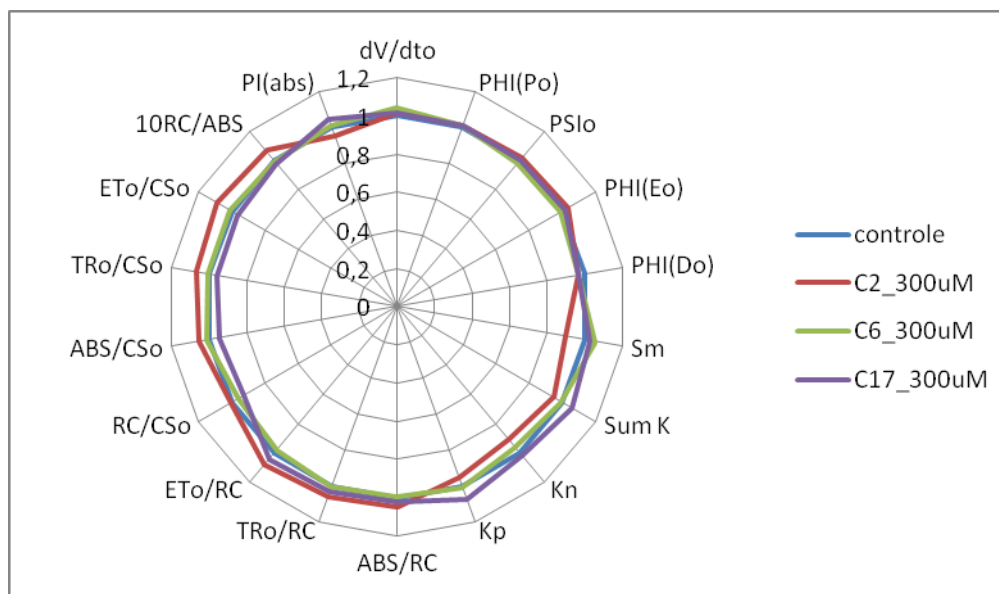


FIGURA 71- Gráfico de radar do efeito das substâncias **02**, **06** e **17** (300µM) nas variáveis da fluorescência Chl *a* em discos foliares de espinafre calculados através da curva OJIP.

### 5.2.2 Efeitos da substância 07 na emissão de fluorescência da Chl a em discos foliares de espinafre

A substância **07** foi avaliada por meio de ensaios de fluorescência da Chl a em semi “*in vivo*” e “*in vivo*”. No ensaio de fluorescência em disco, foi observado um estresse intenso no aparato fotossintético de PSII através da diminuição de 100% do parâmetro  $PI_{(ABS)}$  (Índice de desempenho) em concentrações de 150 e 300  $\mu\text{M}$ . Este parâmetro é uma das principais variáveis avaliadas, pois é a mais sensível para a detecção e quantificação de danos às plantas, o qual relaciona a eficiência de absorção, captura e transferência de energia de excitação de PSII, proporcionando uma melhor definição do grau de efeito do ambiente estressante.

Outro parâmetro avaliado foi o  $dV/dt_0$  (mudança da fluorescência variável relativa em função do tempo), que aumentou 120%. Esse parâmetro indica a eficiência fotossintética, ou seja, a variação da fluorescência que está ocorrendo, desde o tempo inicial do experimento até o final. Quando é observada uma diminuição na variável  $PI_{(ABS)}$ , e um aumento na variável  $dV/dt_0$ , explica o efeito ocorrido através do índice de desempenho com a variação da fluorescência.

Para verificar onde ocorreu o efeito causado na fotossíntese, avaliaram-se os parâmetros baseados no centro de reação (RC), na seção transversal da amostra (CS), na absorção (ABS), no transporte de elétrons (TR) e no rendimento quântico (PHI).

Uma diminuição de 90% foi verificada para as variáveis  $PSI_0$  (probabilidade,  $t=0$ , de um “éxciton” aprisionado mover um elétron pela cadeia transportadora de elétrons após a  $Q_A^-$ ) e  $PHI(E_0)$  (rendimento quântico do transporte de elétrons), quando associados a diminuição dos parâmetros  $ET_0/CS_0$  (transporte de elétrons por seção transversal) e  $ET_0/RC$  (transporte de elétrons por centro de reação) que diminuíram aproximadamente 80% comparado com o controle, em concentrações de 150 e 300 $\mu\text{M}$ , indicando que o efeito de dano ao PSII observado está localizado no transporte de elétrons, ou seja, com a diminuição dos parâmetros de ET, tanto por RC quanto por CS, indica que o fluxo de elétrons que ocorre normalmente na fotossíntese está sendo bloqueado pela ação do composto.

Os parâmetros de rendimento quântico, que mensuram a energia utilizada no processo de transferência de elétrons estão diminuindo, indicando que este transporte está sofrendo interferência.

Os parâmetros de  $TR_0/RC$  (fluxo de energia capturada por centro de reação) e  $ABS/RC$  (tamanho médio do complexo antena de captura de energia) tiveram um pequeno aumento de 20%. O baixo incremento dessas variáveis nos informa que pouca energia está sendo absorvida e aprisionada pelos centros de reação, onde deduz-se que não é necessário muita energia, uma vez que não está sendo utilizada para o transporte de elétrons, que foi afetado como mostra o parâmetro ( $ET_0/RC$ ).

Outro efeito também observado foi que a energia absorvida pelo sistema está sendo liberada em forma de calor ou de possível transferência de energia para outra molécula. Esse efeito é visto por meio das variáveis  $PHI(D_0)$  (rendimento quântico ( $t=0$ ) da energia de dissipação),  $Sm$  (área normalizada) e  $Kn$  (constante “de-excitação” não fotoquímica) que apresentaram um aumento de 30%.

O efeito nos parâmetros descritos está apresentado através do gráfico de radar de emissão da fluorescência da Chl *a* em discos foliares de espinafre (FIGURA 72).

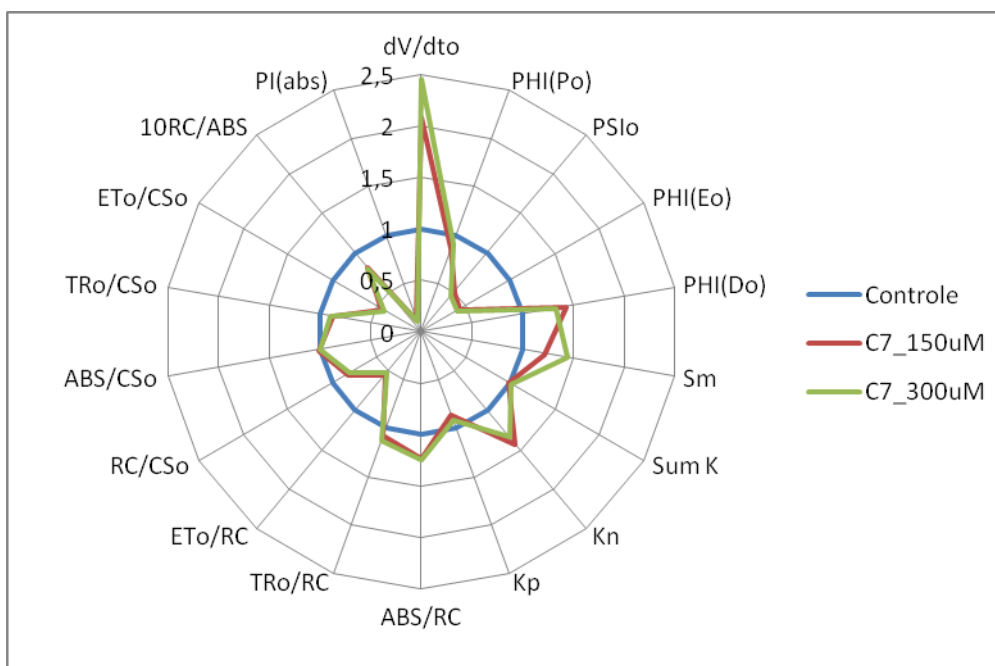


FIGURA 72- Gráfico de radar dos efeitos da substância **07** nos parâmetros/variáveis da fluorescência Chl a em discos foliares de espinafre calculados através da curva OJIP.

O aparecimento de duas bandas transientes certifica o comportamento da substância **07** como inibidora do transporte fotossintético de elétrons no PSII. A FIGURA 73 mostra o aparecimento de uma banda K (300µs) e uma banda J (2ms), o que informa que a ação do composto está sendo nos lados doador e receptor de elétrons de PSII, o que explica a alta variação encontrada nos parâmetros de emissão de fluorescência analisados.

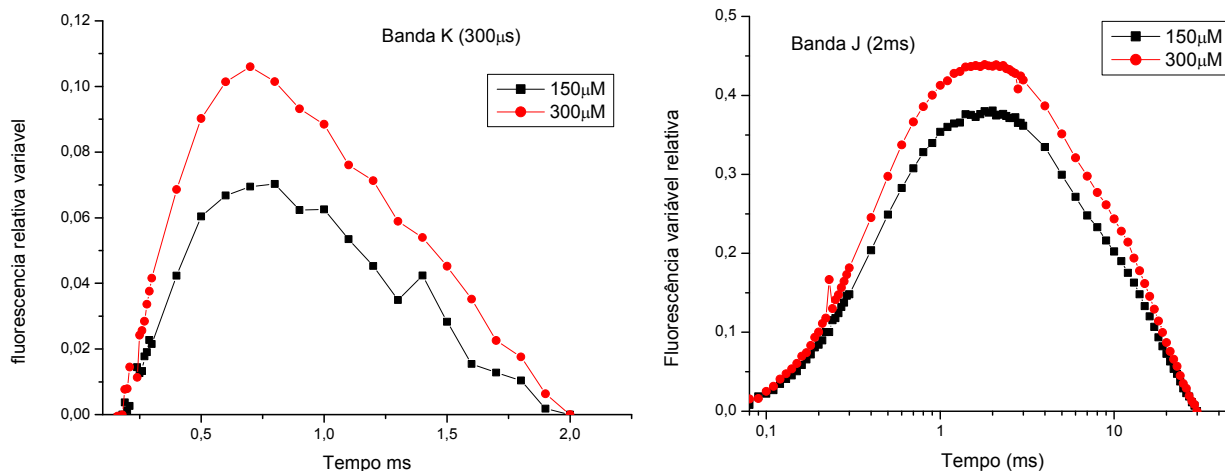


FIGURA 73- Bandas transientes da curva de emissão de fluorescência da Chl a (OJIP).

### 5.2.3 Efeitos da substância 09 na emissão de fluorescência da Chl a em discos foliares de espinafre

Os efeitos da substância 09 foram bastante pronunciados através das variáveis  $PI_{(ABS)}$  e  $dV/dt_0$ . O parâmetro de índice de desempenho  $PI_{(ABS)}$  diminuiu cerca de 80% em concentrações de 150 e 300 $\mu$ M; e 90% em 450 $\mu$ M, enquanto que o parâmetro de variação da fluorescência aumentou cerca de 100% em 450 $\mu$ M o que indica alteração na eficiência do aparato fotossintético (FIGURA 74).

