

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

**“ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
ANTIMICROBIANO DE ESPÉCIES DE *HORTIA* (RUTACEAE):
H. OREADICA, *H. BRASILIANA* E *H. SUPERBA*”**

VANESSA GISELE PASQUALOTTO SEVERINO *

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Química como parte dos
requisitos para obtenção do título
de MESTRE EM QUÍMICA, na
área de concentração QUÍMICA
ORGÂNICA.

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

*Bolsista: FAPESP

São Carlos-SP
2008

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

S498ef

Severino, Vanessa Gisele Pasqualotto.

Estudo fitoquímico e avaliação do potencial antimicrobiano de espécies de *Hortia* (Rutaceae) : *H. oreadica*, *H. brasiliana* e *H. superba* / Vanessa Gisele Pasqualotto Severino. -- São Carlos : UFSCar, 2008. 191 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2008.

1. Produtos naturais. 2. Fitoquímica. 3. Atividade biológica. 4. Substâncias químicas. 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 Mestrado

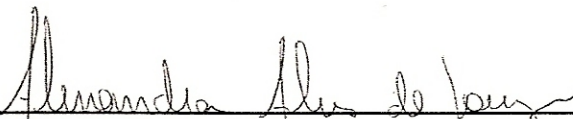
*Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de dissertação de mestrado da candidata **Vanessa Gisele Pasqualotto Severino** realizado em 29 de fevereiro de 2008:*



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



Prof. Dr. Luciano Morais Lião



Prof. Dra. Alessandra Alves de Souza

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACN	acetonitrila
AcOEt	acetato de etila
BOD	biological oxygen demand
CC	cromatografia em coluna
CCDA	cromatografia em camada delgada analítica
CCDP	cromatografia em camada delgada preparativa
CDCl_3	clorofórmio deuterado
CG-EM	cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
APCI	atmospheric pressure chemical ionization
CIM	concentração inibitória mínima
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
COSY	correlation spectroscopy
CVC	clorose variegada dos citros
<i>dd</i>	duplo dubleto
<i>ddd</i>	duplo duplo dubleto
DEPT	distortionless enhancement by polarization transfer
Dicl.	diclorometano
DMSO	dimetilsulfóxido
ED	extrato diclorometano
EH	extrato hexânico
EM	extrato metanólico
EMA	extrato hidrometanólico
EtOH	etanol
Fundecitrus	fundo de defesa da citricultura
<i>h</i>	altura da sílica na coluna
Hex.	hexano
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation
HSCCC	high speed countercurrent chromatography
HSQC	heteronuclear single quantum coherence
Hz	hertz
IAC	instituto agrônomo de Campinas
<i>J</i>	constante de acoplamento
<i>m</i>	múltiplo
<i>m/z</i>	relação massa/carga
MeOH	metanol
MHz	mega-hertz
NOE	nuclear Overhauser effect
OD	optics density
RMN ^{13}C	ressonância magnética nuclear de carbono -13
RMN ^1H	ressonância magnética nuclear de hidrogênio
rpm	rotações por minuto
<i>s</i>	singleto
SAM	adenosil metionina
<i>s/</i>	singleto largo
<i>t</i>	tripleto
δ	deslocamento químico
UV	ultravioleta
Φ	diâmetro

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1. Bactérias predominantes na placa bacteriana.....	12
TABELA 3.1. Massas obtidas de material vegetal e extratos.....	25
TABELA 3.2. Dados de RMN de ¹ H e de ¹³ C de 01 e comparação com a literatura	40
TABELA 3.3. Dados de RMN de ¹ H e de ¹³ C de 02 e comparação com a literatura	46
TABELA 3.4. Dados de RMN de ¹ H e de ¹³ C de 03 e comparação com a literatura	51
TABELA 3.5. Dados de RMN de ¹ H de 04 e comparação com a literatura.....	56
TABELA 3.6. Dados de RMN de ¹ H e de ¹³ C de 05 e comparação com a literatura	61
TABELA 3.7. Dados de RMN de ¹ H e de ¹³ C de 06 e comparação com a literatura	67
TABELA 3.8. Dados de RMN de ¹ H e de ¹³ C de 07 e comparação com a literatura	72
TABELA 3.9. Dados de RMN de ¹ H, ¹³ C e de HMBC de 08.....	79
TABELA 3.10. Dados de RMN de ¹ H de 09 e comparação com a literatura....	87
TABELA 3.11. Dados de RMN de ¹³ C de 09 e comparação com a literatura..	88
TABELA 3.12. Dados de RMN de ¹ H e de ¹³ C de 10 e comparação com a literatura.....	95
TABELA 3.13. Dados de RMN de ¹ H e de ¹³ C de 11 e comparação com a literatura.....	102
TABELA 3.14. Dados de RMN de ¹ H e de ¹³ C de 12 e comparação com a literatura.....	106
TABELA 3.15. Dados de RMN de ¹ H de 13 e comparação com a literatura....	115
TABELA 3.16. Dados de RMN de ¹³ C de 13 e comparação com a literatura..	116
TABELA 3.17. Dados de RMN de ¹ H e de ¹³ C de 14 e comparação com a literatura.....	126
TABELA 3.18. Dados de RMN de ¹ H, ¹³ C e de HMBC de 15.....	135
TABELA 4.1. Reagentes e quantidades necessárias para preparar o meio PW.....	146
TABELA 4.2. Concentração ensaiada e volume retirado da solução estoque	152
TABELA 4.3. Proporções de DMSO:H ₂ O.....	153
TABELA 4.4. Colônias observadas nos controles negativos para as diferentes concentrações de substâncias ensaiadas.....	154
TABELA 4.5. Colônias observadas nas diferentes concentrações de substâncias ensaiadas frente <i>X. fastidiosa</i>	156
TABELA 4.6. CIM dos extratos ensaiados (µg/mL).....	165
TABELA 4.7. CIM dos derivados do ácido diidrocinâmico (µg/mL).....	166
TABELA 4.8. CIM dos limonóides (µg/mL).....	167
TABELA 4.9. CIM dos alcalóides (µg/mL).....	167
TABELA 4.10. CIM das substâncias quinolinônicas sintéticas (µg/mL).....	168
TABELA 4.11. CIM das substâncias ensaiadas frente à <i>V. cholerae</i> (µg/mL)	175
TABELA 4.12. CIM das substâncias ensaiadas frente à <i>S.choleraesuis</i> (µg/mL).....	175
TABELA 4.13. CIM das substâncias ensaiadas frente à <i>B.cereus</i> (µg/mL)....	175

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1. Sintomas típicos de CVC em folhas de laranja doce.....	06
FIGURA 1.2. Plantas com sintomas de CVC	07
FIGURA 1.3. Vasos do xilema obstruídos por células e células de <i>X. fastidiosa</i>	08
FIGURA 1.4. Zoneamento citrícola considerado no levantamento de CVC em 2005 no estado de São Paulo e parte do triângulo mineiro	09
FIGURA 1.5. Micrografia eletrônica de varredura de microrganismos compondo uma placa dental	12
FIGURA 1.6. Micrografia eletrônica de transmissão de <i>S. sobrinus</i> sobre a superfície dental	13
FIGURA 1.7. Fases de formação da placa	14
FIGURA 1.8. Colônias de <i>Salmonella</i>	17
FIGURA 1.9. Colônias de <i>Bacillus cereus</i>	17
FIGURA 3.1. Espécies de <i>Hortia</i> (<i>H. brasiliana</i> , <i>H. oreadica</i> e <i>H. superba</i>).....	24
FIGURA 3.2. Espectro de RMN de ^1H de 01 (CDCl_3 , 400 MHz)	41
FIGURA 3.3. Espectro de RMN de ^{13}C de 01 (CDCl_3 , 100 MHz)	41
FIGURA 3.4. Mapa de contorno de g-HSQC de 01 (CDCl_3 , 400 MHz)	42
FIGURA 3.5. Mapa de contorno de g-HMBC de 01 (CDCl_3 , 400 MHz)	42
FIGURA 3.6. Espectro de massas de 01 (IE-70 eV)	43
FIGURA 3.7. Espectro de RMN de ^1H de 02 (CDCl_3 , 400 MHz)	47
FIGURA 3.8. Espectro de RMN de ^{13}C de 02 (CDCl_3 , 100 MHz)	47
FIGURA 3.9. Mapa de contorno de g-HSQC de 02 (CDCl_3 , 400 MHz)	48
FIGURA 3.10. Mapa de contorno de g-HMBC de 02 (CDCl_3 , 400 MHz).....	48
FIGURA 3.11. Espectro de RMN de ^1H de 03 (CDCl_3 , 400 MHz)	52
FIGURA 3.12. Espectro de RMN de ^{13}C de 03 (CDCl_3 , 100 MHz)	52
FIGURA 3.13. Mapa de contorno de g-HMBC de 03 (CDCl_3 , 400 MHz)	53
FIGURA 3.14. Mapa de contorno de g-HSQC de 03 (CDCl_3 , 400 MHz)	53
FIGURA 3.15. Espectro de RMN de ^1H de 04 (CDCl_3 , 400 MHz)	57
FIGURA 3.16. Mapa de contorno de g-HMBC de 04 (CDCl_3 , 400 MHz)	57
FIGURA 3.17. Espectro de RMN de ^1H da mistura de 01 e 05 (CDCl_3 , 400 MHz)	62
FIGURA 3.18. Espectro de RMN de ^{13}C da mistura de 01 e 05 (CDCl_3 , 100 MHz)	62
FIGURA 3.19. Mapa de contorno de g-HSQC da mistura de 01 e 05 (CDCl_3 , 400 MHz)	63
FIGURA 3.20. Mapa de contorno de g-HMBC da mistura de 01 e 05 (CDCl_3 , 400 MHz)	64
FIGURA 3.21. Espectro de RMN de ^1H de 06 (CDCl_3 , 400 MHz)	68
FIGURA 3.22. Espectro de RMN de ^{13}C de 06 (CDCl_3 , 100 MHz)	68
FIGURA 3.23. Mapa de contorno de g-HSQC de 06 (CDCl_3 , 400 MHz)	69
FIGURA 3.24. Mapa de contorno de g-COSY de 06 (CDCl_3 , 400 MHz)	69
FIGURA 3.25. Mapa de contorno de g-HMBC de 06 (CDCl_3 , 400 MHz)	70
FIGURA 3.26. Espectro de RMN de ^1H da mistura 03 e 07 (CDCl_3 , 400 MHz)	73
FIGURA 3.27. Espectro de RMN de ^{13}C da mistura 03 e 07(CDCl_3 ,100 MHz)	73
FIGURA 3.28. Correlações observadas no HMBC para 08	76

FIGURA 3.29. Espectro de RMN de ^1H de 08 (CDCl_3 , 400 MHz)	80
FIGURA 3.30. Espectro de RMN de ^{13}C de 08 (CDCl_3 , 100 MHz)	80
FIGURA 3.31. Mapa de contorno de g-HSQC de 08 (CDCl_3 , 400 MHz)	81
FIGURA 3.32. Mapa de contorno de g-COSY de 08 (CDCl_3 , 400 MHz)	81
FIGURA 3.33. Mapa de contorno de g-HMBC de 08 (CDCl_3 , 400 MHz)	82
FIGURA 3.34. Espectro de massas de 08 (IE-70 eV)	82
FIGURA 3.35. Correlações observadas no HMBC para 09	86
FIGURA 3.36. Espectro de RMN de ^1H de 09 (CDCl_3 , 400 MHz)	89
FIGURA 3.37. Espectro de RMN de ^{13}C de 09 (CDCl_3 , 100 MHz)	89
FIGURA 3.38. Mapa de contorno de g-COSY (e ampliação) de 09 (CDCl_3 , 400 MHz)	90
FIGURA 3.39. Mapa de contorno de g-HSQC de 09 (CDCl_3 , 400 MHz)	91
FIGURA 3.40. Mapa de contorno de g-HMBC de 09 (CDCl_3 , 400 MHz)	91
FIGURA 3.41. Correlações observadas no HMBC para 10	93
FIGURA 3.42. Espectro de RMN de ^1H de 10 (CDCl_3 , 400 MHz)	96
FIGURA 3.43. Espectro de RMN de ^{13}C de 10 (CDCl_3 , 100 MHz)	96
FIGURA 3.44. Mapa de contorno de g-COSY de 10 (CDCl_3 , 400 MHz)	97
FIGURA 3.45. Mapa de contorno de g-HSQC de 10 (CDCl_3 , 400 MHz)	98
FIGURA 3.46. Mapa de contorno de g-HMBC de 10 (CDCl_3 , 400 MHz)	99
FIGURA 3.47. Espectro de massas de 10	100
FIGURA 3.48. Espectro de RMN de ^1H de 11 (CDCl_3 , 400 MHz)	103
FIGURA 3.49. Espectro de RMN de ^{13}C de 11 (CDCl_3 , 100 MHz)	103
FIGURA 3.50. Mapa de contorno de g-HSQC de 11 (CDCl_3 , 400 MHz)	104
FIGURA 3.51. Mapa de contorno de g-HMBC de 11 (CDCl_3 , 400 MHz)	104
FIGURA 3.52. Espectro de RMN de ^1H de 12 (CDCl_3 , 400 MHz)	107
FIGURA 3.53. Espectro de RMN de ^{13}C de 12 (CDCl_3 , 100 MHz)	107
FIGURA 3.54. Correlações observadas no HMBC para 13	113
FIGURA 3.55. Espectro de RMN de ^1H de 13 (CDCl_3 , 400 MHz)	117
FIGURA 3.56. Espectro de RMN de ^{13}C de 13 (CDCl_3 , 100 MHz)	117
FIGURA 3.57. Mapa de contorno de g-HSQC de 13 (CDCl_3 , 400 MHz)	118
FIGURA 3.58. Mapa de contorno de g-HMBC de 13 (CDCl_3 , 400 MHz)	119
FIGURA 3.59. Espectro de g-COSY de 13 (CDCl_3 , 400 MHz)	120
FIGURA 3.60. Correlações observadas no HMBC para 14	122
FIGURA 3.61. Espectro de RMN de ^1H de 14 (CDCl_3 , 400 MHz)	127
FIGURA 3.62. Espectro de RMN de ^{13}C de 14 (CDCl_3 , 100 MHz)	127
FIGURA 3.63. Espectro de RMN de DEPT 135° de 14 (CDCl_3 , 400 MHz)	128
FIGURA 3.64. Mapa de contorno de g-HSQC de 14 (CDCl_3 , 400 MHz)	128
FIGURA 3.65. Mapa de contorno de g-HMBC de 14 (CDCl_3 , 400 MHz)	129
FIGURA 3.66. Mapa de contorno g-COSY de 14 (CDCl_3 , 400 MHz).....	129
FIGURA 3.67. Correlações observadas no HMBC para 15	133
FIGURA 3.68. Espectro de RMN de ^1H de 15 (CDCl_3 , 400 MHz)	136
FIGURA 3.69. Espectro de RMN de ^{13}C de 15 (CDCl_3 , 100 MHz)	136
FIGURA 3.70. Espectro de RMN de DEPT 135° de 15 (CDCl_3 , 400 MHz)..	137
FIGURA 3.71. Mapa de contorno de g-HSQC de 15 (CDCl_3 , 400 MHz)..	137
FIGURA 3.72. Mapa de contorno de g-HMBC de 15 (CDCl_3 , 400 MHz)	138
FIGURA 3.73. Espectro de g-COSY de 15 (CDCl_3 , 400 MHz)	138
FIGURA 4.1. Estruturas das substâncias ensaiadas	150

FIGURA 4.2. Eppendorfs com a solução de <i>X. fastidiosa</i> e as substâncias ensaiadas nas diferentes concentrações	153
FIGURA 4.3. Placas de Petri com substâncias ensaiadas	155
FIGURA 4.4. CIM das substâncias ensaiadas frente à <i>X. fastidiosa</i>	157
FIGURA 4.5. Estruturas das substâncias naturais ensaiadas	161
FIGURA 4.6. Estruturas das substâncias sintéticas ensaiadas	162
FIGURA 4.7. Metodologia do ensaio biológico	164
FIGURA 4.8. CIM das substâncias ensaiadas frente à patógenos bucais	169
FIGURA 4.9. Estruturas das substâncias ensaiadas frente à patógenos de origem alimentar	172
FIGURA 4.10. Microplaca após revelação com resazurina	174
FIGURA 4.11. CIM da lasiodiplodina, 2-metil-6-fluor-4-quinolona (S2), 2-metil-5,7-dimetoxi-4-quinolona (S4), 2-metil-7-hidroxi-4-quinolona (S6) frente à patógenos de origem alimentar	176

LISTA DE FLUXOGRAMA

FLUXOGRAMA 3.1. Preparação dos extratos das espécies de <i>Hortia</i>	25
FLUXOGRAMA 3.2. Fracionamento do extrato EHTSHB	26
FLUXOGRAMA 3.3. Resumo do fracionamento do subextrato EHTSHB(D)..	27
FLUXOGRAMA 3.4. Fracionamento do extrato EDTSHB	28
FLUXOGRAMA 3.5. Resumo do fracionamento do subextrato EDTSHB(A) e de sua fração 15-17	29
FLUXOGRAMA 3.6. Resumo do fracionamento do subextrato EDTSHB(A) e de suas frações 18-19 e 20	30
FLUXOGRAMA 3.7. Resumo do fracionamento do subextrato EDTSHB(A) e de suas frações 23 e 25-26	30
FLUXOGRAMA 3.8. Resumo do fracionamento do subextrato EDTSHB(A) e de sua fração 28-30	31
FLUXOGRAMA 3.9. Resumo do fracionamento do subextrato EDTSHB(A) e de sua fração 32-34	31
FLUXOGRAMA 3.10. Resumo do fracionamento do subextrato EDTSHB(A) e de sua fração 35-37	32
FLUXOGRAMA 3.11. Resumo do fracionamento do subextrato EDFHB e de suas frações 15-19, 23-26 e 31-34	33
FLUXOGRAMA 3.12. Resumo do fracionamento do subextrato EDFHA e de suas frações 10-14 e 24-26	34
FLUXOGRAMA 3.13. Particionamento do extrato EMTHS	35
FLUXOGRAMA 3.14. Resumo do fracionamento do extrato EMTHS-D e de suas frações 3-5, 6-7 e 11-14	36

LISTA DE ESQUEMAS

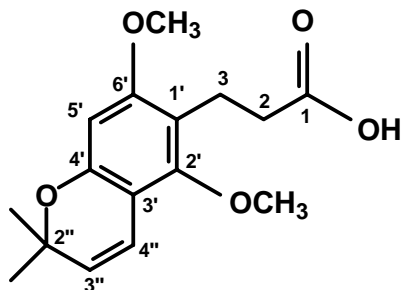
ESQUEMA 3.1. Proposta de fragmentação para 01.....	43
ESQUEMA 3.2. Proposta biogenética para os derivados do ácido diidrocinâmico	74
ESQUEMA 3.3. Proposta de fragmentação para 08	83
ESQUEMA 3.4. Proposta biogenética para 08.....	83
ESQUEMA 3.5. Proposta de fragmentação para 10	100
ESQUEMA 3.6. Proposta de fragmentação para os alcalóides indolopiridoquinazolínicos	108
ESQUEMA 3.7. Proposta biogenética para os alcalóides furoquinolínicos	109
ESQUEMA 3.8. Proposta biogenética para os alcalóides 2-quinolona	110
ESQUEMA 3.9. Biogênese dos limonóides.....	139
ESQUEMA 3.10. Proposta biogenética para 10.....	140
ESQUEMA 3.11. Proposta biogenética para 14.....	141
ESQUEMA 3.12. Proposta biogenética para 15.....	142

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1.1. Comparação da incidência de CVC no período de 1996 a 2005 no estado de São Paulo e parte do triângulo mineiro	10
--	----

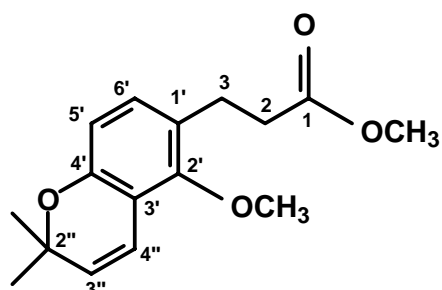
SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

Derivados do Ácido Diidrocinâmico:



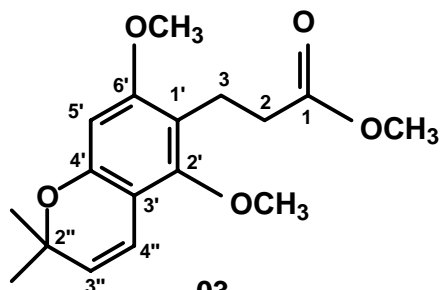
01

Procedência: *H. oreadica* (T. Subterrâneo)
H. brasiliiana (Folhas)
Isolamento: pgs 26, 29 e 34
Identificação: pgs 37 e 58



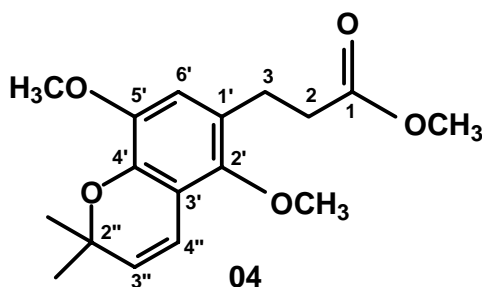
02

Procedência: *H. oreadica* (T. Subterrâneo)
H. brasiliiana (Folhas)
Isolamento: pgs 26 e 34
Identificação: pgs 44



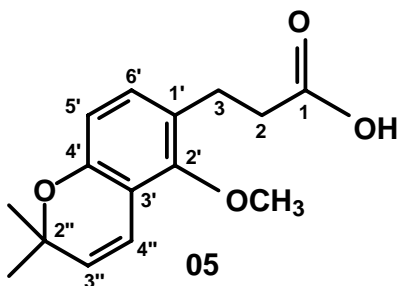
03

Procedência: *H. oreadica* (T. Subterrâneo e Folhas)
Isolamento: pgs 26, 28, 29 e 33
Identificação: pgs 49 e 72



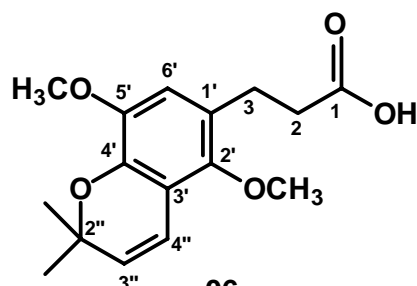
04

Procedência: *H. oreadica* (T. Subterrâneo)
H. brasiliiana (Folhas)
Isolamento: pgs 26, 28 e 34
Identificação: pg 54



05

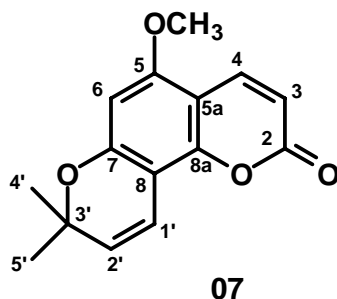
Procedência: *H. oreadica* (T. Subterrâneo)
Isolamento: pg 29 (em mistura com 01)
Identificação: pg 58



06

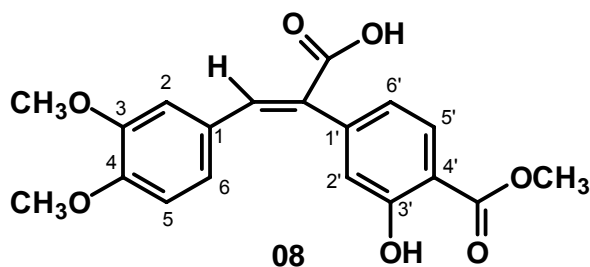
Procedência: *H. oreadica* (T. Subterrâneo)
Isolamento: pg 30
Identificação: pg 66

Cumarina:



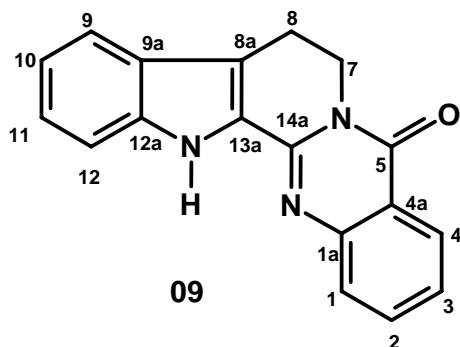
Procedência: *H. oreadica* (T. Subterrâneo)
Isolamento: pgs 26, 28 e 29 (em mistura com **03**)
Identificação: pg 72

Derivado do Ácido Cinâmico:

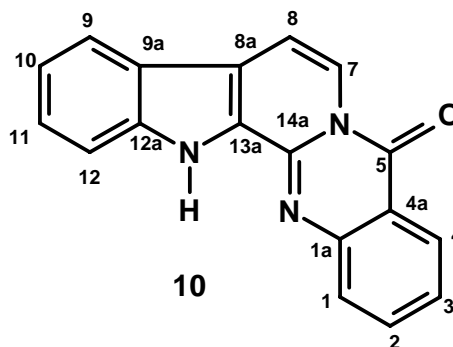


Procedência: *H. oreadica* (T. subterrâneo)
Isolamento: pg 31
Identificação: pg 77

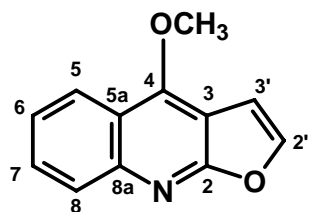
Alcalóides:



Procedência: *H. oreadica* (T. Sub. e Folhas)
H. brasiliiana (Folhas)
H. superba (Tronco)
Isolamento: pgs 29, 33, 34 e 36
Identificação: pg 86

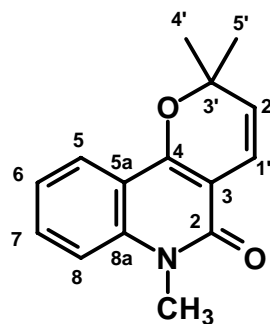


Procedência: *H. oreadica* (T. Subterrâneo)
Isolamento: pgs 28 e 29
Identificação: pg 94



11

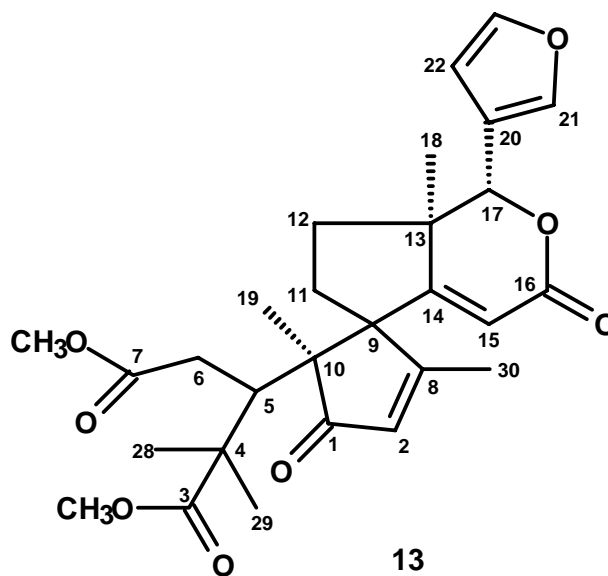
Procedência: *H. oreadica* (T.Sub. e Folhas)
H. superba (Tronco)
 Isolamento: pgs 29, 33 e 36
 Identificação: 103



12

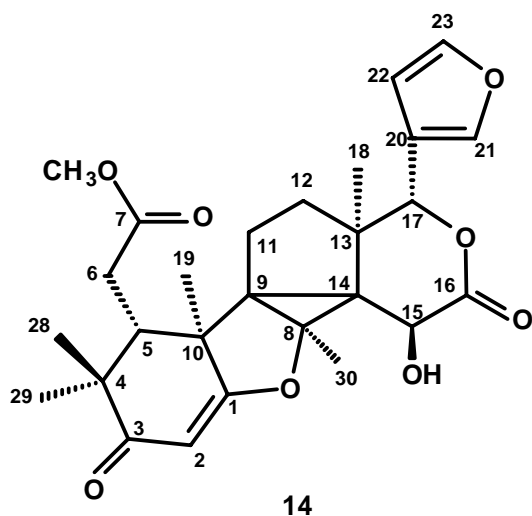
Procedência: *H. superba* (Tronco)
 Isolamento: pg 36
 Identificação: 107

Limonóides:



13

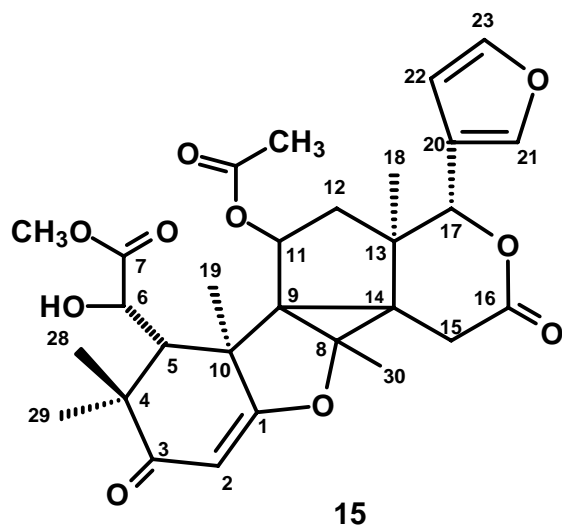
Procedência: *H. oreadica* (T.Sub. e Folhas)
 Isolamento: pgs 30 e 33
 Identificação: pg 113



Procedência: *H. oreadica* (T. Subterrâneo)
H. superba (Tronco)

Isolamento: pgs 31 e 36

Identificação: pg 123



Procedência: *H. oreadica* (T. Subterrâneo)

Isolamento: pg 31

Identificação: pg 132

RESUMO

ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE ESPÉCIES DE *HORTIA* (RUTACEAE): *H. OREADICA*, *H. BRASILIANA* E *H. SUPERBA* – O estudo fitoquímico de *Hortia* descrito neste trabalho visa contribuir com a quimiosistemática da família Rutaceae e também com a melhor classificação do gênero dentro da mesma. O estudo das espécies *H. oreadica*, *H. brasiliana* e *H. superba* levou ao isolamento de 15 substâncias, sendo, derivados do ácido diidrocinâmico ácido 3-fenil-[2',6'-dimetoxi-(3',4'-O:5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano]propionico (01), 3-fenil-[2'-metoxi-(3',4'-O:5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano]propionato de metila (02), 3-fenil-[2',6'-dimetoxi-(3',4'-O:5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano]propionato de metila (03), 3-fenil-[2',5'-dimetoxi-(3',4'-O:5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano]propionato de metila (04), ácido 3-fenil-[2'-metoxi-(3',4'-O:5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano]propionico (05), ácido 3-fenil-[2',5'-dimetoxi-(3',4'-O:5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano]propionico (06), sendo que a estrutura 06 parece ser nova para a espécie *H. oreadica*; a cumarina 5-metoxiseselina (07); o derivado do ácido cinâmico *E*-ácido 3,4-dimetoxi- α (3-hidroxi-4-carbometoxifenil)cinâmico (08), novo na literatura; os alcalóides rutaecarpina (09), 7,8-desidrorutaecarpina (10) inédita no gênero *Hortia*, dictamina (11) e N-metilflindersina (12) e os limonóides guianina (13), hortiolida E (14) e hortiolida G (15), dos quais a estrutura 14 está sendo descrita pela primeira vez na espécie *H. oreadica* e 15 na literatura. O estudo fitoquímico das espécies do gênero *Hortia* ainda não permite classificá-la corretamente dentro da família. *Hortia* apresenta limonóides com anéis C e D modificados, característicos de Meliaceae. No entanto a presença de metabólitos como alcalóides, cumarina, derivados do ácido diidrocinâmico e cinâmico vêm confirmar que *Hortia* pertence à família Rutaceae, embora não esteja claro seu exato posicionamento dentro da mesma. A presença de limonóides bastante modificados para *Hortia* poderia indicar que o gênero não pertença à Todallieae ou Cusparieae, podendo estar posicionado separadamente dentro da família Rutaceae. Vários ensaios biológicos foram realizados com os extratos e compostos isolados, com uma coleção de compostos sintéticos e a lasiodiplodina, composto isolado de um fungo patogênico. São relatadas as Concentrações Inibitórias Mínimas de diversas substâncias frente a bactéria causal da Clorose Variegada dos Citros, *Xylella fastidiosa*. As substâncias promissoras foram as

quinolinônicas sintéticas 2-metil-6-flúor-4-quinolona (S2) e 2-metil-5-metoxi-7-hidróxi-4-quinolona (S4) e o alcalóide rutaecarpina (09), com CIM entre 0,5 e 1,0 mg/mL. Foi realizado a investigação do potencial antimicrobiano *in vitro* frente a alguns patógenos bucais que permitiu determinar o extrato hexânico como o mais promissor frente a todas as cepas ensaiadas e o limonóide guianina (13) e o alcalóide dictamina (11) com os melhores valores de CIM, sendo 200 e 100 µg/mL, respectivamente. Os ensaios frente à patógenos de origem alimentar revelaram que as substâncias lasiodiplodina e as sintéticas 2-metil-6-flúor-4-quinolona (S2) e 2-metil-5,7-dimetoxi-4-quinolona (S4) foram as mais eficazes dentre todas as ensaiadas. Portanto, a partir deste trabalho verificou-se que algumas substâncias com propriedades antibacterianas revelaram importantes fontes na descoberta de novos produtos com potencial antimicrobiano.

ABSTRACT

PHYTOCHEMICAL STUDY AND EVALUATION OF THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF SPECIES FROM *HORTIA* (RUTACEAE): *H. OREADICA*, *H. BRASILIANA* E *H. SUPERBA* – The phytochemical study of *Hortia* in this work aims to contribute with the chemosystematics of the Rutaceae and with the best classification of the genus inside the family. The study of the species *H. oreadica*, *H. brasiliiana* and *H. superba* led us to isolate 15 compounds, such as the dihydrocinnamic acids derivatives 3-phenyl-[2',6'-dimethoxy-(3',4':5'',6'')-2'',2''-dimethylpirano]propionic acid (**01**), methyl 3-phenyl-[2'-methoxy-(3',4':5'',6'')-2'',2''-dimethylpirano]propionate (**02**), methyl 3-phenyl-[2',6'-dimethoxy-(3',4':5'',6'')-2'',2''-dimethylpirano]propionate (**03**), methyl 3-phenyl-[2',5'-dimethoxy-(3',4':5'',6'')-2'',2''-dimethylpirano]propionate (**04**), 3-phenyl-[2'-methoxy-(3',4':5'',6'')-2'',2''-dimethylpirano]propionic acid (**05**), 3-phenyl-[2',5'-dimethoxy-(3',4':5'',6'')-2'',2''-dimethylpyrano]propionic acid (**06**), being structure **06** new for specie *H. oreadica*; coumarin 5-methoxyseselin (**07**); cinnamic acid derivative *E*-3,4-dimethoxy- α (3-hydroxy-4-carbomethoxyphenyl)cinnamic acid (**08**), new in literature, the alkaloids rutaecarpine (**09**), 7,8-dehydrorutaecarpine (**10**) new in the genus *Hortia*, dictamine (**11**), N-methylflindersine (**12**) and the limonoids guyanin (**13**), hortiolide E (**14**) and hortiolide G (**15**), being structure **14** described for the first time in the specie *H. oreadica* and **15** in literature. The phytochemical study of the species from *Hortia* genus still not allow classify correctly it inside the family. *Hortia* presents limonoids with C and D rings modified, characteristic of Meliaceae. However the presence of metabolites such as alkaloids, coumarins, dihydrocinnamic and cinnamic acids derivatives confirm that *Hortia* belongs the Rutaceae family, even so are not clear its accurate positioning. The presence of limonoids highly modified could indicated that genus can not belong nor to the Todallieae and nor the Cusparieae, being located separately inside of the Rutaceae family. Several biological assays had been performed with crude extracts and compounds isolated from *Hortia*, with a collection of the synthetic compounds and the lasiodiplodin, compound isolated from the pathogenic fungus. The Minimum Inhibitory Concentration of many substances was related against the bacteria *Xylella fastidiosa* that causes Citrus Variegated Chlorosis. The promising substances were synthetic quinolinones 2-methyl-6-fluor-4-quinolone

(S2) and 2-methyl-5-methoxy-7-hydroxy-4-quinolone (S4) and the alkaloid rutaecarpine (09) with MIC from 0.5 to 1.0 mg/mL. We have studied the *in vitro* antimicrobial activity against oral pathogens that permitted to determine hexane extract such as successful against all microorganisms assayed and limonoid guyanin (13) and alkaloid dictamine (11) with the best MIC, being 200 and 100 µg/mL, respectively. The assays against alimentary pathogens revealed that lasiodiplodin, 2-methyl-6-fluor-4-quinolone (S2) and 2-methyl-5,7-dimethoxy-4-quinolone (S4) synthetics as the more effective among all substances. Therefore, this work showed that several substances with properties antibacterial constitute an important source for the discovery of new antimicrobial products.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	01
1.1. Família Rutaceae.....	02
1.2. Produtos Naturais com Potencial Antimicrobiano	03
1.3. Doenças Citrícolas.....	04
1.3.1. Clorose Variegada dos Citros (CVC)	05
1.3.1.1 <i>Xylella fastidiosa</i>	07
1.3.2. Incidência da CVC.....	08
1.4. Doenças Bucais.....	10
1.4.1. Patógenos Bucais.....	11
1.5. Doenças de Origem Microbiana Transmitidas Por Alimentos	15
1.5.1. Bactérias de Origem Alimentar.....	16
2. Objetivos.....	19
3. Capítulo 1: Estudo Fitquímico das Espécies de <i>Hortia</i>	21
3.1. Procedimento Experimental.....	22
3.1.1. Materiais e Métodos.....	22
3.1.1.1. Métodos utilizados para o fracionamento e isolamento das substâncias	22
3.1.1.2. Métodos instrumentais utilizados para a identificação e elucidação das estruturas	23
3.1.2. Preparação dos Extratos Brutos.....	24
3.1.3. Fracionamento dos Extratos e Isolamento das Substâncias de <i>H. oreadica</i>	26
3.1.3.1. Fracionamento do Extrato Hexânico do Tronco Subterrâneo	26
3.1.3.2. Fracionamento do Extrato Diclorometano do Tronco Subterrâneo ...	27
3.1.3.3. Fracionamento do Extrato Diclorometano das Folhas	33
3.1.4. Fracionamento do Extrato e Isolamento das Substâncias de <i>H. brasiliiana</i>	34
3.1.4.1. Fracionamento do Extrato Diclorometano das Folhas	34
3.1.5. Fracionamento do Extrato e Isolamento das Substâncias de <i>H. superba</i>	35
3.1.5.1. Fracionamento do Extrato Metanólico do Tronco	35
3.1.5.2. Fracionamento da Fração Diclorometano do Extrato Metanólico do Tronco	35
3.2. Resultados e Discussão.....	37
3.2.1. Derivados do Ácido Diidrocinâmico.....	37
3.2.1.1. Determinação estrutural da substância 01.....	37
3.2.1.2. Determinação estrutural da substância 02.....	44
3.2.1.3. Determinação estrutural da substância 03.....	49
3.2.1.4. Determinação estrutural da substância 04.....	54
3.2.1.5. Determinação estrutural das substâncias 01 e 05	58
3.2.1.6. Determinação estrutural da substância 06.....	65
3.2.1.7. Determinação estrutural das substâncias 03 e 07	71
3.2.1.8. Biogênese dos Derivados do Ácido Diidrocinâmico	74
3.2.2. Derivados do Ácido Cinâmico.....	75
3.2.2.1. Determinação estrutural da substância 08.....	75
3.2.2.2. Biogênese da substância 08.....	83

3.2.3. Alcalóides.....	84
3.2.3.1. Determinação estrutural da substância 09.....	84
3.2.3.2. Determinação estrutural da substância 10.....	92
3.2.3.3. Determinação estrutural da substância 11.....	101
3.2.3.4. Determinação estrutural da substância 12.....	105
3.2.3.5. Biogênese dos alcalóides.....	108
3.2.3.5.1. Alcalóides indolopiridoquinazolínicos.....	108
3.2.3.5.2. Alcalóides furoquinolínicos e 2-quinolonas.....	109
3.2.4. Limonóides.....	111
3.2.4.1. Determinação estrutural da substância 13.....	111
3.2.4.2. Determinação estrutural da substância 14.....	121
3.2.4.3. Determinação estrutural da substância 15.....	130
3.2.4.4. Biogênese dos Limonóides.....	139
4. Capítulo 2: Ensaios Biológicos.....	145
4.1. Ensaios Bactericidas Frente a <i>Xylella fastidiosa</i>	146
4.1.1. Procedimento Experimental.....	146
4.1.1.1. Preparação dos meios de cultivo	146
4.1.1.2. Crescimento de <i>X. fastidiosa</i> em <i>Citrus sinensis</i>	149
4.1.1.3. Preparo do Inóculo para ensaio.....	149
4.1.1.4. Ensaios das Substâncias frente a <i>X. fastidiosa</i>	150
4.1.2. Resultados e Discussões	155
4.2. Ensaios Bactericidas Frente à Patógenos Bucais	160
4.2.1. Procedimento Experimental.....	160
4.2.1.1. Substâncias Ensaçadas Frente à Patógenos Bucais	160
4.2.1.2. Metodologia dos Ensaios frente à Patógenos Bucais	162
4.2.2. Resultados e Discussões.....	165
4.2.2.1. Extratos de <i>H. oreadica</i>	165
4.2.2.2. Substâncias isoladas de <i>H. oreadica</i>	166
4.2.2.3. Substâncias Quinolinônicas Sintéticas.....	168
4.3. Ensaios Bactericidas Frente à Patógenos de Origem Alimentar	172
4.3.1. Procedimento Experimental.....	172
4.3.1.1. Substâncias Ensaçadas Frente à Patógenos de Origem Alimentar ...	172
4.3.1.2. Metodologia dos Ensaios frente à Patógenos de Origem Alimentar	173
4.3.2. Resultados e Discussões.....	174
5. Conclusão.....	179
6. Referências Bibliográficas.....	183

FICHA CATALOGRÁFICA

FOLHA DE APROVAÇÃO

Dedico...

Ao meu marido Maico Roris Severino, meu eterno amor, pelo carinho, amizade, companherismo, atenção, paciência, incentivo e amor em todos os momentos.

Aos meus pais, Celso e Conceição, e ao meu irmão Vinicius, pelo amor e dedicação e por nunca medirem esforços para que eu consiga alcançar meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

À Deus pelas oportunidades concedidas a mim, por me fazer acreditar que tudo é possível e por estar sempre iluminando a minha vida.

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva pela confiança, paciência, excelente convívio e estímulo à pesquisa e pelo seu modo especial de ver a vida e as pessoas.

Aos professores que participaram da banca de defesa, Dra. Alessandra Alves de Souza e Dr. Luciano Moraes Lião, muito obrigado pelas considerações e contribuições para melhoria da versão final de minha dissertação.

Aos professores João Batista Fernandes, Paulo Cezar Vieira e Edson Rodrigues Filho que direta ou indiretamente participaram da evolução deste trabalho e pela ótima convivência durante todos esses anos.

À Profa. Dra. Alessandra Alves de Souza e toda a equipe do Centro de Citricultura pela orientação, ensinamentos, ajuda e contribuição nos ensaios biológicos.

Ao Prof. Carlos Henrique Gomes Martins e aos alunos da UNIFRAN pela receptividade, ensinamentos, carinho e contribuição nos ensaios biológicos.

À todos os amigos do Laboratório de Produtos Naturais da UFSCar que não citarei nomes por serem muitos, pela amizade, ensinamentos, apoio, prestatividade e colaboração neste trabalho e por proporcionarem um ambiente de trabalho prazeroso e familiar. Um agradecimento especial ao Dr. Sebastião da Cruz Silva e à Dra. Patrícia A. C. Braga que me forneceram algumas de suas substâncias para a realização dos ensaios biológicos.

À Profa. Arlene e às alunas Juciane e Patrícia por terem cedido suas substância para serem ensaiadas.

Aos amigos dos laboratórios de CLAE, LSPN, MASSAS, RMN e SÍNTESE.

Aos professores do DQ-UFSCar pela contribuição na minha formação.

Aos técnicos Luciana, Paulo, Valdir e Doraf por terem contribuído imensamente com esta dissertação através da realização de seus trabalhos.

Aos meus pais Celso e Conceição e ao meu irmão Vinicius, pelas orações, incentivo, educação e amor dado ao longo da minha vida.

Ao Maico, pelo incentivo, amor e por estar sempre ao meu lado durante todos estes anos.

À minha segunda família, família Severino, pelo amor, carinho e por estarem sempre torcendo por mim.

À FAPESP pela concessão da bolsa.

À todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

1. INTRODUÇÃO

1.1- Família Rutaceae

A ordem Sapindales, composta pelas famílias Rutaceae, Meliaceae, Burseraceae, Simaroubaceae, Bierbersteiniaceae, Kirkiaceae, Anacardiaceae, Sapindaceae e Nitrariaceae, é rica em diversas classes de metabólitos secundários, sendo de maior ocorrência cumarinas, alcalóides, flavonóides, quassinóides e limonóides.

A família Rutaceae caracteriza-se por uma grande diversidade de metabólitos secundários não comuns nas demais famílias da ordem (DA SILVA *et al.* 1987; WATERMAN, 1983) e é composta por muitos gêneros, dos quais destaca-se o gênero *Hortia*, que compreende 12 espécies distribuídas desde o Panamá e norte da América do Sul (em especial Amazônia) até o centro leste do Brasil (JACOBS *et al.*, 1987). Segundo levantamento bibliográfico há relatos de estudo fitoquímico de 8 espécies de *Hortia*, sendo elas *H. arborea* (ANTONACCIO *et al.*, 1956; PACHTER *et al.*, 1957; PACHTER *et al.*, 1960; FERRACIN, 1992; MONACHE *et al.*, 1976; MONACHE *et al.*, 1977), *H. badinii* (CORRÊA *et al.*, 1975; CORRÊA *et al.*, 1979), *H. longifolia* (CORRÊA *et al.*, 1976; PÁDUA, 1976), *H. brasiliana* (PACHTER *et al.*, 1961, BRAGA, 2005), *H. colombiana* (SUAREZ *et al.*, 1998, CUCA *et al.*, 1998, SUAREZ *et al.*, 2002), *H. regia* (JACOBS *et al.*, 1986; JACOBS *et al.*, 1987; TINTO, 1992), *H. oreadica* (BRAGA, 2005) e *H. superba* (BRAGA, 2005). São relatados para este gênero metabólitos secundários como derivados do ácido diidrocinâmico, alcalóides (furoquinolínicos, 2-quinolonas e β -indolopiridoquinazolínicos), cumarinas (simples, furanocumarinas e piranocumarinas), terpenóides (sesquiterpenos, triterpenos e limonóides), amidas e flavonóides (flavonas e flavanona).

No entanto, o posicionamento taxonômico do gênero *Hortia*, revela contradições entre os antigos botânicos. De Candolle dividiu a família Rutaceae em duas tribos, Diosmeae e Cusparieae, posicionando o gênero *Hortia* nesta última (DE CANDOLLE, 1824). Bentham & Hooker em 1862 propuseram modificações taxonômicas, tornando a família Rutaceae um pouco mais abrangente. Sete tribos foram formadas, adotando-se Cusparieae de onde o gênero *Hortia* foi excluído e posicionado na tribo Toddalieae, mas com comentários de que a classificação era duvidosa (BENTHAM e HOOKER, 1862). O sistema de Engler proposto em 1931, com as modificações de Scholz é o mais

aceito pelos atuais botânicos. Este é bastante semelhante àquele de Bentham & Hooker, e também não esclarece a classificação de *Hortia*, mantendo-a em Toddalieae (ENGLER, 1931; SCHOLZ, 1964). Dados de diversas fontes têm mostrado que a divisão das subfamílias de Engler (1931) é superficial, especialmente quanto ao reconhecimento de Toddalioideae.

A similaridade química entre as subfamílias Rutoideae e Toddalioideae é tão pronunciada que levou Silva *et al.* (1988) a uní-las em uma única subfamília, Rutoideae, subdividindo-a em 17 tribos. Os gêneros americanos de Toddalioideae vieram a constituir três tribos dentro de Rutoideae e *Hortia* foi reposicionada em Cusparieae como fez anteriormente De Candolle (1824). Porém, as justificativas para isto não foram novamente convincentes, mostrando que os dados químicos revelam a mesma dificuldade para o posicionamento de *Hortia*. A única justificativa plausível para reclassificá-la seria que *Hortia* é o único representante americano na subtribo Toddaliinae. Na classificação de Silva *et al.*(1988), Cuspariea (tribo informal "Cusparia") engloba, além de *Hortia*, o gênero Galipea, também neotropical. Engler em 1931 alocou em Toddaliinae gêneros da África, Austrália e América que eram filogeneticamente menos relacionados entre si do que com gêneros de outras tribos e até mesmo de outras subfamílias. Desta forma, *Hortia* estaria mais próxima dos gêneros de Cusparieae do que dos membros de Toddaliinae.

1.2- Produtos Naturais com Potencial Antimicrobiano

Não há dúvidas de que as plantas são fontes promissoras de metabólitos secundários ativos (GELB *et al.*, 2002) e fornecem muitos modelos moleculares para o desenvolvimento de novas substâncias com atividades biológicas. Assim sendo, no Brasil e no mundo buscam-se alternativas para o desenvolvimento de uma cultura ecologicamente correta e que seja sustentável. Para tal, um dos aspectos é o controle de doenças com o uso de extratos e compostos biologicamente ativos isolados de espécies de plantas.

Investigações científicas relatam que cada vez mais microrganismos patogênicos e fitopatogênicos desenvolvem resistência frente à antimicrobianos comerciais. Neste aspecto antimicrobianos de origem natural, embora apresentem efeitos nocivos como os sintéticos, podem também ser considerados eficazes no

tratamento de doenças por apresentarem em sua composição substâncias efetivas. De uma forma geral, substâncias naturais com potencial biológico também são consideradas praticamente inofensivas ao meio ambiente pois degradam-se com maior velocidade que as sintéticas; não deixando resíduos no meio ambiente (DENNIS, 1987).

Entretanto, apesar das vantagens que produtos naturais desempenham como possíveis antimicrobianos, o isolamento de pequena quantidade de massa destes metabólitos das plantas faz com que se torne necessário também a busca de compostos de partida de origem semi-sintética ou sintética para novas substâncias antimicrobianas.

Com base nas informações acima, o grupo de Produtos Naturais (PN) da UFSCar vem realizando ensaios biológicos com metabólitos secundários obtidos de espécies vegetais bem como alguns compostos sintéticos frente à bactéria fitopatogênica *Xylella fastidiosa* que afeta a citricultura brasileira, e frente à patógenos bucais e de origem alimentar que representam um dos mais sérios problemas sócio-econômicos e de saúde pública em âmbito mundial; visando a busca de novos inibidores que sejam mais eficientes no combate destes microrganismos.

1.3- Doenças Citrícolas

Pode-se definir doença como um distúrbio fisiológico, resultado de uma irritação contínua causada por agentes bióticos ou abióticos e que pode levar ao aparecimento de sintomas. Os agentes abióticos podem ser temperaturas muito altas ou muito baixas, intoxicação por pesticidas ou minerais, falta ou excesso de luz, umidade do solo, poluição atmosférica, acidez ou alcalinidade do solo. Dentre os agentes bióticos, destacam-se os fungos, vírus, viróides e bactérias (AGRIOS, 1997).

A cultura de citrus é um alvo constante de inúmeras pragas e doenças, que encontrando condições favoráveis ao seu desenvolvimento são capazes de causar danos irreversíveis. A quantidade e qualidade das frutas cítricas são freqüentemente ameaçadas devido aos danos causados na planta, que dependendo da intensidade do ataque, pode torná-la improdutiva ou levar à sua erradicação. As principais doenças e pragas que afetam a citricultura

brasileira são: Leprose dos Citros, Clorose Variegada dos Citros (CVC), Gomose de Phytophthora, Greening, Cancro Cítrico, Declínio, Mancha Alternaria, Morte Súbita dos Citros (MSC), Pinta Preta, Podridão Floral dos Citros, Rubelose, Tristeza – *Citrus Tristeza Virus* (CTV) (LARANJEIRA *et al.*; 1998).

1.3.1- Clorose Variegada dos Citros (CVC)

A clorose variegada dos citros (CVC), conhecida também como “amarelinho dos citros”, é uma doença causada por uma bactéria gram-negativa denominada *Xylella fastidiosa*. A CVC foi constatada pela primeira vez em 1987 em pomares da região Noroeste do Estado de São Paulo (ROSSETTI *et al.*, 1990; ROSSETTI & DE NEGRI, 1990) e vem se constituindo como a mais importante doença citrícola no Brasil.

Em citros, logo após a primeira descrição da doença e antes mesmo da causa ter sido comprovada em condições experimentais, levantamentos de campo indicavam que todas as variedades de laranjas doces cultivadas, sendo as principais a Pêra Rio, Natal, Hamlim e Valência, eram atacadas pela doença. As tangerinas Ponkam e tangor Murcote, os limões e as limas ácidas Tahiti, de maior expressão comercial, por não manifestarem os sintomas típicos da CVC foram caracterizados como resistentes. Estes resultados foram confirmados mais recentemente em estudo de campo onde foram avaliados diversos híbridos e espécies dos gêneros *Citrus*, *Fortunela* e *Poncirus* (LARANJEIRA *et al.*, 1998). Neste estudo também não foram observadas diferenças consideráveis no nível de resistência dentro do grupo das laranjas doces, que poderia ser explorado comercialmente. É possível que os materiais que não apresentaram sintomas da CVC sejam tolerantes à doença, ou seja, permitindo o crescimento do patógeno em seus tecidos, como observado com as tangerinas Cravo e Ponkan por LI *et al.* (1996) e MACHADO *et al.* (1997), porém não expressando qualquer sintomatologia ou perda de produção. Estas plantas poderiam, no entanto, contribuir para o avanço da CVC nas variedades susceptíveis atuando como fontes de inóculo veiculados pelas cigarrinhas.

Os sintomas da CVC manifestam-se apenas em ramos, folhas e frutos. As raízes não apresentam anormalidade alguma. Inicialmente, pode-se encontrar apenas um ou poucos ramos atacados na parte média ou superior da

planta, mas, com o passar do tempo, toda a árvore pode apresentar os sintomas típicos da anomalia. As plantas, quando muito afetadas, apresentam um aspecto de debilidade geral, denotado pela coloração amarelada.

Contudo, o sintoma mais conhecido de CVC constitui-se de pequenas manchas internervais amarelas na face superior da folha (FIGURA 1.1, pg 06). Inicialmente, essas manchas não são muito extensas. A essas cloroses correspondem, na face inferior, manchas de coloração variando entre o vermelho e o marrom. Em plantas muito afetadas pela CVC, é comum a presença de desequilíbrios nutricionais, notadamente de zinco, magnésio e potássio (ROSSETTI & DE NEGRI, 1990).



FIGURA 1.1: Sintomas típicos de CVC em folhas de laranja doce.

(Fonte: FUNDECITROS, 2008a)

Os sintomas nos frutos surgem sempre após o aparecimento dos sintomas foliares e apenas nos ramos já afetados, havendo uma tendência à frutificação em “pencas” (ROSSETTI & DE NEGRI, 1990; LARANJEIRA, 1998). Plantas afetadas apresentam sintomas de deficiência hídrica (murchamento de folhas), principalmente nas horas mais quentes do dia e independente do nível de encharcamento do solo, sintomas de deficiência mineral (particularmente zinco) e redução no crescimento da copa e no tamanho dos frutos que em citros se tornam impróprios para o consumo *in natura* ou comercialização. Em geral plantas de citros afetadas pela *X. fastidiosa* não chegam a morrer, mas a vida útil das plantações costuma ser bastante reduzida (FUNDECITRUS, 2008a)(FIGURA 1.2, pg 07).



FIGURA 1.2: Plantas com sintomas de CVC.

(Fonte: FUNDECITROS, 2008a)

1.3.1.1- *Xylella fastidiosa*

No Brasil, a bactéria *X. fastidiosa* tem causado muita preocupação, principalmente nos últimos 15 anos, e sido alvo de vários estudos, como o que resultou no seqüenciamento completo de seu genoma (SIMPSON *et al.*, 2000), por ser o agente causal de doenças que podem gerar grandes prejuízos nas culturas de citros (CVC). Diferentemente da grande maioria das bactérias fitopatogênicas, a bactéria *X. fastidiosa* é um microrganismo de difícil cultivo em meios de cultura e que se limita ao xilema das plantas infectadas e aparelho bucal dos insetos vetores, as cigarrinhas (PURCELL e HOPKINS, 1996). É através desse grupo de insetos que, no campo, a bactéria é transmitida de uma planta à outra. Sob condições experimentais, com maior ou menor eficiência, 11 espécies transmitem o patógeno entre plantas cítricas (LOPES *et al.*, 1996, ROBERTO *et al.*, 1996, FUNDECITRUS, 1999, KRÜGNER *et al.*, 1998, YAMAMOTO *et al.*, 2002).

Previamente foi demonstrado que a bactéria é capaz de crescer como um biofilme (MARQUES *et al.*, 2002) e este biofilme poderia ser um fator importante para a patogenezidade (SOUZA *et al.*, 2003). Biofilmes são definidos como uma matriz repleta de população microbiana aderidas umas às outras e nas superfícies e interfaces (COSTERTON *et al.*, 1995). A maneira como *X. fastidiosa* coloniza o xilema, o que é facilmente observável em imagens feitas com microscopia eletrônica (LOPES *et al.*, 2000, CHAGAS *et al.*, 1992, ROSSETI *et al.*, 1990, ALVES, 2003) e óptica, (QUEIROZ-VOLTAN e PARADELA FILHO, 1999) (FIGURA 1.3, pg 08) e as sintomatologias manifestadas por plantas afetadas, sugerem, no entanto, que os danos resultam principalmente de um

bloqueio no fluxo da água do solo para as partes aéreas das plantas e de um constante desvio de nutrientes (OSIRO *et al.*, 2004; DE SOUZA *et al.*, 2004).

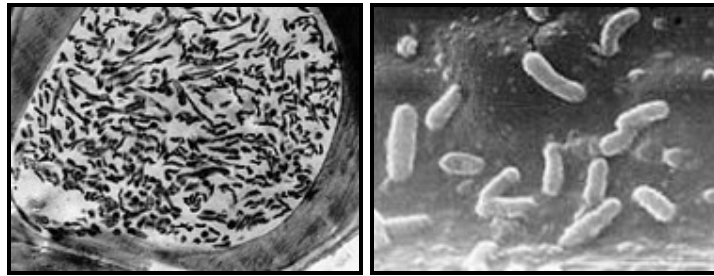


FIGURA 1.3: Vasos do xilema obstruído por células e células de *X. fastidiosa*
(Fonte: FUNDECITROS, 2008a)

1.3.2- Incidência de CVC

O Brasil é atualmente o maior produtor mundial de citros, correspondendo a 25,1% da plantação mundial, seguido pelos Estados Unidos, com 16,4% . A cultura encontra-se disseminada por todo o território nacional, com grande importância econômica e social para diversos estados onde se situa as dez principais culturas: São Paulo, Sergipe, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Rio Grande do Sul e Bahia (RODRIGUEZ *et al.*, 1991). As maiores plantações são de laranja (*Citrus sinensis*, 66%), tangerina (*C. reticulata*, 15,4%), toranja (*C. paradisi*, 8,5%) e limão (*C. limon*, 6,8%).

O volume que representa nas exportações, a extensão em área ocupada e o número de empregos diretos e indiretos gerados pelo setor citrícola brasileiro, associados à rapidez com que a doença se disseminou para os grandes centros produtores de laranja, provavelmente através de mudas contaminadas (TUBELIS *et al.*, 1992), têm feito da CVC um problema preocupante e também bastante estudado. Levantamentos conduzidos pela Fundecitrus a partir de 1996 nos meses que antecedem a colheita, mostram que sua incidência na área nobre da citricultura, que compreende 850 mil hectares localizados em 367 municípios das regiões sul, central, norte e noroeste de São Paulo e sul do triângulo mineiro (AYRES, 2000), tem-se mantido em níveis médios superiores a 30% (FUNDECITROS, 2008b). Pode-se verificar que a região norte do Estado de São Paulo e parte do Triângulo Mineiro são as que

apresentam maior incidência de CVC (FUNDECITROS, 2008b) (FIGURA 1.4, pg 09).

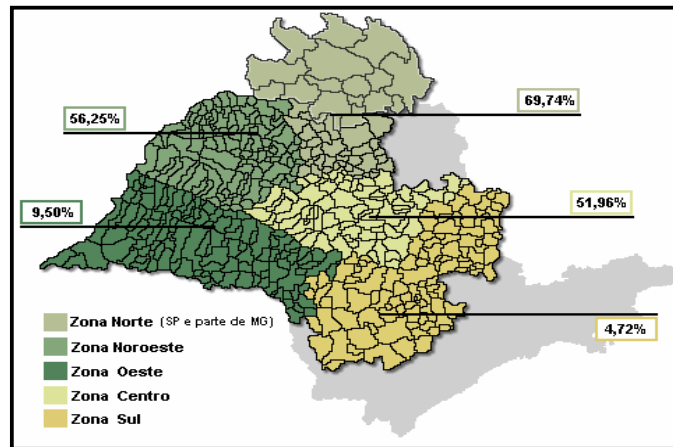


FIGURA 1.4: Zoneamento citrícola considerado no levantamento de CVC em 2005 no Estado de São Paulo e parte do Triângulo Mineiro (Fonte: FUNDECITROS, 2008b)

Os níveis de danos econômicos da CVC, estimados em cem milhões de dólares anuais, poderiam ser ainda maiores não fosse a adoção de medidas conjuntas de controle pelos produtores. Estas envolvem plantio de mudas sadias, poda de ramos sintomáticos, erradicação de plantas com sintomas generalizados e controle químico dos vetores (FUNDECITRUS, 2008c). Atualmente existe norma governamental que, desde janeiro de 2003, proíbe a comercialização em todo o estado de São Paulo de mudas que não tenham sido produzidas em viveiros telados totalmente livres de insetos (FUNDECITRUS, 2008d). Observando o levantamento realizado pela Fundecitrus no período de 1996 a 2005 (GRÁFICO 1.1, pg 10), pode-se verificar que nos anos de 2004 a 2005, houve um pequeno decréscimo na incidência de CVC, porém praticamente insignificante, quando comparado com as perdas que a doença causa para os setores envolvidos.

