



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

“ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Conchocarpus marginatus* (RUTACEAE), e
avaliação do potencial biológico dos compostos isolados”

Barbara Sayuri Bellete*

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do título
de MESTRE EM QUÍMICA, área de
concentração: QUÍMICA ORGANICA

Orientadora: Profa. Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva
*Bolsista Capes

SÃO CARLOS – SP

2009

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

B442ef

Bellete, Barbara Sayuri.

Estudo fitoquímico de *Conchocarpus marginatus* (Rutaceae), e avaliação do potencial biológico dos compostos isolados / Barbara Sayuri Bellete. -- São Carlos : UFSCar, 2013.
175 f.

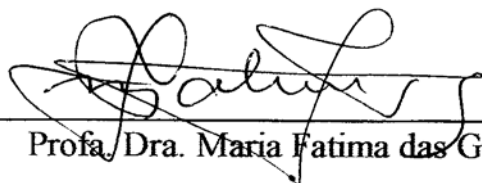
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

1. Química orgânica. 2. *Conchocarpus marginatus*. 3. Alcalóides acridônicos. 4. Fitoquímica. I. Título.

CDD: 363.12 (20ª)

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

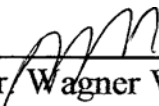
*Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de dissertação de mestrado da candidata **Barbara Sayuri Bellete**, realizada em 27 de março de 2009:*



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



Profa. Dra. Isabel Cristina Piloto Ferreira



Prof. Dr. Wagner Vilegas

Dedico este trabalho aos meus pais, que sempre me apoiaram e nunca mediram esforços para minha formação profissional e pessoal.

À toda minha família, por tanto amor, e por me fazerem tão feliz.

“O homem nasceu para aprender,
aprender tanto quanto a vida lhe permita”.

Guimarães Rosa

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva pela orientação, ensinamentos, confiança e amizade durante a realização deste trabalho;

Aos professores do Laboratório de Produtos Naturais da UFSCar, João Batista Fernandes, Paulo César Vieira e Edson Rodrigues Filho pelos ensinamentos, colaboração e amizade;

Aos demais professores do DQ-UFSCar pela contribuição na minha formação;

Aos alunos do Laboratório de Produtos Naturais Cristiane Cazal e Thiago Veiga, pela contribuição na realização dos ensaios biológicos;

Aos meus amigos do Laboratório de Produtos Naturais da UFSCar, pela amizade, apoio, troca de experiências e maravilhoso convívio;

A todos os colegas do DQ-UFSCar pelo companheirismo;

Ao corpo técnico do Departamento de Química da UFSCar pelo apoio e serviços prestados durante a execução do trabalho;

Às demais pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho;

À CAPES pela bolsa concedida;

Muito Obrigada

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

Δ	Deslocamento químico em partes por milhão
Λ	Comprimento de onda
J	Constante de acoplamento
m/z	Relação massa/carga
AcOEt	Acetato de Etila
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
$CDCl_3$	Clorofórmio Deuterado
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CH_2Cl_2	Diclorometano
Chl <i>a</i>	Clorofila <i>a</i>
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
COSY	<i>Correlated spectroscopy</i>
<i>d</i>	Dubleto
DCMU	3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetiluréia)
<i>dd</i>	Duplo-dubleto
<i>ddd</i>	Duplo-duplo-dubleto
<i>dl</i>	Dubleto largo
DMSO	Dimetil sulfóxido
<i>dt</i>	Duplo-triplete
eV	Elétron volt
FS I	Fotossistema I
FS II	Fotossistema 2
GI ₅₀ –	Grau de inibição
gNOESY	<i>Gradiente Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
Hex	Hexano
HMBC	<i>Heteronuclear multiple quantum correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear single quantum correlation</i>

Hz	Hertz
IE	Impacto eletrônico
<i>m</i>	Multiplete
MeOH	Metanol
MHz	Mega hertz
OMe	Metoxila
P ₆₈₀	Centro de reação do fotossistema II
P ₇₀₀	Centro de reação do fotossistema I
Q _a	Plastoquinona A
Q _b	Plastoquinona B
Q _b H ₂	plastoidroquinona
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
<i>s</i>	Singleto
TMS	Tetrametil-silano
UV	Ultravioleta

Lista de Figuras

FIGURA 1.1 – Substâncias isoladas de <i>Conchocarpus gaudichaudianus</i> subsp. <i>Bahiensis</i> (CORTEZ, 2002).	8
FIGURA 1.2 – Substâncias isoladas de <i>Conchocarpus heterophyllus</i> (AMBROZIM, 2008).	9
FIGURA 1.3 – Substâncias isoladas de <i>Conchocarpus inopinatus</i> (MAFEZOLI, 2001).	10
FIGURA 1.4 – Substâncias isoladas de <i>Conchocarpus longifolius</i> (MAFEZOLI, 2001).	11
FIGURA 1.6 – Imagem das flores (à esquerda) e das folhas (à direita) de <i>Conchocarpus marginatus</i> (Imagens cedidas pelo Professor José Rubens Pirani).	12
FIGURA 4.1 – Cromatograma da fração 2632FD 62-67, usando MeOH:CH ₂ Cl ₂ (7:3) para purificação da substância 6.	37
FIGURA 4.2 – Cromatograma da fração 2632FD68-75, utilizando H ₂ O:Acetonitrila (65:35) para separação dos alcalóides 4, 5, 7 e 8.	39
FIGURA 5.1 - Estrutura dos esteróides Sitosterol (1), Estigmasterol (2) e Campesterol (3).	44
FIGURA 5.2 – Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200MHz) da mistura dos esteróides 1, 2 e 3.	45
FIGURA 5.3 – Espectro de massas do sitosterol (A); estigmasterol (B) e campesterol (C) (IE = 70 eV).	46
FIGURA 5.5 – Estrutura química do alcaloide 1,2,3,6-tetrametoxi-10-metilacridona (substância 4).	49
FIGURA 5.6 – (A) Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) da substância 4; (B) espectro expandido na região dos H aromáticos (à esquerda) e na região das metoxilas (à direita);	52

FIGURA 5.7 – Mapa de contorno de COSY da substância 4, CDCl ₃	53
FIGURA 5.8 – Acoplamentos para os hidrogênios do anel A da substância 4. ...	53
FIGURA 5.9 - Espectro de RMN ¹³ C da substância 4 (CDCl ₃ , 100 MHz).	54
FIGURA 5.10 – Mapa de contorno HSQC da substância 4, CDCl ₃	54
FIGURA 5.11 – Mapa de contorno HMBC da substância 4, CDCl ₃	55
FIGURA 5.12 – Experimento de gNOESY para a substância 4.	55
FIGURA 5.13 - -Espectro de massa (IE = 70 eV) da substância 4.	56
FIGURA 5.14 – Comparação da substância 4 isolada com o alcalóide metilarborinina descrito na literatura.	57
FIGURA 5.15 – Estrutura química do alcalóide 1-hidroxi-2,3,6-trimetoxi-N-metilacridona (substância 5).....	58
FIGURA 5.16 - Espectro de RMN ¹ H da substância 5 (400MHz, CDCl ₃); (B) espectro expandido na região dos H aromáticos (à esquerda) e região das metoxilas (à direita);	61
FIGURA 5.17 – Acoplamentos para os hidrogênios do anel A da substância 5.	61
FIGURA 5.18 - Espectro de RMN ¹³ C da substância 5 (CDCl ₃ , 100MHz).	62
FIGURA 5.19 – Mapa de contorno de HSQC (CDCl ₃ 400 MHz) da substância 5.	62
FIGURA 5.20- Mapa de contorno de HMBC (CDCl ₃ , 400 MHz) da substância 5.	63
FIGURA 5.21 - Espectro de massas (IE = 70 eV) do alcalóide 1-hidroxi-2,3,6-trimetoxi-N-metilacridona (substância 5).	63
FIGURA 5.22 – Comparação da substância 5 isolada com o alcalóide arborinina descrito na literatura.	65
FIGURA 5.23 - Estrutura do alcalóide 1-hidroxi-3-metoxi-N-metil acridona (Substância 6).....	66
FIGURA 5.24 - (A) Espectro de RMN ¹ H da substância 6(CDCl ₃ , 400 MHz); (B) expansão na região dos hidrogênios aromáticos;	68
FIGURA 5.25 - Mapa de contorno de COSY da substância 6 (CDCl ₃ , 400 MHz).	69

FIGURA 5.26 – Acoplamentos para os hidrogênios do anel A da substância 6.	69
FIGURA 5.27 - Espectro de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 100 MHz) da substância 6	70
FIGURA 5.28 - Espectro de HSQC da substância 6 (CDCl ₃ , 400 MHz).	70
FIGURA 5.29- Mapa de contorno de HMBC da substância 6 (CDCl ₃ , 400 MHz).	71
FIGURA 5.30 – Espectro de massas da substância 6 (IE = 70 eV).	71
FIGURA 5.31 - Estrutura do alcalóide 1-hidroxi-2,3-dimetoxi-N-metil acridona (substância 7).....	74
FIGURA 5.32 – (A) Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) da substância 7 em mistura com substância 5;	76
FIGURA 5.32 (continuação) - (B) expansão do espectro na região dos hidrogênios aromáticos.....	77
FIGURA 5.33 - Mapa de contorno de COSY (CDCl ₃ , 400 MHz) da substância 7 com a substância 5.	77
FIGURA 5.34 – Acoplamentos para os hidrogênios do anel A da substância 7.	78
FIGURA 5.35 - Mapa de contorno de HSQC (CDCl ₃ , 400 MHz) da substância 7 com a substância 5.	78
FIGURA 5.36 - Mapa de contorno de HMBC da arborinina (substância 7).....	79
FIGURA 5.37 – Espectro de massas da arborinina (substância 7) (IE = 70 eV).	79
FIGURA 5.38 - Estrutura do alcaloide 1,2,3-tri-metoxi-N-metil acridona (substância 8).....	84
FIGURA 5.39 – (A) Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) da substância 8 (metilarborinina) com substância 4.....	84
FIGURA 5.39 (continuação) – (B) expansão do espectro na região dos hidrogênios aromáticos (acima) e na região das metoxilas (abaixo).....	85
FIGURA 5.40 – Acoplamentos para os hidrogênios do anel A da substância 8.	85
FIGURA 5.41 – Mapa de contorno de HSQC da substância 8 (metilarborinina) com 4 (acima) e expansão na região das metoxilas (abaixo).	86

FIGURA 5.42 – Mapa de contorno de HMBC da substância 8 (metilarborinina) com substância 4.....	87
FIGURA 5.43 – (A) Cromatograma da fração 2632CD 68-75; (B) espectro de massas (IE = 70 eV) da substância 8.....	88
FIGURA 5.44 – Estrutura química do alcalóide 1-hidroxi-2,3,6-trimetoxiacridona (substância 9).	91
FIGURA 5.45 – (A) Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) do alcalóide 1-hidroxi-2,3,6-trimetoxiacridona (substância 9); (B) Expansão na região das metoxilas (à esquerda) e H aromáticos (à direita) (CDCl ₃ , 400 MHz).....	94
FIGURA 5.46 – Acoplamentos para os hidrogênios do anel A da substância 9.	95
FIGURA 5.47 – Mapa de contorno de HSQC (CDCl ₃ , 400 MHz) da substância 9.	95
FIGURA 5.48 - Mapa de contorno de HMBC (CDCl ₃ , 400 MHz) da substância 9	96
FIGURA 5.49 - Espectro de massas (IE = 70 eV) da substância 9.....	96
FIGURA 5.50 - Estrutura química do alcalóide 1-hidroxi-3,6-dimetoxi-N metilacridona (substância 10).	99
FIGURA 5.51 - Espectro de RMN ¹ H da substância 10 (CDCl ₃ , 400MHz); (B) Expansão na região dos H aromáticos (à esquerda) e na região das metoxilas (à direita).....	102
FIGURA 5.52 - Mapa de contorno de COSY da substância 10 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	103
FIGURA 5.53 – Acoplamentos para os hidrogênios do anel A da substância 10.	103
FIGURA 5.54 – Mapa de contorno de HSQC da substância 10 (CDCl ₃ , 400 MHz) em (A) região dos H aromáticos; (B) região de metilas ligadas a heteroátomos.....	104
FIGURA 5.55 – Mapa de contorno de HMBC da substância 10 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	105

FIGURA 5.56 - (A) Cromatograma das substâncias 6 e 10 em mistura (pico 1, substância 6; pico 2, substância 10; (B) Espectro de massas (IE = 70 eV) da substância 10; (C) e da substância 6.....	106
FIGURA 5.57 – Estrutura química do alcalóide 2-fenil-1-metil-quinolin-4-ona (Substância 11).....	109
FIGURA 5.64 – Estrutura química do alcalóide 2-fenil-1-metil-7-metoxi-4-quinolona (substância 12).	111
FIGURA 5.58 – (A) Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) das substância 9, 11 e 12; (B) Expansão na região dos H aromáticos (CDCl ₃ , 400 MHz); (C) Expansão na região das metoxilas (CDCl ₃ , 400 MHz).....	113
FIGURA 5.59 - Mapa de contorno de COSY das substâncias 9, 11 e 12. (CDCl ₃ , 400 MHz).	114
FIGURA 5.60 – Acoplamentos para os hidrogênios do anel A da substância 11. (A) e substância 12 (B).	114
FIGURA 5.61 – Mapa de contorno de HSQC das substâncias 9, 11 e 12 (CDCl ₃ , 400 MHz).	115
FIGURA 5.62 - Mapa de contorno de HMBC das substâncias 9, 11 e 12 (CDCl ₃ , 400 MHz).	115
FIGURA 5.63 – (A) Cromatograma da fração 2632CDM 13-18; (B) Espectro de massa (IE = 70 eV) da substância 11; (C) Espectro de massa (IE = 70 eV) da substância 12 (IE = 70 eV).....	116

Capítulo II: Avaliação do potencial biológico dos compostos isolados

FIGURA 1.1 – Estrutura química do herbicida comercial (3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetiluréia).	135
FIGURA 1.2 – Os cloroplastos e suas organelas, destacando os tilacóides.....	136

FIGURA 1.3 –Imagem representando o transporte de elétrons no fotossistema II. (TAIZ, 2004)	136
FIGURA 1.4 –Transporte de elétrons entre os quatro grandes complexos protéicos (FSII, FSI, o complexo citocromo <i>b6f</i> e o complexo protéico ATP sintase) dos tilacóides de plantas superiores (TAIZ, 2004).....	137
FIGURA 1.5 – Estutura química da Acronicina.	140
FIGURA 3.1 – Meios de cultura utilizados no ensaio de fluorescência da Clorofila <i>a</i> (Chl <i>a</i>).....	148
FIGURA 3.2 – Estrutura química da substância Doxorubicina (esquerda) e Daunorubicina (direita).....	150
FIGURA 3.3– Disposição das diferentes linhas celulares inoculadas em placas.	152
FIGURA 3.4 – Disposição das diferentes concentrações para cada composto testado.	153
FIGURA 4.1 - Aumento cinético da fluorescência em cloroplastos frescos e lisos infiltrados com 5 diferentes alcalóides, DCMU e tilacóides tratados com Tris. Os controles dos cloroplastos são mostrados para comparação. Curvas de indução de fluorescência (Chl <i>a</i>) foram medidas a temperatura ambiente. Os dados são médias de três repetições.	158
FIGURA 4.2 - curva dose-resposta para o alcalóide 1,2,3,6-tetrametoxi-10-metilacridona (substância 4).....	162
FIGURA 4.3 - Curva dose-resposta para o alcalóide 1-hidroxi-2,3,6-trimetoxi-10-metilacridona (substância 5).	162
FIGURA 4.4 - curva dose-resposta para o alcalóide 1-hidroxi-3-metoxi-N-metil acridona (substância 6).....	163
FIGURA 4.5 - curva dose-resposta para o alcalóide 1,2,3-trimetoxi-N-metil acridona (metilarborinina) (substância 8).	163

LISTAS DE FLUXOGRAMAS

Capítulo I: Estudo Fitoquímico de *Conchocarpus marginatus*

FLUXOGRAMA 4.1 - Preparação dos extratos hexânicos, diclorometânicos e metanólicos a partir do caule e folhas de <i>Conchocarpus marginatus</i>	29
FLUXOGRAMA 4.2 - Fracionamento do extrato diclorometânico do caule de <i>C. marginatus</i>	30
FLUXOGRAMA 4.3 - Fracionamento do extrato metanólico do caule de <i>Conchocarpus marginatus</i>	31
FLUXOGRAMA 4.4 - Fracionamento do extrato diclorometanólico das folhas de <i>Conchocarpus marginatus</i>	32
FLUXOGRAMA 4.5 - Fracionamento do extrato metanólico das folhas de <i>Conchocarpus marginatus</i>	33
FLUXOGRAMA 4.6 – Fracionamento da fração de acetato de etila do extrato diclorometânico do caule de <i>Conchocarpus marginatus</i>	35
FLUXOGRAMA 4.7 – Fracionamento da fração metanólica do extrato diclorometânico dos caules de <i>Conchocarpus marginatus</i>	36

LISTA DE ESQUEMAS

Capítulo I: Estudo Fitoquímico de *Conchocarpus marginatus*

ESQUEMA 5.1 – Rota biossintética para os alcalóides quinolínicos e acridônicos.....	48
--------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE TABELAS

Capítulo I: Estudo Fitoquímico de *Conchocarpus marginatus*

TABELA 4.1 – Massas dos extratos de <i>Conchocarpus marginatus</i>	29
TABELA 5.1 – Correlação entre os sinais de hidrogênio das metoxilas com os carbonos da metoxila e carbonos do anel aromático.....	51
TABELA 5.2 - Dados de RMN ^1H para a substância 4 e comparação com a metilarborinina (8).....	56
TABELA 5.3 - Dados de RMN ^{13}C para a substância 4 e comparação com a metilarborinina (8).....	57
TABELA 5.4 - Dados de RMN ^1H para a substância 5 e comparação com a arborinina (7).....	64
TABELA 5.5 - Dados de RMN ^{13}C para a substância 5 isolada e comparação com a arborinina (7).....	65
TABELA 5.6 - Dados de RMN ^1H para substância 6 e comparação com a literatura.....	72
TABELA 5.7 - Ddados de RMN ^{13}C para substância 6 e comparação com a literatura.....	73
TABELA 5.8 - Dados de RMN ^1H para a substância 7 e comparação com a literatura.....	80
TABELA 5.9 - Dados de RMN ^{13}C para a substância 7 e comparação com a literatura.....	81
TABELA 5.10 - Dados de RMN ^1H para a substância 8 e comparação com a literatura.....	89
TABELA 5.11 - Dados de RMN ^{13}C (δ) para a substância 8 e comparação com a literatura.....	90
TABELA 5.12 - Dados de RMN ^1H para a substância 9 e comparação com 5..	97

TABELA 5.13 - Dados de RMN ¹³ C para a substância 9 e comparação com a substância 5	98
TABELA 5.14 - Dados de RMN ¹ H para a substância 10 e comparação com 6	107
TABELA 5.15 - Dados de RMN ¹³ C para 10 e comparação com 6	108
TABELA 5.16 - Dados de RMN ¹ H para a substância 11 e comparação com a literatura.....	117
TABELA 5.17 - Dados de RMN ¹³ C para a substância 11 e comparação com a literatura.....	118
TABELA 5.18 - Dados de RMN ¹ H e ¹³ C para a substância 12	119

Capítulo II : Avaliação do potencial biológico dos compostos ensaiados

TABELA 3.1 – Preparação do meio de cultura RPMI completo.....	156
TABELA 4.1 – Substâncias testadas no ensaio de inibição da fotossíntese (FIGURA 3.2).....	159
TABELA 4.2 - Efeito dos alcalóides acridônicos sobre os parâmetros da fluorescência em tilacóides previamente incubados no escuro por 5 minutos e com Tris 0,8 M, em pH 8,0.....	160
TABELA 4.3 - Valor de GI ₅₀ para as linhas celulares testadas MCF-7 (adenocarcinoma da mama), NCI-460 (câncer de pulmão) e A375-C5 (cancro de melanoma).....	164

RESUMO

ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Conchocarpus marginatus* (RUTACEAE), e avaliação do potencial biológico dos compostos isolados – A espécie *Conchocarpus marginatus* é nativa do Espírito Santo. Esta planta, que foi reclassificada em 1998 por PIRANI e KALLUNKI, ainda não apresenta dados químicos ou biológicos na literatura. Desta forma, o estudo fitoquímico de *Conchocarpus marginatus* descrito neste trabalho, visa contribuir com a quimiosistemática da família Rutaceae e também com a melhor classificação do gênero dentro da mesma. O estudo desta espécie levou ao isolamento e identificação de 12 substâncias, onde foram encontrados principalmente alcalóides derivados do ácido antranílico, sendo estes o 2-fenil-1-metil-quinolin-4-ona (**11**), 2-fenil-1-metil-7-metoxi-quinolin-4-ona (**12**), 1-hidroxi-3-metoxi-N-metilacridona (**6**), Arborinina (**7**), Metil-arborinina (**8**), 1-hidroxi-3,6-dimetoxi-N-metilacridona (**10**), 1,2,3,6-tetrametoxi-acridona (**9**), 1,2,3,6-tetrametoxi-N-metilacridona (**4**) e 1-hidroxi-2,3,6-trimetoxi-N-metilacridona (**5**). Destes, os quatro últimos alcalóides acridônicos citados são estruturas novas.

Dois diferentes ensaios biológicos foram realizados com alguns dos compostos isolados. Com o objetivo de se encontrar modelos para novos herbicidas inibidores da fotossíntese, foram realizados ensaios *in vitro* de inibição da fotossíntese, em cloroplastos isolados das folhas de espinafre, através do estudo de fluorescência da Clorofila a (Chl a). As substâncias isoladas de *Conchocarpus marginatus* testadas frente a este ensaio se mostraram todas ativas, sendo a substância **9** a que se apresentou potencialmente mais ativa nas medidas de fluorescência Chl a. Esse resultado indica que esta causaria dano ao complexo OEC e um de seus sítios de ação está localizado sobre o FSII, prendendo-se ao ambiente de Q_A. Nos ensaios citotóxicos, a substância **6** se apresentou como a mais promissora contra as células cancerígenas MCF-7 (adenocarcinoma da mama), NCI-460 (câncer de pulmão) e A375-C5 (cancro de melanoma), apresentando valores de GI₅₀ de 25, 20 e 22 µM, respectivamente.

ABSTRACT

Phytochemical study of *Conchocarpus marginatus* (RUTACEAE), and evaluation of biological potential from isolated compounds – The specie *Conchocarpus marginatus* is native from Espírito Santo. This plant, that was recently reclassified by PIRANI e KALLUNKI, does not show chemical or biological data in literature yet. In this way, the phytochemical study of *Co. marginatus* described in this work, aim to contributed to chemosystematic of Rutaceae family, and a better classification of this genus in the family.

The study allowed the isolation and identification of 12 substances, and were found mainly alkaloids derived from antranilic acid. They are: 2-phenyl-1-methyl-quinolin-4-one (**11**), 2-phenyl-1-methyl-7-methoxy-quinolin-4-one (**12**), 1-hydroxy-3-methoxy-N-metilacridone (**6**), Arborinine (**7**), Methyl-arborinine (**8**), 1-hydroxy-3,6-dimethoxy-N-metilacridone (**10**), 1,2,3,6-tetramethoxy-acridone (**9**), 1,2,3,6-tetramethoxy-N-metilacridone (**4**) e 1-hydroxy-2,3,6-trimethoxy-N-metilacridone (**5**). The last four substances are new structures.

Two different biological assays were performed with some isolated compounds. Assays *in vitro* of chlorophyll inhibition were performed in chloroplasts isolated from spinach leaves, aiming to found models to new photosynthesis inhibitor herbicides, by study of Chl a fluorescence.

Substances isolated from *Co. marginatus* analysed in this assay were active, and the substance 9 was the most active in Chl a fluorescence measures. This result indicates that this molecule could damage the OEC complex and one of his action site is located in FSII, binding to Q_a environment.

In cytotoxic assays, the substance 6 is the more promising molecule against cancerígenas MCF-7 (breast adenocarcinoma), NCI-460 (non-small cell lung cancer) and A375-C5 (melanoma) cancer cells, showing respectively GJ50 values of 25, 20 e 22 μ M.

SUMÁRIO

Capítulo I : Estudo fitoquímico de *Conchocarpus marginatus*

1 – Introdução	3
1.1 – Produtos Naturais na Descoberta de Novos Fármacos	5
1.2 - A família Rutacea	6
1.3 – O gênero <i>Conchocarpus</i>	7
1.4 - Seleção do Vegetal	12
2 – Objetivos	15
3 – Substâncias Isoladas	19
4 – Experimental	25
4.1 - Procedimento Experimental	25
4.2 - Materiais e Métodos	25
4.2.1 - Métodos Cromatográficos e suportes	25
4.2.2 – Solventes	26
4.2.3 – Reveladores	26
4.2.4 – Detectores	26
4.3 – Equipamentos	26
4.3.1 - Evaporadores Rotativos	26
4.3.2 - Balança Analítica	27
4.3.3 - Câmara de UV	27
4.3.4 - Equipamento de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	27
4.3.5 – Equipamento de Espectrômetria de Massa	27
4.3.6 - Equipamentos de Ressonância Magnética Nuclear	24
4.4 – Coleta e Identificação do Material Botânico	28
4.5 – Preparação dos Extratos Vegetais	28
4.6 - Fracionamento dos Extratos	30

4.6.1 – Fracionamento do extrato diclorometânico do caule de <i>Conchocarpus marginatus</i> (2632CD)	30
4.6.2 – Fracionamento do extrato metanólico do caule de <i>Conchocarpus marginatus</i> (2632CM)	31
4.6.3 – Fracionamento do extrato diclorometânico das folhas de <i>Conchocarpus marginatus</i> (2632FD)	32
4.6.4 – Fracionamento do extrato metanólico das folhas de <i>Conchocarpus marginatus</i> (2632FM)	33
4.7 - Isolamento dos Constituintes de <i>Conchocarpus marginatus</i>	34
4.7.1 - Estudo da fração 2632CDD	34
4.7.2 - Estudo da fração 2632CDAc	34
4.7.3 - Estudo da fração 2632CDM	35
4.7.4 - Estudo da fração 2632CM 9-12	37
4.7.5 – Estudo da fração 2632FD 62-67	37
4.7.6 – Estudo da fração 2632FD 68-69	38
4.7.7 – Estudo da fração 2632FM 70-75	38
4.7.8 – Estudo da fração 2632FM 16-20	39
4.7.9 – Estudo da fração 2632FM 21-22	39
4.7.10 - Estudo da fração 2632FM 25-26	40
4.7.11 - Estudo da fração 2632FM 28	40
5 - Detreminação Estrutural	43
5.1 – Esteróides	43
5.1.1 – Determinação das Substâncias 1, 2 e 3	43
5.2 – Alcalóides	47
5.2.1 - Biossíntese dos alcalóides	47
5.2.2 – Determinação da Substância 4	49
5.2.3 – Determinação da Substância 5	58
5.2.4 – Determinação da Substância 6	66
5.2.5 – Determinação da Substância 7	74

5.2.6 – Determinação da Substância 8	82
5.2.7 – Determinação da Substância 9	91
5.2.8 – Determinação da Substância 10	99
5.2.9 – Determinação da Substância 11 e 12	109
6. Conclusões	123
7. Referências Bibliográficas	127

Capítulo II : Avaliação do potencial biológico dos compostos ensaiados

1- Introdução	133
1.1 – Plantas Daninhas	133
1.1.1 – Métodos de Controle de Plantas Daninhas	134
1.1.2 – Cadeia de Transporte de elétrons	135
1.1.3 - Herbicidas Inibidores da Fotossíntese em Estudo pelo Grupo de Produtos Naturais da UFSCar	137
1.2 – O Câncer	138
1.2.1 – Tipo de Câncer	138
1.2.2 – Causas do Câncer	139
1.2.3 – Importância dos Produtos Naturais no Tratamento	139
2- Objetivos	143
3 – Experimental	147
3.1 - Procedimento Experimental para ensaios da inibição da fotossíntese	147
31.1 - Estudos de fluorescência da Clorofila a (Chl <i>a</i>)	147
3.2 – Procedimento Experimental para ensaios Antitumorais	149
3.2.1 – O teste SRB	149
3.2.1.1 - Preparação do meio completo (RPMI completo)	151
3.2.1.2 - Fixação das placas	151

3.2.1.3 - Coração das placas	151
3.2.1.4 - Solubilização das placas e leitura	152
4 – Resultados e Discussões	157
4.1 - Resultados dos ensaios de fluorescência da Chl <i>a</i>	157
4.2 – Resultados dos ensaios antitumorais	162
5 – Conclusões	169
6 – Referências Bibliográficas	173

APRESENTAÇÃO

O projeto de mestrado envolveu diferentes assuntos e, como consequência disso, a dissertação encontra-se dividida em 2 capítulos. O Capítulo I descreve o estudo fitoquímico da planta *Conchocarpus marginatus*. Este aborda principalmente os estudos químicos de isolamento e identificação dos metabólitos secundários da espécie estudada. No Capítulo II encontram-se os estudos de avaliação do potencial biológico dos compostos isolados. Neste são discutidos os ensaios de inibição da fotossíntese, por meio dos estudos de fluorescência da Clorofila a (Chl *a*), e também ensaios antitumorais, analisados por meio do teste SRB.

Capítulo I

“Estudo fitoquímico de *Conchocarpus marginatus*”

1 - Introdução

1 – Introdução

1.1 - Os produtos naturais na descoberta de novos fármacos

O homem vem utilizando vários produtos de origem natural para o tratamento de doenças e conservação da saúde há séculos. As fontes naturais (plantas, organismos marinhos, microrganismos) produzem o maior arsenal de diversidade estrutural em substâncias químicas, portanto possuem um grande potencial biológico (PETSKO, 1996).

A existência de inúmeros antibióticos, agentes cardioativos, antiespasmódicos, corticóides, anticoncepcionais, substâncias corantes, aromatizantes e edulcorantes são exemplos de aplicações tecnológicas derivadas da pesquisa em produtos naturais (BRAZ FILHO, 1994).

O Brasil é o país que possui o maior número de espécies de angiospermas (plantas com flores) no planeta (MITTERMEIER, 1992). Existem aproximadamente 250.000 espécies de plantas superiores na Terra e cerca de apenas 10% foram estudadas do ponto de vista químico (BRAZ FILHO, 1994). Isto mostra que muitas substâncias bioativas ainda podem ser isoladas de plantas.

Os produtos naturais desempenham quatro papéis na medicina moderna (ROBBERS, 1996):

- Fornecem um grande número de fármacos úteis, para as quais a síntese comercial é difícil ou inviável;
- Podem servir de compostos básicos que são modificados para aumentar a atividade ou diminuir a toxicidade;
- Servem como protótipos ou modelos para fármacos sintéticos que possuem atividades fisiológicas similares às originais;
- Alguns produtos naturais sem atividade podem ser modificados por métodos químicos ou biológicos para a produção de fármacos potentes, que não são obtidos facilmente por outros métodos.

Nos últimos anos houve um ressurgimento do interesse na investigação de produtos naturais para identificação de novas substâncias ativas

como compostos de partida para o desenvolvimento de fármacos (CRAGG, 1997).

Dessa maneira, o estudo fitoquímico de plantas justifica-se pela importância que assume na descoberta de várias substâncias, principalmente aquelas com propriedades biológicas, com aplicações na medicina, agricultura e outras áreas. Além disso, o estudo fitoquímico também fornece vários dados para que as plantas sejam agrupadas, de tal modo que sua similaridade de composição química, em conjunto com outros dados, forneça uma classificação adequada para os mais diversos tipos de plantas existentes.

1.2 - A família Rutaceae

A família Rutaceae tem despertado grande interesse entre os fitoquímicos, por apresentar gêneros que contêm plantas cujo perfil químico é muito importante, tanto do ponto de vista químico, produzindo substâncias de grande complexidade estrutural, quanto do ponto de vista da sua atividade biológica, principalmente contra insetos (REMBOLD, 1989).

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, 1982).

Esta família é subdividida em 7 sub-famílias, 10 tribos e 25 sub-tribos.

Do ponto de vista químico, a família Rutaceae possui uma grande diversidade metabólitos secundários, como alcalóides, principalmente os derivados do ácido antranílico e do triptofano, além de cumarinas, lignanas, limonóides, flavonóides e terpenóides (WATERMAN, 1975). Muitos desses metabólitos possuem variadas atividades biológicas, de grande importância farmacológica, despertando o interesse na investigação fitoquímica desta família (WATERMAN & GRUNDON, 1983)

1.3 - O gênero *Conchocarpus*

O gênero *Conchocarpus* (Rutaceae) é constituído por 49 espécies, predominantemente encontradas em regiões neotropicais. Este gênero foi revisto por PIRANI e KALLUNKI, que reclassificaram algumas espécies do gênero *Angostura* no gênero *Conchocarpus* (KALLUNKI & PIRANI, 1998).

Pouco se conhece sobre o gênero, pois apesar de grande foi muito pouco estudado. Dessa maneira, o grupo de Produtos Naturais da UFSCar tem estudado algumas de suas espécies, na qual foram isoladas e identificadas um grande número de compostos, com as mais diversas atividades biológicas, indicando que novos estudos utilizando plantas desse gênero devem ser realizados.

O estudo fitoquímico do caule e folhas de *Conchocarpus gaudichaudianus* subsp. *Bahiensis* levou ao isolamento de diferentes classes de alcalóides (**1** ao **4**, indolopiridoquinzolínicos; **8** ao **9**, 2-quinolônicos) e amidas (**5** ao **7**) (FIGURA 1.1). Extratos das folhas e algumas substâncias puras apresentaram diversas atividades biológicas, dentre as quais se destacam a atividade antifúngica para *Aspergillus Níger*, antibacteriana para *Bacillus subtilis*, antiinflamatória e leishmanicida. (CORTEZ, 2002).

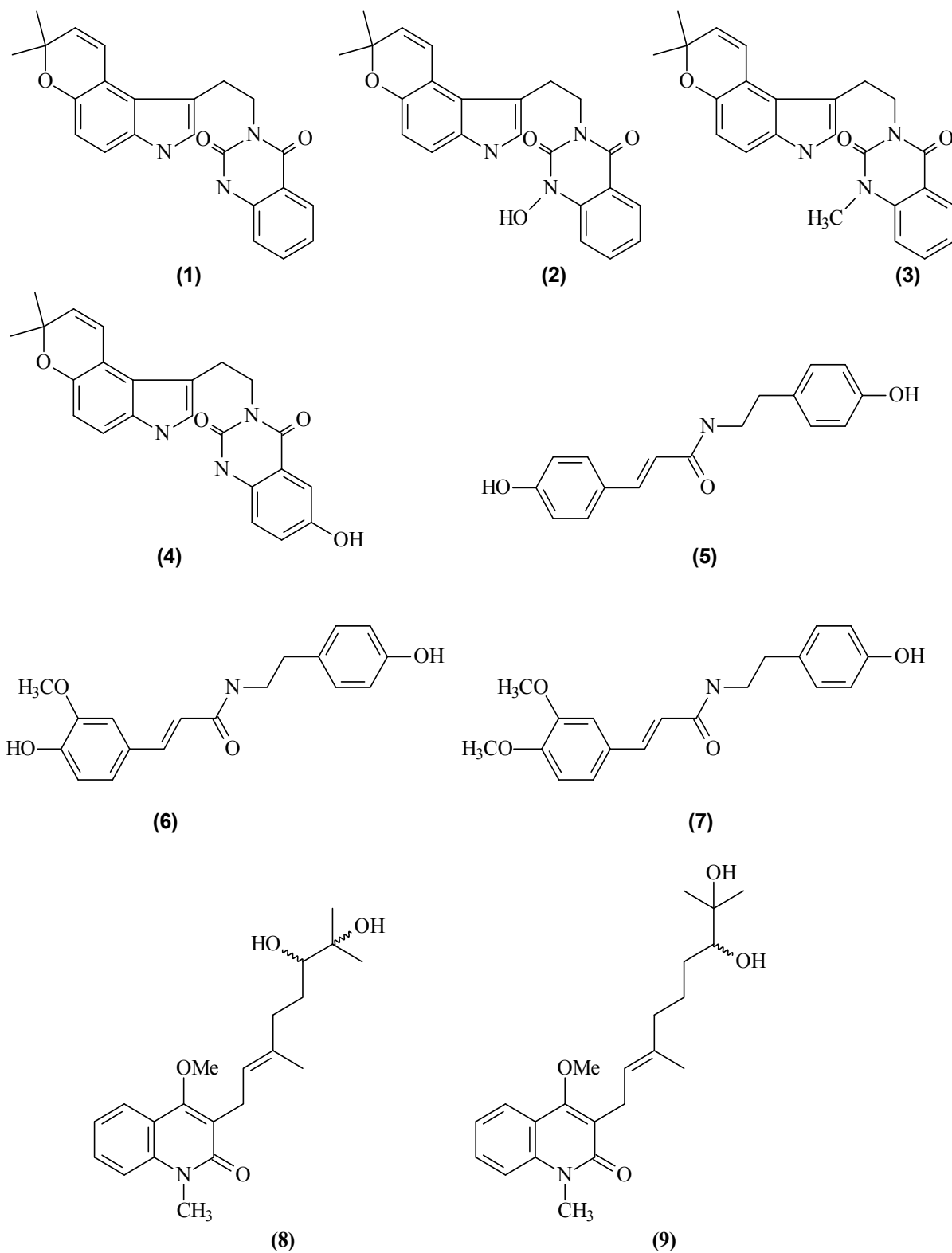


FIGURA 1.1 – Substâncias isoladas de *Conchocarpus gaudichaudianus* subsp. *Bahiensis* (CORTEZ, 2002).

O estudo fitoquímico das folhas de *Conchocarpus heterophyllus* levou ao isolamento de algumas flavonas (**10** ao **13**), alcalóides do tipo 4-quinolona (**14** ao **15**) e β -sitosterol benzoilado (**16**) (FIGURA 1.2) (AMBROZIM, 2008).

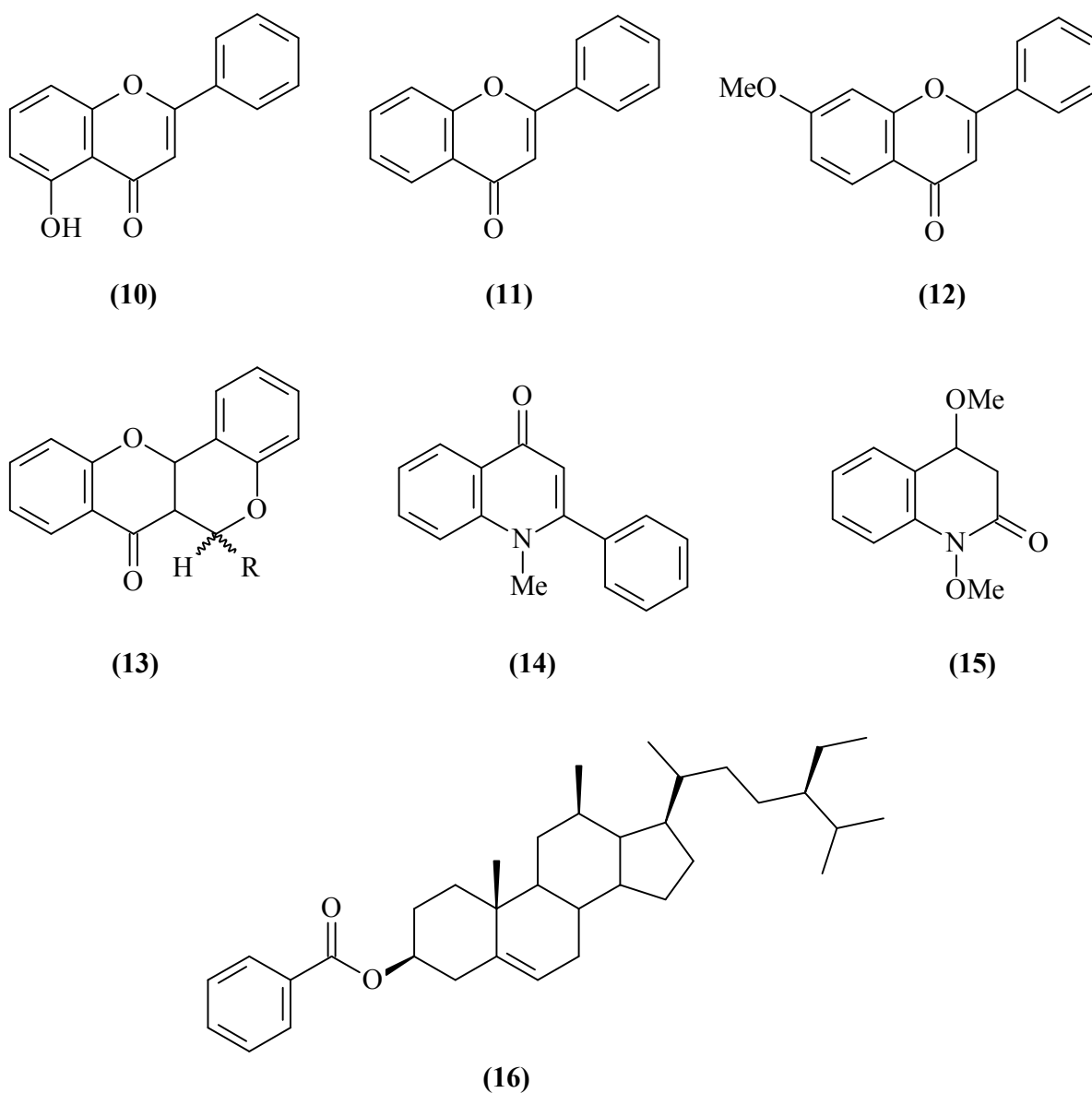


FIGURA 1.2 – Substâncias isoladas de *Conchocarpus heterophyllus* (AMBROZIM, 2008).

O estudo fitoquímico das folhas de *Conchocarpus inopinatus* levou ao isolamento de diversos alcaloides, principalmente os acridônicos (**17** ao **22**) e também uma cumarina (**24**) (FIGURA 1.3), apresentando algumas delas atividade tripanocida (MAFEZOLI, 2001).

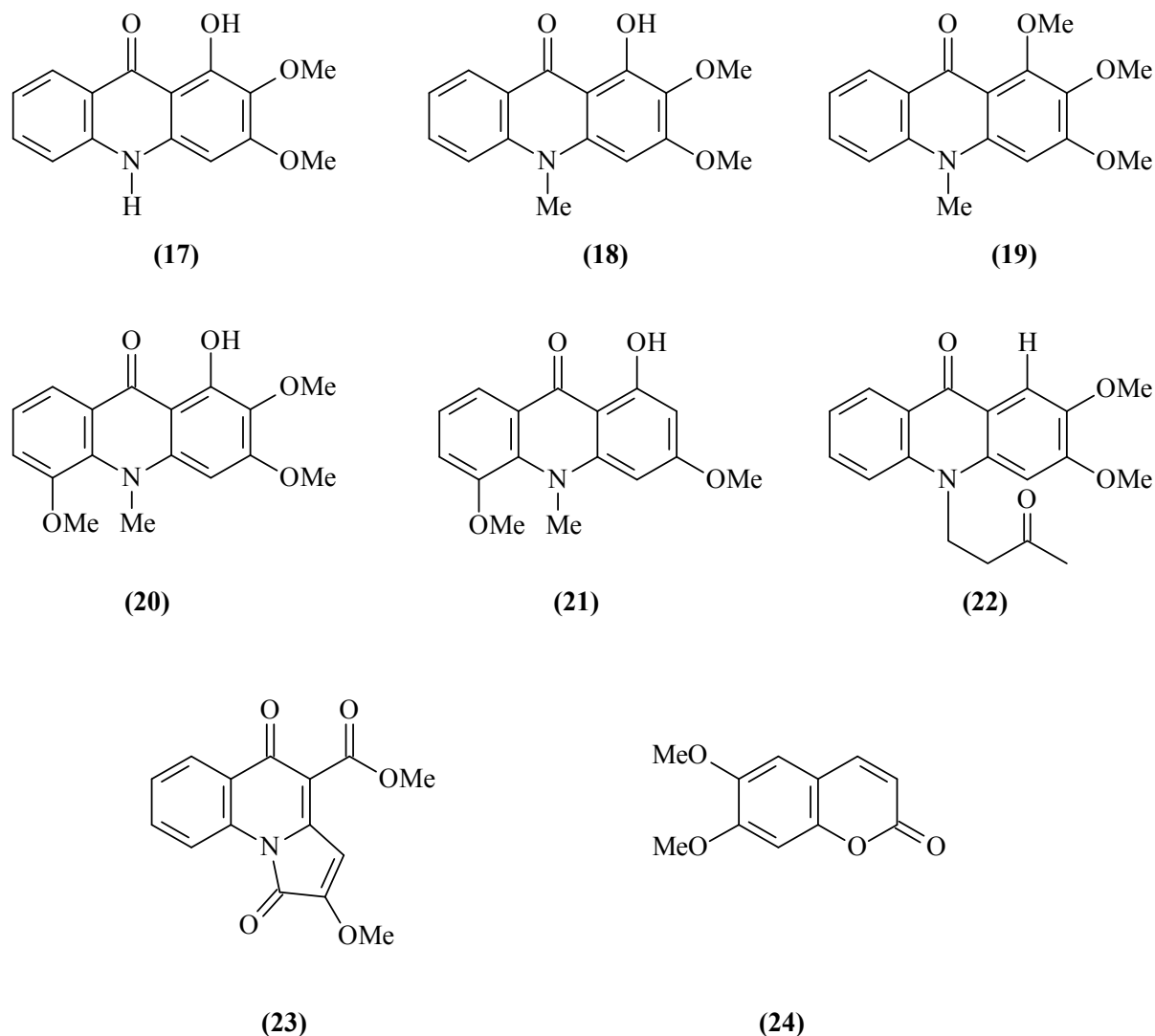


FIGURA 1.3 – Substâncias isoladas de *Conchocarpus inopinatus* (MAFEZOLI, 2001).

O estudo fitoquímico das folhas de *Conchocarpus longifolius* levou ao isolamento de algumas classes de cumarinas (FIGURA 1.4), com atividade antimicrobiana (MAFEZOLLI, 2001).

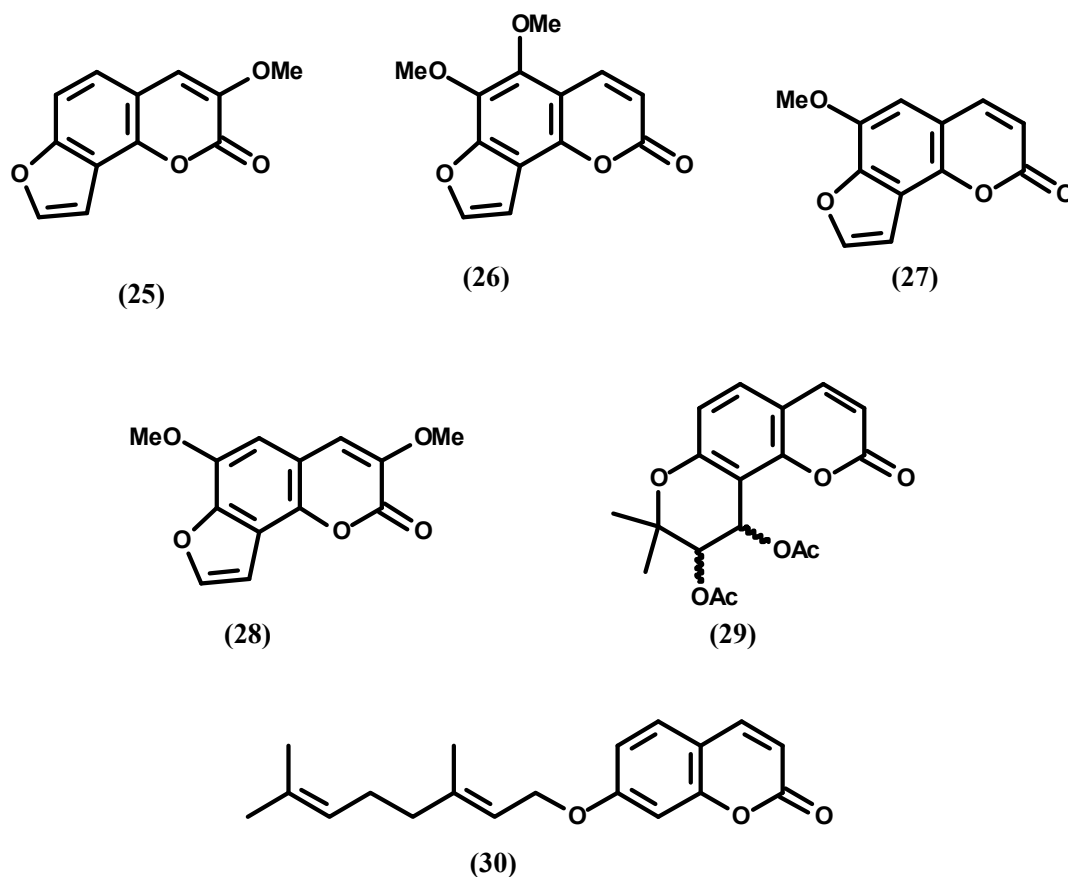


FIGURA 1.4 – Substâncias isoladas de *Conchocarpus longifolius* (MAFEZOLI, 2001).

O estudo fitoquímico das folhas de *Conchocarpus paniculatus* levou ao isolamento de alcalóides acridônicos (FIGURA 1.5), apresentando moderada atividade moluscicida e também citotoxicidade contra alguns tipos de linhagens celulares cancerígenas (VIEIRA ET al., 1992).

