

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

**FITOQUÍMICA DO CAULE DE *Citrus limonia* ENXERTADO
COM *C. sinensis* E DA ESPÉCIE *Nycticalanthus speciosus*
(RUTACEAE) E BIOSÍNTESE DE CUMARINAS PRENILADAS**

ALAN BEZERRA RIBEIRO*

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

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

*bolsista CNPq

São Carlos-SP
2006

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

R484fc

Ribeiro, Alan Bezerra.

Fitoquímica do caule de *Citrus limonia* enxertado com *C. sinensis* e da espécie de *Nycticalanthus speciosus* (RUTACEAE) e biossíntese de cumarinas preniladas / Alan Bezerra Ribeiro. -- São Carlos : UFSCar, 2007.
265 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2006.

1. Produtos naturais. 2. Cumarinas. 3. Biossíntese. 4. *Citrus limonia*. I. Título.

CDD: 547.3 (20^a)

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

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou o exame de tese de doutorado do candidato Alan Bezerra Ribeiro realizado em 19 de outubro de 2006.

Profa.Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva
(UFSCar) - orientadora

Profa. Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza (UFSCar)

Profa. Dra. Maysa Furlan (IQ-UNESP-Araraquara)

Prof. Dr. Sérgio Alves de Carvalho
(Centro APTA citros-IAC-Cordeirópolis)

Prof. Dr. Roberto Sigfrido Gallegos Olea (UFMA)

Minha terra tem palmeiras,
Onde canta o sabiá;
As aves que aqui gorjeiam,
Não gorjeiam como lá.

Nosso céu tem mais estrelas,
Nossas várzeas têm mais flores,
Nossos bosques têm mais vida,
Nossa vida mais amores.

...

Não permita Deus que eu morra,
Sem que volte para lá;
Sem que desfrute os primores
Que não encontro por cá;
Sem qu'inda aviste as palmeiras,
Onde canta o Sabiá.

Gonçalves Dias

Dedico...

Aos meus pais, Antonio José Ribeiro Filho e Leolina Bezerra Ribeiro, pelo apoio e incentivo sempre de forma amável e confiante.

À minha esposa e amante Kiria Karine L. M. Ribeiro, meu verdadeiro amor, pela constante ajuda em qualquer momento de minha vida.

Aos meus irmãos, Sérgio, Fernando e Jane, sempre apoiando e torcendo pelo meu sucesso.

AGRADECIMENTOS

À Deus minha grande Fé;

À Prof^a Dr^a Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva, pela orientação sempre disposta e pelos ensinamentos e conselhos.

À Prof^a Dr^a Maysa Furlan, pelos ensinamentos, colaboração e disposição na execução deste trabalho.

Ao Dr. Sérgio Carvalho pela sua disposição em colaborar com este trabalho.

Aos professores do DQ pelos ensinamentos.

Ao pessoal do RMN principalmente à Luciana pela sua ajuda e paciência na produção dos espectros.

Ao Rodrigo Fachini pela realização dos ensaios antifúngicos.

Aos todos os amigos do laboratório de Produtos Naturais não podendo deixar de mencionar alguns como Moacir, Lica, Tuca, Cleverson, Sheylla, Simone, Taty, Paula, Anna, Karine, Verardi e Márcio, entre tantos outros aos quais peço desculpas por não mencionar o nome, pelo apoio, ensinamentos e descontrações no dia-dia.

A todos da “Família Trapo”: Érika e Márcio, Natilene e Alan, Adriana e Roberto, Louise Lee, Cleones, Ozelito e Hugo, pelo apoio nas horas difíceis e ótimas descontrações nos momentos de alegria, sempre tentando fazer de São Carlos e Araraquara nossa amada São Luís.

Aos amigos Paraenses Sebastião, Paty Marinho, Andrey, Thiago, Adriano e Edson, principalmente pelas conversas “na mesma língua”.

As amigas Adriana e Débora pelas colaborações nos ensaios enzimáticos. Mesmo em vários momentos difíceis sempre achávamos um jeito de dar boas risadas;

Aos amigos dos laboratórios de Síntese, HPLC e RMN, agradeço a todos pelas colaborações;

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram com a realização desta pesquisa.

SUMÁRIO

	P.
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE FIGURAS.....	xvi
LISTA DE QUADROS.....	xxiii
LISTA DE ESQUEMAS.....	xxiii
LISTA DE GRÁFICOS.....	xxiv
SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS.....	xxv
RESUMO	xxx
ABSTRACT	xxxii
PREFÁCIO	1
OBJETIVOS	5
1 - ESTUDO FITOQUÍMICO DO PORTA-ENXERTO DE <i>Citrus sinensis</i> SOBRE <i>C. limonia</i>	7
1.1 - FAMÍLIA RUTACEAE.....	7
1.2 – ENXERTIA.....	11
1.3 - ENXERTO DE <i>Citrus sinensis</i> SOBRE <i>C. limonia</i>	14
1.4 - PARTE EXPERIMENTAL.....	19
1.4.1 - Materiais e reagentes utilizados.....	19
1.4.2 - Coleta do material botânico.....	21
1.5 - OBTENÇÃO DOS EXTRATOS.....	22
1.5.1 - Fracionamentos do extrato Hexano-Diclorometânico (HD).....	24
1.6 - RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	31
1.6.1 – Cumarinas.....	31
1.6.1.1 – Identificação da Substância I (Suberosina).....	31
1.6.1.2 – Identificação da Substância II (Xantiletina).....	41
1.6.1.3 – Identificação da Substância III (Seselina).....	46
1.6.1.4 – Identificação da Substância IV (Tamarina).....	51
1.6.1.5 – Identificação da Substância V (Crenulatina).....	58
1.6.2 – Flavonóides.....	61
1.6.2.1 – Identificação da Substância VI (Limonianina).....	61
1.6.2.2 – Identificação da Substância VII (Lupinifolina).....	69
1.6.2.3 – Identificação da Substância VIII (5,4'-dihidroxi-6-(3''-metil-2''-butenil)-2'',2''-dimetilpirano(5'',6''-7,8)flavanona).....	80
1.6.3 – Alcalóide.....	91
1.6.3.1 – Identificação da Substância IX (5-hidroxinoracrinicina).....	91
2 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA FRENTE A <i>Guignardia citricarpa</i>	101
2.1 - PARTE EXPERIMENTAL.....	106
2.1.1 – Materiais e métodos.....	106
2.1.1.1 – Materiais e reagentes utilizados.....	106

2.1.1.2 – Obtenção das substâncias ensaiadas.....	106
2.1.1.3 – Patógeno.....	107
2.1.2 – Ensaio de inibição de <i>G. citricarpa in vitro</i> pelo método de difusão em agar.....	107
2.1.3 – Ensaio de inibição de <i>G. citricarpa, in vitro</i> , pelo método de germinação de esporos em placa de poliestireno.....	109
2.2 – RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	112
3 - ESTUDO BIOSINTÉTICO DE CUMARINAS PRENILADAS...	117
3.1 - PARTE EXPERIMENTAL.....	125
3.1.1 - Materiais e reagentes utilizados.....	125
3.1.2 - Coleta do material botânico.....	128
3.1.3 – Protocolo para avaliação da atividade da enzima preniltransferase.....	128
3.1.4 – Protocolo de incorporação de precursores marcados com radioisótopos.....	129
3.2 – RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	130
3.2.1 – Dosagem protéica do extrato enzimático das raízes.....	144
3.2.2 – Eletroforese em Gel.....	146
3.2.3 – Quantificação dos produtos da reação de prenilação.....	148
3.2.4 – Experimento de incorporação de IPP- ¹⁴ C.....	150
4 - ESTUDO FITOQUÍMICO DE <i>Nycticalanthus speciosus</i>.....	153
4.1 - PARTE EXPERIMENTAL.....	155
4.1.1 - Materiais e reagentes utilizados.....	155
4.1.2 - Coleta do material botânico.....	157
4.2 – OBTENÇÃO DOS EXTRATOS.....	158
4.2.1 - Fracionamentos do extrato diclorometânico do caule (EDGN)....	159
4.2.3 - Fracionamentos do extrato diclorometânico das raízes (EDRN)..	162
4.3 - RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	165
4.3.1 – Alcalóides.....	165
4.3.1.1 – Identificação da Substância X (Dictamina).....	165
4.3.1.2 – Identificação da Substância XI (γ -fagarina).....	170
4.3.1.3 – Identificação da Substância XII (Esquimianina).....	175
4.3.1.4 – Identificação da Substância XIII (1-metil-4-metoxi-2-quinolona).....	180
4.3.1.5 – Identificação da Substância XIV (N-Metilflindersina).....	185
4.3.1.6 – Identificação da Substância XV (Rutaecarpina).....	190
4.3.1.7 – Identificação da Substância XVI (8,8a-seco-8-carboxi-14-N-metilrutaecarpina).....	200
4.3.2 – Cumarina.....	212
4.3.2.1 – Identificação da Substância XVII (Seselina).....	212
4.3.3 – Limonóides.....	213
4.3.3.1 – Identificação da Substância XVIII (2-hidroxi-epiisobacunoato de metila).....	213

4.3.3.2 – Identificação da Substância XIX (2,21-dihidroxi-23-oxoepiisobacunoato de metila).....	230
4.3.3.3 – Identificação da Substância XX (7-acetil-21-hidroxi-23-oxotecleanino).....	243
5 – CONCLUSÕES.....	257
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	259

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ϕ = diâmetro

δ = deslocamento químico

J = constante de acoplamento

s = singleto

d = dubleto

dd = duplo dubleto

dl = dubleto largo

ddd = duplo duplo dubleto

t = tripleto

tl = tripleto largo

quint = quinteto

m = multipleteo

m/z = relação massa/carga

CC = cromatografia em coluna

CCDA = cromatografia em camada delgada analítica

CCDP = cromatografia em camada delgada preparativa

CG-MS = cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

CLAE = cromatografia líquida de alta eficiência

Hex = hexano

AcOEt = acetato de etila

DCM = diclorometano

Dtt = 1,4-ditiotreitol

MeOH = metanol

RMN de ^1H = ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RMN de ^{13}C = ressonância magnética nuclear de carbono 13

COSY = correlated spectroscopy

HSQC = heteronuclear single quantum correlation

HMBC = heteronuclear multiple quantum correlation

DEPT = “distortionless enhancement by polarization transfer”

NOESY = nuclear overhauser effect spectroscopy

DMAPP = pirofosfato de dimetilalila

EDTA = etileno diamino tetracético (dissódico)

PVPP = polivinilpolipirrolidona

PMSF = fluoreto de fenilmetilsulfonil

TEMED = N, N, N', N' – tetrametiletilenodiamina

dpm = decaimento por minuto

LISTA DE TABELAS

	P.
TABELA 1.1: Dados de RMN de ^1H da substância I (Suberosina) em comparação com dados da literatura.....	36
TABELA 1.2: Dados de RMN de ^{13}C da substância I (Suberosina).....	36
TABELA 1.3: Dados de RMN de ^1H da substância II (Xantiletina) em comparação com dados da literatura.....	43
TABELA 1.4: Dados de RMN de ^{13}C da substância II (Xantiletina)....	43
TABELA 1.5: Dados de RMN de ^1H da substância III (Seselina) em comparação com dados da literatura.....	48
TABELA 1.6: Dados de RMN de ^{13}C da substância III (Seselina).....	48
TABELA 1.7: Dados de RMN de ^1H da substância IV (Tamarina) em comparação com dados da literatura.....	54
TABELA 1.8: Dados de RMN de ^{13}C da substância IV (Tamarina)....	54
TABELA 1.9: Dados de RMN de ^1H da substância V (Crenulatina) em comparação com dados da literatura.....	59
TABELA 1.10: Dados de RMN de ^1H da substância VI (Limonianina) em comparação com dados da literatura.....	64
TABELA 1.11: Dados de RMN de ^{13}C da substância VI (Limonianina).....	64
TABELA 1.12: Dados de RMN de ^1H da substância VII (Lupinifolina) em comparação com dados da literatura.....	74
TABELA 1.13: Dados de RMN de ^{13}C da substância VII (Lupinifolina).....	75
TABELA 1.14: Dados de RMN de ^1H da substância VIII (5,4'-dihidroxi-6-(3''-metil-2''-butenil)-2'',2''-dimetilpirano(5'',6''-7,8)flavanona).....	85
TABELA 1.15: Dados de RMN de ^{13}C da substância VIII (5,4'-dihidroxi-6-(3''-metil-2''-butenil)-2'',2''-dimetilpirano(5'',6''-7,8)flavanona).....	86
TABELA 1.16: Dados de RMN de ^1H da substância IX (5-hidroxinoracrinicina) em comparação com dados da literatura.....	94
TABELA 1.17: Dados de RMN de ^{13}C obtidos pela projeção do HSQC da substância IX (5-hidroxinoracrinicina).....	94
TABELA 3.1: Experimentos de reação de prenilação.....	134
TABELA 3.2: Formação dos produtos xantiletina, seselina e suberosina com os precursores umbeliferona e herniarina em diferentes horários de coleta da planta.....	140
TABELA 3.3: Dados para determinação da curva padrão da ovoalbumina.....	145
TABELA 3.4: Concentrações de proteínas dos extratos enzimáticos da planta enxertada.....	146

TABELA 3.5: Concentrações dos produtos da reação de prenilação....	149
TABELA 4.1: Dados de RMN de ^1H da substância X (Dictamina) em comparação com dados da literatura.....	167
TABELA 4.2: Dados de RMN de ^{13}C da substância X (Dictamina).....	167
TABELA 4.3: Dados de RMN de ^1H da substância XI (γ -Fagarina) em comparação com dados da literatura.....	172
TABELA 4.4: Dados de RMN de ^{13}C da substância XI (γ -Fagarina)....	172
TABELA 4.5: Dados de RMN de ^1H da substância XII (Esquimianina) em comparação com dados da literatura.....	177
TABELA 4.6: Dados de RMN de ^{13}C da substância XII (Esquimianina).....	177
TABELA 4.7: Dados de RMN de ^1H da substância XIII (1-Metil-4-metoxi-2-quinolona) em comparação com dados da literatura.....	182
TABELA 4.8: Dados de RMN de ^{13}C da substância XIII (1-Metil-4-metoxi-2-quinolona).....	182
TABELA 4.9: Dados de RMN de ^1H da substância XIV (N-Metilflindersina) em comparação com dados da literatura.....	187
TABELA 4.10: Dados de RMN de ^{13}C da substância XIV (N-Metilflindersina).....	187
TABELA 4.11: Dados de RMN de ^1H da substância XV (Rutaecarpina) em comparação com dados da literatura.....	194
TABELA 4.12: Dados de RMN de ^{13}C da substância XV (Rutaecarpina).....	194
TABELA 4.13: Dados de RMN de ^1H da substância XVI (8,8a-seco-8-carboxi-14-N-metilrutaecarpina) em comparação com dados da literatura.....	205
TABELA 4.14: Dados de RMN de ^{13}C da substância XVI (8,8a-seco-8-carboxi-14-N-metilrutaecarpina).....	205
TABELA 4.15: Dados de HSQC e HMBC da substância XVI (8,8a-seco-8-carboxi-14-N-metilrutaecarpina).....	206
TABELA 4.16: Dados de RMN de ^1H da substância XVIII (2-hidroxi-isoobacunoato de metila).....	220
TABELA 4.17: Dados de RMN de ^{13}C da substância XVIII (2-hidroxi-isoobacunoato de metila).....	221
TABELA 4.18: Dados de HSQC e HMBC da substância XVIII (2-hidroxi-isoobacunoato de metila).....	222
TABELA 4.19: Dados de RMN de ^1H e do experimento de COSY da substância XIX (2,21-dihidroxi-23-oxoepiisoobacunoato de metila)....	233
TABELA 4.20: Dados de RMN de ^{13}C da substância XIX (2,21-dihidroxi-23-oxoepiisoobacunoato de metila).....	234
TABELA 4.21: Dados de HSQC e HMBC da substância XIX (2,21-dihidroxi-23-oxoepiisoobacunoato de metila).....	235
TABELA 4.22: Dados de RMN de ^1H e do experimento de COSY da substância XX (7-acetil-21-hidroxi-23-oxotecleanino).....	249

TABELA 4.23: Dados de RMN de ^{13}C da substância XX (7-acetil-21-hidroxi-23-oxotecleanino).....	250
TABELA 4.24: Dados de HSQC e HMBC da substância XX (7-acetil-21-hidroxi-23-oxotecleanino).....	251

LISTA DE FIGURAS

	P.
FIGURA 1.1: Processo de formação de uma planta de citros enxertada via borbulha.....	13
FIGURA 1.2: Foto de plantas de <i>Citrus limonia</i> Osbeck (limão Cravo) enxertadas com <i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck (laranja Pêra).....	22
FIGURA 1.3: Estrutura química da cumarina Suberosina (Substância I)..	31
FIGURA 1.4: Correlações observadas no experimento de HMBC da Substância I.....	32
FIGURA 1.5: Correlações complementares observadas no experimento de HMBC da Substância I.....	33
FIGURA 1.6: Correlações observadas no experimento de HMBC para a unidade isoprênica da Substância I.....	35
FIGURA 1.7: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da Substância I (Suberosina).....	37
FIGURA 1.8: Experimento de COSY (400 MHz, CDCl_3) da Substância I (Suberosina).....	38
FIGURA 1.9: Experimento de HSQC (400 MHz, CDCl_3) da Substância I (Suberosina).....	39
FIGURA 1.10: Experimento de HMBC (400 MHz, CDCl_3) da Substância I (Suberosina).....	40
FIGURA 1.11: Espectro de massas da Suberosina (Substância I).....	41
FIGURA 1.12: Estrutura química da cumarina Xantiletina (Substância II).....	41
FIGURA 1.13: Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) da Substância II (Xantiletina).....	44
FIGURA 1.14: Espectro de RMN de ^{13}C (200 MHz, CDCl_3) da Substância II (Xantiletina).....	45
FIGURA 1.15: Espectro de massas Xantiletina (Substância II).....	46
FIGURA 1.16: Estrutura química da cumarina Seselina (Substância III)..	46
FIGURA 1.17: Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) da Substância III (Seselina).....	49
FIGURA 1.18: Espectro de RMN de ^{13}C (200 MHz, CDCl_3) da Substância III (Seselina).....	50
FIGURA 1.19: Espectro de massas Seselina (Substância III).....	51
FIGURA 1.20: Estrutura química da cumarina Tamarina (Substância IV).....	51
FIGURA 1.21: Correlações observadas no experimento de HMBC para a Substância IV.....	53
FIGURA 1.22: Espectro (e ampliações) de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da Substância IV (Tamarina).....	55
FIGURA 1.23: Experimento de HSQC (400 MHz, CDCl_3) da Substância	

IV (Tamarina).....	56
FIGURA 1.24: Experimento de HMBC (400 MHz, CDCl ₃) da Substância IV (Tamarina).....	57
FIGURA 1.25: Espectro de massas da Tamarina (Substância IV).....	58
FIGURA 1.26: Estrutura química da cumarina Crenulatina (Substância V).....	58
FIGURA 1.27: Espectro de RMN de ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) da Substância V (Crenulatina).....	60
FIGURA 1.28: Estrutura química da flavona Limonianina (Substância VI).....	61
FIGURA 1.29: Correlações observadas no experimento de NOESY da Substância VI.....	63
FIGURA 1.30: Espectro de RMN de ¹ H (400MHz, Acetona-d ₆) da Substância VI (Limonianina).....	65
FIGURA 1.31: Experimento de HSQC (400MHz, Acetona-d ₆) da Substância VI (Limonianina).....	66
FIGURA 1.32: Espectro de ¹³ C (100 MHz, Acetona-d ₆) da Substância VI (Limonianina).....	67
FIGURA 1.33: Experimento (ampliação) de NOESY (400MHz, Acetona-d ₆) da Substância VI (Limonianina).....	68
FIGURA 1.34: Espectro de massas da Limonianina (Substância VI).....	69
FIGURA 1.35: Estrutura química da flavanona Lupinifolina (Substância VII).....	69
FIGURA 1.36: Possibilidades de posicionamento do anel pirano e da prenila na estrutura da flavanona.....	72
FIGURA 1.37: Correlações observadas no experimento de HMBC da Substância VII.....	73
FIGURA 1.38: Espectro de RMN de ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) da Substância VII (Lupinifolina).....	76
FIGURA 1.39: Experimento de HSQC (400MHz, CDCl ₃) da Substância VII (Lupinifolina).....	77
FIGURA 1.40: Experimento de HMBC (400MHz, CDCl ₃) da Substância VII (Lupinifolina).....	78
FIGURA 1.41: Experimento de NOESY (400MHz, CDCl ₃) da Substância VII (Lupinifolina).....	79
FIGURA 1.42: Espectro de massas da Lupinifolina (Substância VII).....	80
FIGURA 1.43: Estrutura química da flavanona 5,4'-dihidroxi-6-(3''-metil-2''-butenil)-2'',2''-dimetilpirano(5'',6''-7,8)flavanona (Substância VIII).....	80
FIGURA 1.44: Correlações complementares observadas no experimento de HMBC da Substância VIII.....	82
FIGURA 1.45: Correlações observadas no experimento de HMBC da Substância VIII que confirmam o posicionamento da prenila no anel A da flavanona.....	84

FIGURA 1.46: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da Substância VIII (5,4'-dihidroxi-6-(3'''-metil-2'''-butenil)-2'',2''-dimetilpirano(5'',6''-7,8)flavanona).....	87
FIGURA 1.47: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da Substância VIII (5,4'-dihidroxi-6-(3'''-metil-2'''-butenil)-2'',2''-dimetilpirano(5'',6''-7,8)flavanona).....	88
FIGURA 1.48: Experimento de HMQC (400MHz, CDCl_3) da Substância VIII (5,4'-dihidroxi-6-(3'''-metil-2'''-butenil)-2'',2''-dimetilpirano(5'',6''-7,8)flavanona).....	89
FIGURA 1.49: Experimento de NOESY (400MHz, CDCl_3) da Substância VIII (5,4'-dihidroxi-6-(3'''-metil-2'''-butenil)-2'',2''-dimetilpirano(5'',6''-7,8)flavanona).....	90
FIGURA 1.50: Espectro de massas da 5,4'-dihidroxi-6-(3'''-metil-2'''-butenil)-2'',2''-dimetilpirano(5'',6''-7,8)flavanona (Substância VIII).....	91
FIGURA 1.51: Estrutura química da cumarina 5-hidroxinoracronicina (Substância IX).....	92
FIGURA 1.52: Correlações observadas no experimento de HMBC para a Substância IX.....	93
FIGURA 1.53: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, Acetona- d_6) da Substância IX (5-hidroxinoracrinicina).....	95
FIGURA 1.54: Experimento de COSY (400 MHz, Acetona- d_6) da Substância IX (5-hidroxinoracrinicina).....	96
FIGURA 1.55: Experimento de HSQC (400 MHz, Acetona- d_6) da Substância IX (5-hidroxinoracrinicina).....	97
FIGURA 1.56: Experimento de NOESY (400 MHz, Acetona- d_6) da Substância IX (5-hidroxinoracrinicina).....	98
FIGURA 1.57: Espectro de massas da 5-hidroxinoracrinicina (Substância IX).....	99
FIGURA 2.1: Sintomas da mancha preta dos citros observadas em frutos – Figura extraída do <i>website</i> da FUNDECITRUS.....	103
FIGURA 2.2: Ascósporos (A) e Picnidiósporo (B) de <i>Guignardia citricarpa</i>	104
FIGURA 2.3: Ciclo da doença mancha preta dos citros. – Figura extraída do <i>website</i> da FUNDECITRUS.....	105
FIGURA 2.4: Demonstração do crescimento e inibição do fungo <i>G. citricarpa</i> pelo método de difusão em ágar. (a) crescimento sem inibição do fungo; (b) Inibição do crescimento do fungo próximo aos poços (1, 2 e 3) onde foi adicionado uma substância com potencial antifúngico.....	109

FIGURA 2.5: Germinação de picnidiósporos e formação de apressório de <i>Phyllosticta citricarpa</i> (teleomorfo: <i>Guignardia citricarpa</i>) a partir de picnídios formados em folhas de <i>Citrus</i> (a). Massa de picnidiósporos na superfície do ostíolo do picnídio (b); Picnidiósporos ainda não germinados (c); Placa de Petri com papel de filtro umedecido e placas de vidro em forma de cruz onde se realiza o experimento de inibição (d); Germinação do picnidiósporo e formação de apressório de <i>P. citricarpa</i> (e – f) após 12 e 16h.....	111
FIGURA 3.1: Biossíntese da cumarina Umbeliferona (3) a partir do Ácido cinâmico (1).....	119
FIGURA 3.2: Biossíntese das piranocumarinas Xantiletina (13) e Seselina (16) a partir da cumarina Umbeliferona (3).....	121
FIGURA 3.3: Reação de prenilação da umbeliferona (a) e herniarina (b).	131
FIGURA 3.4: Cromatogramas da xantiletina (a), seselina (b) e suberosina (d).....	132
FIGURA 3.5: Cromatogramas da xantiletina (g) e seselina (h).....	133
FIGURA 3.6: Cromatograma de um branco com presença de endógenos.	135
FIGURA 3.7: Cromatograma da reação de prenilação obtido por CLAE-MS.....	135
FIGURA 3.8: Fragmentogramas dos picos 1 (xantiletina), 2 (seselina) e 3 (suberosina).....	136
FIGURA 3.9: Cromatograma de uma reação de prenilação com precursor umbeliferona e cofator $MgCl_2$ sobreposto ao branco.....	137
FIGURA 3.10: Cromatograma da reação de prenilação realizada às 23:00h, com precursor herniarina e cofator $MgCl_2$ sobreposto ao branco...	138
FIGURA 3.11: Cromatograma da reação de prenilação realizada com o extrato enzimático do caule inferior sobreposto ao branco.....	142
FIGURA 3.12: Cromatograma da reação de prenilação realizada com o extrato enzimático do caule superior sobreposto ao branco.....	143
FIGURA 3.13: Cromatograma da reação de prenilação realizada com o extrato enzimático das folhas sobreposto ao branco.....	143
FIGURA 3.14: Eletroforese em gel de poli(acrilamida) de extratos das raízes e folhas.....	147
FIGURA 3.15: Foto do experimento de incorporação do IPP- ^{14}C nas raízes do enxerto de <i>Citrus sinensis</i> sobre <i>C. limonia</i>	150
FIGURA 4.1: Estrutura química do alcalóide Dictamina (Substância X)..	165
FIGURA 4.2: Espectro de RMN de 1H (200 MHz, $CDCl_3$) da Substância X (Dictamina).....	168
FIGURA 4.3: Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, $CDCl_3$) da Substância X (Dictamina).....	169
FIGURA 4.4: Espectro de massas da Dictamina (Substância X).....	170
FIGURA 4.5: Estrutura química do alcalóide γ -Fagarina (Substância XI).....	170
FIGURA 4.6: Espectro de RMN de 1H (200 MHz, $CDCl_3$) da Substância	

XI (γ -Fagarina).....	173
FIGURA 4.7: Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) da Substância XI (γ -Fagarina).....	174
FIGURA 4.8: Espectro de massas da γ -Fagarina (Substância XI).....	175
FIGURA 4.9: Estrutura química do alcalóide Esquimianina (Substância XII).....	175
FIGURA 4.10: Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) da Substância XII (Esquimianina).....	178
FIGURA 4.11: Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) da Substância XII (Esquimianina).....	179
FIGURA 4.12: Espectro de massas da Esquimianina (Substância X).....	180
FIGURA 4.13: Estrutura química do alcalóide 1-Metil-4-metoxi-2-quinolona (Substância XIII).....	180
FIGURA 4.14: Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) da Substância XIII (1-Metil-4-metoxi-2-quinolona).....	183
FIGURA 4.15: Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) da Substância XIII (1-Metil-4-metoxi-2-quinolona).....	184
FIGURA 4.16: Espectro de massas da 1-Metil-4-metoxi-2-quinolona (Substância XIII).....	185
FIGURA 4.17: Estrutura química do alcalóide N-Metilflindersina (Substância XIV).....	185
FIGURA 4.18: Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) da Substância XIV (N-Metilflindersina).....	188
FIGURA 4.19: Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) da Substância XIV (N-Metilflindersina).....	189
FIGURA 4.20: Espectro de massas da N-Metilflindersina (Substância XIV).....	190
FIGURA 4.21: Estrutura química do alcalóide Rutaecarpina (Substância XV).....	190
FIGURA 4.22: Correlações observadas no experimento de HMBC para a Substância XV.....	192
FIGURA 4.23: Correlações observadas no experimento de HMBC para a Substância XV.....	192
FIGURA 4.24: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da Substância XV (Rutaecarpina).....	195
FIGURA 4.25: Experimento de HSQC (e ampliação) (400MHz, CDCl_3) da Substância XV (Rutaecarpina).....	196
FIGURA 4.26: Experimento de COSY (e ampliação) (400MHz, CDCl_3) da Substância XV (Rutaecarpina).....	197
FIGURA 4.27: Experimento de HMBC (e ampliação) (400MHz, CDCl_3) da Substância XV (Rutaecarpina).....	198
FIGURA 4.28: Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) da Substância XV (Rutaecarpina).....	199
FIGURA 4.29: Estrutura química do alcalóide 8,8a-seco-8-carboxi-14-	

N-Metilrutaecarpina (Substância XVI).....	200
FIGURA 4.30: Correlações observadas no experimento de HMBC para a Substância XVI.....	201
FIGURA 4.31: Correlações observadas no experimento de HMBC para a Substância XVI.....	201
FIGURA 4.32: Correlações observadas no experimento de HMBC para a Substância XVI.....	202
FIGURA 4.33: Correlações observadas no experimento de HMBC para a Substância XVI.....	203
FIGURA 4.34: Correlações observadas no experimento de HMBC para a Substância XVI.....	204
FIGURA 4.35: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO) da Substância XVI (8,8a-seco-8-carboxi-14-N-metilrutaecarpina).....	207
FIGURA 4.36: Experimento de HSQC (400MHz, DMSO) da Substância XVI (8,8a-seco-8-carboxi-14-N-metilrutaecarpina).....	208
FIGURA 4.37: Experimento de COSY (400MHz, DMSO) da Substância XVI (8,8a-seco-8-carboxi-14-N-metilrutaecarpina).....	209
FIGURA 4.38: Experimento de HMBC (400MHz, DMSO) da Substância XVI (8,8a-seco-8-carboxi-14-N-metilrutaecarpina).....	210
FIGURA 4.39: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO) da Substância XVI (8,8a-seco-8-carboxi-14-N-metilrutaecarpina).....	211
FIGURA 4.40: Estrutura química da cumarina Seselina (Substância XVII).....	212
FIGURA 4.41: Estrutura química do limonóide 2-hidroxi-epiisobacunoato de metila (Substância XVIII).....	213
FIGURA 4.42: Correlações observadas no experimento de HMBC para o anel furano da Substância XVIII.....	214
FIGURA 4.43: Correlações observadas no experimento de HMBC para o anel lactônico da Substância XVIII.....	215
FIGURA 4.44: Correlações observadas no experimento de HMBC para o anel C da Substância XVIII.....	216
FIGURA 4.45: Correlações observadas no experimento de HMBC para o anel B da Substância XVIII.....	217
FIGURA 4.46: Correlações observadas no experimento de HMBC para o anel A da Substância XVIII.....	218
FIGURA 4.47: Correlações observadas no experimento de HMBC para o grupo carbometoxi da Substância XVIII.....	219
FIGURA 4.48: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da Substância XVIII (2-hidroxi-epiisobacunoato de metila).....	223
FIGURA 4.49: Experimento de COSY (400MHz, CDCl_3) da Substância XVIII (2-hidroxi-epiisobacunoato de metila).....	224
FIGURA 4.50: Experimento de HSQC (400MHz, CDCl_3) da Substância XVIII (2-hidroxi-epiisobacunoato de metila).....	225
FIGURA 4.51: Experimento de HMBC (400MHz, CDCl_3) da Substância	

XVIII (2-hidroxi-epiisobacunoato de metila).....	226
FIGURA 4.52: Espectro de DEPT 135 (100 MHz, CDCl ₃) da Substância XVIII (2-hidroxi-epiisobacunoato de metila).....	227
FIGURA 4.53: Espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) da Substância XVIII (2-hidroxi-epiisobacunoato de metila).....	228
FIGURA 4.54: Experimento de NOESY (400MHz, CDCl ₃) da Substância XVIII (2-hidroxi-epiisobacunoato de metila).....	229
FIGURA 4.55: Estrutura química do limonóide 2,21-dihidroxi-23-oxoepiisobacunoato de metila (Substância XIX).....	230
FIGURA 4.56: Correlações observadas no experimento de HMBC para o anel A da Substância XIX.....	231
FIGURA 4.57: Possibilidades de oxidação do anel furano para a Substância XIX.....	232
FIGURA 4.58: Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, MeOD) da Substância XIX (2,21-dihidroxi-23-oxoepiisobacunoato de metila).....	236
FIGURA 4.59: Experimento de HSQC (400MHz, MeOD) da Substância XIX (2,21-dihidroxi-23-oxoepiisobacunoato de metila).....	237
FIGURA 4.60: Experimento de HMBC (400MHz, MeOD) da Substância XIX (2,21-dihidroxi-23-oxoepiisobacunoato de metila).....	238
FIGURA 4.61: Espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz, MeOD) da Substância XIX (2,21-dihidroxi-23-oxoepiisobacunoato de metila).....	239
FIGURA 4.62: Espectro de DEPT 135 (100 MHz, MeOD) da Substância XIX (2,21-dihidroxi-23-oxoepiisobacunoato de metila).....	240
FIGURA 4.63: Experimento de COSY (400MHz, MeOD) da Substância XIX (2,21-dihidroxi-23-oxoepiisobacunoato de metila).....	241
FIGURA 4.64: Experimento de NOESY (400MHz, MeOD) da Substância XIX (2,21-dihidroxi-23-oxoepiisobacunoato de metila).....	242
FIGURA 4.65: Estrutura química do limonóide 7-acetil-21-hidroxi-23-oxotectleanino (Substância XX).....	243
FIGURA 4.66: Correlações observadas no experimento de HMBC para o anel A da Substância XX.....	244
FIGURA 4.67: Correlações observadas no experimento de HMBC para o anel lactônico da Substância XX.....	245
FIGURA 4.68: Correlações observadas no experimento de HMBC para o anel B da Substância XX.....	247
FIGURA 4.69: Correlações observadas no experimento de HMBC para o anel D da Substância XX.....	248
FIGURA 4.70: Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) da Substância XX (7-acetil-21-hidroxi-23-oxotectleanino).....	252
FIGURA 4.71: Experimento de HSQC (400MHz, CDCl ₃) da Substância XX (7-acetil-21-hidroxi-23-oxotectleanino).....	253
FIGURA 4.72: Experimento de HMBC (400MHz, CDCl ₃) da Substância XX (7-acetil-21-hidroxi-23-oxotectleanino).....	254
FIGURA 4.73: Experimento de COSY (400MHz, CDCl ₃) da Substância	

XX (7-acetil-21-hidroxi-23-oxotecteanino).....	255
FIGURA 4.74: Espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) da Substância XX (7-acetil-21-hidroxi-23-oxotecteanino).....	256

LISTA DE QUADROS

	P.
QUADRO 1.1: Substâncias isoladas do caule superior e folhas do enxerto de <i>C. sinensis</i> sobre <i>C. limonia</i>	17
QUADRO 1.2: Substâncias isoladas das raízes do enxerto de <i>C. sinensis</i> sobre <i>C. limonia</i>	18
QUADRO 4.1: Substâncias isoladas dos galhos de <i>Nycticalanthus speciosus</i>	154

LISTA DE ESQUEMAS

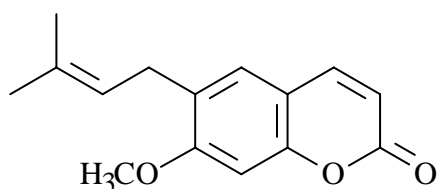
	P.
ESQUEMA 1.1: Preparação dos extratos Hexano-Diclorometânico (HD) e Metanólico a partir do porta-enxerto de <i>C. sinensis</i> sobre <i>C. limonia</i>	23
ESQUEMA 1.2: Fracionamento do extrato Hexano-Diclorometânico com obtenção das substâncias IX e VI.....	26
ESQUEMA 1.3: Fracionamento da subfração C 2.2 com obtenção das Substâncias I, VII e VIII.....	28
ESQUEMA 1.4: Fracionamento das subfrações C 2.2.4 e C 2.2.6 com obtenção das Substâncias II, III, IV, V e IX.....	30
ESQUEMA 4.1: Preparação dos extratos diclorometânico (EDCN), acetato de estila (EACN), n-butanólico (EBCN) e aquoso (EAqCN) do caule de <i>N. speciosus</i>	159
ESQUEMA 4.2: Fracionamento do extrato diclorometânico (EDCN) com obtenção das substâncias XI, XII, XVI, XVIII e XIX.....	161
ESQUEMA 4.3: Fracionamento do extrato EDRN com obtenção das substâncias X, XIII, XIV, XV, XVII, XVIII e XX.....	164

LISTA DE GRÁFICOS

	P.
GRÁFICO 2.1: Efeito das substâncias isoladas do enxerto de <i>C. sinensis</i> sobre <i>C. limonia</i> na germinação de picnidiósporos de <i>G. citricarpa</i>	114
GRÁFICO 2.2: Efeito das substâncias isoladas do enxerto de <i>C. sinensis</i> sobre <i>C. limonia</i> na formação de apressórios (b) de <i>G. citricarpa</i>	115
GRÁFICO 3.1: Comparação da formação da xantiletina com o horário de reação, utilizando a umbeliferona e a herniarina como precursores.....	139
GRÁFICO 3.2: Comparação da formação da seselina com o horário de reação, utilizando a umbeliferona e a herniarina como precursores.....	139
GRÁFICO 3.3: Comparação da formação da suberosina com o horário de reação, utilizando a umbeliferona e a herniarina como precursores.....	140
GRÁFICO 3.4: Comparação da formação da xantiletina, seselina e suberosina com cofator MgCl ₂ e MnCl ₂ , utilizando como precursor a herniarina.....	141
GRÁFICO 3.5: Curva padrão da Ovoalbumina.....	145
GRÁFICO 3.6: Curva de calibração da Xantiletina.....	148
GRÁFICO 3.7: Curva de calibração da Seselina.....	149
GRÁFICO 3.8: Curva de calibração da Suberosina.....	149
GRÁFICO 3.9: Incorporação do IPP- ¹⁴ C obtido do extrato das raízes após 52 h.....	151
GRÁFICO 3.10: Incorporação do IPP- ¹⁴ C obtido do extrato das folhas após 52 h.....	151

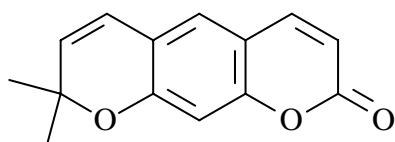
SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS

CAULE DE *CITRUS LIMONIA* ENXERTADO DE *C. SINENSIS*



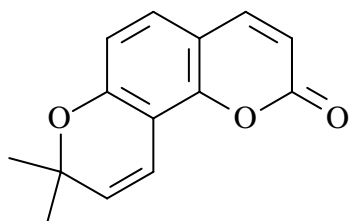
Suberosina (I)

Isolamento (p. 28)
Identificação (p. 31)



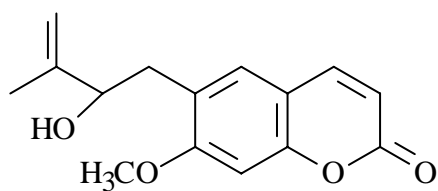
Xantiletina (II)

Isolamento (p. 30)
Identificação (p. 41)



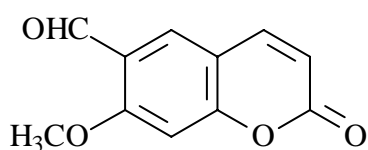
Seselina (III)

Isolamento (p. 30)
Identificação (p. 46)



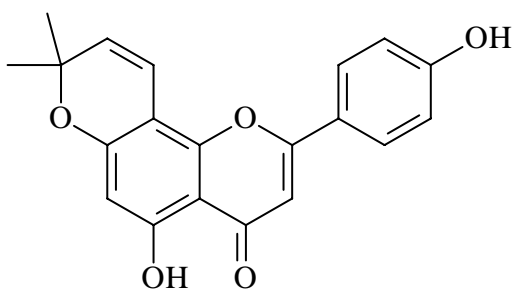
Tamarina (IV)

Isolamento (p. 30)
Identificação (p. 51)



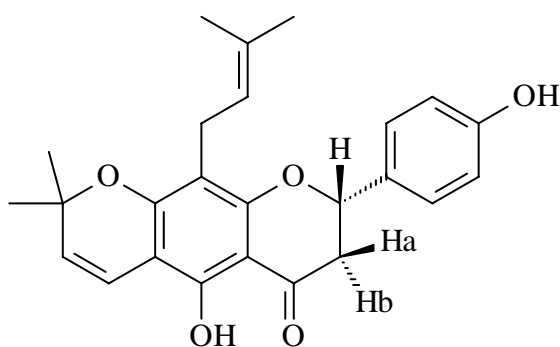
Crenulatina (V)

Isolamento (p. 30)
Identificação (p. 58)



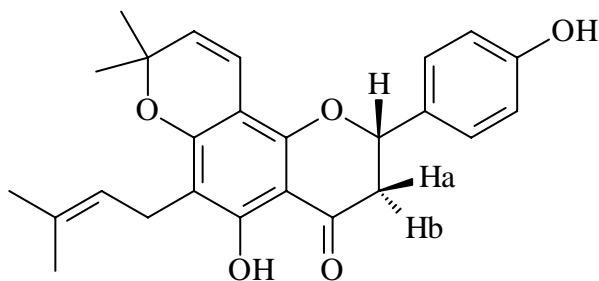
Isolamento (p. 26)
Identificação (p. 61)

Limonianina (VI)



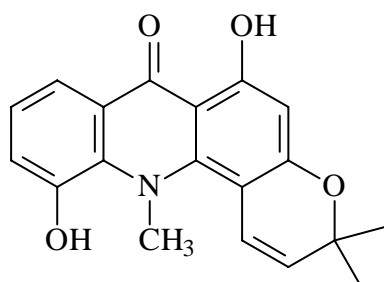
Isolamento (p. 28)
Identificação (p. 69)

Lupinifolina (VII)



Isolamento (p. 28)
Identificação (p. 80)

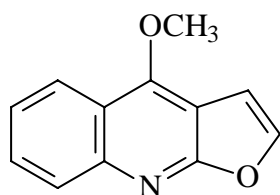
5,4'-diidroxí-6-(3''-metil-2''-butenil)-2'',2''-dimetilpirano(5'',6''-7,8)flavanona (VIII)



Isolamento (p. 26)
Identificação (p. 91)

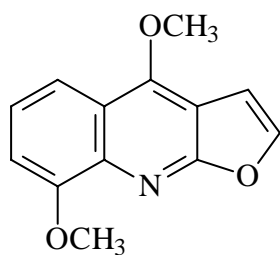
5-hidroxínoracrinicina (IX)

NYCTICALANTHUS SPECIOSUS



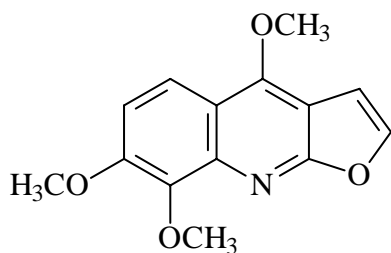
Dictamina (X)

Isolamento (p. 164)
Identificação (p. 165)



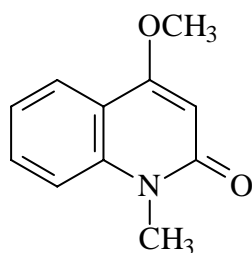
γ-Fagarina (XI)

Isolamento (p. 161)
Identificação (p. 170)



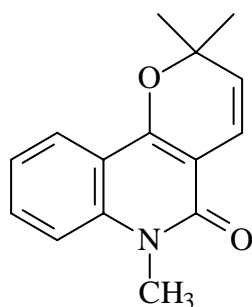
Esquimianina (XII)

Isolamento (p. 161)
Identificação (p. 175)



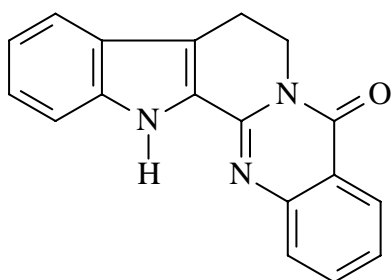
1-Metil-4-metoxi-2-quinolona (XIII)

Isolamento (p. 164)
Identificação (p. 180)



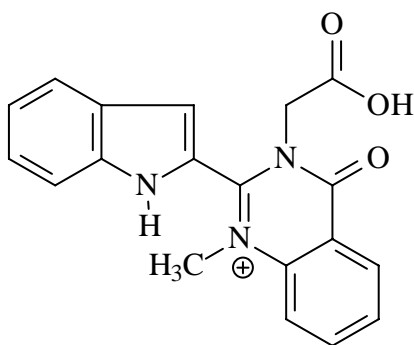
N-Metilflindersina (XIV)

Isolamento (p. 164)
Identificação (p. 185)



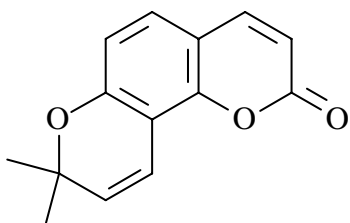
Rutaecarpina (XV)

Isolamento (p. 164)
Identificação (p. 190)



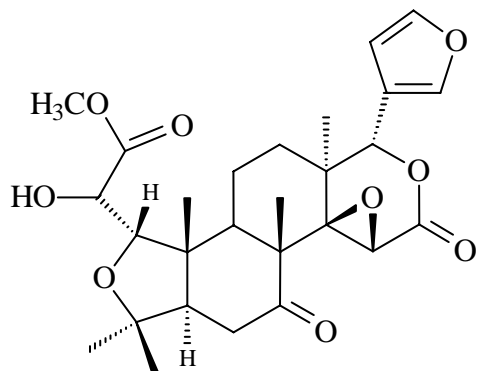
8,8a-seco-8-carboxi-14-N-metilrutaecarpina (XVI)

Isolamento (p. 161)
Identificação (p. 200)



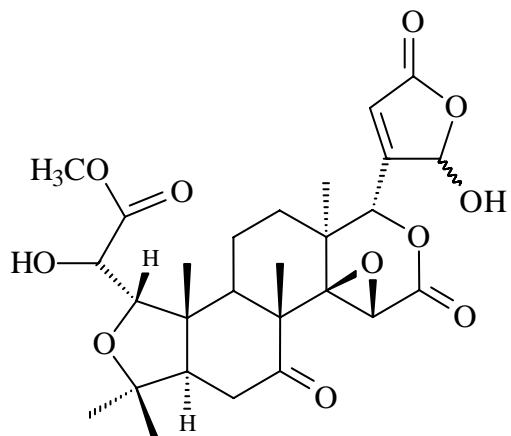
Seselina (XVII)

Isolamento (p. 164)
Identificação (p. 46)



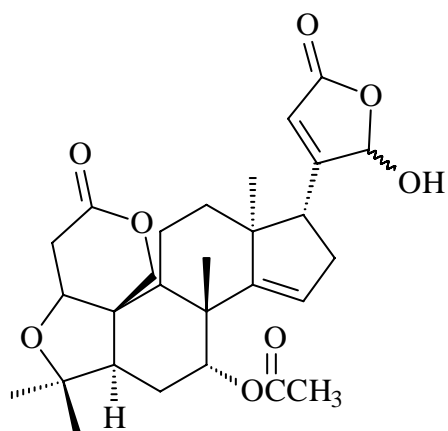
2-hidroxi-epiisobacunoato de metila (XVIII)

Isolamento (p. 161)
Identificação (p. 213)



Isolamento (p. 161)
Identificação (p. 230)

2,21-diidroxi-23-oxoepiisobacunoato de metila (XIX)



Isolamento (p. 164)
Identificação (p. 243)

7-acetil-21-hidroxi-23-oxotecleanino (XX)

RESUMO

FITOQUÍMICA DO CAULE DE *Citrus limonia* ENXERTADO COM *C. sinensis* E DA ESPÉCIE *Nycticalanthus speciosus* (RUTACEAE) E BIOSSÍNTESE DE CUMARINAS PRENILADAS – O limão Cravo (*C. limonia*) é o porta-enxerto mais utilizado na citricultura brasileira por sua alta e precoce produtividade, além de sua boa adaptação aos tipos mais comuns de solo e grande resistência à seca, permitindo um maior aproveitamento da safra. Visando complementar o conhecimento químico de enxertos e entender melhor sobre o mecanismo dos mesmos, realizou-se neste trabalho estudo fitoquímico do caule de *C. limonia* enxertado com *C. sinensis*. Estudos fitoquímicos iniciais mostraram a presença de uma maior quantidade de compostos prenilados na parte inferior do enxerto de *C. sinensis* sobre *C. limonia* enquanto que na parte superior do mesmo apenas dois compostos prenilados foram encontrados em poucas quantidades, levando a supor que esses compostos estejam sendo translocados do porta-enxerto para o enxerto. Dessa forma, realizou-se ainda estudo biossintético de cumarinas preniladas para avaliar a atividade da enzima preniltransferase, responsável pela incorporação de unidades isoprênicas nesses compostos, com o intuito de confirmar se há translocação dos mesmos no enxerto estudado. Com o objetivo de se avançar no conhecimento do perfil químico da família Rutaceae, na qual se insere o gênero *Citrus*, este trabalho descreve também o estudo fitoquímico e quimiossistemático da espécie *Nycticalanthus speciosus* pertencente à mesma família. O estudo fitoquímico do porta-enxerto envolveu diferentes métodos cromatográficos e permitiu identificar nove substâncias, sendo uma flavanona inédita, e da espécie *Nycticalanthus speciosus*, foram identificados onze substâncias sendo um alcalóide indolopiridoquinazolínico e três limonóides inéditos. As substâncias isoladas do porta-enxerto foram ensaiadas frente ao fungo *Guignardia citricarpa* causador da Mancha preta dos citros com o objetivo de se obter um possível antifúngico contra esta doença, sendo que duas cumarinas mostraram atividades inibitórias promissoras. O estudo biossintético da enzima preniltransferase realizado com DMAPP, Umbeliferona e Herniarina mostrou que deve estar ocorrendo a translocação da piranocumarina xantiletina, visto que nas diferentes partes do enxerto de *C. sinensis* sobre *C. limonia* a enzima se mostrou ativa apenas nas raízes e com isso essa cumarina está sendo metabolizadas nas partes inferiores e translocada para as partes superiores do enxerto.

ABSTRACT

PHYTOCHEMISTRY OF *Citrus sinensis* GRAFTING ONTO *C. limonia* AND OF THE *Nycticalanthus speciosus* SPECIES (RUTACEAE) AND THE BIOSYNTHESIS OF PRENYLATED COUMARINES - The Cravo lime species (*C. limonia*) acts as the grafting host, mostly used in the Brazilian citriculture and because of its precocious productivity, besides its good adaptation to most common soils, permitting for an optimum harvest. With the aim to contribute to the chemical knowledge of these graftings and to better understand its mechanisms, a phytochemical study of the rootstock from *C. sinensis* onto *C. limonia* were carried out. Earlier studies indicated the presence of a remarkable amount of prenylated compounds in the lower part of the *C. sinensis* graft, onto the *C. limonia*, while at the same time in the upper part these compounds was found in a very small amounts, rising to the assumption that these compounds could have been translocated from the host to the introduced graft species. In this way, biosynthetic studies of prenylated coumarines were also carried out aiming to evaluate the activity of the prenyltransferase enzyme, responsible by the incorporation of the isoprene units in these compounds. With the objective to advance our knowledge and chemical profile of the Rutaceae family, in which the *Citrus* genus is inserted. This study also describes the phytochemical and phytosystematics of the *Nycticalanthus speciosus* species pertaining to the same family. In the study of the rootstock, several different chromatographic methods were applied permitting to identify nine substances one of them being an unpublished flavanone. From the *Nycticalanthus speciosus*, eleven compounds were isolated as well as an indolopiridoquinazolic alkaloid and also three limonoids previously unheard of. The isolated compounds from the rootstock were assayed against the fungus *Guignardia citricarpa*, responsible for the black stains in *Citrus* species', with the objective to find a possible antifungus for this disease. Two coumarines showed premissory inhibitory activities. The biosynthetic study carried out with the prenyltransferase enzyme DMAPP, Umbelliferone and Herniarin showed that the translocation of the pyranocoumarine Xanthylentin should have happened. Seen in the different parts of the grafting of *C. sinensis* onto the *C. limonia* the enzyme were active only in the roots and with this observation, it appears that the coumarine is being metabolized in the lower part and translocated to the upper parts of the graft.

PREFÁCIO

Atualmente o Brasil é um dos maiores produtores e exportadores mundiais de suco de citros, sendo exportado cerca de 98% da produção. A cultura dos citros é de grande importância econômica para diversos Estados como São Paulo, Sergipe, Minas Gerais, entre outros, onde as maiores produções são de laranja Pêra seguida de Natal e Valência (MATTOS JUNIOR et al., 2005).

A espécie *Citrus limonia* conhecida popularmente como limão Cravo, é pertencente à família Rutaceae e tem sido utilizada em toda citricultura brasileira como porta-enxerto para o cultivo de diversas plantas cítricas. O emprego deste porta-enxerto recebe grande incentivo por apresentar algumas vantagens como a precocidade no início de produção e aumento na produtividade; resistência à seca e ao frio. Desta forma a maioria das laranjas e tangerinas de melhores qualidades são obtidas do enxerto das mesmas sobre o limão Cravo. Sendo assim, o limão cravo é o principal porta-enxerto sobre o qual foi constituída a citricultura brasileira e está presente atualmente em quase 40% das plantas cítricas (POMPEU JUNIOR, 2005).

A partir do estudo do caule de *C. limonia* enxertado com *C. sinensis*, resultados preliminares mostraram o isolamento de vários metabólitos prenilados como cumarinas, flavonóides e alcalóides, enquanto que no enxerto (*C. sinensis*) apenas dois destes compostos foram encontrados e em pequenas quantidades.

Desta forma, visando avançar no conhecimento químico de enxertos e entender melhor sobre o mecanismo dos mesmos, o grupo de Produtos Naturais da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) vem estudando plantas obtidas por enxertia, as quais atingem o estágio adulto em um tempo bem menor, o que facilita os estudos durante o desenvolvimento do mesmo. Assim, iniciou-se o estudo fitoquímico pelo caule do porta-enxerto

Citrus limonia (limão Cravo) enxertado com *C. sinensis* (laranja Pêra) que, associado ao conhecimento do grupo sobre a química da família Rutaceae tornaria o trabalho experimental mais rápido.

Foram estudadas as partes da planta enxertada separadamente, a raiz do porta-enxerto (*C. limonia*) e o caule e as folhas do enxerto (*C. sinensis*). O estudo da parte superior (caule e folhas) levou ao isolamento quase que exclusivamente de flavonóides. Apenas duas piranocumarinas foram isoladas: xantiletina das folhas e caule e xantoxiletina apenas no caule. Um limonóide, a limonina, foi encontrado nas folhas. O triterpeno friedelina foi obtido nas folhas e caule. Os esteróides comuns em plantas, β -sitosterol, estigmasterol, campesterol e 3- β -glicopiranosil-sitosterol, também foram isolados do caule (GARCIA, 2005).

O interessante é que nas raízes a classe de maior representatividade foi cumarina, principalmente as piranocumarinas. Apenas dois limonóides - limonina e acetato de limonina - foram encontrados. Ao contrário da parte superior, onde a predominância é flavonóides metoxilados, apenas um flavonóide foi localizado, uma flavanona, que é diferente por ser um piranoflavonóide. Os esteróides comuns em planta, β -sitosterol, estigmasterol e campesterol também foram isolados das raízes.

A Xantiletina foi isolada em grande quantidade (gramas) nas raízes e apenas em pequenas quantidades (miligramas) nas partes superiores. Este fato chama atenção pela predominância de compostos prenilados na parte inferior do enxerto e associado à ausência do piranoflavonóides na parte superior do enxerto, levando inicialmente a questionar a possível translocação desses metabólitos que estão em grande quantidade na parte inferior para a parte superior do enxerto.

Assim, objetivando entender melhor o mecanismo de plantas enxertadas, neste trabalho será abordado um estudo biossintético para avaliar a

atividade da enzima preniltransferase, responsável pela incorporação de unidades isoprênicas, na formação de metabólitos prenilados.

O perfil químico do gênero *Citrus* é caracterizado pela presença de cumarinas, flavonóides, alcalóides e limonóides, sendo que há um grande número de compostos prenilados presentes neste gênero. Portanto, este trabalho visa também isolar e constatar a presença destes compostos em *C. limonia* quando utilizado como porta-enxerto.

Esses compostos isolados do caule de *C. limonia* foram ensaiados frente ao fungo *Guignardia citricarpa* causador da doença dos citros conhecida como “mancha preta dos citros” visando uma busca de substâncias antifúngicas.

Considerando que a família Rutaceae, estudada pelo grupo de Produtos Naturais da UFSCar, apresenta uma grande variedade de metabólitos secundários como limonóides, flavonóides, alcalóides, cumarinas, etc., buscase ainda nesta pesquisa, avançar no conhecimento químico desta família, por meio de um estudo fitoquímico da espécie *Nycticalanthus speciosus*, também pertencente à família Rutaceae, visando o isolamento de metabólitos. Este estudo objetiva um maior conhecimento no perfil químico da família Rutaceae, e toma relevância na medida em que não há dados químicos sobre esta espécie publicados na literatura, exceto estudos iniciados pelo grupo da UFSCar.

Com o intuito de explorar os objetivos desta pesquisa de forma mais clara, este trabalho será apresentado em forma de capítulos, facilitando o acompanhamento do seu desenvolvimento. Cada capítulo apresentará uma abordagem teórica sobre o assunto, sua parte experimental e os dados obtidos. Por fim, será feita uma única conclusão, com uma síntese geral dos resultados obtidos no trabalho.

No **capítulo 1**, será abordado o estudo fitoquímico do caule de *Citrus limonia* enxertado com *C. sinensis*. No **capítulo 2**, serão apresentados

os ensaios realizados, utilizando as substâncias isoladas, mostradas no **capítulo 1**, contra o fungo *Guignardia citricarpa*. No **capítulo 3**, serão abordados os ensaios para avaliação da translocação de cumarinas preniladas da parte inferior para a superior de plantas de *Citrus limonia* enxertado com *C. sinensis*, por meio da determinação da atividade da enzima preniltransferase. Por último, no **capítulo 4** será mostrado o estudo fitoquímico da espécie *Nycticalanthus speciosus* (Rutaceae).

OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivos principais o estudo fitoquímico do caule do porta-enxerto *Citrus limonia* enxertado com *C. sinensis* com o intuito de buscar um maior conhecimento químico de plantas enxertadas; ensaiar as substâncias isoladas a partir deste estudo fitoquímico frente ao fungo *Guignardia citricarpa*, causador da doença “mancha preta dos citros”; e avaliar a reação de prenilação de cumarinas, por meio da determinação da atividade da enzima preniltransferase para verificar a translocação de metabólitos secundários da parte inferior para a superior em plantas de *C. limonia* enxertadas com *C. sinensis*.

Em outra etapa, propôs-se ainda nesta pesquisa realizar o estudo fitoquímico da espécie *Nycticalanthus speciosus* para um maior conhecimento químico da família Rutaceae.

CAPÍTULO 1

1 - ESTUDO FITOQUÍMICO DO CAULE DE *CITRUS LIMONIA* ENXERTADO COM *C. SINENSIS*

A partir da década de 1980, o Brasil se consolidou como o maior produtor mundial de suco de laranja, com a produção voltada principalmente para o mercado externo, sendo que as plantas cítricas utilizadas comercialmente são obtidas de todo território brasileiro na forma de plantas enxertadas, diversificadas em certas variedades de copas. Entre elas laranjas, tangerinas, limões, limas ácidas, pomelos etc., sendo o grupo das laranjas doces o de maior expressão, principalmente pelo interesse econômico de seu suco (MATTOS JUNIOR et al., 2005).

Essas plantas cítricas são pertencentes ao gênero *Citrus*, que é um dos mais importantes da família Rutaceae devido principalmente ao seu perfil químico (SILVA et al., 1988).

1.1 - FAMÍLIA RUTACEAE

Segundo ENGLER (1931) e WATERMAN (1983), a família Rutaceae se constituía como o maior grupo da ordem Rutales (atualmente denominada Sapindales (STEVENS, 2006), por possuir 150 gêneros com mais de 1500 espécies largamente distribuídas pelas regiões dos trópicos úmidos e temperados do mundo, sendo nas regiões da América tropical, sul da África e Austrália as de maior abundância de espécies desse gênero.

Primeiramente ENGLER (1931) mencionou que dentro da família Rutaceae, a taxonomia da subfamília Aurantioideae incluía 14 gêneros para um número estimado de 71 espécies, das quais apenas 6 pertenciam ao gênero *Citrus*. Posteriormente o mesmo autor incluiu 29 gêneros nesta

subfamília e estimou que houvesse cerca de 180 espécies, das quais no gênero *Citrus* estavam incluso 11.

A classificação botânica da família Rutaceae baseava-se até recentemente na proposta de ENGLER (1931), que a divide em sete subfamílias de acordo com suas características farmacológicas: Rutoideae, Toddalioideae, Aurantioideae (Citroideae), Spathelioideae, Dictyolomatoideae, Flindersioideae e Rhabdodendroideae.

Essa família apresenta uma diversidade muito grande de metabólitos secundários, destacando-se os alcalóides, especialmente os derivados do ácido antranílico, cumarinas, lignanas, flavonóides e limonóides (WATERMAN e GRUND, 1975; SILVA et al., 1988). É nesse contexto que a quimiosistemática desta família foi revisada por SILVA et al. (1988), baseando-se principalmente nos alcalóides derivados do ácido antranílico, cumarinas e limonóides. Estes estudos têm mostrado que a similaridade na diversificação dos alcalóides (do ácido antranílico) entre as subfamílias Rutoideae e Toddalioideae é tão pronunciada que a separação dos dois grupos fica comprometida. Foi principalmente nestas duas subfamílias que se percebeu a necessidade de um novo arranjo taxonômico dos gêneros. Assim, nessa revisão SILVA et al. (1988) provisoriamente uniram estas duas subfamílias em uma única, a Rutoideae, subdividindo-a em 17 tribos.

No sistema de ENGLER (1931) e no sistema publicado posteriormente por SWINGLE e REECE (1967) o caráter natural da subfamília Aurantioideae (Citroideae) nunca foi questionado. Esta subfamília exhibe proliferação total de cumarinas e limonóides, mas há uma escassez em número e diversidade nos alcalóides do ácido antranílico, guardando afinidade ao grupo discutido acima, porém, confirmando sua separação natural do mesmo. A subdivisão nesta subfamília, segundo os dados químicos, está muito próxima daquela proposta por SWINGLE e REECE (1967). Em revisão feita por SCHOLZ (1964), a classificação de ENGLER (1931) aparece com

pequenas alterações, onde a subfamília Aurantioideae passou a ser denominada Citroideae, já que o nome anterior era baseado em *Aurantium* Tourn. ex Miller, o qual foi posteriormente incluído em *Citrus*.

O trabalho considerado o mais completo e ainda mais utilizado sobre o gênero *Citrus* foi publicado por SWINGLE e REECE (1967) no qual eles caracterizaram morfológicamente todos os níveis hierárquicos da subfamília Aurantioideae, incluindo tribos, subtribos, grupos, gêneros, espécies, variedades e até híbridos. Reconheceram 10 espécies de *Citrus* com frutos comestíveis e estames conatos na base (*Citrus* subg. *Citrus*) e 6 espécies com frutos acres, não comestíveis e estames livres (*Citrus* subg. *Papeda*).

MABBERLEY (1997) apresentou estudos taxonômicos indicando que *Citrus* subg. *Citrus* compreende apenas 4 espécies selvagens alopátricas conhecidas – 2 espécies tropicais: *C. halimii* B. C. Stone e *C. grandis* (toranja, do sudoeste da Ásia) e 2 subtropicais: *C. medica* L. (cidra) e *C. reticulata* Blanco (tangerina Mandarin).

Esta subfamília foi estudada por TANAKA (1961) que reconhecia 10 espécies para o gênero *Citrus*, todas já propostas por Swingle e adicionou 17 novas espécies, e em 1961 o mesmo pesquisador dividiu o gênero *Citrus* nos subgêneros *Archicitrus* e *Metacitrus*, em várias seções, subseções, grupos e subgrupos, contabilizando 157 espécies, sendo 30 delas novas espécies de *Citrus* e 48 seriam novas combinações. Após alguns anos, em 1977, essas espécies representantes de *Citrus* totalizavam 162 (ARAÚJO e ROQUE, 2005).

Sendo assim, o gênero *Citrus* é classificado taxonômicamente segundo SWINGLE e REECE (1967) como pertencente à família Rutaceae, subfamília Aurantioideae, tribo Citreae, subtribo Citrinae, grupo subtribal “árvores de citros verdadeiros” (grupo C) (ARAÚJO e ROQUE, 2005).

Foram apresentados estudos realizados com enzimas, onde mostraram que os frutos comercialmente comestíveis referidos em *Citrus* devem ter sido derivados das três espécies citadas anteriormente (*C. grandis*, *C. medica* e *C. reticulata*), através da seleção e hibridização, normalmente não intencional, segundo MABBERLEY (1997). De acordo com o mesmo autor, a grande importância dessas plantas na horticultura comercial deve ter sido responsável pela proliferação de binômios, resultando em crescentes complicações, quando se refere à nomenclatura, à medida que novas linhagens de híbridos foram introduzidas (ARAÚJO e ROQUE, 2005).

A origem genética das espécies de *Citrus* tem sido considerada com base no resultado de hibridização natural, e será mostrada aqui baseando-se nas linhagens maternas somente as espécies *C. limonia* Osbeck e *C. sinensis* (L.) Osbeck, as quais são as espécies que constituem a planta enxertada em estudo realizado durante esta pesquisa de doutorado.

A espécie *C. limonia* Osbeck, conhecida como limão Cravo (também conhecido como limão Rosa, Bravo, Vinagre, Vermelho, etc.), possui três prováveis cruzamentos, entre eles: *C. medica* x lima x espécie não identificada; *C. medica* x lima e *C. medica* x limão Rugoso. Ainda para esta espécie os dados citoplasmáticos colocam-na na linhagem materna das tangerinas, junto a *C. reticulata* (tangerina), *C. jambhiri* (limão Rugoso) e *C. volkameriana* (limão Volkameriano), podendo ter, em qualquer um destes táxons, o seu parental materno (ARAÚJO e ROQUE, 2005).

A espécie *C. sinensis* (L.) Osbeck, conhecida como laranja Pêra é provavelmente originada do cruzamento de *C. grandis* (toranja) com *C. reticulata* (tangerina) sendo que os dados citoplasmáticos sugerem a contribuição materna de *C. grandis* na formação desta espécie (ARAÚJO e ROQUE, 2005).

Considerando que o presente trabalho visa o estudo do enxerto de *C. sinensis* sobre *C. limonia* (espécies abordadas acima), faz-se necessário um maior conhecimento sobre a enxertia, explanado a seguir.

1.2 - ENXERTIA

Enxerto, ou enxertia, é uma prática que se tornou comum a partir do século XV quando se utilizavam dela para reduzir a altura de pereiras e macieiras (POMPEU JUNIOR, 2005). Consiste basicamente no processo de multiplicação vegetal onde é “soldado” (adicionado) um galho ou broto de uma planta ao tronco enraizado de outra, em geral mais resistente, para que nela se desenvolva com características aprimoradas, ou seja, consiste na prática de uma relação simbiótica, destacando-se a garantia de que as novas mudas reproduzirão as qualidades da planta-mãe (RODRIGUEZ et al., 1991). Além disso, a enxertia visa criar uma associação entre dois indivíduos, geneticamente diferentes, cada qual com suas características, que devem passar a crescer de forma mutuamente benéfica, para que a planta final seja produtiva e de vida longa. Isso pode fazer com que ao longo do tempo, a planta sofra influências de sua origem dupla, de acordo com os interesses e necessidades da copa e do porta-enxerto (POMPEU JUNIOR, 2005).

Existem diferentes modalidades de enxerto em que se propagam as plantas cítricas, como: O enxerto por **aproximação** ou **encostia**, no qual dois galhos de duas plantas, ambas enraizadas, são unidos em certo ponto onde parte da casca é removida. Depois que o enxerto “pega”, corta-se abaixo desse ponto o galho que serviu como garfo. O enxerto de **garfo** ou **garfagem** resume-se à implantação de um pedaço de galho da planta a ser multiplicado sobre um porta-enxerto compatível, mais rústico e já enraizado. O enxerto via **borbulha** consiste basicamente em se usar uma borbulha ou gema a qual vai ser fixada sob a casca do porta-enxerto (ou cavalo do enxerto). Para que a

enxertia tenha sucesso, é fundamental que se ajustem perfeitamente as partes interligadas, com enfaixe do conjunto para que se acelere a fusão (RODRIGUEZ et al., 1991).

As plantas enxertadas usadas nessa pesquisa foram obtidas pela técnica de borbulha em “T” invertido cuja descrição mais detalhada é feita a seguir.

Com esse fim, utiliza-se um exemplo do processo de formação de uma planta enxertada via borbulha referente ao enxerto de duas espécies de *Citrus*, mostrado na **FIGURA 1.1**, onde discrimina-se as seguintes etapas: **(a)** Ramos da planta a ser multiplicada do clone de citros são selecionados e uma gema ou *borbulha* é retirada com uma lâmina afiada; **(b)** O porta-enxerto é preparado para receber a borbulha cortando-o longitudinalmente a uma distância de 10 a 15 cm do solo e depois transversalmente na base do primeiro corte, formando um “T” invertido; **(c)** A borbulha retirada do ramo do clone que se deseja reproduzir é inserida de baixo para cima na abertura em “T” invertido formada anteriormente; **(d)** O enxerto é protegido com uma fita plástica com o intuito de se evitar o ressecamento e permitindo a proliferação de células do porta-enxerto e da borbulha, até completarem a união entre ambos; **(e - f)** Retira-se o plástico e verga-se (ou curva-se) o porta-enxerto para forçar a brotação da borbulha do clone enxertado; **(g)** Após certa de 11 dias depois de se retirar o plástico tem-se a brotação; **(h - i)** Os enxertos continuam crescendo até aproximadamente 60 dias quando os porta-enxertos são cortados logo acima da região de enxertia; **(j)** Por fim temos a planta enxertada (FUNDECITRUS, 2004).



FIGURA 1.1: Processo de formação de uma planta de citros enxertada via borbulha – Figura extraída do *website* da FUNDECITRUS.

Algumas observações devem ser levadas em consideração para que haja um bom êxito da operação da enxertia, uma delas diz respeito à compatibilidade entre o enxerto e o porta-enxerto, pois só plantas de espécies que tenham entre si certo grau de parentesco e analogia entre suas estruturas anatômicas podem ser enxertadas (RODRIGUEZ et al., 1991).

Mudas resultantes de enxerto exigem freqüentes inspeções de seu estado geral. Brotos ladrões, que nasçam eventualmente num porta-enxerto, abaixo do ponto de enxertia, devem ser podados logo, para impedir que o porta-enxerto cresça sozinho, rejeitando a parte que lhe foi implantada (RODRIGUEZ et al., 1991).

São inúmeras as alterações sofridas por uma planta cítrica quando enxertada, entre elas podemos destacar algumas como, induzir à copa florescimento e frutificação mais precoce; alterações no teor de açúcares,

ácidos e outros componentes do suco; composição química das folhas; tolerância à salinidade, à seca, ao frio, a doenças e pragas. Existem também influências da copa sobre o porta-enxerto, porém um pouco menos expressível como resistência ao frio, à seca e às doenças e pragas (POMPEU JUNIOR, 2005).

O uso de porta-enxertos na citricultura permitiu elevados ganhos de produtividade, mas apresentou pontos desfavoráveis para a citricultura, como podemos destacar o caso de doenças como a Gomose, Tristeza, Declínio e Morte súbita dos citros, doenças bem expressivas em citros (POMPEU JUNIOR, 2005).

1.3 - ENXERTO DE *Citrus sinensis* SOBRE *C. Limonia*

O início do uso de plantas enxertadas alcançou uma maior expressão com o emprego de laranjas doces, entre elas a laranja Caipira, mas sua baixa resistência à Gomose e à seca motivou a sua substituição pela laranja Azeda que por sua vez foi afetada principalmente pelo vírus Tristeza dos citros, onde as mesmas são intolerantes. Posteriormente, a partir de experimentos desenvolvidos pela Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz e pelo Instituto Agrônomo de Campinas, foram observados que plantas enxertadas sobre limão Cravo, tangerina Cleópatra, tangerina Sunki, laranja Caipira e limão Rugoso não apresentavam os sintomas desta doença, sendo considerados tolerantes à Tristeza e assim utilizados na citricultura.

Com isso os pomares sofreram uma renovação aproveitando-se de borbulhas retiradas de plantas sobre laranja azeda e enxertadas sobre o limão Cravo, porém este último mostrou-se suscetível à Exocorte e à Xiloporose, cuja presença nos pomares antigos eram mascaradas pela tolerância da laranja Azeda (MATTOS JUNIOR et al., 2005).

A Exocorte e a Xiloporose tornaram-se um grave problema em plantas cítricas, pois poderiam reduzir em até 70% a produção das plantas podendo tornar o limão Cravo inviável para a citricultura. Segundo MATTOS JUNIOR et al. (2005), esse problema pode ser minimizado com o emprego de clones nucelares, que é uma forma melhoramento genético, e que não será abordado nesta pesquisa.

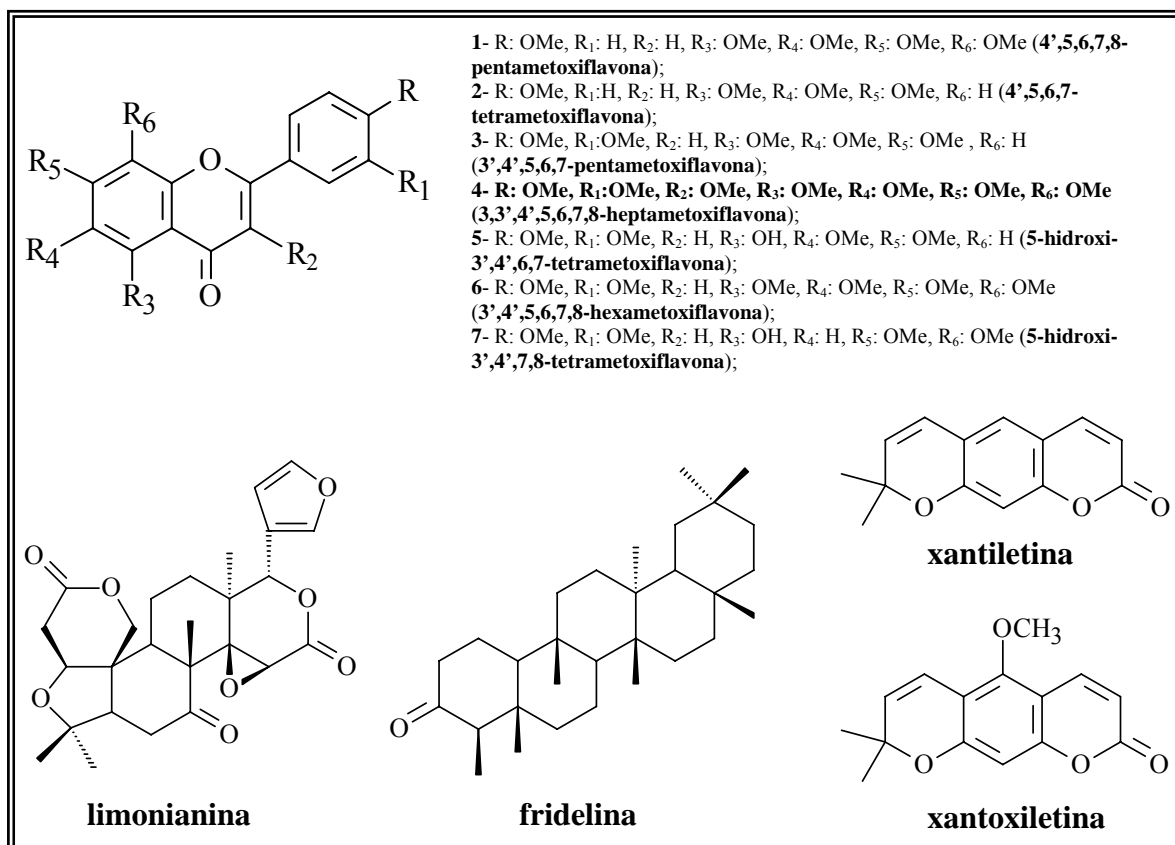
Esses dados associados a outras características apresentadas pelo limão Cravo como, compatibilidade com todas as copas, produção precoce, facilidade de formação das mudas, alta produção de frutos de boa qualidade, e grande resistência à seca, tornam-no o mais utilizado por citricultores e viveiristas. Conforme dados publicados por POMPEU JUNIOR (2001), o limão Cravo passa, a partir da década de 60, a ser praticamente o único porta-enxerto em que se constitui a citricultura paulista.

Mesmo após o surgimento do Declínio dos Citros que afetou as plantas enxertadas sobre o limão Cravo na década de 70, obrigando uma diversificação dos porta-enxertos com a utilização da tangerina Cleópatra e limão Volkameriano, o limão Cravo continuou a predominar nos pomares. Dados apresentados em 2002 pela Fundecitrus mostravam que ele participava em 70% das mudas e, só para o Estado de São Paulo no início deste milênio, ele estava presente em 80%. Outra doença, a Morte Súbita dos Citros acelerou a diversificação dos porta-enxertos, tornando o limão Cravo presente em 39,8% das plantas cítricas seguido pela tangerina Cleópatra com 32,6% (POMPEU JUNIOR, 2005).

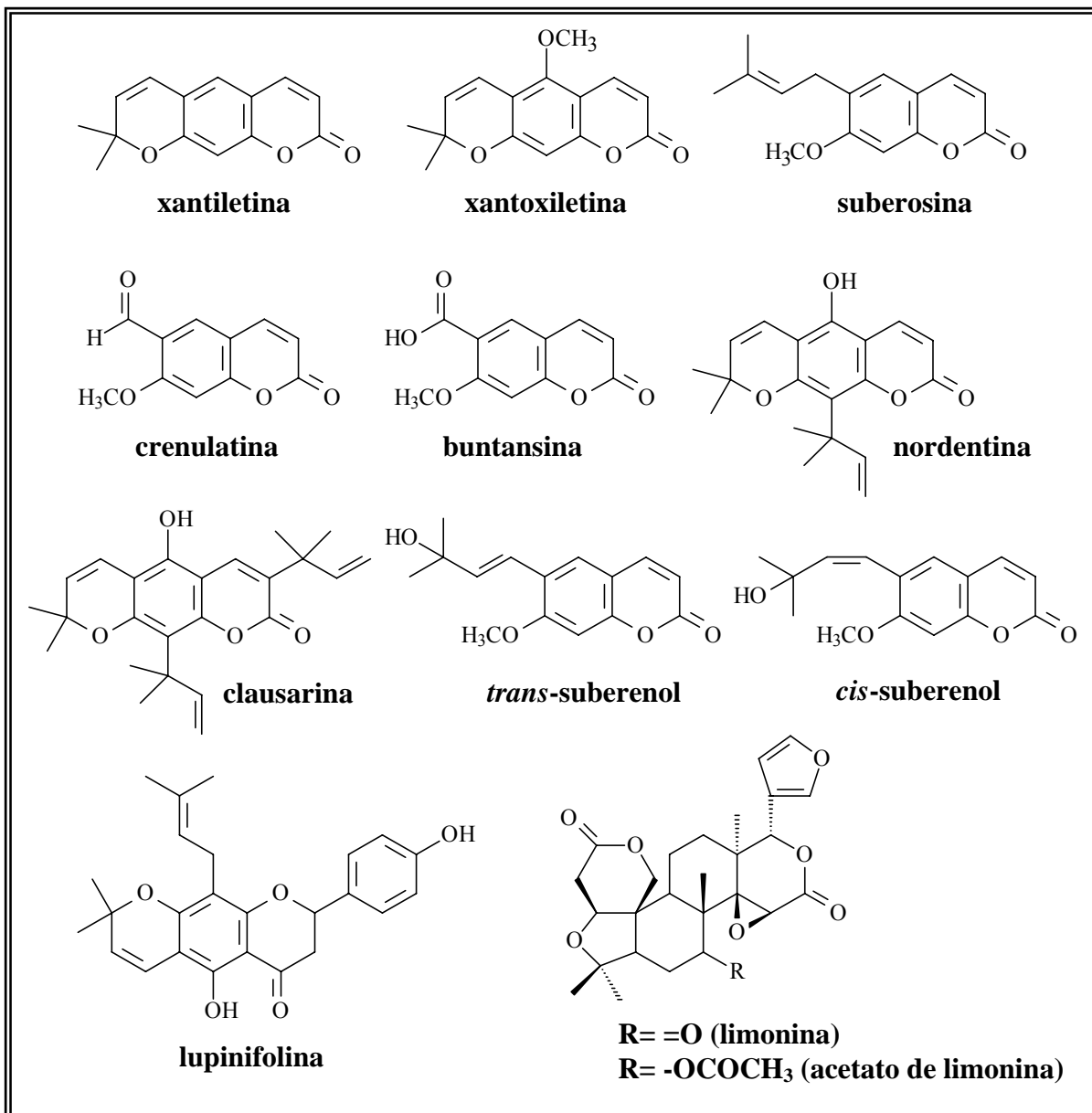
Baseado nos dados descritos percebe-se que o limão Cravo continua sendo o principal porta-enxerto da citricultura brasileira, mesmo após o surgimento de algumas doenças que afetaram e diminuíram o uso do mesmo. E é nesse contexto que se torna relevante um estudo mais aprofundado sobre plantas enxertadas sobre esta espécie, com intuito de se entender melhor o metabolismo secundário de plantas enxertadas.

O grupo de produtos Naturais da UFSCar já vem realizando estudos sobre algumas plantas enxertadas com esse objetivo. Inicialmente foram realizados estudos com plantas de madeira nobre, e posteriormente buscou-se estudar também enxertos que atingissem o estado adulto num tempo bem menor que as primeiras permitindo obtenção de resultados com mais rapidez. Nesse caso, já foram realizados estudos do enxerto de *C. sinensis* sobre *C. limonia* que possui essa característica, e por pertencerem à família Rutaceae que já era quimicamente investigada pelo grupo.

Assim, tendo como objeto de estudo plantas obtidas do enxerto de *C. sinensis* (laranja Pêra) sobre *C. limonia* (limão Cravo), já foram realizados estudos fitoquímicos com o caule e as folhas do enxerto (*C. sinensis*) (**QUADRO 1.1**, p. 17) e com as raízes do porta-enxerto (*C. limonia*) (**QUADRO 1.2**, p. 18), restando ainda estudar o caule do porta-enxerto, que foi um dos objetivos da presente tese e sobre o qual apresentamos neste capítulo. O estudo fitoquímico do caule de *C. limonia* enxertado com *C. sinensis*, visou principalmente ampliar o conhecimento químico de toda a planta enxertada.



QUADRO 1.1: Substâncias isoladas do caule superior e folhas do enxerto de *C. sinensis* sobre *C. limonia* (GARCIA, 2005).



QUADRO 1.2: Substâncias isoladas das raízes *C. limonia* enxertado com *C. sinensis*.

1.4 - PARTE EXPERIMENTAL

1.4.1 - Materiais e reagentes utilizados

- Evaporadores:
 - Evaporador rotativo Tecnal (TE 120);
 - Buchi modelo rotavor R.

- Moinho:
 - Moinho Willey.

- Cromatógrafo líquido de alta eficiência:
 - Cromatógrafo líquido de alta eficiência reciclante (CLAE-R) – Shimadzu LC-8A equipado com válvula de injeção Rheodyne, loop de 500 e 2000 μ L e detector de ultravioleta Shimadzu SPD 6AV;
 - Cromatógrafo líquido de alta eficiência reciclante (CLAE-R) – Shimadzu LC-10Avp equipado com válvula de injeção Rheodyne, loop de 20, 100, 500, 1000 e 2000 μ L e detector de ultravioleta Shimadzu SPD 6AV;

- Espectrômetros de Ressonância Magnética Nuclear:
 - BRÜCKER modelo ARX-200, DQ-UFSCar, com Software UXMNMR;

- BRÜCKER modelo ARX-400, DQ-UFSCar, com Software XWINNMR.

- Cromatografia em coluna:
 - Colunas de vidro com comprimentos e diâmetros variados fabricadas na vidraria do DQ-UFSCar.

- Colunas para CLAE:
 - Coluna analítica Hypersil ODS (5 μ) (ϕ x h = 4,6 mm x 25 cm);
 - Coluna preparativa C₁₈ (10 μ) (ϕ x h = 250 x 21,2 mm);
 - Coluna polimérica Shodex GS-310 2G – Asahipak.

- Fases estacionárias para cromatografia:
 - Sílica gel 60 GF₂₅₄ (MERCK) em placas comerciais, com suporte de alumínio;
 - Sílica gel 60 GF₂₅₄ (MERCK) em placas de vidro preparadas no laboratório (20 cm x 20 cm);
 - Sílica gel 60 (63-230 Mesh) – MERCK;
 - Sílica gel (40-63 Mesh) – MERCK;
 - Sílica gel silanizada 60 (70-230 Mesh) – MERCK;
 - Sephadex LH-20 – AMERSHAM.

- Agentes reveladores:
 - Vanilina em ácido sulfúrico;
 - Iodo – MERCK;

- Solventes para cromatografia:
 - Solventes (Hexano, Diclorometano, Acetato de etila, Acetona, Etanol e Metanol) destilados no laboratório de destilação do DQ-UFSCar;
 - Água MILIQ;
 - Solventes P.A. – MERCK, VETEC, ALDRICH;
 - Solventes com grau cromatográfico/espectroscópico – ALDRICH e MERCK;

- Solventes para obtenção de espectros de RMN:
 - Solventes deuterados – ALDRICH.

1.4.2 - Coleta do material botânico

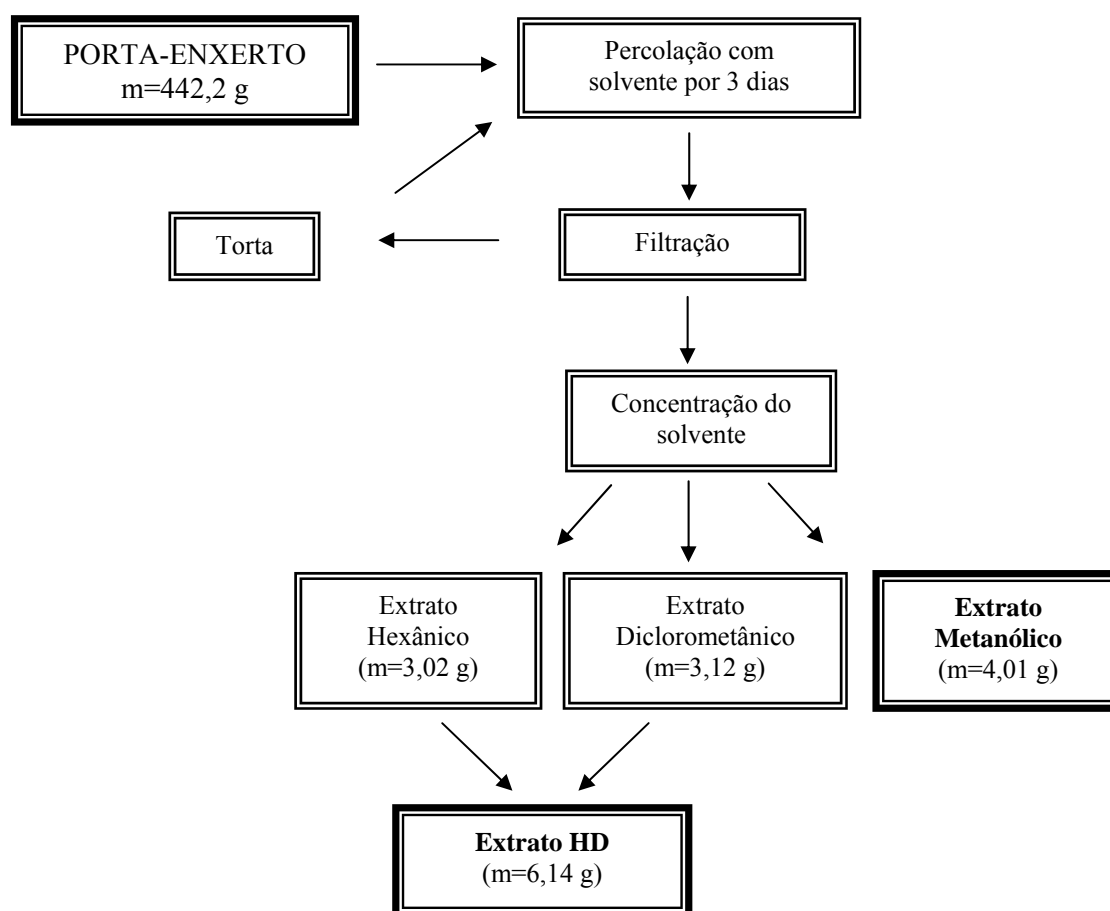
As plantas de *Citrus limonia* Osbeck (limão Cravo) enxertadas com *C. sinensis* (L.) Osbeck (laranja Pêra) (**FIGURA 1.2**, p. 22) foram obtidas no mês de agosto de 2002, com aproximadamente 5 meses após a enxertia, no Centro Avançado de Pesquisas Tecnológicas do Agronegócio de Citros “Sylvio Moreira” do Instituto Agronômico de Campinas (IAC).



FIGURA 1.2: Foto de plantas de *Citrus limonia* Osbeck (limão Cravo) enxertadas com *C. sinensis* (L.) Osbeck (laranja Pêra).

1.5 - OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

Os caules de *C. limonia* enxertados com *C. sinensis* foram separados e secos em estufa de circulação de ar, a 45°C e moídas em moinho. Em seguida o material moído foi percolado com solventes para extração de metabólitos secundários, em ordem crescente de polaridade (Hexano, diclorometano e metanol) a temperatura ambiente e em repouso após três agitações por dia. Cada extração perpassou-se três dias com uma troca de solvente por dia, totalizando nove dias, sendo três para cada solvente. O procedimento de formação dos extratos é mostrado no **ESQUEMA 1.1**, na página 23. Os extratos hexânico e diclorometânico após análise por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) foram constatados como muito semelhantes e por isso foram reunidos em um único extrato, o Extrato Hexano-Diclorometânico (H-D).