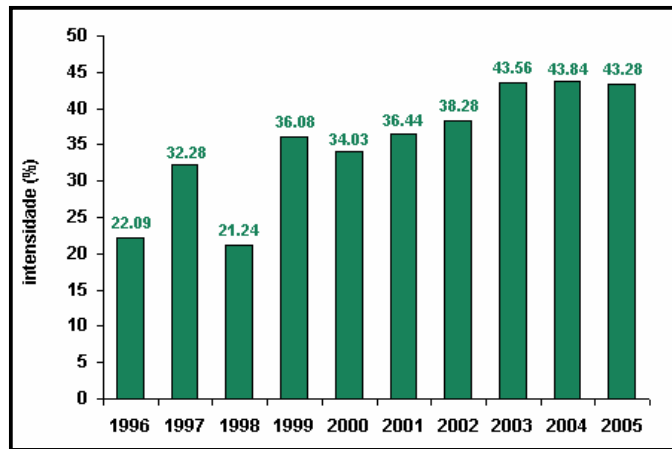


Gráfico 1.1: Comparação da incidência de CVC no período de 1996 a 2005 no Estado de São Paulo e parte do Triângulo Mineiro (Fonte: FUNDECITROS, 2008b)

Desta forma, pode-se concluir que os métodos de manejos atuais da CVC não são eficazes, sendo necessário portanto empreendimento de esforços visando um conhecimento mais aprofundado de vários aspectos desses patossistemas de forma que medidas mais apropriadas sejam desenvolvidas.

1.4- Doenças Bucais

As doenças bucais parecem ser devido a uma transição de uma associação comensal para uma relação oportunística com o hospedeiro. As bactérias da microbiota bucal podem sobreviver na cavidade oral por serem menos susceptíveis aos mecanismos imunológicos ou por serem capazes de sobrepujá-los. Desta forma, um desequilíbrio no ecossistema bucal pode acarretar a emergência de bactérias potencialmente patogênicas. Para a compreensão dos processos envolvidos na cariogênese e nas doenças periodontais é necessário um entendimento da ecologia da cavidade oral e a identificação dos fatores responsáveis pela transição da microbiota oral de uma associação comensal para uma relação patogênica com o hospedeiro.

As características ambientais da cavidade oral, tais como alta umidade, temperatura relativamente constante de 34 a 36°C, pH próximo da neutralidade e disponibilidade de nutrientes (NASCIMENTO *et al.*, 2004), permitem o estabelecimento de uma microbiota altamente complexa, composta

por cerca de 500 grupos bacterianos que habitam as diversas áreas da boca. Os microrganismos que colonizam os dentes produzem uma aderência que os capacitam a desenvolver um biofilme bacteriano que se adere à superfície dos dentes, formando comunidades microbianas organizadas em uma matriz complexa, composta de produtos extracelulares microbianos, constituintes salivares, restos alimentares, células mortas e descamadas da boca. Este biofilme é denominado placa bacteriana e é a causa principal das cáries e das doenças periodontais (MARCOTTE & LAVOIE, 1998).

A composição da microbiota oral varia com a idade, hábitos alimentares, hormônios, fluxo salivar, condições imunológicas e outros fatores como higienização e alcoolismo. A colonização da cavidade oral por microrganismos tem início de seis a dez horas após o nascimento. As espécies pioneiras são as do gênero *Streptococcus* e provêm principalmente da mãe.

1.4.1- Patógenos Bucais

A distribuição das bactérias bucais varia qualitativa e quantitativamente de acordo com o habitat. Bactérias do grupo *Streptococcus* como *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. cricetus*, *S. rattus* e *S. sanguinis* são encontrados em grandes números nos dentes enquanto que *S. salivarius* é isolada principalmente da língua. As espécies *S. mutans* e *S. sanguinis* aparecem na cavidade oral somente após a erupção dos dentes.

A complexidade das comunidades bacterianas nas placas bacterianas torna difícil a determinação de um agente cariogênico específico. Há fortes evidências de que bactérias tais como *S. mutans*, *S. sobrinus* e *Lactobacillus acidophilus* estejam envolvidas na iniciação e progressão das cáries, respectivamente. Estes dois grupos bacterianos são capazes de metabolizar carboidratos em ácidos (primariamente ácido lático) e tolerar um ambiente com pH baixo. Contudo, grandes quantidades de *S. mutans* podem ser encontradas em placas bacterianas sem evidência de cáries.

Dietas ricas em sacarose contribuem para a cariação dos dentes porque o *S. mutans* produz um polissacarídeo de aderência específica a partir da sacarose que é substrato para a produção do ácido lático. Bactérias lácticas como *Lactobacillus acidophilus* produzem ácido lático que dissolvem o fosfato de cálcio

do esmalte dos dentes. A *S. mutans* pode, também, causar endocardite subaguda. Os microrganismos predominantes da placa bacteriana encontram-se na TABELA 1.1 (pg 12).

TABELA 1.1: Bactérias predominantes na placa bacteriana
(Fonte: MORETTI, 2007)

Bactérias Predominantes na Placa Bacteriana	
Cocos Gram-positivos facultativos à oxigênio	<i>Streptococcus (S. mutans; S. sobrinus; S. cricetus)</i>
Bacilos Gram-positivos facultativos à oxigênio	<i>Actinomyces</i>
Bacilos Gram-negativos anaeróbios estritos	<i>Porphyromonas (P. gingivalis; P. endodontalis); Prevotella (P. melaninogenica; P. intermédia; P. loescheii; P. denticola)</i>

As imagens abaixo foram obtidas por micrografia eletrônica de varredura e de transmissão, respectivamente. A FIGURA 1.5 (pg 12) mostra bactérias orais aderidas umas sobre as outras formando filamentos de bactérias empilhadas. Na FIGURA 1.6 (pg 13) pode-se observar a superfície do 3º molar humano recoberta com *Streptococcus sobrinus*.

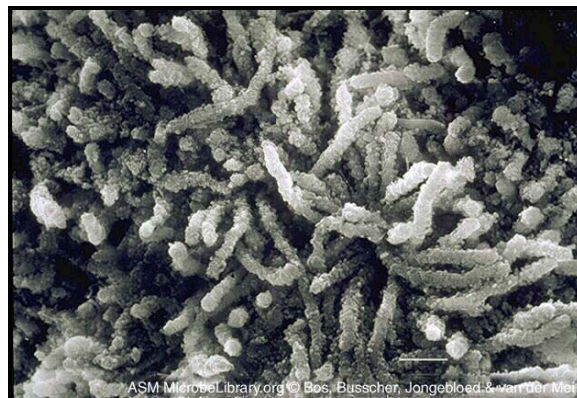


FIGURA 1.5: Micrografia eletrônica de varredura de microrganismos compondo uma placa dental
(Fonte: MORETTI, 2007)

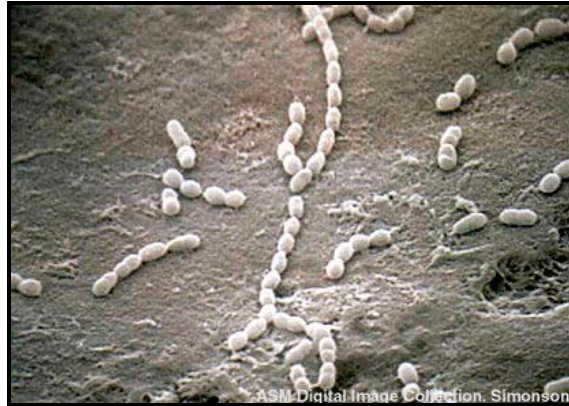


FIGURA 1.6: Micrografia eletrônica de transmissão de *S. sobrinus* sobre a superfície dental
(Fonte: MORETTI, 2007)

A placa dental pode ser prontamente visualizada logo após um ou dois dias sem medidas de higiene bucal. A placa é branca, acinzentada ou amarela. O movimento dos tecidos e dos alimentos sobre os dentes resulta na remoção mecânica da placa, nos dois terços coronários da superfície do dente, ficando a placa localizada no terço gengival da superfície dentária. A localização e o ritmo de formação da placa variam entre os indivíduos. Na ausência de medidas de higiene bucal, a placa continua acumulando até que seja alcançado um equilíbrio entre as forças de remoção da placa e as forças de formação (MESQUINI *et al.*, 2006). O processo de formação da placa pode ser dividido em quatro fases (FIGURA 1.7, pg 14). Na fase 1 observa-se a adsorção molecular para a formação do biofilme; na fase 2 ocorre a adesão bacteriana de microrganismos isolados; na fase 3 há um aumento na produção da matriz extracelular e multiplicação das bactérias aderidas; na fase 4 a adsorção seqüencial de novas bactérias formam um biofilme maduro e complexo (NEWMAN *et al.*, 2004).

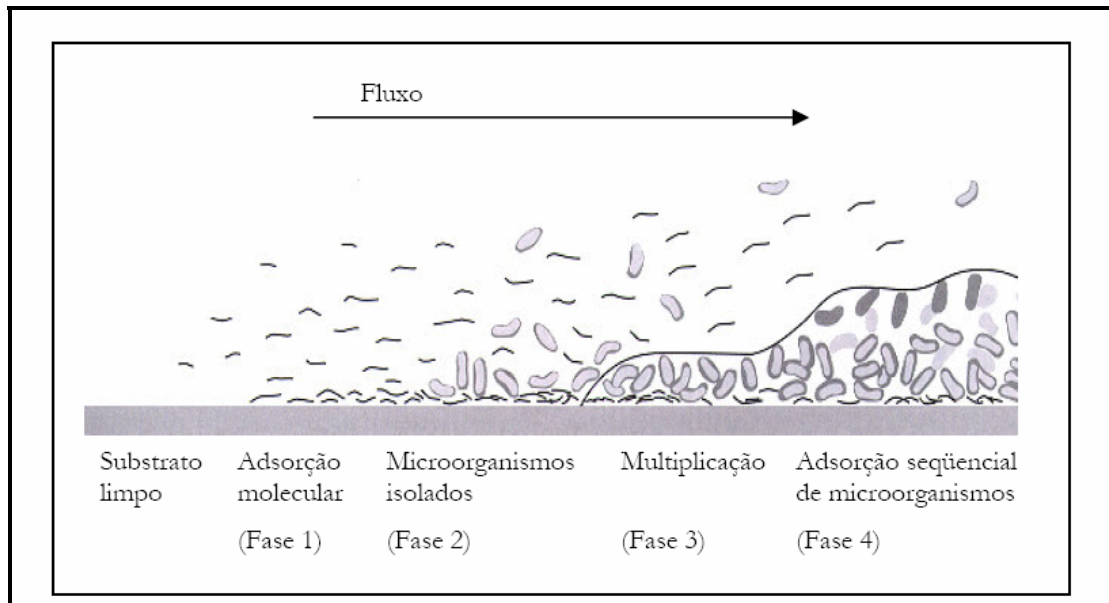


FIGURA 1.7. Fases da formação da placa
(Fonte: LINDHE *et al.*, 2005)

Após a formação do biofilme, inicia-se um processo de propagação sistêmica de infecções periodontais, ou o ataque da placa dental que enfatiza a necessidade de um tratamento específico da infecção por biofilme subgengival. As infecções contidas na cavidade bucal podem repercutir no organismo como um todo. Os micróbios disseminam-se sobre a superfície das mucosas úmidas e quentes. Alguns patógenos aderem às células epiteliais ou proliferam para o interior dos tecidos. Várias bactérias e fungos apresentam a capacidade de invadir o interstício, em função de sua motilidade ou da produção de enzimas líticas. Microorganismos também podem atingir os vasos linfáticos, alcançando os linfonodos e, daí, a corrente sanguínea. Assim, as infecções estafilocócicas, ou mesmo estreptocócicas, não tratadas podem progredir levando a uma endocardite infecciosa. Muitas vezes, as principais manifestações de doenças infecciosas surgem em locais distantes da entrada do agente patogênico (COTRAN *et al.*, 1996).

Devido à problemas conhecidos no tratamento de doenças periodontais causadas por microrganismos resistentes a antibióticos e devido às dificuldades encontradas por laboratórios na descoberta de novas moléculas com propriedades antimicrobianas, pesquisas nesta área têm se mantido restrita à poucos pesquisadores. Na realidade, algas, fungos e plantas superiores constituem atualmente importantes fontes para a prosperação de novas

moléculas bioativas, seja pelo uso direto de seus metabólitos secundários ou pelo emprego de derivados biossintéticos ou semi-sintéticos, os quais são produzidos com o objetivo de promover uma redução do número de microrganismos viáveis, ao inibir sua proliferação ou causar sua morte celular.

1.5- Doenças de Origem Microbiana Transmitidas por Alimentos

Os alimentos de origem animal ou vegetal, frescos ou processados, incluindo a água, podem veicular diversos microrganismos patógenos, causadores de diversas perturbações fisiológicas nas pessoas que os consomem. Os alimentos que, eventualmente, estejam contaminados por microrganismos causadores de doenças, ao serem ingeridos, permitem que os patógenos ou seus metabólitos invadam os fluídos ou os tecidos do hospedeiro potencializando algumas doenças graves, como por exemplo, a tuberculose e a febre de Malta também conhecida como febre ondulante, resultantes da ingestão de leite não pasteurizado ou de queijos, em particular queijos frescos, contaminados por populações bacterianas, de *Mycobacterium bovis* e *M. tuberculosis*, ou por *Brucella abortus*, agentes respectivamente responsáveis pela doença referida (DENNIS,1987).

As doenças de origem alimentar representam um perigo de grande relevância para a saúde humana e para a economia dos indivíduos, famílias e nações e podem ser provocadas por diversos grupos de microrganismos, incluindo bactérias, fungos, protozoários e vírus. As bactérias, pela sua diversidade e patogenia, constituem, de longe, o grupo microbiano mais importante e vulgarmente associado às doenças transmitidas pelos alimentos e portanto este grupo foi o foco deste estudo. Os alimentos podem ser contaminados por bactérias patogênicas para o homem, como resultado de deficientes condições de higiene durante o seu processamento, quer a partir de pessoas ou animais doentes, quer a partir de fezes provenientes de indivíduos infectados. Os alimentos podem, também, constituir um perigo para a saúde pública, devido ao crescimento excessivo de populações bacterianas na superfície ou no interior dos mesmos, oriundas do meio ambiente capazes de produzir toxinas (exotoxinas), que ao serem ingeridas com o alimento podem causar graves problemas (PELCZAR *et al.*, 1980).

1.5.1- Bactérias de Origem Alimentar

Os principais gêneros bacterianos envolvidos no mecanismo de infecção alimentar são: *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio* e *Bacillus*.

O gênero *Escherichia* é composto por uma única espécie: *E. coli*, o ser vivo mais estudado e conhecido do Homem. Praticamente todos os alimentos, quer de origem vegetal, quer de origem animal que não tenham sido objetos de processamento, podem veicular a *E. coli*, desde que, em algum momento, tenham sido sujeitos a poluição fecal. *E. coli* já provocou um surto nos Estados Unidos em 1968, devido à ingestão de água não clorada, proveniente de poço artesiano, e provavelmente contaminada com fezes humanas. Vários surtos de origem alimentar ocorreram na Inglaterra. Um deles em 1967, através da ingestão de carne de porco previamente preparada, e outro em 1973, atribuído à ingestão de torta de carne contaminada (DOYLE E CLIVER, 1990). Este tipo de microrganismo pode se difundir através da água, alimentos e pelo contato pessoa a pessoa. Poucos alimentos tem sido associados a surtos de toxinfecção alimentar provocados por este grupo, mas salmão, carne de aves, leite e queijo Camembert tem sido veículos. Um dos casos mais alarmantes de infecção alimentar por *E. coli* ocorreu nos Estados Unidos em 1971, em que aproximadamente 380 pessoas ingeriram queijo Camembert contaminado. O queijo era de origem francesa e continha *E. coli* O:124 em contagens de 105–107 microrganismos/grama (DOYLE e CLIVER, 1990). O período de incubação da doença varia de 3 a 9 dias, com média de 4 dias, e duração da doença varia de 2 a 9 dias, também com média de 4 dias.

O gênero *Salmonella* é composto por três principais espécies que estão associadas às infecções alimentares: *S. typhimurium*, *S. enteritidis* e *S. newport*, responsáveis pelos maiores incidentes; esta última espécie produz uma enterotoxina de natureza lipopolissacarídica com elevado peso molecular. Os alimentos mais susceptíveis à contaminação por Salmonelas são o leite, queijos, chocolates, carnes frescas, nomeadamente, carcaças de aves. A FIGURA 1.8 (pg 17) foi obtida via microscopia de varredura e mostra algumas colônias de *Salmonella*.

As espécies do gênero *Shigella* são os agentes causais da disenteria bacilar no Homem, tendo-se isolado quatro espécies associadas a esta

doença no Homem: *S. dysenteriae*, *S. boydii*, *S. flexneri* e a *S. sonnei*. Estas espécies são restritas aos humanos, sendo a poluição fecal a sua principal via de contaminação e dispersão.

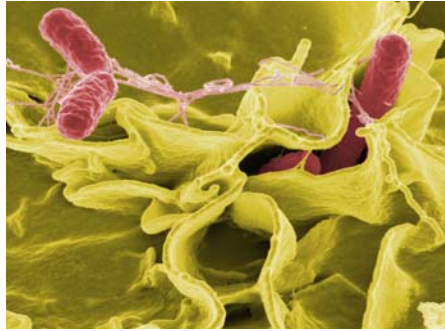


FIGURA 1.8: Colônias de *Salmonella*
(Fonte: FUNDACION ANNA VÁSQUEZ, 2007)

O gênero *Vibrio* inclui duas espécies patogêneas para o Homem, denominadas, *V. cholerae*, responsável pela cólera, e *V. parahaemolyticus*, bem adaptada aos ambientes marinhos e associada às infecções alimentares por ingestão de peixe, moluscos e crustáceos contaminados.

O gênero *Bacillus* compreende uma única espécie: *Bacillus cereus*, que habita preferencialmente o ar, o solo, águas e diferentes alimentos de origem vegetal (cereais), laticínios e produtos cárneos. A FIGURA 1.9 (pg 17) ilustra várias colônias de *B. cereus*.

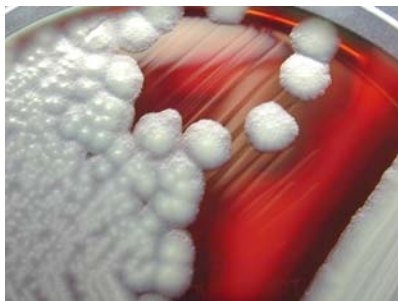


FIGURA 1.9: Colônias de *Bacillus cereus*
(Fonte: WIKIPÉDIA, 2007)

Os sintomas causados por doenças de origem microbiana transmitidas por alimentos podem ser simplesmente incômodos, sem gravidade maior, ou muitas vezes levar à quadros clínicos de alto risco ou mortes. Por isso é imprescindível a adoção de medidas que evitem o desenvolvimento dessas doenças, como por exemplo, inibir a proliferação destes microrganismos no ambiente, com substâncias ativas que sejam de fato eficientes e não prejudiciais à saúde.

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo principal o isolamento e elucidação estrutural de metabólitos secundários de *Hortia oreadica*, *H. brasiliana* e *H. superba*, visando a aplicação dos resultados na investigação de vários problemas, entre eles:

- ↪ Quimiosistemática do gênero *Hortia*: A classificação do gênero *Hortia* dentro da família Rutaceae ainda é duvidosa. A avaliação de várias espécies de *Hortia* teve como objetivo o isolamento de metabólitos secundários que pudessem contribuir para o posicionamento quimiosistemático do gênero dentro da família. Para isto várias partes vegetais das espécies *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani, *H. brasiliana* Vand. Ex DC e *H. superba* consistiram o material de estudo deste trabalho.

- ↪ Investigar o potencial antibacteriano de substâncias isoladas de espécies de *Hortia* e substâncias quinolinônicas sintéticas frente à *X. fastidiosa*, visando o controle da CVC que é uma das doenças mais importantes da citricultura brasileira.

- ↪ Avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* de extratos e substâncias isoladas de *Hortia*, bem como uma série de substâncias sintéticas frente à patógenos bucais e de origem alimentar, com o objetivo de encontrar substâncias antibacterianas capazes de combater agentes causadores de doenças periodontais e microrganismos presentes em alimentos, responsáveis por inúmeras doenças no homem.

3. CAPÍTULO 1:

ESTUDO FITOQUÍMICO DAS ESPÉCIES DE *HORTIA*

3.1- PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1.1- Materiais e Métodos

3.1.1.1- Métodos utilizados para o fracionamento e isolamento das substâncias

a) Fracionamentos por Cromatografia em Coluna (CC), utilizando as seguintes fases estacionárias:

- ❖ Sílica gel 60 (70-230 Mesh ASTM), MERCK
- ❖ Sílica gel (230-400 Mesh ASTM), MERCK
- ❖ Celulose microcristalina, VETEC
- ❖ Sephadex LH-20
- ❖ Florisil (230-400 Mesh ASTM)

b) Separação de misturas de substâncias via Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP) utilizando:

- ❖ Cromatoplaça de sílica gel 60 HF₂₅₄ em alumínio, MERCK
- ❖ Placa preparativa de sílica gel 60 HF₂₅₄ em vidro, MERCK

c) Separação de misturas de substâncias via Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando os cromatógrafos:

- ❖ SHIMADZU SCL-10A, (condições preparativas);
- ❖ SHIMADZU modelo LC-6AV, (condições preparativas com válvula de reciclo (CLAE-R) e “loop” de 2 mL)

Com os seguintes detectores:

- ❖ Espectrofotômetro UV-VIS. Modelo SPD- GAV, Shimadzu para CLAE-R;
- ❖ Detector de índice de refração Shimadzu VIR-6AV para CLAE-R.

d) Solventes utilizados no fracionamento e identificação dos compostos:

- ❖ Solventes comerciais MERCK, SINTH, VETEC, LABSYNTH e outros destilados na sala de destilação do Departamento de Química da UFSCar
- ❖ Solventes grau HPLC da JTB;
- ❖ Solventes deuterados da MERCK e ALDRICH.

e) Evaporadores rotatórios utilizados para preparar e fracionar extratos:

- ❖ BUCHI, rotavapor R-114, equipado com banho BUCHI B-480 e recirculador refrigerado NESLAB, modelo CFT-25 mantido a 5°C.
- ❖ BUCHI, rotavapor R-200, equipado com banho BUCHI 490 e recirculador refrigerado NESLAB, modelo CFT-25 mantido a 5°C.

f) Liofilizador utilizado para extratos hidroalcoólicos:

- ❖ Modelo E.C. Modulyo-Pump Savant VLP 80

3.1.1.2- Métodos instrumentais utilizados para a identificação e elucidação das estruturas

a) Ressonância Magnética Nuclear (RMN), utilizando as técnicas de RMN de ^1H e ^{13}C , COSY, HMBC, HSQC, g-NOESY via os seguintes aparelhos:

- ❖ BRUKER modelo DRX 400 (9,4 Tesla)
- ❖ BRUKER modelo ARX 200 (4,7 Tesla)

b) Espectrometria de massas, utilizando os seguintes aparelhos:

❖ Cromatógrafo de fase gasosa Shimadzu GC-17A, equipado com uma coluna DB₅, L= 30m, Φ = 0,32mm e filme= 0,25 μm acoplado ao espectrômetro de massas de baixa resolução HP-2576

❖ Cromatógrafo de fase gasosa acoplado ao espectrômetro de massas de baixa resolução Shimadzu CG-EM QP5000, equipado com uma coluna HP1, L= 25m, Φ = 0,20mm e filme= 0,25 μm

❖ Espectrômetro de massas ESI-MS e DCI-MS de baixa resolução VG Platform II (Fisons).

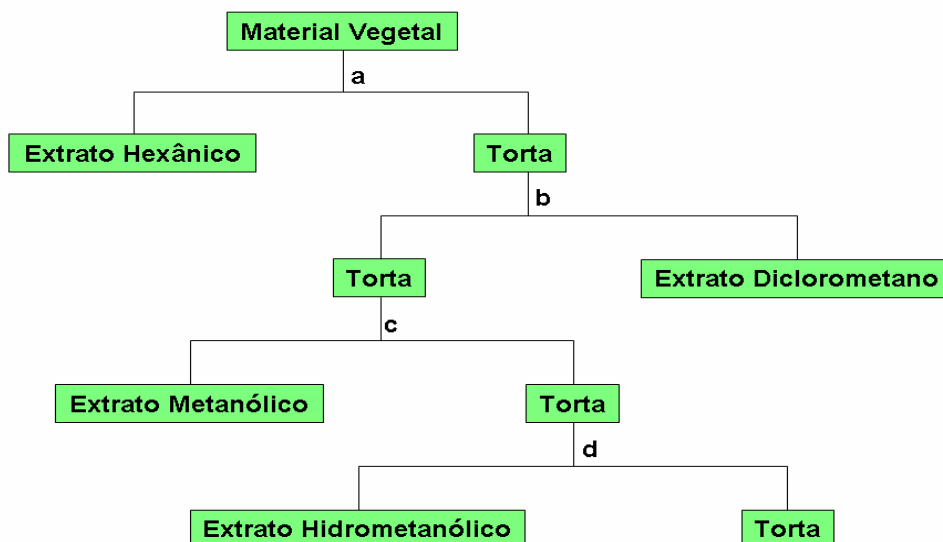
3.1.2- Preparação dos Extratos Brutos

A espécie *H. brasiliiana* Vand. Ex DC foi coletada em 11 de maio de 2000, no município de Linhares, Espírito Santo. As espécies *H. superba* e *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani foram coletadas de 21 a 23 de janeiro de 2001 em uma Reserva DUCKE no município de Itacoatiara, Amazonas. Todas as espécies foram identificadas pelo Prof. Dr. José Rubens Pirani, do Departamento de Botânica, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (USP-SP) e as exsicatas encontram-se depositadas no mesmo instituto. A FIGURA 3.1 (pg 24) mostra três árvores de espécies de *Hortia*, sendo na ordem da esquerda para a direita, *H. brasiliiana*, *H. oreadica* e *H. superba*.

As partes vegetais das espécies de *Hortia* foram secas em estufa de circulação a 40°C durante aproximadamente 10 dias e posteriormente trituradas em moinho. O material seco e moído foi percolado com solventes para extração de metabólitos secundários, em ordem crescente de polaridade [Hexano (EH), Diclorometano (ED), Metanol (EM) e em alguns casos, uma mistura na proporção 1:1 de Metanol:Água (EMA)] a temperatura ambiente com três agitações por dia. A extração para cada solvente perpassou-se três dias com uma troca de solvente por dia, totalizando doze dias, sendo três para cada solvente. O FLUXOGRAMA 3.1 (pg 25) ilustra o procedimento de formação dos extratos. A preparação dos extratos deu-se no período de fevereiro a maio de 2001.



FIGURA 3.1: Espécies de *Hortia* (*H. brasiliiana*, *H. oreadica* e *H. superba*)



FLUXOGRAMA 3.1: Preparação dos extratos das espécies de *Hortia*

- a) Extração com Hexano
- b) Extração com Diclorometano
- c) Extração com Metanol
- d) Extração com mistura de Metanol/Água na proporção de 1:1

Os extratos foram concentrados em rotaevaporador e no caso dos extratos hidroalcoólicos liofilizados; a seguir todos os extratos foram conservados em refrigerador para evitar degradação dos mesmos. As massas das partes vegetais e dos extratos obtidos a partir de cada uma delas está descrito na TABELA 3.1 (pg 25).

TABELA 3.1 - Massas obtidas de material vegetal e extratos

<i>H. brasiliana</i>		Massas de Extratos Obtidas (g)			
Material Vegetal	Massa Vegetal (g)	EH	ED	EM	EMA
Tronco	938	1,6	2,9	26,2	●
Folhas	655	16,0	21,7	25,9	●
Casca	270	1,0	1,1	5,6	●
<i>H. oreadica</i>		Massas de Extratos Obtidas (g)			
Tronco	2.475	8,2	8,4	50,6	○
Tronco Subterrâneo	3.325	85,9	67,6	244,0	●
Folhas	3.180	93,0	161,0	42,0	○
<i>H. superba</i>		Massas de Extratos Obtidas (g)			
Tronco	2.280	0,96	8,2	18,1	○
Casca	800	0,43	3,2	1,6	○

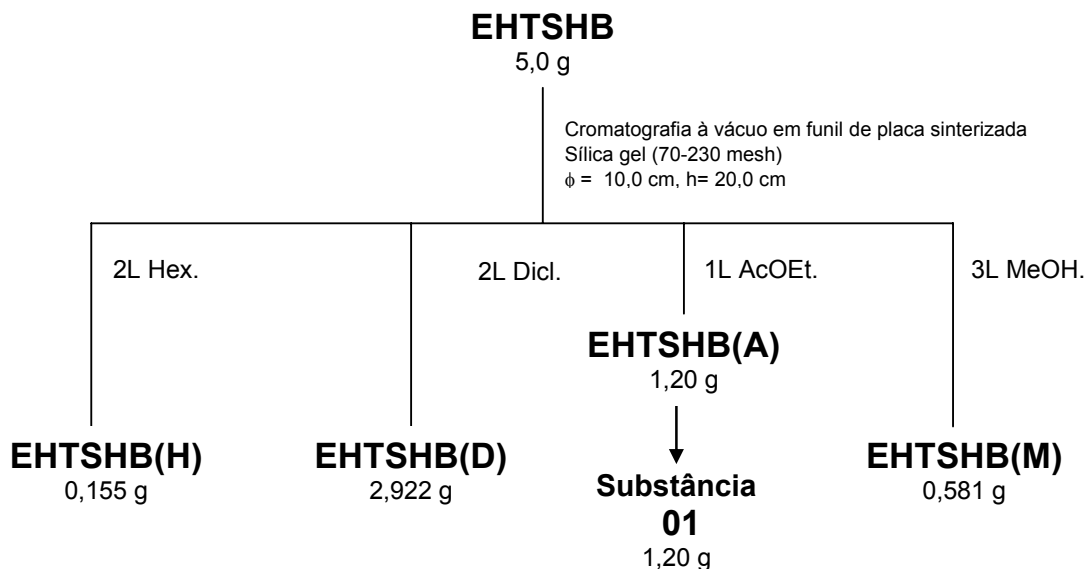
- Extratos preparados somente para ensaio biológico
- Extratos não preparados

3.1.3- Fracionamento dos Extratos e Isolamento das Substâncias de *H. oreadica*

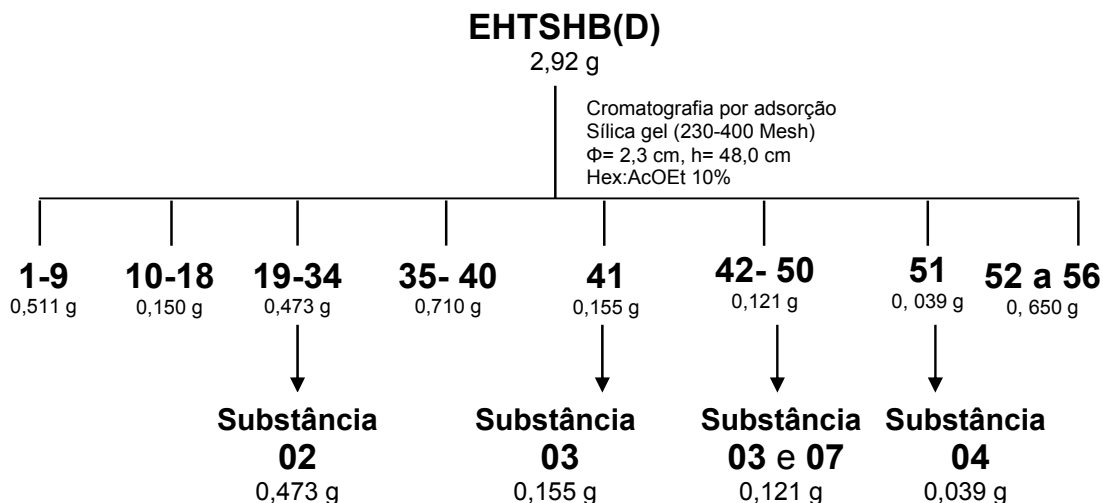
3.1.3.1- Fracionamento do Extrato Hexânico do Tronco Subterrâneo

O extrato hexânico do tronco subterrâneo de *H. oreadica* (EHTSHB) foi fracionado em um funil de placa sinterizada sob vácuo utilizando-se sílica gel 70-230 mesh, o que forneceu 4 subextratos (FLUXOGRAMA 3.2, pg 26). A partir da obtenção de um espectro de RMN de ^1H dos 4 subextratos, o subextrato EHTSHB(D) foi escolhido para refracionamento (FLUXOGRAMA 3.3, pg 27) por apresentar sinais relativos à substâncias de interesse como derivados do ácido diidrocinâmico e cumarinas.

O subextrato EHTSHB(A) proporcionou o isolamento do derivado do ácido diidrocinâmico ácido 3-fenil-[2',6'-dimetoxi-(3',4'-O:5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano]propiónico **01**. Os subextratos EHTSHB(H) e EDTSHB(M) foram refracionados mas não forneceram nenhum metabólito de interesse.



FLUXOGRAMA 3.2: Fracionamento do extrato EHTSHB

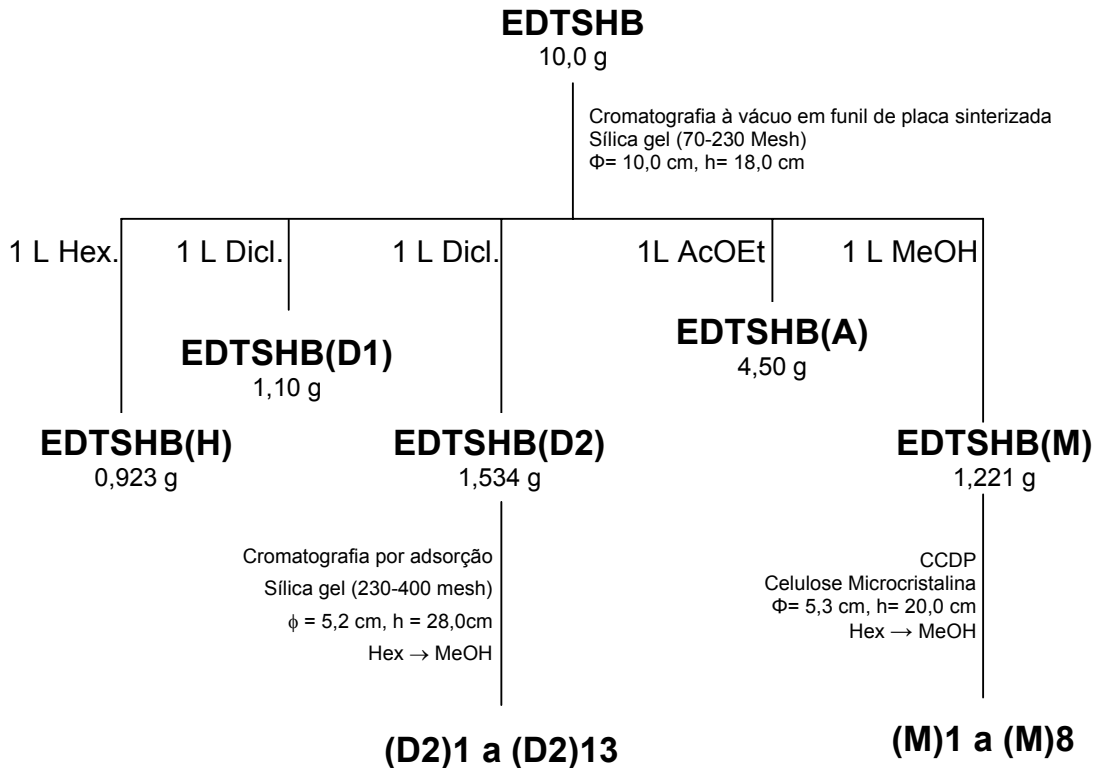


FLUXOGRAMA 3.3: Resumo do fracionamento do subextrato EHTSHB(D)

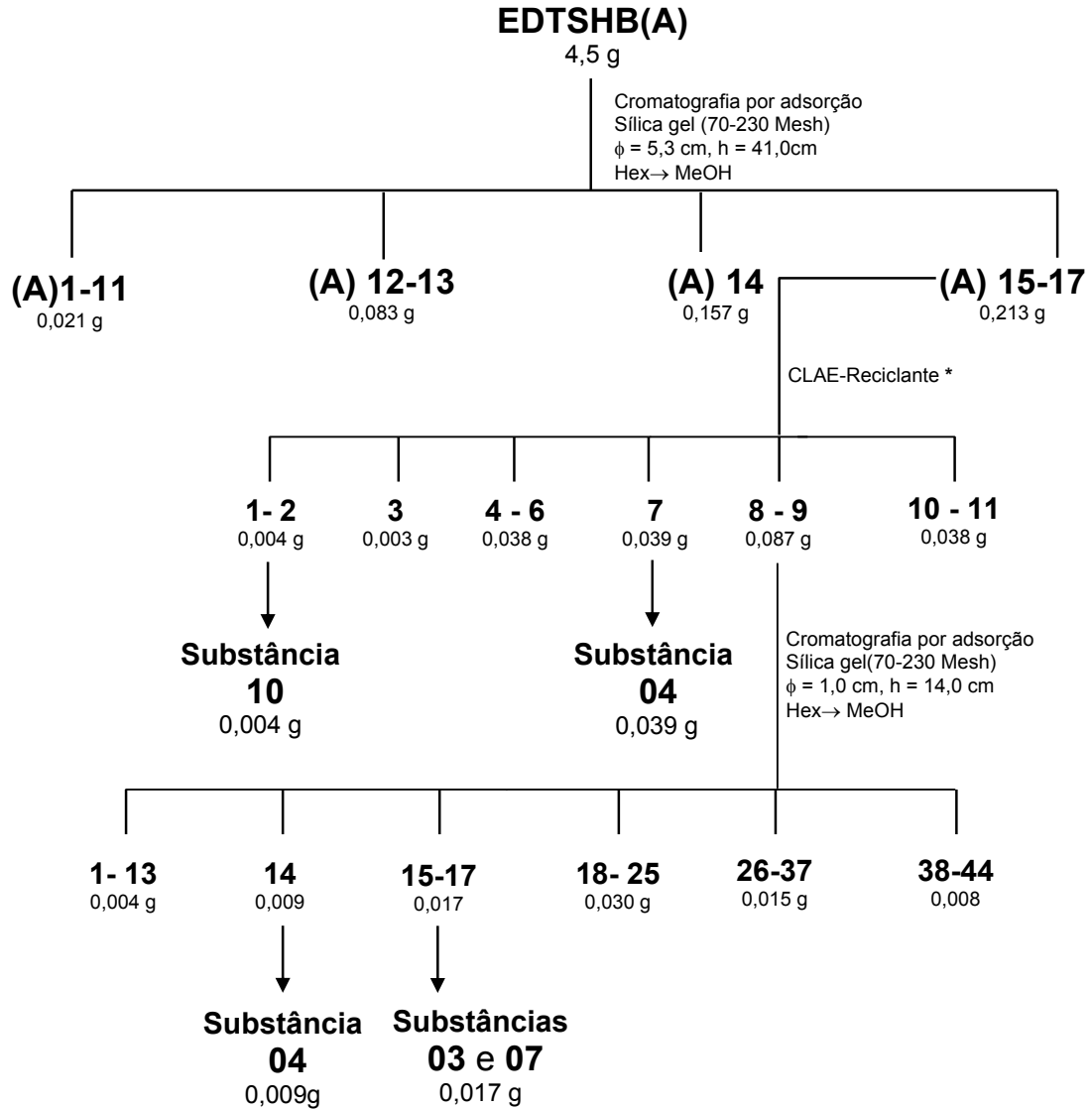
Do subextrato EHTSHB(D) foram isolados os derivados do ácido diidrocinâmico 3-fenil-[2'-metoxi-(3',4'-O:5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano]propionato de metila (**02**), 3-fenil-[2',6'-dimetoxi-(3',4'-O:5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano]propionato de metila (**03**), 3-fenil-[2',5'-dimetoxi-(3',4'-O:5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano]propionato de metila (**04**) e a mistura do derivado do ácido diidrocinâmico (**03**) com a cumarina 5-metoxiseselina (**07**).

3.1.3.2- Fracionamento do Extrato Diclorometano do Tronco Subterrâneo

O extrato diclorometano do tronco subterrâneo de *H. oreadica* (EDTSHB) foi fracionado em um funil de placa sinterizada sob vácuo utilizando-se sílica gel 70-230 mesh, o que forneceu 5 subextratos (FLUXOGRAMA 3.4, pg 28). A partir da obtenção de um espectro de RMN de ^1H dos 5 subextratos, o subextrato EDTSHB(A) foi escolhido para ser refracionado devido a presença de sinais interessantes que poderiam estar relacionados à substâncias de interesse. O espectro do subextrato EDTSHB(D1) apresentou uma quantidade elevada de material graxo e por este motivo foi reservado. O subextrato EDTSHB(D2) foi refracionado, porém nenhuma das frações provenientes foram trabalhadas. O subextrato EDTSHB(M) também foi refracionado, mas não forneceu nenhum metabólito puro.

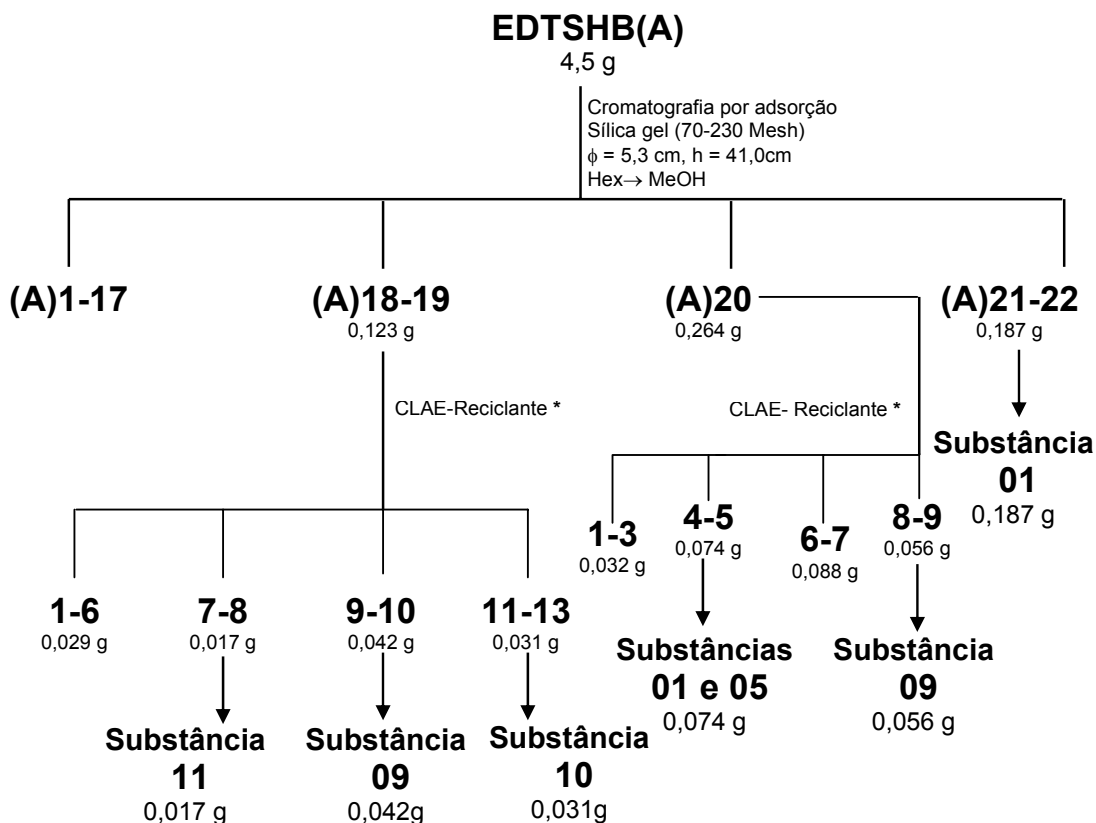


FLUXOGRAMA 3.4: Fracionamento do extrato EDTSHB

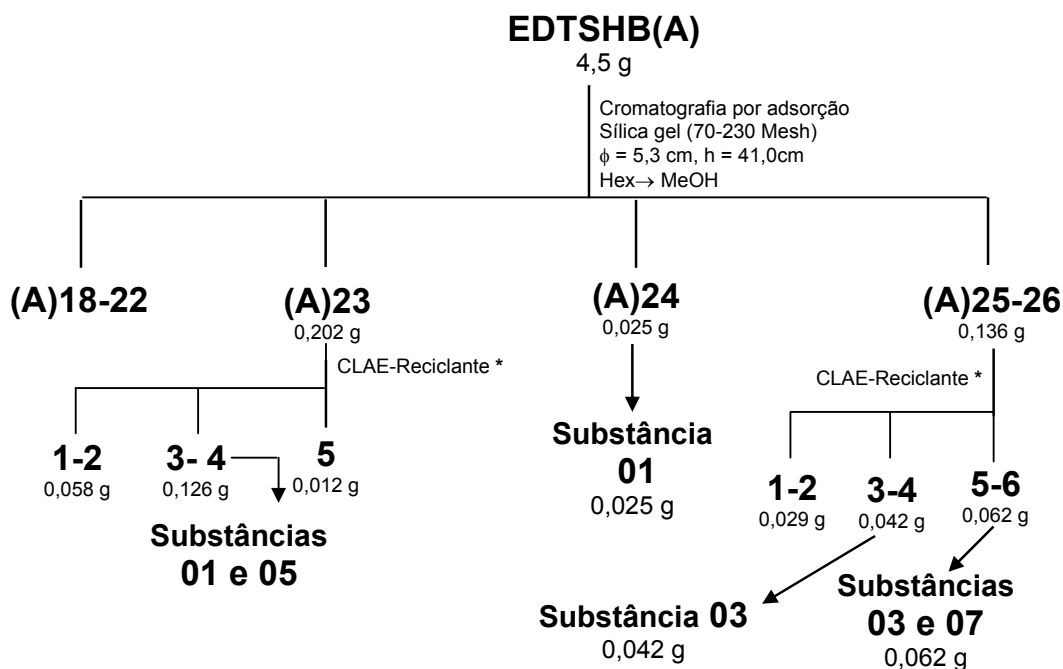


FLUXOGRAMA 3.5: Resumo do fracionamento do subextrato EDTSHB(A) e de sua fração 15-17

* Coluna Polimérica Preparativa Shodex Asahipak (45,0 x 2,5 cm, partícula de 5 μm); Loop: 500 μL
Fase Normal com Eluição Isocrática: MeOH: DiCl. 1:1; Detector UV λ : 217 e 254 nm; Vazão: 3 mL/min.

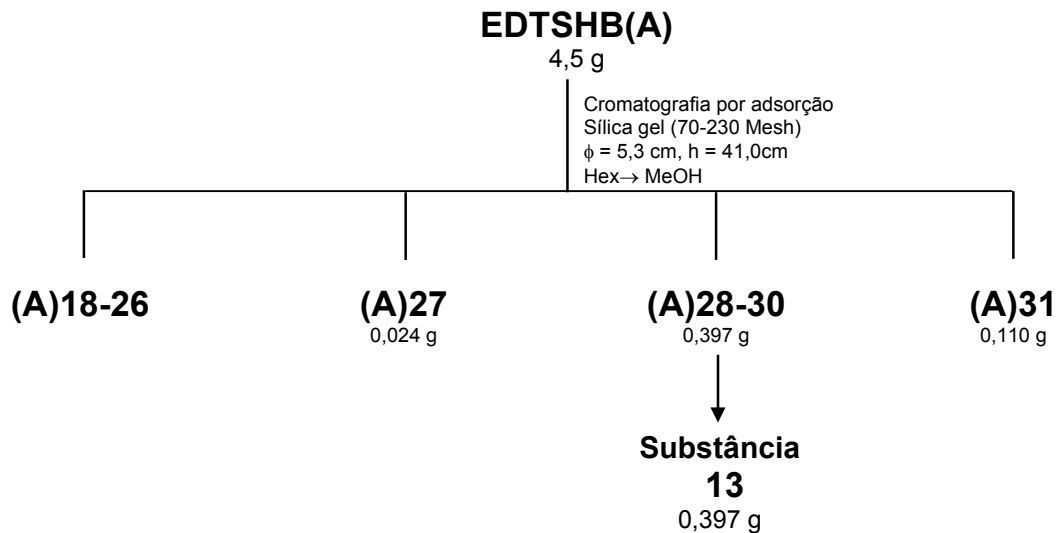


FLUXOGRAMA 3.6: Resumo do fracionamento do subextrato EDTSHB(A) e de suas frações 18-19 e 20.

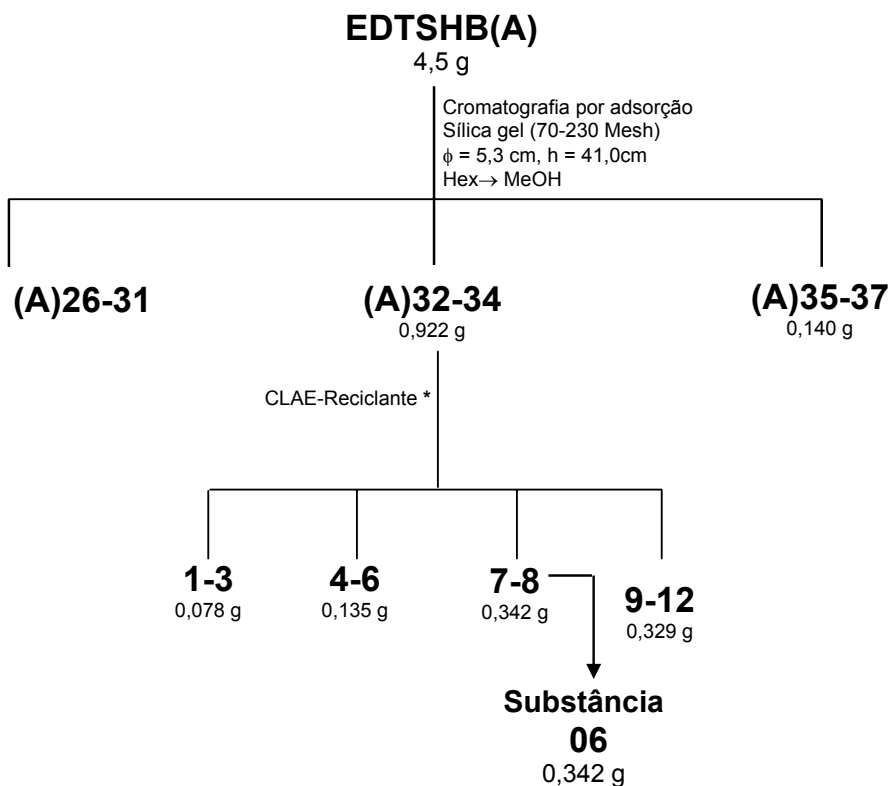


FLUXOGRAMA 3.7: Resumo do fracionamento do subextrato EDTSHB(A) e de suas frações 23 e 25-26.

* Coluna Polimérica Preparativa Shodex Asahipak (45,0 x 2,5 cm, partícula de 5 μ m); Loop: 500 μ L
Fase Normal com Eluição Isocrática: MeOH: Dicl. 1:1; Detector UV λ : 217 e 254 nm; Vazão: 3 mL/min.

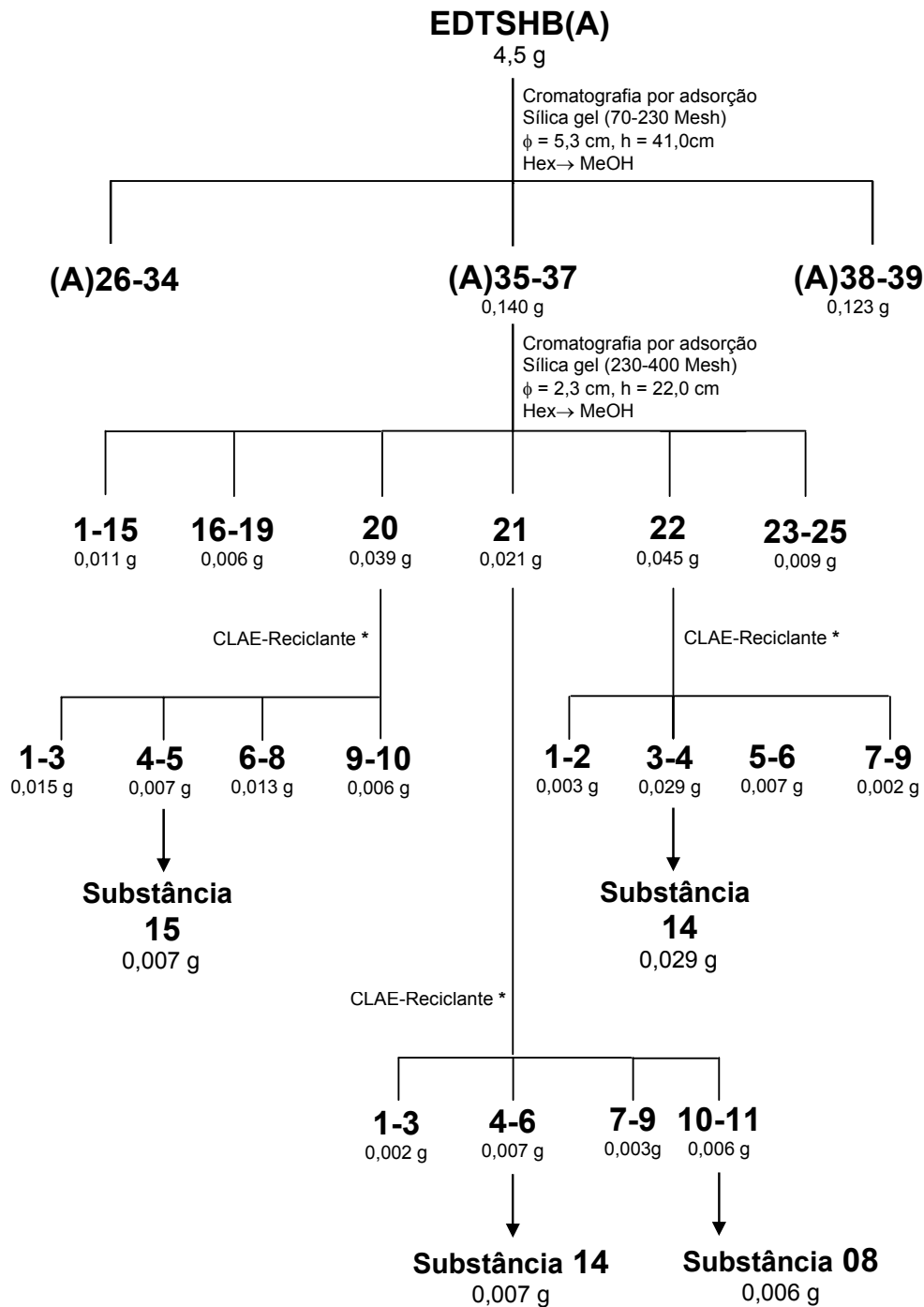


FLUXOGRAMA 3.8: Resumo do fracionamento do subextrato EDTSHB(A) e de sua fração **28-30**.



FLUXOGRAMA 3.9: Resumo do fracionamento do subextrato EDTSHB(A) e de sua fração **32-34**.

* Coluna Polimérica Preparativa Shodex Asahipak (45,0 x 2,5 cm, partícula de 5 μm), Loop: 500 μL , Fase Normal com Eluição Isocrática: MeOH: DiCl. 1:1, Detector UV λ : 217 e 254 nm, Vazão: 3 mL/min.



FLUXOGRAMA 3.10: Resumo do fracionamento do subextrato EDTSHB(A) e de sua fração 35-37.

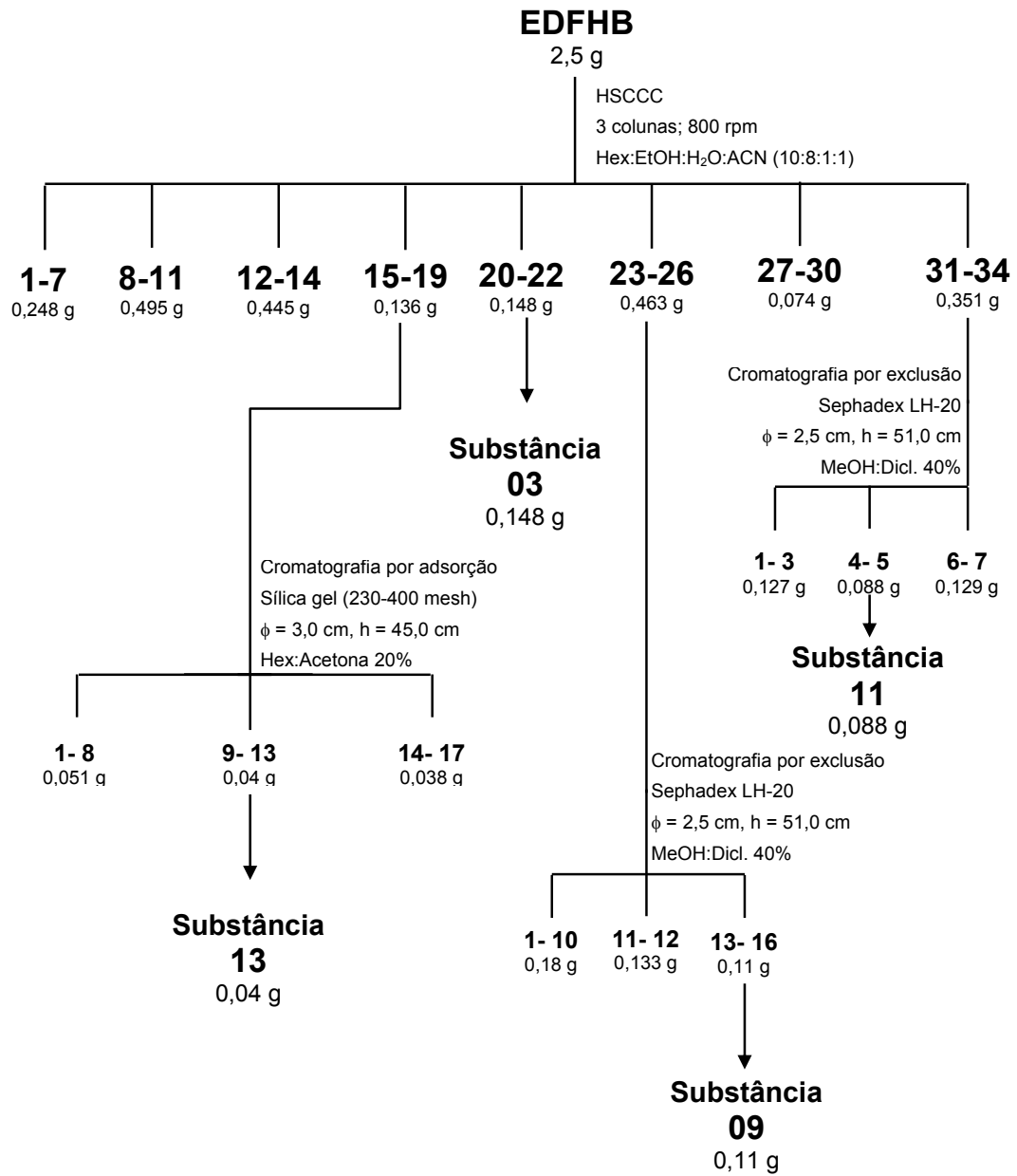
* Coluna Polimérica Preparativa Shodex Asahipak (45,0 x 2,5 cm, partícula de 5 μ m), Loop: 500 μ L, Fase Normal com Eluição Isocrática: MeOH: Dicl. 1:1, Detector UV λ : 217 e 254 nm, Vazão: 3 mL/min.

O subextrato EDTSHB(A) proveniente do extrato diclorometânico do tronco subterrâneo de *H. oreadica* foi fracionado, assim como suas frações de acordo com os FLUXOGRAMAS 3.5 a 3.10 (pgs 29 a 32). Deste subextrato foram isolados os derivados do ácido diidrocinâmico ácido 3-fenil-[2',6'-dimetoxi-(3',4'-O:5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano]propiónico **01**, 3-fenil-[2',6'-dimetoxi-(3',4'-O:5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano]propionato de metila **03**, 3-fenil-[2',5'-dimetoxi-(3',4'-O:5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano]propionato de metila **04**, a mistura ácido 3-fenil-[2',6'-dimetoxi-(3',4'-O:5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano]propiónico **01** e ácido 3-fenil-[2'-metoxi-(3',4'-O:5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano]propiónico **05**, ácido 3-fenil-[2',5'-dimetoxi-(3',4'-O:5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano]propiónico **06**, a mistura 3-fenil-[2',6'-dimetoxi-(3',4'-O:5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano]propionato de metila **03** e cumarina 5-metoxiseselina **07**; o derivado do ácido cinâmico ácido 3,4-dimetoxi- α (3-hidroxi-4-carbometoxifenil)cinâmico **08**, os alcalóides rutaecarpina **09**, 7,8-desidrorutaecarpina **10** e dictamina **11** e os limonóides guianina **13**, hortiolida E **14** e hortiolida G **15**.