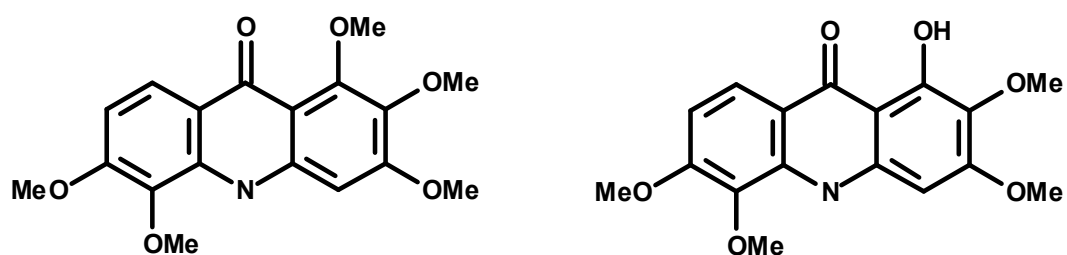


FIGURA 1.5 – Substâncias isoladas de *Conchocarpus paniculatus* (VIEIRA et al., 1992).

1.4 - Seleção do vegetal

A grande diversidade de compostos isolados até o momento no gênero *Conchocarpus*, aliado às suas mais diferentes atividades biológicas, e também devido ao fato deste ser ainda um gênero pouco conhecido e estudado, foram os principais motivos que influenciaram na escolha de uma planta desse gênero. Além disso, existem controvérsias sobre o posicionamento taxonômico de algumas espécies, estimulando o estudo de espécies ainda não estudadas.

Portanto, para a realização deste projeto foi escolhida a espécie *Conchocarpus marginatus*, que por sua vez é uma espécie notável no gênero pelas flores amarelas, possuindo folhas unifolioladas lustrosas e venosas (FIGURA 1.6), nativa do estado de Espírito Santo, Brasil (PIRANI, 2009). Esta pertence ao reino Plantae, Filo Magnoliophyta, Classe Magnoliopsida, Ordem Sapindales e Família Rutaceae. Não há relatos na literatura sobre o estudo desta espécie até o momento.

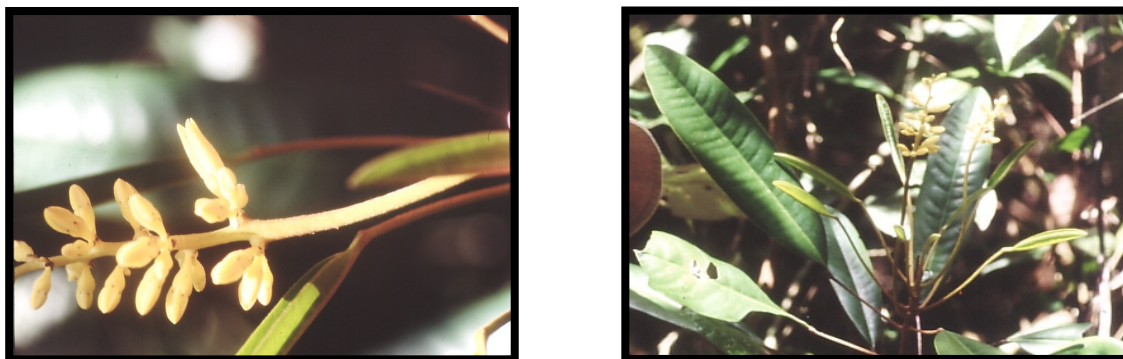


FIGURA 1.6 – Imagem das flores (à esquerda) e das folhas (à direita) de *Conchocarpus marginatus* (Imagens cedidas pelo Professor José Rubens Pirani).

2 - Objetivos

2- Objetivos

O projeto desenvolvido no laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química da UFSCar teve como principais objetivos:

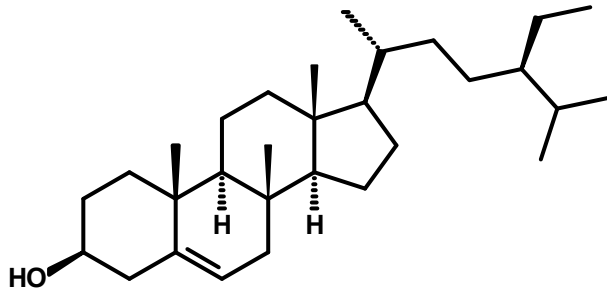
- Estudo fitoquímico do caule e folhas da espécie *Conchocarpus marginatus*;
- Análise de seu perfil químico, com a finalidade de contribuir para um maior conhecimento químico do gênero *Conchocarpus*, ainda pouco estudado;
- Confirmar a atual classificação frente a sua composição química.

3 - Substâncias Isoladas

3- Substâncias Isoladas

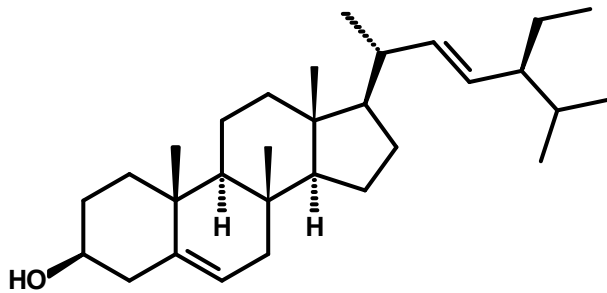
O estudo fitoquímico da planta *Conchocarpus marginatus* possibilitou o isolamento de 12 metabólitos secundários.

1



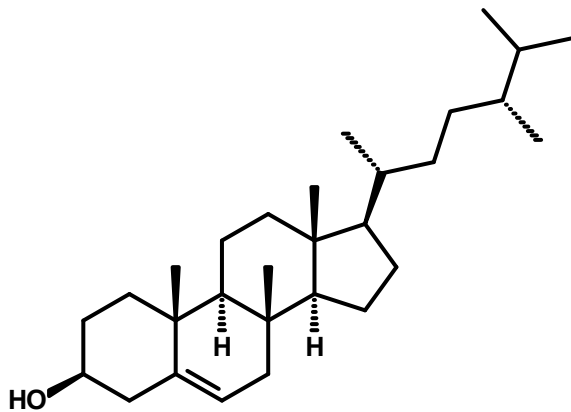
Sitosterol
Identificação: 43

2



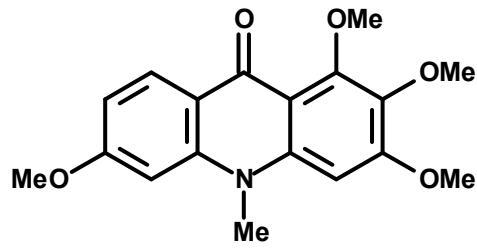
Stigmasterol
Identificação: 43

3



Campesterol
Identificação: p. 43

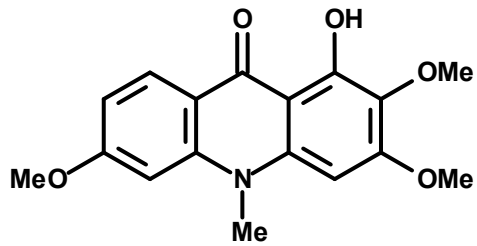
4



1,2,3,6-tetrametoxi-N-metilacridona

Identificação: p. 49

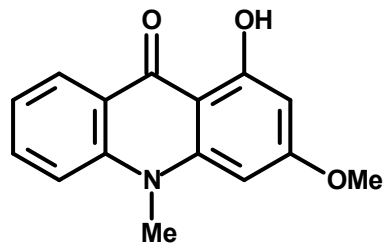
5



1-hidroxi-2,3,6-trimetoxi-N-metilacridona

Identificação: p. 58

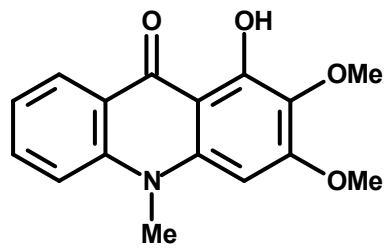
6



1-hidroxi-3-metoxi-N-metil acridona

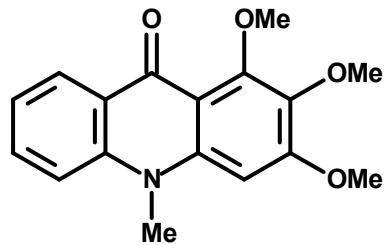
Identificação: p. 66

7



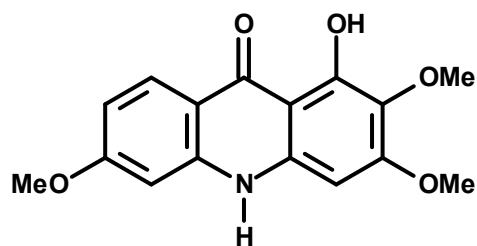
Arborinina
(1-hidroxi-2,3-dimetoxi-N-metil acridona)
Identificação: p. 74

8



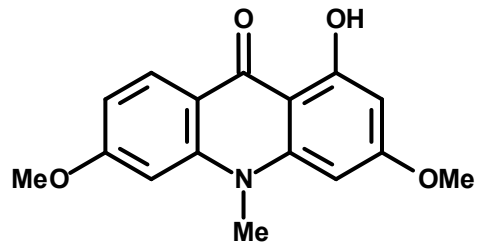
Metil-arborinina
(1,2,3-trimetoxi-N-metil acridona)
Identificação: p. 82

9



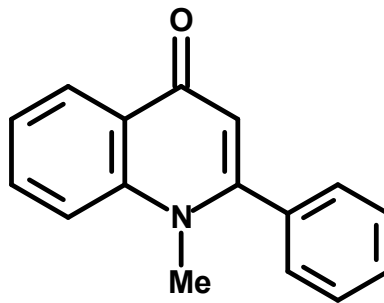
1,2,3,6-tetrametoxi-acridona
Identificação: p. 91

10



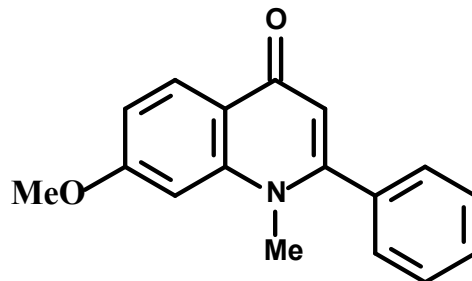
1-hidroxi-3,6-dimetoxi-N-metilacridona
Identificação: p. 99

11



2-fenil-1-metil-quinolin-4-ona
Identificação: p. 109

12



2-fenil-1-metil-7-metoxi-quinolin-4-ona
Identificação: p. 109

4 - Experimental

4 – Experimental

4.1 - Procedimento Experimental

Os procedimentos químicos como a preparação dos extratos vegetais, isolamento e identificação das substâncias foram realizados no laboratório de pesquisa de Produtos Naturais do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

4.2 - Materiais e Métodos

4.2.1 - Métodos Cromatográficos e suportes

Para o fracionamento dos extratos foram utilizadas as seguintes técnicas:

- Cromatografia por adsorção em coluna aberta, utilizando como suporte Sílica gel 60 (70-230 mesh e 230-400 mesh) da Merck;
- Cromatografia por exclusão, utilizando como suporte Sephadex LH-20, da Amersham Pharmacia Biotech AB
- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando como suportes:
 - coluna polimérica Shoedex GS-310 2G – Asahipak (45,0 x 2,5cm; partícula de 5 μ m);
 - coluna Gemini C18 Phenomenex (10 μ m; 250 x 4,60mm);
 - coluna GEMINI C-18 (10 μ m; 25,0 x 2,1 cm).
- Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), utilizando como suporte a coluna DB-5 (30m x 0,25mm x 0,25 μ m)

- Cromatografia em camada delgada analítica, usando folhas de alumínio com sílica gel 60 F₂₅₄, com 0,2mm de diâmetro, da Merck.

4.2.2 - Solventes

- Para cromatografia em coluna aberta foram utilizados solventes comerciais destilados no DQ-UFSCar;
- Para CLAE foram utilizados solventes grau HPLC da Merck e da J. T. Becker;
- Para obtenção de espectros de RMN foram utilizados solventes deuterados da Merck e Aldrich.

4.2.3 - Reveladores

Os reveladores empregados em CCDA foram:

- Radiação UV (254 e 365 nm);
- Solução de Vanilina;
- Reagente de Dragendorff

4.2.4 - Detectores

- UV-Vis Shimadzu SPD-10AV

4.3 – Equipamentos

4.3.1 - 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

4.3.2 - Balança Analítica

- Sartorius modelo BP210S

4.3.3- Câmara de UV

- Cabine tipo Spectroline modelo CM-10 com luz tipo Spectroline modelo ENF-260C

4.3.4 - Equipamento de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

-Shimadzu SCL-10Avp com válvula de reciclo, válvula de injeção Rheodyne 7725i, bomba Shimadzu LC-6AD.

4.3.5 – Equipamento de Espectrômetria de Massa

- CG-EM Shimadzu QP 5000 – ionização por impacto eletrônico - DQ/UFSCar.

4.3.6 - Equipamentos de Ressonância Magnética Nuclear

- Bruker DRX 9,8 T (400 MHz para RMN ^1H e 100 MHz para RMN ^{13}C) – DQ/UFSCar;

- Bruker ARX 4,9 T (200 MHz para RMN ^1H e 50 MHz para RMN ^{13}C) – DQ/UFSCar.

4.4 – Coleta e Identificação do Material Botânico

A espécie *Conchocarpus marginatus* foi coletada no município de Linhares no Espírito Santo, estrada para Colatina, em 19 de janeiro de 1993.

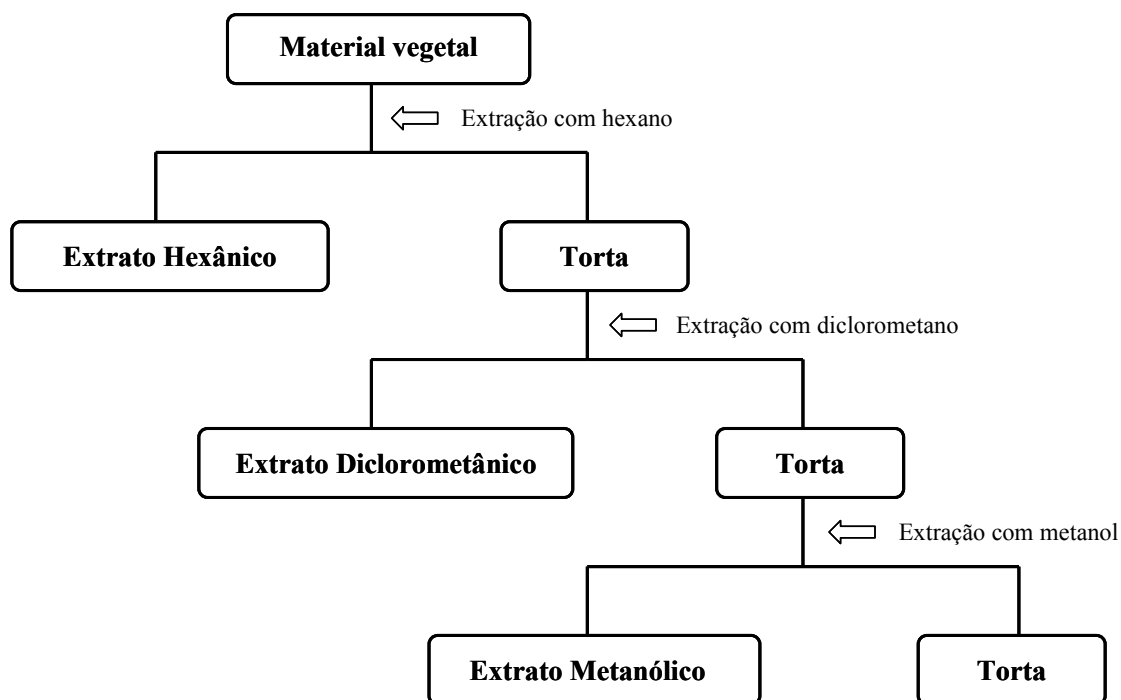
A coleta do material vegetal foi realizada na presença do Professor Dr. José Rubens Pirani e Jacquelyn A. Kallunki, os quais realizaram a identificação do material vegetal.

4.5 – Preparação dos Extratos Vegetais

Os extratos brutos foram preparados a partir das partes vegetais, caule e folhas, da espécie de *Conchocarpus marginatus*. A espécie foi identificada por J. R. Pirani e a exsicata foi depositada no herbário SPF (Herbário do Departamento de Botânica da USP), com exsicata nº 2632.

As partes vegetais mencionadas acima foram secas em estufa de circulação a 40°C durante aproximadamente 10 dias e posteriormente trituradas em moinho. O material seco e moído foi submetido a três extrações consecutivas com um intervalo de três dias entre cada uma delas utilizando-se os solventes n-hexano, diclorometano e metanol, assim representados no FLUXOGRAMA 4.1. Por fim, os extratos foram concentrados em rotaevaporadores.

Os extratos obtidos e suas respectivas massas estão representados na TABELA 4.1.



FLUXOGRAMA 4.1 - Preparação dos extratos hexânicos, diclorometânicos e metanólicos a partir do caule e folhas de *Conchocarpus marginatus*.

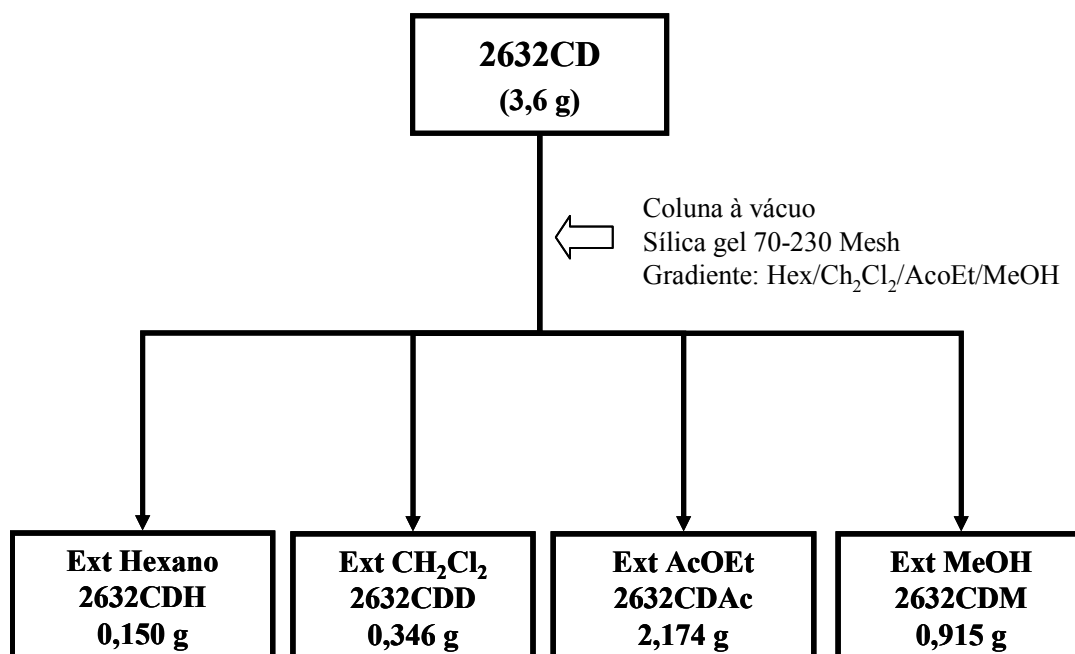
TABELA 4.1 – Massas dos extratos de *Conchocarpus marginatus*.

Extrato	Massa (gramas)	Código
Caule Hexânico	2,9	2632CH
Caule Diclorometânico	5,3	2632CD
Caule Metanólico	20,9	2632CM
Folhas Hexânico	3,9	2632FH
Folhas Diclorometânico	10,7	2632FD
Folhas Metanólico	21,9	2632FM

4.6 - Fracionamento dos Extratos

4.6.1 – Fracionamento do extrato diclorometânico do caule de *Conchocarpus marginatus* (2632CD)

O extrato diclorometânico do caule de *C. marginatus* foi fracionado através de uma coluna à vácuo em funil de placa sinterizada, utilizando como suporte sílica gel (70-230 Mesh) (FLUXOGRAMA 1.2), no modo gradiente de eluição. Essa coluna originou 4 frações: hexânica (2632CDH), diclorometânica (2632CDD), acetato de etila (2632CDAc) e metanólica (2632CDM).

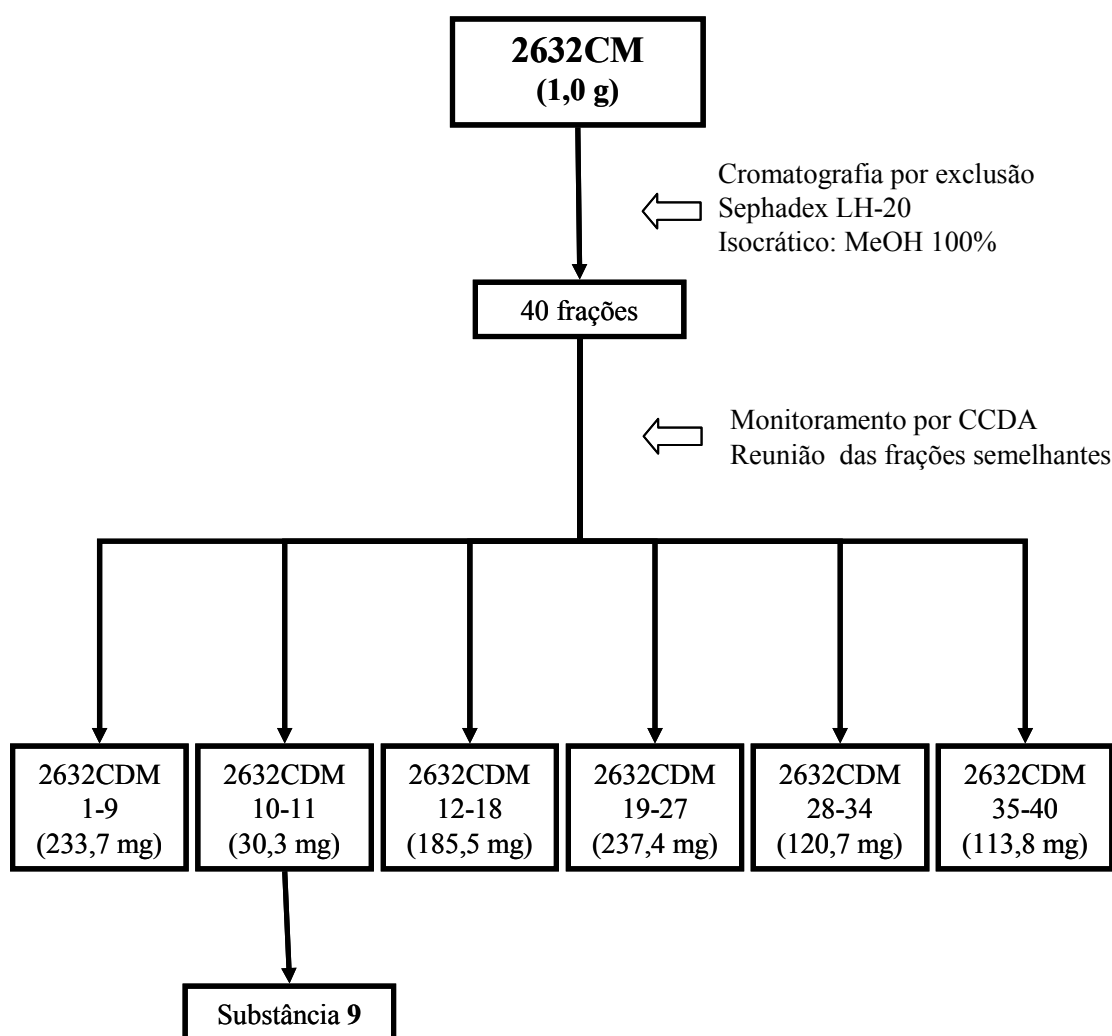


FLUXOGRAMA 4.2 - Fracionamento do extrato diclorometânico do caule de *C. marginatus*.

O estudo dessas frações foi realizado utilizando-se basicamente técnicas de cromatografia por adsorção e exclusão, que serão discutidas no item 4.7.

4.6.2 – Fracionamento do extrato metanólico do caule de *Conchocarpus marginatus* (2632CM)

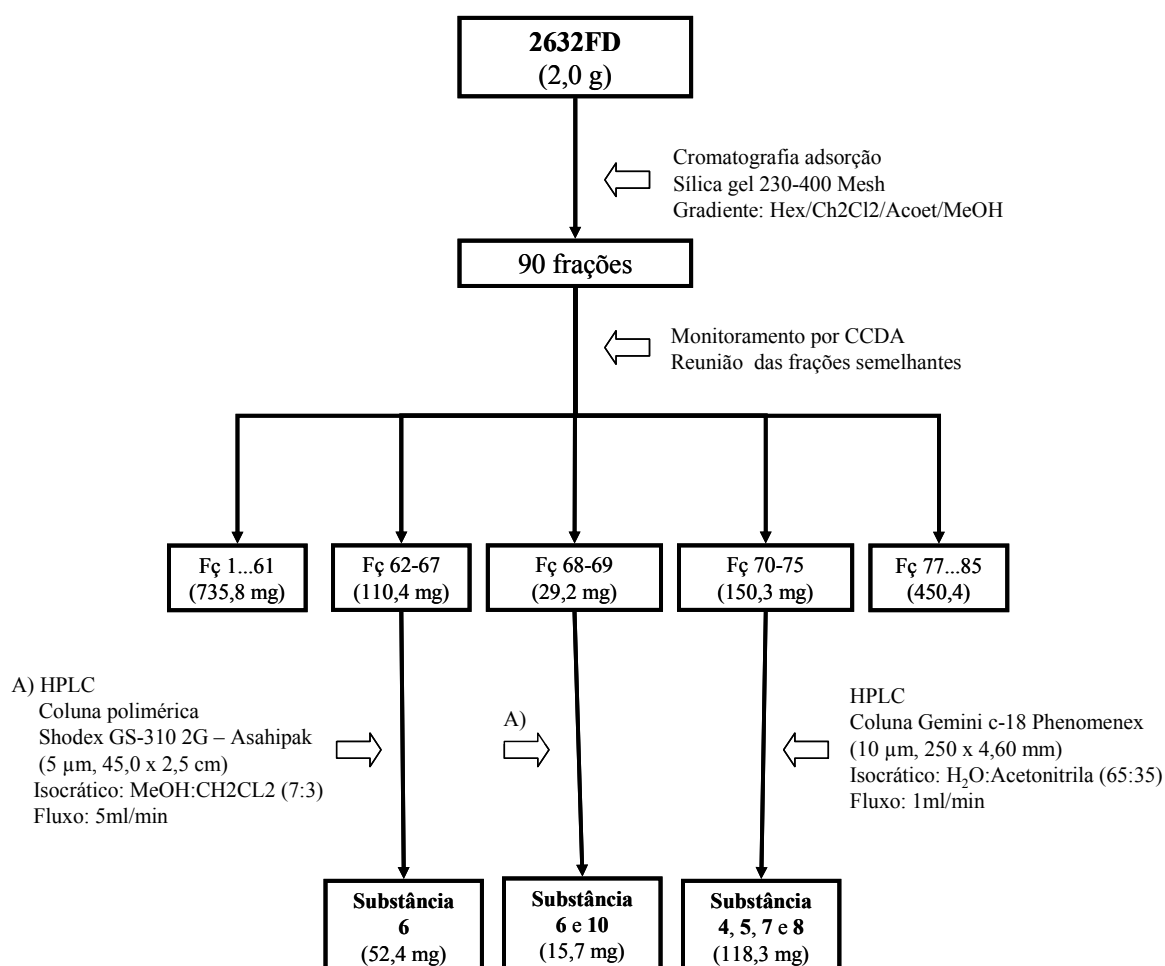
O fracionamento de 2632CM foi realizado utilizando-se a técnica de cromatografia por exclusão em coluna aberta, tendo como suporte sephadex LH-20, e fase móvel com MeOH 100%. A eluição foi acompanhada com cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), onde ao final, após reunião de frações semelhantes, obteve-se 6 grupos de frações (FLUXOGRAMA 1.3).



FLUXOGRAMA 4.3 - Fracionamento do extrato metanólico do caule de *Conchocarpus marginatus*.

4.6.3 – Fracionamento do extrato diclorometânico das folhas de *Conchocarpus marginatus* (2632FD)

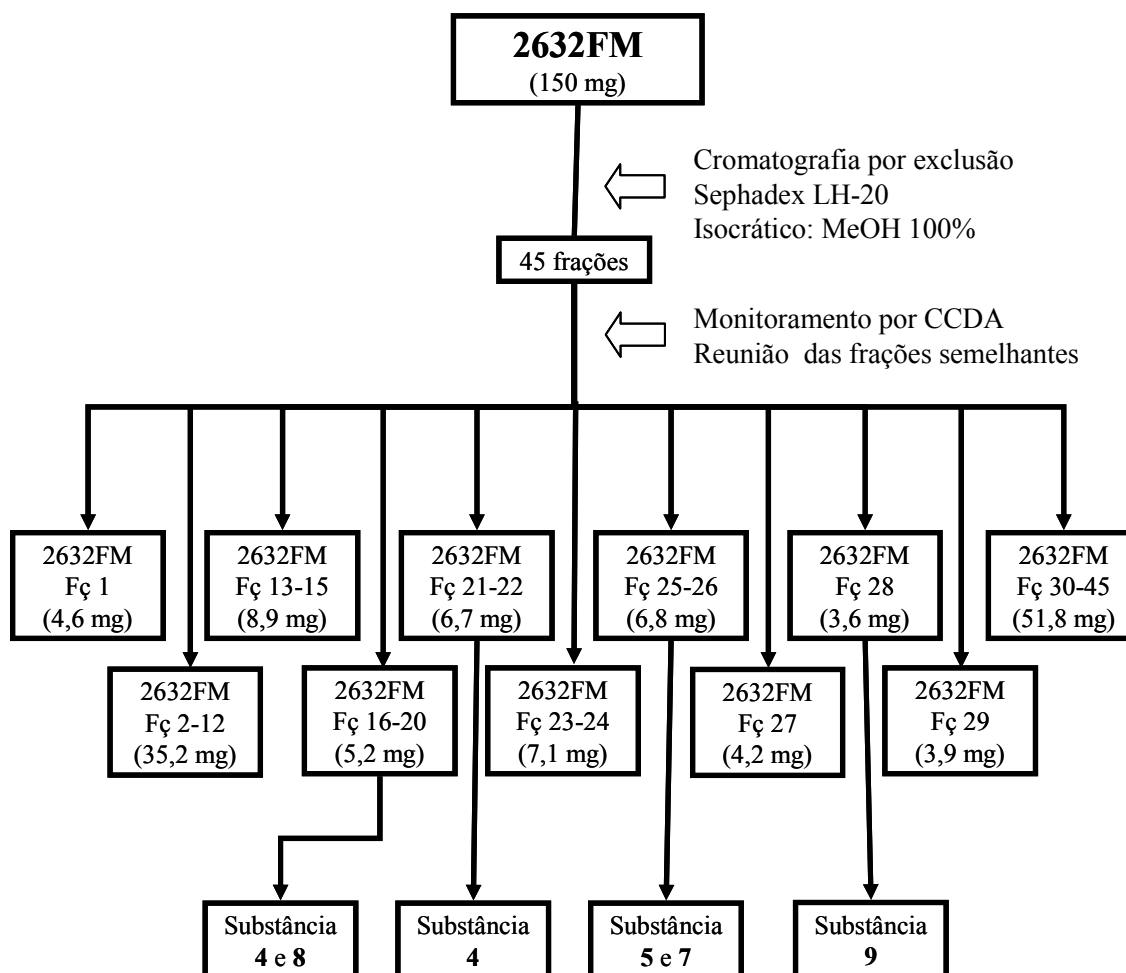
Para o fracionamento do extrato diclorometânico das folhas de *C. marginatus* utilizou-se basicamente cromatografia de adsorção em coluna, tendo-se como fase estacionária sílica gel 230-400 mesh e modo gradiente de eluição, utilizando para isso como fase móvel, os solventes n-hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol. O FLUXOGRAMA 1.4 mostra como este estudo foi realizado. Foram coletadas 90 frações que, após analisadas por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), foram reunidas em sub-frações.



FLUXOGRAMA 4.4 - Fracionamento do extrato diclorometânico das folhas de *C. marginatus*.

4.6.4 – Fracionamento do extrato metanólico das folhas de *Conchocarpus marginatus* (2632FM)

O extrato 2632FM foi submetido à cromatografia por exclusão em coluna aberta, utilizando como fase estacionária Sephadex LH-20, e modo isocrático de eluição usando MeOH 100%. Coletou-se 45 frações, que após monitoramento por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) foram reunidas em 11 frações, como mostrado no FLUXOGRAMA 1.5.



FLUXOGRAMA 4.5 - Fracionamento do extrato metanólico das folhas de *C. marginatus*.

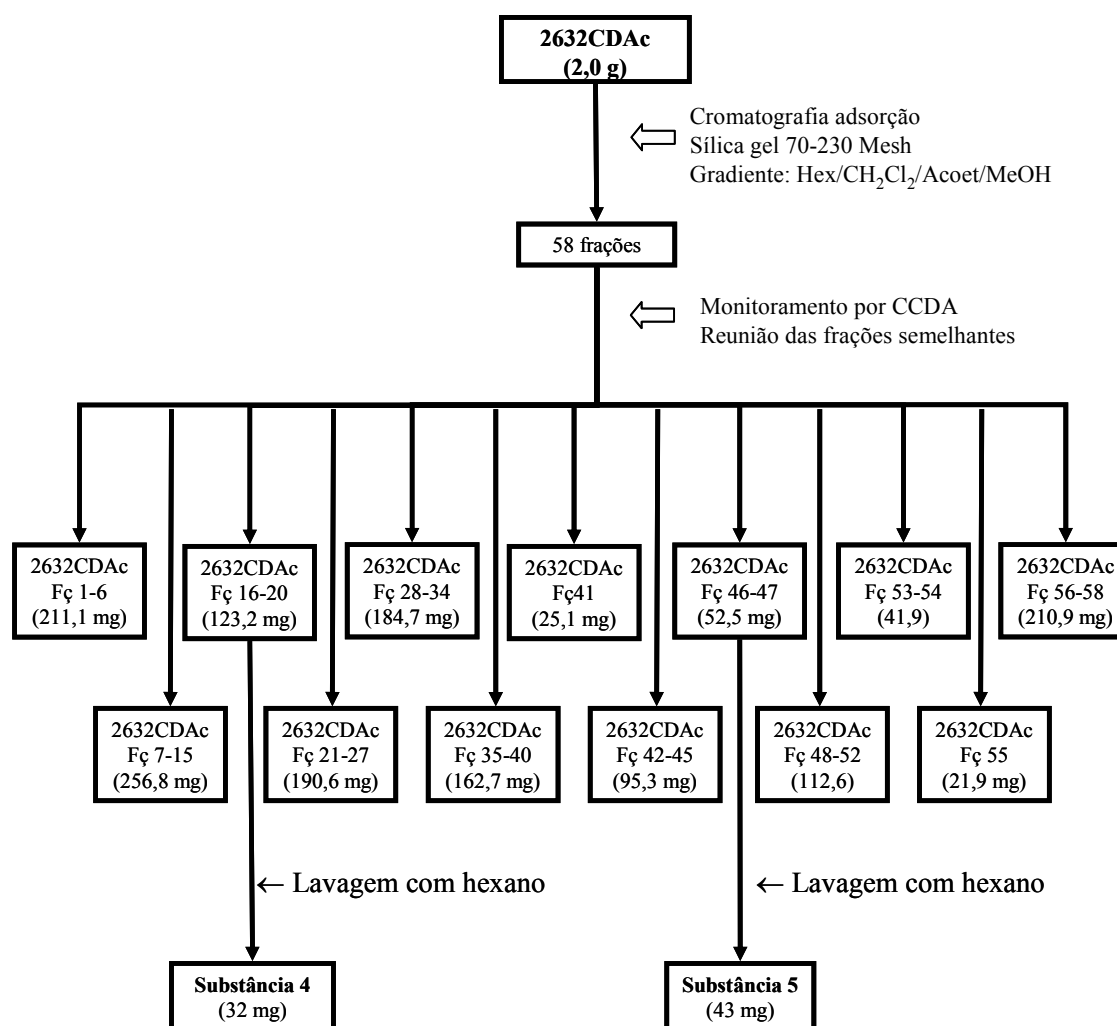
4.7 - Isolamento dos Constituintes de *Conchocarpus marginatus*

4.7.1 - Estudo da fração 2632CDD

Para o estudo da fração diclorometânica do extrato diclorometânico do caule de *C. marginatus* utilizou-se basicamente cromatografia de adsorção em coluna, tendo-se como fase estacionária sílica gel 230-400 mesh, utilizando um sistema de eluição gradiente de polaridade: hexano/diclorometano/acetato de etila/metanol. Desta fração foram isoladas e identificadas as substâncias **1**, **2** e **3**.

4.7.2 - Estudo da fração 2632CDAc

O estudo da fração 2632CDAc permitiu o isolamento das substâncias **4** e **5**. Primeiramente a fração 2632CDAc foi submetida a cromatografia em coluna de sílica gel (70-230 Mesh), com gradiente de eluição hexano/diclorometano/acetato de etila/metanol. 58 Frações foram coletadas e monitoradas por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) e 13 grupos foram obtidos após reunião das frações semelhantes (FLUXOGRAMA 1.6). A fração 2632CDAc 16-20 permitiu o isolamento da substância **5**. A substância foi purificada simplesmente lavando-se a fração com hexano. Da mesma maneira, a fração 2632CDAc 46-47 proporcionou o isolamento da substância **4**.

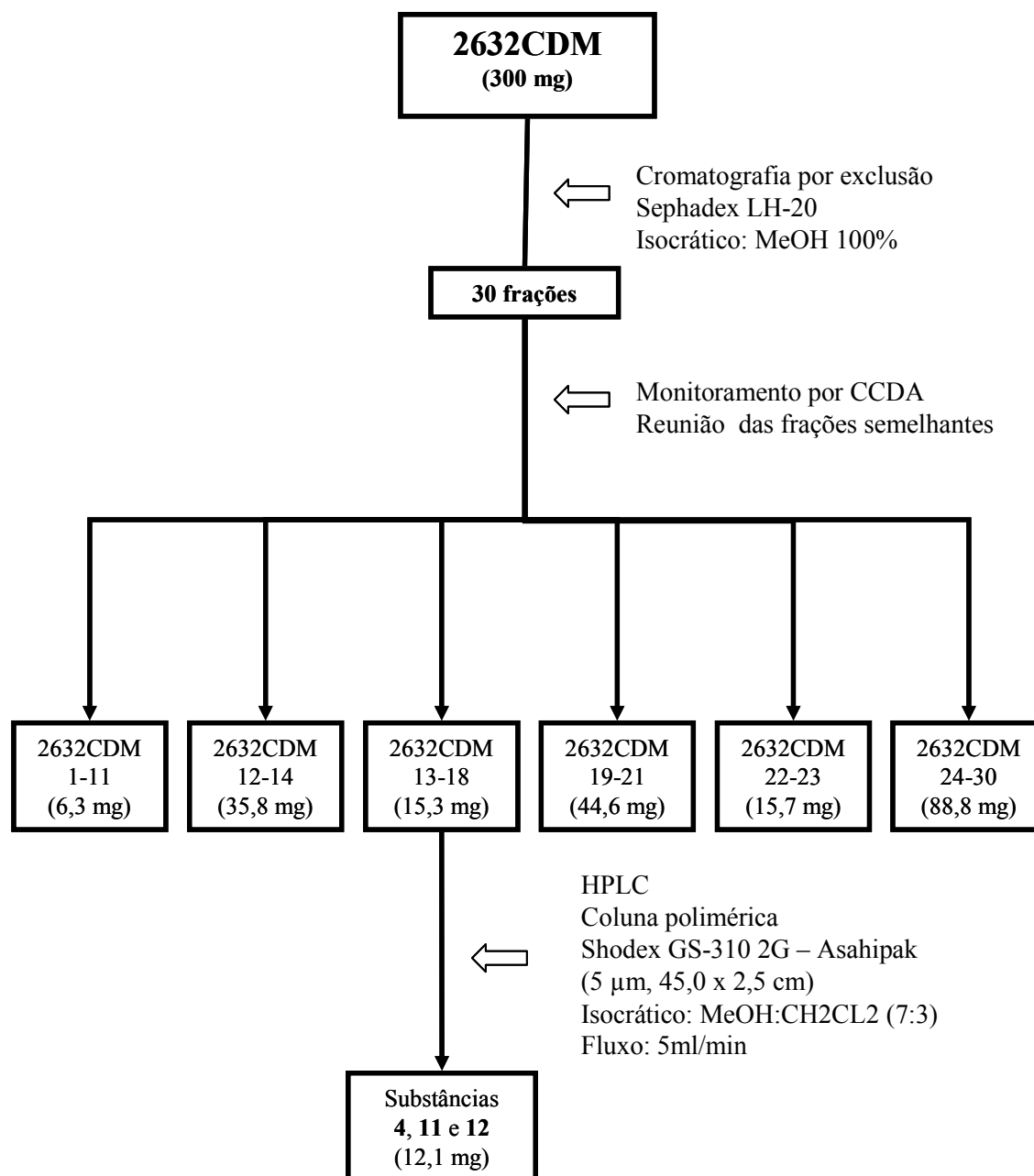


FLUXOGRAMA 4.6 – Fracionamento da fração de acetato de etila do extrato diclorometânico do caule de *Conchocarpus marginatus*.

4.7.3 - Estudo da fração 2632CDM

O extrato 2632CDM foi submetido à cromatografia por exclusão em coluna sephadex LH-20 eluída com metanol 100% (FLUXOGRAMA 1.7). Foram coletadas 30 frações, as quais foram monitoradas por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA). Após a reunião das frações semelhantes, obteve-se 6 grupos. A fração 2632CDM 13-18 permitiu a identificação em mistura das substâncias 4, 11 e 12. Para a purificação dessa fração, recorreu-se à técnica de Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando coluna

polimérica Shodex GS-310 2G – Asahipak (45,0 x 2,5 cm, partícula de 5 μ m), no modo isocrático de eluição usando MeOH:CH₂Cl₂ (7:3), com fluxo de 5 mL/min. O acompanhamento cromatográfico foi realizado com detector de UV nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm.



FLUXOGRAMA 4.7 – Fracionamento da fração metanólica do extrato diclorometânico do caule de *Conchocarpus marginatus*.

4.7.4 - Estudo da fração 2632CM 9-12

A fração 2632CM 9-12 permitiu o isolamento direto da substância **9**, sem a necessidade de refractionamento.

4.7.5 – Estudo da fração 2632FD 62-67

A partir do extrato 2632FD 62-67 foi possível o isolamento e identificação da substância **6**. Para a purificação dessa substância, utilizou-se a técnica de Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com coluna polimérica Shodex GS-310 2G – Asahipak (45,0 x 2,5 cm, partícula de 5 μ m), no modo isocrático de eluição usando MeOH:CH₂CL₂ (7:3) (FIGURA 4.1), com fluxo de 5 mL/min. O acompanhamento cromatográfico foi realizado com detector de UV nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm.

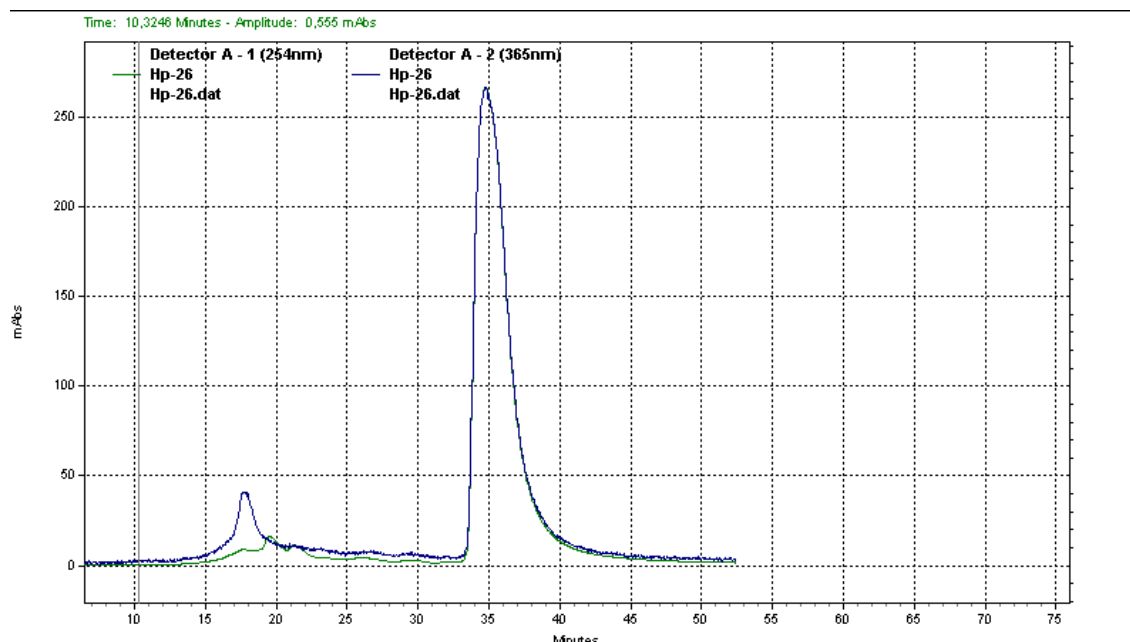


FIGURA 4.1 – Cromatograma da fração 2632FD 62-67, usando MeOH:CH₂CL₂ (7:3) para purificação da substância **6**.

4.7.6– Estudo da fração 2632FD 68-69

O estudo da fração 2632FD 68-69 possibilitou a identificação das substâncias **6** e **10**. A purificação desta fração foi possível através da Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com uma coluna polimérica Shodex GS-310 2G – Asahipak (45,0 x 2,5 cm, partícula de 5µm), utilizando como eluente MeOH:CH₂CL₂ (7:3) no modo isocrático de eluição. O fluxo utilizado foi de 5 mL/min e o acompanhamento da análise foi observado com um detector de UV selecionado para os comprimentos de onda de 254 e 365 nm.

4.7.7 – Estudo da fração 2632FD 70-75

O estudo dessa fração permitiu o isolamento das substâncias **7** e **8** pela primeira vez neste trabalho e novamente as substâncias **4** e **5**.

Para a separação desses alcalóides fez-se uso da Cromatografia líquida de alta eficiência. Para isso utilizou-se a coluna Gemini C18 Phenomenex (10 µm, 250 x 4,60mm), e modo isocrático de eluição, onde a melhor separação foi obtida com a fase móvel H₂O:Acetonitrila (65:35), com um fluxo de 1mL/min. A separação cromatográfica foi acompanhada por um detector de UV com comprimento de onda selecionado para 254 nm.

A separação desses alcalóides pode ser observada na FIGURA 4.2, sendo possível atribuir à banda 1 ao alcalóide **4**, a banda 2 ao alcalóide **8**, a banda 3 ao alcalóide **7** e a banda 4 ao alcalóide **5**.

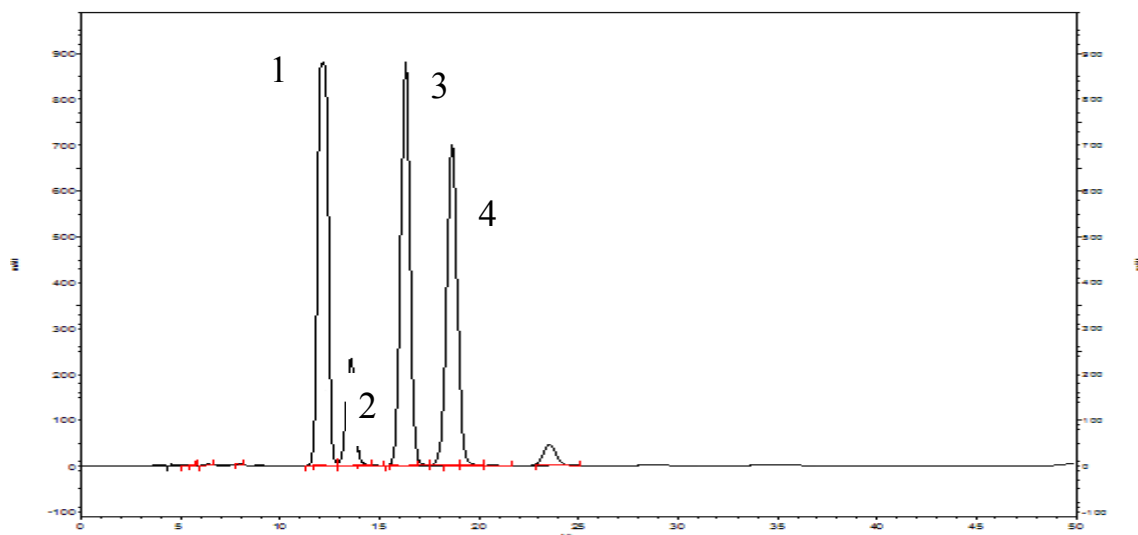


FIGURA 4.2 – Cromatograma da fração 2632FD68-75, utilizando H₂O:Acetonitrila (65:35) para separação dos alcalóides 4, 5, 7 e 8.

4.7.8 – Estudo da fração 2632FM 16-20

O estudo da fração 2632FM 16-20 possibilitou a identificação das substâncias **4** e **8**. Para isso foi utilizada a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), com coluna polimérica Shodex GS-310 2G – Asahipak (45,0 x 2,5 cm, partícula de 5 μ m), no modo isocrático de eluição usando MeOH:CH₂Cl₂ (7:3), com fluxo de 5 mL/min e detector de UV selecionado para os comprimentos de onda de 254 e 365 nm.