Verificou-se que o transporte de elétrons por centro de reação sofreu uma diminuição de 30%, 40% e 50%, em ordem crescente, de acordo com a concentração da substância. Esse comportamento indica que o estresse causado ao aparato fotossintético do PSII, está no fluxo contínuo de elétrons que está sendo bloqueado.

A confirmação do bloqueio do transporte foi vista através da diminuição dos parâmetros de rendimento quântico,  $PHI(E_0)$  e  $PSI_0$ , ligados diretamente com o transporte que diminuíram 50% a 450 $\mu$ M. Dessa forma, a possibilidade de qualquer

éxciton que foi aprisionado seguir através da cadeia transportadora de elétrons para além do sítio da  $Q_A^-$  está limitado.

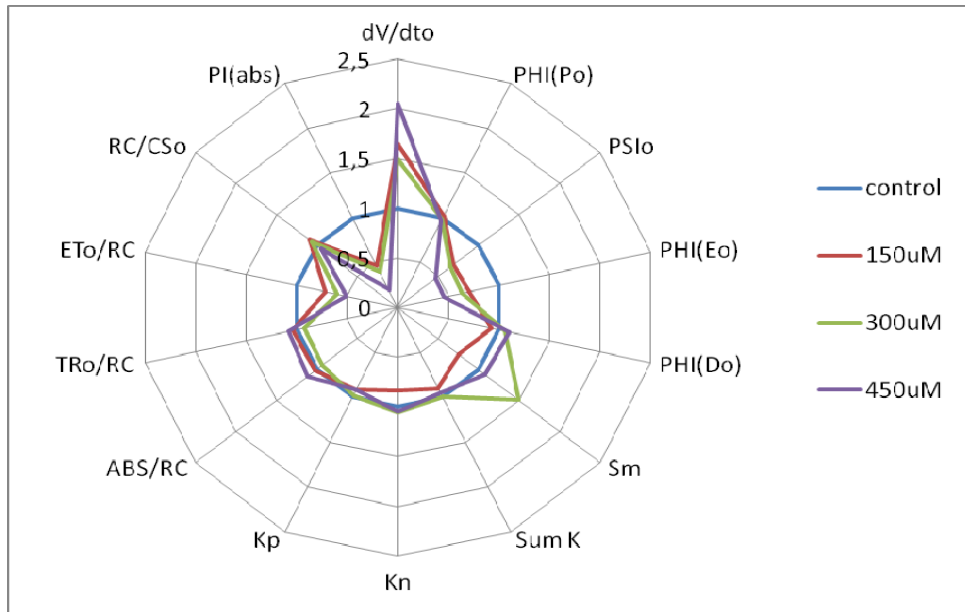


FIGURA 74- Gráfico de radar dos efeitos da substância **09** nos parâmetros/variáveis da fluorescência Chl a em discos foliares de espinafre calculados através da curva OJIP.

Contudo, não foi possível explicar a forma como a energia absorvida foi liberada, pois os parâmetros que indicam esta transição não sofreram alteração. Esta energia absorvida pode estar retida nos complexos protéicos que participam do processo da fotossíntese, pois o parâmetro *Sm* aumentou em 50%, ou seja, a área normalizada do centro reacional não está normal, o que indica um excesso de energia no meio.

Observou-se o surgimento de uma banda transiente J (2ms) o que permite concluir que o sítio de ação da inibição do transporte de elétrons aconteceu no lado acceptor das plastoquinonas (FIGURA 75).

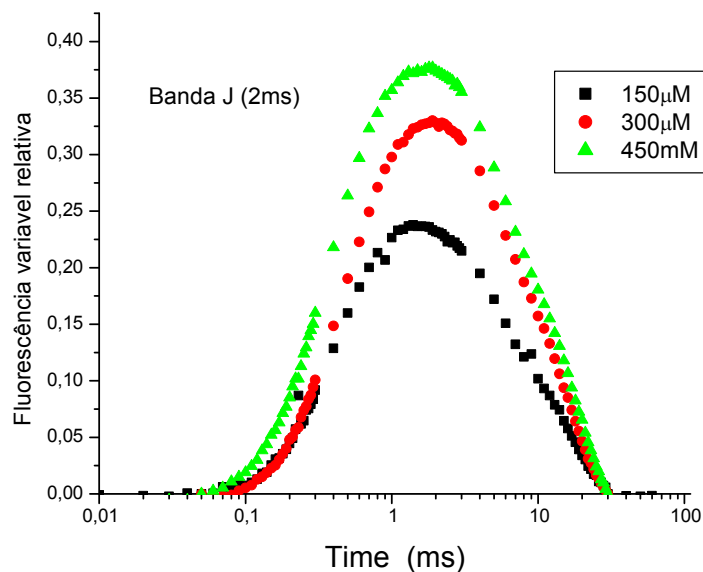


FIGURA 75- Bandas transitentes da curva de emissão de fluorescência da Chl a (OJIP) para a substância **09**.

Comparando este resultado com os transportes de elétrons *in vitro*, observa-se uma pequena diferença. Nos transportes, o sítio de ação do composto ficou localizado apenas no lado doador e na fluorescência no lado aceptor. Acredita-se que o efeito causado no lado doador seja sensível a concentrações menores, já que o experimento foi realizado em baixas concentrações, enquanto o causado no lado aceptor esteja mais propício a altas concentrações. Pode-se inferir também que o fato de os transportes serem realizados *in vitro* deixa os tilacóides mais expostos, facilitando que ocorra a reação, enquanto os ensaios em semi *in vivo* dificultam essa reação, uma vez que o composto necessita romper várias barreiras até chegar aos tilacóides.



#### 5.2.4 Efeitos da substância 10 na emissão de fluorescência da Chl a em discos foliares de espinafre

O efeito causado pela substância **10** foi observado apenas a baixas concentrações. O teste de fluorescência foi realizado em concentrações de 150 e 300 $\mu$ M, contudo, variações foram notadas apenas a concentração de 150 $\mu$ M (FIGURA 76).

Observou-se uma variação nos parâmetros  $dV/dt_0$  que aumentou 60%, enquanto que o  $PI_{(ABS)}$  diminuiu 60%. O parâmetro  $PI_{(ABS)}$ , informa o efeito sobre o estado da planta bem como o grau estressante causado, indicando diretamente que o processo fotossintético não está sendo bem desempenhando. Os dois associados indicam que a fotossíntese sofreu interferência em seu processo natural.

A fim de verificar qual dano ocorreu ao aparato fotossintético, avaliaram-se os parâmetros em função do centro de reação (RC) e da seção transversal da amostra (CS), da absorção (ABS), do transporte de elétrons (TR) e de rendimento quântico (PHI).

Uma diminuição de aproximadamente 40% foi observada para  $PSI_0$ ,  $PHI(E_0)$ ,  $Sm$ ,  $ET_0/CS_0$  e  $ET_0/RC$ , o que diretamente informa que o processo redox ( $Q_A^+ - Q_A^-$ ) do transporte de elétrons foi interrompido. A diminuição de 40% na área total, indica que toda a energia absorvida, de alguma forma, não foi utilizada, e então eliminada do processo.

A confirmação da forma de dissipação de energia foi entendida com o aumento da variável  $Kn$  em 40%, a diminuição do  $Sm$  em 40% e o aumento de aproximadamente 20% da variável  $PHI(D_0)$  (rendimento quântico ( $t=0$ ) da energia de dissipação). Assim, pode-se afirmar que a energia contida no sistema foi liberada na forma de calor ou na possível transferência para outra molécula.

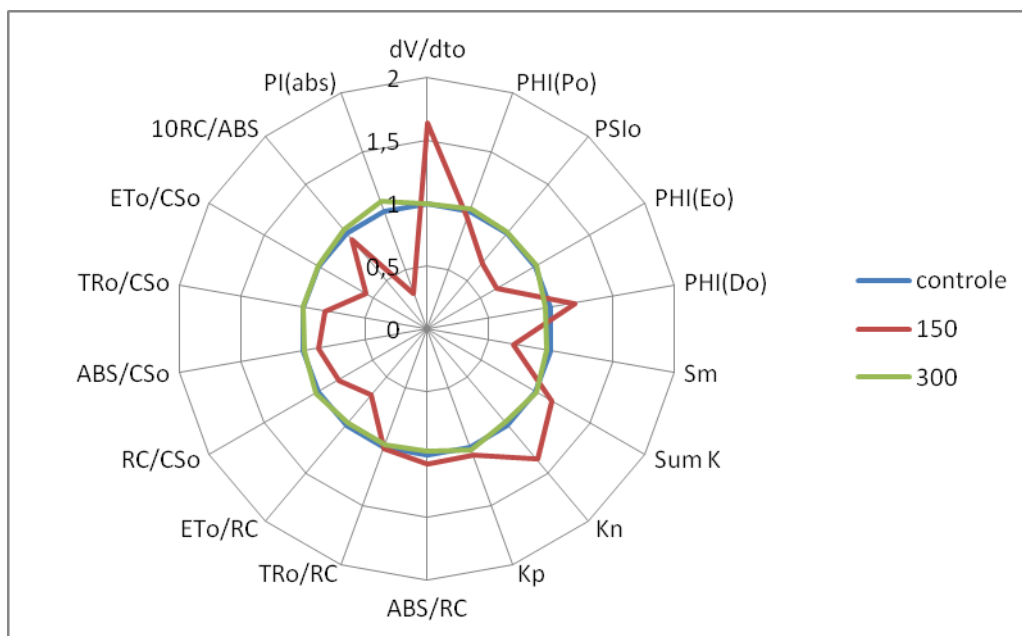


FIGURA 76- Gráficos de radar do efeito da substância **10** nos parâmetros/variáveis da de emissão de fluorescência Chl *a* em discos foliares de espinafre calculados através da curva OJIP.

Para localizar o sítio de ação entre os lados doador ou receptor de elétrons, uma banda transiente da curva OJIP foi encontrada na concentração de 150 μM, a banda J (2ms), que indica que essa ação de inibição está no nível das quinonas, ou seja, no lado receptor de PS II. Para concentrações mais altas não foi verificada nenhuma banda (FIGURA 77). Os resultados de emissão de fluorescência em discos foliares de espinafre corroboram, com os resultados de transporte de elétrons *in vitro*, que afirmaram que o composto atua como um inibidor da reação de Hill.