3.1.3.3- Fracionamento do Extrato Diclorometano das Folhas

O extrato diclorometano das folhas foi fracionado via a técnica de HSCCC (High Speed Countercurrent Chromatography) preparativa (FLUXOGRAMA 3.11, pg 34) utilizando um sistema de solventes composto por etanol, água, acetonitrila e hexano, sendo a fase estacionária etanol, água e acetonitrila (8:1:1) e a fase móvel composta apenas por hexano. As frações obtidas a partir deste extrato foram submetidas à análise por CCDA, agrupadas de acordo com as similaridades e a seguir refracionadas.

Assim, este extrato proporcionou o isolamento do derivado do ácido diidrocinâmico 3-fenil-[2',6'-dimetoxi-(3',4'-O:5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano]propionato de metila **03**, dos alcalóides rutaecarpina **09** e dictamina **11** e do limonóide guianina **13**.

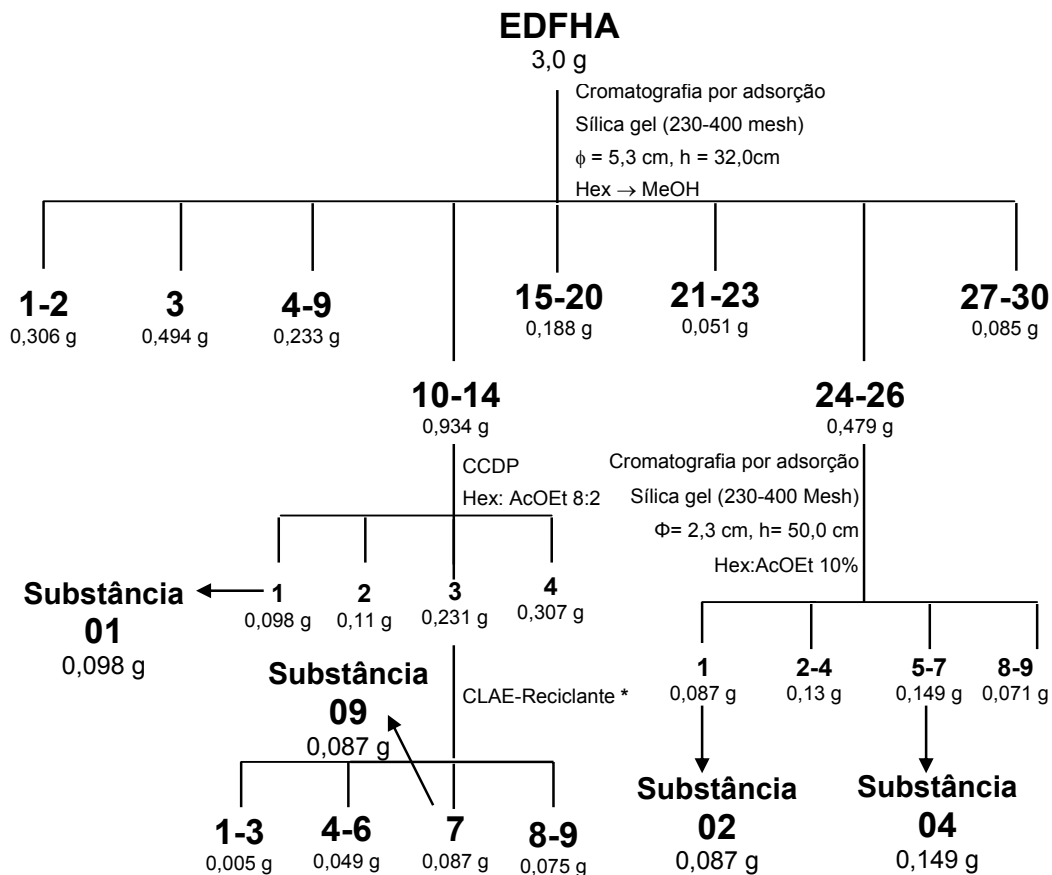


FLUXOGRAMA 3.11: Resumo do fracionamento do extrato EDFHB e de suas frações 15-19, 23-26 e 31-34.

3.1.4- Fracionamento do Extrato e Isolamento das Substâncias de *H. brasiliana*

3.1.4.1- Fracionamento do Extrato Diclorometano das Folhas

O extrato diclorometano das folhas foi estudado fitoquimicamente utilizando diversas técnicas cromatográficas. O fracionamento levou ao isolamento dos derivados do ácido diidrocinâmico ácido 3-fenil-[2', 6'-dimetoxi-(3', 4'-O:5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano]propionico **01**, 3-fenil-[2'-metoxi-(3',4'-O:5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano]propionato de metila **02**, 3-fenil-[2',5'-dimetoxi-(3',4'-O:5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano]propionato de metila **04** e do alcalóide rutaecarpina **09**. O FLUXOGRAMA 3.12 (pg 34) mostra de forma resumida como este estudo foi realizado.



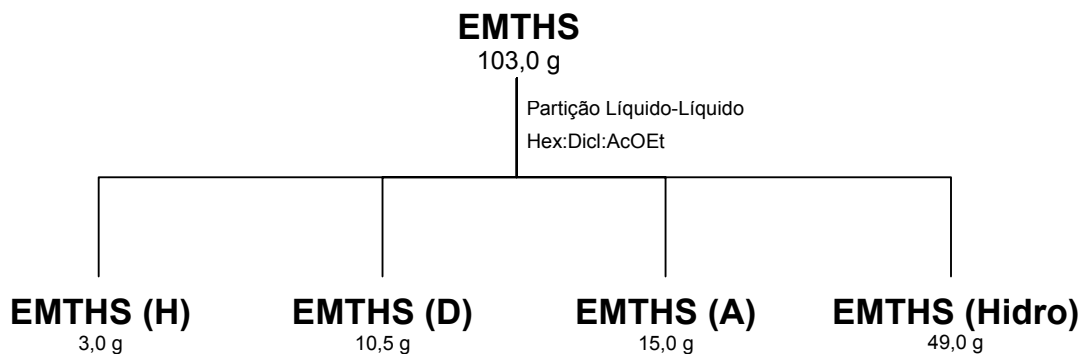
FLUXOGRAMA 3.12: Resumo do fracionamento do extrato EDFHA e de suas frações **10-14** e **24-26**.

* Coluna Polimérica Preparativa Shodex Asahipak (45,0 x 2,5 cm, partícula de 5 µm); Loop: 500 µL
Fase Normal com Eluição Isocrática: MeOH: DiCl. 1:1; Detector UV λ: 217 e 254 nm.; Vazão: 3 mL/min.

3.1.5- Fracionamento do Extrato e Isolamento das Substâncias de *H. superba*

3.1.5.1- Fracionamento do Extrato Metanólico do Tronco

O extrato metanólico do tronco foi submetido à partição líquido-líquido, gerando quatro frações: fração hexano (EMTHS-H), fração diclorometano (EMTHS-D), fração acetato de etila (EMTHS-A) e fração hidroalcoólica (EMTHS-Hidro), de acordo com o FLUXOGRAMA 3.13 (pg 35). A partir da obtenção de um espectro de RMN de ^1H das quatro frações, a fração EMTHS(D) foi escolhida para refractionamento por apresentar sinais relativos à substâncias de interesse como alcalóides e cumarinas. O espectro de EMTHS(H) apresentou quantidade relevante de material graxo e por este motivo a fração foi reservada. As frações EMTHS(A) e EMTHS(hidro) também foram reservadas para serem refractionadas posteriormente.

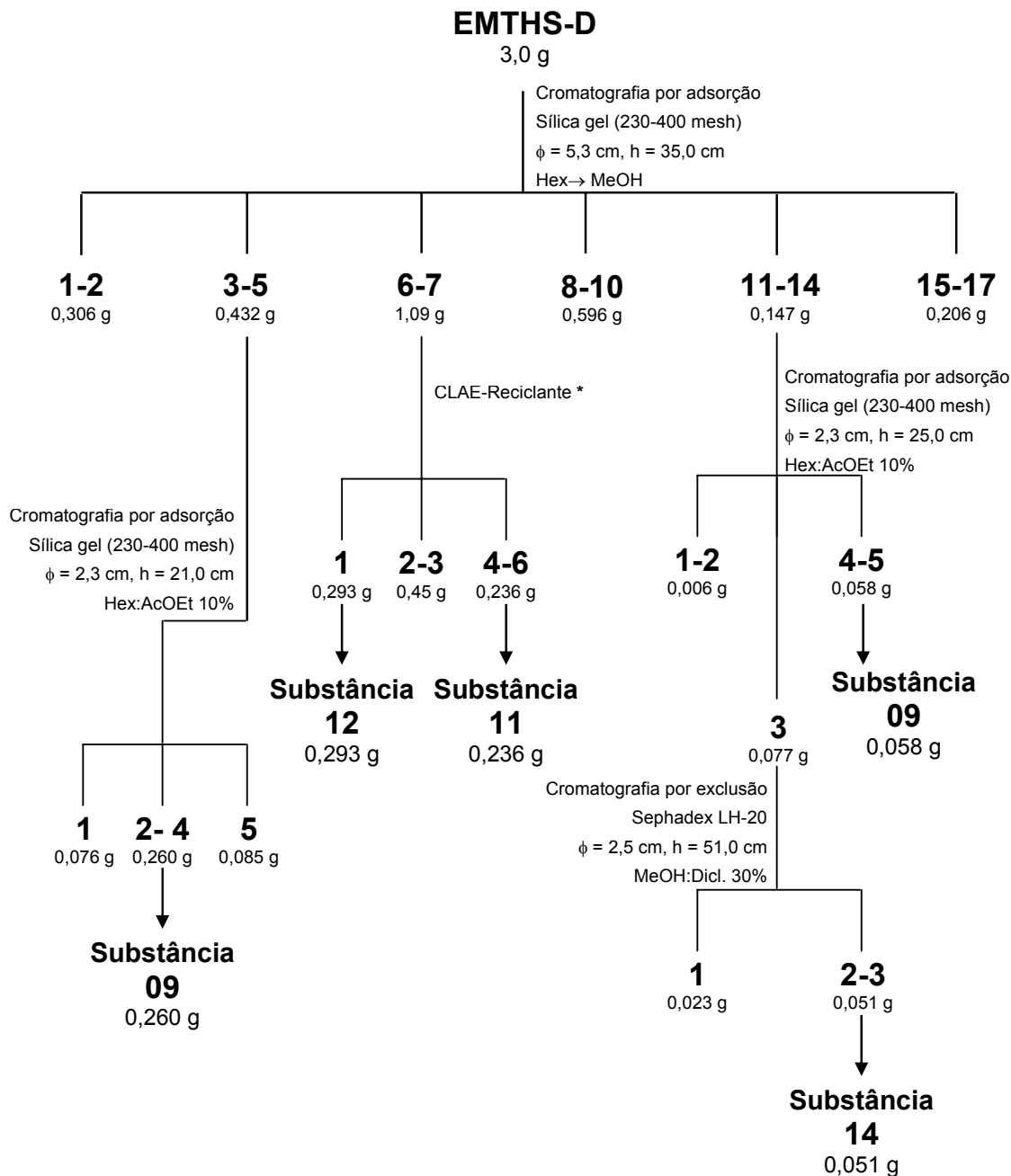


FLUXOGRAMA 3.13: Particionamento do extrato EMTHS

3.1.5.2- Fracionamento da Fração Diclorometano do Extrato Metanólico do Tronco

A fração diclorometano do extrato metanólico do tronco (EMTHS-D) foi estudada fitoquimicamente utilizando diversas técnicas cromatográficas (FLUXOGRAMA 3.14, pg 36). O fracionamento levou ao isolamento dos

alcalóides rutaecarpina **09**, dictamina **11**, N-metilflindersina **12** e do limonóide hortiolida E **14**.



FLUXOGRAMA 3.14: Resumo do fracionamento do extrato EMTHS-D e de suas frações **3-5**, **6-7** e **11-14**.

* Coluna Polimérica Preparativa Shodex Asahipak (45,0 x 2,5 cm, partícula de 5 μ m), Loop: 500 μ L, Fase Normal com Eluição Isocrática: MeOH: Dicl. 1:1, Detector UV λ : 217 e 254 nm, Vazão: 3 mL/min.

3.2- RESULTADOS E DISCUSSÃO

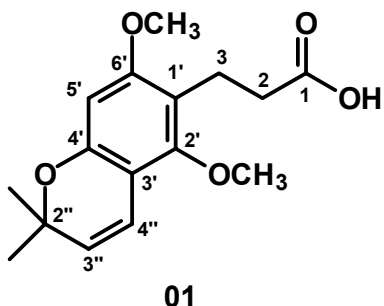
3.2.1 – Derivados do Ácido Diidrocinâmico

Os derivados do ácido diidrocinâmico são de ocorrência na família Rutaceae, sendo descritos em literatura para os gêneros *Adiscanthus* (VIEIRA *et al.*, 1980), *Drummondita* (RASHID *et al.*, 1992), *Geleznovia* (RASHID *et al.*, 1991), *Eriostemon* (SARKER *et al.*, 1994a, SARKER *et al.*, 1994b, SARKER *et al.*, 1995a, SARKER *et al.*, 1995b) e *Micromelum* (RAHMANI *et al.*, 1994). Para o gênero *Hortia* estão descritos na literatura 15 derivados do ácido diidrocinâmico, sendo os mesmos isolados de *H. badinii* (CORREA *et al.*, 1975; CORREA *et al.*, 1979), *H. regia* (TINTO, 1992), *H. colombiana* (SUAREZ, *et al.*, 2002), *H. oreadica* (BRAGA, 2005) e *H. brasiliiana* (BRAGA, 2005).

Neste estudo foram isolados seis derivados do ácido diidrocinâmico, sendo que os derivados **01** a **05** já aparecem descritos em literatura para o gênero *Hortia* e o **06** parece ser inédito até o momento para a espécie *H. oreadica*. Também foi isolado em mistura o derivado do ácido diidrocinâmico **03** com a cumarina **07**, já conhecida na literatura como 5-metoxiseselina.

3.2.1.1- Determinação estrutural da substância 01

A substância **01** foi isolada dos extratos hexânico e diclorometano do tronco de *H. oreadica* e do extrato diclorometano das folhas de *H. brasiliiana* e sua estrutura foi determinada com base em espectros de RMN tais como de ^1H , ^{13}C , HMBC, HSQC; CG-EM e também por comparação com dados da literatura (CORRÊA, *et al.*, 1975; VIEIRA, *et al.*, 1980).



O espectro de RMN de ^1H de **01** (FIGURA 3.2, pg 41) mostra dois sinais em δ 2,89 (2H, t) e δ 2,57 (2H, t) referentes aos hidrogênios metilênicos H-3 e H-2, respectivamente. Em δ 3,74 (3H, s) e 3,77 (3H, s) observam-se os sinais de duas metoxilas aromáticas e em δ 1,42 (6H, s) observa-se a presença do sinal referente as duas metilas características do anel cromeno. Em δ 6,49 (1H, d, $J=9,9$ Hz) e em δ 5,48 (1H, d, $J=9,9$ Hz) observam-se os sinais referentes aos hidrogênios do anel cromeno. Em δ 6,20 (1H, s) observa-se o sinal de um hidrogênio aromático.

O espectro de RMN de ^{13}C (FIGURA 3.3, pg 41) apresenta sinais de 16 carbonos para a molécula, cujos valores podem ser observados na TABELA 3.2 (pg 40). A presença de sinal em δ 178,7 indica a presença de uma carboxila na molécula.

O experimento de HSQC (FIGURA 3.4, pg 42) mostra a correlação a J^1 de H-2 em δ 2,57 com C-2 em δ 33,9 e de H-3 em δ 2,89 com C-3 em δ 18,8. As metilas do carbono C-2'' mostram correlação com o sinal em δ 27,8 e as metoxilas em δ 3,74 e δ 3,77 mostram correlação a J^1 com os carbonos em δ 62,4 e em δ 55,5, respectivamente.

No experimento de HMBC (FIGURA 3.5, pg 42) as metilas em C-2'' mostram correlação entre si (δ 27,8), com um sinal em δ 76,1 atribuído ao carbono carbinólico C-2'' e com um sinal em δ 127,2, atribuído ao C-3''. O hidrogênio H-2 (δ 2,57) mostra correlação com C-3 em δ 18,8, com a carboxila em δ 178,7 e com um sinal de um carbono quaternário em δ 113,7 que foi atribuído ao C-1'. O hidrogênio H-3 mostra correlação com C-2 em δ 33,9, com C-1' em δ 113,7, com C-1 (δ 178,7) e com dois sinais de carbono quaternário referentes aos C-2' (δ 155,1) e C-6' (δ 158,8).

Na estrutura **01** as metoxilas estão posicionadas nos carbonos C-6' e C-2', sendo o sinal de hidrogênio aromático em δ 6,20 atribuído ao H-5'. Pelo HSQC, ao C-5' foi atribuído o sinal em δ 96,0. No experimento de HMBC, H-5' (δ 6,20) mostra correlação com C-1' (δ 113,7), com C-6' (δ 158,8), que suporta a metoxila em δ 3,77. O hidrogênio H-4'' mostra correlação com C-2'' (δ 76,1), com C-2' (δ 155,1) e com C-4' (δ 153,2).

O espectro de massas da substância **01** (FIGURA 3.6, pg 43) apresentou o pico do íon molecular em m/z 292, estando compatível com a

fórmula molecular $C_{16}H_{20}O_5$. O esquema 3.1 (pg 43) mostra a proposta de fragmentação da substância **01**.

Assim, pode-se determinar que a estrutura **01** é um derivado do ácido diidrocínâmico com função ácido carboxílico, sendo o ácido 3-fenil-[2',6'-dimetoxi-(3',4'-O:5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano]propiónico.

TABELA 3.2: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **01** e comparação com a literatura

H/C	SUBSTÂNCIA 01 (400/100 MHz, CDCl_3)		Braga, 2005 (400/100 MHz, CDCl_3)	
	δ (ppm), <i>J</i> (Hz)	δ (ppm)	δ (ppm), <i>J</i> (Hz)	δ (ppm)
1	-	178,7	-	178,7
2	2,57 (2H, <i>t</i> , <i>J</i> =7,6)	33,9	2,57 (2H, <i>m</i>)	33,9
3	2,89 (2H, <i>t</i> , <i>J</i> =7,6)	18,8	2,89 (2H, <i>m</i>)	18,8
1'	-	113,7	-	113,7
2'	-	155,1	-	155,1
3'	-	107,7	-	107,7
4'	-	153,2	-	153,2
5'	6,20 (1H, <i>s</i>)	96,0	6,20 (1H, <i>s</i>)	96,0
6'	-	158,8	-	158,8
4''	6,49 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =10,0)	117,3	6,49 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =10,0)	117,3
3''	5,48 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =10,0)	127,2	5,48 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =10,0)	127,2
2''	-	76,1	-	76,1
2''-Me	1,42 (6H, <i>s</i>)	27,8	1,42 (6H, <i>s</i>)	27,8
2'-OMe	3,74 (3H, <i>s</i>)	62,4	3,74 (3H, <i>s</i>)	62,4
6'-OMe	3,77 (3H, <i>s</i>)	55,5	3,77 (3H, <i>s</i>)	55,5

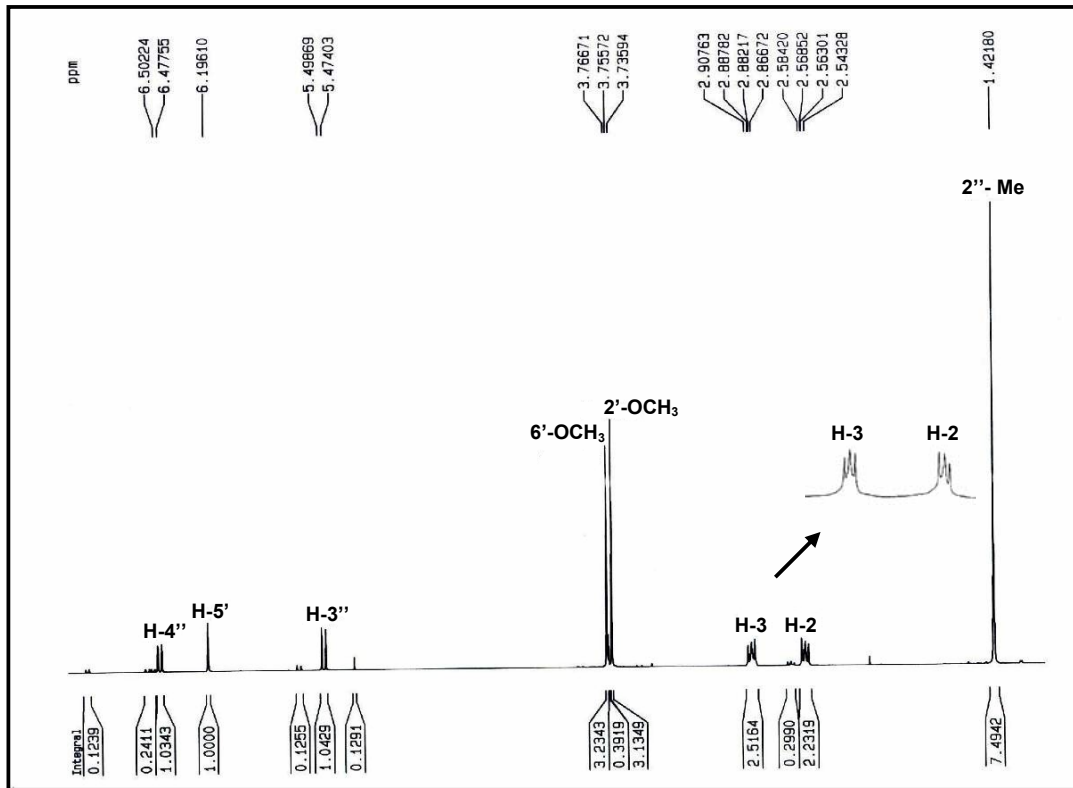


FIGURA 3.2: Espectro de RMN de ¹H de **01** (CDCl₃, 400 MHz)

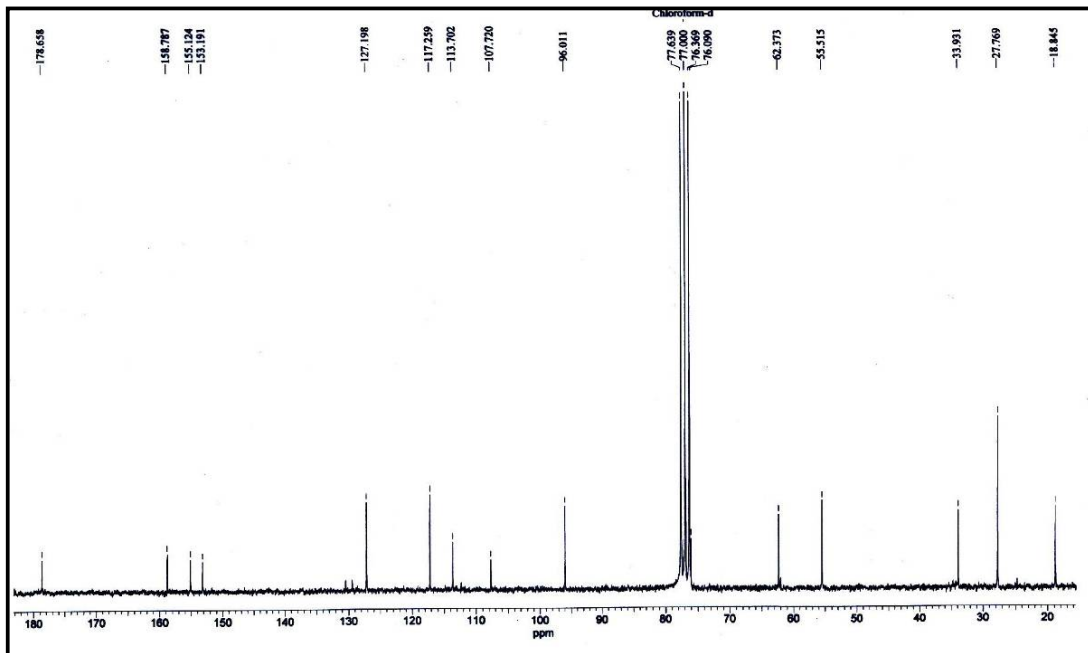


FIGURA 3.3: Espectro de RMN de ¹³C de **01** (CDCl₃, 100 MHz)

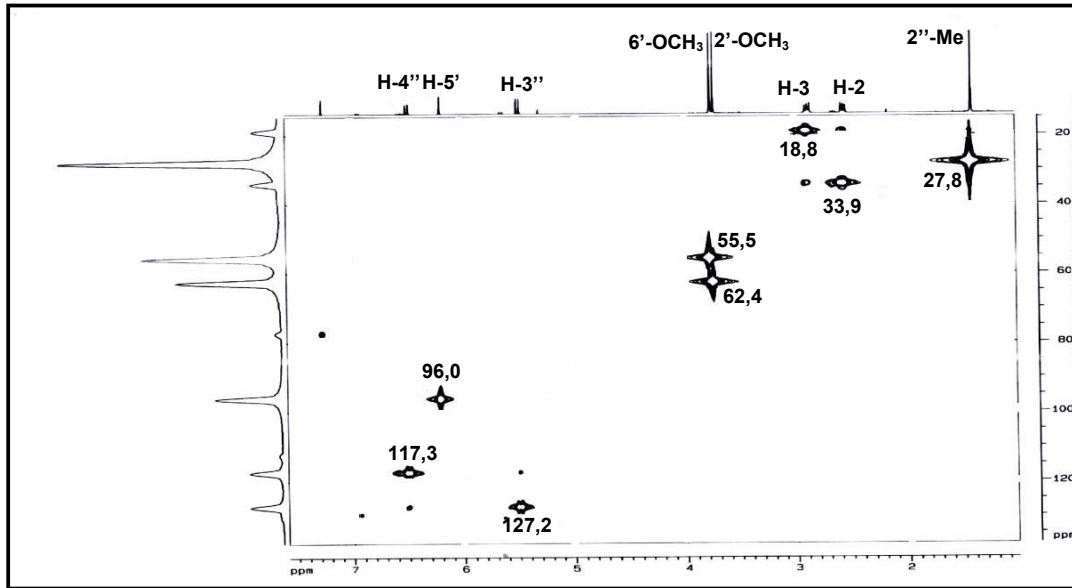


FIGURA 3.4: Mapa de contorno de g-HSQC de **01** (CDCl₃, 400 MHz)

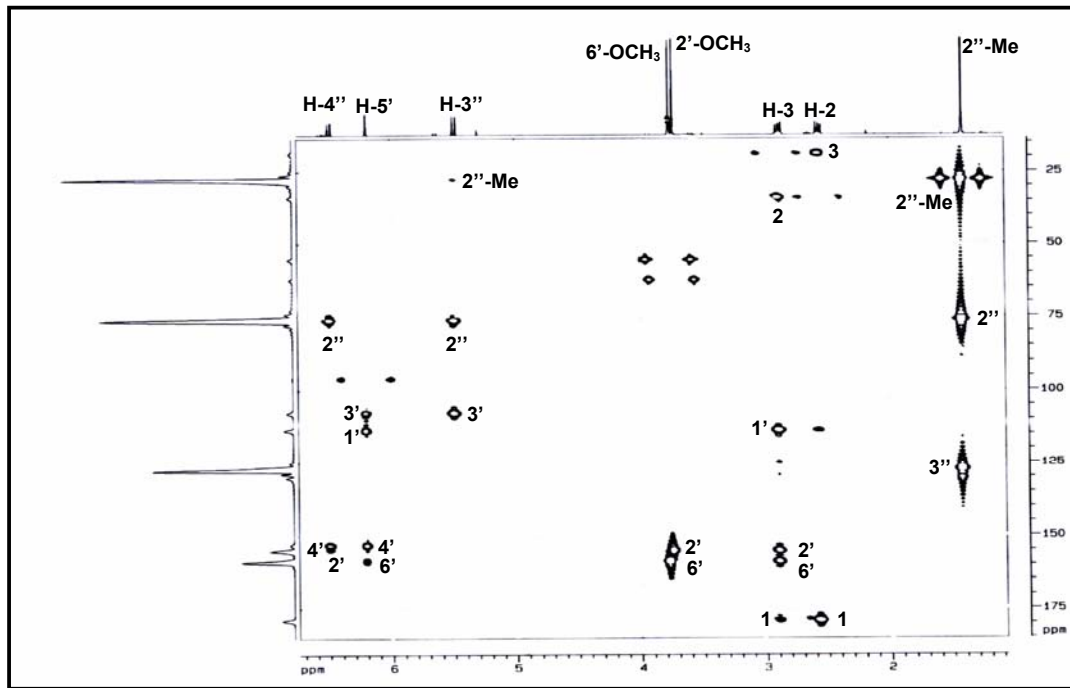


FIGURA 3.5: Mapa de contorno g-HMBC de **01** (CDCl₃, 400 MHz)

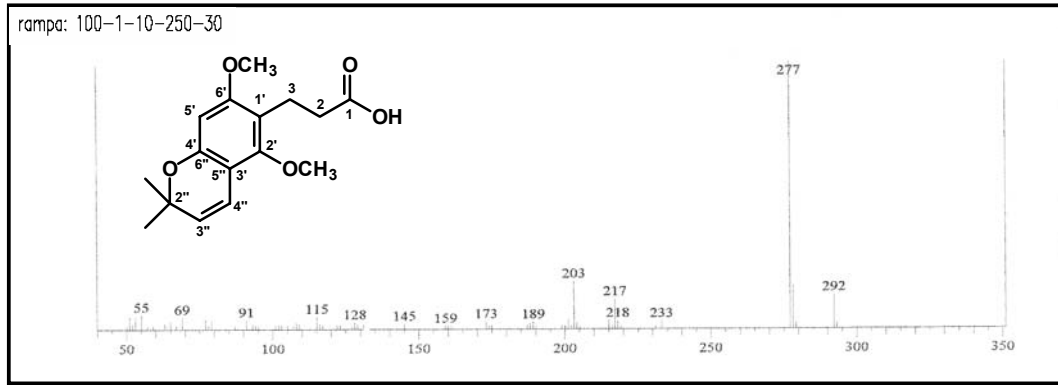
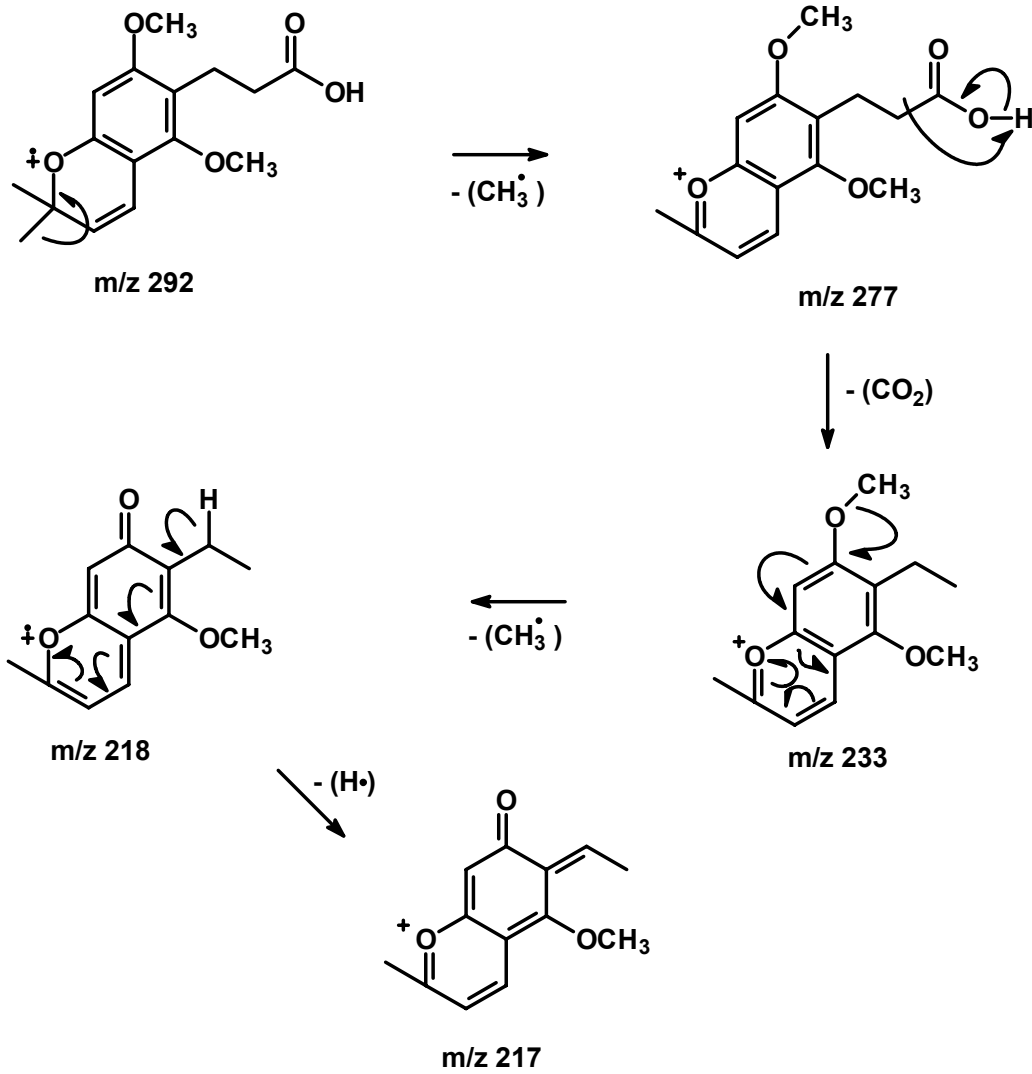


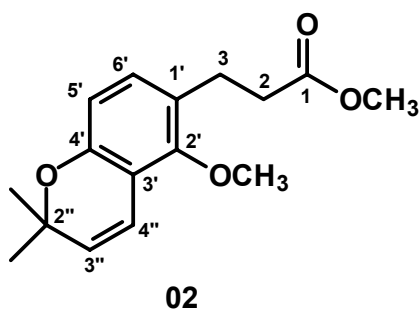
FIGURA 3.6: Espectro de massas de **01** (IE-70eV)



ESQUEMA 3.1: Proposta de fragmentação para **01**

3.2.1.2- Determinação estrutural da substância 02

A substância **02** foi isolada do extrato hexânico do tronco subterrâneo de *H. oreadica* e do extrato diclorometano das folhas de *H. brasiliana*, sendo que para esta última espécie é a primeira vez que é encontrada. Sua estrutura foi determinada com base em espectros de RMN de ^1H , ^{13}C , HMBC, HSQC como também através da comparação com dados da literatura (SUAREZ, *et al.*, 2002).



O espectro de RMN de ^1H de **02** (FIGURA 3.7, pg 47) mostra dois sinais em δ 2,86 (2H, *t*, $J=7,5$ Hz) e δ 2,59 (2H, *t*, $J=7,5$ Hz) referentes aos hidrogênios metilênicos H-3 e H-2, respectivamente. Em δ 3,67 (3H, *s*) e δ 3,75 (3H, *s*) observam-se os sinais de duas metoxilas e em δ 1,42 (6H, *s*) observa-se a presença de um sinal referente as duas metilas características do anel cromeno. Em δ 6,91 (1H, *d*, $J=8,3$ Hz) e em δ 6,52 (1H, *dd*, $J=8,3$ e 0,7 Hz) observam-se os sinais referentes aos hidrogênios aromáticos e em δ 5,63 (1H, *d*, $J=10,0$ Hz) e em δ 6,56 (1H, *dd*, $J=10,0$ e 0,7 Hz) observam-se a presença dos hidrogênios do anel cromeno.

O espectro de RMN de ^{13}C (FIGURA 3.8, pg 47) apresenta sinais de 16 carbonos para a molécula, cujos valores podem ser observados na TABELA 3.3 (pg 46).

O espectro de HSQC (FIGURA 3.9, pg 48) mostra a correlação a J^1 de H-2 em δ 2,59 com C-2 em δ 34,8 e de H-3 em δ 2,86 com C-3 em δ 24,9. As metilas ligadas ao carbono C-2'' mostram correlação com o sinal em δ 27,6 e as metoxilas em δ 3,68 e em δ 3,75 mostram correlação a J^1 com os carbonos em δ 51,4 e em δ 61,9, respectivamente.

No espectro de HMBC (FIGURA 3.10, pg 48) as metilas do anel cromeno mostram correlação entre si (δ 27,6), com um sinal em δ 75,4 atribuído ao carbono carbinólico C-2'' e com um sinal em δ 130,3, podendo somente ser atribuído ao C-3''. O hidrogênio H-2 (δ 2,59) mostra correlação com C-3 em δ 24,9, com a carboxila do éster em δ 173,5 e com um sinal em δ 125,0 que foi atribuído ao C-1'. O hidrogênio H-3 mostra correlação com C-2 em δ 34,8, com C-1' em δ 125,0, com um sinal relativo a um carbono de CH em δ 129,3, podendo somente ser atribuído ao C-6'.

Ainda é possível observar para H-3 a correlação com um sinal em δ 154,2 atribuído ao C-2' e com C-1 em δ 173,5. A metoxila em δ 3,67 mostra correlação com C-1 em δ 173,5 e a outra em δ 3,75 mostra correlação com C-2' em δ 154,2, o que permite atribuir a segunda ao anel aromático. Além disso, sugere-se a correção da atribuição feita na literatura onde os valores de C-4' e C-2' estão trocados (SUAREZ *et al.*, 2002)

Através da análise do HSQC, sabendo-se o valor de C-6' (δ 129,3), pode-se atribuir o dubleto em δ 6,91 ao H-6'. No HMBC, H-6' mostra correlação com C-3 (δ 24,9), com C-2' (δ 154,2) e com um sinal em δ 152,5 atribuído ao C-4'. No HMBC H-5' mostra correlação com C-1' (δ 125,0), com C-3' (δ 152,5) e com um sinal de carbono quaternário em δ 114,7 atribuído ao C-3'. O hidrogênio H-4'', atribuído ao sinal em δ 6,56, mostra correlação com C-2'' (δ 75,4), C-4' (δ 152,5), com C-2' (δ 154,3) e com C-3' (δ 114,7).

Desta forma foi possível determinar a estrutura **02** como sendo o 3-fenil-[2'-metoxi-(3',4'-O:5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano]propionato de metila.

TABELA 3.3: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **02** e comparação com a literatura

H/C	SUBSTÂNCIA 02 (400/100 MHz, CDCl_3)		SUAREZ, 2002 (300/75 MHz, CDCl_3)	
	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm)	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm)
1	-	173,5	-	173,7
2	2,59 (2H, <i>t</i> , $J=7,5$)	34,8	2,59 (2H, <i>t</i> , $J=7,5$)	34,9
3	2,86 (2H, <i>t</i> , $J=7,5$)	24,9	2,86 (2H, <i>t</i> , $J=7,5$)	24,9
1'	-	125,0	-	125,1
2'	-	154,2	-	152,5
3'	-	114,7	-	114,8
4'	-	152,5	-	154,3
5'	6,52 (1H, <i>dd</i> , $J=8,3$ e $0,7$)	112,2	6,52 (1H, <i>d</i> , $J=8,3$)	112,3
6'	6,91 (1H, <i>d</i> , $J=8,3$)	129,3	6,92 (1H, <i>d</i> , $J=8,3$)	129,4
4''	6,56 (1H, <i>dd</i> , $J=10,0$ e $0,7$)	117,2	6,56 (1H, <i>d</i> , $J=10,0$)	117,2
3''	5,63 (1H, <i>d</i> , $J=10,0$)	130,3	5,63 (1H, <i>d</i> , $J=10,0$)	130,4
2''	-	75,4	-	75,6
2''-Me	1,42 (6H, <i>s</i>)	27,6	1,42 (6H, <i>s</i>)	27,7
1-OMe	3,67 (3H, <i>s</i>)	51,4	3,68 (3H, <i>s</i>)	51,6
2'-OMe	3,75 (3H, <i>s</i>)	61,9	3,75 (3H, <i>s</i>)	62,1

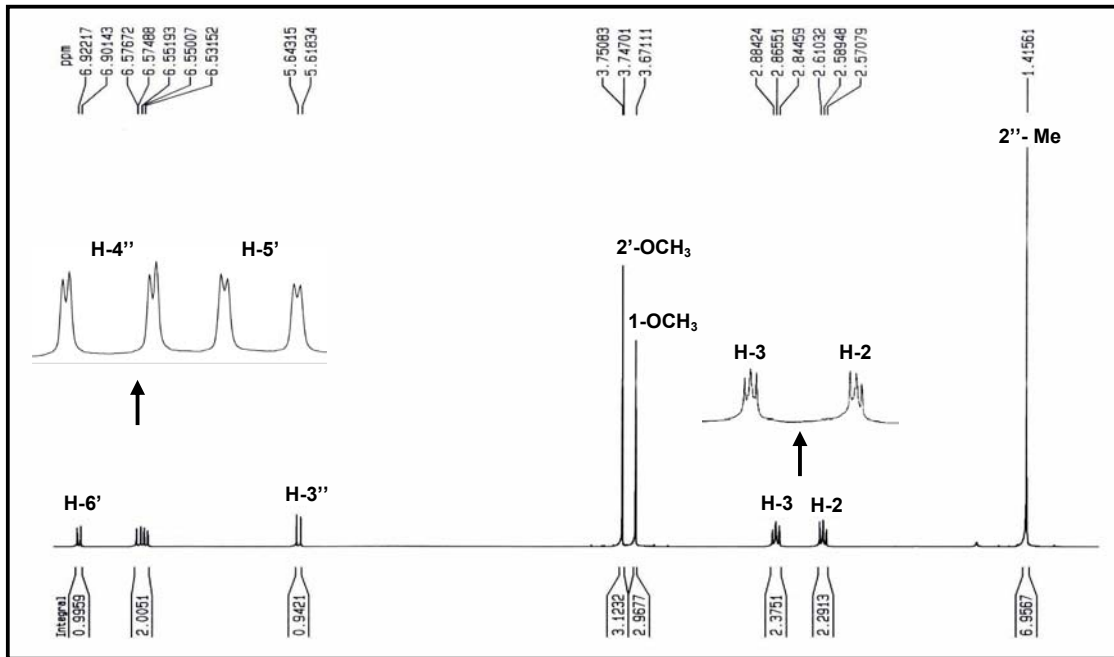


FIGURA 3.7: Espectro de RMN de ^1H de **O2** (CDCl_3 , 400 MHz)

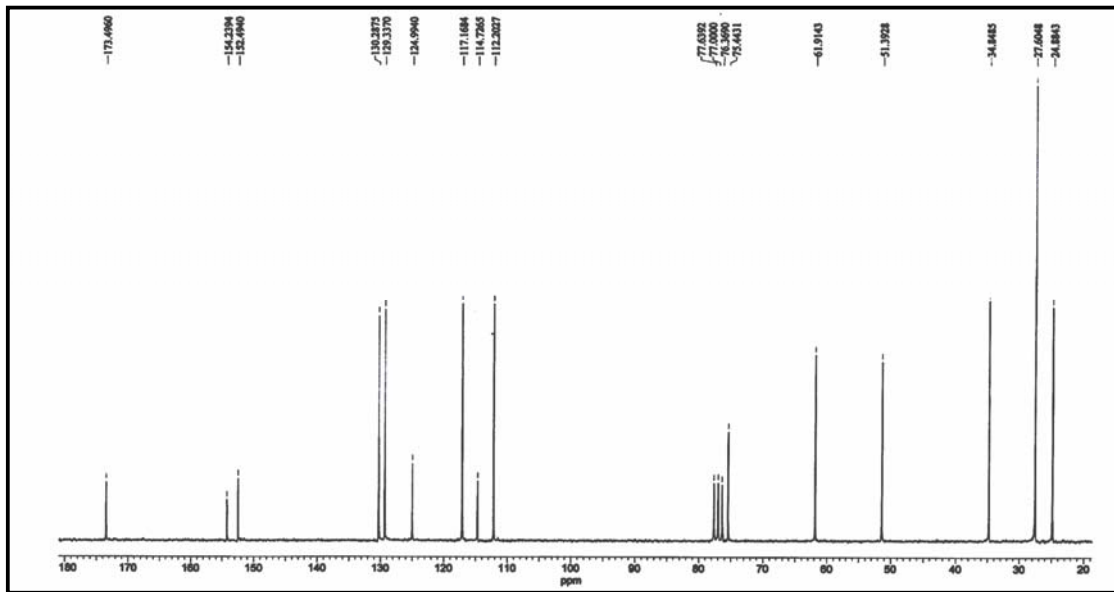


FIGURA 3.8: Espectro de RMN de ^{13}C de **O2** (CDCl_3 , 100 MHz)

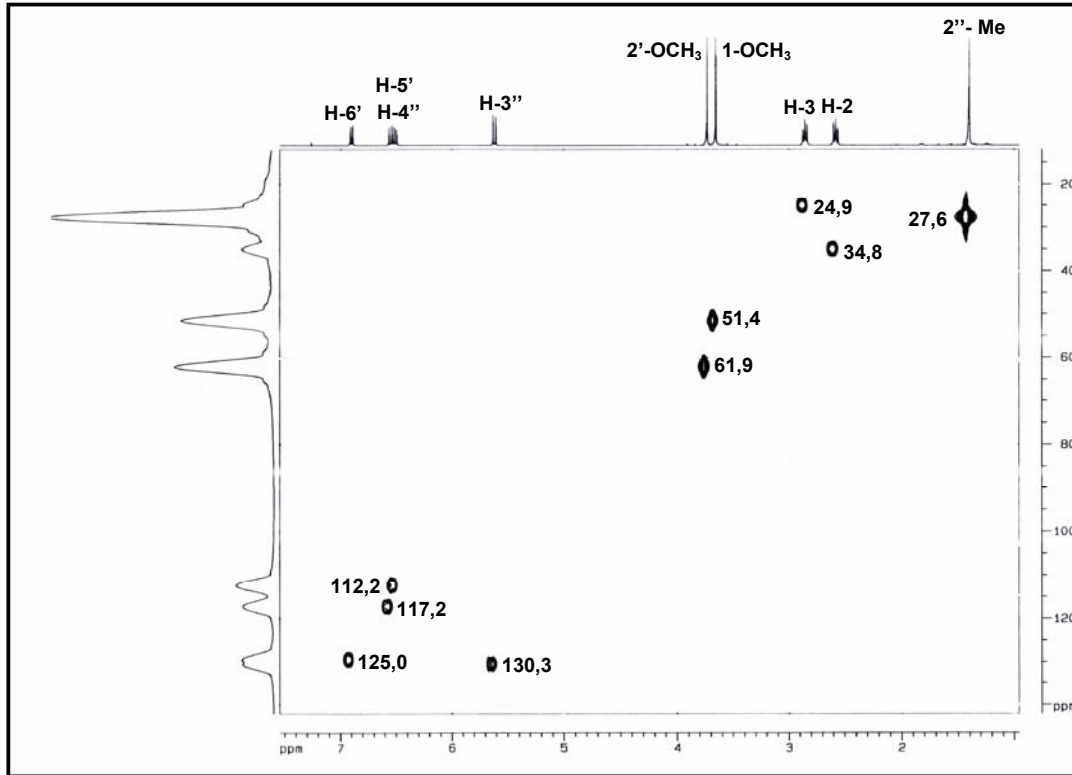


FIGURA 3.9: Mapa de contorno de g-HSQC de **02** (CDCl_3 , 400 MHz)

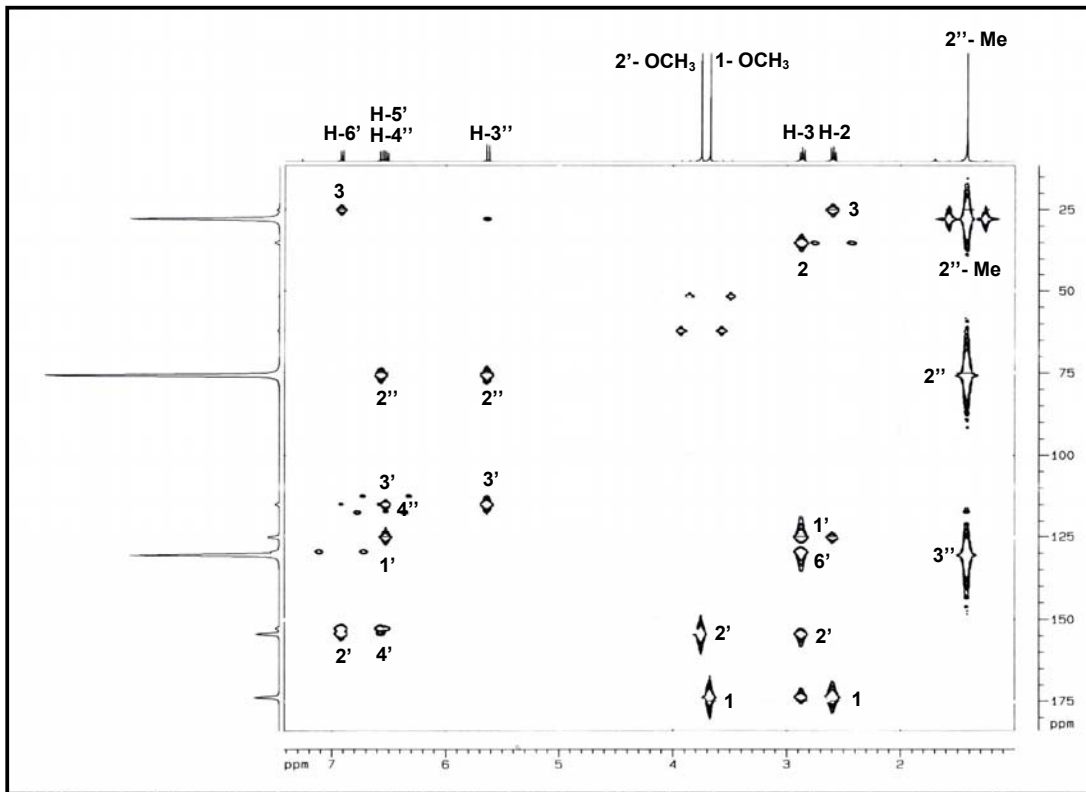
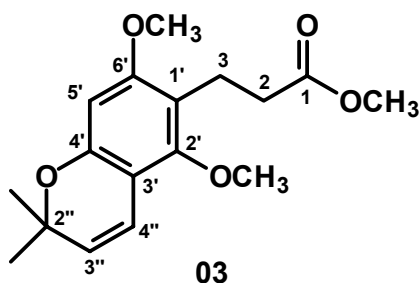


FIGURA 3.10: Mapa de contorno de g-HMBC de **02** (CDCl_3 , 400 MHz)

3.2.1.3- Determinação estrutural da substância 03

A substância **03** foi isolada dos extratos hexânico e diclorometano do tronco subterrâneo e do extrato diclorometano das folhas de *H. oreadica* e a sua estrutura foi determinada com base em experimentos de RMN de ^1H , ^{13}C , HMBC e HSQC e por comparação com dados da literatura (SUAREZ, *et al.*, 2002).



O espectro de RMN de ^1H de **03** (FIGURA 3.11, pg 52) mostra dois sinais em δ 2,87 (2H, *t*, $J=7,6$) e δ 2,51 (2H, *t*, $J=7,6$) referentes aos hidrogênios metilênicos H-3 e H-2, respectivamente. Em δ 3,68 (3H, *s*), δ 3,73 (3H, *s*) e 3,76 (3H, *s*) observa-se os sinais de três metoxilas e em δ 1,42 (6H, *s*) observa-se à presença do sinal referente as duas metilas características do anel dimetilpirano. Em δ 6,48 (1H, *dd*, $J=9,9$ e 0,6 Hz) e em δ 5,48 (1H, *d*, $J=9,9$ Hz) observa-se os sinais referentes aos hidrogênios do anel cromeno e em δ 6,19 (1H, *s*) observa-se o sinal de um hidrogênio aromático.

O espectro de RMN de ^{13}C (FIGURA 3.12, pg 52) apresenta sinais de 17 carbonos para a molécula, cujos valores podem ser observados na TABELA 3.4, pg 51).

O experimento de HSQC (FIGURA 3.14, pg 53) mostra a correlação à J^1 de H-2 em δ 2,51 com C-2 em δ 34,0 e de H-3 em δ 2,87 com C-3 em δ 19,0. As metilas ligadas ao carbono C-2'' mostram correlação a J^1 com o sinal em δ 27,6 e as metoxilas em δ 3,73 e δ 3,76 com os carbonos em δ 62,4 e em δ 55,4, respectivamente. No experimento de HMBC (FIGURA 3.13, pg 53) as metilas do anel cromeno mostram correlação entre si (δ 27,6), com um sinal em δ 75,9 atribuído ao carbono carbinólico C-2'' e com um sinal em δ 127,0, atribuído ao C-3''. O hidrogênio H-2 (δ 2,51) mostra correlação com C-3 em δ 19,0, com a carboxila em δ 173,9 e com um sinal de um carbono quaternário em δ 113,8 que

foi atribuído ao C-1'. A correlação do sinal em δ 3,68 com o carbono em δ 173,9, atribuído ao C-1, indica a presença da função éster na estrutura. O hidrogênio H-3 mostra correlação com C-2 em δ 34,0 com C-1' em δ 113,8, com C-1 (δ 173,9) e com dois sinais de carbono quaternário referentes aos C-2' (δ 155,0) e C-6' (δ 158,7).

De acordo com as correlações observadas para H-3 pode-se sugerir que as metoxilas estão posicionadas nos carbonos C-6' e C-2'. Desta forma, o hidrogênio aromático em δ 6,19 foi atribuído ao H-5'. Pelo HSQC, C-5' foi atribuído ao sinal em δ 95,8. No experimento de HMBC, H-5' (δ 6,19) mostra correlação com C-1' (δ 113,8) e com o carbono em δ 158,7 (carbono que suporta a metoxila em δ 3,76) que somente pode ser atribuído ao C-6'. Desta maneira pode-se atribuir o valor de δ 155,0 ao C-2'.

O hidrogênio H-5' mostra no HMBC correlação com um sinal em δ 117,2 referente a um carbono que suporta um dos hidrogênios do anel cromeno, podendo somente ser atribuído ao H-4'' (δ 6,48). A multiplicidade observada para H-4'' (*dd*, $J=9,9$ e $0,6$ Hz) sugere que o mesmo esteja acoplado a longa distância com H-5' (*s*) com constante bastante pequena. O hidrogênio H-4'' mostra correlação com C-2'' (δ 75,9), com C-2' (δ 155,0) e com C-5' (δ 95,8). Além disso, tanto H-4'' como H-5' mostram correlação com dois carbonos quaternários em δ 153,0 e 107,6 que foram atribuídos aos carbonos C-4' e C-3', respectivamente. Esta atribuição foi confirmada com base na correlação observada para H-3'' com o carbono em δ 107,6 que pode somente correlacionar com C-3' a três ligações. A correlação de H-4'' com C-2' garante o anel cromeno na posição indicada e desta forma pode-se determinar a estrutura **03** como sendo o derivado 3-fenil-[2',6'-dimetoxi-(3',4'-O:5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano]propionato de metila.

TABELA 3.4: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **03** e comparação com a literatura

H/C	SUBSTÂNCIA 03 (400/100 MHz, CDCl_3)		SUAREZ, 2002 (300/75 MHz, CDCl_3)	
	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm)	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm)
1	-	173,9	-	174,1
2	2,51 (2H, <i>t</i> , $J=7,6$)	34,0	2,50 (2H, <i>t</i> , $J=7,5$)	34,1
3	2,87 (2H, <i>t</i> , $J=7,6$)	19,0	2,87 (2H, <i>t</i> , $J=7,5$)	19,0
1'	-	113,8	-	113,9
2'	-	155,0	-	153,0
3'	-	107,6	-	107,6
4'	-	153,0	-	155,1
5'	6,19 (1H, <i>s</i>)	95,8	6,19 (1H, <i>s</i>)	95,8
6'	-	158,7	-	158,7
4''	6,48 (1H, <i>dd</i> , $J=9,9$ e $0,6$)	117,2	6,49 (1H, <i>d</i> , $J=10,0$)	117,2
3''	5,48 (1H, <i>d</i> , $J=9,9$)	127,0	5,48 (1H, <i>d</i> , $J=10,0$)	127,1
2''	-	75,9	-	76,0
2''-Me	1,42 (6H, <i>s</i>)	27,6	1,41 (6H, <i>s</i>)	27,7
1-OMe	3,68 (3H, <i>s</i>)	51,3	3,68 (3H, <i>s</i>)	51,5
2'-OMe	3,73 (3H, <i>s</i>)	62,3	3,73 (3H, <i>s</i>)	62,4
6'-OMe	3,76 (3H, <i>s</i>)	55,4	3,76 (3H, <i>s</i>)	55,5

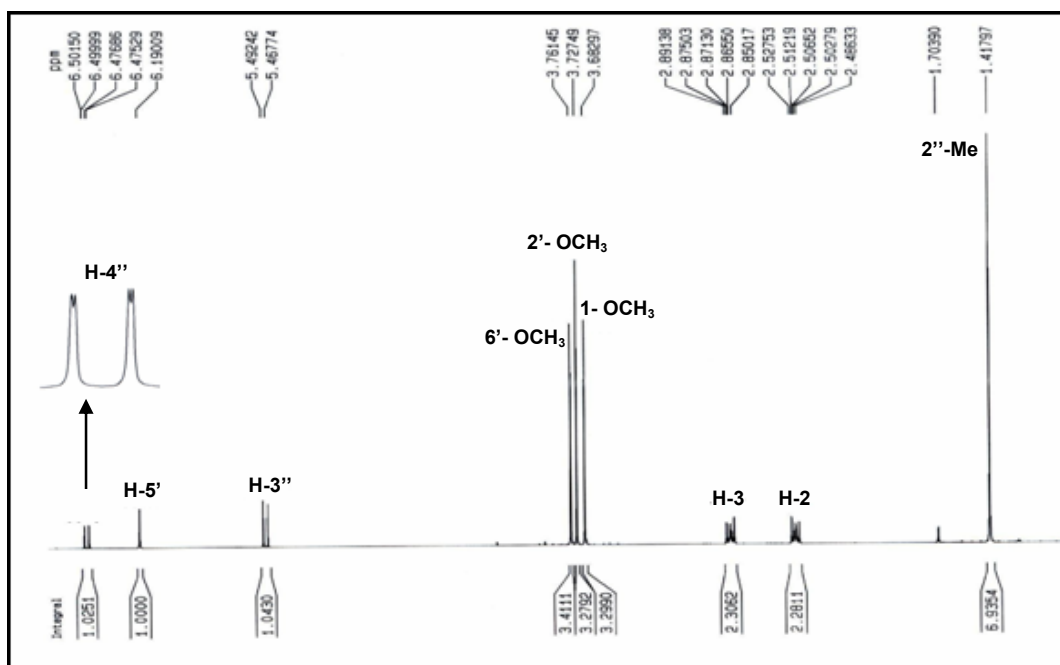


FIGURA 3.11: Espectro de RMN de ^1H de **03** (CDCl_3 , 400 MHz)

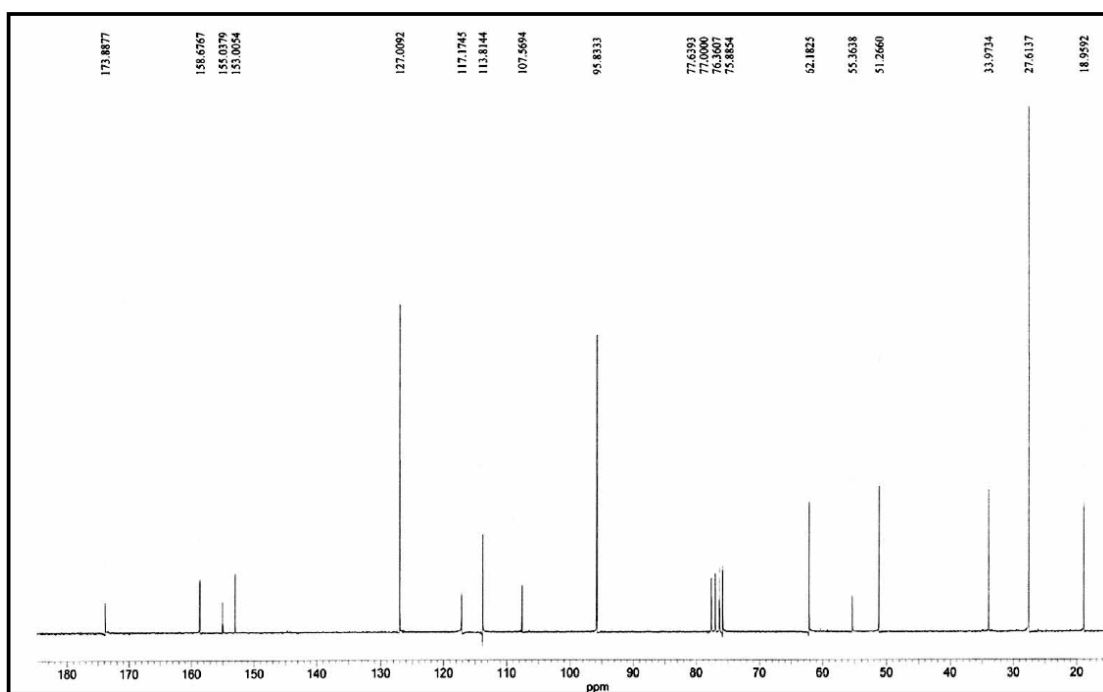


FIGURA 3.12: Espectro de RMN de ^{13}C de **03** (CDCl_3 , 100 MHz)

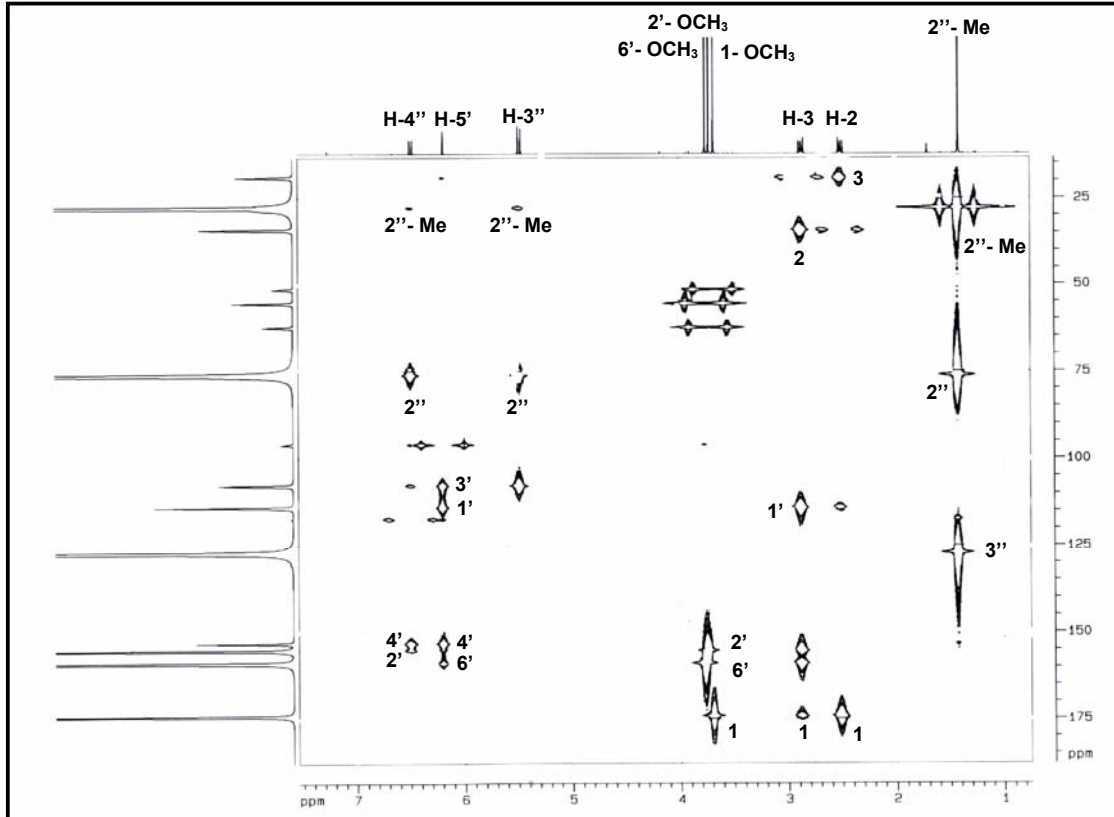


FIGURA 3.13: Mapa de contorno de g-HMBC de **03** (CDCl₃, 400 MHz)

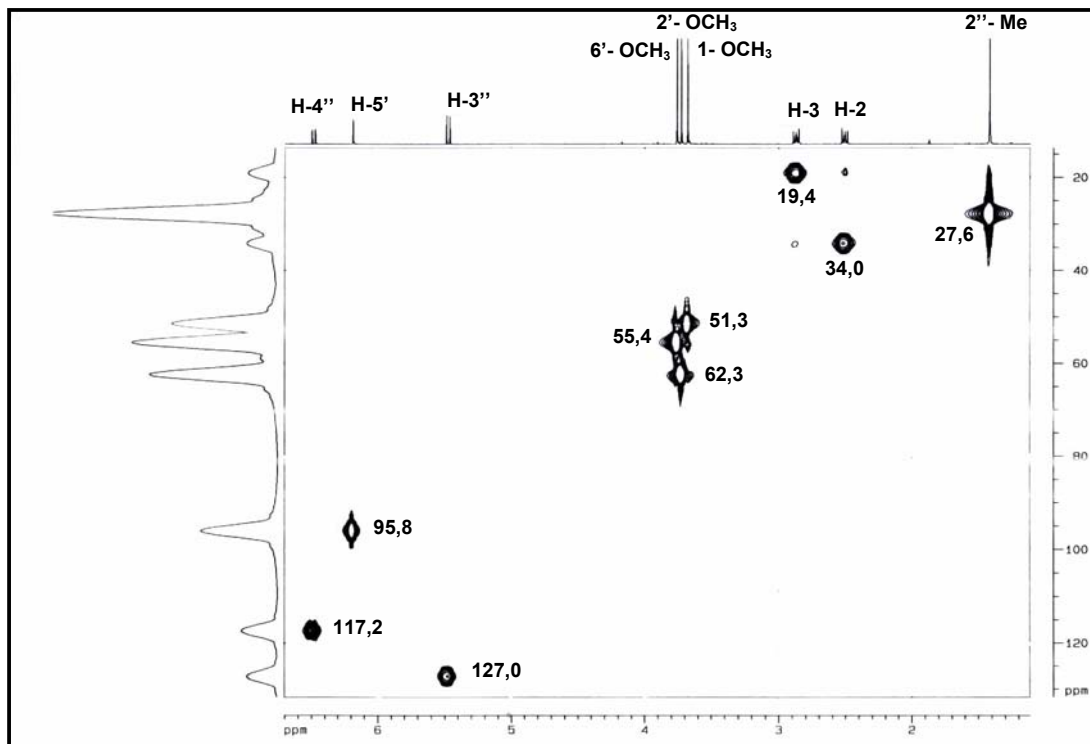
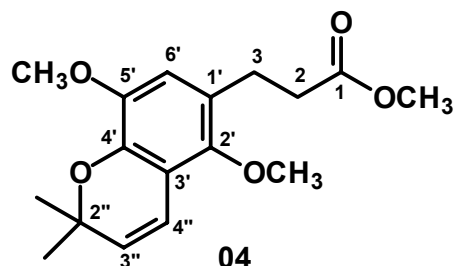


FIGURA 3.14: Mapa de contorno de g-HSQC de **03** (CDCl₃, 400 MHz)

3.2.1.4- Determinação estrutural da substância 04

A substância **04** foi isolada dos extratos hexânico e diclorometano do tronco subterrâneo de *H. oreadica* e do extrato diclorometano das folhas de *H. brasiliiana*, onde sua ocorrência se deu pela primeira vez. A sua estrutura foi determinada com base em experimentos de RMN de ^1H e HMBC como também através da comparação com dados da literatura (SUAREZ, *et al.*, 2002).