4.7.9 – Estudo da fração 2632FM 21-22

A fração 2632FM 21-22 permitiu o isolamento direto da substância **4**, sem a necessidade de refractionamento.

4.7.10 – Estudo da fração 2632FM 25-26

O estudo da fração 2632FM 25-26 permitiu o isolamento direto da substância **5**, sem a necessidade de refractionamento.

4.7.11 – Estudo da fração 2632FM 28

O estudo da fração 2632FM 28 permitiu o isolamento direto da substância **9**, sem a necessidade de refractionamento.

5 - Resultados e Discussões

5 – Resultados e Discussões

5.1 - Esteróides

Os esteróides são triterpenos modificados contendo o sistema de anéis tetracíclicos do lanosterol, mas sem a presença das metilas nas posições C-4 e C-14. Originados das frações lipídicas de vegetais e animais o sitosterol, o estigmasterol e o campesterol são os esteróides mais frequentemente encontrados no reino vegetal. Quase sempre estes esteróides encontram-se em mistura devido às suas semelhanças estruturais, ocasionando dificuldades em suas separações, então, na maioria das vezes, suas identificações são realizadas em mistura através de CG/EM.

5.1.1 – Identificação das Substâncias 1, 2 e 3

Estes esteróides foram obtidos do fracionamento do extrato diclorometânico do caule (2632CDD). Estes foram identificados através da análise do espectro de RMN ^1H , por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e também por comparação com dados da literatura. Foram identificadas em mistura, apresentando-se como um sólido branco amorfo. Em CCDA não apresentavam fluorescência quando expostos à radiação UV e apresentavam uma coloração violeta quando revelados com vanilina.

O espectro de RMN ^1H da mistura (FIGURA 5.2) apresentou sinais característicos de esteroides. Os hidrogênios olefínicos em δ_{H} 5,36 (*dl*) e em δ_{H} 5,10 (*m*) (1H, *d*, $J = 9,2$ Hz) foram associados respectivamente ao H-6 do esqueleto do esteroide e aos hidrogênios vinílicos da cadeia lateral do estigmasterol (substância 2). O sinal em δ_{H} 3,50 (*m*) foi associado ao hidrogênio carbinólico H-3. Os muitos sinais em região mais blindada (δ_{H} 0,6-2,4) foram associados aos hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos da mistura dos três esteroides. Através da análise por CG/EM, foi possível confirmar a existência de três substâncias. A presença da mistura de sitosterol (1),

estigmasterol (2) e campesterol (3) foram confirmadas através dos picos referentes ao íon molecular em m/z 414, 412 e 400 (FIGURA 5.3), que conferiram com as fórmulas moleculares das três substâncias $C_{29}H_{50}O$, $C_{29}H_{48}O$ e $C_{28}H_{48}O$, respectivamente.

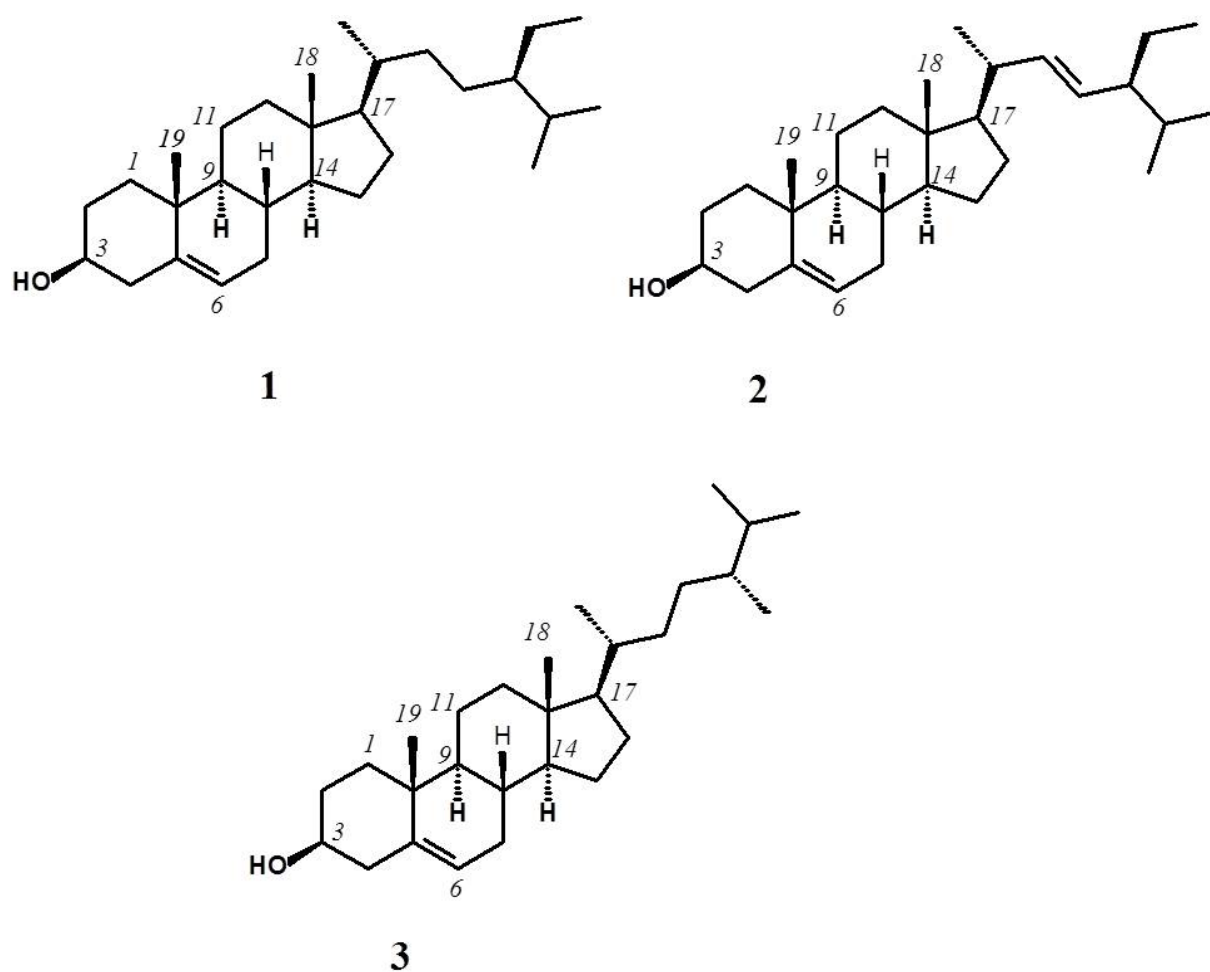


FIGURA 5.1 - Estrutura dos esteróides Sitosterol (1), Estigmasterol (2) e Campesterol (3).

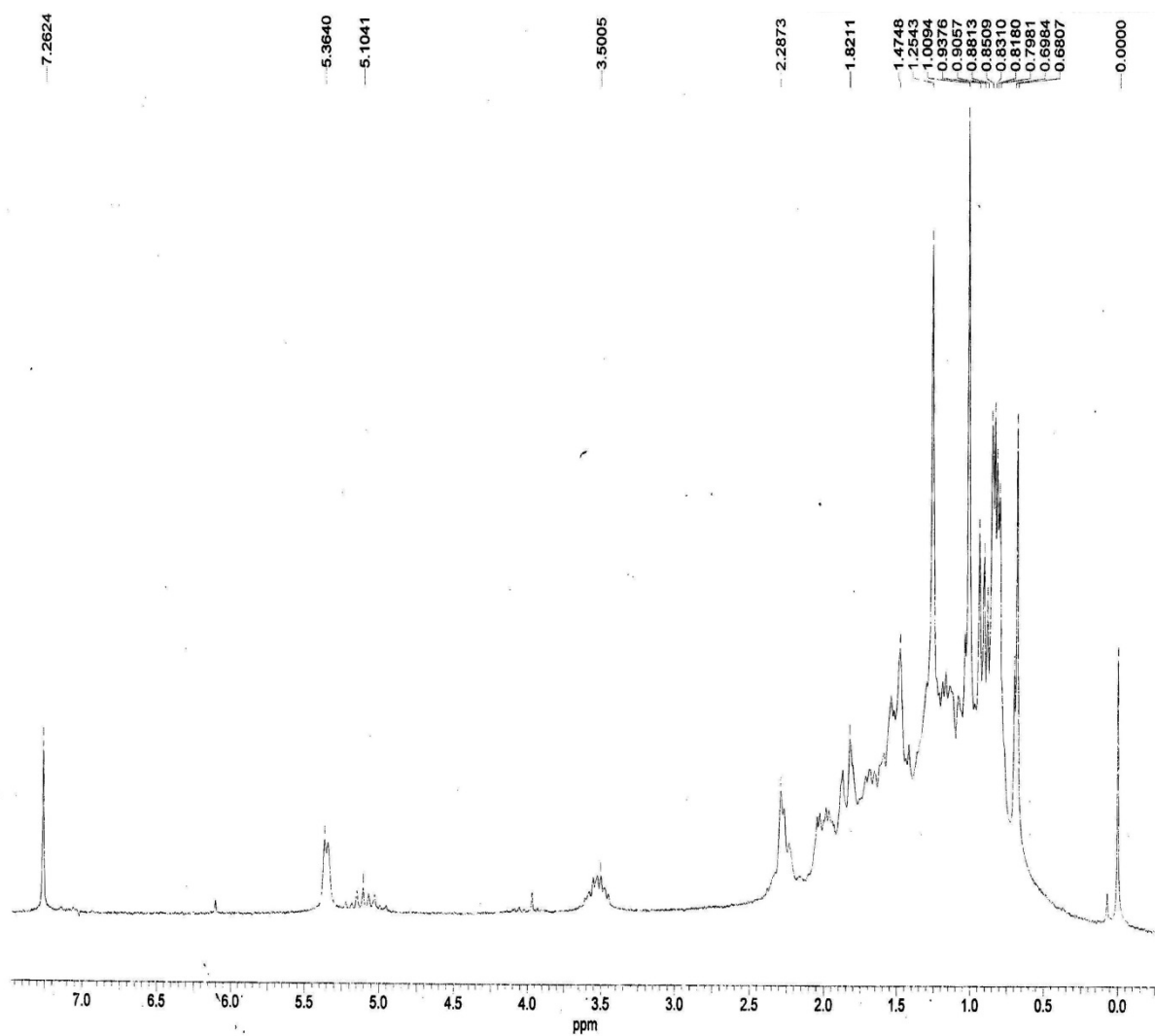


FIGURA 5.2 – Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200MHz) da mistura dos esteróides 1, 2 e 3.

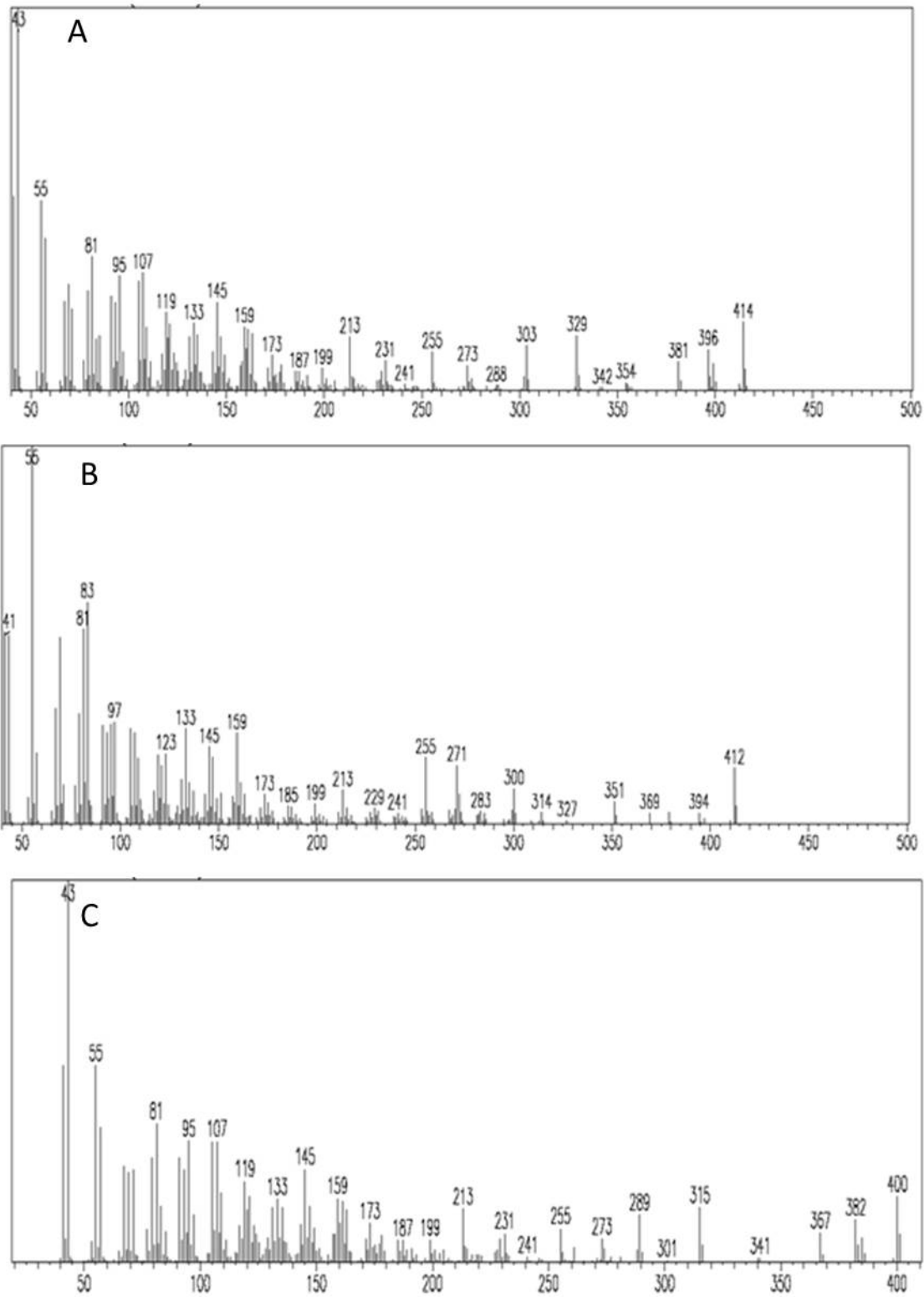


FIGURA 5.3 – Espectro de massas do sitosterol (A); estigmasterol (B) e campesterol (C) (IE = 70 eV).

5.2 - Alcalóides

Os alcalóides constituem-se num vasto grupo de metabólitos com grande diversidade estrutural, representando cerca de 20% das substâncias naturais descritas. Estes são bases nitrogenadas encontradas principalmente nas plantas, mas também podem ser encontrados em menor quantidade em microorganismos e animais (DEWICK, 2002). Um ou mais átomos de nitrogênio estão presentes, tipicamente como amina primária, secundária ou terciária, e isso geralmente confere à basicidade ao alcalóide, facilitando seu isolamento e purificação.

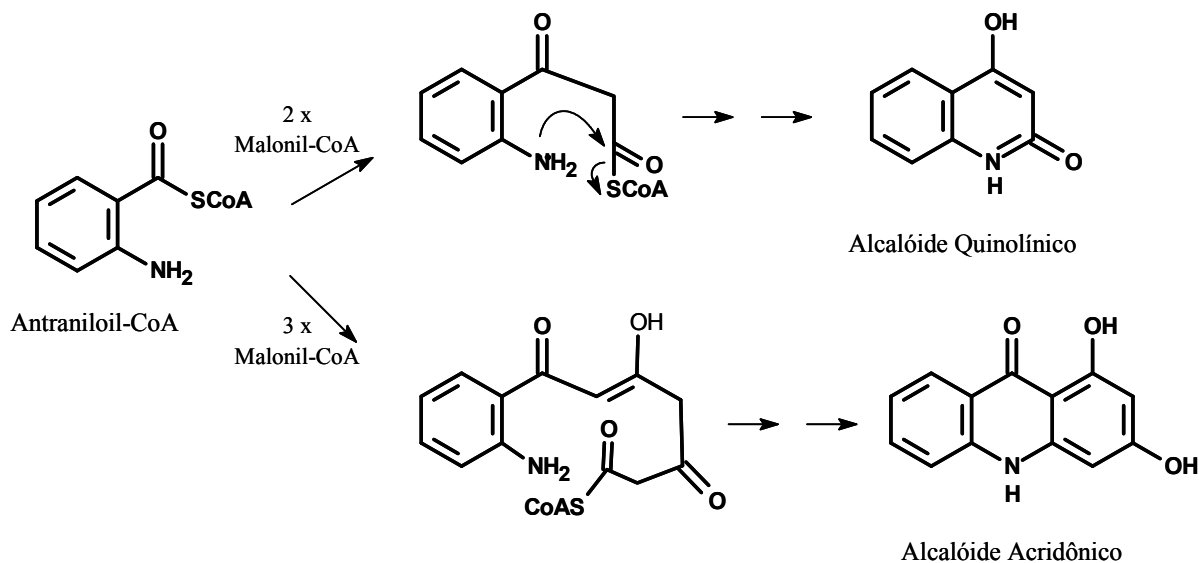
O nome alcalóide é de fato derivado de “alkali”, que quer dizer “básico”. Entretanto, o grau de basicidade pode variar muito, dependendo da estrutura da molécula do alcalóide, e também da presença e posicionamento dos grupos funcionais.

O átomo de nitrogênio nos alcalóides é originado de um aminoácido, e em geral, o esqueleto carbônico do aminoácido precursor é mantido intacto na estrutura alcaloidal. Portanto, a subdivisão dos alcalóides em grupos é baseado no aminoácido precursor.

5.2.1 - Biossíntese dos alcalóides

Na família Rutaceae ocorrem cinco tipos de diferentes de alcalóides, que são classificados de acordo com sua origem biogenética. Estes são derivados da fenilalanina/tirosina; do triptofano; do ácido antranílico, da histidina e outros de origem não definida, como os carbazóis (WATERMANN, 1999). Entretanto a família Rutaceae é caracterizada pela presença de alcalóides derivados do ácido antranílico, cuja rota biossintética é mostrada de forma bastante simplificada no ESQUEMA 5.1. Os alcalóides quinolínicos e acridônicos, que foram isolados neste trabalho, possuem os esqueletos básicos como mostrado na

FIGURA 5.4, e suas respectivas biossínteses diferem apenas no número de unidades de malonil-CoA que são adicionados ao aminoácido precursor.



ESQUEMA 5.1 – Rota biossintética para os alcalóides quinolínicos e acridônicos.

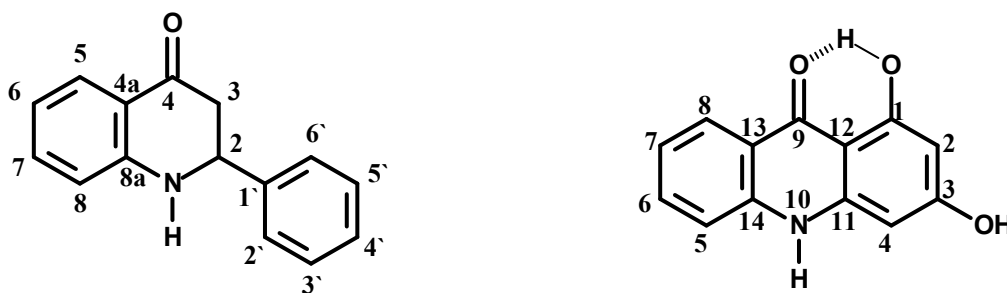


FIGURA 5.4 – Esqueleto do alcalóide quinolínico 2-fenil-1-metil-quinolin-4-ona (à esquerda) e do alcalóide acridônico 1,3-diidroxi-acridona (à direita), com suas respectivas numerações.

5.2.2 - Determinação Estrutural da Substância 4

O estudo dos extratos diclorometânico e metanólico do caule e do extrato metanólico das folhas de *Conchocarpus marginatus*, levou ao isolamento e determinação da substância 4. Esta se apresentou como um sólido cristalino de coloração branca, que flouresce sob radiação ultravioleta em 254 e 365 nm. A substância revela amarela em vanilina e apresenta coloração alaranjada quando revelado com reagente de Dragendorff, indicando a presença de um alcalóide. Este foi identificado através da análise dos experimentos RMN de ^1H e ^{13}C em 1D e 2D e também por análise de CG-EM. Este alcalóide foi isolado de diversas frações da planta, mas seu isolamento foi possível pela primeira vez durante o estudo da fração 2632CDAc 46-47, ao eluir a coluna com 100% de acetato de etila. Os dados discutidos abaixo permitiram a elucidação estrutural do alcaloide acridônico 1,2,3,6-tetrametoxi-10-metilacridona (FIGURA 5.5).

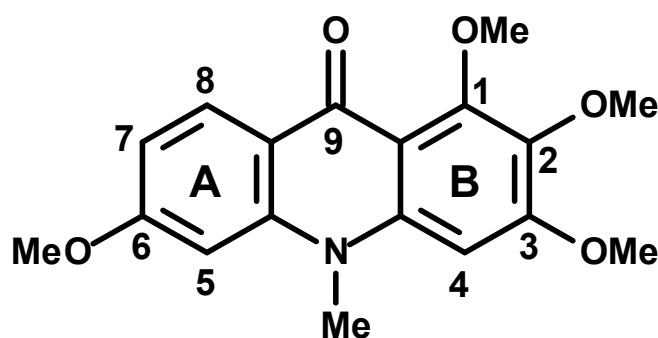


FIGURA 5.5 – Estrutura química do alcaloide 1,2,3,6-tetrametoxi-10-metilacridona (substância 4).

O espectro de RMN ^1H da substância 4 apresentou sinais característicos de alcalóide acridônico (Figura 5.6). Os sinais em δ_{H} 8,39 (1H, *d*, $J = 9,2$ Hz); δ_{H} 6,80 (1H, *dd*, $J = 9,2$ e $2,4$ Hz); δ_{H} 6,64 (1H, *d*, $J = 2,4$ Hz); foram associados respectivamente aos hidrogênios 8, 7 e 5 do anel aromático trissubstituído (anel A); o sinal δ_{H} 6,49 (1H, *s*) foi relacionado a um hidrogênio do anel aromático pentassubstituído (anel B); os sinais em δ_{H} 4,02 (3H, *s*), δ_{H}

3,98 (3H, *s*), δ_{H} 3,91 (3H, *s*), δ_{H} 3,89 (3H, *s*) e δ_{H} 3,65 (3H, *s*) foram associados a grupos metilas ligados a heteroátomos (N ou O). A ausência do sinal em δ_{H} 14 (1H, *s*), referente a um hidrogênio quelado, indicou a presença de um substituinte na posição *peri* a uma carbonila do esqueleto acridônico.

O espectro de COSY (FIGURA 5.7) mostra um acoplamento dos núcleos de H entre H-8 (δ_{H} 8,39) e H-7 (δ_{H} 6,80), dado este que pode ser confirmado com o valor calculado para a constante de acoplamento de 9,2 Hz, sugerindo um acoplamento do tipo *orto*. Este mesmo espectro também mostra um acoplamento entre os núcleos de H entre H-7 (δ_{H} 6,80) e H-5 (δ_{H} 6,64) com uma constante de acoplamento calculada de 2,4 Hz, sugerindo para estes núcleos um acoplamento do tipo *meta*. A reunião destes dados sugere para o anel A do alcalóide acridônico um anel trissubstituído (FIGURA 5.8).

O espectro de RMN ^{13}C apresentou 18 sinais (FIGURA 5.9). Aquele em 175,69 δ foi relacionado a uma carbonila; os carbonos em δ_{C} 61,8; 61,4; 55,9 e 55,5 foram associados a grupos metoxila aromáticos, podendo ainda ser sugerido que os dois primeiros tratam-se de metoxilas em posição de compressão estérica, com grupos substituintes em ambas as posições *orto*, enquanto os dois últimos evidenciam metoxilas livres desse efeito (FURUKAWA, et. Al., 1983); o sinal em δ_{C} 34,6 foi atribuído a um grupo metila ligado ao nitrogênio, cujo valor de deslocamento químico sugere a ausência de substituintes nas posições *peri* ao nitrogênio (GRÖGER, 1988). Os sinais em δ_{C} 163,5; 157,4 e 154,7 estão associados à carbonos ligados a metoxilas nas posições C-6, C-3 e C-1. Esses valores de deslocamento químico para esses núcleos são desblindados quando comparados com os demais devido à presença da carbonila na posição C-9, que provoca essa desblindagem. Já para a metoxila ligada ao C-2 o valor é observado em δ_{C} 137,9.

Analisando os espectros de HSQC (FIGURA 5.10) e HMBC (FIGURA 5.11) foi possível correlacionar os sinais de hidrogênio das metoxilas

com os Carbonos (TABELA 5.1), e assim pôde-se atribuir as posições de cada metoxila no esqueleto acridônico.

TABELA 5.1 – Correlação entre os sinais de hidrogênio das metoxilas com os carbonos da metoxila e carbonos do anel aromático.

H Δ	C metílico δ	C do anel aromático Δ	Posição no anel
4,02	61,8	154,7	C-1
3,98	55,9	157,4	C-3
3,91	61,4	137,9	C-2
3,89	55,5	163,5	C-6

Para confirmar a posição dos hidrogênios aromáticos na molécula realizou-se também o experimento de gNoesy (FIGURA 5.12), cujos resultados estão de acordo com todos os dados sugeridos até o momento. Para este experimento observou-se que ao irradiar o sinal em δ_H 8,39, este apresentou efeito NOI com o sinal δ_H 6,80. Já o sinal δ_H 6,80, quando irradiado, apresentou efeito NOI com os sinais δ_H 8,39 e 6,64. Por sua vez, o sinal em δ_H 6,64 apresentou efeito NOI com os sinais δ_H 3,84 e 3,65, quando irradiado. Ao irradiar o sinal em δ_H 6,49, este apresentou efeito NOI com os sinais δ_H 3,98 e 3,65. E por fim, ao ser irradiado, o sinal em δ_H 3,65 apresentou efeito NOI com os sinais δ_H 6,64 e 6,49.

O espectro de massas da substância **4** (FIGURA 5.13) apresentou o pico do íon molecular em 329 daltons, confirmando a presença de nitrogênio na estrutura e, confirmou a fórmula molecular do alcalóide proposto, $C_{18}H_{19}NO_5$.

O alcaloide acridônico 1,2,3,6-tetrametoxi-10-metilacridona, o qual ainda é inédito na literatura, apresenta como única diferença do alcalóide já conhecido metilarborinina (substância **8**, descrita posteriormente na seção 5.2.6) o grupo substituinte metoxila na posição C-6 ao invés de um hidrogênio (FIGURA 5.14). Uma vez que não se dispunha dos dados de RMN 1H e ^{13}C

descritos na literatura para essa substância, por se tratar de um composto ainda inédito, a confirmação da estrutura proposta foi baseada na comparação da substância **4** com a metilarborinina (MAFEZOLI, 2001) (TABELA 5.2 e 5.3).

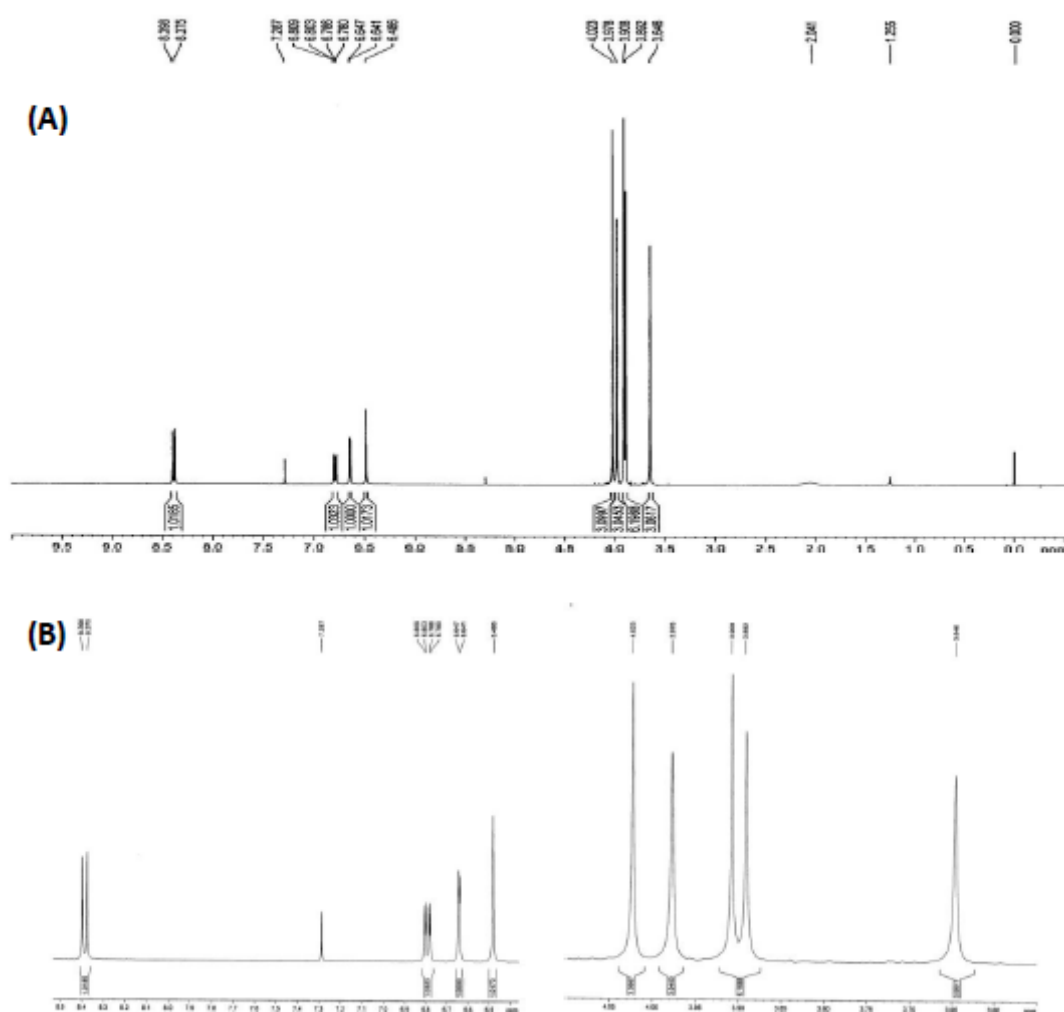


FIGURA 5.6 – (A) Espectro de RMN ^1H (CDCl₃, 400 MHz) da substância **4**; (B) espectro expandido na região dos H aromáticos (à esquerda) e na região das metoxilas (à direita);

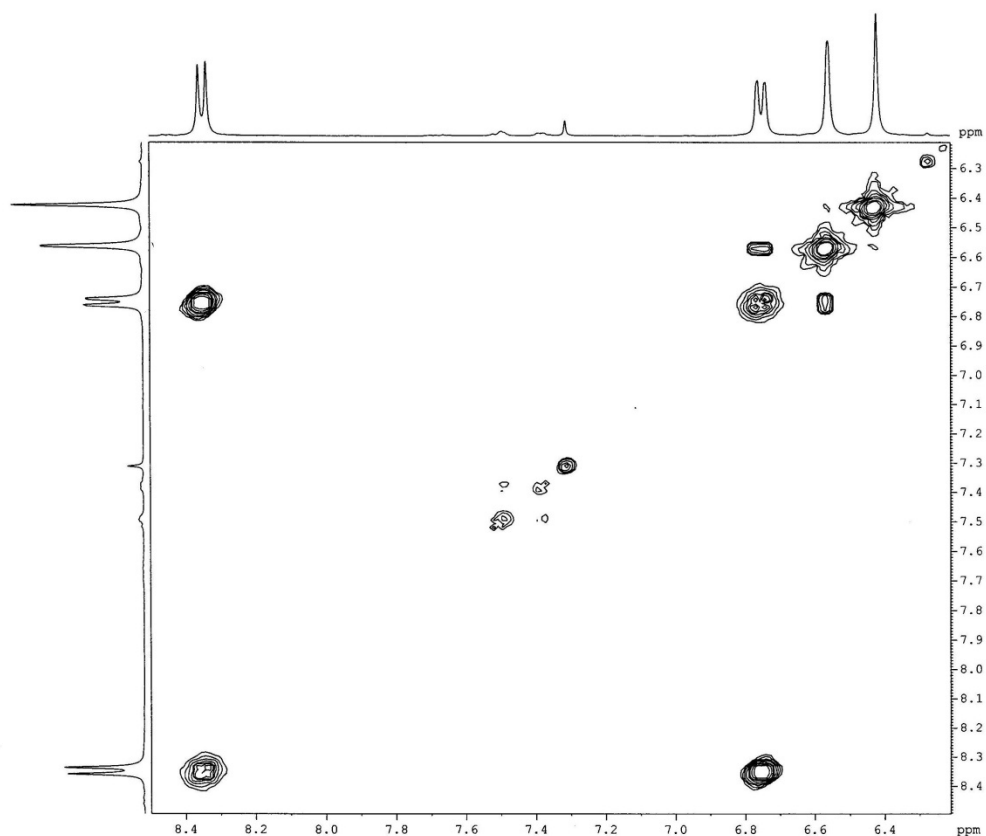


FIGURA 5.7 – Mapa de contorno de COSY da substância 4, CDCl_3 .

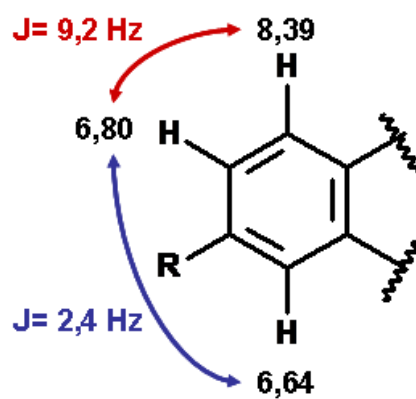


FIGURA 5.8 – Acoplamentos para os hidrogênios do anel A da substância 4.

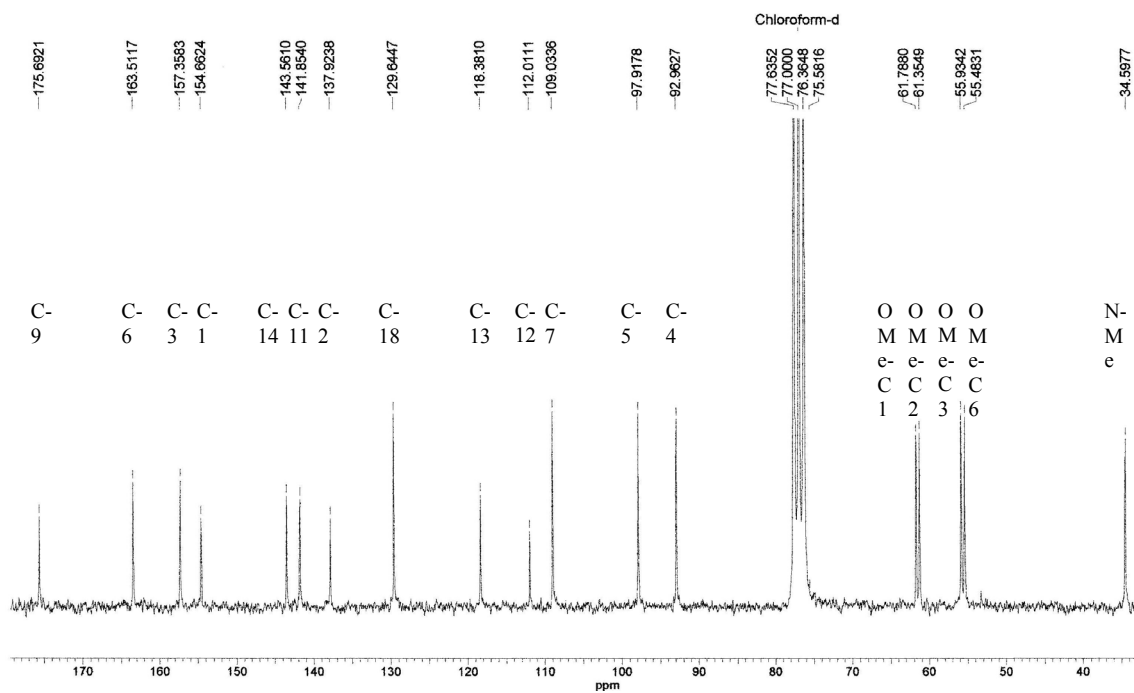


FIGURA 5.9 - Espectro de RMN ^{13}C da substância 4 (CDCl_3 , 100 MHz).

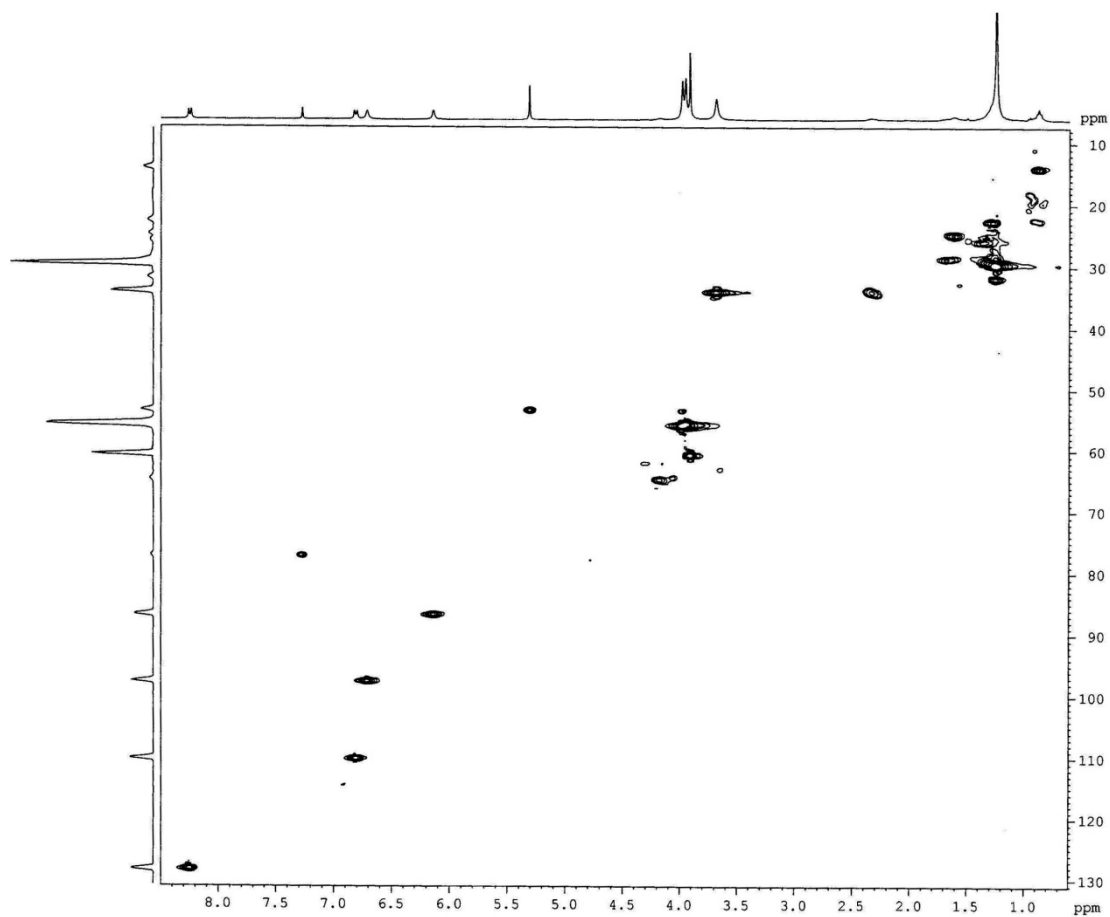


FIGURA 5.10 – Mapa de contorno HSQC da substância 4, CDCl_3 .

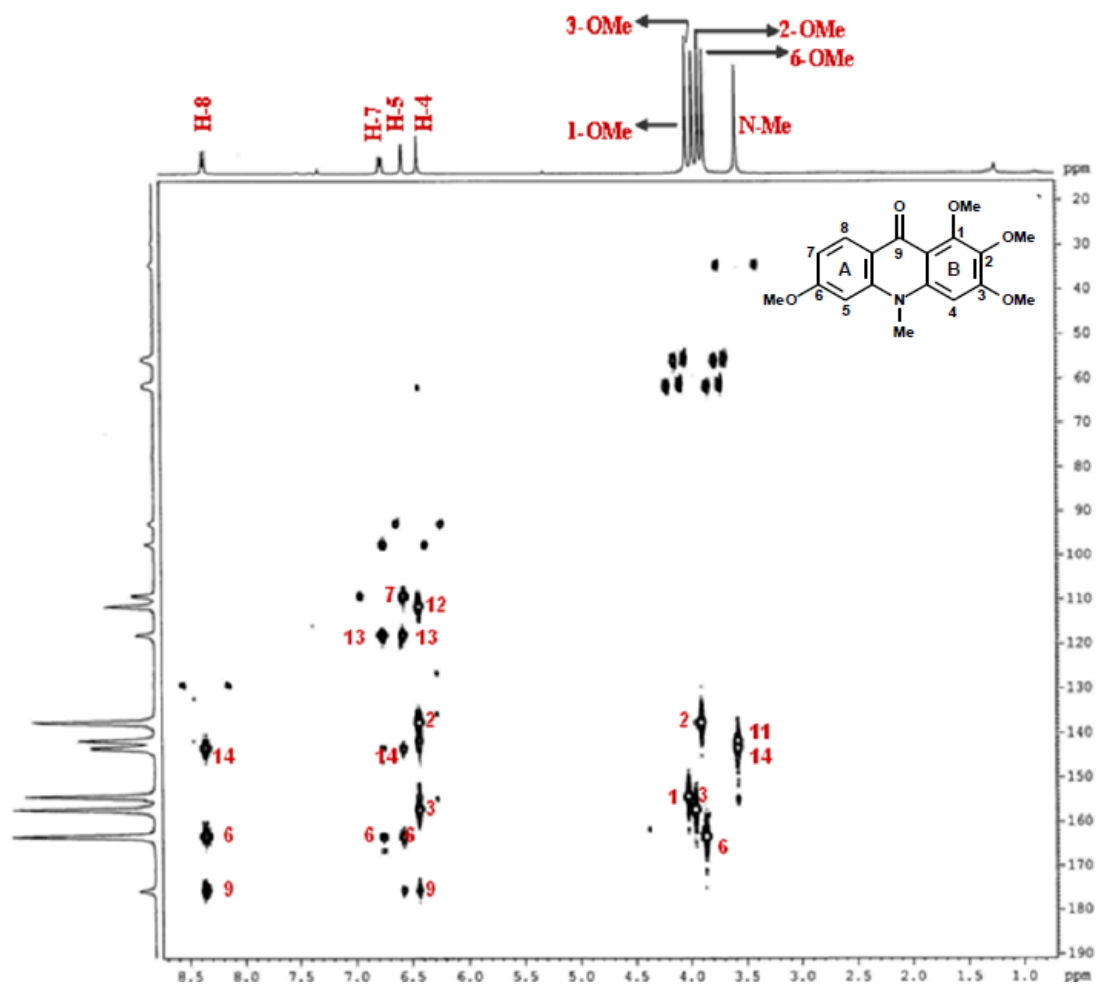


FIGURA 5.11 – Mapa de contorno HMBC da substância 4, CDCl_3 .

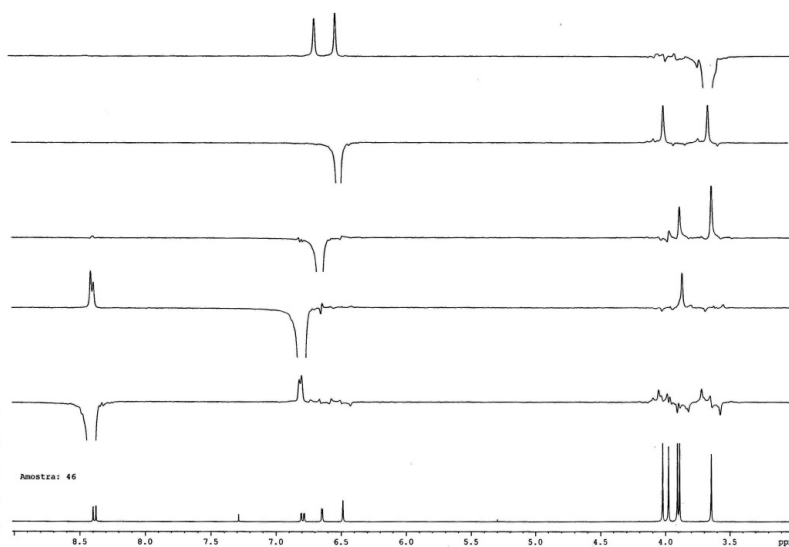


FIGURA 5.12 – Experimento de gNOESY para a substância 4.

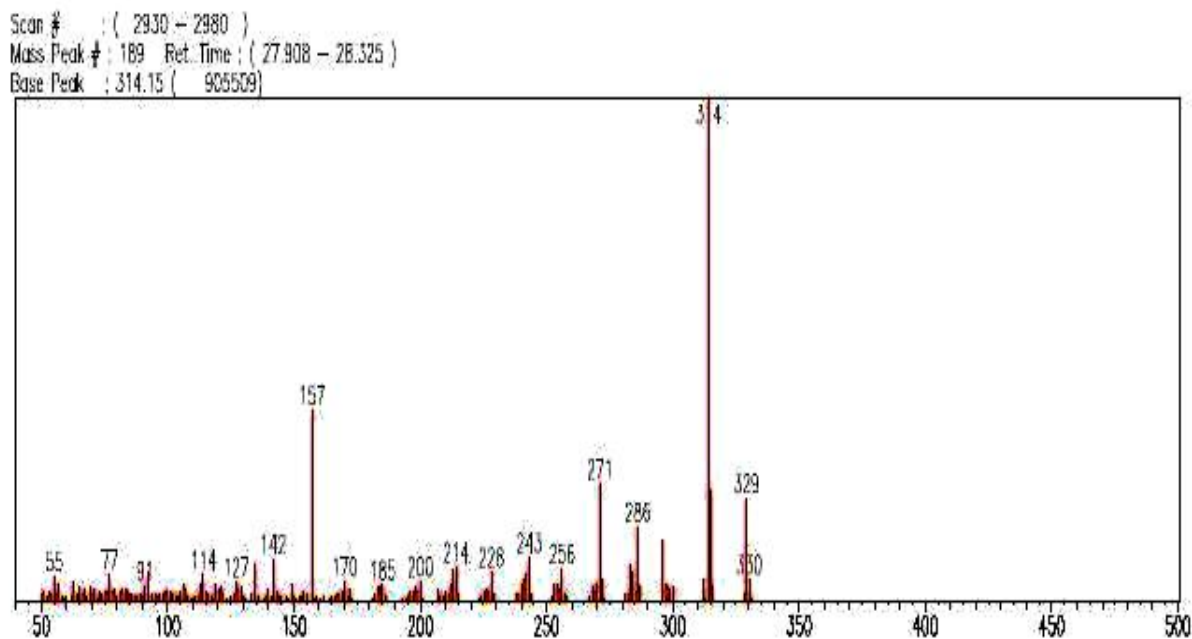


FIGURA 5.13 - -Espectro de massa (IE = 70 eV) da substância 4.

TABELA 5.2 - Dados de RMN ^1H para a substância 4 e comparação com a metilarborinina (8)

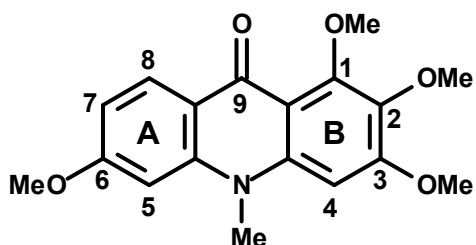
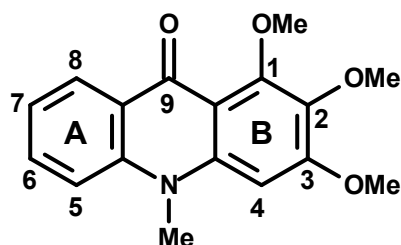
1,2,3,6-tetrametoxi-N-metilacridona		
Hidrogênio	Isolada (a) δ	MAFEZOLI, 2001(b) δ
4	6,49 (1H, <i>s</i>)	6,50 (1H, <i>s</i>)
5	6,64 (1H, <i>d</i> , 2,4 Hz)	7,31 (1H, <i>dl</i>)
6	-	7,19 (1H, <i>ddd</i>)
7	6,80 (1H, <i>dd</i> , 9,2 e 2,4 Hz)	7,56 (1H, <i>ddd</i>)
8	8,39 (1H, <i>d</i> , 9,2 Hz)	8,44 (1H, <i>ddd</i>)
N-Me	3,65 (3H, <i>s</i>)	3,70 (3H, <i>s</i>)
OMe (C1)	4,02 (3H, <i>s</i>)	4,03 (3H, <i>s</i>)
OMe (C2)	3,91 (3H, <i>s</i>)	3,90 (3H, <i>s</i>)
OMe (C3)	3,98 (3H, <i>s</i>)	3,98 (3H, <i>s</i>)
OMe (C6)	3,89 (3H, <i>s</i>)	-

(a) 400 MHz, CDCl_3 ; (b) 200 Mhz, CDCl_3

TABELA 5.3 - Dados de RMN ^{13}C para a substância **4** e comparação com a metilarborinina (**8**)

1,2,3,6-tetrametoxi-N-metilacridona		
Carbono	Isolada(a) δ	MAFEZOLI, 2001(b) δ
1	154,6	154,4
2	137,9	137,8
3	157,4	157,7
4	93,0	92,7
5	97,9	114,3
6	163,5	132,8
7	109,3	121,1
8	129,6	127,3
9	175,7	176,4
11	141,9	141,7
12	112,0	111,9
13	118,4	123,7
14	143,6	141,7
NMe	34,6	34,6
OMe (C1)	61,8	61,8
OMe (C2)	61,4	61,4
OMe (C3)	55,9	55,9
OMe (C6)	55,5	-

(a) 100 MHz, CDCl_3 , (b) 50 MHz, CDCl_3

Substância **4**

Metilarborinina

FIGURA 5.14 – Comparação da substância **4** isolada com o alcalóide metilarborinina descrito na literatura.