ESQUEMA 1.1: Preparação dos extratos Hexano-Diclorometânico (HD) e Metanólico a partir do porta-enxerto de *C. sinensis* sobre *C. limonia*.

O caule da planta de Citros enxertada possui uma intersecção que é justamente o ponto de união entre o *Citrus limonia* (limãoCravo) e o *C. sinensis* (laranja Pêra) na enxertia. Esta intersecção foi separada do caule superior e inferior com dois cortes transversais, pois observou-se após análise por CCDA que esta possui algumas substâncias que são diferentes daquela do caule do porta-enxerto (*C. limonia*) e do enxerto (*C. sinensis*) a fim de que não se tivesse uma resposta errônea da constituição química do porta-enxerto, ou seja, a planta enxertada foi dividida sem que restasse nenhuma parte da intersecção onde houvessem restado constituintes químicos da própria

intersecção ou até mesmo do enxerto. A intersecção pode ser vista na **FIGURA 1.2**, p. 22.

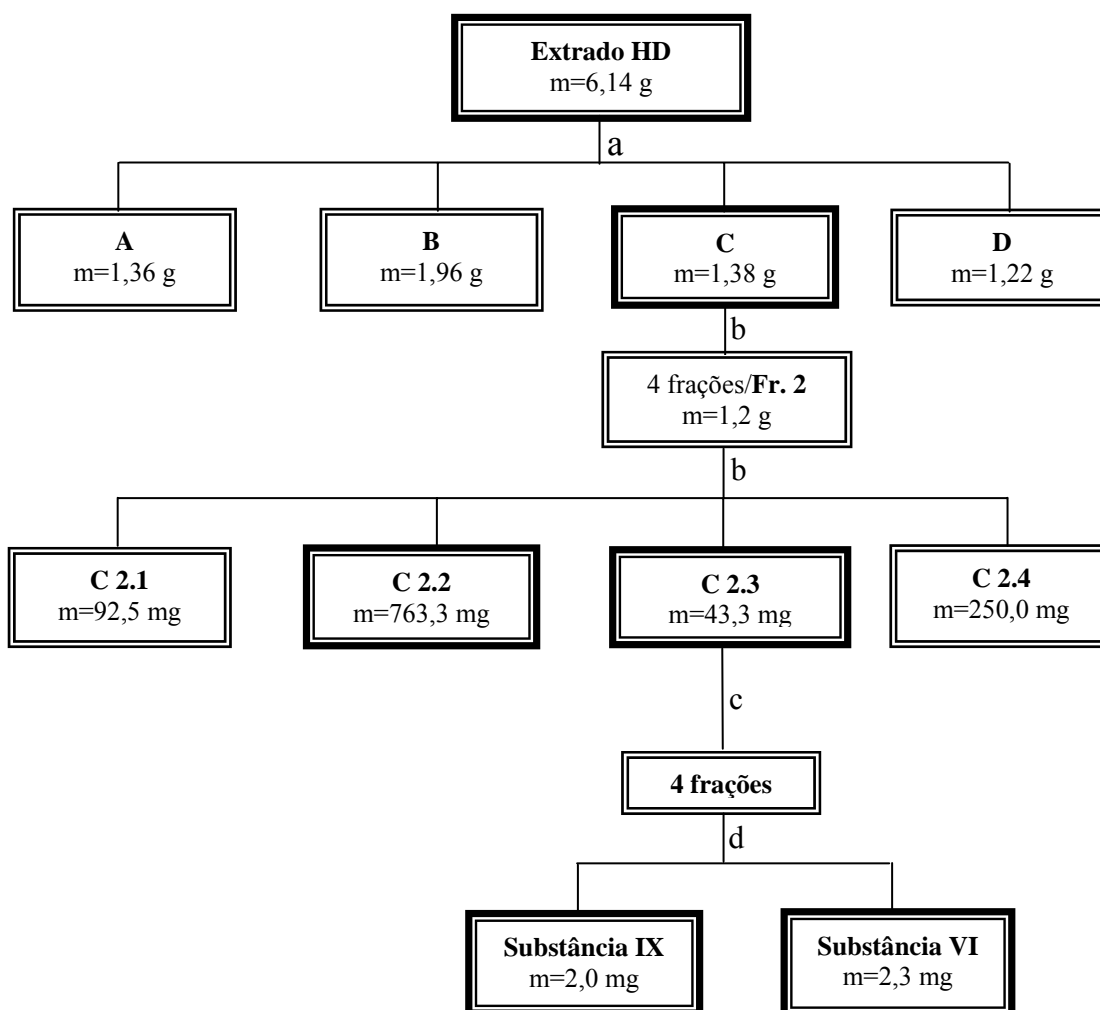
1.5.1 - Fracionamentos do extrato Hexano-Diclorometânico (HD)

Após obter-se os dois extratos, hexânico e diclorometânico, fez-se análise por CCDA como dito anteriormente e observou-se similaridades em ambos, os quais foram reunidos e trabalhados como um único extrato obtendo-se assim, uma massa total de 6,14g.

O extrato HD do porta-enxerto foi submetido inicialmente a cromatografia em coluna (CC) (ϕ x h = 3 cm x 140cm) usando como fase estacionária Sephadex LH-20 e como fase móvel diclorometano/metanol (1:1), visando minimizar futuras perdas de compostos mais polares que ficariam retidos quando submetidos a fracionamento sobre sílica em funil de placa sinterizada. Foram coletadas 50 frações de 25 mL, que foram reunidas após análise em CCDA, segundo a sua similaridade em R_f, em 4 frações denominadas frações A, B, C e D (**ESQUEMA 1.2**, p. 26).

Por conter sinais referentes a hidrogênios das classes de compostos dos alcalóides e flavonóides no espectro de RMN de ¹H, e ainda, por conter uma boa separação de manchas em CCDA, selecionou-se a fração C que foi submetida a uma CC ($\phi=3$ cm e h=35 cm) com Sephadex LH-20 como fase estacionária e como fase móvel diclorometano/metanol (1:1). Foram coletadas 42 subfrações de 25 mL cada, que foram reunidas após CCDA em 4 subfrações. Em seguida, a subfração C 2 (m=1,2 g) foi fracionada em CC ($\phi=3$ cm h= 35cm) com Sephadex LH-20 e com fase móvel diclorometano/metanol (1:1), sendo coletadas 40 subfrações de 15mL cada, que foram reunidas após CCDA originando 4 subfrações (**ESQUEMA 1.2**, p. 26).

Dessas, foi selecionada a subfração **C 2.3** (m=43,3 mg) por conter no espectro de RMN de ^1H sinais referentes a hidrogênios de alcalóides e flavonóides, e foi submetida a CC ($\phi=2$ cm e $h=45$ cm) com Sílica (230-400 mesh) como fase estacionária e com um sistema de eluição gradiente em ordem crescente de polaridade em Hexano:AcOEt (99:1/90:10/70:30/50:50) e AcOEt (100%). Foram coletadas 43 subfrações de 15mL cada, que foram reunidas após CCDA originando 4 subfrações, onde a subfração **C 2.3.1**, por conter apenas 2,3 mg de amostra foi purificada em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com uma coluna semi-preparativa (C18) ($\phi=4,6$ mm e $h=25$ cm) com fase móvel de MeOH/H₂O (3:1) em um fluxo de 1mL/min, usando um detector de ultravioleta com comprimento de onda de 280nm. Foram feitas 30 injeções de 10 μ L para uma menor perda em massa do composto, que foi analisada por RMN e identificado como sendo um alcalóide do tipo acridônico (Substância I). E ainda, a subfração **C 2.3.2** (m=2,0 mg) após análise por RMN foi identificada como sendo uma substância da classe dos flavonóides, uma flavona (Substância VI) (**ESQUEMA 1.2**, p. 26).



a= CC em Sephadex LH-20, $\phi=3$ cm e $h=140$ cm, eluição: DCM/MeOH (1:1).

b= CC em Sephadex LH-20, $\phi=3$ cm e $h=35$ cm, eluição: DCM/MeOH (1:1).

c= CC em Sílica (230-400 mesh), $\phi=2$ cm e $h=45$ cm, eluição: Hexano:AcOEt (99:1/90:10/70:30/50:50) e AcOEt (100%).

d= CLAE (coluna semi-preparativa C18), $\phi=4,6$ mm e $h=25$ cm, fase móvel : MeOH/H₂O (3:1).

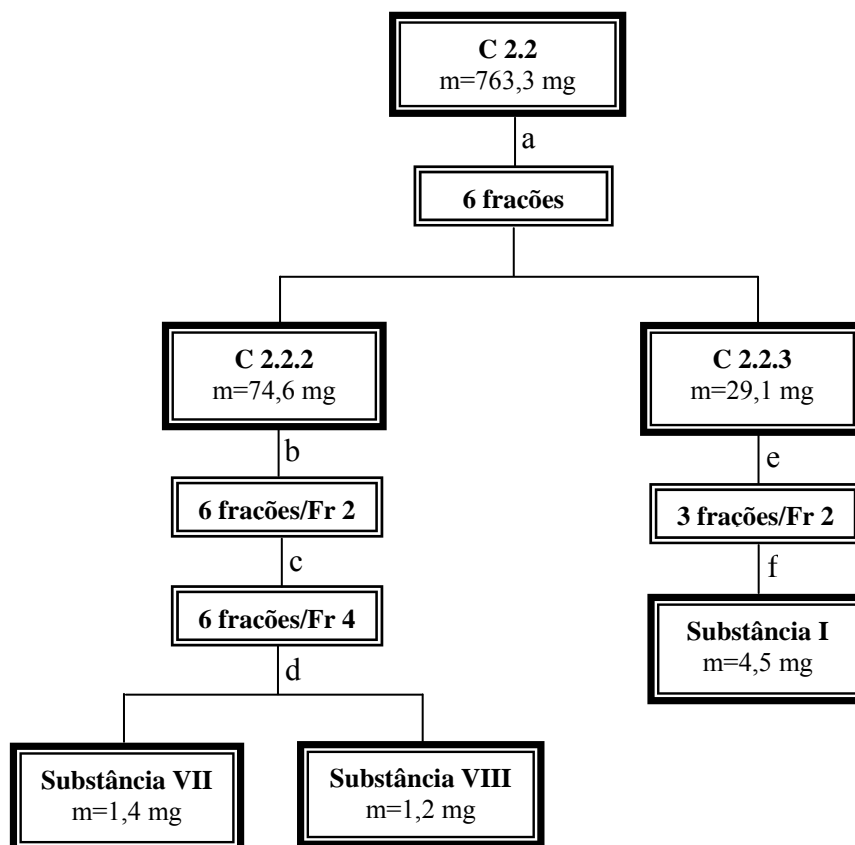
ESQUEMA 1.2: Fracionamento do extrato Hexano-Diclorometânico com obtenção das substâncias IX e VI.

Prosseguindo com o fracionamento cromatográfico do extrato hexano-diclorometânico, a subfração **C 2.2** ($m=763,3$ mg) selecionada por conter, após análise por meio de RMN de ¹H, sinais referentes a hidrogênios característicos de flavonóides, alcalóides e cumarinas. Desta forma, a subfração **C 2.2** foi primeiramente submetida a uma CC ($\phi=2$ cm e $h=23$ cm) com Sílica gel (230-400 mesh) como fase estacionária e com um sistema de

eluição gradiente em ordem crescente de polaridade em Hexano (100%), Hexano:AcOEt (90:10/80:20/70:30/60:40/50:50) e AcOEt (100%). Foram coletadas 27 subfrações e reunidas de acordo com suas semelhanças de Rf após avaliação em CCDA e RMN de ^1H , originando 6 subfrações. Dentre essas, foi selecionada a subfração **C 2.2.2** por apresentar uma boa separação em CCDA e por mostrar em RMN de ^1H sinais de hidrogênios característicos de flavonóides. Assim, a subfração **C 2.2.2** (m=74,6 mg) foi submetida a uma CC ($\phi=1,5$ cm e h=33 cm) com Sílica gel (230-400 mesh) como fase estacionária e com um sistema de eluição gradiente em ordem crescente de polaridade em Hexano:AcOEt (90:10/70:30/50:50) e AcOEt (100%). Foram coletadas 22 subfrações e reunidas de acordo com suas semelhanças de Rf em CCDA, originando 6 subfrações. Dentre essas, por CCDA, foi selecionada a subfração C 2.2.2.2 (m=60,8 mg) onde foi submetida a uma CC ($\phi=2$ cm e h=55 cm) em Sephadex LH-20 como fase estacionária e como fase móvel diclorometano/metanol (1:1), obtendo-se 6 subfrações. Em seguida a subfração C 2.2.2.2.4 foi submetida a uma CCDP usando como fase móvel Hexano/AcOEt (60:40), obtendo-se 5 subfrações. As subfrações C 2.2.2.2.4B (Substância VII) e C 2.2.2.2.4C (Substância VIII) foram analisadas por RMN e identificadas como duas favononas. O fracionamento da subfração C 2.2.2 até a obtenção das substâncias VII e VIII é mostrado no **ESQUEMA 1.3** na página 28.

Continuando com o fracionamento cromatográfico da subfração **C 2.2**, foi selecionado desta vez a subfração **C 2.2.3** (m=29,1 mg) por apresentar no espectro de RMN de ^1H sinais característicos de substâncias da classe das cumarinas. Desta forma, a subfração **C 2.2.3** foi submetida a uma CC ($\phi=1$ cm e h=25 cm) com Sílica gel (230-40 mesh) como fase estacionária e com um sistema de eluição isocrático usando como fase móvel Hexano/AcOEt (80:20), obtendo-se 3 subfrações, onde a subfração C 2.2.3.2 foi submetida a uma CCDP utilizando como fase móvel Hexano/AcOEt

(70:30), obtendo-se três subfrações, onde a subfração C 2.2.3.2.2 (Substância I) após análise por espectrometria de RMN foi identificada como sendo uma substância da classe das cumarinas (**ESQUEMA 1.3**, p. 28).



a= CC em Sílica (230-400 mesh), $\phi=2$ cm e $h=23$ cm, eluição: Hexano (100%), Hexano:AcOEt (90:10/80:20/70:30/60:40/50:50) e AcOEt (100%).

b= CC em Sílica (230-400 mesh), $\phi=1,5$ cm e $h=33$ cm, eluição: Hexano:AcOEt (90:10/70:30/50:50) e AcOEt (100%).

c= CC em Sephadex LH-20, $\phi=2$ cm e $h=55$ cm, eluição: DCM/MeOH (1:1).

d= CCDP, eluição: Hexano/AcOEt (60:40).

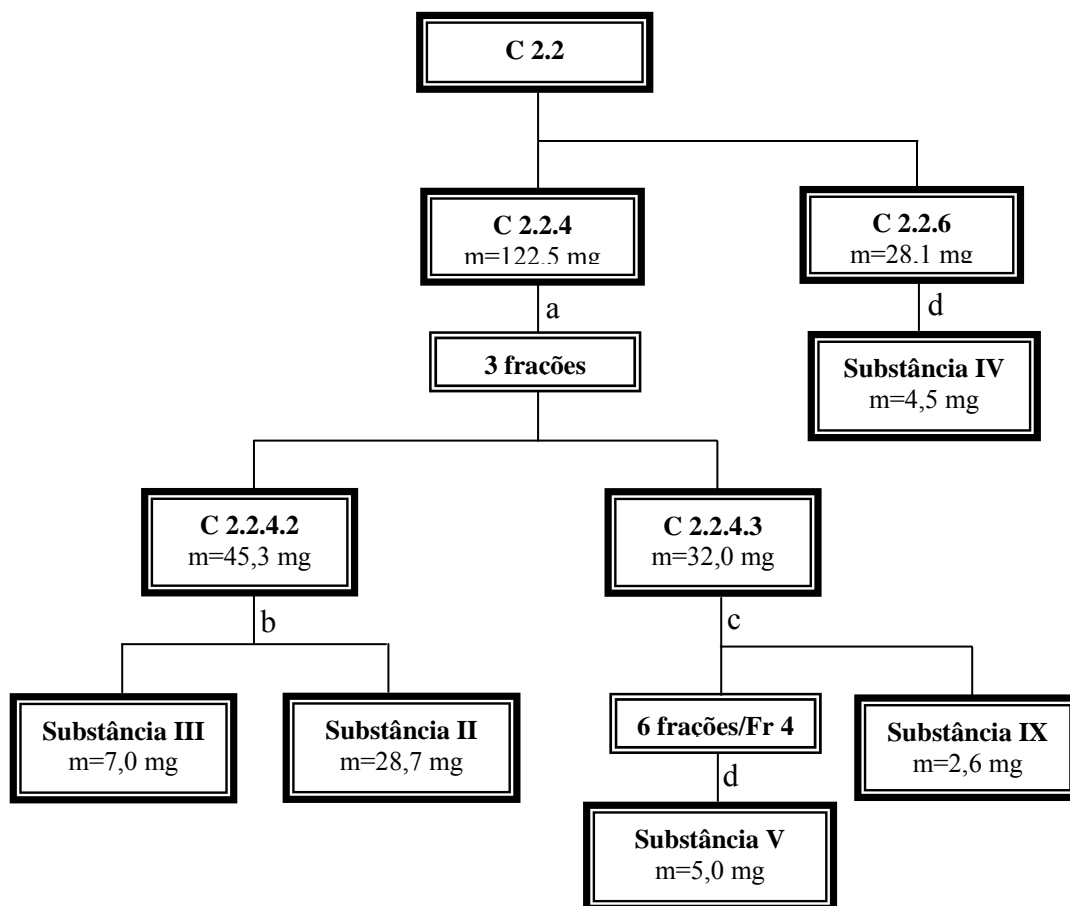
e= CC em Sílica (230-400 mesh), $\phi=1,0$ cm e $h=25$ cm, eluição: Hexano:AcOEt (60:40).

f= CCDP, eluição: Hexano/AcOEt (70:30).

ESQUEMA 1.3: Fracionamento da subfração C 2.2 com obtenção das Substâncias I, VII e VIII.

Após o fracionamento das subfrações C 2.2.2 e C 2.2.3, prosseguiu-se agora com a análise da subfração C 2.2.4 que apresentou no

espectro de RMN de ^1H sinais característicos de substâncias das classes das cumarinas e alcalóides. Assim, a subfração **C 2.2.4** (m=122,5 mg) foi submetida a uma CC ($\phi=2$ cm e h=18 cm) com Sílica gel (230-400 mesh) como fase estacionária e com um sistema de eluição gradiente em ordem crescente de polaridade em Hexano (100%), Hexano:AcOEt (90:10/80:20/70:30/60:40/50:50) e AcOEt (100%). Foram coletadas 25 subfrações e reunidas de acordo com suas semelhanças de Rf após avaliação em CCDA e RMN de ^1H , originando 3 subfrações, onde a subfração **C 2.2.4.2** (m=45,3 mg) foi submetida a uma CCDP utilizando como fase móvel Hexano/AcOEt (70:30), obtendo-se as substâncias III e II. A subfração **C 2.2.4.3** (m=32,0 mg) foi submetida a uma CC ($\phi=2$ cm e h=55 cm) com Sephadex LH-20 como fase estacionária e como fase móvel DCM/MeOH (1:1), originando 19 subfrações que foram reunidas em 6 outras subfrações de acordo com seus Rfs em CCDA. Na subfração C 2.2.4.3.5 houve formação de dois grupos de cristais que foram separados com o auxílio de uma espátula e posteriormente analisado por RMN e identificado como um alcalóide do tipo acridônico (Substância IX). A subfração C 2.2.4.3.4 (m=11 mg) foi submetida a uma CCDP em diclorometano (100%) como fase móvel, obtendo-se 5 subfrações, sendo que a subfração C 2.2.4.3.4.3 (Substância V) foi analisada por RMN e identificada como uma cumarina. A subfração C 2.2.6 (28,1 mg) foi purificada por meio de CCDP em diclorometano (100%) como fase móvel, sendo analisada por RMN e identificada como uma cumarina (Substância IV) (**ESQUEMA 1.4**, p. 30).



a= CC em Sílica (230-400 mesh), $\phi=2$ cm e h=18 cm, eluição: Hexano (100%), Hexano:AcOEt (90:10/80:20/70:30/60:40/50:50) e AcOEt (100%).

b= CCDP, eluição: Hexano/AcOEt (70:30).

c= CC em Sephadex LH-20, $\phi=2$ cm e h=55 cm, eluição: DCM/MeOH (1:1).

d= CCDP, eluição: DCM (100%).

ESQUEMA 1.4: Fracionamento das subfrações C 2.2.4 e C 2.2.6 com obtenção das Substâncias II, III, IV, V e IX.

1.6 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

A partir do estudo fitoquímico do caule de *Citrus limonia* enxertado com *C. sinensis* foram isolados nove metabólitos secundários, sendo eles pertencentes às seguintes classes de metabólitos: flavonóides, cumarinas e alcalóides. Esses metabólitos foram identificados por meio de técnicas espectroscópicas de RMN 1D e 2D e espectrometria de massas. As determinações estruturais dessas substâncias serão apresentadas em seguida, reunidas por classes para um melhor entendimento.

1.6.1 – Cumarinas

1.6.1.1 – Identificação da Substância I (Suberosina)

A Substância I (**FIGURA 1.3**, p. 31) apresentou-se como um cristal branco e é denominada como Suberosina (NAYAR e BHAN, 1972; GONZALEZ et al., 1977; GRAY e WATEMAN, 1978; BURKE e PARKINS, 1979 e WU et al., 1983) e é comumente isolada no gênero *Citrus*.

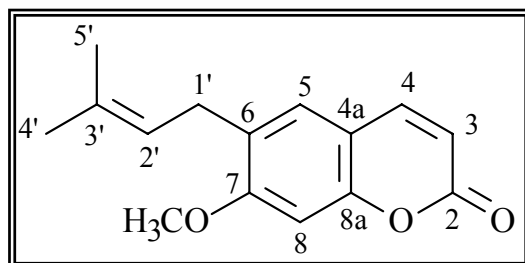


FIGURA 1.3: Estrutura química da cumarina Suberosina (Substância I).

O espectro de RMN de ^1H (**FIGURA 1.7**, p. 37) da Substância I apresenta sinais característicos referentes à classe estrutural das cumarinas, ou

seja, a presença de dois dubletos em δ 6,23 e δ 7,62 na região espectral de desblindagem, com $J = 9,4$ Hz, referentes aos hidrogênios H-3 e H-4, respectivamente, do anel lactônico de uma cumarina. Pode-se observar o acoplamento entre esses dois sinais por meio do experimento de COSY (**FIGURA 1.8** p. 38). No experimento de HSQC (**FIGURA 1.9**, p. 39) pode-se ver o dubleto referente ao H-3 em δ 6,23 correlacionar-se com um carbono em δ 113,0 e o outro dubleto referente ao H-4 em δ 7,62 com o carbono em δ 145,0. Por meio do experimento de HMBC (**FIGURA 1.10**, p. 40) observou-se a correlação dos dois dubletos em δ 6,23 e δ 7,62 com um carbono carbonílico em δ 162,0 permitindo confirmar a presença de um anel lactônico. Pode-se ver ainda no experimento de HMBC, que o dubleto em δ 6,23 correlaciona-se com um sinal referente a um carbono em δ 113,0 o que permite atribuí-lo ao C-4a, e o outro dubleto em δ 7,62 correlaciona-se com o sinal em δ 155,0 que foi atribuído ao C-8a (**FIGURA 1.4**, p. 32). Todos os valores de hidrogênio e carbono, obtidos pelos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C são mostrados nas **TABELAS 1.1** e **1.2**, na página 36.

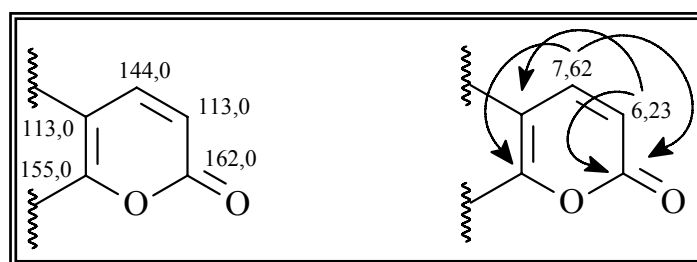


FIGURA 1.4: Correlações observadas no experimento de HMBC da Substância I.

Esse mesmo dubleto em δ 7,62 correlaciona-se com o sinal em δ 127,0 que por sua vez no experimento de HSQC correlaciona-se com o sinal referente a um hidrogênio em δ 7,18 permitindo dizer que este sinal refere-se ao H-5. No espectro de RMN de ^1H pode ser observado um outro sinal (um

singleto) referente a hidrogênio aromático em δ 6,78 que foi atribuído ao H-8, o qual no experimento de HSQC correlaciona-se com o sinal referente a um carbono em δ 99,0. Esses dois sinais sendo singletos indicam ser os hidrogênios aromáticos das posições 5 e 8 da estrutura de uma cumarina e ainda que a estrutura possui substituições nas posições 6 e 7. O sinal em δ 6,78 por meio do experimento de HMBC possui correlações com os sinais em δ 113,0 (C-4a), 128,0 (C-6) e 155,0 (C-8a), confirmando-o ao H-8. Pode ser observado também no experimento de HMBC que o sinal em δ 7,18 correlaciona-se com os sinais em δ 145,0 (C-2) e 155,0 (C-8a), confirmando-o para H-5 (**FIGURA 1.5**, p. 35).

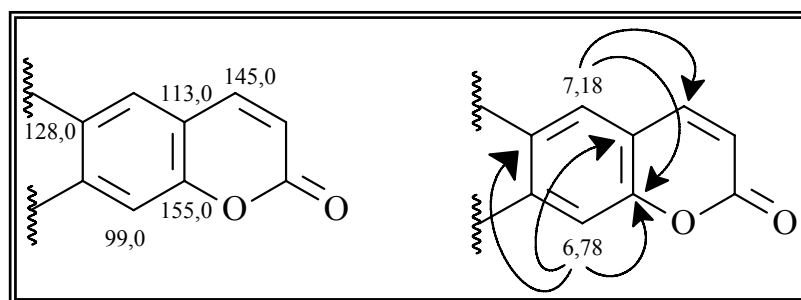


FIGURA 1.5: Correlações complementares observadas no experimento de HMBC da Substância I.

O espectro de RMN de ^1H apresenta ainda, um singleto em δ 3,90 integrando para três hidrogênios, característico de hidrogênios de metila ligada a heteroátomo, e por meio do experimento de HSQC pode ser observado sua correlação com o sinal em δ 57,0 indicando assim a presença de uma metoxila na estrutura da cumarina. O sinal da metoxila correlaciona-se via HMBC com o carbono em δ 161,0 atribuído ao C-7. Isso confirma a posição da metoxila em 7, de acordo com a rota biossintética desta classe que indica a presença de um átomo de oxigênio na posição 7.

O espectro de RMN de ^1H mostrou ainda sinais característicos de uma unidade isoprênica, substituinte comum em estruturas de cumarinas

isoladas do gênero *Citrus*. No espectro pode-se observar um dubleto em δ 3,31 integrando para dois hidrogênios, que pelo experimento de COSY correlaciona-se com um tripleto em δ 5,28, este por sua vez integra para um único hidrogênio e pelo seu deslocamento sugere ser um hidrogênio olefínico. No experimento de HSQC os sinais em δ 3,31 e 5,28 correlacionam-se com os sinais em δ 28,0 e 122,0, respectivamente. Por meio do experimento de HMBC, pode ser visto as correlações do sinal em δ 3,31 com os sinais em δ 122,0 e 134,0. Desta forma, o sinal em δ 3,31 foi atribuído ao hidrogênio H-1' que se correlacionou com δ 122,0 o qual é o carbono em que o hidrogênio em δ 5,28 está ligado. Assim o sinal em δ 5,28 foi atribuído ao hidrogênio H-2'. O sinal referente ao H-1' correlacionou-se ainda com δ 134,0 que pelo experimento de HSQC não possui hidrogênio ligado, sugerindo ser um carbono olefínico trissubstituído, C-3'. Pode ser verificado ainda pelo espectro de RMN de ^1H que há dois singletos em δ 1,77 e 1,70 integrando para três hidrogênios cada um dos sinais. Esses dois sinais correlacionam-se com aqueles em δ 26,0 e 18,0, respectivamente, como pode ser visto no experimento de HSQC. No experimento de HMBC pode-se ver que os sinais em δ 1,77 e 1,70 correlacionam-se com os sinais em δ 122,0 (C-2') e 134,0 (C-3') confirmando serem as metilas 4' e 5'. O posicionamento da unidade isoprênica foi confirmada, com base no experimento de HMBC, na posição 6, pela correlação do H-1' (δ 3,31) com o sinal referente ao carbono C-5 em δ 127,0 e C-7 em δ 161,0. As correlações observadas para a unidade isoprênica e a confirmação de seu posicionamento podem ser observadas na **FIGURA 1.6**, na página 35.

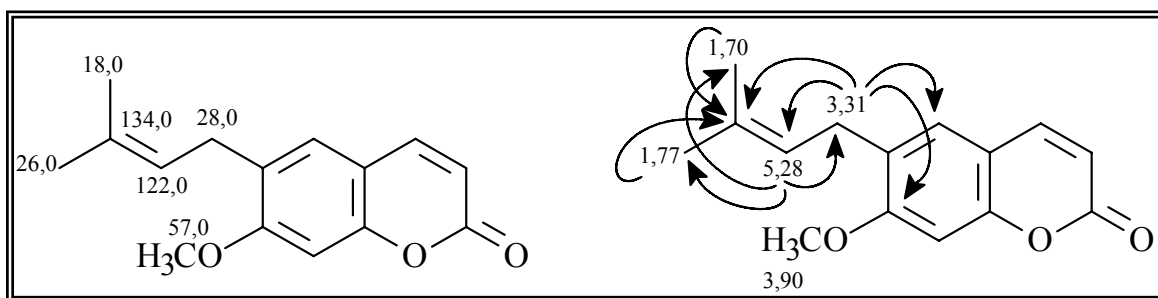


FIGURA 1.6: Correlações observadas no experimento de HMBC para a unidade isoprênica da Substância I.

A estrutura da Substância I foi confirmada pelo espectro de massas (**FIGURA 1.11**, p. 41) obtido por LC-MS e apresentou o pico do *íon quasi molecular* $[M+H]^+$ com relação massa/carga de m/z 245, e o pico referente ao íon $[M+Na]^+$ com m/z 267, estando de acordo com a estrutura proposta. Assim, baseados nos dados mencionados e em comparação os dados de RMN já mencionados na literatura, confirmou-se a estrutura da Substância I como sendo a cumarina **SUBEROSINA**.

TABELA 1.1: Dados de RMN de ^1H da Substância I (Suberosina) em comparação com dados da literatura.

Hidrogênio	Suberosina isolada	Suberosina (literatura)
3	6,23 <i>d</i> (9,6) (1H)	6,24 <i>d</i> (9,5) (1H)
4	7,62 <i>d</i> (9,6) (1H)	7,62 <i>d</i> (9,5) (1H)
5	7,18 <i>s</i> (1H)	7,19 <i>s</i> (1H)
8	6,78 <i>s</i> (1H)	6,80 <i>s</i> (1H)
1'	3,31 <i>d</i> (7,2) (2H)	3,30 <i>d</i> (8,0) (2H)
2'	5,28 <i>t</i> (7,2) (1H)	5,30 <i>d</i> (8,0) (1H)
4'	1,77 <i>s</i> (6H)	1,80 <i>s</i> (3H)
5'	1,70 <i>s</i> (6H)	1,70 <i>s</i> (3H)
7-OCH ₃	3,90 <i>s</i> (3H)	4,00 <i>s</i> (3H)

OBS: Dados de RMN de ^1H (δ , mult., *J*(Hz)) (integração) (CDCl₃, 400 MHz).

TABELA 1.2: Dados de RMN de ^{13}C da Substância I (Suberosina).

Carbono	Suberosina isolada
2	162,0
3	113,0
4	145,0
4a	113,0
5	127,0
6	128,0
7	161,0
8	99,0
8a	155,0
1'	28,0
2'	122,0
3'	134,0
4'	26,0
5'	18,0
7-OCH ₃	57,0

OBS: Dados de RMN de ^{13}C (δ) foram obtidos por meio das projeções do HSQC e HMBC.

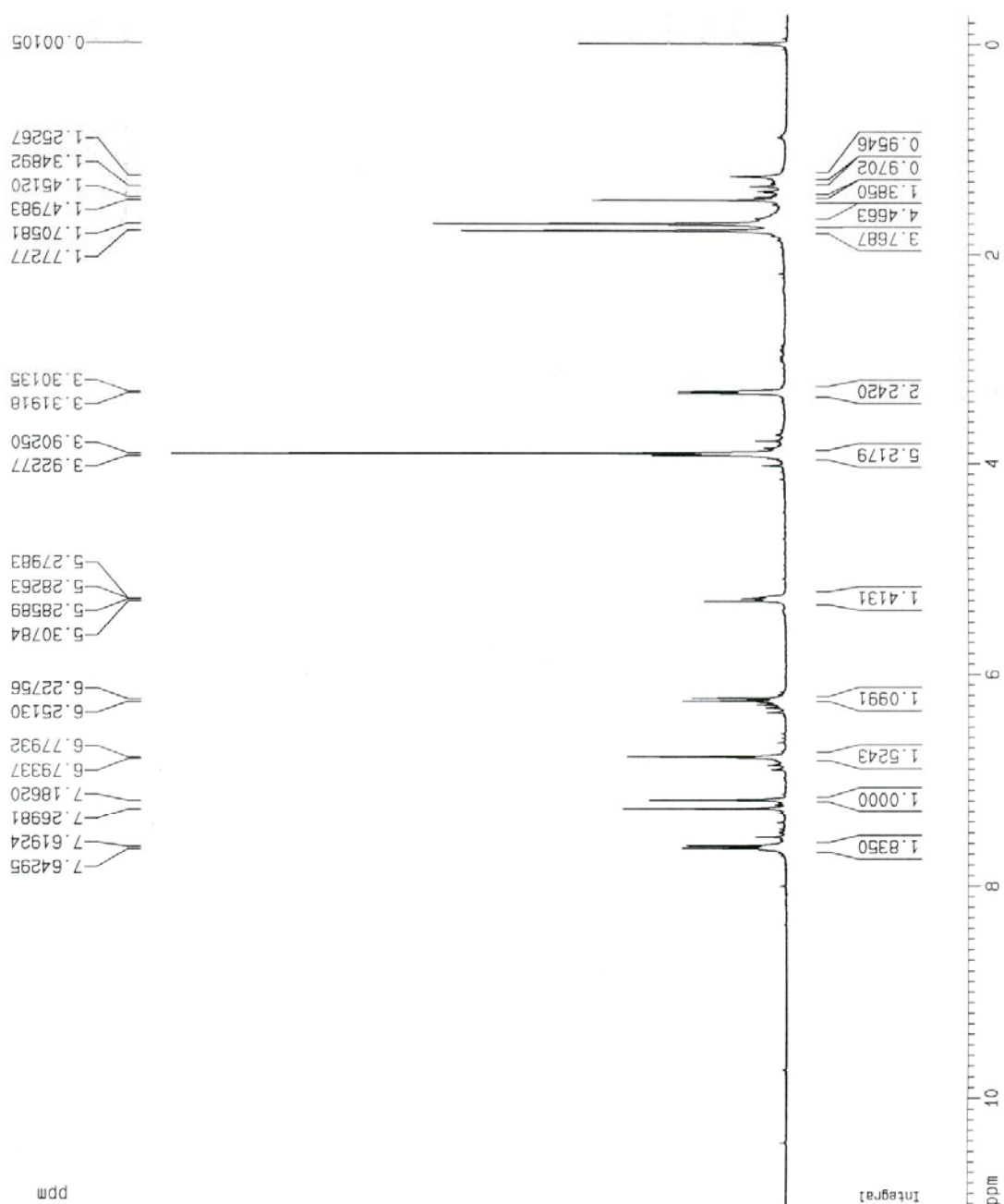


FIGURA 1.7: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da Substância I (Suberosina).

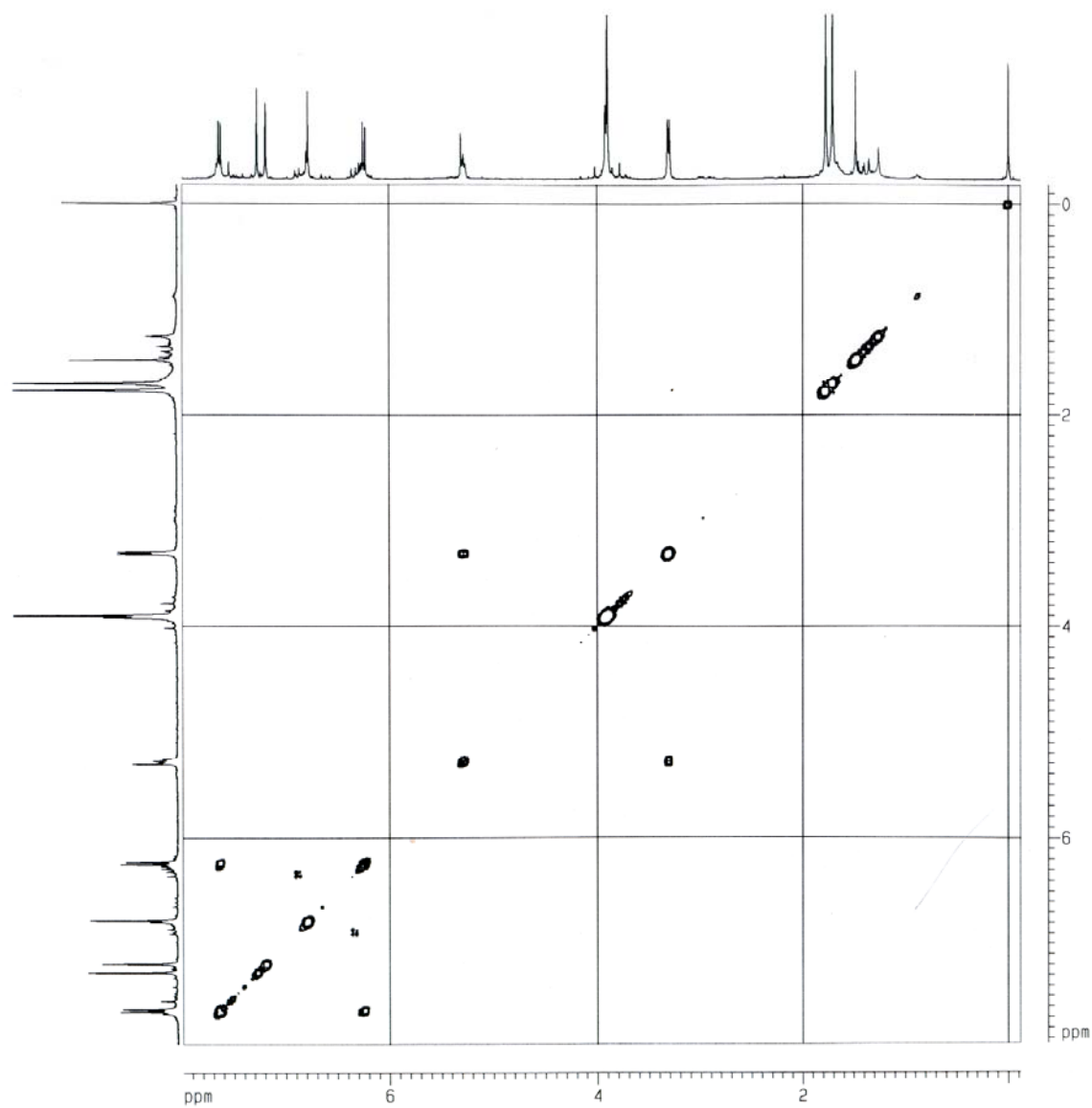


FIGURA 1.8: Experimento de COSY (400 MHz, CDCl₃) da Substância I (Suberosina).

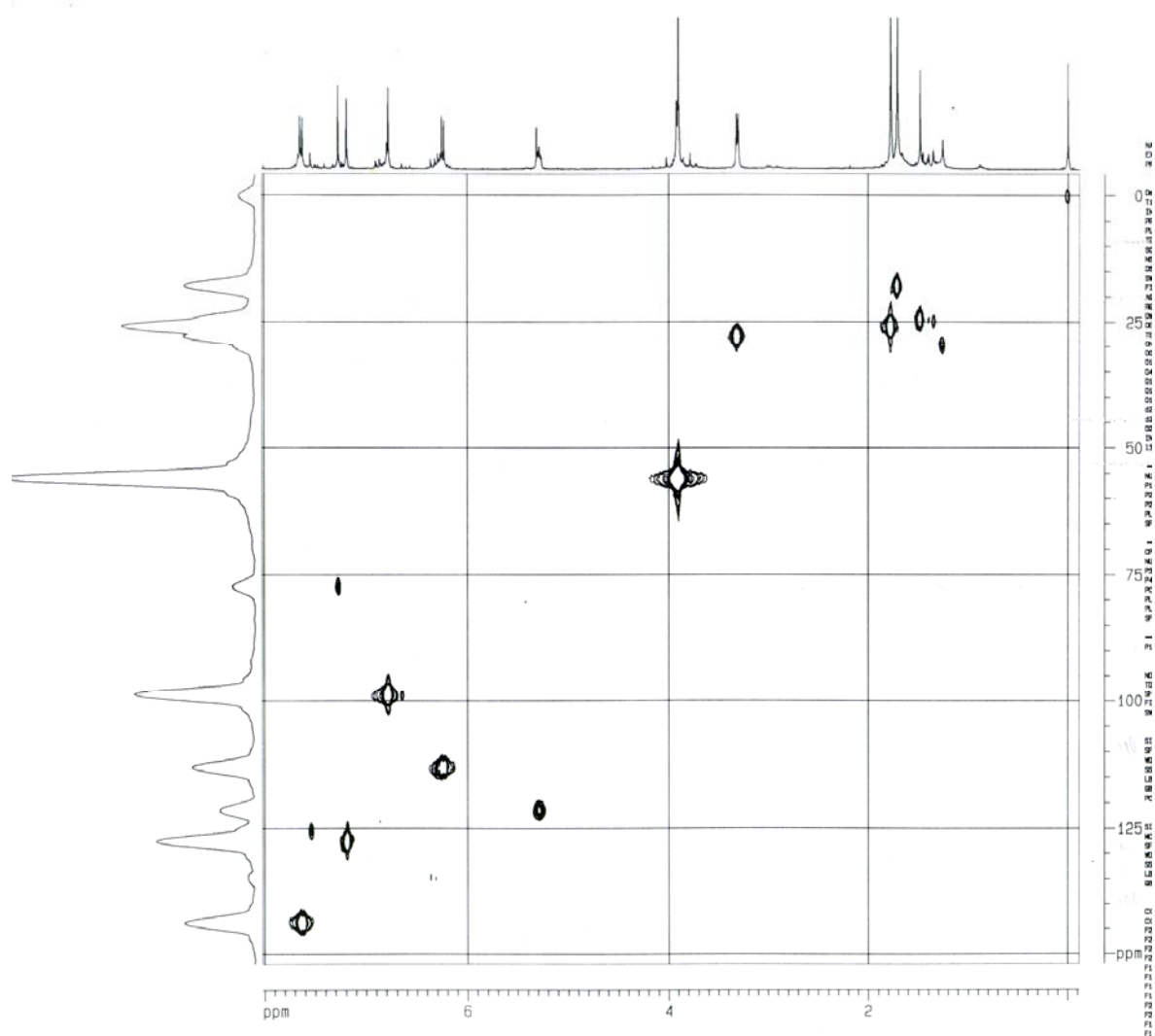


FIGURA 1.9: Experimento de HSQC (400 MHz, CDCl_3) da Substância I (Suberosina).

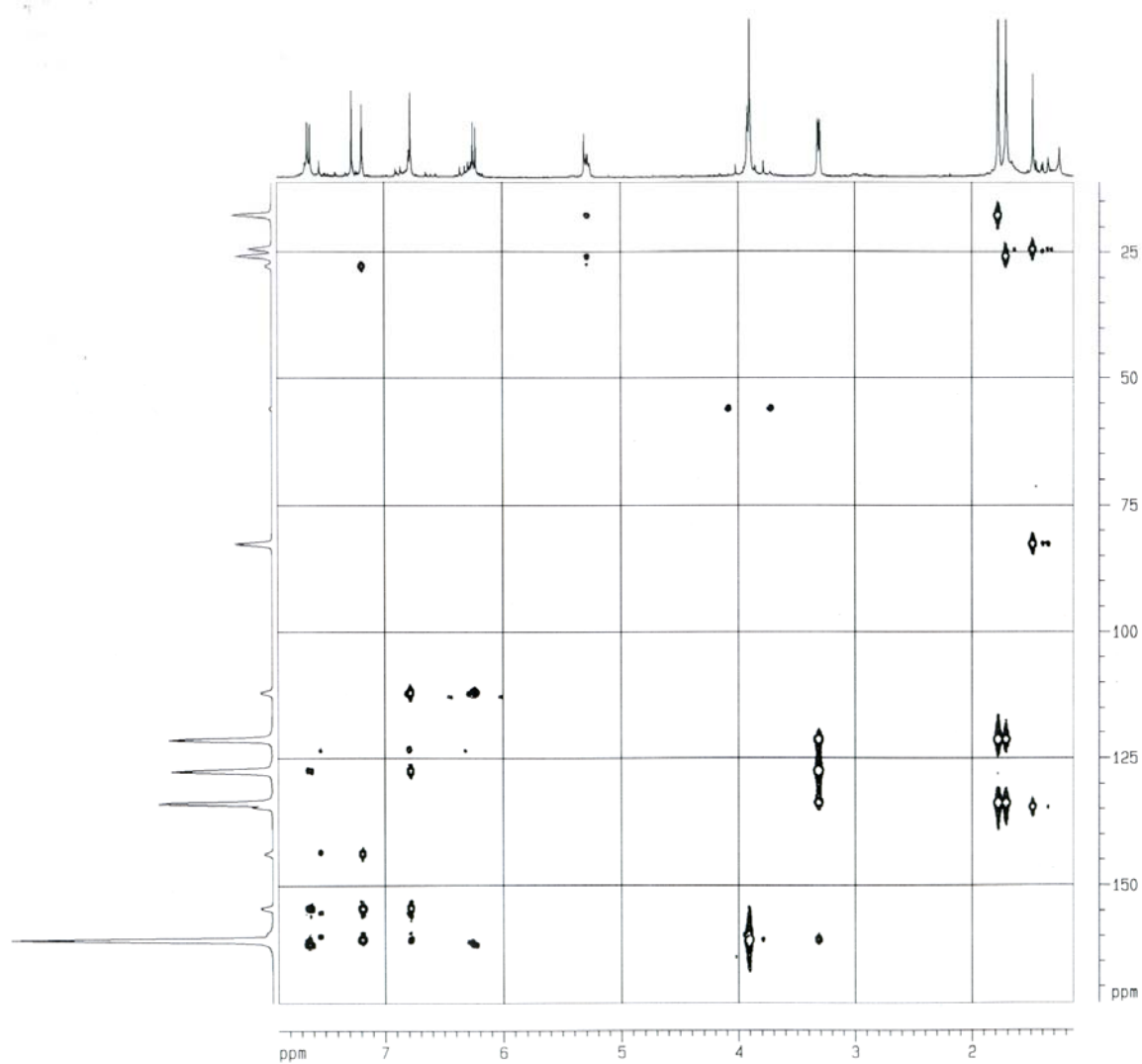


FIGURA 1.10: Experimento de HMBC (400 MHz, CDCl_3) da Substância I (Suberosina).

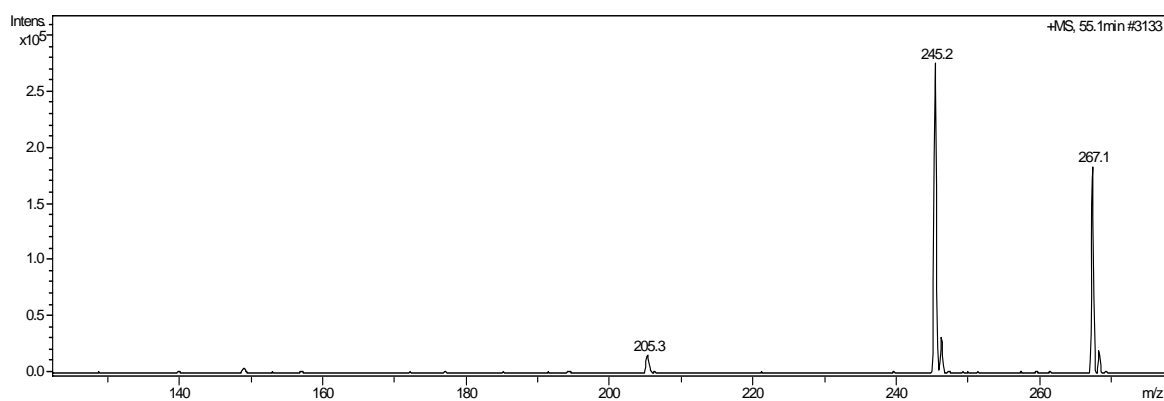


FIGURA 1.11: Espectro de massas da Suberósina (Substância I).

1.6.1.2 – Identificação da Substância II (Xantiletina)

A Substância II (**FIGURA 1.12**, p. 41) apresentou-se como um cristal branco e é denominada como Xantiletina (GOREN et al., 1970; TATUM et al., 1977; WATERMAN, 1983 e WU et al., 1983a), comumente isolada em *Citrus*.

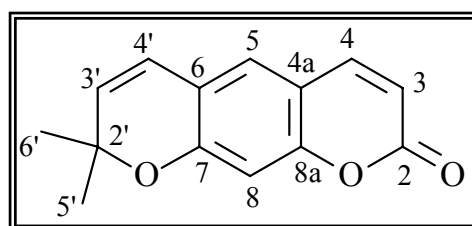


FIGURA 1.12: Estrutura química da cumarina Xantiletina (Substância II).

O espectro de RMN de ^1H (**FIGURA 1.13**, p. 44) da Substância III apresenta sinais padrões que caracteriza a classe estrutural das cumarinas, ou seja, a presença de dois dubletos em δ 6,19 e 7,56 ($J= 9,4$ Hz), referentes aos hidrogênios H-3 e H-4, respectivamente, de um anel lactônico. Observa-se ainda os dois singletos em δ 7,02 e 6,69 (H-5 e H-8) caracterizando um

anel aromático substituído nas posições 6 e 7 semelhante aos dados descritos com mais detalhes no item 1.6.1.1, ou seja, caracterizando-se um esqueleto básico de uma cumarina 6, 7 dissubstituída.

No espectro de RMN de ^1H observa-se a presença de dois dubletos em δ 6,31 e 5,66 com $J= 10,0$ Hz e um singlete em δ 1,44 integrando para seis hidrogênios, caracterizando-se a presença de um anel pirano na estrutura. Dentre estes, o dubleto mais desblindado, em δ 6,31 foi atribuído ao hidrogênio H-4', e o outro em δ 5,66 foi atribuído ao H-3', e o singlete em δ 1,44 aos hidrogênios de duas metilas.

O posicionamento do anel pirano nas posições 6 e 7 é justificado pela presença de dois singletos em δ 6,69 e 7,02, referentes aos hidrogênios nas posições 8 e 5 que não acoplam entre si, e conseqüentemente, indicam a linearidade da molécula. O deslocamento químico em δ 7,02 foi atribuído ao H-8 por ele ser mais desblindado estando vizinho a dois carbonos oxigenados.

Os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C (espectro de RMN de ^{13}C **FIGURA 1.14**, p. 45) da Substância II são mostrados nas **TABELAS 1.3 e 1.4**, na página 43, e comparados com os dados da literatura.

A estrutura da Substância II foi confirmada pelo espectro de massas (**FIGURA 1.15**, p. 46) obtido por LC-MS que apresentou o pico do *íon quasi molecular* $[\text{M}+\text{H}]^+$ com relação massa/carga de m/z 229 e o pico referente ao íon $[\text{M}+\text{Na}]^+$ com m/z 250. Assim, baseados nos dados mencionados e em comparação os dados de RMN já mencionados na literatura, confirmou-se a estrutura da Substância II como sendo a cumarina **XANTILETINA**.

TABELA 1.3: Dados de RMN de ^1H da Substância II (Xantiletina) em comparação com dados da literatura.

Hidrogênio	Xantiletina isolada	Xantiletina (literatura)
3	6,19 <i>d</i> (9,6) (1 H)	6,22 <i>d</i> (9,2) (1 H)
4	7,56 <i>d</i> (9,6) (1 H)	7,59 <i>d</i> (9,2) (1 H)
5	7,02 <i>s</i> (1 H)	7,05 <i>s</i> (1 H)
8	6,69 <i>s</i> (1 H)	6,72 <i>s</i> (1 H)
3'	5,66 <i>d</i> (10) (1 H)	5,69 <i>d</i> (9,6) (1 H)
4'	6,31 <i>d</i> (10)(1 H)	6,34 <i>d</i> (9,6)(1 H)
5'	1,44 <i>s</i> (3 H)	1,47 <i>s</i> (3 H)
6'	1,44 <i>s</i> (3 H)	1,46 <i>s</i> (3 H)

OBS: Dados de RMN de ^1H (δ , mult., $J(\text{Hz})$) (integração) (CDCl_3 , 200 MHz).

TABELA 1.4: Dados de RMN de ^{13}C da Substância II (Xantiletina).

Carbono	Xantiletina isolada
2	161,0
3	131,1
4	143,3
4a	112,9
5	124,7
6	118,4
7	156,7
8	120,7
8a	155,3
2'	77,0-77,6
3'	104,3
4'	112,6
5'	28,3
6'	28,3

OBS: Dados de RMN de ^{13}C (δ) (CDCl_3 , 50 MHz).

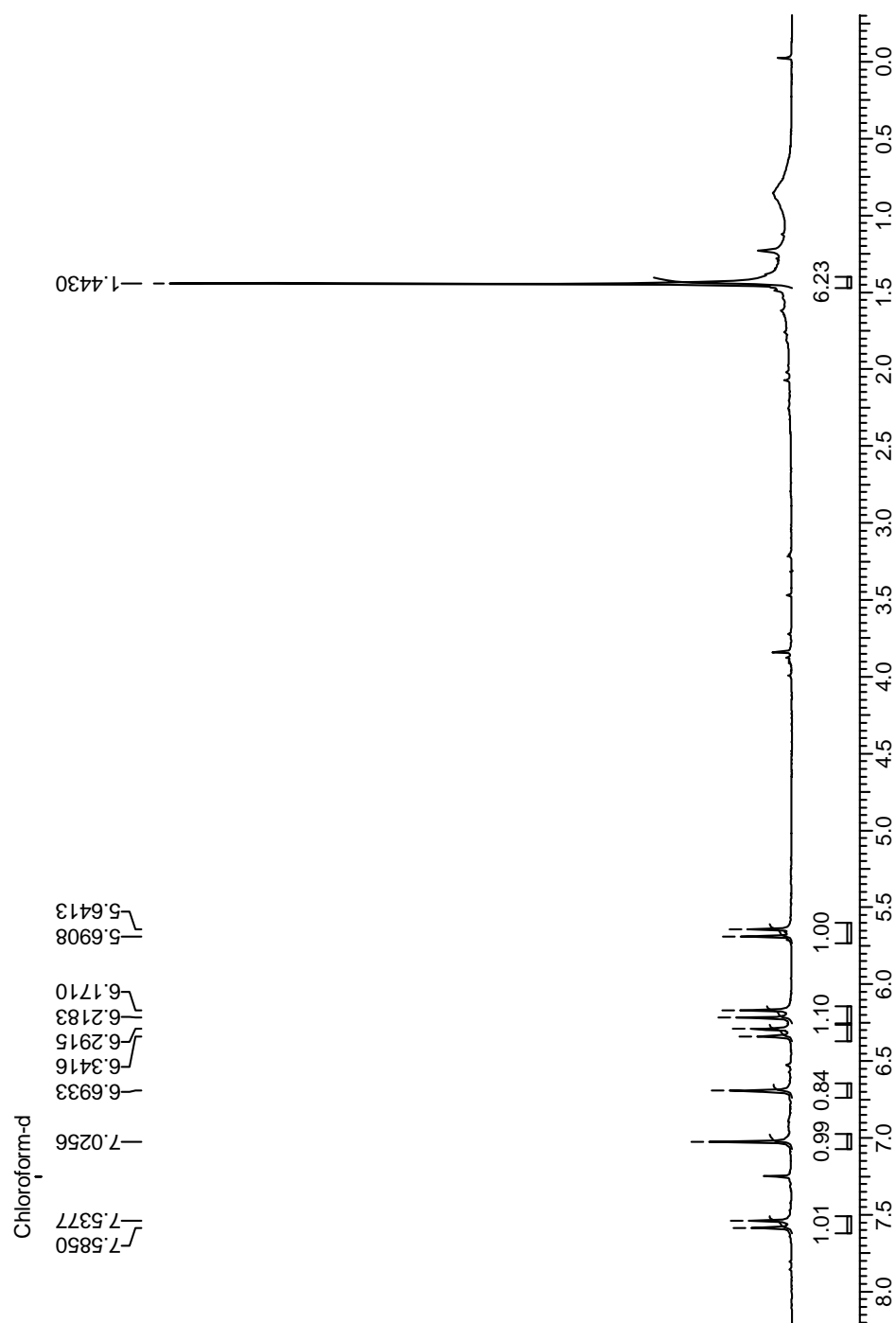


FIGURA 1.13: Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) da Substância II (Xantiletina).

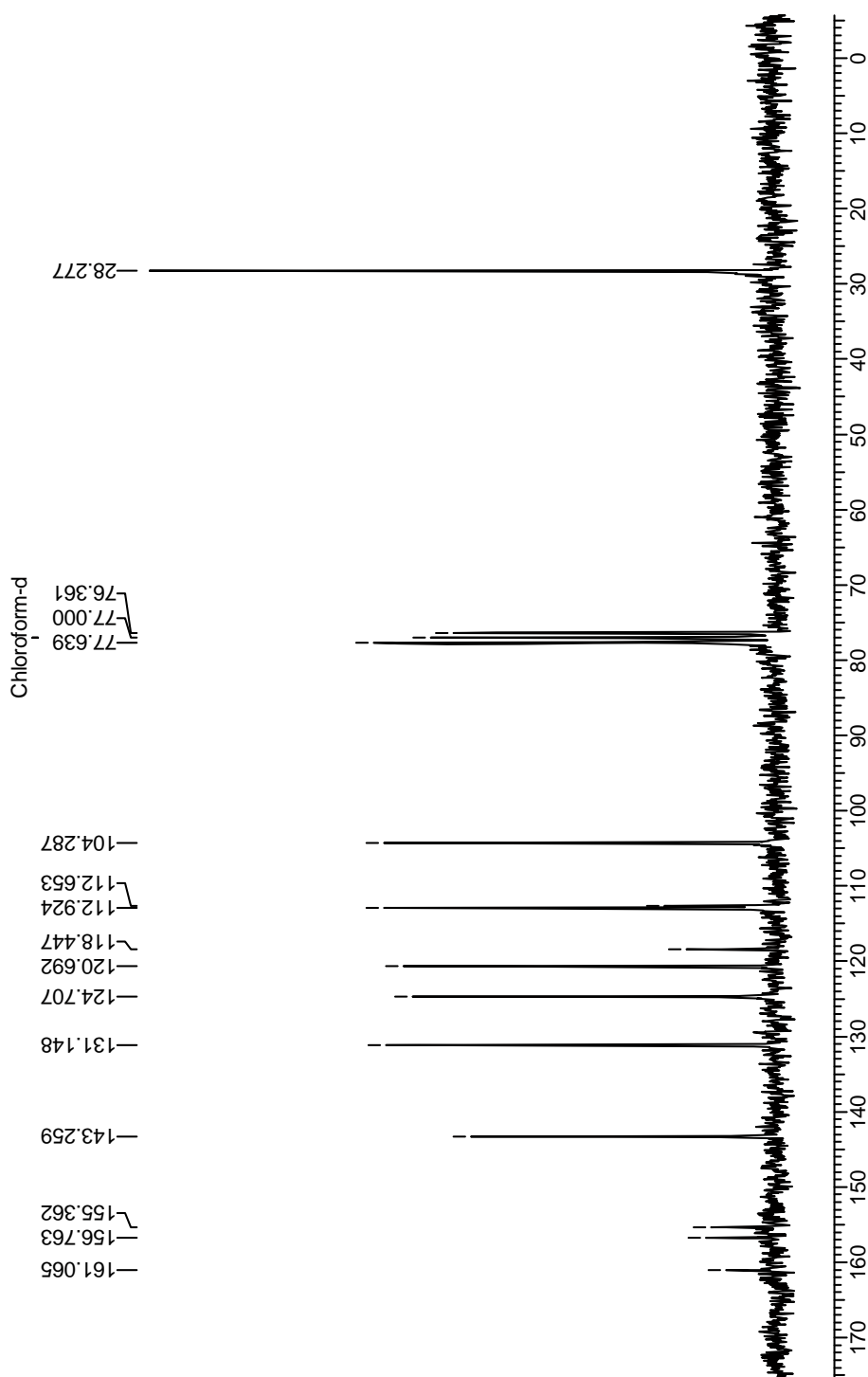


FIGURA 1.14: Espectro de RMN de ^{13}C (200 MHz, CDCl_3) da Substância II (Xantiletina).

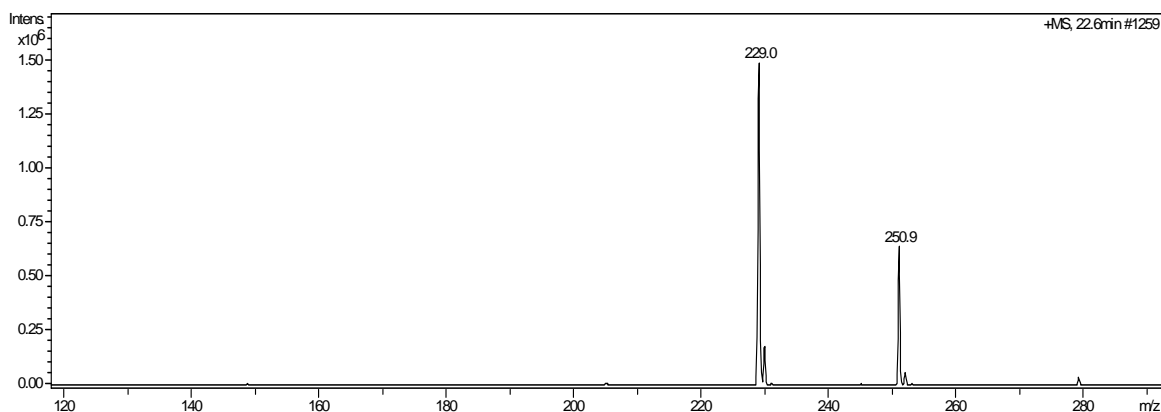


FIGURA 1.15: Espectro de massas Xantiletina (Substância II).

1.6.1.3 – Identificação da Substância III (Seselina)

A Substância III (**FIGURA 1.16**, p. 46) apresentou-se como um sólido amarelo e é denominada como Seselina (TAKEMURA et al., 1996) também comumente isolada em *Citrus*.

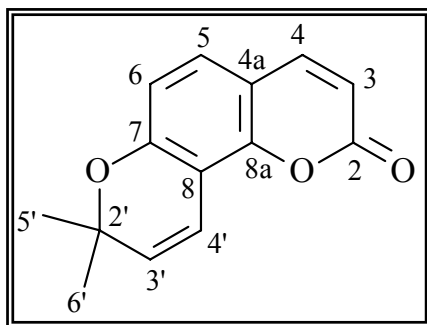


FIGURA 1.16: Estrutura química da cumarina Seselina (Substância III).

No espectro de RMN de ^1H (**FIGURA 1.17**, p. 49) assim como o da Xantiletina, apresenta sinais padrões que caracteriza a classe estrutural das cumarinas, com a presença dos dois dubletos em δ 6,24 e 7,61 do anel lactônico.

Observa-se também no espectro de RMN de ^1H assim como para a Xantiletina (item 1.6.2.2) a presença de dois dubletos em δ 6,89 e 5,74 e um singlete em δ 1,49 referentes aos sinais de um anel pirano.

Todos os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C (espectro de RMN de ^{13}C , **FIGURA 1.18**, p. 50) da Substância II são mostrados nas **TABELAS 1.5** e **1.6**, na página 48, e comparados com os dados da literatura, confirmando a determinação da estrutura.

O espectro de RMN de ^1H da Substância III não apresenta os dois singletos em δ 7,05 (H-5) e 6,71 (H-8), como no espectro de RMN de ^1H da Xantiletina, e sim dois dubletos em δ 6,73 e 7,22 com $J = 8,5$ Hz, referentes a hidrogênios aromáticos com acoplamentos em *orto*. Esse acoplamento em *orto* dos sinais de hidrogênios em δ 6,73 e 7,22 evidencia a angularidade da molécula, ou seja, a localização do anel pirano nas posições 7 e 8 da estrutura da cumarina.

Os sinais em δ 6,73 e 7,22 foram atribuídos aos hidrogênios H-6 e H-5, respectivamente. Todos os valores de hidrogênio e de carbono apresentados foram comparados e confirmados com dados da literatura.

A definição da estrutura da Substância III foi confirmada pelo espectro de massas (**FIGURA 1.19**, p. 51) obtido por CG-MS (rampa 100-1-10-250-15) que apresentou o pico do íon molecular M^+ com m/z igual a 228, o que permitiu, somado aos dados mencionados, definir a estrutura da Substância III como sendo a cumarina **SESELINA**.

TABELA 1.5: Dados de RMN de ^1H da Substância III (Seselina) em comparação com dados da literatura.

Hidrogênio	Seselina isolada	Seselina (literatura)
3	6,24 <i>d</i> (9,4) (1H)	6,23 <i>d</i> (9,6) (1H)
4	7,61 <i>d</i> (9,4) (1H)	7,60 <i>d</i> (9,6) (1H)
5	7,22 <i>d</i> (8,5) (1H)	7,21 <i>d</i> (8,4) (1H)
6	6,73 <i>d</i> (8,5) (1H)	6,72 <i>d</i> (8,4) (1H)
3'	5,74 <i>d</i> (10) (1H)	5,73 <i>d</i> (10) (1H)
4'	6,89 <i>d</i> (10) (1H)	6,89 <i>d</i> (10) (1H)
5'	1,49 <i>s</i> (3H)	1,48 <i>s</i> (3H)
6'	1,49 <i>s</i> (3H)	1,48 <i>s</i> (3H)

OBS: Dados de RMN de ^1H (δ , mult., $J(\text{Hz})$) (integração) (CDCl_3 , 200 MHz).

TABELA 1.6: Dados de RMN de ^{13}C da Substância III (Seselina).

Carbono	Seselina isolada
2	160,9
3	112,5
4	143,8
4a	112,5
5	127,7
6	114,9
7	156,3
8	109,2
8a	150,1
2'	77,0-77,6
3'	130,7
4'	113,5
5'	28,1
6'	28,1

OBS: Dados de RMN de ^{13}C (δ) (CDCl_3 , 50 MHz).

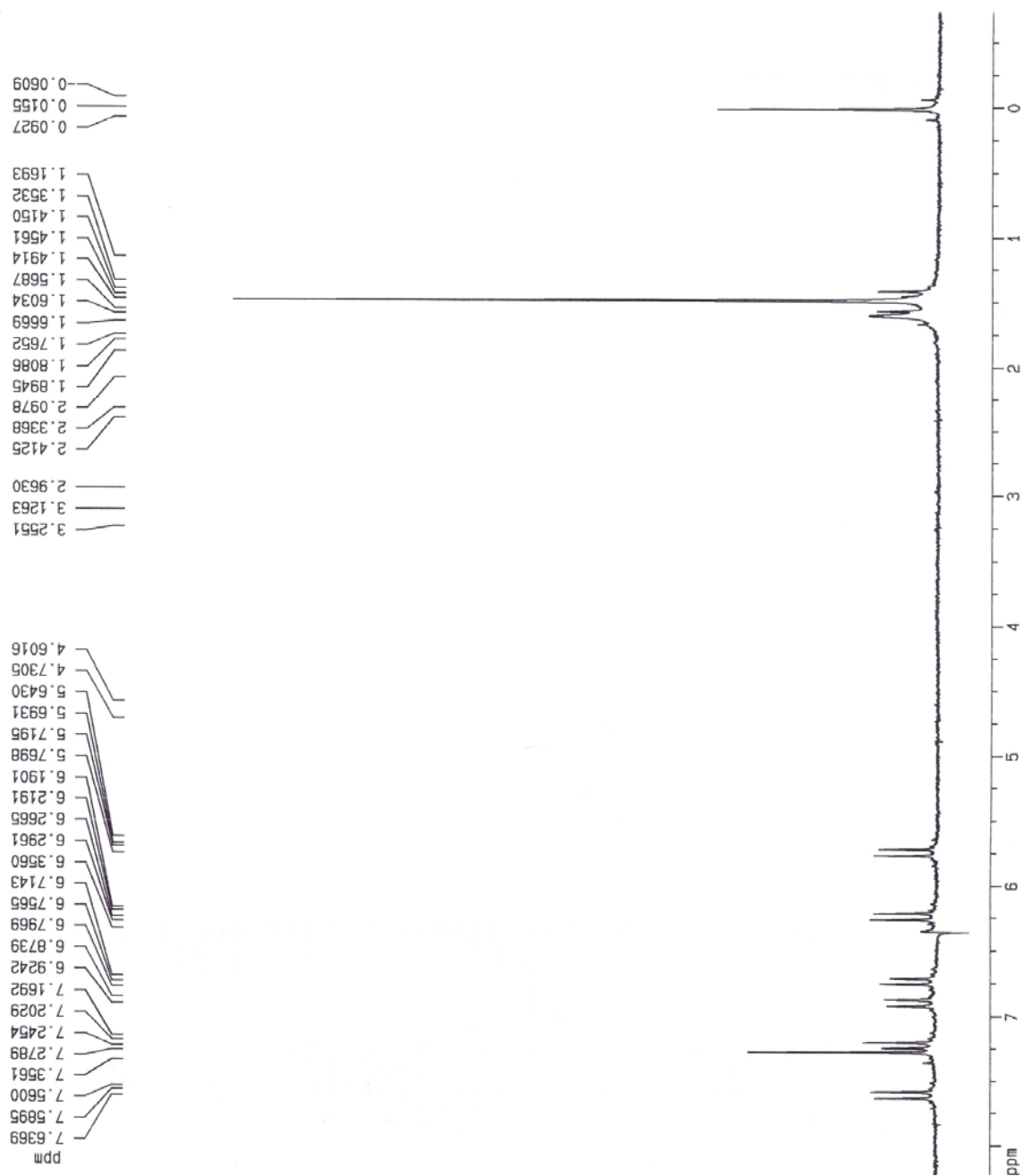


FIGURA 1.17: Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) da Substância III (Seselina).

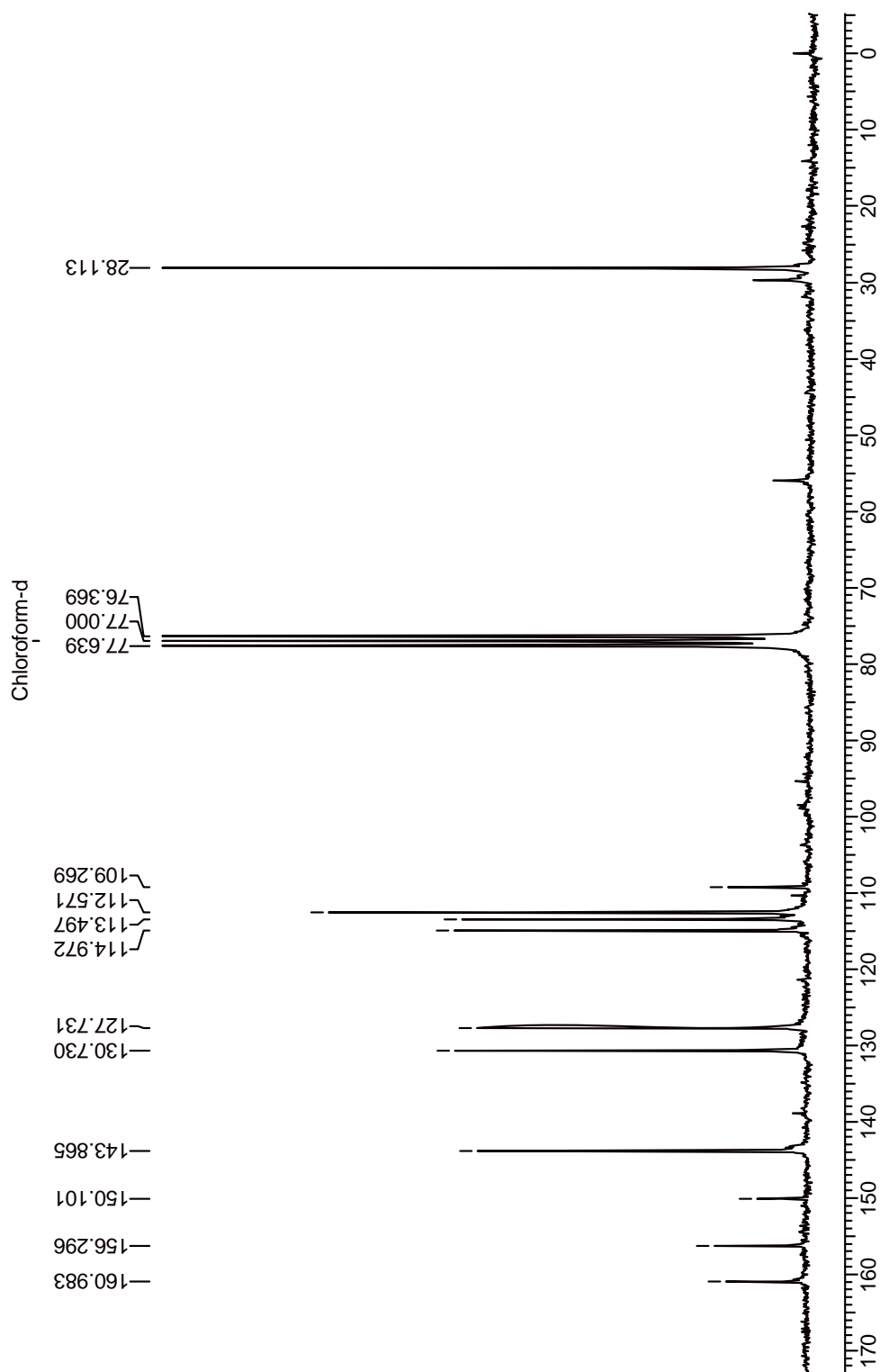


FIGURA 1.18: Espectro de RMN de ^{13}C (200 MHz, CDCl_3) da Substância III (Seselina).

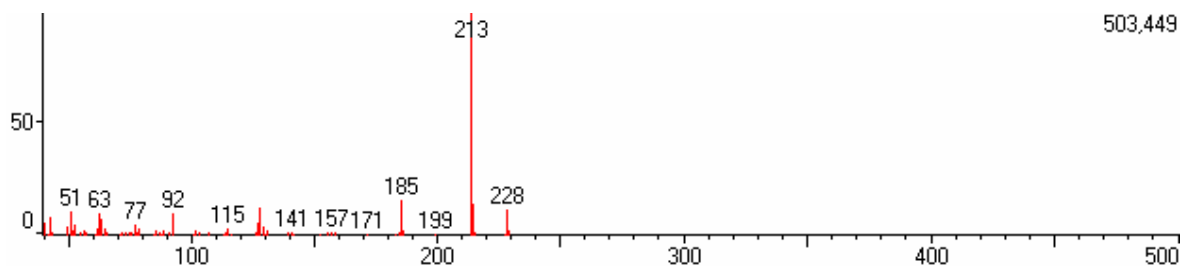


FIGURA 1.19: Espectro de massas Seselina (Substância III).

1.6.1.4 – Identificação da Substância IV (Tamarina)

A substância IV (**FIGURA 1.20**, p. 51) apresentou-se como um cristal branco e é denominada como Tamarina (BURKE e PERKINS, 1979; GONZALEZ et al., 1977 e TAKEMURA et al., 1996), já isolada em *Citrus*. Sua estrutura foi proposta de acordo com dados de RMN de 1D e 2D.

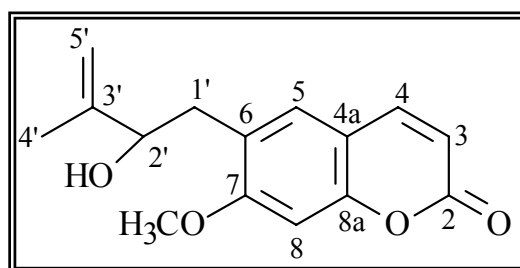


FIGURA 1.20: Estrutura química da cumarina Tamarina (Substância IV).

O espectro de RMN de ^1H (**FIGURA 1.22**, p. 55) da substância IV apresenta os dois dubletos em δ 6,25 e 7,63, referentes aos hidrogênios do anel lactônico de uma cumarina, dois singletos em δ 7,28 e 6,81 referem-se aos hidrogênios H-5 e H-8, respectivamente, sugerindo que a estrutura apresenta-se 6, 7 dissustituída, assim como mostrado para a Suberosina (item 1.6.1.1) e Xantiletina (item 1.6.1.2).

Observou-se também no espectro de RMN de ^1H um singlete em δ 3,91 integrando para três hidrogênios referente a hidrogênios de uma metila ligada a um heteroátomo, que pela rota biossintética das cumarinas foi possível sugeri-la na posição 7. Pelo experimento de HSQC esse sinal em δ 3,91 correlaciona-se com o sinal em δ 56,0 confirmando corresponder a uma metoxila. O espectro de RMN de ^1H mostrou também um singlete em δ 1,82 (integrando para três hidrogênios) característico de hidrogênios metílicos de uma unidade de prenila, atribuído à Me-4'. Esse sinal em δ 1,82 correlaciona-se no experimento de HSQC (**FIGURA 1.23**, p. 56) com o carbono em δ 18,0. Por meio do experimento de HMBC (**FIGURA 1.24**, p. 57) esse sinal em δ 18,0 correlaciona-se com dois multipletos em δ 4,85 e 4,94 (integrando para um hidrogênio cada) atribuídos aos H₂-5' que pelo experimento de HSQC correlacionam-se com um único sinal de carbono em δ 114,0 sugerindo serem esses dois multipletos de dupla terminal. Esses sinais em δ 4,85 e 4,94 correlacionam-se também no experimento de HMBC com o sinal em δ 75,0 que pelo HSQC é referente ao sinal duplo dubleto em δ 4,31 (integrando para um hidrogênio) com constantes de acoplamentos de 4,1 Hz e 8,6 Hz. Esse duplo dubleto correlaciona-se com outros dois duplos dubletos em δ 3,01 com $J= 4,1$ e 13,8 Hz e em δ 2,75 com $J= 8,6$ Hz e 13,8 Hz.

No experimento de HSQC os sinais em δ 3,01 e δ 2,75 correlacionam-se com o mesmo sinal de carbono em δ 36,0 sendo estes atribuídos aos hidrogênios H-1'a e H-1'b.

O sinal em δ 4,31 é mais desblindado por estar ligado a um carbono carbinólico. O posicionamento deste substituinte na posição 6 foi confirmado pelas correlações observadas no experimento de HMBC, onde os sinais dos hidrogênios em H-1' se correlacionam com o sinal de carbono em δ 130,0 (C-5) e do sinal de hidrogênio em δ 7,28 (H-5) com o sinal de carbono em δ 36,0 (C-1') (**FIGURA 1.21**, p. 53).

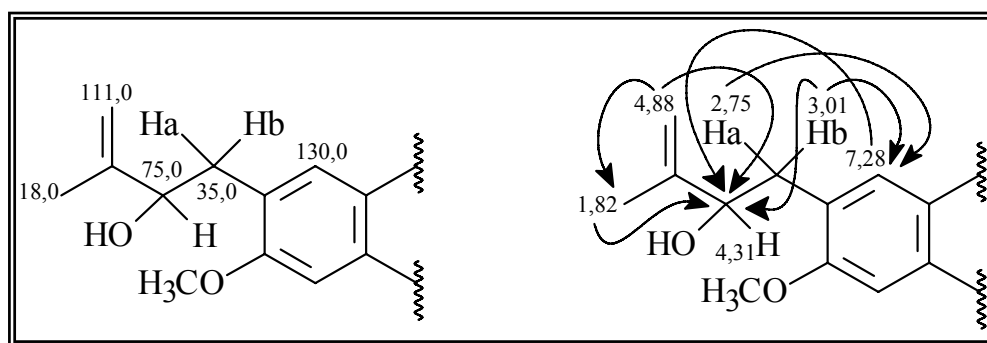


FIGURA 1.21: Correlações observadas no experimento de HMBC para a Substância IV.

Todos os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C da substância IV são mostrados nas **TABELAS 1.7** e **1.8**, na página 54, e comparados com os dados da literatura.

A definição da estrutura da substância IV foi confirmada pelo espectro de massas (**FIGURA 1.25**, p. 58) obtido por CG-MS (rampa 100-1-10-250-15) que apresentou o pico do íon molecular M^+ com m/z igual a 260, o que permitiu, somado aos dados mencionados, definir a estrutura da Substância IX como sendo a cumarina **TAMARINA**.

TABELA 1.7: Dados de RMN de ^1H da substância IV (Tamarina) em comparação com dados da literatura.

Hidrogênio	Tamarina isolada	Tamarina (literatura)
3	6,25 <i>d</i> (9,4) (1H)	6,11 <i>d</i> (9,5) (1H)
4	7,63 <i>d</i> (9,4) (1H)	7,57 <i>d</i> (9,5) (1H)
5	7,28 <i>s</i> (1H)	7,14 <i>s</i> (1H)
8	6,81 <i>s</i> (1H)	6,64 <i>s</i> (1H)
1'a	2,75 <i>dd</i> (8,6 e 13,8) (1H)	3,1 <i>m</i> (2H)
b	3,01 <i>dd</i> (4,1 e 13,8) (1H)	
2'	4,31 <i>dd</i> (4,1 e 8,6) (1H)	-
4'	1,82 <i>s</i> (3H)	1,69 <i>s</i> (3H)
5'a	4,85 <i>m</i> (1H)	4,87 <i>m</i> (2H)
b	4,94 <i>m</i> (1H)	
7-OCH ₃	3,91 <i>s</i> (3H)	3,81 <i>s</i> (3H)

OBS: Dados de RMN de ^1H (δ , mult., $J(\text{Hz})$) (integração) (CDCl_3 , 400 MHz).

TABELA 1.8: Dados de RMN de ^{13}C da substância IV (Tamarina).

Carbono	Tamarina isolada
2	160,0
3	114,0
4	145,0
4a	113,0
5	130,0
6	124,0
7	160,0
8	99,0
8a	155,0
1'	36,0
2'	75,0
3'	147,0
4'	18,0
5'	111,0
7-OCH ₃	55,0

* não observado.

OBS: Dados de RMN de ^{13}C (δ) foram obtidos por meio das projeções do HSQC e HMBC.

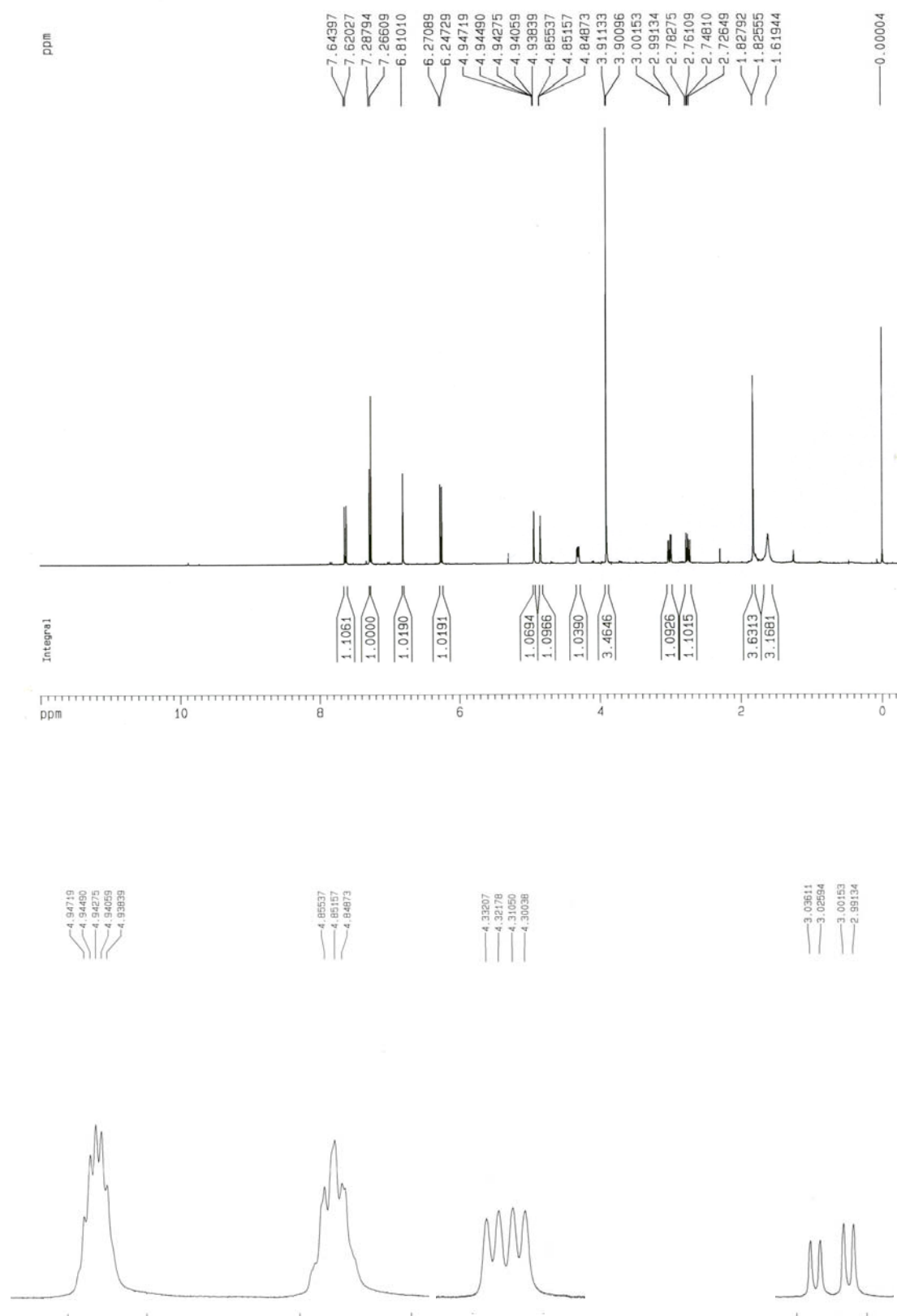


FIGURA 1.22: Espectro (e ampliações) de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da Substância IV (Tamarina).

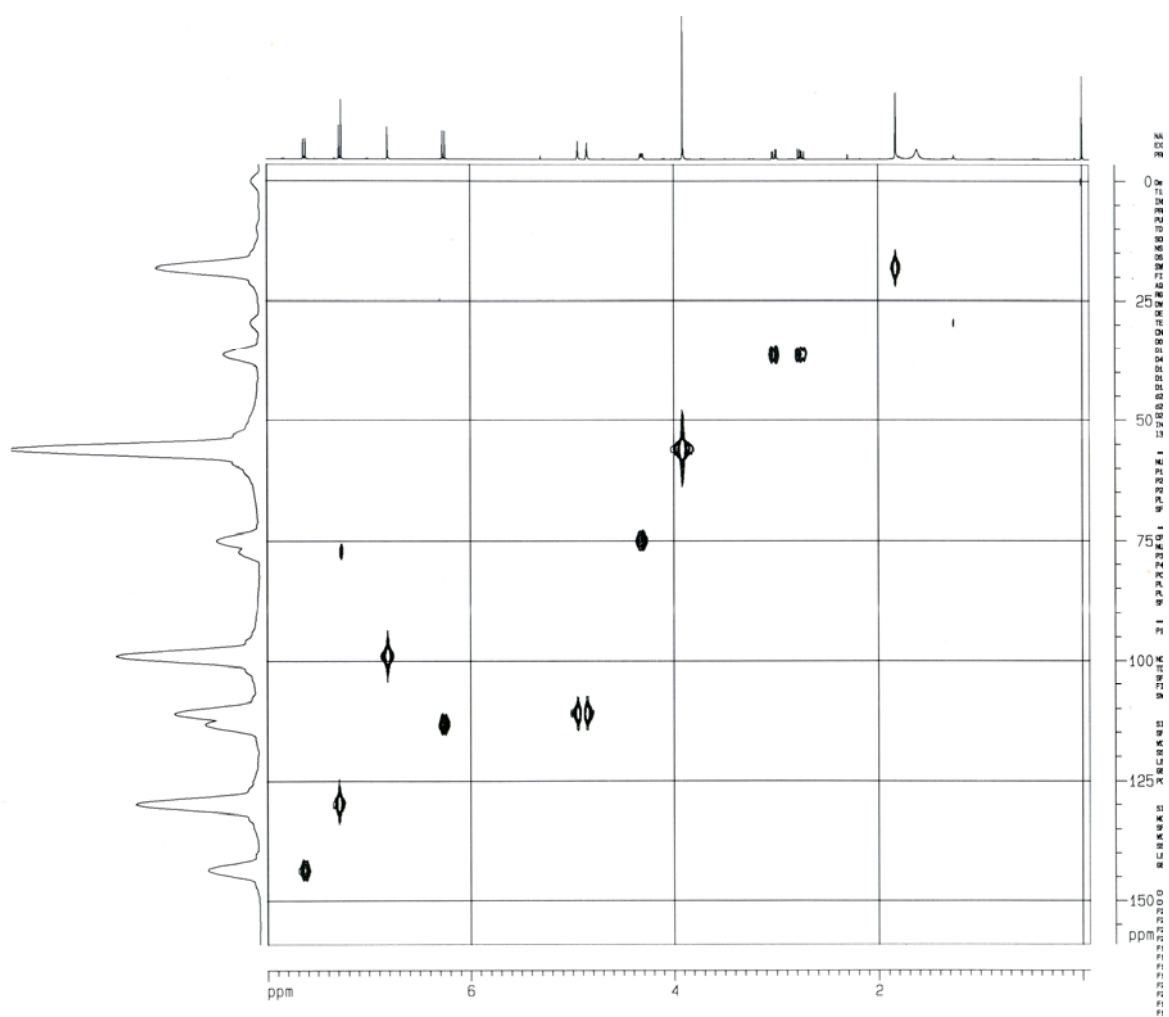


FIGURA 1.23: Experimento de HSQC (400 MHz, CDCl₃) da Substância IV (Tamarina).