O espectro de RMN de ^1H de **04** é bastante parecido com o espectro do derivado **03** discutido anteriormente, diferenciando-se pela desblindagem de H-5', observada em δ 6,19 (**03**) e em δ 6,59 (**04**).

O espectro de RMN de ^1H de **04** (FIGURA 3.15, pg 57) mostra dois sinais em δ 2,87 (2H, *t*, $J=7,5$) e δ 2,61 (2H, *t*, $J=7,5$) referentes aos hidrogênios metilênicos H-3 e H-2, respectivamente. Em δ 3,68 (3H, *s*), δ 3,71 (3H, *s*) e 3,81 (3H, *s*) observa-se os sinais de três metoxilas e em δ 1,47 (6H, *s*) observa-se a presença do sinal referente as duas metilas características do anel cromeno. Em δ 6,55 (1H, *d*, $J=9,9$ Hz) e em δ 5,65 (1H, *d*, $J=9,9$ Hz) observa-se os sinais referentes aos hidrogênios do anel cromeno. Em δ 6,59 (1H, *s*) observa-se o sinal de um hidrogênio aromático.

No experimento de HMBC (FIGURA 3.16, pg 57) as metilas em C-2'' mostram correlação entre si (δ 27,4), com um sinal em δ 75,6 atribuído ao carbono carbinólico C-2'' e com um sinal em δ 130,4, atribuído ao C-3''. O hidrogênio H-2 (δ 2,61) mostra correlação com C-3 em δ 25,0, com a carboxila do éster em δ 173,4 e com um sinal de um carbono quaternário em δ 124,0 que foi atribuído ao C-1'. O hidrogênio H-3 mostra correlação com C-2 em δ 34,9, com C-1' em δ 124,0, com C-1 (δ 173,4), com um sinal de carbono quaternário em δ 147,7 e com

um sinal referente a CH em δ 113,1. A metoxila em δ 3,68 mostra correlação com um sinal em δ 173,4, sendo atribuída, então, a função éster. As outras duas metoxilas em δ 3,81 e em δ 3,71 mostram correlação com sinais em δ 144,6 e em δ 147,7, respectivamente.

O sinal referente ao hidrogênio aromático mostra correlação com C-3 (δ 25,0), com os sinal em δ 147,7 e em δ 144,6, cujos carbonos suportam as duas metoxilas. Desta maneira, o hidrogênio aromático em δ 6,59 foi atribuído ao H-6' e o carbono em δ 147,7 ao C-2'. Conseqüentemente, o sinal em δ 144,6 foi atribuído ao C-5' e o sinal em δ 141,1 ao C-4'. Ainda é possível observar a correlação de H-4'' (δ 6,55) com C-2'' (δ 75,6) e de H-3'' (δ 5,65) com C-2'' (δ 75,6) e com um sinal referente a um carbono quaternário o qual pode ser atribuído ao C-3'.

Desta forma pôde-se concluir que a substância **04** é referente ao derivado 3-fenil-[2',5'-dimetoxi-(3',4'-O:5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano]propionato de metila.

TABELA 3.5: Dados de RMN de ^1H de **04** e comparação com a literatura

	SUBSTÂNCIA 04 (400 MHz, CDCl_3)	SUAREZ, 2002 (300 MHz, CDCl_3)
H	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm), J (Hz)
1	-	-
2	2,61 (2H, <i>t</i> , $J=7,5$)	2,62 (2H, <i>t</i> , $J=7,5$)
3	2,88 (2H, <i>t</i> , $J=7,5$)	2,88 (2H, <i>t</i> , $J=7,5$)
1'	-	-
2'	-	-
3'	-	-
4'	-	-
5'		
6'	6,59 (1H, <i>s</i>)	6,59 (1H, <i>s</i>)
4''	6,55 (1H, <i>d</i> , $J=9,9$)	6,55 (1H, <i>d</i> , $J=10,0$)
3''	5,65 (1H, <i>d</i> , $J=9,9$)	5,65 (1H, <i>d</i> , $J=10,0$)
2''	-	-
2''-Me	1,47 (6H, <i>s</i>)	1,47 (6H, <i>s</i>)
1-OMe	3,68 (3H, <i>s</i>)	3,68 (3H, <i>s</i>)
2'-OMe	3,71 (3H, <i>s</i>)	3,71 (3H, <i>s</i>)
5'-OMe	3,81 (3H, <i>s</i>)	3,82 (3H, <i>s</i>)

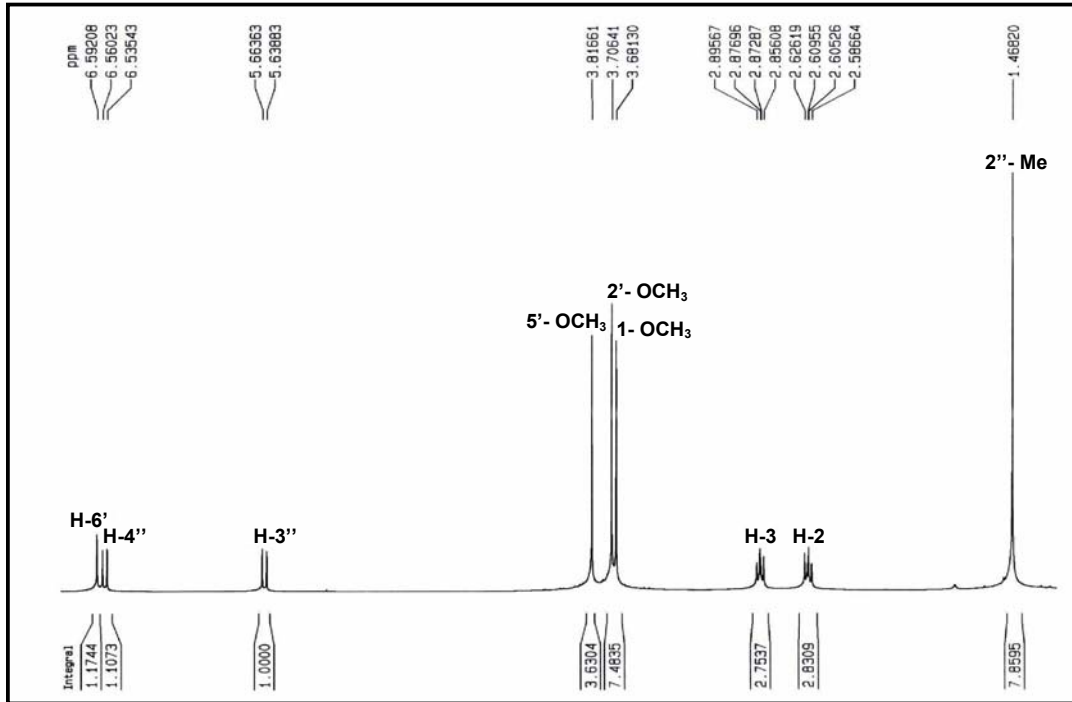


FIGURA 3.15: Espectro de RMN de ^1H de **04** (CDCl_3 , 400 MHz)

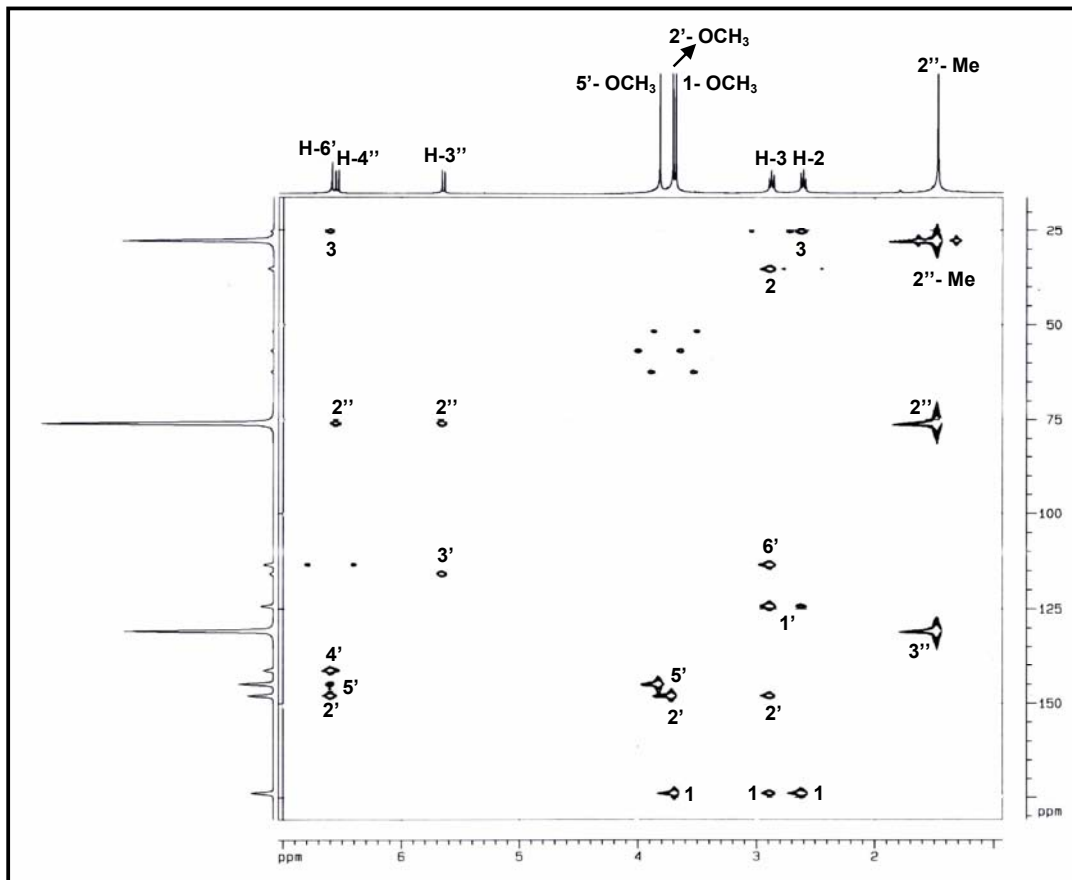
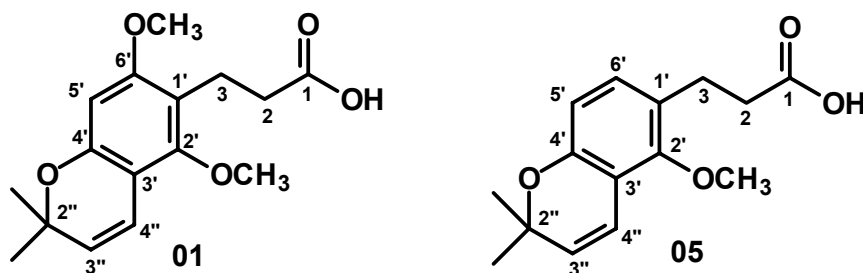


FIGURA 3.16: Mapa de contorno de g-HMBC de **04** (CDCl_3 , 400 MHz)

3.2.1.5- Determinação estrutural das substâncias **01** e **05**

As substâncias **01** e **05** foram obtidas em mistura do extrato diclorometano do tronco subterrâneo de *H. oreadica*. Não foi realizado nenhum refração em busca da separação destas substâncias, pois ambas já se encontram descritas em literatura. As estruturas foram determinadas com base em espectros de RMN em uma dimensão tais como de ^1H e ^{13}C , experimentos em duas dimensões como HMBC e HSQC e também através da comparação com dados da literatura (BRAGA, 2005 e SUAREZ, 2002).



O espectro de RMN de ^1H (FIGURA 3.17, pg 62) mostra dois sinais em δ 2,87 (2H, *m*) e δ 2,52 (2H, *t*, $J=7,6$ Hz) referentes aos hidrogênios metilênicos H-3 e H-2, respectivamente, de **01**. Da mesma forma, este mostra dois sinais em δ 2,86 (2H, *m*) e δ 2,61 (2H, *t*, $J=8,0$ Hz) referentes aos hidrogênios metilênicos H-3 e H-2, respectivamente, de **05**. Em δ 3,73 (3H, *s*) e 3,76 (3H, *s*) observam-se os sinais das duas metoxilas de **01** e em δ 3,75 (3H, *s*) observa-se o sinal da metoxila de **05**, e em δ 1,42 (12H, *s*) a presença do sinal referente as quatro metilas características do anel cromeno de ambas as substâncias. Em δ 6,49 (1H, *d*, $J=10,0$ Hz) e em δ 5,49 (1H, *d*, $J=10,0$ Hz) observam-se os sinais referentes aos hidrogênios H-4'' e H-3'' do anel cromeno de **01** e em δ 5,64 (1H, *d*, $J=10$ Hz) e δ 6,56 (1H, *d*, $J=10$ Hz) observam-se a presença dos hidrogênios H-4'' e H-3'' do anel cromeno de **05**. Ainda é possível observar em δ 6,20 (1H, *s*) o sinal relativo a um hidrogênio aromático de **01** e em δ 6,94 (1H, *d*, $J=8,4$ Hz) e δ 6,53 (1H, *d*, $J=8,4$ Hz) observam-se os sinais referentes aos hidrogênios aromáticos H-6' e H-5', respectivamente, de **05**.

O espectro de RMN de ^{13}C (FIGURA 3.18, pg 62) apresenta sinais de 16 carbonos para a molécula **01** e 15 carbonos para a molécula **05**. Os valores de ^1H e ^{13}C da substância **05** e comparação com a literatura podem ser observados na TABELA 3.6 (pg 61). Os sinais característicos das carboxilas não aparecem no espectro de ^{13}C , e por isso o deslocamento das mesmas ficou estabelecido como o valor encontrado na literatura.

Os experimentos de HSQC e HMBC foram discutidos para a substância **01** e para a substância **05**, respectivamente.

Desta forma, o experimento de HSQC (FIGURA 3.19, pg 63) para **01** mostra correlação de H-2 em δ 2,52 com C-2 em 33,8 e de H-3 em 2,87, com C-3 em δ 18,6. As metilas do carbono C-2'' mostram correlação com o sinal em δ 27,3 e as metoxilas em δ 3,73 e δ 3,76 mostram correlação com os carbonos em δ 62,0 e em δ 55,1, respectivamente. Para a substância **05**, o experimento de HSQC mostra correlação de H-2 em δ 2,61 com C-2 em 34,6 e de H-3 em 2,86 com C-3 em δ 24,5. As metilas do carbono C-2'' mostram correlação com o sinal em δ 27,3 e a metoxila em δ 3,75 mostra correlação com o carbono em δ 61,7.

No experimento de HMBC (FIGURA 3.20, pg 64), para a substância **01** as metilas em C-2'' mostram correlação entre si (δ 27,3), com um sinal em δ 75,7 atribuído ao carbono carbinólico C-2'' e com um sinal em δ 126,9 atribuído ao C-3''. O hidrogênio H-2 (δ 2,52) mostra correlação com C-3 em δ 18,6 e com um sinal de um carbono quaternário em δ 113,6 que foi atribuído ao C-1'. O hidrogênio H-3 mostra correlação com C-2 em δ 33,8, com C-1' em δ 113,6 e com dois sinais de carbono quaternário referentes aos carbonos C-2' (δ 154,6) e C-6' (δ 158,4). As metoxilas estão posicionadas nos carbonos C-2' e C-6' sendo o sinal de hidrogênio aromático em δ 6,20 atribuído ao sinal em δ 95,7. Pelo HSQC, C-5' foi atribuído ao sinal em δ 95,7. No experimento de HMBC, H-5' (δ 6,20) mostra correlação com C-1' (δ 113,6) e com C-6' (δ 158,4), que suporta a metoxila em δ 3,76. O hidrogênio H-5' mostra no HMBC correlação a J^A com um sinal em δ 116,8 atribuído ao C-4''. O hidrogênio H-4'' mostra correlação com C-2'' (δ 75,7) e com C-2' (δ 154,6). Além disso, tanto H-4'' como H-5' mostram correlação com dois carbonos quaternários em δ 152,7 e 107,3 que foram atribuídos aos carbonos C-4' e C-3', respectivamente. Esta atribuição foi confirmada com base na correlação

observada para H-3'' com o carbono em δ 107,3 que pode somente correlacionar com C-3' a três ligações.

No experimento de HMBC para a substância **05**, as metilas em C-2'' mostram correlação entre si (δ 27,3), com um sinal em δ 75,3 atribuído ao carbono carbinólico C-2'' e com um sinal em δ 130,1 atribuído ao C-3''. O hidrogênio H-2 (δ 2,61) mostra correlação com C-3 em δ 24,5 e com um sinal de um carbono quaternário em δ 124,8 que foi atribuído ao C-1'. O hidrogênio H-3 mostra correlação com C-2 em δ 34,6, com C-1' em δ 124,8 e com dois sinais de carbono referentes aos carbonos C-2' (δ 152,1) e C-6' (δ 129,1). Da mesma forma, H-5' (δ 6,53) mostra correlação com C-1' (δ 124,8) e com C-6' (δ 129,1).

Assim, pôde-se determinar a estrutura **01** como sendo o ácido 3-fenil-[2', 6'-dimetoxi-(3',4'-O:5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano]propiónico, e a estrutura **05** como sendo o derivado ácido 3-fenil-[2'-metoxi-(3',4'-O:5'',6''')-2'',2''-dimetilpirano]propiónico.

TABELA 3.6: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **05** e comparação com a literatura

H/C	SUBSTÂNCIA 05 (400/100 MHz, CDCl_3)		Braga, 2005 (^1H , CDCl_3) 200 MHz Suarez, 2002 (^{13}C , CDCl_3) 75 MHz	
	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm)	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm)
1	-	178,7	-	178,7
2	2,61(2H, <i>t</i> , $J=8,0$)	34,6	2,61 (2H, <i>t</i> , $J=7,4$)	34,9
3	2,89 (2H, <i>m</i>)	24,5	2,87 (2H, <i>t</i> , $J=7,4$)	24,9
1'	-	124,8	-	125,1
2'	-	152,1	-	152,5
3'	-	114,5	-	114,8
4'	-	153,8	-	154,3
5'	6,53 (1H, <i>d</i> , $J=8,4$)	112,0	6,52 (1H, <i>d</i> , $J=8,4$)	112,3
6'	6,94 (1H, <i>d</i> , $J=8,4$)	129,1	6,93 (1H, <i>d</i> , $J=8,4$)	129,4
4''	5,64 (1H, <i>d</i> , $J=10,0$)	116,8	5,63 (1H, <i>d</i> , $J=10,0$)	117,2
3''	6,56 (1H, <i>d</i> , $J=10,0$)	130,1	6,56 (1H, <i>d</i> , $J=10,0$)	130,4
2''	-	75,3	-	75,6
2''-Me	1,42 (6H, <i>s</i>)	27,3	1,42 (6H, <i>s</i>)	27,7
2''-OMe	3,75 (3H, <i>s</i>)	61,7	3,75 (3H, <i>s</i>)	62,1

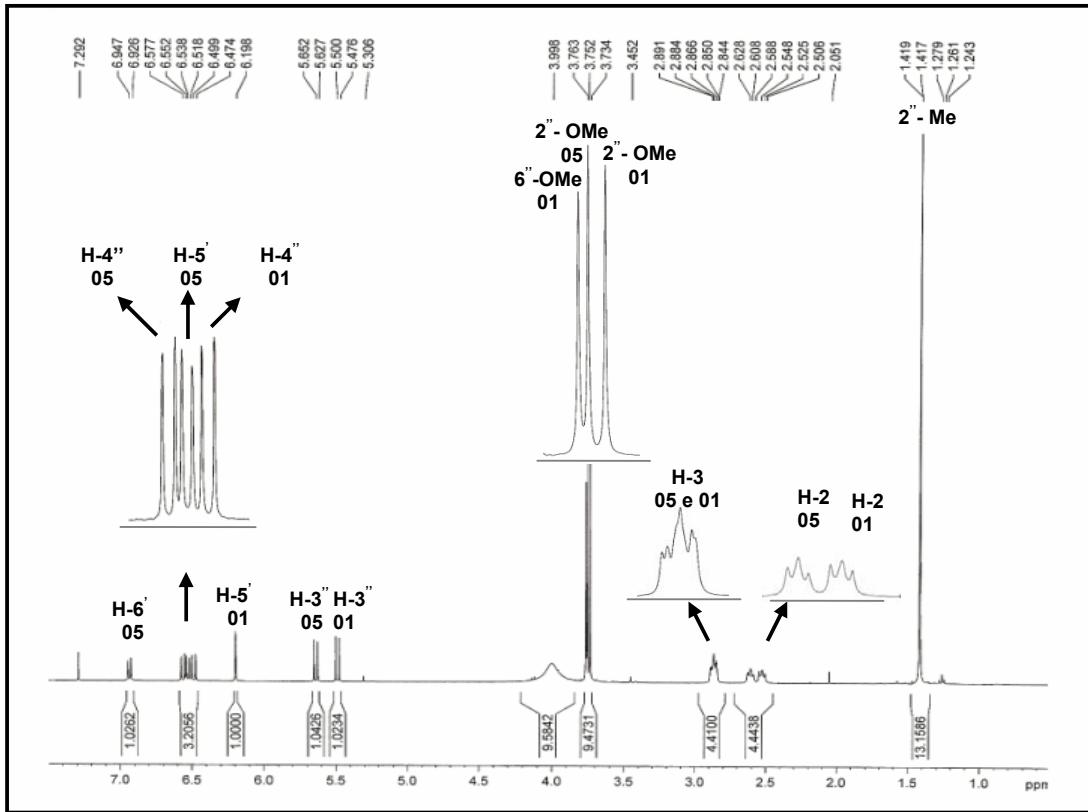


FIGURA 3.17: Espectro de RMN de ^1H da mistura de **01** e **05** (CDCl_3 , 400 MHz)

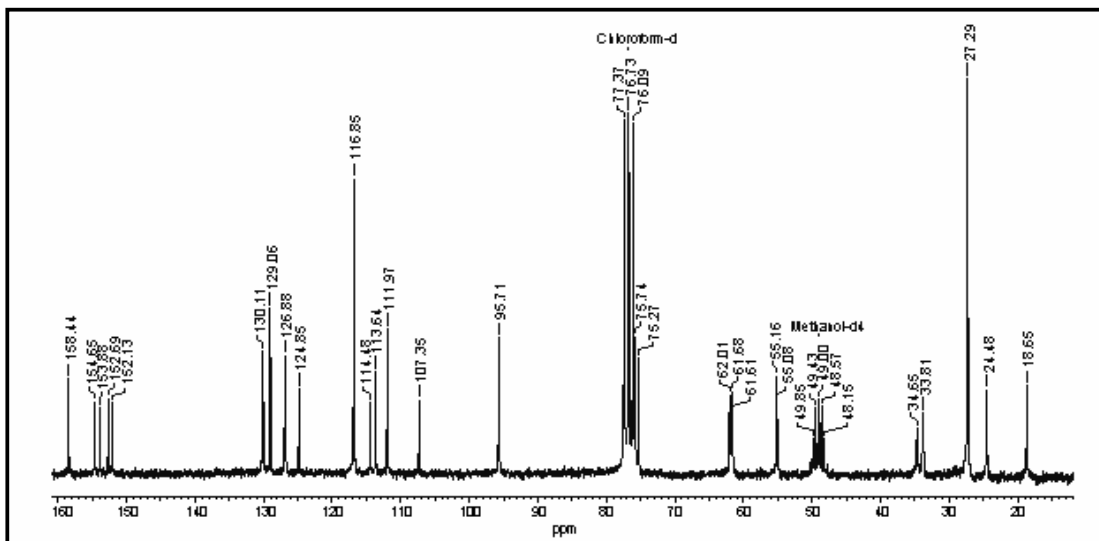


FIGURA 3.18: Espectro de RMN de ^{13}C da mistura de **01** e **05** (CDCl_3 , 100 MHz)

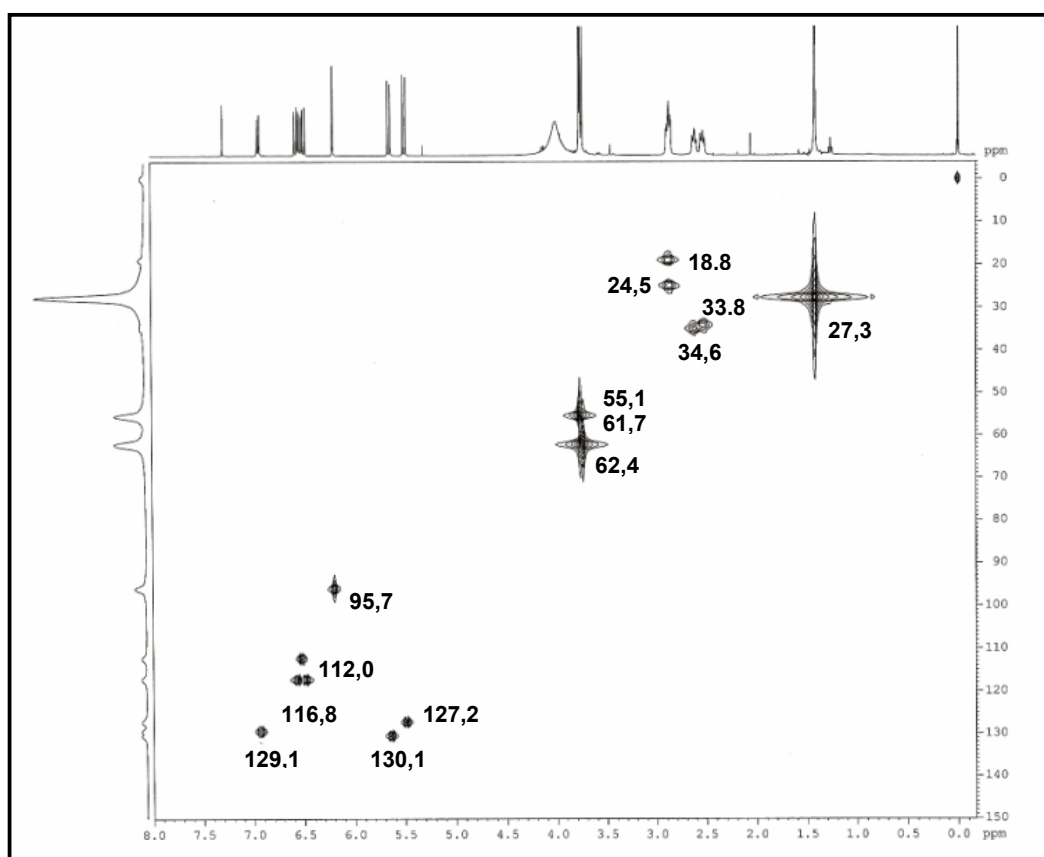


FIGURA 3.19: Mapa de contorno de g-HSQC da mistura de **01** e **05**
(CDCl_3 , 400 MHz)

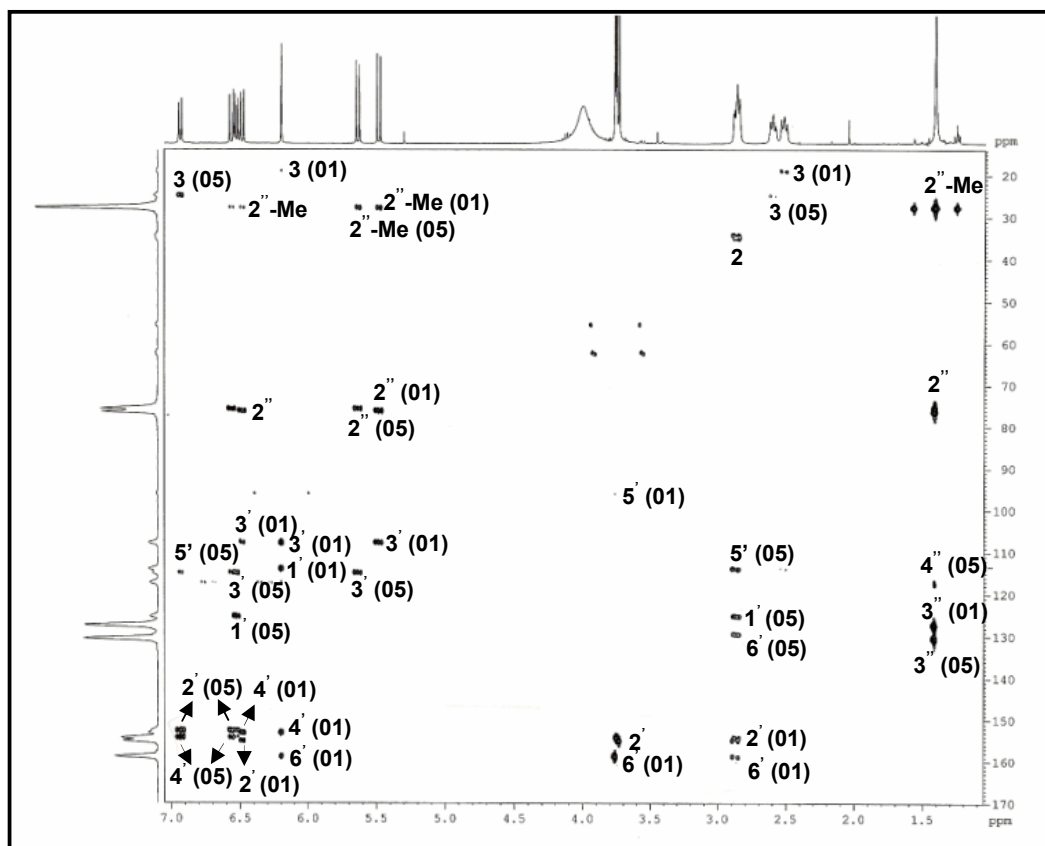
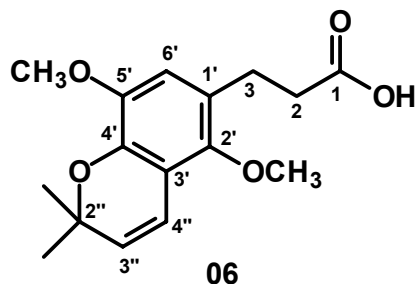


FIGURA 3.20: Mapa de contorno de g-HMBC da mistura de **01** e **05**
(CDCl₃, 400 MHz)

3.2.1.6- Determinação estrutural da substância 06

A substância **06** foi isolada do extrato diclorometano do tronco subterrâneo de *Hortia oreadica* e sua estrutura foi determinada com base em experimentos de RMN de ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC, HMBC como também através da comparação com dados da literatura (SUAREZ, *et al*, 2002).



O espectro de RMN de ^1H de **06** é bastante parecido com o espectro do derivado do ácido diidrocínâmico **04**, exceto que o espectro de **06** não apresenta a metoxila referente à função éster. Desta maneira, podemos concluir que trata-se do derivado do ácido diidrocínâmico com a função ácido carboxílico.

O espectro de RMN de ^1H de **06** (FIGURA 3.21, pg 68) mostra dois sinais em δ 2,81 (2H, *m*) e δ 2,60 (2H, *m*) referentes aos hidrogênios metilênicos H-3 e H-2, respectivamente. Em δ 3,63 (3H, *s*) e δ 3,76 (3H, *s*) observa-se os sinais de duas metoxilas e em δ 1,43 (6H, *s*) observa-se a presença do sinal referente às duas metilas do anel cromeno. Em δ 6,49 (1H, *d*, $J= 10$ Hz) e em δ 5,60 (1H, *d*, $J= 10$ Hz) observa-se os sinais referentes aos hidrogênios do anel cromeno. Em δ 6,58 (1H, *s*) observa-se o sinal de um hidrogênio aromático.

O espectro de ^{13}C (FIGURA 3.22, pg 68) apresenta sinais de 16 carbonos para a molécula, cujos valores podem ser observados na Tabela 3.7 (pg 67).

O experimento de HSQC (FIGURA 3.23, pg 69) mostra a correlação a J^1 de H-2 em δ 2,60 com C-2 em δ 36,3 e de H-3 em δ 2,81 com C-3 em δ 25,2. As metilas do carbono C-2'' mostram correlação com o sinal em δ 27,6 e as metoxilas em δ 3,63 e δ 3,76 mostram correlação com os carbonos em δ 62,3 e em δ 56,7, respectivamente.

No espectro de COSY (FIGURA 3.24, pg 69), pode-se observar o acoplamento entre H-4'' (δ 6,49) e um sinal em δ 5,60 atribuído ao H-3'' (C-3'' em δ 130,6 pelo HSQC). Outra correlação observada ainda é de H-3 em δ 2,81 com um sinal em δ 2,60 atribuído ao H-2.

No espectro de HMBC (FIGURA 3.25, pg 70), as metilas em C-2'' mostram correlação entre si (δ 27,6), com um sinal em δ 75,7 atribuído ao carbono carbinólico C-2'' e com um sinal em δ 130,6 atribuído ao C-3''. As metoxilas em δ 3,63 e δ 3,76 mostram correlação com C-2' em δ 147,7 e C-5' em δ 144,9, respectivamente. O sinal referente ao hidrogênio aromático mostra correlação com C-3 (δ 25,2) e com os sinais em δ 147,7 e em δ 144,9, cujos carbonos suportam as duas metoxilas. Desta maneira, o hidrogênio aromático em δ 6,58 foi atribuído ao H-6'.

Ainda é possível observar a correlação de H-4'' (δ 6,49) com C-2'' (δ 75,7) e C-2' (δ 147,7) e de H-3'' (δ 5,60) com C-2'' (δ 75,7) e com um sinal referente a um carbono quaternário em δ 115,5, o qual somente pode ser atribuído ao C-3'.

Desta forma, pode-se concluir que a substância **06** é referente ao ácido 3-fenil-[2',5'-dimetoxi-(3',4'-O:5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano]propiónico.

TABELA 3.7: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **06** e comparação com a literatura.

H/C	Substância 06 (400/100 MHz, CDCl_3)		SUAREZ, 2002 (300/75 MHz, CDCl_3)	
	δ (ppm), <i>J</i> (Hz)	δ (ppm)	δ (ppm), <i>J</i> (Hz)	δ (ppm)
1	-	177,9	-	178,7
2	2,60 (2H, <i>t</i> , <i>J</i> = 7,5 Hz)	36,3	2,65 (2H, <i>t</i> , <i>J</i> = 7,5 Hz)	35,0
3	2,81 (2H, <i>t</i> , <i>J</i> = 7,5 Hz)	25,2	2,88 (2H, <i>t</i> , <i>J</i> = 7,5 Hz)	24,9
1'	-	124,6	-	123,8
2'	-	147,7	-	147,8
3'	-	115,5	-	115,6
4'	-	141,1	-	141,2
5'	-	144,9	-	144,7
6'	6,58 (1H, <i>s</i>)	113,5	6,60 (1H, <i>s</i>)	113,0
2''	-	75,7	-	75,8
3''	5,60 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =10,0 Hz)	130,6	5,65 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 10 Hz)	130,6
4''	6,49 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 10,0 Hz)	117,5	6,55 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 10 Hz)	117,3
2''-Me	1,43 (6H, <i>s</i>)	27,6	1,47 (6H, <i>s</i>)	27,5
2'-Ome	3,63 (3H, <i>s</i>)	62,3	3,71 (3H, <i>s</i>)	62,2
5'-Ome	3,76 (3H, <i>s</i>)	56,7	3,82 (3H, <i>s</i>)	56,5

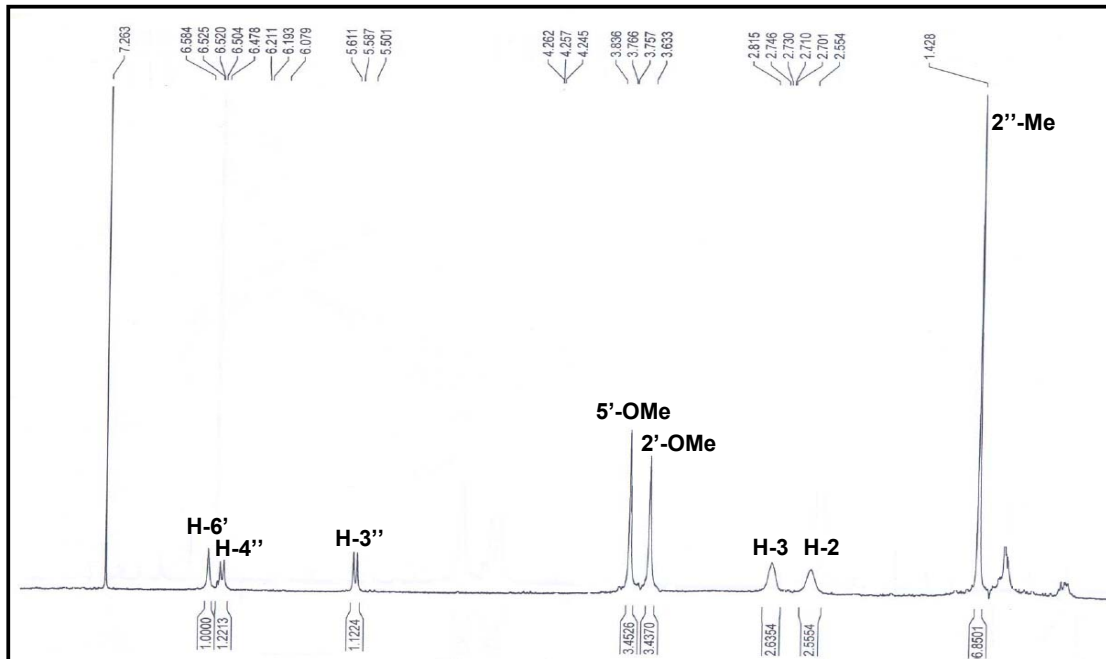


FIGURA 3.21: Espectro de RMN de ^1H de **06** (CDCl_3 , 400 MHz)

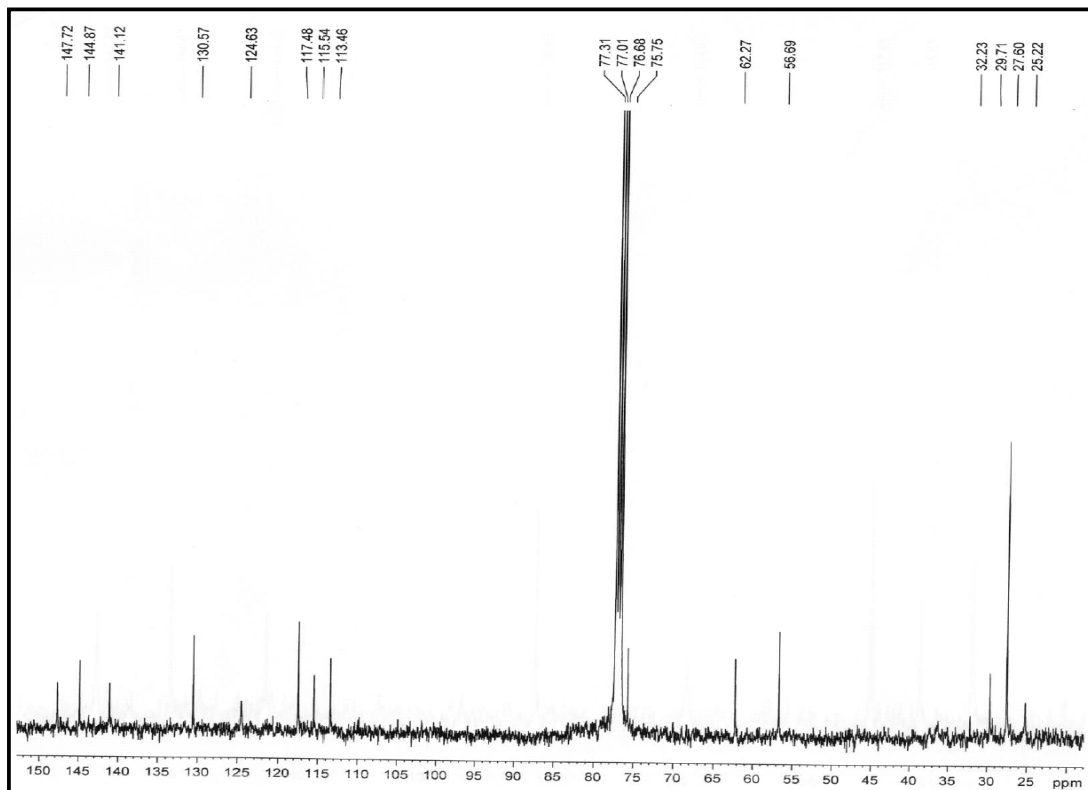


FIGURA 3.22: Espectro de RMN de ^{13}C de **06** (CDCl_3 , 100 MHz)

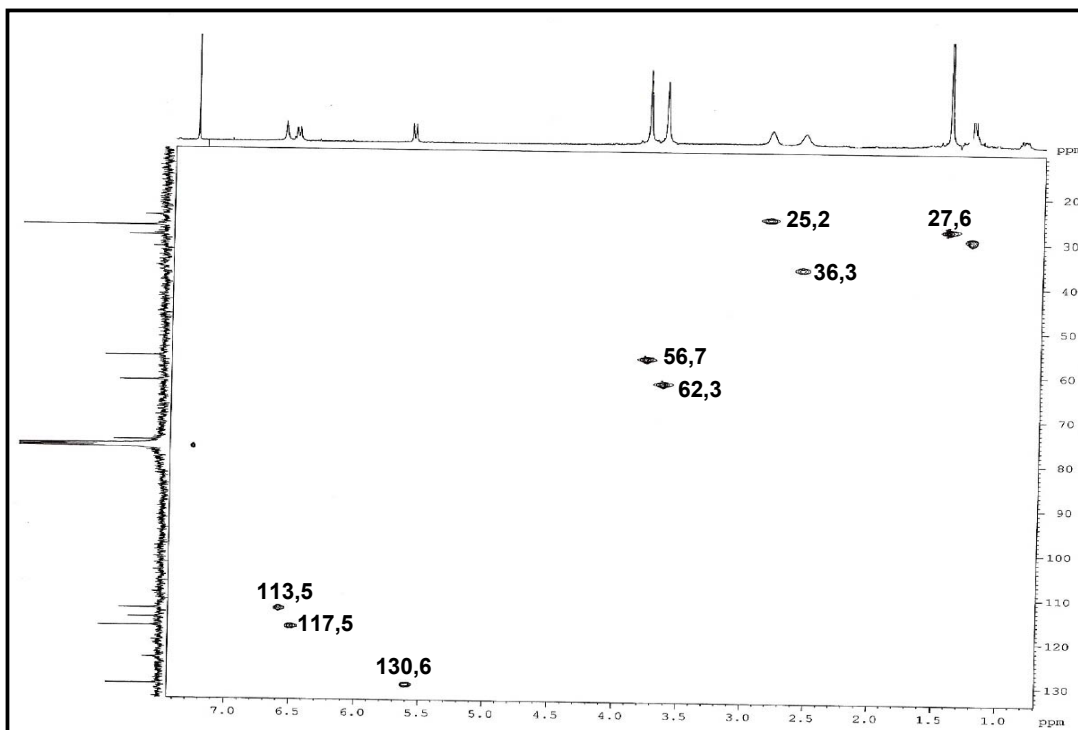


FIGURA 3.23: Mapa de contorno de g-HSQC de **06** (CDCl_3 , 400 MHz)

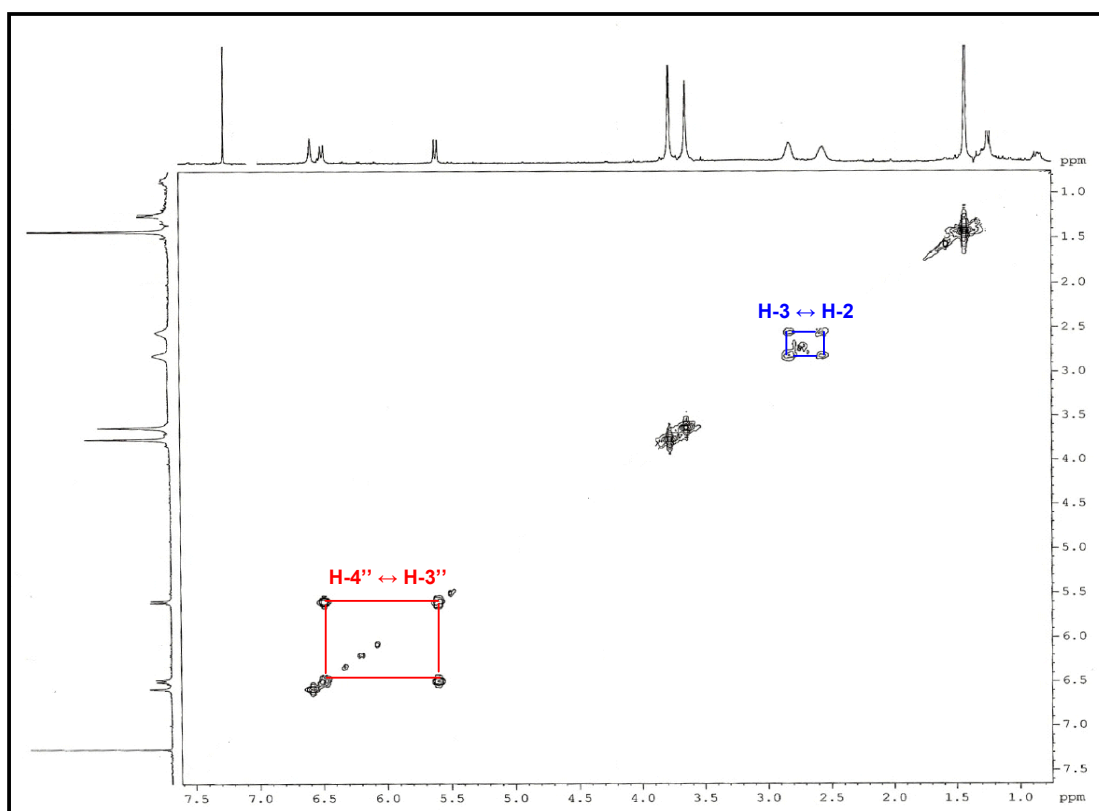


FIGURA 3.24: Espectro de g-COSY de **06** (CDCl_3 , 400 MHz)

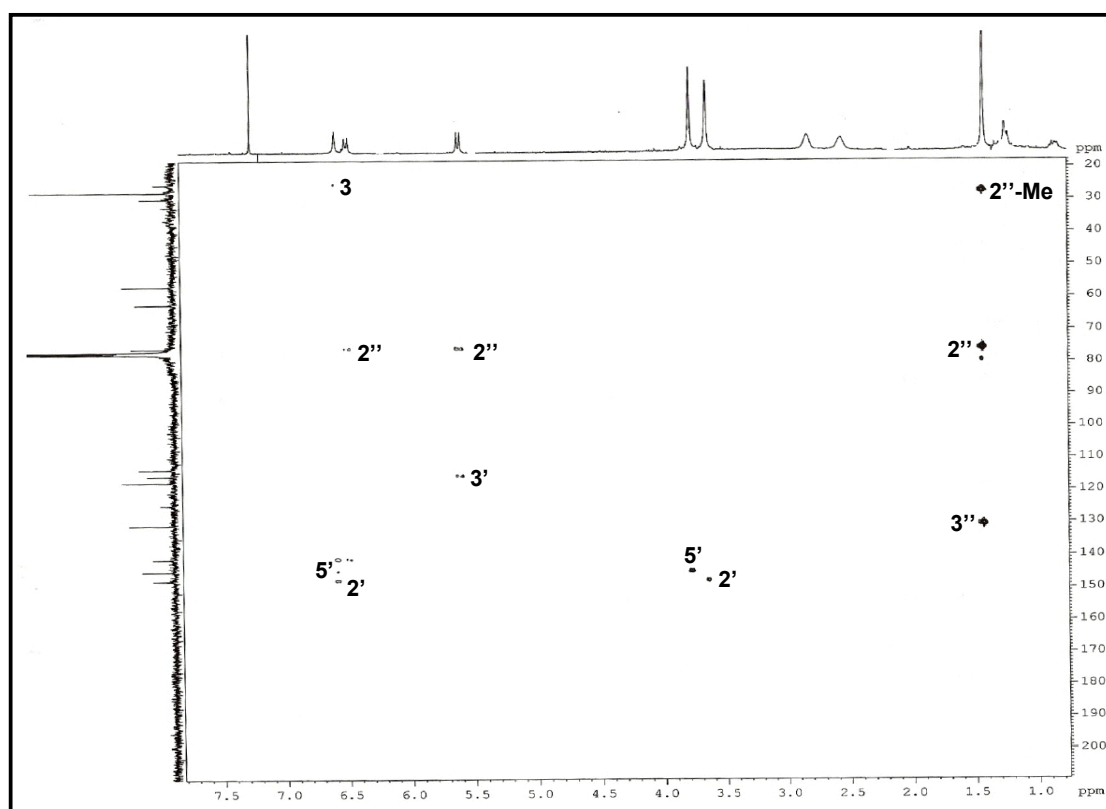
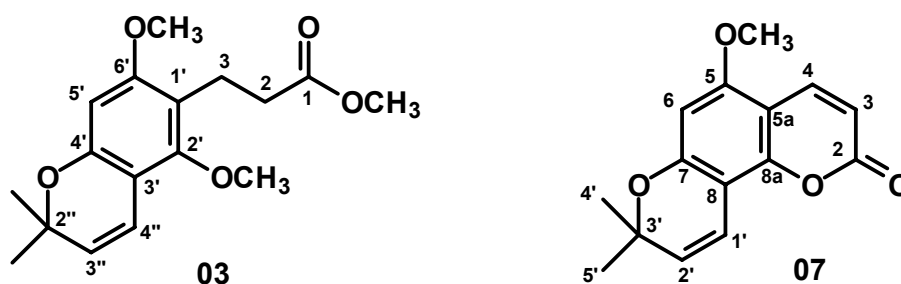


FIGURA 3.25: Mapa de contorno de g-HMBC de **06** (CDCl₃, 400 MHz)

3.2.1.7- Determinação estrutural das substâncias **03** e **07**

As substâncias **03** e **07** foram isoladas em mistura dos extratos hexânico e diclorometano do tronco subterrâneo de *H. oreadica*. Ambas já se encontram descritas em literatura. As estruturas foram determinadas com base em espectros de RMN de ^1H e ^{13}C e por comparação com dados da literatura (SUAREZ, 2002; BRAGA, 2005).



O espectro de RMN de ^1H (FIGURA 3.26, pg 73) mostra dois sinais em δ 2,87 (2H, *t*, $J=7,6$ Hz) e δ 2,51 (2H, *t*, $J=7,6$ Hz) referentes aos hidrogênios metilênicos H-3 e H-2, respectivamente, de **03**. Em δ 3,68 (3H, *s*), δ 3,73 (3H, *s*) e δ 3,76 observa-se os sinais das três metoxilas de **03** e em δ 3,87 (3H, *s*) observa-se o sinal da metoxila de **07**. Em δ 1,41 (6H, *s*) nota-se a presença do sinal referente as duas metilas características do anel cromeno de **03** e em δ 1,46 (6H, *s*) observa-se as duas metilas do anel cromeno de **07**. Em δ 6,49 (1H, *d*, $J=9,2$ Hz) e em δ 5,48 (1H, *d*, $J=9,2$ Hz) observa-se os sinais referentes aos hidrogênios H-4'' e H-3'' do anel cromeno de **03** e em δ 5,57 (1H, *d*, $J=10\text{Hz}$) e δ 6,78 (1H, *d*, $J=10\text{Hz}$) observa-se a presença dos hidrogênios H-2' e H-1' de **07**. Ainda é possível observar em δ 6,19 (1H, *s*) o sinal relativo a um hidrogênio aromático de **03**; em δ 7,94 (1H, *d*, $J=10,0$ Hz) e δ 6,12 (1H, *d*, $J=10,0$ Hz) observa-se os sinais característicos do esqueleto cumarínico relativo aos hidrogênios H-4 e H-3 e em δ 6,23 (1H, *s*) um sinal relativo ao hidrogênio aromático de **07**.

O espectro de RMN de ^{13}C (FIGURA 3.27, pg 73) apresenta sinais de 17 carbonos para a molécula **03** e 15 carbonos para a molécula **07**, cujos valores para **07** podem ser observados na TABELA 3.8 (pg 72).