5.2.3 - Determinação Estrutural da Substância 5

O alcalóide **5** do tipo acridônico foi isolado de diversas partes da planta *Conchocarpus marginatus*, mas foi isolado neste trabalho pela primeira vez na fração 2632CDAc 16-20, no qual foi extraído enquanto eluia-se a coluna com CH₂CL₂:AcOEt (8:2). Apresentou-se como um sólido amorfo de coloração amarela. Quando submetido à radiação UV em CCDA apresentou fluorescência nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm. Ao ser revelado em vanilina apresentou coloração amarela e em reagente de Dragendorff apresentou coloração alaranjada, sugerindo tratar-se de um alcalóide. Foi identificado através da análise dos experimentos RMN ¹H e ¹³C em 1D e 2D e por análise de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, levando à elucidação da substância **5** (FIGURA 5.15), um alcalóide ainda inédito na literatura.

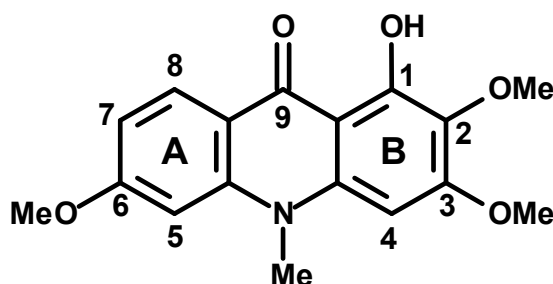


FIGURA 5.15 – Estrutura química do alcalóide 1-hidroxi-2,3,6-trimetoxi-N-metilacridona (substância 5)

O espectro de RMN ¹H da substância **5** apresentou sinais característicos de alcalóide acridônico (FIGURA 5.16). Aqueles em δ_H 8,25 (1H, *d*, *J* = 8,8 Hz); δ_H 6,80 (1H, *dd*, *J* = 8,8 e 2,0 Hz) e δ_H 6,71 (1H, *d*, *J* = 2,0 Hz) foram associados a hidrogênios de um anel aromático trissubstituído (anel A); o sinal δ_H 6,14 (1H, *s*) foi relacionado a um hidrogênio de anel aromático pentassubstituído (anel B); os sinais em δ_H 3,98 (3H, *s*), δ_H 3,94 (3H, *s*), δ_H 3,91 (3H, *s*) e δ_H 3,68 (3H, *s*) foram associados a grupos metilas ligados a heteroátomos (N ou O). O sinal em δ_H 14,86 (1H, *s*) indicou a presença de uma

hidroxila na posição *peri* a uma carbonila do esqueleto acridônico, referente à um sinal de hidrogênio quelado. A partir das constantes de acoplamentos calculadas acima foi possível verificar que o δ_H 6,80 apresenta um acoplamento do tipo *orto* com o δ_H 8,25 e apresenta também um acoplamento do tipo *meta* com o δ_H 6,71. Com esses dados foi possível atribuir as devidas posições de substituição do anel A (FIGURA 5.17). O espectro de RMN ^{13}C apresentou 17 sinais (FIGURA 5.18).

Analisando o espectro de HSQC (FIGURA 5.19) foi possível correlacionar o sinal δ_H 3,98 com δ_C 55,7. Também observa-se o sinal δ_H 3,94 correlacionando com δ_C 58,9 e o sinal δ_H 3,91 com δ_C 60,7. A partir desses valores foi possível sugerir uma posição de compressão estérica apenas para o δ_C 60,7, estando esta metoxila ligada a carbono *orto*-dissubstituído (FURUKAWA et al.,1983).

Para atribuir a posição das metoxilas no esqueleto do alcalóide foi necessário realizar uma análise de HMBC (FIGURA 5.20) onde este mostrou uma correlação do sinal δ_H 3,98 com δ_C 158,7, e do sinal δ_H 3,94 correlacionando com δ_C 164,4, sugerindo que estes carbonos encontravam-se nas posições C-3 e C-6 do alcalóide. Essa afirmação pôde ser justificada devido à presença de uma carbonila na posição C-9 dos alcalóides acridônicos, que causa uma desblindagem nesses núcleos de carbonos. O mapa de correlações de HMBC ainda mostrou que para o anel A trissubstituído, o sinal δ_H 6,80 apresentou acoplamento a longa distância (J^2) com δ_C 164,4, confirmando dessa maneira a presença da metoxila com sinal δ_H 3,94 em C-6. Já o sinal δ_H 6,14, referente ao anel B, apresenta esse acoplamento a longa distância (J^2) com δ_C 158,7, atribuindo a posição C-3 à metoxila em questão.

O espectro de massa da substância 10 (FIGURA 5.21) mostrou pico íon molecular com relação massa/carga de 215 daltons, sugerindo a presença de nitrogênio na molécula e, confirmando a fórmula molecular do alcalóide proposto, $C_{17}H_{17}NO_5$.

Através da análise dos resultados discutidos acima confirmou-se para a substância **5** a estrutura do alcalóide acridônico 1-hidroxi-2,3,6-trimetoxi-N-metilacridona, ainda inédito na literatura. Esta apresentou como diferença do alcalóide arborinina (**7**) o grupo metoxila na posição C6 ao invés do hidrogênio (FIGURA 5.22). Por se tratar de uma substância ainda inédita, não se dispunha de dados de RMN ^1H e ^{13}C na literatura para fazer-se uma comparação de valores de deslocamentos químicos, comparando-se então estes valores da estrutura proposta com a estrutura arborinina (BERGENTHAL et. al, 1979) (TABELA 5.4 e 5.5).

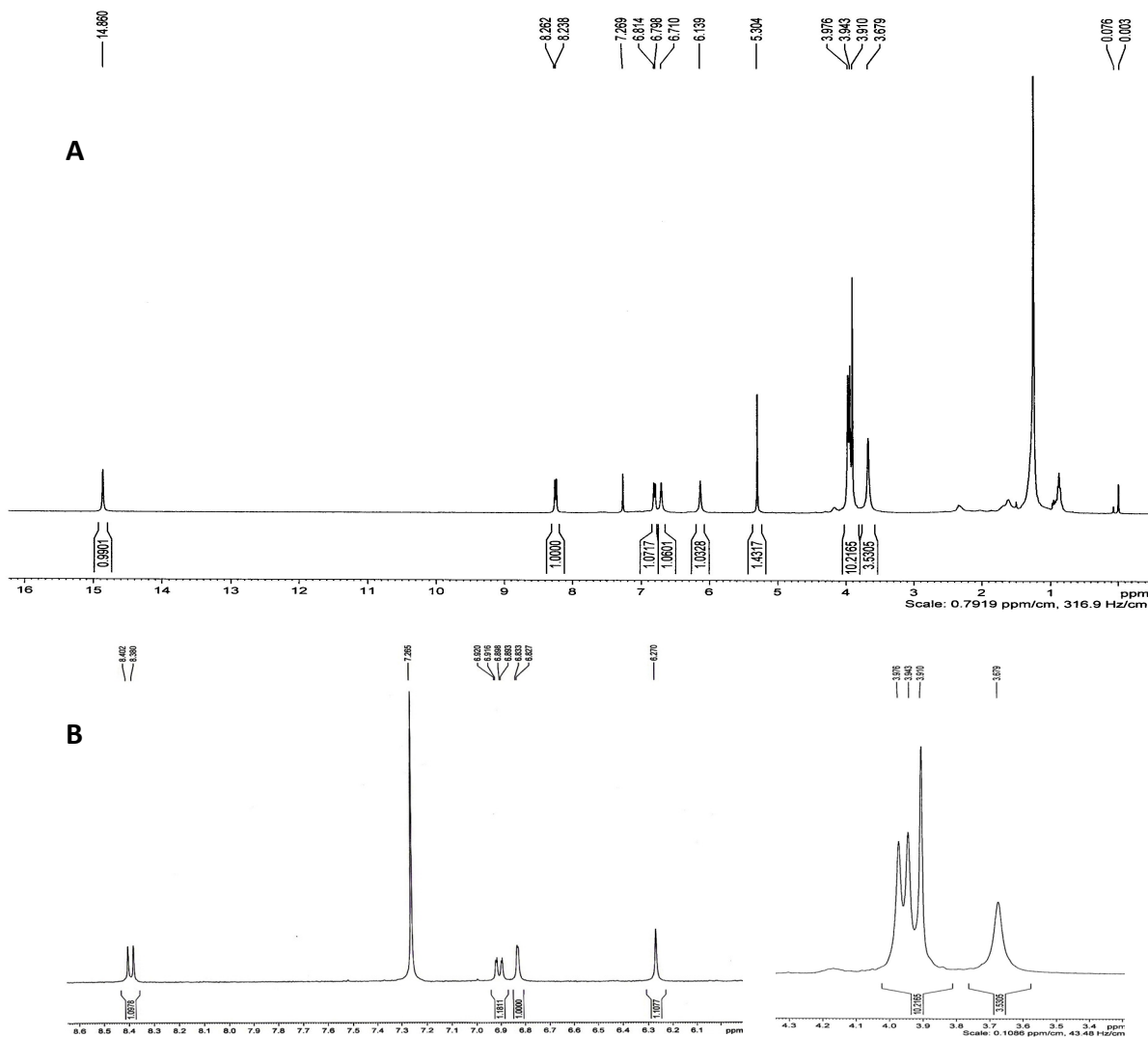


FIGURA 5.16 - Espectro de RMN ¹H da substância 5 (400MHz, CDCl₃); (B) espectro expandido na região dos H aromáticos (à esquerda) e região das metoxilas (à direita);

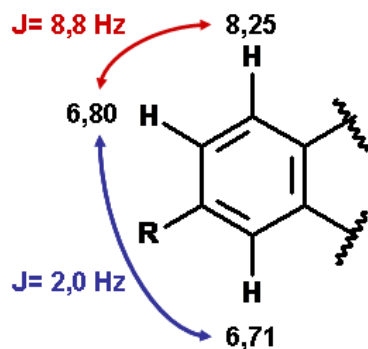


FIGURA 5.17 – Acoplamentos para os hidrogênios do anel A da substância 5.

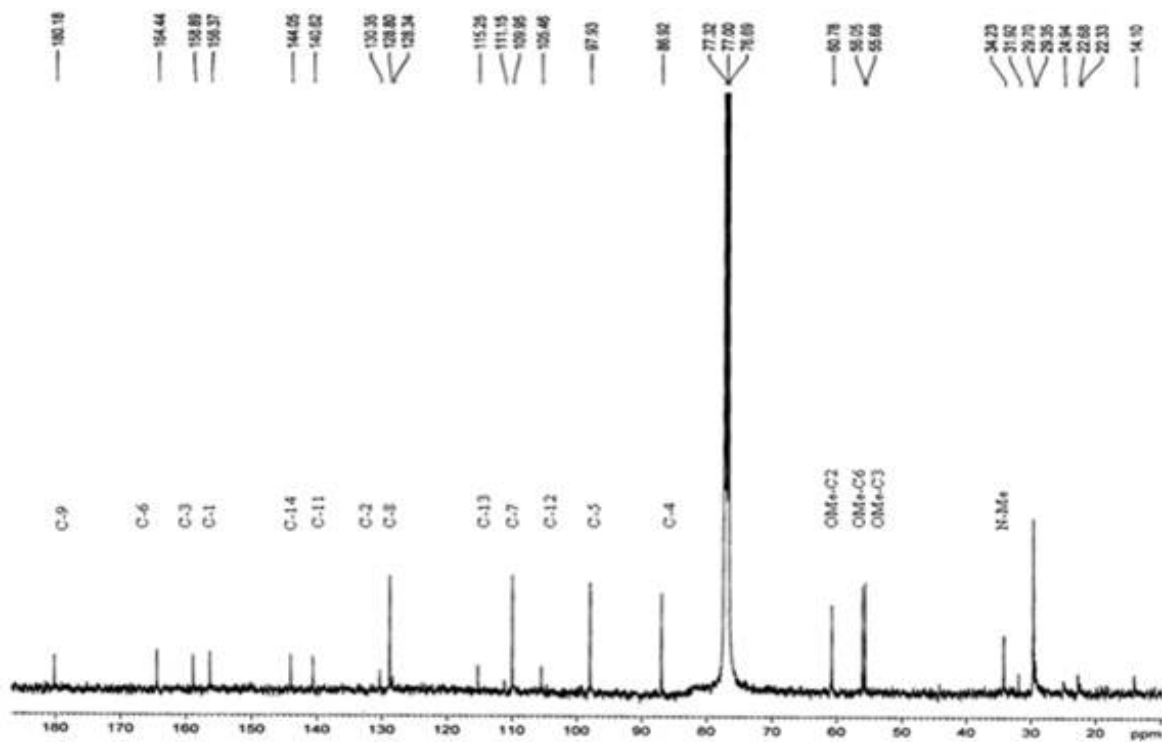


FIGURA 5.18 - Espectro de RMN ^{13}C da substância 5 (CDCl_3 , 100MHz).

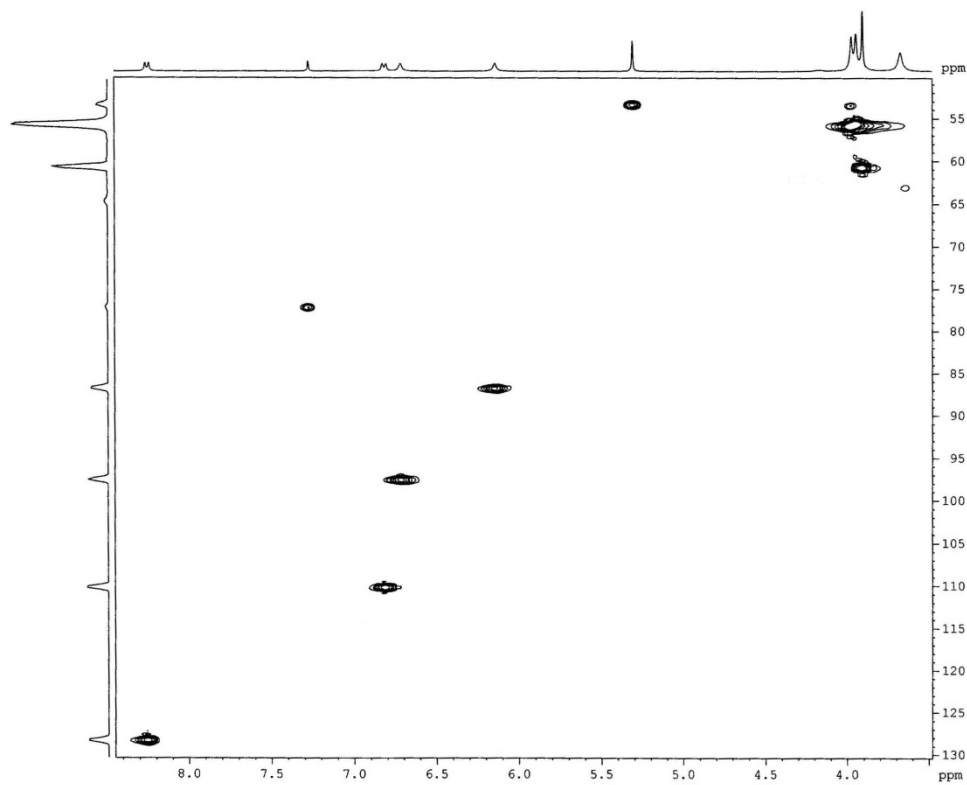


FIGURA 5.19 – Mapa de contorno de HSQC (CDCl_3 400 MHz) da substância 5.

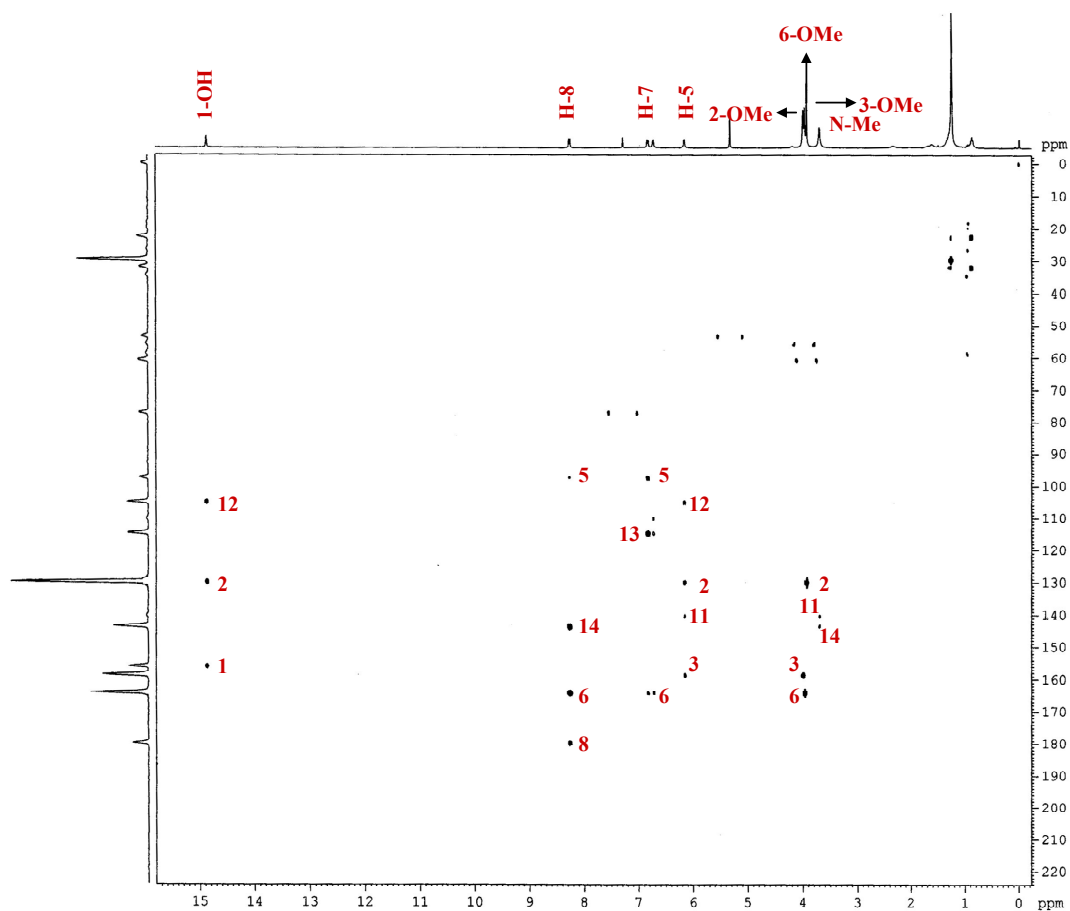


FIGURA 5.20- Mapa de contorno de HMBC (CDCl₃, 400 MHz) da substância 5.

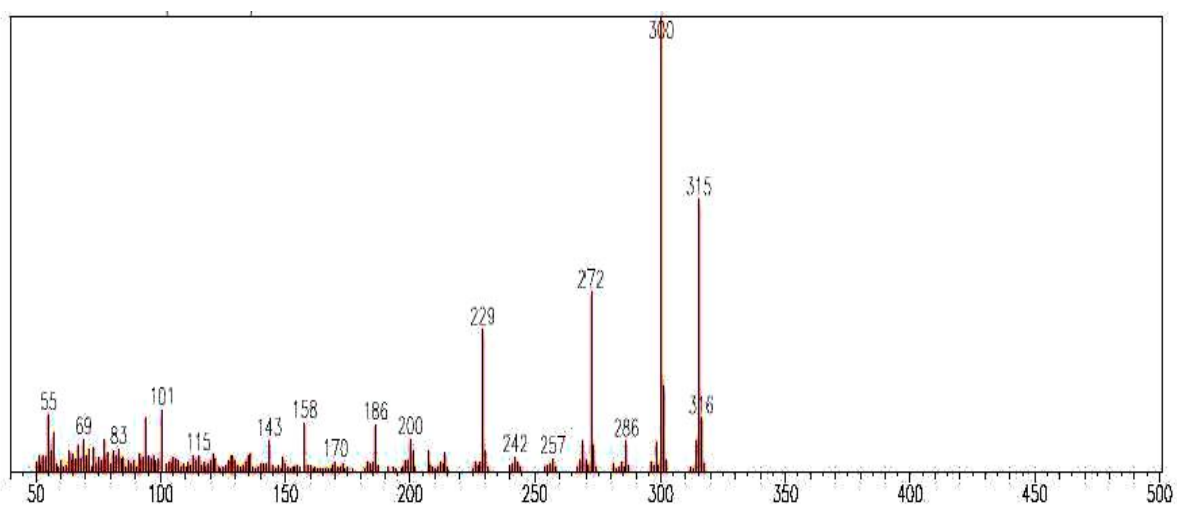


FIGURA 5.21 - Espectro de massas (IE = 70 eV) do alcalóide 1-hidroxi-2,3,6-trimetoxi-N-metilacridona (substância 5).

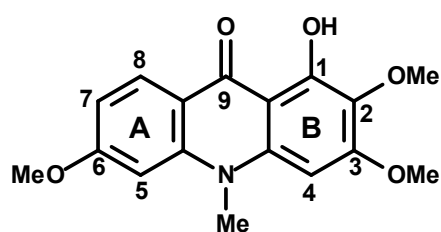
TABELA 5.4 - Dados de RMN ^1H para a substância **5** e comparação com a arborinina (**7**)

1-hidroxi-2,3,6-trimetoxi-N-metilacridona		
Hidrogênio	Isolada (a)	MAFEZOLI, 2001 (b)
	δ	δ
4	6,14 (1H, <i>s</i>)	6,18 (1H, <i>s</i>)
5	6,71 (1H, <i>d</i> , 2,0 Hz)	7,45 (1H, <i>dl</i>)
6	-	7,24 (1H, <i>ddd</i>)
7	6,80 (1H, <i>dd</i> , 8,8 e 2,0 Hz)	7,68 (1H, <i>ddd</i>)
8	8,25 (1H, <i>d</i> , 8,8 Hz)	8,34 (1H, <i>dd</i>)
N-Me	3,68 (3H, <i>s</i>)	3,77 (3H, <i>s</i>)
OMe (C-2)	3,91 (3H, <i>s</i>)	3,91 (3H, <i>s</i>)
OMe (C-3)	3,98 (3H, <i>s</i>)	3,99 (3H, <i>s</i>)
OMe (C-6)	3,94 (3H, <i>s</i>)	-
OH	14,15 (1H, <i>s</i>)	14,75(1H, <i>s</i>)

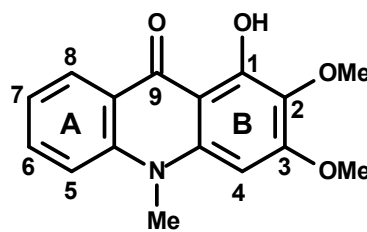
(a) 400 MHz, CDCl_3 ; (b) 200 Mhz, CDCl_3

TABELA 5.5 - Dados de RMN ^{13}C para a substância **5** isolada e comparação com a arborinina (**7**)

1-hidroxi-2,3,6-trimetoxi-N-metilacridona		
Carbono	Isolada(a) δ	BERGENTHAL, 1979 (b) δ
1	156,4	155,7
2	130,4	129,9
3	158,9	159,1
b4	86,9	86,7
5	97,9	114,5
6	164,4	133,7
7	110,0	121,2
8	128,3	126,0
9	180,2	180,4
11	140,6	140,1
12	105,5	105,3
13	115,3	120,3
14	144,0	141,6
NMe	34,2	33,8
OMe (C2)	60,8	60,6
OMe (C3)	55,7	55,8
OMe (C6)	56,1	-

(a) 100 MHz, CDCl_3 , (b) 50 Mhz, CDCl_3 

Substância 4



Arborinina

FIGURA 5.22 – Comparação da substância 5 isolada com o alcalóide arborinina descrito na literatura.

5.2.4 – Identificação da Substância 6

O alcalóide do tipo acridônico foi isolado da fração 2632FD62-67 das folhas de *Conchocarpus marginatus* e apresentou-se como um sólido cristalino de coloração amarela intensa. Foi identificado através da realização dos experimentos RMN de ^1H e ^{13}C em 1D e 2D, por análise de CG-EM e também por comparação com dados da literatura, levando à determinação do alcalóide acridônico 1-hidroxi-3-metoxi-N-metil acridona (Figura 5.23).

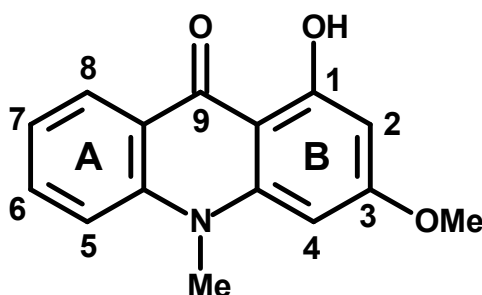


FIGURA 5.23 - Estrutura do alcalóide 1-hidroxi-3-metoxi-N-metil acridona (Substância 6).

Foi realizada uma análise do espectro de RMN ^1H (FIGURA 5.24) onde o sinal em δ_{H} 14,83 (1H, *s*) foi relacionado à um hidrogênio de uma hidroxila na posição *peri* a um grupo carbonílico. Os sinais em δ_{H} 8,44 (1H, *dd*, $J = 8$ e 1,6 Hz); δ_{H} 7,71 (1H, *ddd*, $J = 8,8$; 7,2 e 2,0 Hz); δ_{H} 7,47 (1H, *dl*, $J = 8,8$ Hz) e δ_{H} 7,28 (1H, *ddd*, $J = 8,0$; 7,2 e 0,8 Hz) foram associados a hidrogênios de um anel aromático *orto*-dissubstituído (anel A). Aquele em δ_{H} 6,29 (2H, *d*, $J = 2,4$ Hz) foi associado à 2 hidrogênios de um anel aromático tetra-substituído (anel B). Os sinais em δ_{H} 3,90 (3H, *s*) e δ_{H} 3,78 (3H, *s*) foram relacionados a grupos metila ligados a heteroátomos (N ou O). Analisando o espectro de COSY (FIGURA 5.25) juntamente com as constantes de acoplamento calculadas acima foi possível atribuir as posições para o anel A *orto*-dissubstituído, onde o sinal δ_{H} 8,44 acopla-se com o δ_{H} 7,28 (acoplamento do tipo *orto*, com $J = 8,0$ Hz) e com o δ_{H} 7,71 (acoplamento do tipo *meta*, com $J = 1,6$ Hz); o sinal δ_{H} 7,71

acopla-se com o sinal δ_H 7,47 (acoplamento do tipo *orto*, com $J = 8,8$ Hz) e com o δ_H 7,28 (acoplamento do tipo *orto*, com $J = 7,2$ Hz). Essas correlações podem ser observadas na FIGURA 5.26. Por sua vez, analisando o espectro de ^{13}C foi possível verificar a presença de 14 sinais (FIGURA 5.27).

A atribuição das posições do anel B é possível analisando os mapas de correlações HSQC e HMBC (FIGURA 5.28 e 5.29), onde o espectro de HSQC mostra que o sinal δ_H 3,90 correlaciona-se com δ_C 55,6, sugerindo com esse valor de deslocamento químico que a metoxila não está ligada a um carbono *orto* dissubstituído (FURUKAWA, et. al., 1983). Para o sinal δ_H 3,78, tem-se a correlação com δ_C 34,0, indicando tratar-se de um grupo metila ligado ao nitrogênio, cujo valor indica ausência de grupos substituintes na posição *peri* ao nitrogênio (GROEGER, 1988). Já o experimento de HMBC apontou correlação do sinal δ_H 3,90 com o sinal δ_C 166,1, valor esse relacionado com metoxilas ligadas a carbonos nas posições C1 ou C-3 do anel, devido à presença de uma carbonila na posição C-9 que desblinda os núcleos de carbono nessas posições. A união dos resultados mais a informação da presença de uma hidroxila *peri* a carbonila permitem atribuir as posições para o anel B, onde a metoxila estaria ligada ao C-3.

A confirmação da massa molecular foi obtida através do espectro de massas (IE, 70Ev) que apresentou o pico do íon molecular com razão massa/carga 255 daltons (FIGURA 5.30), confirmando a fórmula proposta $C_{15}H_{13}NO_3$. A análise dos dados experimentais obtidos, juntamente com a comparação destes com dados da literatura (BERGENTHAL et al., 1979) (TABELA 5.6 e 5.7), pôde-se concluir que a substância identificada é o alcalóide acridônico 1-hidroxi-3-metoxi-N-metil acridona.

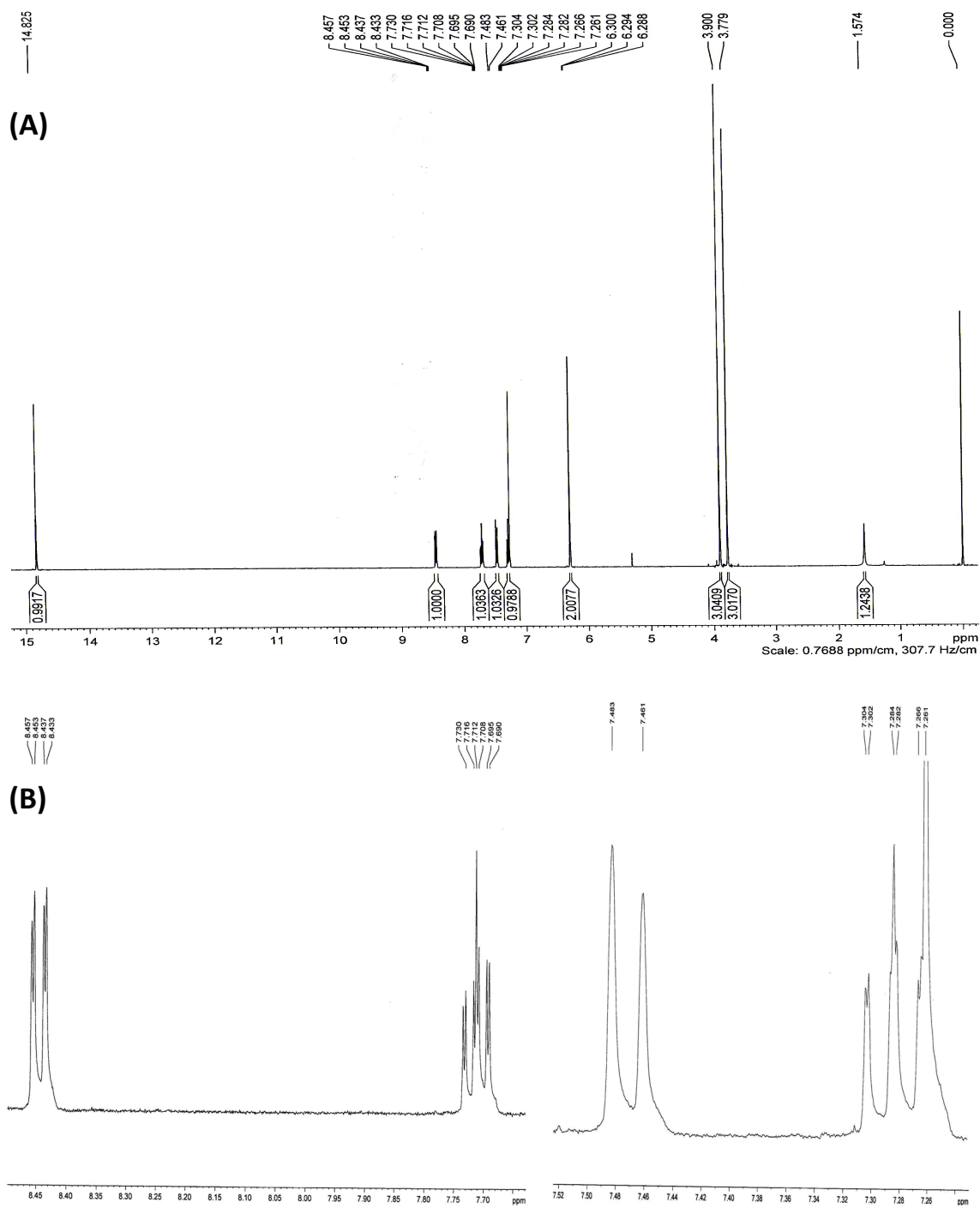


FIGURA 5.24 - (A) Espectro de RMN ^1H da substância 6(CDCl_3 , 400 MHz); (B) expansão na região dos hidrogênios aromáticos;

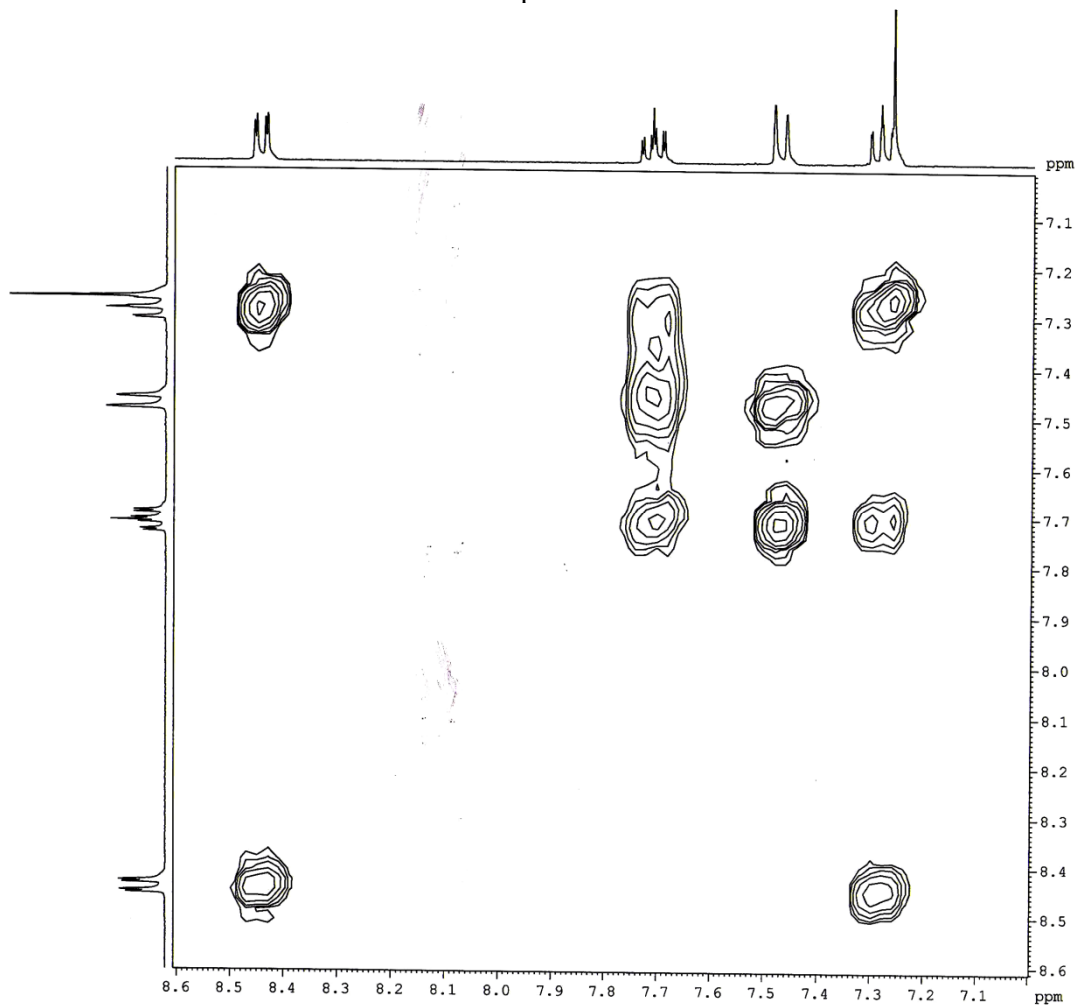


FIGURA 5.25 - Mapa de contorno de COSY da substância 6 (CDCl_3 , 400 MHz).

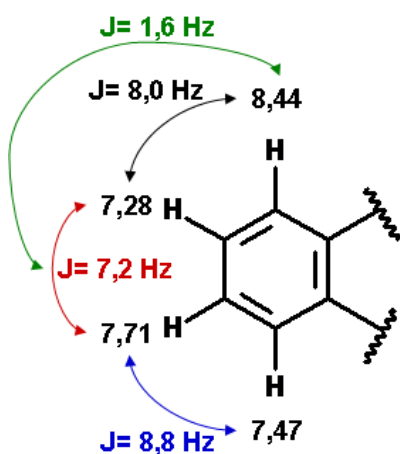


FIGURA 5.26 – Acoplamentos para os hidrogênios do anel A da substância 6.

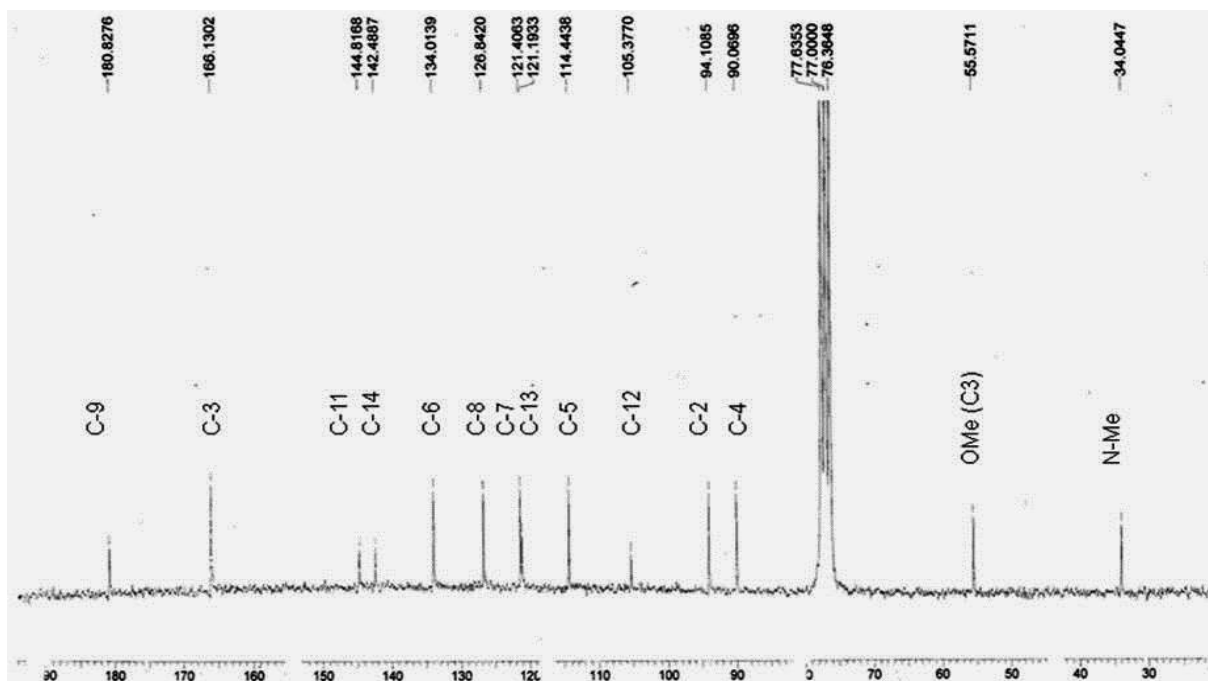


FIGURA 5.27 - Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) da substância 6.

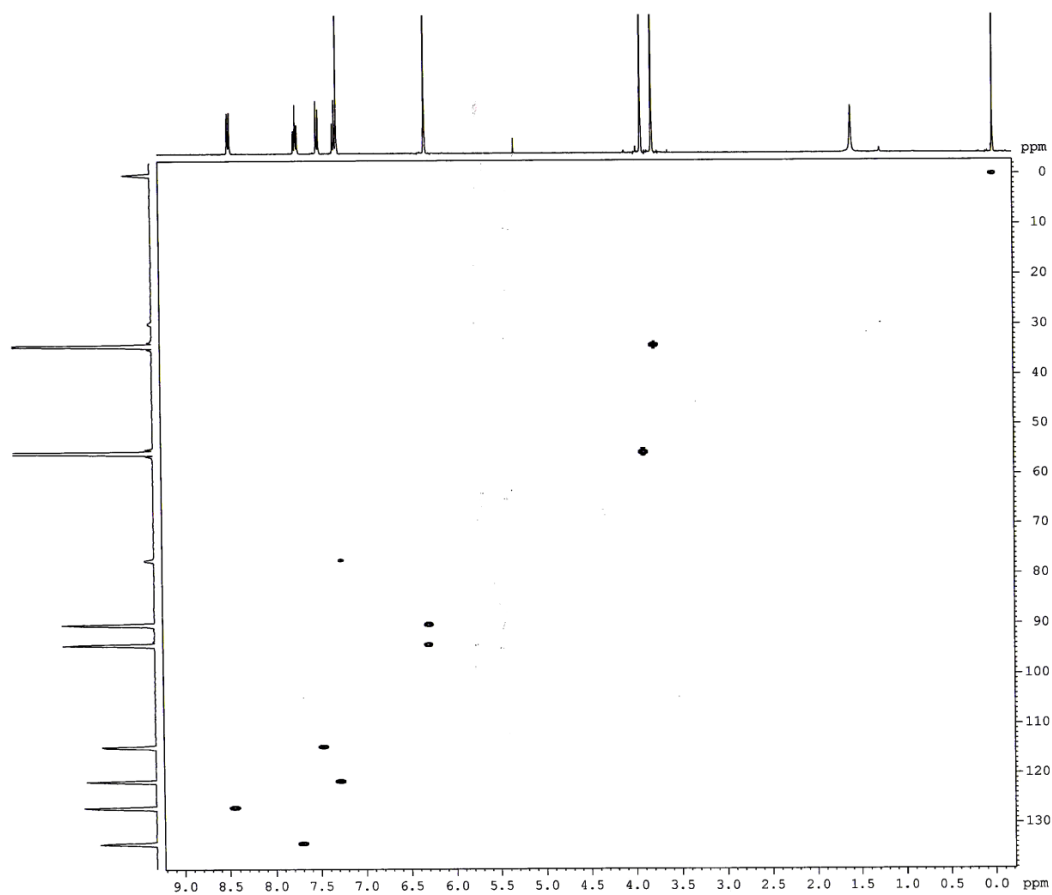


FIGURA 5.28 - Espectro de HSQC da substância 6 (CDCl_3 , 400 MHz).

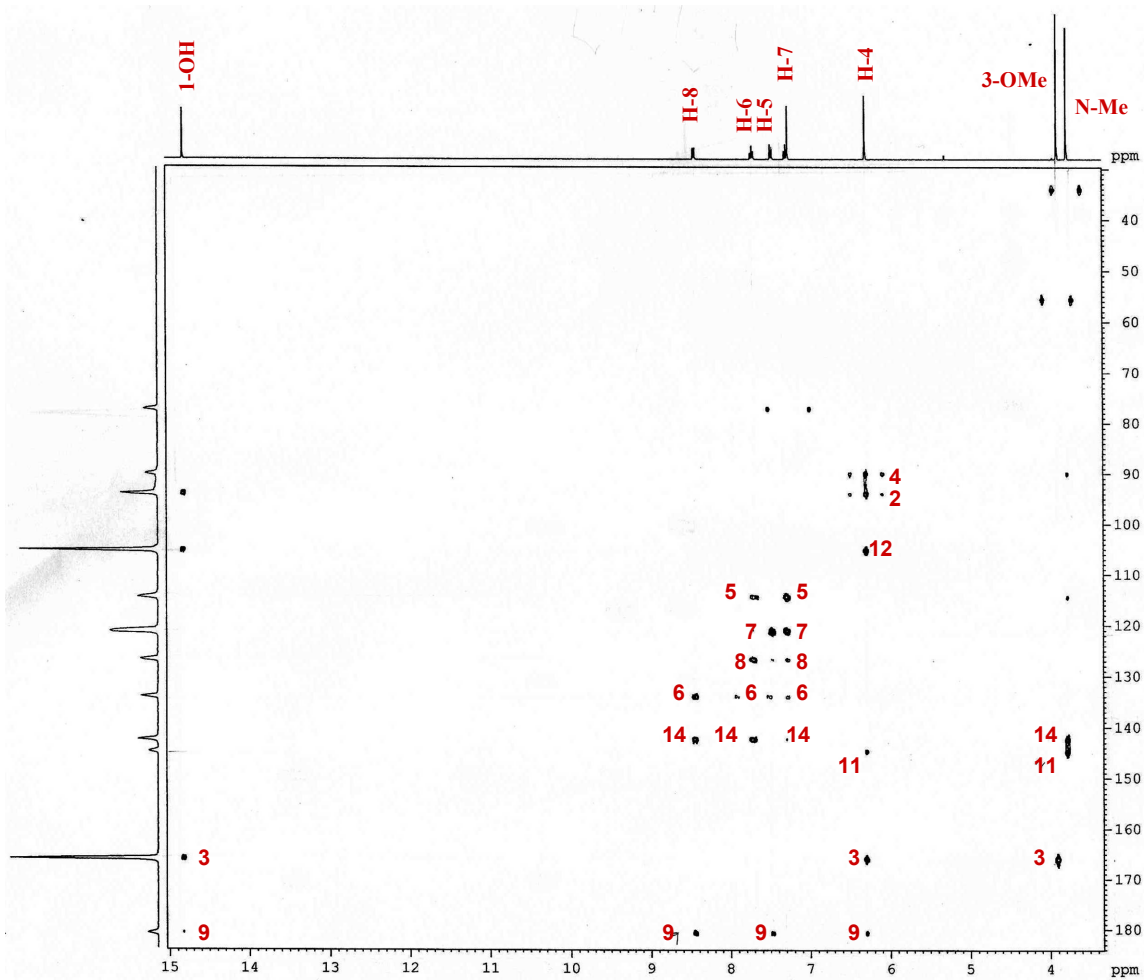


FIGURA 5.29- Mapa de contorno de HMBC da substância 6 (CDCl₃, 400 MHz).

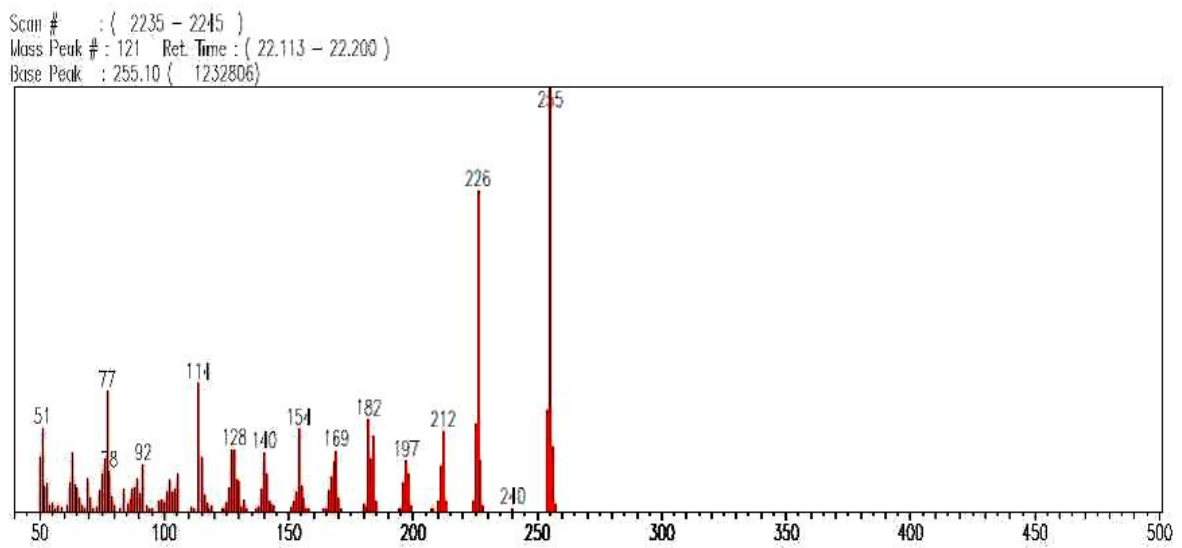


FIGURA 5.30 – Espectro de massas da substância 6 (IE = 70 eV).

TABELA 5.6 - Dados de RMN ^1H para substância **6** e comparação com a literatura.

1-hidroxi-3-metoxi-N-metil acridona		
Hidrogênio	Isolada (a)	BERGENTHAL, 1979
	δ	(b) δ
2	6,29 (2H, <i>d</i> , 2,4 Hz)	6,29 (2H, <i>dd</i>)
4	6,29 (2H, <i>d</i> , 2,4 Hz)	6,29 (2H, <i>dd</i>)
5	7,47 (1H, <i>dl</i> , 8,8 Hz)	7,47 (1H, <i>dl</i>)
6	7,71 (1H, <i>ddd</i> , 8,8; 7,2 e 1,6 Hz)	7,71 (1H, <i>ddd</i>)
7	7,28 (1H, <i>ddd</i> , 8,0; 7,2 e 0,8 Hz)	7,28 (1H, <i>ddd</i>)
8	8,44 (1H, <i>dd</i> , 8 e 1,6 Hz)	8,44 (1H, <i>ddd</i>)
N-Me	3,78 (3H, <i>s</i>)	3,78 (3H, <i>s</i>)
OMe (C3)	3,90 (3H, <i>s</i>)	3,90 (3H, <i>s</i>)
OH	14,83 (1H, <i>s</i>)	14,83 (1H, <i>s</i>)

(a) 400 MHz, CDCl_3 ; (b) 50 Mhz, CDCl_3

TABELA 5.7 - Dados de RMN ^{13}C para substância **6** e comparação com a literatura.