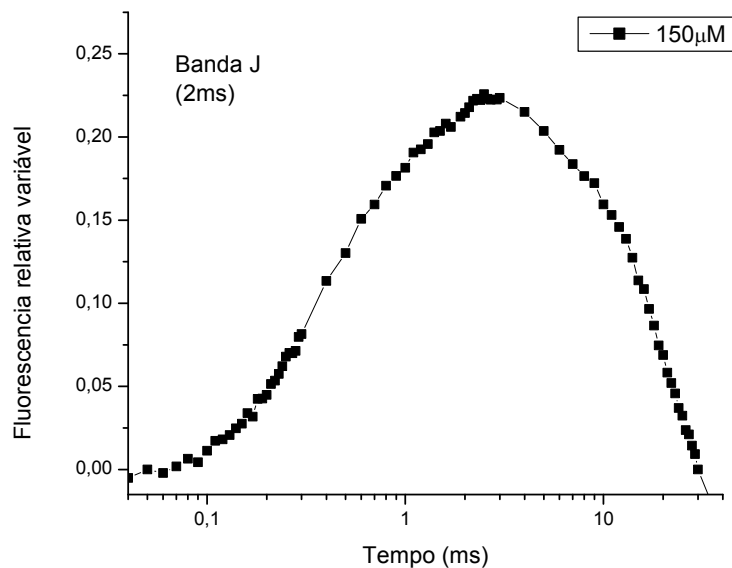


FIGURA 77- Bandas transitentes da curva de emissão de fluorescência da Chl a (OJIP) para a substância **10**.

### 5.2.5 Efeitos da substância 11 na emissão de fluorescência da Chl a em discos foliares de espinafre

Na fluorescência em disco foliares, a substância **11** foi bastante ativa em baixas concentrações (FIGURA 78). O parâmetro  $PI_{(ABS)}$  apresentou uma diminuição de 70% na concentração de  $150\mu\text{M}$ , que indica um estresse no aparato fotossintético.

Avaliando os outros parâmetros, foram observadas reduções em  $PSI_0$ ,  $PHI(E_0)$  e  $ET_0/CS_0$  e  $ET_0/RC$  de 40, 40, 60 e 40% a  $150\mu\text{M}$ , respectivamente, mostrando que, em baixas concentrações, o efeito foi intensificado. A diminuição desses parâmetros informa que o dano observado na eficiência, por meio do índice de desempenho, está ocorrendo no transporte de elétrons dentro do PSII, ou seja,

que os valores calculados de rendimento quântico para o transporte de elétrons diminuíam à medida que esse fluxo é inibido no processo.

Os parâmetros  $ET_0/CS_0$  e  $ET_0/RC$  indicam que o transporte de elétrons está sendo bloqueado, o parâmetro  $RC/CS_0$  (densidades de centros de reação por seção transversal) diminuiu em 30% a  $150\mu M$ , o que informa sobre a concentração de centros de reação participantes. Dessa forma, o composto está inibindo diretamente nos centros de reação, ou seja, na parte mais sensível da análise.

Para os parâmetros/variáveis  $dV/dt_0$ ,  $SmK$ ,  $Kn$  e  $PHI(D_0)$  foi verificado um aumento de 70, 40, 70 e 20% na concentração de  $150\mu M$ , respectivamente, revelando que a energia absorvida está sendo dissipada na forma de calor ou ainda na transferência para outras moléculas.

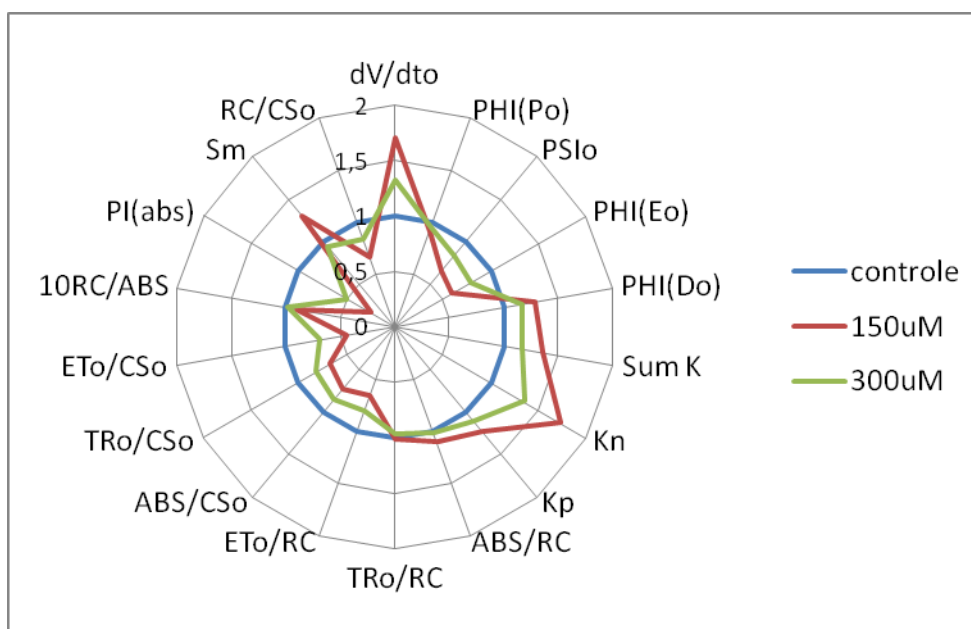


FIGURA 78- Gráfico de radar do efeito da substância 11 nos parâmetros/variáveis da de emissão de fluorescência Chl a em discos foliares de espinafre calculados através da curva OJIP.

O aparecimento da banda J (2ms) afirma que esse composto tem ação no lado aceptor de PSII em nível das quinonas, e da banda I (30ms), que se refere

exclusivamente a eficiência do *pool* das quinonas, ou seja, se as plastoquinonas estão ativas ou não no processo de redução da  $Q_A$ .

Quando a banda I é encontrada em valores negativos do gráfico, indica que o *pool* de  $Q_A$  está funcionando excelentemente e com isso é observado um incremento na banda J, o que indica que a ação do composto está ocorrendo nos centros de reação. As bandas transientes mostram exatamente esse efeito de acordo com as concentrações (FIGURA 79).

Relacionando este ensaio com os ensaios *in vitro* e em semi *in vivo*, observa-se que o mesmo não apresentou inibição nos transportes de elétrons *in vitro*. Acredita-se que o efeito da inibição da transferência de elétrons em baixas concentrações mascarou o aparecimento deste segundo efeito. Outro fato a se considerar é a sensibilidade das medidas de fluorescência, a qual tem tornado essa técnica uma das melhores, para detectar e quantificar qualquer variação na fotossíntese, além de viabilizar a realização das medidas *in vivo* sem causar nenhum dano à planta.

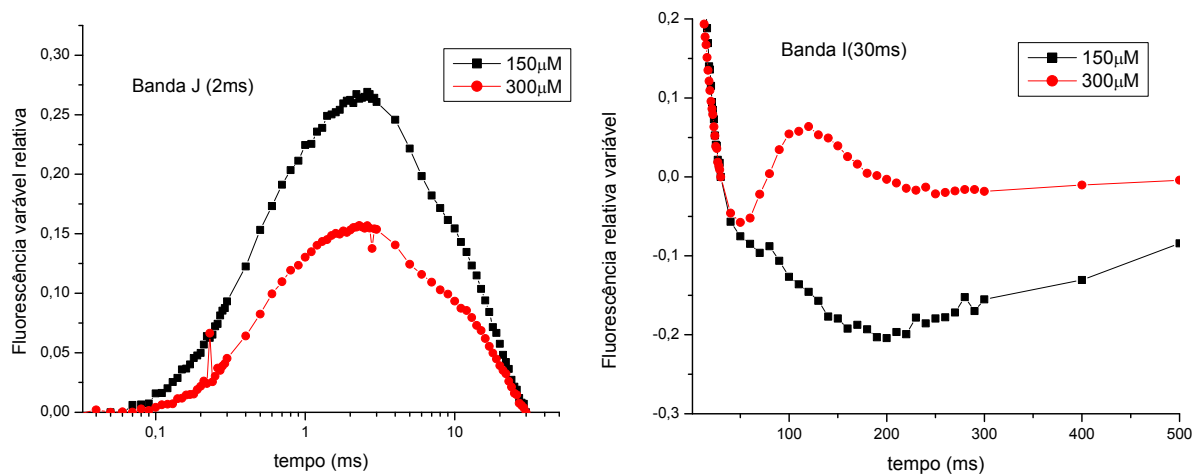


FIGURA 79- Bandas transientes da curva de emissão de fluorescência da Chl *a* (OJIP) para a substância 11.

### 5.2.6 Efeitos da substância 12 na emissão de fluorescência da Chl a em discos foliares de espinafre

A substância **12**, na fluorescência em disco foliares (FIGURA 80), apresentou um efeito diferenciado. Em baixa concentração, não foram observados resultados significativos (>20%), contudo, em concentrações mais elevadas, pôde-se verificar um efeito diretamente ligado ao transporte de elétrons.

O índice de desempenho  $PI_{(ABS)}$  diminuiu em aproximadamente 60% na concentração de 300 $\mu$ M, enquanto que o  $dV/dt_0$  teve um aumento de 40%, indicando que o aparato fotossintético, exclusivamente de PSII, está sofrendo um estresse. Na busca pelo fator que influenciou essa alteração, notou-se que os parâmetros de RC não apresentaram variações significativas, entretanto, os parâmetros com relação à seção transversal da amostra (CS) forneceram informações suficientes para sugerir o efeito direto sobre os transportes de elétrons.

Os parâmetros  $ET_0/CS_0$ ,  $TR_0/CS_0$  e  $RC/CS_0$  sofreram diminuição de 40%, 20% e 20% na concentração de 300 $\mu$ M, respectivamente, indicando que a energia absorvida nessas seções foi reduzida. Isto ocorreu pelo fato de que o composto **12** inibiu o transporte de elétrons nessas seções e, não havendo necessidade de transportá-los, portanto o gasto de energia no processo foi reduzido. Por outro lado, as variáveis de rendimento quântico PSII,  $\Phi(EO)$  diminuíram 20% na mesma concentração, o que reafirma que a probabilidade de ocorrer fluxo de elétrons no interior de PSII diminuiu.

A energia, absorvida durante o processo, foi liberada na forma de calor e na transferência para outras moléculas, como informa a constante “de-excitação” não fotoquímica ( $K_n$ ), que aumentou 40% durante o processo. A variável  $\Phi(D_0)$  (rendimento quântico ( $t=0$ ) da energia de dissipação) aumentou em aproximadamente 20%, o que indica a liberação de energia na forma de calor, afirmando que dos 40% da liberação não-fotoquímica mencionada, aproximadamente 20% foi exclusivamente na forma de calor para o meio.