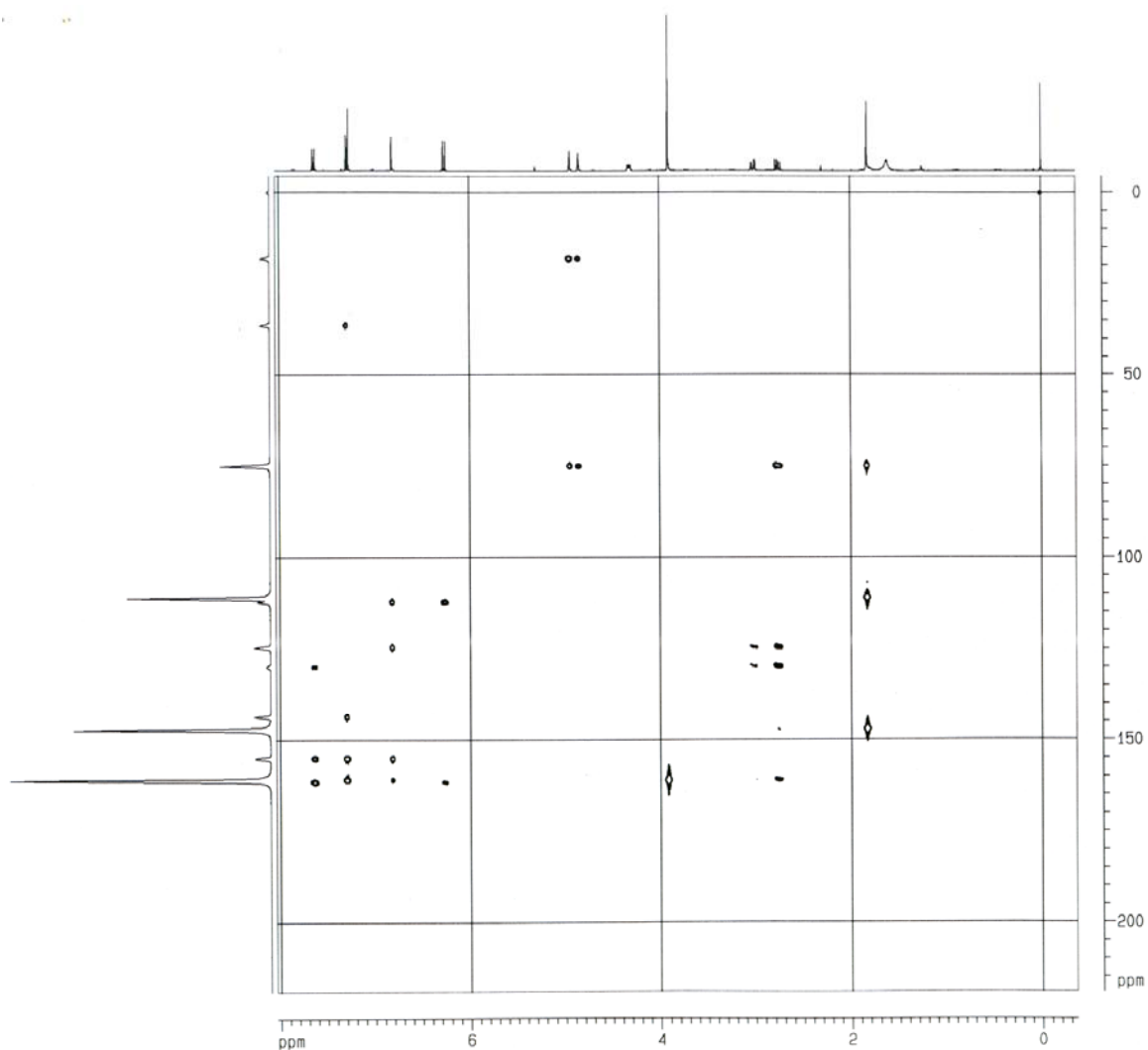


FIGURA 1.24: Experimento de HMBC (400 MHz, CDCl₃) da Substância IV (Tamarina).

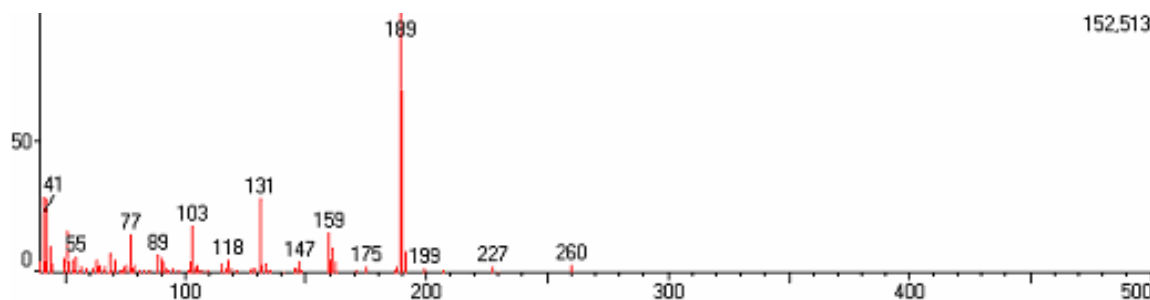


FIGURA 1.25: Espectro de massas da Tamarina (Substância IV).

1.6.1.5 – Identificação da Substância V (Crenulatina)

A Substância V (**FIGURA 1.26**, p. 58) apresentou-se como um cristal branco e é denominada como Crenulatina ou Angelical (BOWEN e PERERA, 1982; WU e FURUKAMA, 1983a e TAKEMURA et al., 1996), comumente isolada em *Citrus*.

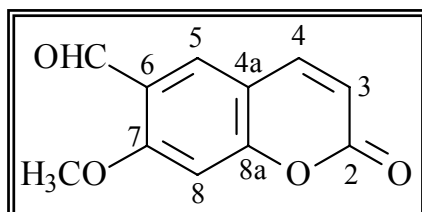


FIGURA 1.26: Estrutura química da cumarina Crenulatina (Substância V).

O espectro de RMN de ^1H (**FIGURA 1.27**, p. 60) da Substância V apresenta os dois dubletos em δ 6,32 e 7,68, dois singletos em δ 7,98 e 6,87, referentes a estrutura de uma cumarina 6, 7 dissustituída. Outro sinal semelhante também é o singletto em δ 4,00 integrando para três hidrogênios, referente aos hidrogênios metílicos ligados a um heteroátomo.

O que o espectro de RMN de ^1H apresenta a mais é a presença de um singlete em δ 10,40 integrando para um hidrogênio, característico de um hidrogênio de uma unidade aldeídica. Esses dados sugerem que a Substância V seja a cumarina **CRENULATINA**, a qual é considerada artefato.

Os dados de RMN de ^1H da Substância V são mostrados na **TABELA 1.9**, na página 59, e comparados com os dados da literatura.

TABELA 1.9: Dados de RMN de ^1H da Substância V (Crenulatina) em comparação com dados da literatura.

Hidrogênio	Crenulatina isolada	Crenulatina (literatura)
3	6,32 <i>d</i> (9,5) (1H)	6,30 <i>d</i> (9,5) (1H)
4	7,68 <i>d</i> (9,5) (1H)	7,65 <i>d</i> (9,5) (1H)
5	7,98 <i>s</i> (1H)	8,06 <i>s</i> (1H)
8	6,87 <i>s</i> (1H)	6,96 <i>s</i> (1H)
6-CHO	10,40 <i>s</i> (1H)	10,82 <i>s</i> (1H)
7-OCH ₃	4,00 <i>s</i> (3H)	4,0 <i>s</i> (3H)

OBS: Dados de RMN de ^1H (δ , mult., *J*(Hz)) (integração) (CDCl₃, 200 MHz).

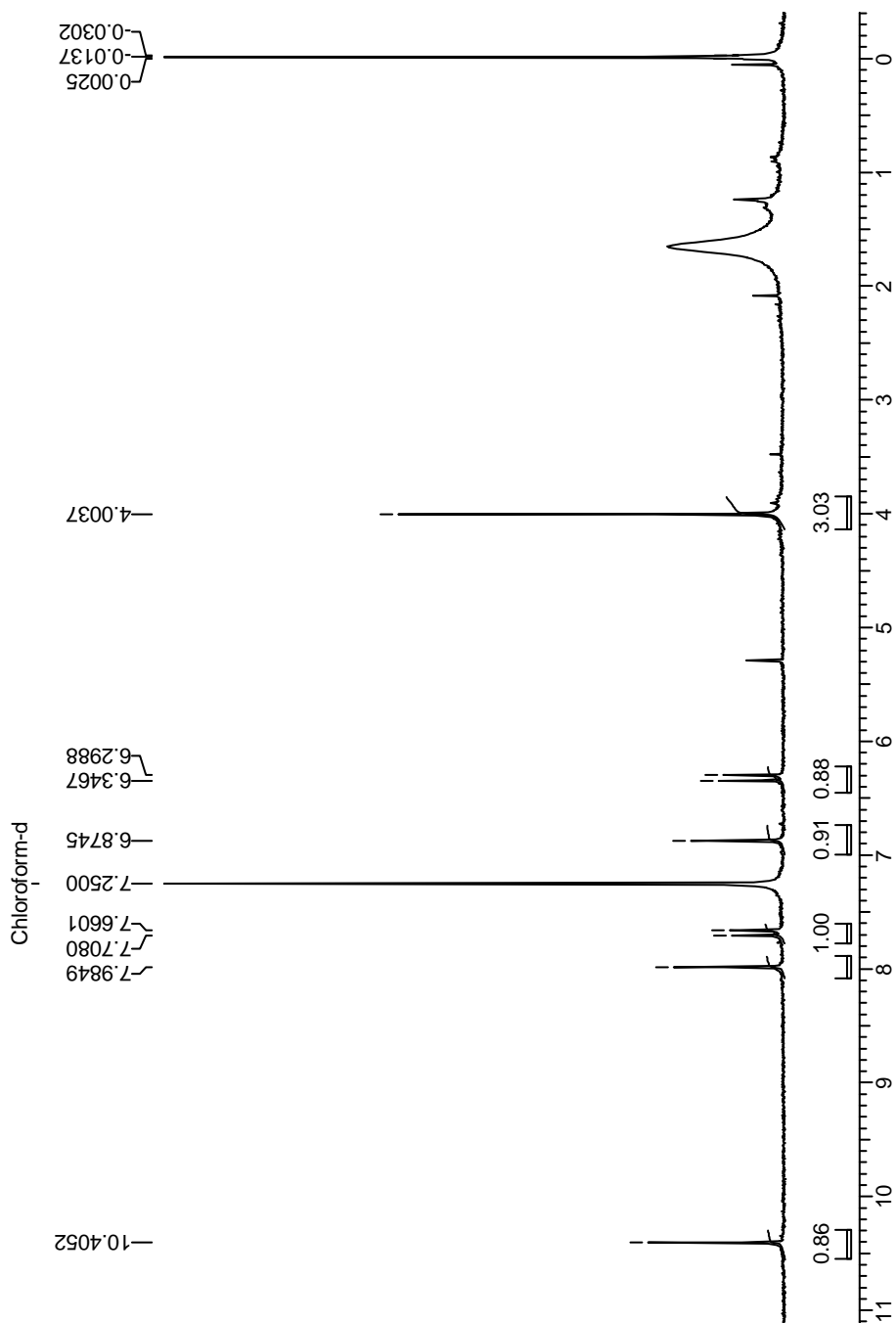


FIGURA 1.27: Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) da Substância V (Crenulatina).

1.6.2 - Flavonóides

1.6.2.1 – Identificação da Substância VI (Limonianina)

A Substância VI (**FIGURA 1.28**, p. 61) apresentou-se como um cristal amarelo e é denominada como Limonianina (ou Atalantoflavona), a qual já foi isolada do gênero *Citrus*, e teve sua estrutura identificada com base nos espectros de RMN 1D e 2D e por meio de comparações de dados mencionados na literatura (BANERJ et al., 1988; CHANG et al., 1990; MÁXIMO et al., 2002).

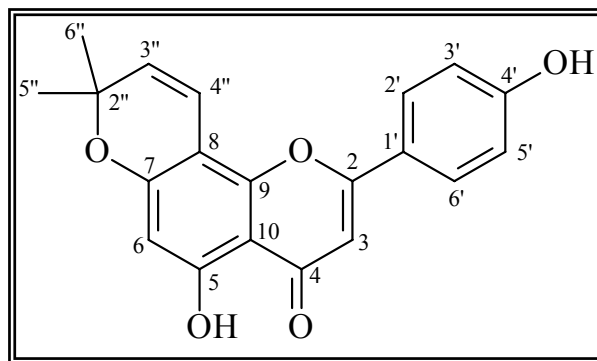


FIGURA 1.28: Estrutura química da flavona Limonianina (Substância VI).

Analisando-se o espectro de RMN de ^1H (**FIGURA 1.30**, p. 65) da substância em questão, verificou-se a presença de um singlete em δ 13,12 característico de hidroxila quelada de um flavonóide e dois dubletos em δ 7,99 e 7,05 integrando para dois hidrogênios cada com constantes de acoplamento iguais a 8,6 Hz, referente a acoplamento *orto* de hidrogênios em um sistema aromático, característico do anel B de um flavonóide. Assim, o sinal em δ 7,05 que se correlaciona pelo experimento de HSQC (**FIGURA 1.31**, p. 66) com o sinal de carbono em δ 116,9 foi atribuído aos hidrogênios magneticamente equivalentes H-3' e H-5', e o sinal mais desblindado em δ 7,99 (pelo experimento de HSQC se correlaciona com δ 129,2) foi atribuído

aos H-2' e H-6'. Observou-se ainda um singlete em δ 6,69 integrando para um hidrogênio que pelo experimento de HSQC correlaciona-se com o sinal em δ 104,1 característico do hidrogênio H-3 de uma flavona. Os sinais referentes aos carbonos podem ser observados no espectro de RMN de ^{13}C na **FIGURA 1.32** na página 67.

O espectro de RMN de ^1H apresentou também dois dubletos em δ 5,79 (pelo HSQC correlaciona-se com δ 128,6) e 6,92 (pelo HSQC correlaciona-se com δ 115,4) integrando para um hidrogênio cada com $J=10,0$ Hz e um singlete em δ 1,48 (pelo HSQC correlaciona-se com δ 28,2) integrando para seis hidrogênios indicando duas metilas magneticamente equivalentes, caracterizando a presença de um anel pirano que é um substituinte comum encontrado em substâncias isoladas em *Citrus*. Desta forma, o sinal em δ 5,79 foi atribuído ao H-3'' e o sinal mais desblindado em δ 6,92 atribuído ao H-4'', restando o sinal em δ 1,48 que foi atribuído aos H-5'' e H-6''.

A posição do pirano foi definida por meio do experimento de NOESY (**FIGURA 1.33**, p. 68) que apresentou correlações entre os sinais de hidrogênios em δ 6,92 (H-4'') com δ 7,99 (H-2'/H-6') o que possibilita um único posicionamento para o grupo pirano que é nas posições 7 e 8. Outras correlações observadas no experimento de NOESY são mostradas na **FIGURA 1.29**, página 63.

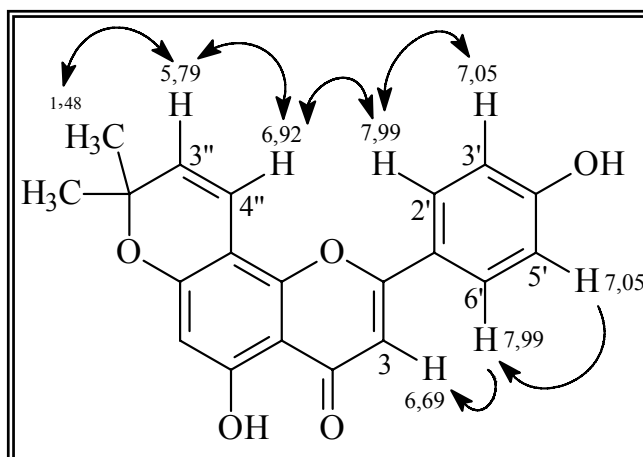


FIGURA 1.29: Correlações observadas no experimento de NOESY da Substância VI.

Restou ainda no espectro de RMN de ^1H um singlete em δ 6,18 que pelo experimento de HSQC correlaciona-se com o sinal em δ 100,2 sendo atribuído ao H-6 após a definição do anel pirano.

Todos os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C da substância VI são mostrados nas **TABELAS 1.10 e 1.11**, na página 64, e comparados com os dados da literatura.

A análise por Espectrometria de Massas (**FIGURA 1.34**, p. 69, obtido no modo positivo com inserção direta) da flavona mostrou o pico do *íon quase molecular* $[\text{M}+\text{H}]^+$ com m/z 337 comprovando assim a fórmula molecular do mesmo. Assim, baseado nos dados mencionados e em comparação os dados de RMN já mencionados na literatura, confirmou-se a estrutura da Substância VI como sendo a flavona **LIMONIANINA**.

TABELA 1.10: Dados de RMN de ^1H da substância VI (Limonianina) em comparação com dados da literatura.

Hidrogênio	Limonianina isolada	Limonianina (literatura)
3	6,69 <i>s</i> (1H)	6,70 <i>s</i> (1H)
6	6,18 <i>s</i> (1H)	6,19 <i>s</i> (1H)
2'/6'	7,99 <i>d</i> (8,6) (2H)	8,01 <i>d</i> (2H)
3'/5'	7,05 <i>d</i> (8,6) (2H)	7,01 <i>d</i> (2H)
3''	5,79 <i>d</i> (10) (1H)	5,78 <i>d</i> (10) (1H)
4''	6,92 <i>d</i> (10) (1H)	6,93 <i>d</i> (10) (1H)
5''/6''	1,48 <i>s</i> (6H)	1,49 <i>s</i> (6H)
5-OH	13,12 <i>s</i>	

OBS: Dados de RMN de ^1H (δ , mult., $J(\text{Hz})$) (integração) (CDCl_3 , 400 MHz).

TABELA 1.11: Dados de RMN de ^{13}C da substância VI (Limonianina).

Carbono	Limonianina isolada
2	165,0
3	104,1
4	183,2
5	152,6
6	100,2
7	162,7
8	105,8
9	162,1
10	102,1
1'	123,0
2'/6'	129,2
3'/5'	116,9
4'	160,1
2''	78,8
3''	128,6
4''	115,4
5''/6''	28,2

OBS: Dados de RMN de ^{13}C (δ) (CDCl_3 , 100 MHz).

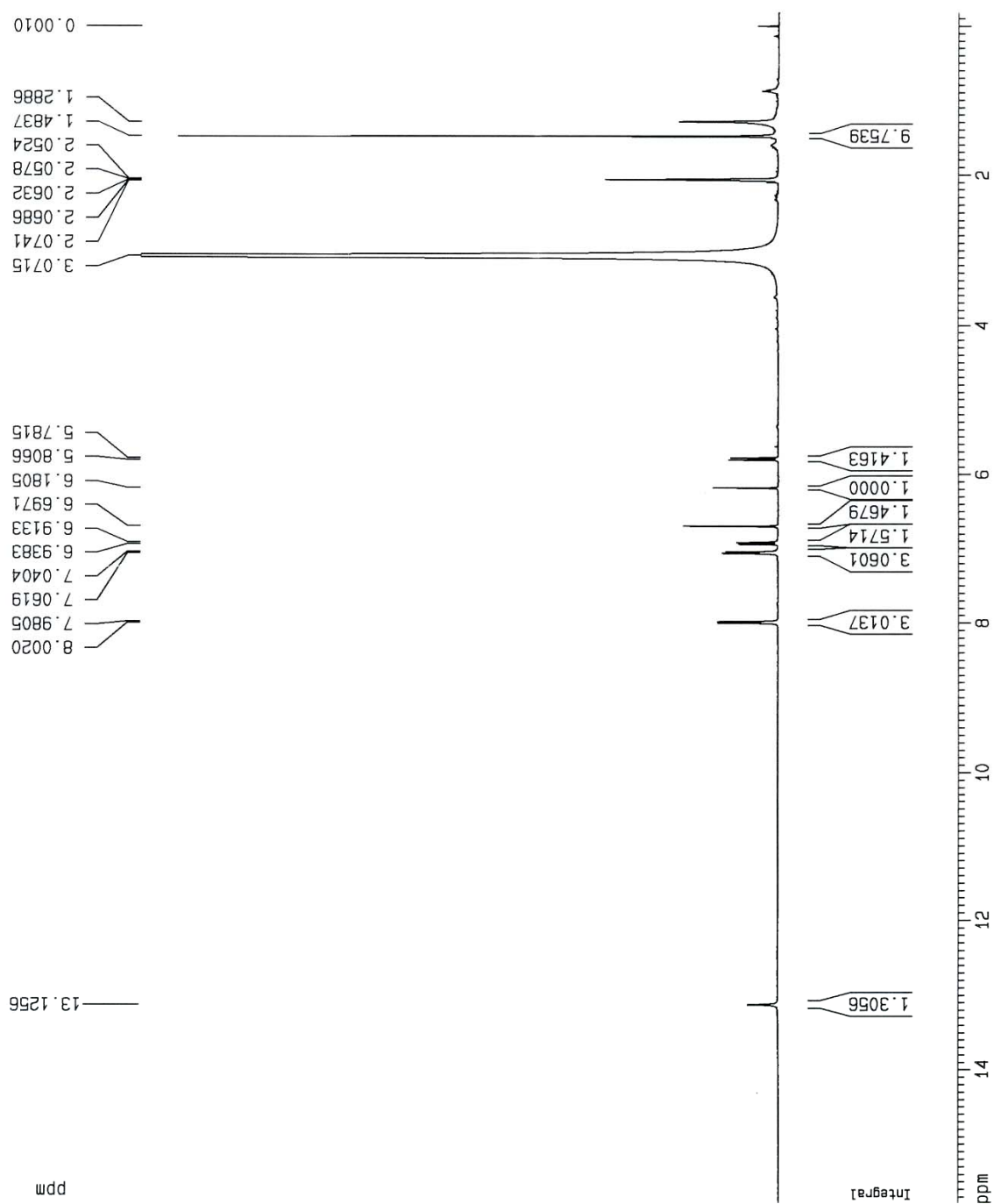


FIGURA 1.30: Espectro de RMN de ^1H (400MHz, Acetona-d₆) da Substância VI (Limonianina).

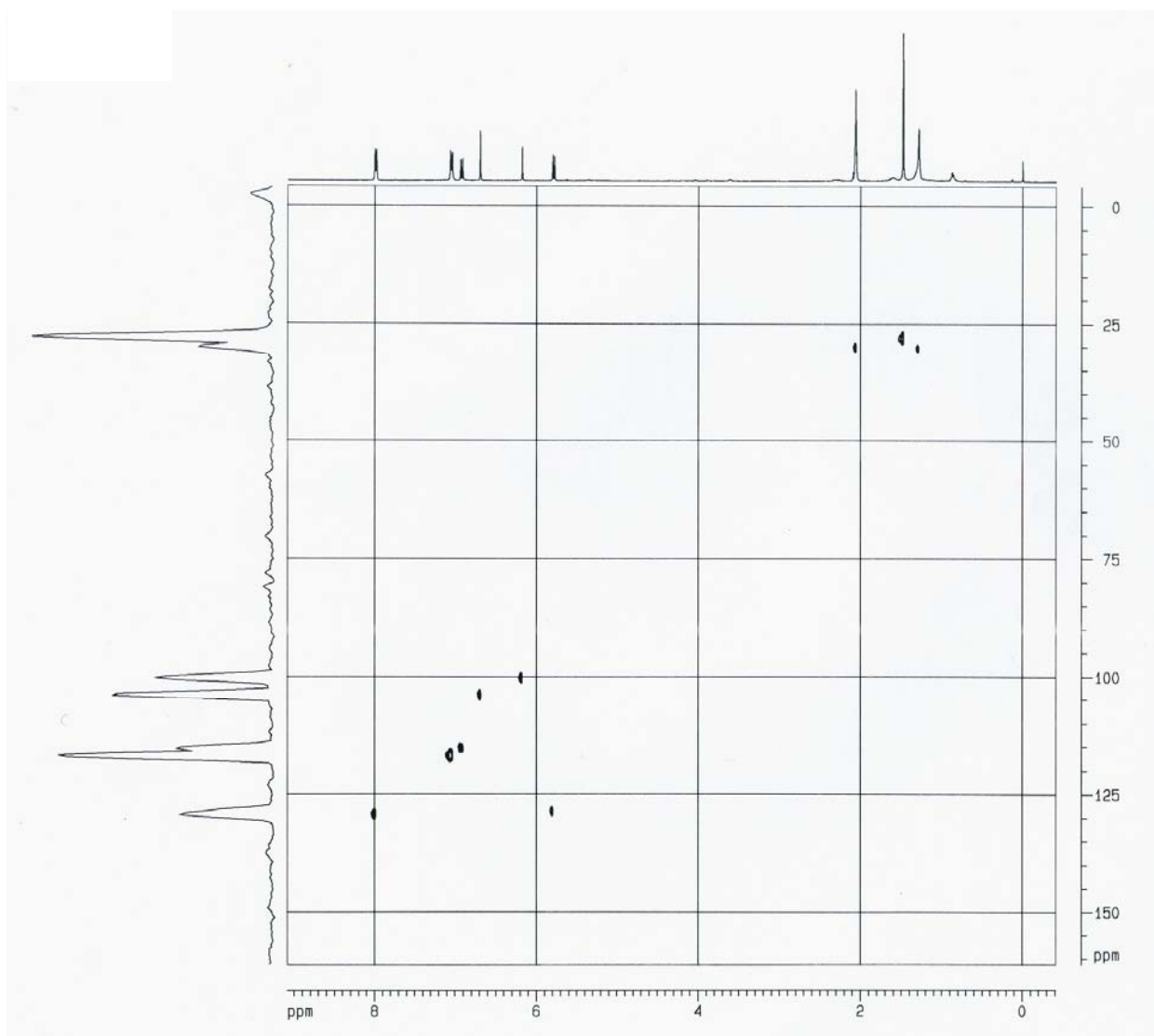


FIGURA 1.31: Experimento de HSQC (400MHz, Acetona-d6) da Substância VI (Limonianina).

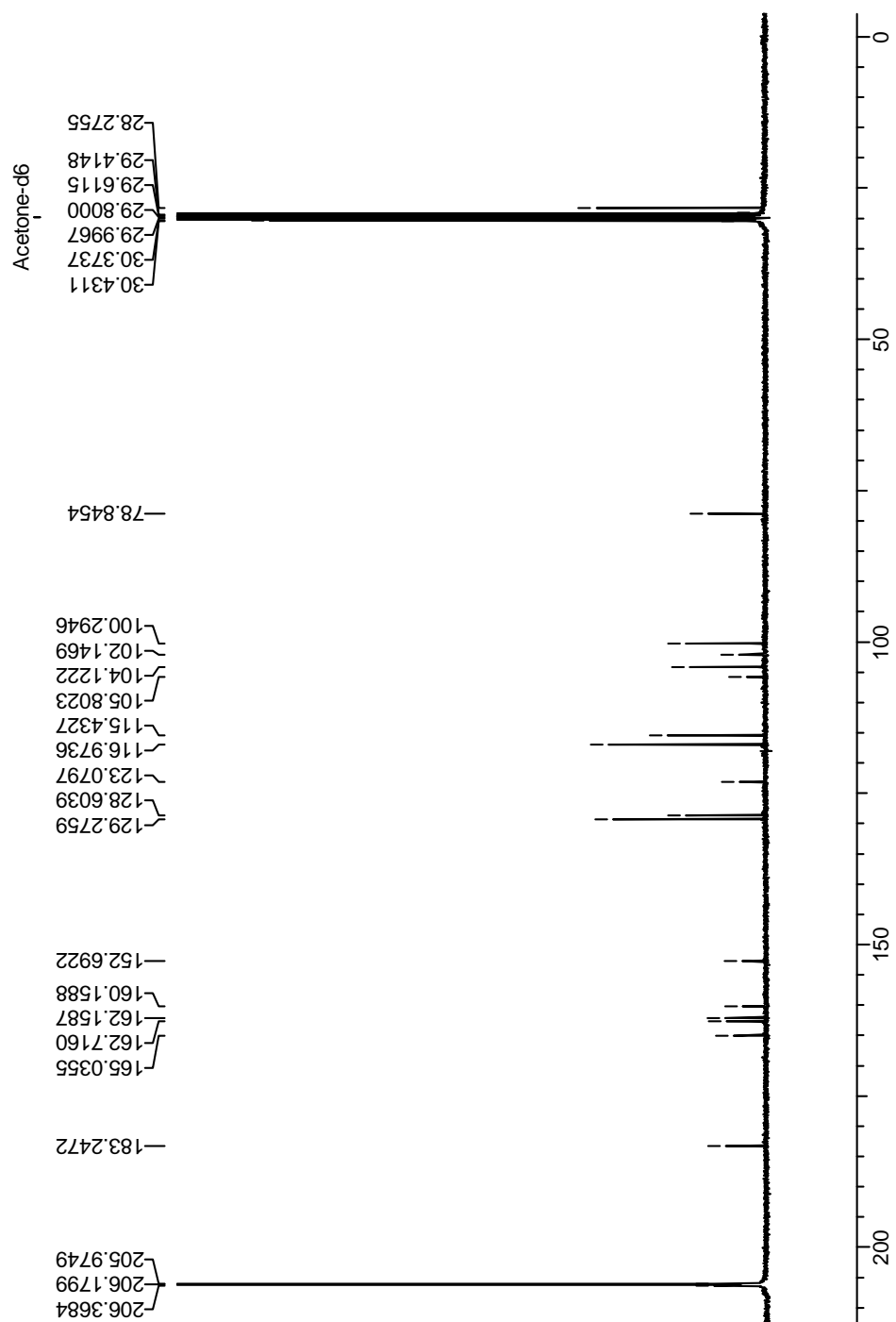


FIGURA 1.32: Espectro de ^{13}C (100 MHz, Acetona-d6) da Substância VI (Limonianina).

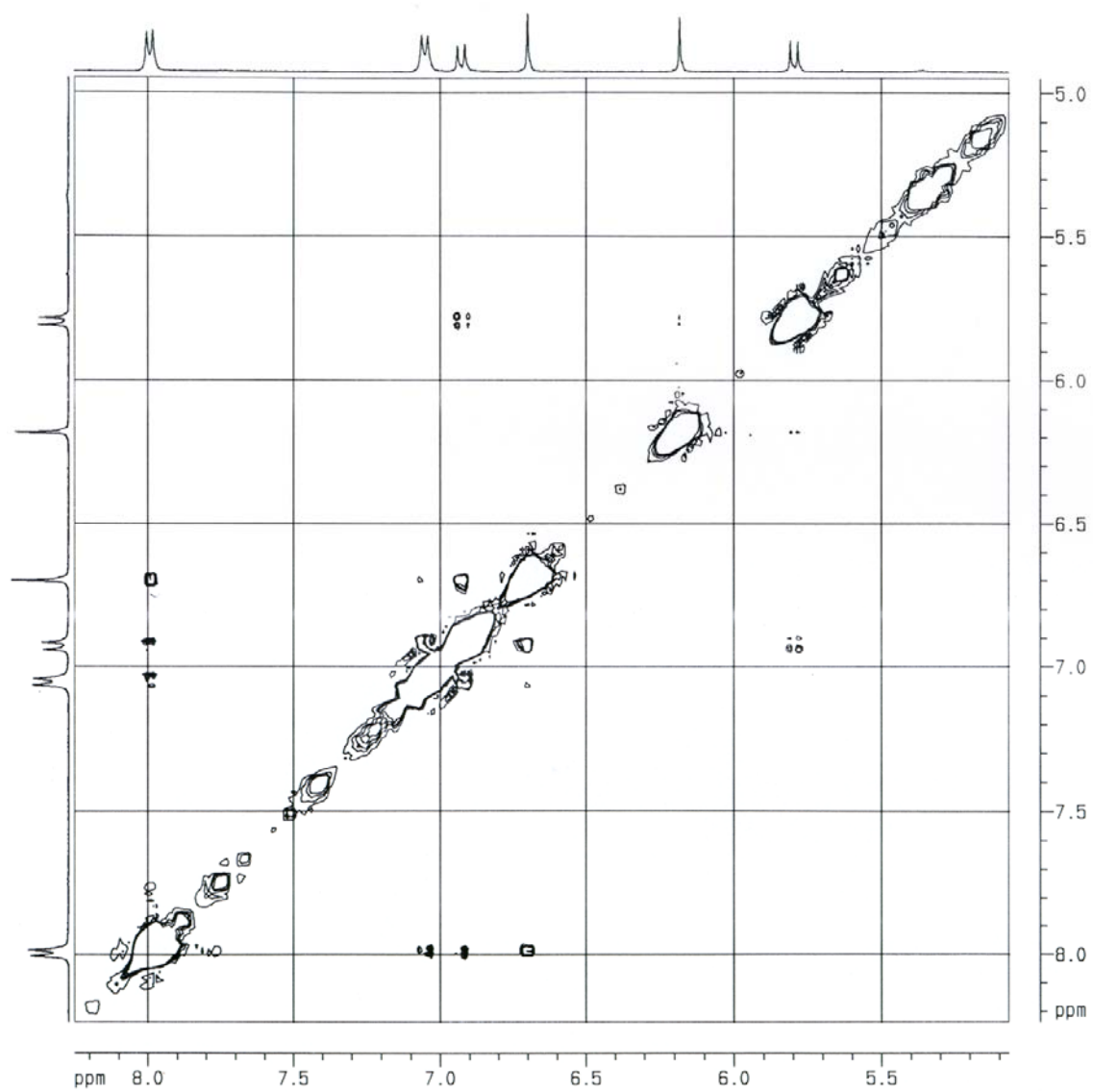


FIGURA 1.33: Experimento (ampliação) de NOESY (400MHz, Acetona-d6) da Substância VI (Limonianina).

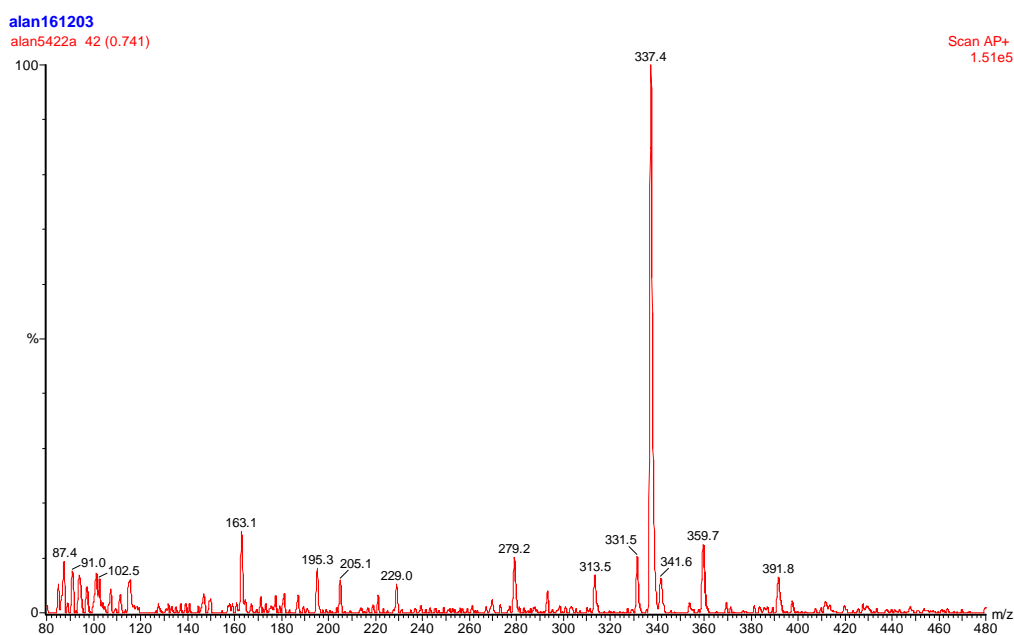


FIGURA 1.34: Espectro de massas da Limonianina (Substância VI).

1.6.2.2 – Identificação da Substância VII (Lupinifolina)

A Substância VII (**FIGURA 1.35**, p. 69) apresentou-se também como um cristal amarelo e é denominada como Lupinifolina, a qual ainda não havia sido isolada em *Citrus*, teve sua estrutura identificada com base nos espectros de RMN 1D e 2D e por meio de comparações de dados mencionados na literatura (SMALBERGER et al., 1974; AGRAWAL, 1989).

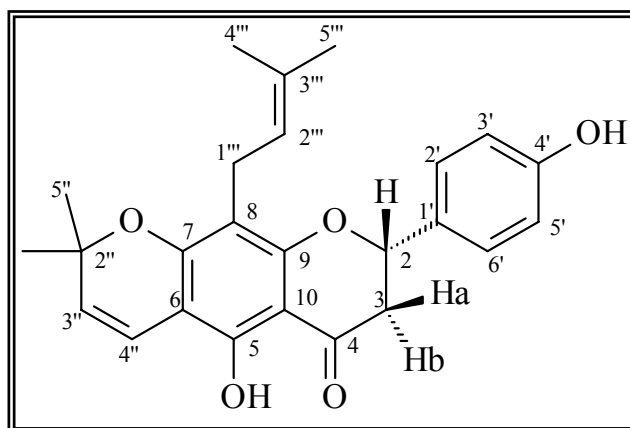


FIGURA 1.35: Estrutura química da flavanona Lupinifolina (Substância VII).

O espectro de RMN de ^1H (**FIGURA 1.38**, p. 76) da substância VII apresenta sinais semelhantes aos da Limonianina (ver item 1.6.2.1), ou seja, o singlete em δ 12,24 de uma hidroxila quelada de um flavonóide e os dois dubletos em δ 7,31 e 6,86 ($J = 8,6$ Hz) do anel B. O sinal em δ 6,86 (atribuído aos H-3' e H-5') se correlaciona pelo experimento de HSQC (**FIGURA 1.39**, p. 77) com o sinal referente ao carbono em δ 115,6 e o sinal em δ 7,31 (atribuído aos H-2' e H-6') com δ 127,5.

Pode ser observado pela ampliação do espectro de RMN de ^1H a presença de três duplo dubletos que pelas constantes de acoplamentos correlacionam-se entre si: O sinal em δ 2,78 integrando para um hidrogênio com $J = 3,2$ e 16,9 Hz (acoplamentos eq-ax e geminal); δ 3,04 integrando para um hidrogênio com $J = 12,6$ e 16,9 Hz (acoplamentos ax-ax e geminal) e δ 5,32 também integrando para um hidrogênio com $J = 3,2$ e 12,6 Hz (acoplamentos ax-eq e ax-ax). O sinal em δ 2,78 e δ 3,04 correlacionam-se pelo experimento de HSQC para o mesmo sinal de carbono em δ 43,2 e o sinal em δ 5,32 com o sinal em δ 77,2. Esses três duplo dubletos com as constantes apresentadas são característicos dos hidrogênios do anel C de uma flavanona.

Assim, os sinais e a estereoquímica puderam ser definidas, isto é, o sinal δ 2,78 em eq-ax (3,2 Hz) foi atribuído ao H-3a em correlação com o H-2 e geminal (16,9 Hz) referente à correlação do H-3a com H-3b; o sinal δ 3,04 em ax-ax (12,6 Hz) foi atribuído ao H-3b em correlação com o H-2 e geminal (16,9 Hz) referente à correlação do H-3b com H-3a e o sinal em δ 5,32 em ax-eq (3,2 Hz) foi atribuído ao H-2 em correlação com o H-3a e ax-ax (12,6 Hz) referente à correlação do H-2 com H-3b. Desta forma, o H-2 e o H-3a estão em beta e o H-3b em alfa como mostrado na **FIGURA 1.35**, na página 69.

O espectro de RMN de ^1H apresentou também dois dubletos em δ 5,49 (pelo HSQC correlaciona-se com δ 126,9) e δ 6,62 (pelo HSQC correlaciona-se com δ 115,6) integrando para um hidrogênio cada com $J=10,0$ Hz e um singleto em δ 1,43 (pelo HSQC correlaciona-se com δ 28,2) integrando para seis hidrogênios indicando duas metilas magneticamente equivalentes, caracterizando a presença de um anel pirano. O sinal em δ 5,49 foi atribuído ao H-3'' e o sinal em δ 6,62 por ser mais desblindado foi atribuído ao H-4''.

Foi observado também no espectro de RMN de ^1H sinais característicos de uma unidade isoprênica (prenila), substituinte comum em estruturas de flavonóides isolados do gênero *Citrus*, ou seja, um dubleto em δ 3,19 (integrando para dois hidrogênios) que pelo experimento de COSY correlaciona-se com um tripleto em δ 5,14 que integra para um único hidrogênio, sugerindo ser um hidrogênio olefínico. Observa-se ainda um sinal em δ 1,63 (integrando para seis hidrogênios) indicando hidrogênios de duas metilas. O sinal em δ 3,19 pelo HSQC correlaciona-se com δ 21,4; O sinal em δ 5,14 com δ 122,4 e o sinal em δ 1,63 com δ 25,7.

Observando o experimento de HMBC (**FIGURA 1.40**, p. 78), pode-se ver as correlações do sinal em δ 3,19 com o sinal em δ 133,8 que por sua vez não possui correlação pelo HSQC, sugerindo ser C-3''' olefínico dissubstituído. Pelo experimento de NOESY (**FIGURA 1.41**, p. 79) vê-se as correlações entre δ 1,63 com δ 5,14 e de δ 5,14 com δ 1,63 e ainda com δ 3,19. Desta forma, o sinal em δ 3,19 foi atribuído ao H-1''' que se correlacionou pelo HMBC com δ 122,4 o qual é o carbono em que o hidrogênio em δ 5,14 está ligado, assim o sinal em δ 5,14 foi atribuído ao H-2'''. Restando definir para a unidade isoprênica o sinal em δ 1,63 que foi atribuído aos hidrogênios das Me-4''' e Me-5'''.

Resta ainda definir o posicionamento do anel pirano e da prenila que poderiam estar no anel A da flavanona de duas formas, como mostrado na **FIGURA 1.36** na página 72.

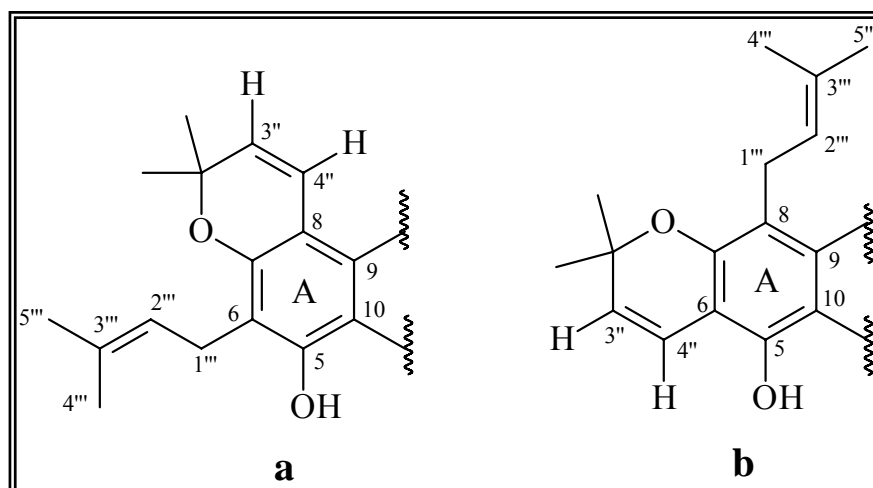


FIGURA 1.36: Possibilidades de posicionamento do anel pirano e da prenila na estrutura da flavanona.

No experimento de NOESY pode-se observar a correlação do sinal referente ao hidrogênio da hidroxila quelada em δ 12,2 com o sinal em δ 6,62 (H-4'') e ainda, pelo experimento de HMBC observa-se a correlação destes dois sinais δ 12,2 e δ 6,62 com o sinal em δ 159,3 que é referente ao C-5. Verificam-se também outras correlações no experimento de HMBC como: H-3'' com C-6 (δ 105,4) e C-2'' (δ 80,7); H-4'' com C-2'' e C-7 (δ 162,3); H-5''/6'' com C-2'' e C-3'' (δ 127,7), e do hidrogênio da hidroxila quelada com δ 159,3 como dito anteriormente e com C-6, permitindo assim, posicionar o anel pirano nas posições 6 e 7. Com isso a prenila pode ser posicionada no carbono 8 e foi confirmada pela correlação do H-1''' com C-7. Essas e outras correlações são mostradas na **FIGURA 1.37**, na página 73.

Os valores de carbono foram obtidos pela projeção de ^{13}C dos experimentos de HSQC e HMBC, visto que a massa da substância era

insuficiente para se obter todos os valores de carbono por meio do experimento de RMN de ^{13}C . Os valores de hidrogênio e carbono são mostrados nas **TABELAS 1.12** e **1.13**, nas páginas 74 e 75.

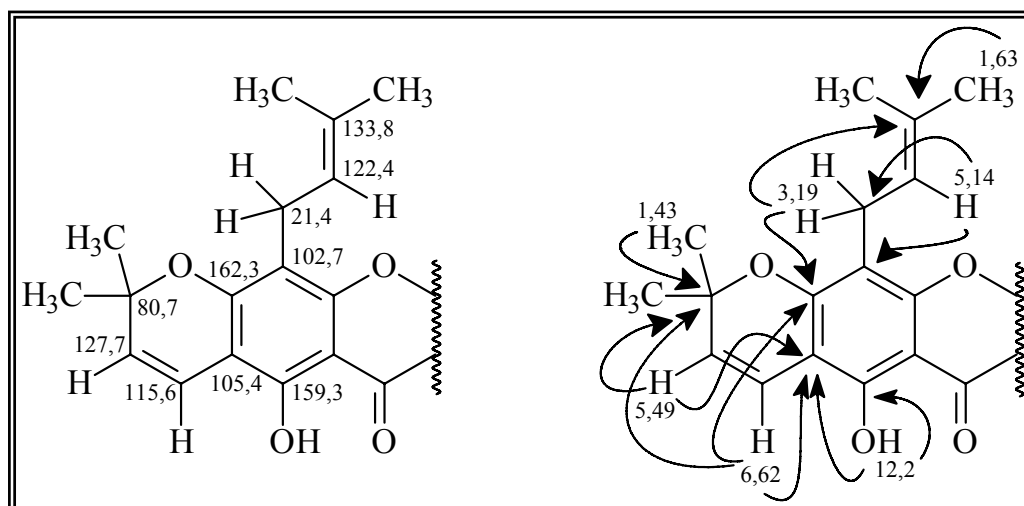


FIGURA 1.37: Correlações observadas no experimento de HMBC da Substância VII.

A estrutura da substância VII foi confirmada pelo espectro de massas (**FIGURA 1.42**, p. 80), obtido no modo positivo com inserção direta, que apresentou o pico do *íon quase molecular* $[\text{M}+\text{H}]^+$ com m/z 407, de acordo com a estrutura sugerida. Desta forma os dados obtidos e mencionados anteriormente foram comparados com os dados de RMN já mencionados na literatura e confirmou-se a estrutura da Substância VII como sendo a flavanona **LUPINIFOLINA**.

TABELA 1.12: Dados de RMN de ^1H da substância VII (Lupinifolina) em comparação com dados da literatura.

Hidrogênio	Lupinifolina isolada	Lupinifolina (literatura)
2	5,32 <i>dd</i> (3,2 e 12,6) (1H)	5,30 <i>dd</i> (3,3 e 12,7)
3 a	2,78 <i>dd</i> (3,2 e 16,9) (1H)	2,78 <i>dd</i> (3,3 e 17,3)
b	3,04 <i>dd</i> (12,6 e 16,9) (1H)	3,03 <i>dd</i> (12,7 e 17,3)
2'/6'	7,31 <i>d</i> (8,6) (2H)	7,28 <i>d</i> (8,5)
3'/5'	6,86 <i>d</i> (8,6) (2H)	6,84 <i>d</i> (8,5)
3''	5,49 <i>d</i> (10) (1H)	5,48 <i>d</i> (10)
4''	6,62 <i>d</i> (10) (1H)	6,63 <i>d</i> (10)
5''/6''	1,43 <i>s</i> (1H)	1,44 <i>s</i> (6H)
1'''	3,19 <i>d</i> (7,5) (2H)	3,20 <i>d</i> (7)
2'''	5,14 <i>t</i> (1H)	5,14 <i>t</i> (7)
4'''/5'''	1,63 <i>s</i> (6H)	1,64 <i>s</i> (6H)
5-OH	12,24 <i>s</i> (1H)	12,20 <i>s</i>

OBS: Dados de RMN de ^1H (δ , mult., $J(\text{Hz})$) (integração) (CDCl_3 , 400 MHz).

TABELA 1.13: Dados de RMN de ^{13}C da substância VII (Lupinifolina).

Carbono	Lupinifolina isolada
2	77,2
3	43,2
4	195,0
5	159,3
6	105,4
7	162,3
8	102,7
9	*
10	*
1'	*
2'/6'	127,5
3'/5'	115,6
4'	159,3
2''	80,7
3''	127,7
4''	115,6
5''/6''	28,2
1'''	21,4
2'''	122,4
3'''	133,8
4'''/5'''	25,7

* não observado.

OBS: Dados de RMN de ^{13}C (δ) foram obtidos por meio das projeções do HSQC e HMBC.

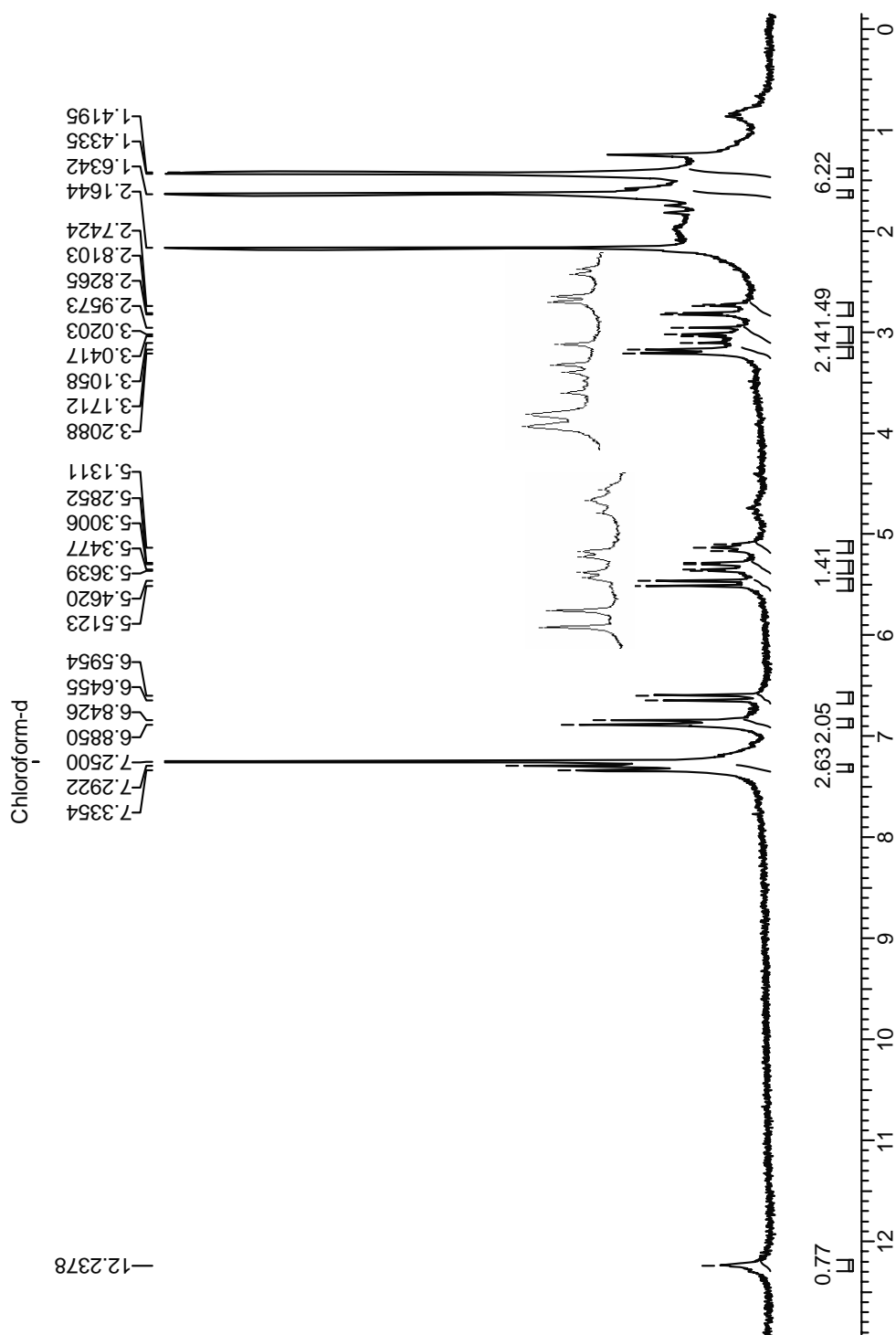


FIGURA 1.38: Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) da Substância VII (Lupinifolina).

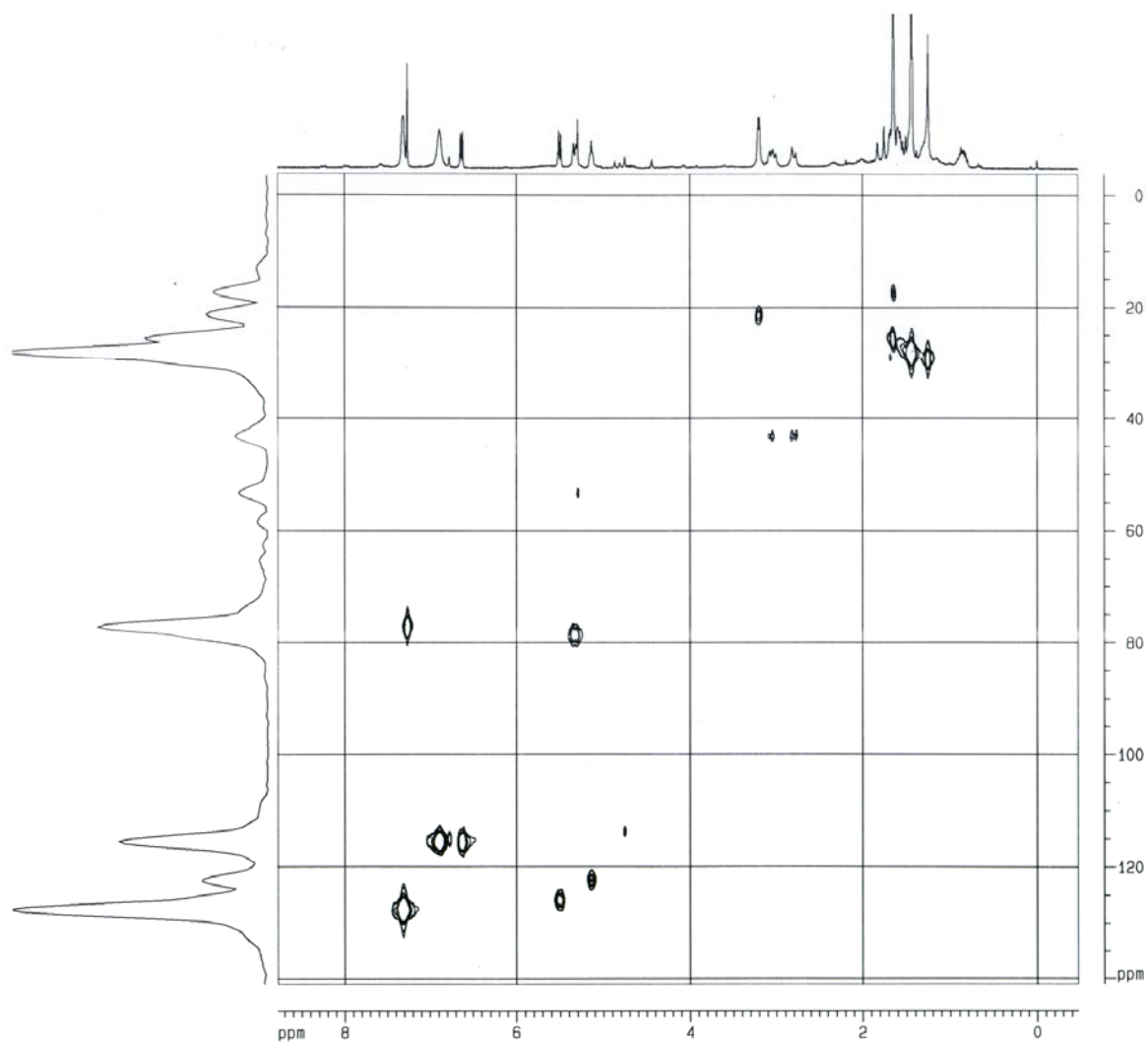


FIGURA 1.39: Experimento de HSQC (400MHz, CDCl₃) da Substância VII (Lupinifolina).

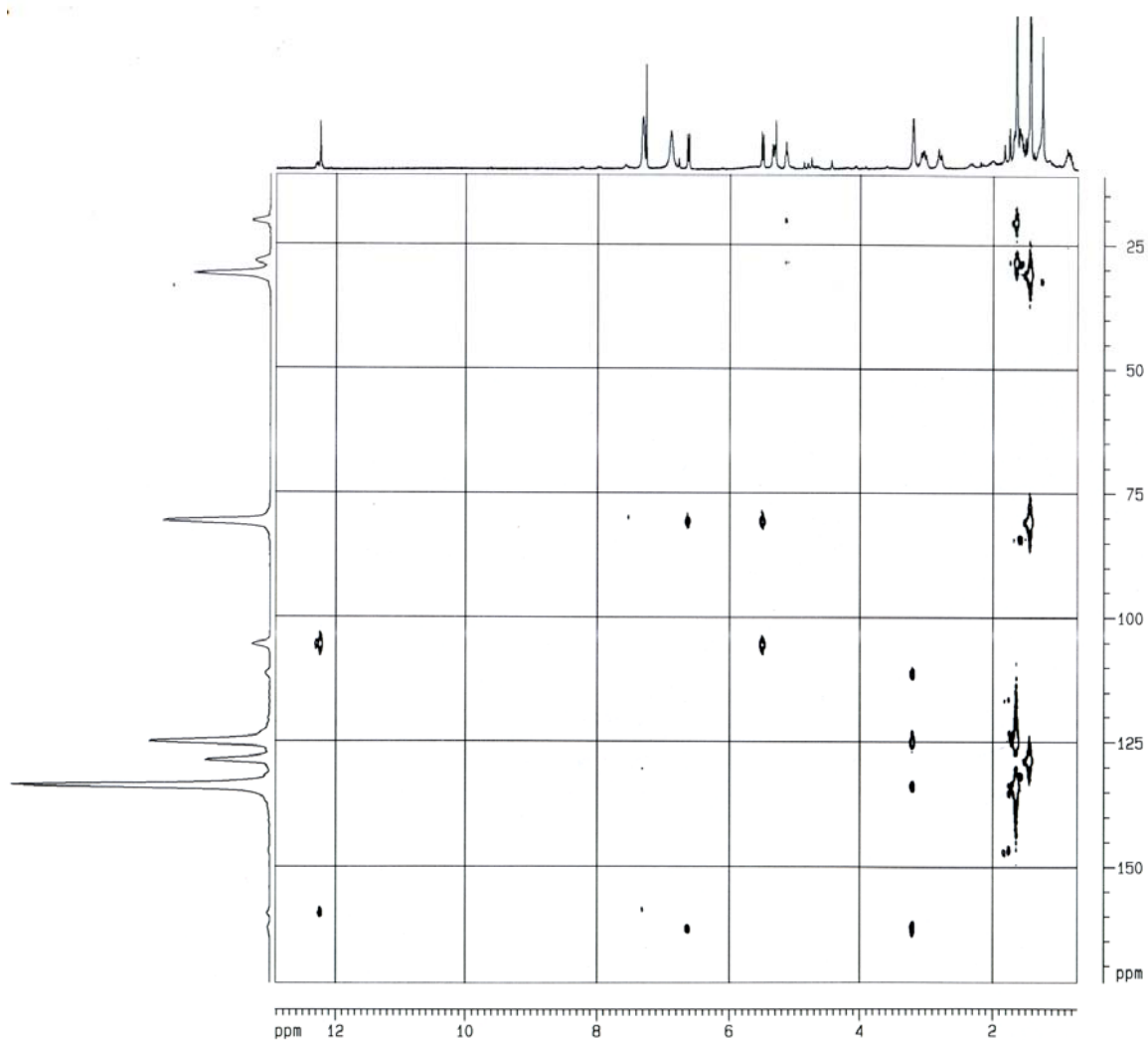


FIGURA 1.40: Experimento de HMBC (400MHz, CDCl₃) da Substância VII (Lupinifolina).

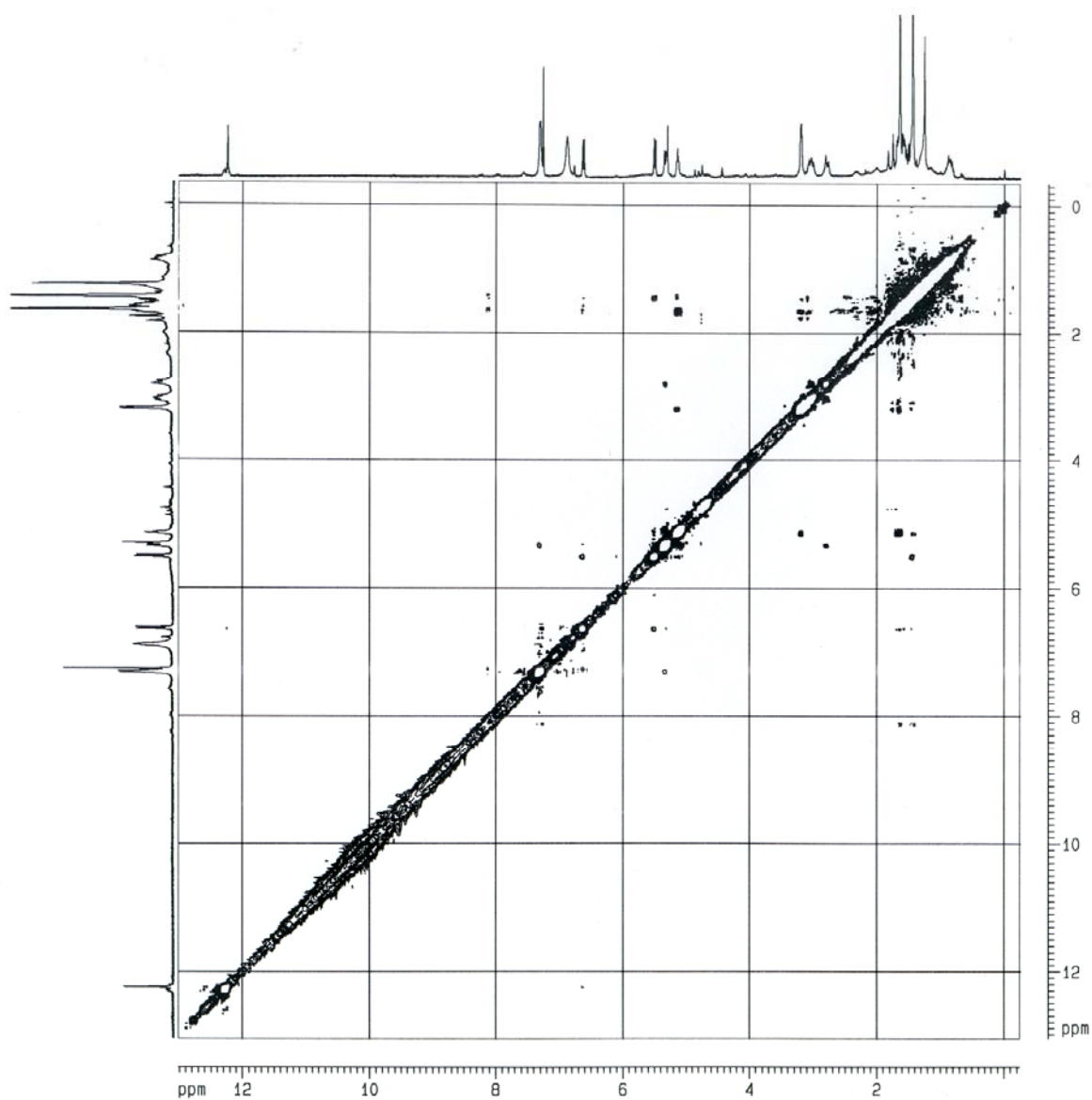


FIGURA 1.41: Experimento de NOESY (400MHz, CDCl₃) da Substância VII (Lupinifolina).

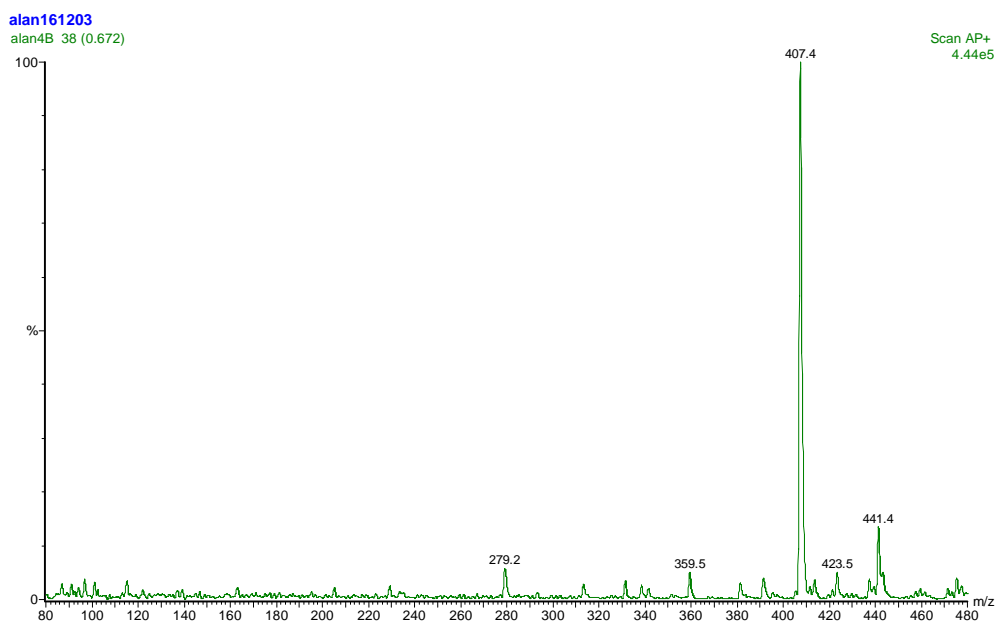


FIGURA 1.42: Espectro de massas da Lupinifolina (Substância VII).

1.6.2.3 – Identificação da Substância VIII (5,4'-dihidroxi-6-(3'''-metil-2'''-butenil)-2'',2''-dimetilpirano(5'',6''-7,8)flavanona)

A Substância VIII (**FIGURA 1.43**, p. 80), apresentou-se também como um cristal amarelo e teve sua estrutura identificada com base nos espectros de RMN 1D e 2D e por meio de comparações de dados de substâncias semelhantes mencionados na literatura (SMALBERGER et al., 1974; AGRAWAL, 1989).

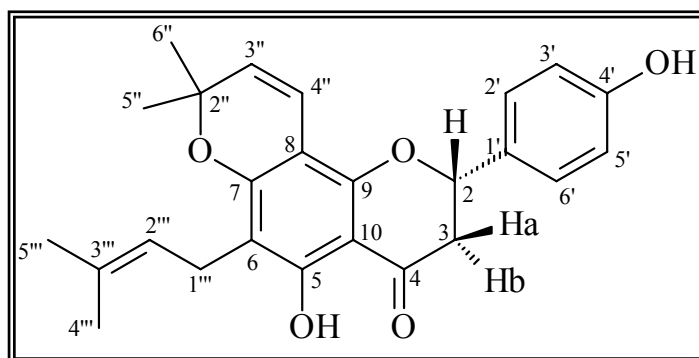


FIGURA 1.43: Estrutura química da flavanona 5,4'-dihidroxi-6-(3'''-metil-2'''-butenil)-2'',2''-dimetilpirano(5'',6''-7,8)flavanona (Substância VIII).

Pode-se observar no espectro de RMN de ^1H (**FIGURA 1.46**, p. 87) da substância VIII sinais semelhantes aos mostrados para a Limonianina (item 1.6.2.1), ou seja, um singlete em δ 12,25 da hidroxila quelada e os dois dubletos em δ 7,32 (H-2'/6') e 6,88 (H-3'/5') referente aos hidrogênios do anel B.

Pode ser observado pela ampliação do espectro de RMN de ^1H a presença de três duplo dubletos que pelas constantes de acoplamentos correlacionam-se entre si: O sinal em δ 2,80 integrando para um hidrogênio com $J= 3,0$ e 17,1 Hz (acoplamentos eq-ax e geminal); δ 3,04 integrando para um hidrogênio com $J= 12,8$ e 17,1 Hz (acoplamentos ax-ax e geminal) e δ 5,34 também integrando para um hidrogênio com $J= 3,0$ e 12,8 Hz (acoplamentos eq-ax e ax-ax). O sinal em δ 2,80 e δ 3,04 correlacionam-se pelo experimento de HSQC para o mesmo sinal de carbono em δ 43,2 e o sinal em δ 5,32 com o sinal em δ 78,0. Esses três duplo dubletos com as constantes apresentadas são característicos dos hidrogênios do anel C de uma flavanona, assim como discutido para a Lupinifolina (item 1.6.2.3).

Assim, os sinais e a estereoquímica puderam ser definidas, isto é, o sinal δ 2,80 em eq-ax (3,0 Hz) foi atribuído ao H-3a em correlação com o H-2 e geminal (17,1 Hz) referente à correlação do H-3a com H-3b; o sinal δ 3,04 em ax-ax (12,8 Hz) foi atribuído ao H-3b em correlação com o H-2 e geminal (17,1 Hz) referente à correlação do H-3b com H-3a e o sinal em δ 5,34 em eq-ax (3,0 Hz) foi atribuído ao H-2 em correlação com o H-3a e ax-ax (12,8 Hz) referente à correlação do H-2 com H-3b. Desta forma, o H-2 e o H-3a estão em beta e o H-3b em alfa como mostrado na **FIGURA 1.43**, na página 80.

Os sinais de carbonos referentes aos H-2 e H-3a e H-3b foram atribuídos por meio do espectro de RMN de ^{13}C (**FIGURA 1.47**, p. 83) e por comparação com os dados da Lupinifolina. A seguir na **FIGURA 1.44** página 82, mostra algumas correlações observadas no experimento de HMBC

(FIGURA 1.48, p. 89) que confirmam as atribuições para o anel B e C da flavanona mostradas acima:

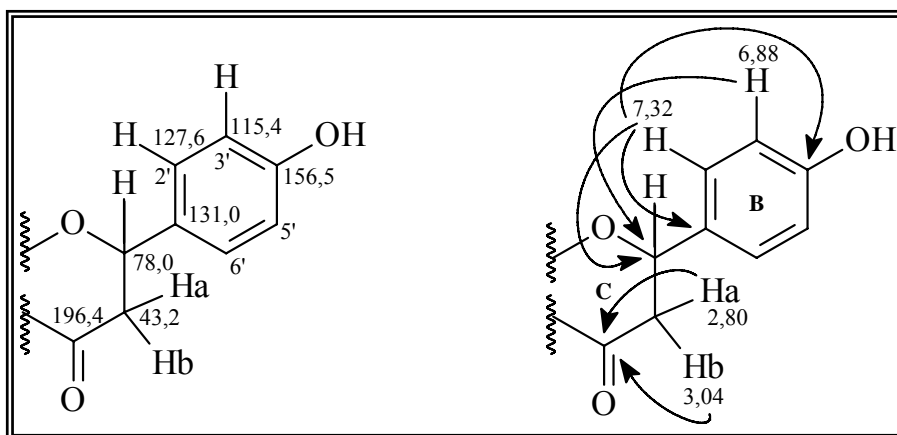


FIGURA 1.44: Correlações complementares observadas no experimento de HMBC da Substância VIII.

Todos os sinais de RMN de ^1H e ^{13}C são mostrados nas **TABELAS 1.14** e **1.15**, nas páginas 85 e 86.

O espectro de RMN de ^1H apresentou também os sinais característicos da presença de um anel pirano, ou seja, dois dubletos em δ 5,50 (pelo HSQC correlaciona-se com δ 125,9) e 6,64 (pelo HSQC correlaciona-se com δ 115,6) integrando para um hidrogênio cada com $J= 9,9$ Hz e um singlete em δ 1,44 (pelo HSQC correlaciona-se com δ 28,2) integrando para seis hidrogênios. O sinal em δ 5,50 foi atribuído ao H-3'' e o sinal em δ 6,64 por ser mais desblindado foi atribuído ao H-4''.

Foi observado também no espectro de RMN de ^1H sinais característicos de uma unidade isoprênica (prenila), ou seja, um dubleto em δ 3,21 (integrando para dois hidrogênios), um tripleto em δ 5,15 que integra para um único hidrogênio e um singlete em δ 1,65 (integrando para seis hidrogênios) indicando hidrogênios de duas metilas. Os sinais em δ 3,21 e δ 5,15 foram atribuídos aos H-1''' e H-2''', respectivamente, e o sinal em δ 1,65 referente às Me-H-4''' e Me-H-5'''.

Observando o experimento de HMBC pode-se ver as correlações do sinal em δ 3,21 (H-1''') com os sinais em δ 122,4 (C-2''') e δ 131,5 (C-3''') e do sinal em δ 1,65 (H-4'''/5''') com os sinais referentes a C-2''' e C-3''', confirmando os hidrogênios e carbonos da prenila.

Assim como para a definição da estrutura da Lupinifolina (item 1.6.2.3), falta definir a posição do anel pirano e da prenila no anel A da estrutura da flavanona. Essa definição pôde ser feita a partir de análise das correlações observadas no experimento de HMBC e também pelas correlações observadas no experimento de NOESY (**FIGURA 1.49**, p. 90). No experimento de HMBC observa-se as correlações do sinal da hidroxila quelada em δ 12,25 com os sinais de carbonos em δ 155,8 (C-5) e δ 108,5 (C-6). Baseado nesses dados e somado com as correlações entre o H-1''' (da prenila) com os mesmos sinais de carbonos C-5 e C-6, permite-se afirmar que a prenila está na posição 6. Essas e outras correlações da prenila são mostradas na **FIGURA 1.45**, na página 84. Pode-se observar também a correlação do sinal da hidroxila quelada em δ 12,25 no experimento de NOESY com o sinal em δ 1,63 referente às Me-4''' e Me-5''', confirmando assim o posicionamento da prenila. Desta forma, o anel pirano está na posição 7 e 8.

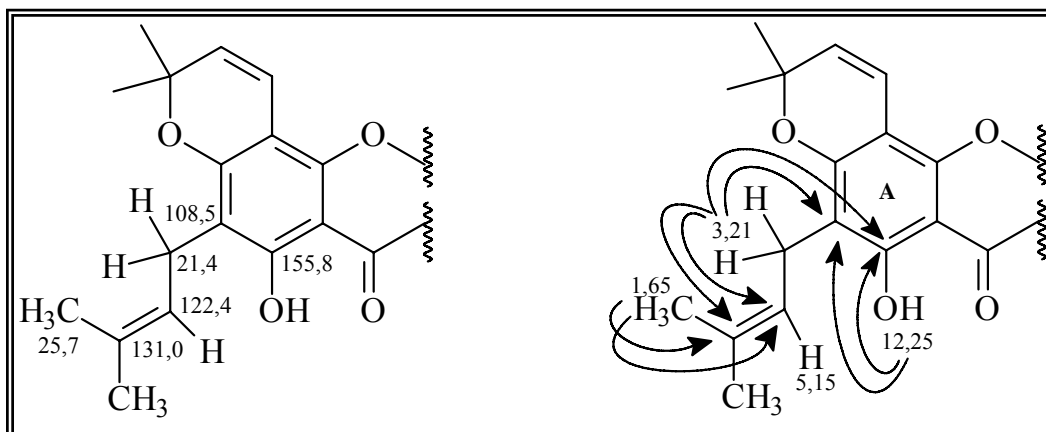


FIGURA 1.45: Correlações observadas no experimento de HMBC da substância VIII que confirmam o posicionamento da prenila no anel A da flavanona.

A estrutura da substância VIII foi confirmada pelo espectro de massas (**FIGURA 1.50**, p. 91) que apresentou o pico do *íon quase molecular* $[M+H]^+$ com relação massa/carga de m/z 407, o que está de acordo com a fórmula molecular $C_{25}H_{26}O_5$ para a estrutura sugerida. Desta forma os dados obtidos e mencionados anteriormente foram comparados com os dados de RMN de substâncias semelhantes mencionados na literatura e confirmou-se a estrutura da Substância VIII como sendo uma flavanona nova denominada **5,4'-dihidroxi-6-(3''-metil-2''-butenil)-2'',2''-dimetilpirano(5'',6''-7,8)flavanona**.

TABELA 1.14: Dados de RMN de ^1H da substância VIII (5,4'-dihidroxi-6-(3''-metil-2''-butenil)-2'',2''-dimetilpirano(5'',6''-7,8)flavanona).

Hidrogênio	Substância X isolada
2	5,34 <i>dd</i> (3,0 e 12,8) (1H)
3 a	2,80 <i>dd</i> (3,0 e 17,1) (1H)
b	3,04 <i>dd</i> (12,8 e 17,1) (1H)
2'/6'	7,32 <i>d</i> (8,5) (2H)
3'/5'	6,88 <i>d</i> (8,5) (2H)
3''	5,50 <i>d</i> (9,9) (1H)
4''	6,64 <i>d</i> (9,9) (1H)
5''/6''	1,44 <i>s</i> (6H)
1'''	3,21 <i>d</i> (7,4) (2H)
2'''	5,15 <i>t</i> (1H)
4'''/5'''	1,65 <i>s</i> (6H)
5-OH	12,25 <i>s</i> (1H)

OBS: Dados de RMN de ^1H (δ , mult., $J(\text{Hz})$) (integração) (CDCl_3 , 400 MHz).

TABELA 1.15: Dados de RMN de ^{13}C da substância VIII (5,4'-dihidroxi-6-(3'''-metil-2'''-butenil)-2'',2''-dimetilpirano(5'',6''-7,8)flavanona).

Carbono	Substância X isolada
2	78,0
3	43,2
4	196,4
5	155,8
6	108,5
7	159,3
8	102,8
9	159,8
10	102,6
1'	131,0
2'/6'	127,6
3'/5'	115,4
4'	156,5
2''	78,4
3''	125,9
4''	115,6
5''/6''	28,2
1'''	21,4
2'''	122,4
3'''	133,5
4'''/5'''	25,7

OBS: Dados de RMN de ^{13}C (δ) (CDCl_3 , 100 MHz).

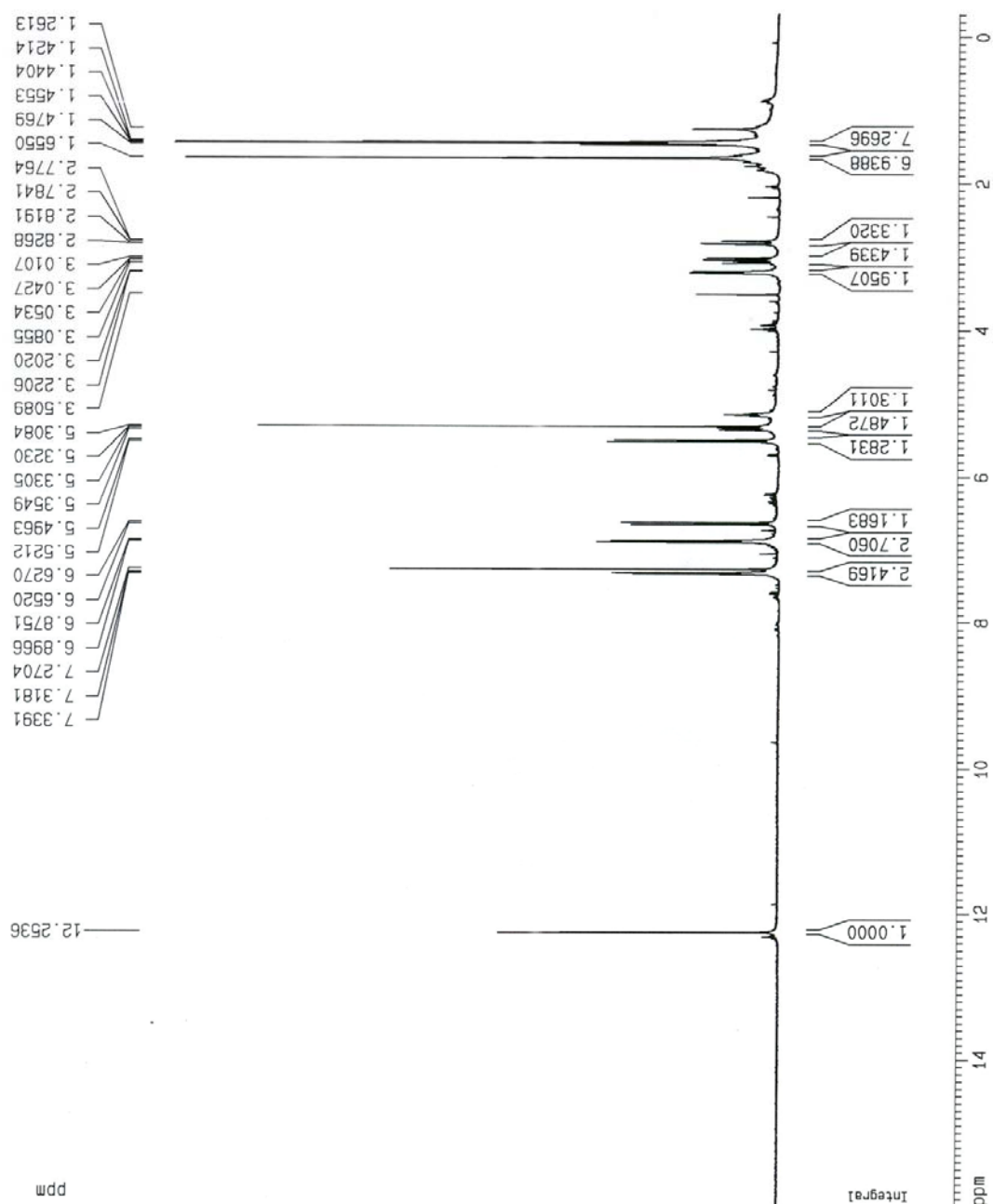


FIGURA 1.46: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da Substância VIII (5,4'-dihidroxi-6-(3'''-metil-2'''-butenil)-2'',2''-dimetilpirano(5'',6''-7,8)flavanona).

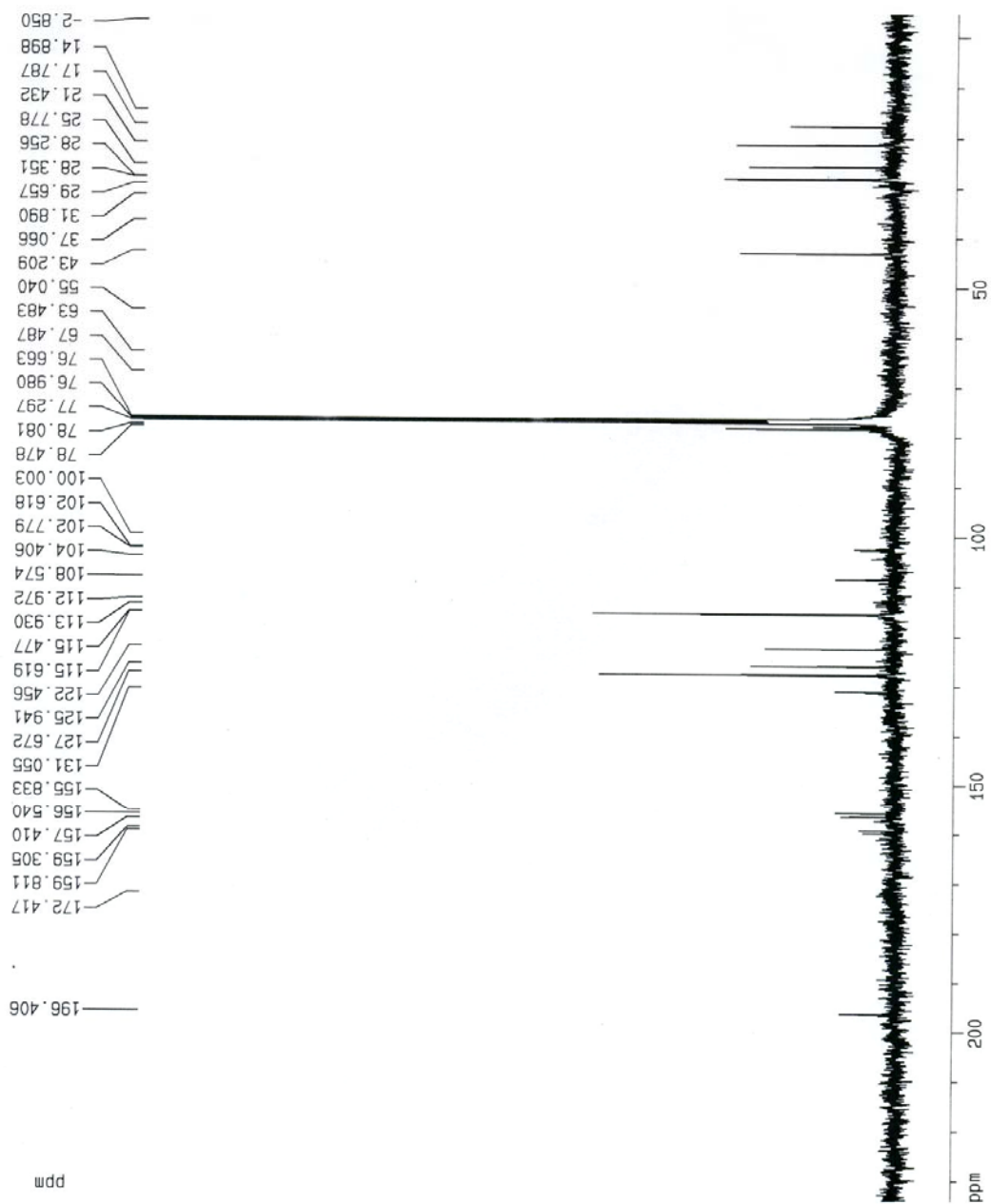


FIGURA 1.47: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da Substância VIII (5,4'-dihidroxi-6-(3'''-metil-2'''-butenil)-2'',2''-dimetilpirano(5'',6''-7,8)flavanona).

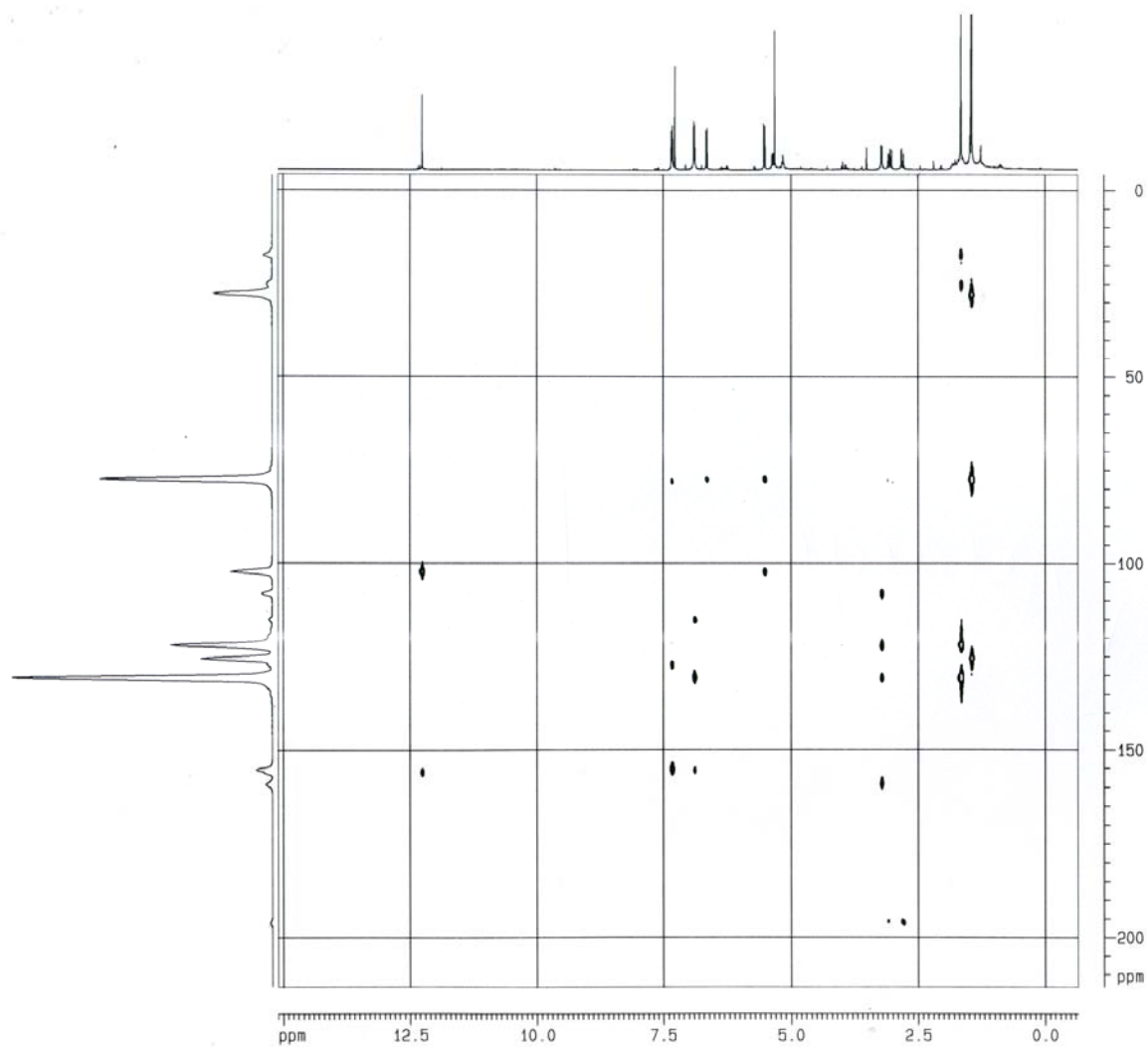


FIGURA 1.48: Experimento de HMQC (400MHz, CDCl_3) da Substância VIII (5,4'-dihidroxi-6-(3'''-metil-2'''-butenil)-2'',2''-dimetilpirano(5'',6''-7,8)flavanona).