1-hidroxi-3-metoxi-N-metil acridona		
Carbono	Isolada (a)	BERGENTHAL, 1979 (b)
	δ	δ
1	164,2	164,6
2	94,1	94,3
3	166,1	165,7
4	90,1	89,7
5	114,4	115,7
6	134,0	134,2
7	121,4	121,3
8	126,8	125,4
9	180,8	179,6
11	144,8	144,4
12	105,4	104,3
13	121,2	119,9
14	142,5	141,9
N-Me	34,0	34,0
OMe (C3)	55,6	55,5

(a) 100 MHz, CDCl_3 ; (b) 20 Mhz, CDCl_3

5.2.5 - Identificação da Substância 7

A substância 7, um alcalóide do tipo acridônico, foi obtida em mistura com a substância 5, das folhas de *Conchocarpus marginatus* da fração 2632FD 68-75. Esta por sua vez, em CCDA, apresentou fluorescência sob radiação UV, coloração amarela quando revelada em vanilina e alaranjada com reagente de Dragendorff, sugerindo dessa maneira a presença de um alcalóide. A substância 7 foi identificada através da análise dos experimentos RMN de ^1H e ^{13}C em 1D e 2D, por análise de CG-EM e também por comparação com dados da literatura, permitindo a identificação do alcalóide 1-hidroxi-2,3-dimetoxi-N-metil acridona, conhecido como Arborinina (FIGURA 5.31)

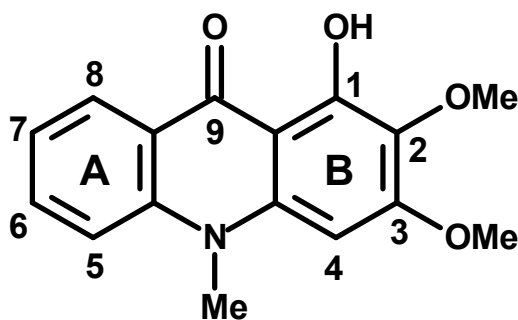


FIGURA 5.31 - Estrutura do alcalóide 1-hidroxi-2,3-dimetoxi-N-metil acridona (substância 7).

O espectro de RMN ^1H da fração em questão apresentou, além dos sinais correspondentes à substância 5 (discutidos na seção 5.2.3), sinais referentes à substância 7, característicos de alcalóide acridônico (FIGURA 5.32). Aqueles em δ_{H} 8,47 (1H, *dd*, $J = 8$ e 1,6 Hz); δ_{H} 7,73 (1H, *ddd*, $J = 8,8$; 6,8 e 1,6 Hz); δ_{H} 7,52 (1H, *dl*, $J = 8,8$ Hz); δ_{H} 7,31 (1H, *ddd*, $J = 8,0$; 6,8 e 0,8 Hz) foram associados a hidrogênios de um anel aromático *orto* dissubstituído; o sinal δ_{H} 6,29 (1H, *s*) foi relacionado a um hidrogênio de anel aromático pentassubstituído; os sinais δ_{H} 4,04 (3H, *s*); δ_{H} 3,94 (3H, *s*) e δ_{H} 3,85 (3H, *s*)

foram associados a grupos metilas ligados a heteroátomos (N ou O); e o sinal em δ_H 14,77 (1H, s) foi relacionado a um hidrogênio de hidroxila quelado (*peri* a uma carbonila).

Analisando o espectro de COSY (FIGURA 5.33) juntamente com as constantes de acoplamento calculadas foi possível verificar o acoplamento do sinal δ_H 8,47 com o δ_H 7,31 ($J= 8$ Hz) e verificou-se também o acoplamento do sinal δ_H 7,73 com aqueles em δ_H 7,52 ($J= 8,8$ Hz) e δ_H 7,31 ($J= 6,8$ Hz). Dessa maneira foi possível atribuir as posições dos hidrogênios para o anel *orto*-dissubstituído (FIGURA 5.34).

Analisando os sinais dos grupos metilas ligados a heteroátomos, com o auxílio do espectro de HSQC (FIGURA 5.35) é possível verificar uma correlação do sinal δ_H 4,04 com o δ_C 55,8 e do sinal δ_H 3,94 com o δ_C 60,8, que foram associados a grupos metoxilas aromáticas, onde aquele em δ_C 60,8 evidencia uma metoxila ligada à um carbono *orto*-dissubstituído (FURUKAWA, et. al., 1983). O sinal δ_H 3,85 correlacionou-se com o δ_C 34,5, indicando ser este um grupo metila ligada à um Nitrogênio, onde o valor de deslocamento químico do carbono sugere a ausência de grupos substituintes nas posições C-4 e C-5 do alcalóide (GROEGER, 1988).

O estudo do mapa de correlações HMBC (FIGURA 5.36) mostra que o sinal δ_H 4,04 correlaciona-se com δ_C 159,3 e que o sinal δ_H 3,94 correlaciona-se com o δ_C 130,1. Esses valores sugerem que para o primeiro caso, como o valor de deslocamento químico para este núcleo de carbono está mais desblindado, trata-se de uma metoxila ligada a um carbono em posição C-1 ou C-3. Este fato pode ser explicado devido à presença de uma carbonila em C-9 provocando esse efeito. Reunindo todas as informações foi possível atribuir para a metoxila com δ_H 4,04 a posição C-3, uma vez que a posição C-1 está ocupada por uma carbonila juntamente com o fato de tratar-se de uma metoxila livre de compressão estérica.

O espectro de massas da substância **7** (FIGURA 5.37) mostrou pico do íon molecular com relação massa/carga de 285 daltons, sugerindo a presença de nitrogênio na molécula e confirmando a fórmula molecular do alcalóide, $C_{16}H_{15}NO_4$.

A análise dos dados obtidos, juntamente com a comparação com dados da literatura, permitiu atribuir para a substância **7** a estrutura do alcalóide acridônico arborinina. Os valores de deslocamentos químicos de 1H e ^{13}C da substância **7** com os valores da literatura (BERGENTHAL et al., 1979) confirmaram a identidade entre as mesmas (TABELA 5.8 e 5.9).

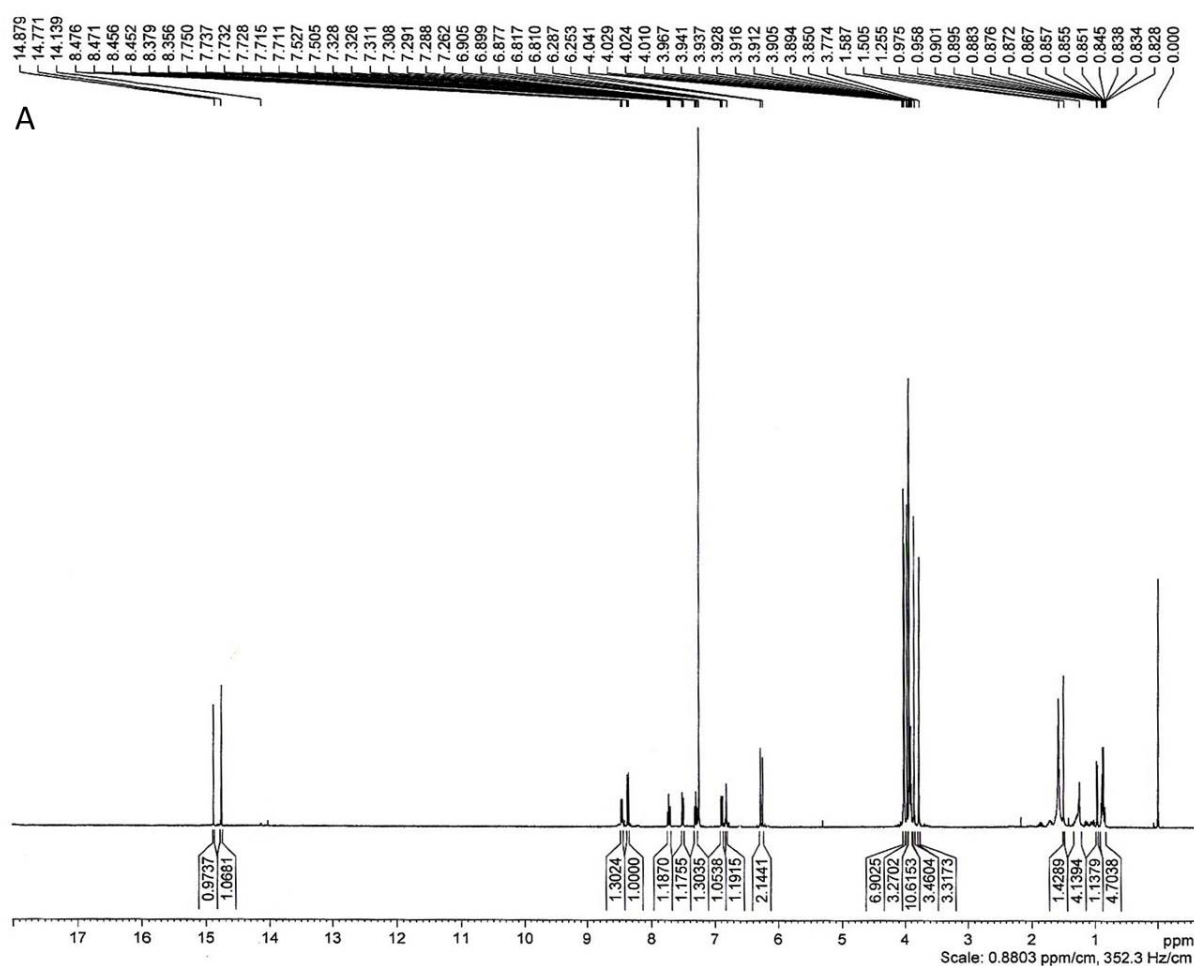


FIGURA 5.32 – (A) Espectro de RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz) da substância **7** em mistura com substância **5**;

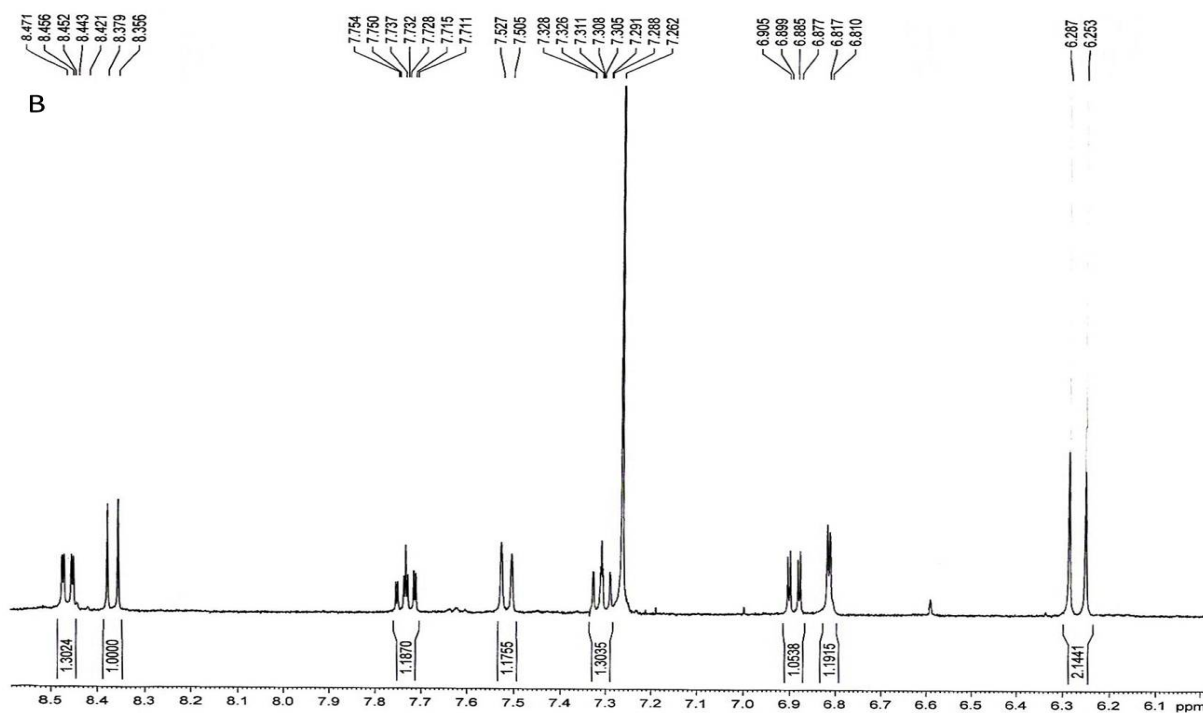


FIGURA 5.32 (continuação) - (B) expansão do espectro na região dos hidrogênios aromáticos.

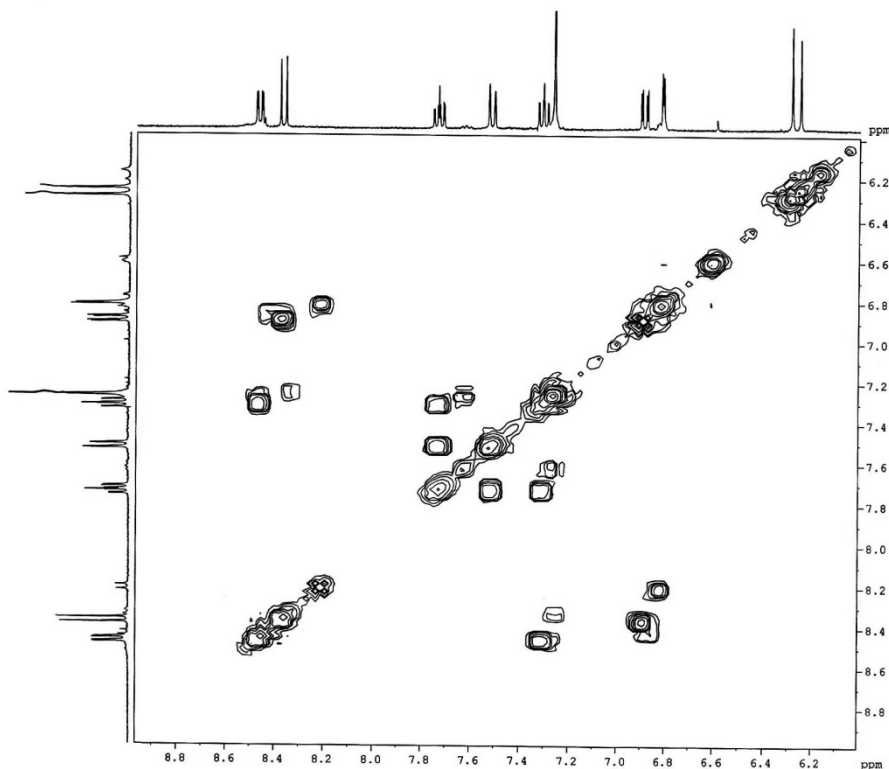


FIGURA 5.33 - Mapa de contorno de COSY (CDCl_3 , 400 MHz) da substância 7 com a substância 5.

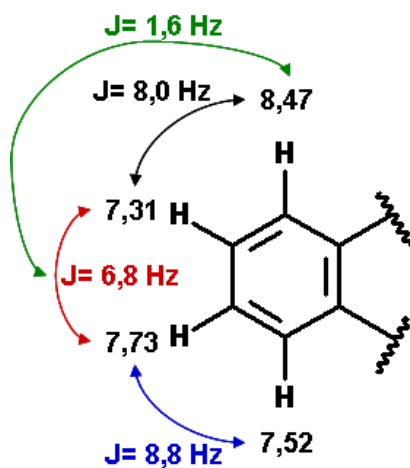


FIGURA 5.34 – Acoplamentos para os hidrogênios do anel A da substância 7.

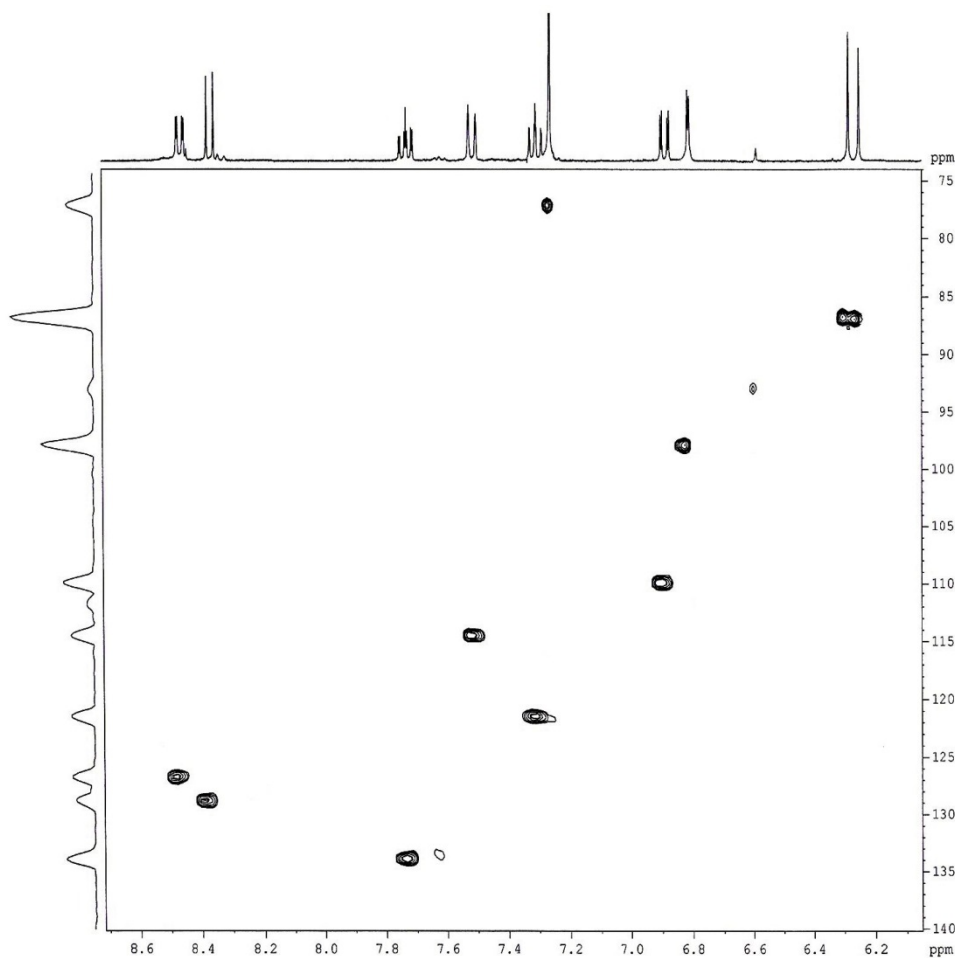


FIGURA 5.35 - Mapa de contorno de HSQC (CDCl_3 , 400 MHz) da substância 7 com a substância 5.

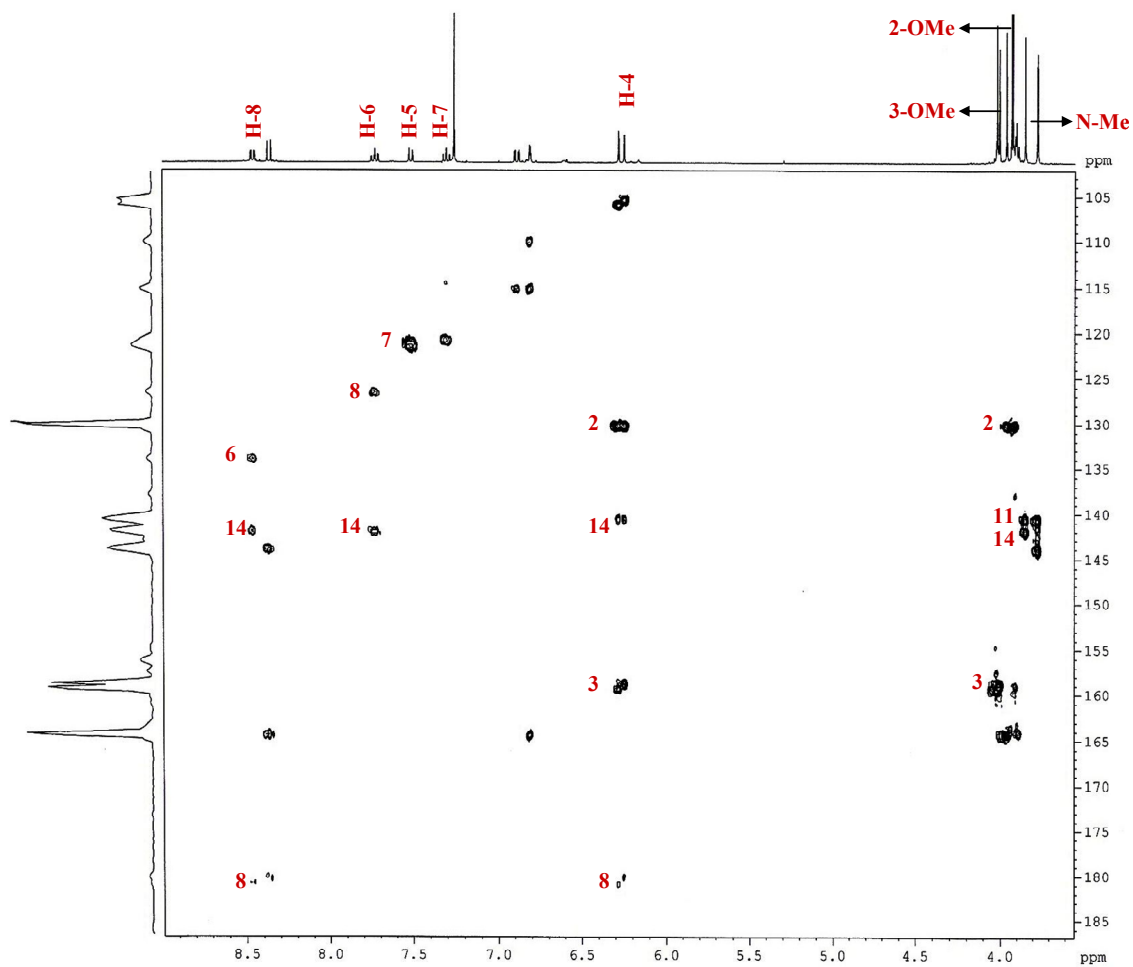


FIGURA 5.36 - Mapa de contorno de HMBC da arborinina (substância 7).

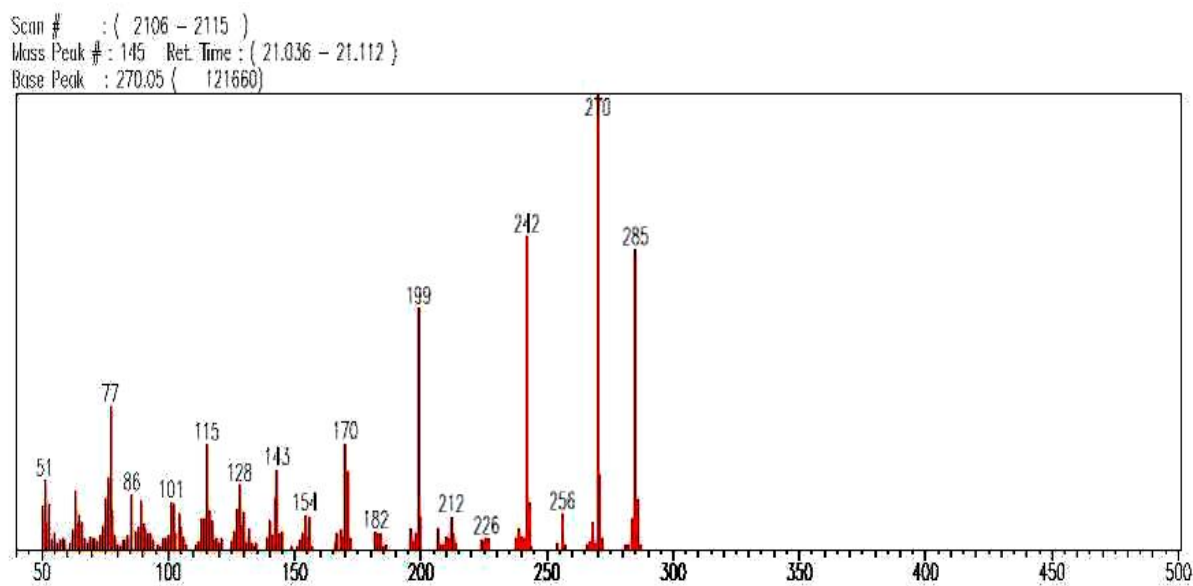


FIGURA 5.37 – Espectro de massas da arborinina (substância 7) (IE = 70 eV).

TABELA 5.8 - Dados de RMN ^1H para a substância **7** e comparação com a literatura.

1-hidroxi-2,3-dimetoxi-N-metilacridona		
Hidrogênio	Isolada (a)	MAFEZOLI, 2001
	δ	(b) δ
4	6,29 (1H, <i>s</i>)	6,18 (1H, <i>s</i>)
5	7,52 (1H, <i>dl</i> , J= 8,8 Hz)	7,45 (1H, <i>dl</i>)
6	7,73 (1H, <i>ddd</i> , J= 8,8; 6,8 e 1,6 Hz)	7,68 (1H, <i>ddd</i>)
7	7,31 (1H, <i>ddd</i> , J= 8,0; 6,8 e 0,8 HZ)	7,24 (1H, <i>ddd</i>)
8	8,47 (1H, <i>dd</i> , J= 8 e 1,6 Hz)	8,34 (1H, <i>dd</i>)
N-Me	3,85 (3H, <i>s</i>)	3,77 (3H, <i>s</i>)
OMe (C-2)	3,94 (3H, <i>s</i>)	3,91 (3H, <i>s</i>)
OMe (C-3)	4,04 (3H, <i>s</i>)	3,99 (3H, <i>s</i>)
OH	14,77 (3H, <i>s</i>)	14,75 (1H, <i>s</i>)

(a) 400 MHz, CDCl_3 ; (b) 200 Mhz, CDCl_3

TABELA 5.9 - Dados de RMN ^{13}C para a substância **7** e comparação com a literatura.

Arborinina		
Carbono	Isolada (a)	BERGENTHAL, 1979 (b)
	δ	δ
1	156,2	155,7
2	130,1	129,9
3	159,3	159,1
4	87,0	86,7
5	114,3	114,5
6	134,1	133,7
7	121,6	121,2
8	126,9	126,0
9	180,4	180,4
11	140,7	140,1
12	105,9	105,3
13	NO	120,3
14	142,0	141,6
N-Me	34,5	33,8
OMe (C-2)	60,8	60,6
OMe (C-3)	55,8	55,8

(a) 100 MHz, CDCl_3 ; (b) 50 MHz, CDCl_3 ; NO: Não Observado

5.2.6 - Identificação da Substância 8

O alcalóide do tipo acridônico foi obtido em mistura com a substância 4 nas folhas de *Conchocarpus marginatus* no extrato diclorometânico fração 2632FD 70-75. Apresentou-se como um sólido amorfo de coloração amarela. Quando submetido à radiação UV em CCDA apresentou fluorescência nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm. Ao ser revelado em vanilina este apresentou coloração amarela e em reagente de Dragendorff apresentou coloração alaranjada, sugerindo tratar-se de um alcalóide. A substância em questão foi identificada através da análise dos experimentos RMN de ^1H e ^{13}C em 1D e 2D, por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e também por comparação com dados da literatura, permitindo dessa maneira confirmar para a substância 8 a estrutura do alcalóide acridônico já conhecido metilarborinina (1,2,3-tri-metoxi-N-metil acridona (FIGURA 5.38)).

Por se tratar de uma mistura de duas substâncias, o espectro de RMN ^1H apresentou sinais para ambas estruturas, mas através da integração destes foi possível diferenciar os sinais de cada uma delas, sendo atribuído para a substância 8 aqueles de menor intensidade (FIGURA 5.39). O espectro de RMN ^1H apresentou sinais característicos de alcalóide acridônico. Os sinais em δ_{H} 8,47 (1H, *ddd*, $J = 7,6; 2,0$ e $0,4$ Hz); δ_{H} 7,59 (1H, *ddd*, $J = 7,6; 6,8$ e $0,8$ Hz); δ_{H} 7,35 (1H, *dl*, $J = 8,8$ Hz) e δ_{H} 7,21 (1H, *ddd*, $J = 8,8; 6,8$ e $2,0$ Hz) foram associados a um anel aromático *orto* dissubstituído. O sinal em δ_{H} 6,53 (1H, *s*) foi relacionado a um hidrogênio de anel aromático pentassubstituído, e aqueles em δ_{H} 4,03 (3H, *s*); δ_{H} 3,99 (3H, *s*); δ_{H} 3,91 (3H, *s*) e δ_{H} 3,74 (3H, *s*) foram associados a grupos metilas ligados a heteroátomos (O ou N). A ausência do sinal em aproximadamente δ_{H} 14 (1H, *s*) referente a um hidrogênio quelado, indicou a presença de uma metoxila na posição *peri* a uma carbonila do esqueleto acridônico. Uma vez que um dos anéis do alcalóide é *orto*-dissubstituído, foi possível atribuir as posições desses hidrogênios a partir das

constantes de acoplamento calculadas. Essas atribuições podem ser observadas através da FIGURA 5.40.

Através do mapa de correlações HSQC (FIGURA 5.41) observa-se as correlações dos sinais de ^1H em δ_{H} 4,03 com o carbono com deslocamento químico em δ_{C} 61,7, do δ_{H} 3,99 δ com o δ_{C} 56,0, do δ_{H} 3,91 com o δ_{C} 61,2, e também do sinal δ_{H} 3,74 com o carbono em δ_{C} 35,0 δ . O valor de deslocamento químico do Carbono em δ_{C} 35,0 sugere um grupo metila ligado ao Nitrogênio sem substituintes em C-4 e C-5 (GROEGER, 1988), atribuindo-se para os três sinais de $^1\text{H}_3$ restantes às metilas nas posições C-1, C-2 e C-3. Esses valores também sugerem que os carbonos cujos núcleos são os mais desblindados, em 61,7 e 61,2 δ , são referentes às metoxilas ligadas a carbonos *orto*-dissubstituído, sob efeito de compressão estérica, diferente do carbono em 56,0 δ cujo valor de deslocamento químico sugere que este esteja livre desse efeito (FURUKAWA, et. al., 1983). Dessa maneira pode-se atribuir à posição C-3 a metoxila com carbono em 56,0 δ .

Ao analisar o mapa de correlações HMBC (FIGURA 5.42) observa-se para a metoxila em δ_{H} 4,03 uma correlação com o carbono em δ_{C} 154,5 δ , para a metoxila em δ_{H} 3,99 observa-se uma correlação com um carbono em δ_{C} 157,3, e para a metoxila em δ_{H} 3,91 uma correlação com um carbono em δ_{C} 137,6. A partir desses valores pode-se atribuir para os carbonos cujos núcleos estejam mais desblindados as posições C-1 e C-3, devido à presença da carbonila na posição C-9 dos alcalóides acridônicos provocando esse efeito, e para o carbono em 137,6 δ a posição C-2, uma vez que a posição C-4 deve estar livre. Dessa maneira, juntando os dados dos mapas de correlação de HSQC e HMBC é possível atribuir as posições desses hidrogênios na molécula, onde o hidrogênio em 4,03 δ é atribuído à MeO-1, o δ_{H} 3,99 é atribuído à MeO-3 e aquele em δ_{H} 3,91 é atribuído à MeO-2.

A análise por CG-EM dessa fração identificou duas bandas cromatográficas, referentes às substâncias **8** (banda 4) e **4** (banda 5) (FIGURA

5.40). O espectro de massas da substância **8** apresentou pico íon molecular com relação massa/carga de 299 daltons, confirmando a presença de nitrogênio na molécula e, confirmando a fórmula molecular $C_{17}H_{17}NO_4$.

Os dados de RMN de 1H e ^{13}C da substância **8** com os valores da metilarborinina encontrados na literatura (MAFEZOLI, 2001) confirmaram a identidade entre as mesmas (TABELA 5.10 e 5.11).

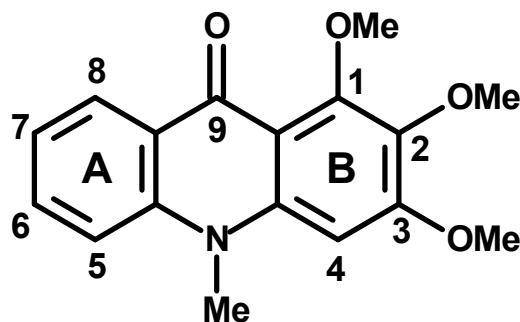


FIGURA 5.38 - Estrutura do alcaloide 1,2,3-tri-metoxi-N-metil acridona (substância 8).

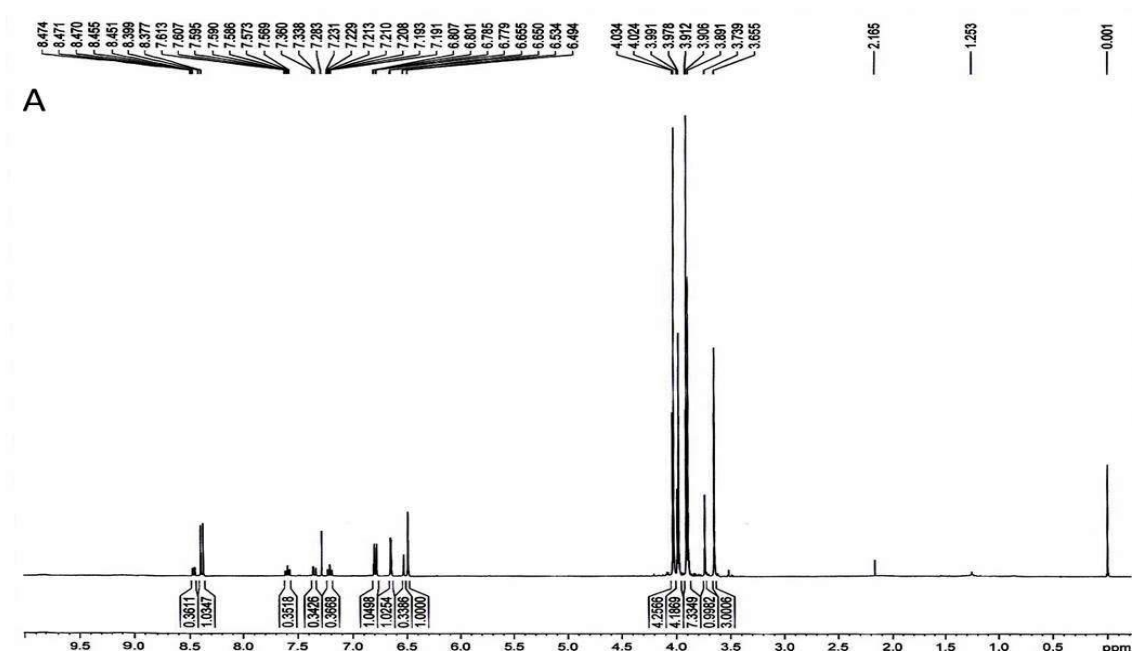


FIGURA 5.39 – (A) Espectro de RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz) da substância 8 (metilarborinina) com substância 4.

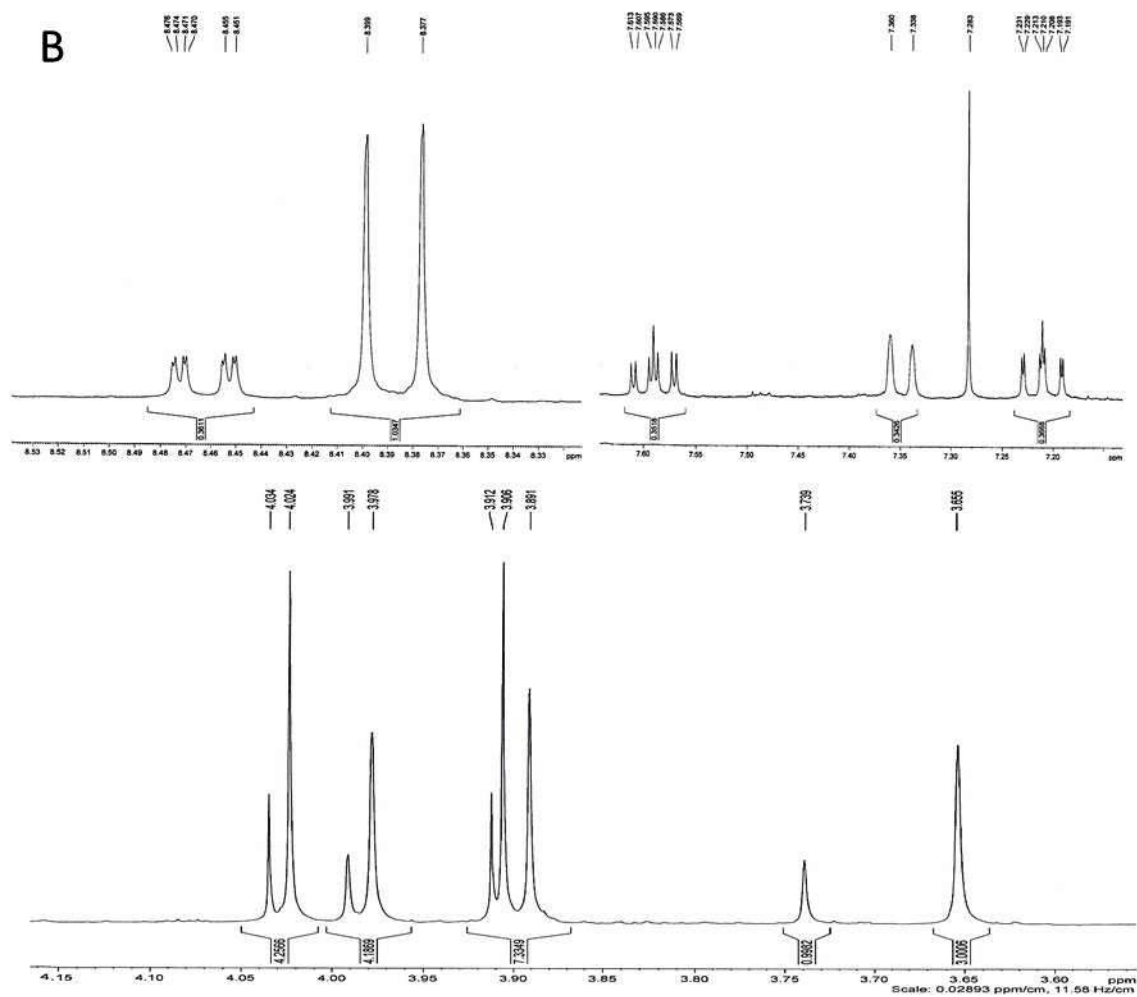


FIGURA 5.39 (continuação) – (B) expansão do espectro na região dos hidrogênios aromáticos (acima) e na região das metoxilas (abaixo).

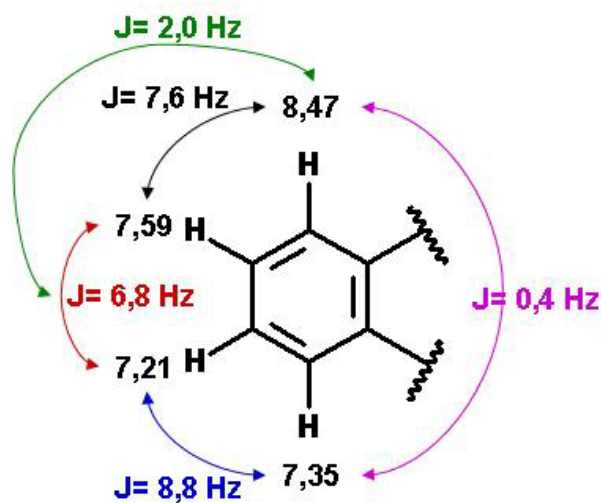


FIGURA 5.40 – Acoplamentos para os hidrogênios do anel A da substância 8.

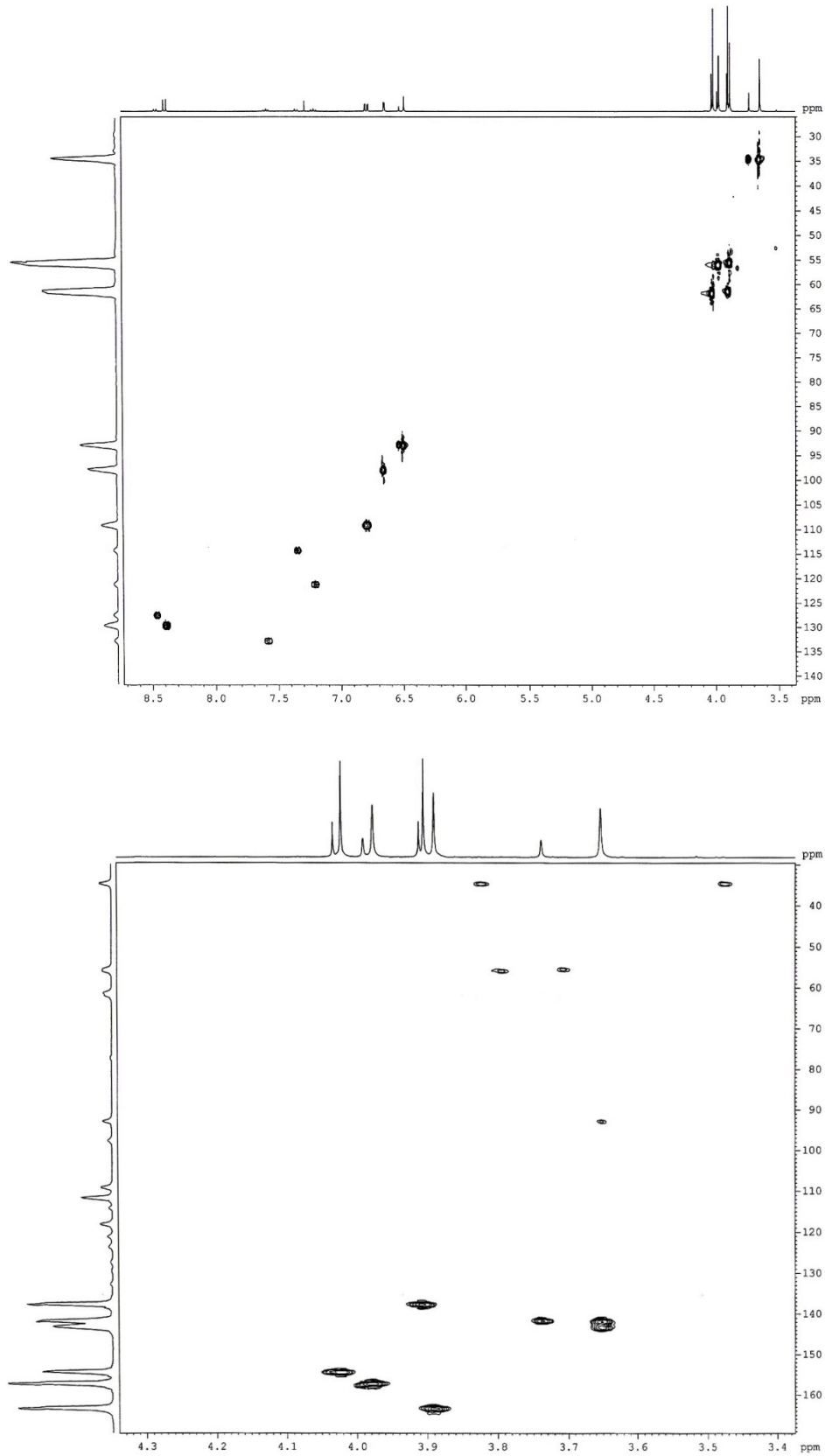


FIGURA 5.41 – Mapa de contorno de HSQC da substância 8 (metilarborinina) com 4 (acima) e expansão na região das metoxilas (abaixo).

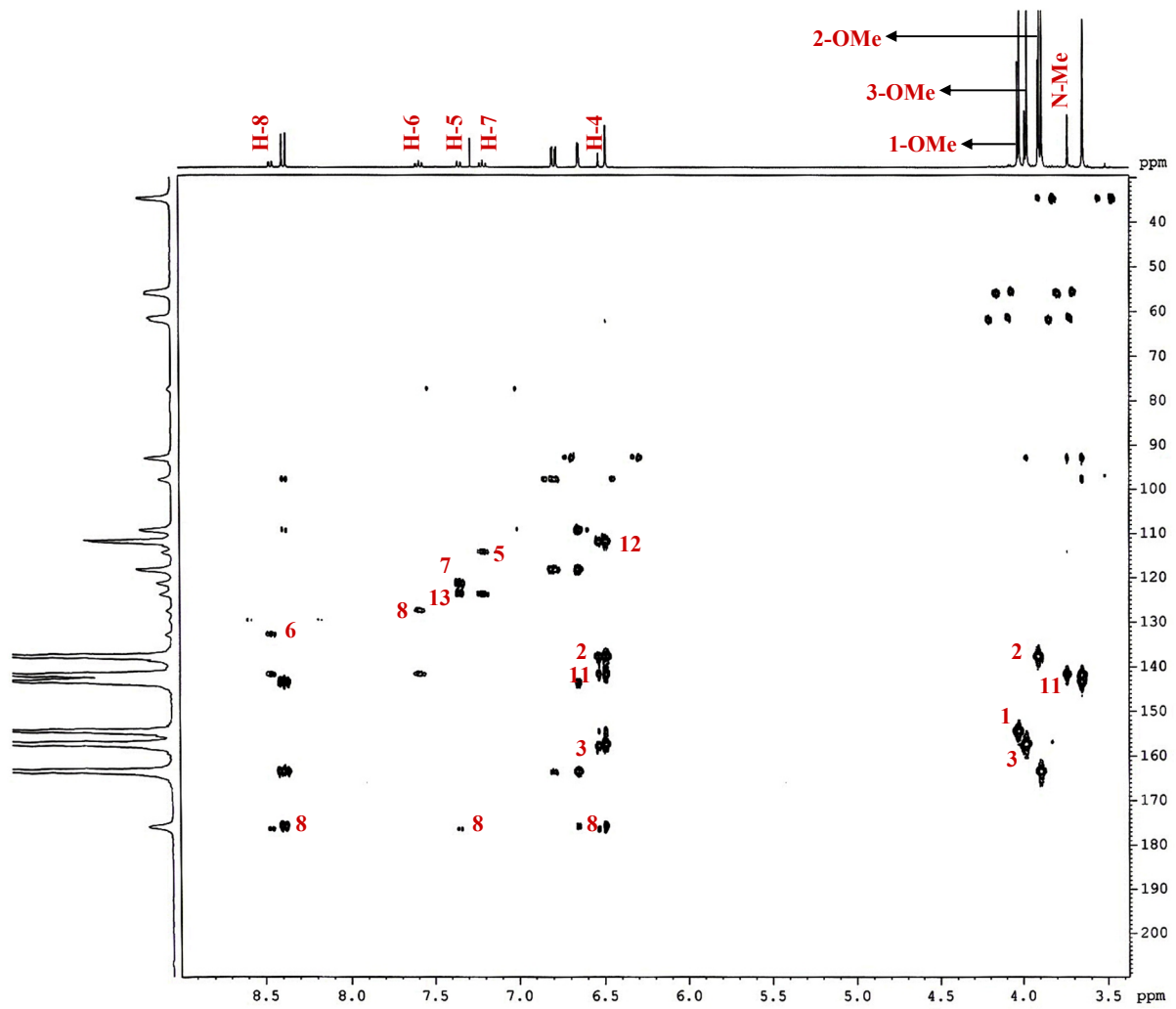


FIGURA 5.42 – Mapa de contorno de HMBC da substância 8 (metilarborinina) com substância 4.

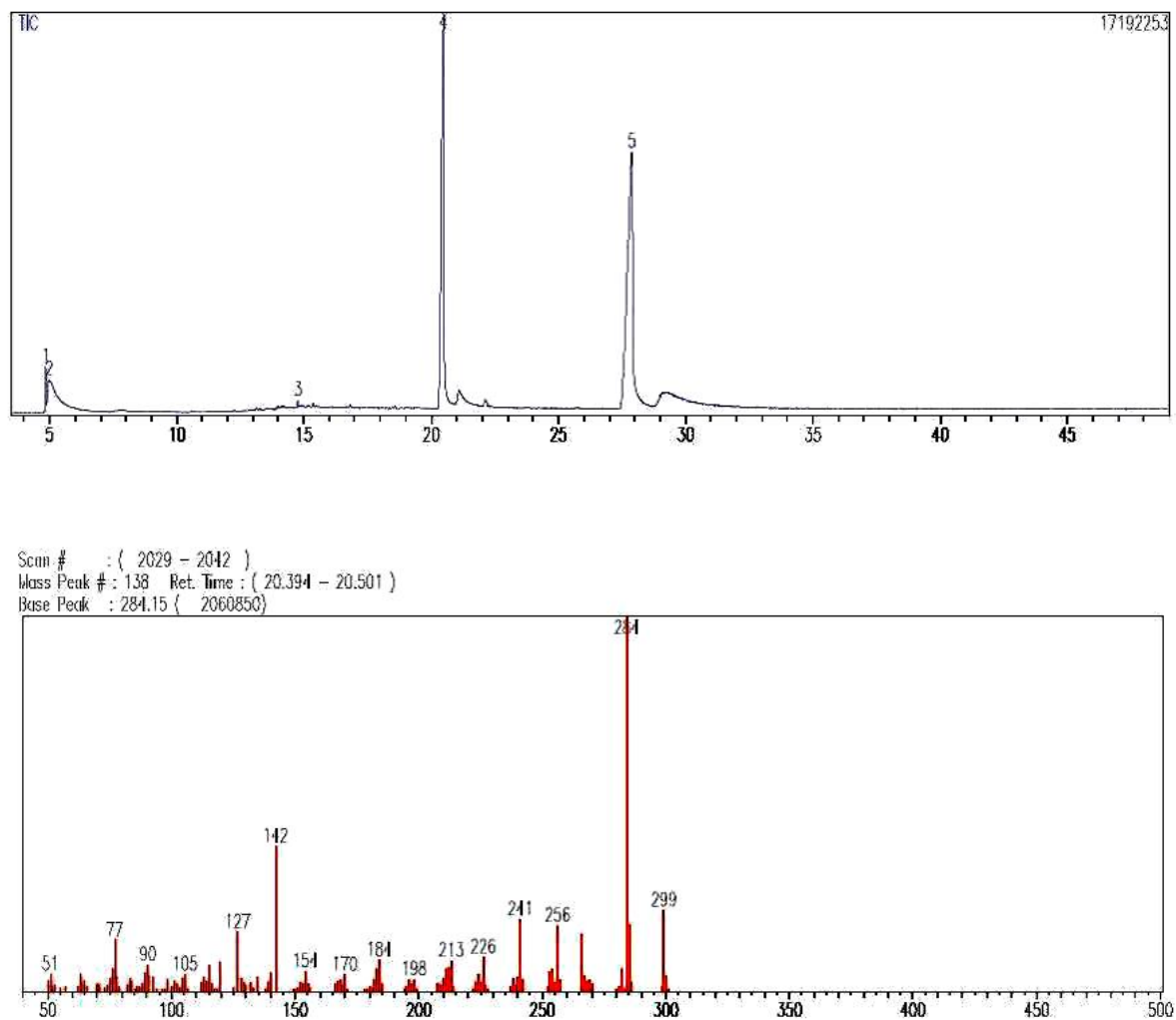


FIGURA 5.43 – (A) Cromatograma da fração 2632CD 68-75; (B) espectro de massas (IE = 70 eV) da substância 8.