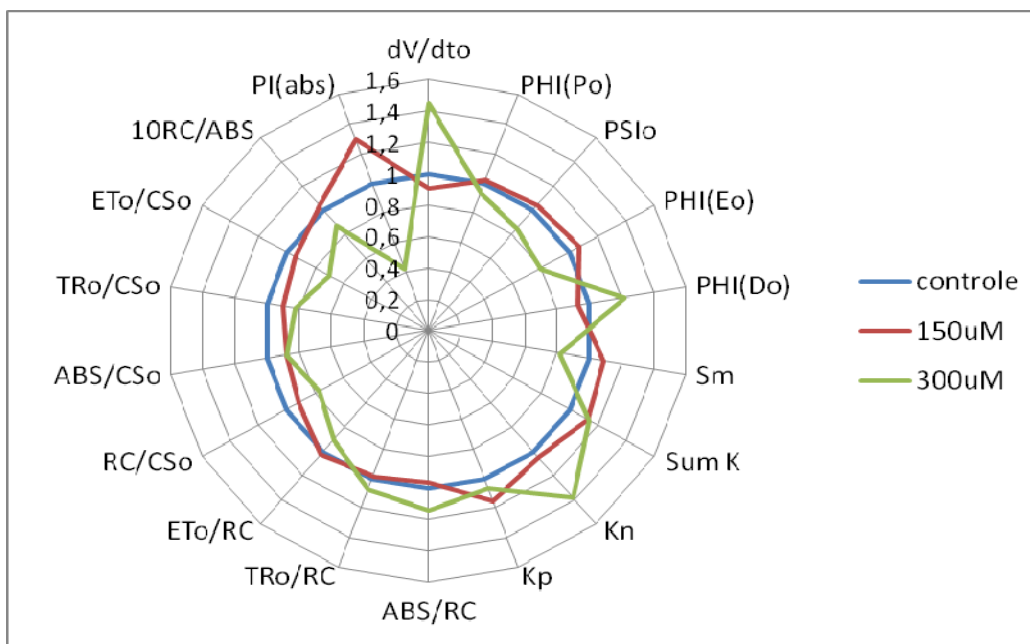


FIGURA 80- Gráfico de radar do efeito da substância **12** nos parâmetros/variáveis da de emissão de fluorescência Chl a em discos foliares de espinafre calculados através da curva OJIP.

Para corroborar os resultados, o aparecimento de uma banda J (2ms) foi observado na concentração de 300µM (FIGURA 81). Através desta informação, pode-se afirmar que o composto atua no PSII em nível do pool de quinonas. Comparando ensaios *in vitro* e em semi *in vivo* observou-se que o mesmo não apresentou inibição no transporte de elétrons, isso ocorreu porque as medições dos transportes *in vitro* foram realizadas em baixas concentrações.

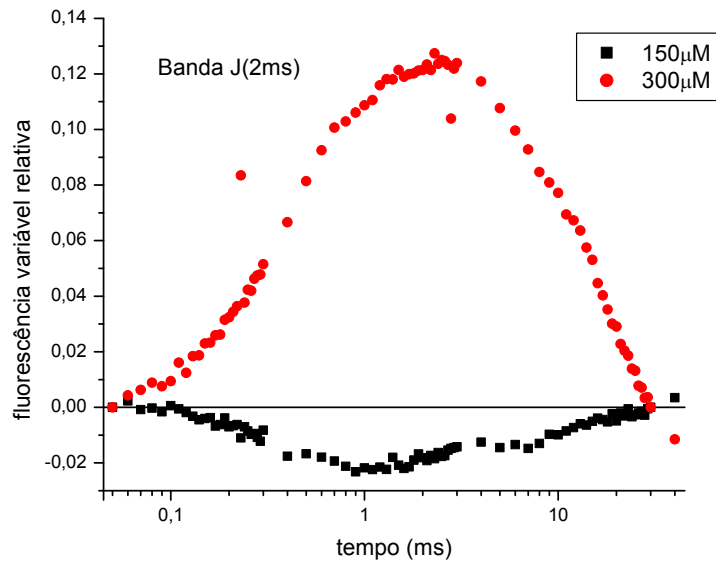


FIGURA 81- Bandas transientes da curva de emissão de fluorescência da Chl a (OJIP) para a substância **12**.

### 5.2.7 Efeitos da substância **18** na emissão de fluorescência da Chl a em discos foliares de espinafre

A substância **18** mostrou resultados significativos na concentração de 300 μM (FIGURA 82). Os parâmetros que variaram significativamente (>20%) foram:  $PI_{(ABS)}$  diminuiu 60%, enquanto o  $dV/dt_0$  aumentou 40%, informando que a substância afetou o bom funcionamento da fotossíntese.

Os parâmetros  $TR_0/CS_0$ ,  $ABS/CS_0$ ,  $RC/CS_0$ ,  $ET_0/RC$ , e as variáveis  $PSI_0$  e  $PHI(E_0)$  diminuíram 20% e demonstrando que houve dano no aparato fotossintético em nível de transporte de elétrons.

Observou-se um aumento nas variáveis  $Kn$  e  $PHI(D_0)$  de 50% e 20% respectivamente, isto implica que a energia que foi absorvida durante o processo foi liberada na forma de calor ou na transferência para outras moléculas.



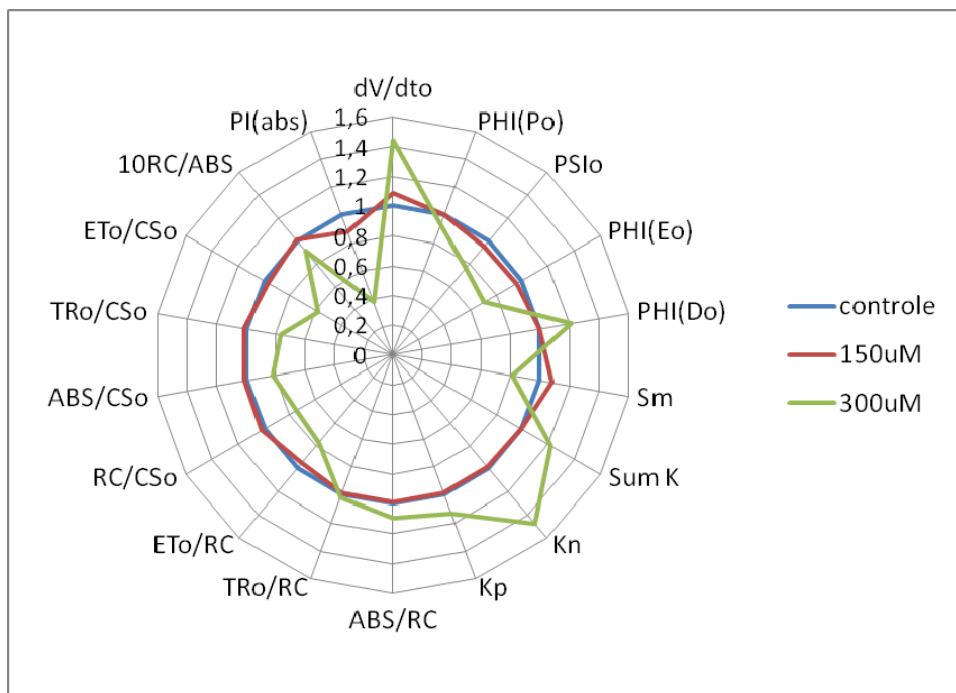


FIGURA 82- Gráfico de radar do efeito da substância **18** nos parâmetros/variáveis da de emissão de fluorescência Chl *a* em discos foliares de espinafre calculados através da curva OJIP.

Verificou-se uma banda transiente da curva polifásica OJIP em 2ms, a banda J, na concentração mais alta do experimento, evidenciando que a ação do composto está no lado aceptor de PSII ( $Q_A^+ - Q_A^-$ ) (FIGURA 83).

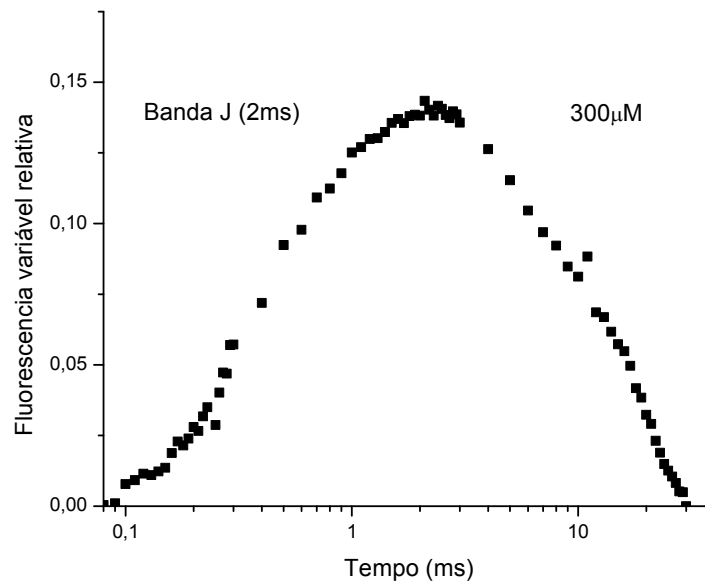


FIGURA 83- Bandas transitentes da curva de emissão de fluorescência da Chl a (OJIP) para a substância **18**.

### **5.3 Ensaios “in vivo” da emissão de fluorescência da clorofila a e biomassa seca em *L. pereni***

Os ensaios realizados *in vivo* foram:

a) Fluorescência da clorofila *a*, a qual apresenta como uma ferramenta poderosa para avaliar o desempenho do sistema de fotossíntese em plantas vivas sem causar nenhum dano às mesmas (AGUILAR ET AL, 2008);

b) Biomassa Seca que informa, através da massa da amostra, a variação causada pelo efeito de algum composto sobre a planta, impedindo diretamente o seu crescimento (TORRES-ROMERO ET AL, 2010).

Os ensaios *in vivo* revelam como a planta age diante de qualquer estresse causado a ela, ou seja, qualquer dano que interfira em seu desenvolvimento direto

ou indireto. Os ensaios foram realizados com as substâncias **02, 06, 07, 09, 10, 11, 12, 17 e 18**.

### 5.3.1 Estudos da emissão de fluorescência da clorofila a (Chl a) em plantas *Lolium pereni*

Os ensaios de fluorescência da Chl a foram realizados com plantas da espécie *Lolium pereni*, e as substâncias avaliadas a concentrações de 150 e 300 $\mu$ M.

Os resultados obtidos para este experimento em 24h, 48h e 72h não foram significativos. Isto pode ser explicado em parte de que nessas concentrações os compostos não conseguem ultrapassar as barreiras naturais (paredes, membranas celulares e etc.), oferecidas pelas plantas até chegar aos tilacóides, no cloroplasto.

As FIGURAS 84 e 85 apresentam os gráficos de radar da emissão de fluorescência das substâncias **02, 06, 07, 09, 10, 11, 12, 17 e 18** na concentração de 300 $\mu$ M e por 72h.