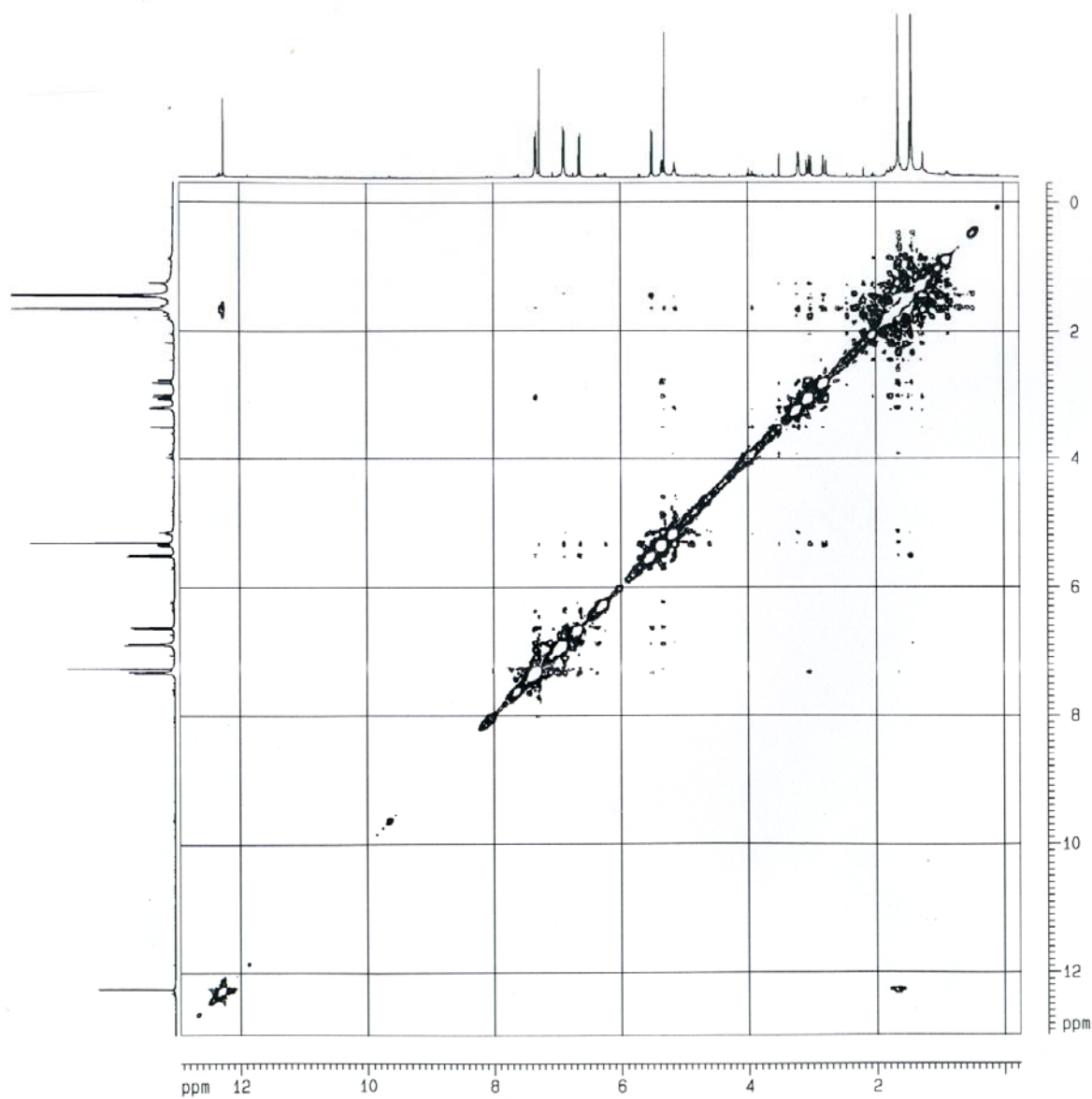


FIGURA 1.49: Experimento de NOESY (400MHz, CDCl_3) da Substância VIII (5,4'-dihidroxi-6-(3'''-metil-2'''-butenil)-2'',2''-dimetilpirano(5'',6''-7,8)flavanona).

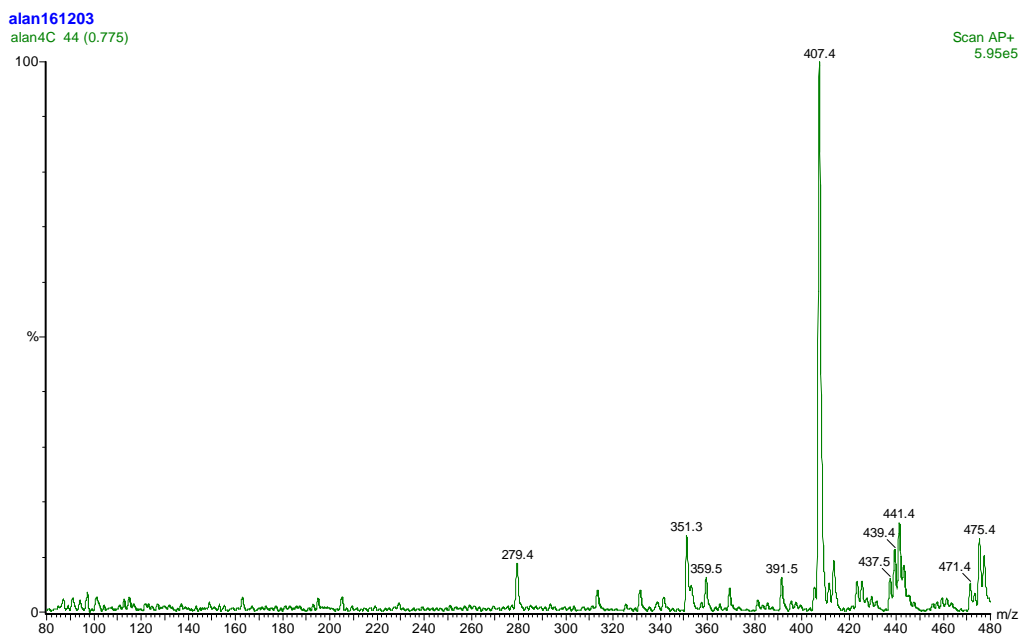


FIGURA 1.50: Espectro de massas da 5,4'-dihidroxi-6-(3'''-metil-2'''-butenil)-2'',2''-dimetilpirano(5'',6''-7,8)flavanona (Substância VIII).

1.6.3 - Alcalóide

1.6.3.1 – Identificação da Substância IX (5-hidroxinoracrinicina)

A substância IX (**FIGURA 1.51**, p. 92) apresentou-se como um cristal amarelo que ao analisar em CCDA mostrou fluorescência sob radiação UV (254 e 365 nm) e ainda coloração alaranjada quando revelada com reagente Dragendorff, evidenciando a possibilidade de tratar-se de um alcalóide. A substância IX foi analisada por RMN 1D e 2D e por espectrometria de massas sendo denominada como a 5-hidroxinoracrinicina (FRASER et al., 1973; WU et al., 1983; TAKEMURA et al., 1996), já descrito na literatura seu isolamento em *Citrus*.

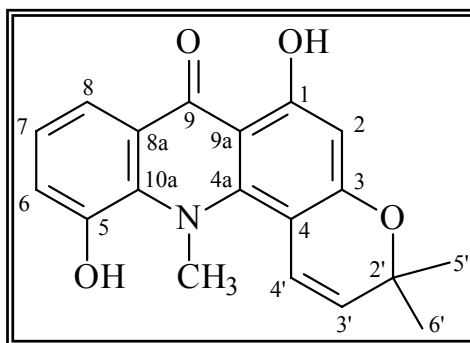


FIGURA 1.51: Estrutura química do alcalóide 5-Hidroxinoracrinicina (Substância IX).

O espectro de RMN de ^1H (**FIGURA 1.53**, p. 95) apresentou sinais em δ 7,79 *dl* integrando para um hidrogênio com $J= 8,2$ Hz; um dubleto em δ 7,33 *dl* integrando para um hidrogênio com $J= 7,4$ Hz e um tripleto em δ 7,21 também integrando para um hidrogênio, associados a hidrogênios de um anel aromático trissubstituído. Pelo experimento de COSY (**FIGURA 1.54**, p. 96) pode-se observar as correlações de δ 7,79 e 7,33 com δ 7,21 e de δ 7,21 com os sinais em δ 7,79 e 7,33. No experimento de HSQC (**FIGURA 1.55**, p. 97) pode ser visto as correlações de δ 7,79 com o sinal de carbono em δ 118,0; δ 7,33 com δ 121,0 e δ 7,21 com δ 124,0. Observa-se ainda no espectro de RMN de ^1H a presença de um singlete em δ 14,46 referente a um hidrogênio de uma hidroxila quelada de alcalóide.

Esse sinal de hidroxila quelada em δ 14,46 também pode ser característico de flavonóides 5-hidroxilado. Contudo, o espectro de massas (**FIGURA 1.57**, p. 99) mostrou um possível peso molecular inferior que aquele para um flavonóide. Conhecendo o perfil químico da família Rutaceae e de acordo com dados da literatura (TAKEMURA et al., 1998 e ITO et al., 2000) o sinal em δ 14,46 logo levou a se propor a presença de um alcalóide derivado do ácido antranílico do tipo acridônico. Desta forma, a hidroxila quelada está localizada na posição 1 como mostra a **FIGURA 1.52**, na página 93.

Observa-se também no espectro de RMN de ^1H um singlete em δ 3,84 integrando para três hidrogênios referentes uma metila ligada a um heteroátomo. Esse sinal em δ 3,84 correlaciona-se no experimento de HSQC com um sinal em δ 49,0 sugerindo uma maior blindagem em relação a um carbono ligado a um oxigênio, assim o sinal em δ 3,84 refere-se a uma metila ligada a um nitrogênio.

O espectro de RMN de ^1H mostrou ainda dois dubletos em δ 6,75 e 5,69 integrando para um hidrogênio cada e com $J= 9,7$ Hz, juntamente com o singlete correspondente a hidrogênios metílicos em δ 1,52 integrando para seis hidrogênios, indicando a presença de um anel pirano.

No experimento de NOESY (**FIGURA 1.56**, p. 98) observa-se as correlações de δ 1,52 com δ 5,68; de δ 5,68 com δ 6,75 e de δ 6,75 com 3,84, permitindo posicionar o anel pirano nas posições 3 e 4 (**FIGURA 1.52**, p. 93).

Por último, tem-se no espectro de RMN de ^1H um singlete em δ 6,11 que se correlaciona pelo experimento de HSQC com o sinal de carbono em δ 98,0 sendo atribuído ao hidrogênio na posição 2.

Todos os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C da substância IX discutidos acima são mostrados nas **TABELAS 1.16 e 1.17**, na página 94, em comparação com os dados da literatura.

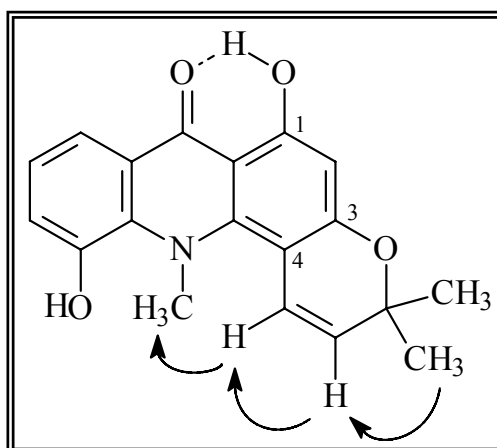


FIGURA 1.52: Correlações observadas no experimento de NOESY para a Substância IX.

O espectro de massas (**FIGURA 1.57**, p. 99) apresentou para a Substância IX o pico do *íon quase molecular* [M-H]⁻ com m/z 322, e somado aos dados discutidos acima, confirma sua estrutura como sendo o alcalóide **5-HIDROXINORACRINICINA**.

TABELA 1.16: Dados de RMN de ¹H da substância IX (5-Hidroxinoracrinicina) em comparação com dados da literatura.

Hidrogênio	5-hidroxinoracrinicina isolada	5-hidroxinoracrinicina (literatura)
2	6,11 <i>s</i> (1H)	6,13 <i>s</i>
6	7,33 <i>dl</i> (8,2) (1H)	7,32 <i>m</i>
7	7,21 <i>t</i> (1H)	7,22 <i>m</i>
8	7,79 <i>dl</i> (8,2) (1H)	7,78 <i>dd</i> (1H)
3'	5,68 <i>d</i> (9,7) (1H)	5,43 <i>d</i>
4'	6,75 <i>d</i> (9,7) (1H)	6,69 <i>d</i>
5', 6'	1,50 <i>s</i> (6H)	1,51 <i>s</i>
-NCH ₃	3,84 <i>s</i> (3H)	3,80 <i>s</i>
1-OH	14,46 <i>s</i> (1H)	14,2 <i>s</i>

OBS: Dados de RMN de ¹H (δ , mult., *J*(Hz)) (integração) (CDCl₃, 400 MHz).

TABELA 1.17: Dados de RMN de ¹³C obtidos pela projeção do HSQC da substância IX (5-Hidroxinoracrinicina).

Carbono	5-hidroxinoracrinicina isolada
2	98,0
6	121,0
7	124,0
8	118,0
3'	126,0
4'	122,0
5'	27,0
6'	27,0
-NCH ₃	49,0

OBS: Dados de RMN de ¹³C obtidos pela projeção do HSQC.

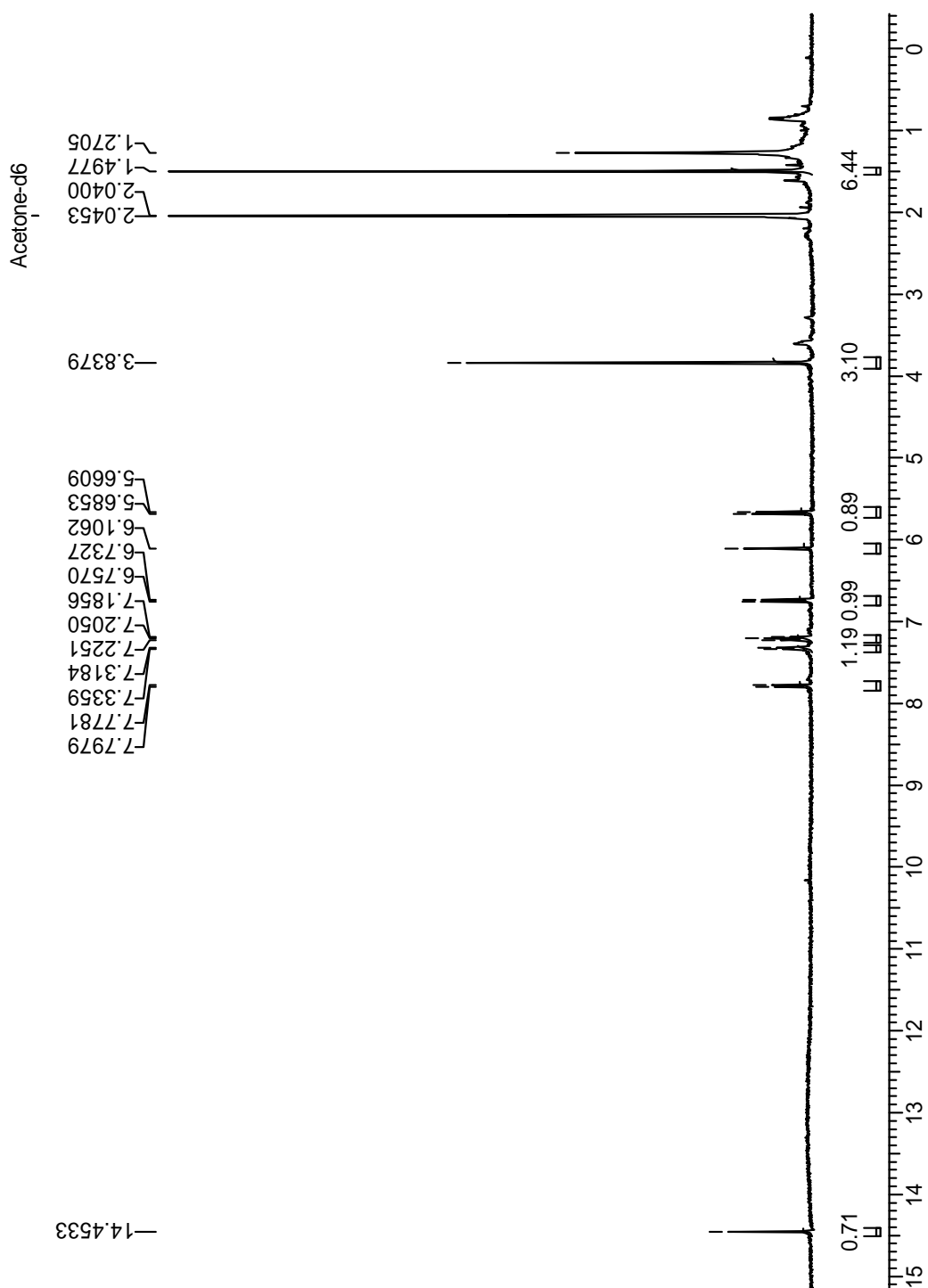


FIGURA 1.53: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, Acetona-d₆) da Substância IX (5-Hidroxinoracrinicina).

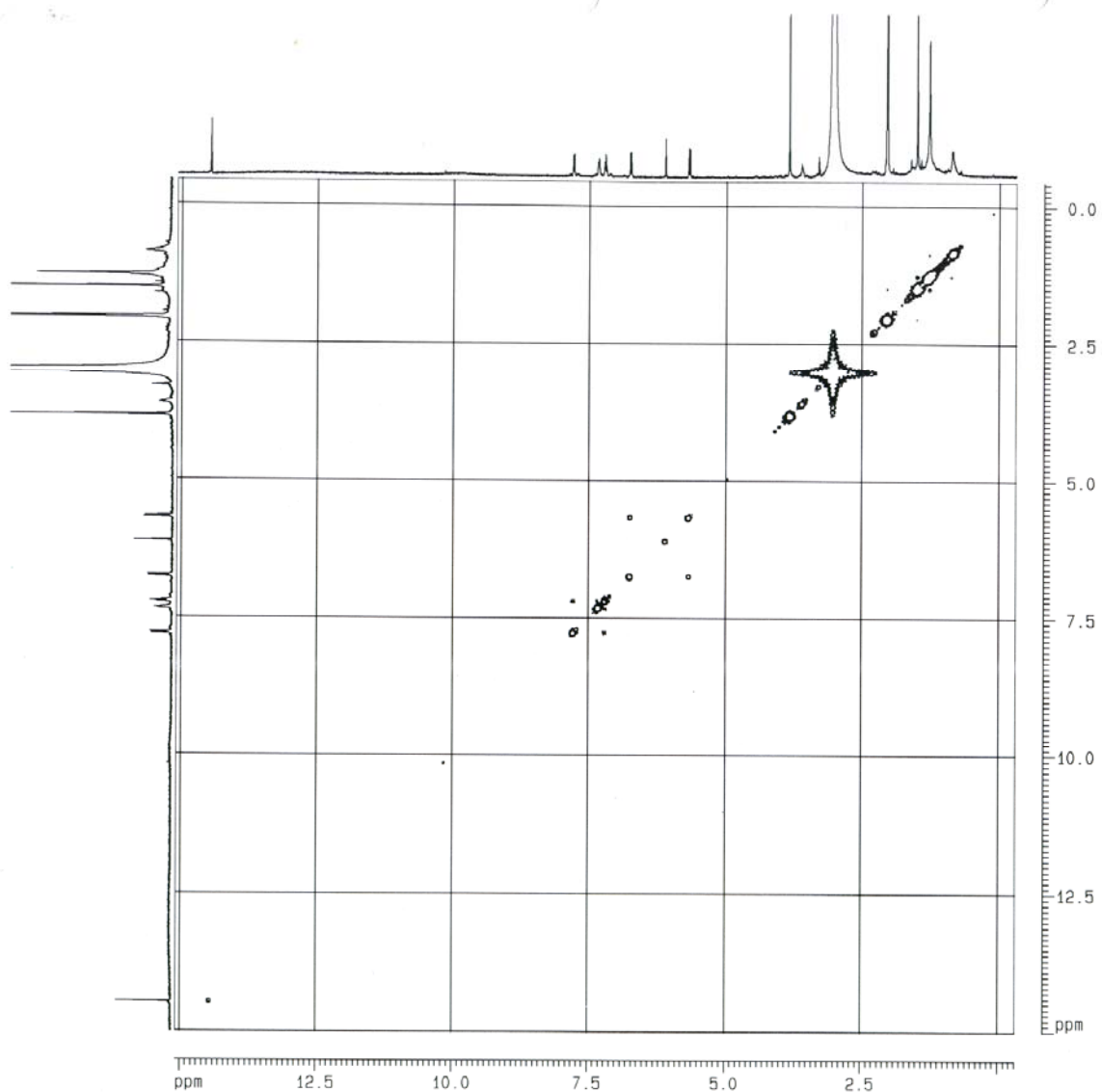


FIGURA 1.54: Experimento de COSY (400 MHz, Acetona-d₆) da Substância IX (5-Hidroxinoracrinicina).

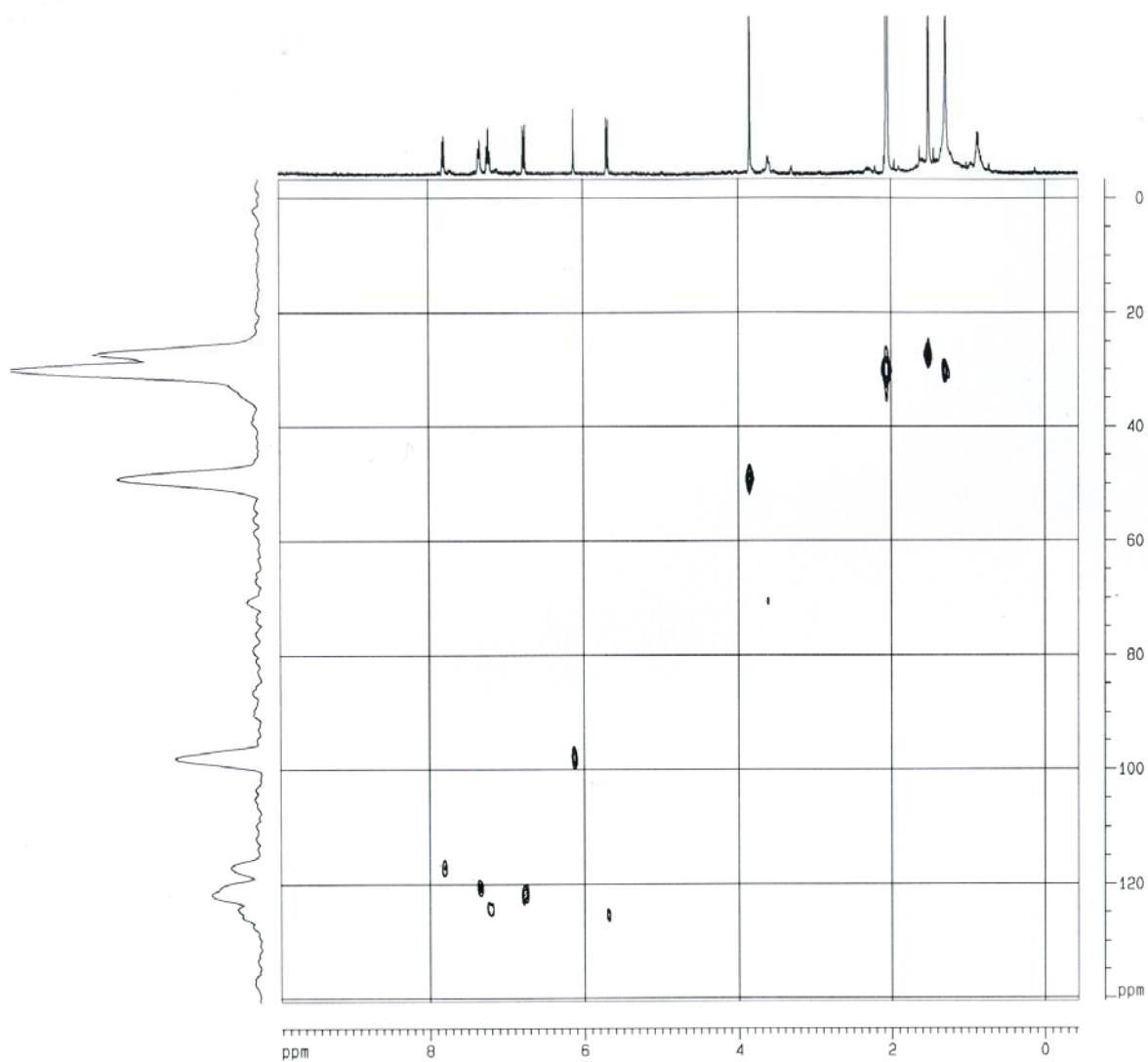


FIGURA 1.55: Experimento de HSQC (400 MHz, Acetona-d₆) da Substância IX (5-Hidroxinoracrinicina).

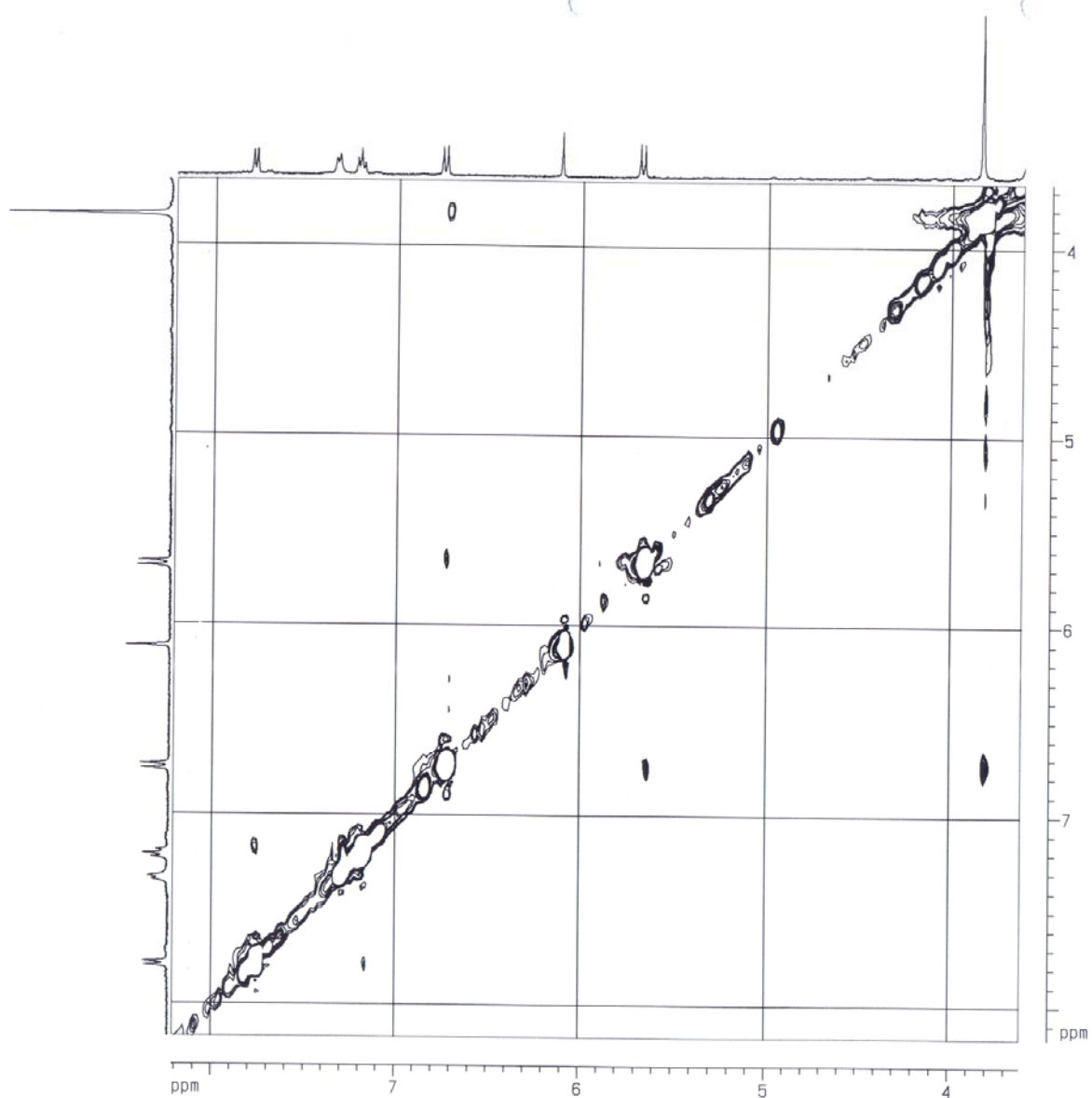


FIGURA 1.56: Experimento de NOESY (400 MHz, Acetona-d₆) da Substância IX (5-Hidroxinoracrinicina).

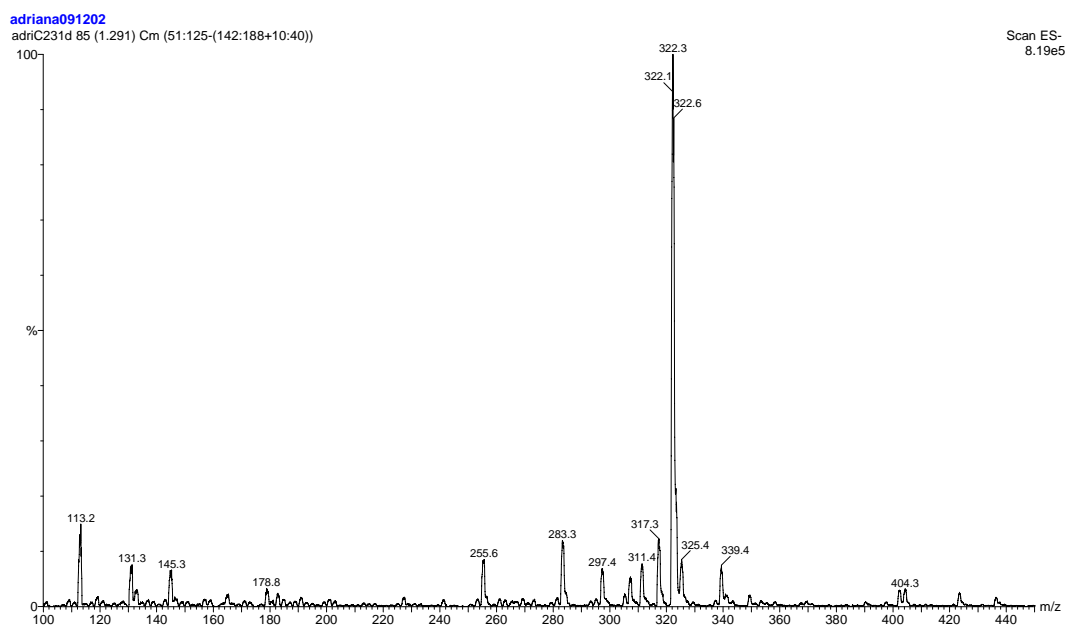


FIGURA 1.57: Espectro de massas da 5-Hidroxinoracrinicina (Substância IX).

CAPÍTULO 2

2 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA FRENTE À *GUIGNARDIA CITRICARPA*

A citricultura brasileira vem enfrentando vários prejuízos causados pela ocorrência de pragas como a Clorose Variegada dos Citros (CVC), Tristeza dos Citros (CTV), Leprose dos Citros, Pinta Preta dos Citros e Cancro Cítrico (AGUILAR-VILDOSO et al., 2002). Dentre elas, a Mancha Preta dos Citros ou Pinta Preta dos Citros afeta várias espécies do gênero, causando consideráveis danos, por afetar o aspecto dos frutos, restringindo assim, a comercialização de mudas e frutos principalmente da laranja doce (*Citrus sinensis*) (KOTZÉ, 1996). Esses danos ocasionam prejuízos no mercado externo em decorrência das barreiras fitossanitárias impostas pelos países como os EUA e a Comunidade Européia (AGUILAR-VILDOSO et al., 2002).

Desta forma, os sintomas da “mancha preta” são vistos com preocupação principalmente por prejudicarem a comercialização dos órgãos de reserva das plantas, ou seja, o produto de maior importância econômica, o fruto. (LARANJEIRA et al., 2005). Assim, considerando o ponto de vista econômico, a Mancha Preta do Citros tem grande importância por atingir os frutos nas variedades mais apreciadas para o consumo *in natura*, principalmente a laranja Pêra, depreciando-os comercialmente na aparência através de manchas, que apesar de limitadas à casca (flavedo), inviabilizam a sua comercialização, principalmente para o mercado externo (GÓES, 1998; CARDOSO FILHO, 2003).

Descrita pela primeira vez em frutos cítricos em 1895, na Austrália, a Mancha Preta causou perdas significativas em laranja Valência, resultante de infecções ocorridas nos pomares em fases de pós-colheita (GOES, 1998). No Brasil, em 1937, houve os primeiros relatos da possível presença da doença no estado de São Paulo, dado que não se confirmou, visto

que, além dos frutos de laranjeira seleta no município de Piracicaba, não houve nenhum novo relato da doença, até a sua detecção de forma epidêmica no estado do Rio de Janeiro. Considerando que as lesões encontradas não eram iguais às do agente causal e, ainda, que em nenhum país do mundo onde foi encontrada a presença do patógeno houve uma redução da doença (AGUILAR-VILDOSO et al., 2002).

A Mancha Preta dos citros é uma doença que tem sua origem fúngica atacando folhas, ramos verdes e, principalmente, frutos (LARANJEIRA et al., 2005). Uma das principais características desta doença é a ausência de sintomas típicos mesmo estando infectados, sendo que o aparecimento dos sintomas pode demorar até um ano (AGUILAR-VILDOSO et al., 2002). Há uma grande variação nos sintomas, dependendo da fase do fruto e das condições climáticas. Os tipos de sintomas (**FIGURA 2.1**, p. 103) que podem ocorrer nos frutos cítricos são: 1) mancha de falsa melanose, que causa lesões minúsculas e numerosas, semelhantes à melanose; 2) mancha dura, que se manifesta preferencialmente durante a maturação do fruto, causando lesões circulares, com o centro claro, circundadas por borda escura, é a lesão mais típica da doença e a mais fácil para sua confirmação. Ocorre principalmente na maturação dos frutos de laranja e em frutos jovens de limão; 3) mancha sardenta, é pequena, marrom-avermelhada e desenvolve-se em frutos maduros e em pós-colheita; 4) mancha virulenta, ocorre tardiamente, é profunda, marrom-avermelhada e pode cobrir grande parte da superfície do fruto; 5) mancha trincada, observada desde frutos verdes, ligeiramente saliente e superficial, variável em tamanho, podendo apresentar halo; 6) a mancha rendilhada, freqüentemente denominada como falsa melanose, expressando-se em frutos verdes (LARANJEIRA et al., 2005).

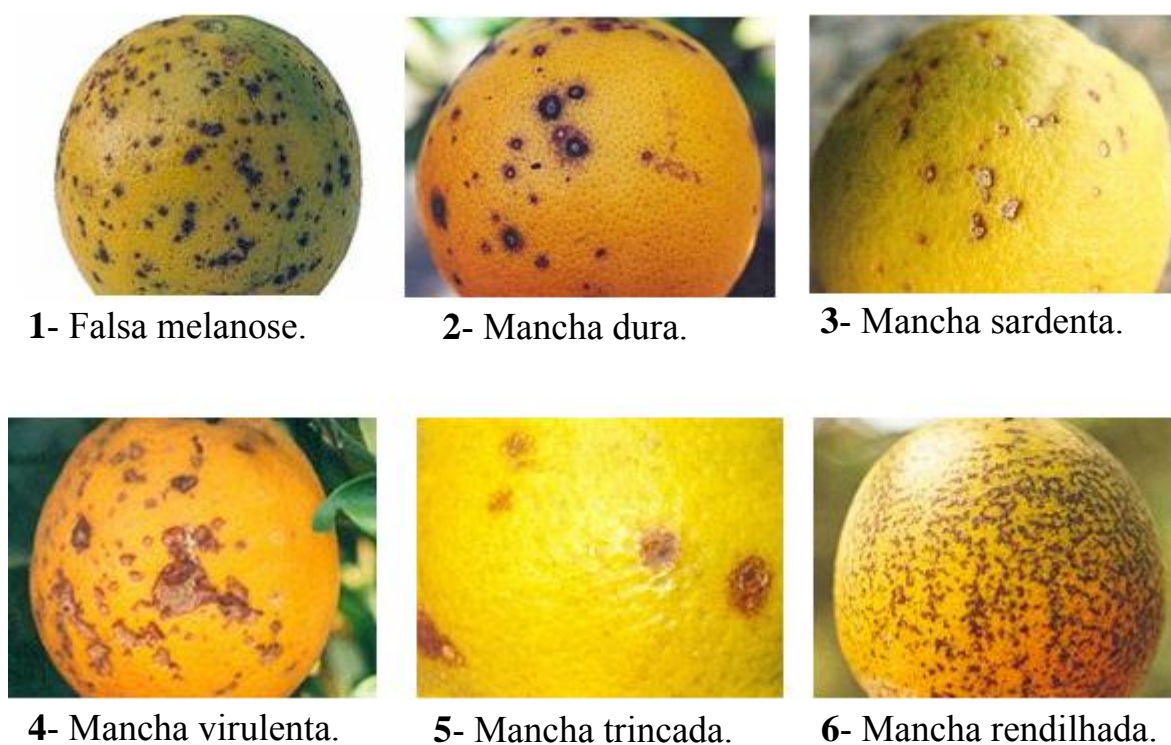


FIGURA 2.1: Sintomas da mancha preta dos citros observadas em frutos. Figura extraída do *website* da FUNDECITRUS.

O fungo causador da Mancha Preta dos frutos cítricos foi descrito por McAlpine em 1889 na sua forma assexuada e recebeu a designação de *Phoma citricarpa* e posteriormente de *Phyllosticta citricarpa*. O estágio sexual do patógeno foi descoberto por Kiely e foi chamado de *Guignardia citricarpa*, apresentando uma ampla faixa de hospedeiros compreendendo plantas de dezenas de famílias, sendo que no gênero *Citrus*, a doença ocorre em laranjas, tangerinas e limões (GOES, 1998).

A “mancha preta” dos citros apresenta os ciclos primários e secundários bem distintos. O primeiro representa a fase sexual de *Guignardia citricarpa*, cujas estruturas infectadas são os ascósporos, responsáveis pela introdução do patógeno na área e início das epidemias a cada ciclo da citricultura, sendo os ascósporos mencionados por alguns autores como a principal frente do inóculo. O ciclo secundário é caracterizado pela fase assexual do fungo (*Phyllosticta citricarpa*), onde os picinidiósporos são

responsáveis pelo incremento da doença na planta e ao seu redor (AGUILAR-VILDOSO et al., 2002).

O patógeno pode permanecer no estado latente e infectar mais de 90% das folhas em pomares altamente infectados (LARANJEIRA et al., 2005).

O desenvolvimento dos picnidiósporos e pseudotécios pode ser influenciado pela alternância de condições úmidas e secas, além de temperaturas amenas. Sob tais condições, ocorre a maturação dos pseudotécios em seis a oito semanas. Pseudotécios maduros contêm ascos, cada um com oito ascósporos (**FIGURA 2.2 (A)**, p. 104), que são ejetados no ar e disseminados pelas correntes de ar. Os picnidiósporos (**FIGURA 2.2 (B)**, p. 104) são disseminados a distâncias mais curtas e dependem de chuva. As duas formas de esporo causam infecção em frutos e folhas (LARANJEIRA et al., 2005).

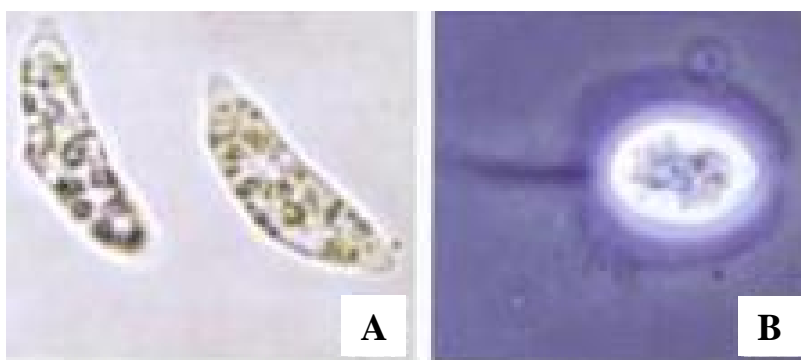


FIGURA 2.2: Ascósporos (**A**) e Picnidiósporo (**B**) de *Guignardia citricarpa* (LARANJEIRA et al., 2005).

Na **FIGURA 2.3**, na página 105 pode ser observado o ciclo da doença: No estágio **1**, as folhas infectadas em decomposição no solo permite a formação dos ascósporos, que são levados pelo vento, podendo infectar folhas, frutos e ramos. No estágio **2**, formam-se as lesões nos frutos onde são produzidos picnidiósporos, onde são levados por meio de água, que pode ser

por chuva, orvalho e irrigação. Esses picnidiósporos infectam folhas, frutos e ramos. Por último, no estágio 3, as folhas infectadas ao caírem no solo formam novos ascósporos, dando continuidade ao ciclo (FUNDECITRUS, 2006).

Assim sendo, percebe-se que se houverem fatores que provoquem danos à planta ocasionando a queda de folhas ou a debilitem - como pragas e doenças, abandono dos tratos culturais e desequilíbrios nutricionais – esses poderão favorecer ainda mais o desenvolvimento da mancha preta no citros (FUNDECITRUS, 2006).

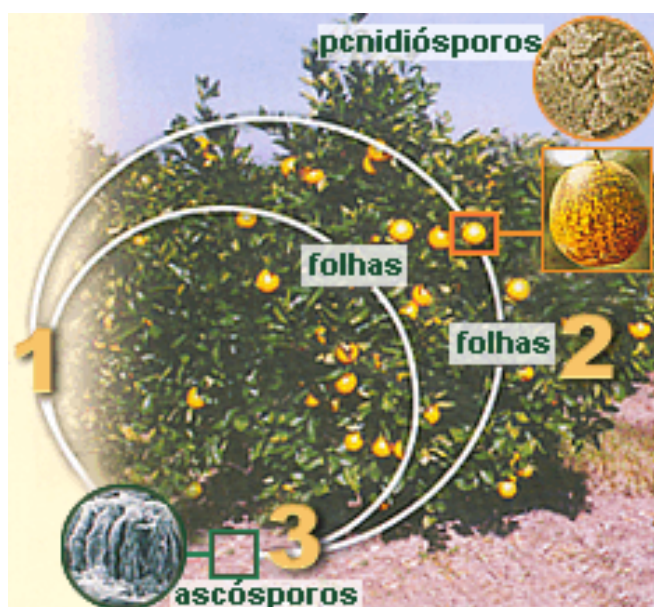


FIGURA 2.3: Ciclo da doença Mancha Preta dos Citros – Figura extraída do *website* da FUNDECITRUS.

Em função da importância econômica das frutas cítricas, buscou-se avaliar os metabólitos secundários isolados¹ do caule de *Citrus limonia* enxertado com *C. sinensis* frente ao fungo *Guignardia citricarpa* com o intuito de buscar uma ou mais substâncias que impeçam o crescimento do fungo e, assim obter possível antifúngico eficaz contra a doença. Esta

¹ Descritos no Capítulo 1.

avaliação foi realizada de duas formas: primeiro realizou-se o ensaio de inibição de *G. citricarpa in vitro* pelo método de difusão em ágar, e em seguida, o ensaio de inibição de *G. citricarpa, in vitro*, pelo método de germinação de esporos em placa de poliestireno.

2.1 - PARTE EXPERIMENTAL

2.1.1 – Materiais e métodos

2.1.1.1 – Materiais e reagentes utilizados

- Cortador com um vazador metálico (com 2cm de diâmetro);
- Alfinete entomológico;
- Placas de Petri (dimensão h x ϕ = 12 x 90mm);
- Lâminas de vidro;
- Câmara de Newbauer;
- Câmara de crescimento (Marconi, Brasil);
- Microscópio ótico;
- Meios de cultura: BDA (Batata-dextrose-ágar) e ágar-água (1,5%);
- Papel de filtro;
- DMSO;
- Acetato de amila.

2.1.1.2 – Obtenção das substâncias ensaiadas

As substâncias ensaiadas frente ao fungo *G. citricarpa* foram obtidas a partir do fracionamento cromatográfico do caule de *C. limonia* enxertado com *C. sinensis*, descrito com detalhes no **capítulo** 1 desta tese. São elas: Xantiletina (Substância II), Seselina (Substância III), Suberosina (Substância I), Crenulatina (Substância V), Tamarina (Substância IV), Limonianina (Substância VI) e 5-Hidroxinoracrinicina (Substância IX).

2.1.1.3 – Patógeno

O fungo *Phyllosticta citricarpa* foi repicado em BDA (Batata-dextrose-ágar) e cultivado em câmara de crescimento a 26°C, sob alternância de luz, 12h de claro e 12h de escuro, com o uso de lâmpada fluorescente durante 25 dias. Após repicagem, obteve-se os picnidiósporos do fungo por meio do crescimento do mesmo em fragmentos de folhas de limão siciliano que foram autoclavadas por 20 minutos em água destilada e colocadas em placas de Petri com meio agar-água (1,5%), sendo 5 fragmentos por placa. Em pontos próximos ao fragmento de folha, foram colocados discos de micélio, ou seja, colônias com 20 dias de crescimento em BDA. Passado 14 dias, observou-se a presença de picnídios na superfície das folhas.

2.1.2 – Ensaio de inibição de *G. citricarpa in vitro* pelo método de difusão em ágar

Para a detecção de substâncias com atividade antifúngica *in vitro*, utilizou-se o método de difusão. Por este método buscava-se detectar

quais substâncias possuem atividade inibindo o crescimento de micélios do fungo *G. citricarpa*.

O meio sólido de cultura utilizado foi o BDA (batata-dextrose-ágar), onde este material, depois de preparado e esterilizado em autoclave, foi vertido em placas de Petri e mantidas em capela de fluxo laminar até a solidificação. Essas placas de Petri foram preparadas para os ensaios realizando-se no meio de cultura, três poços de 5 mm de diâmetro cada, de forma que circundassem a região central da placa, onde se inoculou o fungo. Nesses três poços foram adicionados 100 μ L das soluções em DMSO nas concentrações de 5,00 mg/mL, 2,50 mg/mL e 1,25 mg/mL, para cada substância testada. Depois do período de desenvolvimento do fungo foi avaliado o potencial fungitóxico desses materiais através da inibição do crescimento do microrganismo. A seguir, na **FIGURA 2.4** na página 109 é mostrado, segundo este método de difusão, uma placa sem a inibição do crescimento do fungo (**a**) e outra com atividade antifúngica, demonstrada pela inibição do crescimento do fungo no local, ou seja, próximo ao local onde foi adicionado um composto com potencial antifúngico frente ao fungo *G. citricarpa* (**b**).

Este método se restringe a um dado apenas qualitativo, visto que só é possível determinar se uma dada substância inibe ou não o crescimento de micélios do fungo, ou seja, não se pode mensurar o quanto de inibição do fungo foi observado.

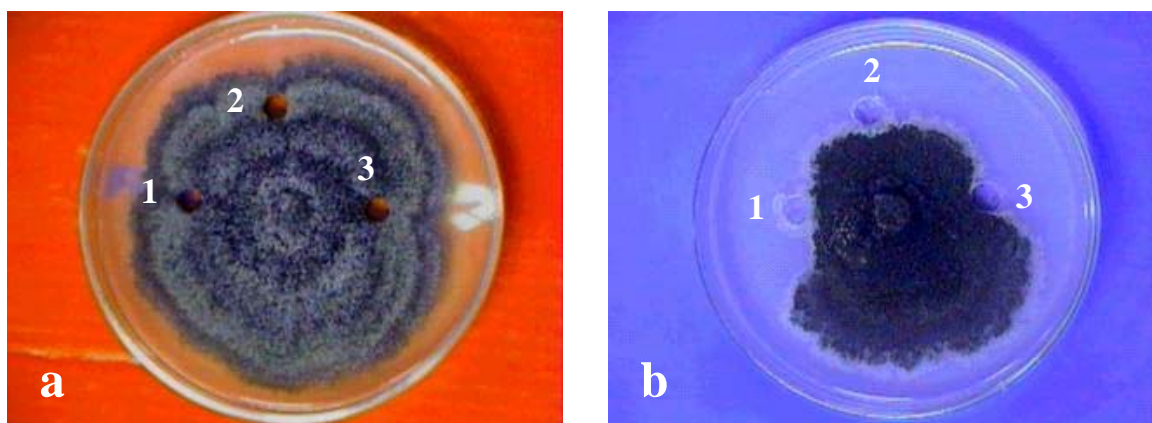


FIGURA 2.4: Demonstração do crescimento e inibição do fungo *G. citricarpa* pelo método de difusão em ágar. (a) crescimento sem inibição do fungo; (b) Inibição do crescimento do fungo próximo aos poços (1, 2 e 3) onde foi adicionado uma substância com potencial antifúngico.

2.1.3 – Ensaio de inibição de *G. citricarpa*, *in vitro*, pelo método de germinação de esporos em placa de poliestireno

Outro meio de determinação da inibição do fungo *G. citricarpa* realizado neste trabalho foi via a germinação de esporos. A obtenção dos esporos de *G. citricarpa* foi feita crescendo o fungo em folhas (cortadas com um vazador metálico com 2 cm de diâmetro) de *Citrus*, as quais foram autoclavadas em água destilada por 20 min e colocados em placa de Petri (de dimensões $h \times \phi = 12 \times 90$ mm) com meio ágar-água (1,5%), sendo 5 fragmentos por placa, como mostrado na **FIGURA 2.5a**, na página 111. Em pontos próximos ao fragmento da folha, foram colocados discos de micélio (colônias com 20 dias de crescimento em BDA) (**FIGURA 2.5a**). Após 14 dias observou-se, com auxílio de uma lupa, a presença de uma matriz gelatinosa no ostíolo do picnídio (**FIGURA 2.5b**) que foi coletada, sob lupa (que permitiu um aumento de visualização de 200 vezes), com auxílio de um alfinete entomológico, sendo em seguida, essa massa utilizada para o preparo

das suspensões de conídios (2×10^4 conídios mL⁻¹) (**FIGURA 2.5c**), quantificados em câmara de Newbauer.

A obtenção dos picnidiósporos é realizada segundo MCONIE (1964, 1967) e BLANCO (1999), onde são retirados a partir de uma massa gelatinosa presente no ostíolo dos picnídios, sendo necessário viabilizar a massa desses picnidiósporos. Isso é feito por meio de observação em lâminas de poliestireno com auxílio de um microscópio (que permite o aumento de visibilidade de 400 vezes) e confirmada a partir da germinação dos mesmos, em H₂O destilada esterilizada, após 12h de inoculação em câmara de crescimento a 25°C.

Para a produção das lâminas recobertas com filme de poliestireno, obteve-se uma solução de poliestireno, através da solubilização de uma placa de petri de poliestireno (de dimensões h x ϕ = 12 x 90 mm) moída em 100,0 mL de acetato de amila. Em seguida, mergulhou-se um número desejado de lâminas de vidro nessa solução de poliestireno e deixou-se secar por um período de 6 horas em capela, obtendo-se, assim, um filme de poliestireno nas lâminas de vidro. A lâmina de poliestireno tem a função de mimetizar a superfície hidrofóbica das folhas de *Citrus*.

O experimento é realizado utilizando-se uma placa de Petri de vidro (h x ϕ = 12 x 90 mm), a qual é forrada no interior com papel de filtro circular e adicionando-se uma lâmina de vidro sem o filme de poliestireno sobre este papel de filtro, para que a lâmina superior não tenha contato com o papel de filtro. Sobre esta lâmina, sobrepõe-se uma outra lâmina de vidro, mas agora recoberta com filme de poliestireno de tal modo que se forme uma cruz, umedecendo em seguida o papel de filtro com água destilada (**FIGURA 2.5d**) (LEITE, 1992).

O experimento é conduzido adicionando-se 20 μ L da suspensão de esporos mais 20 μ L da solução em DMSO/H₂O (1:1) da substância a ser testada sobre a lâmina de vidro que é recoberta com o filme de poliestireno.

As placas de Petri contendo o experimento são seladas com plástico transparente e incubadas em câmara de crescimento à temperatura de 26°C e luz fluorescente constante por 12h. Com o auxílio de um microscópio é possível observar a germinação dos picnidiósporos, nos períodos de 12, 18 e 24 horas do início do experimento.

São considerados como germinados os picnidiósporos com tubos germinativos maior que o comprimento do próprio picnidiósporos (**FIGURA 2.5e e f**) (GLIENKE, 1995). Se não houver germinação dos picnidiósporos, dentro do período de 24 horas, o composto testado pode ser tido como um agente fungitóxico.

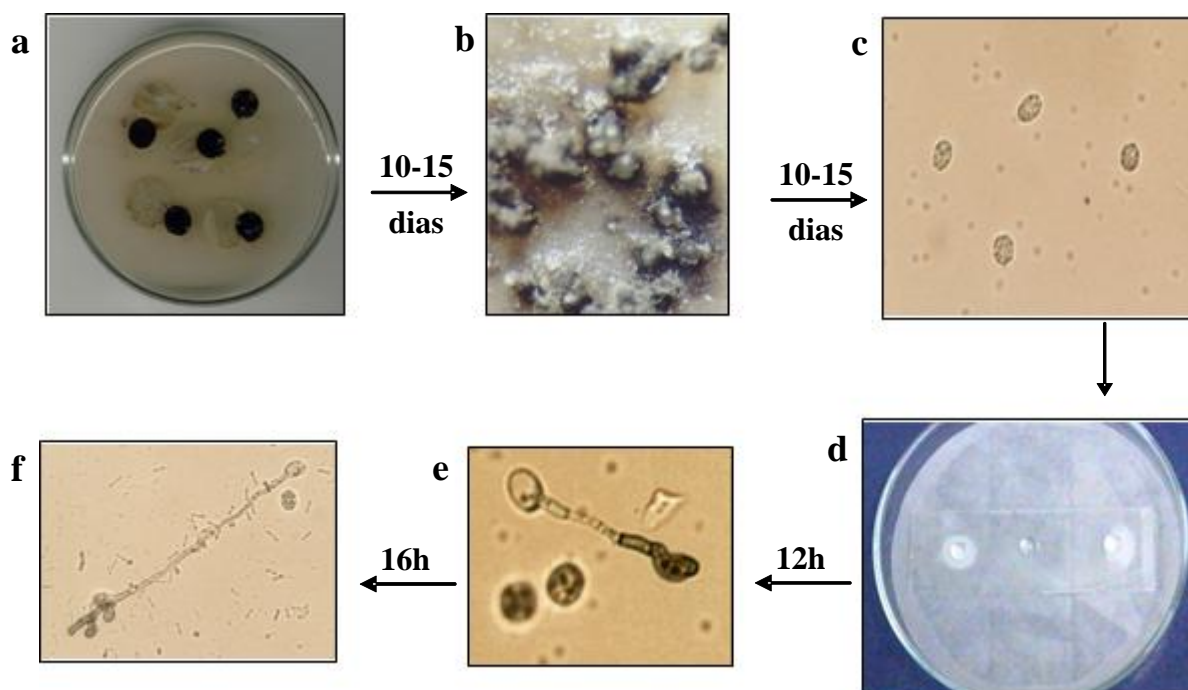


FIGURA 2.5: Germinação de picnidiósporos e formação de apressório de *Phyllosticta citricarpa* (teleomorfo: *Guignardia citricarpa*) a partir de picnídios formados em folhas de *Citrus* (**a**). Massa de picnidiósporos na superfície do ostíolo do picnídio (**b**); Picnidiósporos ainda não germinados (**c**); Placa de Petri com papel de filtro umedecido e placas de vidro em forma de cruz onde se realiza o experimento de inibição (**d**); Germinação do picnidiósporo e formação de apressório de *P. citricarpa* (**e – f**) após 12 e 16h.

2.2 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foram mostrados na parte experimental do presente capítulo como se procederam aos experimentos para testar atividade antifúngica (frente ao fungo *G. citricarpa*) das substâncias isoladas do porta-enxerto de *C. sinensis* sobre *C. limonia*.

Iniciou-se os testes com as cumarinas Suberosina (Substância I) e Xantiletina (SubstânciaII) avaliando a inibição de *G. citricarpa* pelo método de difusão em ágar com o intuito de saber quais substâncias isoladas do porta-enxerto de *Citrus* poderiam ter atividades antifúngica, porém este teste inibe apenas a formação de micélios, e estes não estão envolvidos diretamente com o processo de infecção das plantas.

Dentre as substâncias testadas frente ao fungo, a cumarina Suberosina (I) apresentou inibição do crescimento de micélios do fungo em todas as três concentrações da cumarina utilizadas no ensaio. Este resultado mostra que as substâncias isoladas na parte inferior do enxerto de *C. sinensis* sobre *C. limonia* podem ser promissoras frente ao fungo. Vale também mencionar que este dado é apenas qualitativo, como já foi dito anteriormente no item 2.1.2. Mas o intuito aqui é de se ter uma idéia de atividade frente ao fungo quando se utiliza substâncias isoladas do caule de *C. limonia* enxertado com *C. sinensis*. Desta forma, esse resultado mostrou que substâncias preniladas isoladas na parte inferior do enxerto podem ser possíveis antifúngicos.

Vale ressaltar que esse teste foi realizado no início da pesquisa, quando não se havia isolado um grande número de substâncias, por isso se utilizou no teste um número muito pequeno de substâncias isoladas do porta-enxerto de *C. sinensis* sobre *C. limonia*. Posteriormente, pelo fato deste teste não mostrar resultado frente ao órgão do microrganismo em que se dá a infecção nas plantas, restringiu-se somente a estes dados aqui apresentados,

que foram de grande valia, pois mostraram a potencialidade de uma substância isolada do porta-enxerto.

Em seguida, pretendia-se ter um dado quantitativo de inibição do fungo e mais direcionado com o órgão do microrganismo em que se dá a infecção nas plantas, ou seja, os conídeos (esporos do fungo) e ainda, testar outras substâncias que foram sendo isoladas durante esta pesquisa de doutorado. Esses dados foram obtidos no Laboratório de Fitopatologia da ESALQ/USP de Piracicaba. Os ensaios foram realizados avaliando a inibição de *G. citricarpa*, *in vitro*, pelo método de germinação de esporos em placa de poliestireno.

Os resultados foram avaliados como mencionado no item 2.1.3 e as substâncias ensaiadas foram as cumarinas Xantiletina (Substância II), Seselina (Substância III), Suberosina (Substância I), Crenulatina (Substância V) e Tamarina (Substância IV); o flavonóide Limonianina (Substância VI) e o alcalóide 5-Hidroxinoracrinicina (Substância IX), todas isoladas do porta-enxerto de *C. sinensis* sobre *C. limonia*.

As substâncias testadas foram solubilizadas em uma solução de DMSO/H₂O (1:1) numa concentração de 0,5 mg/mL. Essa proporção do solvente é devido à não solubilidade das substâncias em uma solução aquosa, ideal para o ensaio. Foram realizados ensaios preliminares com o solvente para se saber qual quantidade máxima DMSO seria possível para que não houvesse interferência nos resultados a serem obtidos, chegando-se à proporção de 50% de DMSO, o que foi possível para solubilização das substâncias testadas.

Um dado importante é que antes da leitura, em cada lâmina, foram adicionados 10uL de uma solução contendo 27mL de metanol, 63 mL de água e 15mL de formol (37%), visando paralisar a germinação dos picnidiósporos (CARDOSO FILHO, 2003).

Como o ensaio é baseado na germinação de picnidiósporos, são considerados segundo GLIENKE (1995) como germinados os picnidiósporos com tubos germinativos maiores que o comprimento do picnidiósporo não germinado. Desta forma, o ensaio procedeu com a contagem de 100 esporos por repetição, sendo realizado quatro repetições para cada substância testada.

Dentre as substâncias testadas, podemos observar, como mostrados nos gráficos a seguir, que as cumarinas Seselina (Substância III) e Crenulatina (Substância V) apresentaram resultados mais promissores pela maior inibição na germinação de picnidiósporos (**GRÁFICO 2.1**, p. 114) e formação de apressórios (**GRÁFICO 2.2**, p. 115) do fungo *G. citricarpa*, apresentando uma porcentagem de 98,5 e 99,25 %, respectivamente, seguido pelo flavonóide Limonianina com 83 % e o alcalóide 5-Hidroxinoracrinicina com 79 %. Cada valor representa a média de quatro repetições dos dados percentuais observados, em relação a 100 picnidiósporos.

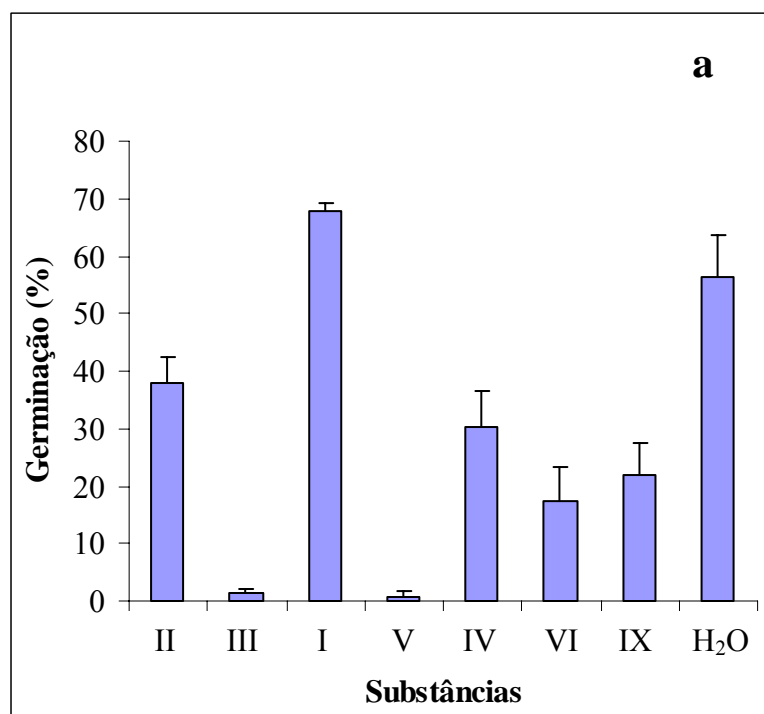


GRÁFICO 2.1: Efeito das substâncias isoladas do enxerto de *C. sinensis* sobre *C. limonia* na germinação de picnidiósporos de *G. citricarpa*.

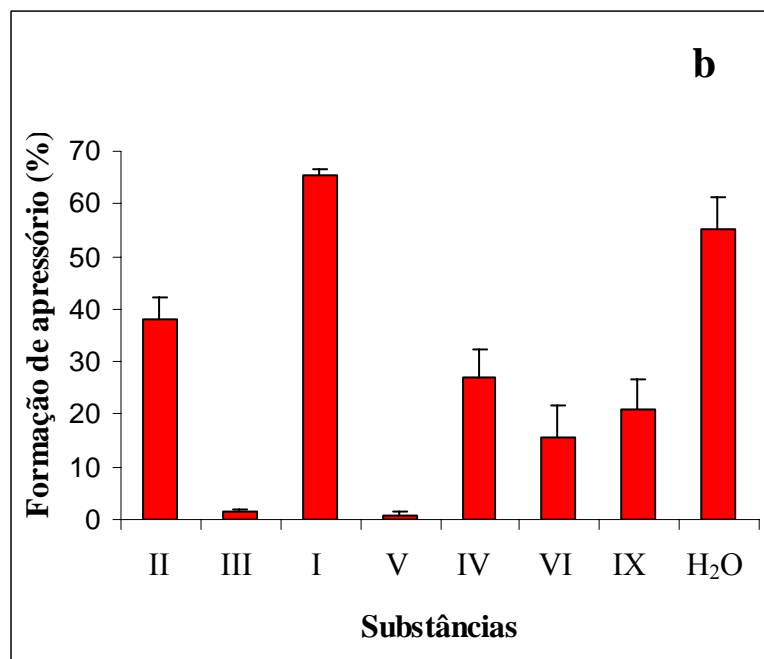


GRÁFICO 2.2: Efeito das substâncias isoladas do enxerto de *C. sinensis* sobre *C. limonia* na formação de apressórios (**b**) de *G. citricarpa*.

CAPÍTULO 3

3 - ESTUDO BIOSSINTÉTICO DE CUMARINAS PRENILADAS

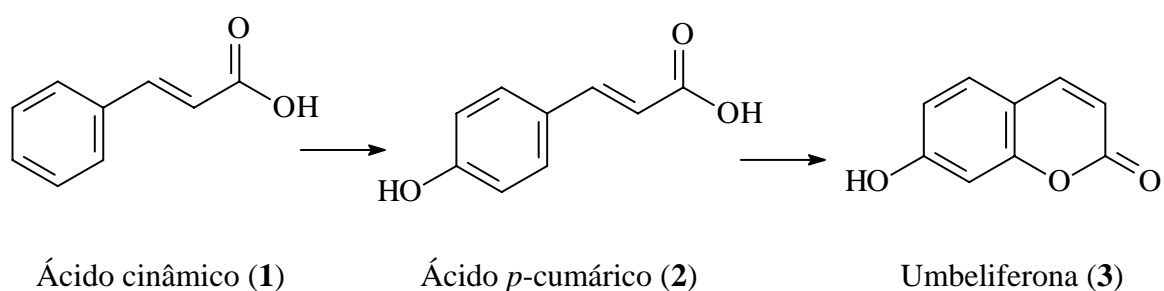
A biossíntese dos metabólitos biologicamente ativos é determinada por interações ecológicas, sendo que a co-evolução de plantas, insetos, microorganismos e mamíferos conduz à síntese de metabólitos secundários com funções principalmente de defesa e atração (RHODES, 1994). Os metabólitos, de acordo com a classe química a que pertencem, são potencialmente ativos em uma determinada função. Essa função também depende da localização na planta em que são metabolizados e assim a formação destes metabólitos são condicionados às reações enzimáticas que ocorrem em nível de compartimentos celulares (ENGLARD, 1990).

Após determinar a classe química de alguns metabólitos pode porpôr-se uma rota biossintética, ou seja, a biogênese, que é baseada no seu metabolismo primário derivadas de substâncias do caminho do mevalonato, acetato, chiquimato e ácidos aminados (BERGAMO, 2003).

O estudo para determinação de rotas biossintéticas de metabólitos secundários está associado ao fato de que quando uma substância com alguma atividade biológica e de interesse farmacológico é isolada, muitas vezes, é necessário otimizar a produção destes metabólitos. Para tanto, é importante conhecer a enzima ou sistema enzimático envolvido na biossíntese desta substância, além de conhecer seu mecanismo de ação, seus ativadores e inibidores, entre outras características.

Desta forma, com intuito de se conhecer melhor sobre o mecanismo de ação das piranocumarinas que foram as substâncias isoladas em maior quantidade das raízes de plantas de *C. limonia* enxertadas com *C. sinensis* e ainda por serem as únicas cumarinas preniladas isoladas nas folhas do mesmo enxerto, é que se segue um estudo biossintético. Levou-se em consideração nesse estudo pesquisas já realizadas desde 1942 em que o ácido

p-cumárico (2), formado a partir do ácido cinâmico (1), é utilizado como precursor geral de cumarinas 7-oxigenadas sintetizadas em plantas e que uma hidroxilação na posição *meta* em relação à hidroxila existente no ácido *p*-cumárico é necessária para a formação do anel lactônico o que leva à formação da Umbeliferona (3), cumarina precursora para a formação das piranocumarinas (NIELSEN, 1970).



Esta hidroxilação é mecanisticamente desfavorável o que torna essa etapa biossintética aparentemente duvidosa. Para isto, os experimentos realizados em *Hydrangea macrophylla* e *Lavandula officinalis*, tendo como substratos marcados o ácido *trans-p*-cumárico (2) e seu β -D-glicosídeo (4), o ácido *cis-p*-cumárico, ácido *trans*-cinâmico, espirolactona, ácido *trans-o*-cumárico e seu β -D-glicosídeo, demonstraram que o ácido *trans-p*-cumárico e seu β -D-glicosídeo são prontamente transformados em umbeliferona (3), enquanto que os demais são precursores ineficientes.

Os passos para a formação da Umbeliferona (3) foram realizados *in vitro* segundo Austin (1965) e seguem a partir da transformação do ácido *trans*-2,4-di- β -D-glicosiloxicinâmico (6) ao *cis*-2,4-di- β -D-glicosiloxicinâmico (7) e posteriormente à skimmina (8). Em estudos posteriores realizados com *Hydrangea macrophylla* foram isolados a skimmina e o ácido *cis*-2,4-di- β -D-glicosiloxicinâmico (5), o que permite esquematizar a biossíntese de umbeliferona como mostrado na **FIGURA 3.1**, na página 119.

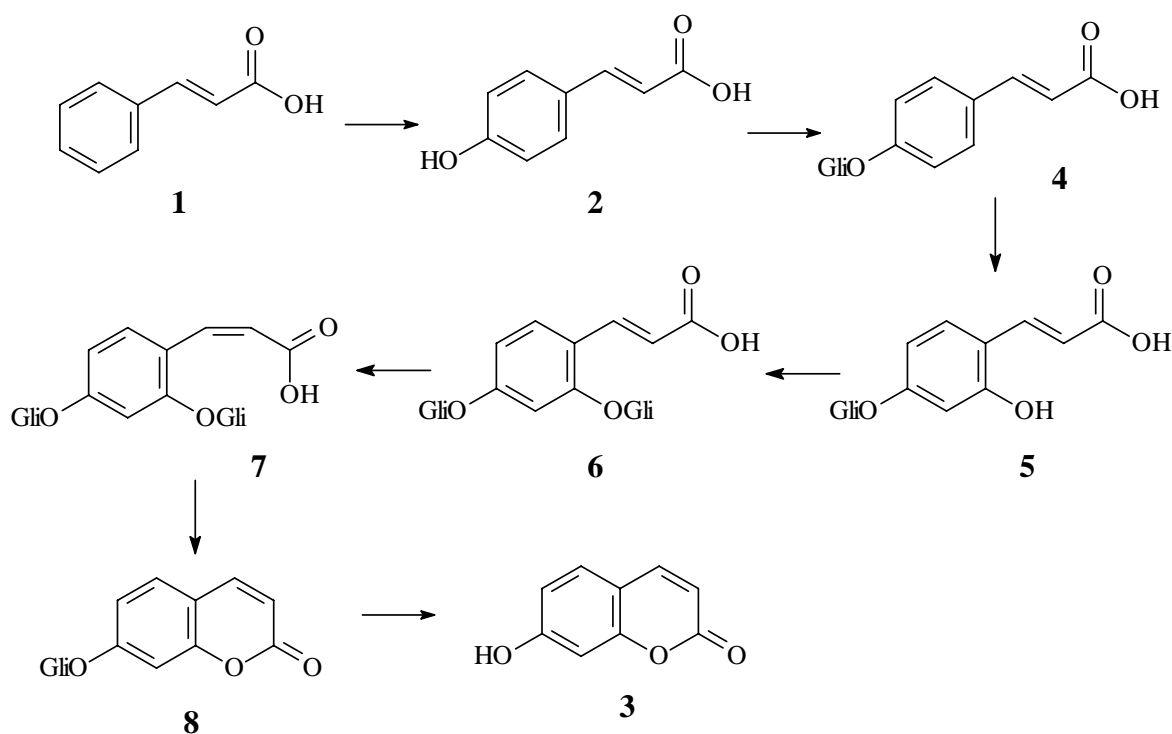


FIGURA 3.1: Biossíntese da cumarina Umbeliferona (3) a partir do Ácido cinâmico (1).

A isomerização do *trans*-2,4-di- β -D-glicosiloxicinâmico (6) ao *cis*- (7) ocorre rapidamente e o equilíbrio favorece a forma *cis*. Segundo NIELSEN (1970) essa isomerização *trans-cis* é uma reação catalizada pela luz e não enzimática, mas há também estudos que mostram uma conexão entre a formação do ácido *cis*-o- β -D-glicosiloxicinâmico em *Melilotus alba* e a intensidade de iluminação na planta, e também há algumas evidências para a presença de uma isomerase nessa mesma planta. O equilíbrio de uma mistura *cis-trans* de ácidos cinâmicos sem oxigenação na posição *orto*, favorece a forma *trans* (65-75%). A estabilidade do isômero *cis*-o- β -D-glicosiloxicinâmico é devido a uma ponte de hidrogênio entre o grupo carboxila e a 2-hidroxila da glicose, o que não é possível no isômero *trans* (NIELSEN, 1970).

Os experimentos realizados com Umbeliferona (**3**), ácido cinâmico (**1**) e ácido mevalônico marcados, em *Conium maculatum*, *Heracleum lanatum*, *Pastinaca sativa* e *Ruta graveolens*, indicaram que Umbeliferona (**3**) é o precursor mais eficiente das piranocumarinas xantiletina (**13**) e seselina (**16**), e que o anel pirano resulta de isoprenilação de umbeliferona. Essa isoprenilação pode ocorrer de duas maneiras diferentes, resultando na desmetilsuberosina (**9**), ou no ostenol (**10**), que são respectivamente os intermediários na biossíntese das piranocumarinas lineares e angulares. Em seguida desmetilsuberosina (**9**) e ostenol (**10**) sofrem uma epoxidação na cadeia lateral, resultando respectivamente 6-(2',3'-epoxi-isopentil)-umbeliferona (**11**) (configuração R ou S) e 8-(2',3'-epoxi-isopentil)-umbeliferona (**14**) (configuração R ou S). A hidrólise desses epóxidos conduz aos dióis, os quais possivelmente são artefatos formados durante o isolamento, segundo Grundon (1975). O mesmo autor sugere ainda que os próprios epóxidos, e não seus dióis participem na biossíntese das piranocumarinas, os quais podem sofrer ciclização para formar as diidropiranocumarinas sem afetar o centro quiral como a (S)-(+)-decursinol (**12**) a partir do (S)- 6-(2',3'-epoxi-isopentil)-umbeliferona (**11**) ou (R)-(+)-lomatina (**15**) a partir do (R)- 8-(2',3'-epoxi-isopentil)-umbeliferona (**14**) (**FIGURA 3.2**, p. 121).

Os intermediários nas transformações das diidropiranocumarinas nas piranocumarinas não estão bem caracterizados. Admite-se nessa transformação uma eliminação da 3'-hidroxila da diidropiranocumarina, através de uma desidratação, a qual conduz a piranocumarina linear (Xantiletina **13**) ou angular (Seselina **16**).

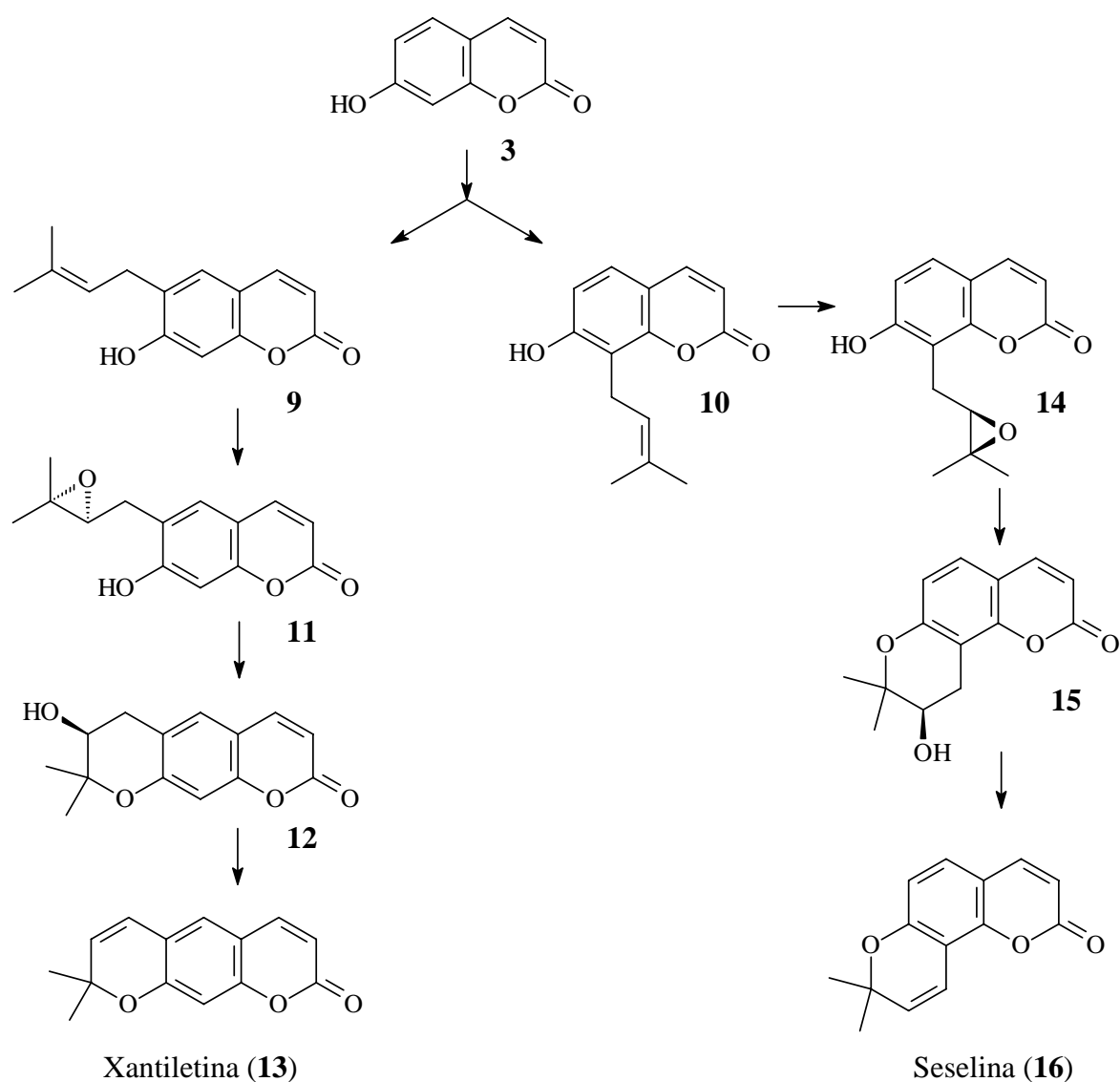


FIGURA 3.2: Biossíntese das piranocumarinas Xantiletina (13) e Seselina (16) a partir da cumarina Umbeliferona (3).

Na biossíntese das cumarinas discutidas acima, são mostrados os passos para a formação das piranocumarinas com a isoprenilação da umbeliferona, ou seja, como a transferência de uma unidade prenil (pirofosfato de dimetilalila - DMAPP) leva a formação dos precursores Desmetilsuberosina (9) ou Ostenol (10), que são respectivamente os intermediários na biossíntese das piranocumarinas lineares e angulares. Essa

isoprenilação das cumarinas é realizada por meio de enzimas que catalisam a adição do pirofosfato de dimetilalila na umbeliferona.

As enzimas são catalisadores biológicos encontrados em todas as células vivas, distinguindo-se dos não biológicos pela sua eficiência, especificidade e sensibilidade. Em geral são proteínas, especializadas pela catálise de reações biológicas no interior das células dos animais, vegetais e microorganismos (ROYER, 1982). São encontradas na natureza em misturas complexas, usualmente em células, as quais contêm cem ou mais enzimas diferentes além de outros componentes celulares (DIXON, 1964).

Primeiramente é necessário reconhecer a que classe pertence a enzima que está intermediando a reação de interesse. Entre elas, existem seis: (a) Oxidoredutases são enzimas que catalisam reações de transferência de elétrons; (b) Hidrolases que catalisam reações de hidrólises de ligações covalentes; (c) Liases que catalisam a ruptura de ligações covalentes e a remoção de moléculas de água, amônia ou gás carbônico; (d) Isomerases que catalisam reações de interconversão entre isômeros; (e) Ligases que catalisam reações de formação de novas moléculas a partir da ligação entre duas já existentes utilizando ATP; e por último, as de interesse para este trabalho, (f) Transferases que catalisam reações de transferência de grupamentos funcionais tais como amino, fosfato, acila, carboxila, isoprenila e etc (EISENTHAL, 1992).

Dentre o grupo das transferases, existem as preniltransferases que são enzimas responsáveis pela catálise nas reações de prenilação de inúmeros compostos e pode ser dividido em duas famílias: As difosfato de isoprenila sintase, que catalisam a condensação de unidades isoprênicas; e as preniltransferases que catalisam a adição de grupamentos isoprênicos, que são importantes para este estudo por catalisarem a adição do pirofosfato de dimetilalila na umbeliferona, como discutido anteriormente, e será o foco de estudo neste capítulo.

As enzimas preniltransferases, assim como outros tipos de enzimas, reagem segundo um meio sobre o qual deve-se tomar alguns cuidados para que seja conservada sua atividade. No interior das células, as enzimas encontram todas as condições necessárias para expressarem sua atividade, desta forma durante a incubação *in vitro* de uma enzima com determinado substrato, ela deve estar de acordo com o pH, temperatura, cofatores, etc. necessários para que a enzima exerça sua atividade.

O processo de extração enzimática de um material vegetal pode ser realizado considerando-se que as plantas possuem parede celular celulósica e vacúolos e a extração deve ser feita de tal forma que se evite o rompimento dos vacúolos que poderiam conduzir a liberação de proteinases e o abaixamento do pH do extrato se não for controlado com uma solução tampão. Durante o processo de extração ou durante os tratamentos seguintes, a atividade enzimática pode ser perdida e para isso EISENTHAL (1992) menciona algumas estratégias que permitem minimizar essa inatividade como:

- ✓ Controle do pH: a maioria das enzimas é ativa em apenas uma determinada faixa de pH, para isso deve-se estabelecer uma determinada solução tampão em um pH específico;
- ✓ Controle da temperatura: a temperatura não deve ultrapassar 4°C para que minimize a desnaturação da enzima. Desta forma se utiliza soluções e condições sob banho de gelo evitando o aumento da temperatura. A baixa temperatura também é utilizada com objetivo de diminuir a desnaturação das enzimas pela ação de proteinases (proteólise) endógenas durante e após a extração. Isso pode ser evitado também, por exemplo, para serinoprotease e cisteínoprotease (proteinases oriundas de tecidos vegetais), com adição de inibidores específicos de proteinases como pela adição de PMSF;

- ✓ Proteção os grupos tióis: os grupos tióis da cadeia lateral da cisteína podem ser oxidados pela ação do oxigênio. No interior da célula, a cadeia lateral é mantida na forma reduzida (-SH), mas com o rompimento da célula e exposição a oxigênio, há uma tendência da cadeia formar ligações dissulfeto ou espécies oxidadas como ácido sulfídrico;
- ✓ Controle de compostos fenólicos: As células apresentam alta concentração de compostos fenólicos, os quais na presença de oxigênio podem ser convertidos em pigmentos poliméricos, pela ação das fenoloxidasas. A inativação da enzima no extrato é proporcionada por esses pigmentos. Esses compostos fenólicos podem ser removidos do extrato por meio da complexação com polivinilpolipirrolidona (PVPP).

Com isso procede-se com o processo de extração da enzima como um dos três processos descritos por Bernard (1955), em que para extratos de folhas o procedimento é realizado por meio de trituração com nitrogênio líquido em gral e pistilo com solução tampão, com posterior centrifugação em centrífuga refrigerada a 4°C em tempo pré-estabelecido.

O estudo da enzima preniltransferase abordado neste capítulo não visa entender a biossíntese das piranocumarinas, pois estas já possuem estudos comprovando-as, como descritos ao longo deste capítulo. Na verdade, propõe-se verificar se há uma possível translocação da piranocumarina xantiletina (**12**), das raízes para as folhas em plantas enxertadas de laranja Pêra (*Citrus sinensis*) sobre limão Cravo (*C. limonia*), com base nos estudos biossintéticos já realizados.

O interesse de verificar a possível translocação advém, como já mencionado, dos estudos fitoquímicos onde a xantiletina foi isolada das raízes em uma quantidade muito maior em relação a que foi isolada nas folhas da mesma planta, e ainda pelo fato de que na parte inferior da planta (raízes e

caule inferior), praticamente todos os metabólitos isolados possuem uma unidade isoprênica em sua estrutura; já o estudo das partes superiores (caule superior e folhas), apenas dois únicos compostos, duas piranocumarinas. Esses resultados trazem evidências de que essas piranocumarinas estariam sendo metabolizadas nas partes inferiores da planta e posteriormente sendo translocadas para a parte superior da mesma.

Assim, neste capítulo mostra-se o estudo biossintético com a enzima preniltransferase com o objetivo de verificar a atividade da mesma em todas as partes da planta enxertada (laranja Pêra sobre limão Cravo), raiz, caule inferior e superior e folhas, e com isso afirmar se estas piranocumarinas podem estar sendo translocadas.

3.1 - PARTE EXPERIMENTAL

3.1.1 - Materiais e reagentes utilizados

- Centrífugas:
 - Centrífuga refrigerada Sorvall RC 5C Plus;
 - Microcentrífuga Denver.

- Cromatógrafo líquido de alta eficiência:
 - Cromatógrafo líquido de alta eficiência – Varian Prostar equipado com sistema quaternário de bombas 240; Injetor auto sampler 410 e detector de ultravioleta diode Array 230;

- Cromatógrafo líquido de alta eficiência – Shimadzu LC-10Avp equipado com auto injetor e detector de ultravioleta Shimadzu SPD 6AV;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência – Shimadzu LC- 10Avp equipado com auto injetor SIL 10AF e detector de ultravioleta Shimadzu SPD 10AV.

- Espectrômetro:
 - Perkin Elmer (Lambda 6, UV/VIS spectrophotometer.

- Coluna para CLAE:
 - Coluna analítica Hypersil ODS (C₁₈) (ϕ x h = 4,6mm x 25cm).

- Contador de radioisótopo:
 - .Cintilador BECKMAN COULTER – LS 6500 Multi-purpose Scintillation Counter.

- Solução cintilante:
 - Solução cintilante EcoLume-ICN.

- Reagentes para ensaio enzimático:
 - PVPP;
 - Polietilenoglicol;
 - EDTA;

- Sacarose;
 - Cisteína;
 - Ácido ascórbico;
 - Tampão fostato pH 8,0;
 - Cloreto de magnésio e manganês 0,5 M;
 - Ácido clorídrico 5M;
 - Acetato de etila.
-
- Eletroforese:
 - Cuba Mighty Small SE 250/SE 260 mini-vertical UNIT;
 - Fonte Eletrophoresis Power Supply EPS 301.
-
- Reagentes para eletroforese:
 - Tampão de separação pH 8,8 (Tris-HCl 1,5M, SDS 0,4%);
 - Tampão de concentração pH 6,8 (Tris-HCl 0,5M, SDS 0,4%);
 - Acrilamida-Bis (30-8%), Bisacrilamida (2%);
 - Persulfato de amônio (10%);
 - TEMED;
 - Glicina;
 - SDS;
 - Glicerol;
 - EDTA;
 - Mationina;
 - Azul de bromofenol;
 - Ácido tricloroacético (TCA) (10%);
 - DTT;
 - Nitrato de prata (0,1%);

- Carbonato de sódio (3%);
- Acetaldeído (0,085%);
- Ácido cítrico 2,3M.

3.1.2 - Coleta do material botânico

O material vegetal utilizado foram plantas obtidas do enxerto de *Citrus sinensis* (laranja Pêra) sobre *C. limonia* (limão Cravo) com 3 a 5 meses após a enxertia e foram coletadas no Centro Avançado de Pesquisas Tecnológicas do Agronegócio de Citros “Sylvio Moreira” do Instituto Agronômico de Campinas (IAC).

3.1.3 – Protocolo para avaliação da atividade da enzima preniltransferase

O experimento foi realizado segundo o protocolo publicado por Zuurbier (1998) com a utilização de 10g de material vegetal fresco, mantido em casa de vegetação do Instituto de Química da UNESP-Araraquara, sendo submetido para os ensaios da atividade da enzima preniltransferases:

- ✓ Triturar o material vegetal em nitrogênio líquido com auxílio de almofariz e pistilo;
- ✓ Ao material triturado adicionar 20mL de tampão fosfato pH 8,0 que foi anteriormente agitado com 1,7 g de PVPP por cerca de 30-50 minutos; Ao tampão adiciona-se também 435 mg de polietilenoglicol, 5,58 mg de EDTA, 3,0 mg de sacarose, 263,4 mg de cisteína e 1,05 g de ácido ascórbico;
- ✓ Filtrar em gaze e recolher o filtrado em tubo de centrífuga em banho de gelo;

- ✓ Centrifugar em centrífuga refrigerada a 4°C por 30 minutos a 10.000g e depois o sobrenadante foi novamente centrifugado por 2 horas a 16.000g;
- ✓ Solubilizar o precipitado (fração microsomal) em 3,0 mL de tampão fosfato pH 8,0 obtendo-se assim o extrato enzimático;
- ✓ Ensaiair em eppendorff, os seguintes reagentes:
 - 25 µL Precursor (Umbeliferona / Herniarina) (0,15 mg/mL);
 - 25 µL DMAPP (10 mM);
 - 5 µL Cofator (MgCl₂ ou MnCl₂ 0,5 M);
 - 235 µL Extrato enzimático
- ✓ Colocar para incubação por 30 minutos a 30°C em banho de aquecimento e iniciar a contagem do tempo a partir o momento em que se adiciona o extrato enzimático;
- ✓ Parar a reação com adição de 10 µL de HCl (5 M) e 450 µL de AcOEt;
- ✓ Centrifugar em microcentrífuga por 5 minutos a 7 RPM;
- ✓ Retirar 300 µL do sobrenadante e evaporar;
- ✓ Suspender em 70 µL e analisar via CLAE.

3.1.4 – Protocolo de incorporação de precursores marcados com radioisótopos

As plantas enxertadas de *C. sinensis* sobre *C. limonia*, foram utilizadas como matrizes nos experimentos de incorporação com o pirofosfato de isopentenila [IPP-1-¹⁴C]. Este experimento foi realizado com o objetivo de se confirmar a translocação de cumarinas preniladas das raízes para as folhas nos enxertos de *Citrus*.

Os experimentos foram realizados de acordo com o protocolo:

- ✓ Colocar em eppendorff 100 μ L da solução com o reagente marcado com ^{14}C ;
- ✓ O precursor foi administrado numa concentração de 4 $\mu\text{Ci/planta}$;
- ✓ Limpar as raízes da planta e colocar as raízes no eppendorff com a solução do reagente marcado;
- ✓ Após absorvido a solução, adicionar mais 100 μ L de água ao eppendorff para evitar o ressecamento da planta;
- ✓ Colocar as plantas em tubo de ensaio com água;
- ✓ Retirar a planta ao final de 1, 2 e 3 dias;
- ✓ Separar as raízes, caule inferior e superior e folhas. Extrair em AcOEt, concentrar e suspender em 3 mL de MeOH. Retirar 50 μ L para contagem no cintilador;
- ✓ Para contagem, adicionar 2 mL de solução cintilante;
- ✓ Injetar 50 μ L em CLAE, coletar frações de 1 mL pó 50 minutos e fazer contagem no cintilador.

3.2 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

A determinação da atividade da enzima preniltransferase foi avaliada por meio de experimentos de prenilação de dois precursores, a Umbeliferona (**a**) e Herniarina (**b**) utilizando-se como substrato o DMAPP e extratos enzimáticos obtidos das frações microssomais das raízes, caule inferior e superior e folhas obtidas do material vegetal, sendo monitorado a produção de Desmetilsuberosina (**c**) e Suberosina (**d**) e Ostenol (**e**) e Ostol (**f**) (**FIGURA 3.3**, p. 131).