TABELA 3.8: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **07** e comparação com a literatura

H/C	SUBSTÂNCIA 07 (400/100 MHz, CDCl_3)		BRAGA, 2005 (400/50 MHz, CDCl_3)	
	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm)	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm)
2	-	161,2	-	161,2
3	6,12 (1H, <i>d</i> , $J= 10,0$ Hz)	110,3	6,13 (1H, <i>d</i> , $J= 9,6$ Hz)	110,3
4	7,94 (1H, <i>d</i> , $J= 10,0$ Hz)	138,8	7,96 (1H, <i>d</i> , $J= 9,6$ Hz)	138,9
5a	-	103,6	-	103,6
5	-	156,5	-	156,5
6	6,23 (1H, <i>s</i>)	95,3	6,23 (1H, <i>s</i>)	95,3
7	-	157,4	-	157,4
8a	-	151,0	-	151,0
8	-	102,5	-	102,5
1'	6,78 (1H, <i>d</i> , $J= 10,0$ Hz)	114,9	6,79 (1H, <i>dd</i> , $J= 10,0$ e $0,5$ Hz)	114,9
2'	5,57 (1H, <i>d</i> , $J= 10,0$ Hz)	127,5	5,57 (1H, <i>d</i> , $J= 10,0$ Hz)	127,5
3'	-	77,9	-	77,9
4', 5'-Me	1,46 (6H, <i>s</i>)	28,0	1,46 (6H, <i>s</i>)	28,1
5-OMe	3,87 (3H, <i>s</i>)	55,9	3,88 (3H, <i>s</i>)	55,9

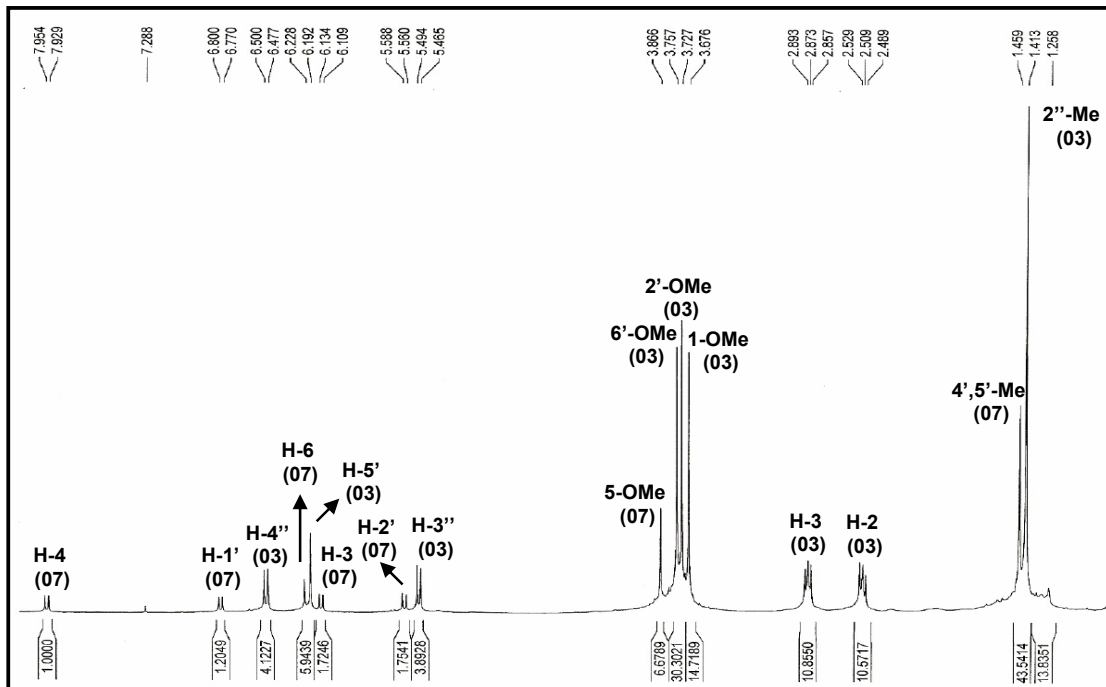


FIGURA 3.26: Espectro de RMN de ^1H da mistura de **03** e **07** (400 MHz, CDCl_3)

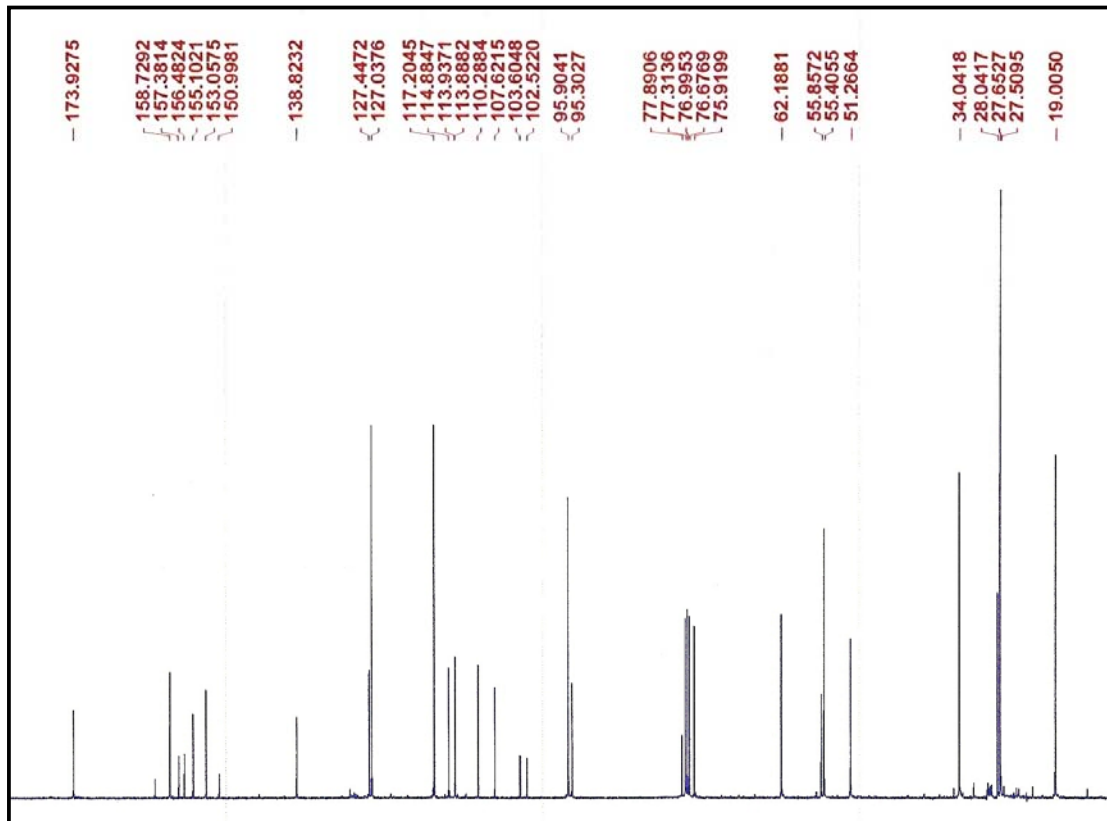
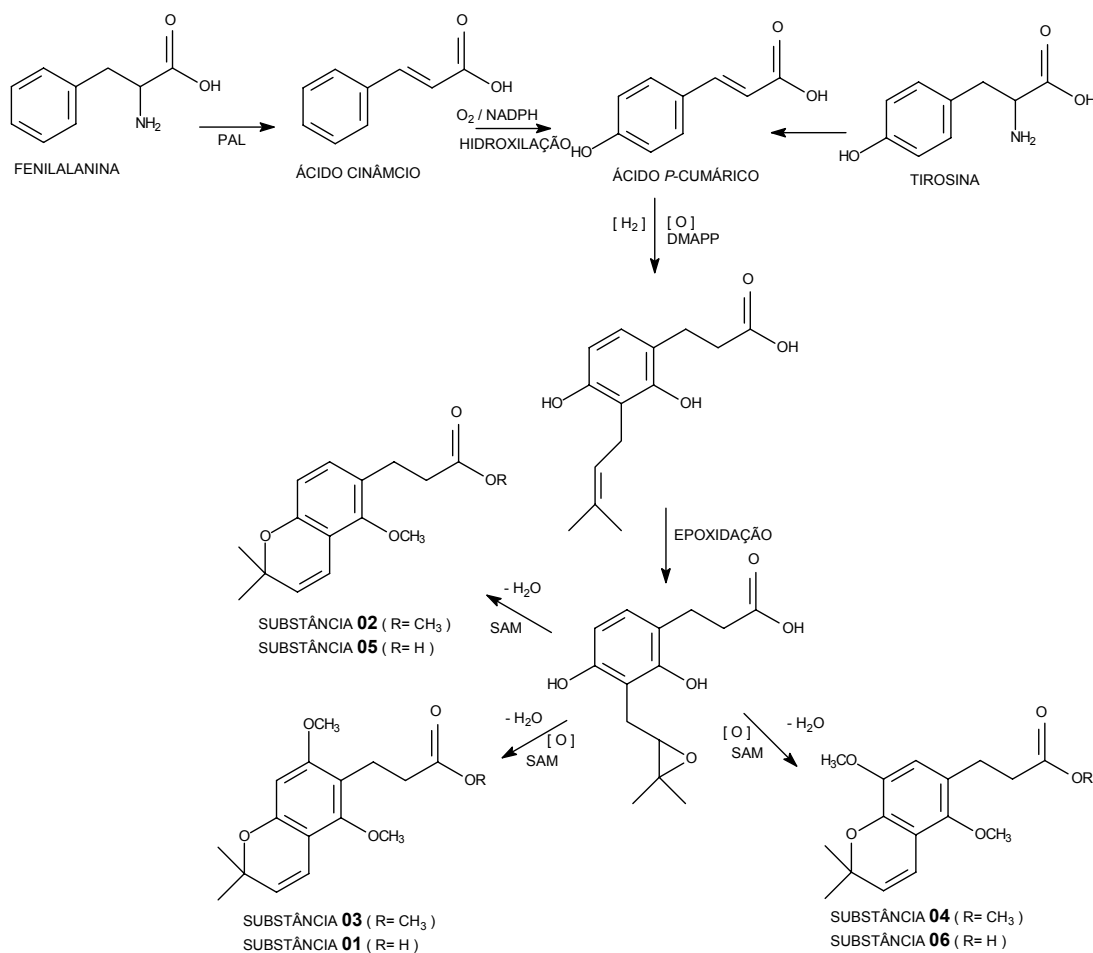


FIGURA 3.27: Espectro de RMN de ^{13}C da mistura de **03** e **07** (100 MHz, CDCl_3)

3.2.1.8- Biogênese dos Derivados do Ácido Diidrocinâmico

A L-fenilalanina e a L-tirosina são precursores de uma grande variedade de produtos naturais. Nas plantas, o passo inicial é a eliminação da amônia da cadeia lateral para gerar o ácido cinâmico trans (E). No caso da fenilalanina, tem-se o ácido cinâmico, enquanto que a tirosina produz o ácido 4-cumárico ou ácido *p*-cumárico (ESQUEMA 3.2, pg 74).

Todas as plantas têm habilidade para promover a desaminação da fenilalanina via a enzima fenilalanina amônia liase (PAL), porém a correspondente transformação da tirosina é restrita a algumas famílias e ainda não é bem esclarecida. As plantas que não são capazes de transformar a tirosina, sintetizam o ácido *p*-cumárico através da hidroxilação direta do ácido cinâmico (DEWICK, 2002).

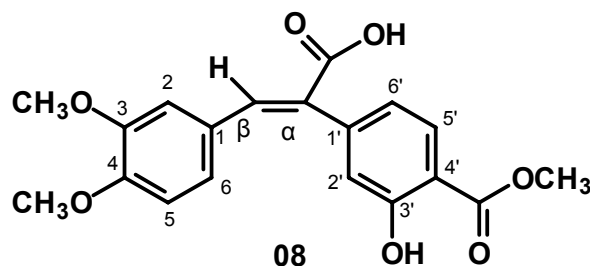


ESQUEMA 3.2: Proposta biogênica para os derivados do ácido diidrocinâmico

3.2.2 – Derivado do Ácido Cinâmico

3.2.2.1- Determinação estrutural da substância 08

A substância **08** foi isolada do extrato diclorometano do tronco subterrâneo de *H. oreadica* e sua estrutura foi determinada com base em experimentos de RMN de ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC, HMBC e através de experimento de CG-EM. Esta estrutura parece ser inédita na literatura até o momento.



O espectro de RMN de ^1H de **08** (FIGURA 3.29, pg 80) mostra sinais para sete hidrogênios em região espectral desblindada, sendo quatro dubletos em δ 8,22 (1H, $J= 8,4$ Hz), δ 7,22 (1H, $J= 2,0$ Hz), δ 6,93 (1H, $J= 8,4$ Hz) e δ 6,87 (1H, $J= 2,0$ Hz) referentes aos hidrogênios H-5', H-2, H-5 e H-2', respectivamente; um singlete em δ 7,95 de H- β e dois duplo dubletos, sendo um de H-6 em δ 7,06 (1H, $J= 8,4$ e 2,0 Hz) e o outro de H-6' em δ 6,99 (1H, $J= 8,4$ e 2,0 Hz). Além disso, observa-se ainda três singletos em δ 3,92, δ 3,93 e δ 3,94 característicos de metoxilas.

O espectro de RMN de ^{13}C (FIGURA 3.30, pg 80) apresenta sinais de 19 carbonos para a molécula, cujos valores podem ser observados na TABELA 3.9 (pg 79).

O experimento de HSQC (FIGURA 3.31, pg 81) mostra a correlação a J' de H-5' em δ 8,22 com C-5' em δ 127,8, de H-6' em δ 6,99 com C-6' em δ 114,6 e de H-2' em δ 6,87 com o sinal em δ 100,1 de C-2'. Outras correlações observadas pelo HSQC foram do H-6 em δ 7,06 com o C-6 em δ 121,1; H-5 em δ 6,93 com o C-5 em δ 111,3 e de H-2 em δ 7,22 com o C-2 em δ 112,6, atribuindo

assim todas as correlações para os dois anéis aromáticos trissubstituídos. Ainda foi possível observar a correlação do singlete em δ 7,95 referente ao H- β com C- β em δ 152,2.

No espectro de COSY (FIGURA 3.32, pg 81), pode-se observar o acoplamento entre H-6 (δ 7,06) e um sinal em δ 6,93 atribuído ao H-5. Outra correlação observada ainda foi de H-6' em δ 6,99 com um sinal em δ 8,22 atribuído ao H-5'.

No espectro de HMBC (FIGURA 3.33, pg 82), o sinal referente ao H- β (δ 7,95) mostra correlação com C-1 (δ 124,7), com o sinal em δ 158,0 referente ao C- α e com o sinal em δ 176,0 do carbono da carboxila. Ainda é possível observar a correlação de H-2 (δ 7,22) com C-6 (δ 121,1) e C-3 (δ 149,2); H-6 (δ 7,06) com C-2 (δ 112,6) e com um sinal referente a um carbono quaternário em δ 148,9, o qual foi atribuído ao C-4 e H-5 (δ 6,93) com C-1 (δ 124,7) e com C-4 (δ 148,9) (FIGURA 3.28 (1), pg 76).

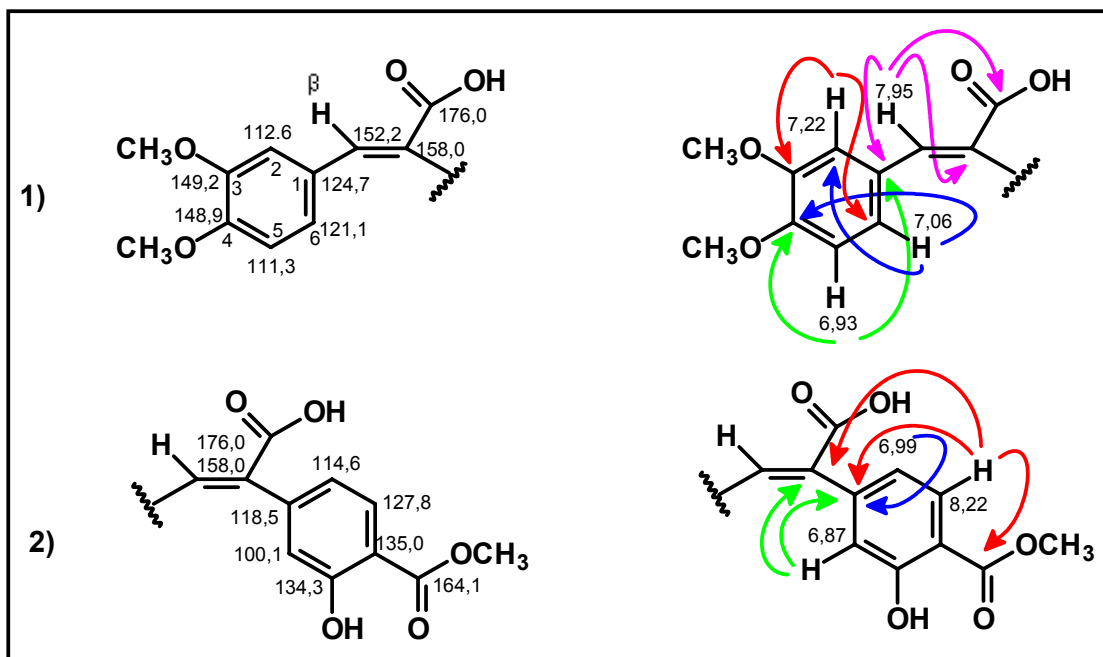


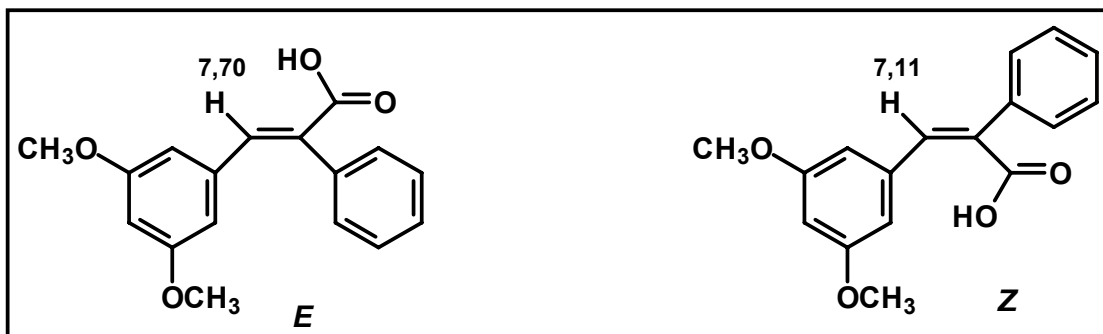
FIGURA 3.28: Correlações observadas no HMBC para **08**

Pelo espectro de HMBC observa-se que duas metoxilas possuem o mesmo deslocamento químico (δ 3,92) e apresentam correlações com C-3 e C-4. Desta forma, conclui-se que uma delas está ligada ao C-3 e a outra a C-4, e o valor de carbono para ambas é δ 55,8.

O hidrogênio H-6' (δ 6,99) apresentou apenas uma correlação via HMBC, com um sinal em δ 118,5 que foi atribuído ao C-1'. O H-5' (δ 8,22) apresentou correlação com C- α em δ 158,0, com um sinal em δ 118,5 atribuído ao C-1' e com um carbono em δ 164,1 que suporta a terceira metoxila; o sinal em δ 6,87 (H-2') correlacionou-se com C- α (δ 158,0) e com um sinal em δ 118,5 referente ao C-1' (FIGURA 3.28 (2), pg 76).

A configuração da substância **08** (*E* ou *Z*) foi realizada com base na literatura (JANUÁRIO *et al.*, 1992; JACKMAN, *et al.*, 1960; GERIG, *et al.*, 1970). Estudos relatam que o deslocamento de um hidrogênio β -olefínico *Z* a um grupo aldeído ou carboxílico é significativamente mais desblindado que um hidrogênio *E*. Segundo POPLE e McCONNEL citado por JACKMAN (1960), o deslocamento químico de um hidrogênio na molécula dependerá da relação espacial entre o hidrogênio e vários grupos de elétrons que circulam ao seu redor. Estas correntes de elétrons podem arbitrariamente atuarem de 3 maneiras, seja pela circulação diamagnética local, circulação paramagnética ou circulação diamagnética interatômica e são elas que promovem a diferenciação de deslocamento químico entre um hidrogênio e um determinado grupo.

Abaixo é mostrado uma substância similar à **08** nas duas configurações possíveis e seus respectivos deslocamentos químicos:



Portanto, comparando estes deslocamentos químicos com aquele obtido via RMN de ^1H para o hidrogênio na posição β com um valor de δ 7,95, é possível propor que a configuração da substância **08** seja *E*.

O espectro de massas (FIGURA 3.34, pg 82) obtido por CG-EM da substância **08** não detectou o pico do íon molecular; entretanto aparece o íon $[\text{M}]^+$ em m/z 312 que indica possivelmente a perda de ácido fórmico da molécula. O ESQUEMA 3.3 (pg 83) mostra a proposta de fragmentação.

Desta forma, pode-se determinar a estrutura em questão como sendo *E*-ácido 3,4-dimetoxi- α (3,4-hidroxi-4-carbometoxifenil)cinâmico.

TABELA 3.9: Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e HMBC de **08**

Substância 08 (400/100 MHz, CDCl_3)			
H/C	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm)	Correlações observadas no HMBC
1	-	124,7	-
2	7,22 (1H, <i>d</i> , $J= 2,0$)	112,6	C-3, C-6
3		149,2	
4	-	148,9	-
5	6,93 (1H, <i>dl</i> , $J= 8,4$)	111,3	C-1, C-4
6	7,06 (1H, <i>dd</i> , $J= 8,4;2,0$)	121,1	C-2, C-4
1'	-	118,5	-
2'	6,87 (1H, <i>d</i> , $J= 2,0$)	100,1	C-1', C- α
3'	-	134,3	-
4'	-	135,0	-
5'	8,22 (1H, <i>d</i> , $J= 8,4$)	127,8	C-1', <u>C</u> OOCH ₃ , C- α
6'	6,99 (1H, <i>dd</i> , $J= 8,4; 2,0$)	114,6	C-1'
<u>C</u> OOH	-	176,0	-
<u>C</u> OOCH ₃	-	164,1	-
COO <u>C</u> H ₃	3,933 (3H, <i>s</i>)	56,0	-
3-OCH ₃	3,917 (3H, <i>s</i>)	55,8	C-4, C-3
4-OCH ₃	3,926 (3H, <i>s</i>)	55,8	C-3, C-4
H/C- β	7,95 (1H, <i>s</i>)	152,2	C-1, C- α , <u>C</u> OOH
C- α		158,0	-

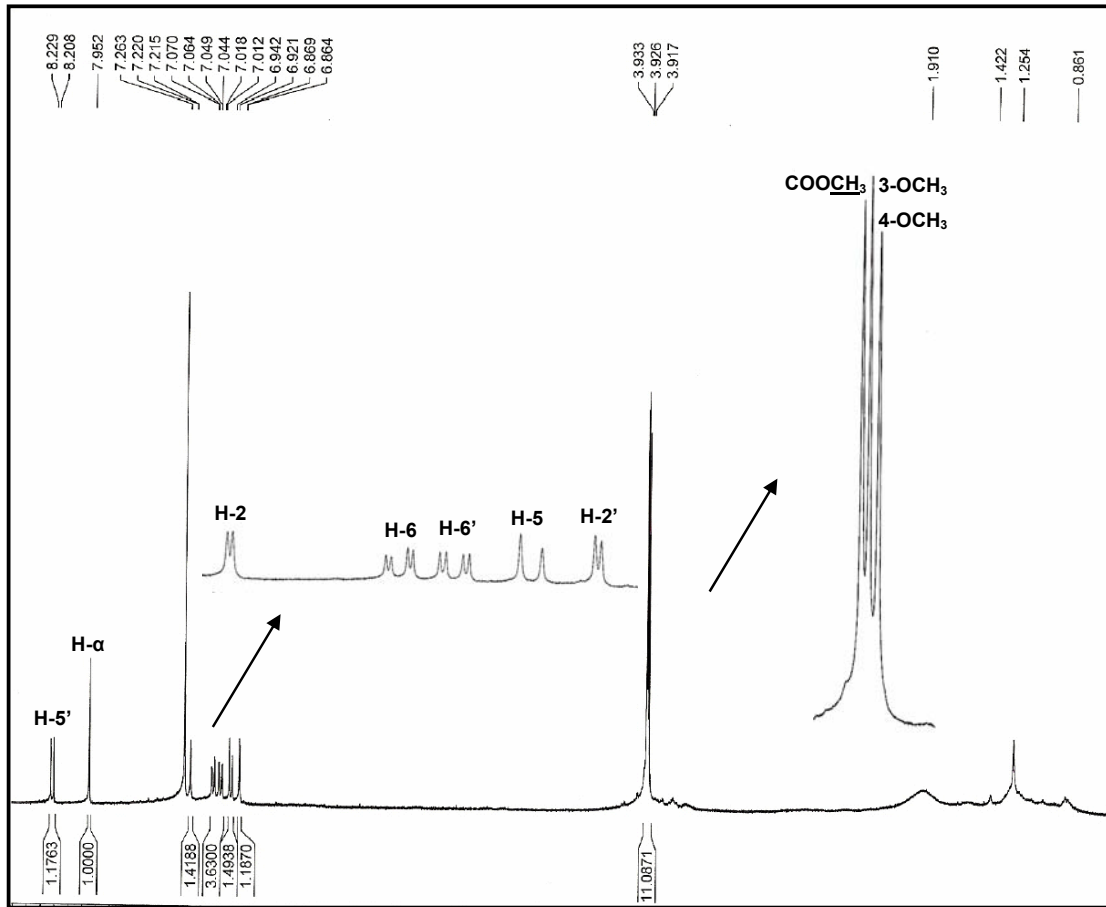


FIGURA 3.29: Espectro de RMN de ^1H de **08** (CDCl_3 , 400 MHz)

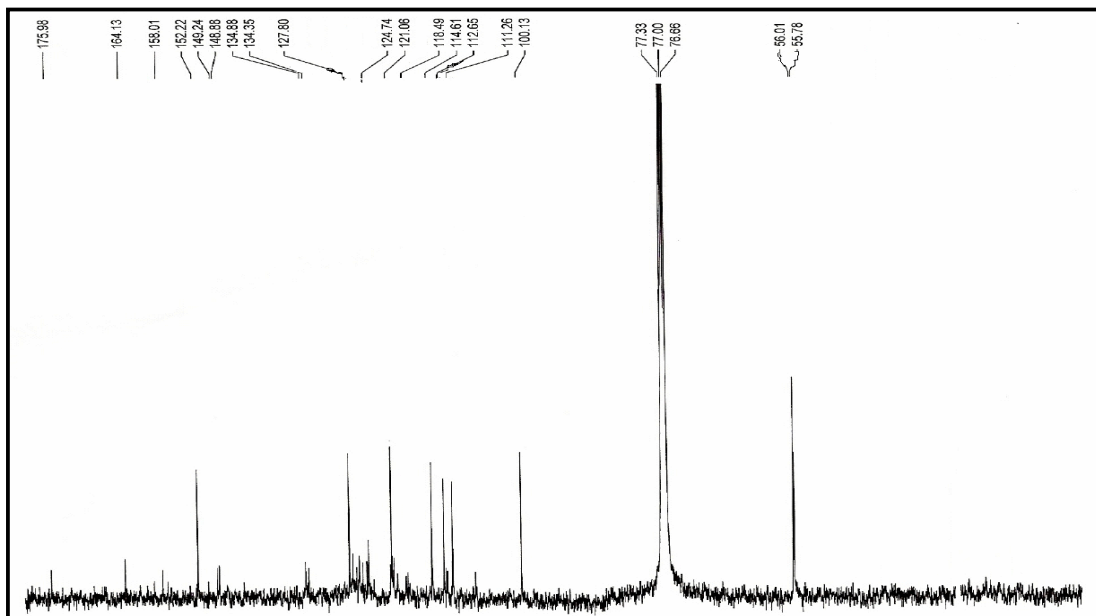


FIGURA 3.30: Espectro de RMN de ^{13}C de **08** (CDCl_3 , 100 MHz)

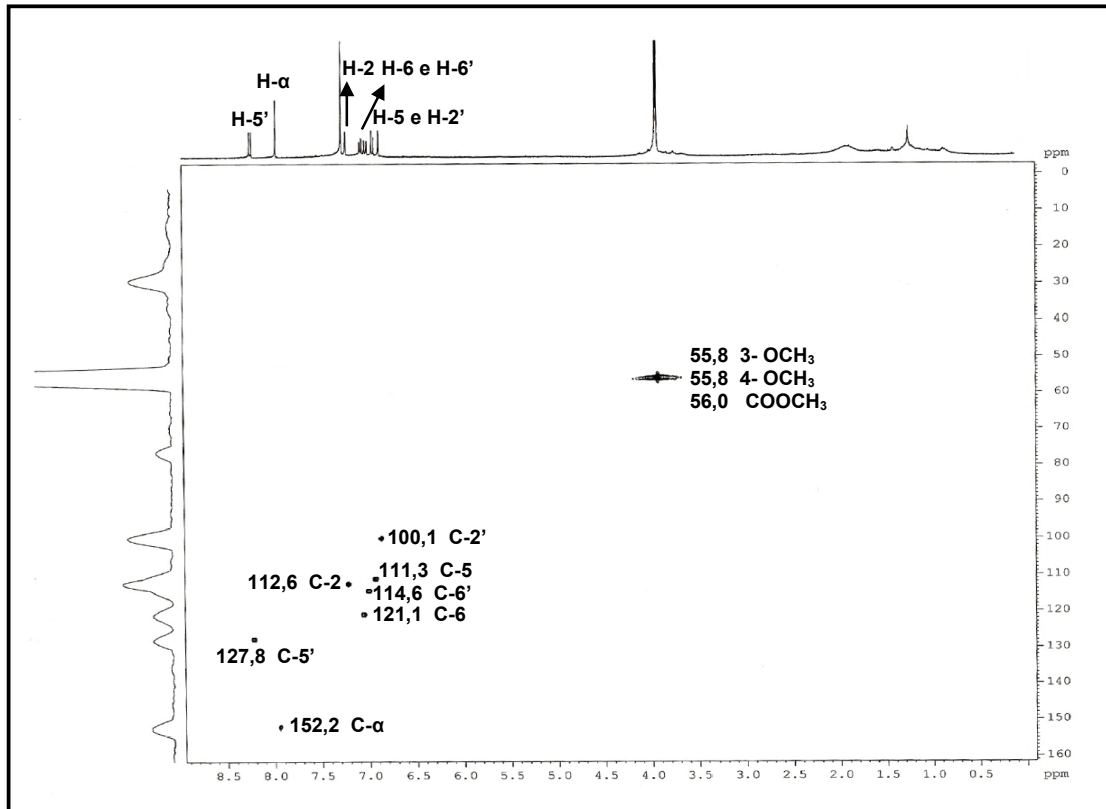


FIGURA 3.31: Mapa de contorno de g-HSQC de **08** (CDCl₃, 400MHz)

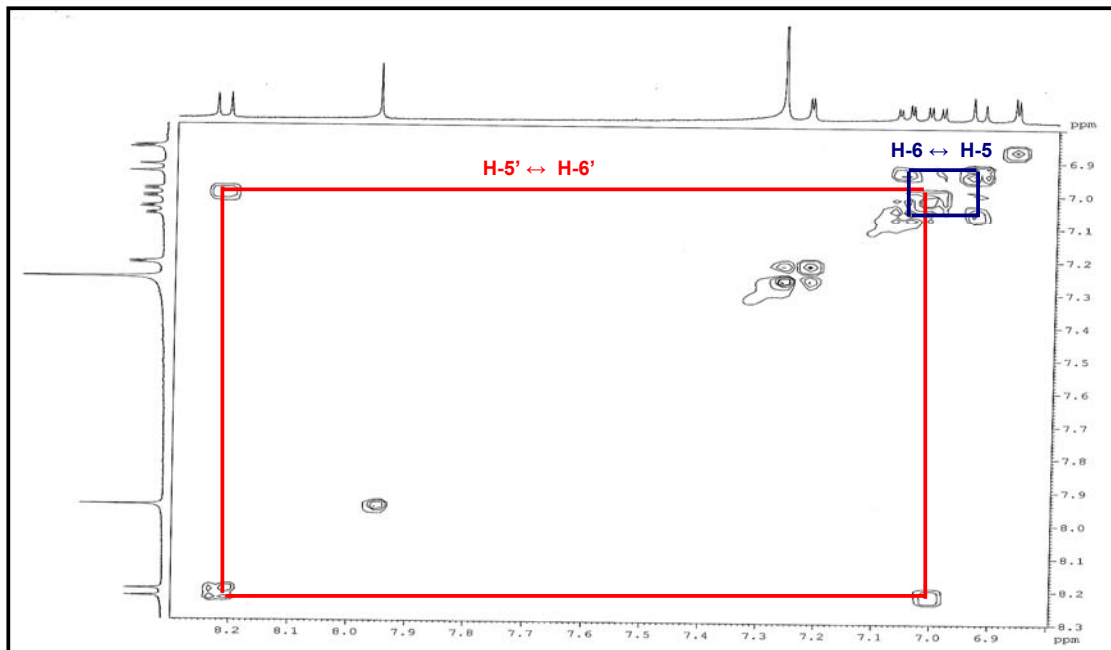


FIGURA 3.32: Espectro de g-COSY de **08** (CDCl₃, 400 MHz)

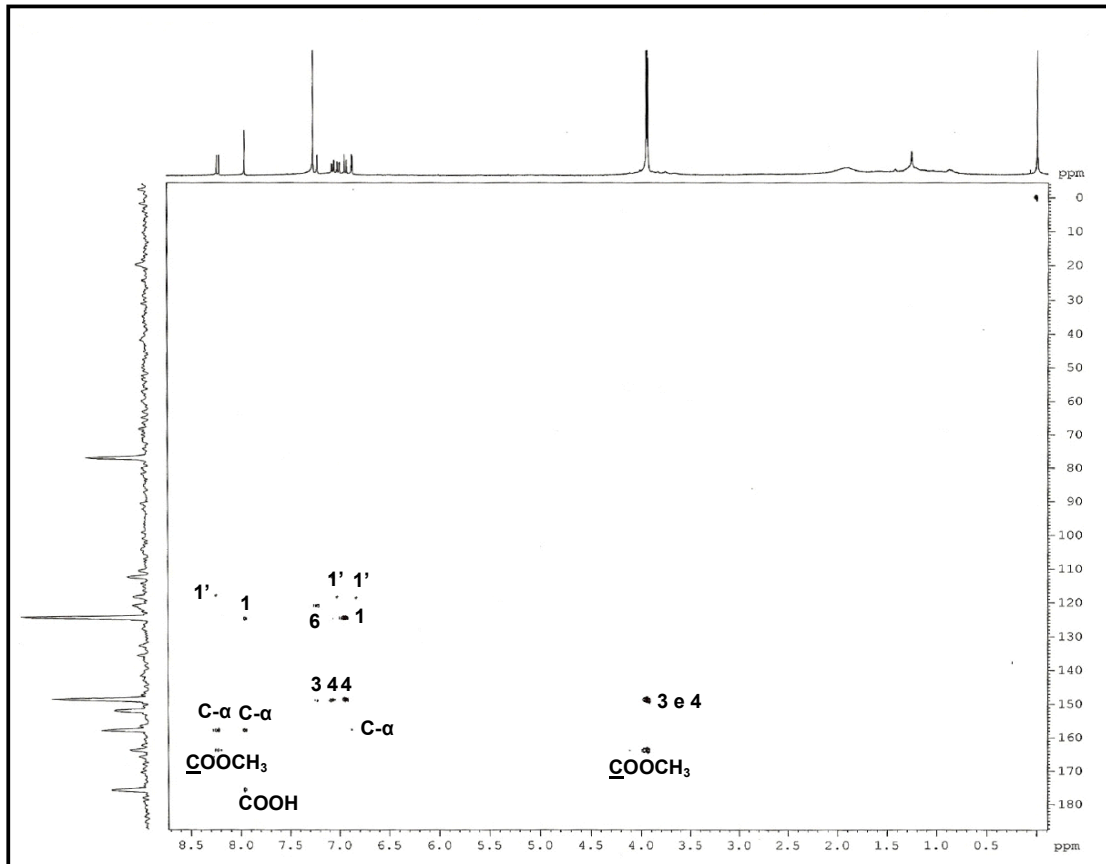


FIGURA 3.33: Mapa de contorno de g-HMBC de **08** (CDCl₃, 400MHz)

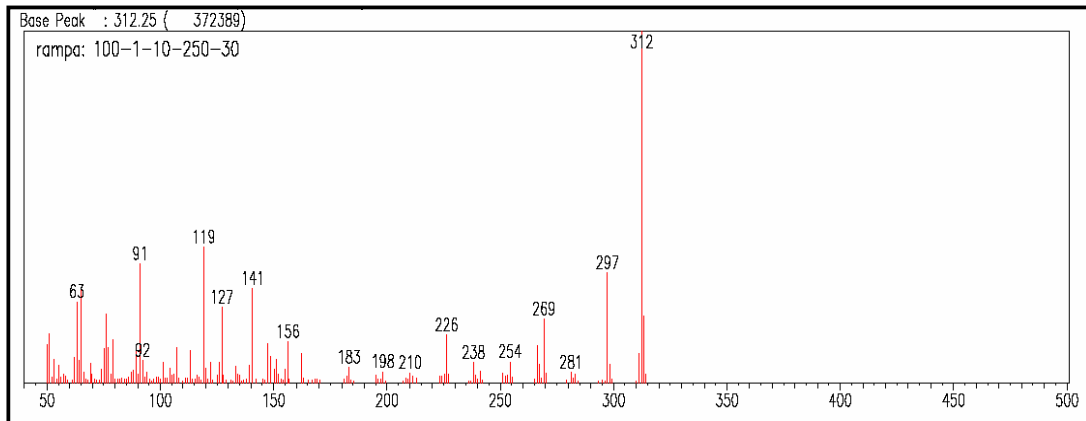
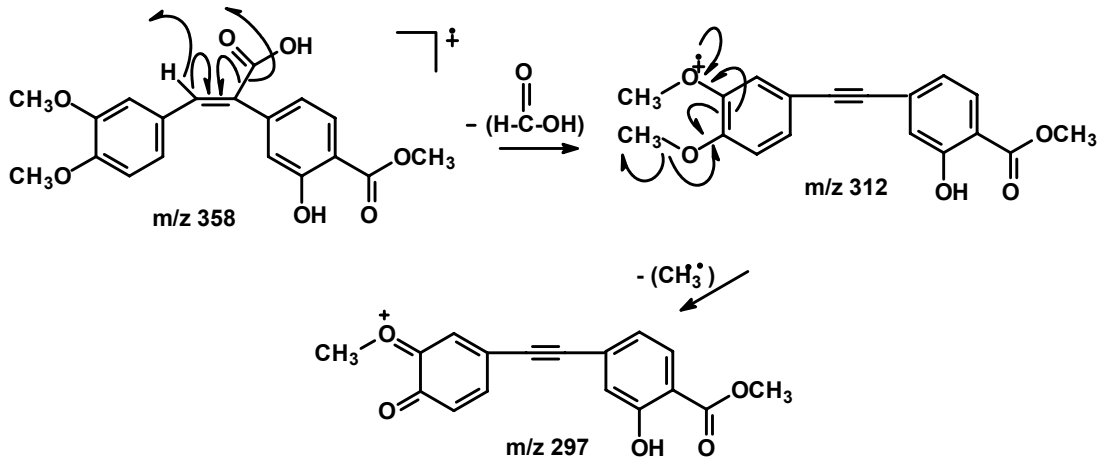
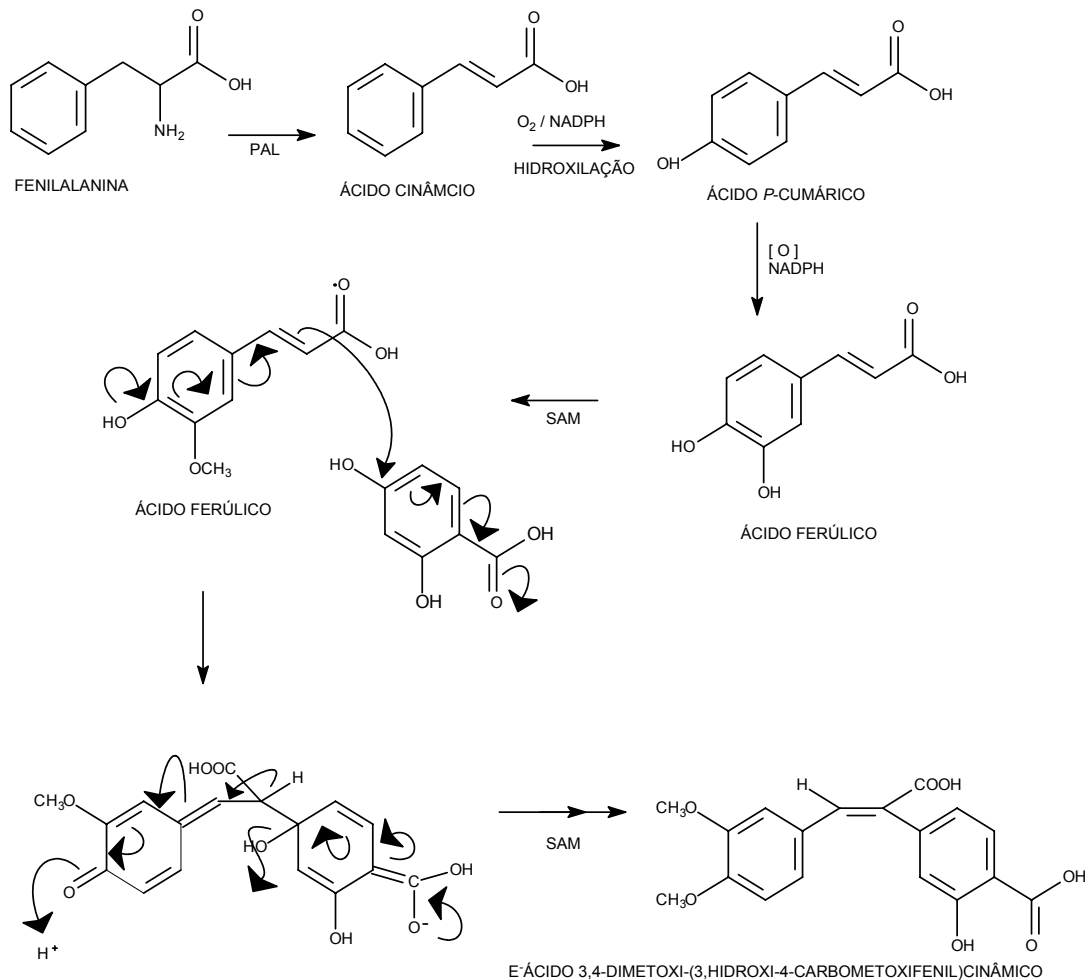


FIGURA 3.34: Espectro de massas de **08** (IE-70eV)



ESQUEMA 3.3: Proposta de fragmentação para 08

3.2.2.2- Biogênese da Substância 08



ESQUEMA 3.4: Proposta biogênética para 08

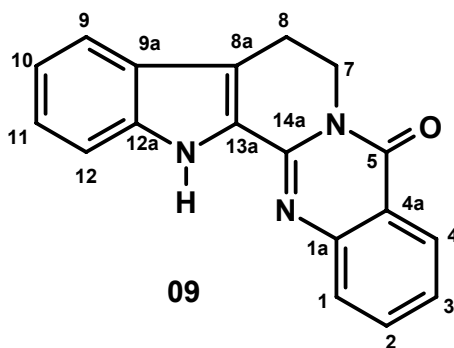
3.2.3 – Alcalóides

Os alcalóides constituem um vasto grupo de metabólitos secundários com grande diversidade estrutural, representando cerca de 20% das substâncias naturais descritas (HENRIQUES *et al.*, 2001). As plantas da família Rutaceae são capazes de produzir uma grande variedade de alcalóides derivados do ácido antranílico, tais como alcalóides furoquinolínicos, 2-quinolona, 4-quinolona, piranoquinolonas e acridônicos, dentre outros (WATERMAN, 1999). Alguns alcalóides são descritos para o gênero *Hortia*, dentre eles os furoquinolínicos (PACHTER, *et al.*, 1960; BRAGA, 2005), 2-quinolona (PÁDUA, 1976; FERRACIN, 1992; BRAGA, 2005), piranoquinolonas (CUCA, 1998; BRAGA, 2005) e os indolopiridoquinazolínicos (PACHTER, 1957; CUCA, 1998; BRAGA, 2005).

Neste estudo foram isolados quatro alcalóides, sendo dois indolopiridoquinazolínicos (rutaecarpina e 7,8-desidrorutaecarpina), um furoquinolínico (dictamina) e um piranoquinolona (N-metilflindersina). O alcalóide 7,8-desidrorutaecarpina ainda não havia sido relatado para o gênero *Hortia*.

3.2.3.1- Determinação estrutural da substância 09

O alcalóide do tipo indolopiridoquinazolínico **09** foi isolado dos extratos diclorometano do tronco subterrâneo e das folhas de *H. oreadica*, extrato diclorometano das folhas de *H. brasiliiana* e extrato metanólico do tronco de *H. superba*. Sua estrutura foi determinada com base em espectros de RMN de ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC e HMBC e por comparação com dados da literatura (RIBEIRO, 2006).



O espectro de RMN de ^1H de **09** (FIGURA 3.36, pg 89) mostra sinais de 8 hidrogênios aromáticos na região de δ 8,32 a 7,17 e um outro sinal em δ 9,22 (1H, s) relativo ao hidrogênio ligado ao nitrogênio (H-13). Os dois sinais em δ 4,59 (2H, t, $J=7,2$ Hz) e δ 3,24 (2H, t, $J=7,2$ Hz) são relativos aos hidrogênios H-7 e H-8, respectivamente. É possível observar H-4 em δ 8,32 (1H, ddd, $J=8,0; 1,2$ e $0,4$ Hz), acoplando com constantes orto, meta e para com H-3, H-2 e H-1 respectivamente.

O espectro de RMN de ^{13}C (FIGURA 3.37, pg 89) mostra sinais para 18 carbonos, cujos valores encontram-se na TABELA 3.11 (pg 88).

Analisando o espectro de COSY (FIGURA 3.38, pg 90), H-4 em δ 8,32 mostra correlação com um sinal em δ 7,43 atribuído a H-3. O sinal atribuído ao H-3 (δ 7,43) mostra correlação com um sinal em δ 7,73 atribuído ao H-2. Através do espectro de HSQC (FIGURA 3.39, pg 91) pode-se atribuir C-4 em δ 127,3, C-3 em δ 126,3, C-2 em δ 134,4 e C-1 em δ 126,3.

Outros valores atribuídos via HSQC são para C-7 em δ 41,2 e C-8 em δ 19,6. Pelo espectro de HMBC (FIGURA 3.40, pg 91) observa-se correlações de H-7 (δ 4,59) com C-8 (δ 19,6), com um sinal em δ 118,7 atribuído ao C-8a, com um sinal em δ 145,0 atribuído ao C-14a e com C-5 em δ 161,4; o H-8 (δ 3,24) mostra correlações com C-7 (δ 41,2), com C-8a (δ 118,7) e com um sinal em δ 125,7 atribuído ao C-9a (FIGURA 3.35 (1), pg 86).

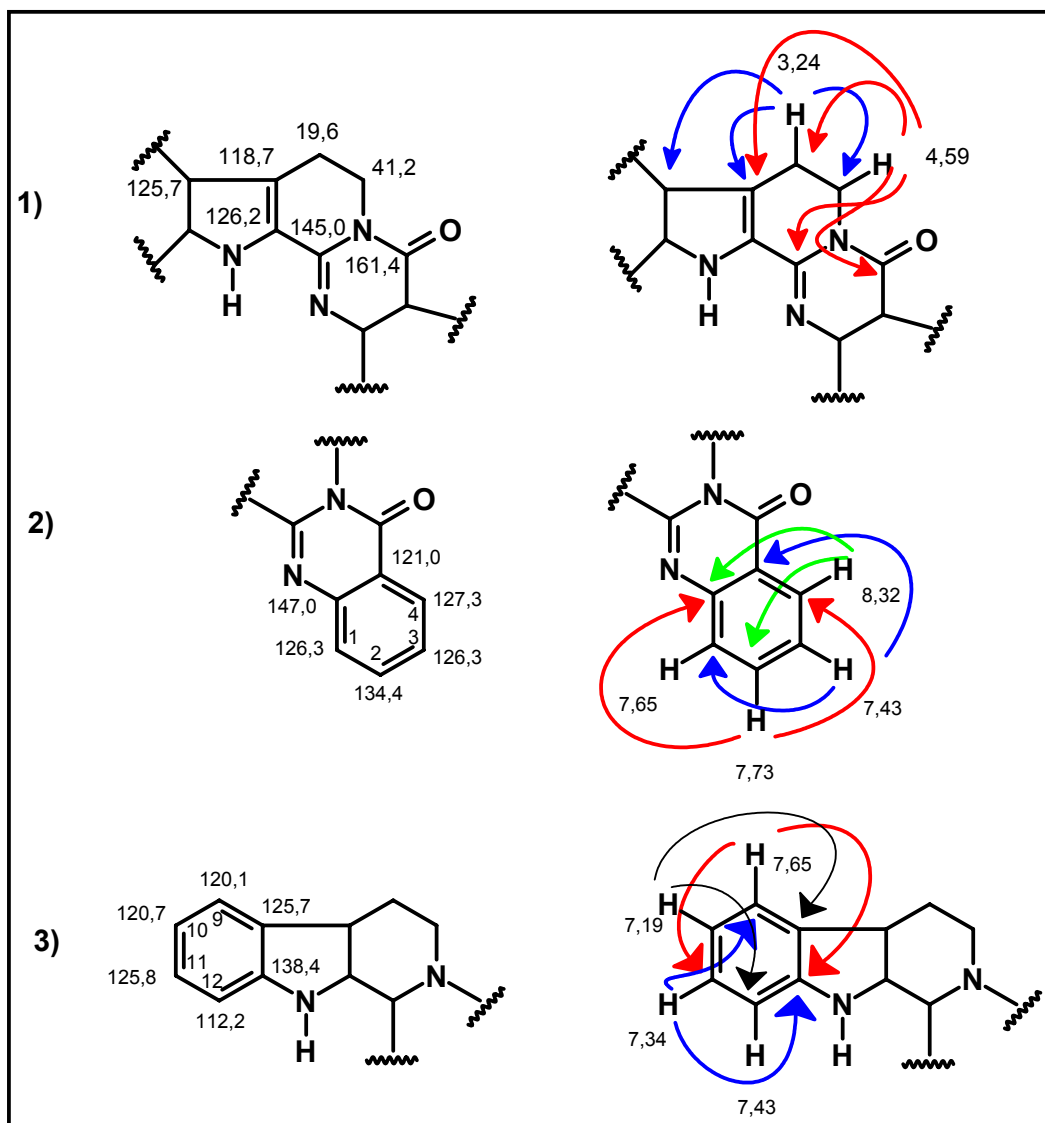


FIGURA 3.35: Correlações observadas no HMBC para **09**

Pelo HMBC, H-4 (δ 8,32) correlaciona-se com C-2 (δ 134,4) e com C-1a (δ 147,0); H-2 (δ 7,73) mostra correlação com C-4 (δ 127,3) e com C-1a (δ 147,0) e H-3 (δ 7,43) mostra correlação com C-4a (δ 121,0) e com C-1 (δ 126,3) (FIGURA 3.35 (2), pg 86).

Ainda pelo espectro de HMBC observa-se que um sinal em δ 7,19 mostra duas correlações, sendo uma com C-12 (δ 112,2) e a outra com C-9a (δ 125,7), e foi atribuído ao H-10 que pelo espectro de HSQC mostra correlação com um carbono em δ 120,7, atribuído ao C-10. O sinal em δ 7,65 atribuído ao H-9 mostra correlação com C-11 (δ 125,8) e com um sinal em δ 138,4 atribuído ao C-

12a; H-11 em δ 7,34 mostra correlação com C-9 (δ 120,1), além da correlação com C-12a (FIGURA 3.35 (3), pg 86).

No espectro de COSY, podemos observar dois acoplamentos de H-10 (δ 7,19), sendo um com o sinal em δ 7,34 atribuído ao H-11 (C-11 em δ 125,8 pelo HSQC) e outro em δ 7,65 atribuído ao H-9 (C-9 em δ 120,1 pelo HSQC). O espectro de COSY mostra ainda correlação de H-11 com um sinal em δ 7,43 atribuído ao H-12.

Desta forma, através da análise dos espectros da substância **09** a estrutura foi determinada como sendo a rutaecarpina.

TABELA 3.10: Dados de RMN de ^1H de **09** e comparação com a literatura

H	SUBSTÂNCIA 09	RIBEIRO, 2006
	(400 MHz, CDCl_3)	(400 MHz, CDCl_3)
	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm), J (Hz)
1	7,65 (1H, <i>ddd</i> , $J=7,0; 1,2$ e $0,5$)	7,69 (1H, <i>dl</i> , $J=8,0$)
2	7,73 (1H, <i>ddd</i> , $J=8,4; 7,0$ e $1,2$)	7,71 (1H, <i>dd</i> , $J=7,0$ e $1,5$)
3	7,43 (1H, <i>ddd</i> , $J=8,4; 8,0$ e $1,2$)	7,46 (1H, <i>dd</i> , $J=1,5$ e $8,0$)
4	8,32 (1H, <i>ddd</i> , $J=8,0; 1,2$ e $0,5$)	8,31 (1H, <i>ddd</i> , $J=8,0; 1,5$ e $0,6$)
7	4,59 (2H, <i>t</i> , $J=7,2$)	4,58 (2H, <i>t</i> , $J=7,0$)
8	3,24 (2H, <i>t</i> , $J=7,2$)	3,23 (2H, <i>t</i> , $J=7,0$)
9	7,65 (1H, <i>dd</i> , $J=8,0$ e $1,2$)	7,62 (1H, <i>dd</i> , $J=8,0$ e $1,0$)
10	7,19 (1H, <i>ddd</i> , $J=8,0; 7,2$ e $1,2$)	7,17 (1H, <i>ddd</i> , $J=8,0; 7,0$ e $1,0$)
11	7,34 (1H, <i>ddd</i> , $J=8,4; 7,2$ e $1,2$)	7,32 (1H, <i>ddd</i> , $J=8,0; 7,0$ e $1,0$)
12	7,43 (1H, <i>dd</i> , $J=8,4$ e $1,2$)	7,42 (1H, <i>ddd</i> , $J=8,0$ e $1,0$)
13-NH	9,22 (1H, <i>s</i>)	9,49 (1H, <i>s</i>)

TABELA 3.11: Dados de RMN de ^{13}C de **09** e comparação com a literatura

C	SUBSTÂNCIA 09	RIBEIRO, 2006
	(100 MHz, CDCl_3)	(100 MHz, CDCl_3)
	δ (ppm)	δ (ppm)
1	126,3	126,4
1a	147,0	146,7
2	134,4	138,4
3	126,3	126,9
4	127,3	127,2
4a	121,0	121,0
5	161,4	161,4
7	41,2	41,1
8	19,6	19,6
8a	118,7	118,6
9	120,1	120,1
9a	125,7	125,7
10	120,7	120,6
11	125,8	126,2
12	112,2	112,1
12a	138,4	138,4
13a	126,2	126,9
14a	145,0	145,0

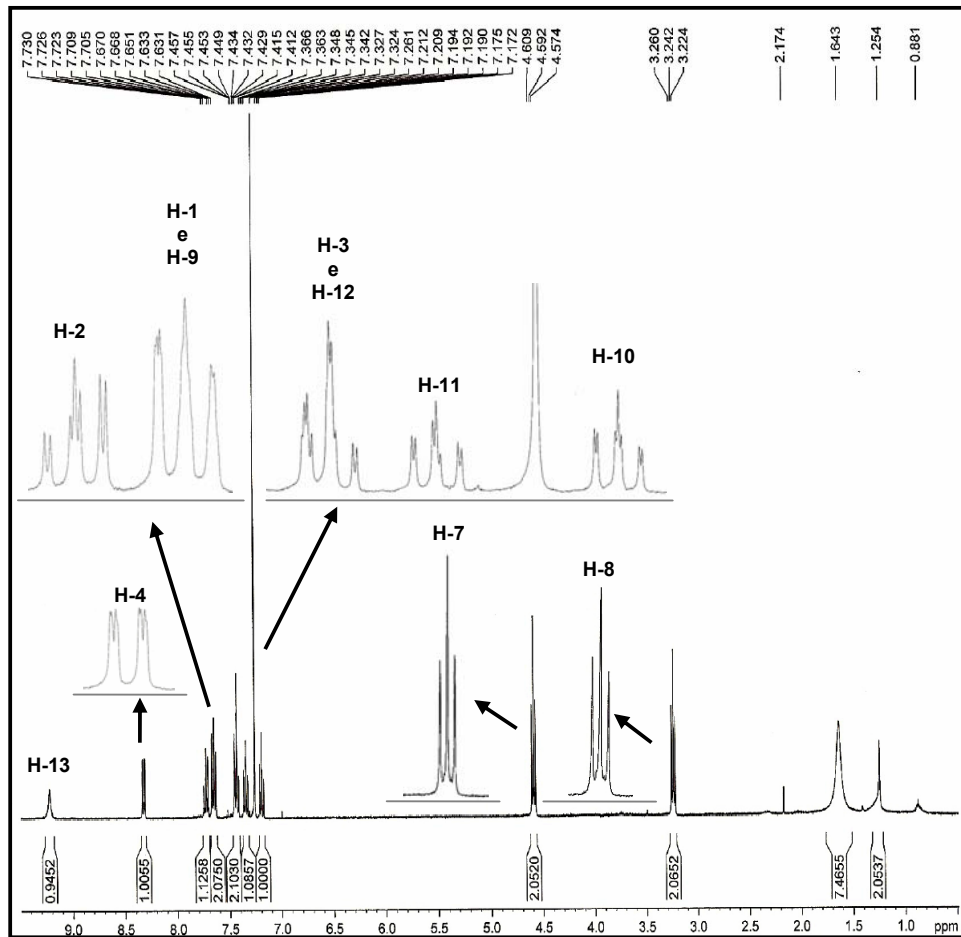


FIGURA 3.36: Espectro de RMN de ^1H de **09** (CDCl_3 , 400 MHz)

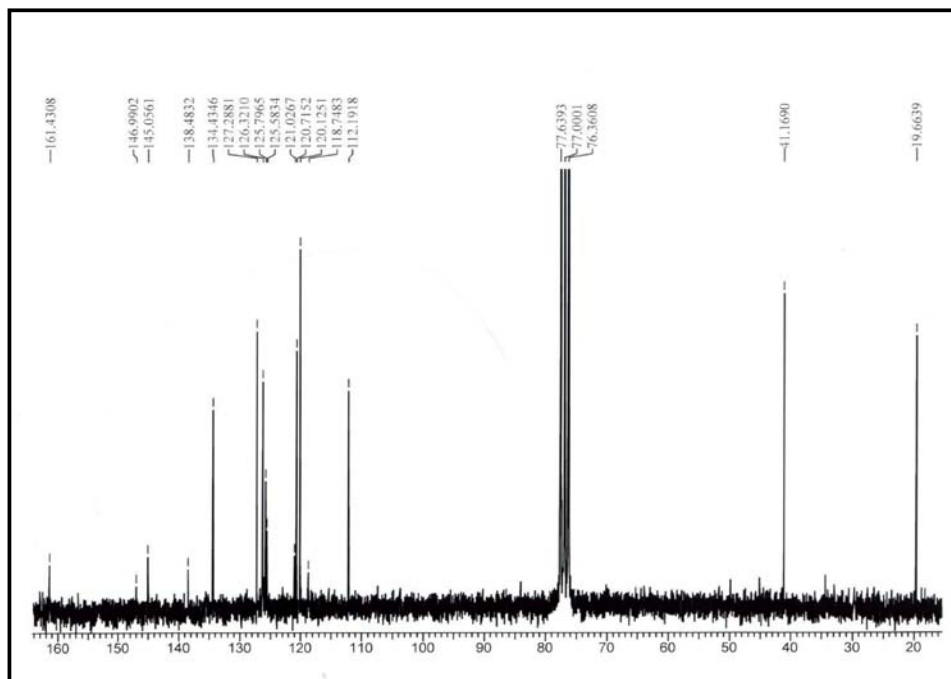


FIGURA 3.37: Espectro de RMN de ^{13}C de **09** (CDCl_3 , 100 MHz)

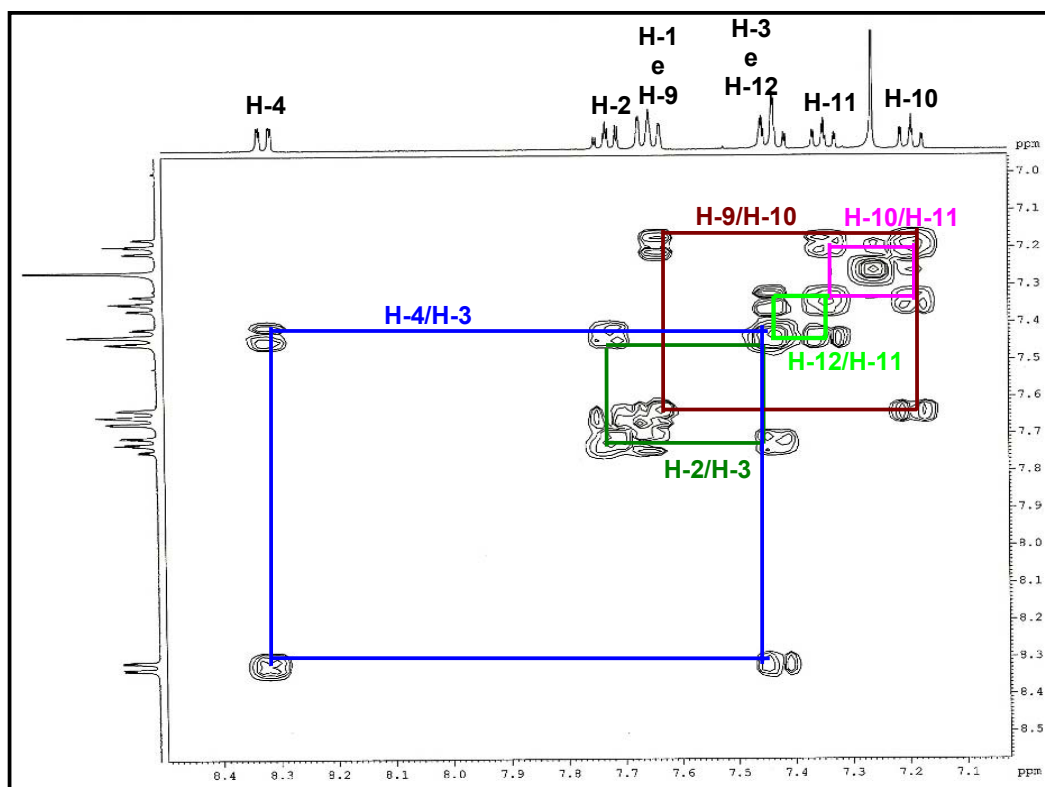
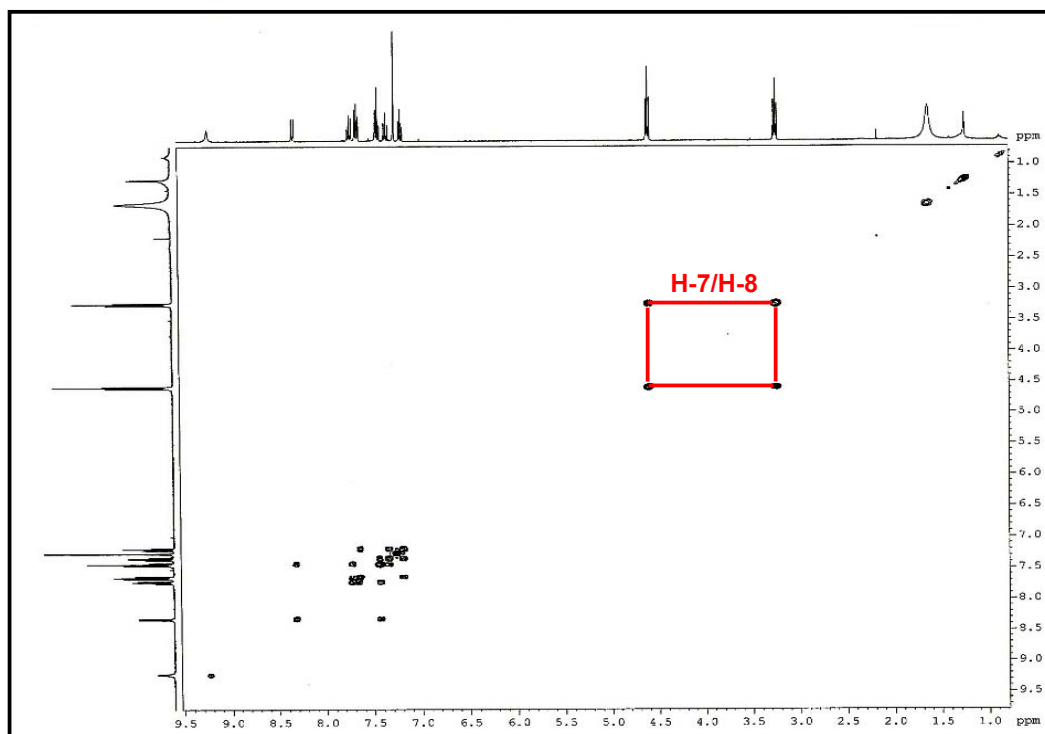


FIGURA 3.38: Espectro de g-COSY (e ampliação) de **09** (CDCl₃, 400 MHz)

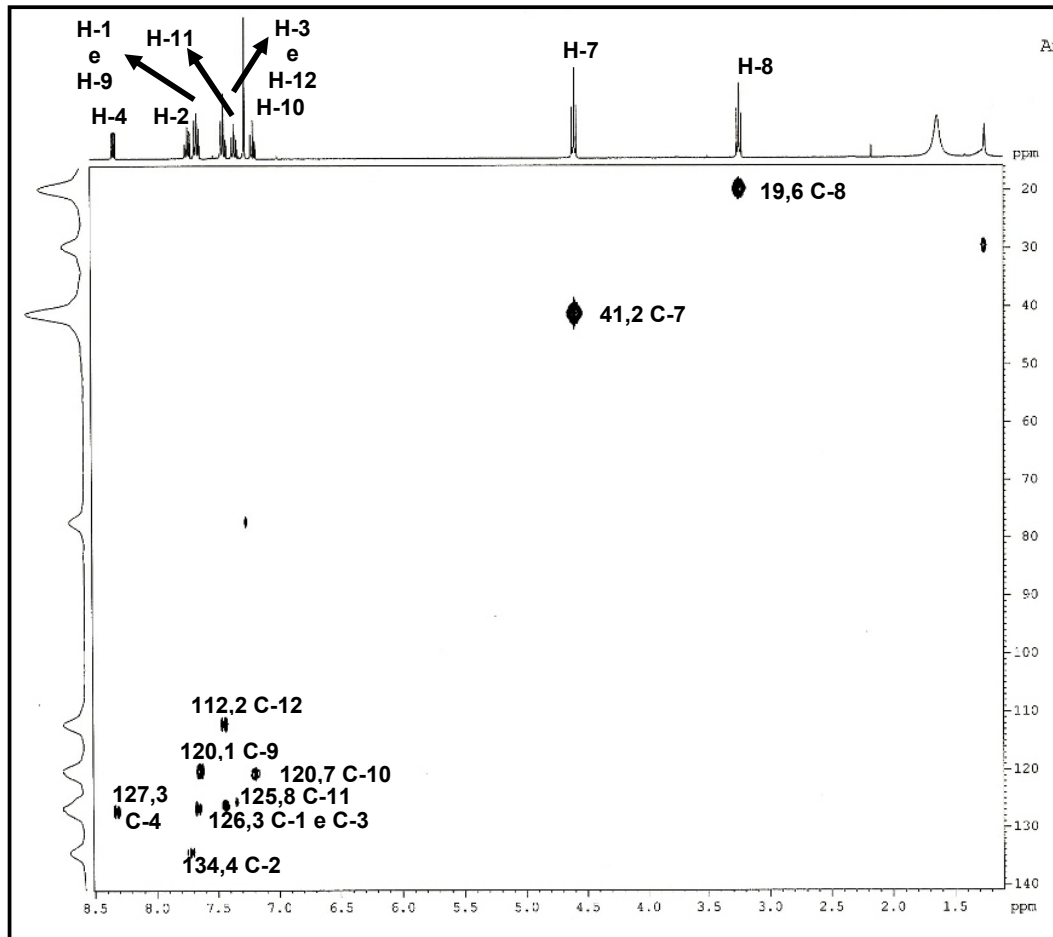


FIGURA 3.39: Mapa de contorno de g-HSQC de **09** (CDCl₃, 400MHz)

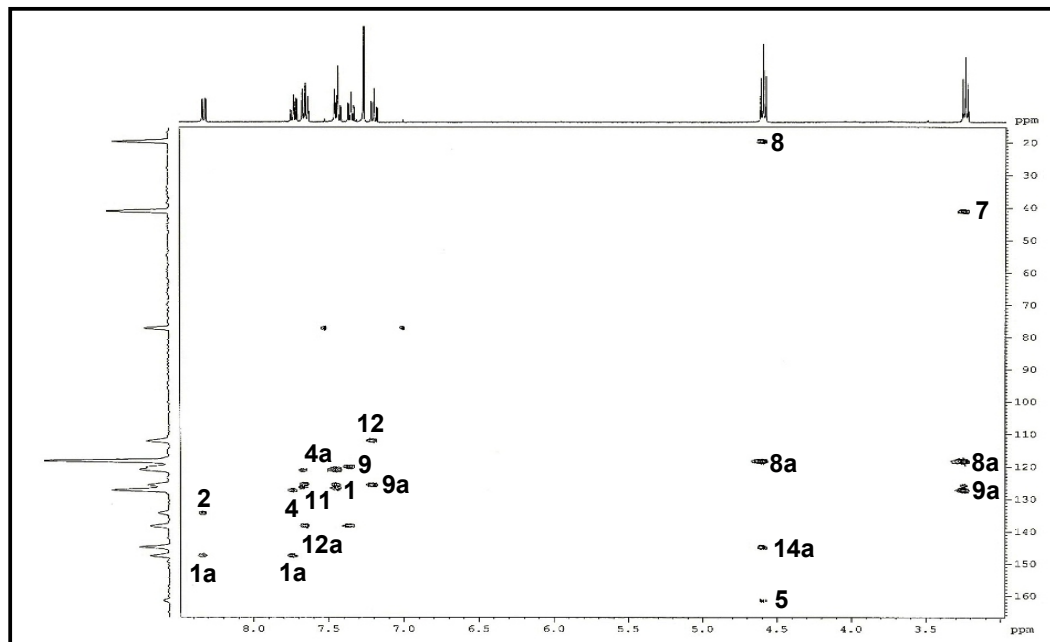
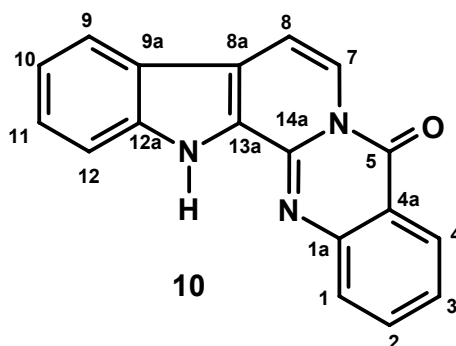


FIGURA 3.40: Mapa de contorno de g-HMBC de **09** (CDCl₃, 400MHz)

3.2.3.2- Determinação estrutural da substância 10

O alcalóide do tipo indolopiridoquinazolinico **10** foi isolado do extrato diclorometano do tronco subterrâneo de *H. oreadica* (EDTSHB) e apresentou-se como um cristal branco. A sua estrutura foi determinada com base em espectros de RMN de ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC e HMBC; CG-EM e por comparação com dados da literatura (IKUTA, *et al.*, 1998).