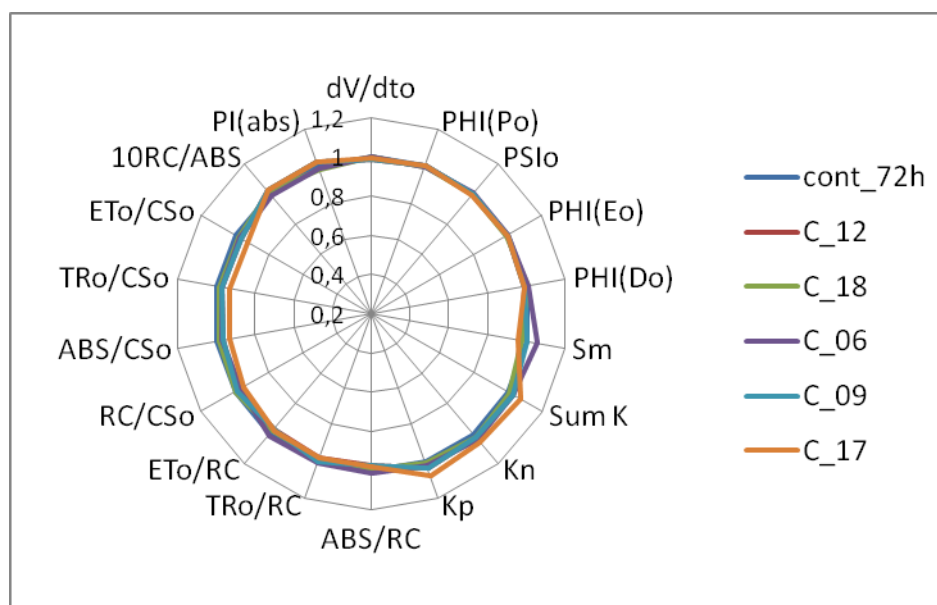


FIGURA 84- Gráfico de radar dos efeitos das substâncias **12, 18, 06, 09 e 17** nos parâmetros/variáveis da de emissão de fluorescência Chl a calculados através da curva OJIP.

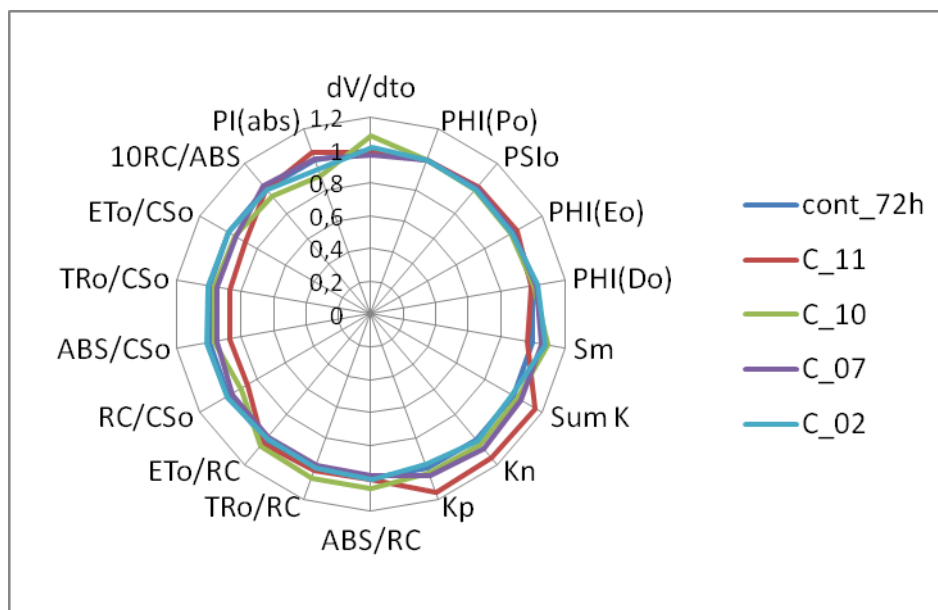


FIGURA 85- Gráfico de radar dos efeitos das substâncias **11**, **10**, **06**, **07** e **02** nos parâmetros/variáveis da de emissão de fluorescência Chl a calculados através da curva OJIP.

### 5.3.2 Avaliação de biomassa seca em *L. pereni*

O experimento de biomassa seca tem sido considerado de ampla ajuda na confirmação de atividade herbicida pós-emergente. Essa atividade está relacionada com o crescimento das plantas, ou seja, avalia se, de alguma forma, um composto pode regular o crescimento, podendo até causar a morte.

A maioria dos herbicidas reguladores de crescimento é rapidamente absorvido pelas raízes e folhas, e translocados tanto pelo floema quanto pelo xilema. A translocação desses herbicidas aplicados em folhas de gramíneas é mais restrita que em folhas largas. Dessa forma, esses herbicidas são usados, prioritariamente, para controlar plantas daninhas de folhas largas em culturas de gramíneas e

pastagens, sendo assim os mais efetivos no controle de plantas daninhas nessas culturas (MARCHI ET AL, 2008).

Esse experimento pode ser realizado utilizando as mesmas plantas avaliadas na fluorescência da Chl *a in vivo*, pois esta não é destrutiva e, desta forma, não há interferência nos resultados adquiridos com relação ao crescimento das plantas para as medidas da biomassa.

Os resultados de biomassa seca foram medidos em plantas da espécie *L. perenne*, 15 dias após a aplicação dos compostos. Foram avaliadas as substâncias **02, 06, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 17 e 18** em duas concentrações 150 e 300µM. Os demais compostos não foram ensaiados, pois a quantidade de massa foi reduzida. O herbicida comercial DCMU foi utilizado como controle positivo.

As TABELAS 27, 28 e 29 mostram os resultados encontrados, em relação a biomassa seca.

TABELA 27- Efeitos das substâncias **02, 07, 10 e 11** na produção da biomassa seca de *L. pereni*.

Substância	Concentração (µM)	Biomassa Seca (mg)	Porcentagem (%)
Controle	0	400	100
DCMU	10	307	77
<b>02</b>	150	384	96
	300	387	97
<b>07</b>	150	445	111
	300	378	95
<b>10</b>	150	320	80
	300	327	82
<b>11</b>	150	310	77
	300	350	87

Apenas as substâncias **10** e **11** apresentaram resultados significativos, ambos compostos se mostraram melhores inibidores em concentrações mais baixas (150µM) com um decaimento de 20% e 23%, respectivamente. A substância **11** comparada com o DCMU, apresentou uma inibição no mesmo percentual 23% em concentrações diferenciadas.

Avaliando os efeitos causados pelas duas substâncias, nas condições semi *in vivo*, *in vitro* e *in vivo*, pôde-se observar que os mesmos apresentaram melhores resultados em baixas concentrações. Com as informações obtidas é possível inferir que a substância **10** atua como inibidor do transporte fotossintético de elétrons e regulador de crescimento (pós-emergente), e a substância **11** atua como inibidor da transferência de elétrons, da transferência de energia e regulador do crescimento.

TABELA 28- Efeitos das substâncias **03**, **06**, **12**, **13** e **17** na produção de biomassa seca de *L. pereni*.

Substância	Concentração ( $\mu\text{M}$ )	Biomassa Seca (mg)	Porcentagem (%)
Controle	0	453	100
DCMU	10	271	60
<b>03</b>	150	433	95
	300	430	94
	150	489	108
<b>06</b>	300	414	91
	150	361	80
<b>12</b>	300	396	87
	150	355	78
<b>13</b>	300	403	89
	150	446	98
<b>17</b>	300	406	90

As substâncias que apresentaram efeitos significativos sobre o crescimento foram **12** e **13**, as demais não mostraram desempenho acima de 10%. A substância **12** inibiu o crescimento em 20% e 23% nas concentrações de 150 e 300 $\mu\text{M}$ , respectivamente. Este composto apresentou efeitos inibitórios no transporte fotossintético de elétrons, na transferência de energia e agora na regulação do crescimento vegetativo. A substância **13** apresentou uma diminuição de 23% no desenvolvimento das plantas na concentração de 150 $\mu\text{M}$ . Contudo, este composto não apresentou atividade nos outros experimentos. Dessa forma pode-se afirmar que o mesmo apresentou apenas potencial como regulador do crescimento.

TABELA 29- Efeitos das substâncias **08** e **09** na produção da biomassa seca de *L. pereni*.

Substância	Concentração ( $\mu\text{M}$ )	Biomassa Seca (mg)	Porcentagem (%)
Controle	0	569	100
DCMU	10	423	74
<b>08</b>	150	483	85
	300	459	80
<b>09</b>	150	554	97
	300	581	102

A substância **08** apresentou uma diminuição de 20% no desenvolvimento das plantas na concentração de 300 $\mu\text{M}$ . Contudo, este composto não apresentou atividade nos outros experimentos. Dessa forma, pode-se afirmar que o mesmo apresentou apenas potencial como regulador do crescimento. Por outro lado, a substância **09** não inibiu o crescimento. Este composto, nos experimentos anteriores, apresentou efeitos inibitórios no transporte fotossintético de elétrons e na emissão de fluorescência da Chl *a*.



# *Parte Experimental*

*2*

## **6.1 Ensaio de inibição da fotossíntese “in vitro”**

### **6.1.1 Fluxo de elétrons durante a fase fotoquímica da fotossíntese em cloroplastos isolados de folhas de *Spinacia oleracea* L**

Para a extração dos cloroplastos de *Spinacia oleracea* L., foram eliminadas a nervura central e as extremidades basal e apical das folhas e, em seguida, colocadas no liquidificador (aproximadamente 25g) contendo 100mL do meio de isolamento: sacarose (400mmol L<sup>-1</sup>), MgCl<sub>2</sub> (5mmol L<sup>-1</sup>), KCl (10mmol L<sup>-1</sup>) e K<sup>+</sup>-tricina (30mmol L<sup>-1</sup>) em pH 8,0 (1 mol L<sup>-1</sup>KOH).

O meio homogeneizado foi filtrado e centrifugado (4000rpm, 4°C e 5min). O sobrenadante foi eliminado, restando um sólido com os cloroplastos. Este sólido foi ressuspensionado em 1mL do mesmo meio, usado no isolamento (LOTINA-HENNSEN, 1999). Todos os reagentes utilizados no procedimento são de procedência da Sigma/Aldrich® e da Merc®. Para o preparo das soluções foi utilizada água destilada.

Para determinar a concentração de clorofila, foram retiradas 2 alíquotas de 20µL da suspensão dos cloroplastos e transferidas para 2 tubos de centrifuga contendo 5mL de acetona. A amostra permaneceu no escuro e em repouso por cinco minutos e, em seguida, centrifugada (4000rpm e 5min). Posteriormente, foram realizadas medidas de absorvâncias do sobrenadante em comprimentos de onda específicos ( $\lambda = 645$  e  $663\text{nm}$ ).

Para a quantificação de clorofila foi utilizada a equação abaixo (Equação 7) como descrito na literatura (ROMAGNI, 2002).

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

EQUAÇÃO 7. Equação de quantificação de clorofila.