TABELA 5.10 - Dados de RMN ^1H para a substância **8** e comparação com a literatura.

1,2,3-tri-metoxi-N-metil acridona		
Hidrogênio	Isolada (a) δ (ppm)	MAFEZOLI, 2001 (b) δ (ppm)
4	6,53 (1H, <i>s</i>)	6,50(1H, <i>s</i>)
5	7,35 (1H, <i>dl</i> , J= 8,8 Hz)	7,31 (1H, <i>dl</i>)
6	7,59 (1H, <i>ddd</i> , J= 7,6; 6,8 e 0,8 Hz)	7,56 (1H, <i>ddd</i>)
7	7,21 (1H, <i>ddd</i> , J= 8,8; 6,8 e 2,0 Hz)	7,19 (1H, <i>ddd</i>)
8	8,47 (1H, <i>ddd</i> , J= 7,6; 2,0 e 0,4 Hz)	8,44 (1H, <i>ddd</i>)
N-Me	3,74 (3H, <i>s</i>)	3,70 (3H, <i>s</i>)
OMe (C1)	4,03 (3H, <i>s</i>)	4,03 (3H, <i>s</i>)
OMe (C2)	3,91 (3H, <i>s</i>)	3,90 (3H, <i>s</i>)
OMe (C3)	3,99 (3H, <i>s</i>)	3,98 (3H, <i>s</i>)

(a) 400 MHz, CDCl_3 ; (b) 400 Mhz, CDCl_3 .

TABELA 5.11 - Dados de RMN ^{13}C (δ) para a substância **8** e comparação com a literatura.

1,2,3-tri-metoxi-N-metil acridona		
Carbono	Isolada (a)	MAFEZOLI, 2001 (b)
1	154,6	154,4
2	137,8	137,8
3	157,4	157,7
4	92,7	92,7
5	113,9	114,3
6	132,4	132,8
7	121,1	121,1
8	127,1	127,3
9	176,3	176,4
11	142,0	141,7
12	111,9	111,9
13	123,5	123,7
14	143,0	141,7
N-Me	34,5	34,6
OMe (C1)	61,7	61,8
OMe (C2)	61,2	61,4
OMe (C3)	56,0	55,9

(a) 100 MHz, CDCl_3 ; (b) 50 Mhz, CDCl_3

5.2.7 - Determinação Estrutural da Substância 9

A partir da fração 9-12 do extrato metanólico do caule de *Conchocarpus marginatus* (2632CM 9-12) foi possível isolar a substância 9. Esta apresentou-se como um sólido amorfo de coloração branca, que fluorescia ao ser submetido à radiação UV em CCDA. Esta apresentou coloração amarela ao ser revelada em vanilina e alaranjada em reagente de Dragendorff, sugerindo mais uma vez tratar-se de um alcalóide. Esta substância foi identificada através da análise dos experimentos RMN de ^1H e ^{13}C em 1D e 2D e por análise de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Através da análise dos experimentos citados acima confirmou-se para a substância 9 a estrutura do alcalóide acridônico 1-hidroxi-2,3,6-trimetoxi-acridona, ainda inédito na literatura (FIGURA 5.44).

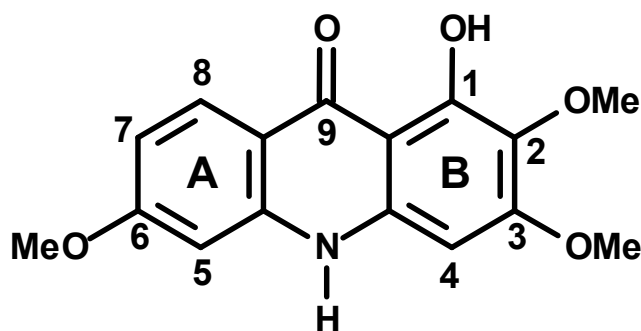


FIGURA 5.44 – Estrutura química do alcalóide 1-hidroxi-2,3,6-trimetoxi-acridona (substância 9).

O espectro de RMN ^1H da substância 9 apresentou sinais característicos de alcalóide acridônico (FIGURA 5.45), onde aqueles em δ_{H} 8,24 (1H, *d*, $J = 9,2$ Hz); δ_{H} 6,85 (1H, *dd*, $J = 9,2$ e $2,4$ Hz); δ_{H} 6,61 (1H, *d*, $J = 2,4$ Hz); foram associados a hidrogênios de um anel aromático trissubstituído (anel A); o sinal δ_{H} 6,18 (1H, *s*) foi relacionado a um hidrogênio de anel aromático pentassubstituído; os sinais em δ_{H} 3,93 (3H, *s*), δ_{H} 3,92 (3H, *s*) e δ_{H}

3,90 (3H, *s*) foram associados a grupos metilas ligados a heteroátomos (N ou O). O sinal em δ_H 14,15 (1H, *s*) indicou a presença de uma hidroxila na posição *peri* a uma carbonila do esqueleto acridônico, referente à um sinal de hidrogênio quelado.

As multiplicidades e constantes de acoplamento calculadas dos sinais de hidrogênio em região aromática do anel sugerem que o hidrogênio em δ_H 8,24 possui um acoplamento em *orto* com o sinal em δ_H 6,85, que este possui também um segundo acoplamento com o hidrogênio δ_H 6,61 do tipo *meta*. Essas informações tornam possível atribuir estes respectivos deslocamentos químicos ao anel A do esqueleto acridônico como mostrado na FIGURA 5.46.

Pôde-se observar pelo mapa de correlações de HSQC (FIGURA 5.47) que, na região dos grupos metilas ligados à heteroátomos, estes estão correlacionados a Carbonos com deslocamento químico δ_H 60,9; δ_H 56,02 e δ_H 56,02, valores estes de metoxilas aromáticas onde a primeira encontra-se em um sistema *orto*-dissubstituído (FURUKAWA et. Al.; 1983). Esses valores também sugerem a ausência de um grupo N-metil, sugerindo que ao Nitrogênio esteja ligado um hidrogênio.

Estudando o mapa de correlações de HMBC (FIGURA 5.48) foi possível atribuir à metoxila em δ_H 3,93 δ um valor de deslocamento químico de ^{13}C δ_C em 159,2, para a metoxila em δ_H em 3,92 atribuiu-se um sinal de ^{13}C em δ_H 130,2 e para a metoxila em δ_H 3,90 δ atribuiu-se um sinal de ^{13}C em δ_C 164,2. Estes valores sugerem que estes carbonos com deslocamento químico em δ_C 159,2 e δ_C 164,2 podem ser atribuídos às posições C-3 e C-6 do esqueleto acridônico (uma vez que a posição C-1 está ocupada por uma hidroxila e a posição C-8 por um Hidrogênio), e que o carbono em δ_C 130,2 pode ser atribuído à posição C-2. Esse fato pode ser explicado devido à presença da carbonila em C-9 causando uma desblindagem dos núcleos de carbono nessas posições. Para atribuir exatamente as posições dos carbonos cujos núcleos são mais desblindados deve-se realizar uma análise do mapa de correlações de

HMBC. Os sinais de hidrogênio com deslocamento químico em δ_H 8,24 e δ_H 6,61, pertencentes ao anel A, exibem um acoplamento a longa distância (J^3 e J^2 respectivamente) com o carbono em δ_C 164,2, sugerindo dessa maneira que a metoxila com carbono em δ_C 164,2 encontra-se na posição C-6 do esqueleto do alcalóide. Já o sinal de hidrogênio em δ_H 6,18, pertencente ao anel B, também apresenta um acoplamento a longa distância (J^2) com o carbono em δ_C 159,2, sugerindo que a metoxila cujo carbono tenha este mesmo deslocamento químico encontra-se na posição C-3. Atribuem-se assim as posições de todos os grupos substituintes para essa estrutura. Todas as demais correlações puderam ser comprovadas através dos mapas de contornos HSQC e HMBC.

O espectro de massas da substância **9** (FIGURA 5.49) mostrou pico íon molecular com relação massa/carga de 301 daltons, sugerindo a fórmula molecular do alcalóide acridônico $C_{16}H_{15}NO_5$.

Através da análise dos dados discutidos acima confirmou-se para a substância **9** a estrutura do alcalóide acridônico 1-hidroxi-2,3,6-trimetoxiacridona, ainda inédito na literatura como mencionado anteriormente. Este apresenta como única diferença do alcalóide 1-hidroxi-2,3,6-trimetoxi-N-metilacridona (**5**), isolada anteriormente neste mesmo trabalho, ausência de um grupo metila ligado ao nitrogênio. Por se tratar de uma substância ainda inédita não se dispunha de dados de RMN 1H e ^{13}C na literatura para fazer-se uma comparação de valores de deslocamentos químicos. Para isso, a confirmação da estrutura proposta foi baseada nos dados da estrutura 1-hidroxi-2,3,6-trimetoxi-N-metilacridona (substância **5**) (TABELA 5.12 e 5.13).

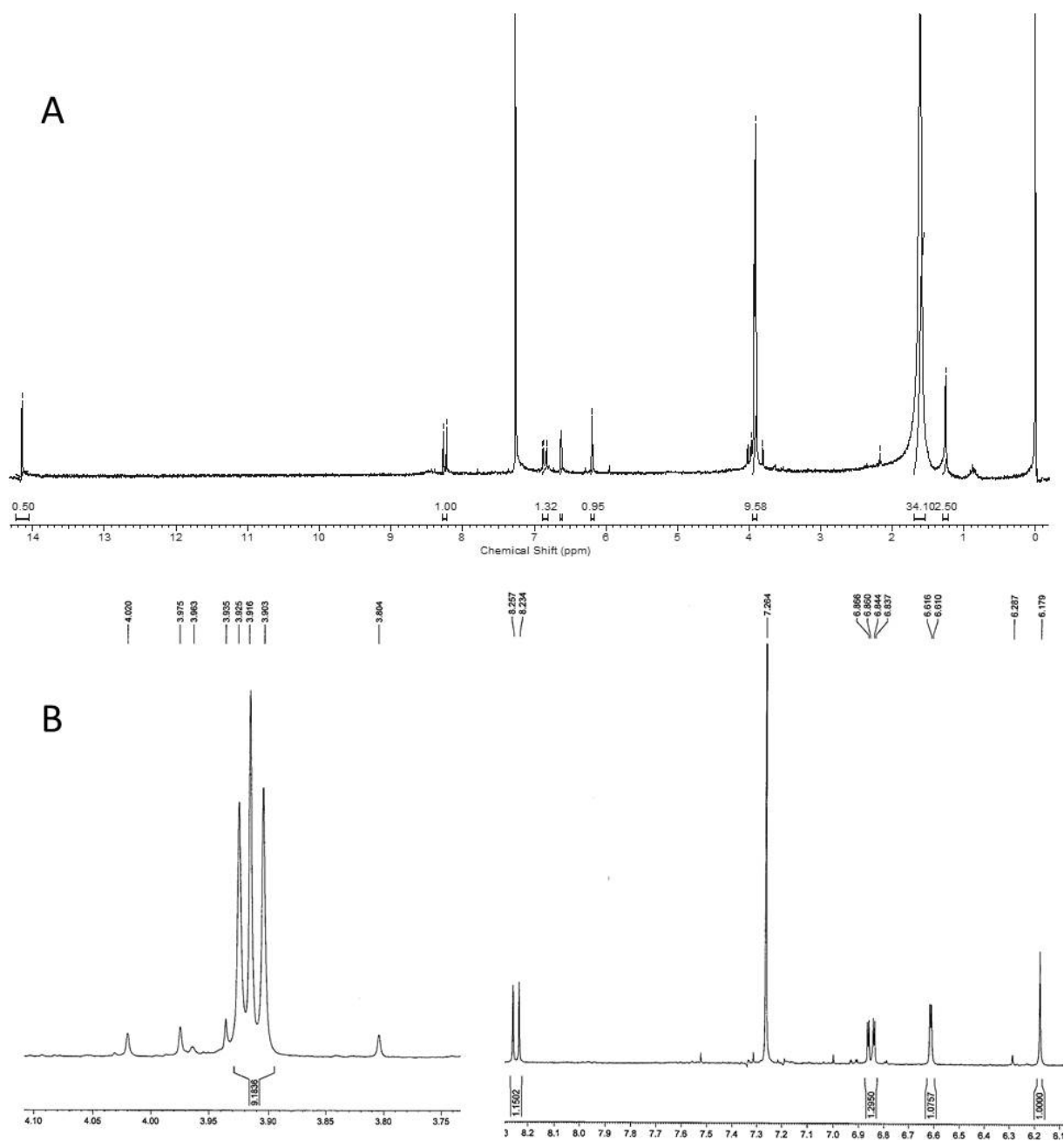


FIGURA 5.45 – (A) Espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz) do alcalóide 1-hidroxi-2,3,6-trimetoxi-acridona (substância 9); (B) Expansão na região das metoxilas (à esquerda) e H aromáticos (à direita) (CDCl₃, 400 MHz).

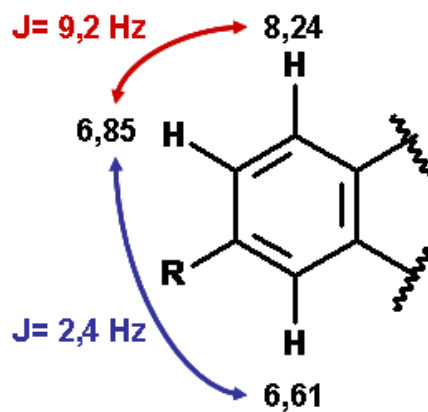


FIGURA 5.46 – Acoplamentos para os hidrogênios do anel A da substância 9.

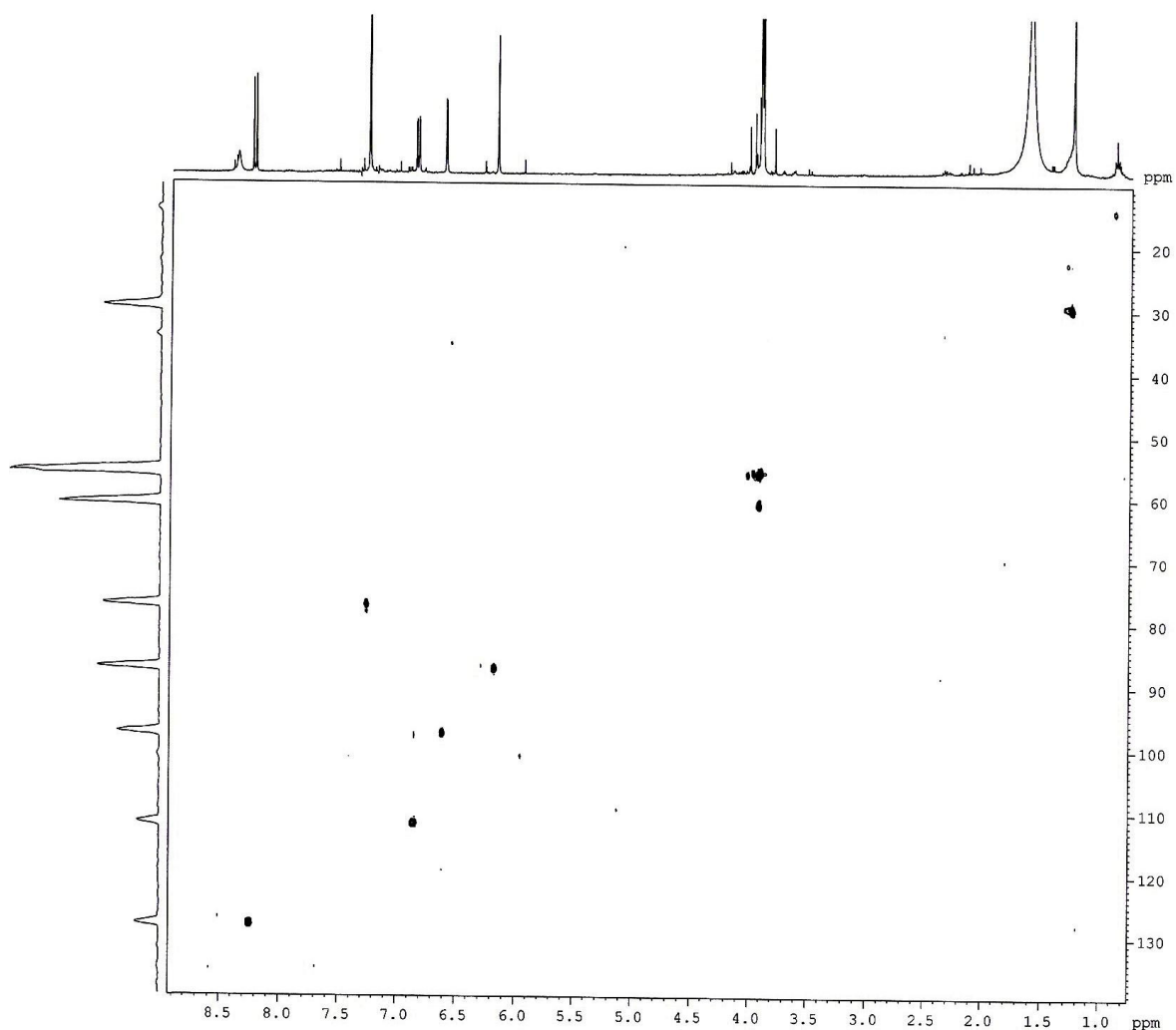


FIGURA 5.47 – Mapa de contorno de HSQC (CDCl₃, 400 MHz) da substância 9.

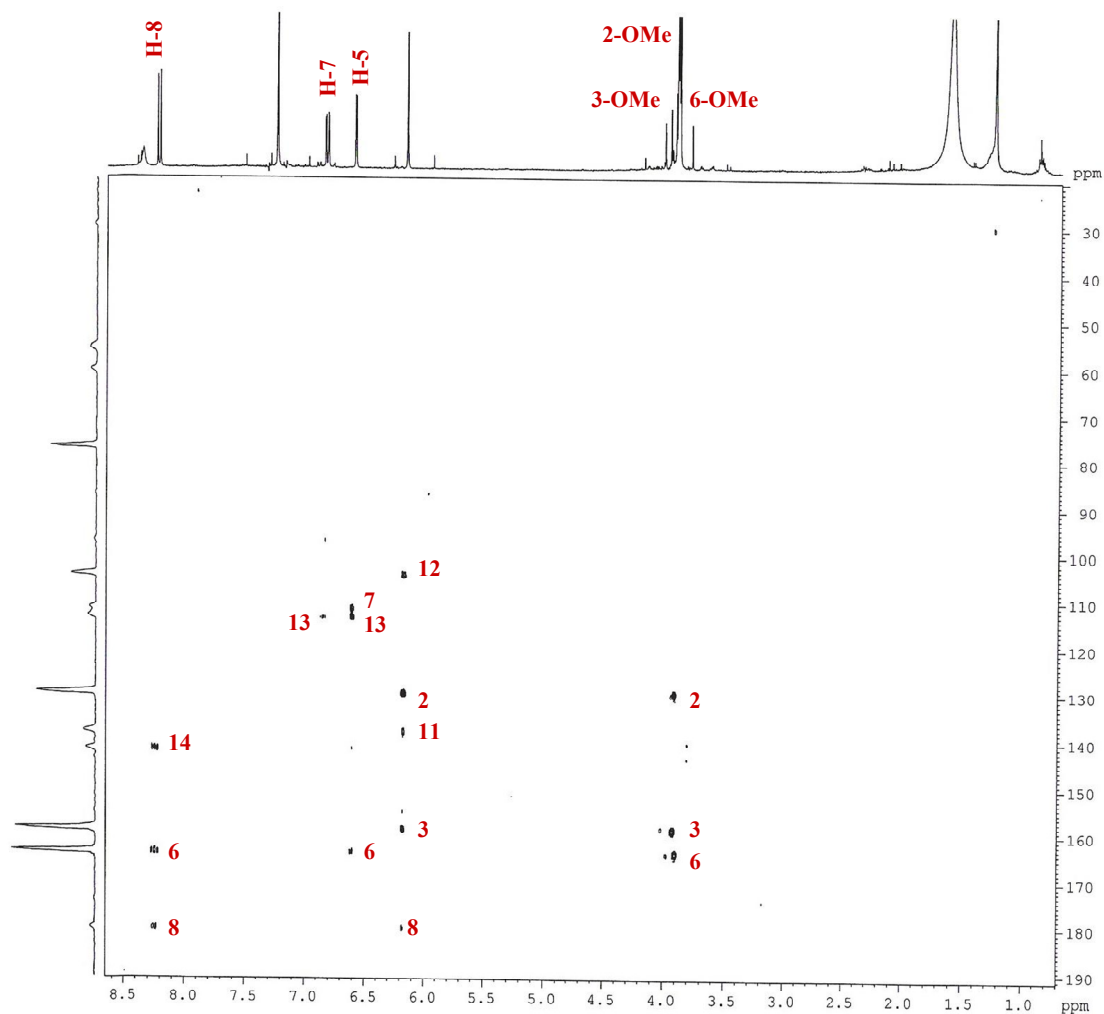


FIGURA 5.48 - Mapa de contorno de HMBC (CDCl_3 , 400 MHz) da substância 9.

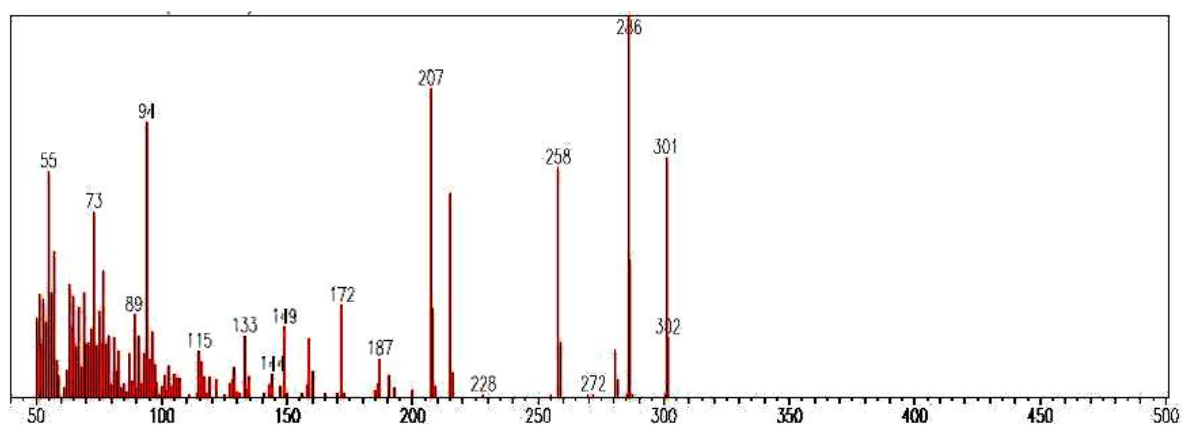


FIGURA 5.49 - Espectro de massas (IE = 70 eV) da substância 9.

TABELA 5.12 - Dados de RMN ^1H para a substância **9** e comparação com **5**.

1-hidroxi-2,3,6-trimetoxi-N-metilacridona		
Hidrogênio	Isolada (a)	MAFEZOLI, 2001 (b)
	δ	δ
4	6,18 (1H, <i>s</i>)	6,14 (1H, <i>s</i>)
5	6,61 (1H, <i>d</i> , J= 2,4 Hz)	6,71 (1H, <i>d</i>)
6	-	-
7	6,85 (1H, <i>dd</i> , J= 9,2 e 2,4 Hz)	6,80 (1H, <i>dd</i>)
8	8,24 (1H, <i>d</i> , J= 9,2 Hz)	8,25 (1H, <i>d</i>)
N-Me	-	3,68 (3H, <i>s</i>)
OMe (C-2)	3,92 (3H, <i>s</i>)	3,91 (3H, <i>s</i>)
OMe (C-3)	3,93 (3H, <i>s</i>)	3,98 (3H, <i>s</i>)
OMe (C-6)	3,90 (3H, <i>s</i>)	3,94 (3H, <i>s</i>)
OH	14,15 (1H, <i>s</i>)	14,15 (1H, <i>s</i>)

(a) 400 MHz, CDCl_3 ; (b) 200 Mhz, CDCl_3

TABELA 5.13 - Dados de RMN ^{13}C para a substância **9** e comparação com a substância **5**.

1-hidroxi-2,3,6-trimetoxi-acridona		
Carbono	Isolada (a)	Substância 5 (b)
	δ	δ
1	NO	155,8
2	130,2	130,0
3	159,2	158,7
4	87,3	86,6
5	101,3	97,5
6	164,2	164,4
7	111,8	110,2
8	128,1	128,3
9	180,6	180,4
11	138,1	140,7
12	104,8	105,5
13	113,7	115,3
14	141,9	144,4
NMe	-	34,0
OMe (C2)	60,9	60,7
OMe (C3)	56,2	55,7
OMe (C6)	56,2	58,9

(a) 100 MHz, CDCl_3 , (b) 50 Mhz, CDCl_3

5.2.8 - Determinação Estrutural da Substância 10

O estudo do extrato diclorometânico das folhas de *Conchocarpus marginatus* foi responsável pela determinação da substância **10**, em mistura com a substância **6**, o alcalóide acridônico 1-hidroxi-3-metoxi-N-metil acridona. Esta fração apresentou-se como um sólido amorfo de coloração branca, que em CCDA apresentou fluorescência quando exposto à radiação ultravioleta. Esta também revelou amarela em vanilina, e alaranjada em reagente de Dragendorff, sugerindo tratar-se de um alcalóide. A substância **10** foi identificada através de análises de experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C em 1D e 2D e por análise de CG-EM, permitindo dessa maneira sugerir a estrutura do alcalóide acridônico 1-hidroxi-3,6-dimetoxi-N-metilacridona, ainda inédito na literatura (FIGURA 5.50).

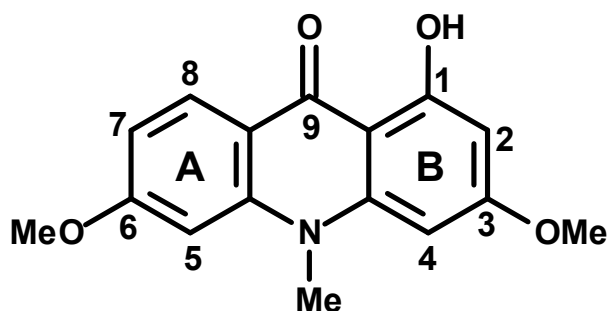


FIGURA 5.50 - Estrutura química do alcalóide 1-hidroxi-3,6-dimetoxi-N-metilacridona (substância 10).

O espectro de RMN ^1H apresentou, além dos sinais correspondentes à substância **6** (discutidos na seção 5.2.4), sinais referentes à substância **10** (FIGURA 5.51), sendo estes últimos os de maior intensidade. O sinal em δ_{H} 14,92 (1H, *s*) foi relacionado a um hidrogênio de uma hidroxila quelada na posição *peri* a uma carbonila. Aqueles em δ_{H} 8,34 (1H, *d*, $J = 9,2$ Hz); δ_{H} 6,85 (1H, *dd*, $J = 9,2$ e $2,0$ Hz); δ_{H} 6,77 (1H, *d*, $J = 2$ Hz) foram

atribuídos à hidrogênios de um anel aromático trissubstituído. Os sinais em δ_{H} 6,27 (1H, *d*, $J = 2,0$ Hz) e δ_{H} 6,25 (1H, *d*, $J = 2,0$ Hz) foram associados a hidrogênios de outro anel aromático, cujas constantes calculadas sugerem um acoplamento do tipo *meta* entre eles. Os sinais em δ_{H} 3,95 (3H, *s*), δ_{H} 3,89 (3H, *s*) e δ_{H} 3,70 (3H, *s*) foram associados a grupos metilas ligados a heteroátomos (N ou O).

Através do espectro de COSY (FIGURA 5.52) juntamente com as constantes de acoplamento calculadas foi possível atribuir as posições dos hidrogênios para o anel A. O hidrogênio em δ_{H} 6,85 acopla-se com o δ_{H} 8,34 com uma constante de 9,2 Hz, sugerindo assim um acoplamento do tipo *orto*, e acopla-se também com o δ_{H} 6,77, dessa vez com uma constante de 2,0 Hz, sugerindo um acoplamento do tipo *meta*, como mostra a FIGURA 5.53.

A partir do mapa de correlações HSQC (FIGURA 5.54) foi possível atribuir para o hidrogênio em δ_{H} 3,70 o carbono com deslocamento químico em δ_{C} 34,5, sugerindo tratar-se de um grupo metila ligado a um nitrogênio, sem substituintes em C-4 e C-5 (GROEGER, 1988). Já o sinal δ_{H} 3,95, ao realizar uma análise do espectro de HSQC verifica-se que este está correlacionado com um carbono com deslocamento químico em δ_{C} 55,5 e pelo mapa de correlações HMBC (FIGURA 5.55) com um carbono em δ_{C} 164,4. O δ_{H} 3,89 está correlacionado com δ_{C} 55,5 pelo espectro de HSQC, e também com o δ_{C} 165,7 pelo espectro de HMBC. Esses valores sugerem que ambas metoxilas não estão ligadas a carbonos *orto*-disubstituídas, pois seus valores de carbono encontram-se em δ_{C} 55,5 (FURUKAWA, et. al., 1983), e também que as metoxilas encontram-se nas posições C-3 e C-6 do esqueleto acridônico, uma vez que os núcleos de seus carbonos encontram-se bastante desblindados (164,4 e 165,7 δ) devido à presença da carbonila em C-9. Para atribuir cada uma destas últimas metoxilas realizou-se uma nova análise do espectro de HMBC, onde observou-se que os sinais do anel aromático A δ_{H} 8,34 e δ_{H} 6,77 apresentaram acoplamento à longa distância (J^3 e J^2 respectivamente) com δ_{C} 164,4,

permitindo dessa maneira atribuir à metoxila em δ_H 3,89 ao C-6. Por sua vez, os sinais do anel aromático B δ_H 6,27 e δ_H 6,25 apresentaram acoplamento de longa distância (ambos com J^2) com o δ_C 165,6. Esse fato permitiu atribuir à metoxila em δ_H 3,95 ao C-3.

Na análise por CG/EM (IE, 70Ev) foram observados dois picos no cromatograma de íons totais (FIGURA 5.56) que indicaram a presença de duas substâncias. A presença da mistura foi confirmada através dos picos referentes ao íon molecular em m/z 255 e 285, com os respectivos tempos de retenção de 18 e 24 minutos. Estes resultados conferiram com as fórmulas moleculares das duas substâncias propostas $C_{16}H_{15}NO_4$ (substância **10**) e $C_{15}H_{13}NO_3$ (substância **6**) respectivamente.

Através da análise dos dados discutidos acima sugeriu-se para a substância **10** a estrutura do alcalóide acridônico 1-hidroxi-3,6-dimetoxi-N-metilacridona, ainda inédito na literatura como mencionado anteriormente. Esta apresenta como única diferença em relação ao alcalóide já conhecido 1-hidroxi-3-metoxi-N-metil acridona (**6**) o grupo metoxila na posição C6 ao invés do hidrogênio. Por se tratar de uma substância ainda inédita, não se dispunha de dados de RMN 1H e ^{13}C na literatura para fazer-se uma comparação. Para isso, a confirmação da estrutura proposta foi baseada nos dados da estrutura 1-hidroxi-3-metoxi-N-metil acridona (substância **6**), (BERGENTAL et. al., 1979) (TABELA 5.14 e 5.15).

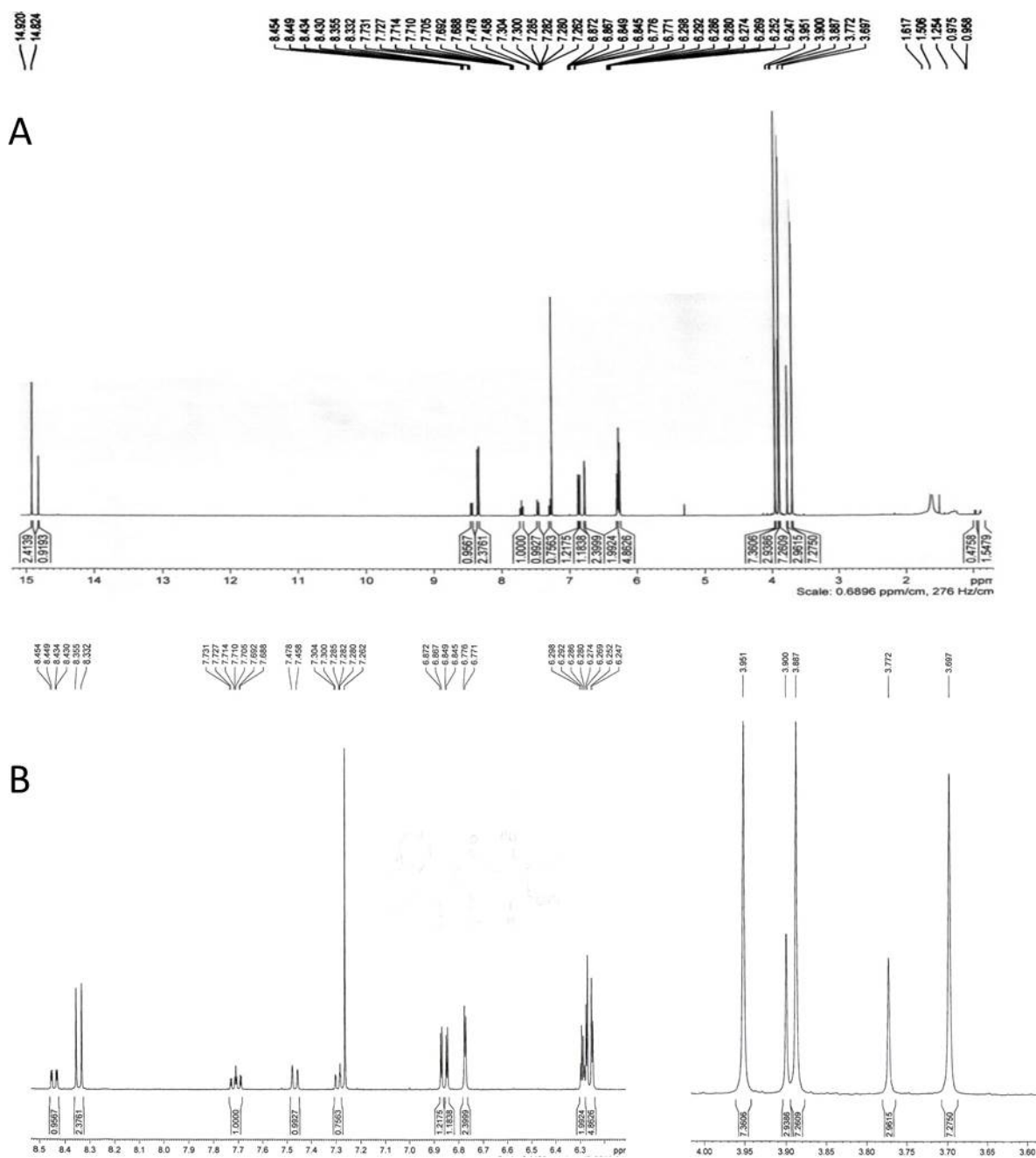


FIGURA 5.51 - Espectro de RMN 1H da substância 10 (CDCl₃, 400MHz); (B) Expansão na região dos H aromáticos (à esquerda) e na região das metoxilas (à direita).

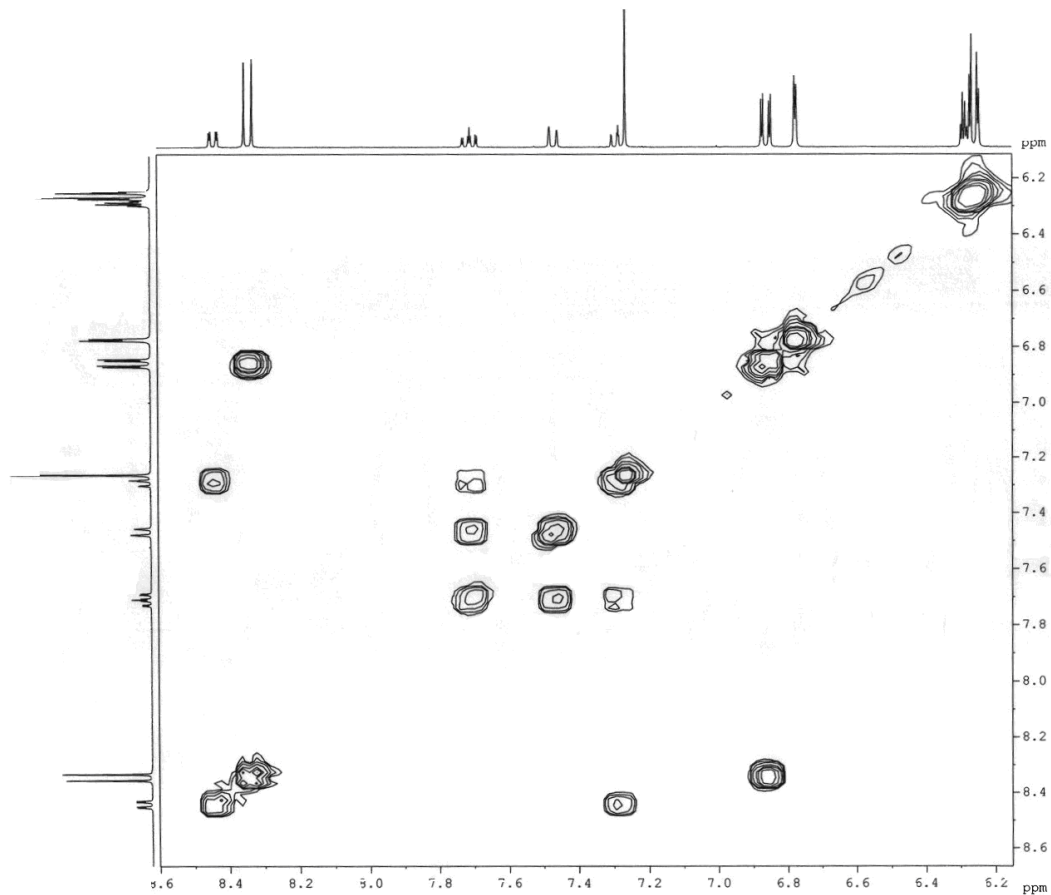


FIGURA 5.52 - Mapa de contorno de COSY da substância 10 (CDCl_3 , 400 MHz).

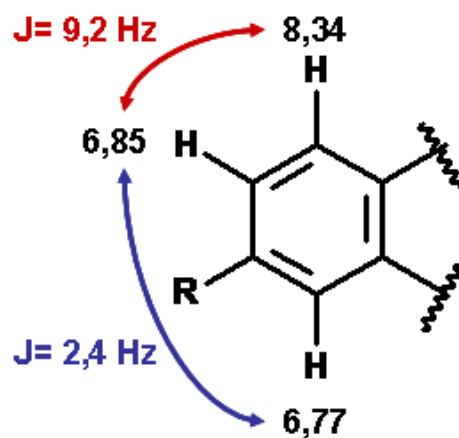
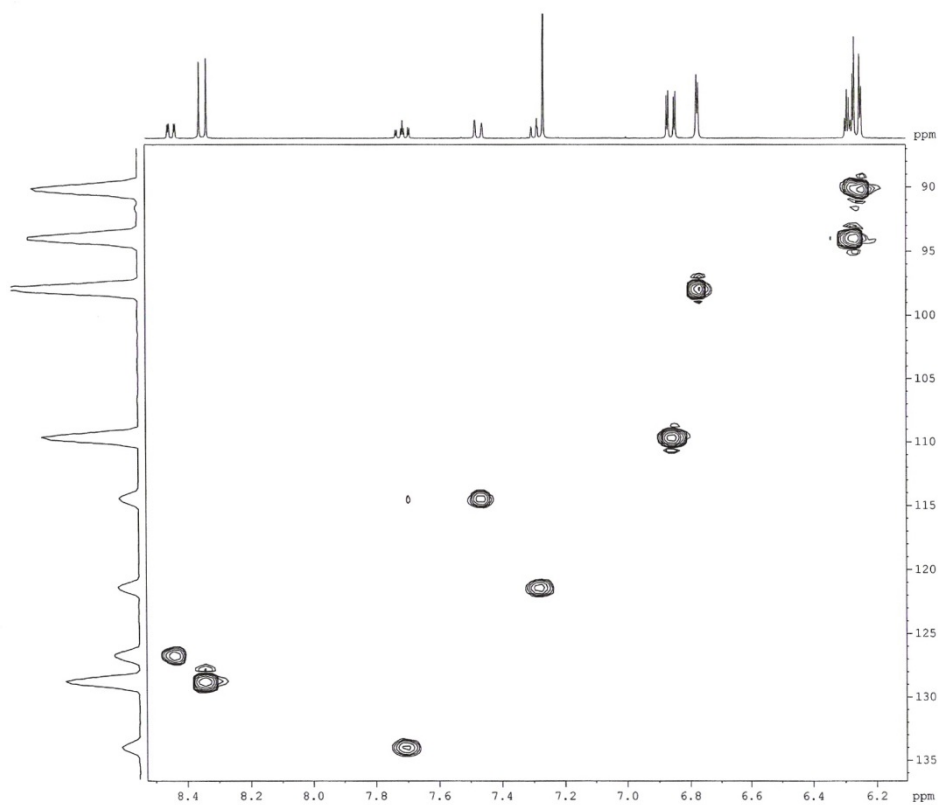


FIGURA 5.53 – Acoplamentos para os hidrogênios do anel A da substância 10.

A)



B)

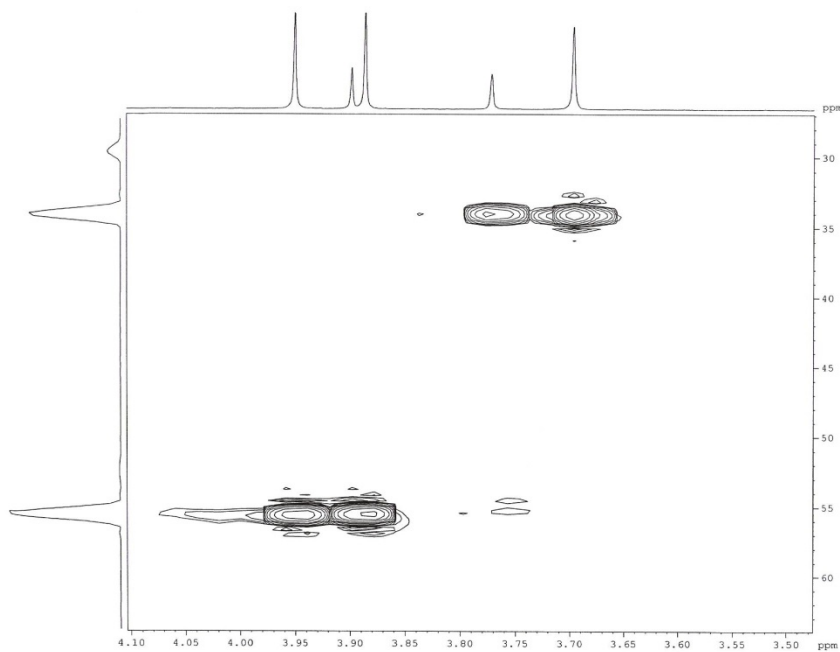


FIGURA 5.54 – Mapa de contorno de HSQC da substância 10 (CDCl₃, 400 MHz) em (A) região dos H aromáticos; (B) região de metilas ligadas a heteroátomos.

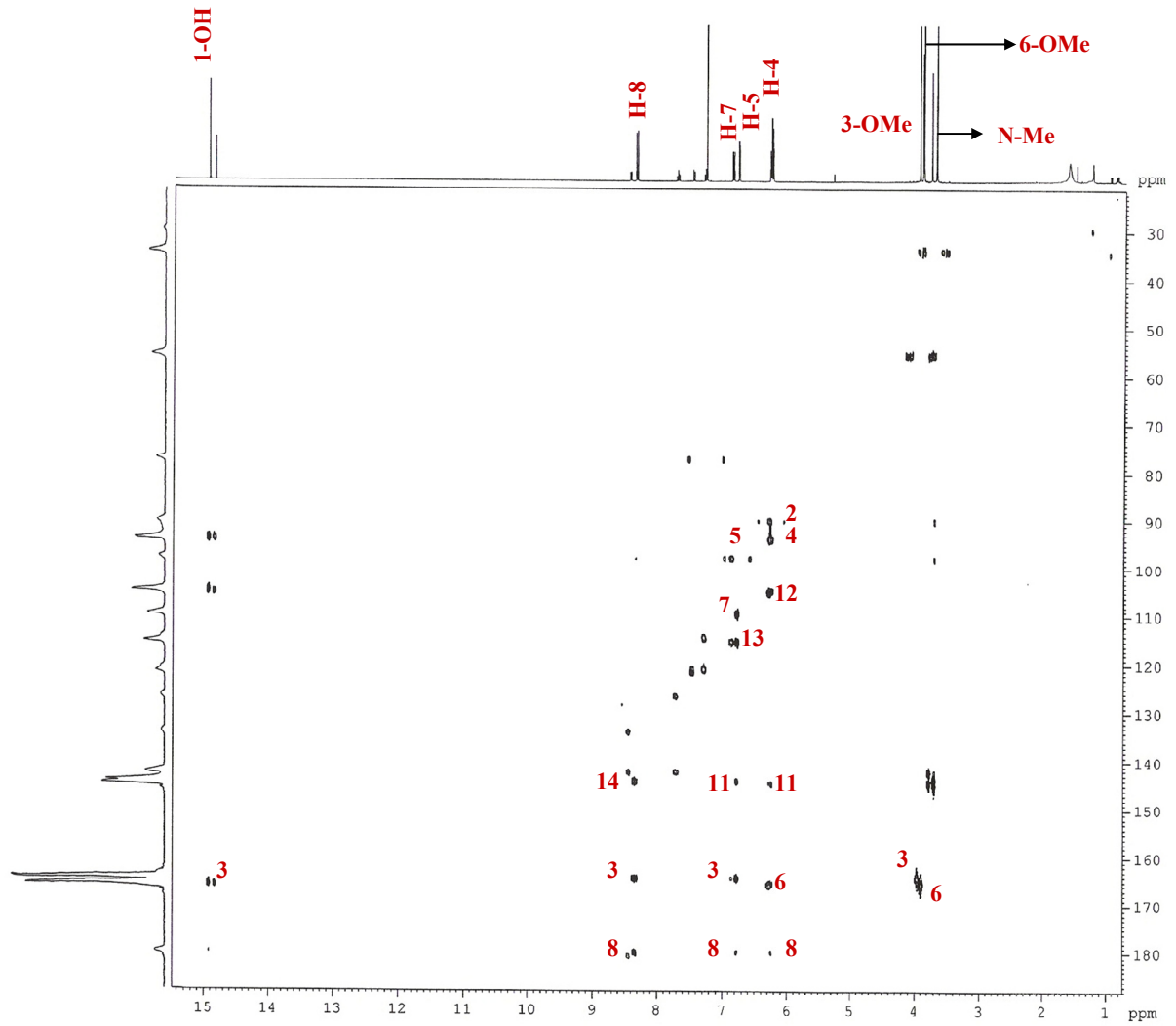
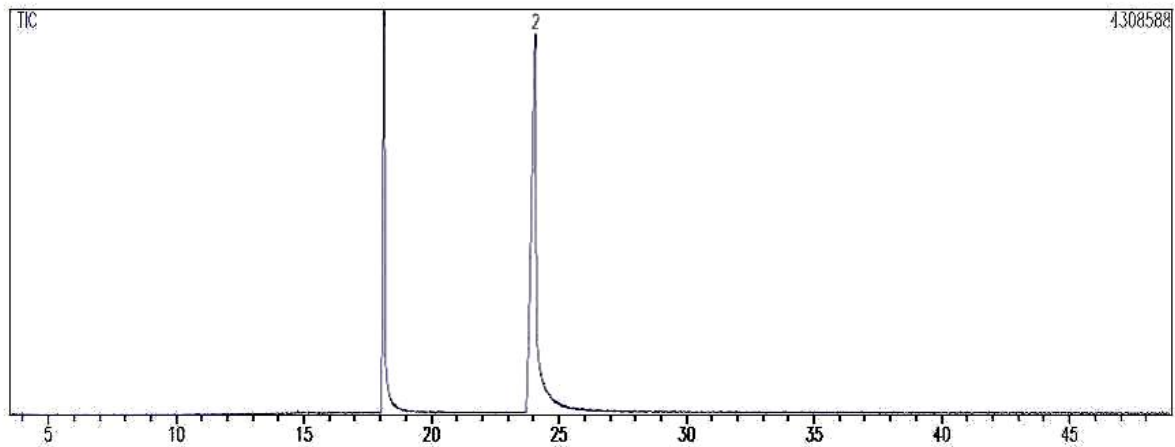
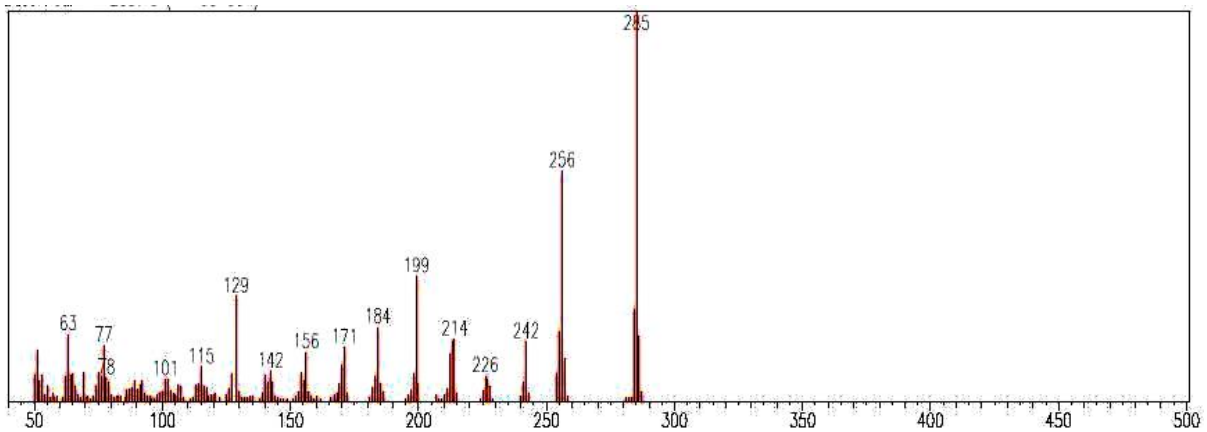


FIGURA 5.55 – Mapa de contorno de HMBC da substância 10 (CDCl₃, 400 MHz).