O espectro de RMN de ^1H de **10** (FIGURA 3.42, pg 96) apresenta sinais semelhantes ao da rutaecarpina (substância **09**) na região espectral de desblindagem, referentes a 10 hidrogênios aromáticos, ou seja, um tripleto largo em δ 7,34 que correlaciona-se pelo experimento de COSY (FIGURA 3.44, pg 97) com um sinal em δ 7,49 e com um dubleto em δ 8,04 ($J = 8,0$ Hz) referente a um hidrogênio com acoplamento em *orto*. O sinal em δ 7,49 correlaciona-se pelo COSY com δ 7,34 e 7,51. Pelo experimento de HSQC (FIGURA 3.45, pg 98), pode ser observado as correlações de δ 7,34 com o sinal de carbono em δ 121,2; δ 7,49 com δ 127,2; δ 7,51 com δ 112,2 e de δ 8,04 com δ 120,9, caracterizando-se assim um anel aromático dissubstituído.

Por meio do experimento de HMBC (FIGURA 3.46, pg 99) pode-se verificar a correlação do sinal em δ 7,34 (atribuído ao H-10) com o δ 112,2 (atribuído ao C-12) e 122,5 (C-9a); o sinal em δ 7,49 (H-11) se correlaciona com δ 120,9 (C-9) e 139,5 (C-12a); δ 7,51 (H-12) se correlaciona com δ 139,5 (C-12a) e 121,2 (C-10) e δ 8,04 (H-9) correlaciona-se com δ 122,5 (C-9a) e 139,5 (C-12a), além de uma correlação com um sinal em δ 120,9 atribuído ao C-8a (FIGURA 3.41 (1), pg 93).

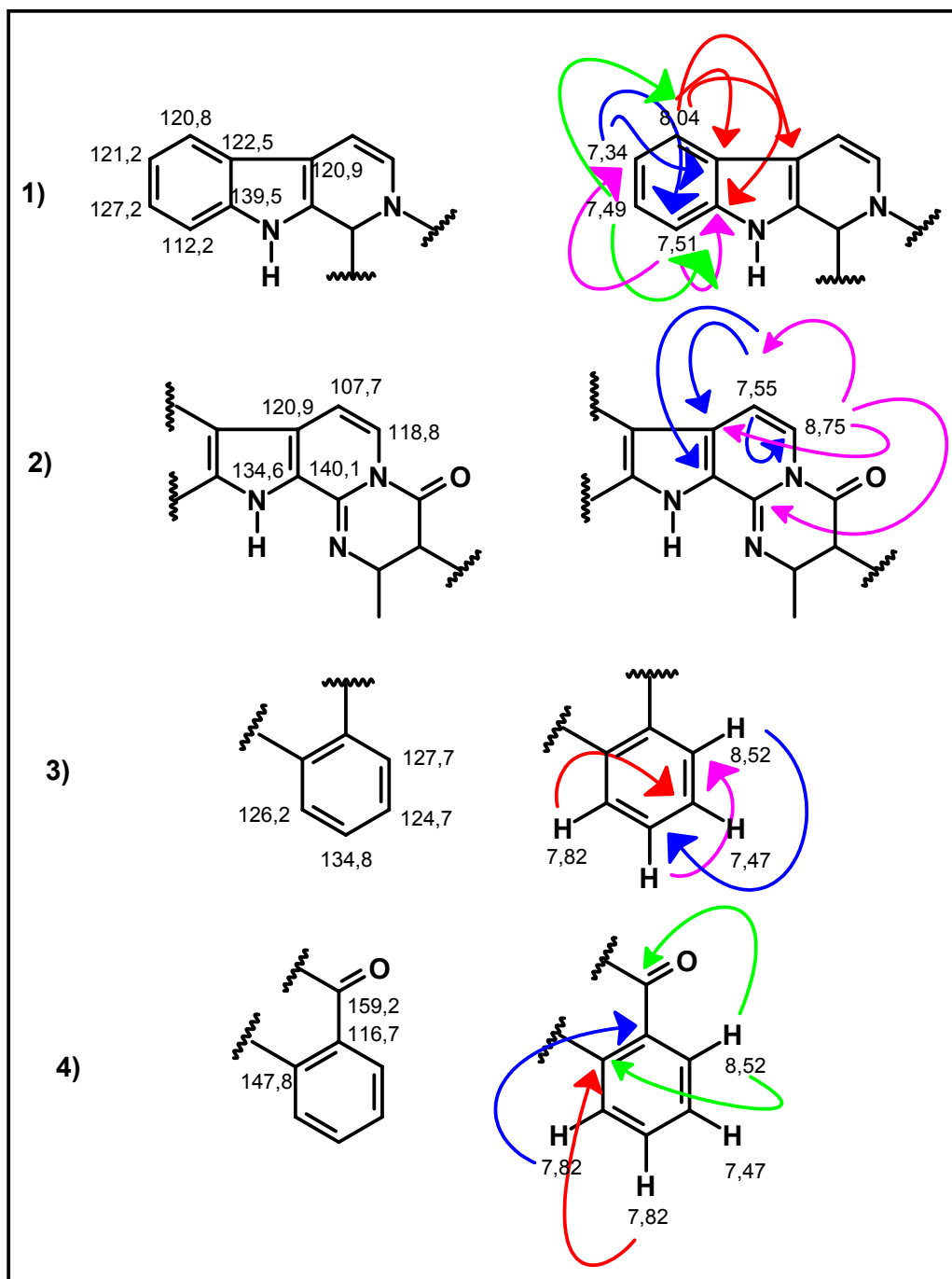


FIGURA 3.41: Correlações observadas no HMBC para **10**

O experimento de HMBC mostra também correlações do sinal em δ 7,55 (H-8) com δ 120,9 (C-8a), 134,8 (C-13a) e 118,7 (C-7). Esse sinal em δ 118,7 pelo experimento de HSQC correlaciona-se com o duplete em δ 8,76 que foi atribuído ao H-7. Este, por sua vez se correlaciona pelo experimento de HMBC com δ 107,5 (C-8), 120,9 (C-8a), 134,8 (C-13a), 140,1 (C-14a) e o carbono

carbonílico em δ 159,2 (C-5). Essas correlações são mostradas na FIGURA 3.41 (2) (pg 93).

O espectro de RMN de ^1H apresenta sinais para outro anel aromático, um multiplete em δ 7,82 (H-1 e H-2) que pelo HSQC refere-se aos carbonos em δ 126,2 e 134,8, respectivamente. Esse sinal em δ 7,82 acopla via COSY com um sinal em δ 7,47 (H-3) que pelo HSQC se refere ao C-3 em δ 124,7. Esse sinal em δ 7,47 acopla também via COSY com um dubleto em δ 8,52 ($J= 9,2$ Hz) que pelo HSQC se refere ao C-4 em δ 127,7. Esses dados sugerem a presença de um outro anel aromático dissustituído na estrutura da substância **09** (FIGURA 3.41 (3), pg 93).

O experimento de HMBC mostra ainda que os sinais em δ 7,82 (H-1) e 8,52 (H-4) correlacionam-se com δ 147,8 (C-1a) e 116,7 (4a), respectivamente. Sendo assim, estes sinais de carbono foram atribuídos ao anel aromático. O sinal em δ 8,52 apresenta ainda via HMBC correlação com um sinal de carbono carboxílico em δ 159,2. Com isso sugere-se que esta parte da estrutura seja da seguinte forma como mostrado por meio de suas correlações via HMBC (FIGURA 3.41 (4), pg 93).

O deslocamento químico do sinal de carbono em δ 147,8 do anel aromático sugere que esteja ligado a um nitrogênio como no caso da rutaecarpina (substância **08**). O deslocamento do carbono em δ 140,1 sugere que este esteja ligado a dois heteroátomos. O espectro de RMN de ^1H apresenta ainda um singleto largo em δ 10,2 referente à N-H na molécula.

Todos os dados de ^1H e ^{13}C (espectro de ^{13}C , FIGURA 3.43, pg 96) da substância **10** são mostrados na TABELA 3.12 (pg 95).

O espectro de massas (FIGURA 3.47, pg 100) exibiu $[\text{M}+\text{H}]^+$ em m/z 286, estando compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{18}\text{H}_{11}\text{ON}_3$. O ESQUEMA 3.5 (pg 100) mostra a proposta de fragmentação da substância **10**.

Desta forma a estrutura **10** foi determinada como sendo a 7,8-desidrorutaecarpina.

TABELA 3.12: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **10** e comparação com a literatura

H/C	SUBSTÂNCIA 10 (400/100 MHz, CDCl_3)		IKUTA, 1998 (500/125 MHz, CDCl_3)	
	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm)	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm)
1	7,81 (<i>sl</i>)	126,2	7,81	126,0
1a	-	147,8	-	147,5
2	7,81 (<i>sl</i>)	135,0	7,81	134,9
3	7,47 (<i>m</i>)	124,7	7,46	124,8
4	8,52 (1H, <i>d</i> , $J=9,2$)	127,7	8,50	127,7
4a	-	116,7	-	116,7
5	-	159,2	-	159,2
7	8,76 (1H, <i>d</i> , $J=7,2$)	118,7	8,75 (1H, <i>d</i> , $J=8,0$ Hz)	118,8
8	7,55 (1H, <i>d</i> , $J=7,2$)	107,5	7,55 (1H, <i>d</i> , $J=8$ Hz)	107,7
8a	-	120,9	-	120,9
9	8,04 (1H, <i>d</i> , $J=8,0$)	120,9	8,02	120,9
9a	-	122,6	-	122,5
10	7,34 (<i>m</i>)	121,2	7,33	121,3
11	7,49 (<i>m</i>)	127,2	7,48	127,4
12	7,51 (<i>m</i>)	112,2	7,52	112,3
12a	-	139,5	-	139,5
13	10,2 (1H, <i>s</i>)		10,15 (1H, <i>s</i>)	
13a	-	134,8	-	134,6
14a	-	140,1	-	140,1

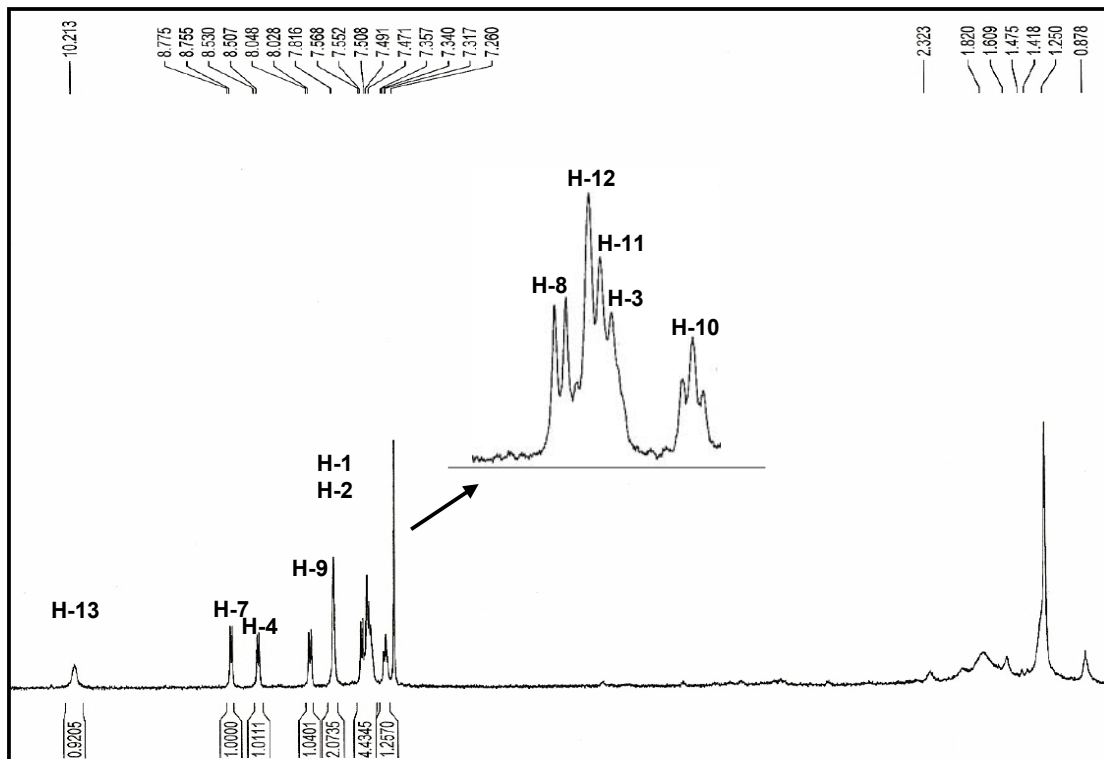


FIGURA 3.42: Espectro de RMN de ^1H de **10** (CDCl_3 , 400 MHz)

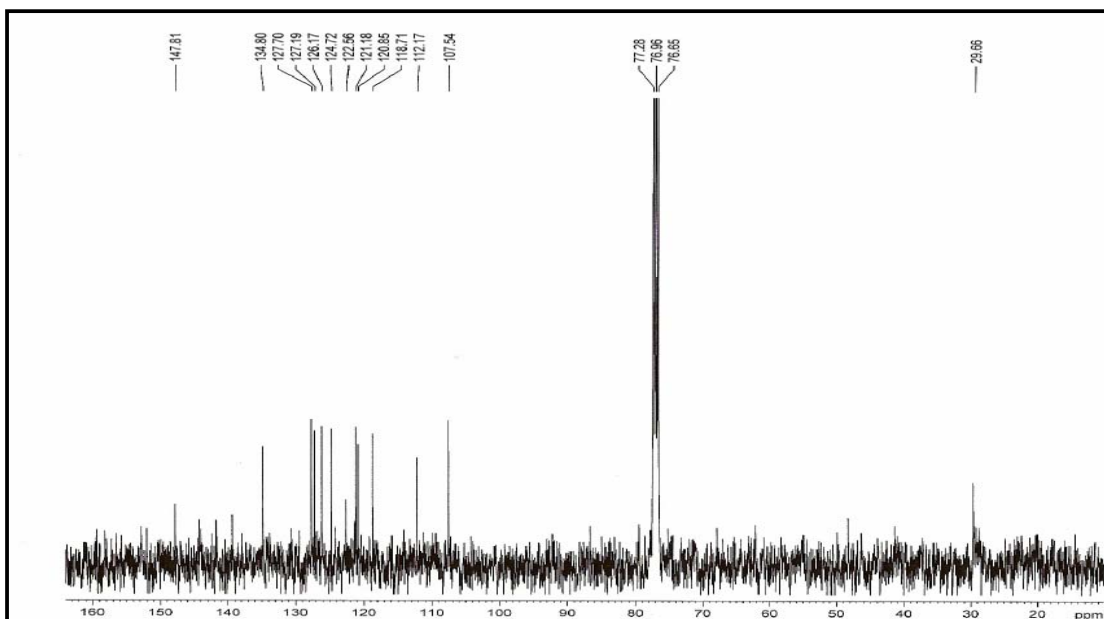


FIGURA 3.43: Espectro de RMN de ^{13}C de **10** (CDCl_3 , 100 MHz)

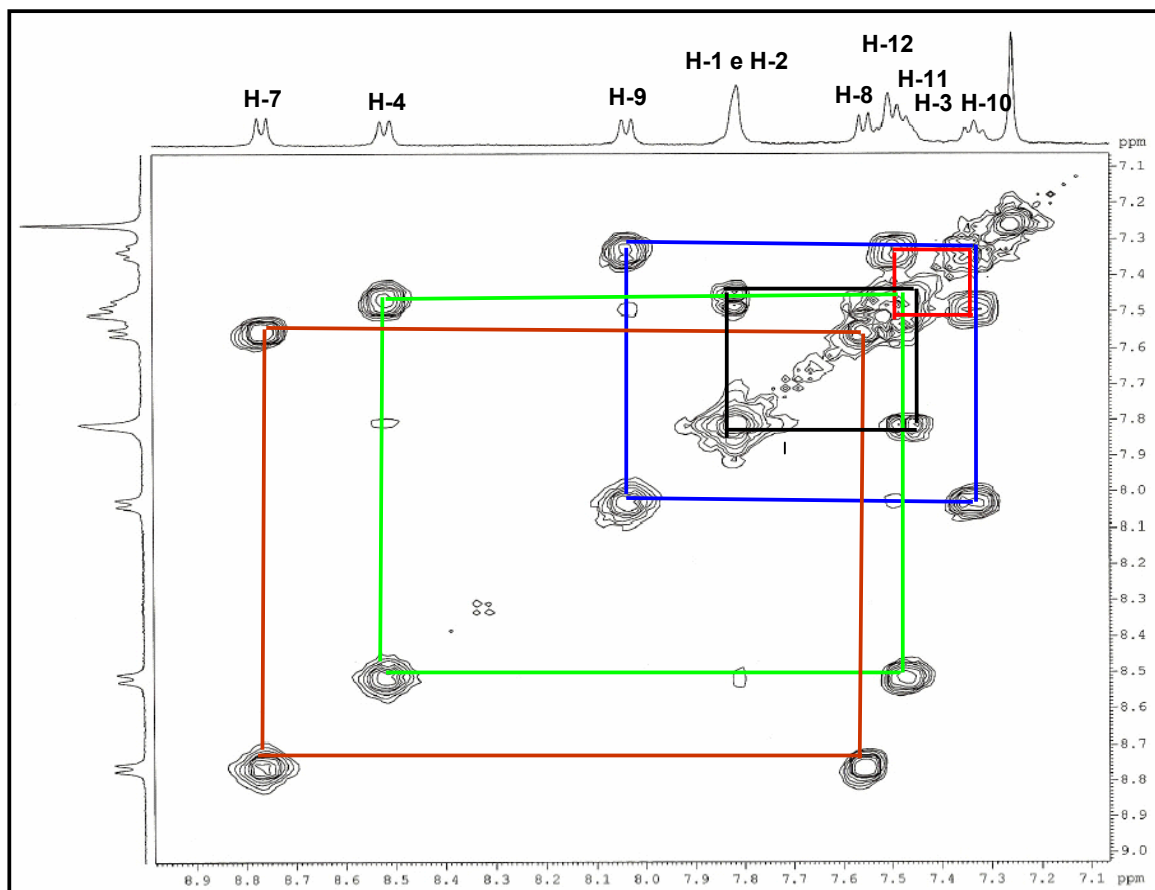


FIGURA 3.44: Espectro de g-COSY de **10** (CDCl₃, 400 MHz)

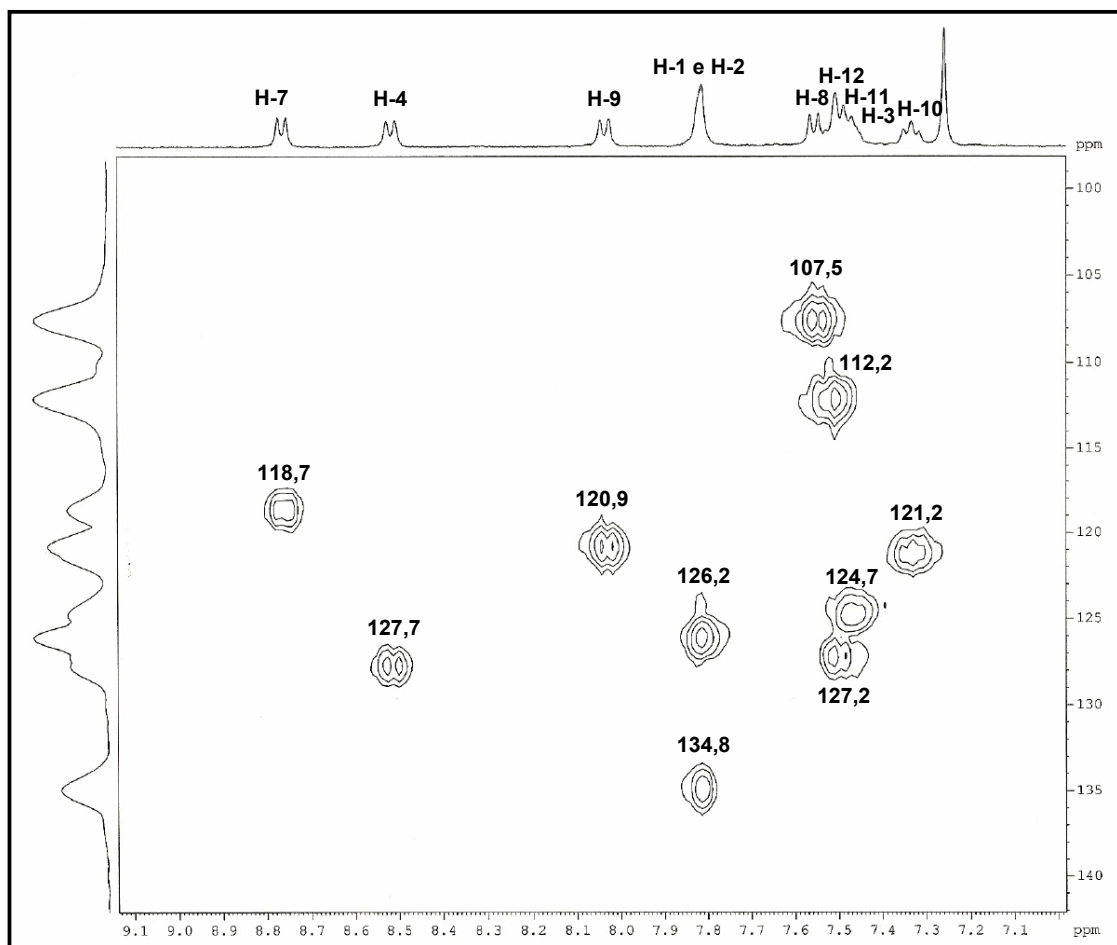


FIGURA 3.45: Mapa de contorno de g-HSQC de **10** (CDCl₃, 400 MHz)

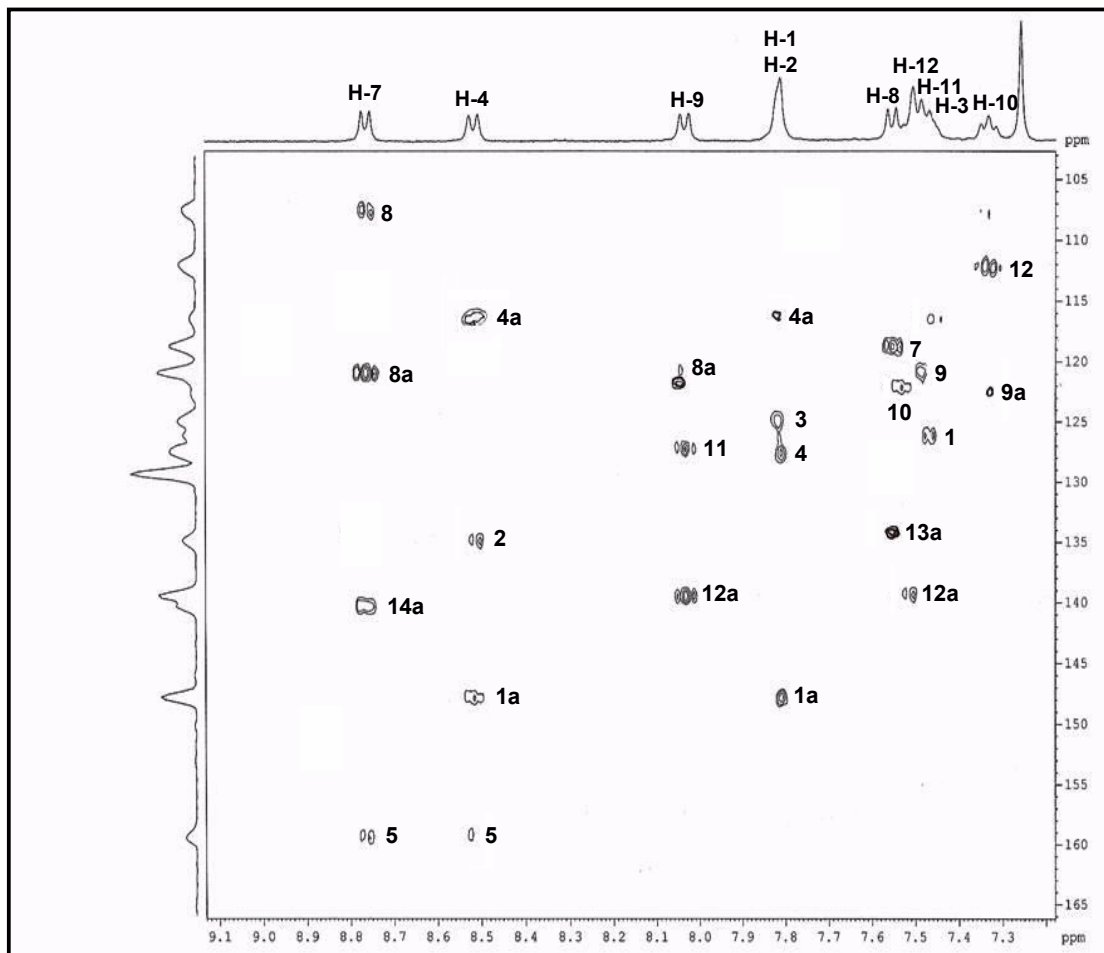


FIGURA 3.46: Mapa de contorno de g-HMBC de **10** (CDCl₃, 400 MHz)

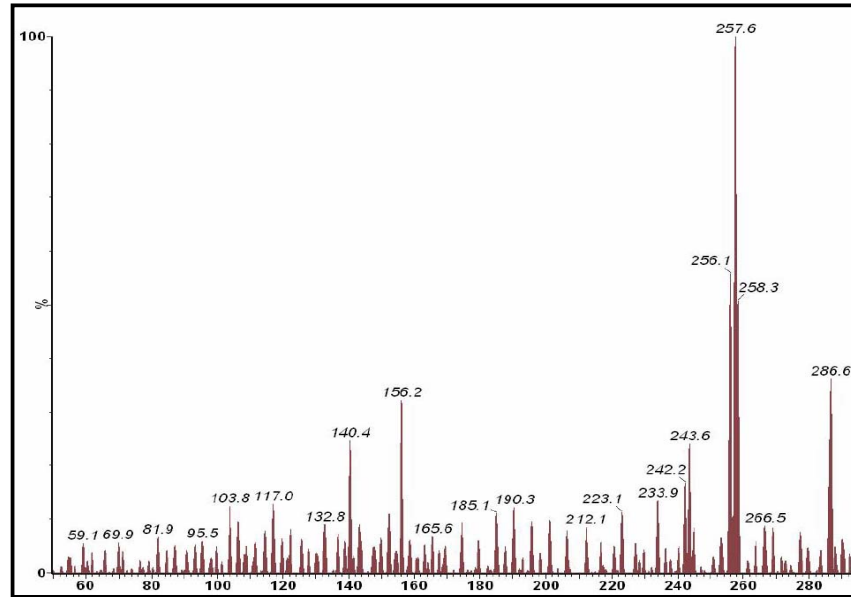
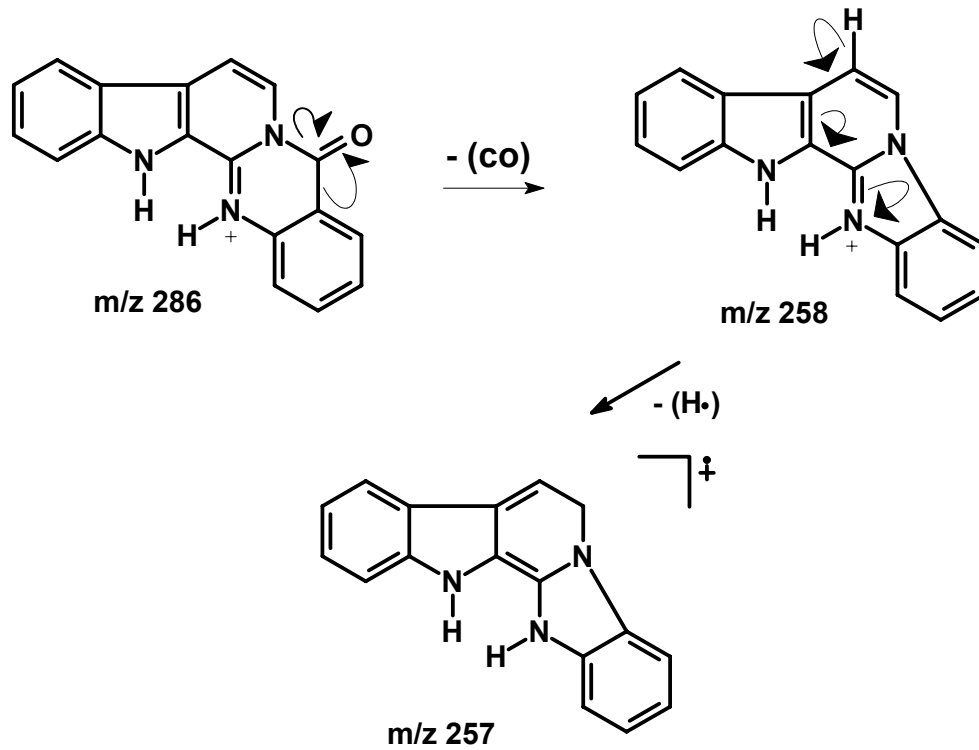


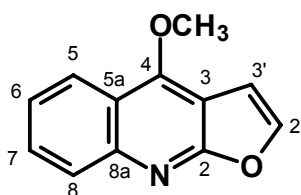
FIGURA 3.47: Espectro de massas de **10** (APCI, $[M+H]^+$)



ESQUEMA 3.5: Proposta de fragmentação para **10**

3.2.3.3- Determinação estrutural da substância 11

O alcalóide do tipo furoquinolínico **11** foi isolado dos extratos diclorometano do tronco subterrâneo e das folhas de *H. oreadica* e do extrato metanólico do tronco de *H. superba*. Sua estrutura foi determinada com base em espectros de RMN de ^1H , ^{13}C , HSQC e HMBC e por comparação com dados da literatura (BRAGA, 2005).



11

No espectro de RMN de ^1H de **11** (FIGURA 3.48, pg 103) observa-se dois dubletos em δ 7,09 e 7,64 integrando para um hidrogênio cada, com constante de acoplamento $J = 2,8$ Hz, característico de um anel furano dissustituído. O sinal em δ 7,09 foi atribuído ao hidrogênio na posição 3' e o sinal mais desblindado em δ 7,64 foi atribuído ao H-2'. Observa-se ainda quatro sinais de hidrogênios aromáticos, sendo eles duplo duplo dubleto em δ 7,45, 7,69, 8,01 e 8,28 integrando para um hidrogênio cada. Assim, o sinal em δ 7,45 foi atribuído ao H-6 que acopla com duas constantes orto de $J = 8,4$ e $6,8$ com H-5 e H-7, respectivamente. Além disso, H-6 mostra acoplamento com H-8 com constante meta de $1,2$ Hz. O sinal em δ 7,69 foi atribuído ao hidrogênio H-7 que assim como H-6 acopla com duas constantes orto de $8,4$ e $6,8$ Hz com H-8 e H-6, respectivamente e com uma constante pequena de $1,2$ Hz referente ao acoplamento meta com H-5. O sinal observado em δ 8,28 foi atribuído ao hidrogênio H-5 e acopla com H-6 com constante orto de $8,4$ Hz, com H-7 com constante meta de $1,2$ Hz e com H-8 com constante para de $0,4$ Hz. O sinal em δ 8,01 foi atribuído ao H-8, e este acopla com H-7 com constante orto de $8,4$ Hz, com H-6 com constante meta de $1,2$ Hz e com H-5 com constante para de $0,4$ Hz.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (FIGURA 3.49, pg 103) indica a presença de 12 carbonos, sendo um relativo à metoxila em δ 59,0.

Através da análise do espectro de HSQC (FIGURA 3.50, pg 104) foi possível atribuir os valores de δ 122,3 para C-5, δ 123,7 para C-6, δ 129,6 para C-7, δ 127,8 para C-8, δ 143,5 para C-2' e δ 104,7 para C-3'.

No espectro de HMBC (FIGURA 3.51, pg 104) é possível observar correlação de H-3' (δ 7,09) com C-2' (δ 143,5), com um sinal em δ 103,4 que foi atribuído ao C-3 e com um sinal em δ 163,9 que foi atribuído ao C-2. O hidrogênio H-2' (δ 7,64) mostra correlação com C-3' (δ 104,7) e com C-2 (δ 163,9).

A metoxila em δ 4,46 (δ 59,0) mostra correlação com um sinal em δ 156,8 atribuído ao C-4 e δ 104,7 que foi atribuído ao C-3. O hidrogênio H-5 (δ 8,28) mostra correlação com C-4 (δ 156,8), com C-7 (δ 129,6) e com um sinal de carbono quaternário em δ 145,6 que foi atribuído ao C-8a. O hidrogênio H-6 (δ 7,44) mostra correlação com C-8 (δ 127,8), com C-7 (δ 129,6) e com um sinal em δ 118,7 referente a C-5a. O hidrogênio H-7 (δ 7,68) mostra 2 correlações sendo as mesmas com C-8a (δ 145,6) e com C-5 (δ 122,3).

Com base na análise de todos os dados, foi possível atribuir a substância **11** ao alcalóide furoquinolínico dictamina.

TABELA 3.13: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **11** e comparação com a literatura

SUBSTÂNCIA 11 (400/100 MHz, CDCl_3)		BRAGA, 2005 (200/ 50 MHz, CDCl_3)		
H/C	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm)	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm)
2	-	163,9	-	163,8
3	-	103,4	-	103,3
4	-	156,8	-	156,7
5a	-	118,7	-	118,6
5	8,28 (1H, <i>ddd</i> , J= 8,4;1,2;0,4)	122,3	8,26 (1H, <i>ddd</i> , J=8,5;1,4;0,5)	122,3
6	7,45 (1H, <i>ddd</i> , J=8,4;6,8;1,2)	123,7	7,44 (1H, <i>ddd</i> , J=8,5; 6,8;1,2)	123,6
7	7,69 (1H, <i>ddd</i> , J=8,4;6,8;1,2)	129,6	7,69 (1H, <i>ddd</i> , J=8,5; 6,8;1,4)	129,5
8	8,01 (1H, <i>ddd</i> , J=8,4;1,2;0,4)	127,8	8,01 (1H, <i>dl</i> , J=8,5)	127,7
8a	-	145,6	-	145,6
2'	7,64 (1H, <i>d</i> , J=2,8)	143,5	7,59 (1H, <i>d</i> , J=2,8)	143,4
3'	7,09 (1H, <i>d</i> , J= 2,8)	104,7	7,01 (1H, <i>d</i> , J=2,8)	104,6
4-OMe	4,46 (3H, s)	59,0	4,40 (3H, s)	58,9

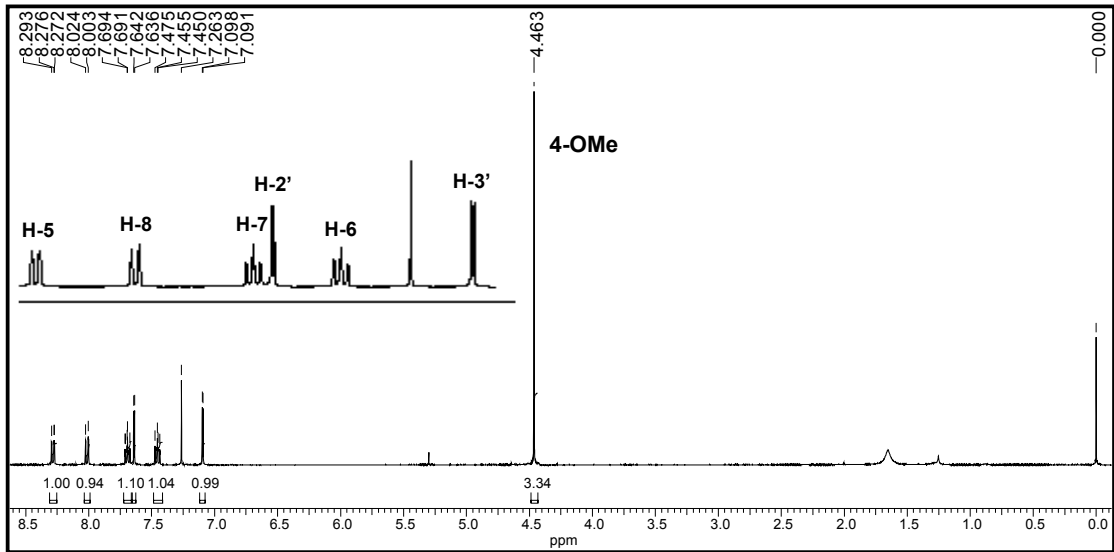


FIGURA 3.48: Espectro de RMN de ^1H de **11** (CDCl_3 , 400 MHz)

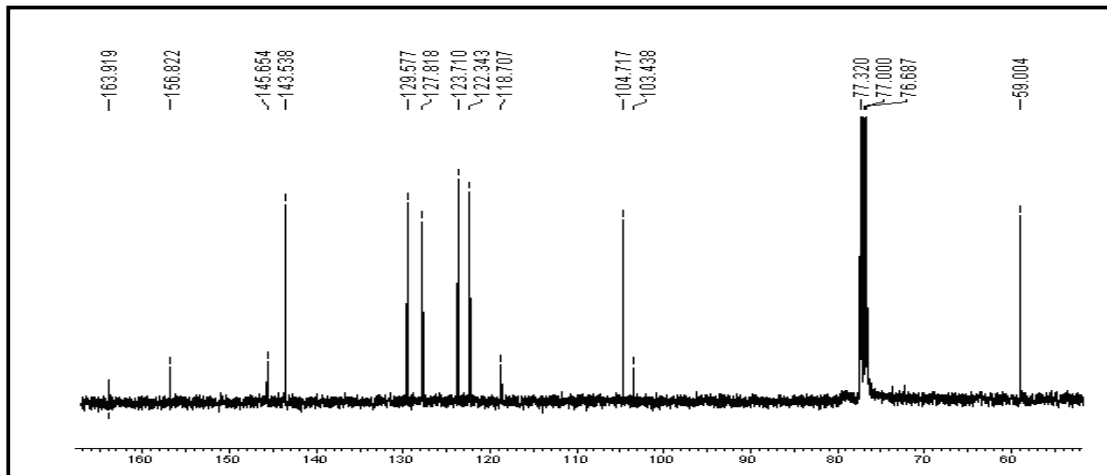


FIGURA 3.49: Espectro de RMN de ^{13}C de **11** (CDCl_3 , 100 MHz)

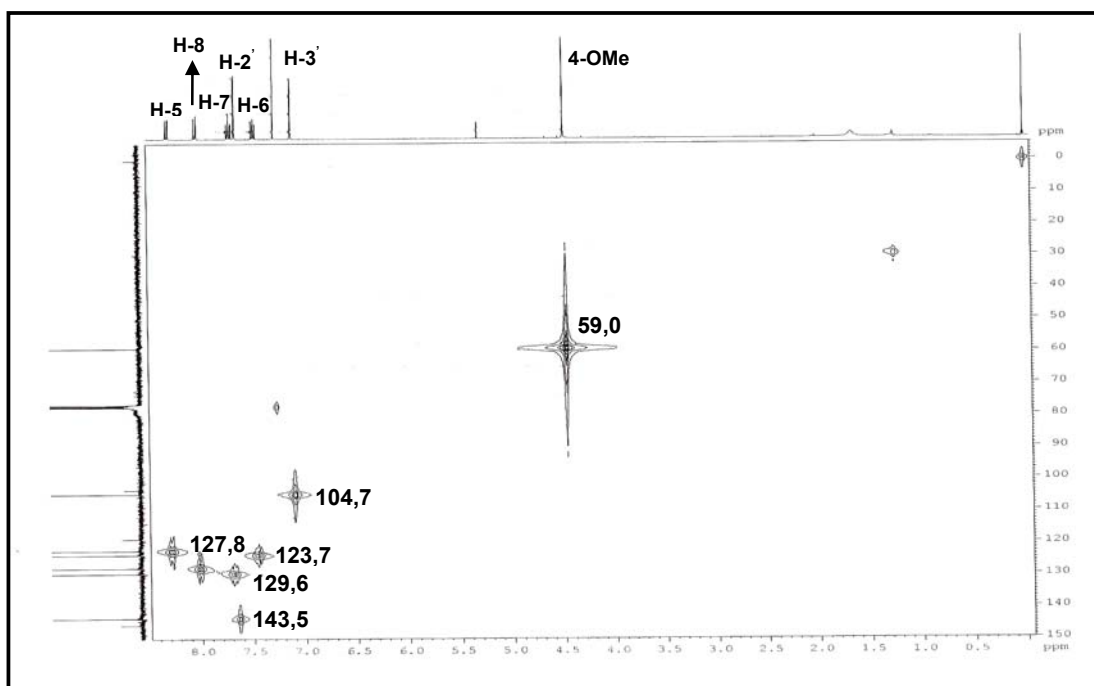


FIGURA 3.50: Mapa de contorno g-HSQC de **11** (CDCl₃, 400 MHz)

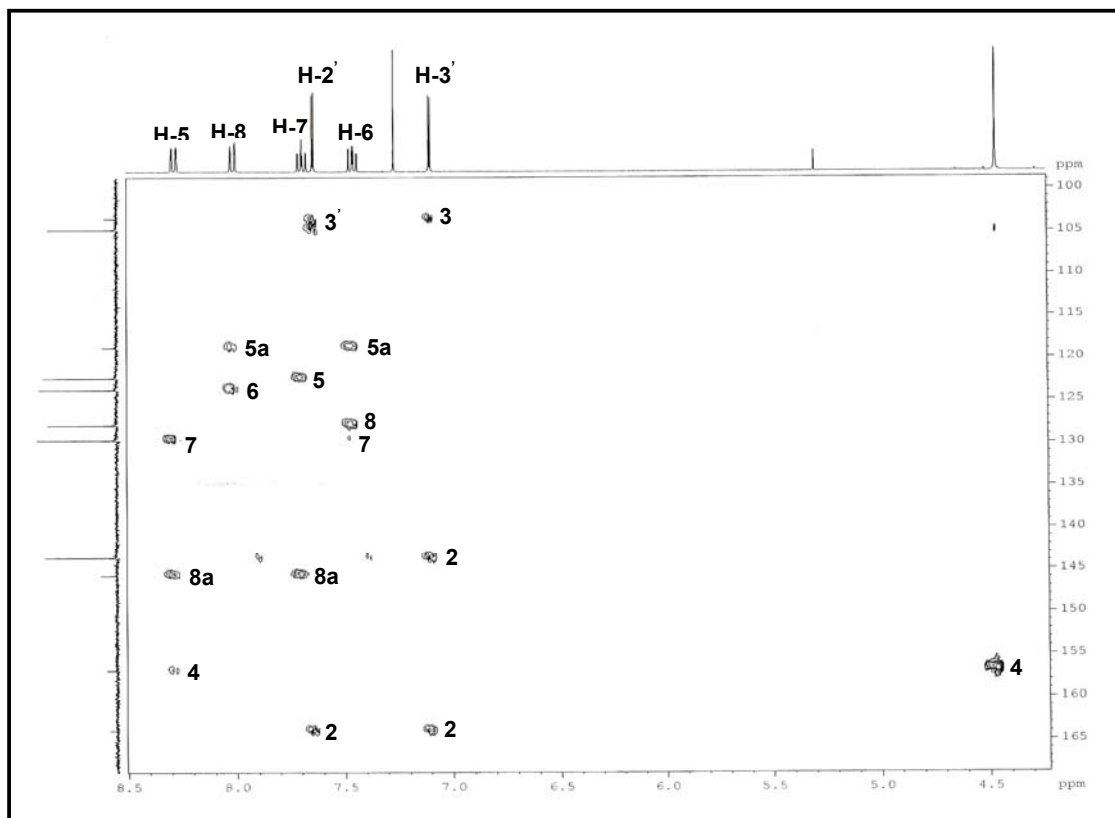
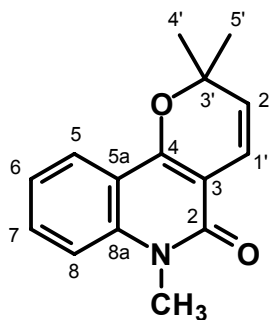


FIGURA 3.51: Mapa de contorno g-HMBC de **11** (CDCl₃, 400 MHz)

3.2.3.4- Determinação estrutural da substância 12

O alcalóide do tipo piranoquinolona **12** foi isolado do extrato metanólico do tronco de *H. superba* (EMTHS) e identificado através da análise de experimentos de RMN de ^1H , ^{13}C e comparação com dados da literatura (KAMPERDICK, 1999).



12

O espectro de RMN de ^1H (FIGURA 3.52, pg 107) de **12** mostra na região desblindada do espectro um duplo dubleto em δ 7,97 ($J = 7,9$ e $1,6$ Hz), dois duplo duplo dubletos em δ 7,23 ($J = 8,0$; $7,0$ e $1,0$ Hz) e δ 7,55 ($J = 8,6$; $7,0$ e $1,6$ Hz) e um dubleto largo em δ 7,31 ($J = 8,6$ Hz) referentes as hidrogênios de um anel aromático dissustituído. A presença do anel cromeno é comprovada pela presença de dois dubletos, sendo um em δ 6,75 ($J = 9,9$ Hz) e outro em δ 6,54 ($J = 9,9$ Hz) integrando para um hidrogênio cada referentes aos hidrogênios H-1'e H-2', respectivamente, além da presença de um singleto em δ 1,52 integrando para seis hidrogênios característicos das metilas 4'e 5'de um anel 2,2-dimetilcromeno ou anel pirano. Observa-se também um singleto em δ 3,69 integrando para três hidrogênios, característico de hidrogênios metílicos ligados a heteroátomo, referentes a uma N-metila.

O espectro de RMN de ^{13}C (FIGURA 3.53, pg 107) apresenta 14 sinais de carbonos, sendo que se pode destacar o sinal em δ 161,0 referente a carboxila de lactama na posição 2, o sinal em δ 28,2 referente a uma N-metila e o sinal em δ 29,2 referentes às metilas equivalentes do anel pirano.

Todos os sinais de hidrogênios e carbonos foram atribuídos baseando-se em dados da literatura e são mostrados na TABELA 3.14 (pg 106).

Assim, a análise dos experimentos de RMN e comparação com os dados da literatura permitiu atribuir a estrutura **12** ao alcalóide N-metilflindersina.

TABELA 3.14: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **12** e comparação com a literatura

H/C	SUBSTÂNCIA 12 (200/50 MHz, CDCl_3)		KAMPERDICK, 1999 (300/75 MHz, CDCl_3)	
	δ (ppm), <i>J</i> (Hz)	δ (ppm)	δ (ppm), <i>J</i> (Hz)	δ (ppm)
2	-	161,0	-	161,0
3	-	105,9	-	105,9
4	-	155,2	-	155,2
5a	-	116,1	-	116,1
5	7,97 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 8,0; 1,6)	123,1	7,97 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =8,2; 1,5)	123,1
6	7,23 (1H, <i>ddd</i> , <i>J</i> = 8,0; 7,0,1,0)	121,7	7,23 (1H, <i>ddd</i> , <i>J</i> = 8,2;7,1;1,0)	121,7
7	7,55 (1H, <i>ddd</i> , <i>J</i> = 8,6; 7,0; 1,6)	130,8	7,55 (1H, <i>ddd</i> , <i>J</i> = 8,6;7,1;1,5)	130,8
8	7,31 (1H, <i>dl</i> , <i>J</i> = 8,6)	114,0	7,32 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,6)	114,0
8a	-	139,4	-	139,4
1'	6,75 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9,9)	118,0	6,76 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9,8)	118,0
2'	6,54 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9,9)	126,3	5,54 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9,8)	126,3
3'	-	78,7	-	78,7
4'	1,52 (6H, <i>s</i>)	29,2	1,52 (6H, <i>s</i>)	29,2
5'				
N-Me	3,70 (3H, <i>s</i>)	28,2	3,70 (3H, <i>s</i>)	28,2

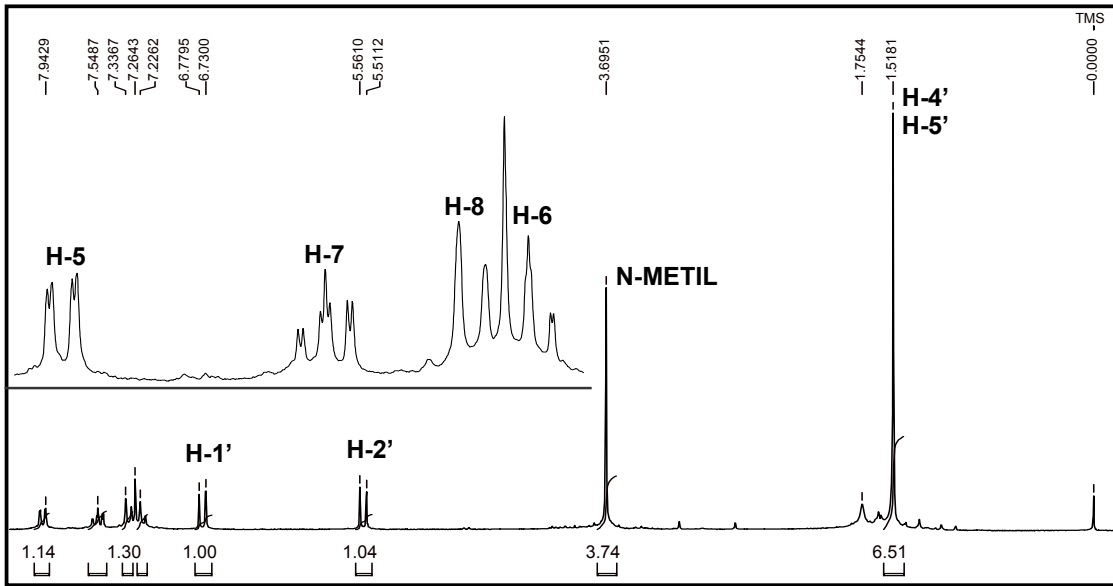


FIGURA 3.52: Espectro de RMN de ^1H de **12** (CDCl_3 , 200 MHz)

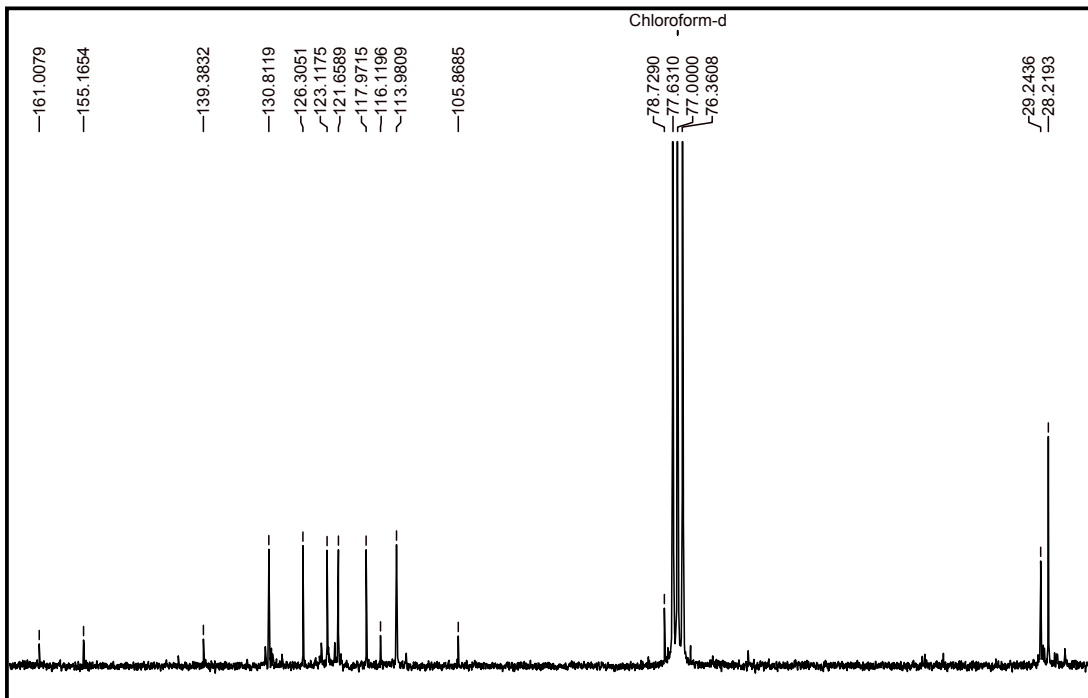


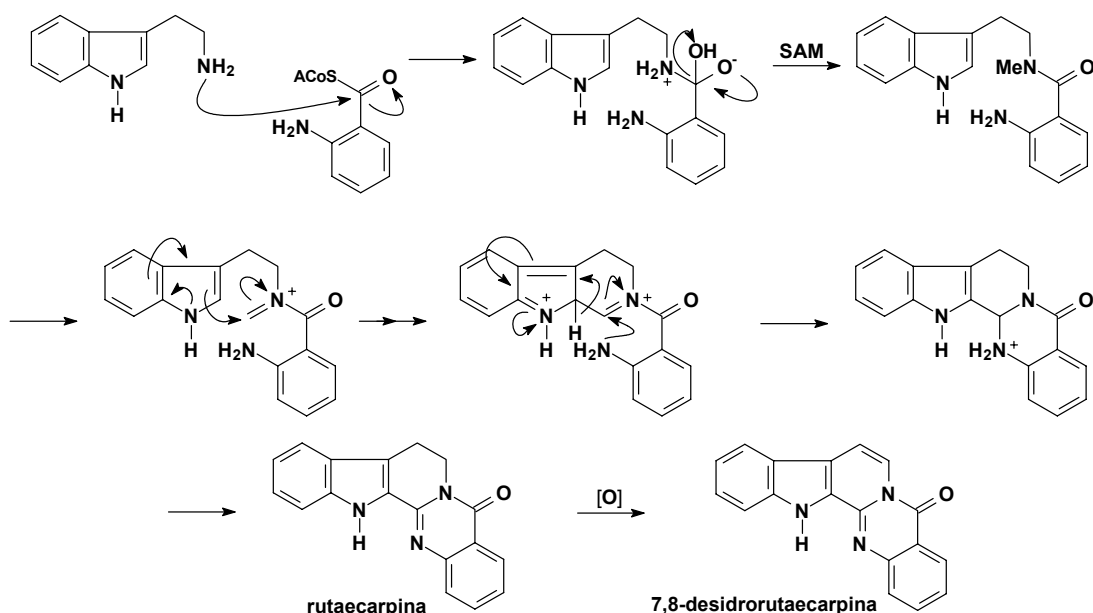
FIGURA 3.53: Espectro de RMN de ^{13}C de **12** (CDCl_3 , 50 MHz)

3.2.3.5- Biogênese dos Alcalóides

Os alcalóides são bases orgânicas nitrogenadas encontradas principalmente em plantas, e em extensão menor em microrganismos e animais. São freqüentemente classificados em pirrolidínico, piperidínico, quinolínico, indol, etc, de acordo com a natureza da estrutura contendo o nitrogênio. Os átomos de nitrogênio originam de poucos aminoácidos precursores, sendo os principais, ornitina, lisina, ácido nicotínico, tirosina, triptofano, ácido antranílico, e histidina (DEWICK, 2002).

3.2.3.5.1- Alcalóides indolopiridoquinazolínicos

A distribuição dos alcalóides indolopiridoquinazolínicos, especialmente aqueles com estruturas mais complexas como a rutaecarpina, está restrita apenas à família Rutaceae e ocorre em apenas poucos gêneros (IKUTA, *et al.*, 1998). A origem da rota biossintética é através da combinação do triptofano, que é um aminoácido contendo um sistema indol, com o ácido antranílico. A proposta biogenética para a formação deste tipo de alcalóide está descrita no ESQUEMA 3.6 (pg 108).