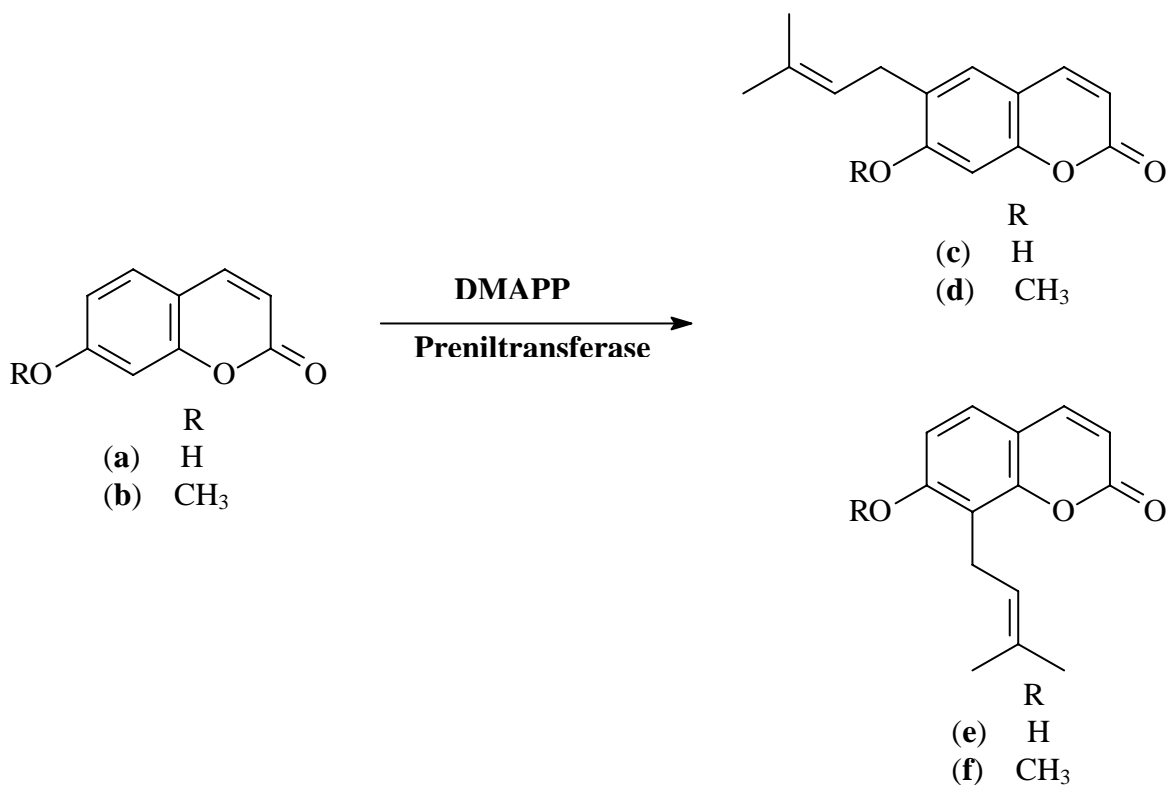


FIGURA 3.3: Reação de prenilação da Umbeliferona (a) e Herniarina (b).

Inicialmente foram analisados via CLAE os precursores Umbeliferona (a) e Herniarina (b) e apenas um dos produtos, a Suberosina (d), pois era o único à disposição, em condições pré-estabelecidas utilizando-se como fase móvel MeOH/H₂O (6:4) e uma coluna analítica C₁₈ (ϕ x h = 4,6 mm x 25 cm) em 220 nm. Os cromatogramas para a, b e d são mostrados a seguir (FIGURA 3.4, p. 132).

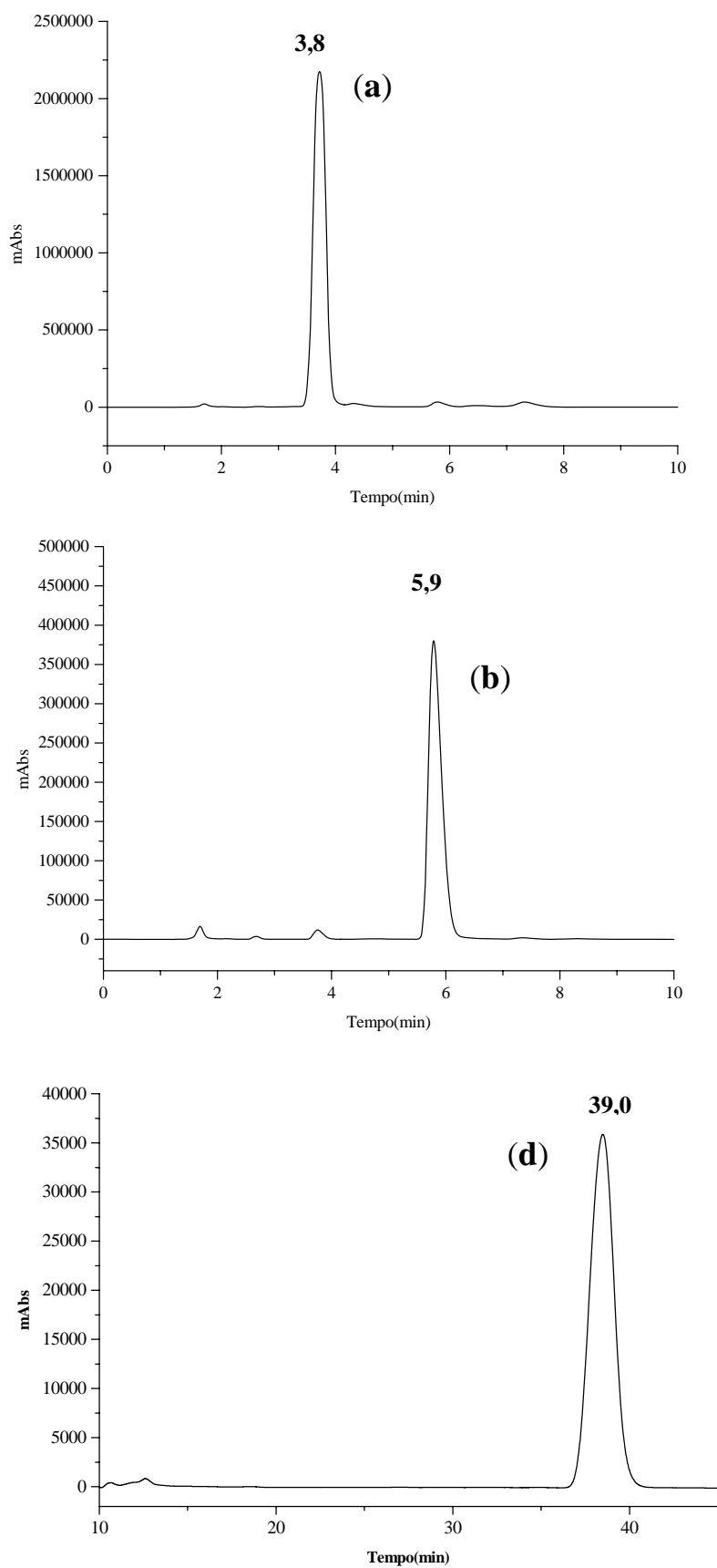


FIGURA 3.4: Cromatogramas da Umbeliferona (a), Herniarina (b) e Suberosina (d).

Foram monitorados também os compostos que são obtidos das partes inferiores (raiz e caule inferior) em grande quantidade, as piranocumarinas Xantiletina (**g**) e Seselina (**h**) visto que por ser um extrato enzimático bruto poderia haver outro tipo de enzima como, por exemplo, a ciclase, que estaria levando à formação de piranocumarinas, ou seja, cumarinas com a unidade prenila ciclizada. Os cromatogramas para as piranocumarinas Xantiletina e Seselina são mostrados na **FIGURA 3.5**, na página 133.

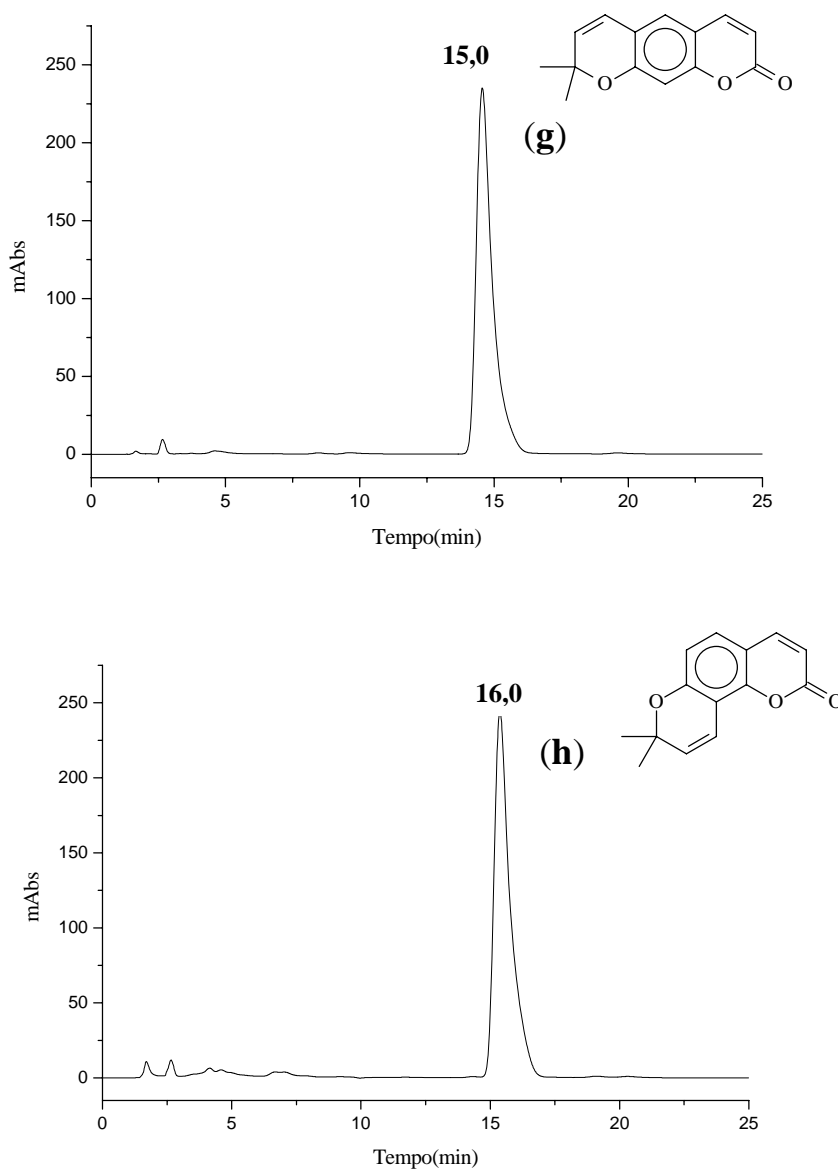


FIGURA 3.5: Cromatogramas da Xantiletina (**g**) e Seselina (**h**).

Depois de ter estipuladas as condições analíticas e determinados os tempos de retenções dos compostos, iniciou-se os experimentos com a realização dos ensaios primeiramente com as raízes e depois com as outras partes da planta.

Foram utilizados como branco, ensaios com omissão de precursor (Umbeliferona e Herniarina), cofatores, DMAPP e com desnaturação da enzima por ultrasom. Os experimentos eram realizados em triplicada para um resultado mais confiável (TABELA 3.1, p. 132).

TABELA 3.1: Experimentos de reação de prenilação.

Exper.	Tampão	DMAPP (μL)	Precursor a (μL)	Precursor b (μL)	MgCl ₂ (μL)	MnCl ₂ (μL)	Enzima (μL)	Temp. (°C)	Tempo (min)
1	40	-	-	-	-	-	325	30	30
2	25	10	-	25	5	-	325	30	30
3	25	10	25	-	5	-	325	30	30
4	10	-	25	-	5	-	325	30	30
5	10	-	-	25	5	-	325	30	30
6	-	10	25	-	5	-	325	30	30
7	-	10	-	25	5	-	325	30	30
8	-	10	25	-	5	-	325	30	30
9	-	10	25	-	-	5	325	30	30
10	-	10	-	25	5	-	325	30	30
11	-	10	-	25	-	-	325	30	30
12*	-	10	25	-	5	-	325	30	30
13*	-	10	-	25	5	-	325	30	30

* ensaio com enzima desnaturada.

A seguir é mostrado um cromatograma de um experimento (branco) em que se utilizou apenas tampão e extrato enzimático (FIGURA 3.6, p. 135). Pode-se observar que no branco já tem os produtos **d**, **g** e **h** como endógenos. Desta forma, os experimentos serão avaliados em relação à porcentagem de aumento de área dos picos em relação ao branco.

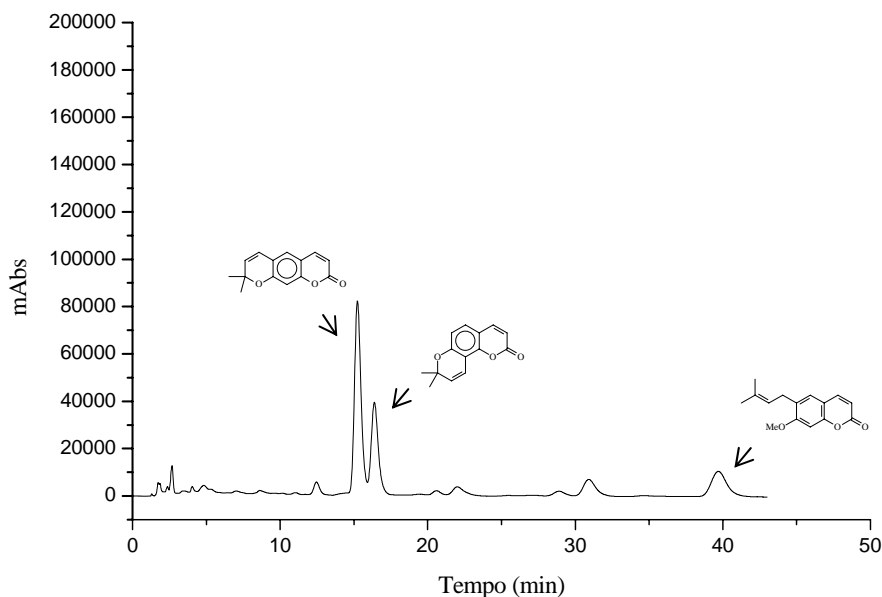


FIGURA 3.6: Cromatograma de um branco com presença de endógenos.

Esses picos foram comparados utilizando o tempo de retenção de cada padrão determinado anteriormente (**FIGURAS 3.4 e 3.5**, p. 132 e 133) e avaliados por meio de CLAE acoplado a espectrometria de massas (modo positivo) e assim foi possível afirmar sobre qual substância se refere (**FIGURAS 3.7 e 3.8**, p. 135 e 136). Os picos **1** e **2** apresentaram o *íon quasi molecular* $[M+H]^+$ com m/z igual a 229 que está de acordo com a fórmula molecular ($C_{14}O_3H_{12}$) das Xantiletina e Seselina. O pico **3** apresentou o *íon quasi molecular* $[M+H]^+$ com m/z igual a 245, referente à fórmula molecular ($C_{15}O_3H_{16}$) da Suberosina.

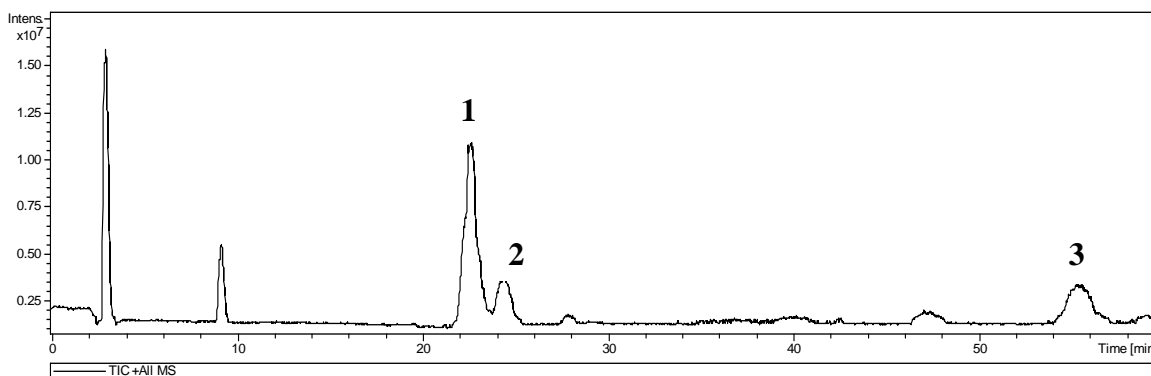


FIGURA 3.7: Cromatograma da reação de prenilação obtido por CLAE-MS.

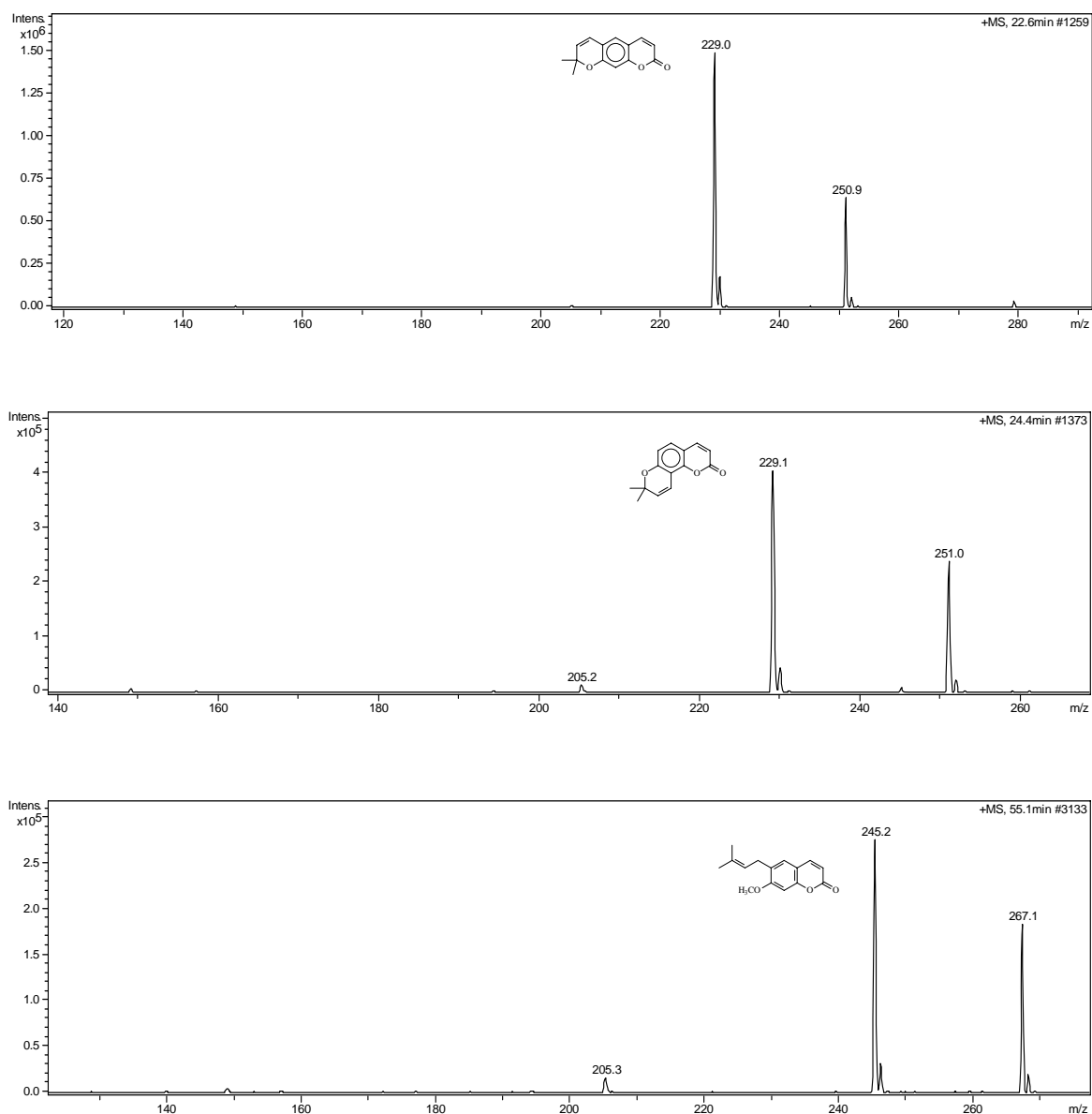


FIGURA 3.8: Fragmentogramas dos picos **1** (Xantiletina), **2** (Seselina) e **3** (Suberosina).

Os experimentos com os precursores umbeliferona e herniarina apresentaram formação dos produtos xantiletina e seselina, ou seja, as cumarinas com a prenila ciclizada, em uma proporção em relação ao branco de aproximadamente 20% (**FIGURA 3.9**, p. 137). Esse resultado indica que há no meio reacional a presença da enzima preniltransferase, e ainda, da

enzima ciclase. Dado este que justificaria a alta proporção das piranocumarinas encontradas nas raízes.

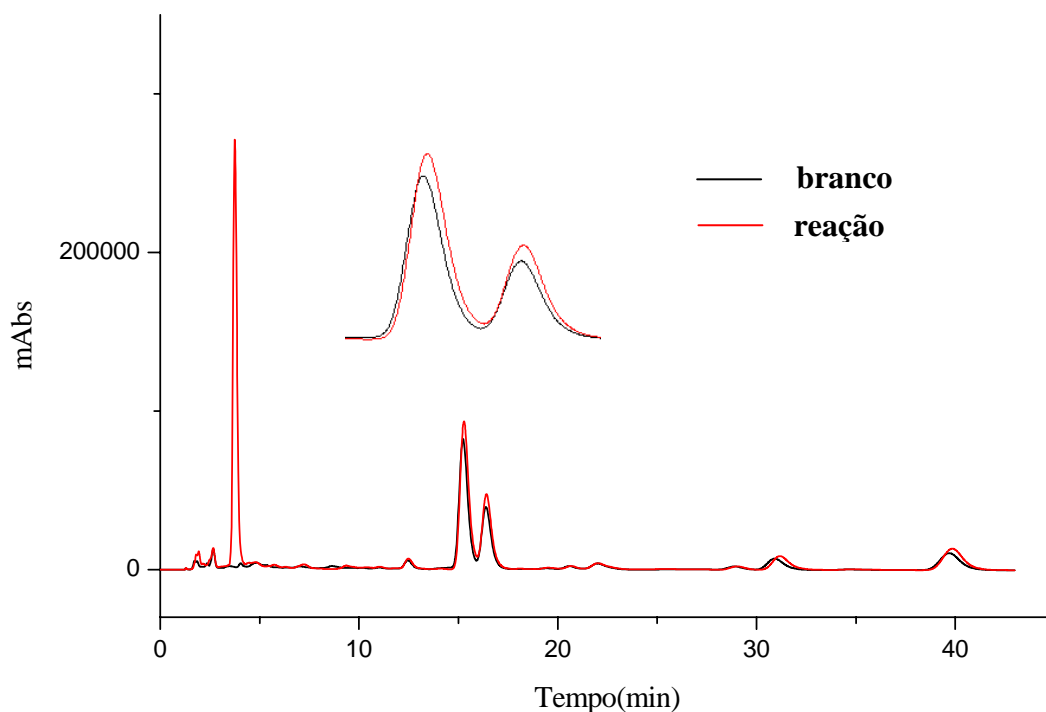


FIGURA 3.9: Cromatograma de uma reação de prenilação com precursor Umbeliferona e cofator $MgCl_2$ sobreposto ao branco.

Foram realizados outros experimentos variando o tempo de reação de 30 minutos para 1 hora, com o objetivo de verificar uma maior formação dos produtos formados e os resultados foram muito semelhantes. Em seguida procurou-se uma alternativa que foi de realizar os ensaios no período noturno, visto que há relatos (HAMERSKI, 1990; MORANDIM, 2005) de melhor atividade da enzima preniltransferase dentro deste período. Desta forma realizou-se ensaios nos horários de 19:00 / 23:00 / 3:00 e 6:00 horas.

A **FIGURA 3.10**, na página 138 mostra o resultado da reação de prenilação no horário de 23:00h, o qual foi o que apresentou maior expressão, com a formação das piranocumarinas em 15 e 16 minutos, numa proporção de

aproximadamente 100% em relação ao branco, e ainda foi possível observar em 41 minutos a formação da cumarina Suberosina, ou seja, o produto sem que houvesse a ciclização.

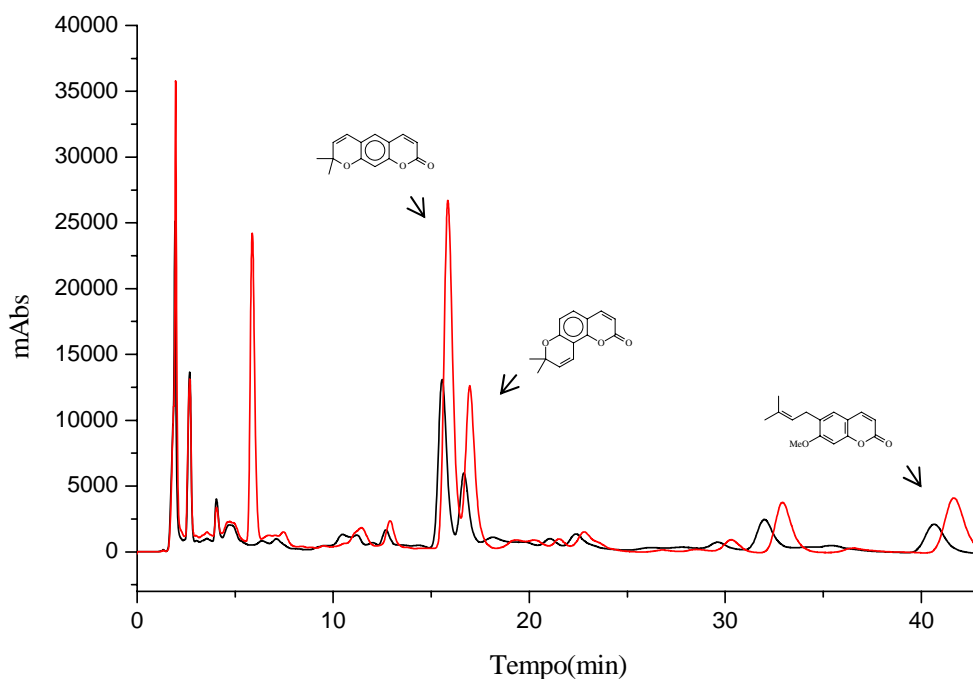


FIGURA 3.10: Cromatograma da reação de prenilação realizada às 23:00h, com precursor Herniarina e cofator $MgCl_2$ sobreposto ao branco.

Os resultados quando se utiliza a Umbeliferona ou a Herniarina como precursores, são bem semelhantes, porém o horário da reação para realização do ensaio é fundamental na atividade da enzima preniltransferase, como pode ser observado nos **GRAFICOS 3.1, 3.2 e 3.3**, nas páginas 139 e 140, quando se compara a formação das cumarinas com o precursor e o horário da reação. Os dados mostram também que o precursor Umbeliferona apresenta um resultado mais interessante, visto que tanto às 23:00h como 6:00h houve formação dos três produtos em uma proporção de aproximadamente 100%, com exceção para a formação da suberosina que às 6:00h sua porcentagem aumenta para 120%, e quando se utiliza a Herniarina como precursor, a variação na formação é sempre diminuída em

aproximadamente 20% no mínimo. Os valores de porcentagens de formação dos três produtos em relação ao horário da coleta são mostrados na **TABELA 3.2**, na página 140.

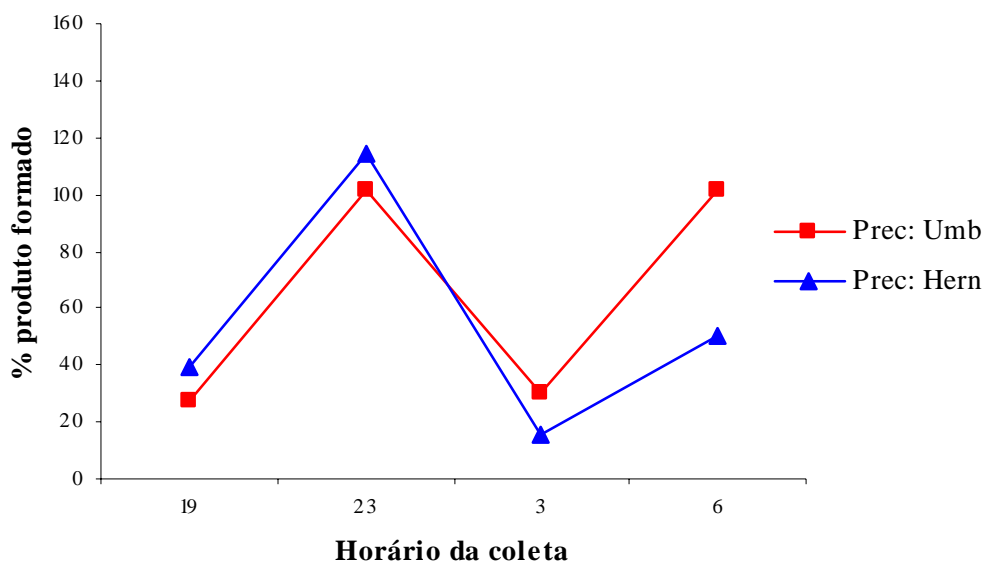


GRÁFICO 3.1: Comparação da formação da Xantiletina com o horário de reação, utilizando a Umbeliferona e a Herniarina como precursores.

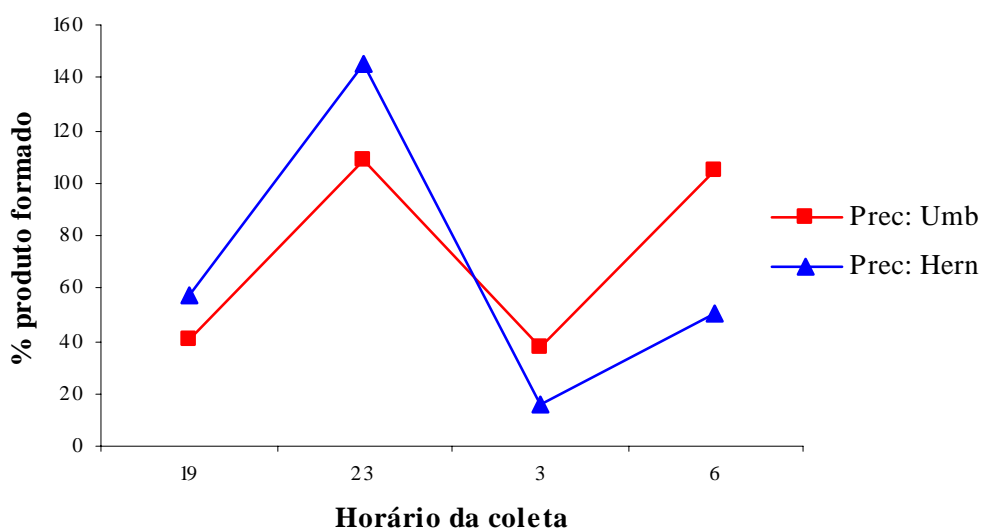


GRÁFICO 3.2: Comparação da formação da Seselina com o horário de reação, utilizando a Umbeliferona e a Herniarina como precursores.

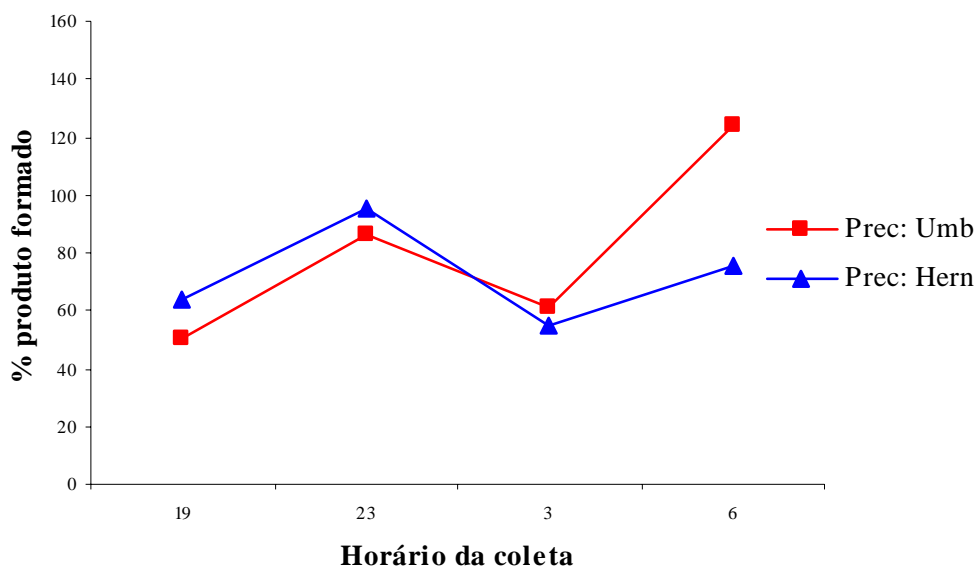


GRÁFICO 3.3: Comparação da formação da Suberosina com o horário de reação, utilizando a Umbeliferona e a Herniarina como precursores.

TABELA 3.2: Análise circadiana da formação dos produtos Xantiletina, Seselina e Suberosina com os precursores Umbeliferona e Herniarina.

Horário (h)	Xantiletina (Umb)(%)	Seselina (Umb)(%)	Suberosina (Umb)(%)	Xantiletina (Hern)(%)	Seselina (Hern)(%)	Suberosina (Hern)(%)
19:00	27,7	40,2	50,4	39,5	56,9	63,9
23:00	101,3	109,0	86,2	114,7	144,9	95,2
3:00	30,0	37,8	60,7	15,1	15,9	54,6
6:00	101,8	105,0	124,0	50,4	50,0	75,6

Todos os dados mostrados anteriormente foram de ensaios em que se utilizou o mesmo cofator $MgCl_2$. Partindo-se de dados (CORSINO, 2000) que relatam a atividade da enzima ciclase expressada pela utilização do $MgCl_2$ como cofator, porém sendo inativa quando se utiliza $MnCl_2$ como cofator. Desta forma, prosseguiu-se os ensaios com o $MnCl_2$ com o objetivo de se observar a formação apenas do produto suberosina e inibir da formação

dos produtos xantiletina e seselina, ou seja, inibindo a ciclase observar-se-ia apenas o produto com a prenila aberta, e assim os resultados apresentados estariam sendo apenas em relação à enzima preniltransferase, sem a atividade de uma outra enzima, como neste caso a ciclase. Os resultados (**GRÁFICO 3.4**, p. 141) mostraram que há uma certa inibição dos produtos ciclizados, porém não são totalmente inibidos.

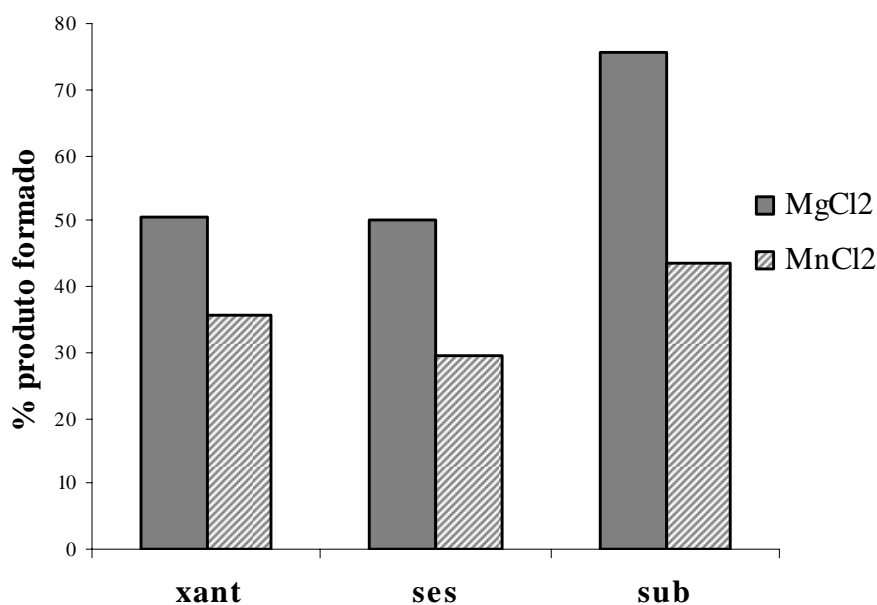


GRÁFICO 3.4: Comparação da formação da Xantiletina, Seselina e Suberosina com cofator MgCl₂ e MnCl₂, utilizando como precursor a herniarina.

Em seguida foram realizados ensaios com todas as partes da planta com o objetivo de verificar a ocorrência de compartimentalização da enzima preniltransferase em raízes, caule inferior e superior e folhas de plantas enxertadas (*C. sinensis* sobre *C. limonia*) (**FIGURAS 3.11-3.13**, p. 142 e 143).

Pode-se verificar que não houve formação dos produtos esperados nos ensaios com o caule inferior e superior e com as folhas, sugerindo que haja uma compartimentalização enzimática nas raízes.

Isso vem somar aos dados mencionados na introdução e confirmar que deve estar havendo a translocação de metabólitos prenilados das raízes para as folhas no enxerto de *C. sinensis* sobre *C. limonia*, já que, se não há atividade da enzima responsável pela formação desses metabólitos prenilados (cumarinas) nas partes superiores do enxerto, essas cumarinas estão sendo metabolizadas nas raízes, onde há atividade da preniltransferase, e translocadas para as folhas.

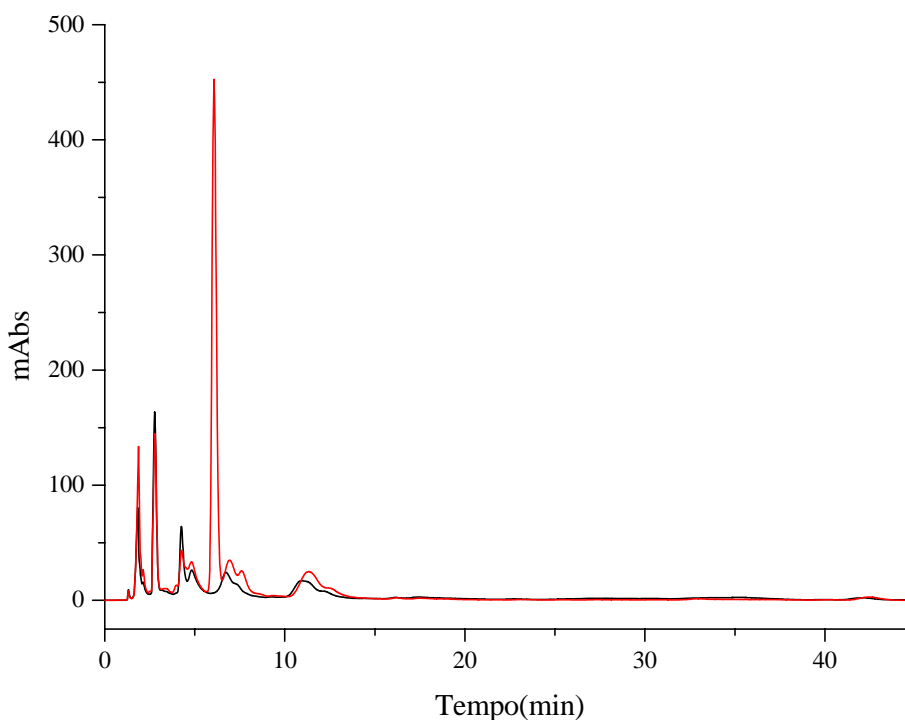


FIGURA 3.11: Cromatograma da reação de prenilação realizada com o extrato enzimático do caule inferior sobreposto ao branco.

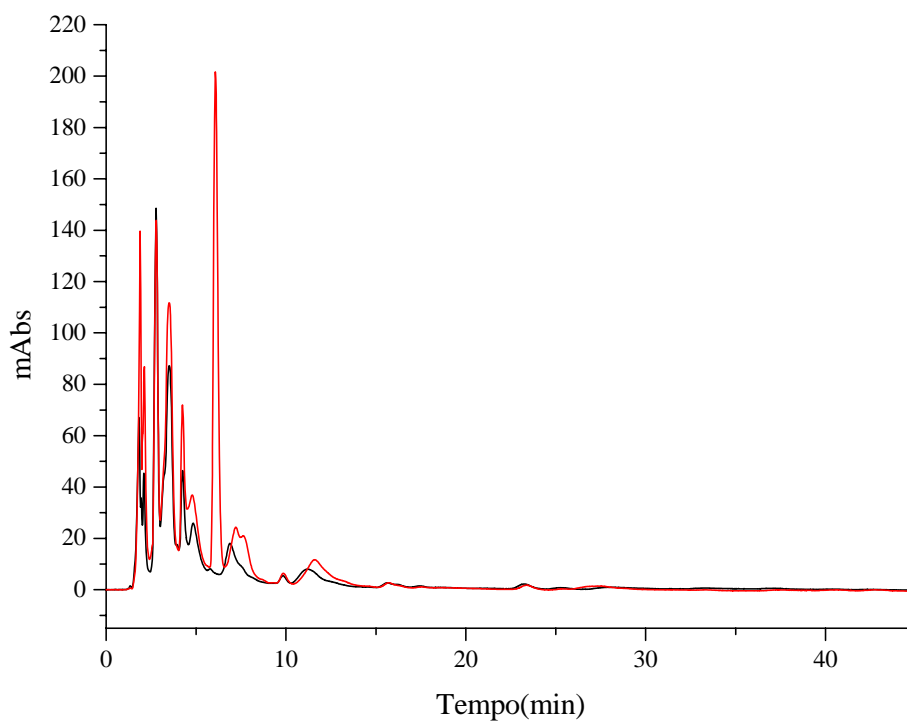


FIGURA 3.12: Cromatograma da reação de prenilação realizada com o extrato enzimático do caule superior sobreposto ao branco.

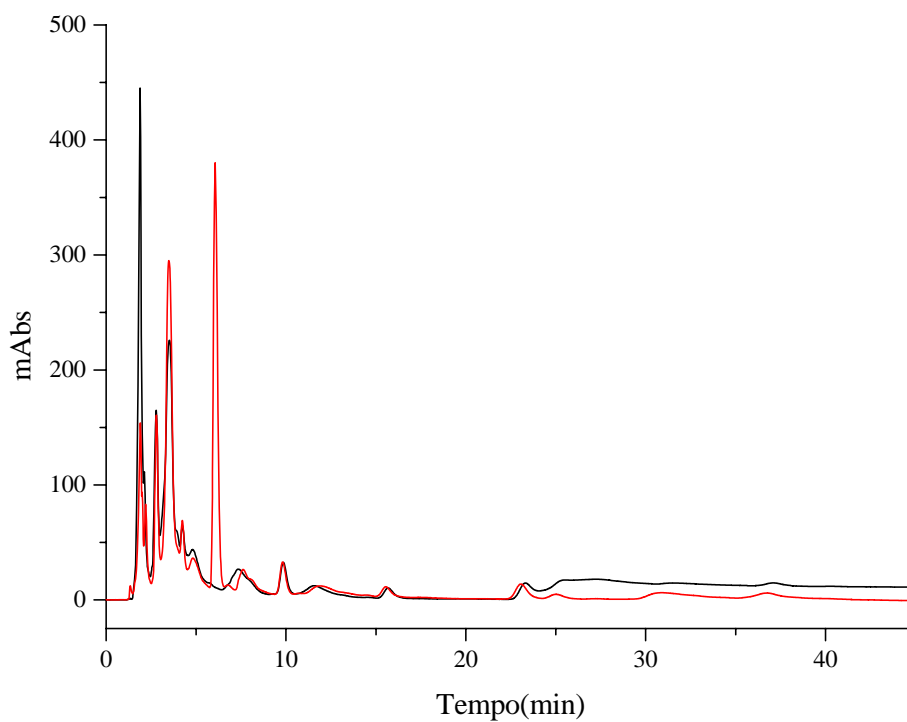


FIGURA 3.13: Cromatograma da reação de prenilação realizada com o extrato enzimático das folhas sobreposto ao branco.

3.2.1 – Dosagem protéica do extrato enzimático das raízes

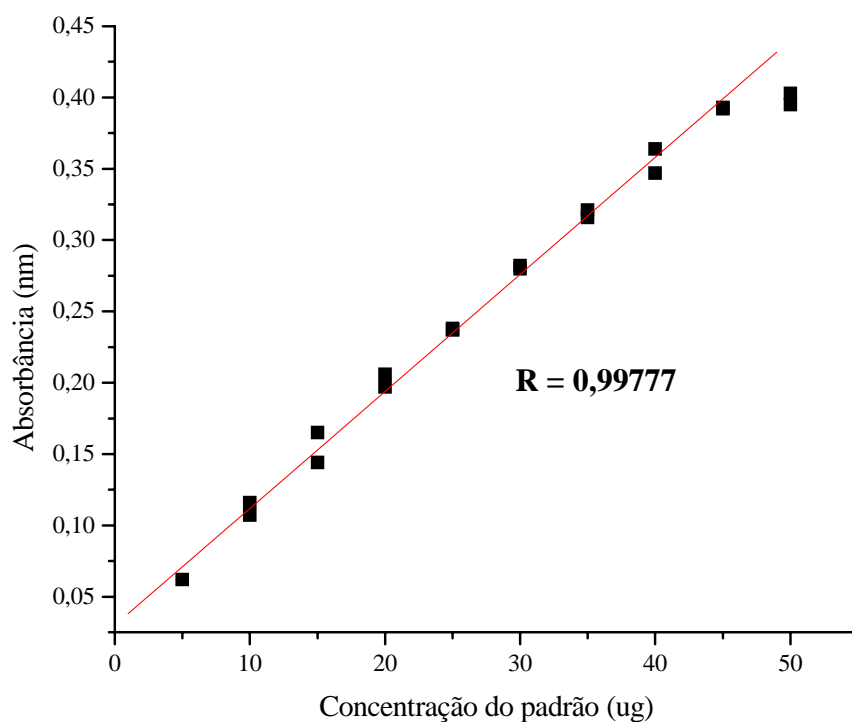
Utilizou-se o método de Bradford (BRADFORD, 1976) para a determinação da concentração de proteína presente no extrato enzimático das diferentes partes da planta enxertada (*C. sinensis* sobre *C. limonia*). O teste foi realizado utilizando-se 50 µL da amostra, (800 – 50) µL de água e 200 µL do reagente Coomassie Blue. A solução foi agitada e transferida para uma cubeta de 1 cm e realizada a leitura da absorbância em 595 nm.

A determinação é realizada utilizando-se as medidas de absorções, obtidas em um espectrofotômetro no UV, de soluções em diferentes concentrações de ovoalbumina e traçado sua curva padrão. Primeiramente foi preparado uma solução em 0,50 mg/mL de ovoalbumina e em seguida a mesma foi diluída em diferentes concentrações. Suas absorções foram medidas em 595 nm.

Depois de obtido os valores de absorções, traçou-se uma curva padrão da absorbância pela concentração protéica (**GRAFICO 3.5**, p. 145). A partir da equação da reta obtida do gráfico, foram calculadas as concentrações dos extratos enzimáticos das raízes, caule inferior e superior e folhas da planta enxertada (**TABELA 3.3**, p. 145).

TABELA 3.3: Dados para determinação da curva padrão da ovoalbumina.

Ovoalbumina (μL)	Água (μL)	Concentração protéica (mg/mL)	Absorbância (nm)
0	50	0	0
5	45	0,05	0,0570
10	40	0,10	0,1115
15	35	0,15	0,1545
20	30	0,20	0,2015
25	25	0,25	0,2375
30	20	0,30	0,2810
35	15	0,35	0,3185
40	10	0,40	0,3555
45	5	0,45	0,3925
50	0	0,50	0,3990

**GRÁFICO 3.5:** Curva padrão da ovoalbumina.

A **TABELA 3.4**, na página 146 apresenta os valores de concentração protéica dos extratos enzimáticos das raízes, caule inferior e

superior e folhas da planta enxertada, obtidas a partir da equação da reta da curva padrão da ovoalbumina.

TABELA 3.4: Concentrações de proteínas dos extratos enzimáticos da planta enxertada.

Extrato	Volume de amostra (μL)	Volume de água (μL)	Absorbância (nm)	Concentração protéica ($\mu\text{g/mL}$)
Raiz	50	50	0,0706	4,97
Caule inferior	50	50	0,0523	2,74
Caule superior	50	50	0,1166	10,77
Folhas	50	50	0,2250	23,77

* as medidas foram feitas em duplicata.

3.2.2 – Eletroforese em Gel

Após avaliada a dosagem protéica dos extratos enzimáticos, os mesmos foram aplicados em gel de poliacrilamida junto com padrões que continham enzimas de pesos moleculares conhecidos como a fosforilase b (97.4000 daltons), albumina sérica (66.200) e inibidora de tripsina (21.500).

O gel foi colocado em cuba para eletroforese e aplicado uma corrente de 20 mA e uma voltagem de 120 V até que as amostras atingissem o final do gel. Em seguida foi submetido a revelação sob agitação segundo a seqüência mostrada a seguir:

- 1 – Fixação com ácido tricloroacético por pelo menos 1 h, descartar;
- 2 – Lavar 1 vez com água deionizada por 15 a 30 minutos, descartar;
- 3 – Redução com DTT por 30 minutos, descartar;

- 4 – Adicionar AgNO_3 por 15 a 30 minutos, descartar;
- 5 – Lavar 2 vezes com água por 5 a 1 minutos;
- 6 – Revelar com Na_2CO_3 e formaldeído adicionando 3 vezes: 10-30 seg / 1-2 min e 5-10 min
- 7 – Adicionar ácido cítrico por no mínimo 5 minutos;
- 8 – Lavar com água.

Depois de revelado o gel (**FIGURA 3.14**, p. 147), observa-se bandas presentes, e comparando com os padrões é possível estimar aproximadamente o peso molecular enzima preniltransferase presente no extrato das raízes com sendo entre 97400 - 66200 daltons.

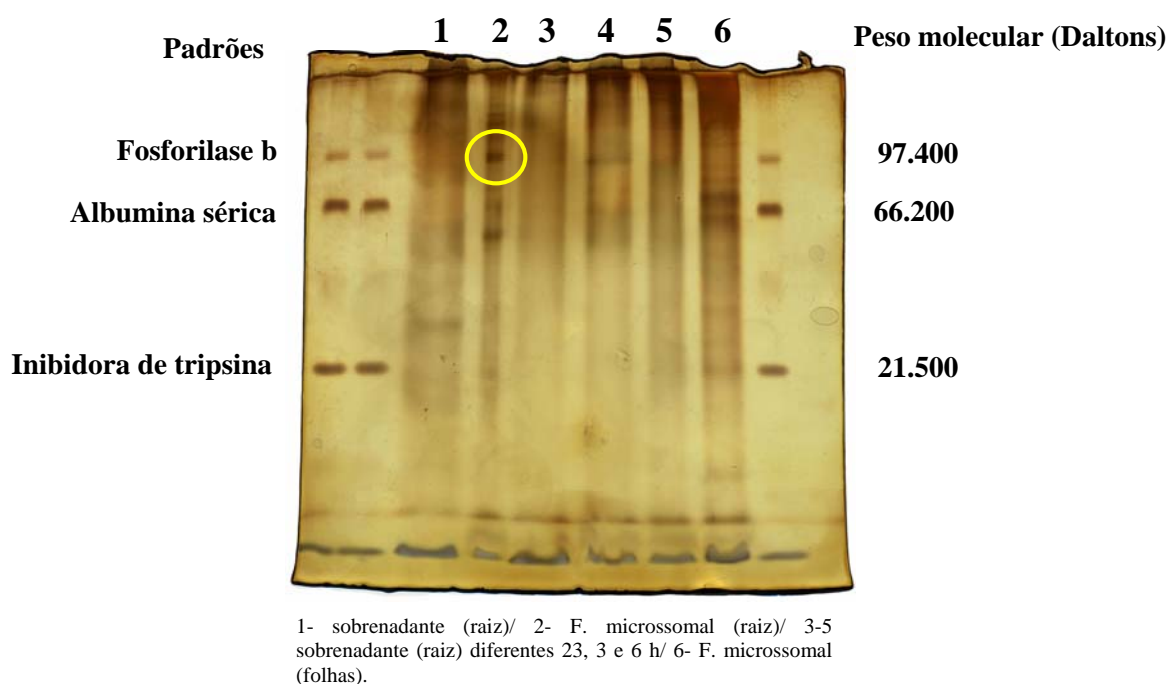


FIGURA 3.14: Eletroforese em gel de poliacrilamida de extratos das raízes e folhas.

3.2.3 – Quantificação dos produtos da reação de prenilação

Após avaliada a formação dos três produtos formados a partir da reação de prenilação às 23:00 h, o passo seguinte foi quantificá-los e para tal foram feitas as curvas de calibrações para cada um dos três produtos prenilados, as cumarinas Xantiletina, Seselina e Suberosina. As curvas de calibrações foram obtidas a partir de concentrações de 60 / 40 / 20 / 10 / 5 / 3 e 1 $\mu\text{g/mL}$ para as cumarinas Xantiletina e Seselina, e de 40 / 20 / 10 / 5 / 1 e 0,5 $\mu\text{g/mL}$ para a Suberosina. Cada uma das concentrações foi feita em triplicata (**GRÁFICOS 3.6-3.8**, nas páginas 148 e 149).

Por meio das curvas de calibrações foi possível determinar as concentrações de cada uma das três cumarinas produzidas na reação de prenilação. Na **TABELA 3.5**, na página 149, são mostrados os valores da Xantiletina, Seselina e Suberosina produzidas pela reação de prenilação com extrato enzimático das raízes da planta enxertada, utilizando como precursores a Umbeliferona e a Herniarina, como cofator a MgCl_2 , no horário de 23:00h.

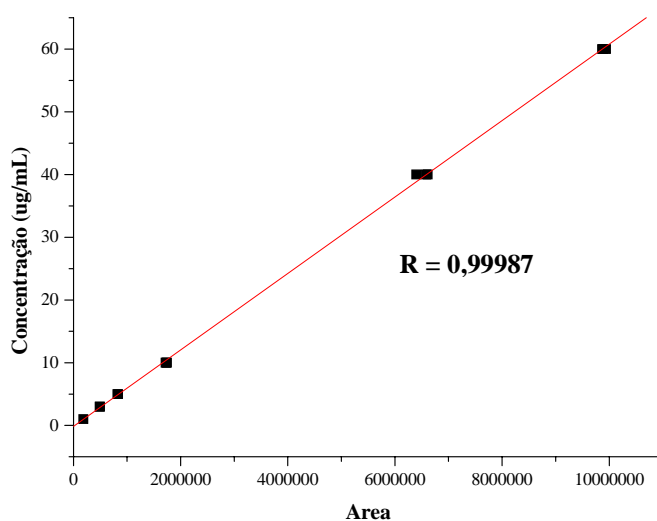


GRÁFICO 3.6: Curva de calibração da Xantiletina.

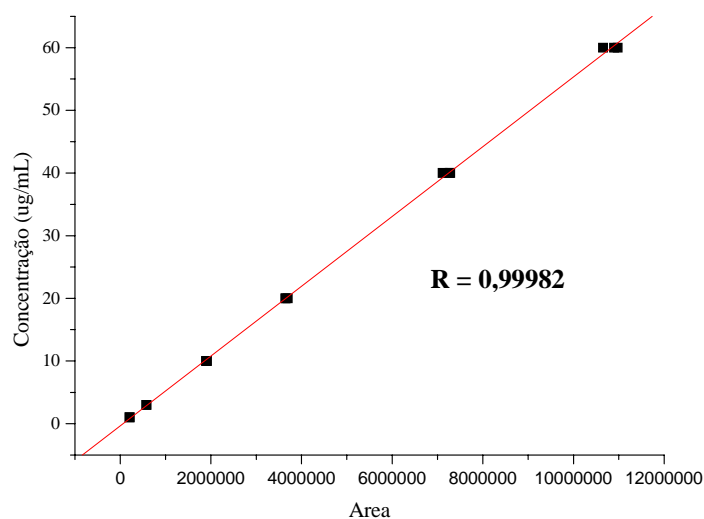


GRÁFICO 3.7: Curva de calibração da Seselina.

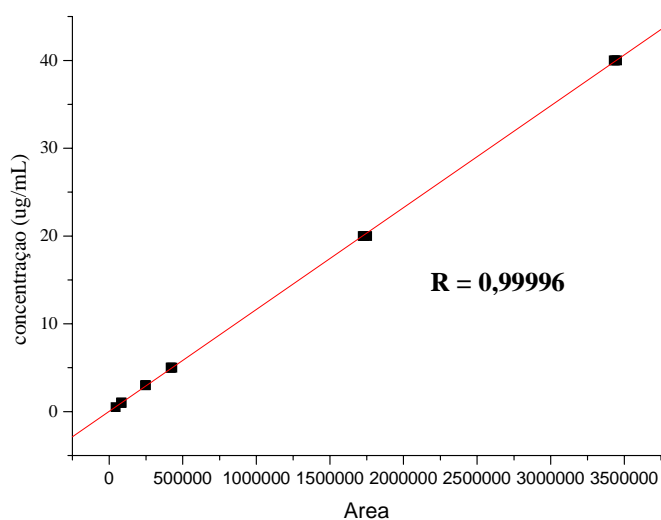


GRÁFICO 3.8: Curva de calibração da Suberosina.

TABELA 3.5: Concentrações dos produtos da reação de prenilação.

Precursor	Xantiletina ($\mu\text{g/mL}$)	Seselina ($\mu\text{g/mL}$)	Suberosina ($\mu\text{g/mL}$)
Umbeliferona	2,40	1,15	0,71
Herniarina	2,71	1,53	0,78

Pode-se observar que a quantidade de um dos produtos formados a partir da reação de prenilação realizada às 23:00 h, a piranocumarina Xantiletina é mais expressiva do que a Seselina e a Suberosina, o que está de

acordo com os dados fitoquímicos obtidos, que mostram uma maioria desta mesma em relação às outras. Com isso observa-se que além da Xantiletina estar em maior quantidade na planta (dados fitoquímicos) em relação aos outros metabólitos, também é produzida em maior quantidade pela reação enzimática com a preniltransferase.

3.2.4 – Experimento de incorporação de IPP-¹⁴C

Foi realizada a incorporação *in vivo* do pirofosfato de isopentenila [IPP-1-¹⁴C] administrado nas raízes da planta enxertada de *C. sinensis* sobre *C. limonia* (**FIGURA 3.15**, p. 150) com o objetivo de se confirmar a translocação das piranocumarinas avaliadas nos ensaios enzimáticos com a preniltransferase.

Essa confirmação é feita encontrando nas raízes e nas folhas a piranocumarina xantiletina com a marcação do ¹⁴C, visto que nas folhas não há atividade da enzima preniltransferase e se a mesma estiver marcada neste órgão, então conclui-se que teria sido translocada.

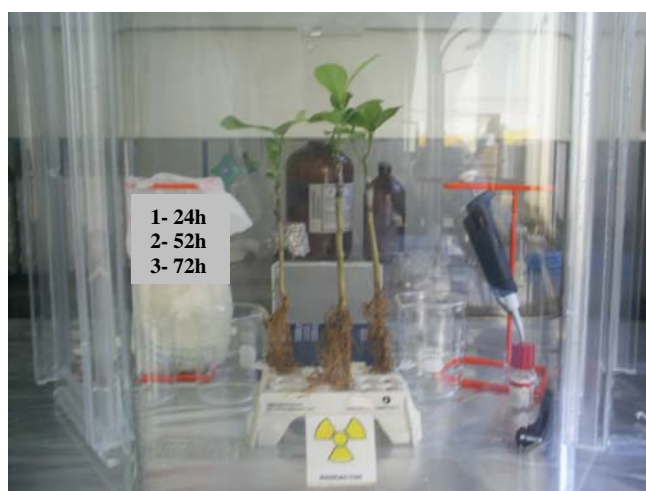


FIGURA 3.15: Foto do experimento de incorporação do IPP-¹⁴C nas raízes do enxerto de *Citrus sinensis* sobre *C. limonia*.

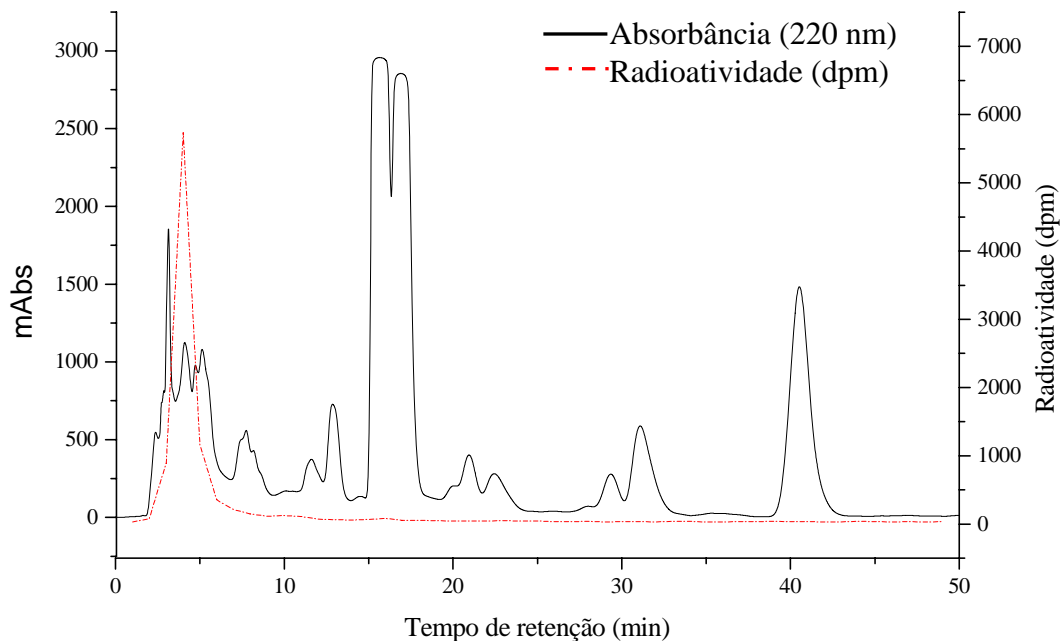


GRÁFICO 3.9: Incorporação do IPP-¹⁴C obtido do extrato das raízes após 52 h.

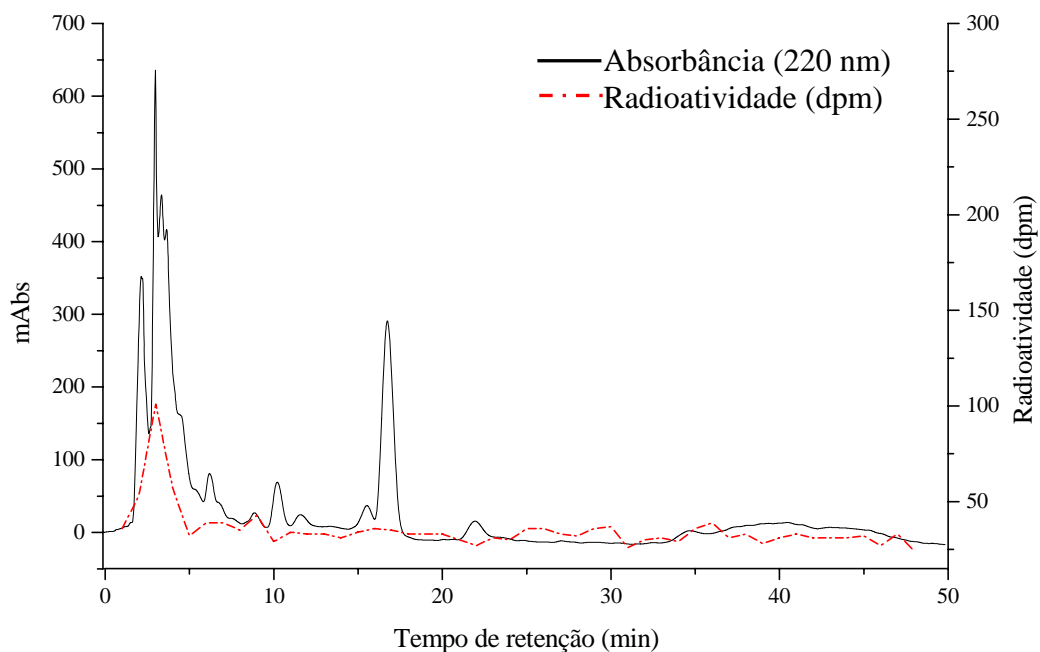


GRÁFICO 3.10: Incorporação do IPP-¹⁴C obtido do extrato das folhas após 52 h.

Os resultados mostrados foram realizados com as raízes e folhas com 52 h de metabolização e mostram que houve absorção do radioisótopo pela planta. Isso pode ser visto nos gráficos **GRÁFICOS 3.9** e **3.10**, na página 151, que houve leitura de radioatividade nas raízes e folhas, mas o reagente radiativo eluiu da coluna no volume morto (entre 3-5 min), caracterizando que ele foi absorvido, porém a planta não conseguiu metabolizá-lo para formação da piranocumarina. Com isto, infelizmente não foi possível confirmar se a enzima encontra-se ativa apenas nas raízes. Contudo, este experimento será otimizado e concluído por um segundo aluno do grupo de Produtos Naturais da UFSCar.

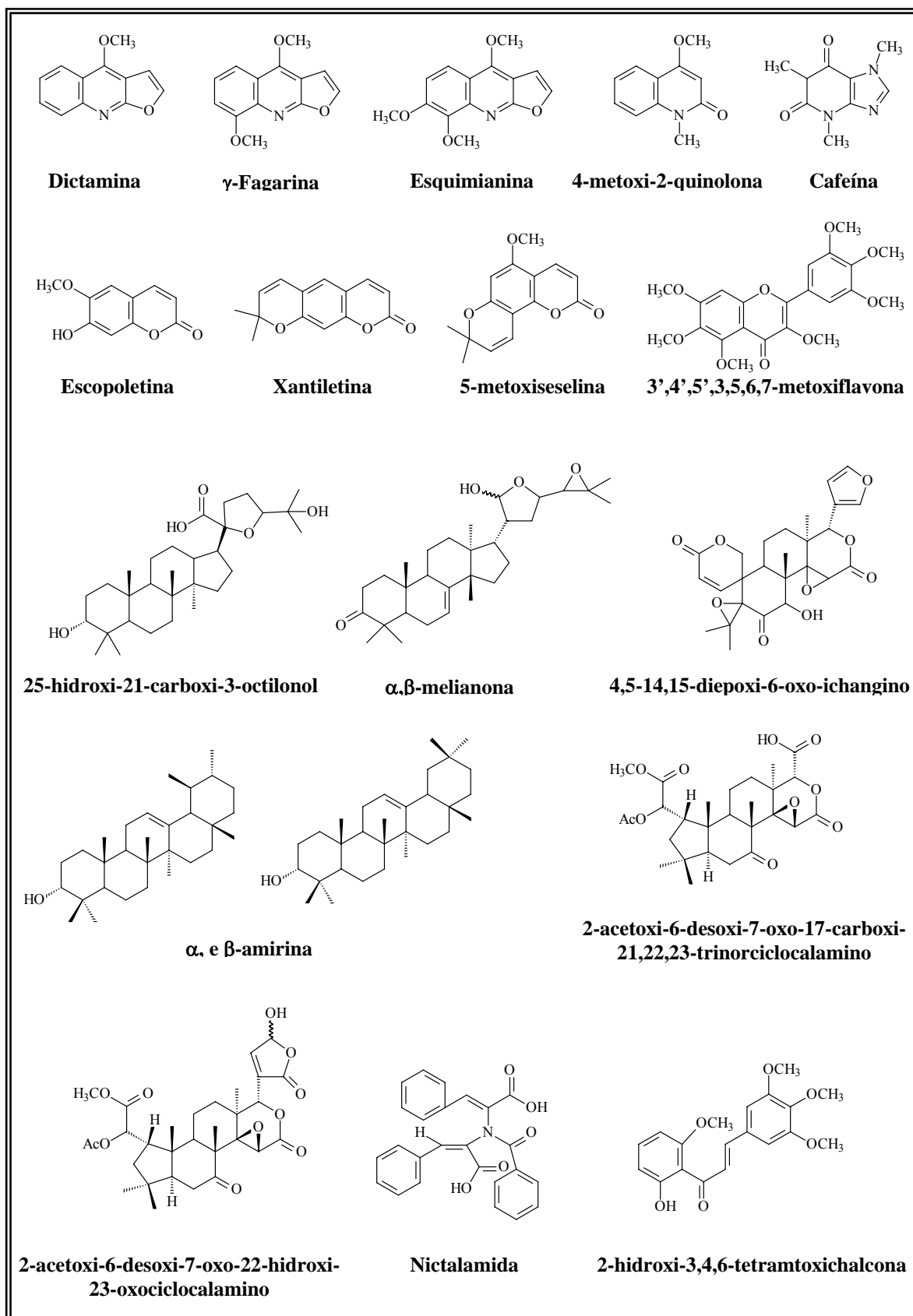
CAPÍTULO 4

4 - ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Nycticalanthus speciosus*

A espécie *Nycticalanthus speciosus* é provavelmente endêmica da Amazônia central e é conhecida apenas na região de Manaus. Segundo PIRANI (2005) *Nycticalanthus* é um gênero monotípico, exclusivamente amazônico e pertencente à família Rutaceae (ver Capítulo 1, item 1.1). O estudo químico dessa espécie possui relevância científica visto que a mesma praticamente ainda não possui estudos publicados com esse objetivo.

O Grupo de Produtos Naturais da UFSCar já vem estudando a família Rutaceae, enfocando a quimiosistemática e o posicionamento taxonômico de alguns gêneros que podem estar em contradição com os estudos sistemáticos já realizados. Assim, a espécie *Nycticalanthus speciosus* passou a ser objeto de estudo desse grupo, visando contribuir no conhecimento químico sobre essa espécie, assim como aprofundar os conhecimentos sobre a família Rutaceae.

Numa primeira pesquisa realizada pelo grupo com propósito de se obter maiores informações sobre a espécie *Nycticalanthus speciosus*, foram identificados alguns metabólitos isolados dos galhos, como alcalóides, piranocumarinas, flavonóide, triterpenos e limonóides (PLACERES NETO, 2004), detalhadas no quadro a seguir:



QUADRO 4.1: Substâncias isoladas dos galhos de *Nycticalanthus speciosus* (PLACERES NETO, 2004).

No entanto, os dados obtidos são bastante preliminares, necessitando de continuação e aprofundamento. Com este intuito é que a presente tese propôs-se colaborar. Desta forma, objetiva-se neste capítulo apresentar o estudo fitoquímico da espécie *Nycticalanthus speciosus* que visa avançar no conhecimento químico da família Rutaceae por meio do isolamento de metabólitos secundários.

4.1 - PARTE EXPERIMENTAL

4.1.1 - Materiais e reagentes utilizados

- Evaporadores:
 - Evaporador rotativo Tecnal (TE 120);
 - Buchi modelo rotavor R.

- Moinho:
 - Moinho Willey.

- Cromatógrafo líquido de alta eficiência:
 - Cromatógrafo líquido de alta eficiência reciclante (CLAE-R) – Shimadzu LC-8A equipado com válvula de injeção Rheodyne, loop de 500 e 2000 μ L e detector de ultravioleta Shimadzu SPD 6AV;
 - Cromatógrafo líquido de alta eficiência reciclante (CLAE-R) – Shimadzu LC-10Avp equipado com válvula de injeção

Rheodyne, loop de 20, 100, 500, 1000 e 2000 μL e detector de ultravioleta Shimadzu SPD 6AV;

- Espectrômetros de Ressonância Magnética Nuclear:
 - BRÜCKER modelo ARX-200, DQ-UFSCar, com Software UXNMR;
 - BRÜCKER modelo ARX-400, DQ-UFSCar, com Software XWINNMR.

- Cromatografia em coluna:
 - Colunas de vidro com comprimentos e diâmetros variados fabricadas na vidraria do DQ-UFSCar.

- Colunas para CLAE:
 - Coluna polimérica Shodex GS-310 2G – Asahipak;
 - Coluna preparativa C18 (10 μ) (ϕ x h = 250 x 21,2 mm);

- Fases estacionárias para cromatografia:
 - Sílica gel 60 GF₂₅₄ (MERCK) em placas comerciais, com suporte de alumínio;
 - Sílica gel 60 GF₂₅₄ (MERCK) em placas de vidro preparadas no laboratório (20 cm x 20 cm);
 - Sílica gel 60 (63-230 Mesh) – MERCK;
 - Sílica gel (40-63 Mesh) – MERCK;
 - Sílica gel silanizada 60 (70-230 Mesh) – MERCK;

- Sephadex LH-20 – AMERSHAM.

- Agentes reveladores:
 - Vanilina em ácido sulfúrico;
 - Iodo – MERCK;
 - Reagente de Dragendorf.

- Solventes para cromatografia:
 - Solventes (Hexano, Diclorometano, Acetato de etila e Metanol) destilados no laboratório de destilação do DQ-UFSCar;
 - Solventes P.A. – MERCK, VETEC, ALDRICH;
 - Solventes com grau cromatográfico/espectroscópico – ALDRICH e MERCK;

- Solventes para obtenção de espectros de RMN:
 - Solventes deuterados – MERCK e ALDRICH.

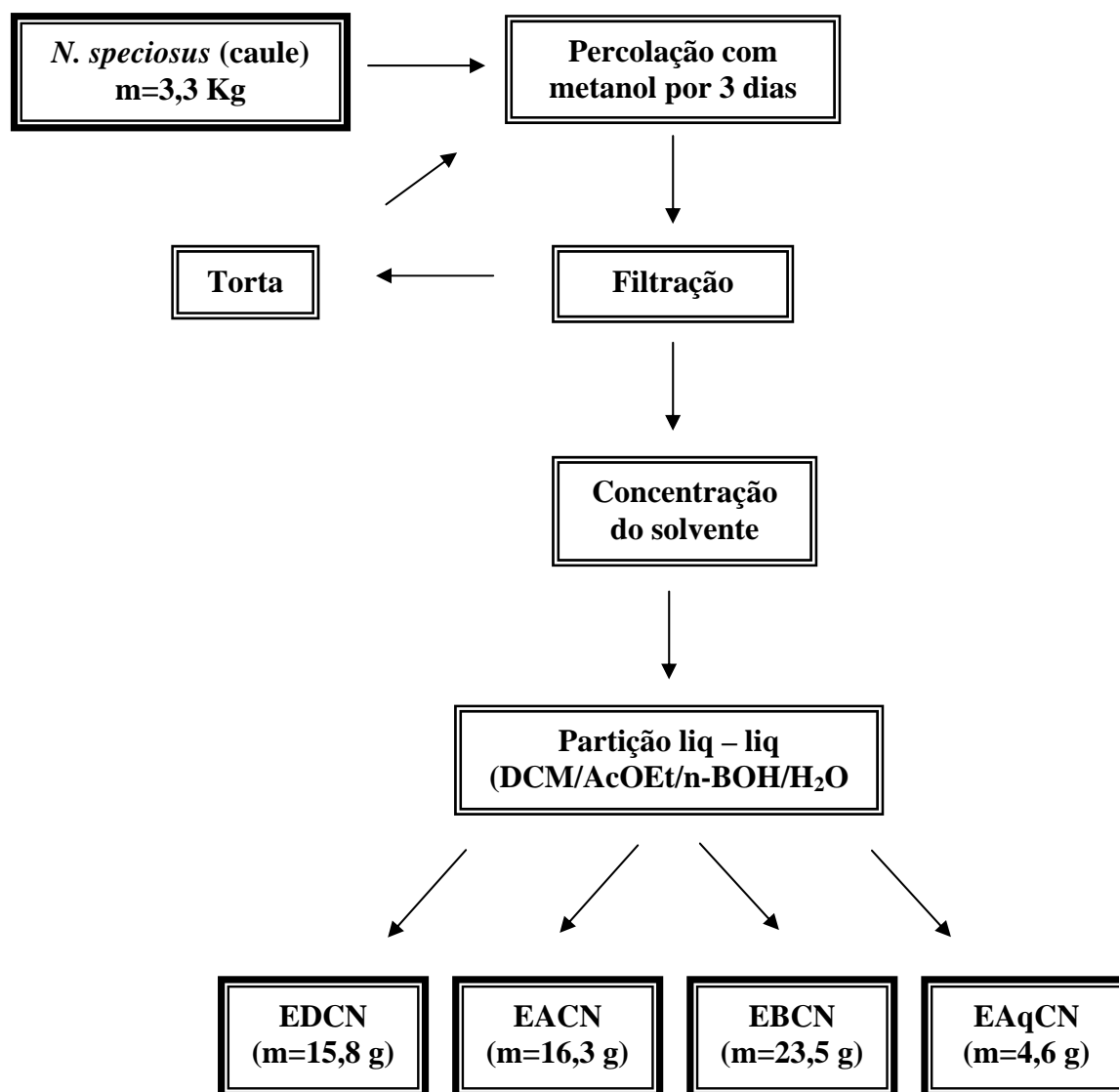
4.1.2 - Coleta do material botânico

A espécie *Nycticalanthus speciosus* (raízes, caules e folhas) foi coletada no mês de janeiro de 2001, na Reserva Florestal Ducke-INPA, situada no km 26 da estrada Manaus-Itacoatiara, próximo ao igarapé do Tinga. A exsicata estéril foi identificada pela botânica Maria de Fátima Figueiredo Melo do Instituto Nacional de Pesquisa do Amazonas (INPA) por comparação com a exsicata do INPA.

4.2 – OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

O caule de *N. speciosus* foi seco em estufa de circulação de ar (45°C) e moídas em moinho. Após o material vegetal seco e moído, foi percolado com Metanol para extração de metabólitos secundários, em temperatura ambiente com três agitações por dia. Em seguida, foi feita partição líquido-líquido com os solventes: diclorometano, acetato de etila, n-butanol e água, obtendo-se assim os extratos diclorometânico (EDCN), acetato de etila (EACN), n-butanólico (EBCN) e aquoso (EAqCN). O procedimento de obtenção dos extratos é mostrado no **ESQUEMA 4.1**, na página 159.

Assim como para o caule de *N. speciosus*, as raízes (1,8 Kg) foram fracionadas da mesma forma como mostrado para os galhos obtendo os extratos diclorometânico (EDRN), acetato de etila (EDARN), n-butanólico (EBRN) e aquoso (EAqRN).

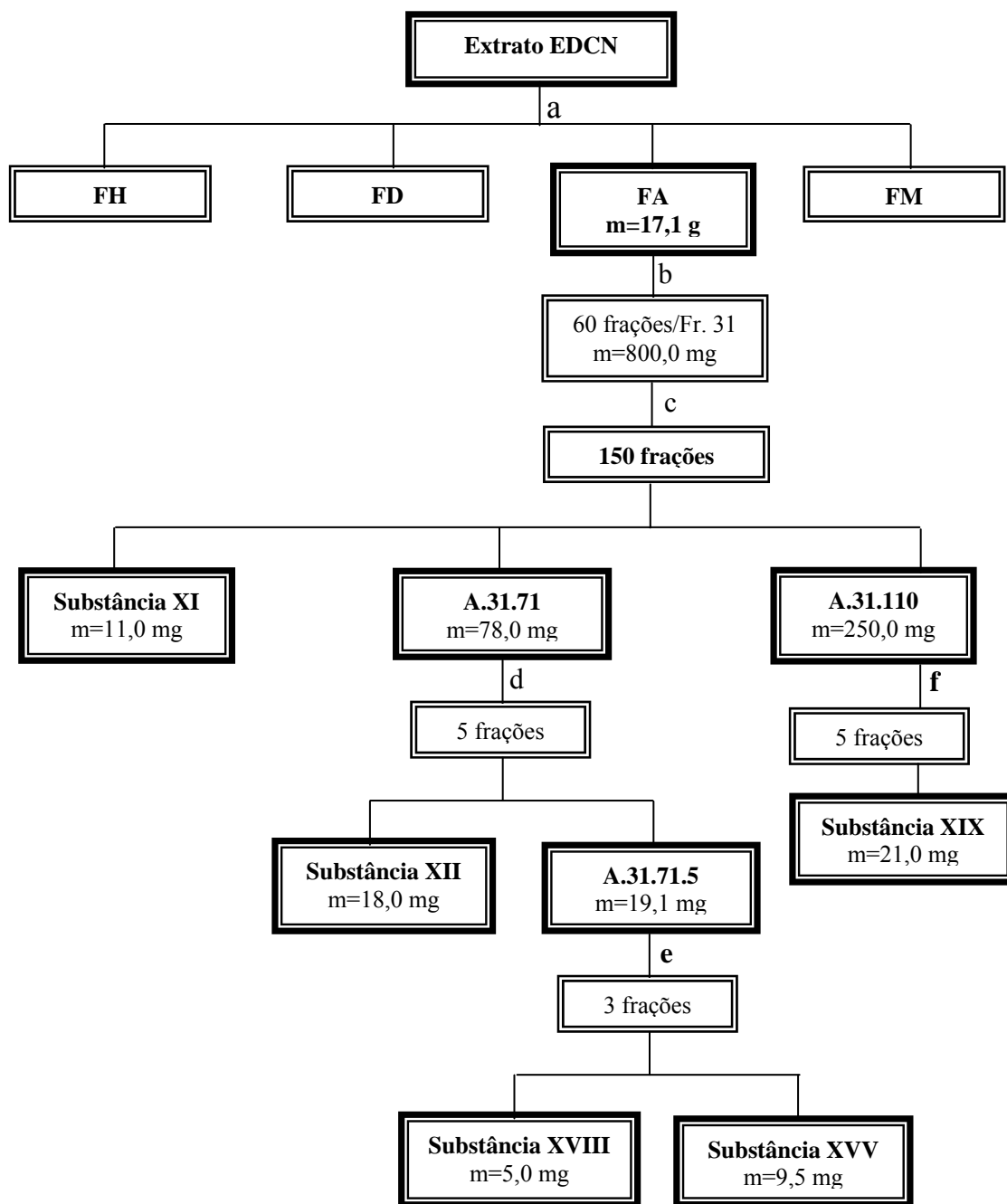


ESQUEMA 4.1: Preparação dos extratos diclorometânico (EDCN), acetato de etila (EACN), n-butanólico (EBCN) e aquoso (EAqCN) do caule de *N. speciosus*.

4.2.1 - Fracionamentos do extrato diclorometânico do caule (EDGN)

Após obter o extrato diclorometânico do caule de *N. speciosus*, o mesmo foi submetido inicialmente a cromatografia em coluna (CC) usando

como fase estacionária Sílica (230-400 mesh) e como fase móvel Hex., DCM, AcOEt e MeOH, obtendo as frações **FH**, **FD**, **FA** e **FM**. Destas frações, a acetato de etila (**FA**) foi submetida à CC usando Sílica:florisil (1:1) e eluída com Hex.:AcOEt (70:30) e MeOH (100%), obtendo-se 60 subfrações. Em seguida, a subfração **A.31** foi submetida à CC usando Sílica:florisil (1:1) e eluída com Hex., Hex.:AcOEt (80:20)/(60:40)/(50:50), AcOEt e MeOH, obtendo-se 150 subfrações. A subfração **A.31.66** foi analisada por RMN e identificada como sendo um alcalóide (Substância XI). A subfração **A.31.71** foi submetida à CC em Sílica e eluída com Hex./AcOEt (70:30), (60:40), (50:50), AcOEt e MeOH, obtendo-se 26 subfrações que foram reunidas por análise em CCDA de acordo com seus Rfs em 5, sendo a subfração 3 (**A.31.71.3**) analisada por RMN e identificada como sendo um alcalóide (Substância XII). A subfração **A.31.71.5** foi submetida a CLAE em coluna polimérica eluída com DCM:MeOH (1:1) obtendo-se três subfrações sendo que as subfrações **A.31.71.5.2** e **A.31.71.5.3** foram analisadas por RMN e identificadas como sendo dois alcalóides, as Substâncias XVIII e XVI, respectivamente. A subfração **A.31.110** foi submetida a CLAE em coluna polimérica e eluída com DCM:MeOH (1:1) obtendo-se 5 subfrações, onde a **A.31.110.4** foi analisada por RMN e identificada como sendo um limonóide (Substância XIX) (**ESQUEMA 4.2**, p. 161).



a= CC em Sílica (230-400 mesh), eluição: Hex., DCM, AcOEt e MeOH.

b= CC em Sílica:florisil (1:1), eluição com Hex.:AcOEt (70:30) e MeOH (100%).

c= CC em Sílica:florisil (1:1), eluição com Hex., Hex.;AcOEt (80:20)/(60:40)/(50:50), AcOEt e MeOH.

d= CC em Sílica, eluição com Hex./AcOEt (70:30), (60:40), (50:50), AcOEt e MeOH.

e= CLAE em coluna polimérica Shodex GS-310 2G, eluição com DCM:MeOH (1:1).

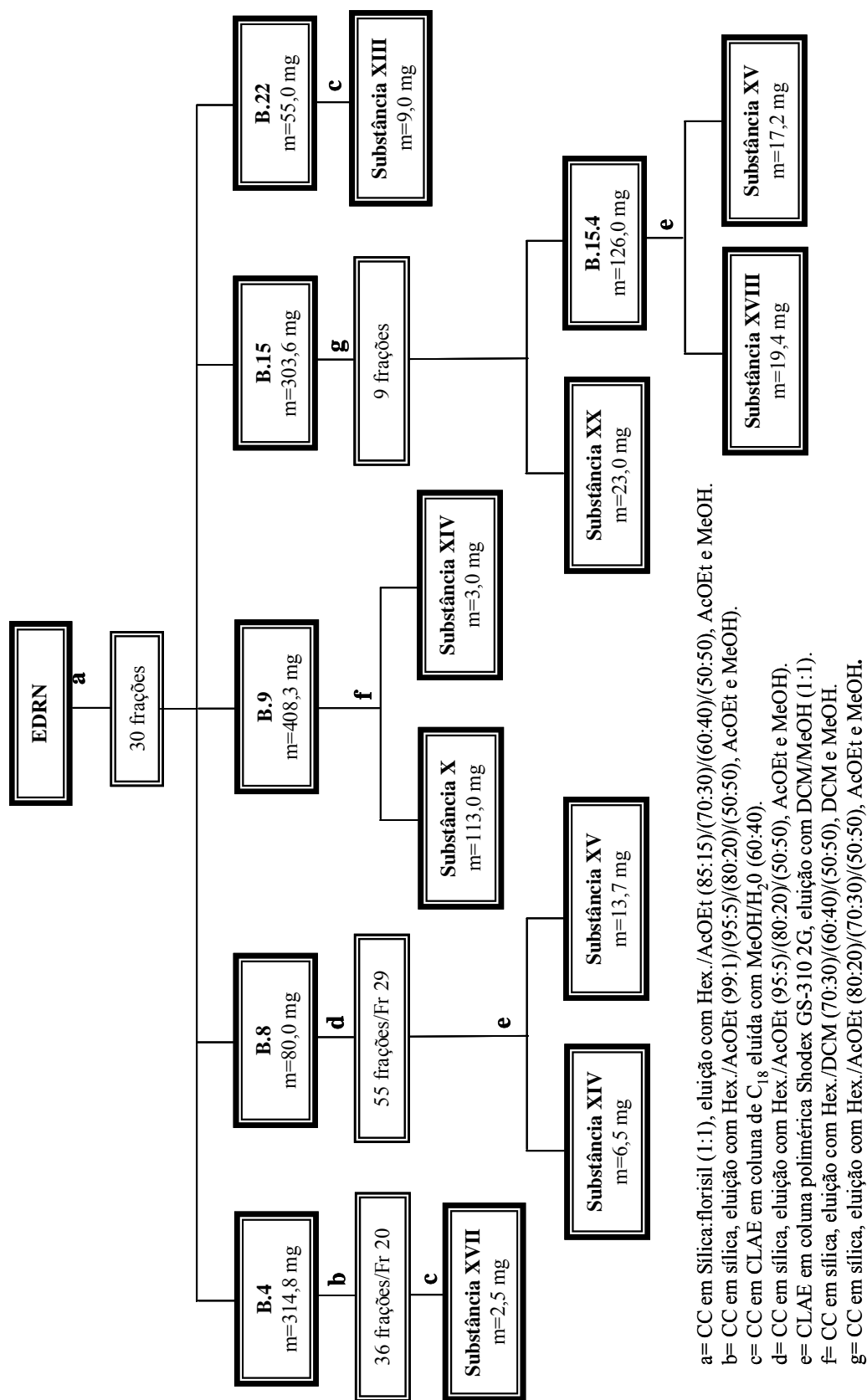
f= CLAE em coluna polimérica Shodex GS-310 2G, eluição com DCM:MeOH (1:1).

ESQUEMA 4.2: Fracionamento do extrato diclorometânico (EDCN) com obtenção das substâncias XI, XII, XVI, XVIII e XIX.

4.2.3 - Fracionamentos do extrato diclorometânico das raízes (EDRN)

Após obter o extrato diclorometânico das raízes de *N. speciosus*, o mesmo foi submetido inicialmente a CC em Sílica:florisil (1:1) eluído com Hex./AcOEt (85:15)/(70:30)/(60:40)/(50:50), AcOEt e MeOH, obtendo 90 frações que foram reunidas por análise em CCDA de acordo com seus R_fs em 30. A subfração **B.4** foi submetidas à CC em sílica e eluída com Hex./AcOEt (99:1)/(95:5)/(80:20)/(50:50), AcOEt e MeOH obtendo-se 36 subfrações sendo que a **B.4.20** foi submetida à CLAE em coluna de C₁₈ eluída com MeOH/H₂O (60:40) obtendo-se 6 subfrações onde a **B.4.20.2** foi analisada por RMN e identificada como sendo uma cumarina (Substância XVII). A subfração **B.8** foi submetida à CC em sílica e eluída com Hex./AcOEt (95:5)/(80:20)/(50:50), AcOEt e MeOH obtendo-se 55 subfrações onde a **B.8.29** foi submetida à CLAE em coluna polimérica eluída com DCM/MeOH (1:1) obtendo-se 3 subfrações onde **B.8.29.1** e **B.8.29.3** foram analisadas por RMN e identificadas como sendo dois alcalóides (Substâncias XIV e XV). A subfração **B.9** foi submetida à CC em sílica e eluída com Hex./DCM (70:30)/(60:40)/(50:50), DCM e MeOH obtendo-se 18 subfrações onde **B.9.2** e **B.9.11** após analisadas por RMN foram identificadas com sendo dois alcalóides (Substâncias X e XIV). A subfração **B.15** foi submetida à CC em sílica e eluída com Hex./AcOEt (80:20)/(70:30)/(50:50), AcOEt e MeOH obtendo-se 9 subfrações onde a **B.15.3** após análise por RMN foi identificada como sendo um limonóide (Substância XX), e a **B.15.4** foi submetida à CLAE em coluna polimérica e eluída com DCM/MeOH (1:1) obtendo-se 6 subfrações onde a **B.15.4.2** e **B.15.4.5** após análise foram identificadas como um limonóide e um alcalóide, respectivamente (Substâncias XVIII e XV). A subfração **B.22** foi purificada em CLAE com coluna C₁₈ e eluída com

MeOH/H₂O (60:40) obtendo-se a subfração **B.22.2** identificada como sendo um alcalóide (Substância XIII) (**ESQUEMA 4.3**, p. 164).



a= CC em Sílica:florisil (1:1), eluição com Hex./AcOEt (85:15)/(70:30)/(60:40)/(50:50), AcOEt e MeOH.

b= CC em sílica, eluição com Hex./AcOEt (99:1)/(95:5)/(80:20)/(50:50), AcOEt e MeOH.

c= CC em CLAE em coluna de C_{18} eluída com MeOH/ H_2O (60:40).

d= CC em sílica, eluição com Hex./AcOEt (95:5)/(80:20)/(50:50), AcOEt e MeOH.

e= CLAE em coluna polimérica Shodex GS-310 2G, eluição com DCM/MeOH (1:1).

f= CC em sílica, eluição com Hex./DCM (70:30)/(60:40)/(50:50), DCM e MeOH.

g= CC em sílica, eluição com Hex./AcOEt (80:20)/(70:30)/(50:50), AcOEt e MeOH.