(A)



(B)



(C)

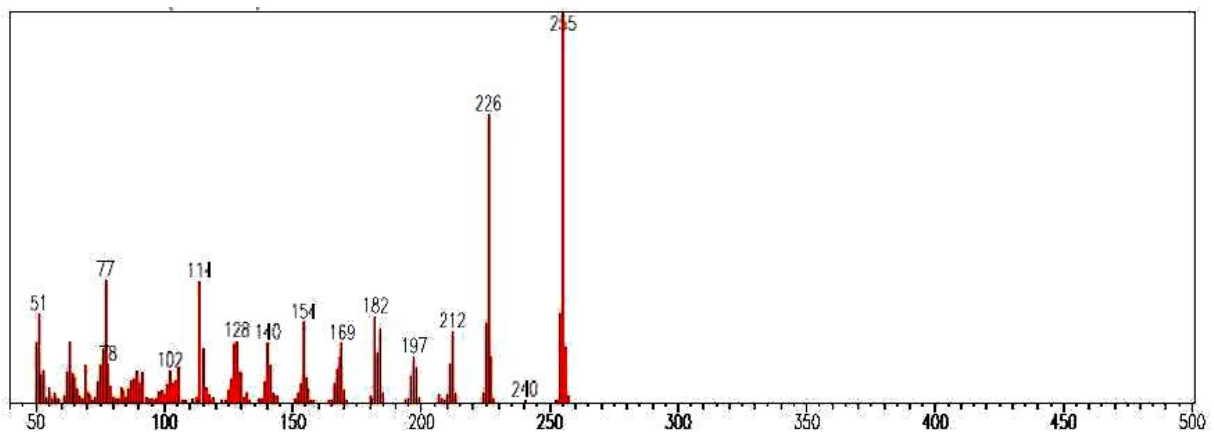


FIGURA 5.56 - (A) Cromatograma das substâncias 6 e 10 em mistura (pico 1, substância 6; pico 2, substância 10); (B) Espectro de massas (IE = 70 eV) da substância 10; (C) e da substância 6.

TABELA 5.14 - Dados de RMN ^1H para a substância **10** e comparação com **6**.

1-hidroxi-3,6-dimetoxi-N-metil acridona		
Hidrogênio	Isolada (a) δ	BERGENTHAL, 1979 (b) Δ
2	6,27 (1H, <i>d</i> , J= 2,0 Hz)	6,29 (2H, <i>dd</i>)
4	6,25 (1H, <i>d</i> , J= 2,0 Hz)	6,29 (2H, <i>dd</i>)
5	6,77 (1H, <i>d</i> , J= 2,0 Hz)	7,47 (1H, <i>dl</i>)
6	-	7,28 (1H, <i>ddd</i>)
7	6,85 (1H, <i>dd</i> , J= 9,2 e 2,0 Hz)	7,71 (1H, <i>ddd</i>)
8	8,34 (1H, <i>d</i> , J= 9,2 Hz)	8,44 (1H, <i>ddd</i>)
N-Me	3,7 (3H, <i>s</i>)	3,78 (3H, <i>s</i>)
OMe (C3)	3,95 (3H, <i>s</i>)	3,90 (3H, <i>s</i>)
OMe (C6)	3,89 (3H, <i>s</i>)	-
OH	14,92 (1H, <i>s</i>)	14,83 (1H, <i>s</i>)

(a) 400 MHz, CDCl_3 ; (b) 50 Mhz, CDCl_3

TABELA 5.15 - Dados de RMN ^{13}C para **10** e comparação com **6**.

1-hidroxi-3,6-dimetoxi-N-metil acridona		
Carbono	Isolada (a)	BERGENTHAL, 1979 (b)
	δ	δ
1	164,4	164,6
2	90,3	94,3
3	165,6	165,7
4	94,1	89,7
5	97,9	115,7
6	164,4	134,2
7	110,1	121,3
8	128,9	125,4
9	179,9	179,6
11	144,9	144,4
12	104,7	104,3
13	115,9	119,9
14	144,0	141,9
N-Me	34,4	34,0
OMe (C3)	55,5	55,5
OMe (C6)	55,5	-

(a) 100 MHz, CDCl_3 ; (b) 20 MHz, CDCl_3

5.2.9 - Identificação das Substâncias 11 e 12

O estudo da fração metanólica do extrato diclorometânico (2632CDM 13-18) do caule de *Conchocarpus marginatus*, levou à determinação da substância **11** e **12**.

As substâncias foram identificadas através da análise de experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C em 1D e 2D, por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e também por comparação com dados da literatura. Foram identificadas em mistura, juntamente com a substância **9**, apresentando-se como um sólido branco amorfo. Em CCDA apresentaram fluorescência quando expostos à radiação UV, revelavam amarelas quando expostas à vanilina e coloração alaranjada quando revelados com reagente de Dragendorff, confirmando assim tratar-se de alcalóides.

As substâncias foram identificada através da análise dos experimentos RMN de ^1H em 1D e 2D, por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e também por comparação com dados da literatura. A partir das análises dos dados foi possível confirmar para a substância **11** a estrutura do alcalóide 2-fenil-1-metil-quinolin-4-ona (FIGURA 5.38).

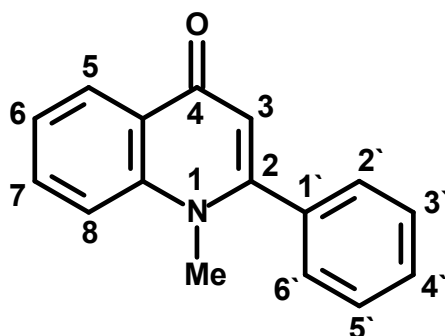


FIGURA 5.57 – Estrutura química do alcalóide 2-fenil-1-metil-quinolin-4-ona (Substância 11).

O espectro de RMN ^1H dessa fração apresentou sinais de hidrogênio referentes à substância **4**, descritos na seção 5.2.2, e também para a

substância **11** (FIGURA 5.58). Aqueles em δ_H 8,52; (1H, *dd*, $J=8,4$ e $2,0$ Hz); δ_H 7,73 (*ddd*, 1H, $J= 8,4$; $7,6$ e $2,0$ Hz); δ_H 7,57 (1H, *dl*, $J= 8,4$ Hz) e δ_H 7,44 (*m*, 1H) foram associados a hidrogênios de um anel aromático orto dissubstituído; o sinal δ_H 6,33 (1H, *s*) foi relacionado a um hidrogênio olefínico; o sinal em δ_H 3,63 (3H, *s*) foi associados a um grupo metila ligado a um heteroátomo (N ou O).

A partir do espectro bidimensional homonuclear COSY (FIGURA 5.59) foi possível observar para a substância **11** o acoplamento entre os núcleos dos hidrogênios aromáticos com deslocamento químico em δ_H 8,52 com os sinais δ_H 7,73 ($J = 2,0$ Hz, sugerindo um acoplamento *meta*) e δ_H 7,44 ($J = 8,4$ Hz, sugerindo um acoplamento *orto*). E também do sinal δ_H 7,73 com os δ_H 7,57 ($J = 8,4$ Hz, sugerindo um acoplamento *orto*) e δ_H 7,41 ($J = 7,6$ Hz, sugerindo outro acoplamento *orto*) (FIGURA 5.60). Para o substituinte fenila foi possível verificar o acoplamento entre os sinais em δ_H 7,52 com δ_H 7,42 δ .

Através da análise do mapa de contorno de HSQC (FIGURA 5.561) foi possível correlacionar o sinal δ_H 3,63 com δ_C 37,4, atribuindo-se esse valor a um grupo metila ligado à Nitrogênio. Também foi possível verificar o hidrogênio olefínico em δ_H 6,33 correlacionando-se com δ_C 112,5. Para o substituinte fenila observou-se correlação entre δ_H 7,52 (H-3', H4' e H-5') com δ_C 129,1, e δ_H 7,42 (H-2' e H6') com δ_C 128,6.

Partindo-se para o estudo do mapa de contorno de HMBC (FIGURA 5.62) foi possível confirmar o posicionamento do substituinte fenila na posição C-2, uma vez que o sinal δ_H 7,42 (H-2' e H-6') apresentou um acoplamento a longa distância (J^3) com δ_C 154,5 (C-2). Para este substituinte também foi possível verificar um acoplamento a longa distância entre o sinal δ_H 7,52 (H-3', H-4' e H-5') com δ_C 135,6 (C-1') e δ_C 128,6 (C-2' e C-6'). O espectro de HMBC ainda nos permitiu atribuir a posição do hidrogênio olefínico H-3 (δ_H 6,33), uma vez que este apresentou acoplamento a longa distância com δ_C 154,5 (J^2), δ_C 126,9 (J^3) e δ_C 135,6 (J^3).

Na análise por CG/EM (IE, 70Ev) da fração 2632CDM 13-18, foram observados três picos no cromatograma (FIGURA 5.63) indicando a presença de três substâncias. A presença da substância **11**, cuja banda é a indicada como 2, foi confirmada através do pico referentes ao íon molecular em m/z 235, que confere com a fórmula molecular $C_{16}H_{13}NO$.

Dessa maneira, a análise dos dados discutidos permitiu sugerir para a substância 11 a estrutura do alcalóide já isolado anteriormente na mesma família, 2-fenil-1-metil-quinolin-4-ona. Os dados da literatura (BIAVATTI, 2001) tornaram possível confirmar essa estrutura (TABELA 5.16 e 5.17).

Os experimentos citados anteriormente também permitiram a identificação de uma segunda substância, o alcalóide 2-fenil-1-metil-7-metoxi-quinolin-4-ona (FIGURA 5.64), onde este será discutido logo abaixo.

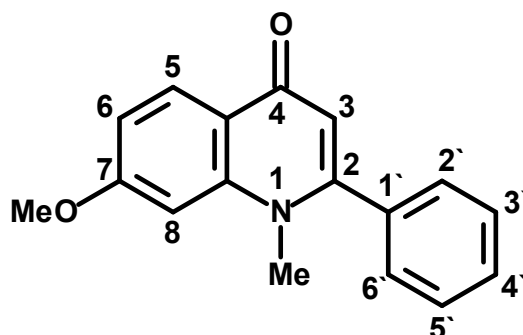


FIGURA 5.64 – Estrutura química do alcalóide 2-fenil-1-metil-7-metoxi-4-quinolona (substância 12).

Para a substância **12**, o espectro de RMN 1H (FIGURA 5.58) apresentou sinais em δ_H 8,43 (1H, d, $J=9,2$ Hz); δ_H 7,03 (dd, 1H, $J=9,2$ e 2,8 Hz) e δ_H 6,88 (1H, d, $J=2,8$ Hz) que foram associados a hidrogênios de um anel aromático trissubstituído; o sinal δ_H 6,26 (1H, s) foi relacionado a um hidrogênio olefínico e aqueles em δ_H 3,95 (3H, s) e δ_H 3,56 (3H, s) foram associados a grupos metilas ligados a heteroátomos (N ou O);

A partir do espectro bidimensional homonuclear COSY (FIGURA 5.59) foi possível observar para a substância **12** o acoplamento do sinal δ_H 8,43 com o δ_H 7,03, estando esse último acoplando também com outro em δ_H 6,88. Esses valores, juntamente com as constantes de acoplamento calculadas, possibilitaram atribuir as posições do anel A (FIGURA 5.60). Também foi possível observar, através do mesmo espectro, o acoplamento entre os hidrogênios do grupo substituinte fenila, com os sinais em δ_H 7,52 e δ_H 7,42.

A análise do espectro de HSQC (FIGURA 5.61) mostrou a correlação do δ_H 3,56 com δ_C 37,4, tratando-se de um grupo metila ligado ao nitrogênio. Também foi possível verificar a correlação do hidrogênio olefínico δ_H 6,26 com δ_C 112,5. E para o substituinte fenila, verificou-se a correlação entre δ_H 7,52 (H-3', H4' e H-5') com δ_C 129,1, e δ_H 7,42 (H-2' e H6') com δ_C 128,6.

O estudo do mapa de contorno de HMBC (FIGURA 5.62) permitiu confirmar o posicionamento do substituinte fenila na posição C-2, uma vez que o sinal δ_H 7,42 (H-2' e H-6') apresentou um acoplamento a longa distância (J^3) com C-2 (δ_C 154,5). Para o hidrogênio olefínico H-3 (δ_H 6,26), o espectro de HMBC permitiu atribuir a posição C-3 do esqueleto, uma vez que este apresentou acoplamento a longa distância com δ_C 154,5 (J^2), δ_C 120,9 (J^3) e δ_C 135,6 (J^3).

O espectro de massas obtido da substância **12** (FIGURA 5.63 C) apresentou pico do íon molecular com razão massa/carga 265 daltons (banda indicada como 4 no cromatograma), levando à fórmula molecular $C_{17}H_{15}NO$.

A análise dos dados experimentais obtidos permitiram concluir que a substância identificada é o alcalóide 2-fenil-1-metil-7-metoxi-quinolin-4-ona (FIGURA 5.64), como já mencionado, e já isolado anteriormente na mesma família (IRIARTE, 1956). Seus respectivos valores de deslocamento químico de 1H e ^{13}C podem ser encontrados na TABELA 5.18.

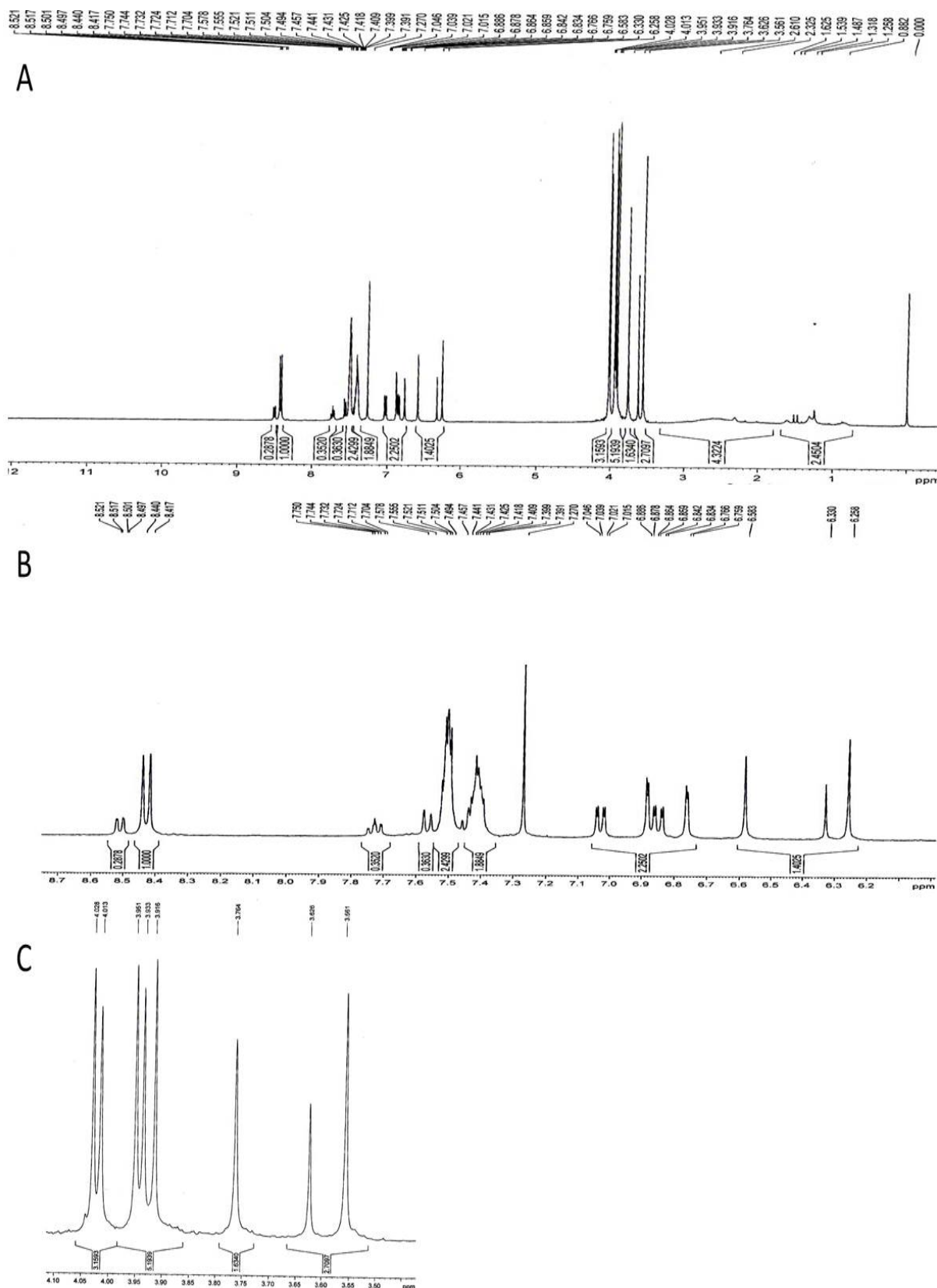


FIGURA 5.58 – (A) Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) das substâncias 9, 11 e 12; (B) Expansão na região dos H aromáticos (CDCl_3 , 400 MHz); (C) Expansão na região das metoxilas (CDCl_3 , 400 MHz).

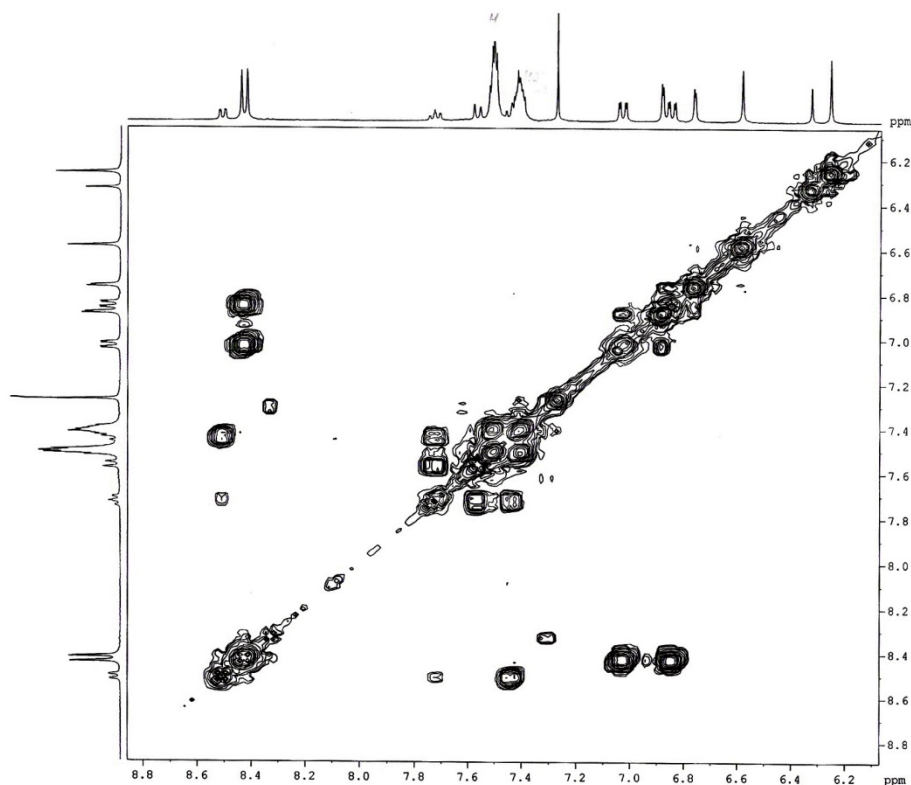


FIGURA 5.59 - Mapa de contorno de COSY das substâncias 9, 11 e 12. (CDCl₃, 400 MHz).

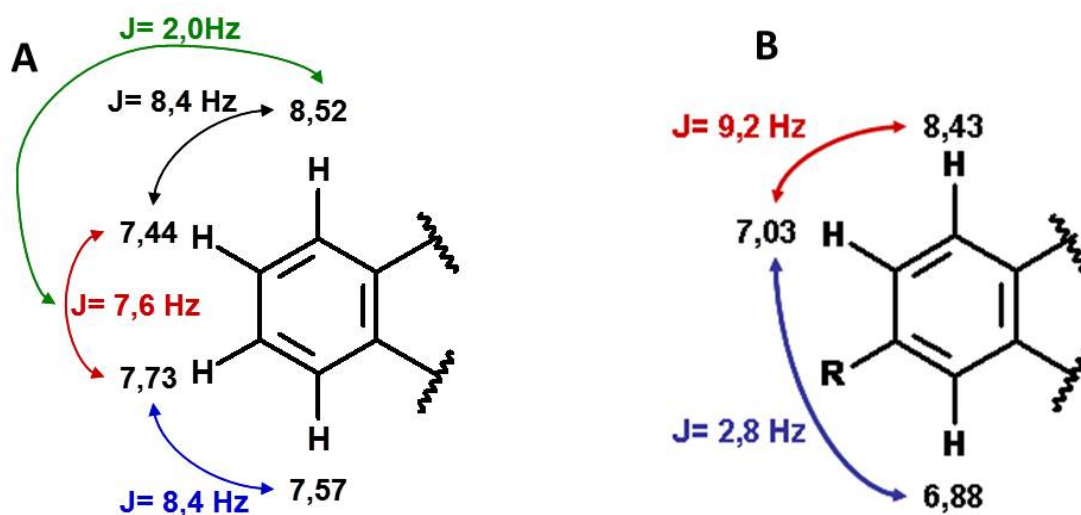


FIGURA 5.60 – Acoplamentos para os hidrogênios do anel A da substância 11. (A) e substância 12 (B).

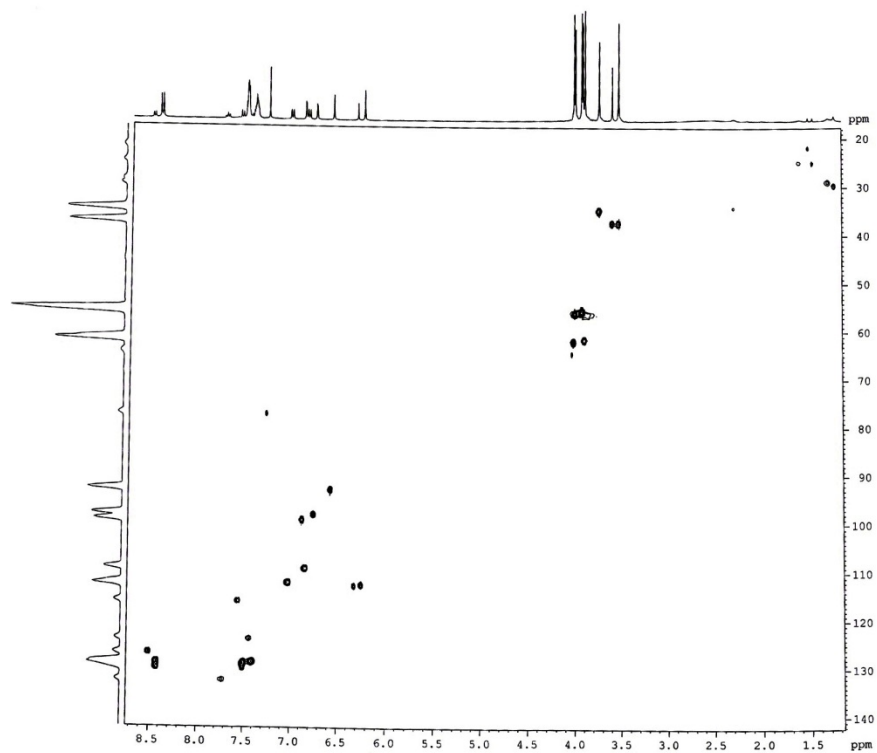


FIGURA 5.61 – Mapa de contorno de HSQC das substâncias 9, 11 e 12 (CDCl_3 , 400 MHz).

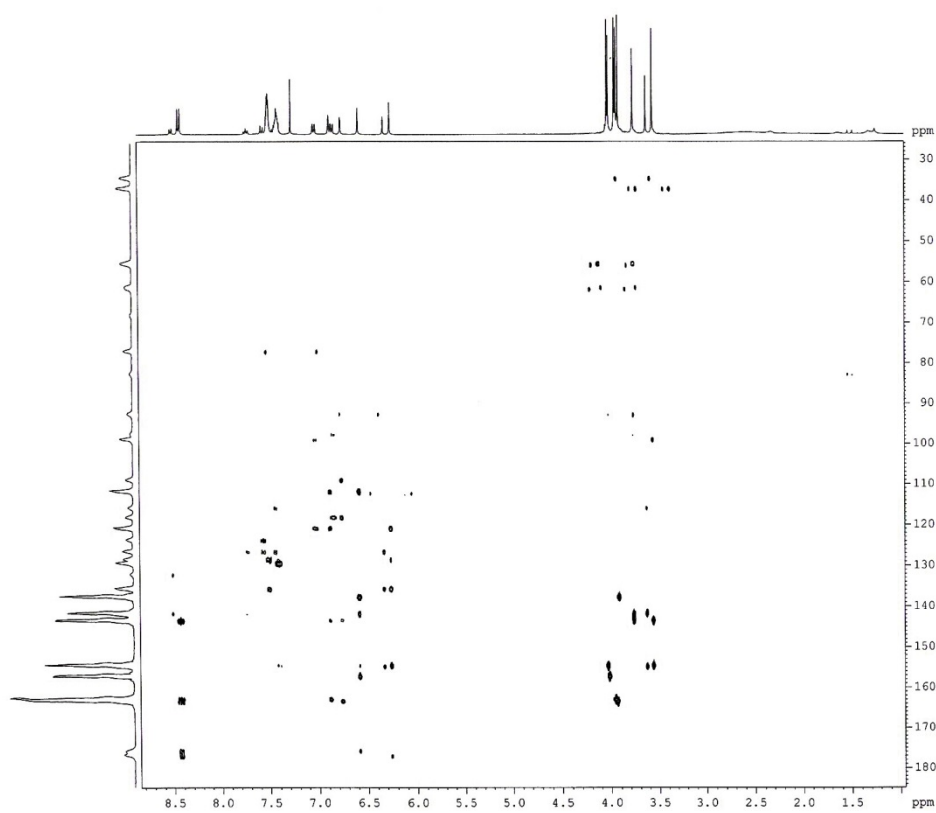
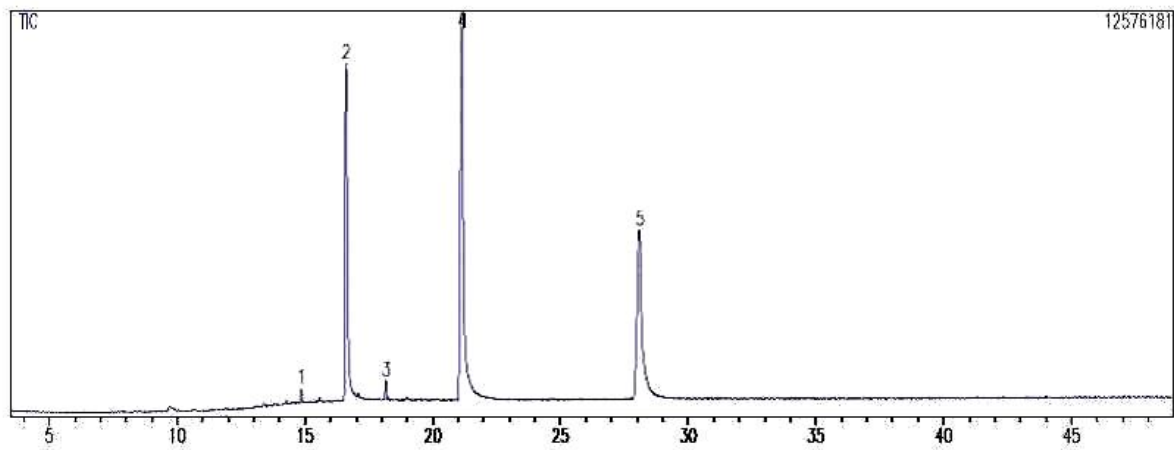
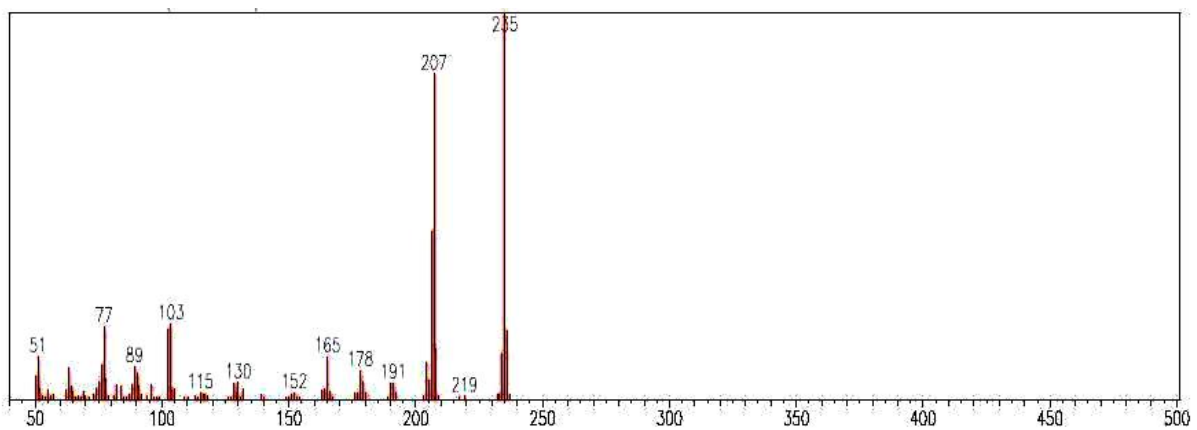


FIGURA 5.62 - Mapa de contorno de HMBC das substâncias 9, 11 e 12 (CDCl_3 , 400 MHz).

(A)



(B)



(C)

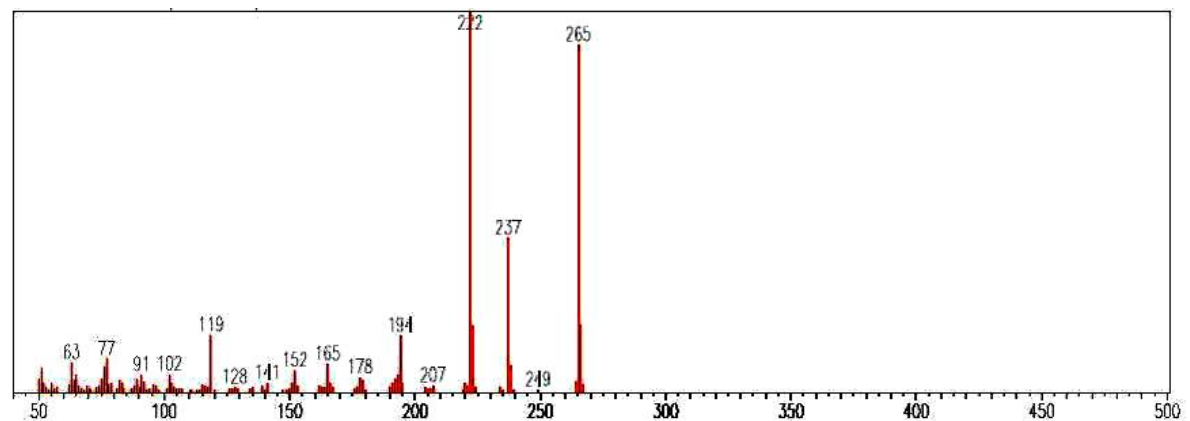


FIGURA 5.63 – (A) Cromatograma da fração 2632CDM 13-18; (B) Espectro de massa (IE = 70 eV) da substância 11; (C) Espectro de massa (IE = 70 eV) da substância 12 (IE = 70 eV).

TABELA 5.16 - Dados de RMN ^1H para a substância **11** e comparação com a literatura.

2-fenil-1-metil-quinolin-4-ona		
Hidrogênio	Isolada (a)	BIAVATTI, 2001 (b)
	δ	Δ
3	6,33 (1H, <i>s</i>)	6,31 (1H, <i>s</i>)
5	8,52 (1H, <i>dd</i> , J= 8,4 e 2,0 Hz)	8,51 (1H, <i>dd</i>)
6	7,44 (1H, <i>m</i>)	7,45 (1H, <i>dd</i>)
7	7,73 (1H, <i>ddd</i> , J= 8,4; 7,6 e 2,0 Hz)	7,73 (1H, <i>ddd</i>)
8	7,57 (1H, <i>dl</i> , J= 8,4 Hz)	7,57 (1H, <i>dl</i>)
N-Me	3,63 (3H, <i>s</i>)	3,62 (3H, <i>s</i>)
2'	7,42	7,42
3'	7,52	7,52
4'	7,52	7,52
5'	7,52	7,52
6'	7,42	7,42

(a) 400 MHz, CDCl_3 ; (b) 400 Mhz, CDCl_3

TABELA 5.17 - Dados de RMN ^{13}C para a substância **11** e comparação com a literatura.

2-fenil-1-metil-quinolin-4-ona		
Carbono	Isolada (a)	BIAVATTI, 2001 (b)
	δ	δ
2	154,5	154,8
3	112,5	112,7
4	176,8	177,6
4a	126,5	126,8
5	126,9	126,8
6	123,9	123,8
7	132,5	132,3
8	161,0	115,9
8a	141,7	141,9
1'	135,6	135,9
2'	128,6	128,5
3'	129,1	128,8
4'	129,1	129,6
5'	129,1	128,8
6'	128,6	128,5
N-Me	37,4	37,3

(a) valores de Carbonos obtidos através de experimentos de HSQC e HMBC (400 MHz, CDCl_3) (b) 100 Mhz, CDCl_3

TABELA 5.18 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C para a substância **12**.

2-fenil-1-metil-7-metoxi-quinolin-4-ona		
	Carbono (a)	Hidrogênio (b)
	δ	Δ
2	154,5	-
3	112,5	6,26 (1H, <i>s</i>)
4	176,8	-
4 ^a	120,9	-
5	128,5	8,43 (1H, <i>d</i> J= 9,2 Hz)
6	112,5	7,03 (1H, <i>dd</i> , J= 9,2 e 2,8 Hz)
7	163,1	-
8	99,3	6,88 (1H, <i>d</i> , J= 2,8 Hz)
8 ^a	143,5	-
N-Me	37,4	3,56 (3H, <i>s</i>)
OMe (C-7)	55,0	3,95 (3H, <i>s</i>)
1'	135,6	-
2'	128,6	7,42 (1H, <i>m</i>)
3'	129,0	7,52 (1H, <i>m</i>)
4'	129,4	7,52 (1H, <i>m</i>)
5'	129,0	7,52 (1H, <i>m</i>)
6'	128,5	7,42 (1H, <i>m</i>)

(a) valores de Carbonos obtidos através de experimentos de HSQC e HMBC (400 MHz, CDCl_3); (b) 400 MHz, CDCl_3

6 - Conclusões

6 – Conclusões

O estudo fitoquímico de *Conchocarpus marginatus* proporcionou o isolamento de 12 substâncias, sendo estes fitoesteróides, alcalóides quinolínicos e alcalóides acridônicos. Dentre as substâncias isoladas 4 destas são ainda inéditas na literatura: 1,2,3,6-tetrametoxi-10-metilacridona (substância **4**), 1-hidroxi-2,3,6-trimetoxi-10-metilacridona (substância **5**), 1,2,3,6-tetrametoxi-10-acridona (substância **9**) e 1-hidroxi-3,6-dimetoxi-10-metilacridona (substância **10**). Já a substância 2-fenil-1-metil-7-metoxi-quinolin-4-ona (substância **12**) encontrou-se como sendo inédita no gênero. Dessa maneira, este estudo contribuiu para o melhor conhecimento do perfil químico do gênero, confirmando a classificação desta espécie junto à família Rutaceae.

Neste trabalho, observou-se uma grande quantidade e variedade de alcalóides, principalmente os acridônicos, podendo assim terem mascarados outros possíveis metabólitos que estavam presentes em menor quantidade. Porém, o fato da grande incidência de alcalóides na planta em estudo pode ser justificada uma vez que a família Rutaceae é conhecida por possuir uma grande diversidade de metabólitos secundários, como alcalóides, principalmente os derivados do ácido antranílico.

Os resultados fitoquímicos obtidos confirmaram a classificação do gênero em Rutaceae. A partir dos resultados obtidos pode-se também concluir que a proposta de Kallunki e Pirani (KALLUNKI & PIRANI, 1998) está correta, ao classificar o gênero como *Conchocarpus*.

7 - Referências Bibliográficas

7 - Referências Bibliográficas

AMBROZIN, A. R. P. ; VIEIRA, P. C. ; FERNANDES, J. B. ; SILVA, M. F. G. F. “Piranoflavonas inéditas e atividades tripanocidas das substâncias isoladas de *Conchocarpus heterophyllus*”. Quim. Nova, Vol. 31, No. 4, 740-743, 2008

BERGENTAL, D.; MESTER, I.; ROSZA, Zs. & REISH, J. “¹³C-NMR-spectren einiiger acridon-alkaloide”. *Phytochemistry*, **18**: 161-163, 1979.

BIAVATTI, M. W. Química e Bioatividade de *Raulinoa echinata* (Rutaceae), espécie endêmica do vale do Itajaí –SC. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2001. Tese de Doutorado, 246 p.

BRAZ FILHO, R. “Química de produtos naturais: importância, interdisciplinaridade, dificuldades e perspectivas. A peregrinação de um pacatubano”. Quím. Nova, 17 (5), 405-421, 1994.

CORTEZ, L.E.R. Estudo fitoquímico de *Conchocarpus gaudichaudianus subsp. Bahiensis* e *Almeidea coerulea*. A busca de compostos biologicamente ativos. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2002. Tese de Doutorado, 202 p.

CRAGG, G. M., NEWMAN, D. J., SNADER, K. M. “Natural products in drug discovery and development”. J. Nat. Prod., 60 (1), 52-60, 1997.

DEWICK, P. M. Medicinal Natural Products, A Biosynthetic Approach. Second Edition, John Wiley & Sons Ltd, 2002. 507 p.

FURUKAWA, H., YOGO, M., WU, T. “Acridone Alkaloids. X. ¹³C-Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Acridone Alkaloids”. Chem. Pharm. Bull, 31: (9) 3084-3090, 1983.

GROGER, D. “Vorkommen und biochemie der acridon-alkaloide – ein fortschrittsbericht”. Pharmazie, **43**: 815-826, 1988.

IRIARTE, J., KINCL, F. A., ROSENKRANZ, G., SONDHHEMEIER, F. “The constituents of *Casimiroa edulis* Llave et Lex. Part II, The bark” Journal of the Chemical Society, 1956:4170-4173, 1956.

KALLUNKI, J.A.; PIRANI, J.R. “Synopsis of *Angostura* Roem. & Schults. And *Conchocarpus* J. C. Mikan (Rutaceae)”. Kew Bulletin, **53**: 257-334, 1998.

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.

MITTERMEIER, R. A., WERNER, T., AYRES, J. M., FONSECA, G. A. B. “O país da biodiversidade”. *Ciência Hoje*, 14 (81), 20-27, 1992.

PETSKO, G. A. “For medicinal purposes”. *Nature*, 384 (6604), 7-9, 1996

PIRANI, J. R. “Flora da Reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Rutaceae”. *Rodriguesia*, 56 (86): 189-204, 2005.

PIRANI, J.R., F. F. BEGALE, SILVA F.G. Rutaceae in Flora brasiliensis revisitada. <http://flora.cria.org.br> (10/02/2009).

REMBOLD, H. “Azadirachtins”. IN: *Insecticides of Plant Origin*. ARNASON, J. T.; PHILOGÉNE, B.; MORAND, P. (Eds.). Washington, ACS. p 150, 1989.

ROBBERS, J. E., SPEEDIE, M. K., TYLER, V. E. *Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1996, p. 2-3.

ROMAGNI, J. G.; NANAYAKKARA, N. P. D.; ROSELL, R.; DAYAN, F. E. “Ecophysiological Roles of Selected Lichen Secondary Compounds”. In: *Allelopathy from Molecules to Ecosystems*. REIGOSA, M. J.; PEDROL, N. (Eds.). Enfield: Science Publishers, 316, **2002**.

VIEIRA, P.C.; KUBO, I.; KUJIME, H.; YAMAJIVA, T. “Molluscicidal acridone alkaloids from *Angostura paniculata*: isolation, structures and synthesis”. *J. Nat. Prod.*, **55**: 1112-1117, 1992.

WATTERMANN, P. G., “Alkaloids of the Rutaceae. Distribution and systematic significance”. *Biochem. Syst. Eco.*, **3** : 149-180, 1975

WATERMAN, P. G., GRUNDON, M. F. *Chemistry and Chemical Taxonomy on the Rutales*. London, Academic Press, 1983, p. 308-309.

WATTERMANN, P. G. “The chemical systematic of alkaloids: a review emphasizing the contribution of Robert Hegnauer”. *Biochem. Syst. Eco.*, **27** (4):395-406, 1999.

Capítulo II

“Avaliação do potencial biológico dos compostos isolados”

1 - Introdução

1 – Introdução

1.1 – Plantas Daninhas

O controle de plantas daninhas é essencial para garantir a qualidade e produtividade das plantações. Desde o início das atividades agrícolas, a produtividade de plantas cultivadas tem sido reduzida por pragas, doenças e principalmente pela competição com as plantas daninhas, que existem desde que o homem começou a produzir alimentos para sua subsistência há cerca de 10000 anos.

O Brasil possui extensas áreas ocupadas por agricultura intensiva, com boas condições climáticas, favorecendo a proliferação de pragas que causam danos consideráveis e prejudicam boa parte da colheita. Desse modo, a agricultura brasileira representa um dos grandes mercados mundiais para pesticidas químicos, estes, muitas vezes antieconômicos, pouco biodegradáveis e tóxicos, ocasionando problemas para agricultores, consumidores de produtos agrícolas e ao meio ambiente. Assim, as plantas daninhas são conhecidas como um dos mais sérios limitantes à produção agrícola, sendo que o controle destas espécies é geralmente realizado através de métodos mecânicos ou químicos, muitas vezes com conseqüências prejudiciais para o meio ambiente, à saúde humana e animal (ROBBS, 1999).

Planta daninha pode ser definida como toda aquela cujas vantagens não têm sido ainda descobertas e cresce onde não é desejada (VYVYAN, 2002). As espécies daninhas podem germinar, crescer, desenvolver-se e reproduzir em condições ambientais pouco favoráveis, como em estresse hídrico, umidade excessiva, temperaturas pouco propícias, fertilidade desfavorável, elevada salinidade, acidez ou alcalinidade.

As plantas daninhas interferem no cultivo de plantas por competir pela luz, água, nutrientes, parasitismo, além de se mostrar como hospedeiros de pragas e doenças (SILVA, 1999). Estas, apesar de apresentarem as mesmas

necessidades básicas que as plantas cultivadas, possuem maior habilidade em aproveitar os elementos vitais, disponíveis no meio ambiente, possuindo em sua estrutura orgânica: 1,6 vez mais Fósforo; duas vezes mais Nitrogênio; 3,3 vezes mais Magnésio; 3,5 vezes mais Potássio e 7,6 vezes mais Cálcio, que as plantas cultivadas.

1.1.1 - Métodos de Controle de Plantas Daninhas

Os métodos para o controle de plantas daninhas são os mais variados possíveis. Pesquisas realizadas verificam uma grande evolução nessa área, que abrangem desde o arranque manual das plantas até a utilização de equipamentos sofisticados de microondas para exterminar as sementes no solo. No entanto, recomenda-se o “manejo integrado de plantas daninhas”, que consiste num sistema ambiental de campo, usando todos os conhecimentos e ferramentas disponíveis para produção de culturas livres de danos econômicos da vegetação daninha competitiva (SILVA, 2001).

A indústria de herbicidas manteve seu foco na produção de herbicidas sintéticos (VYVYAN, 2002), porém a preocupação pública sobre o impacto desses sobre a saúde humana e ao meio-ambiente voltou a atenção ao desenvolvimento de tecnologias alternativas baseadas em produtos naturais.

Quanto ao mecanismo de ação, os herbicidas podem ser classificados em: reguladores de crescimento, inibidores do crescimento, inibidores da fotossíntese, formadores de radicais livres, dentre outros (SPADOTTO, 2002). Dentre todos, os herbicidas inibidores da fotossíntese é umas das classes mais importantes em todo o mundo. Estes são amplamente empregados na agricultura brasileira nas culturas de milho, cana-de-açúcar, soja, fruteiras, hortaliças, entre outras. O DCMU (3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetiluréia) (FIGURA 1.1) é um representante dessa classe, é um herbicida que inibe a fotossíntese.

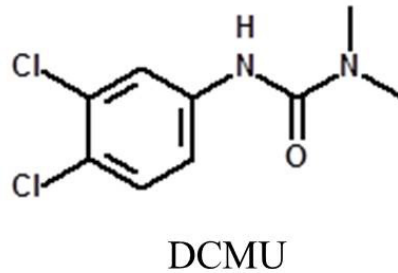


FIGURA 1.1 – Estrutura química do herbicida comercial (3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetiluréia).

1.1.2 – Cadeia de transporte de elétrons

Os pigmentos, as proteínas e outras substâncias químicas envolvidas na reação da fotossíntese estão localizados nos cloroplastos, e são neles que todo o processo fotossintético ocorre. Os cloroplastos estão localizados na parede celular das folhas, e no interior destes cloroplastos encontramos os tilacóides (FIGURA 1.2), organela envolvida no processo de transporte de elétrons. Em condições normais, sem a interferência de inibidores fotossintéticos, durante a fase luminosa da fotossíntese, 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 presa a uma membrana do cloroplasto (Qa). A molécula da plastoquinona “Qa” transfere o elétron, por sua vez, para uma outra molécula de plastoquinona, chamada “Qb”, também presa na proteína (FIGURA 1.3).

Quando um segundo elétron é transferido para a plastoquinona “Qb”, a quinona reduzida torna-se protonada (dois íons de hidrogênio são adicionados), formando uma plastoidroquinona (QbH₂), com baixa afinidade para se prender na proteína. De maneira simplificada, a função da plastoidroquinona é transferir elétrons entre os fotossistemas II (P680) e I (P700) (FIGURA 1.4), garantindo a produção e energia pela planta.

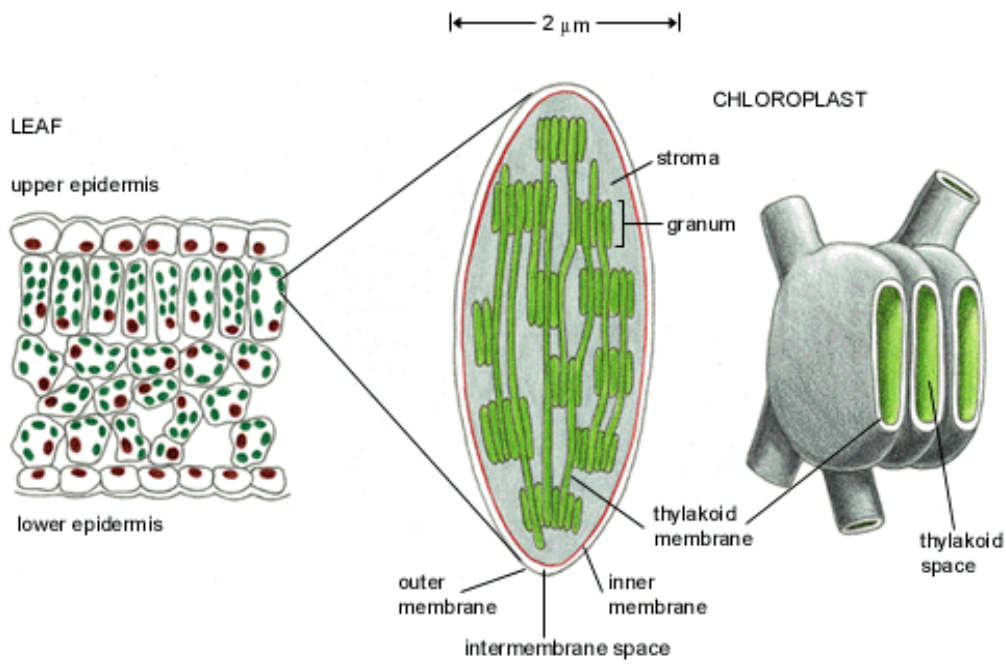


FIGURA 1.2 – Os cloroplastos e suas organelas, destacando os tilacóides.