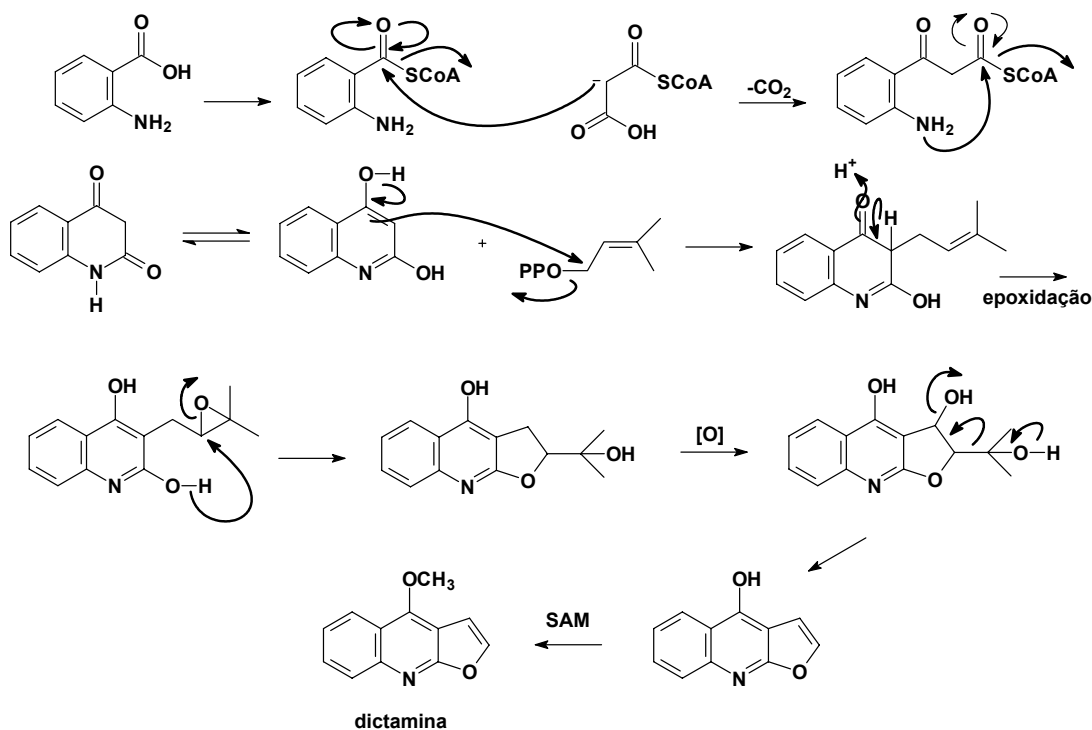


ESQUEMA 3.6: Proposta biogenética para os alcalóides indolopiridoquinazolínicos

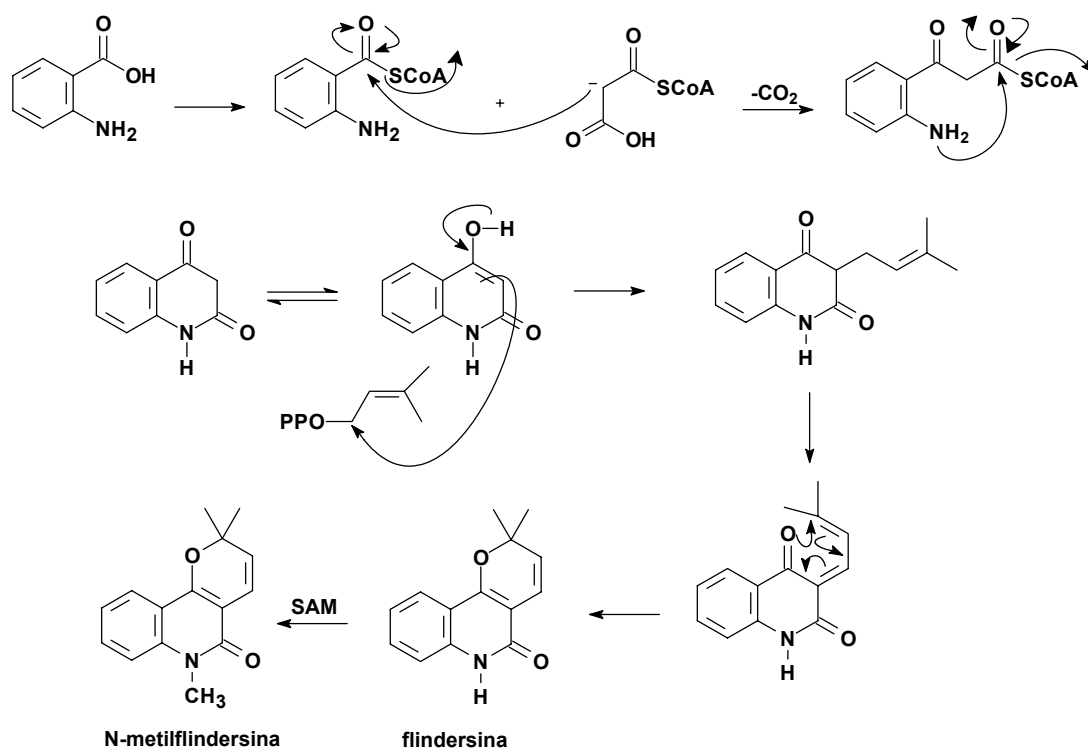
3.2.3.5.2- Alcalóides furoquinolínicos e 2-quinolonas

Os alcalóides derivados do ácido antranílico são formados através da combinação do ácido antranílico com uma unidade de malonil-CoA pela reação de Claisen, levando à formação do sistema heterocíclico (DEWICK, 2002).

A diversidade desses alcalóides está relacionada, em parte, com a habilidade biogénica da família Rutaceae em incorporar unidades prenila ao precursor, sobretudo na posição C-3 que é altamente nucleofílica e susceptível a alquilação. A prenilação em C-3 leva à formação de alcalóides furoquinolínicos, como a dictamina (ESQUEMA 3.7, pg 109) e 2-quinolona, como a flindersina e N-metilflindersina (ESQUEMA 3.8, pg 110). Para os alcalóides furoquinolínicos, o anel furano é formado através da ciclização oxidativa de uma unidade prenila, como mostra o ESQUEMA 3.7.



ESQUEMA 3.7: Proposta biogénica para alcalóides furoquinolínicos



ESQUEMA 3.8: Proposta biogénica para os alcalóides 2-quinolona

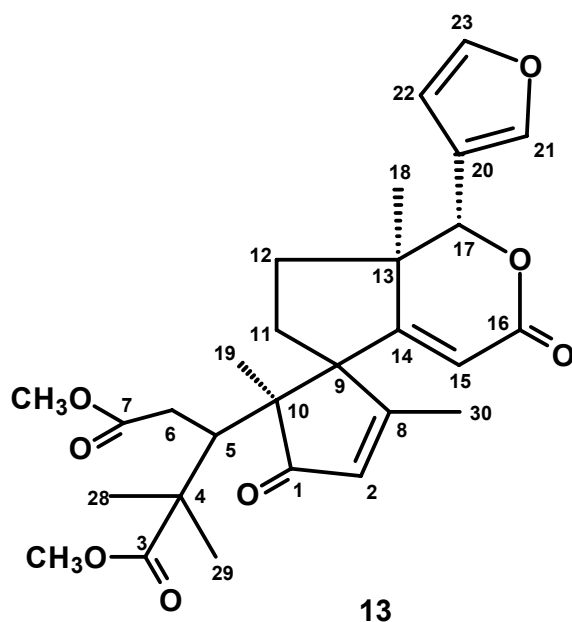
3.2.4 – Limonóides

Alguns limonóides têm sido relatados no gênero *Hortia*, sendo que o primeiro, chamado de guianina, foi isolado de *H. regia* em 1986 (JACOBS, *et al.*, 1986). Este limonóide por apresentar um esqueleto bastante complexo, sugeria a presença de outros com esqueletos mais simples no gênero. Posteriormente, foram isolados da espécie *H. colombiana* hortiolida A e hortiolida B, cujas estruturas são mais simples, em relação ao primeiro isolado (SUAREZ, *et al.*, 1998, SUAREZ, *et al.*, 2002). Recentemente foram isolados quatro novos limonóides que são inéditos em literatura, sendo eles: hortiolida C, hortiolida D e hortiolida F de *H. oreadica* e hortiolida E de *H. superba* (BRAGA, 2005).

Neste estudo foram isolados três limonóides, sendo eles: guianina (**13**), já descrito em literatura; hortiolida E (**14**) inédito para a espécie de *H. oreadica* e hortiolida G (**15**) que parece ser novo na literatura.

3.2.4.1 – Determinação estrutural da substância 13

O limonóide **13** foi isolado dos extratos diclorometano do tronco subterrâneo e das folhas de *H. oreadica* e teve sua estrutura determinada através de experimento de RMN de ^1H e ^{13}C , HSQC, HMBC e COSY, além da comparação com os dados existentes na literatura (JACOBS, *et al.*, 1986)



Analisando o espectro de RMN de ^1H de **13** (FIGURA 3.55, pg 117) é possível atribuir os sinais característicos dos hidrogênios do anel furânico H-21 e H-23 em δ 7,56 (1H, *m*) e δ 7,42 (1H, *t*, $J=1,7$ Hz) respectivamente, e H-22 em δ 6,38 (1H, *dd*, $J= 1,8$ e $0,7$ Hz).

Através dos espectros de RMN de ^{13}C (FIGURA 3.56, pg 117) e HSQC (FIGURA 3.57, pg 118) foi possível fazer a atribuição de todos os carbonos do esqueleto. Os valores de hidrogênio e carbono estão descritos nas TABELAS 3.15 e 3.16 (pgs 115 a 116).

O espectro de HMBC (FIGURA 3.58, pg 119) mostra a correlação de um hidrogênio carbinólico em δ 5,91 (1H, *s*) com C-21 (δ 140,7) indicando a presença do anel D lactônico, o que permite atribuí-lo ao H-17(δ 80,2). Este hidrogênio mostra ainda correlação com C-20 (δ 121,2) e com C-22 (δ 108,9), uma correlação a J^3 com uma metila em δ 19,3 (δ 1,17) que foi atribuída à Me-18 e com um sinal em δ 173,1 que pode ser atribuído ao C-14. O sinal da Me-18 (δ 1,17) mostra correlação com C-17 (δ 80,2), com o sinal em δ 173,1, com um carbono quaternário em δ 46,7, atribuído ao C-13 e com um sinal de um carbono metilênico em δ 34,6, atribuído ao C-12. O espectro de HSQC mostra a correlação a J^1 deste sinal em δ 34,6 com sinais em δ 1,57 (*m*) e δ 1,70 (*m*) e com os sinais em δ 2,56 (1H, *dd*, $J=10,8$ e $16,9$) e $2,17$ (*m*), indicando que este sinal em δ 34,6 é referente a dois carbonos. Através da análise do espectro de HMBC foi possível observar a correlação dos sinal em δ 1,57 e $1,70$ com o carbono C-18 (δ 19,3), C-13 (δ 46,7), C-17 (δ 80,2) e com o sinal em δ 173,1. Desta maneira, estes sinais foram atribuídos aos hidrogênios H-12a e H-12b. Ainda é possível observar no espectro de HMBC a correlação do H-12a (δ 1,57) com um sinal em δ 69,0, que pode ser atribuído somente ao C-9, justificando a correlação do mesmo a J^3 . No espectro de COSY (FIGURA 3.59, pg 120) é possível observar o acoplamento entre os hidrogênios H-12 com um sinal em aproximadamente δ 2,15, que pode ser atribuído somente aos hidrogênios H-11. No HSQC foi possível, então, atribuir o sinal em δ 28,7 ao C-11. O sinal de H-11 em δ 2,27 mostra correlação no HMBC com C-12 (δ 34,6), com C-9 (δ 69,0) e com um sinal em δ 61,7 ainda não atribuído.

A análise do espectro de HMBC mostra a correlação de um sinal em δ 5,95 (1H, *s*) atribuído ao H-15, com o sinal em δ 46,7 atribuído ao C-13, com um

sinal em δ 164,6, atribuído ao C-16 e com o sinal em δ 69,0, previamente atribuído ao C-9. Num esqueleto intacto, esta correlação seria a J^A , o que não seria justificável neste caso. Desta forma, a correlação somente pode ser justificada a J^B com a contração do anel C, como mostrado na FIGURA 3.54 (1) (pg 113).

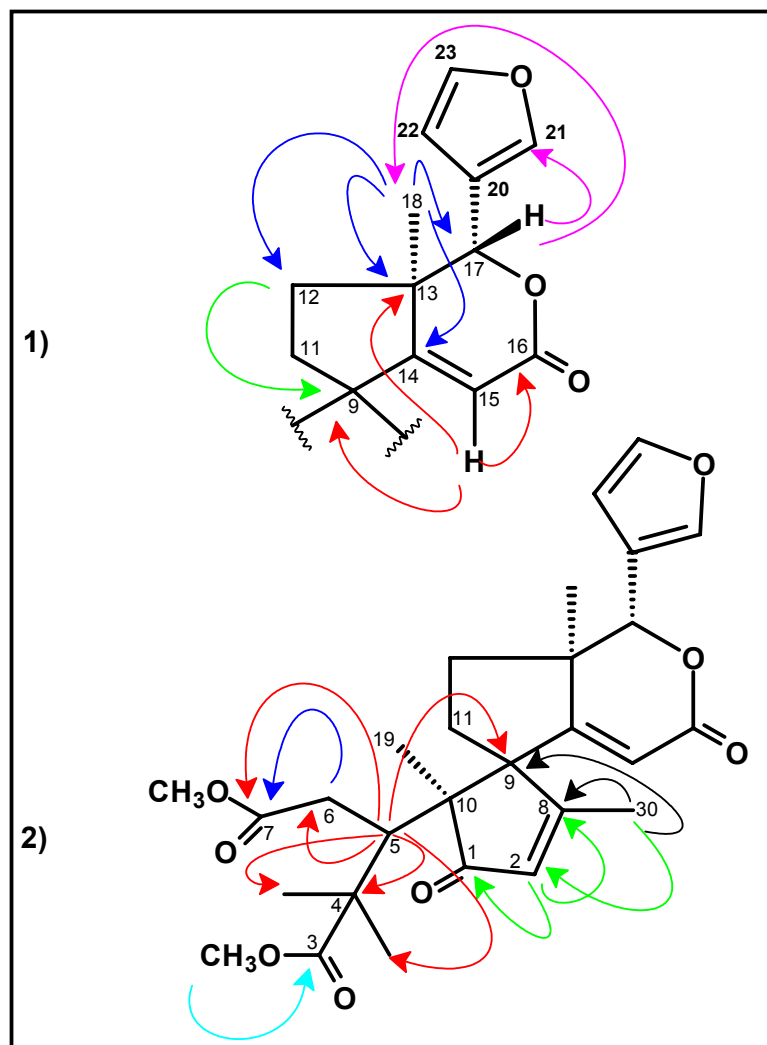


FIGURA 3.54: Correlações observadas no HMBC para **13**

A presença de dois sinais em δ 3,62 (δ 51,5) e δ 3,66 (δ 52,2), indicou que, além do anel B ser *seco*, alguma outra modificação tinha ocorrido no esqueleto. O espectro de HMBC mostra a correlação do sinal já mencionado anteriormente em δ 2,56 (1H, *dd*, $J=10,8$ e $16,9$) com os sinais em δ 174,0 (cuja metoxila em δ 3,66 também se correlaciona), indicando ser este sinal relativo a

um dos hidrogênios H-6 correlacionando com C-7. Portanto, o sinal em δ 34,6 corresponde aos carbonos C-12 e C-6. No espectro de COSY é possível observar o acoplamento entre os hidrogênios H-6a (δ 2,56) e H-6b (δ 2,15), assim como o acoplamento de H-6a com um sinal em δ 3,26 (1H, *d*, $J=10,8$), indicando ser o sinal referente ao H-5. Pelo HSQC, este sinal mostra correlação a J^1 com o sinal em δ 41,3; mostra correlação também via HMBC com C-7 (δ 174,0), C-6 (δ 34,6), com sinais de duas metilas em δ 20,8 (δ 1,44) e 28,3 (δ 0,99), com o sinal de carbono quaternário em δ 46,6, com C-9 (δ 69,0) e com o sinal ainda não atribuído em δ 61,7. A correlação das duas metilas mencionadas acima com o sinal do carbono em δ 46,6 indica serem as mesmas Me-28 e Me-29 e o sinal, então, relativo ao carbono C-4.

A metila em δ 1,27 (δ 23,6), que mostra no HMBC correlação com C-5 (δ 41,3), com C-9 (δ 69,0) e com o sinal em δ 61,7, foi atribuída a Me-19. Este sinal em δ 61,7 pode ser atribuído somente ao C-10, justificando a correlação a J^2 . Ainda é observado a correlação de um sinal em δ 5,90 (1H, *d*, $J=1,3$) (δ 129,4) com dois sinais, um em δ 208,8 e outro em δ 175,2. No espectro de COSY, ainda é possível observar que este sinal mostra um acoplamento alílico com a metila em δ 2,03 (3H, *d*, $J=1,3$). Esta metila somente pode ser atribuída a Me-30, cujo sinal do carbono é δ 16,5. A mesma mostra no HMBC correlação com C-9 (δ 69,0), com C-2 (δ 129,4) e com o sinal em δ 175,2, que somente pode ser atribuído ao C-8. Desta forma, o sinal em δ 208,8 foi atribuído ao C-1. A presença de uma outra metoxila em δ 3,62 se correlacionando no HMBC com sinal em δ 177,4 indica que houve uma abertura também do anel A, com a quebra da ligação entre os carbonos C-2 e C-3. A correlação de H-2 (δ 5,90) com C-8 (δ 175,2) indica que houve a formação de um novo anel devido a formação da ligação entre os carbonos C-2 e C-8, como pode-se observar na FIGURA 3.54 (2) (pg 113).

Portanto, a substância **13** foi identificada pela análise de experimentos de RMN como sendo a guianina, limonóide já descrito em literatura.

TABELA 3.15: Dados de RMN de ^1H de **13** e comparação com a literatura

H/C	SUBSTÂNCIA 13 (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm), J (Hz)	JACOBS, 1986 (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm), J (Hz)
2	5,90 (1H, <i>d</i> , $J=1,3$)	5,87 (<i>q</i> , $J=1,3$)
5	3,26 (1H, <i>d</i> , $J=10,8$)	3,26 (<i>d</i> , $J=10$)
6a	2,56 (1H, <i>dd</i> , $J=10,8$ e $16,9$)	2,55 (<i>dd</i> , $J=10$ e 17)
6b	2,15 (<i>m</i>)	2,18 (<i>d</i> , $J=17$)
11a	2,27 (<i>m</i>)	2,29 (<i>m</i>)
11b	2,17 (<i>m</i>)	2,16 (<i>dd</i> , $J=15$ e 6)
12a	1,70 (<i>m</i>)	1,55 (<i>dd</i> , $J=13$ e 6)
12b	1,57 (<i>m</i>)	1,71 (<i>td</i> , 13 e 6)
15	5,95 (1H, <i>s</i>)	5,90 (<i>s</i>)
17	5,91 (<i>sl</i>)	5,94 (<i>d</i> , $J=0,8$)
Me-18	1,17 (3H, <i>s</i>)	1,16 (<i>s</i>)
Me-19	1,27 (3H, <i>s</i>)	1,27 (<i>s</i>)
21	7,56 (1H, <i>m</i>)	7,56 (<i>dt</i> , $J=1,7$ e $0,8$)
22	6,38 (1H, <i>dd</i> , $J=1,7$ e $0,8$)	6,32 (<i>dd</i> , $J=1,7$ e $0,8$)
23	7,42 (1H, <i>t</i> , $J=1,7$)	7,44 (<i>t</i> , $J=1,7$)
Me-28	1,44 (3H, <i>s</i>)	1,43 (<i>s</i>)
Me-29	0,99 (3H, <i>s</i>)	0,95 (<i>s</i>)
Me-30	2,03 (3H, <i>s</i>)	2,04 (<i>s</i>)
O- CH_3	3,66 (3H, <i>s</i>)	3,60 (<i>s</i>)
O- CH_3	3,62 (3H, <i>s</i>)	3,52 (<i>s</i>)

TABELA 3.16: Dados de RMN de ^{13}C de **13** e comparação com a literatura

	SUBSTÂNCIA 13 (100 MHz, CDCl_3)	JACOBS, 1986 (100 MHz, CDCl_3)
H/C	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm)
1	208,8	208,4
2	129,4	128,9
3	177,4	177,0
4	46,7	46,3
5	41,3	40,9
6a	34,6	34,3
6b		
7	174,0	173,7
8	175,2	175,3
9	69,0	69,0
10	61,7	62,0
11a	28,7	28,3
11b		
12a	34,6	34,4
12b		
13	46,6	46,6
14	173,1	173,2
15	118,0	117,5
16	164,6	164,3
17	80,2	80,0
Me-18	19,3	19,0
Me-19	23,6	23,7
20	121,2	120,9
21	140,7	140,3
22	108,9	108,5
23	143,2	142,9
Me-28	20,8	20,7
Me-29	28,3	27,8
Me-30	16,5	16,4
O- CH_3	52,2	52,0
O- CH_3	51,5	51,3

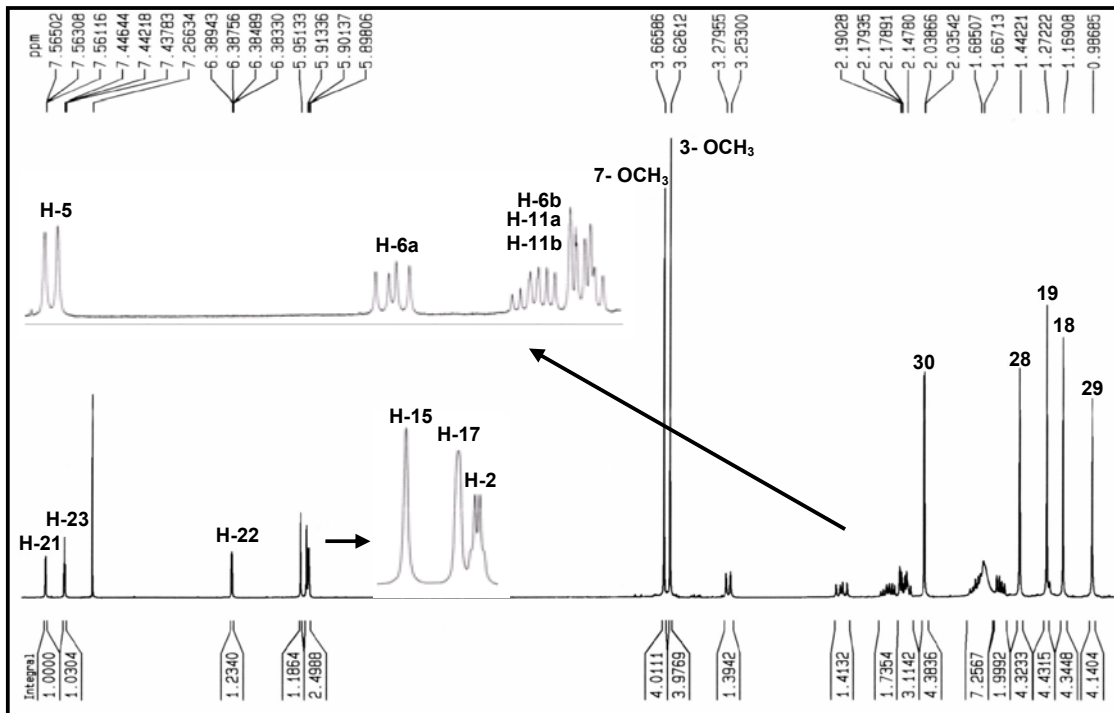


FIGURA 3.55: Espectro de RMN de ^1H de **13** (CDCl_3 , 400 MHz)

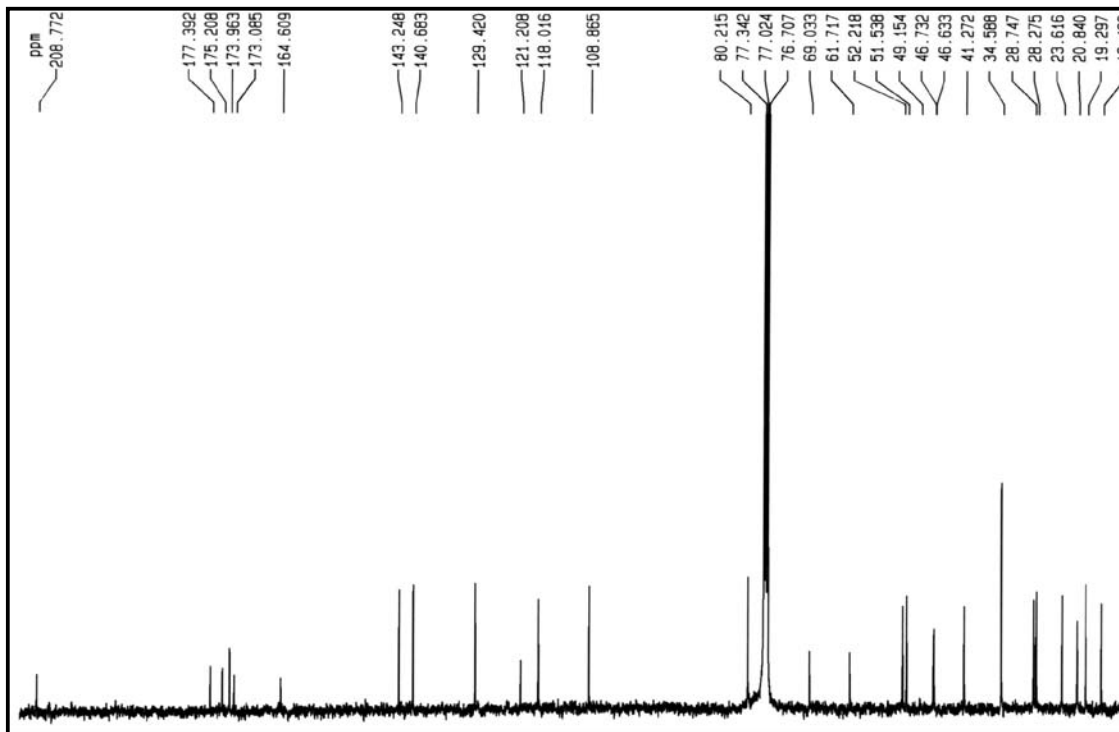


FIGURA 3.56: Espectro de RMN de ^{13}C de **13** (CDCl_3 , 100 MHz)

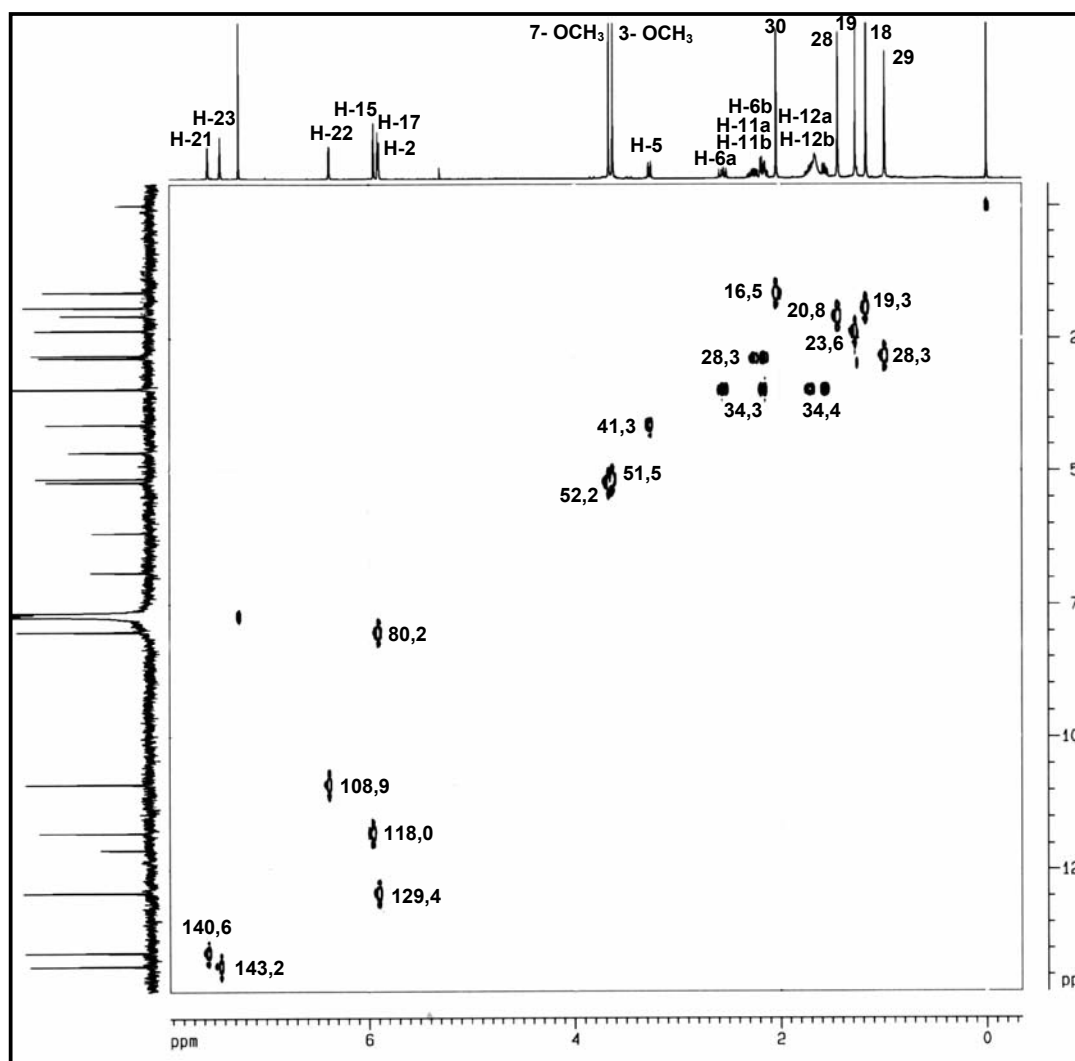


FIGURA 3.57: Mapa de contorno de g-HSQC de **13** (CDCl₃, 400 MHz)

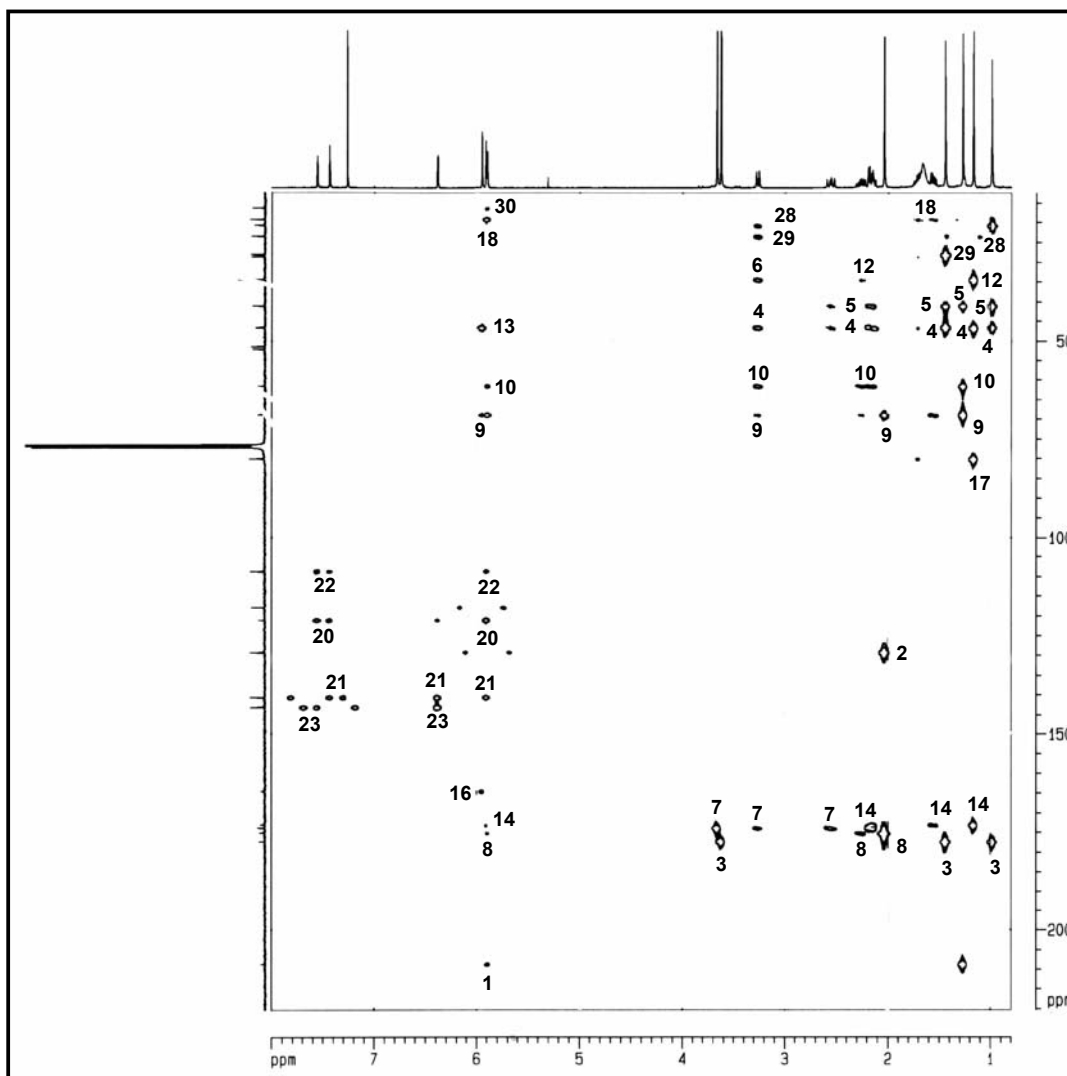


FIGURA 3.58: Mapa de contorno de g-HMBC de **13** (CDCl₃, 400 MHz)

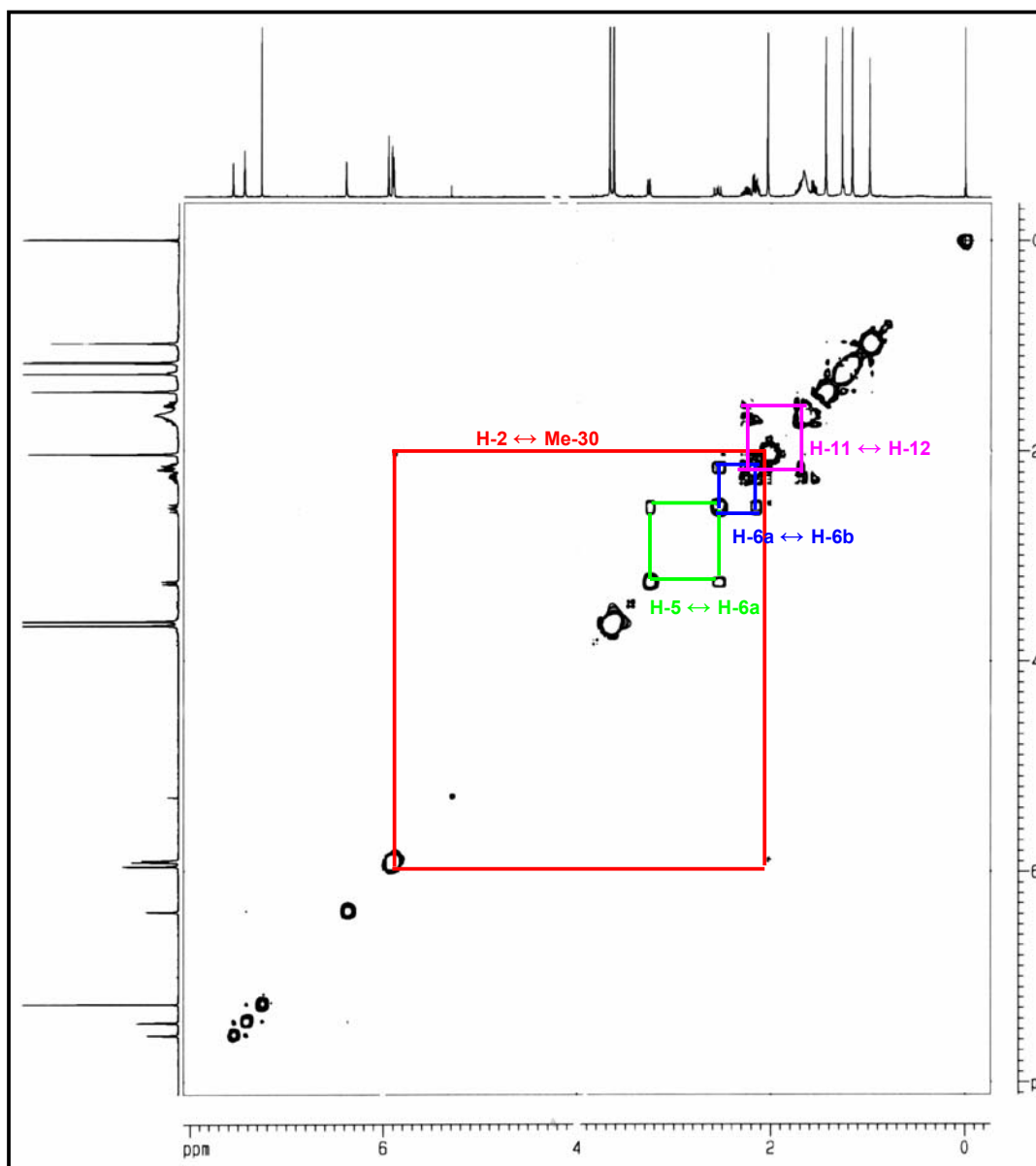
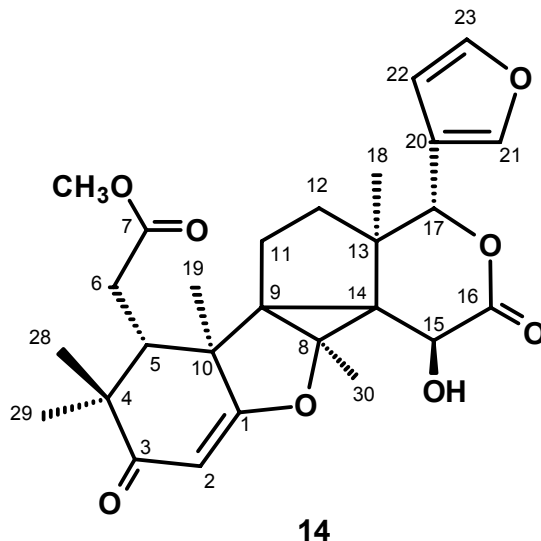


FIGURA 3.59: Espectro de g-COSY de **13** (CDCl₃, 400 MHz)

3.2.4.2 – Determinação estrutural da substância 14

O limonóide **14** foi isolado do extrato diclorometano do tronco subterrâneo de *H. oreadica* e do extrato metanólico do tronco de *H. superba* e teve sua estrutura determinada através de experimentos de RMN de ^1H , ^{13}C , DEPT-135°, HSQC, HMBC, COSY e por comparação com dados da literatura (BRAGA, 2005).



A análise do espectro de RMN de ^1H de **14** (FIGURA 3.61, pg 127) permitiu atribuir os sinais em δ 7,49 (1H, *m*), δ 7,44 (1H, *t*, $J=1,4$ Hz) e δ 6,45 (1H, *m*) aos hidrogênios do anel furano H-21, H-23 e H-22, respectivamente. A análise conjunta dos espectros de RMN de ^{13}C (FIGURA 3.62, pg 127), DEPT 135° (FIGURA 3.63, pg 128) e HSQC (FIGURA 3.64, pg 128) permitiu atribuir todos os carbonos do esqueleto. Os valores para hidrogênios e carbonos estão mostrados na TABELA 3.17 (pg 126).

A presença do sinal em δ 5,31 relativo a hidrogênio carbinólico correlacionando-se no espectro de HMBC (FIGURA 3.65, pg 129) com os sinais de C-21 (δ 141,6), C-20 (120,3) e C-22 (δ 110,0) indicam a presença de lactona no anel D. O sinal atribuído ao H-17 (δ 5,31; δ 79,9) ainda mostra correlações com um sinal de carbono tetrasubstituído em δ 48,2 e com um sinal em δ 15,1 relativo a uma metila que pode ser atribuído somente à Me-18.

O sinal da metila Me-18 (δ 1,19) mostra correlações com o sinal de C-17 (δ 79,9) e com os sinais em δ 48,2 e δ 29,6. No espectro de HSQC observa-

se que os sinais em δ 1,60 (*m*) e δ 1,27 (*m*) mostram correlação a J^1 com δ 29,6, sendo atribuído ao C-12. No espectro de COSY (FIGURA 3.66, pg 129) é possível observar o acoplamento dos hidrogênios H-12a e H-12b com os sinais em δ 2,25 (*m*) e δ 2,04 (*dd*) atribuídos aos hidrogênios H-11a e H-11b, respectivamente.

O sinal de hidrogênio carbinólico em δ 4,40 (1H, *s*) foi atribuído ao H-15 e mostra correlação via HMBC com o sinal em δ 48,2, δ 45,4 e com o sinal em δ 171,4 atribuído à carbonila do anel lactônico D. Analisando dados da literatura (BRAGA, 2005), observa-se a presença de um grupo hidroxila com sinal em δ 3,03 que foi atribuído ao C-15. Na FIGURA 3.60 (1) (pg 122) pode-se observar as principais correlações observadas no anel C e D:

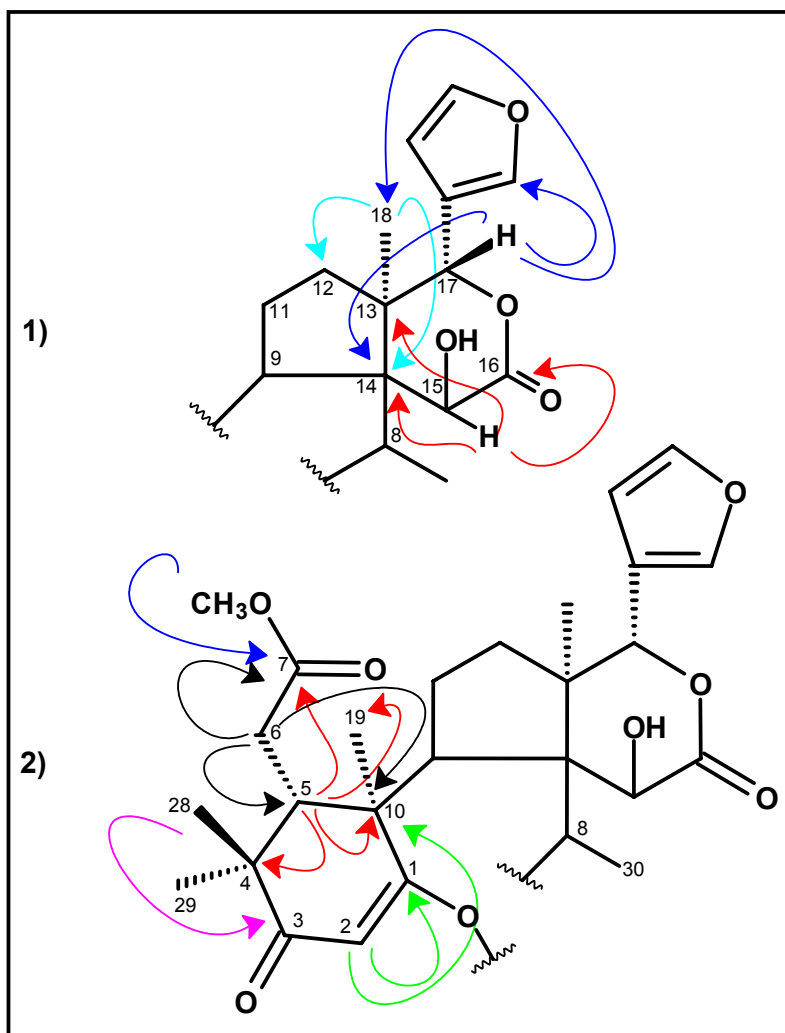


FIGURA 3.60: Correlações observadas no HMBC para **14**

A presença de um sinal em δ 3,71 (3H, *s*) de metoxila correlacionando com um sinal em δ 173,8 sugere que o anel B seja seco para

este limonóide. Os sinais em δ 2,74 (1H, *dd*, $J=17,2$ e $4,7$ Hz) e 2,66 (1H, *dd*, $J=17,4$ e $4,7$ Hz) mostram correlação a J^1 com o sinal de carbono em δ 31,8, que pelo espectro de DEPT 135° é um metileno. Estes sinais mostram no HMBC correlação com o sinal em δ 173,8 sugerindo atribuir estes dois sinais aos hidrogênios H-6a e H-6b. Ainda é possível observar para os hidrogênios H-6 a correlação com sinais em δ 47,6 (quaternário pelo DEPT 135°) e δ 45,4 que no espectro de HSQC se correlaciona a J^1 com o sinal do hidrogênio em δ 2,52 (1H, *t*, $J=4,8$ Hz).

No espectro de COSY é possível observar o acoplamento dos hidrogênios H-6 com o sinal em δ 3,52 sugerindo que o mesmo seja atribuído ao hidrogênio H-5. O sinal de carbono quaternário em δ 47,6, cujo H-6 se correlaciona no HMBC poderia ser atribuído tanto ao C-10 quanto ao C-4 pelas correlações permitidas a este hidrogênio. Porém, o sinal atribuído ao H-11b em δ 2,04 mostra correlação com o mesmo sinal em δ 47,6 que assim pode ser atribuído somente ao C-10.

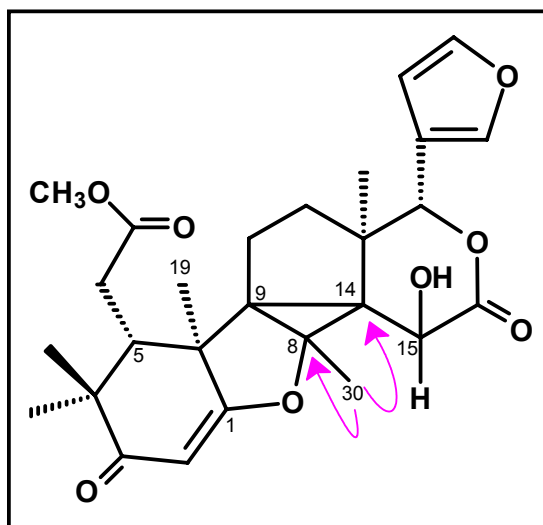
O sinal de H-5 em δ 2,52 mostra no HMBC correlações com C-7 (δ 173,8), C-10 (δ 47,6), com um sinal em δ 44,9 quaternário pelo DEPT 135°, que foi atribuído ao C-4, e com o sinal em δ 22,8 que mostra no HSQC correlação com o sinal em δ 1,42 (3H, *s*) referente a uma metila, podendo ser atribuído somente a metila Me-19. A análise do espectro de HMBC mostra correlações do sinal desta metila com os sinais de C-5 (δ 45,4), C-10 (δ 47,6) e com um sinal em δ 180,6 ainda não atribuído.

A presença de um sinal em δ 201,8 indica a existência de uma carbonila α,β -insaturada na estrutura. O espectro de HSQC mostra um sinal em δ 5,48 (1H, *s*) correlacionando-se com o sinal em δ 99,7. Este sinal mostra correlação no HMBC com C-10 (δ 47,6) e com o mesmo sinal em 180,6 o qual a Me-19 também se correlaciona. Desta forma, o singlete em δ 5,48 foi atribuído ao H-2 e o sinal em δ 180,6 ao C-1.

O espectro de HMBC mostra duas metilas com deslocamentos químicos de δ 1,09 (3H, *s*) e δ 1,19 (3H, *s*) correlacionando-se entre si e com o sinal de C-3 em δ 201,8. No espectro de HSQC é possível observar a correlação do sinal em δ 1,09 com o sinal em δ 27,6 e do sinal em δ 1,19 com o sinal em 22,8 e os mesmos foram atribuídos as metilas Me-29 e Me-28. A metila Me-29 mostra

ainda no HMBC correlação com C-5 em δ 45,4 e a metila Me-28 correlaciona-se com um sinal de carbono quaternário em δ 44,9 que somente pode ser atribuído ao C-4. As observações até agora mencionadas sugerem um esqueleto parcial como mostrado na FIGURA 3.60 (2) (pg 122).

O sinal em δ 1,89 (3H, s), que pode ser atribuído somente à metila Me-30, mostra no espectro de HSQC correlação a J^1 com o sinal em δ 15,1. A análise do espectro de HMBC mostra que o sinal da mesma se correlaciona com o sinal de C-14 em δ 48,2 e com um sinal de carbono carbinólico que está ausente no DEPT 135°, indicando ser um carbono quaternário em δ 75,4. Pelas possíveis correlações para Me-30, este sinal foi atribuído ao C-8. Estas correlações indicam a união de C-14 ao C-8 e ao C-9 (δ 46,8) que também é um carbono quaternário pelo DEPT 135°. Portanto o limonóide **14** apresenta contração do anel C e a seguinte estrutura é proposta:



Experimentos de g-NOESY foram realizados por BRAGA (2005) para esta estrutura. Quando o sinal referente a H-15 em δ 4,40 foi irradiado foi possível observar NOE com o sinal de H-5 em δ 2,52 indicando que H-15 e H-5 estão na mesma face e que, portanto, a hidroxila em C-15 está na face β . Quando a metila Me-30 foi irradiada pode-se observar NOE nos sinais relativos às metilas Me-19 (δ 1,42), Me-18 (δ 1,19) e Me-29 (δ 1,09), o que sugere que a metila Me-30 também esteja posicionada na face α da molécula.

Desta forma, a substância **14** foi identificada como o limonóide hortiolida E.

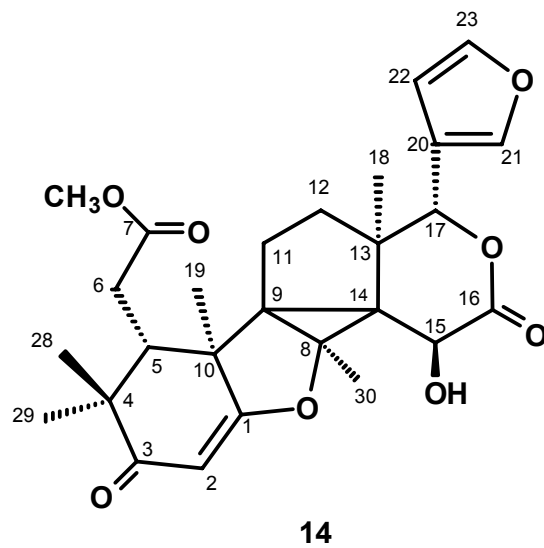


TABELA 3.17: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **14** e comparação com literatura

H/C	SUBSTÂNCIA 14 (400/100 MHz, CDCl_3)		BRAGA, 2005 (400/100 MHz, CDCl_3)	
	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm)	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm)
1	-	180,6	-	180,6
2	5,48 (1H, s)	99,7	5,50 (1H, s)	99,8
3	-	201,8	-	201,9
4	-	44,9	-	44,9
5	2,52 (1H, t, $J=4,7$)	45,4	2,52 (1H, t, $J=4,7$)	45,4
6a	2,74 (1H, dd, $J=17,2$ e $4,7$)	31,8	2,74 (1H, dd, $J=17,2$ e $4,7$)	31,8
6b	2,66 (1H, dd, $J=17,2$ e $4,7$)		2,66 (1H, dd, $J=17,2$ e $4,7$)	
7	-	173,8	-	173,9
8	-	75,4	-	75,5
9	-	46,8	-	46,8
10	-	47,6	-	47,6
11a	2,25 (m)	23,1	2,25 (m)	23,2
11b	2,04 (m)		2,04 (dd, 13,3 e 8,8)	
12a	1,60(m)	29,6	1,60(m)	29,7
12b	1,27 (m)		1,27 (m)	
13	-	45,4	-	45,5
14	-	48,2	-	48,2
15	4,40 (s)	64,1	4,40 (1H, d, $J=1,2$)	64,1
16	-	171,4	-	171,5
17	5,31 (1H, s)	79,9	5,35 (1H, s)	79,9
Me18	1,19 (3H, s)	15,1	1,18 (3H, s)	15,0
Me19	1,42 (3H, s)	22,7	1,42 (3H, s)	22,8
20	-	120,3	-	120,4
21	7,49 (1H, m)	141,6	7,49 (1H, m)	141,7
22	6,45 (1H, m)	110,0	6,44 (1H, dd, $J=1,8$ e $1,0$)	110,0
23	7,44 (1H, t, $J=1,4$)	143,4	7,44 (1H, t, $J=1,7$)	143,4
Me28	1,19 (3H, s)	22,8	1,19 (3H, s)	22,9
Me29	1,09 (3H, s)	27,6	1,11 (3H, s)	27,6
Me30	1,89 (3H, s)	15,1	1,87 (1H, s)	15,1
OCH ₃	3,71 (3H, s)	52,6	3,71 (3H, s)	52,6
OH	*	-	3,03 (1H, d, $J=1,8$)	-

* valor não obtido nos experimentos de RMN

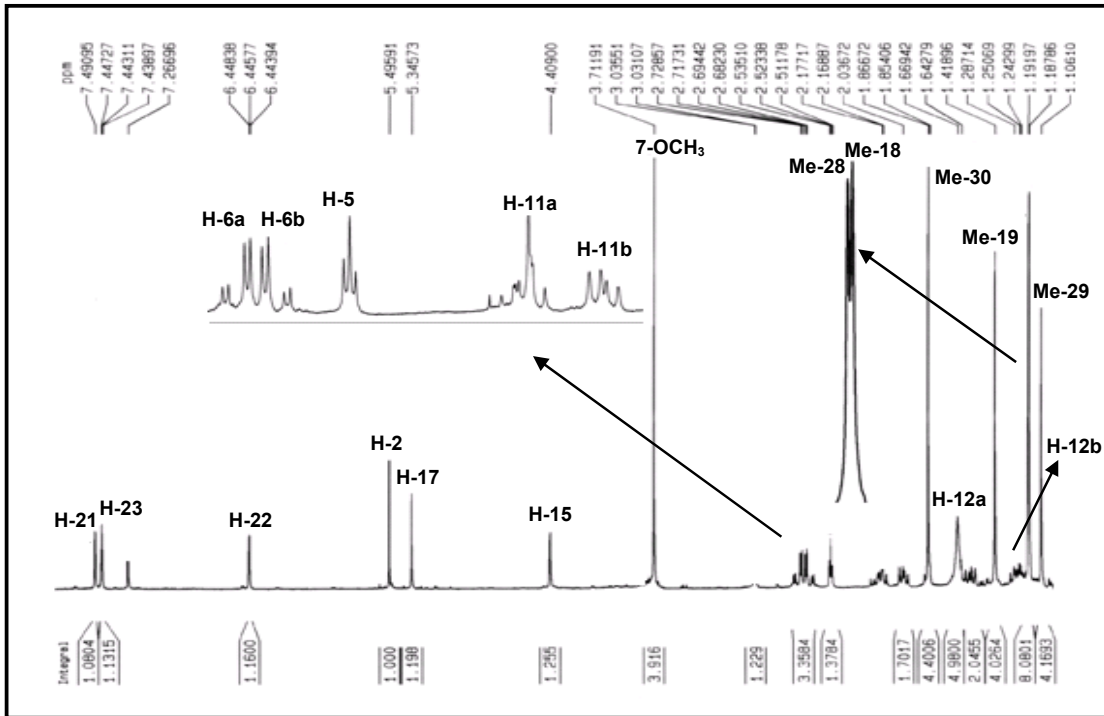


FIGURA 3.61: Espectro de RMN de ^1H de **14** (CDCl_3 , 400 MHz)

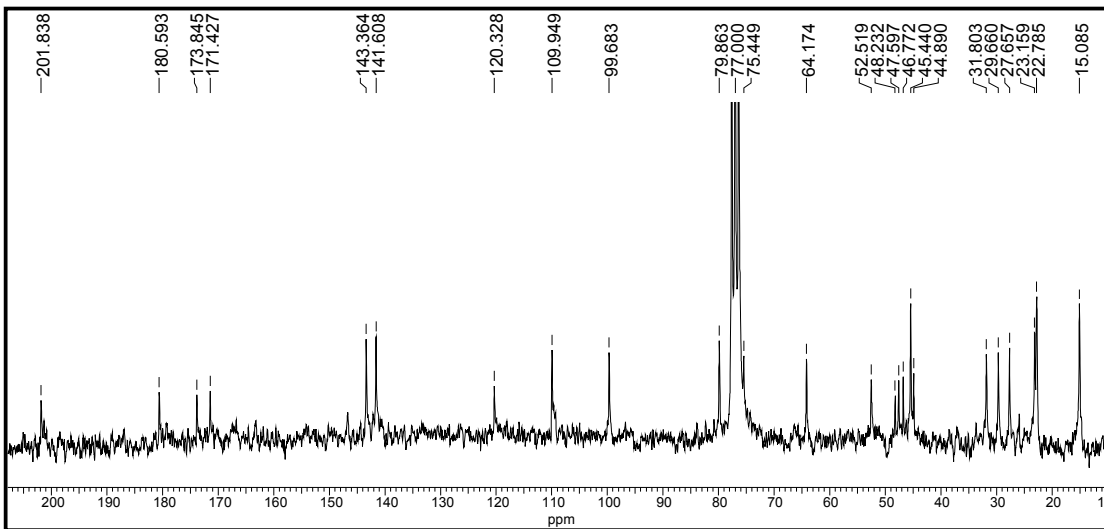


FIGURA 3.62: Espectro de RMN de ^{13}C de **14** (CDCl_3 , 50 MHz)

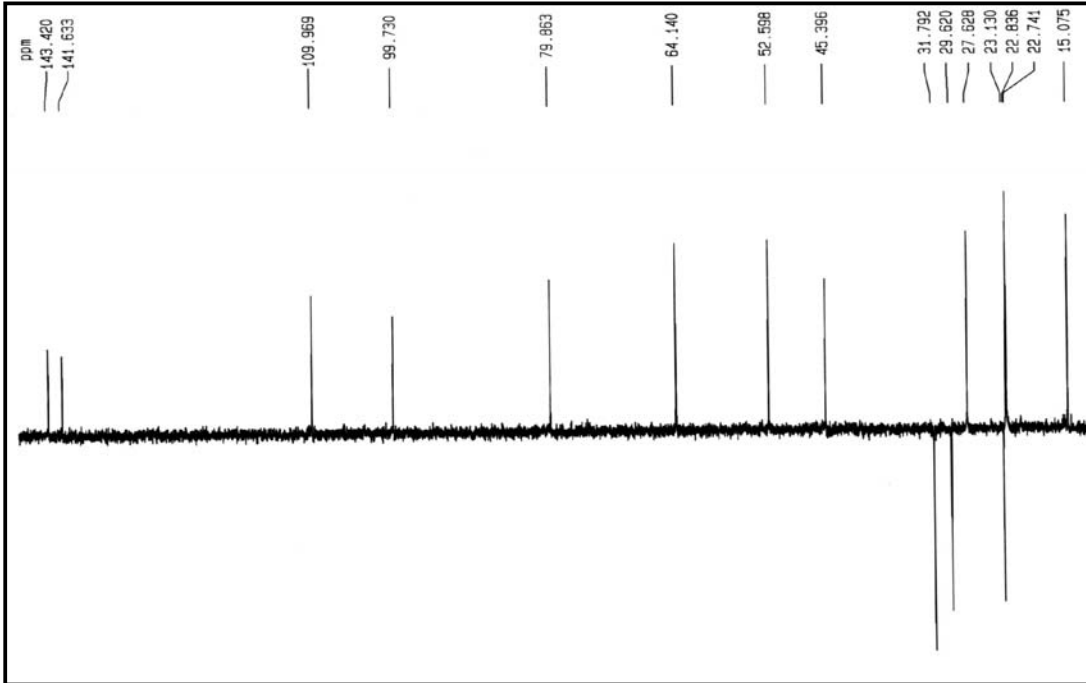


FIGURA 3.63: Espectro de RMN de DEPT 135° de **14** (CDCl₃, 100 MHz)

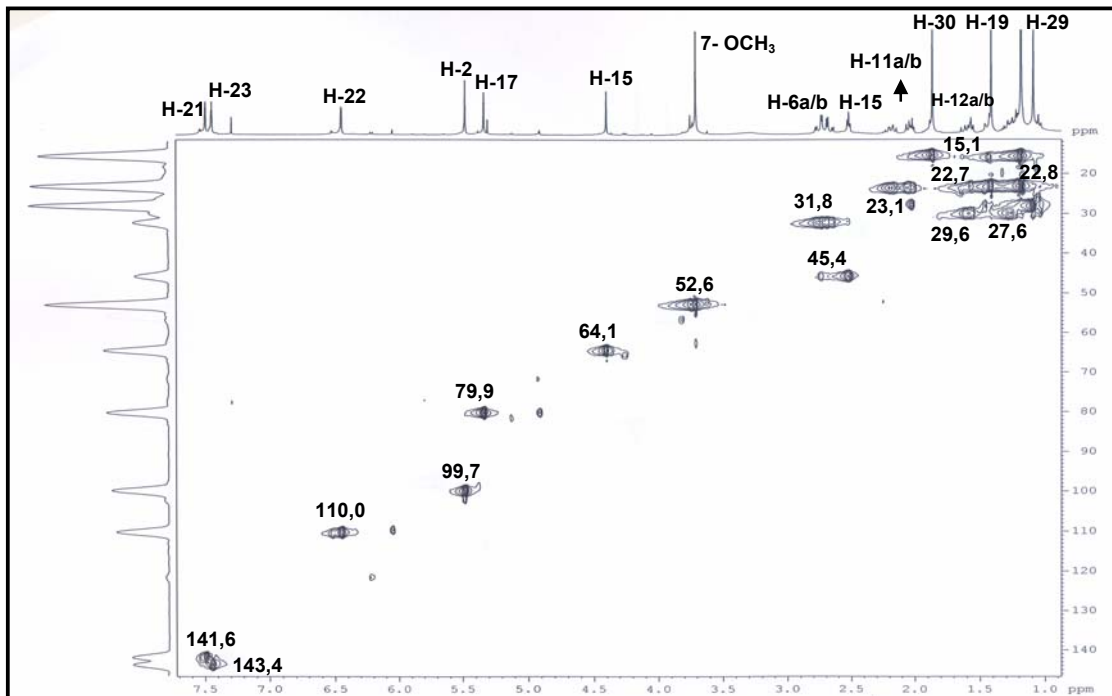


FIGURA 3.64: Mapa de contorno de g-HSQC de **14** (CDCl₃, 400 MHz)

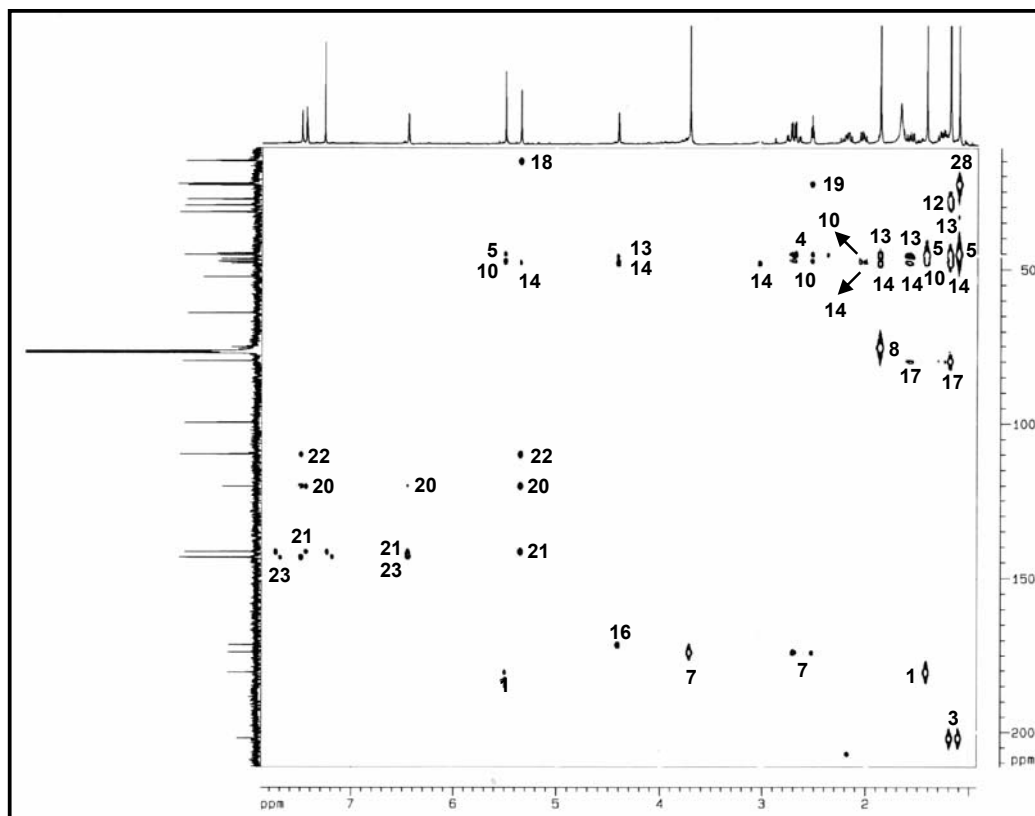


FIGURA 3.65: Mapa de contorno de g-HMBC de **14** (CDCl₃, 400 MHz)

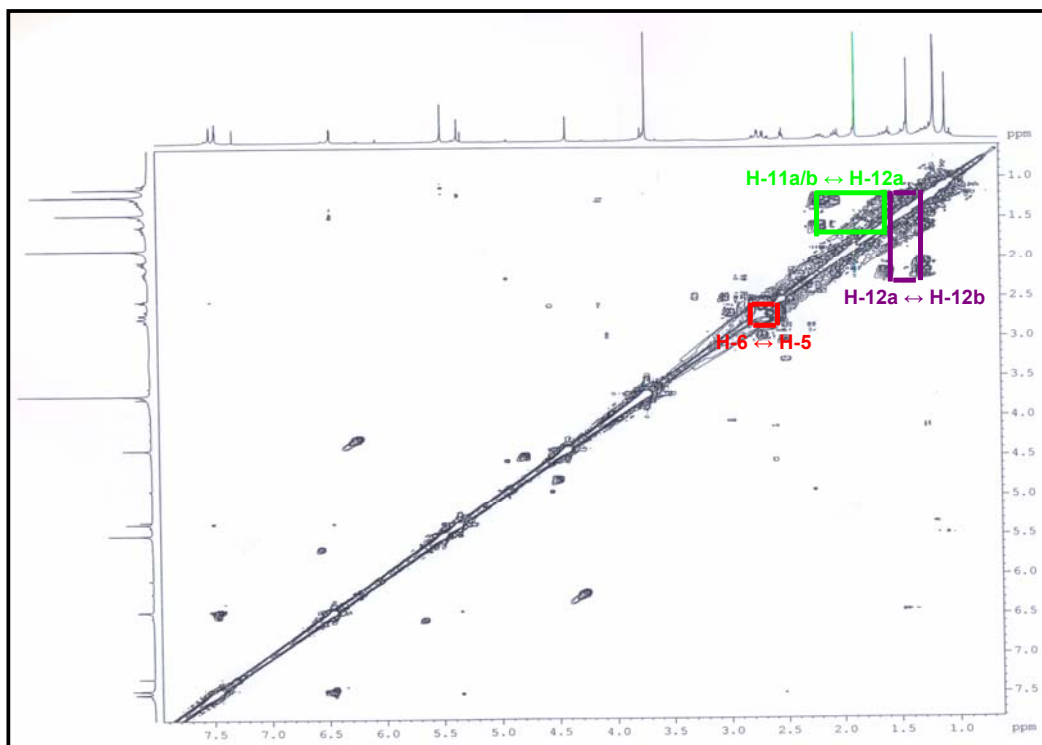
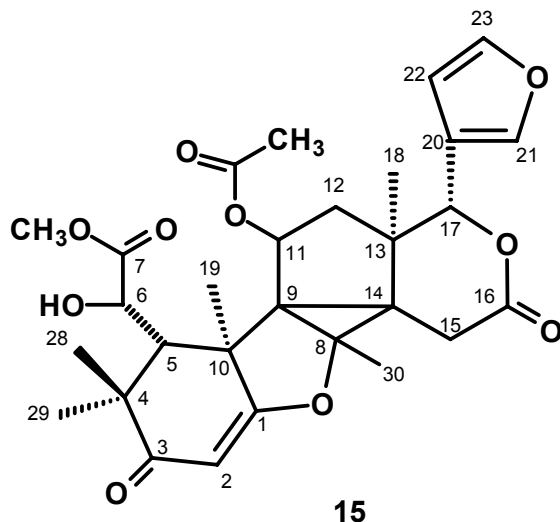


FIGURA 3.66: Espectro de g-COSY de **14** (CDCl₃, 400 MHz)

3.2.4.3 – Determinação estrutural da substância 15

O limonóide **15** foi isolado do extrato diclorometano do tronco subterrâneo de *H. oreadica* e teve sua estrutura determinada através de experimentos de RMN de ^1H , ^{13}C , DEPT 135°, HSQC, HMBC e COSY.