Para os ensaios com as substâncias puras, foram preparadas soluções estoque em DMSO na concentração de 20mM . Para a realização das medições, alíquotas específicas foram tomadas para cada concentração desejada. Para as

reações de transporte fotossintético de elétrons utilizou-se um microeletrodo de Clark (Orion), conectado a um Oxímetro YSI -5300<sup>a</sup> (Biological Oxygen Monitor), para determinação do consumo de oxigênio. A resposta do sinal em função do tempo era registrada em um registrador. O transporte de elétrons basal foi determinado através de um oxímetro. Em uma cubeta de vidro, foram adicionados 3mL do meio de transporte: sacarose (100mmol L<sup>-1</sup>), MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (5mmol L<sup>-1</sup>), KCl (10mmol L<sup>-1</sup>), pH 8 (1mmol L<sup>-1</sup> KOH) na presença de ADP (1mmol L<sup>-1</sup>) e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (3mmol L<sup>-1</sup>). À mesma adicionou 20mg de Chl.mL<sup>-1</sup>, e iluminou por 3 min. com uma lâmpada azul (60W), sob condições aeróbicas .

Para a determinação da curva de concentração de inibição, antes de iluminar, foram adicionadas alíquotas da solução estoque para atingir concentrações requerentes.

O transporte de elétrons fosforilante foi determinado como o transporte de elétrons basal, adicionando-se à mistura ADP (1mmol L<sup>-1</sup>), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,1mmol.L<sup>-1</sup>) e KCN (3 mmol L<sup>-1</sup>) para inibir a atividade catalítica. O transporte de elétrons desacoplado, assim como o basal, foi determinado adicionando-se à mistura uma solução de NH<sub>4</sub>Cl (5mmol L<sup>-1</sup>). As reações parciais na cadeia de transporte de elétrons foram medidas utilizando-se inibidores artificiais específicos como o 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilureia (DCMU), 10μmol L<sup>-1</sup>; 2,5-dibromo-3-metil-6-isopropil-1,4-*p*-benzoquinona (DBMIB), 1μmol L<sup>-1</sup>; e os doadores e aceptores de elétrons artificiais: silicomolibdato de sódio (SiMo), 100μmol L<sup>-1</sup>; difenilcarbazida (DPC), 200μmol L<sup>-1</sup>; diaminodureno (DAD), 100μmol L<sup>-1</sup> e metilviologênio (MV), 100μmol L<sup>-1</sup>.

Quando um composto apresentou-se como inibidor do transporte de elétrons, o seu mecanismo de ação foi elucidado nos dois fotossistemas. Todas as medidas de transporte de elétrons foram realizadas em triplicata, e todas as determinações foram estabelecidas por comparação com o controle.

### 6.1.2. Determinação do fluxo fotossintético de elétrons nos fotossistemas II e I (PSII e PSI) desacoplados

O fluxo de elétrons nos PSII e PSI foi determinado como o transporte de elétrons desacoplado. O PSII foi medido da H<sub>2</sub>O a DCPIP (reduzido), suportado pela

evolução de O<sub>2</sub>. O meio reacional foi constituído por DBMIB (1µM), DCPIP (100µM), K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] (500mM) e NH<sub>4</sub>Cl (6mM) (Garza-Ortíz et al., 2004). O transporte de elétrons parciais do PSII desacoplado de H<sub>2</sub>O a SiMo foi determinado, assim como para PSII, com exceção do DBMIB, DCPIP e K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>], e adicionados SiMo (200µM) e DCMU (10µM). O transporte de elétrons do PSII (DPC a DCPIP<sub>oxidado</sub>) foi medido através da redução da razão de DCPIP<sub>ox</sub> com espectrofotômetro de ultravioleta e determinados em tilacóides previamente tratados com Tris (0,8M) em pH 8,0 e incubados por 30min a 4°C.

Para o transporte de elétrons de PSI foi medido o consumo de O<sub>2</sub> de uma maneira similar à razão do transporte de elétrons basal acíclico com DCMU (10µM), DCPIP (100µM) reduzido, com ácido ascórbico (300µM), MV (50µM) e NH<sub>4</sub>Cl (6mM), que foram utilizados como meio reacional (ALLEN E HOLMES ET AL., 1986). Todas as medições de transporte fotossintético de elétrons foram realizadas em triplicata, e todas as determinações foram estabelecidas por comparação com o controle (medida realizada sem adição de composto).

### 6.1.3 Ensaios com o complexo H<sup>+</sup>-ATPase na membrana tilacóide

Cloroplastos foram isolados de folhas de *S. oleacea* L. e ressuspensos com uma solução de: sorbitol (0,35M), EDTA (2mM), MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (1mM), MnCl<sub>2</sub> (1mM) e HEPES (50mM), em pH 7,6. A atividade H<sup>+</sup>-ATPase ligada as membranas tilacóides foi medida de acordo com metodologia descrita por Mills *et al.* (1980). Utilizou-se NH<sub>4</sub>Cl como controle positivo. Para cada reação, um experimento em branco foi realizado com os cloroplastos isolados no meio de reação. Os resultados são atribuídos em função da concentração de fosfato inorgânico (Pi) presente nas medições finais. Para realizar essa quantificação, utilizou-se um espectrofotômetro de ultravioleta com medidas em λ=660nm. As medidas de atividade da ATPase foram realizadas em sextuplicatas, e todas as determinações foram estabelecidas por comparação com o controle.

## **6.2 Ensaio semi “in vivo” de medidas da emissão de fluorescência da clorofila a**

### **6.2.1 Estudos da fluorescência da clorofila a (Chl a) em discos foliares de *S. oleracea* L.**

Em folhas de *S. oleracea* L, foram feitos dez discos com diâmetro de 1cm cada e colocados em placas de Petri (90x10cm) contendo 20mL do meio Krebs “modificado”: NaCl (115mM), KCl (5,9mM), MgCl<sub>2</sub> (1,2mM), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,2mM), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1,2mM), CaCl<sub>2</sub> (2,5mM) e NaHCO<sub>3</sub> (25mM) ajustado a um pH 7,4. As placas contendo os discos permaneceram sob agitação (130rpm) por um fotoperíodo de 12 h à temperatura ambiente 26°C. Após esse período, foram adicionados aos discos foliares, alíquotas das substâncias (150 e 300µM) isoladas de *R. graveolens*, e para o controle adicionou-se os mesmos volumes de DMSO. Após um período de aproximadamente 6 h de incubação, os discos permaneceram por 30 min no escuro, e, em seguida, foram realizadas as medidas de fluorescência da Chl a com um Hansatech Handy PEA (*Plant Efficient Analyzer*) como descrito por STRASSER ET AL. (1995) e AGUILAR ET. AL., 2008.

O processamento dos dados foi feito com o programa Biolyzer\_HP3, onde foram avaliados 19 parâmetros fotossintéticos e as curva polifásicas transientes. Para esse experimento foram realizadas 10 replicatas.

### **6.3 Ensaaios “in vivo” de medidas da fluorescência da clorofila a**

#### **6.3.1 Estudos da fluorescência da clorofila a (Chl a) em folhas de *L. pereni***

Para a realização deste experimento, primeiramente teve-se que cultivar plantas da espécie *L. perenne*. Duzentas sementes foram selecionadas, para cada vaso, e foram plantadas com terra previamente esterilizada. Estas foram mantidas em estufa a 25-30<sup>0</sup>C por 15 dias para crescimento. Após o período estabelecido para crescimento, as plantas de *L. perenne* foram selecionadas por tamanho similar e foram borrifadas soluções dos compostos (150 e 300 µM). A alíquota de cada composto foi solubilizada em uma solução de Tween-20 (0,05%). Ao grupo de plantas controle, foram borrifadas Tween e DMSO. Posteriormente, foi efetuada as medições de emissão da fluorescência da Chl a *in vivo* com um Hansatech Handy PEA (*Plant Efficient Analyzer*), nos períodos de 24, 48 e 72 h. Antes de cada medida, as plantas eram deixadas em repouso, no escuro, por 30 min. (TORRES-ROMERO ET AL, 2010).

Para as medidas de fluorescência e para o processamento dos dados utilizou-se o Biolyzer\_HP3, e os mesmos parâmetros fotossintéticos foram avaliados. Todas as medidas foram realizadas em triplicata, e todas as determinações foram estabelecidas por comparação ao controle. Para o preparo das soluções foi utilizada água destilada.

#### **6.3.2 Avaliação da biomassa seca em plantas de *L. pereni***

As plantas que foram utilizadas para os ensaios de fluorescência *in vivo*, foram as mesmas utilizadas para determinação da biomassa seca. Após 15 dias de contato dos compostos com as plantas, as mesmas foram cortadas na região do coleto, transição caule- raiz, e colocadas para secagem em uma estufa a 65<sup>0</sup>C. Após

este período de secagem, as biomassas secas foram pesadas e comparadas com o controle (GONZÁLEZ-IBARRA ET AL, 2005, TORRES-ROMERO ET AL, 2010).

## **7.0 Considerações Finais**

Foram isolados dezoito metabólitos secundários da *Ruta graveolens* (Rutaceae), onze alcalóides e sete furanocumarinas. Dessas substâncias, treze apresentaram potencial de inibição da fotossíntese, avaliado *in vitro*, semi *in vivo* e *in vivo*.

Nos ensaios de transporte fotossintético de elétrons, as substâncias **02, 06, 07, 09, 10, 11, 12, 17 e 18** apresentaram atividade relevante. Para as substâncias **02** e **09**, que atuaram diretamente como inibidores de Hill, seus mecanismos de ação entre os PSI e PSII foram elucidados. Ambas as substâncias se apresentaram como inibidores do PSII, atuando no lado doador ( $H_2O$  a *SiMo*), onde a **02** inibiu 60% em 400 $\mu$ M, e a **09** inibiu 100% em 150 $\mu$ M.

Com as substâncias **06** e **07**, não foi possível realizar os ensaios, pois a massa isolada dos compostos foi insuficiente para todos os experimentos, e as substâncias **10, 11, 12, 17 e 18** não apresentaram potenciais de inibição.

Nos ensaios de ATPase, foram avaliadas as substâncias **02, 06, 11, 12 e 18** em concentrações variadas. Para os compostos **02, 11 e 12** apresentaram-se como inibidores da transferência de elétrons em concentrações 100, 300 e 75  $\mu$ M; enquanto **06 e 18** atuaram como desacoplante a concentração de 100  $\mu$ M.

No ensaio de emissão de fluorescência da clorofila *a* em semi *in vivo* (discos foliares), as substâncias **07, 09, 10, 11, 12 e 18** apresentaram resultados satisfatórios, interferindo diretamente no aparato fotossintético do PSII. O composto **07** mostrou uma diminuição de 100% na variável  $PI_{ABS}$  em concentração de 300 $\mu$ M, indicando que o sistema está sofrendo estresse. Esta é uma das principais variáveis avaliadas, pois é sensível para a detecção e quantificação de estresse em plantas. O aparecimento de duas bandas transientes *K* e *J*, confirma a ação do composto no lado aceptor de elétrons do PSII.