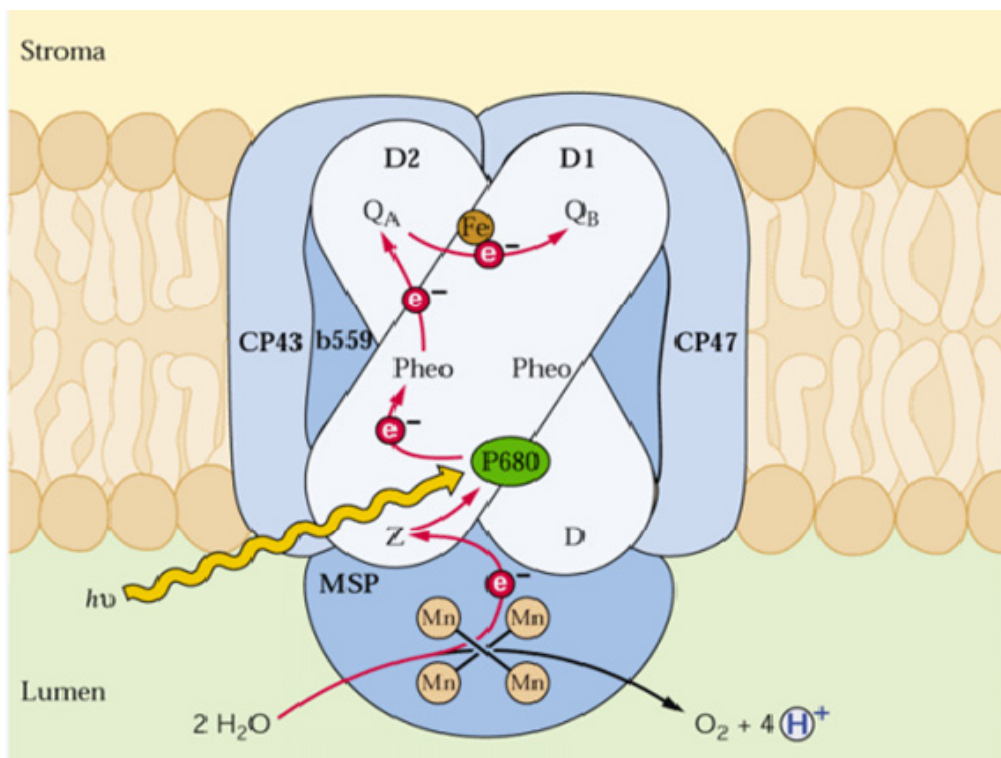


FIGURA 1.3 - Imagem representando o transporte de elétrons no fotossistema II. (TAIZ, 2004)

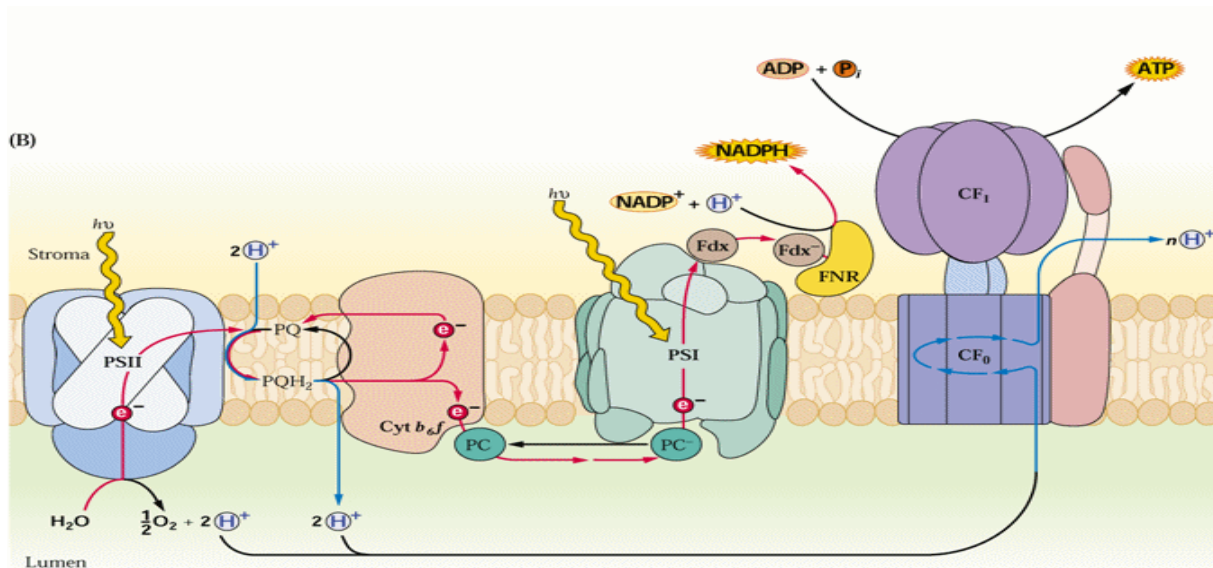


FIGURA 1.4 – Transporte de elétrons entre os quatro grandes complexos protéicos (FSII, FSI, o complexo citocromo *b6f* e o complexo protéico ATP sintase) dos tilacóides de plantas superiores (TAIZ, 2004).

Muitos herbicidas inibidores do fotossistema II se ligam à proteína D-1 no sítio onde se prende a plastoquinona “Qb”. Esses herbicidas competem com a plastoquinona “Qb” parcialmente reduzida (QbH) pelo sítio na proteína D-1, ocasionando a saída da plastoquinona e interrompendo o fluxo de elétrons entre os fotossistemas. Além da competição em si pelo sítio na proteína, os herbicidas apresentam maior tempo de residência do que a plastoquinona “Qb”, o que aumenta o seu efeito inibitório. É possível citar como exemplo o herbicida comercial DCMU, 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetiluréia, bloqueando o fluxo de elétrons fotossintético pelo mecanismo descrito acima (VEIGA, 2008).

1.1.3 - 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 seus trabalhos com um projeto em parceria com o Prof^o. Dr. Blas Lotina-

Hennsen da Universidade Nacional Autônoma do México, que teve como objetivo principal aprender as técnicas de ensaios de inibição da fotossíntese para posterior implantação no Laboratório de Produtos Naturais da UFSCar.

Foram realizados ensaios bioquímicos de avaliação do potencial fitotóxico de aproximadamente 160 produtos naturais em um estágio realizado por um aluno do grupo. (VEIGA *et al*, 2007a; VEIGA *et al*, 2007b, VEIGA, 2008; VEIGA *et al*, 2008).

Os resultados mostraram que os compostos ensaiados apresentaram os mais variados mecanismos de ação, indicando excelentes perspectivas para continuação deste tipo de estudo.

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

1.2 – O Câncer

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores (acúmulo de células cancerosas). Por outro lado, um tumor benigno raramente constitui um risco de vida.

1.2.1 – Tipos de Câncer

Os diferentes tipos de câncer correspondem aos vários tipos de células do corpo. Por exemplo, existem diversos tipos de câncer de pele porque a pele é formada de mais de um tipo de célula. Se o câncer tem início em tecidos

epiteliais como pele ou mucosas ele é denominado carcinoma. Se começa em tecidos conjuntivos como osso, músculo ou cartilagem é chamado de sarcoma. Outras características que diferenciam os diversos tipos de câncer entre si são a velocidade de multiplicação das células e a capacidade de invadir tecidos e órgãos vizinhos ou distantes (metástases).

1.2.2 – Causas do Câncer

As causas de câncer são variadas, podendo ser externas ou internas ao organismo, estando ambas inter-relacionadas. As causas externas relacionam-se ao meio ambiente e aos hábitos ou costumes próprios de um ambiente social e cultural. As causas internas são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas, estão ligadas à capacidade do organismo de se defender das agressões externas. Esses fatores causais podem interagir de várias formas, aumentando a probabilidade de transformações malignas nas células normais (INCA – “Instituto Nacional do Câncer”, visitado em 17/02/09).

1.2.3 – Importância dos Produtos Naturais no Tratamento do Câncer

O papel dos produtos naturais, de todas as origens, no descobrimento de fármacos tem sido revisto recentemente, e uma grande parte tem sido devotada exclusivamente ao tratamento anticâncer (PETTIT, et. al., 1994). Há atualmente um grande interesse por produtos naturais para o tratamento dessa doença. Por exemplo, dos 87 fármacos anticâncer aprovadas 62% são de origem natural ou foram modeladas em produtos naturais de partida, e entre as 299 substâncias candidatas a fármacos anticancerígenas em desenvolvimento clínico ou pré-clínico 61% são de origem natural (CRAGG, et. al., 1997).

Um grande número de alcalóides acridônicos têm sido isolados da família Rutaceae. Estes são conhecidos por apresentar diversas atividades

biológicas, como antivirais, antiinflamatórias, antimaláricas, entre outras, sendo inclusive utilizado no tratamento e combate ao câncer. A atividade antitumoral de diversos alcalóides acridônicos tem sido estudada frente várias linhagens celulares (CHOU et al., 1989; ITOIGAWA ET AL.; LISKA, 1972; KAWAII et al, 1999). Dentre estes, a acronicina (**1**) merece atenção especial (FIGURA 1,5). Seus estudos foram iniciados em 1966, e verificou-se que esta apresentou atividade contra diversos tipos de câncer (SVOBODA, 1966; WATTERMAN & GRUNDON, 1983).

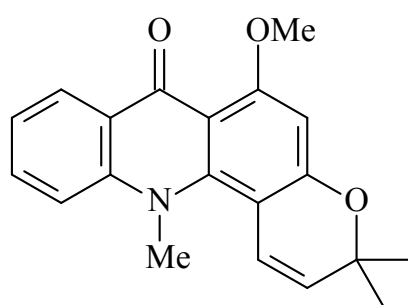


FIGURA 1.5 – Estutura química da Acronicina.

2 - Objetivos

2- Objetivos

Os ensaios realizados no laboratório de Produtos Naturais do departamento de Química da UFSCar, em parceria com o laboratório CEQMED-UP na Universidade do Porto, tiveram como principal objetivo:

- Avaliar a atividade das substâncias isoladas frente à ensaios herbicidas;
- Avaliar o potencial antitumoral dos compostos isolados.

3 – Experimental

3 – Experimental

3.1 – Procedimento Experimental para ensaios da inibição da fotossíntese

Todos os procedimentos para a realização dos ensaios biológicos herbicidas foram realizados no laboratório de pesquisa de Produtos Naturais do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

3.1.2 - Estudos de fluorescência da Clorofila a (Chl a)

Folhas de espinafre foram obtidas em supermercados do município de São Carlos. Em seguida foram lavadas e secas, para posterior seleção das folhas com maior grau de uniformidade. Para extração dos cloroplastos de espinafre, aproximadamente 40 g de folhas livres da nervura central e das extremidades basal e apical foram trituradas em liquidificador e submetidas à extração com 100 mL do meio I. Este, por sua vez, era composto por: sacarose (400 mmol L^{-1}), MgCl_2 (5 mmol L^{-1}), KCl (10 mmol L^{-1}) e K^+ -tricina (30 mmol L^{-1}) em $\text{pH } 8,0$ ($1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KOH}$). Em seguida, este foi homogeneizado e filtrado com o auxílio de camadas de gaze. O filtrado foi centrifugado a 4000 rpm, a 4°C por 5 minutos, o sobrenadante foi eliminado e o sólido contendo os cloroplastos foi dissolvido em 1 mL do meio I (FIGURA 3.1) (LOTINA-HENNSEN *et al.*, 1999).

Para determinar a concentração da clorofila, uma alíquota de 20 μL da suspensão de cloroplastos foi transferida para um tubo de centrífuga a 4.000 rpm contendo 5 mL de acetona 80%, e agitada a 25°C por 5 minutos. A amostra permaneceu no escuro por cinco minutos e depois foi submetida à centrifugação clínica. Realizaram-se então medidas de absorbâncias do sobrenadante nos comprimentos de onda de $\lambda=645$ e 663 nm de acordo com a equação abaixo (ROMAGNI *et al.*, 2002).

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

Meio I:	Meio II:
<ul style="list-style-type: none"> • Sacarose (400 mmol / L) • MgCl₂ (5 mmol / L) • KCl (10 mmol / L) • Tricina (30 mmol / L) • pH 8,0 	<ul style="list-style-type: none"> • Sacarose (100 mmol / L) • MgCl₂.6H₂O (5 mmol / L) • KCl (10 mmol / L) • Tricina (1 mmol / L) • KCN (0,5 mmol / L) • pH 8,0

FIGURA 3.1 – Meios de cultura utilizados no ensaio de fluorescência da Clorofila *a* (Chl *a*)

Para monitorar os transientes da fluorescência da Chl *a*, alíquotas de tilacóides adaptadas ao escuro contendo 20 μ g de Chl foram transferidos a um papel de filtro, para gerar homogeneidade e reprodutibilidade dos tilacóides no papel de filtro. Em seguida o material foi adicionado em 3mL do meio II (FIGURA 3.1), no qual permaneceu incubado por 5 minutos. Este meio era constituído por: Sacarose (100 mmol/L), KCl (10 mmol/L), MgCl₂.6H₂O (5mmol/L), Tricina (1 mmol/L), KCN (0,5 mmol/L) e Metilviologênio (50 μ M), em pH 8,0. As amostras foram mantidas no escuro, e posteriormente foram realizadas as leituras dos parâmetros cinéticos. As curvas de indução da Chl *a* foram medidas a temperatura ambiente, utilizando o Hansatech Handy PEA (*Plant Efficient Analyzer*) (Strasser *et al.*,1995). O rendimento máximo da fluorescência das amostras foi gerado usando três fontes de diodos, que emitem luz em $\lambda=650\text{nm}$. A duração do pulso foi de 1s. Os resultados obtidos representam a média de 3 repetições.

3.2 – Procedimento Experimental para ensaios antitumorais

Os ensaios biológicos foram realizados na Universidade do Porto, na cidade do Porto, em Portugal, no laboratório CEQMED-UP, Serviço de Microbiologia na Faculdade de Farmácia.

3.2.1 – O teste SRB

O teste da sulforodamina B (SRB) foi desenvolvido por Skehan e colaboradores para medir a citotoxicidade de fármacos *in vitro* e a proliferação de células (SKEHAN *et al.*, 1990). Este ensaio trata-se de um micrométodo que utiliza placas de 96 poços e que avalia o efeito de compostos sobre células em crescimento exponencial após uma exposição contínua de 48 horas, através da quantificação do conteúdo protéico celular pelo corante sulforodamina B (SRB). Esse é um processo adotado pelo National Câncer Institute (NCI).

As diferentes linhas celulares foram inoculadas em placas de 96 poços de fundo plano, e incubadas durante 24 horas antes da adição dos compostos, a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ com 95% de umidade, para promover a adsorção das células na placa. . As linhas celulares testadas foram MCF-7 (adenocarcinoma da mama), NCI-H460 (câncer de pulmão) e A375-C5 (cancro de melanoma) (FIGURA 3.3).

Foram testadas 5 concentrações para cada composto (150; 75; 37,5; 18,75 e 9,375 µM/poço), as quais foram preparadas por diluições seriadas (1:2) em meio de cultura (seção 3.2.1.1). Em cada ensaio o composto foi testado em duplicata (foram realizados dois ensaios para cada composto, portanto cada concentração foi testada quatro vezes em cada linha celular usada) (FIGURA 3.4).

Para cada ensaio foi preparada uma placa idêntica, a qual foi designada por placa T₀, que serviu para determinar o conteúdo protéico celular no momento de adição do composto e deste modo avaliar a sua toxicidade. Esta placa foi fixada imediatamente antes da adição do composto às placas teste.

Após 48 horas de exposição ao composto, as células foram fixadas com uma solução de ácido tricloroacético 50% (seção 3.2.1.2). Depois de totalmente secas as células foram coradas com uma solução de SRB (seção 3.2.1.3). O excesso de SRB foi removido por lavagem da placa com solução de ácido acético 1%. O SRB foi posteriormente solubilizado com tampão tris(hidroximetil)aminometano (Tris). A placa T₀, previamente fixada foi corada de igual modo. Procedeu-se a leitura de densidade óptica em espectrofotômetro de placas (seção 3.2.1.4).

Para cada linha celular foi obtida uma curva dose-resposta tendo o valor de GI₅₀, concentração do composto que causou uma redução de 50% no crescimento celular comparativamente às células controles não tratadas, tendo sido determinado por interpolação gráfica, com base no programa de cálculo fornecido pelo NCI, EUA (MONKS et al., 1991).

Como controle positivo, foi usado o composto Doxorubicina, que é uma droga usada na quimioterapia contra o câncer. Doxorubicina é bastante semelhante ao produto natural Daunorubicina (FIGURA 3.2), produzido naturalmente por uma bactéria (*Streptomyces peucetius*). Esta classe é a mais efetiva no tratamento anticâncer.

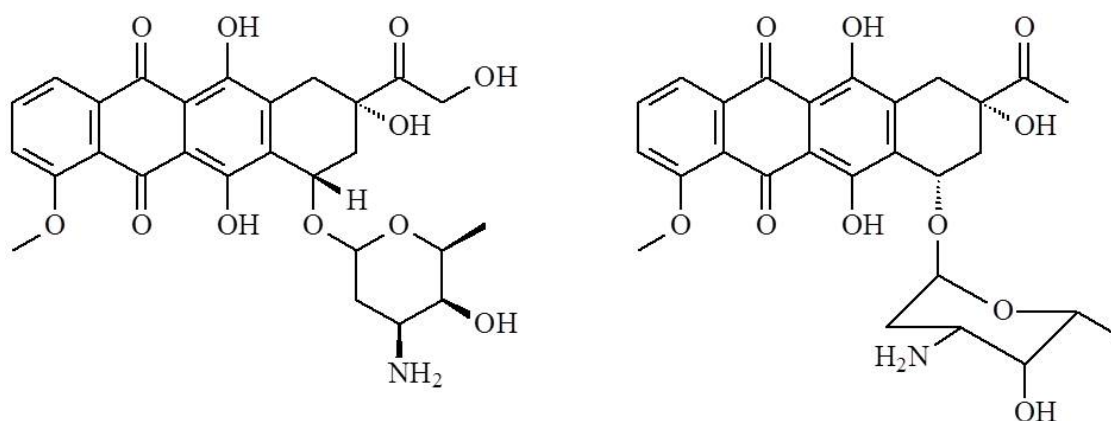


FIGURA 3.2 – Estrutura química da substância Doxorubicina (esquerda) e Daunorubicina (direita).

3.2.1.1 - Preparação do meio completo (RPMI completo)

O meio de cultura foi preparado de acordo com a TABELA 3.1, utilizando meio RPMI 1640(a), Soro Bovino fetal (SBF)(b), Glutamina(c) e Penicilina(d)/Estreptomicina(e). Os três primeiros (a, b, c) foram obtidos do Gibco Invitrogen Co (Scotland, UK), e os dois últimos (d, e) foram obtidos da Sigma Chemical Co (Saint Louis, USA).

TABELA 3.1 – Preparação do meio de cultura RPMI completo.

Meio (mL)	SBF a 5%		Glutamina (mL)	P/S (mL)
	RPMI (mL)	SBF (mL)		
25	23.75	1.25	0.25	0.50
50	47.50	2.50	0.50	1.00
75	71.25	3.75	0.75	1.50
100	95.00	5.00	1.00	2.00

3.2.1.2 - Fixação das placas

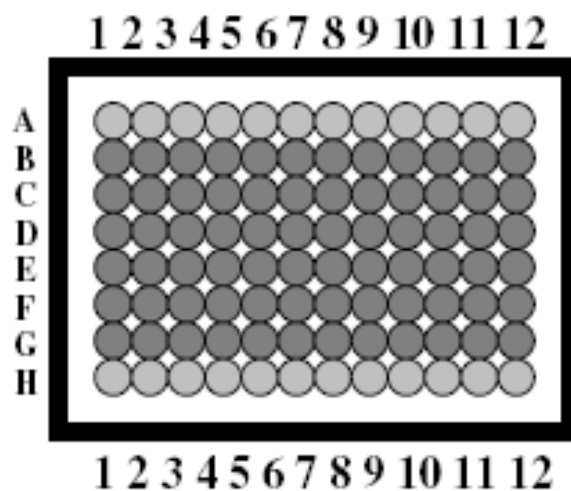
Foi realizada com ácido tricloroacético (TCA) 50%. Adiciona-se 50 µL de TCA em cada poço. Colocou-se sob refrigeração a 4°C durante 1 hora. Passada essa hora, retirou-se o ácido e lavou-se com H₂O destilada (cerca de 5 vezes). Esperou secar (pode-se forçar a secagem pondo numa estufa a 37°C).

3.2.1.3 - Coloração das placas

Depois das placas T₀ e as de teste estarem completamente secas, estas foram coradas pela adição de 50 µL de SRB (0.4% w/v em 1% ácido acético glacial), obtidas da Sigma Chemical Co (Saint Louis, USA). Esperou-se 30 minutos à temperatura ambiente. Removeu-se o SRB e lavou-se 5 vezes com ácido acético 1%. Deixou secar (pode-se “forçar” a secagem, colocando as placas na estufa a 37°C).

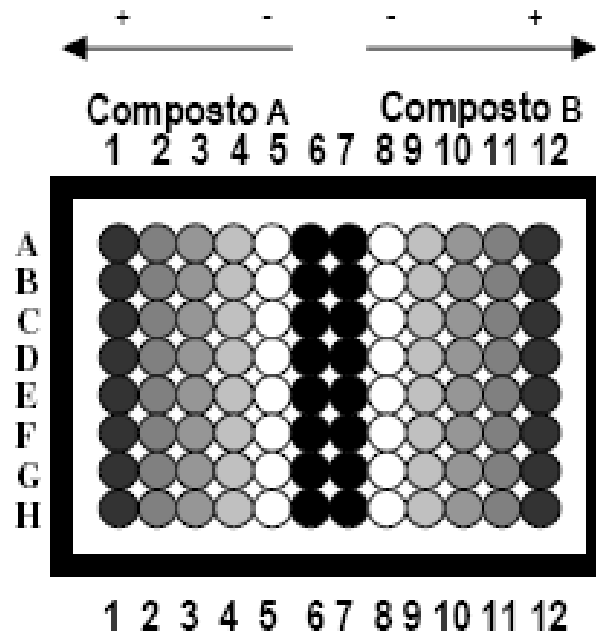
3.2.1.4 - Solubilização das placas e leitura

Depois das placas T_0 e as de teste estarem completamente secas, adicionou-se 100 μL de TRIS em cada poço (para solubilizar com o SRB) e deixou atuando durante 30 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, efetuou-se a leitura no aparelho BIOTEK no comprimento de onda 492 nm (EAR400 STL-Labinstruments.)



- Filas A (1-12) e H (1-12): meio RPMI 5%SBF
- Filas B a G (1-12): células, onde as 3 linhas celulares utilizadas neste experimento foram:
 - filas B-C (1-12): MCF-7;
 - filas D-E (1-12): NCI-H460;
 - filas F-G (1-12): A375-C5.

FIGURA 3.3– Disposição das diferentes linhas celulares inoculadas em placas.



- Filas 6 e 7 (A-H): meio RPMI completo (CONTROLE)
- Fila 5 (A-H): concentração de 9,375 μM do composto A
Fila 8 (A-H): concentração de 9,375 μM do composto B
- Fila 4 (A-H): concentração de 18,75 μM do composto A
Fila 9 (A-H): concentração de 18,75 μM do composto B
- Fila 3 (A-H): concentração de 37,5 μM do 3 composto A
Fila 10 (A-H): concentração de 37,5 μM do composto B
- Fila 2 (A-H): concentração de 75 μM do composto A
Fila 11 (A-H): concentração de 75 μM do composto B
- Fila 1 (A-H): concentração de 150 μM do composto A
Fila 12 (A-H): concentração de 150 μM do composto B

FIGURA 3.4 – Disposição das diferentes concentrações para cada composto testado.z

4 - Resultados e Discussões

4 – Resultados e Discussões

4.1 - Resultados dos ensaios de fluorescência da Chl *a*

Para observar o comportamento herbicida dos alcalóides acridônicos de *Conchocarpus marginatus* no FSII, foram realizados ensaios de fluorescência da Chl *a*, em que cloroplastos frescos e lisos foram incubados por 5 minutos no escuro a temperatura ambiente com a concentração de 100 μ M dos alcalóides 1,2,3,6-tetrametoxi-N-metilacridona (**4**), 1-hidroxi-2,3,6-trimetoxi-N-metilacridona(**5**), 1-hidroxi-3-metoxi-N-metil-acridona (**6**), 1,2,3,6-tetrametoxi-N-metilacridona (**8**) e 1-hidroxi-2,3,6-trimetoxi-acridona (**9**), que foram solubilizadas em dimetilsulfóxido 0,5 % (DMSO). O mesmo procedimento foi realizado para DCMU (3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetiluréia) 50 μ M e cloroplastos infiltrados com Tris 0,8 M (RICKERT et al., 1991), os quais foram usados como controle positivo (FIGURA 4.1). Seus códigos foram alterados para a realização deste ensaio, e esta correção encontra-se na tabela 4.1.

O rápido aumento da fluorescência inicial foi devido a redução de Q_A à Q_A^- seguida pela redução de $P680^+$ por Z sem a participação direta do complexo de evolução de oxigênio - OEC (STRASSER, 1997). Assim, a análise do transiente da fluorescência (Chl *a*) claramente indicou que o OEC foi inibido pelas substâncias testadas neste experimento. Quando o OEC é inibido, este não pode doar elétrons ao Y_z , que por sua vez não pode reduzir $P680^+$, dentro deste contexto, uma máxima acumulação de $P680^+$, $Pheo^+$ e Q_A^- ocorre (LAZÁR *et al*, 1999). Strasser et al. (2004), propôs o termo “centro de reação silencioso” como os centros que não podem nem reduzir Q_A e nem voltar a transferir sua energia de excitação a antena; portanto, as unidades correspondentes ao FSII não contribuem para a fluorescência variável e seus rendimentos de fluorescência são menores.

Os valores de F_0 foram quase constantes variando de 186 à 229, e de F_M diminuíram com a presença das frações. Os valores mais baixos da área

da curva entre F_0 e F_M (TABELA 4.2) indicam que a transferência de elétrons ao sítio da quinona é bloqueado. Assim, Q_A do FSII não é reduzida, e estes resultados indicam a criação dos centros de reação silenciosos.

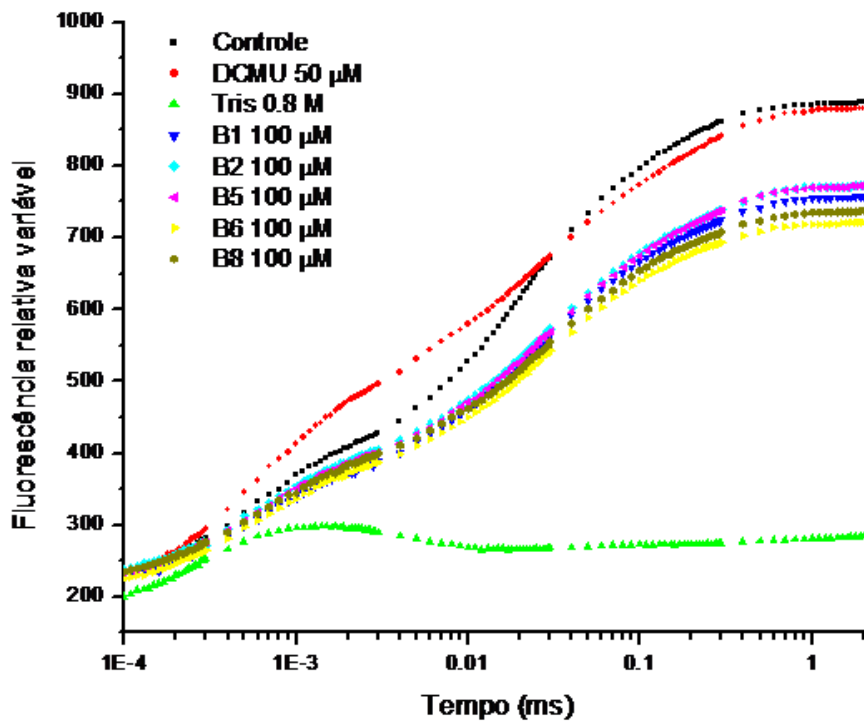


FIGURA 4.1 - Aumento cinético da fluorescência em cloroplastos frescos e lisos infiltrados com 5 diferentes alcalóides, DCMU e tilacóides tratados com Tris. Os controles dos cloroplastos são mostrados para comparação. Curvas de indução de fluorescência (Chl *a*) foram medidas a temperatura ambiente. Os dados são médias de três repetições.

TABELA 4.1 – Substâncias testadas no ensaio de inibição da fotossíntese (FIGURA 3.2)

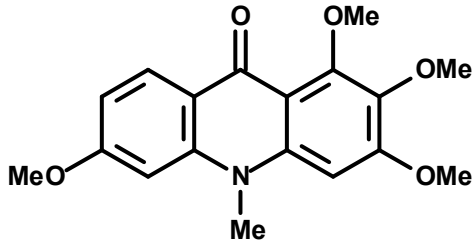
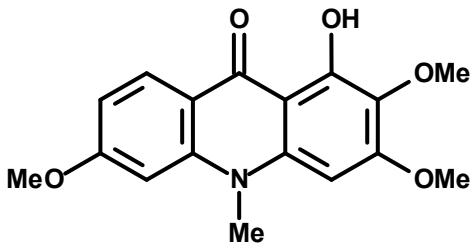
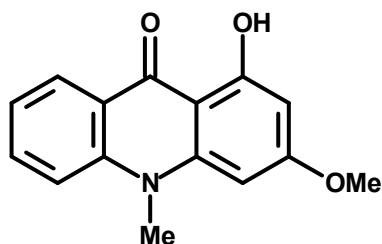
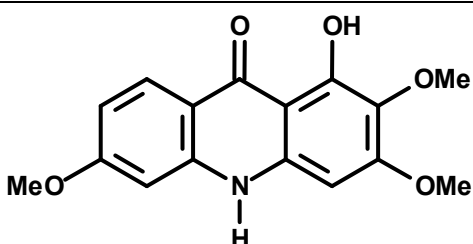
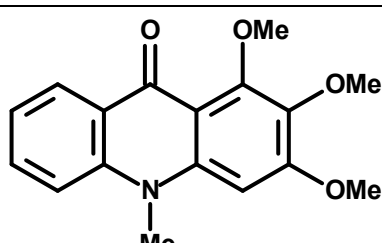
Código	Substância	Estrutura
B1	Substância 4	 <chem>CN1C(=O)c2cc(OC)cc2-c3ccc(OC)cc31</chem>
B2	Substância 5	 <chem>CN1C(=O)c2cc(OC)cc2-c3cc(O)c(OC)c31</chem>
B5	Substância 6	 <chem>CN1C(=O)c2ccccc2-c3cc(O)c(OC)c31</chem>
B6	Substância 9	 <chem>O=C1Nc2cc(OC)cc2-c3cc(O)c(OC)c31</chem>
B8	Substância 8	 <chem>CN1C(=O)c2cc(OC)c(OC)c2-c3cc(O)c(OC)c31</chem>

TABELA 4.2 - Efeito dos alcalóides acridônicos sobre os parâmetros da fluorescência em tilacóides previamente incubados no escuro por 5 minutos e com Tris 0,8 M, em pH 8,0.

Composto	Concentração	F ₀	F _M	F _V /F _M	Área
Controle	-	214	888	0,759	38425
DCMU	50µM	208	875	0,762	36039
Tris	0,8M	173	297	0,418	0
B1	100mg/L	209	753	0,722	32146
B2	100mg/L	216	770	0,719	33888
B5	100mg/L	213	768	0,723	33500
B6	100mg/L	203	718	0,717	29149
B8	100mg/L	214	734	0,708	30156

A escala de atividade foi observada, comparando-se as áreas das substâncias testadas com a área do herbicida comercial DCMU. Os baixos valores de área calculado indicam que todas as substâncias ensaiadas apresentaram atividade frente o ensaio de fluorescência da Chl *a*. Estes valores são inferiores à área do herbicida comercial DCMU, mostrando que os alcalóides testados são bastante promissores no estudo para o desenvolvimento de herbicidas.

Dentre as substâncias testadas, a substância **9** (B6) foi o que se apresentou potencialmente mais ativo nas medidas de fluorescência Chl *a*. Esse resultado indica que este causaria dano ao complexo OEC e um de seus sítios de ação está localizado sobre o FSII, prendendo-se ao ambiente de Q_A. Com o objetivo de se encontrar modelos para novos herbicidas inibidores da fotossíntese, o estudo da fluorescência destes compostos foi realizado no intuito de contribuir para o esclarecimento de um dos mecanismos de interação destes

compostos como doadores de elétrons no sítio do FSII. Após este estudo, pôde-se afirmar que estes compostos possuem mecanismo de ação semelhante.

Analisando os resultados obtidos das substâncias ensaiadas até o momento, não foi possível realizar uma relação da “estrutura-atividade” para os compostos testados, devido ao pequeno número de compostos analisados, sendo necessária a investigação de um maior número de substâncias para tal objetivo, bem como a realização dos demais ensaios que esclarecerão os outros ambientes de interação com o complexo fotossintético.

4.2 – Resultados dos ensaios antitumorais

Para cada linha celular foi obtida uma curva dose-resposta tendo o valor de GI50 (FIGURAS 4.2 –4.5), concentração do composto que causou uma redução de 50% no crescimento celular comparativamente às células controles não tratadas, tendo sido determinado por interpolação gráfica, com base no programa de cálculo fornecido pelo NCI, EUA (MONKS et al., 1991). Os resultados obtidos estão resumidos na TABELA 4.3.

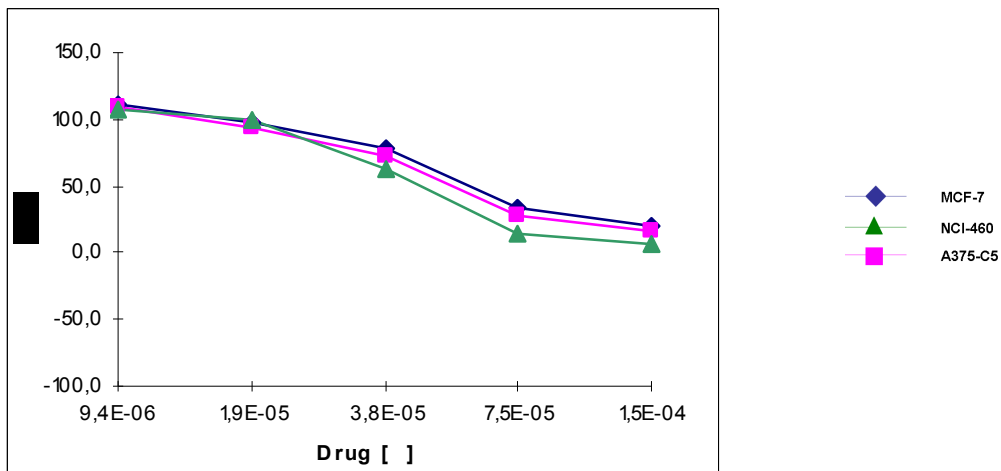


FIGURA 4.2 - curva dose-resposta para o alcalóide 1,2,3,6-tetrametoxi-10-metilacridona (substância 4).

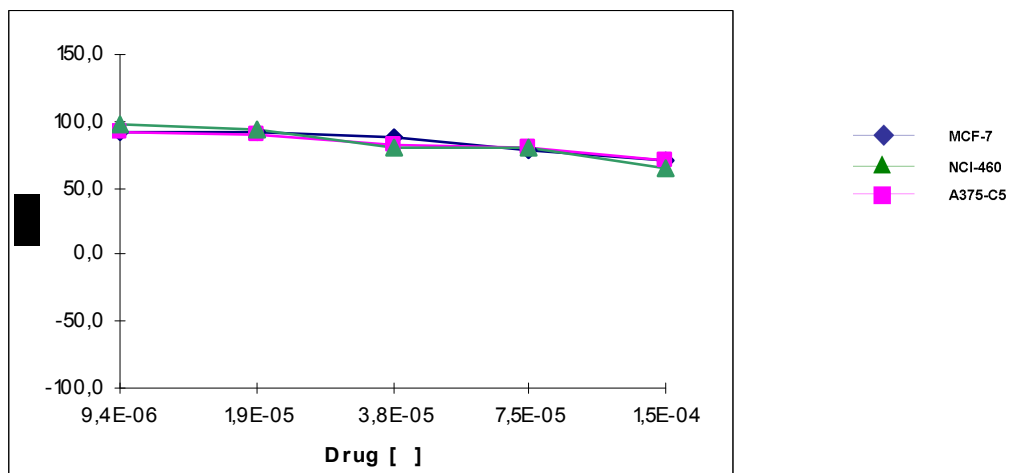


FIGURA 4.3 - Curva dose-resposta para o alcalóide 1-hidroxi-2,3,6-trimetoxi-10-metilacridona (substância 5).

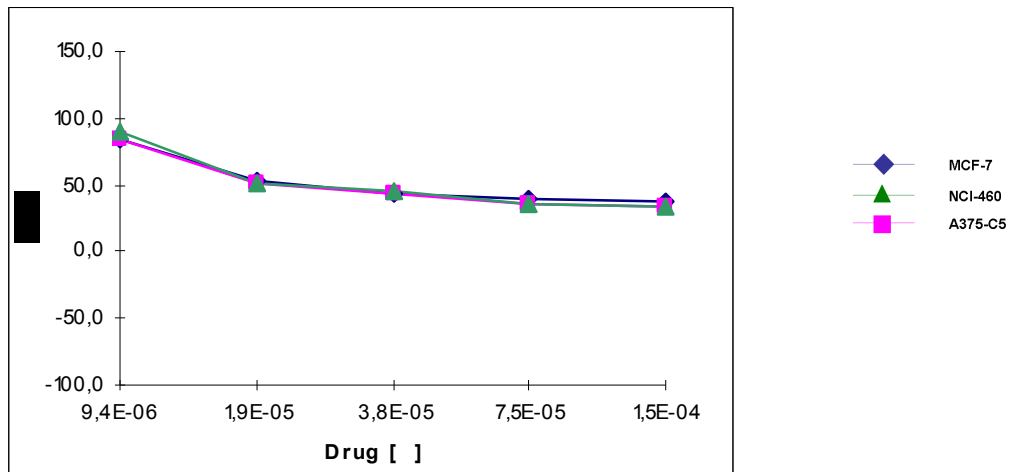


FIGURA 4.4 - curva dose-resposta para o alcalóide 1-hidroxi-3-metoxi-N-metil acridona (substância 6).

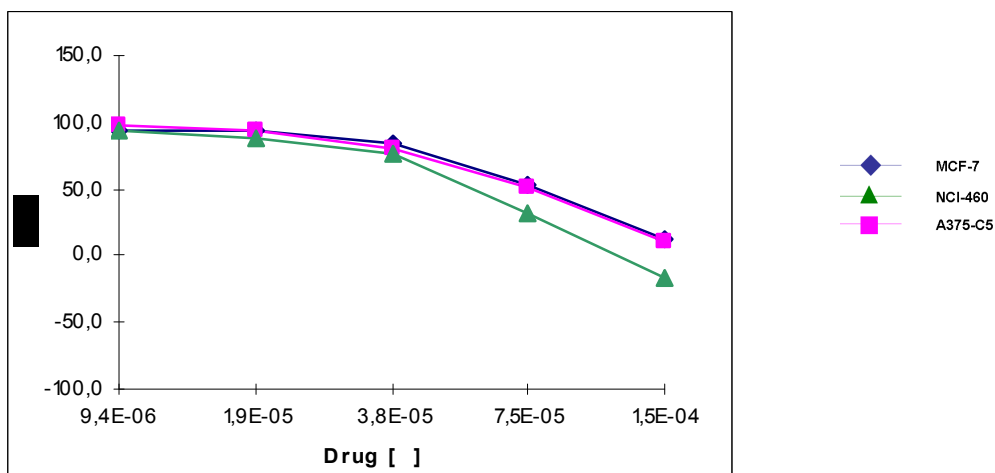
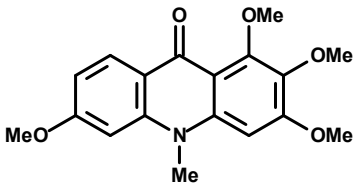
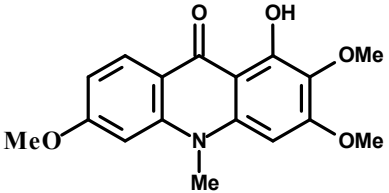
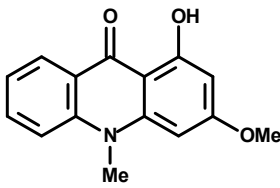
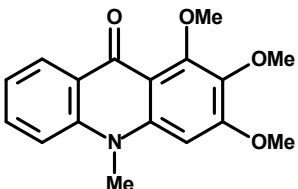


FIGURA 4.5 - curva dose-resposta para o alcalóide 1,2,3-trimetoxi-N-metil acridona (metilarborinina) (substância 8).

TABELA 4.3 - Valor de GI₅₀ para as linhas celulares testadas MCF-7 (adenocarcinoma da mama), NCI-460 (câncer de pulmão) e A375-C5 (cancro de melanoma).

Substância	Estrutura	GI ₅₀ (μM)		
		MCF-7	NCI-460	A375-C5
4		58	36	30
5		>150	>150	>150
6		25	20	22
8		80	77	56

A Substância Doxorubicin foi usada como controle positivo para os ensaios, e os respectivos GI_{50} obtidos foram: MCF-7= 42,8 nM; NCI-H460= 94,0 nM; A375-C5= 79,5 nM.

Dentre as substâncias testadas, o alcalóide 1-hidroxi-3-metoxi-N-metilacridona (substância **6**) foi o que apresentou melhor potencial antitumoral frente aos ensaios antitumorais, apresentando uma concentração para GI_{50} de 25, 20 e 22 μ M para as linhas celulares MCF-7, NCI-460 e A375-C5 respectivamente. Essas concentrações foram consideradas baixas e boas, porém ainda estão longe das concentrações obtidas para o controle positivo.

Através dos experimentos realizados foi possível afirmar também que as substâncias ensaiadas foram ativas, porém não foram tóxicas para as células em estudo, ou seja, elas inibiram o crescimento das células mas não as mataram.

De acordo com os dados obtidos até o momento não foi possível realizar uma relação da “estrutura-atividade” para os compostos testados, havendo a necessidade de análise de um maior número de compostos para tal objetivo.

5 - Conclusões

5 – Conclusões

Este trabalho teve como um dos objetivos avaliar a atividade das substâncias isoladas através da realização de ensaios antitumorais e herbicidas. Estes ensaios foram escolhidos devido ao grande interesse pela classe dos alcalóides acridônicos no combate ao câncer e às plantas daninhas.

Nesse estudo, 5 alcalóides acridônicos foram submetidos a testes fitotóxicos em cloroplastos isolados de espinafres obtidos da espécie *Conchocarpus marginatus*. Os resultados mostraram-se bastante positivos uma vez que todas as substâncias ensaiadas foram ativas, inibindo a cadeia transportadora de elétrons sob o FSII, através do estudo de fluorescência da clorofila *a*. Esses dados mostraram que os alcalóides testados são bastante promissores no estudo para o desenvolvimento de herbicidas.

Para os ensaios antitumorais, das 4 substâncias ensaiadas, somente a substância arborinina não apresentou redução no crescimento celular nas concentrações testadas frente às linhagens MCF-7, NCI-460e A375-C5, sendo a substância 1-hidroxi-3-metoxi-N-metil acridona a que apresentou valores de GI50 mais baixos. Pode-se dizer ainda que, as substâncias ensaiadas foram ativas mas não foram tóxicas, ou seja, elas inibiram o crescimento das células mas não as mataram. Desta forma, os resultados obtidos neste ensaio vem a corroborar com os dados da literatura, e mantêm os alcalóides acridônicos como uma classe de compostos promissora na busca de quimioterápicos.

6 - Referências Bibliográficas

6- Referências Bibliográficas

CHOU, T., TZENG, C., WU, T., WATANABE, K. A., SU, T. “Inhibition of Cell Growth and Macromolecule Biosynthesis of Human Promyelocytic Leukemic Cells by Acridone Alkaloids”. *Phytotherapy Research*, **3**: 237-242, 1989.

INSTITUTO NACIONAL do CANCER. Disponível em:
<<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>>.
Acesso em: fev. 2009.

ITOIGAWA, M., ITO, C., WU, T., ENJO, F., TOKUDA, H., NISHINO, H., FURUKAWA, H. “Cancer chemopreventive activity on acridone alkaloids on Epstein-Barr virus activation and two-stage mouse skin carcinogenesis”. *Cancer Letters*. **193**: 133-138, 2002.

KAWAII, S., TOMONO, Y., KATASE, E., OGAWA, K., YANO, M. TAKEMURA, Y., JU-ICHI, M., ITO, C., FURUKAWA, H. “The antiproliferative Effect of Acridone Alkaloids on Several Cancer Cell Lines”. *J. Nat. Prod.* **62**: 587-589, 1999.

LAZÁR, D.; POSPÍSIL, P.; NAUS, J.” Decrease of fluorescence intensity after the K step in chlorophyll a fluorescence induction is suppressed by electron acceptors and donors to photosystem “2. *Photosynthetica*, **37**: 255, 1999.

LISKA, K. J., “Preparation and Antitumor Properties of Analogs of Acronycine”. *J. Med. Chem.* **15**: 1177-1179, 1972.

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

PETTIT, G. R.; PIERSON, F. H.; HERALD, C. T. *Anticancer drugs from animals, Plants and microorganisms*; John Wiley & Sons: New York, 1994.

RICKERT, K.W.; SEARS, J.; BECK, W.F.; BRUDVIG, G.W. “Mechanism of irreversible inhibition of O₂ evolution in photosystem II by Tris (hydroxymethyl)aminomethane”. *Biochemistry*, **30**: 7888, 1991.

ROBBS, C.F., BITTENCOURT, A. M. “Controle Biológico de Insetos”. Embrapa/ctaa, 1999 – biotecnologia, ciência e desenvolvimento.

SILVA, A. A., FERREIRA, F. A.; FERREIRA, L. R. “Biologia e Controle de Plantas Daninhas”. Viçosa:UFV, 142, 2001.

SKEHAN P, STORENG R, SCUDIERO D, MONKS A, MCMAHON J, VISTICA J, WARREN JT, BOKESCH H, KENNEY S, BOYD MR (1990). “New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening”. *J Natl Cancer Inst.* **82** (13):1107-12

SPADOTTO, C. A. “Uso de herbicidas no Brasil”. Comitê de Meio Ambiente, Sociedade Brasileira de plantas daninhas. 2002
<http://cnpma.embrapa.br/herbicidas> (15/10/2008).

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

STRASSER, R. J. “Donor site capacity of photosystem II probed by chlorophyll *a* transients”. *Photosynth. Res.*, **52**: 147, 1997.

STRASSER, R.J.; SRIVASTAVA, A.; TSIMILLI-MICHAEL, M. “Analysis of the chlorophyll *a* fluorescence transient”. In: *Advances in Photosynthesis and Respiration. Chlorophyll Fluorescence a Signature of photosynthesis.* Papageorgiou, G., Govindjee, (Eds.). Kluwer Academic Publishers: The Netherlands, **2004**.

SVODOBA, G. H. “Inhibition of cell growth and macromolecule biosynthesis of human promyelocytic leukemic cells by acridone alkaloids”. *Lloydia.* **29**: 206-224, 1966.

TAIZ, L.; Zeiger, E. *Fisiologia vegetal.* 3ª ed. Artmed, Porto Alegre, 2004. P. 719.

VEIGA, T. A. M.; GONZALEZ-VAZQUEZ, R.; OIANO NETO, J.; SILVA, M.F.G.F.; DIAZ, B. K.; HENSENN, B. L. “Siderin from *Toona ciliata* (Meliaceae) as water-splitting enzyme inhibitor on thylakoids”. *Arc.Biochem. Biophys.*, **465**: 38, 2007b.

VEIGA, T. A. M. *Fitoquímica de Raputia praetermissa (Rutaceae) e busca por candidas a herbicidas inibidores da fotossíntese a partir de Produtos Naturais.* Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2008. Tese de Doutorado, 275 p.

VEIGA, T. A. M., GONZALEZ-VAZQUEZ, R.; BRAGA, P.A.C.; SILVA,

M.F.G.F, DIAZ, B. K., HENSENN, B. L. “Effects of Alkaloids from *Hortia superba* (Rutaceae) on Thylakoid Electron Transport and Photophosphorylation in Isolated Spinach Chloroplasts”. *Allelopathy Journal*, **21**: 133, 2008.

VYVYAN, J.R. “Allelochemicals as lead for new herbicides and agrochemicals”. *Tetrahedron*, **58**: 1631-1646, 2002.

WATERMAN, P. G., GRUNDON, M. F. *Chemistry and Chemical Taxonomy on the Rutales*. London, Academic Press, 1983, p. 308-309.