ESQUEMA 4.3: Fracionamento do extrato EDRN com obtenção das substâncias X, XIII, XIV, XV, XVII, XVIII e XX.

4.3 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

A partir do estudo fitoquímico dos galhos de *Nycticalanthus speciosus* foram identificados XX metabólitos secundários, pertencentes às classes: alcalóides, cumarinas e limonóides. Estes metabólitos foram identificados por meio de técnicas espectroscópicas de RMN 1D e 2D e espectrometria de massas, sendo as determinações estruturais apresentadas por classe de substâncias.

4.3.1 – Alcalóides

4.3.1.1 – Identificação da Substância X (Dictamina)

A substância X (**FIGURA 4.1**, p. 165) apresentou-se como um cristal branco que ao ser analisado por CCDA com reagente de Dragendorff apresentou uma mancha alaranjada e é denominada como Dictamina (PUSSET et al., 1991).

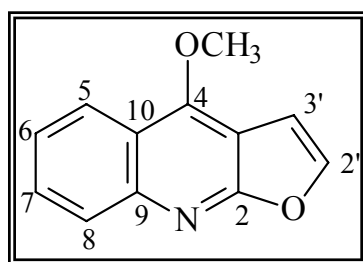


FIGURA 4.1: Estrutura química do alcalóide Dictamina (Substância X).

Pode ser observado no espectro de RMN de ^1H (**FIGURA 4.2**, p. 168) dois dubletos em δ 7,06 e 7,61 integrando para um hidrogênio cada, com constante de acoplamento $J = 2,8$ Hz, característico de um anel furano dissubstituído. O sinal em δ 7,06 foi atribuído ao hidrogênio na posição 3' e

por meio do espectro de RMN de ^{13}C (**FIGURA 4.3**, p. 169) e em comparação com dados da literatura refere-se ao carbono em δ 104,8, o sinal mais desblindado em δ 7,61 atribuído ao H-2' refere-se ao carbono δ 143,6.

Observa-se ainda quatro sinais de hidrogênios aromáticos, entre eles dois duplo duplo dubletos em δ 7,44 e 7,68 integrando para um hidrogênio cada com $J = 1,4 / 6,8 / 8,3$ e dois dubletos largos em δ 8,00 e 8,26 integrando também para um hidrogênio cada com $J = 8,3$ característicos de hidrogênios de um anel aromático dissustituído. Os sinais de hidrogênios e carbonos foram atribuídos em comparação com os dados da literatura, ou seja, o sinal em δ 7,44 foi atribuído ao H-6 e o sinal em δ 123,8 referente ao carbono C-6, o sinal em δ 7,68 ao H-7 referente ao C-7 em δ 129,6, o sinal em δ 8,00 ao H-8 referente ao C-8 em δ 127,9 e o sinal em δ 8,26 ao H-5 referente ao C-5 em δ 122,5.

Todos os sinais referentes aos hidrogênios e carbonos, são mostrados nas **TABELAS 4.1 e 4.2**, na página 167.

O espectro de RMN de ^1H apresenta ainda um singlete em δ 4,43 integrando para três hidrogênios, referente aos hidrogênios metílicos ligado a heteroátomo, e pelo espectro de RMN de ^{13}C pode-se observar um sinal em δ 59,1 característico de uma metoxila.

Baseando-se nos dados mencionados acima, ou seja, a presença de um anel furano e um aromático dissustituídos pode-se sugerir que a substância X seja um alcalóide do tipo furoquinolínico. E ainda, a presença de uma metoxila, sugere-se ser o alcalóide furoquinolínico Dictamina.

O espectro de massas (**FIGURA 4.4**, p. 170) obtido por CG-MS (rampa 100-1-10-250-15) da Substância X apresentou o pico do íon molecular M^+ com relação massa/carga (m/z) de 199 que está de acordo com a fórmula molecular $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{NO}_2$ e somado aos dados discutidos acima, permitiu-se confirmar a estrutura como sendo o alcalóide furoquinolínico **DICTAMINA**.

TABELA 4.1: Dados de RMN de ^1H da substância X (Dictamina) em comparação com dados da literatura.

Hidrogênio	Dictamina isolada	Dictamina (literatura)
5	8,26 <i>dl</i> (8,4) (1H)	8,29 <i>ddd</i> (0,6/1,2/8,5) (1H)
6	7,44 <i>ddd</i> (1,4/6,8/8,2) (1H)	7,46 <i>ddd</i> (1,5/6,8/8,4) (1H)
7	7,68 <i>ddd</i> (1,4/6,8/8,2) (1H)	7,69 <i>ddd</i> (1,5/6,8/8,4) (1H)
8	8,00 <i>dl</i> (8,4) (1H)	8,01 <i>ddd</i> (0,6/1,2/8,5) (1H)
2'	7,59 <i>d</i> (2,8) (1H)	7,64 <i>d</i> (2,8) (1H)
3'	7,03 <i>d</i> (2,8) (1H)	7,10 <i>d</i> (2,8) (1H)
4-OCH ₃	4,43 <i>s</i> (3H)	4,47 <i>s</i> (3H)

OBS: Dados de RMN de ^1H (δ , mult., $J(\text{Hz})$) (integração) (CDCl₃, 200 MHz).

TABELA 4.2: Dados de RMN de ^{13}C da substância X (Dictamina).

Carbono	Dictamina isolada
2	163,9
3	103,5
4	156,9
5	122,5
6	123,8
7	129,6
8	127,9
9	145,7
10	118,8
2'	143,6
3'	104,8
4-OCH ₃	59,1

OBS: Dados de RMN de ^{13}C (δ) (CDCl₃, 50 MHz).

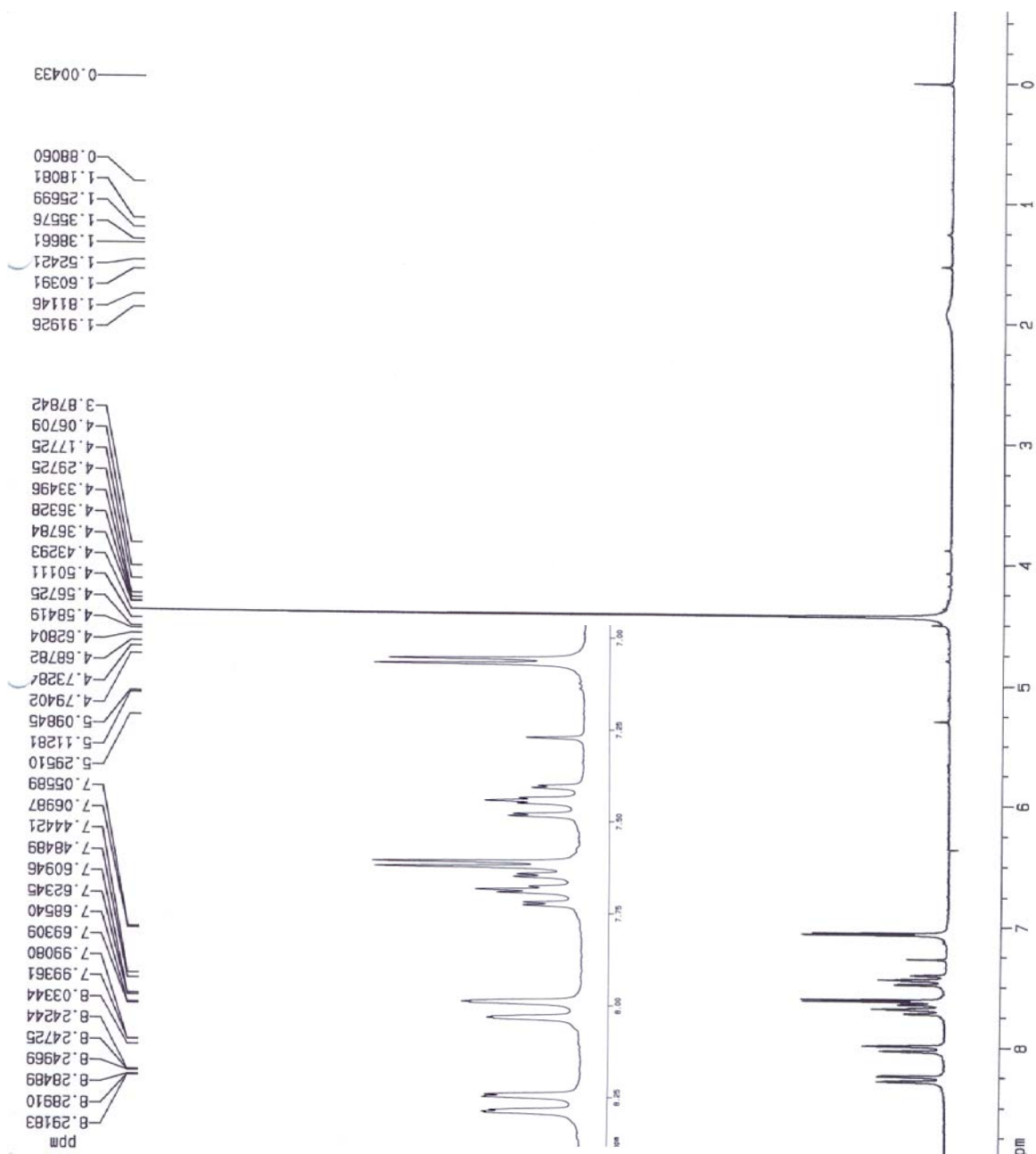


FIGURA 4.2: Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) da Substância X (Dictamina).

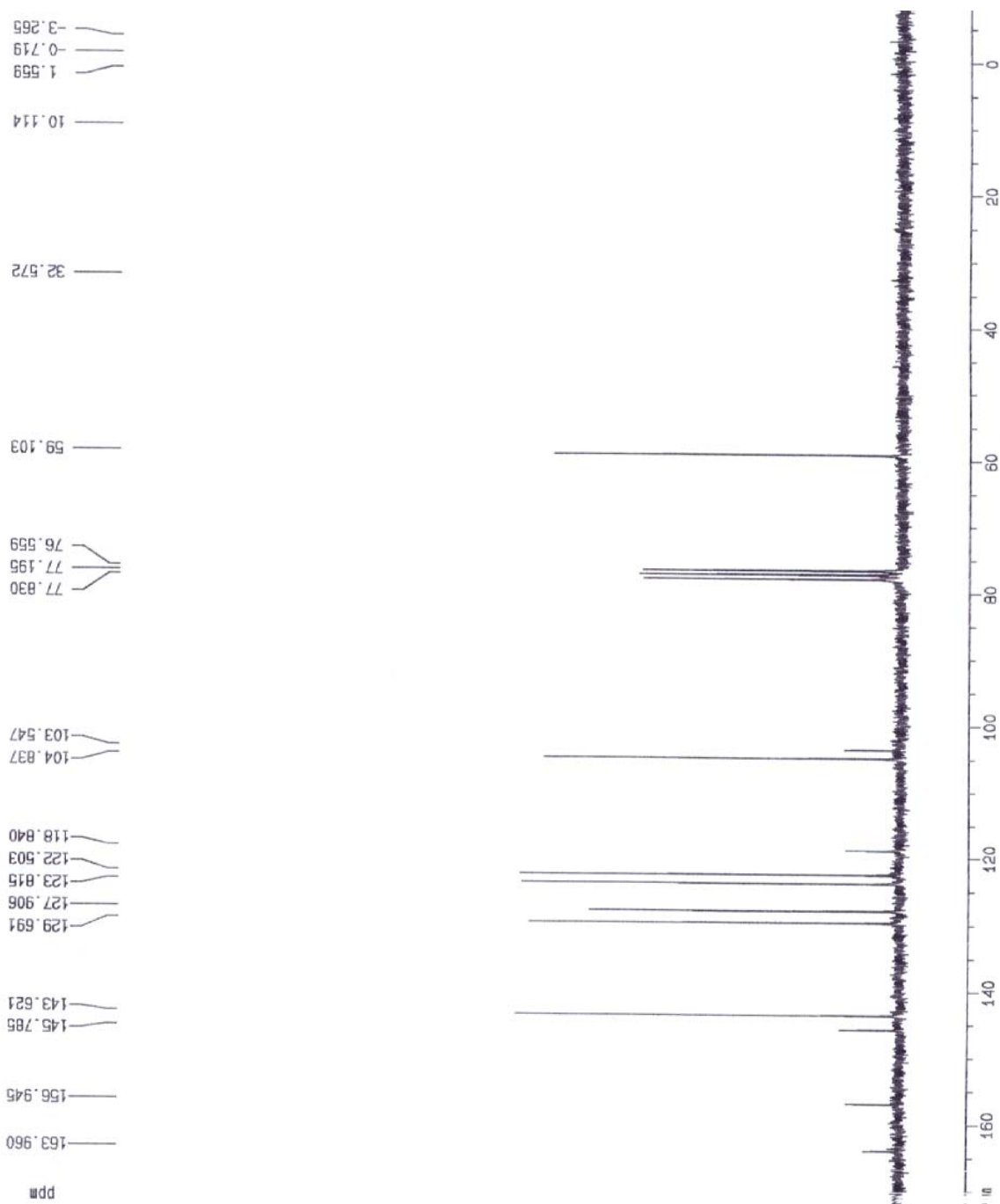


FIGURA 4.3: Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) da Substância X (Dictamina).

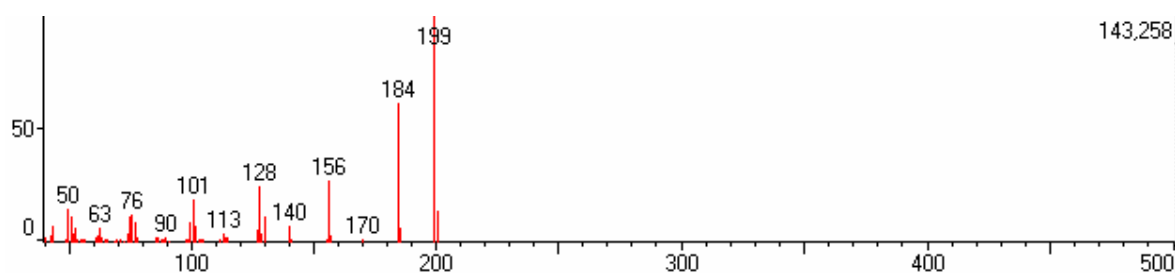


FIGURA 4.4: Espectro de massas da Dictamina (Substância X).

4.3.1.2 – Identificação da Substância XI (γ -Fagarina)

A substância XI (**FIGURA 4.5**, p. 170) apresentou-se como um cristal branco que ao ser analisado por CCDA com reagente de Dragendorff apresentou uma mancha alaranjada e é denominada como γ -Fagarina (CUCA et al., 1998).

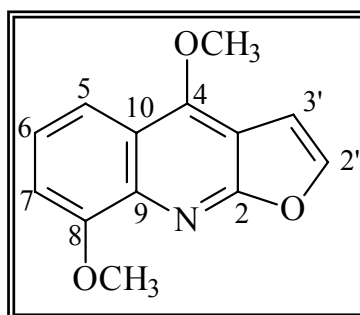


FIGURA 4.5: Estrutura química do alcalóide γ -Fagarina (Substância XI).

Ao analisar o espectro de RMN de ^1H (**FIGURA 4.6**, p. 173) da substância XI pode-se perceber a presença de sinais semelhantes aos mostrados para a Dictamina (ver item 4.3.1.1), ou seja, dois dubletos em δ 7,07 (H-3') e 7,63 (H-2') com $J = 2,8$ Hz, evidenciando a presença de um anel furano dissubstituído.

Observa-se ainda três sinais de hidrogênios aromáticos, ou seja, três duplo dubletos, sendo que um deles possivelmente estar com parte de seu

sinal sob o dubleto em δ 7,07. Desta forma temos um duplo dubleto em δ 7,03 integrando par um hidrogênio com $J= 8,4/1,2$ Hz referente a hidrogênios com acoplamento em *orto* e *meta*, um duplo dubleto em δ 7,35 integrando para um hidrogênio com $J= 8,6/8,6$ Hz referente a dois acoplamentos *orto* e outro duplo dubleto em δ 7,84 integrando para um hidrogênio com $J= 8,6/1,2$ Hz referente acoplamentos *orto* e *meta*. Esses sinais evidenciam um anel aromático trissubstituído.

Todos os sinais referentes aos hidrogênios e carbonos foram atribuídos baseando-se em dados da literatura e são mostrados nas **TABELAS 4.3 e 4.4**, na página 172.

O espectro de RMN de ^1H apresenta um singleto em δ 4,43 (igual ao mostrado para a Dictamina, item 4.3.1.1) e ainda um outro singleto em δ 4,07 referente a hidrogênios metílicos ligados a heteroátomos, e pelo espectro de RMN de ^{13}C (**FIGURA 4.7**, p. 174) pode-se observar um sinal em δ 59,0 e outro em δ 55,9 característicos de duas metoxilas. Os sinais de hidrogênio e carbono mais desblindados foram atribuídos a metoxila localizada na posição 4.

Analisando-se os dados mencionados acima, pode-se evidenciar, assim como para a Dictamina, a presença de sinais sugerindo que a substância II seja um alcalóide furoquinolínico. E ainda, com a presença de duas metoxilas, sugere-se ser o alcalóide furoquinolínico γ -Fagarina.

O espectro de massas (**FIGURA 4.8**, p. 175) obtido por CG-MS (rampa 100-1-10-250-15) da Substância XI apresentou o pico do íon molecular M^+ com m/z 229, e está de acordo com a fórmula molecular $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{NO}_2$ e somado aos dados discutidos acima, permitiu-se confirmar a estrutura como sendo o alcalóide furoquinolínico γ -**FAGARINA**.

TABELA 4.3: Dados de RMN de ^1H da substância XI (γ -Fagarina) em comparação com dados da literatura.

Hidrogênio	γ -fagarina isolada	γ -Fagarina (literatura)
5	7,84 <i>dd</i> (1,2/8,4) (1H)	7,85 <i>dl</i> (8,5) (1H)
6	7,35 <i>dd</i> (8,4/8,4) (1H)	7,34 <i>ddd</i> (0,9/7,8/8,4) (1H)
7	7,03 <i>dd</i> (1,2/8,4) (1H)	7,07 <i>dl</i> (7,8) (1H)
2'	7,63 <i>d</i> (2,8) (1H)	7,65 <i>d</i> (2,8) (1H)
3'	7,03 <i>d</i> (2,8) (1H)	7,09 <i>d</i> (2,8) (1H)
4-OCH ₃	4,43 <i>s</i> (3H)	4,44 <i>s</i> (3H)
8-OCH ₃	4,07 <i>s</i> (3H)	4,07 <i>s</i> (3H)

OBS: Dados de RMN de ^1H (δ , mult., $J(\text{Hz})$) (integração) (CDCl_3 , 200 MHz).

TABELA 4.4: Dados de RMN de ^{13}C da substância XI (γ -Fagarina).

Carbono	γ -Fagarina isolada
2	163,2
3	103,8
4	156,8
5	114,0
6	123,4
7	107,7
8	154,5
9	137,5
10	119,7
2'	143,8
3'	103,8
4-OCH ₃	59,0
8-OCH ₃	55,9

OBS: Dados de RMN de ^{13}C (δ) (CDCl_3 , 50 MHz).

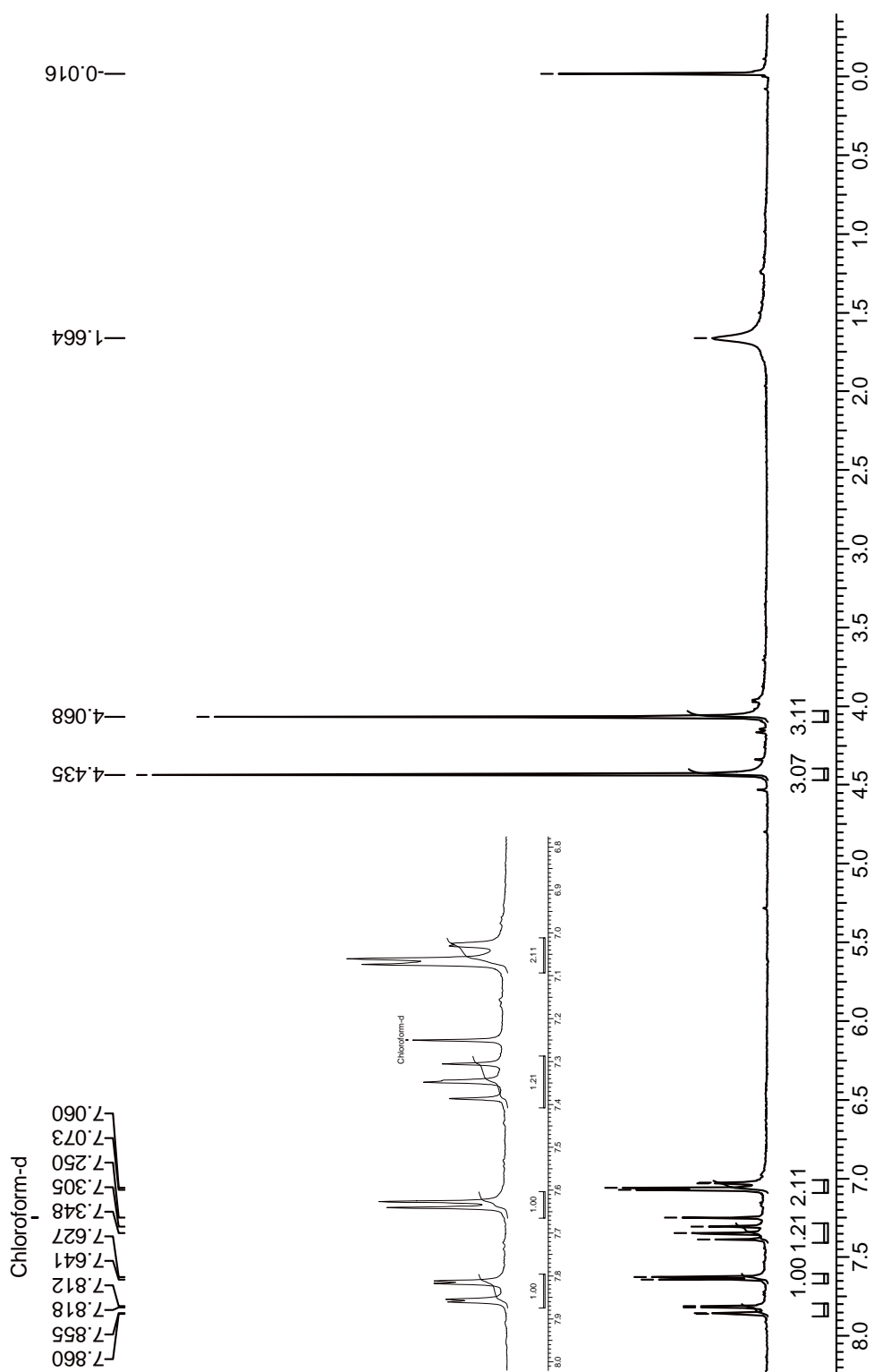


FIGURA 4.6: Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) da Substância XI (γ -Fagarina).

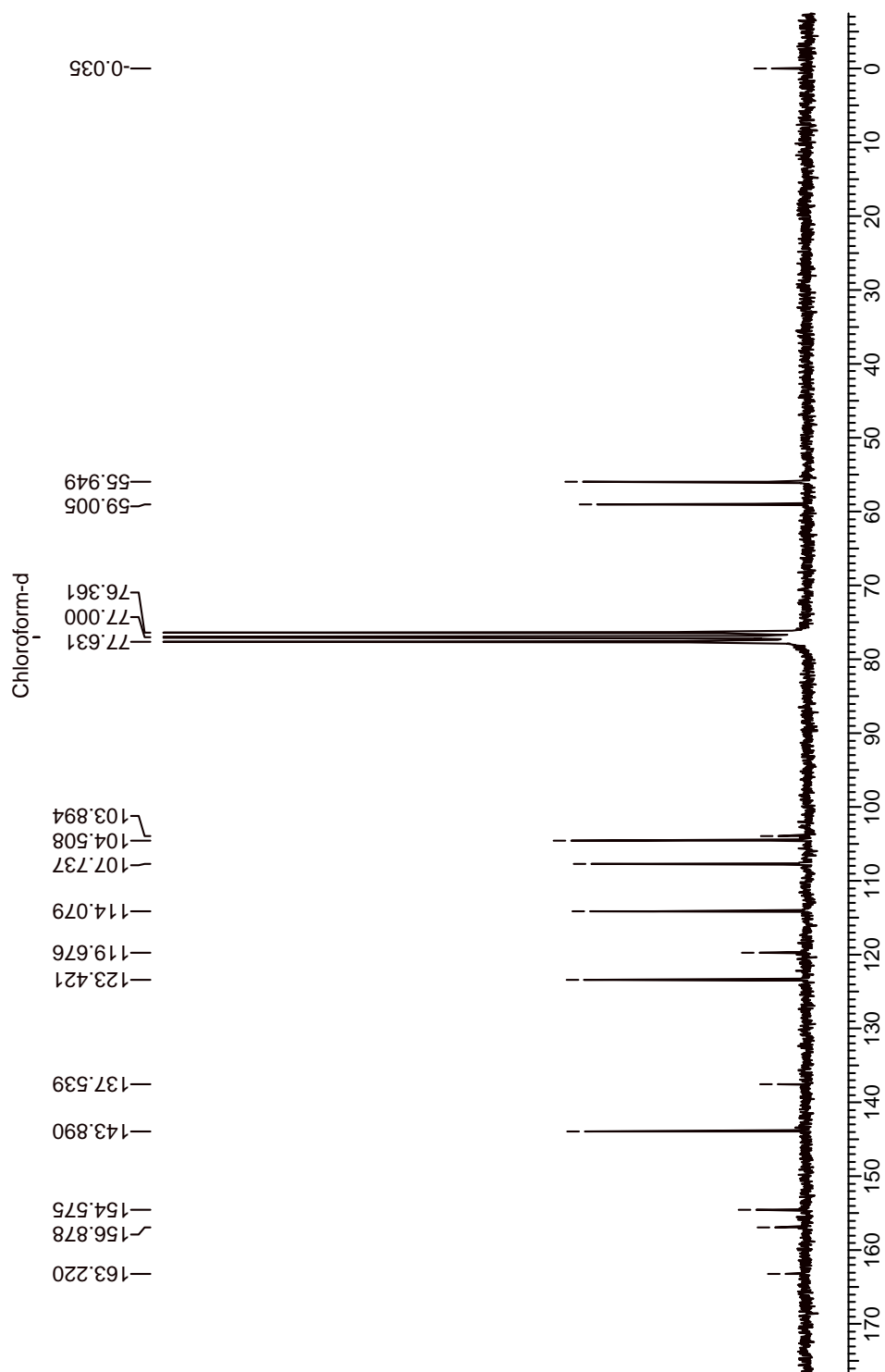


FIGURA 4.7: Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) da Substância XI (γ -Fagarina).

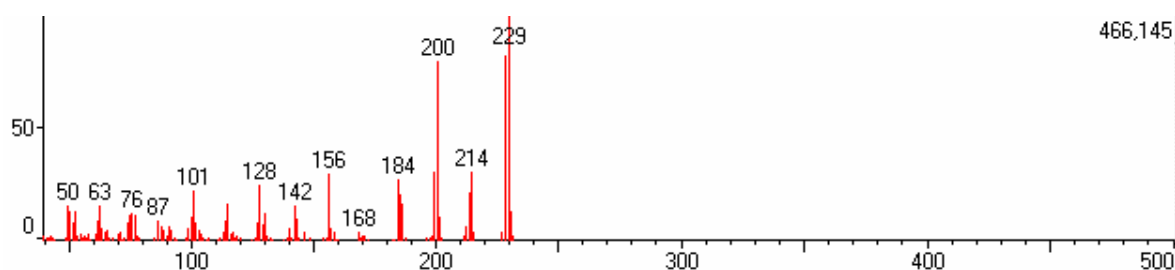


FIGURA 4.8: Espectro de massas da γ -fagarina (Substância XI).

4.3.1.3 – Identificação da Substância XII (Esquimianina)

A substância XII (**FIGURA 4.9**, p. 175) apresentou-se como um cristal branco que ao ser analisado por CCDA com reagente de Dragendorff apresentou uma mancha alaranjada e é denominada como Esquimianina (AHOND, 1978; CUCA et al., 1998; CHAKRAVARTY et al., 1999).

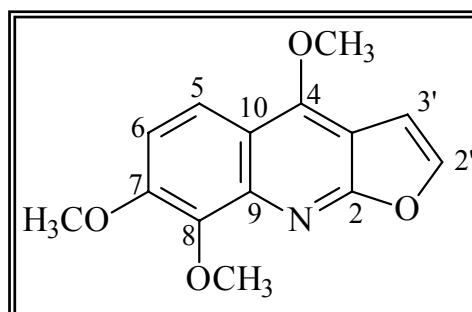


FIGURA 4.9: Estrutura química do alcalóide Esquimianina (Substância XII).

O espectro de RMN de ^1H (**FIGURA 4.10**, p. 178) da substância XII apresenta sinais semelhantes aos mostrados para a dictamina e a γ -Fagarina (ver itens 4.3.1.1 e 4.3.1.2), ou seja, dois dubletos em δ 7,00 (H-3') e 7,54 (H-2') com $J = 2,8$ Hz, evidenciando a presença de um anel furano dissustituído.

O que o espectro de RMN de ^1H da substância I apresenta de diferente em relação à γ -Fagarina é a falta de um sinal referente a hidrogênio aromático, apresentando então, apenas dois dubletos em δ 7,19 e 7,97 integrando para um hidrogênio cada com $J= 9,4$ Hz referente a dois hidrogênios com acoplamentos em *orto*, evidenciando um anel aromático tetrassubstituído.

O espectro de RMN de ^1H apresenta, ainda, três singletos em δ 4,00, δ 4,08 e δ 4,39 integrando para três hidrogênios cada, referente à hidrogênios metílicos ligados a heteroátomos, e pelo espectro de RMN de ^{13}C (**FIGURA 4.11**, p. 179) pode-se observar os sinais em δ 56,7, 58,8 e 61,5 característicos de três metoxilas.

Todos os sinais referentes aos hidrogênios e carbonos foram atribuídos baseando-se em dados da literatura e são mostrados nas **TABELAS 4.5 e 4.6**, na página 177.

Os dados mencionados acima sugerem que a substância XII seja um alcalóide furoquinolínico, e com a presença de três metoxilas, sugere-se ser o alcalóide furoquinolínico Esquimianina.

Por meio do espectro de massas (**FIGURA 4.12**, p. 180) obtido por CG-MS (rampa 100-1-10-250-15) a Substância XII apresentou o pico do íon molecular M^+ com m/z 259 que está de acordo com a fórmula molecular $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{NO}_4$ e somado aos dados discutidos acima, permitiu-se confirmar a estrutura da substância XII como sendo o alcalóide furoquinolínico **ESQUIMIANINA**.

TABELA 4.5: Dados de RMN de ^1H da substância XII (Esquimianina) em comparação com dados da literatura.

Hidrogênio	esquimianina isolada	Esquimianina (literatura)
5	7,97 <i>d</i> (9,4) (1H)	8,02 <i>d</i> (9,5) (1H)
6	7,19 <i>d</i> (9,4) (1H)	7,24 <i>d</i> (9,5) (1H)
2'	7,54 <i>d</i> (2,8) (1H)	7,55 <i>d</i> (2,8) (1H)
3'	7,00 <i>d</i> (2,8) (1H)	7,04 <i>d</i> (2,8) (1H)
4-OCH ₃	4,39 <i>s</i> (3H)	4,44 <i>s</i> (3H)
7-OCH ₃	4,07 <i>s</i> (3H)	4,11 <i>s</i> (3H)
8-OCH ₃	4,00 <i>s</i> (3H)	4,03 <i>s</i> (3H)

OBS: Dados de RMN de ^1H (δ , mult., $J(\text{Hz})$) (integração) (CDCl_3 , 200 MHz).

TABELA 4.6: Dados de RMN de ^{13}C da substância XII (Esquimianina).

Carbono	Esquimianina isolada
2	164,2
3	101,9
4	157,1
5	118,1
6	111,9
7	141,9
8	141,4
9	152,0
10	101,9
2'	143,6
3'	104,8
4-OCH ₃	61,5
7-OCH ₃	58,9
8-OCH ₃	56,7

OBS: Dados de RMN de ^{13}C (δ) (CDCl_3 , 50 MHz).

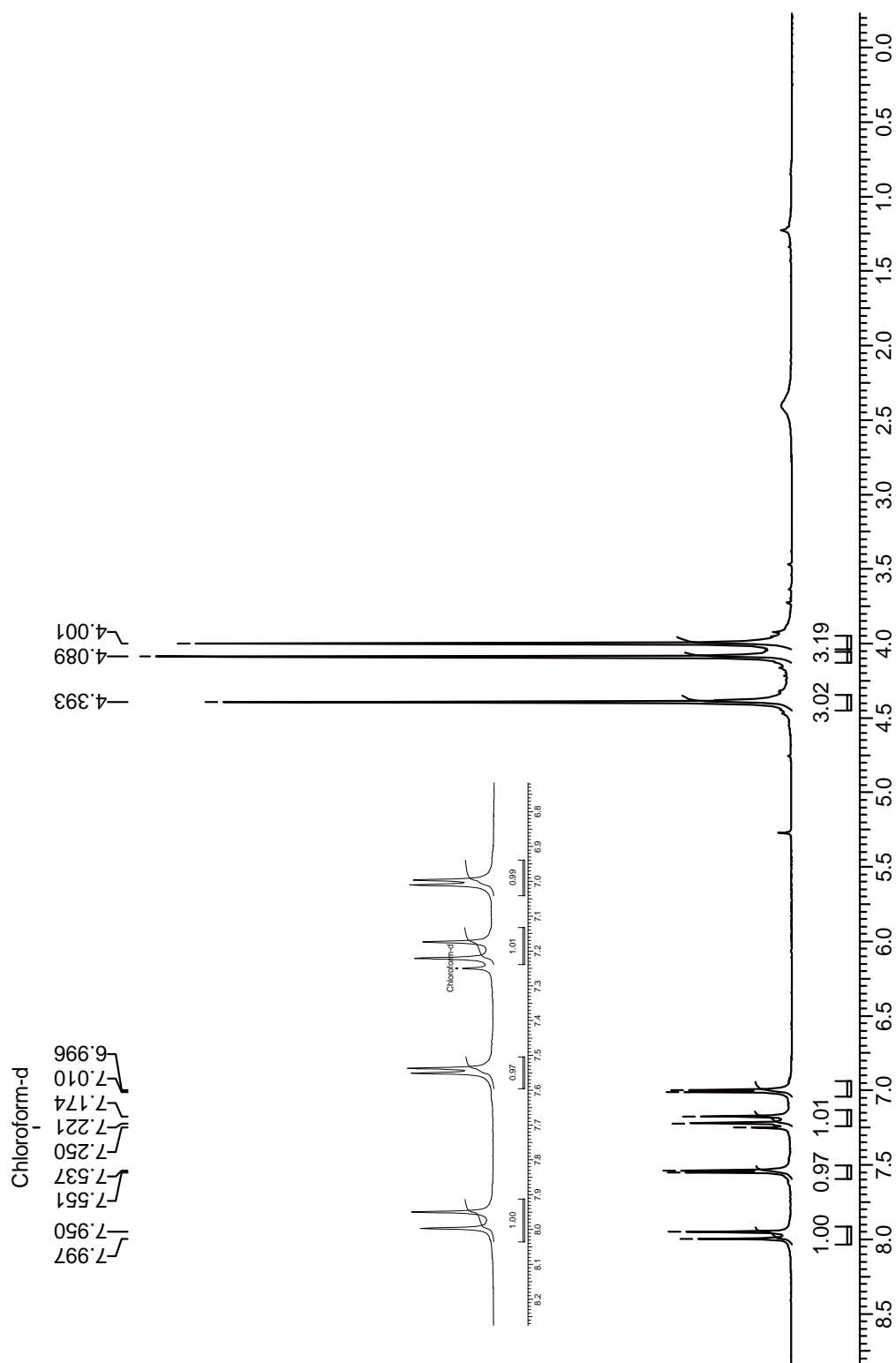


FIGURA 4.10: Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) da Substância XII (Esquimianina).

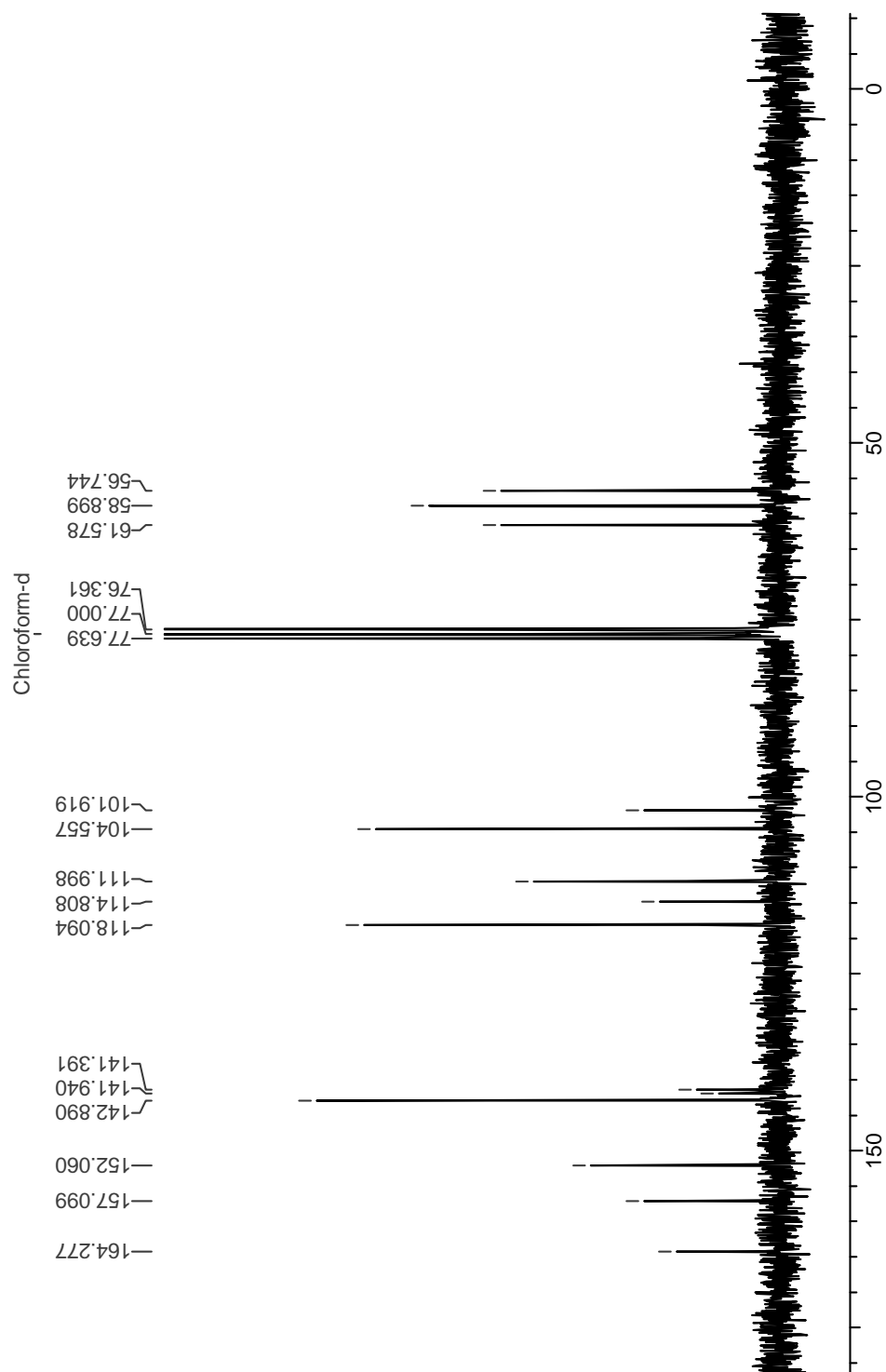


FIGURA 4.11: Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) da Substância XII (Esquimianina).

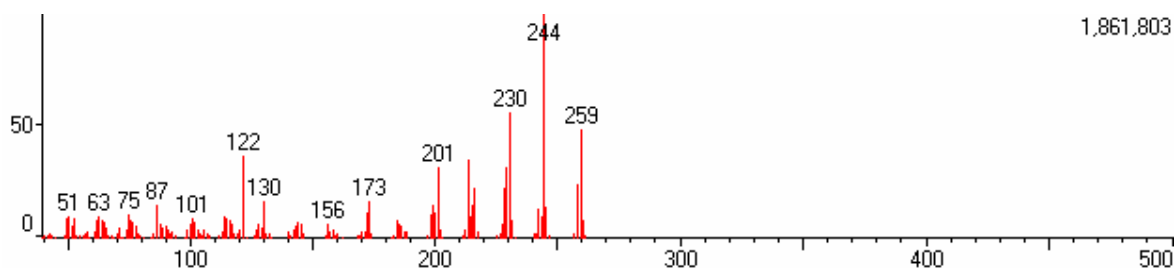


FIGURA 4.12: Espectro de massas da Esquimianina (Substância XII).

4.3.1.4 – Identificação da Substância XIII (1-Metil-4-metoxi-2-quinolona)

A substância XIII (**FIGURA 4.13**, p. 180) apresentou-se como um cristal branco que ao ser analisado por CCDA com reagente de Dragendorff apresentou uma mancha alaranjada e é denominada como 1-metil-4-metoxi-2-quinolona (MAFEZOLI, 2001).

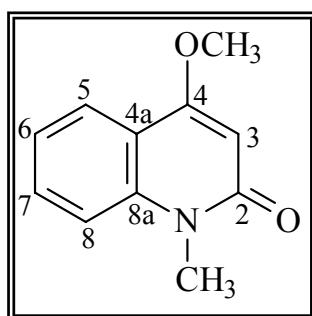


FIGURA 4.13: Estrutura química do alcalóide 1-metil-4-metoxi-2-quinolona (Substância XIII).

Analisando-se o espectro de RMN de ^1H (**FIGURA 4.14**, p. 183) observa-se quatro sinais de hidrogênios aromáticos, entre eles dois duplo duplo dubletos em δ 7,23 integrando para um hidrogênio com $J = 1,0 / 7,2 / 8,0$ e δ 7,58 integrando também para um hidrogênio com $J = 1,5 / 7,2 / 8,4$; um dubleto largo em δ 7,34 integrando para um hidrogênio com $J = 8,4$ e um

duplo dubleto δ 7,97 integrando para um hidrogênio com $J = 1,5 / 8,4$ característicos de hidrogênios de um anel aromático dissustituído. Os sinais de hidrogênios e carbonos foram atribuídos em comparação com os dados da literatura, ou seja, o sinal em δ 7,23 foi atribuído ao H-6 e por meio do espectro de RMN de ^{13}C (**FIGURA 4.15**, p. 184) o sinal em δ 121,6 é referente ao carbono C-6, o sinal em δ 7,58 foi atribuído ao H-7 referente ao C-7 em δ 131,1; o sinal em δ 7,34 ao H-8 referente ao C-8 em δ 113,9 e o sinal em δ 7,97 ao H-5 referente ao C-5 em δ 123,3.

Observa-se também no espectro de RMN de ^1H um singleto em δ 6,03 que é característico de alcalóides 2-quinolínicos, e ainda dois singletos em δ 3,67 e δ 3,95 integrando para três hidrogênios cada, referentes à hidrogênios metílicos ligados a heteroátomos. O sinal mais desblindado em δ 3,95 foi atribuído a uma metoxila e o sinal em δ 3,67 a uma N-metila. No espectro de RMN de ^{13}C pode-se observar o sinal em δ 55,7 referente ao carbono de uma metoxila e o sinal em δ 29,0 referente ao carbono N-metílico.

O espectro de RMN de ^{13}C apresenta 11 sinais de carbonos, sendo que pode-se destacar o sinal em δ 163,8 referente ao carbono carbonílico na posição 2 e o sinal em δ 96,4 referente a um carbono olefínico alfa carbonílico.

Todos os sinais referentes aos hidrogênios e carbonos foram atribuídos baseando-se em dados da literatura e são mostrados nas **TABELAS 4.7 e 4.8**, na página 182.

O espectro de massas (**FIGURA 4.16**, p. 185) obtido por CG-MS (rampa 100-1-10-250-15) da Substância XIII apresentou o pico do íon molecular M^+ com m/z 189 que está de acordo com sua fórmula molecular $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{NO}_2$ que somado aos dados discutidos acima, permitiu-se confirmar a estrutura da substância XIII como sendo o alcalóide 2-quinolínico **1-METIL-4-METOXI-2-QUINOLONA**.

TABELA 4.7: Dados de RMN de ^1H da substância XIII (1-metil-4-metoxi-2-quinolona) em comparação com dados da literatura.

Hidrogênio	1-metil-4-metoxi-2-quinolona isolada	1-metil-4-metoxi-2-quinolona (literatura)
3	6,04 <i>s</i> (1H)	6,05 <i>s</i> (1H)
5	7,97 <i>dd</i> (1,5/8,0) (1H)	7,97 <i>dd</i> (1,5/8,0) (1H)
6	7,23 <i>ddd</i> (1,0/7,2/8,0) (1H)	7,22 <i>ddd</i> (1,0/7,1/8,0) (1H)
7	7,58 <i>ddd</i> (1,5/7,2/8,4) (1H)	7,587 <i>ddd</i> (1,5/7,1/8,6) (1H)
8	7,34 <i>dl</i> (8,4) (1H)	7,33 <i>dl</i> (8,6) (1H)
1-NCH ₃	3,67 <i>s</i> (3H)	3,68 <i>s</i> (3H)
4-OCH ₃	3,95 <i>s</i> (3H)	3,95 <i>s</i> (3H)

OBS: Dados de RMN de ^1H (δ , mult., $J(\text{Hz})$) (integração) (CDCl_3 , 200 MHz).**TABELA 4.8:** Dados de RMN de ^{13}C da substância XIII (1-metil-4-metoxi-2-quinolona).

Carbono	1-metil-4-metoxi-2-quinolona isolada
2	163,8
3	96,4
4	162,6
4a	116,4
5	123,3
6	121,6
7	131,1
8	113,9
8a	139,7
1-NCH ₃	29,0
4-OCH ₃	55,7

OBS: Dados de RMN de ^{13}C (δ) (CDCl_3 , 50 MHz).

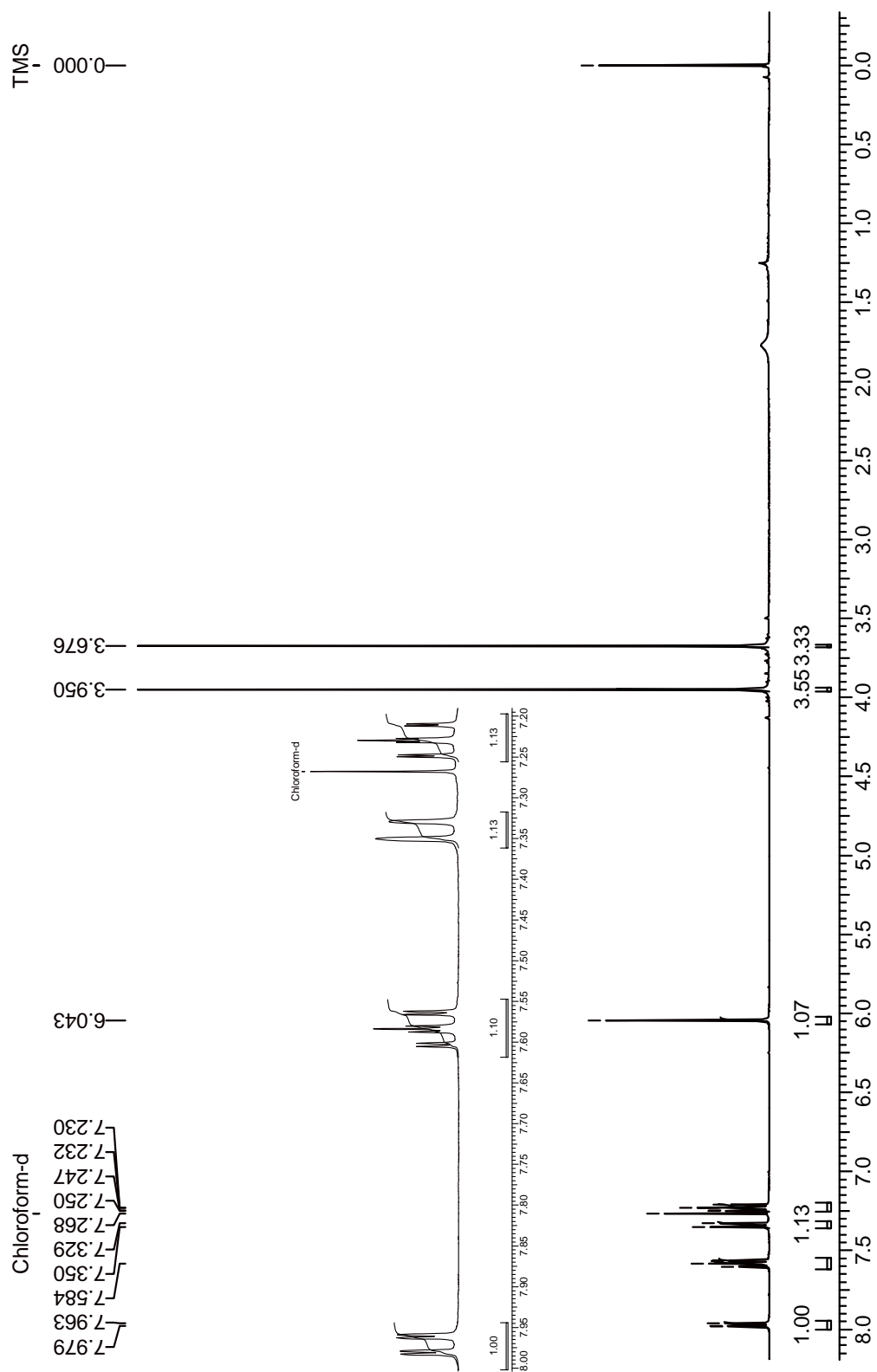


FIGURA 4.14: Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) da Substância XIII (1-metil-4-metoxi-2-quinolona).

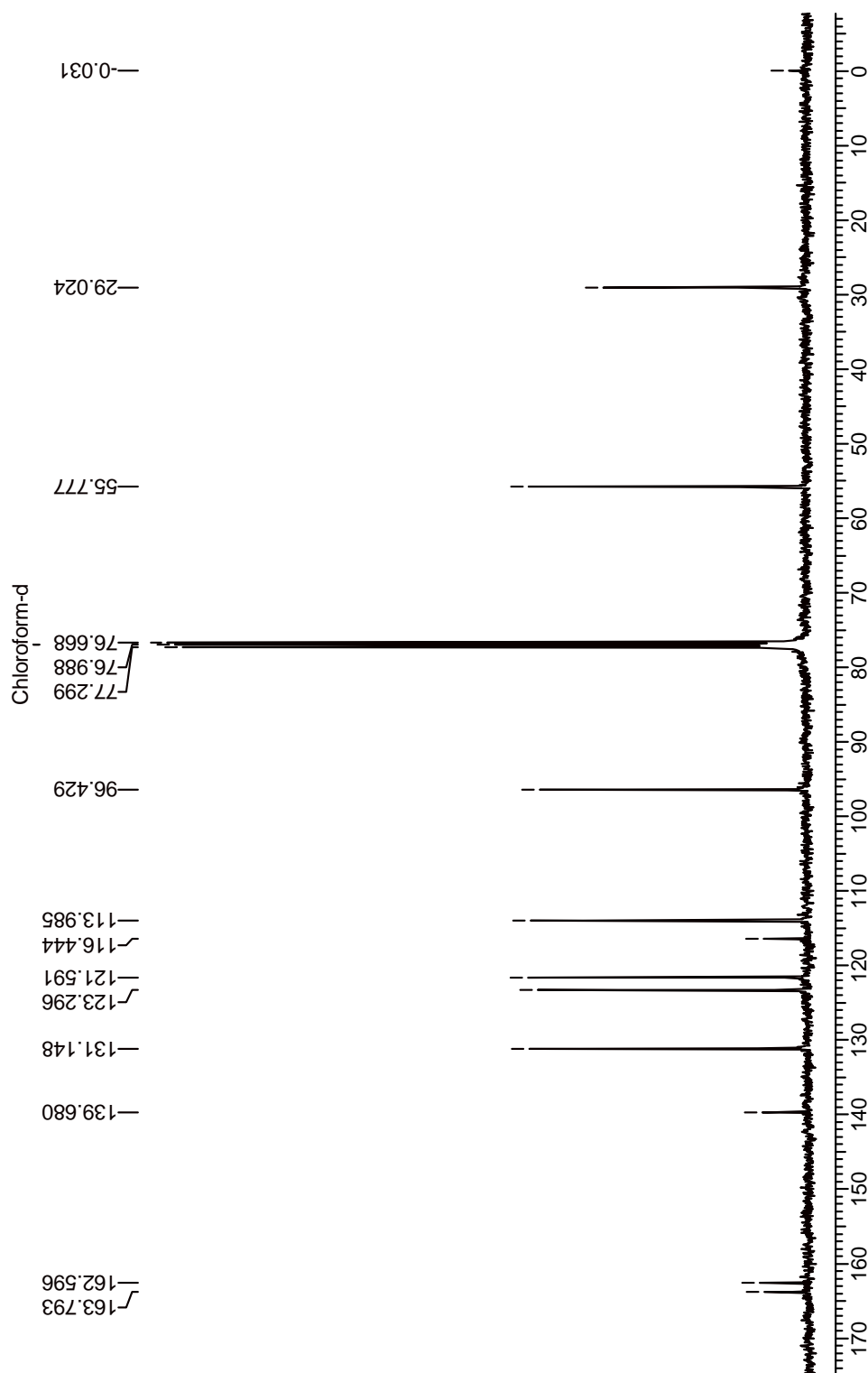


FIGURA 4.15: Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) da Substância XIII (1-metil-4-metoxi-2-quinolona).

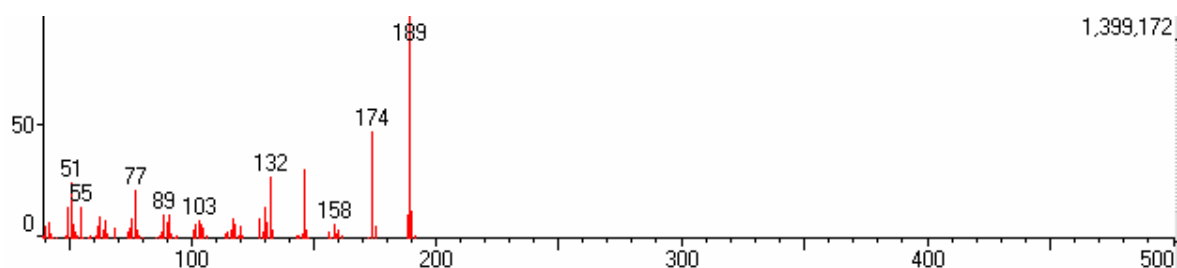


FIGURA 4.16: Espectro de massas da 1-metil-4-metoxi-2-quinolona (Substância XIII).

4.3.1.5 – Identificação da Substância XIV (N-metilflindersina)

A substância XIV (**FIGURA 4.17**, p. 185) apresentou-se como um cristal branco que ao ser analisado por CCDA com reagente de Dragendorff apresentou uma mancha alaranjada e é denominada como N-metilflindersina (CUCA et al., 1998; MAFEZOLI, 2001; ROCHA, 2004).

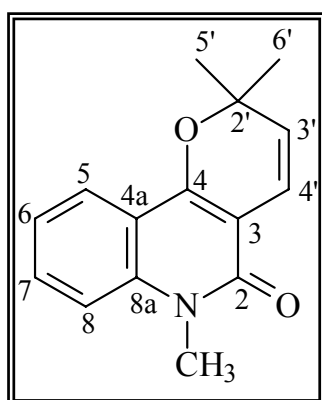


FIGURA 4.17: Estrutura química do alcalóide N-metilflindersina (Substância XIV).

O espectro de RMN de ^1H (**FIGURA 4.18**, p. 188) da substância XIV apresenta sinais semelhantes aos da 1-metil-4-metoxi-2-quinolona (ver item 4.3.1.4), ou seja, dois duplo duplo dubletos em δ 7,24 ($J= 1,0/7,0/8,0$ Hz) e 7,61 ($J= 1,6/7,0/8,5$ Hz); um dubleto largo em δ 7,47 ($J= 8,5$ Hz) e um

duplo dubleto em δ 7,92 ($J= 1,6/8,0$ Hz) referentes aos hidrogênios de um anel aromático dissubstituído.

Observa-se também no espectro de RMN de ^1H um singlete em δ 3,64 integrando para três hidrogênios, característico de hidrogênios metílicos ligados a heteroátomo, referentes a uma N-metila. O espectro apresenta ainda dois dubletos em δ 5,64 e 6,64 integrando para um hidrogênio cada com $J= 9,9$ Hz e um singlete em δ 1,51 integrando para seis hidrogênios característicos de um anel 2,2-dimetilcromeno (ou anel pirano). Desta forma, sugere-se que a estrutura da substância XIV seja um alcalóide 2-quinolínico com um anel pirano nas posições 3 e 4.

O espectro de RMN de ^{13}C (**FIGURA 4.19**, p. 189) apresenta 14 sinais de carbonos, sendo que pode-se destacar o sinal em δ 165,0 referente ao carbono carbonílico na posição 2 e o sinal em δ 31,1 referente a uma N-metila e o sinal em δ 28,8 referentes às metilas equivalentes do anel pirano.

Todos os sinais referentes aos hidrogênios e carbonos foram atribuídos baseando-se em dados da literatura e são mostrados nas **TABELAS 4.9 e 4.10**, na página 187.

O espectro de massas (**FIGURA 4.20**, p. 190) obtido por CG-MS (rampa 100-1-10-250-15) da Substância XIV apresentou o pico do íon molecular M^+ com m/z 241 que está de acordo com sua fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{NO}_2$ e somado aos dados discutidos acima, permitiu-se confirmar a estrutura da substância XIV como sendo o alcalóide 2-quinolínico **N-METILFLINDERSINA**.

TABELA 4.9: Dados de RMN de ^1H da substância XIV (N-metilflindersina) em comparação com dados da literatura.

Hidrogênio	N-metilflindersina isolada	N-metilflindersina (literatura)
5	7,47 <i>dl</i> (8,5) (1H)	7,30 <i>dl</i> (8,5) (1H)
6	7,24 <i>ddd</i> (1,5/7,2/8,0) (1H)	7,22 <i>tl</i> (7,8) (1H)
7	7,60 <i>ddd</i> (1,5/7,2/8,5) (1H)	7,54 <i>ddd</i> (1,3/7,2/8,1) (1H)
8	7,92 <i>dd</i> (1,6/8,0) (1H)	7,96 <i>dd</i> (1,5/8,1) (1H)
3'	6,64 <i>d</i> (9,9) (1H)	6,76 <i>d</i> (10) (1H)
4'	5,64 <i>d</i> (9,9) (1H)	5,54 <i>d</i> (10) (1H)
5'/6'	1,51 <i>s</i> (3H)	1,54 <i>s</i> (3H)
1-NCH ₃	3,64 <i>s</i> (3H)	3,70 <i>s</i> (3H)

OBS: Dados de RMN de ^1H (δ , mult., $J(\text{Hz})$) (integração) (CDCl_3 , 200 MHz).

TABELA 4.10: Dados de RMN de ^{13}C da substância XIV (N-metilflindersina).

Carbono	N-metilflindersina isolada
2	165,9
3	100,9
4	154,9
4a	115,7
5	122,7
6	121,9
7	131,7
8	113,7
8a	137,9
2'	80,9
3'	131,7
4'	127,9
5'/6'	28,8
1-NCH ₃	31,1

OBS: Dados de RMN de ^{13}C (δ) (CDCl_3 , 50 MHz).

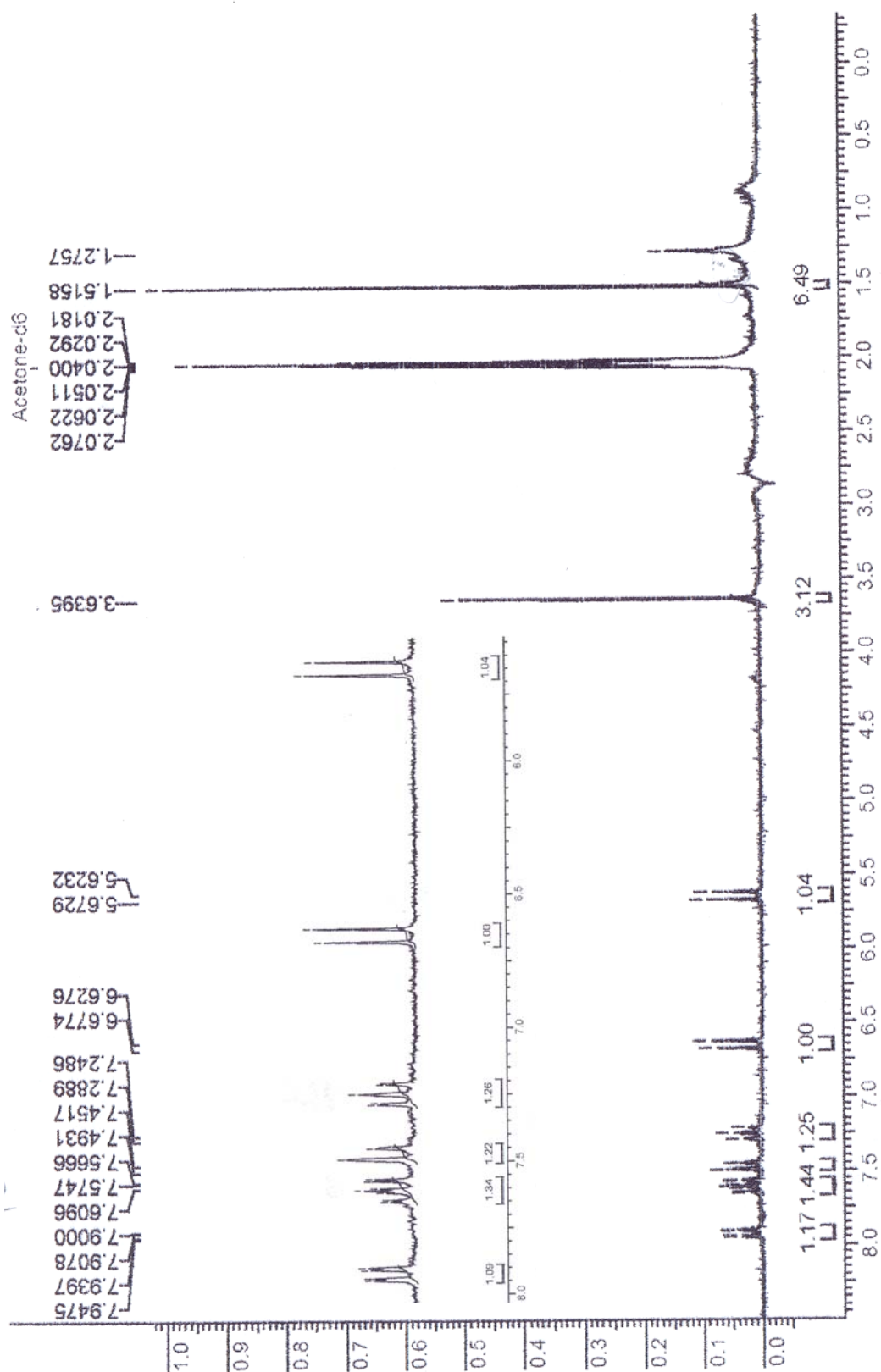


FIGURA 4.18: Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, Acetona-d6) da Substância XIV (N-metilflindersina).

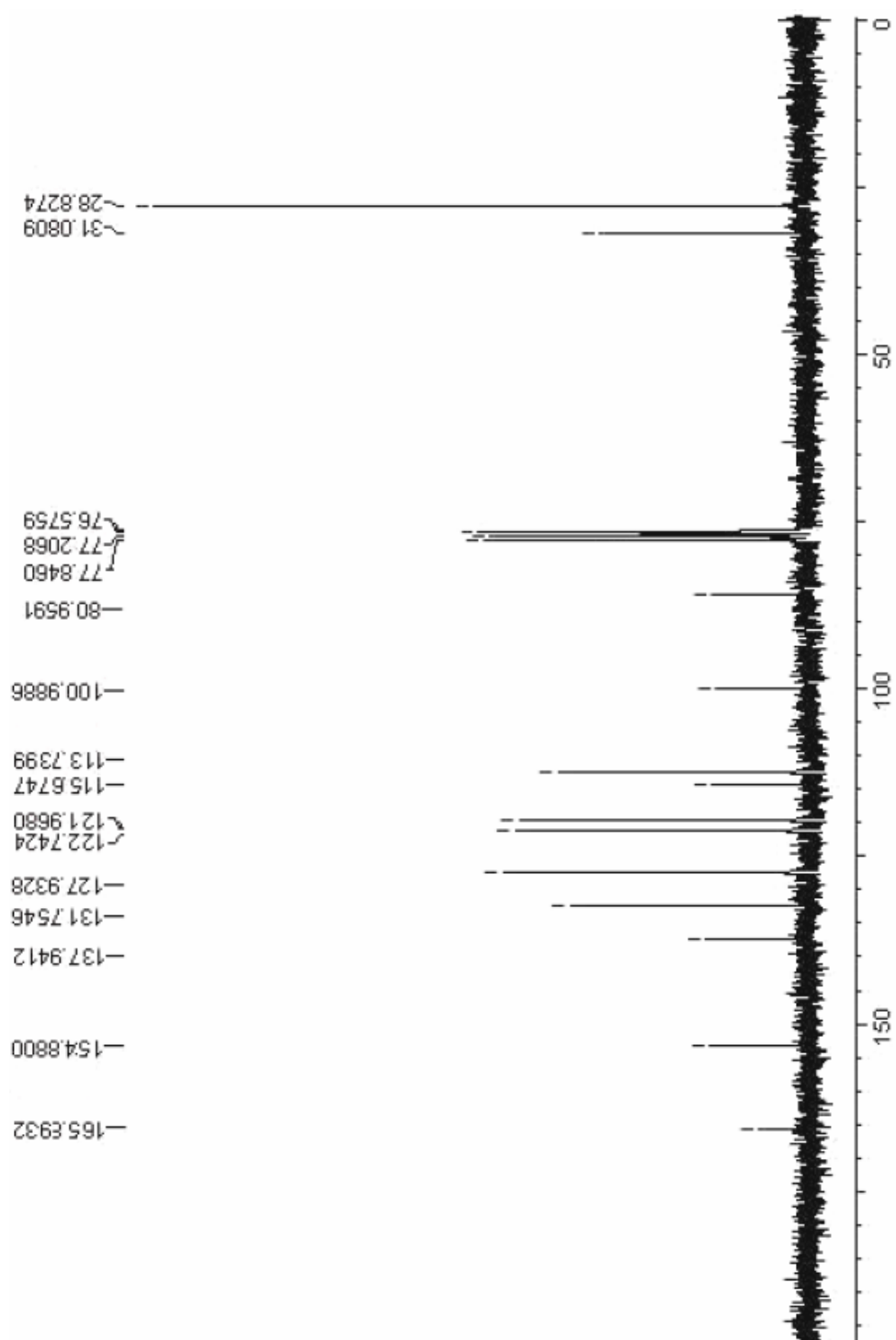


FIGURA 4.19: Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) da Substância XIV (N-metilflindersina).

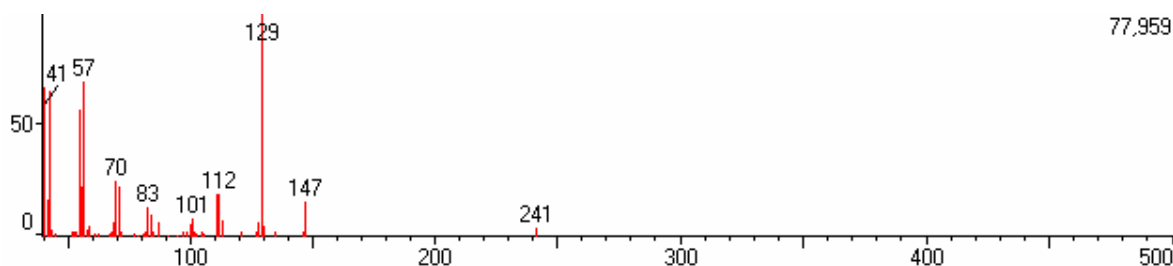


FIGURA 4.20: Espectro de massas da N-metilflindersina (Substância XIV).

4.3.1.6 – Identificação da Substância XV (Rutaecarpina)

A substância XV (**FIGURA 4.21**, p. 190) apresentou-se como um cristal branco que ao ser analisado por CCDA com reagente de Dragendorff apresentou uma mancha alaranjada e é denominada como Rutaecarpina (IKUTA et al., 1998, CUCA et al., 1998).

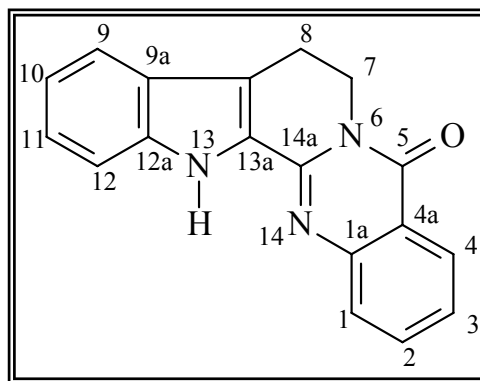


FIGURA 4.21: Estrutura química do alcalóide Rutaecarpina (Substância XV).

O espectro de RMN de ^1H (**FIGURA 4.24**, p. 195) apresenta dois tripletos em δ 3,23 e 4,58 integrando para dois hidrogênios cada, com $J=6,8$ Hz que associado com sinais de hidrogênios aromáticos indicam que a substância XV seja um alcalóide indolopiridoquinazolínico. Esses sinais pelo

experimento de HSQC (**FIGURA 4.25**, p. 196) correlacionam-se com os sinais de carbono em δ 19,6 e 41,1, respectivamente.

Observa-se também no espectro de RMN de ^1H sinais para 8 hidrogênios aromáticos, ou seja, um duplo duplo dubleto em δ 7,17 ($J= 1,0/7,0/8,0$ Hz) referente a um hidrogênio com acoplamentos em *orto* e *meta*. Esse sinal correlaciona-se pelo experimento de COSY (**FIGURA 4.26**, p. 197) com um duplo duplo dubleto em δ 7,32 ($J= 1,0/7,0/8,0$ Hz) e com o duplo dubleto em δ 7,62 ($J= 1,0/8,0$ Hz). O sinal em δ 7,32 correlaciona-se pelo COSY com δ 7,17 e com duplo dubleto em δ 7,42 ($J= 1,0/8,0$ Hz). Pelo experimento de HSQC podem-se observar as correlações de δ 7,17 com o sinal de carbono em δ 120,6; δ 7,32 com δ 126,2; δ 7,42 com δ 112,1 e de δ 7,62 com 120,1, caracterizando-se assim um anel aromático dissustituído.

Por meio do experimento de HMBC (**FIGURA 4.27**, p. 198) pode-se verificar a correlação do sinal em δ 7,17 (atribuído ao H- 10) com δ 112,1 (atribuído ao C-12) e 125,7 (C-9a); o sinal em δ 7,32 (H-11) se correlaciona com δ 120,1 (C-9) e 138,4 (C-12a); δ 7,42 (H-12) se correlaciona com δ 120,6 (C-10) e 125,7 (C-9a); e δ 7,62 (H-9) com δ 125,7 (C-9a) e 138,4 (C-12a). Assim, todos os sinais do anel aromáticos foram atribuídos e suas correlações são mostradas na **FIGURA 4.22**, na página 192. O sinal em δ 7,62 (H-9) apresenta ainda uma correlação com um sinal em δ 118,6 que pelo HSQC se correlaciona com o tripleto em δ 3,23 atribuído ao H-8.

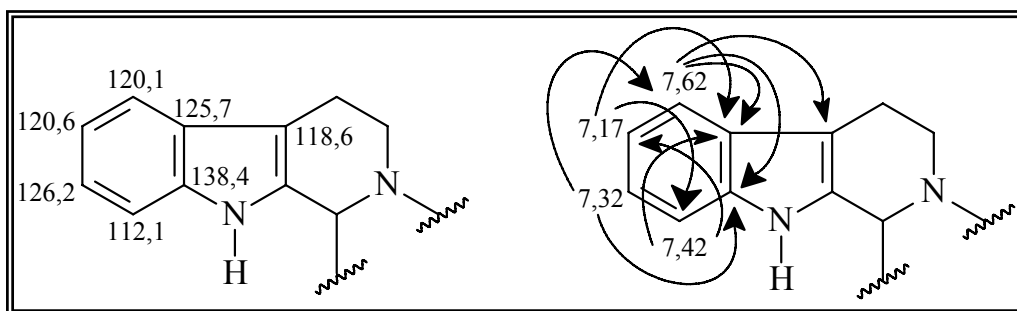


FIGURA 4.22: Correlações observadas no experimento de HMBC para a Substância XV.

O experimento de HMBC mostra também correlações do sinal em δ 3,23 (H-8) com δ 118,6 (C-8a) / 126,9 (C-13a) e 41,1 (C-7). Esse sinal em δ 41,1 pelo experimento de HSQC correlaciona-se com o tripleto em δ 4,58 que foi atribuído ao H-7, este por sua vez, se correlaciona pelo experimento de HMBC com δ 19,6 (C-8) / 118,6 (C-8a) / 126,9 (C-13a) / 145,0 (C-14a) e o carbono carbonílico em δ 161,4 (C-5). Essas correlações são mostradas na **FIGURA 4.23**, na página 192.

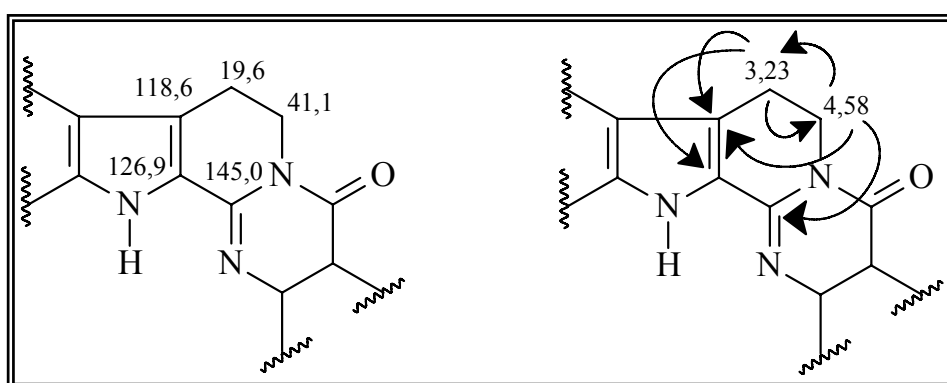


FIGURA 4.23: Correlações observadas no experimento de HMBC para a Substância XV.

O carbono carbonílico em δ 161,4 se correlaciona pelo HMBC com um sinal de hidrogênio aromático em δ 8,31 que pelo espectro de RMN

de ^1H é um duplo duplo dubleto com $J= 0,6/1,5/8,0$ Hz, e se correlaciona pelo COSY com o duplo dubleto em $\delta 7,46$ ($J= 1,5/8,0$ Hz), este se correlaciona com $\delta 8,31$ e também com o duplo dubleto em $\delta 7,71$ ($J= 1,5/7,0$ Hz). Resta ainda um dubleto largo em $\delta 7,69$ ($J= 8,0$ Hz) referente a um outro sinal de hidrogênio aromático. Esses sinais se correlacionam pelo HSQC com os sinais de carbono da seguinte forma: $\delta 7,46$ com $\delta 126,9$; $\delta 7,69$ com $\delta 126,4$; $\delta 7,71$ com $\delta 138,4$ e o $\delta 8,31$ com $\delta 127,2$, evidenciando-se assim um outro anel aromático dissubstituído na estrutura da molécula.

O espectro de RMN de ^1H apresenta ainda um singlete largo em $\delta 9,49$ referente à N-H na molécula.

Todos os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C (espectro de ^{13}C , **FIGURA 4.28**, p. 199) da substância XV são mostrados nas **TABELAS 4.11** e **4.12**, na página 194, e comparados com os dados da literatura.

A presença de dois anéis aromáticos e dos dois tripletos mencionados acima confirmam a possibilidade da estrutura se tratar de um alcalóide indolopiridoquinazolínico, isolado de espécies da família Rutaceae. Baseando-se nas correlações observadas e de acordo com dados da literaturas, a estrutura da substância XV é o alcalóide **RUTAECARPINA**.

TABELA 4.11: Dados de RMN de ^1H da substância XV (Rutaecarpina) em comparação com dados da literatura.

Hidrogênio	Rutaecarpina isolada	Rutaecarpina (literatura)
1	7,69 <i>dl</i> (8,0) (1H)	7,66
2	7,71 <i>dd</i> (1,5/7,0) (1H)	7,72
3	7,46 <i>dd</i> (1,5/8,0) (1H)	7,43
4	8,31 <i>ddd</i> (0,6/1,5/8,0) (1H)	8,32
7	4,58 <i>t</i> (7,0) (2H)	4,59 <i>t</i> (7,0) (2H)
8	3,23 <i>t</i> (7,0) (2H)	3,52 <i>t</i> (7,0) (2H)
9	7,62 <i>dd</i> (1,0/8,0) (1H)	7,65
10	7,17 <i>ddd</i> (1,0/7,0/8,0)(1H)	7,18
11	7,32 <i>ddd</i> (1,0/7,0/8,0)(1H)	7,33
12	7,42 <i>ddd</i> (1,0/8,0)(1H)	7,42
13-NH	9,49 <i>s</i> (1 H)	9,15 <i>s</i>

OBS: Dados de RMN de ^1H (δ , mult., $J(\text{Hz})$) (integração) (CDCl_3 , 400 MHz).**TABELA 4.12:** Dados de RMN de ^{13}C da substância XV (Rutaecarpina).

Carbono	Rutaecarpina isolada
1	126,4
1a	146,7
2	138,4
3	126,9
4	127,2
4a	121,0
5	161,4
7	41,1
8	19,6
8a	118,6
9	120,1
9a	125,7
10	120,6
11	126,2
12	112,1
12a	138,4
13a	126,9
14a	145,0

OBS: Dados de RMN de ^{13}C (δ) (CDCl_3 , 100 MHz).

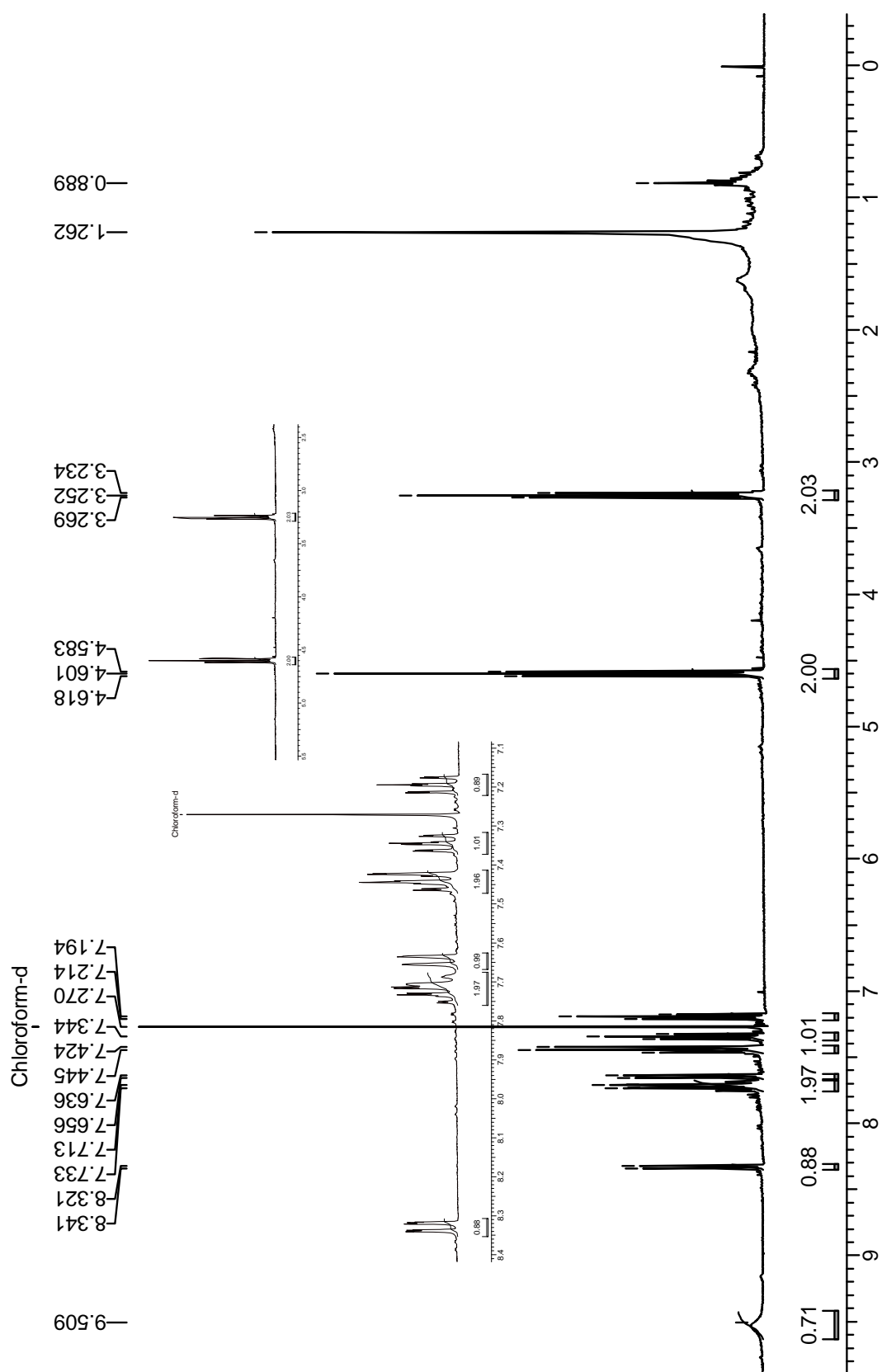


FIGURA 4.24: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da Substância XV (Rutaecarpina).

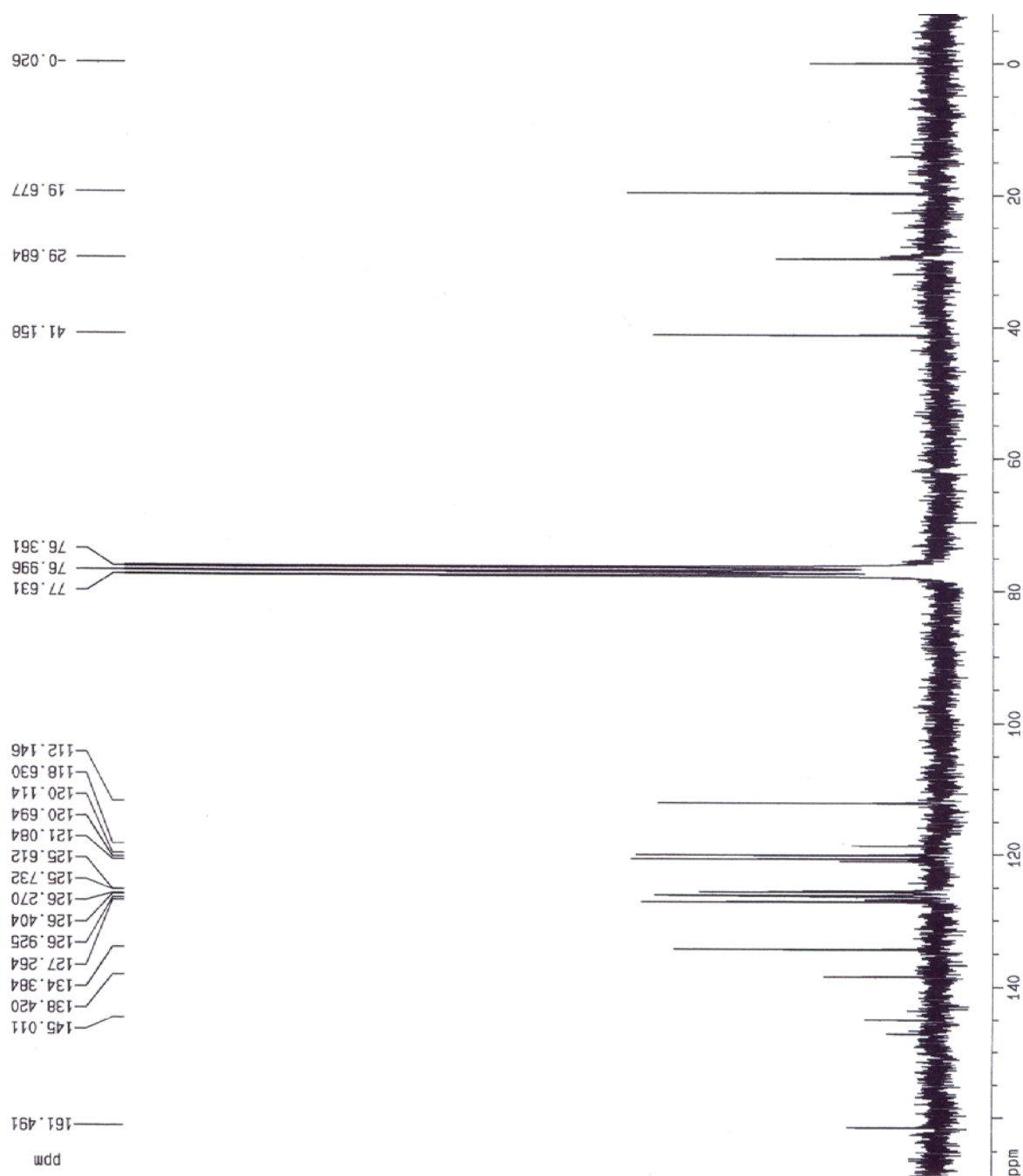


FIGURA 4.25: Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) da Substância XV (Rutaecarpina).

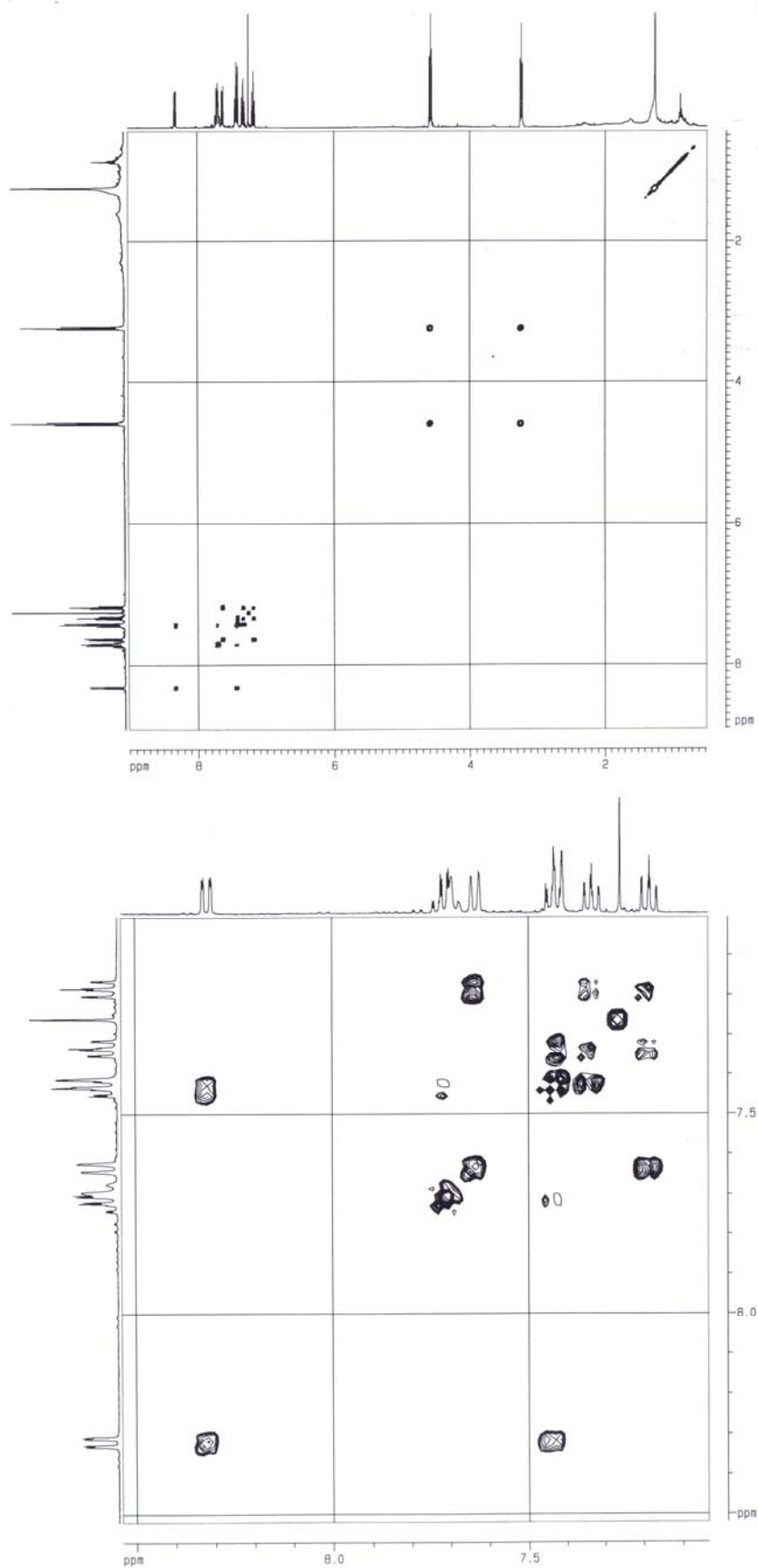


FIGURA 4.26: Experimento de COSY (e ampliação) (400MHz, CDCl_3) da Substância XV (Rutaecarpina).