As substâncias **09**, **10**, **12** e **18** a concentração de 450, 150, 300 e 300  $\mu\text{M}$ , também apresentaram inibição na emissão de fluorescência em disco foliares. Nestas, foram observadas o aparecimento da banda transiente *J* (2ms) confirmando ação no lado acceptor de elétrons.

Ainda nos ensaios de discos foliares, o composto **11**, apresentou um comportamento diferenciado dos demais. Sua ação, dentro do PSII, foi vista a concentração de 150  $\mu\text{M}$  e o aparecimento de duas bandas foi verificado *J* e *I*. Estas bandas indicam que a ação no pool das quinonas foi efetivo e acentuado. Nos ensaios de fluorescência *in vivo* em plantas da espécie *L. pereni* L., nenhum dos compostos avaliados, apresentou variação destacada.

No experimento de biomassa seca, as substâncias **08**, **12** e **13** inibiram o crescimento das plantas em aproximadamente 20%, a concentrações de 150  $\mu\text{M}$ , sendo assim classificadas como inibidoras do crescimento.

Assim pode-se concluir que os objetivos propostos foram alcançados com êxito. Os compostos que se mostraram promissores na inibição da fotossíntese, são considerados causadores de estresse em plantas inibindo o funcionamento perfeito do aparato fotossintético.

## **8.0 Referências Bibliográficas**

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

AGUILAR, M. I.; ROMERO, M. G.; CHÁVEZ, M. I.; KING-DÍAZ, B.; LOTINA-HENNSEN, B. "Biflavonoids isolated from *Selaginella lepidophylla* inhibit photosynthesis in spinach chloroplasts." *J. Agric. Food Chem.*, **56**: 6994, 2008.



AHSAN, M.; GRAY, A. I.; WATERMAN, P.G. "4-Quinolinone, 2-Quinolinone, 9-Acridone, and Furoquinoline Alkaloids from the aerial parts of *Boronia bowmanii*", *Journal of Natural Products*, **57**: 670, 1994.

ALBARICI, T. R. "*Estudo fitoquímico de Rauia sp e Conchocarpus macrophyllus (Rutaceae) e avaliação da atividade antiparasitária de extratos e substâncias isoladas*" São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2006. Tese de Doutorado, 190.

ANDREIADIS, E. S.; CHAVAROT-KERLIDOU, M.; FONTECAVE, M.; ARTERO, V. "Artificial Photosynthesis: From Molecular Catalysts for Light-driven Water Splitting to Photoelectrochemical Cells", *Photochemistry and Photobiology*, **87**: 946, 2011.

BRAGA, P. A. C. "*Fitoquímica quimiossistemática e busca de compostos de partida para novos fármacos: estudo de espécies do gênero Hortia (Rutaceae)*." São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química –UFSCar, 2005. Tese de Doutorado, 213p.

BURGA, L. N. "*Methyltransferases from Ruta graveolens L.: Molecular Biology and Biochemistry*". Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg, Boston-USA, 2005. Dissertação de Mestrado, 220p.

CABO T. J. "Pharmacognostic study of rue leaf ( *Ruta graveolens* ) its principle components; rutoside and essence." *Farmacognosia; anales del Instituto Jose Celestino Mutis*, **10**: 275, 1950.

CASTELO-BRANCO, P. A.; SANTOS, F. J. L. ; RUBINGER, M. M. M.; FERREIRA-ALVES, D. L.; PILÓ-VELOSO, D. ; KING-DÍAZ, B.; LOTINA-HENNSEN, B.. "Inhibition and uncoupling of photosynthetic electron transport by diterpene lactone amide derivatives." *Zeitschrift für Naturforschung*, **63c**: 251, 2008.

CHRISTOFFOLETI, P.; et al. “*Aspéctos de resistência de plantas daninhas a herbicidas*”, 3ª ed., Piracicaba, Associação Brasileira de Ação à Resistência de Plantas daninhas, 2008, 120p.

CLARK, A. J.; LANDOLT, W.; BUCHER, J. B.; STRASSER, R. J. “How wind affects the photosynthetic performance of trees: quantified with chlorophyll a fluorescence and open-top chambers”, *Photosynt.*, **38**:3, 349, 2000.

COBB, A. H. & KIRKWOOD, R. C. “In: Herbicides and Their Mechanisms of Action” (eds AH Cobb & RC Kirkwood), *Sheffield Academic Press*, Sheffield, UK. 2000, p. 24.

CRUCIANI, D. E.; BAPTISTA, G. C.; CHRISTOFFOLETI, P.J; MINAMI, K. “Comportamento de herbicida em solo de várzea com drenagem subterrânea”, *Sci. agric.*, **53**, 316, 1996.

DAS, HASI RANI; RAGHAV, SUNIL KUMAR; GUPTA, BHAWNA. “*Compound 3-(1, 1-dimethyl-allyl)-6-hydroxy-chromen-2-one and its pharmaceutically acceptable salts thereof*” Plantent, 2008, 21p.

DELGADO, G. C. “Expansão e modernização do setor agropecuário no pós-guerra: um estudo da reflexão agrária” *Estudos Avançados*, **15**: 157, 2011.

DEWICK, P. M., “*Medicinal Natural Products, A Biosynthetic Approach.*” 2ª Ed., *John Wiley & Sons Ltd*, 2002, 507 p.

FRANKART, C.; EULLAFFROY, P.; VERNET, G. “Comparative effects of four herbicides on non-photochemical fluorescence quenching in *Lemna minor*”, *Environmental and Experimental Botany*, **49**: 159, 2003.

GONÇALVES, J. F. C.; SILVA, C. E. M. ; GUIMARAES, D. G. ; BERNARDES, R. S. A. “ Análise dos transientes da fluorescência da clorofila a de plantas jovens de *Carapa guianensis* e de *Dipteryx odorata* submetidas a dois ambientes de luz” *Acta Amaz.*, **40**: 89, 2010.

GONZALEZ-IBARRA, M.; FARFÁN, N.; TREJO, C.; URIBE, S.; LOTINA-HENNSSEN, B. "Selective herbicides activity of 2,5-Di (benzylamine)-p-benzoquinone against the Monocot weed *Echinochloa crusgalli*. An in vivo analysis of photosynthesis and growth." *J. Agric. Food Chem.*, **53**: 3415, 2005.

GOVINDJEE, P "Chlorophyl a Fluorescência: A signature of Photosynthesis" in the press Papageorgiou and Govindjee eds, *Ed. Springer*, 2004, 785p.

HOLUB, O; SEUFFERHELD, M. J; GOHLKE, C.; GOVINDJEE; HEISS, G. J; CLEGG, R. M. "Fluorescence lifetime imaging microscopy of *Chlamydomonas reinhardtii*: non-photochemical quenching mutants and effect of photosynthetic inhibitors on the slow chlorophyll fluorescence transient" *Jour. Of Microsc.*, **226**: 90, 2007.

HONGWEI, Y.; BOGANG, L.; XIAOZHEN, C.; CHANGSONG, L.; GUOLIN, Z. "Chemical study on *Evodia vestita*", *Chin J. Appl Environ Biol*, **16**: 72, 2010.

KARP G. "*Biologia Celular e Molecular: conceitos e experimentos*", Manole, 3ed., São Paulo, 2005 .

KING-DÍAZ, B.; SANTOS, F. J. L. ; RUBINGER, M. M. M. ; PILÓ-VELOSO, D. ; LOTINA-HENNSSEN, B. "A diterpene  $\gamma$ -lactone derivative from *Pterodon polygalaeflorus* benth. As a photosystem II inhibitor and uncoupler of photosynthesis." *Zeitschrift für Naturforschung*, **61c**: 227, 2006.

KOSTOVA, I.; IVANOVA, A.; MIKHOVA, B.; KLAIBER, I. "Alkaloids na Coumarins from *Ruta graveolens*." *Monatshefte fur Chemie/Chemical Monthly*, **130**: 703, 1999.

KOZAWA, M.; et al "Über die cumarine der *Boenninghausenia japonica* (Sieb.) Nakai" *Chem. Pharm. Bull*, **22**: 2746, 1974.

KUMAR, V.; et al "2,7-dihydroxy-3-formyl-1-(3'-methyl-2'-butenyl)carbazole from *Clausena lansium*", *Phytochemistry*, **40**:1565, 1995.

KUDSK, P.; STREIBIG, J. C. "Herbicides –a two-edged sword" *Weed Research*, **43**: 90, 2003.

Kuzovkina, I.; Al'terman, I.; Schneider, B. "Specific accumulation and revised structures of acridone alkaloid glucosides in the tips of transformed roots of *Ruta graveolens*", *Phytochemistry*, **65**: 1095, 2004.

KRUGER, G. H. J., TSIMILLI-MICHAEL, M., STRASSER, R. J. "Light stress provokes plastic and elastic modifications in structure and function of photosystem II in camellia leaves", *Physiologia Plantarum*, **101**: 265, 1997.

LARBAT, R.; HEHN, A.; HANS, J.; SCHNEIDER, S.; JUGDE, H.; SCHNEIDER, B.; MATERN, U.; BOURGAUD, F. "Isolation and functional characterization of *CYP71AJ4* encoding for the first P450 monooxygenase of angular furanocoumarin biosynthesis." *The Journal of Biological Chemistry*, **284**: 8, 4776, 2009.

LAZÁR, D. "The polyphasic chlorophyll *a* fluorescence rise measured under high intensity of exciting light", *Functional Plant Biology*, **33**: 9, 2006.

LICHTENTHALER, H. K. "The Kautsky effect: 60 years of chlorophyll fluorescence induction kinetics.", *Photosynt.*, **27**: 45, 1992.

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

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." *Phys. Plant.*, **106**: 246, 1999.

MACIAS, M. L.; ROJAS, I. S.; MATA, R.; LOTINA-HENNSEN, B. "Effect of selected coumarins on spinach chloroplast photosynthesis", *J. Agric. Food Chem.*, **47**: 2137, 1999.

MAFEZOLI, J. “Atividade tripanocina e antimicrobiana de plantas da família Rutaceae”. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2002. Tese de Doutorado, 240 p.

MARCHI, G.; MARCHI, E. C. S. “Efeito alelopático de um híbrido de sorgo com capim-sudão em sementes de plantas daninhas” *IN: Congresso brasileiro da ciência das plantas daninhas, 26; Congresso de La asociación latinoamericana de malezas, 18, 2008*, Ouro Preto.

MASUDA, T.; TAKASUGI, M.; ANETAI, M. “Psoralen and other linear furanocoumarins as phytoalexins in *Glehnia littoralis*.” *Phytochem.*, **47**: 1, 13, 1998.

MEEPAGALA, K. M. et al. “Algicidal and antifungal compounds from the roots of *Ruta graveolens* and synthesis of their analogs”. *Phytochem.*, **66**: 2689, 2005.

MILLS, J. D.; MITCHELL, P.; SCHURMANN, P., *FEBS Lett.*, **191**: 144, 1980.