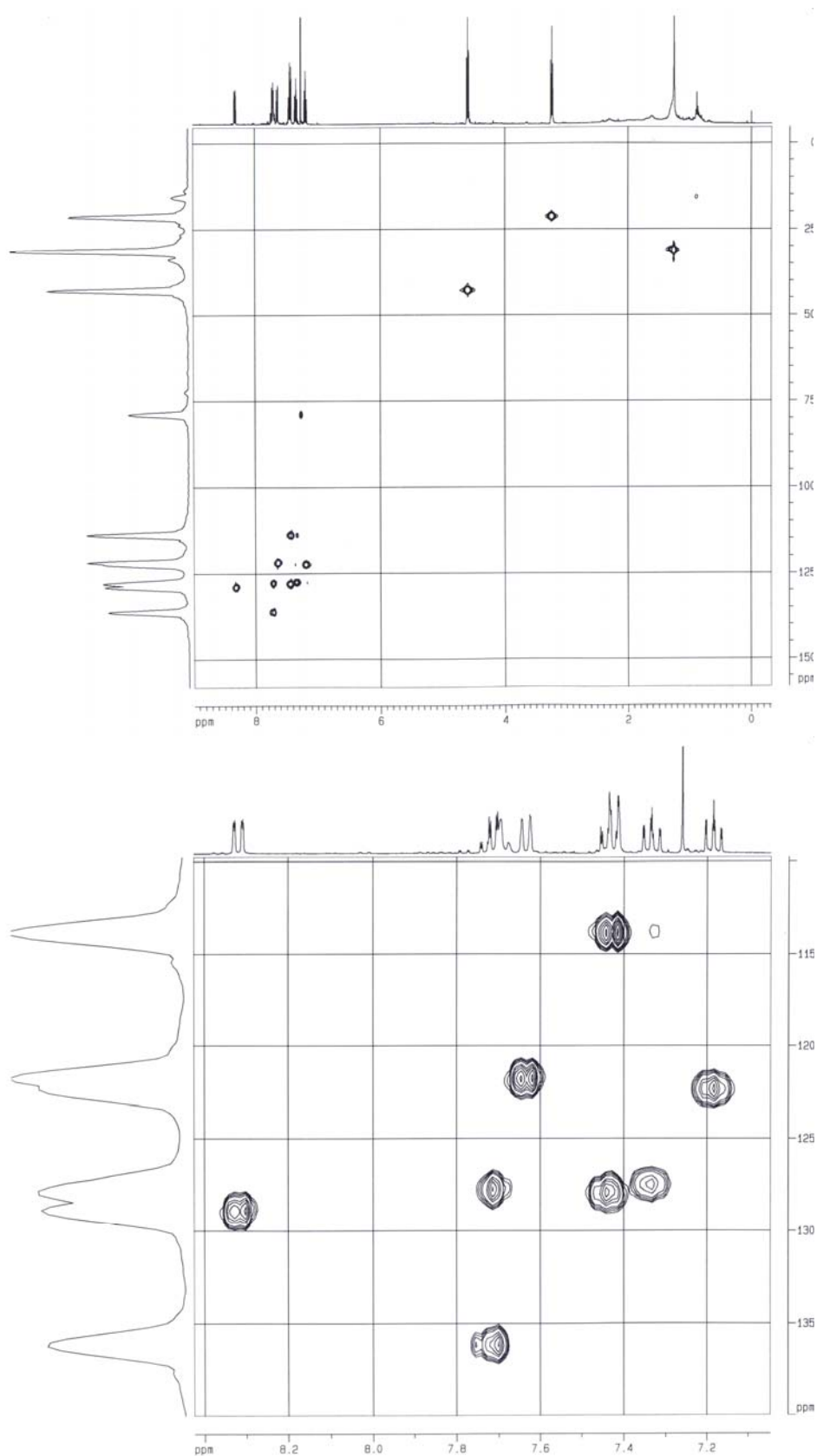


FIGURA 4.27: Experimento de HSQC (e ampliação) (400MHz, CDCl_3) da Substância XV (Rutaecarpina).

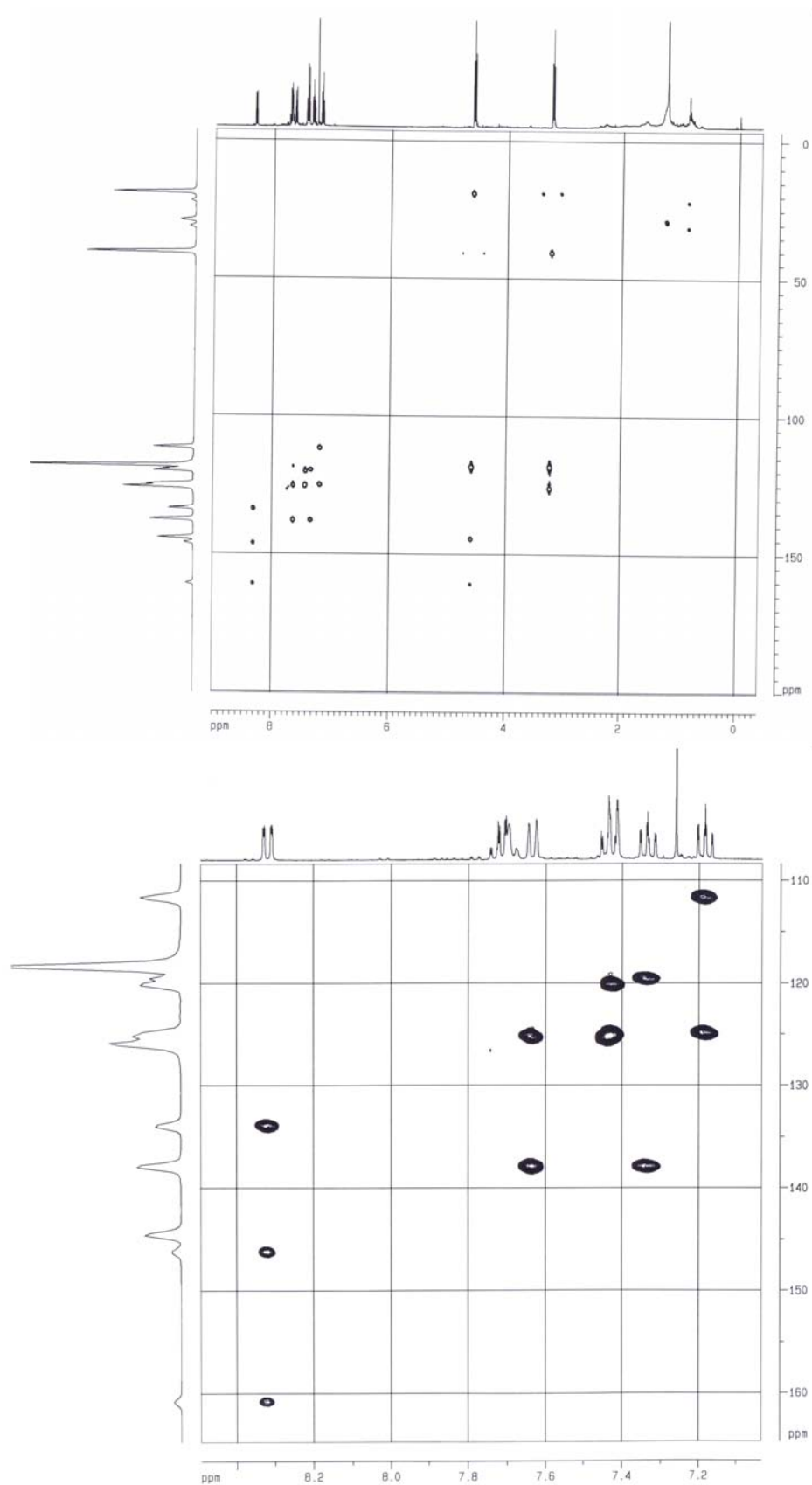


FIGURA 4.28: Experimento de HMBC (e ampliação) (400MHz, CDCl_3) da Substância XV (Rutaecarpina).

4.3.1.7 – Identificação da Substância XVI (8,8a-seco-8-carboxi-14-N-metilrutaecarpina)

A substância XVI (**FIGURA 4.29**, p. 200) apresentou-se como um sólido branco que ao ser analisado por CCDA com reagente de Dragendorff apresentou uma mancha alaranjada e é denominada como 8,8a-seco-8-carboxi-14-N-metilrutaecarpina.

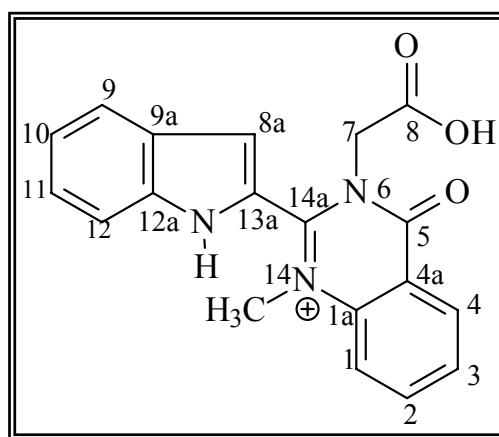


FIGURA 4.29: Estrutura química do alcalóide 8,8a-seco-8-carboxi-14-N-metilrutaecarpina (Substância XVI).

O espectro de RMN de ^1H (**FIGURA 4.35**, p. 207) apresenta sinais semelhantes aos da Rutaecarpina (item 4.3.1.6) na região espectral de desblindagem, referentes a 8 hidrogênios aromáticos, ou seja, um dubleto em δ 8,09 ($J= 7,5$ Hz) referente a um hidrogênio com acoplamento em *orto*, que pelo experimento de HSQC (**FIGURA 4.36**, p. 208) se refere ao carbono em δ 120,8. Esse sinal acopla pelo experimento de COSY (**FIGURA 4.37**, p. 209) com um tripleto largo em δ 7,19 ($J= 7,5$ Hz) referente a um hidrogênio com acoplamento em *orto*, que pelo HSQC se refere ao carbono em δ 121,9. O sinal em δ 120,8 pelo experimento de HMBC (**FIGURA 4.38**, p. 210) se correlaciona com δ 7,24 que pelo HSQC se refere ao carbono em δ 122,9. Esse sinal em δ 7,24 pelo COSY acopla com δ 7,52 que pelo HSQC se refere

ao carbono em δ 112,2. Esses dados sugerem a presença de um anel aromático dissustituído. Os sinais de hidrogênios aromáticos correlacionam ainda com dois sinais de carbono em δ 125,1 e 136,4 como mostrado por meio de suas correlações via HMBC (**FIGURA 4.30**, p. 201).

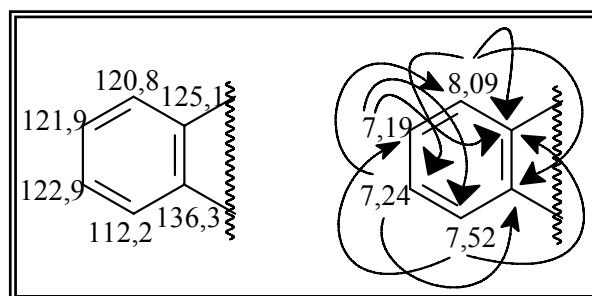


FIGURA 4.30: Correlações observadas no experimento de HMBC para a Substância XVI.

Os sinais de carbono em δ 125,1 e 136,3 pelo HMBC se correlacionam também com o sinal em δ 8,63 que pelo HSQC se refere ao carbono em δ 134,0. Esse sinal em δ 8,63 se correlaciona também via HMBC com o sinal em δ 113,5 e acopla via COSY a longa distância com o sinal em δ 12,1 que pelo HSQC não tem correlação. Isso sugere um sistema indol como mostrado na **FIGURA 4.31**, na página 201.

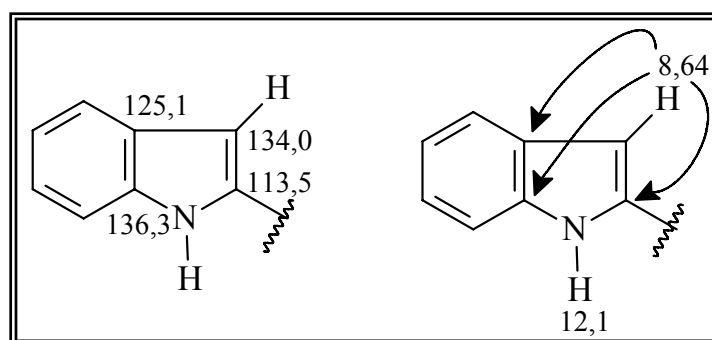


FIGURA 4.31: Correlações observadas no experimento de HMBC para a Substância XVI.

O espectro de RMN de ^1H apresenta sinais para outro anel aromático, um tripleto largo em δ 7,54 ($J= 7,5$ Hz) referente a um acoplamento em *orto*, que pelo HSQC se refere ao carbono em δ 114,7. Esse sinal em δ 7,54 acopla via COSY com δ 7,85, um duplo duplo dubleto com $J= 1,5$ e 7,5 Hz que é referente a um hidrogênio em acoplamentos *orto* e *meta*, e pelo HSQC se refere ao carbono em δ 135,5. Esse sinal em δ 7,85 acopla também via COSY com δ 7,36, um tripleto largo com $J= 7,5$ Hz que é referente a um hidrogênio em acoplamento *orto*, e pelo HSQC se refere ao carbono em δ 122,9. Esse sinal em δ 7,37 acopla via COSY com um dubleto em δ 8,09 que pelo HSQC se refere ao carbono em δ 127,8. Esses dados sugerem a presença de um outro anel aromático dissustituído na estrutura da substância XVI (**FIGURA 4.32**, p. 202).

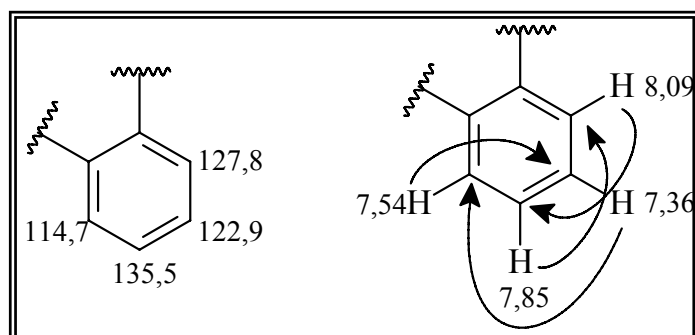


FIGURA 4.32: Correlações observadas no experimento de HMBC para a Substância XVI.

O experimento de HMBC mostra ainda que o sinal em δ 7,54 correlaciona-se com δ 114,5 e os sinais em δ 7,85 e 8,09 com δ 140,3. Sendo assim, estes dois sinais de carbonos foram atribuídos ao anel aromático. O sinal em δ 8,09 apresenta ainda via HMBC correlação com um sinal de carbono carboxílico em δ 160,9. Com isso sugere-se que esta parte da estrutura seja da seguinte forma como mostrado por meio de suas correlações via HMBC (**FIGURA 4.33**, p. 203).

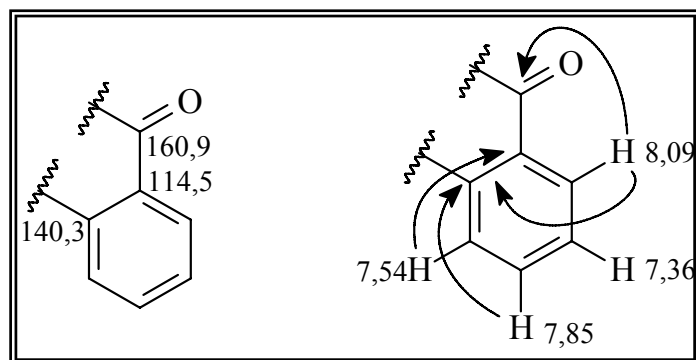


FIGURA 4.33: Correlações observadas no experimento de HMBC para a Substância XVI.

O deslocamento do sinal de carbono em δ 140,3 do anel aromático sugere que esteja ligado a um nitrogênio como no caso da Rutaecarpina (item 4.3.1.6). Esse sinal de carbono correlaciona-se também com um sinal em δ 3,57 que está integrando para três hidrogênios e pelo HSQC se refere ao carbono em δ 30,6, sugerindo uma metila ligado a um heteroátomo. O sinal em δ 3,57 correlaciona-se também com δ 150,2 que pelo HSQC não tem correlação, sugerindo uma base quaternária como mostrado na **FIGURA 4.34**, na página 204.

O deslocamento desse carbono em δ 150,2 sugere que esteja ligado a dois heteroátomos. Ele correlaciona-se também com um singlete integrando para dois hidrogênios em δ 5,38 que pelo HSQC se refere ao carbono em δ 47,3. Este singlete se correlaciona pelo HMBC também com o sinal da carboxila já mencionada anteriormente em δ 160,9 e com um sinal em δ 186,8 que pelo seu deslocamento sugere ser uma carboxila livre (**FIGURA 4.34**, p. 204).

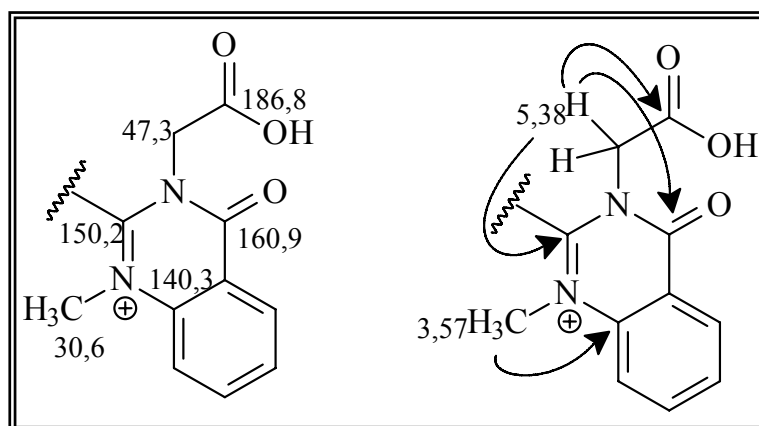


FIGURA 4.34: Correlações observadas no experimento de HMBC para a Substância XVI.

Os carbonos em δ 113,5 da primeira parte da estrutura e δ 150,2 da segunda parte são carbonos em que não possuem hidrogênios e assim estão deficientes de uma ligação. Isso permite que as duas partes da estrutura sejam interligadas exatamente entre esses carbonos. Com isso, pode-se dizer que a estrutura da substância XVI seja um alcalóide do tipo indolopiridoquinazolínico como a Rutaecarpina, e que o mesmo possui um anel SECO entre os carbonos em 8 e 8a.

Todos os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C (espectro **FIGURA 4.39**, p. 211) da substância XVI são mostrados nas **TABELAS 4.13 - 4.15**, nas páginas 205 e 206.

Baseando-se nos dados e correlações discutidos acima, a estrutura da substância XVI é o alcalóide do tipo indolopiridoquinazolínico, o **8,8a-SECO-8-CARBOXI-14-N-METILRUTAECARPINA**, inédito na literatura.

TABELA 4.13: Dados de RMN de ^1H da substância XVI (8,8a-seco-8-carboxi-14-N-metilrutaecarpina) em comparação com dados da literatura.

Hidrogênio	8,8a-seco-8-carboxi-14-N-metilrutaecarpina isolada
1	7,54 <i>tl</i> (7,5) (1H)
2	7,85 <i>ddd</i> (1,5/7,5) (1H)
3	7,36 <i>tl</i> (7,5) (1H)
4	8,09 <i>d</i> (7,5) (1H)
7	5,38 <i>s</i> (2H)
8a	8,64 <i>d</i> (2,8) (1H)
9	8,09 <i>d</i> (7,5) (1H)
10	7,19 <i>tl</i> (7,5) (1H)
11	7,24 <i>tl</i> (7,5) (1H)
12	7,52 <i>tl</i> (7,5) (1H)
13-NH	12,1 <i>s</i> (1H)
14-NCH ₃	3,57 <i>s</i> (3H)

OBS: Dados de RMN de ^1H (δ , mult., $J(\text{Hz})$) (integração) (CDCl_3 , 400 MHz).

TABELA 4.14: Dados de RMN de ^{13}C da substância XVI (8,8a-seco-8-carboxi-14-N-metilrutaecarpina).

Carbono	8,8a-seco-8-carboxi-14-N-metilrutaecarpina isolada
1	114,7
1a	140,3
2	135,5
3	122,9
4	127,8
4a	114,5
5	160,9
7	47,3
8	186,8
8a	134,0
9	120,8
9a	125,1
10	121,9
11	122,9
12	112,2
12a	136,3
13a	113,5
14a	150,2

OBS: Dados de RMN de ^{13}C (δ) (CDCl_3 , 100 MHz).

TABELA 4.15: Dados de HSQC e HMBC da substância XVI (8,8a-seco-8-carboxi-14-N-metilrutaecarpina).

Carbono	δ_C	HSQC	HMBC
1	114,7	7,54	7,36
1a	140,3	-	3,57/7,85/8,09
2	135,5	7,85	8,09
3	122,9	7,36	7,54
4	127,8	8,09	7,85
4a	114,5	-	7,54
5	160,9	-	5,38/8,09
7	47,3	-	-
8	186,8	5,38	5,38
8a	134,0	8,64	-
9	120,8	8,09	7,24
9a	125,1	-	7,19/7,52/8,09/8,64
10	121,9	7,19	7,52
11	122,9	7,24	8,09
12	112,2	7,52	7,19
12a	136,3	-	7,24/8,09/8,64
13a	113,5	-	8,64
14a	150,2	-	3,57/5,38
14-NCH ₃	30,6	3,57	-

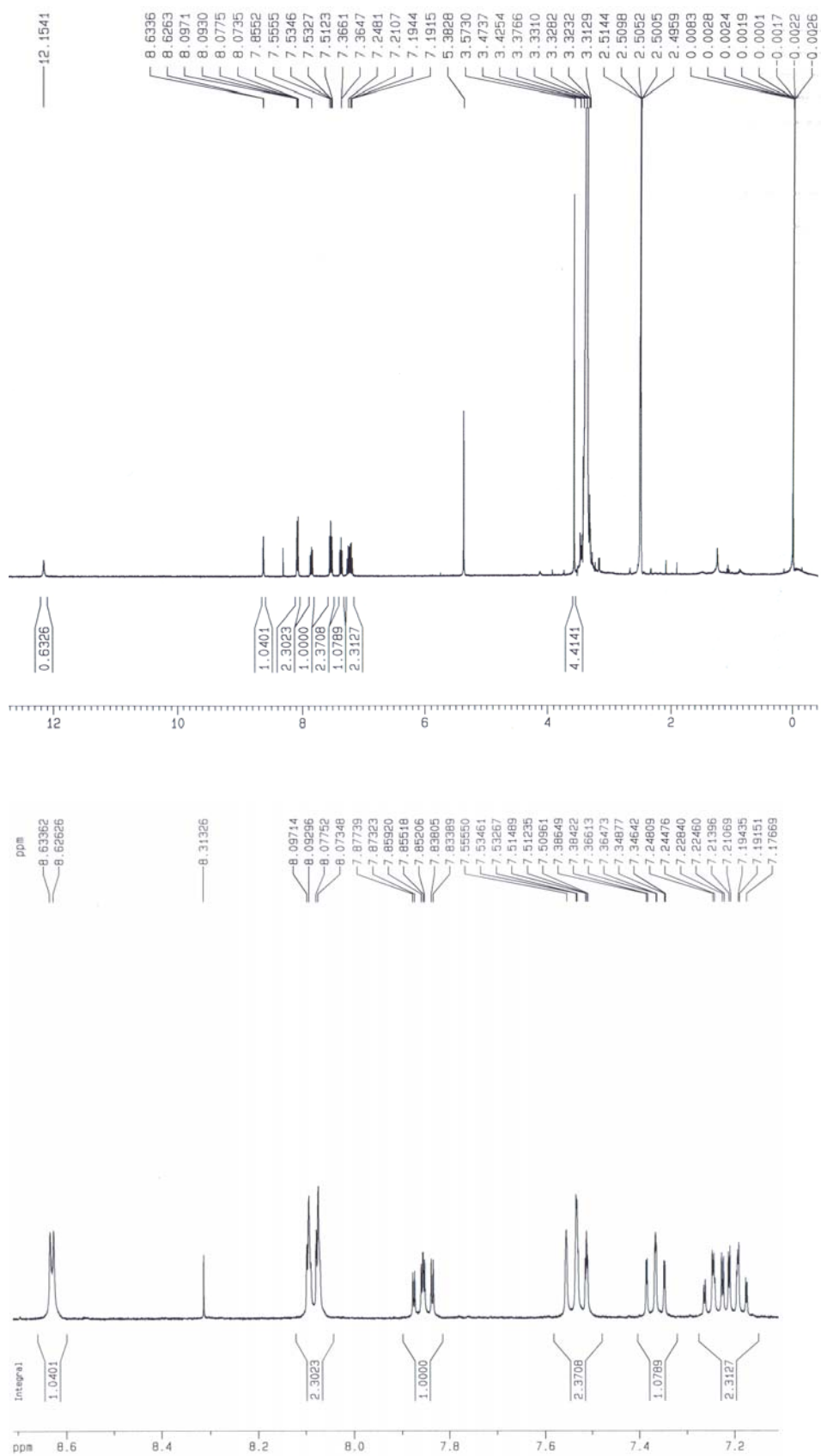


FIGURA 4.35: Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, DMSO) da Substância XVI (8,8a-seco-8-carboxi-14-N-metilrutaecarpina).

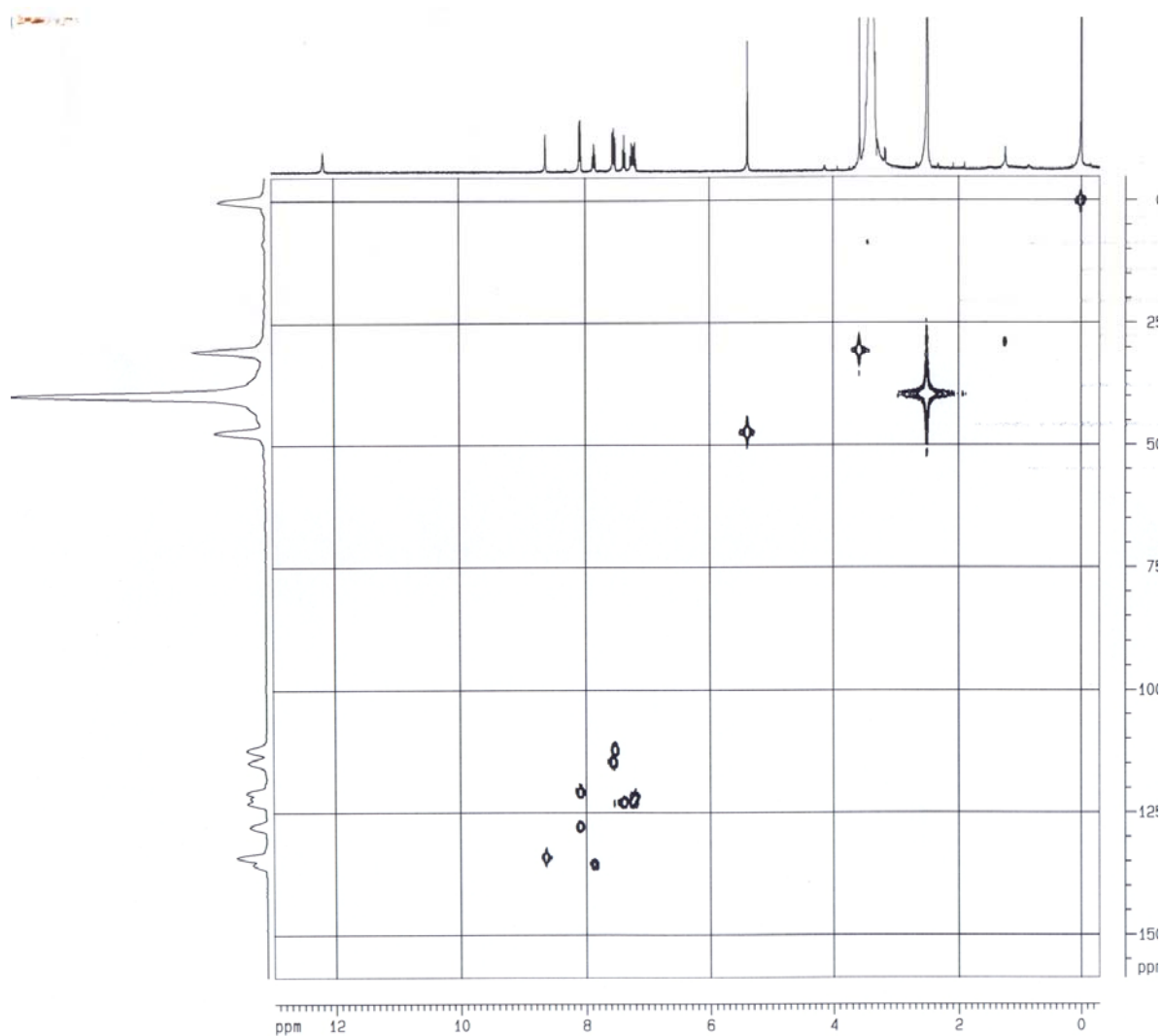


FIGURA 4.36: Experimento de HSQC (400MHz, DMSO) da Substância XVI (8,8a-seco-8-carboxi-14-N-metilrutacarpina).

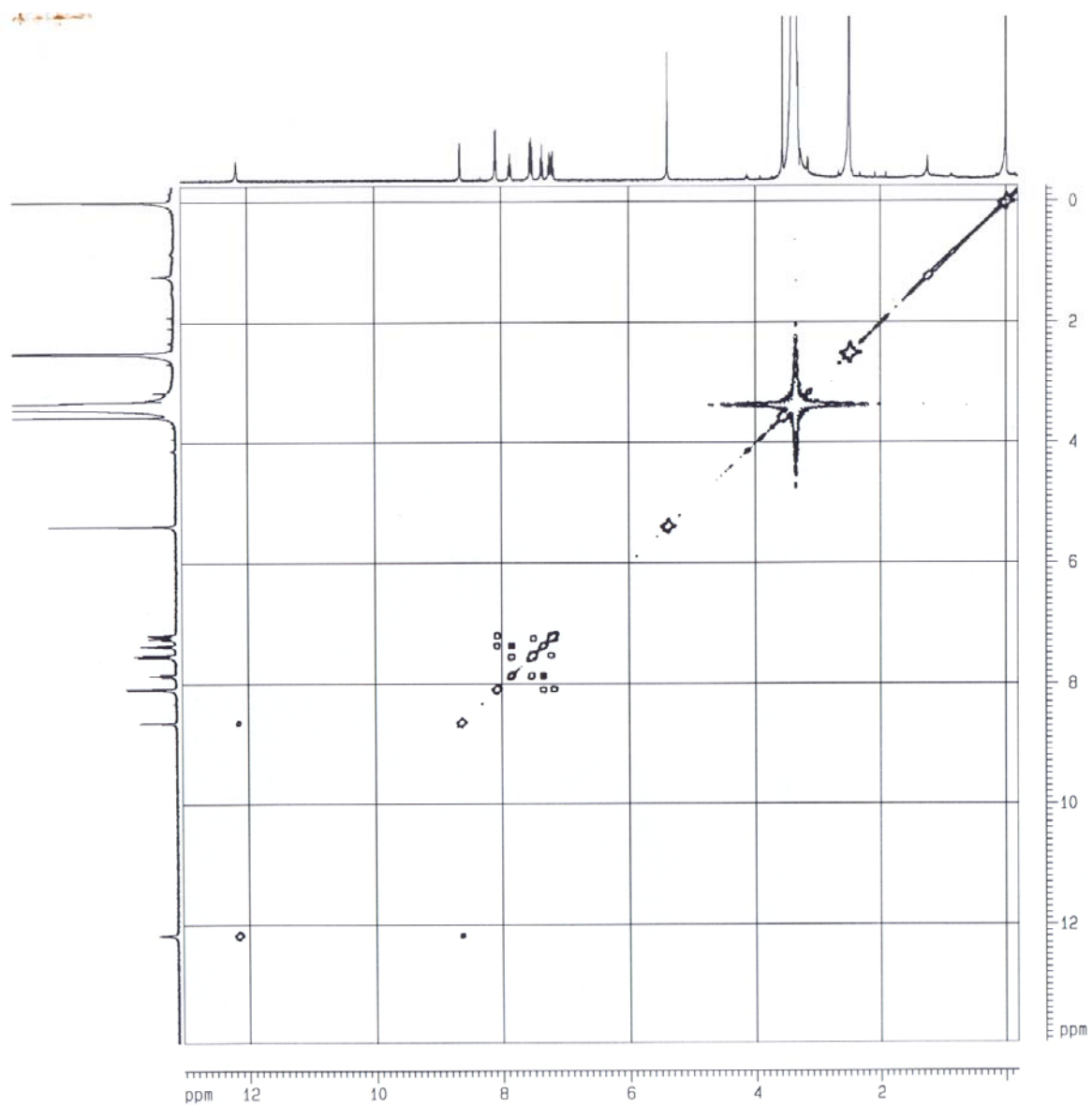


FIGURA 4.37: Experimento de COSY (400MHz, DMSO) da Substância XVI (8,8a-seco-8-carboxi-14-N-metilrutaecarpina).

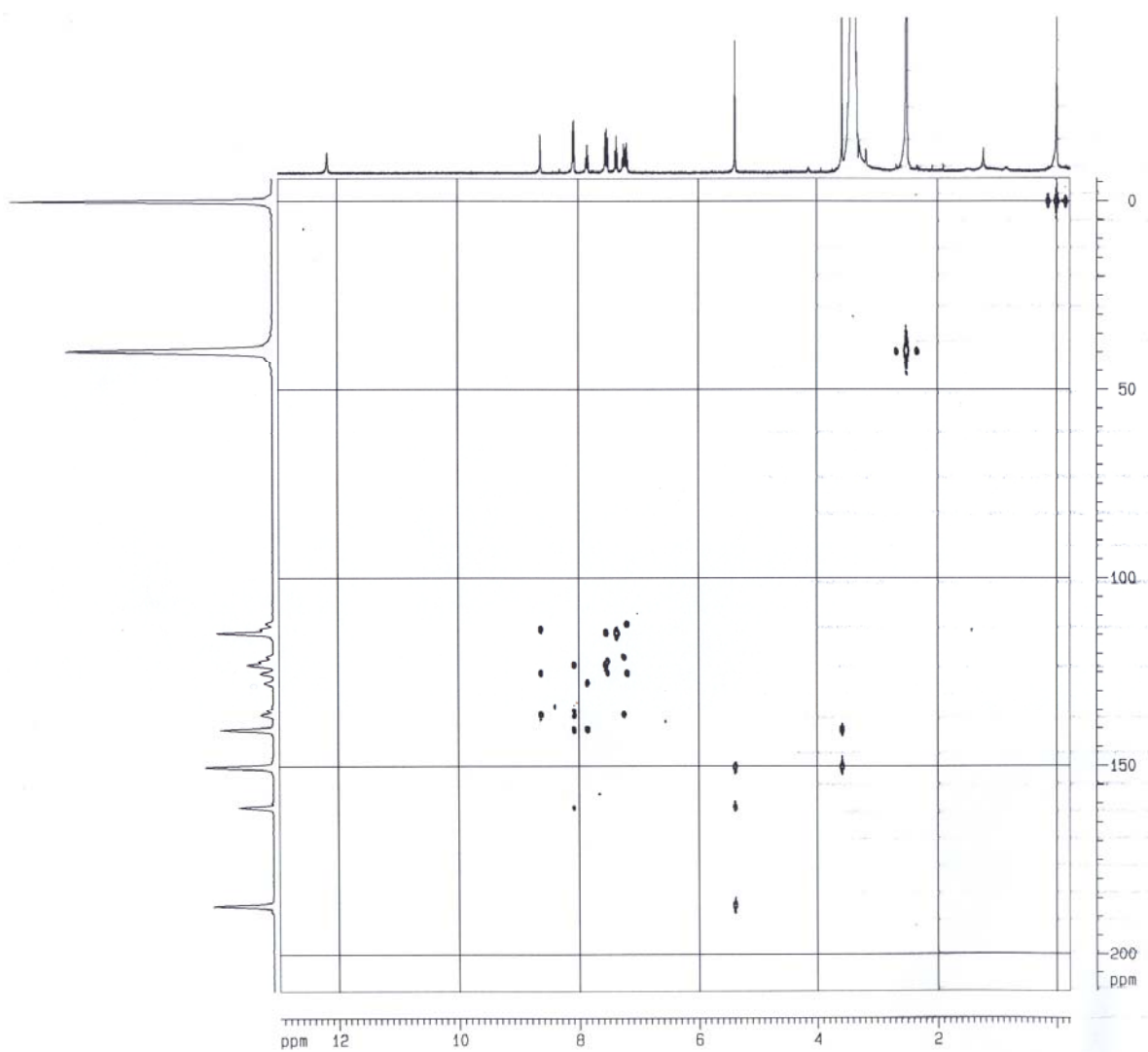


FIGURA 4.38: Experimento de HMBC (400MHz, DMSO) da Substância XVI (8,8a-seco-8-carboxi-14-N-metilrutaecarpina).

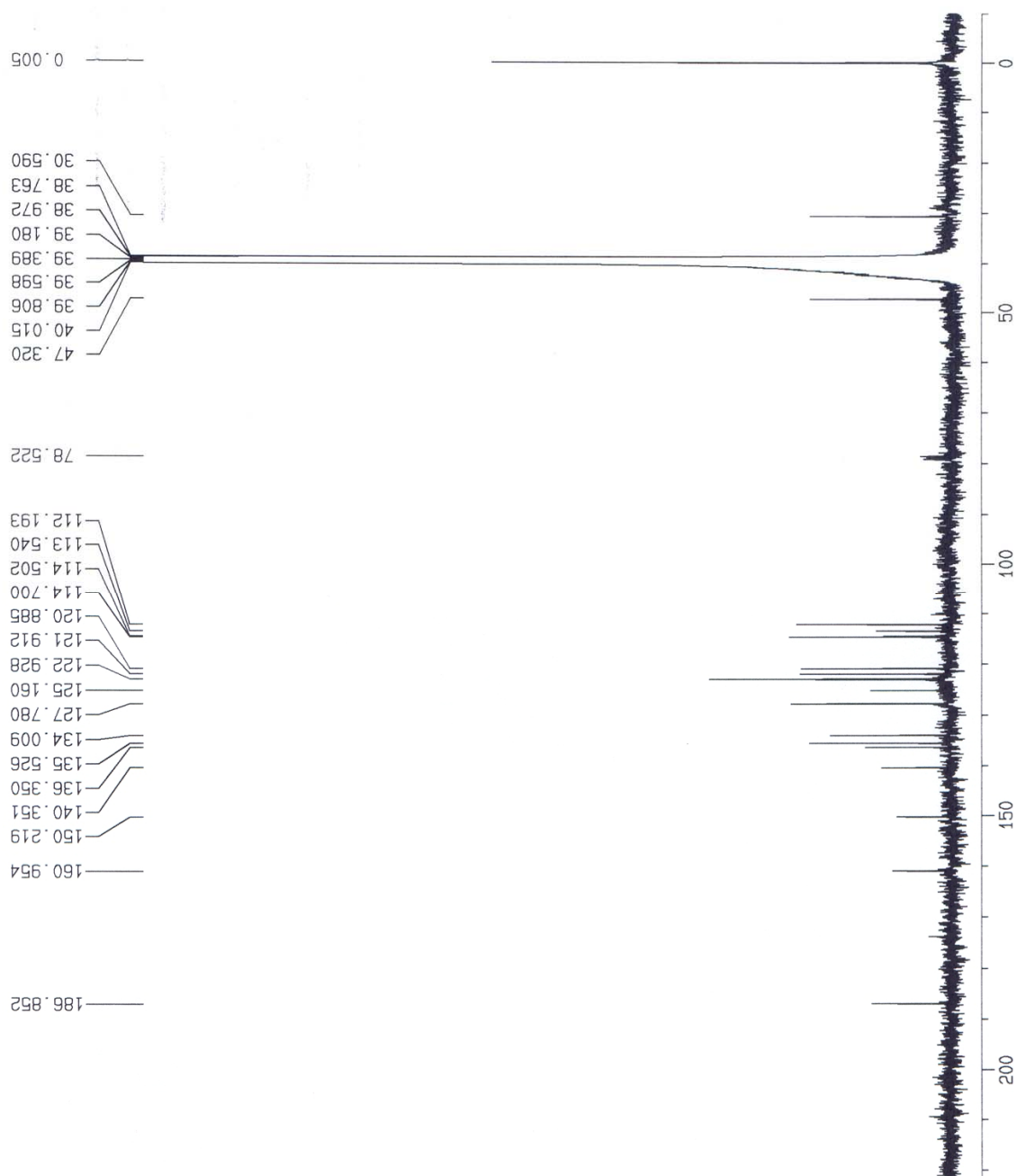


FIGURA 4.39: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO) da Substância XVI (8,8a-seco-8-carboxi-14-N-metilrutaecarpina).

4.3.2 – Cumarina

4.3.2.1 – Identificação da Substância XVII (Seselina)

A substância XVII (**FIGURA 4.40**, p. 212) apresentou-se como um sólido amarelo e é denominada como Seselina (TAKEMURA, 1996).

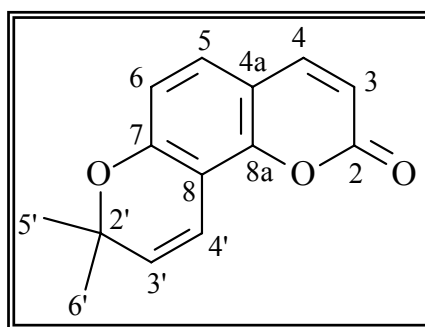


FIGURA 4.40: Estrutura química da cumarina Seselina (Substância XVII).

A determinação estrutural da substância XVII (seselina) já foi discutida anteriormente. Ver item 1.6.1.3 no Capítulo 1.

4.3.3 – Limonóides

4.3.3.1 – Identificação da Substância XVIII (2-hidroxi-epiisobacunoato de metila)

A substância XVIII (**FIGURA 4.41**, p. 213) apresentou-se como um sólido amorfo branco e é denominada de 2-hidroxi-epiisobacunoato de metila.

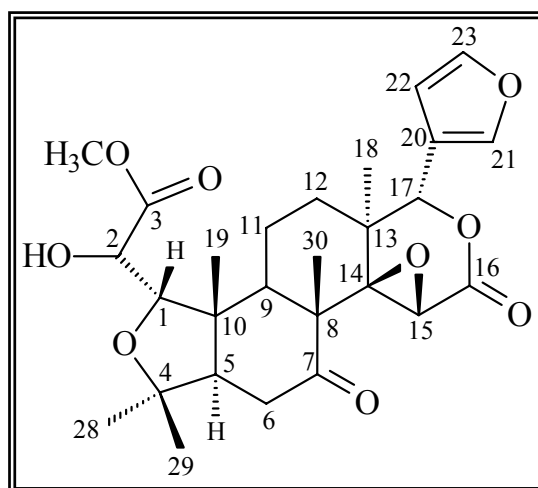


FIGURA 4.41: Estrutura química do limonóide 2-hidroxi-epiisobacunoato de metila (Substância XVIII).

O espectro de RMN de ^1H (**FIGURA 4.48**, p. 223) apresenta três sinais integrando para um hidrogênio cada, ou seja, um quintupletto em δ 7,40 com $J= 0,8$ e $1,6$ Hz; um tripleto em δ 7,37 com $J= 1,6$ Hz e um duplo dubleto em δ 6,34 com $J= 0,8$ e $1,6$ Hz, característicos de um anel furano de um limonóide, atribuídos aos H-21, H-23 e H-22, respectivamente. Pode-se observar o acoplamento do sinal em δ 6,34 (H-22) pelo experimento de COSY (**FIGURA 4.49**, p. 224) com δ 7,37 (H-23).

Por meio do experimento de HSQC (**FIGURA 4.50**, p. 225) o sinal δ 7,40 correlaciona-se com o sinal de carbono em δ 141,0; o sinal δ 7,37 com δ 142,9 e o sinal δ 6,34 com δ 109,8. Pode-se observar pelo experimento de HMBC (**FIGURA 4.51**, p. 226) que o sinal δ 7,37 correlaciona-se com δ 109,8 e 142,9; δ 7,37 com δ 120,4 e 141,0 e o sinal δ 6,34 com δ 120,4 / 141,0 e 142,9. Desta forma, confirma-se as posições do anel furano e atribui-se o sinal em δ 120,4 ao carbono C-20. Este por sua vez, correlaciona-se pelo HMBC com um singlete em δ 5,48 característico do H-17 de um limonóide. Estas correlações observadas no experimento de HMBC são demonstradas na **FIGURA 4.42**, na página 214.

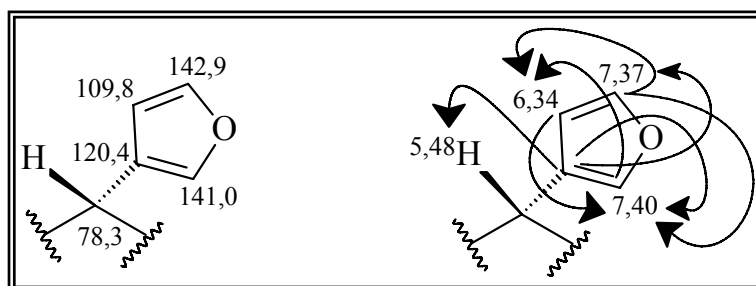


FIGURA 4.42: Correlações observadas no experimento de HMBC para a o anel furano da Substância XVIII.

Pelo experimento de HSQC esse H-17 correlaciona-se com δ 78,3 que por este deslocamento deve estar vizinho a um oxigênio, e pelo HMBC correlaciona-se com um carbono carbonílico em δ 167,5 sugerindo que este H-17 esteja em um anel D lactônico de um limonóide. Este H-17 pelo HMBC correlaciona-se também com os carbonos do anel furano C-20/21 e 22; com um sinal em δ 37,9 que pelo espectro de DEPT 135 (**FIGURA 4.52**, p. 227) é um carbono quaternário, atribuído ao C-13, com δ 20,7 que pelo DEPT 135 é um carbono metílico, atribuído à metila 18 em δ 1,18; com δ 66,6 que pelo DEPT 135 é também um quaternário e pelo seu deslocamento

requer a presença de um oxigênio, atribuído assim ao C-14. Esse carbono pelo HMBC correlaciona-se com o sinal em δ 4,03 que pelo HSQC se refere ao carbono em δ 54,0. Esse hidrogênio em δ 4,03 pelo HMBC se correlaciona com o C-14 e com um carbono carbonílico em δ 167,5. Desta forma, o sinal em δ 4,03 foi atribuído ao H-15 do anel lactônico com a presença de um epóxido entre 14 e 15 como mostrado na **FIGURA 4.43**, na página 215.

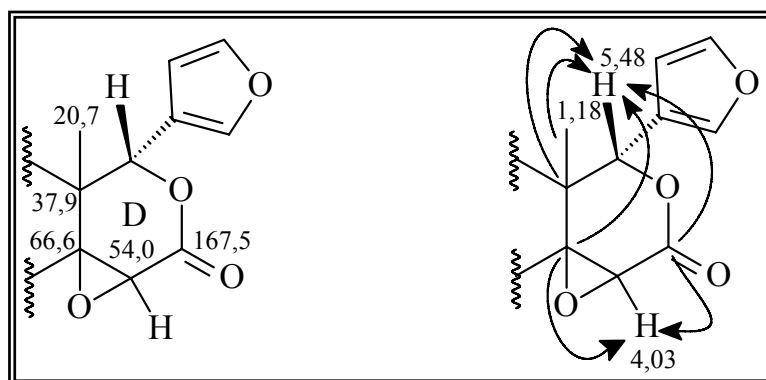


FIGURA 4.43: Correlações observadas no experimento de HMBC para o anel lactônico da Substância XVIII.

O sinal em δ 5,48 mostrou ainda pelo HMBC correlação com o sinal em δ 30,9 que pelo DEPT 135 é um carbono metínico apresentando correlação pelo HSQC com os sinais em δ 1,52/1,65 atribuído aos hidrogênios H-12.

O sinal em δ 66,6 (C-14) pelo HMBC apresenta correlação com um singlete em δ 1,20 que pelo HSQC refere-se ao carbono em δ 18,0 e pelo DEPT 135 é um carbono metílico, atribuído à metila 30. Esse sinal em δ 1,20 se correlaciona também pelo HMBC com o sinal em δ 51,8 que pelo DEPT 135 é um carbono quaternário atribuído ao C-8; com um carbono carbonílico em δ 208,8 atribuído ao C-7; e com δ 43,2 que pelo HSQC se refere ao duplo dubleto em δ 2,53 com $J = 1,9$ e 11,6 Hz atribuído ao H-9. Esse H-9 se correlaciona pelo experimento de COSY com o multipletto em δ 1,76, este por

sua vez também pelo COSY acopla com o multipletto em δ 2,00. Os dois multipletos apresentam pelo HSQC correlação com o mesmo sinal de carbono em δ 19,6 atribuídos aos H-11 do anel C (**FIGURA 4.44**, p. 216).

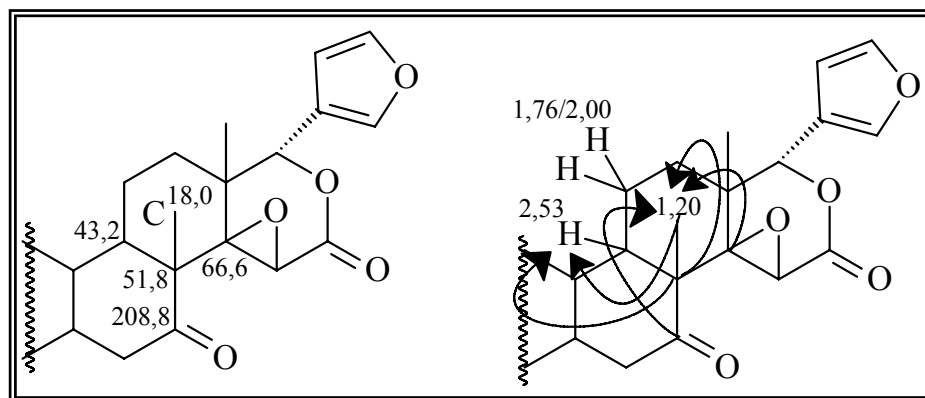


FIGURA 4.44: Correlações observadas no experimento de HMBC para o anel C da Substância XVIII.

No experimento de HMBC pode-se observar a correlação do carbono carbonílico em δ 208,8 com dois duplo dubletos em δ 2,30 com $J=3,4$ e $13,4$ Hz e δ 2,83 com $J=13,5$ e $15,3$ Hz. Esses dois sinais pelo DEPT 135 são carbono metínicos e apresentam correlação pelo HSQC com um único sinal de carbono em δ 36,3 e foram atribuídos aos hidrogênios H-6. Pelo COSY esses dois H-6 acoplam com um duplo dubleto em δ 2,19 que possui $J=3,4$ e $15,3$ Hz sendo atribuído ao H-5.

Os sinais em δ 2,30/2,83 (H-6) pelo HMBC correlacionam-se com o δ 208,8 (C-7); com δ 55,5 (C-5) e δ 47,9 (C-10) que pelo DEPT 135 é um quaternário, e o sinal em δ 2,19 (H-5) com δ 47,9 e δ 20,0 (C-19) que é uma metila. Assim tem-se para o anel B as seguintes correlações mostradas na **FIGURA 4.45**, na página 217.

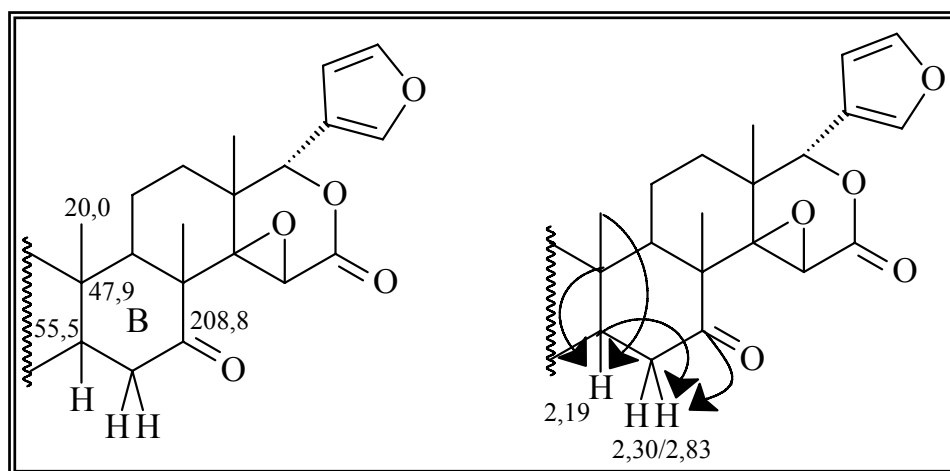


FIGURA 4.45: Correlações observadas no experimento de HMBC para o anel B da Substância XVIII.

O sinal em δ 2,19 apresenta ainda no HMBC correlações com δ 80,6 que pelo DEPT 135 é um quaternário sugerindo este possuir um oxigênio, e com δ 23,6 que é uma metila, onde pelo HSQC é referente a δ 1,16 atribuído ao H-29. Este sinal em δ 1,16 pelo HMBC se correlaciona com δ 30,5 que pelo HSQC é referente a outra metila em δ 1,27 atribuído ao H-28. A presença de um outro sinal referente a carbono oxidado em δ 88,5 sugere-se ciclizar o oxigênio de C-1 a C-4. Pode-se observar a correlação deste carbono em δ 88,5 com a metila 19 em δ 1,39 que pelo HSQC se refere ao carbono em δ 20,0 (C-19) mencionado anteriormente. Assim pode-se observar na **FIGURA 4.46**, na página 218 as seguintes correlações para o anel A.

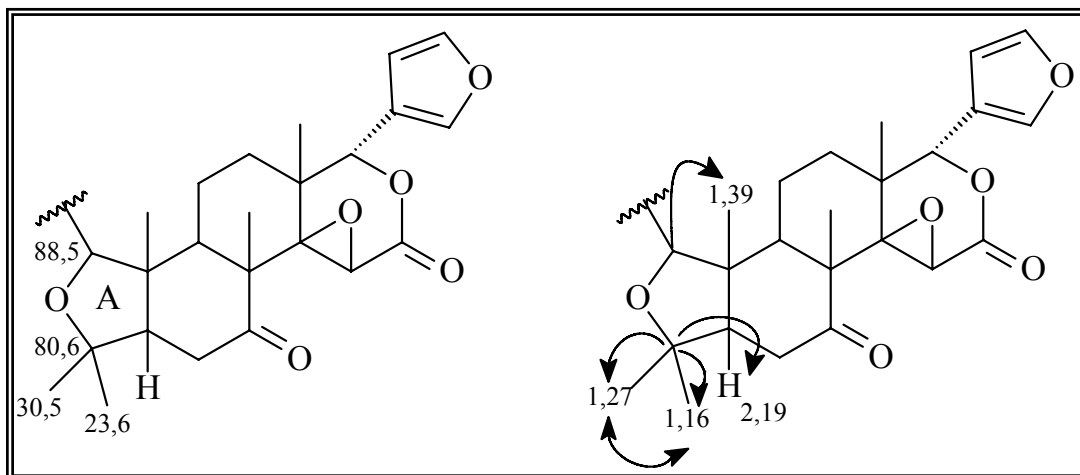


FIGURA 4.46: Correlações observadas no experimento de HMBC para o anel A da Substância XVIII.

O sinal em δ 88,5 pelo HSQC é referente ao δ 3,71 atribuído ao H-1 que pelo COSY acopla com δ 4,09 atribuído ao H-2. Pelo HSQC esse sinal δ 4,09 é referente ao δ 71,2 que pelo DEPT é um carbono terciário, sugerindo então que há um oxigênio na posição 2, o que é possível observar com a presença de um dubleto em δ 2,98 no espectro de RMN de ^1H .

No HMBC observa-se a correlação do δ 4,09 (H-2) com o δ 88,5 (C-1) e também com um sinal de carbono carbonílico em δ 174,2, e este apresenta correlação com um sinal em δ 3,77 referente a uma metoxila que pelo HSQC se refere ao carbono em δ 52,4. Desta forma sugere-se tratar de um grupo carbometoxi e seu posicionamento pode ser confirmado pelas correlações observadas no HMBC para os H-1 e H-2 como mostrado na **FIGURA 4.47**, na página 219.

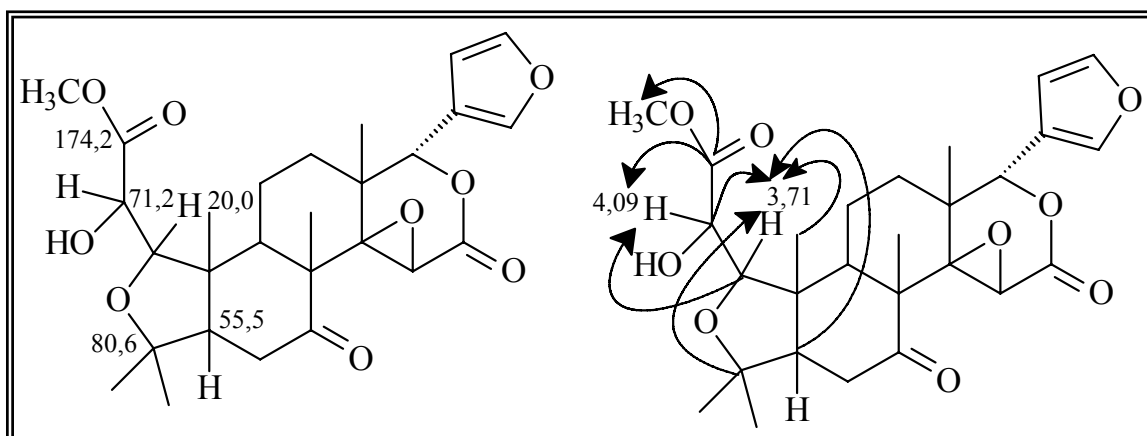


FIGURA 4.47: Correlações observadas no experimento de HMBC para o grupo carbometoxi da Substância XVIII.

Todos os valores de hidrogênio e carbonos (espectro de RMN de ^{13}C , **FIGURA 4.53**, p. 228) e suas correlações são mostrados nas **TABELAS 4.16–4.18**, nas páginas 220-222.

A estereoquímica foi definida por meio do experimento de NOESY (**FIGURA 4.54**, p. 229) que permitiu observar correlações como da metila 28 em δ 1,27 com o H-5 (δ 2,19) e H-2 (δ 4,09) indicando que estes deveriam estar na mesma face da molécula. Outras correlações importantes observadas são da metila 19 (δ 1,39) com o H-1 e do H-15 (δ 4,03) com a metila 18 (δ 1,18), o que se faz possível sugerir a estereoquímica apresentada. Desta forma, sugere-se a estrutura da substância XVIII como sendo o limonóide, inédito na literatura, o **2-HIDROXI-EPIISOOBACUNOATO DE METILA**.

TABELA 4.16: Dados de RMN de ^1H da substância XVIII (2-hidroxi-epiisobacunoato de metila).

Hidrogênio	2-hidroxi-epiisobacunoato de metila isolado
1	3,71 <i>d</i> (9,1) (1H)
2	4,09 <i>tl</i> (1H)
5	2,19 <i>dd</i> (3,4/15,4) (1H)
6a	2,83 <i>dd</i> (13,5/15,3) (1H)
6b	2,30 <i>dd</i> (3,4/13,5) (1H)
9	2,53 <i>dd</i> (1,9/11,6) (1H)
11a	1,76 <i>m</i> (1H)
11b	2,00 <i>m</i> (1H)
12a	1,52 <i>m</i> (1H)
12b	1,65 <i>m</i> (1H)
15	4,03 <i>s</i> (1H)
17	5,48 <i>s</i> (1H)
21	7,40 <i>quint</i> (0,7/1,7)
22	6,34 <i>dd</i> (0,7/1,7)
23	7,37 <i>t</i> (1,7)
18-CH ₃	1,18 <i>s</i> (3H)
19-CH ₃	1,39 <i>s</i> (3H)
28-CH ₃	1,27 <i>s</i> (3H)
29-CH ₃	1,16 <i>s</i> (3H)
30-CH ₃	1,20 <i>s</i> (3H)
2-OH	2,98 <i>d</i> (1H)
3-OCH ₃	3,77 <i>s</i> (3H)

OBS: Dados de RMN de ^1H (δ , mult., $J(\text{Hz})$) (integração) (CDCl_3 , 400 MHz).

TABELA 4.17: Dados de RMN de ^{13}C da substância XVIII (2-hidroxi-epiisobacunoato de metila).

Carbono	2-hidroxi-epiisobacunoato de metila isolado
1	88,5
2	71,2
3	174,2
4	80,6
5	55,5
6	36,3
7	208,8
8	51,8
9	43,2
10	47,9
11	19,6
12	30,9
13	37,9
14	66,6
15	54,0
16	167,5
17	78,3
18	20,7
19	20,0
20	120,4
21	141,0
22	109,8
23	142,9
28	30,5
29	23,6
30	18,0
3-OCH ₃	52,4

OBS: Dados de RMN de ^{13}C (δ) (CDCl₃, 100 MHz).

TABELA 4.18: Dados de HSQC e HMBC da substância XVIII (2-hidroxi-epiisobacunoato de metila).

Carbono	δ_C	HSQC	HMBC
1	88,5	3,71	1,39/4,09
2	71,2	4,09	3,71
3	174,2	-	3,77/4,09
4	80,6	-	1,16/1,27/2,19/3,71
5	55,5	2,19	1,16/1,27/1,39/2,30/2,83/3,71
6	36,3	2,83	-
7	208,8	-	1,20/2,30/2,83
8	51,8	-	1,20/2,00/2,53
9	43,2	2,53	1,20/1,39/1,65
10	47,9	-	1,39/2,19/2,30/2,53/2,83
11	19,6	1,76	-
12	30,9	1,65	5,48
13	37,9	-	1,18/1,52/5,48
14	66,6	-	1,20/1,52/4,03/5,48
15	54,0	4,03	-
16	167,5	-	4,03
17	78,3	5,48	1,18/1,65
18	20,7	1,18	1,52/1,65/5,48
19	20,0	1,39	2,19/2,53/3,71
20	120,4	-	5,48/6,34/7,37
21	141,0	7,40	5,48/6,34/7,37
22	109,8	6,34	5,48/7,40
23	142,9	-	6,34/7,40
28	30,5	1,27	1,16
29	23,6	1,16	1,27/2,19
30	18,0	1,20	2,53
3-OCH ₃	52,4	3,77	-

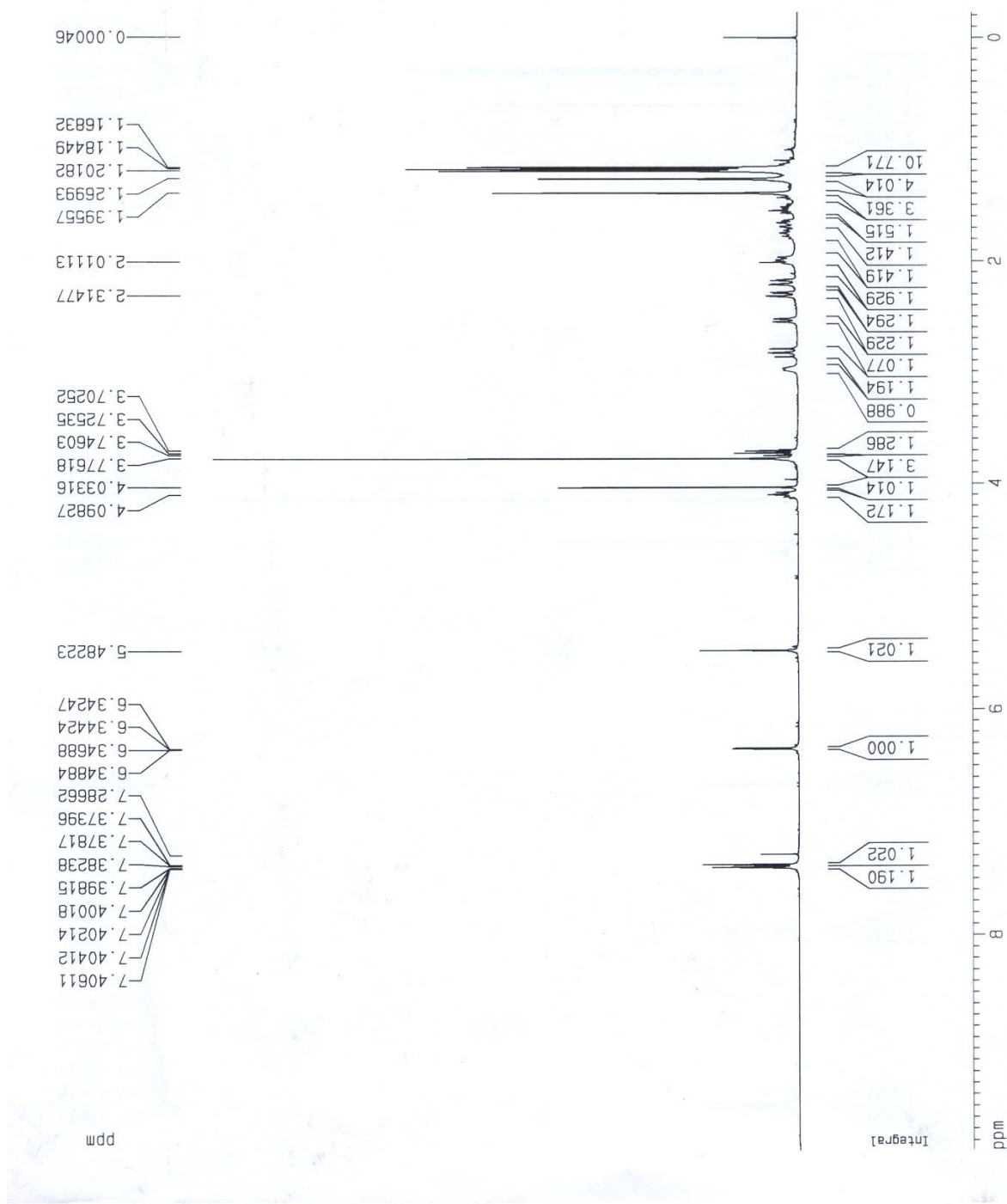


FIGURA 4.48: Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) da Substância XVIII (2-hidroxi-epiisobacunoato de metila).

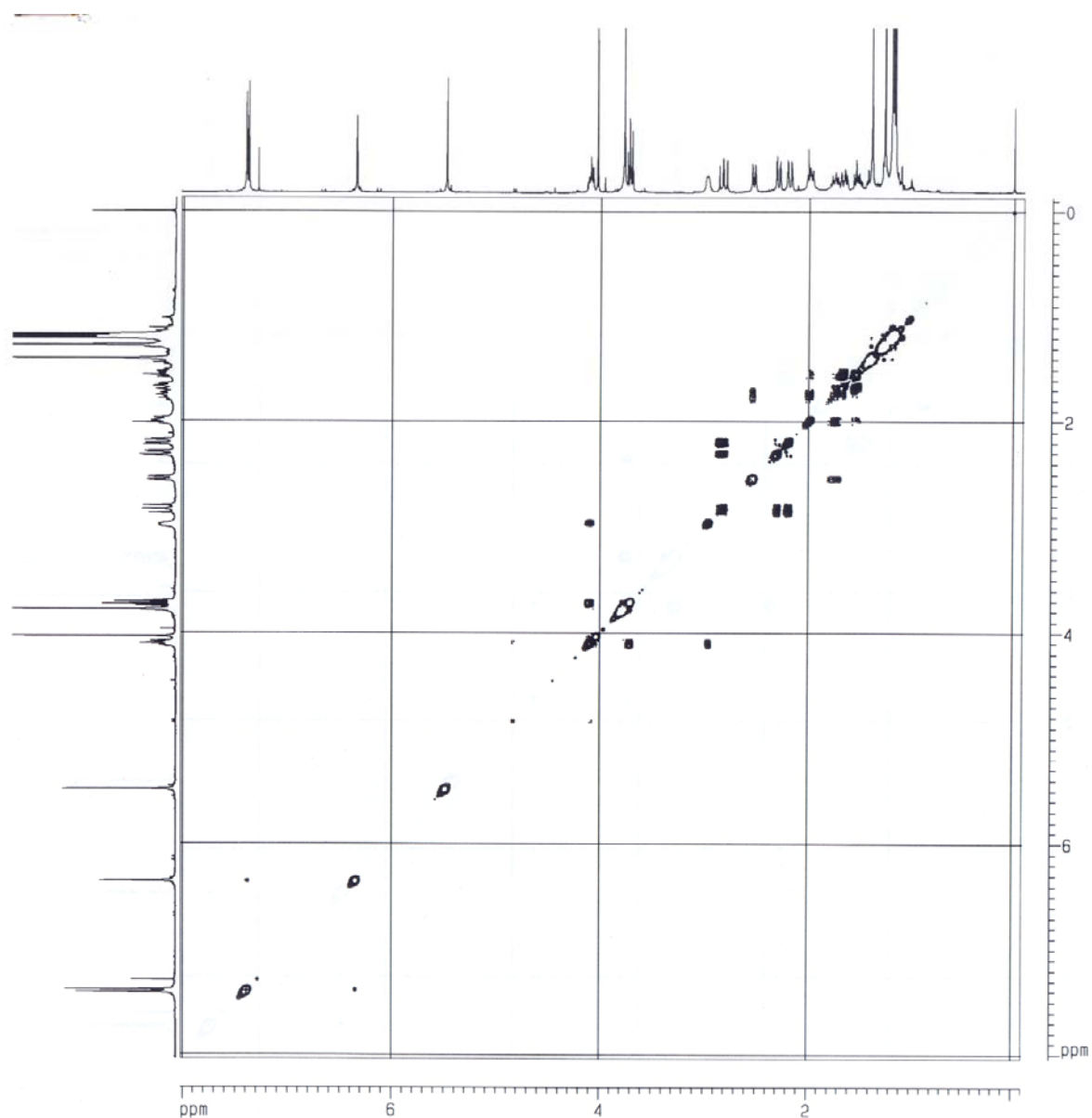


FIGURA 4.49: Experimento de COSY (400MHz, CDCl₃) da Substância XVIII (2-hidroxi-epiisobacunoato de metila).

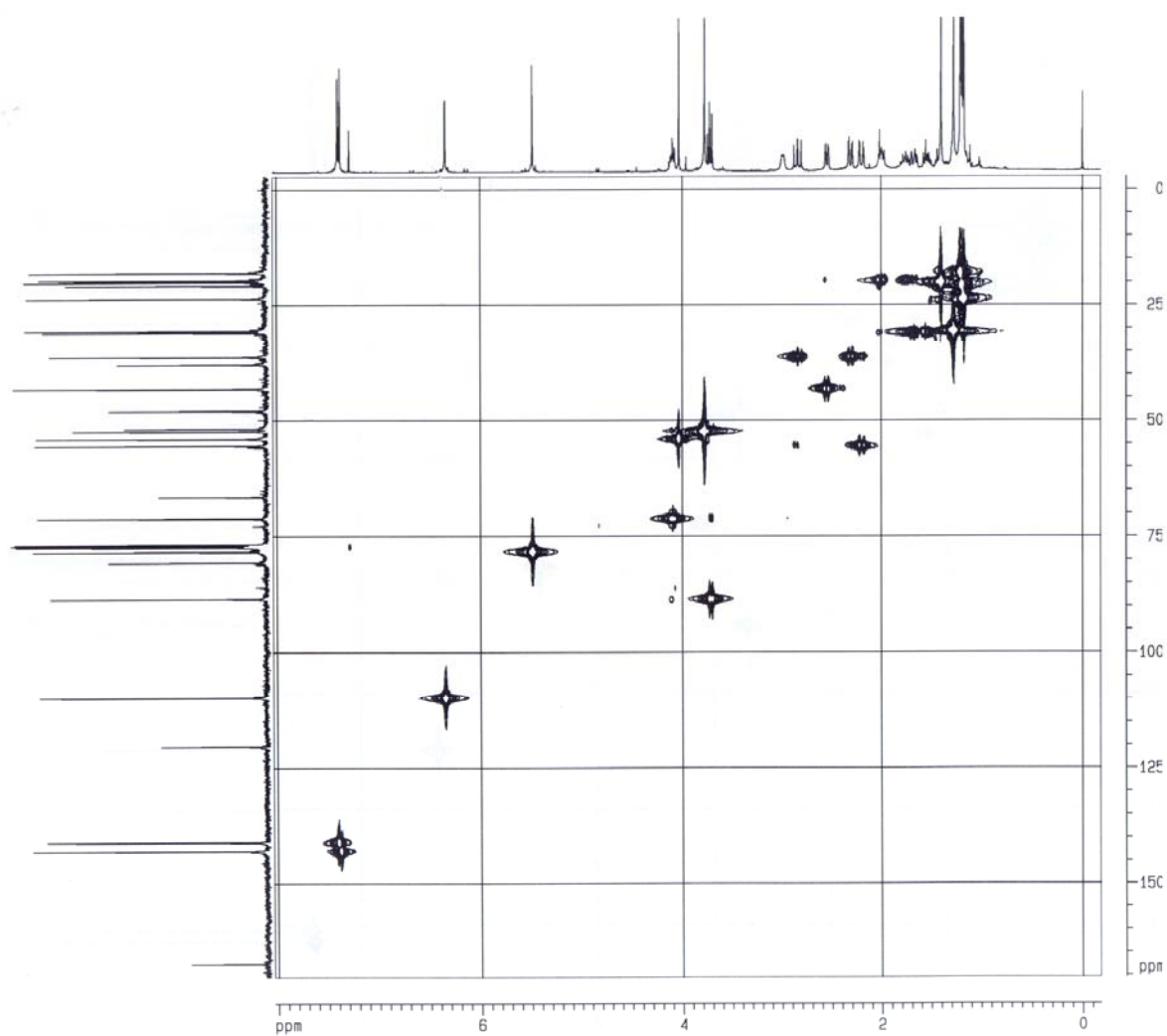


FIGURA 4.50: Experimento de HSQC (400MHz, CDCl₃) da Substância XVIII (2-hidroxi-epiisobacunoato de metila).

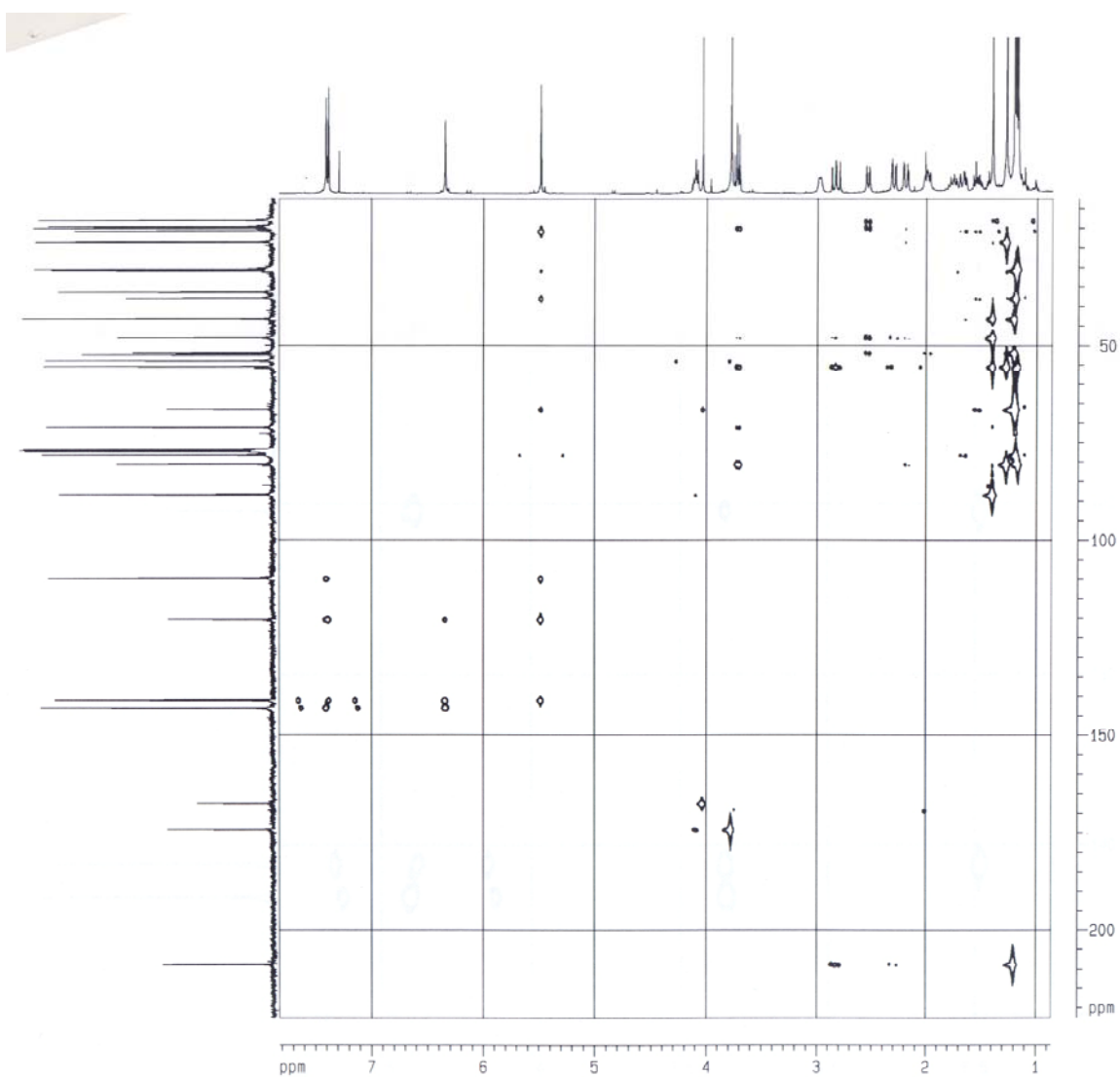


FIGURA 4.51: Experimento de HMBC (400MHz, CDCl_3) da Substância XVIII (2-hidroxi-epiisobacunoato de metila).

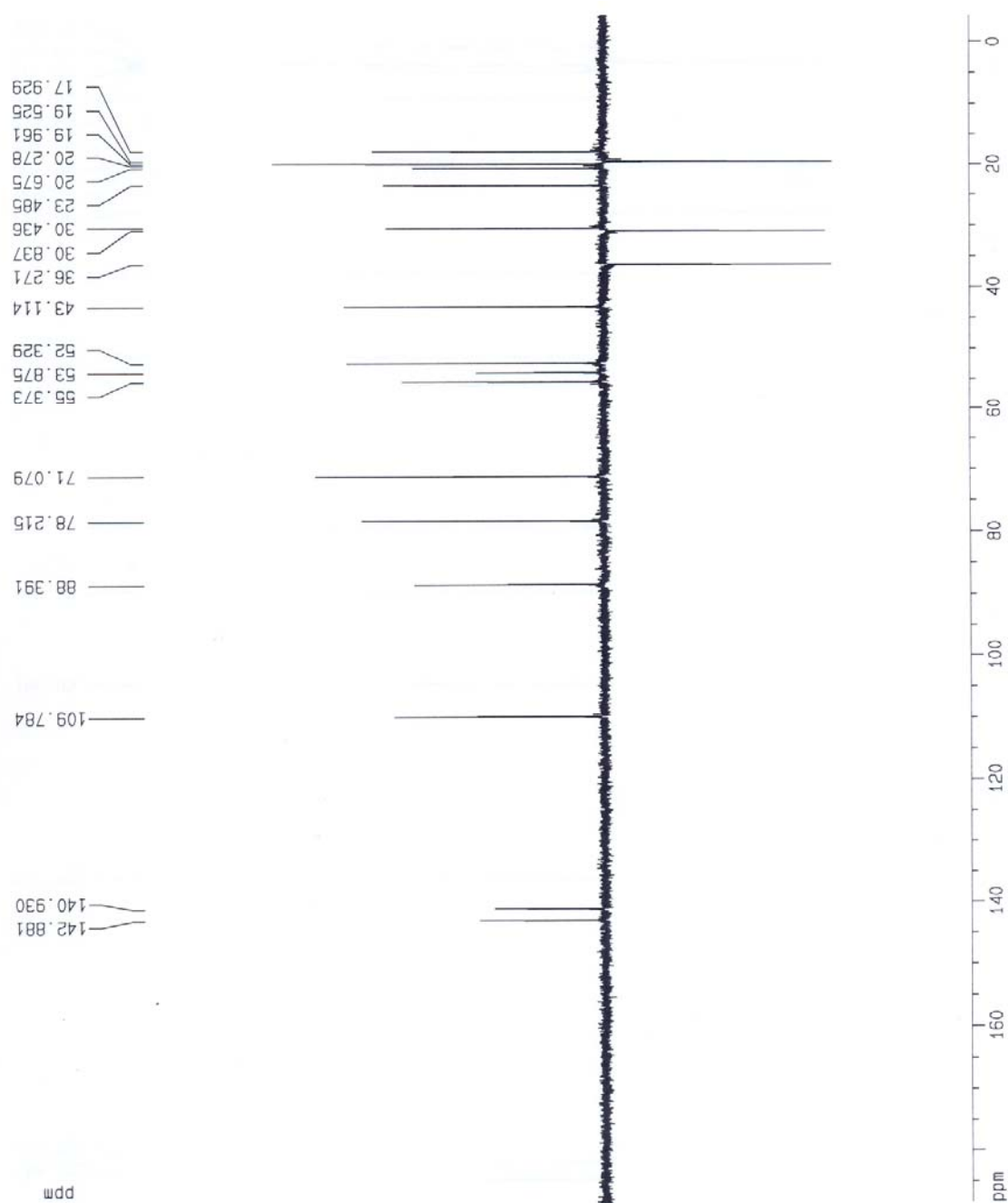


FIGURA 4.52: Espectro de DEPT 135 (100 MHz, CDCl_3) da Substância XVIII (2-hidroxi-epiisobacunoato de metila).

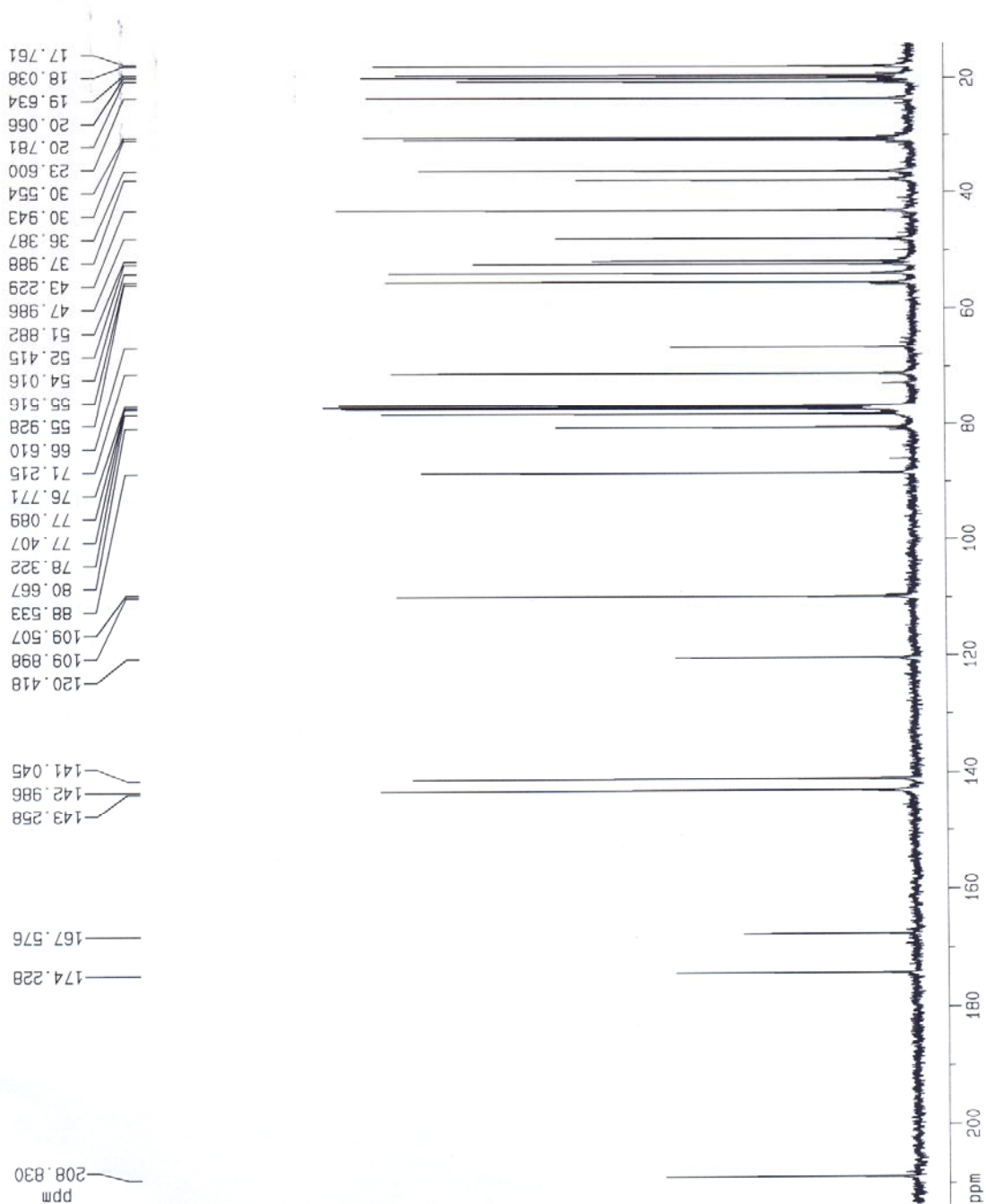


FIGURA 4.53: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da Substância XVIII (2-hidroxi-epiisobacunoato de metila).

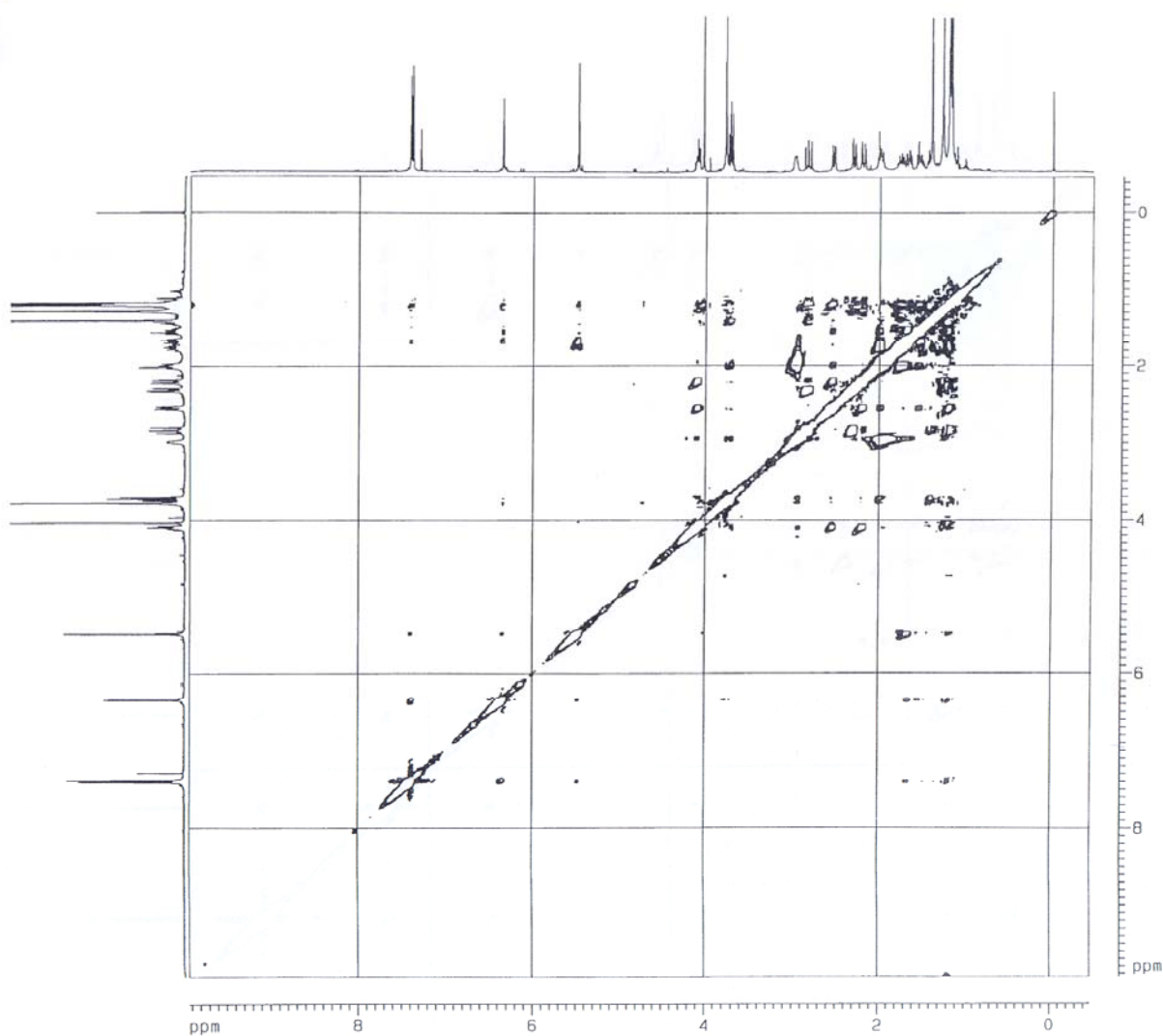


FIGURA 4.54: Experimento de NOESY (400MHz, CDCl_3) da Substância XVIII (2-hidroxi-epiisobacunoato de metila).

4.3.3.2 – Identificação da Substância XIX (2,21-dihidroxi-23-oxoepiisobacunoato de metila)

A substância XIX (**FIGURA 4.55**, p. 230) apresentou-se como um sólido amorfo branco e é denominada de 2,21-dihidroxi-23-oxoepiisobacunoato de metila.