MURRAY, R. D. H.; JORGE, Z. D. “A simple method for differentiating between angular and linear 5- methoxyfuranocoumarins.” *Phytochem.*, **23**: 697, 1984.

NGADJUI, B. T.; et al. “Prenilated flavones and phenylpropanoid derivative from roots of *Dorstenia psilurus*”, *Phytochem.*, **48**:733, 1998.

OLIVA, A. et al. “Natural fungicides from *Ruta graveolens* L. leaves, including a new quinolone alkaloid.”, *J. Agric. And Food Chem.*,**51**: 890, 2003.

OLIVEIRA, F. M.; et al. “Alkaloids and coumarins from *Esembeckia species*”, *Phytochem.*, **41**: 647, 1996.

OLIVEIRA, L. C.; et al. “Fluorescência transiente da clorofila a (O-J-I-P) em orquídeas infectada por *Planococcus citris*”, *Anais do IX Congresso de ecologia do Brasil (SEB)*, São lourenço-MG, 2009.

ORLITA, ALEKSANDRA; et al., “Identification of *Ruta graveolens* L. metabolites accumulated in the presence of abiotic elicitors.” *Biotechnology progress* **24**: 1, 128, 2008.

OUKARROM, A.; STRASSER, R. J. "Phenotyping of dark and light adapted barley plants by the fast chlorophyll a fluorescence rise OJIP", *S. Afr J. Bot.*, **70**:277, 2004.

PAULINI, H., WAIBEL, R.; SCHIMMER, O. "Mutagenicity and structure-mutagenicity relationships of furoquinolines, naturally occurring alkaloids of the Rutaceae". *Mut. Res.*, **277**: 179, 1989.

PEÑA-VALDIVIA, C. B.; RODRIGUEZ-FLORES, L.; LOTINA-HENNSEN, B. "Inhibition of photophosphorylation and electron transport by N,N-dimethylformamide." *Biophys. Chem.*, **41**: 169, 1991.

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

PIRANI, J. R.; EL OTTRA, J. H. L.; MENEZES, N. L. "Morfoanatomia da flor de cinco espécies de *Galipea* Aubl. e seu significado na evolução de flores tubulosas entre as Rutaceae neotropicais", *Revista Brasil. Bot.*, **33**:301-318, 2010.

RAGHAV, S. K.; GUPTA, B.; AGRAWAL, C.; GOSWAMI, K.; DAS, H. R. "Anti-inflammatory effect of *Ruta graveolens* L. in murine macrophage cells" *J. of Ethnoph.*, **104**: 234, 2006.

REMBOLD, H. "*Azadirachtins*". IN: *Insecticides of plant origin*, ACS Symposium series 387. ARNASON, J. T.; PHILOGÉNE, B.; MORAND, P. (Eds.). Washington, ACS. p 150, 1989.

RICKERT, K. W., et al. „Mechanism of irreversible inhibition of O<sub>2</sub> evolution in thotosystem II by Tris (hydroxymethyl) aminomethane.", *Biochem.*, **30**: 7888, 1991.

ROBBS, C.F.; BITTENCOURT, A. M. "Controle Biológico de Insetos. Embrapa/ctaa", 1999 – biotecnologia ciência & desenvolvimento.

ROMAGNI, J. G.; NANAYAKKARA, N. P. D.; ROSELL, R.; DAYAN, F. E. In: REIGOSA, M. J.; PEDROL, N., "Allelopathy from Molecules to Ecosystems." *Enfield:Science, Publishers*, **316**: p. 113, 2002.

SANTOS, D. A. P. “Busca de metabólitos bioativos em plantas da família *Bignoniaceae* e *Rutaceae* contra parasitas causadores de doenças tropicais.” São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química UFSCar-2005. Tese de Doutorado, 234p.

SAYED, K. E.; et al. “New quinoline alkaloids from *Ruta chalepensis*”, *J. Nat. Prod.*, **63**:995, 2000.

Schanker, G.; Strasser, R. J. “Quantification of non-QB-reducing centers in leaves using a far-red pre-illumination” *Photosynth Res.*, **84**: 145, 2005.

SCHREIBER, U.; KUHL, M.; KLIMANT, I.; REISING, H. “Measurement of chlorophyll fluorescence within leaves using a modified PAM fluorometer with a fiber-optic microprobe”, *Photosynthesis Research*, **47**: 103, 1996.

SIMOTE, S. Y. “Estudo fitoquímico de *Helietta puberula* (*Rutaceae*), *Simarouba versicolor* (*Simaroubaceae*) e busca de um processo de microencapsulação de compostos ativos, visando o controle de formigas cortadeiras.” Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2006. Tese de Doutorado, 200 p.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. “Fundamental of analytical Chemistry”, 8 ed., *Thomson Brooks/Cole*, 2004.

SING, S.; DEBUS, R. J.; WYDRZYNSKI, T.; HILLIER, W. “Investigation of substrate water interactions at the high-affinity Mn site in the photosystem II oxygen-evolving complex” *Philos Trans R. Soc. Lond B Biol. Sci.*, **363**: 1229, 2008.

STRASSER, R. J. “The grouping model of plant photosynthesis.” In: Chloroplast Development eds., G. Akoyunoglou and J. H. Argyroudi-Akoyunoglou, *Elsevier/North-Holland Biomedical Press*, 1978, p. 513-524.

STRASSER, R. J.; GOVINDJEE. “The F<sub>0</sub> and the O-J-I-P fluorescence rise in higher plants and algae.” In: Regulation of Chloroplast Biogenesis, pp.423-426, J, H. argyroudi-Akoyunoglou. *Ed. Plenum Press*, NewYork, 1992.

STRASSER, R.J.; SRIVASTAVA, A.; GOVINDJEE. "Polyphasic chlorophyll a fluorescence transients in plants and cyanobacteria", *Photochem Photobiol*, **61**: 32, 1995.

STRASSER, R.J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; SRIVASTAVA, A. "Analysis of the Chlorophyll a fluorescence transient." In: Papageorgiou, C., Govindjee, (Eds.), *Chlorophyll Fluorescence: A Signature of Photosynthesis*. Springer, Netherlands, p. 321–362, **2004**.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*, 3a ed., Ed. Artmed, Porto Alegre, 719, **2009**.

THANH, P. N.; et al. "Citotoxic coumarins from the root of *Angelica dahurica*", *Arch Pharm. Res.*, **27**: 1211, 2004.

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

TORRES-ROMERO, D.; KING-DÍAZ, B.; STRASSER, R. J.; JIMÉNEZ, I. A.; LOTINA-HENNSEN, B.; BAZZOCCHI, I. L. "Friedelane triterpenes from *Celastrus vulcanicola* as Photosynthetic Inhibitors." *J. Agric. Food Chem.*, **58**: 10847, 2010.

TSIMILLI-MICHAEL, M.; STRASSER, R. J. "In vivo assessment of stress impact on plant's vitality: applications in detecting and evaluating the beneficial role of mycorrhization on host plants", In: Mycorrhiza: Genetics and Molecular Biology, Eco-fuction, Biotechnonology, Eco-physiology, and Struture and Systematic, Varma, A. 3 ed, *Springer*, Berlin, Germany, pp. 679-703, 2008.

TSIMILLI-MICHAEL, M., ET AL. "Synergistic an antagonistic effects of arbuscular mycorrhizal fungi and *Azospirillum* and *Rhizobium* nitrogen-fixers on the photosynthetic activity of alfalfa, probed by the polyphasic chlorophyll a fluorescence transient O-J-I-P", *App. Soil Eco.*, **15**:169, 2000.



VEIGA, T. A. M. et al. "Alkaloids isolated from *Hortia superba* (Rutaceae) interact with spinach thylakoids inhibiting the electron transport chain". *Allelopathy J.*, **21**: 133, 2008.

VEIGA, T. A. M., SILVA, S. C., ARCHUNDIA-CAMACHO, F., VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J.B.; RODRIGUES FO, E.; MULLER, M.W.; SILVA, M.F. DAS G.F DA; HENSENN, B. L. "Inhibition of Photophorylation and Electron Transport Chain inThylakoids 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. DAS G.F DA, DIAZ, B. K., HENSENN, B. L. "Siderin from *Toona cillliata* (Meliaceae) as water-splitting enzyme inhibitor on thylakoids"*Arc. Biochem. Biophys.*, **465**: 38, 2007b.

WAFFO, A. F. K.; et al. "Acridone and furoquinoline alkaloids from *Teclea gerrardii* (Rutaceae: Toddalioideae) of southern Africa." *Phytochemistry*, **68**: 663, 2007.

WATERMAN, P. G. "The Chemical Systematics of Alkaloids: A Review Emphasizing the Contribution of Robert Hegnauer." *Biochemical Systematics and Ecology*, **27**: 395, 1999.

WATERMAN, P. G., GRUNDON, M. F. "Chemistry and Chemical Taxonomy on the Rutales". *London, Academic Press*, p. 308-309, **1983**.

WU, T-S. ; FURUKAWA, H. "Acridone alkaloids VII. Constituents of *Citrus sinensis* Osbeck var. *brasiliensis* Tanaka. Isolation and characterization of three new acridone alkaloids, and a new coumarins." *Chem. Pharm. Bull.*, **31**: 901, 1993a.

WU, T-S. ; FURUKAWA, H. "Acridone alkaloids VI. The constituents of *Citrus depressa*. Isolation and structure elucidation of new acridone alkaloids from *Citrus genus*." *Chem. Pharm. Bull.*, **31**: 895,1993b.

YUSUF, M.A.; KUMAR, D.; RAJWANSHI, R.; STRASSER, R.J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; GOVINDJEE; SARIN, N.B. "Overexpression of  $\gamma$ -tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: Physiological and chlorophyll a fluorescence measurements", *Biochimica et Biophysica Acta*, **1797**: 1428, 2010.

Infopédia: Acessado em 19/11/2011.

"Herbicida." In Infopédia [Em linha]. Porto: Porto Editora, 2003-2011. Disponível: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Herbicida>

Pirani: Acessado em 10/02/2009.

Pirani, J.R., F. F. Begale, Silva F.G.. Rutaceae in Flora brasiliensis revisitada. <http://flora.cria.org.br>

Silva: Acessado em 23/08/2011. Por Silva, L. R.

<http://www.mundosustentavel.com.br/2011/06/control-de-agrotoxicos-no-brasil/>)

Spadotto: Acessado em 20/10/2008.

SPADOTTO, C.A. "*Uso de Herbicidas no Brasil*". Comitê de Meio Ambiente, Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas, 2002. [online] Disponível: <http://www.cnpma.embrapa.br/herbicidas/>

Acessado em 24/10/2011. Portal São Francisco.

(<http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/fotossintese/historico-da-fotossintese-3.php>)

Acessado em 18 setembro de 2009.

<[http://www.atpsynthase.info/images/ATP\\_synthesis1.jpg](http://www.atpsynthase.info/images/ATP_synthesis1.jpg)>.