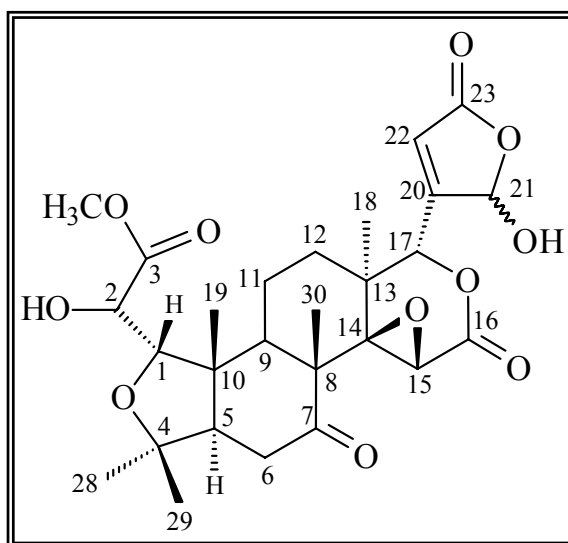


FIGURA 4.55: Estrutura química do limonóide 2,21-dihidroxi-23-oxoepiisobacunoato de metila (Substância XIX).

O espectro de RMN de ^1H (**FIGURA 4.58**, p. 236) da substância V apresenta sinais semelhantes aos da Substância XVIII (ver item 4.3.3.1), ou seja, singletos para cinco metilas em δ 1,15/1,16/1,23/1,25 e 1,40 referentes aos H_3 -18, H_3 -29, H_3 -30, H_3 -28 e H_3 -19, respectivamente. Um singlete em δ 3,71/3,72 que pelo experimento de HSQC (**FIGURA 4.59**, p. 237) se refere ao carbono em δ 52,2. Este sinal em δ 3,71/3,72 associado ao sinal em δ 4,17 e 3,77 atribuídos aos H-2 e H-1 e suas correlações observadas no experimento de HMBC (**FIGURA 4.60**, p. 238) sugerem o mesmo grupo substituinte no anel A do limonóide como mostrado na **FIGURA 4.56**, na página 231.

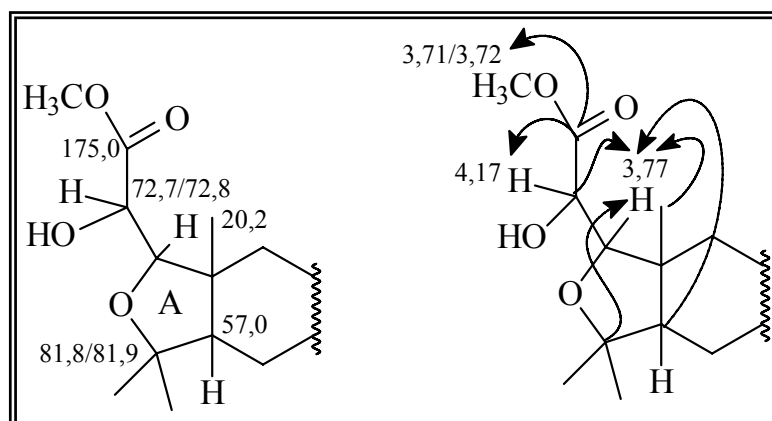


FIGURA 4.56: Correlações observadas no experimento de HMBC para o anel A da Substância XIX.

Todos os sinais referentes aos anéis A, B, C e D são semelhantes aos da substância XVIII discutidos anteriormente no item 4.3.3.1 e são apresentados nas **TABELAS 4.19-21**, nas páginas 233-235. Os sinais foram atribuídos da mesma forma como para a Substância XVIII segundo seus espectros de RMN de ^1H , ^{13}C (**FIGURA 4.61**, p. 239), DEPT 135 (**FIGURA 4.62**, p.240) e experimentos COSY (**FIGURA 4.63**, p. 241), HSQC, HMBC e NOESY (**FIGURA 4.64**, p. 242).

O que se observa de diferente entre estes dois limonóides pode ser visto no espectro de RMN de ^1H , onde não são observados os sinais referentes ao anel furano, ou seja, os sinais em δ 7,40 (*quint*), δ 6,34 (*dd*) e δ 7,37 (*t*) referentes aos H-21/22 e 23, respectivamente. Para a presente substância, observa-se um singlete em δ 6,27 e um singlete largo em δ 6,19 que são característicos de um anel furano oxidado, como mostrado na **FIGURA 4.57**, na página 232, podendo referir-se a uma das duas estruturas:

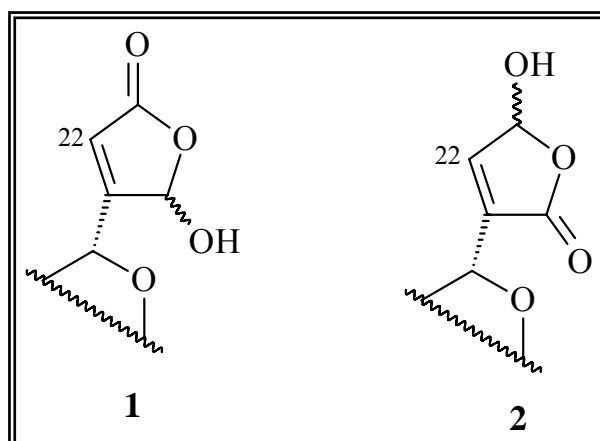


FIGURA 4.57: Possibilidades de oxidação do anel furano para a Substância XIX.

A diferença entre as duas opções apresentadas se baseia no deslocamento químico do H-22, o qual na possibilidade **2** por ser β carbonílico seria mais desblindado, e seu deslocamento seria próximo a δ 7,30 (PLACERES NETO, 2004) e na possibilidade **1** o hidrogênio é α carbonílico e seu deslocamento é mais blindado, ou seja, δ 6,27 o que permite dizer que se trata neste caso da possibilidade **1**.

Deve ser ressaltado que alguns sinais aparecem duplicados por se referirem aos epímeros da posição 21. Desta forma, sugere-se a estrutura da substância XIX como sendo o limonóide, inédito na literatura, o **2,21-DIHIDROXI-23-OXOEPIISOOBACUNOATO DE METILA**.

TABELA 4.19: Dados de RMN de ^1H e do experimento de COSY da substância XIX (2,21-dihidroxi-23-oxoeppiisobacunoato de metila).

Hidrogênio	2,21-dihidroxi-23-oxoeppiisobacunoato de metila isolado	COSY
1	3,77 <i>dd</i> (5,7/9,5) (1H)	4,17
2	4,17 <i>dd</i> (6,3/9,5) (1H)	3,77
5	2,32 <i>t</i> (3,3) (1H)	3,00
6	3,00 <i>m</i> (2H)	2,32
9	2,53/2,56 <i>dd</i> (2,0/11,8) (1H)	1,80
11	1,80 <i>m</i> (1H)	2,53/2,56
12	2,03 <i>m</i> (1H)	-
15	3,88/4,03 <i>s</i> (1H)	-
17	5,41 <i>s</i> (1H)	-
21	6,19 <i>sl</i> (1H)	-
22	6,27 <i>s</i> (1H)	-
18-CH ₃	1,15 <i>s</i> (3H)	-
19-CH ₃	1,40/1,42 <i>s</i> (3H)	-
28-CH ₃	1,25 <i>s</i>	-
29-CH ₃	1,16 <i>s</i> (3H)	-
30-CH ₃	1,23 <i>s</i> (3H)	-
3-OCH ₃	3,71/3,72 <i>s</i> (3H)	-

OBS: Dados de RMN de ^1H (δ , mult., $J(\text{Hz})$) (integração) (CDCl_3 , 400 MHz).

TABELA 4.20: Dados de RMN de ^{13}C da substância XIX (2,21-dihidroxi-23-oxoepiisobacunoato de metila).

Carbono	2,21-dihidroxi-23-oxoepiisobacunoato de metila isolado
1	89,2
2	72,7/72,8
3	175,0
4	81,8/81,9
5	57,0
6	37,3
7	210,7/210,8
8	52,9
9	44,2/44,7
10	47,9/48,4
11	20,7
12	30,2
13	39,3/40,1
14	67,4/68,2
15	55,3/56,3
16	168,2/169,1
17	77,8
18	24,0
19	20,2
20	124,3
21	*
22	*
23	171,4/171,7
28	30,9/31,0
29	23,9
30	17,9
3-OCH ₃	52,2

* não observado

OBS: Dados de RMN de ^{13}C (δ) (CDCl₃, 100 MHz).

TABELA 4.21: Dados de HSQC e HMBC da substância XIX (2,21-dihidroxi-23-oxoeipiisobacunoato de metila).

Carbono	δ_C	HSQC	HMBC
1	89,2	3,77	1,40/1,42
2	72,7/72,8	4,17	3,77
3	175,0	-	3,71/3,72/4,17
4	81,8/81,9	-	3,00/3,77/4,17
5	57,0	2,32	1,40/1,42/3,00/3,77
6	37,3	3,00	-
7	210,7/210,8	-	-
8	52,9	-	1,80/2,03/2,53/2,56
9	44,2/44,7	2,53/2,56	1,20/1,39/1,65
10	47,9/48,4	-	1,23/1,40/1,42
11	20,7	1,80	-
12	30,2	2,03	-
13	39,3/40,1	-	5,41
14	67,4/68,2	-	1,23/3,88/4,11/5,41
15	55,3/56,3	3,88/4,11	1,15
16	168,2/169,1	-	3,88/4,11
17	77,8	5,41	-
18	24,0	1,15	-
19	20,2	1,40/1,41	2,32/2,53/2,56/3,77
20	124,3	-	5,41
21	*	-	-
22	*	-	-
23	171,4/171,7	-	5,41/6,27
28	30,9/31,0	1,25	1,16
29	23,9	1,16	-
30	17,9	1,23	2,53/2,56
3-OCH ₃	52,2	3,71/3,72	-

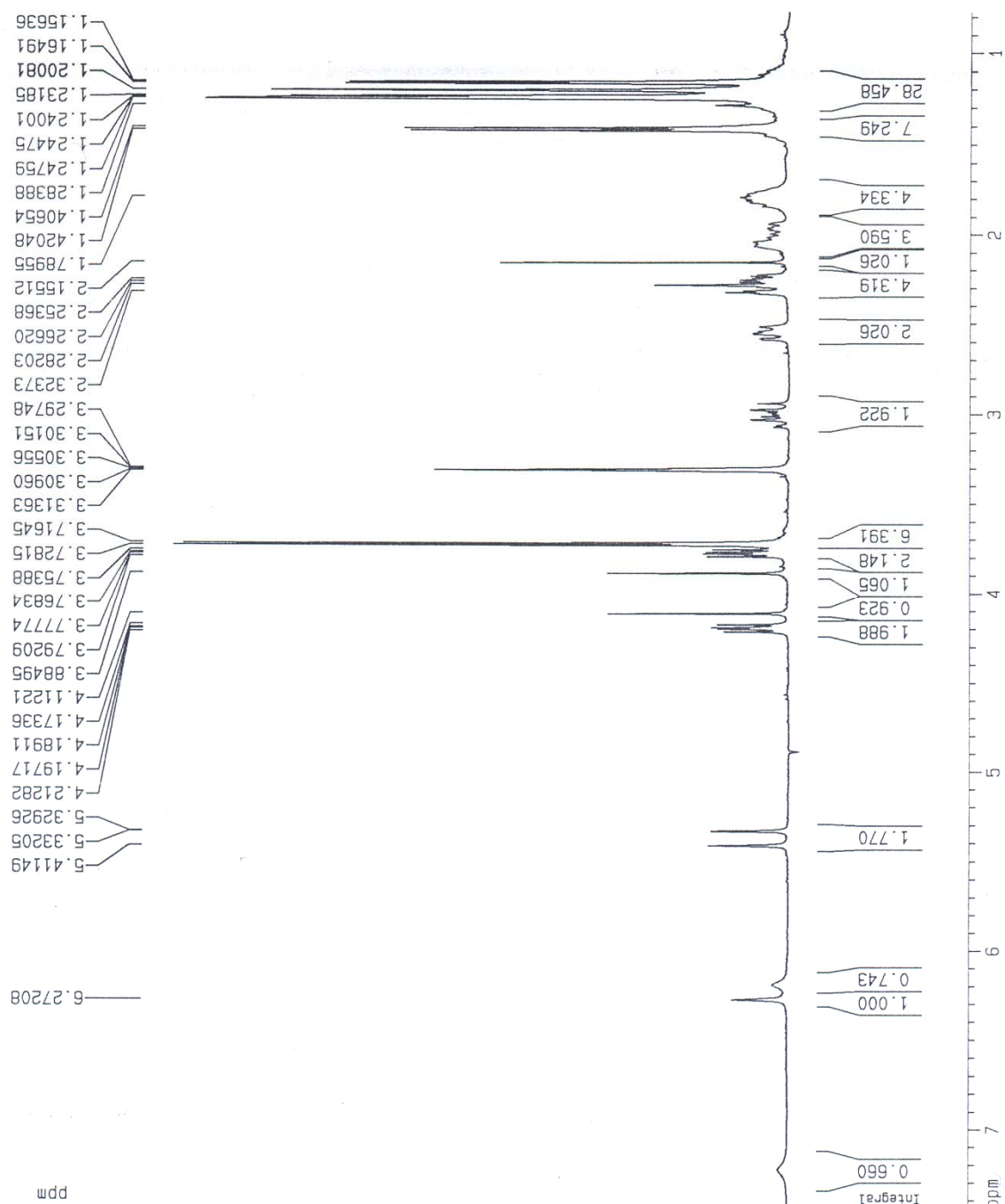


FIGURA 4.58: Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, MeOD) da Substância XIX (2,21-dihidroxi-23-oxoepiisobacunoato de metila).

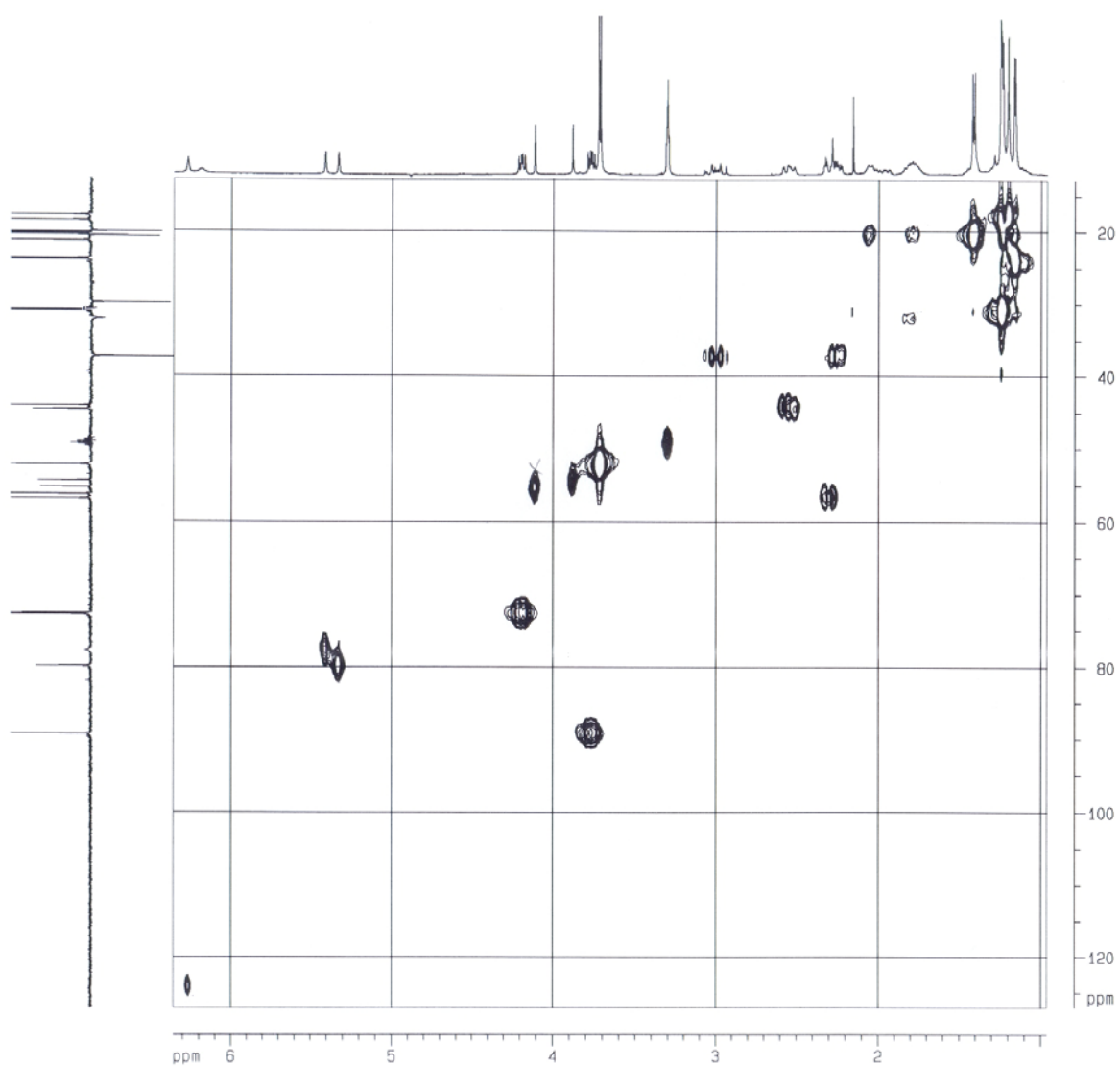


FIGURA 4.59: Experimento de HSQC (400MHz, MeOD) da Substância XIX (2,21-dihidroxi-23-oxoepiisobacunoato de metila).

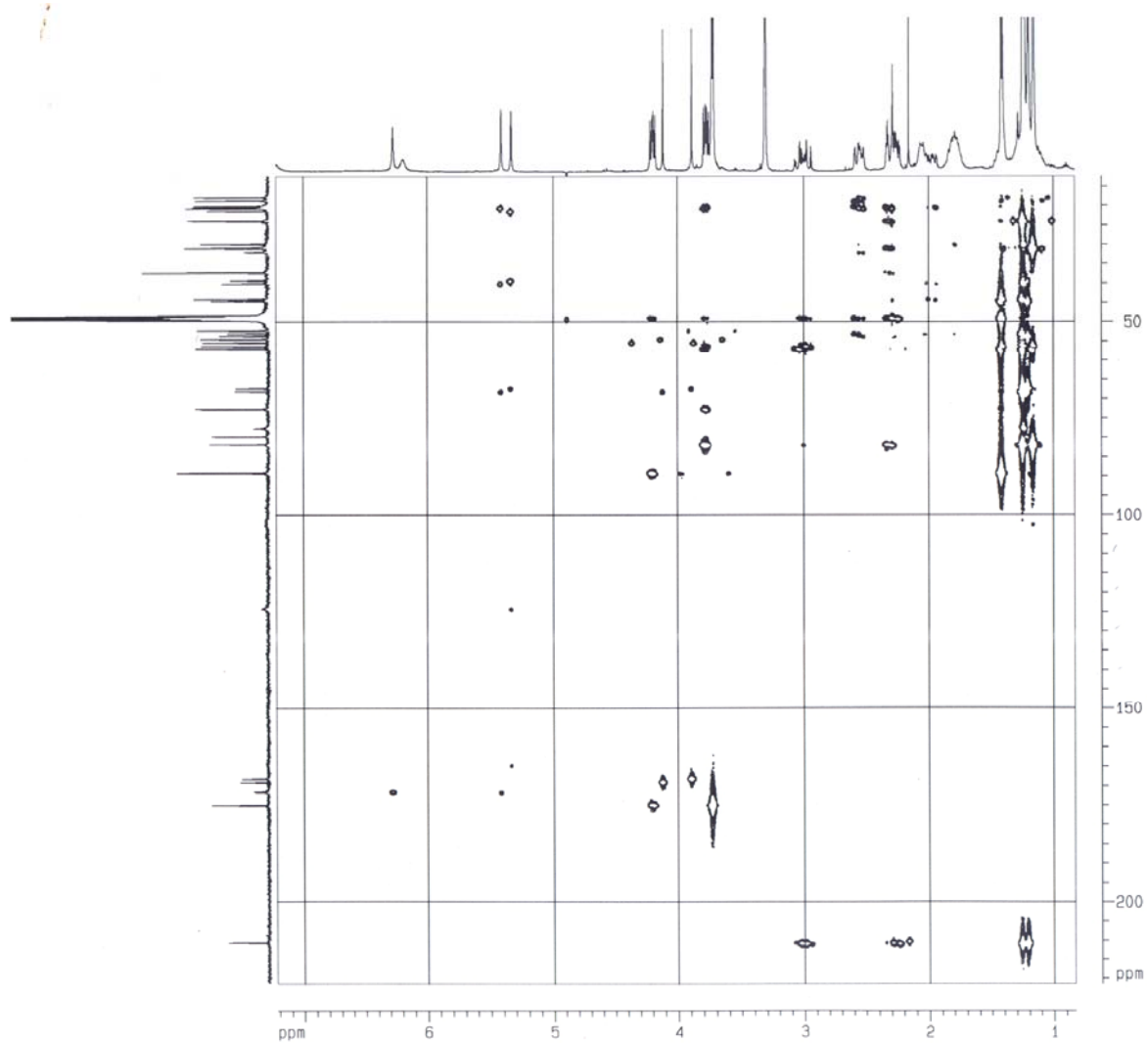


FIGURA 4.60: Experimento de HMBC (400MHz, MeOD) da Substância XIX (2,21-dihidroxi-23-oxoepiisobacunoato de metila).

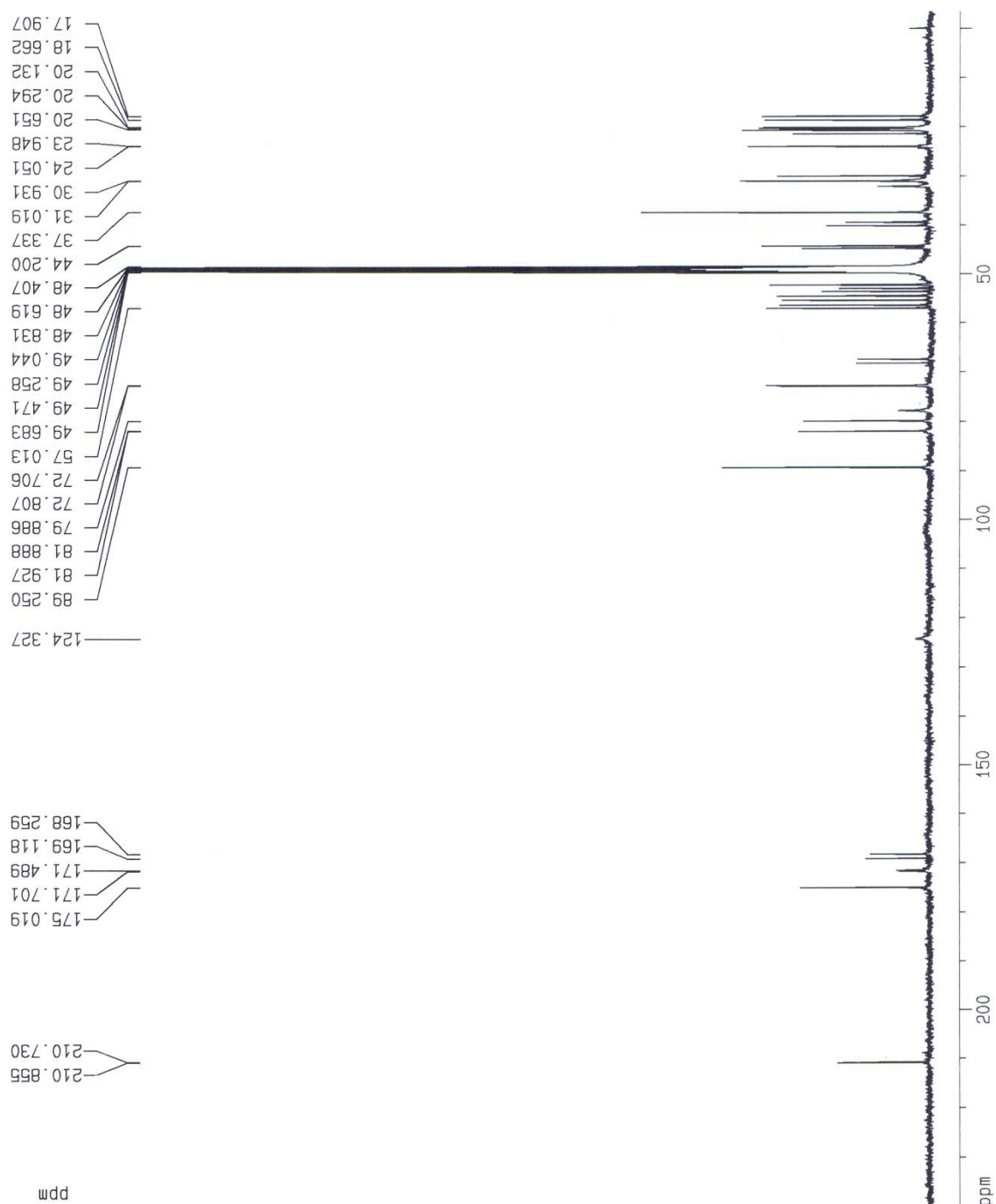


FIGURA 4.61: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, MeOD) da Substância XIX (2,21-dihidroxi-23-oxoepiisobacunoato de metila).

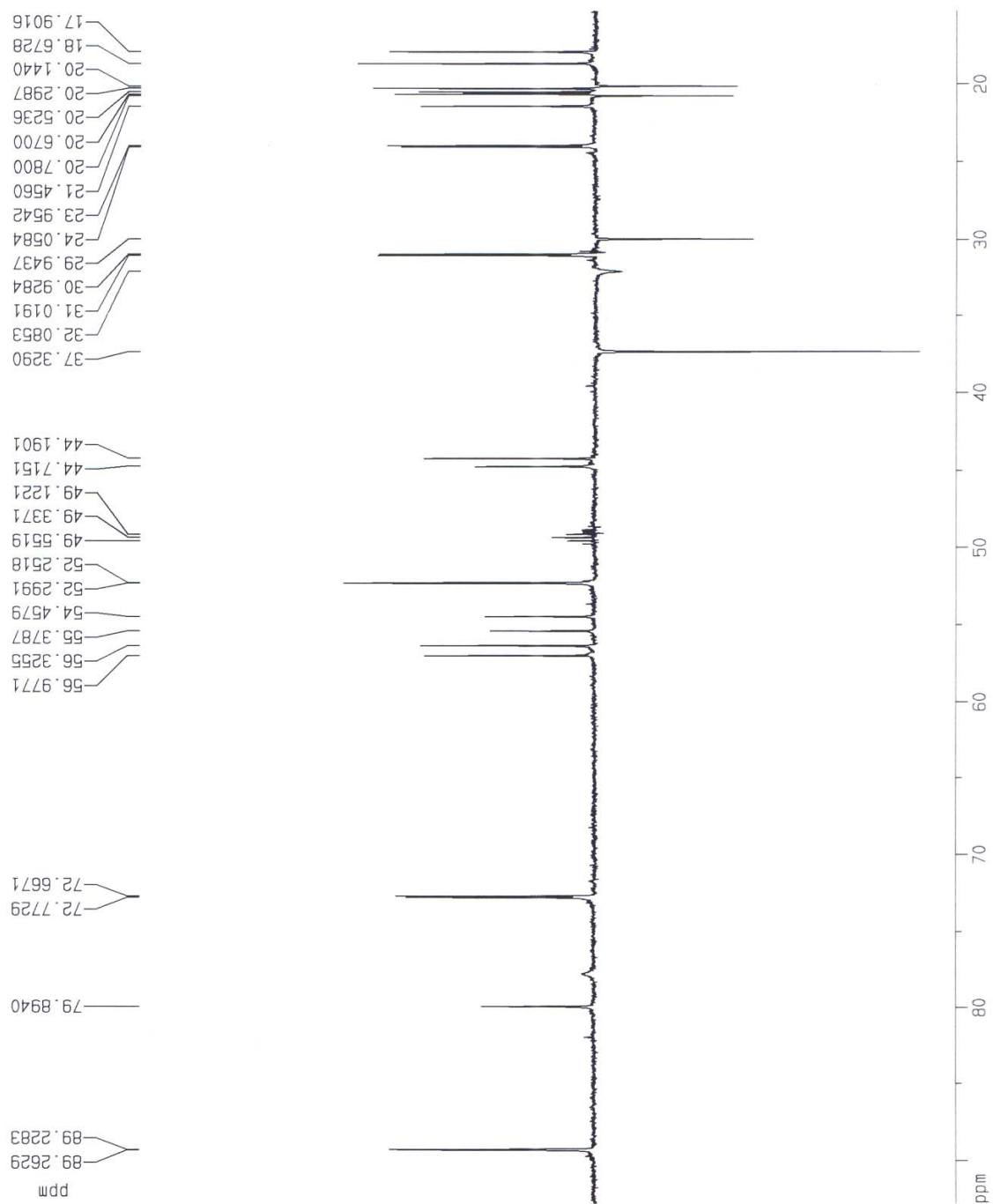


FIGURA 4.62: Espectro de DEPT 135 (100 MHz, MeOD) da Substância XIX (2,21-dihidroxi-23-oxoepiisobacunoato de metila).

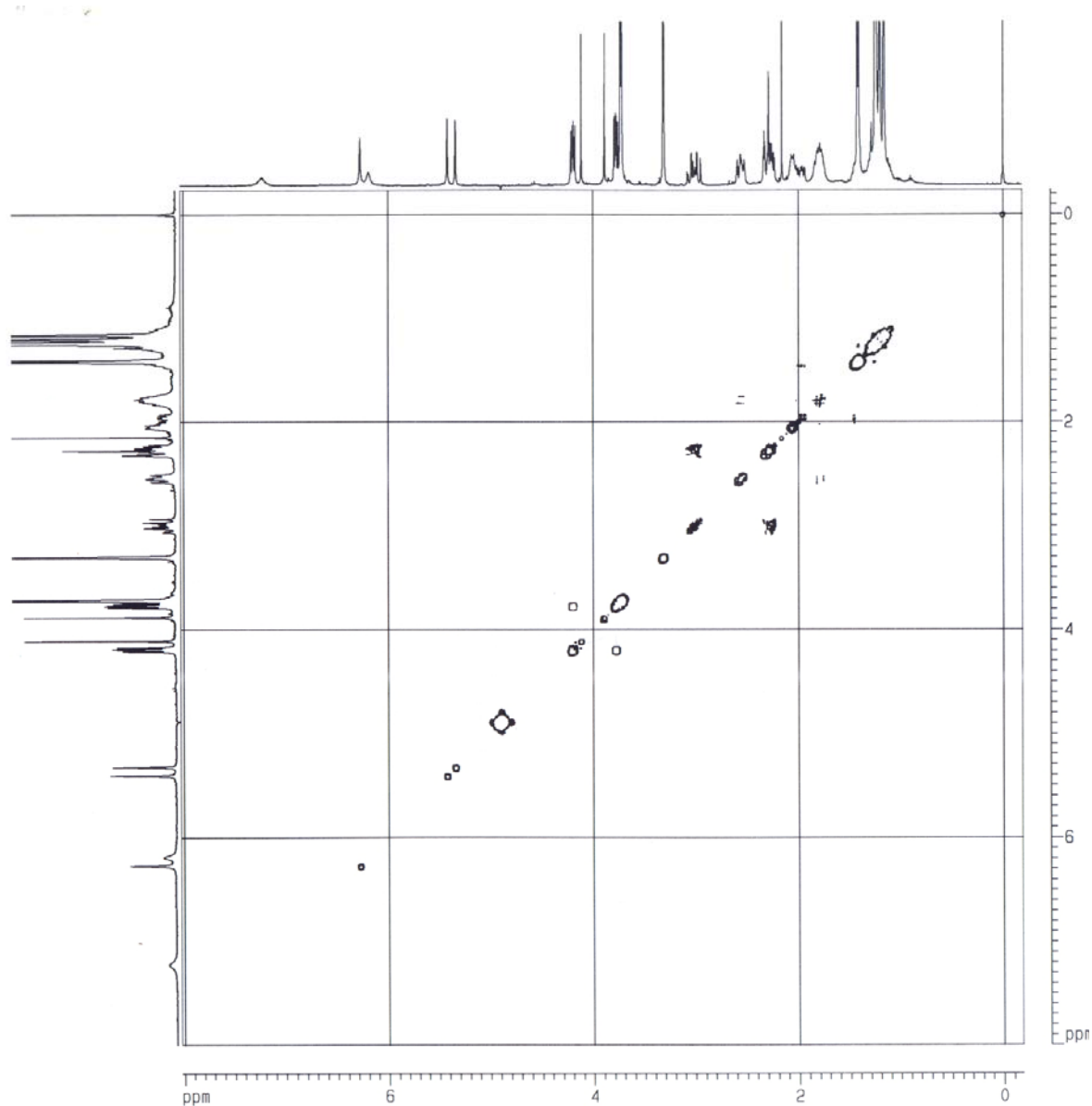


FIGURA 4.63: Experimento de COSY (400MHz, MeOD) da Substância XIX (2,21-dihidroxi-23-oxoepiisobacunoato de metila).

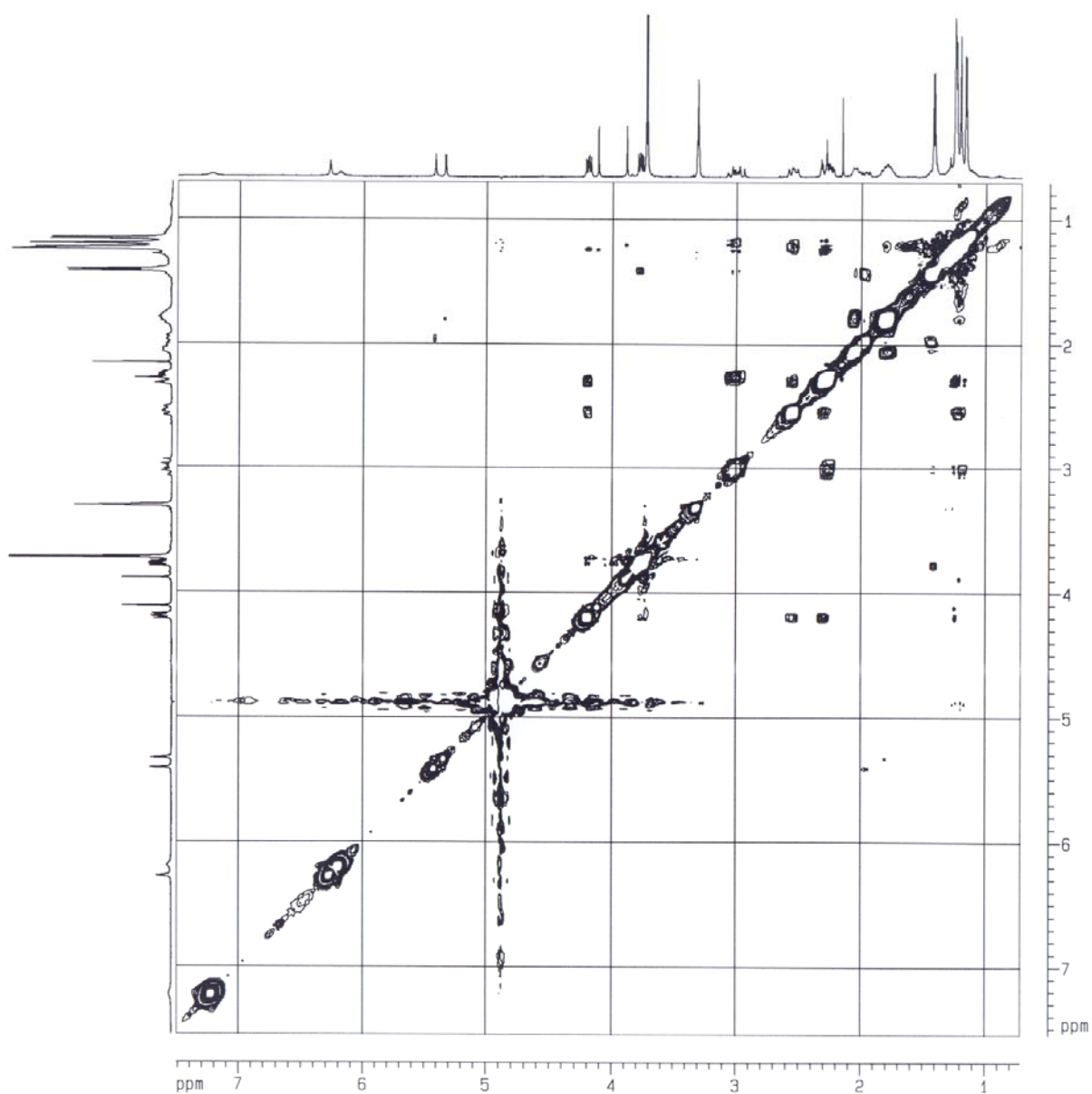


FIGURA 4.64: Experimento de NOESY (400MHz, MeOD) da Substância XIX (2,21-dihidroxi-23-oxoepiisobacunoato de metila).

4.3.3.3 – Identificação da Substância XX (7-acetil-21-hidroxi-23-oxotecleanino)

A substância XX (**FIGURA 4.65**, p. 243) apresentou-se como um sólido amorfo branco e é denominada de 7-acetil-21-hidroxi-23-oxotecleanino.

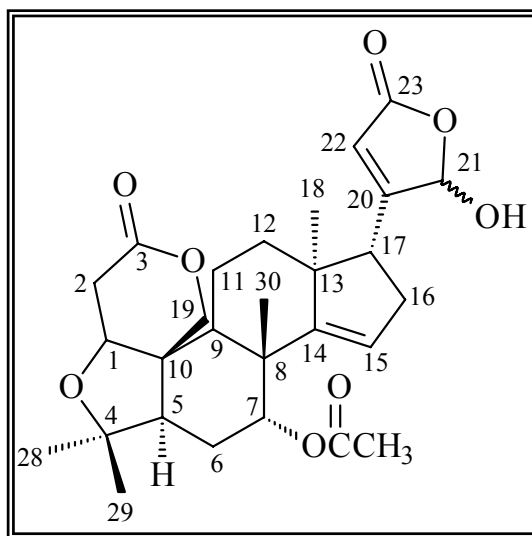


FIGURA 4.65: Estrutura química do limonóide 7-acetil-21-hidroxi-23-oxotecleanino (Substância XX).

O espectro de RMN de ^1H (**FIGURA 4.70**, p. 252) da substância XX apresentou-se um pouco diferente dos dois limonóides mencionados anteriormente, porém alguns sinais são semelhantes como os do anel furano oxidado. Para a presente substância o espectro apresenta um singlete em δ 6,95 atribuído ao H-22 que pelo experimento de HSQC (**FIGURA 4.71**, p. 253) se refere ao carbono em δ 145,6/145,8 e o singlete largo em δ 6,01/6,17 atribuído ao H-21 que pelo HSQC é referente ao carbono em δ 96,5/98,4. Assim como já mencionado para o limonóide anterior, alguns sinais se apresentam duplicados, se referindo aos epímeros em C-21.

Observa-se também no espectro de RMN de ^1H sinais para quatro metilas em δ 1,04/1,05/1,12 e 1,25. O sinal em δ 1,12 pelo HSQC se refere ao carbono em δ 21,4/21,5 e pelo HMBC (**FIGURA 4.72**, p. 254) correlaciona-se com o sinal de carbono em δ 30,3 que pelo HSQC se refere a uma metila em δ 1,25, desta forma esses sinais foram atribuídos às metilas 29 e 28, respectivamente.

Observa-se também no HMBC as correlações das duas metilas com um sinal em δ 80,7 que deve ser um carbono quaternário pela ausência de correlação no HSQC e pelo seu deslocamento está ligado a um oxigênio, atribuído ao carbono C-4. Este carbono em δ 80,7 se correlaciona também com um duplete em δ 2,27 que pelo HSQC se refere ao carbono em δ 53,6 e assim, atribuído ao H-5. este por sua vez se correlaciona com o C-4 e ainda com outro carbono em δ 45,5 que pelo HSQC não tem correlação e assim atribuído ao C-10. Essas correlações são referentes ao anel A do limonóide como mostra a **FIGURA 4.66**, na página 244.

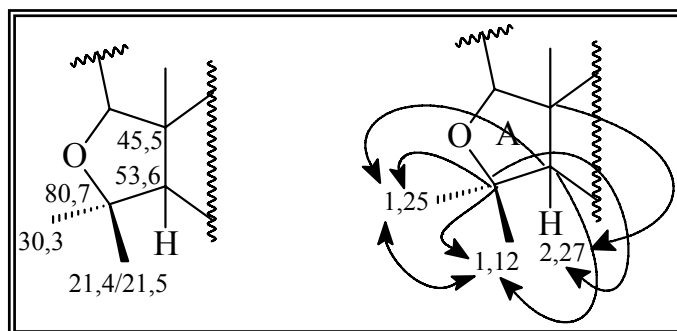


FIGURA 4.66: Correlações observadas no experimento de HMBC para o anel A da Substância XX.

O sinal em δ 45,5 (C-10) correlaciona-se também no HMBC com um singlete largo em δ 4,07 que pelo HSQC se refere ao carbono em δ 79,7. Esse deslocamento sugere que o carbono esteja ligado a um oxigênio e por

isso foi atribuído ao C-1, atribuindo-se assim todos os sinais referentes ao anel A.

Por meio do experimento de COSY (**FIGURA 4.73**, p. 255) o sinal do H-1 em δ 4,07 acopla com um tripleto em δ 2,91/2,93 e com um dubleto em δ 2,63, sendo que estes sinais pelo HSQC se correlacionam com o mesmo sinal de carbono em δ 35,7 e assim foram atribuídos aos H-2a e 2b. Pelo HMBC os sinais de H-2 correlacionam-se com o δ 79,7 (C-1) e δ 168,4 sugerindo estar vizinho a uma carboxila que foi atribuído ao C-3. O sinal em δ 79,7 (C-1) apresenta, ainda, uma correlação via HMBC com dois duplos dubletos em δ 4,41 e 4,48 que via HSQC se correlacionam com o mesmo carbono em δ 65,8 e este deslocamento sugere que esteja ligado a um oxigênio. Com isso e pelo fato de no espectro de RMN de ^1H apresentar sinais para quatro metilas, permite-se dizer que este sinal em δ 65,8 se refere ao que seria a metila 19 que neste caso está ligado a um oxigênio formando um anel lactônico e assim foi atribuído ao C-19. Suas correlações via HMBC são mostradas na **FIGURA 4.67**, na página 245.

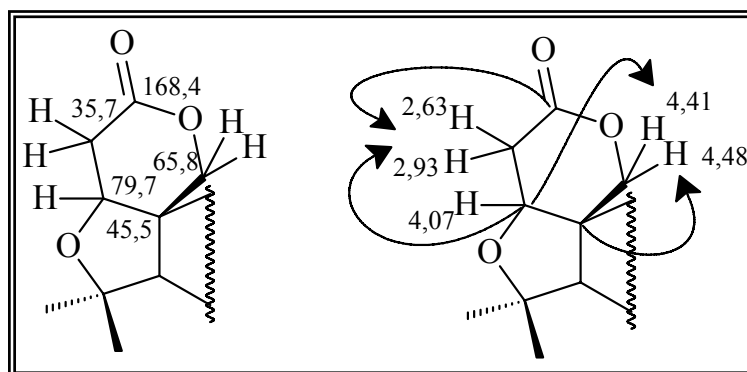


FIGURA 4.67: Correlações observadas no experimento de HMBC para o anel lactônico da Substância XX.

O sinal em δ 2,27 (H-5) via COSY acopla com sinal em δ 1,92/1,95 que pelo HSQC se refere ao carbono em δ 21,1. Estes sinais de

hidrogênios pelo HMBC se correlacionam com o δ 53,6 (C-5) e assim foram atribuído aos H-6. Esse H-6 acopla via COSY com o H-5 e também com um singlete largo em δ 5,27 atribuído ao H-7 que pelo HSQC se refere ao carbono em δ 74,3. Essa multiplicidade do H-7 (*sl*) permite dizer que o mesmo esteja em beta, visto que se estivesse em alfa sua multiplicidade seria um duplo dubleto com uma das constantes axial-axial próximo de 12 Hz.

O deslocamento do carbono em δ 74,3 sugere que esteja ligado a um oxigênio e como pelo HMBC o sinal em δ 5,27 (H-7) se correlaciona com um carbono carboxílico em δ 169,7, permite-se afirmar que em C-7 esteja um substituinte acetato, confirmado pela presença de um singlete em δ 2,00 integrando para três hidrogênios, o que via HSQC se refere ao carbono em δ 21,1.

O sinal em δ 5,27 pelo HMBC se correlaciona, ainda, com um sinal em δ 27,5 que pelo HSQC se refere a uma metila em 1,05, atribuído à metila 30. Essa metila se correlaciona com os sinais em δ 43,3 que não apresenta correlação no HSQC sugerindo ser o carbono quaternário C-8 e com δ 41,7 que pelo HSQC se refere ao δ 2,40/2,48 que foi atribuído ao H-9. Esse sinal de H-9 se correlaciona com o sinal de carbono em δ 45,5 (C-10) e 65,8 (C-19) confirmando assim os sinais referentes ao anel B do limonóide como mostrado na **FIGURA 4.68**, na página 247.

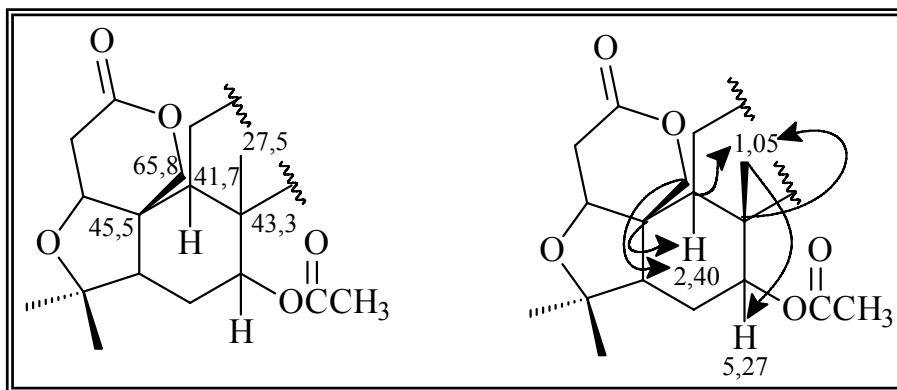


FIGURA 4.68: Correlações observadas no experimento de HMBC para o anel B da Substância XX.

O sinal em δ 2,40/2,48 (H-9) acopla via COSY com o sinal em δ 1,82/1,89 que pelo HSQC se refere ao carbono em δ 18,7 e foi atribuído ao H-11. O H-9 se correlaciona via HMBC com os sinais em δ 18,7 (C-11) e 32,5/32,6 que via HSQC se refere aos hidrogênios em δ 1,76 atribuído aos H₂-12. O H-11 e 12 acoplam entre si no experimento de COSY permitindo assim confirmar os seus posicionamentos.

Voltando para a metila 30 em δ 1,05 pode-se observar, ainda, uma correlação via HMBC com um sinal em δ 156,5/156,8 que via HSQC não se correlaciona com nenhum hidrogênio e seu deslocamento sugere ser um carbono olefínico que foi atribuído ao C-14. Esse C-14 se correlaciona também com a metila 18 em δ 1,04.

O dubleto largo que se observa no espectro de RMN de ¹H em δ 5,39/5,40 correlaciona-se via HSQC com δ 119,9/120,4 sugerindo ser, por sua desproteção, o H-15. Este por sua vez se correlaciona via HMBC com os sinais: δ 47,3 que não apresenta correlação no HSQC sendo assim atribuído ao C-13; δ 33,6/33,8 que pelo HSQC se refere ao hidrogênio em δ 2,52; e δ 50,5 que via HSQC se refere ao hidrogênio em δ 2,80. O sinal em δ 2,52 acopla via COSY com δ 2,80 desta forma, o sinal em δ 2,52 foi atribuído ao H-16 e δ 2,80 ao H-17 como mostrado na **FIGURA 4.69**, na página 248.

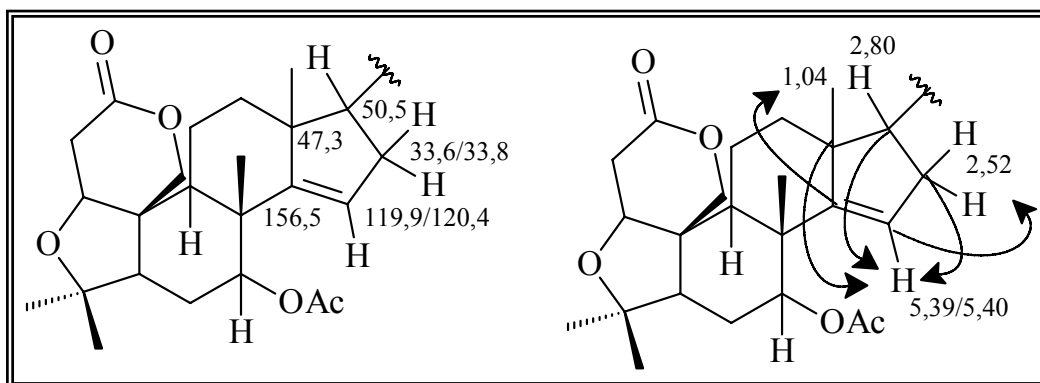


FIGURA 4.69: Correlações observadas no experimento de HMBC para o anel D da Substância XX.

Todos os sinais atribuídos aos hidrogênios e carbonos (espectro de RMN de ^{13}C , **FIGURA 4.74**, p. 256) são apresentados nas **TABELAS 4.22-24**, nas páginas 249-251.

Assim como mencionado para o limonóide anterior, a substância XX se refere aos epímeros na posição 21 e de acordo com o discutido acima, a estrutura da substância XX é o limonóide, inédito na literatura, **7-ACETIL-21-HIDROXI-23-OXOTECLEANINO**.

TABELA 4.22: Dados de RMN de ^1H e do experimento de COSY da substância XX (7-acetil-21-hidroxi-23-oxotecleanino).

Hidrogênio	7-acetil-21-hidroxi-23-oxotecleanino isolado	COSY
1	4,07 <i>sl</i> (1H)	2,91/2,93
2a	2,63 <i>d</i> (17,2)	2,91/2,93
2b	2,91/2,93 <i>t</i> (4,6)	2,63/4,07
5	2,27 <i>d</i> (13,6)	1,92/1,95
6	1,92/1,95 <i>m</i>	2,27/5,27
7	5,27 <i>sl</i> (1H)	1,92/1,95
9	2,40/2,48 <i>m</i>	1,82/1,89
11	1,82/1,89 <i>m</i>	1,76/2,40
12	1,76 <i>m</i>	1,82/1,89
15	5,39/5,40 <i>dl</i> (14,0)	-
16	2,52 <i>m</i>	2,80
17	2,80 <i>m</i>	2,52
19	4,41/4,48 <i>m</i> (2H)	-
21	6,01/6,17 <i>sl</i> (1H)	-
22	6,95 <i>s</i> (1H)	-
18-CH ₃	1,04 <i>s</i> (3H)	-
28-CH ₃	1,25 <i>s</i> (3H)	-
29-CH ₃	1,12 <i>s</i> (3H)	-
30-CH ₃	1,05 <i>s</i> (3H)	-
7-OCOCH ₃	2,00 <i>s</i> (3H)	-

OBS: Dados de RMN de ^1H (δ , mult., $J(\text{Hz})$) (integração) (CDCl_3 , 400 MHz).

TABELA 4.23: Dados de RMN de ^{13}C da substância XX (7-acetil-21-hidroxi-23-oxotecleanino).

Carbono	7-acetil-21-hidroxi-23-oxotecleanino isolado
1	79,7
2	35,7
3	168,4
4	80,7
5	53,6
6	21,1
7	74,3
8	43,3
9	41,7
10	45,5
11	18,7
12	32,5/32,6
13	47,3
14	156,5/156,8
15	119,9/120,4
16	33,6/33,8
17	50,5
18	20,7
19	65,8
20	137,9
21	96,5/98,4
22	145,6/145,8
23	170,0/170,5
28	30,3
29	21,4/21,5
30	27,5
7-OCOCH ₃	169,7 e 21,1

OBS: Dados de RMN de ^{13}C (δ) (CDCl_3 , 100 MHz).

TABELA 4.24: Dados de HSQC e HMBC da substância XX (7-acetil-21-hidroxi-23-oxotecleanino).

Carbono	δ_c	HSQC	HMBC
1	79,7	4,07	4,41/4,48
2	35,7	2,63/2,93	-
3	168,4	-	2,63/2,93/4,07
4	80,7	-	1,12/1,25/2,27
5	53,6	2,27	1,12/1,25/1,92/1,95/4,41/4,48/5,27
6	21,1	1,92/1,95	-
7	74,3	5,27	1,05
8	43,3	-	1,05/2,40/2,48
9	41,7	2,40/2,48	1,05/1,76/4,41/4,48/5,27
10	45,5	-	2,27;2,40/2,48/2,63/2,93/4,41/4,48
11	18,7	1,82/1,89	2,40/2,48
12	32,5/32,6	1,76	-
13	47,3	-	5,39/5,40
14	156,5/156,8	-	1,04/1,05
15	119,9/120,4	5,39/5,40	2,52
16	33,6/33,8	2,52	5,39/5,40
17	50,5	2,80	5,39/5,40
18	20,7	1,04	-
19	65,8	4,11/4,48	2,27/2,40/2,48
20	137,9	-	6,95
21	96,5/98,4	6,01/6,17	6,95
22	145,6/145,8	6,95	-
23	170,0/170,5	-	6,01/6,17/6,95
28	30,3	1,25	1,12/2,27
29	21,4/21,5	1,12	1,25/2,27
30	27,5	1,05	2,40/2,48/5,27
7-OCOCH ₃	169,7 e 21,1	2,00	5,27

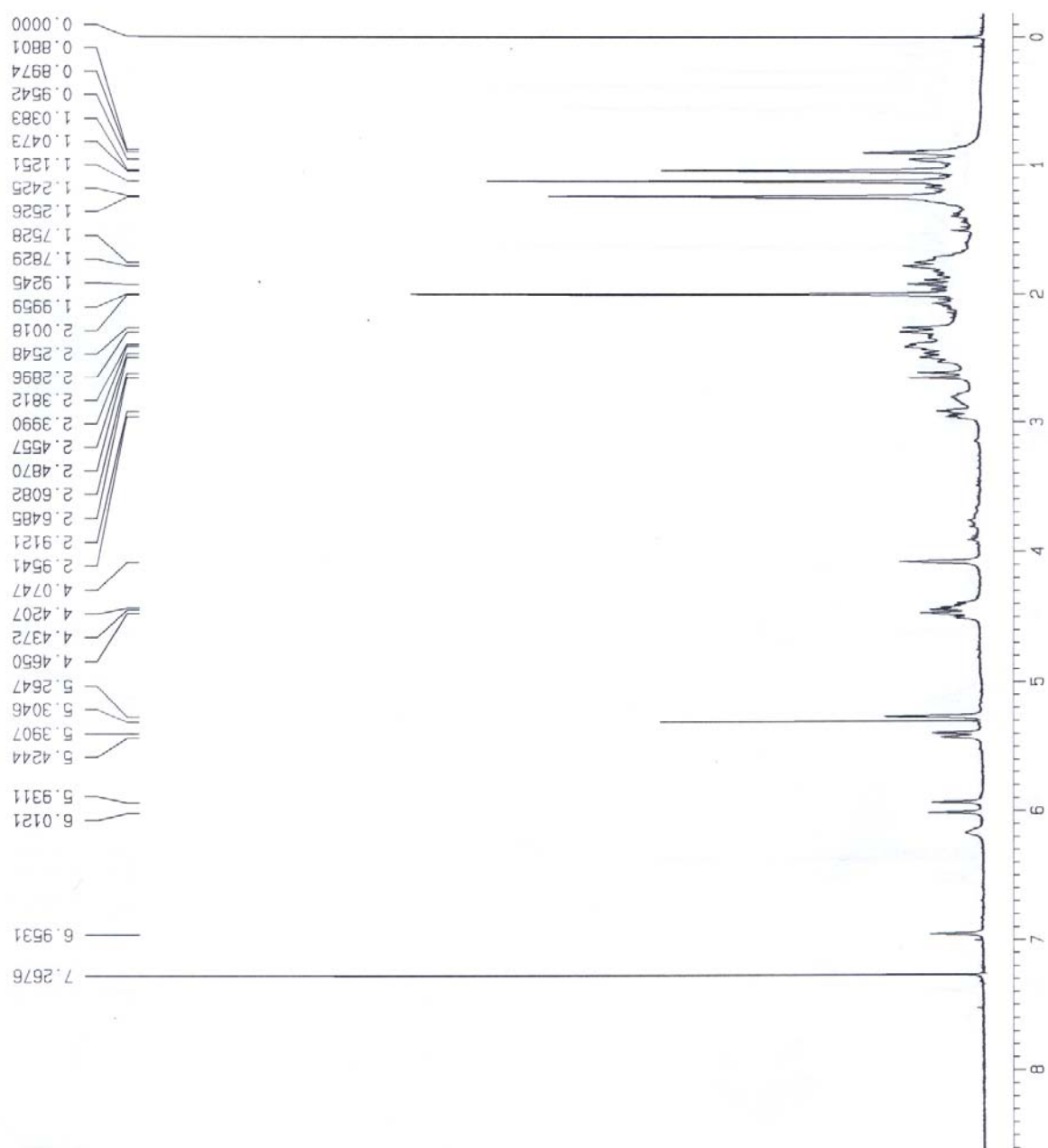


FIGURA 4.70: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da Substância XX (7-acetil-21-hidroxi-23-oxotectleanino).

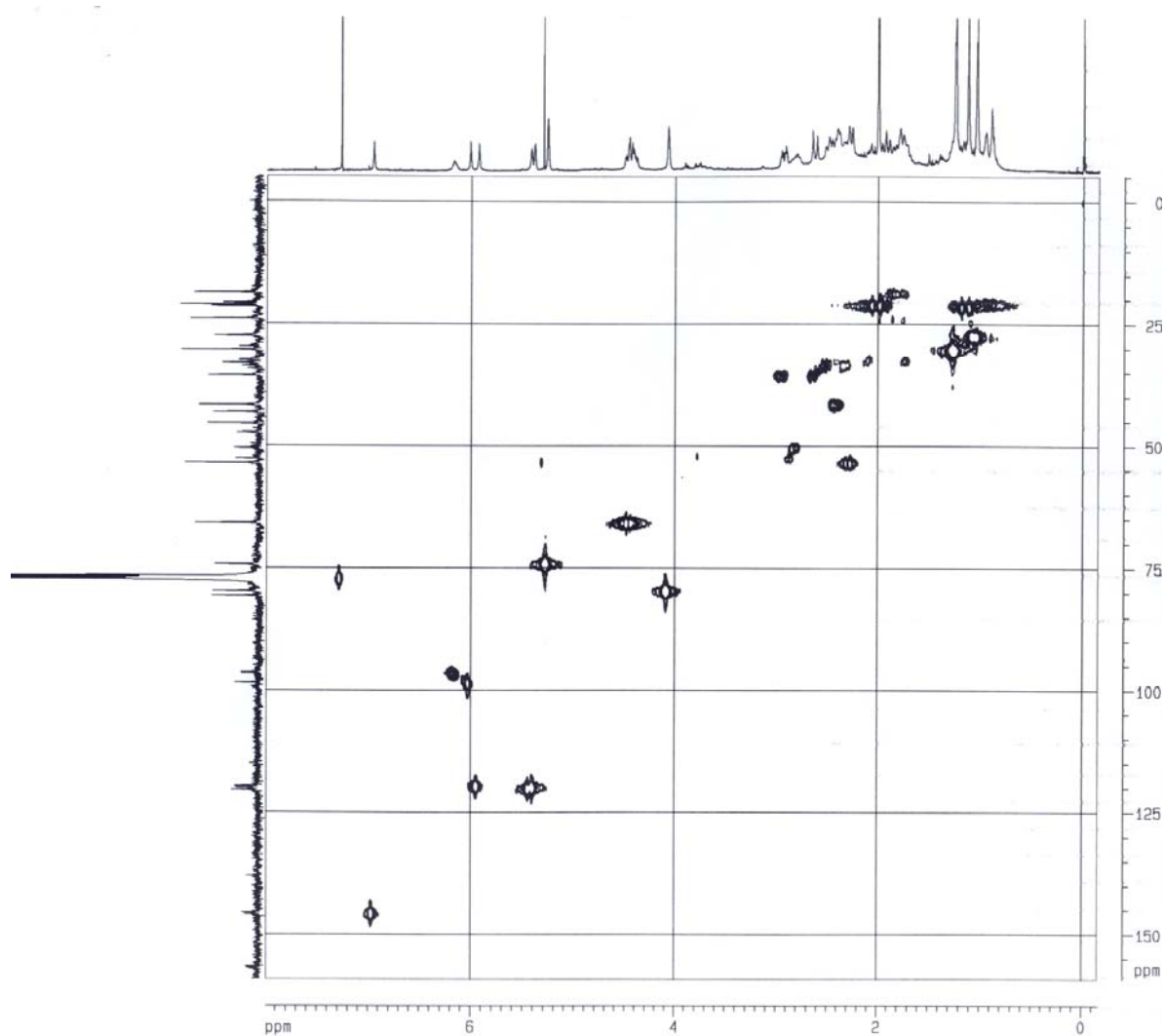


FIGURA 4.71: Experimento de HSQC (400MHz, CDCl_3) da Substância XX (7-acetil-21-hidroxi-23-oxotectanino).

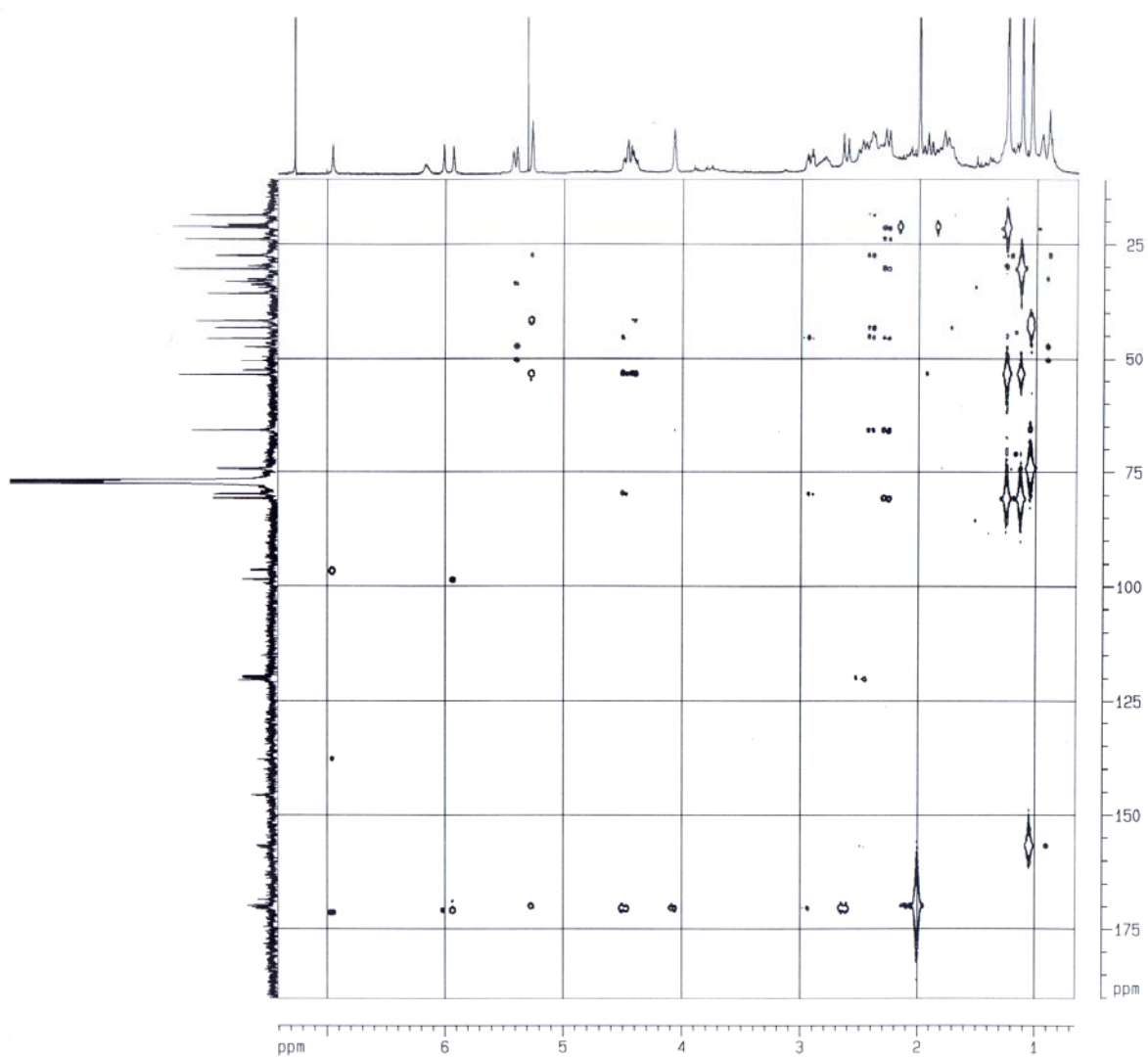


FIGURA 4.72: Experimento de HMBC (400MHz, CDCl_3) da Substância XX (7-acetil-21-hidroxi-23-oxotectleanino).

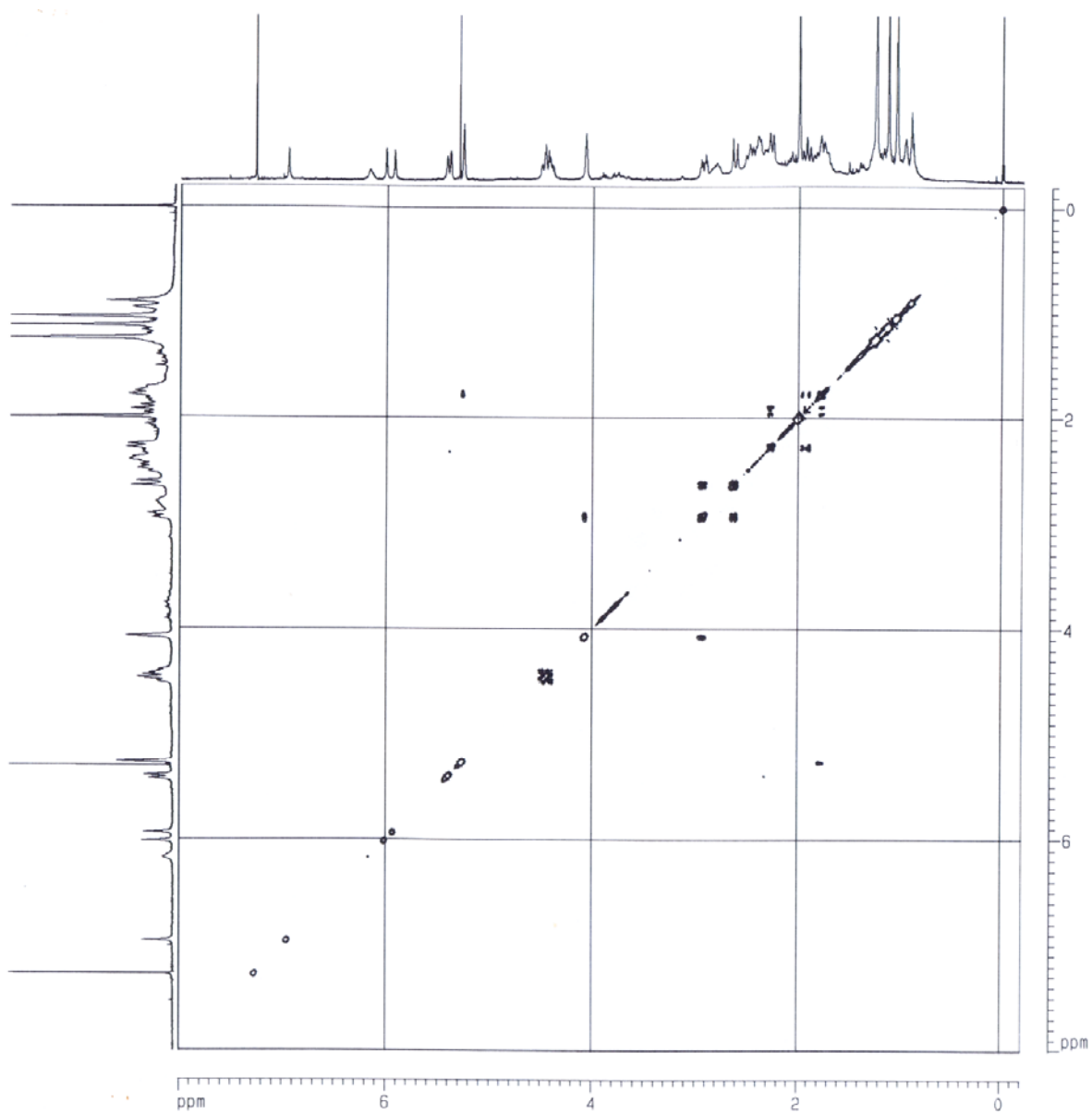


FIGURA 4.73: Experimento de COSY (400MHz, CDCl_3) da Substância XX (7-acetil-21-hidroxi-23-oxotectleanino).

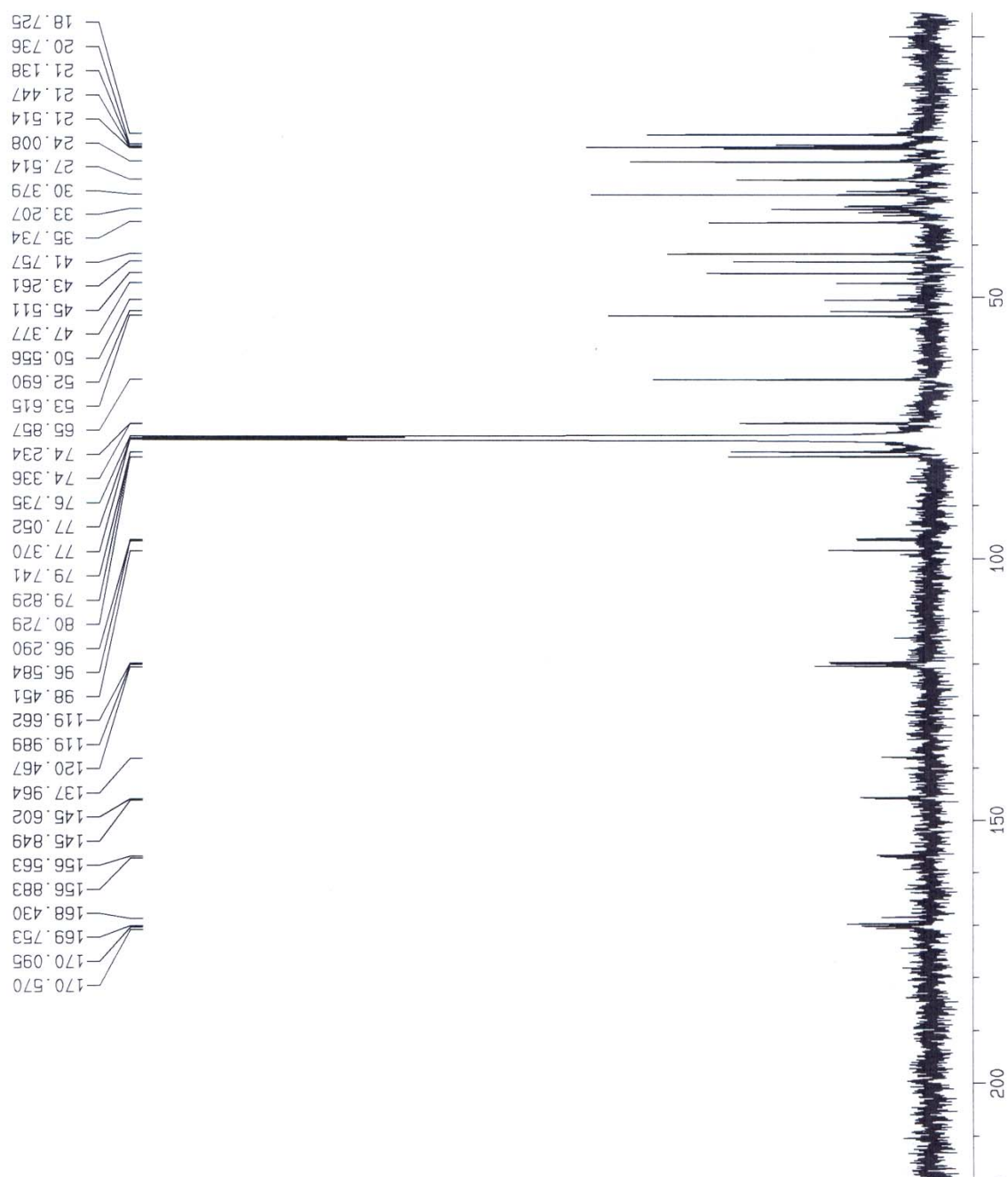


FIGURA 4.74: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da Substância XX (7-acetil-21-hidroxi-23-oxotectleanino).

5 – CONCLUSÕES

O estudo fitoquímico do caule de *Citrus limonia* enxertado com *C. sinensis* resultou no isolamento e identificação de nove substâncias, entre elas oito conhecidas que são as cumarinas Suberosina, Xantiletina, Seselina, Tamarina e Crenulatina, a flavona Limonianina, a flavanona Lupinifolina e o alcalóide 5-Hidroxinoracrinicina e ainda uma substância inédita na literatura a flavanona 5,4'-dihidroxi-6-(3''-metil-2''-butenil)-2'',2''-dimetilpirano-(5'',6''-7,8)flavanona.

Dentre as substâncias isoladas do porta-enxerto, as cumarinas Seselina e Crenulatina mostraram-se mais promissoras frente ao fungo *Guignardia citricarpa* com inibição na germinação de picnidiósporos e formação de apressórios de 98,5 e 99,25 %, respectivamente, seguidas pelo flavonóide Limonianina com 83 % e a 5-Hidroxinoracrinicina com 79 %.

O estudo biossintético com enfoque na determinação da atividade da enzima preniltransferase mostrou atividade da mesma nas raízes de plantas enxertadas de *C. sinensis* sobre *C. limonia*, com a formação das piranocumarinas Xantiletina, Seselina e Suberosina a partir do DMAPP, com os precursores Umbeliferona e Herniarina e com cofator $MgCl_2$. A análise circadiana apresentou atividade mais expressiva às 23:00 e 6:00h, apresentando na reação enzimática com a Umbeliferona, às 23:00h, formação de 2,40, 1,15 e 0,71 μ g/mL de Xantiletina, Seselina e Suberosina, respectivamente, e com a Herniarina no mesmo horário, 2,71, 1,53 e 0,78 μ g/mL dos mesmos produtos.

A avaliação da atividade da enzima preniltransferase nas raízes, caule inferior e superior e folhas do enxerto de *C. sinensis* sobre *C. limonia* apresentou formação das piranocumarinas apenas nas raízes, concluindo-se que se há atividade da enzima apenas neste último órgão. Estes dados

permitem sugerir que a piranocumarina Xantiletina está sendo metabolizada na parte inferior do enxerto e translocada até as folhas.

O experimento com o IPP-¹⁴C mostrou que houve absorção do mesmo pela planta enxertada (*C. sinensis* sobre *C. limonia*), porém esta não o metabolizou para formação das piranocumarinas, necessitando de estudos mais aprofundados que visem conseguir a deslocalização do precursor até o sítio de metabolização específica das cumarinas.

O estudo fitoquímico da espécie *Nycticalanthus speciosus*, resultou no isolamento e identificação de onze substâncias, entre elas sete conhecidas, os alcalóides Dictamina, γ -Fagarina, Esquimianina, 1-Metil-4-metoxi-2-quinolona, N-Metilflindersina e Rutaecarpina, e a cumarina Seselina. Entre as substâncias inéditas isoladas temos um alcalóide, a 8,8a-seco-8-carboxi-14-N-metilrutaecarpina e três limonóides: o 2-hidroxi-epiisobacunoato de metila, o 2,21-dihidroxi-23-oxoepiisobacunoato de metila e o 7-acetil-21-hidroxi-23-oxotecleanino.

Os resultados fitoquímicos da espécie *Nycticalanthus speciosus*, mostraram que a presença de alcalóides dos tipos furoquinolínico, 2-quinolínico e indolopiridoquinazolínico, piranocumarina e limonóides que são comuns na família Rutaceae, confirmam o correto posicionamento da espécie nesta família.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILAR-VILDOSO, C. I.; RIBEIRO, J. G. B.; FEICHTENBERGER, E.; GÓES, A. de; SPÓSITO, M. B. *Manual Técnico de Procedimentos da Mancha Preta dos Citros*. Brasília: MAPA/DAS/DDIV, 2002.
- AGRAWAL, P. K. *Carbon-13 NMR of Flavonoids*. Amsterdam, Elsevier, 1989.
- AHOND, A.; POUPAT, C.; POTIER, P. Carbon-13 NMR study of 9(10H)-acridinone and 6H-pyrido[4,3-b]carbazole alkaloids. *Tetrahedron*, v. 34, n. 15, p. 2385-2388, 1978.
- ARAÚJO, E. F., ROQUE, N. In: MATTOS JÚNIOR, D.; NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JÚNIOR, J. *Citros*. Cordeirópolis, Centro APTA Citros Sylvio Moreira, 2005, p. 126 – 143.
- AUSTIN, D. J.; MEYERS, M. B. Glucoside Intermediates in Umbelliferone Synthesis. *Phytochemistry*, v. 4, n. 2, p. 255-262, 1965.
- BANERJI, A.; LUTHRIA, D. L.; PRABHU, B. R. Prenylated Compounds from *Atalantia racemosa*: Isolation and synthesis of two pyranoflavones. *Phytochemistry*, v. 27, n. 11, p. 3637-3640, 1988.
- BERGAMO, D. C. B. *Avaliação Química dos Componentes Não Voláteis e Voláteis e Estudo Biossintético do 4-Nerolidilcatecol em Potomorphe Umbellata (Piperaceae)*. Araraquara, UNESP, 2003. Tese de doutorado.
- BERNARD, A. *Methods in Enzymology: Preparation and Assay of Enzymes*. v. 1, New York, Academic Press, 1955.
- BLANCO, C. G. *Guignardia citricarpa Kiely: genética, cariotípica e interação com o hospedeiro*. Piracicaba, Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz”, USP, 1999. Tese de Doutorado.
- BOWEN, I. H.; PERERA, K. P. W. C. Alkaloids, Coumarins and Flavonoids of *Micromelum zeylanicum*. *Phytochemistry*, v. 21, n. 2, p. 433-437, 1982.
- BRADFORD, M. M. A. Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248, 1976.

- BURKE, B. A.; PARKINS, H. Coumarins from *Amyris balsamifera*. *Phytochemistry*, v. 18, p. 1073-1075, 1979.
- CARDOSO FILHO, J. A. *Efeito de Extratos de Albedo de Laranja (Citrus sinensis) Indutores de Resistência Ácido Salicílico, Acilbenzolar-S-meil e Saccharomyces cerevisiae no controle de Phyllosticta citricarpa (telemorfo: Guignardia citricarpa)*. 2003. Tese (Doutorado em Agronomia) – USP, Piracicaba, 2003.
- CHAKRAVARTY, A. K. ; SARKAR, T.; MASUDA, K.; SHIOJIMA, K. Carbazole Alkaloids from Roots of *Glycosmis arborea*. *Phytochemistry*, v. 50, p. 1263-1266, 1999.
- CHANG, S. H. Flavonoids, Coumarins and Acridone Alkaloids from the Root Bank of *Citrus limonia*. *Phytochemistry*, v. 29, n. 1, p. 351-353, 1990.
- CORSINO, J.; CARVALHO, P. R. F.; KATO, M. J.; LATORRE, L. R.; OLIVEIRA, O. M. M. F.; ARAÚJO, A. R.; BOLZANI, V. S.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, A. M.; FURLAN, M. Biosynthesis of Friedeline and Quinonemethide Triterpenoids is Compartmentalized in *Maytenus aquifolium* and *Salacia campestris*. *Phytochemistry*, v. 55, p. 741-748, 2000.
- CUCA, L. E.; MARTÍNEZ, J. C.; MONACHE, F. D. Alcaloides Presentes en *Hortia colombiana*. *Revista Colombiana de Química*, v. 27, n. 1, 1998.
- DIXON, M.; WEBB, E. C. *Enzymes*, 2. ed. New York, Academic Press, 1964.
- EISENTHAL, R.; DANSON, M. J. *Enzyme Assays: A practical Approach*. New York, Irl Press, 1992.
- ENGLARD, S.; SEIFTER, S. *Methods in Enzymology: Guide to Protein Purification*. v. 182. San Diego, Academic Press, 1990.
- ENGLER, A. Rutaceae, Simaroubaceae, Burseraceae. In: ENGLER, A. *Die Natürlichen Pflanzenfamilien*. 2. ed. Leipzig, Wilhelm Engelmann, p.187-456, 1931.
- FRASER, A. W.; LEWIS, J. R. Rutaceous Constituents. Part II. Two Acridone Alkaloids from *Atalantia ceylanica* (Rutaceae). *Journal Chemical Society Perkin I*. p. 1173-1175, 1973.
- FUNDECITRUS, 2006. Disponível em: www.fundecitrus.com.br/doencas/pinta_preta.html. Acesso em: 10 jan. 2006.

- GARCIA, C. F. *Estudo Comparativo de Pré-Francos e Enxertos do Gênero Citrus: correlação entre seus metabólitos e o processo de enxertia*. São Carlos, Programa de Pós-graduação em Química — UFSCar, 2005. Tese de doutorado.
- GLIENKE, C. *Variabilidade Genética do Fungo Endofítico Guignardia citricarpa Kiely Detectada POR RAPD*. Curitiba, Universidade Federal do Paraná, 1995. Dissertação de Mestrado.
- GOES, A. de. Controle da Mancha-Preta dos Frutos Cítricos. *Laranja*, v. 19, n. 2, p. 305-320. 1998.
- GONZALEZ, A. G.; REYER, R. E.; ESPINO, M. R. Two New Coumarins from *Ruta Pinnata*. *Phytochemistry*, v. 16, p. 2033-2035, 1977
- GOREN, R.; STANLEY, W. L.. Isolation and Identification of Xanthyletin in *Citrus roots*. *Phytochemistry* v. 9, n. 9, p. 2069, 1970.
- GRAY, A I.; WATERMAN, P. G. Coumarins in the Rutaceae. *Phytochemistry*, v. 17, p. 845-864, 1978
- GRUNDON, M. F.; MCCOLL, I. S. Stereochemical Aspects of the Biological Oxidation of Aryl isoprenoids. Asymmetric Synthesis and Absolute Configuration of Meranzin and of Meranzin Hydrate. *Phytochemistry*, v. 14, n. 1, p. 143-150, 1975.
- HAMERSKI, D., SCHMITT, D.; MATERN, U. Induction of Two Prenyltransferases for the Accumulation of Coumarin Phytoalexins in Elicitor-treated *Ammi majus* Cell Suspension Cultures. *Phytochemistry*, v. 29, n. 4, p. 1131-1135, 1990.
- IKUTA, A.; NAKAMURA, T.; URABE, H. Indolopyridoquinazoline, Furoquinoline and Canthinone Type Alkaloids from *Phellodendron amurense* Callus Tissues. *Phytochemistry*, v. 48, n. 2, p. 285-291, 1998.
- ITO, C.; KONDO, Y.; WU, T. S.; FURUKAWA, H. Chemical constituents of *Glycosmis citrifolia* (Willd.) Lindl. Structures of four new acridones and three new quinolone alkaloids. *Chemical & pharmaceutical bulletin*, v. 48, n. 1, p. 65-70, 2000.
- KOTZÉ, J. M. History and Epidemiology of *Citrus black Spot* in South Africa. *Proceedings of International Society of Citriculture*. V. 2, p. 1296-1299, 1996.

- LARANJEIRA, F. F. et al. Fungos, procaristas e doenças abióticas. In: MATTOS JÚNIOR, D.; NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JÚNIOR, J. *Citros*. Cordeirópolis, Centro APTA Citros Sylvio Moreira, 2005, p. 510 – 517.
- LEITE, B.; NICHOLSON, R. L. Mycosporine-alanine: a self-inhibitor of germination from the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. *Experimental Mycology*, v.16, p. 76-86, 1992.
- MABBERLEY, D. J. A Classification of Edible *Citrus* (Rutaceae). In: MATTOS JÚNIOR, D.; NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JÚNIOR, J. *Citros*. Cordeirópolis, Centro APTA Citros Sylvio Moreira, 2005
- MAFEZOLI, J. *Atividade tripanocida e antimicrobiana de plantas da família Rutaceae*. São Carlos, UFSCar, 2001. Tese de doutorado.
- MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, J. *Citros*. Cordeirópolis, Centro APTA Citros Sylvio Moreira, 2005.
- MÁXIMO, P.; LOURENÇO, A.; FEIO, S. S.; ROSEIRO, J. C. Flavonoids from *Ulex airensis* and *Ulex europaeus* ssp. *europaeus*. *Journal Natural Products*. v. 65, p. 1975-1978, 2002.
- MCONIE, K.C. Source of Inoculum of *Guignardia citricarpa*, the Citrus Black Spot Pathogen. *Phytopathology*. n. 54, p. 64-67, 1964.
- MCONIE, K.C. Germination and Infection of Ascospores of *Guignardia citricarpa* in Relation to Control of Black Spot. *Phytopathology*. n. 57 p. 743-746, 1967.
- MORANDIM, A. A. *Estudo químico, biológico e biossintético em Piper aduncum L.* Araraquara, UNESP, 2004. Tese de doutorado.
- NAYAR, M. N. S.; BHAN, M. K. Coumarins and Other Constituents of *Hesperethusa crenulata*. *Phytochemistry*, v. 11, p. 3331-3333, 1972.
- NIELSEN, B. E. *Coumarins of Umbelliferous Plants*. Copenhagen, School of Pharmacy, 1970.
- PIRANI, J. R. Flora da Reserve Ducke, Amazomas, Brasil: Rutaceae. *Rodriguésia*. v. 56, n. 86, p. 189-204, 2005.

- PLACERES NETO, A. *Busca de compostos anthichagasicos e leishmanicidas, através do estudo de espécies das famílias Myrsinaceae e Rutaceae, e o isolamento e a quantificação de azadirachtina em sementes de Azadirachta indica*. 2004. Tese. (Doutorado em Química Orgânica) — UFSCar, São Carlos: 2004.
- POMPEU JUNIOR, J. Rootstocks and scions in the citriculture of the São Paulo State. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF CITRUS NURSERYMEN, 6., 2001, Ribeirão Preto. *Proceedings*. Bebedouro: Estação Experimental de Citricultura, p.75-82, 2001.
- POMPEU JUNIOR, J. Porta-enxerto. In: MATTOS JÚNIOR, D.; NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JÚNIOR, J. *Citros*. Cordeirópolis, Centro APTA Citros Sylvio Moreira, 2005, p. 63 - 93
- PUSSET, J.; LOPEZ, L. L.; PAIS, M. Isolation and 2D NMR studies of alkaloids from *Comptonella sessifolia*. *Planta Médica*, v. 57, p. 153-155, 1991.
- ROCHA, W. C. *Busca de Substâncias Bioativas em Plantas Amazônicas: Adiscanthus fusciflorus (Rutaceae), Trichilia pallida e T. rubra (Meliaceae)*. São Carlos, UFSCar, 2004. Tese de doutorado.
- RODRIGUEZ, O; VIEGAS, F.; POMPEU JUNIOR, J.; AMARO, A. *Citricultura brasileira*. 2. ed. Campinas: Fundação Cargill, 1991.
- ROYER, G. P. *Fundamentals of Enzymology: Rate Enhancement, specificity, control and applications*, New York, John Wiley and Sons Inc., 1982.
- SCHOL, H. Reihe Rutales, reihe Sapindales. In: ENGLER, A. *Syllabus der Pflanzenfamilien: mit besonderer Berücksichtigung der Nutzpflanzen nebst einer übersicht über die Florenreiche und Florengebiete der Erde*, Berlin: Gebrüder Borntraeger, 1964.
- SILVA, M. F. G. F. da; GOTTLIEB, O. R.; EHRENDORFER, F. Chemosystematics of Rutaceae: suggestions for a more natural taxonomy and evolutionary interpretation of the family. *Plant Systematics and Evolution*, v.161, n. 3-4, p. 97-134. 1988.
- SMALBERGER, T. M., et. al. Flavonoids from Tephrosia-VII. *Tetrahedron*. v. 30, p. 3927-3931, 1974.

- STEVENS, P. F. Ordem Sapindales, 2006. Disponível em: www.mobot.org/MOBOT/Research/curators/stevens.shtml. Acesso em 25 fev. 2006.
- SWINGLE, W. T.; REECE, P. C. The botany of Citrus and its wild relatives. In: MATTOS JÚNIOR, D.; NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JÚNIOR, J. *Citros*. Cordeirópolis, Centro APTA Citros Sylvio Moreira, 2005
- TAKEMURA, Y.; KAWAGUCHI, H.; MAKI, S.; JU-ICHI, M.; OMURA, M.; ITO, C.; FURUKAWA, H. Constituents of domestic *Citrus* plants. Part XXVI. Studies on the constituents of Yalaha. Structures of a new acridone alkaloid and two new coumarins. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v. 44, n. 4, p. 804-809, 1996.
- TANAKA, T. Citrologia (Semi-centennial commemoration papers on *Citrus* studies). In: MATTOS JÚNIOR, D.; NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JÚNIOR, J. *Citros*. Cordeirópolis, Centro APTA Citros Sylvio Moreira, 2005
- TATUM, J. H.; BERRY, R. E. 6,7-Dimethoxycoumarin in the peels of *Citrus*. *Phytochemistry*, v. 16, n. 7, p. 1091-1092, 1977.
- TOIT, E.A., RAUTENBACH, M. A sensitive standardised micro-gel well diffusion assay for the determination of antimicrobial activity. *Journal of Microbiological Methods*. n. 42, p. 159–165, 2000.
- ZUURBIER, K. W. M.; FUNG, S. Y.; SCHEFFER, J. J. C.; VERPOORTE, R.; *In-vitro* prenylation of aromatic intermediates in the biosynthesis of bitter acids in *Humulus lupulus*. *Phytochemistry*, v. 49, n. 8, p. 2315-2322, 1998.
- WATERMAN, P. G. Alkaloids of the Rutaceae. Distribution and systematic significance. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 3, n. 3, p. 149-180, 1975.
- WATERMAN, P. G.; GRUNDON, M. F. *Chemistry and Chemical Taxonomy of The Rutales*. London, Academic Press, 1983.
- WU, T.; KUOH, C.; FURUKAWA, H. Acridone Alkaloids. VI. The constituents of *Citrus depressa*. Isolation and Structure Elucidation Alkaloids from Citrus Genus. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, v. 31, n.3, p. 895-900, 1983.

WU, T.; KUOH, C.; FURUKAWA. Acridone alkaloids. VII. Constituents of *Citrus sinensis* Osbeck var. *brasiliensis* Tanaka. Isolation and Characterization of Three new acridone alkaloids and a new coumarin. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, v. 31, n. 3, p. 901-906, 1983a.