A análise do espectro de RMN de ^1H de **15** (FIGURA 3.68, pg 136) permitiu atribuir os sinais em δ 7,53 (1H, *m*), δ 7,46 (1H, *t*, $J=1,8$ Hz) e δ 6,47 (1H, *dd*, $J= 2,2$ e $1,4$ Hz) aos hidrogênios do anel furano H-21, H-23 e H-22, respectivamente. A análise conjunta dos espectros de RMN de ^{13}C (FIGURA 3.69, pg 136), DEPT 135° (FIGURA 3.70, pg 137) e HSQC (FIGURA 3.71, pg 137) permitiu atribuir todos os carbonos do esqueleto.

Observando o espectro de HMBC (FIGURA 3.72, pg 138), a presença do sinal em δ 5,23 relativo a hidrogênio carbinólico correlacionando-se com os sinais de C-21 (δ 141,8), C-20 (119,9) e C-22 (δ 109,9) sugerem a presença de lactona no anel D, assim como para os limonóides anteriormente descritos. O sinal atribuído ao H-17 (δ 5,23; δ 81,5) mostra correlações também com sinais de carbonos quaternários em δ 48,6 ou δ 48,4 ainda não atribuídos e δ 47,0. Ainda mostra correlação com δ 29,3, δ 29,8 que pelo DEPT é um carbono CH_2 , e com um sinal em δ 15,4 relativo a uma metila que somente pode ser atribuído à Me-18.

O sinal da metila Me-18 (δ 1,24) mostra correlações com o sinal de C-17 (δ 81,5) e com os sinais em δ 48,6 ou δ 48,4 e δ 29,8. No espectro de HSQC observa-se que os sinais em δ 1,65 (*m*) e δ 1,30 (*m*) mostram correlação a J^1 com δ 29,8, sendo atribuído ao C-12.

Os sinais de hidrogênios em δ 2,23 (1H, *m*) e δ 2,02 (1H, *m*) mostram correlações via HMBC com o sinal em δ 47,0 que foi atribuído ao C-13 e com o sinal em δ 170,4 atribuído à carboxila do anel lactônico D. Desta forma, estes sinais foram atribuídos ao H-15a e H-15b que mostram correlação via HSQC com um carbono em δ 23,8. Na FIGURA 3.67 (1) (pg 133) pode-se observar as principais correlações observadas no anel C e D.

A presença de um sinal em δ 3,71 (3H, *s*) de metoxila correlacionando com um sinal em δ 169,6 sugere que o anel B seja seco também para este limonóide. O sinal em δ 5,82 (1H, *d*, $J= 2,4$ Hz) mostra correlação a J^1 com o sinal de carbono em δ 71,5 e via HMBC mostra correlação com o sinal em δ 169,6 sugerindo atribuir este sinal ao hidrogênio H-6. Ainda é possível observar para o hidrogênio H-6 a correlação com sinais em δ 46,0, δ 48,6 ou δ 48,4 (quaternários pelo DEPT 135°) e δ 50,3 que no espectro de HSQC se correlaciona a J^1 com o sinal do hidrogênio em δ 2,53 (1H, *d*, $J=3,2$ Hz). A correlação da metoxila em δ 3,71 com δ 169,6 e o sinal em δ 5,82 com δ 169,6 sugere que o grupo hidroxila esteja em C-6. No espectro de COSY (FIGURA 3.73, pg 138) é possível observar o acoplamento do hidrogênio H-6 com o sinal em δ 2,53 sugerindo que o mesmo seja atribuído ao hidrogênio H-5.

O sinal de carbono quaternário em δ 46,0, cujo H-6 se correlaciona no HMBC poderia ser atribuído tanto ao C-10 quanto ao C-4 pelas correlações permitidas a este hidrogênio. Porém, o sinal atribuído ao H-11 em δ 4,39 não mostra correlação com o mesmo sinal em δ 46,0 que então não poderia ser atribuído ao C-10 e por isso foi atribuído ao C-4.

O sinal de H-5 em δ 2,53 mostra no HMBC correlações com C-10 em δ 48,6 ou δ 48,4 (valores de δ intercambiáveis), com C-7 (δ 169,3), com um sinal em δ 45,3, quaternário pelo DEPT 135° e foi atribuído ao C-9 e com o sinal em δ 23,7 que mostra no HSQC correlação com o sinal em δ 1,47 (3H, *s*) referente a uma metila, podendo ser atribuído somente a metila Me-19. A análise do espectro de HMBC mostra correlações do sinal desta metila com os sinais de

C-5 (δ 50,3), C-9 (δ 45,3), C-10 (δ 48,6 ou δ 48,4) e com um sinal em δ 181,5 atribuído à carbonila.

A presença de um sinal em δ 202,1, assim como para os limonóides discutidos anteriormente, indica a existência de uma carbonila α,β -insaturada na estrutura. O espectro de HSQC mostra um sinal em δ 5,42 (1H, s) se correlacionando com o sinal em δ 98,5. Este sinal mostra correlação no HMBC com C-10 (δ 48,6 ou δ 48,4) e com o mesmo sinal em 181,5 o qual a Me-19 também se correlaciona. Desta forma, o singlete em δ 5,42 foi atribuído ao H-2 e o sinal em δ 181,5 ao C-1.

O espectro de HMBC mostra duas metilas com deslocamentos químicos de δ 1,09 (3H, s) e δ 1,50 (3H, s) correlacionando-se entre si e com o sinal de C-3 em δ 202,1. No espectro de HSQC é possível observar a correlação do sinal em δ 1,09 com o sinal em δ 29,3 e do sinal em δ 1,50 com o sinal em 23,7 e os mesmos foram atribuídos às metilas Me-28 e Me-29. A metila Me-29 mostra ainda no HMBC correlação com C-5 em δ 50,3 e a metila Me-28 correlaciona-se com um sinal de carbono quaternário em δ 46,0 que somente pode ser atribuído ao C-4. As observações até agora mencionadas sugerem um esqueleto parcial como mostrado na FIGURA 3.67 (2) (pg 133).

O sinal em δ 1,87 (3H, s), que pode ser atribuído somente à metila Me-30, mostra no espectro de HSQC correlação a J^I com o sinal em δ 14,6. A análise do espectro de HMBC mostra que o sinal da mesma se correlaciona com o sinal de C-14 em δ 48,6 ou δ 48,4 (valores de δ intercambiáveis com C-10) e com um sinal de carbono que está ausente no DEPT 135°, indicando ser um carbono quaternário em δ 77,0. Pelas possíveis correlações para Me-30, este sinal foi atribuído ao C-8. O sinal atribuído ao H-11 em δ 4,39 (1H, s) mostrou correlação com C-13 (δ 47,0), C-10 (δ 48,6 ou δ 48,4), C-9 (δ 45,3) e com um sinal em δ 170,7 que sugere um carbono carboxílico. O sinal em δ 2,27 referente à uma metila também se correlacionou com δ 170,7, indicando a presença de um grupo acetato que foi atribuído ao C-11.

A análise do HMBC permitiu observar também que H-5 (δ 2,53), H-11 (δ 4,39) e a Me-19 (δ 1,47) correlacionam-se com C-9 (δ 45,3); Me-30 (δ 1,87), Me-18 (δ 1,24) e H-17 (δ 5,23) correlacionam-se com C-14 (δ 48,6 ou δ 48,4) que pelo DEPT 135° são carbonos quaternários. Desta forma, estas

correlações indicam a união de C-9 ao C-8 e ao C-14 e portanto o limonóide **15**, assim como o limonóide **14**, apresenta contração do anel C.

A FIGURA 3.67 (3) (pg 133) apresenta as principais correlações observadas para a estrutura em questão.

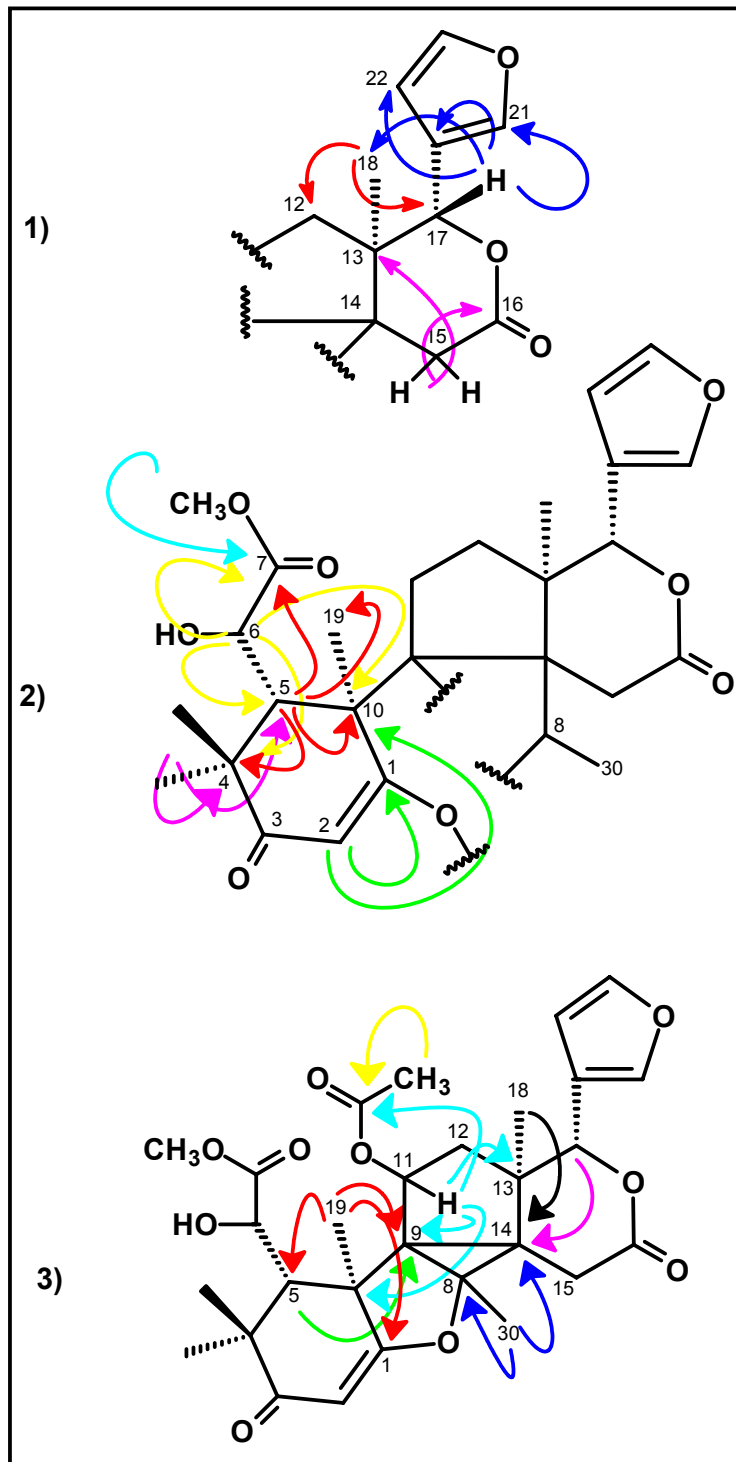


FIGURA 3.67: Correlações observadas no HMBC para **15**

Experimentos de g-NOESY serão realizados para esta estrutura, visando definir a correta estereoquímica dos grupos hidroxila, acetoxila e Me-30. Desta forma, a substância **15** foi identificada como um novo limonóide denominado hortiolida G e a seguinte estrutura é então proposta:

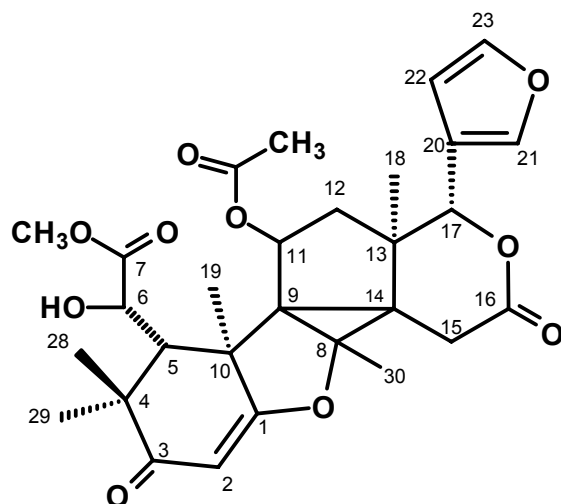


TABELA 3.18: Dados de RMN ^1H , ^{13}C e g-HMBC de **15**

H/C	SUBSTÂNCIA 15	SUBSTÂNCIA 15	Principais Correlações Observadas
	(400 MHz, CDCl_3)	(100 MHz, CDCl_3)	
	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm)	HMBC
1	-	181,5	-
2	5,42 (1H, s)	98,5	C-1, C-10
3	-	202,1	-
4	-	46,0	-
5	2,53 (1H, d, $J=2,8$)	50,3	C-7, C-9, C-10, C-19
6	5,82 (1H, d, $J=2,8$)	71,5	C-4, C-5, C-7, C-10
7	-	169,6	-
8	-	77,0	-
9	-	45,3	-
10	-	48,6/48,4*	-
11	4,39 (1H, s)	64,7	C-9, C-10, C-13
12a	1,65 (<i>m</i>)	29,8	C-13, C-14, C-17
12b	1,30 (<i>m</i>)		
13	-	47,0	-
14	-	48,6/48,4*	-
15a	2,23 (1H, d, $J=10$)	23,8	C-13, C-16
15b	2,02 (1H, d, $J=10$)		
16	-	170,4	-
17	5,23 (1H, s)	81,5	C-14, C-18, C-20, C-21
Me-18	1,24 (3H, s)	15,4	C-12, C-13, C-14, C-17
Me-19	1,47 (3H, s)	23,7	C-1, C-5, C-10
20	-	119,9	-
21	7,53 (1H, <i>m</i>)	141,8	C-20, C-22, C-23
22	6,47 (1H, <i>dd</i> , $J=2,2$ e $1,4$)	109,9	C-20, C-21, C-23
23	7,46 (1H, <i>t</i> , $J=1,8$)	143,6	C-20, C-22, C-21
Me-28	1,09 (3H, s)	29,3	C-3, C-4
Me-29	1,50 (3H, s)	23,7	C-3, C-5
Me-30	1,87 (1H, s)	14,6	C-8, C-14
OCH_3	3,71 (3H, s)	52,9	C-7
OCOCH_3	-	170,7	-
OCOCH_3	2,27 (3H, s)	21,0	OCOCH_3

* valores intercambiáveis

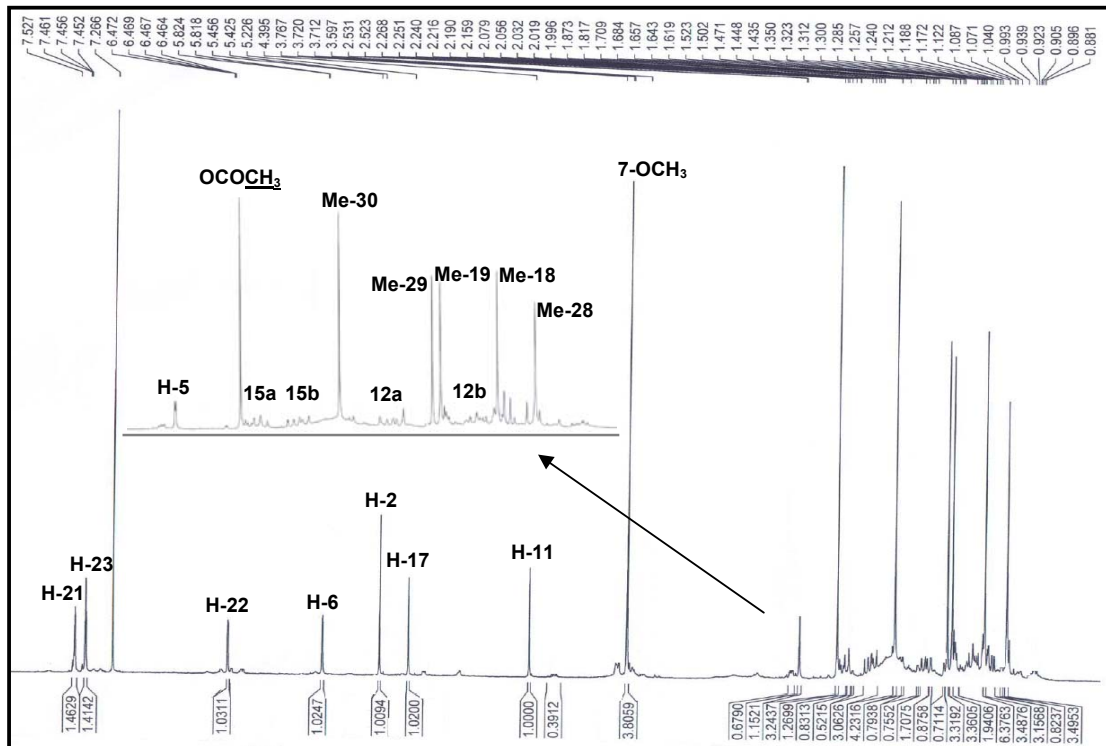


FIGURA 3.68: Espectro de RMN ^1H de **15** (CDCl_3 , 400 MHz)

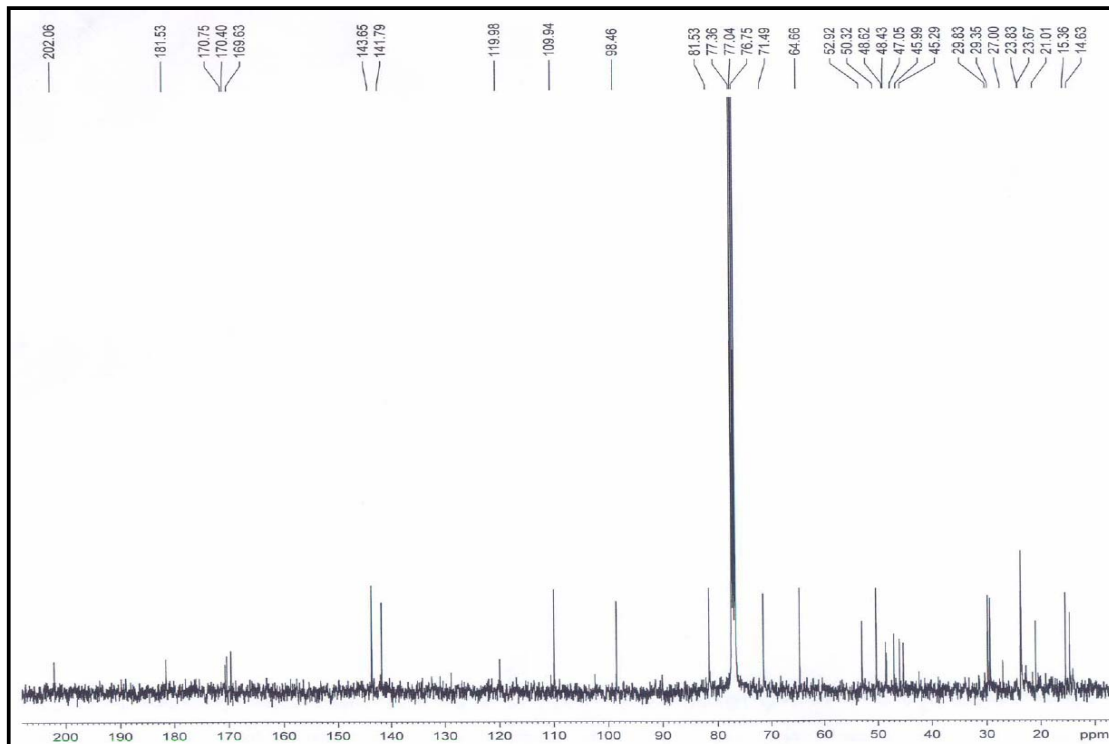


FIGURA 3.69: Espectro de RMN ^{13}C de **15** (CDCl_3 , 100 MHz)

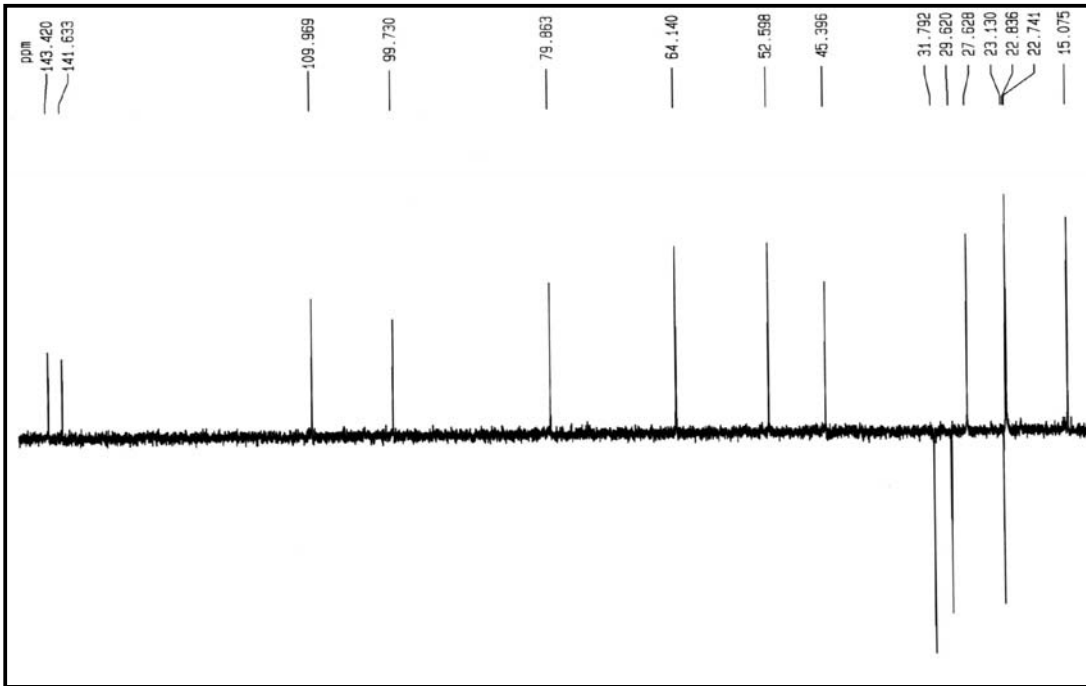


FIGURA 3.70: Espectro de RMN DEPT 135° de **15** (CDCl₃, 100 MHz)

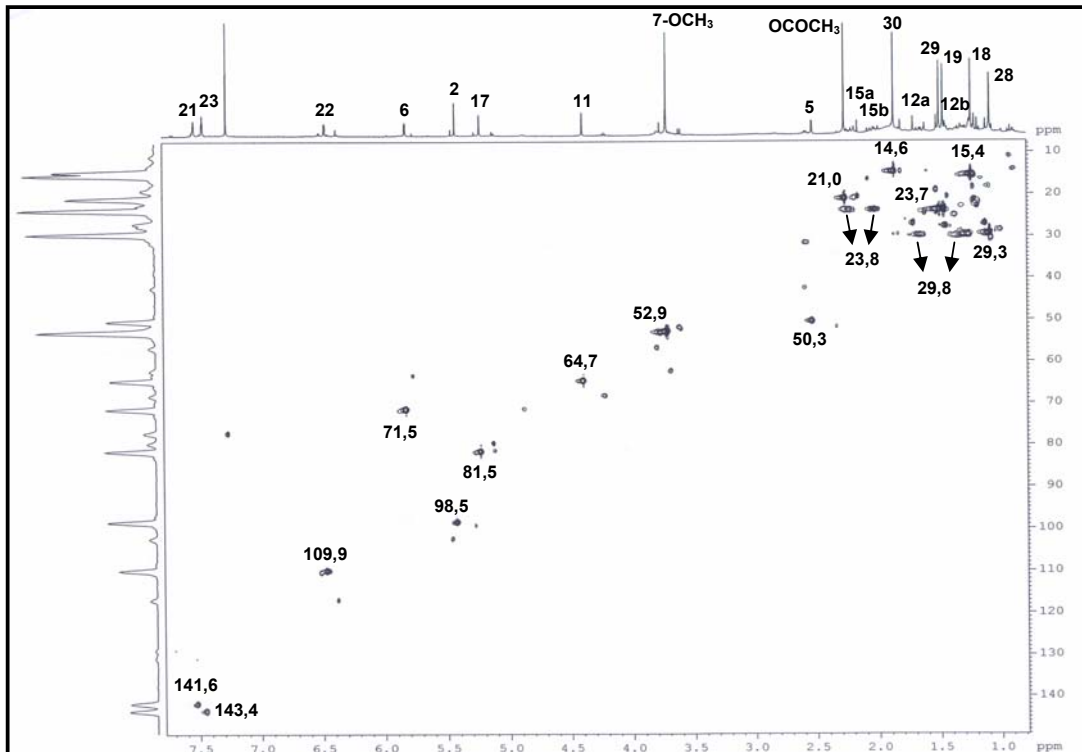
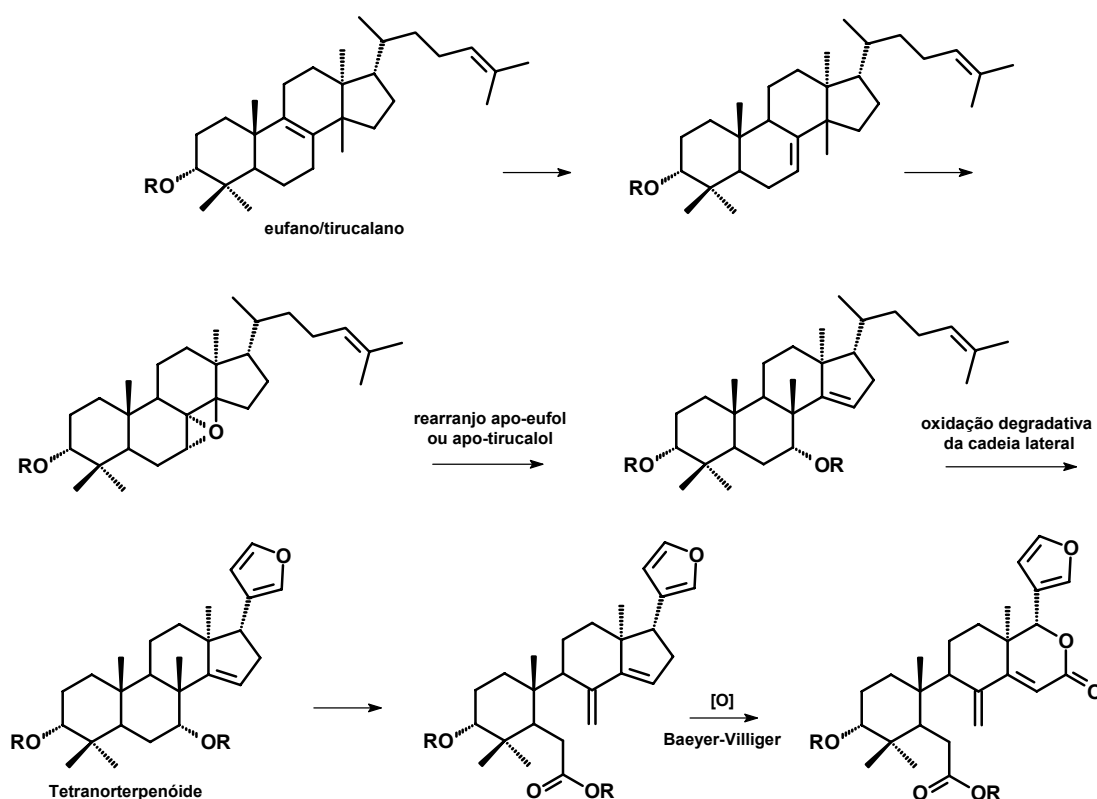


FIGURA 3.71: Mapa de contorno de g-HSQC de **15** (CDCl₃, 400 MHz)

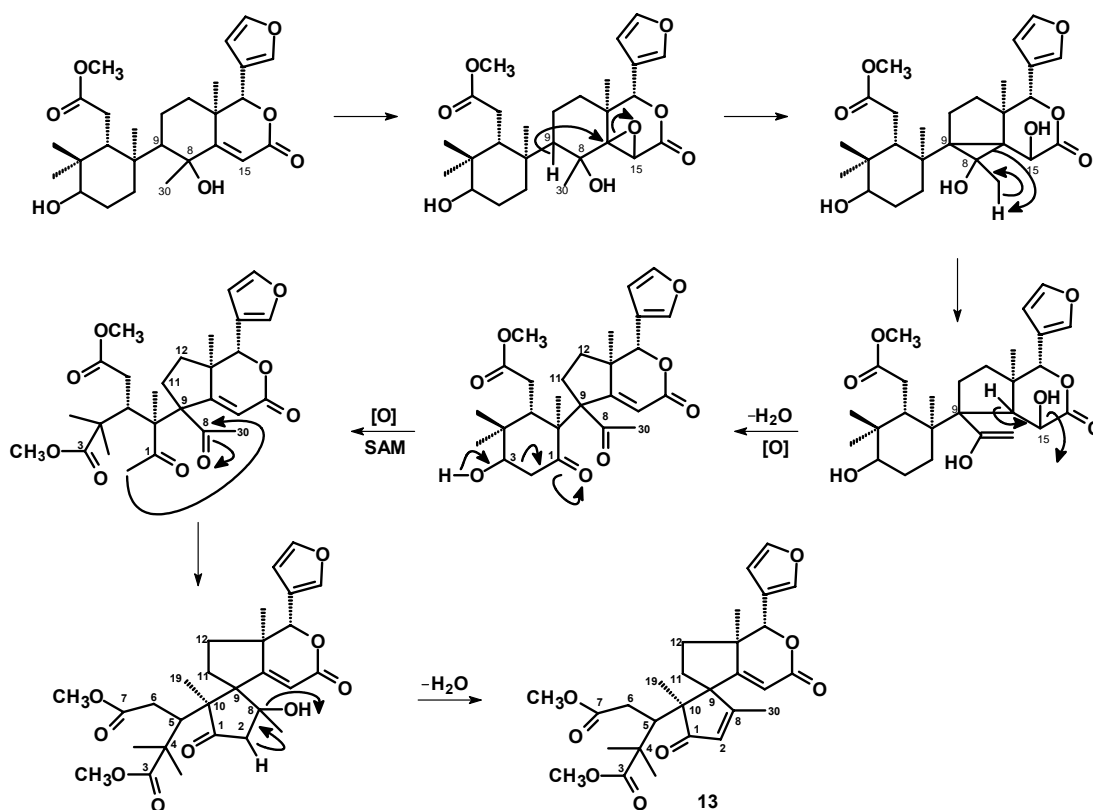
3.2.4.4- Biogênese dos Limonóides

Os limonóides têm sua origem biogenética nos triterpenos do tipo tirucalanos (H-20/C-20 *R*) ou eufanos (H-20/C-20 *S*). De acordo com a biogênese geralmente descrita, há formação de epóxido entre C-7 e C-8 que abre levando a uma hidroxila na posição C-7 e induzindo a migração da Me-30 de C-14 para C-8 e C-15. Em seguida há a ciclização da cadeia lateral, com perda de 4 unidades de carbono levando a formação do anel 17 β furano, como mostra o ESQUEMA 3.9 (pg 139). Comumente o anel D é oxidado a lactona, processo envolvendo a introdução de uma carbonila em C-16 seguida de uma oxidação Baeyer-Villiger (CHAMPAGNE *et. al.*, 1992). Todos os limonóides descritos para o gênero *Hortia*, inclusive os isolados neste trabalho, apresentam o anel D lactonizado assim como o anel B *seco*.



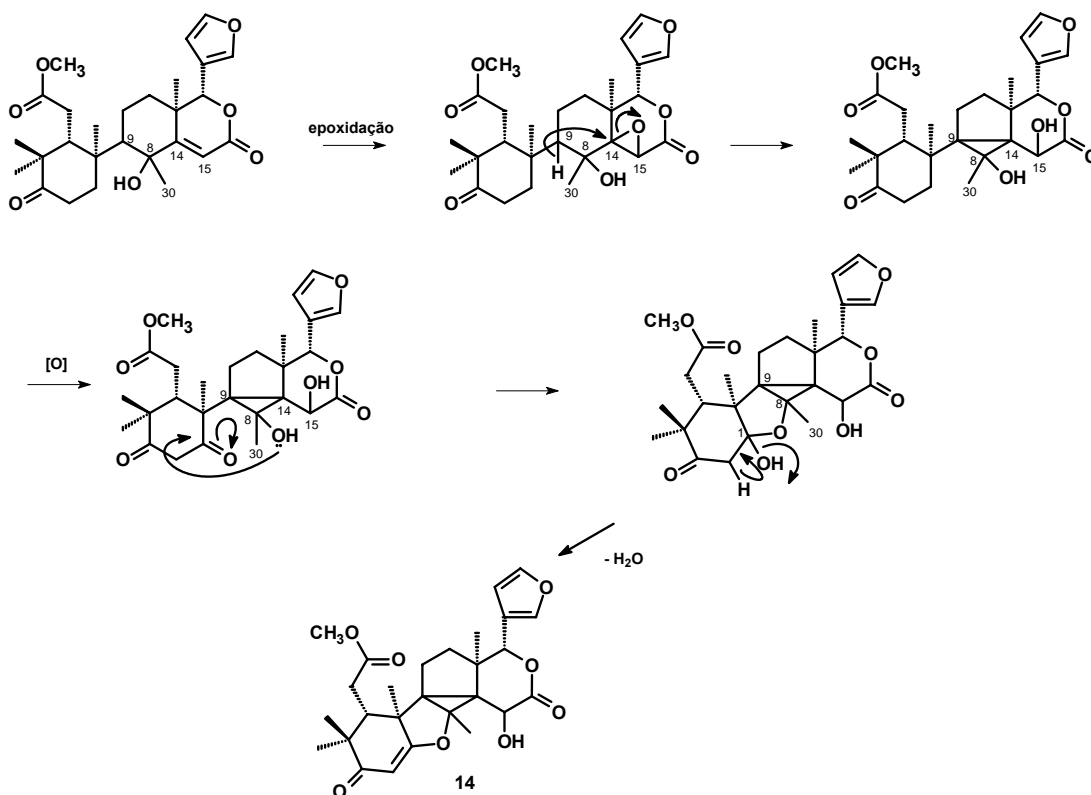
ESQUEMA 3.9: Biogênese dos limonóides

O limonóide **13**, primeiro limonóide isolado de *Hortia* (JACOBS *et. al.*,1986), é bastante modificado e por este motivo esperava-se encontrar outros esqueletos mais simples no gênero, como de fato aconteceu. A proposta biogenética para a guianina (**13**) está no ESQUEMA 3.10 (pg 140) e sua formação envolve, além da contração do anel C, a abertura do anel A.



ESQUEMA 3.10: Proposta biogenética para **13**

O limonóide **14** parece ser o precursor para os demais limonóides descritos para *Hortia*, com formação de um anel de três membros entre os carbonos C-8, C-9 e C-14 (BRAGA, 2005). A biogênese proposta para o limonóides **14** está descrita no ESQUEMA 3.11 (pg 141). A presença do epóxido entre C-14 e C-15 justifica a presença da hidroxila em C-15 para o limonóide **14**.



ESQUEMA 3.11: Proposta biogénica para **14**

O estudo fitoquímico realizado com as espécies de *Hortia* conduziu ao isolamento de algumas classes de metabólitos secundários como derivados do ácido diidrocinâmico e cinâmico, cumarina, alcalóides e limonóides, sendo as estruturas **06** e **14** inéditos em *H. oreadica*, **10** para o gênero *Hortia* e **08** e **15** na literatura.

Entretanto, ainda não é possível propor a classificação correta do gênero *Hortia* dentro da família Rutaceae. *Hortia*, que já foi posicionada em Cusparieae por De Candolle em 1824, na mais recente classificação morfológica de Engler em 1931 pertence a Toddalieae (DE CANDOLLE, 1824; ENGLER, 1931). A proposta de Silva e colaboradores (DA SILVA *et. al.*, 1988), que sugere a união das subfamílias Rutoideae e Toddalioideae por suas similaridades químicas, volta a propor *Hortia* em Cusparieae. *Hortia* é o único representante americano na subtribo Toddaliinae. Na classificação de SILVA *et. al.* (1988) Cusparieae (Cusparia) engloba, além de *Hortia*, o gênero Galipea, que também é um gênero neotropical. Desta forma, *Hortia* estaria mais próxima destes gêneros do que dos membros de Toddaliinae. Este posicionamento está de acordo com os resultados obtidos por GROppo (2004) em um trabalho utilizando análise macromolecular, em que os dados obtidos pelo autor sugerem um relacionamento mais próximo entre *Hortia* e outros gêneros de Cusparieae, como *Adiscanthus*.

Além disso, outro dado muito relevante para o posicionamento é que *Hortia* apresenta limonóides com anéis C e D modificados, muito característicos de Meliaceae, embora a presença de metabólitos como alcalóides, cumarinas, derivados do ácido diidrocinâmico e cinâmico vêm a confirmar que *Hortia* pertence à família Rutaceae. Como exemplo de reposicionamento relatado em literatura (ENGLER, 1931), pode-se citar Flindersioideae, que por apresentar limonóides altamente rearranjados já pertenceu à Meliaceae e na classificação de Engler é um grupo isolado dentro de Rutaceae. A presença de limonóides bastante modificados para *Hortia* poderia indicar que o gênero pode não pertencer nem a Toddalieae e nem a Cusparieae, podendo estar posicionado separadamente dentro da Família Rutaceae, como aconteceu com Flindersioideae.

Neste estudo não foi possível estudar todos os extratos das espécies de *Hortia* devido ao fato que para executar um trabalho fitoquímico completo faz-se necessário um tempo maior que o proposto para o mestrado.

Acredita-se que *Hortia* apresente outros limonóides complexos, como os isolados anteriormente.

Portanto, o estudo dos extratos será realizado durante o doutorado para então concluir melhor sobre o posicionamento quimiossistemático de *Hortia*.

4. CAPÍTULO 2:
ENSAIOS BIOLÓGICOS

4.1- ENSAIOS BACTERICIDAS FRENTE A *Xylella fastidiosa*

Os ensaios foram realizados no Centro APTA Citros “Sylvio Moreira”, situado na cidade de Cordeirópolis-S.P., com a colaboração da professora Dra. Alessandra Alves de Souza. Utilizou-se meio PW Líquido (DAVIS *et al.*, 1981) para o cultivo da bactéria e realizou-se experimentos com esta no início da fase estacionária, ou seja, após 10 dias de crescimento. A solução preparada contendo bactéria e substância ensaiada foi plaqueada em placas de Petri contendo meio PW sólido. A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada visualmente quando, no máximo, uma colônia foi obtida após plaqueamento da cultura não diluída (BROOUN *et al.*, 2000).

4.1.1- Procedimento Experimental

4.1.1.1- Preparação dos meios de cultivo

Inicialmente preparou-se o meio de cultura PW (líquido e sólido) para *X. fastidiosa*, segundo o protocolo de DAVIS *et al.*, 1981 (TABELA 4.1, pg 146). Adicionou-se a quantidade específica de cada reagente de acordo com a quantidade total de meio necessário.

TABELA 4.1: Reagentes e quantidades necessárias para preparar o meio PW

Reagentes	Para 1000 mL de meio	Para 200 mL de meio	Para 150 mL de meio	Para 100 mL de meio
Phytone Peptone	4,00 g	0,80 g	0,60 g	0,40 g
Trypticase Peptone	1,00 g	0,20 g	0,15 g	0,10 g
Hemin Chloride (0,1%)	10,00 mL	2,00 mL	1,50 mL	1,00 mL
Phenol Red (0,2%)	10,00 mL	2,00 mL	1,50 mL	1,00 mL
K ₂ HPO ₄	1,20 g	0,24 g	0,18 g	0,12 g
KH ₂ PO	1,00 g	0,20 g	0,15 g	0,10 g
MgSO ₄ .H ₂ O	0,40 g	0,08 g	0,06 g	0,04 g
Agar	12,00 g	2,40 g	1,80 g	1,20 g
água destilada	800 mL	164 mL	125 mL	92 mL

Preparou-se Phenol Red 0,2% a partir da adição de 0,2 g de Phenol Red e 10 gotas de NaOH 20% em 100 mL de água; e Hemin Chloride 0,1 % a partir da adição de 0,1 g de Hemin Chloride (Sigma H-1652) e 0,2 g de NaOH em 100 mL de água. Os outros reagentes foram obtidos comercialmente. Autoclavou-se a mistura por 20 minutos a 120°C e adicionou-se Glutamina 4% e BSA 10% por filtração.

Foi necessário a utilização de grande quantidade de meio líquido e sólido para a realização dos experimentos. Desta forma, preparou-se 1000 mL de cada um toda vez que realizava-se os ensaios.

✚ Preparo de 1000 mL de meio sólido:

Em um frasco grande, adicionou-se primeiramente 400 mL de água destilada. Em seguida, colocou-se 4,00 g de Phytone Peptone (BBL 4311906), 1,00 g de Trypticase Peptone (BBL 4311921), 1,20 g de K_2HPO_4 , 1,00 g de KH_2PO_4 , 0,40 g de $MgSO_4 \cdot H_2O$ e 12,0 g de Agar. Então, sob agitação mecânica, adicionou-se 10 mL de Hemin Chloride (0,1%) e 10 mL de Phenol Red (0,2%). Após a solução ter ficado homogênea, completou-se até 800 mL com água destilada. Autoclavou-se o meio e paralelamente preparou-se a solução de BSA e Glutamina.

Para o preparo da Glutamina 4% adicionou-se em um erlenmeyer 4,00 g de Glutamina (Sigma G-5763) e 100 mL de H_2O autoclavada e deixou-se em banho-maria (50-55°C) até que toda a Glutamina se dissolvesse. Para o BSA, adicionou-se em outro erlenmeyer 6,00 g de BSA fração V (Sigma A-9418) e 100 mL de água autoclavada e deixou-se sob agitação até que todo reagente se dissolvesse.

Após autoclavado o meio sólido, resfriou-se um pouco e depois inseriu-se o BSA e a Glutamina através de um filtro. Por fim, verteu-se o meio em placas de Petri deixando-as abertas por alguns minutos para que o vapor liberado do meio PW evaporasse. Não se pode resfriar muito o meio sólido antes de verter, pois este se solidifica rapidamente. As placas foram fechadas e vedadas (1000 mL de meio resulta em aproximadamente 30 Placas de Petri).

✚ Preparo de 1000 mL de meio líquido:

Os reagentes utilizados para o preparo do meio líquido foram os mesmos utilizados para preparar o meio sólido, porém no meio líquido não se utiliza o Agar que é responsável por solidificar o meio. O procedimento realizado foi praticamente o mesmo, porém em vez de autoclavar em um único frasco como no meio sólido, dividiu-se a solução em 10 erlenmeyers contendo 80 mL e depois que todos foram autoclavados, adicionou-se 10 mL de BSA e 10 mL de Glutamina em cada erlenmeyer.

Ambos os meios foram preparados com o máximo de cautela, ou seja, toda vidraria usada e o meio foram autoclavados e toda preparação do meio foi executada dentro de um fluxo próprio e próximo ao fogo, uma vez que este meio é facilmente contaminado devido ao fato de ser um meio rico em nutrientes. No entanto, o meio líquido é mais facilmente contaminado em relação ao meio sólido, pois há maior manuseio e transferência de vidrarias.

Após este procedimento os meios ficaram em repouso por aproximadamente 14 dias para verificar se não houve contaminação. O meio líquido foi utilizado para cultivar a bactéria, enquanto que o meio sólido foi utilizado para plaquear a solução contendo meio *X. fastidiosa* e a substância a ser ensaiada, e portanto verificar se bactéria se desenvolveu com a substância em questão.

Preparados os meios de cultivo, colocou-se a bactéria para crescer no meio líquido. Um trabalho citado na literatura (CAMPANHARO, *et al.*, 2003) compara o crescimento da bactéria em diferentes meios e demonstra que, independente deste, a *X. fastidiosa* possui três fases de crescimento: Fase lag, na qual a bactéria ainda não se multiplica; Fase log (exponencial), em que a bactéria se multiplica, aumentando sua população; e Fase estacionária, na qual pára de se multiplicar e conseqüentemente começa a morrer.

4.1.1.2- Crescimento de *X. fastidiosa* em *Citrus sinensis*

A linhagem de *X. fastidiosa* 9a5c foi utilizada neste estudo. Células bacterianas foram inoculadas em *Citrus sinensis* e estas plantas foram reservadas na casa de vegetação do Centro de Citricultura APTA Citros Sylvio Moreira, Instituto Agrônomo, Cordeirópolis-SP. Aproximadamente seis meses após a inoculação, quando sintomas de CVC eram visíveis nas plantas, as folhas foram coletadas e as células bacterianas presentes nas mesmas foram isoladas de pecíolos e hastes. A seiva resultante foi assepticamente mantida em tampão fosfato salino (PBS) e esta suspensão foi distribuída em placas de Petri contendo meio líquido PW (SOUZA *et al.*, 2005). Para confirmar a linhagem de *X. fastidiosa* nesta suspensão, uma alíquota foi submetida à ensaios de RT-PCR utilizando dois conjuntos de primers específicos para a detecção de *X. fastidiosa* (MISSANVAGE *et al.*, 1994; POOLER & HARTUNG, 1995).

4.1.1.3- Preparo do Inóculo para Ensaio

A cultura de *X. fastidiosa* foi crescida em placas de Petri com meio sólido PW e após 10 a 15 dias do plaqueamento as primeiras colônias foram observadas. Para a obtenção de células aderidas à superfície do vidro, diversas colônias foram transferidas para tubos de polipropileno contendo 3 mL de meio líquido PW. Quando a OD_{600nm} atingiu 0,3 (correspondendo a 10⁸ unidades formadoras de colônias (CFU)/ml) os tubos foram colocados para centrifugar e as células foram transferidas para um frasco de 1 litro contendo 300 mL de meio líquido PW. Após 3 dias de crescimento a 28°C no agitador giratório a 120 rpm, um fino biofilme foi observado aderido ao vidro na interface meio-ar (SOUZA *et al.*, 2005) e estas culturas foram então utilizadas para realizar os ensaios biológicos frente a determinadas substâncias.

4.1.1.4- Ensaio das Substâncias frente a *X. fastidiosa*

Foram ensaiados frente à *X. fastidiosa* dois alcalóides (rutaecarpina (09) e N-metil-4-metoxi-2-quinolona, um derivado do ácido diidrocinâmico {ácido 3-fenil-[2',6'-dimetoxi-(3',4'-O:5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano]propiónico (01)} e um limonóide guianina (13) isolados de espécies de *Hortia* e quatro substâncias quinolinônicas sintéticas: 2-carbometoxi-6-metoxi-4-quinolona (S1), 2-metil-6-fluor-4-quinolona (S2), 2-metil-5,7-dimetoxi-4-quinolona (S3) e 2-metil-5-metoxi-7-hidroxi-4-quinolona (S4), apresentados na FIGURA 4.1 (pgs 150 a 151).

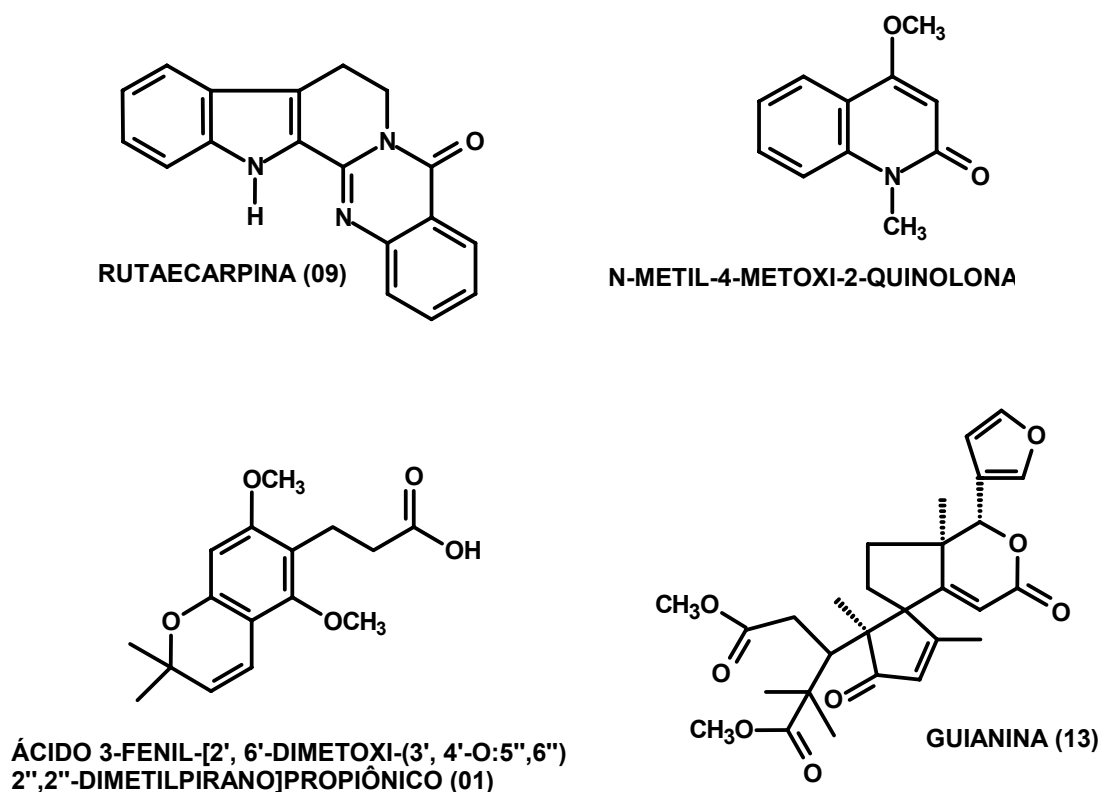
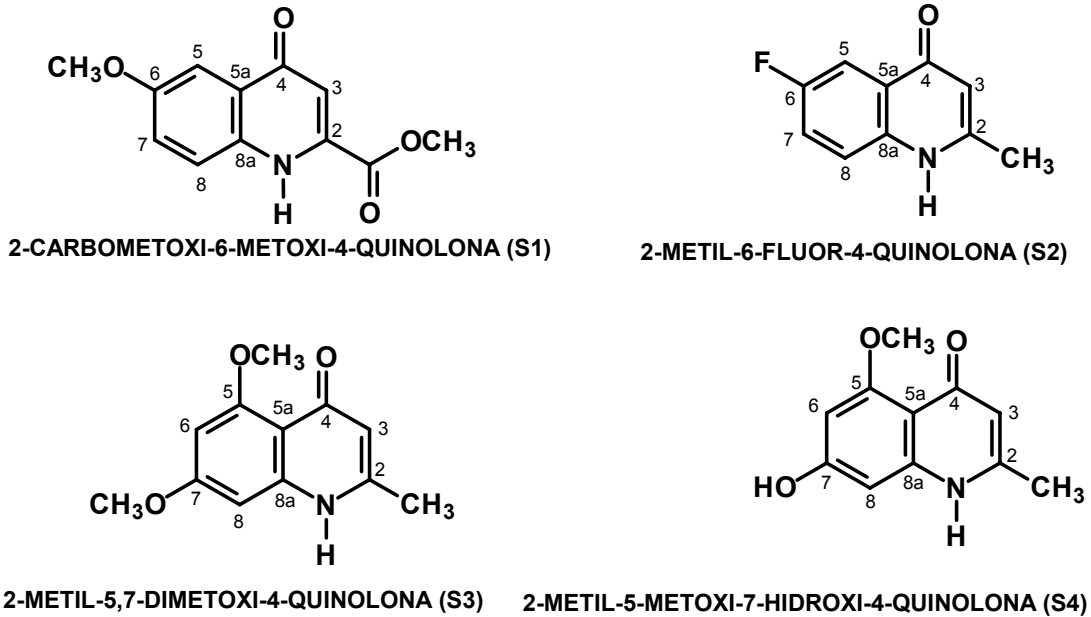


FIGURA 4.1: Estruturas das substâncias ensaiadas



SÉRIE SINTÉTICA

FIGURA 4.1: Estruturas das substâncias ensaiadas (continuação)

Primeiramente, preparou-se uma solução estoque (5mg/mL) de cada substância teste. Calculou-se o volume de solução estoque necessário para a obtenção da concentração final, utilizando-se 100 μ L da bactéria. Iniciou-se os experimentos utilizando-se concentrações finais de 0,5 mg/mL, 1,0 mg/mL, 1,5 mg/mL e 2,0 mg/mL, uma vez que não havia descrito na literatura ensaios com este tipo de substâncias frente à *X. fastidiosa* e a partir dos resultados iniciais obtidos foi alterando-se estas concentrações de 0,4 à 2,0 mg/mL até a determinação da CIM de cada substância.

$$C_i \cdot V_i = C_f \cdot V_f$$

- $C_i \cdot V_i = C_f \cdot V_f$
 $5 \text{ mg/mL} \cdot V_i = 0,4 \text{ mg/mL} \cdot (0,1 \text{ mL} + V_i)$

$V_i = 8,7 \mu\text{L}$ → Para uma concentração de 0,4 mg/mL deve-se usar 8,7 μ L da solução estoque (5mg/mL)

- $C_i \cdot V_i = C_f \cdot V_f$
 $5 \text{ mg/mL} \cdot V_i = 0,5 \text{ mg/mL} \cdot (0,1 \text{ mL} + V_i)$

$V_i = 11,1 \mu\text{L}$ → Para uma concentração de 0,5 mg/mL deve-se usar 11,1 μL da solução estoque (5mg/mL)

Os cálculos para as demais concentrações foram semelhantes ao descrito acima e estão indicados na TABELA 4.2 (pg 152).

TABELA 4.2: Concentração ensaiada e volume retirado da solução estoque

Concentração ensaiada (mg/mL)	Volume da Solução Estoque (μL)
0,4	8,7
0,5	11,1
1,0	25,0
1,2	31,6
1,3	35,0
1,4	39,0
1,5	43,0
1,6	47,0
1,7	51,0
1,8	56,0
2,0	67,0

Utilizou-se um eppendorf para cada volume pipetado da solução estoque. Adicionou-se em cada eppendorf 100 μL do meio líquido contendo a *X. fastidiosa* e posteriormente inseriu-se o volume necessário da solução estoque para atingir as concentrações finais desejadas, como mostrado para algumas concentrações na FIGURA 4.2 (pg 153).

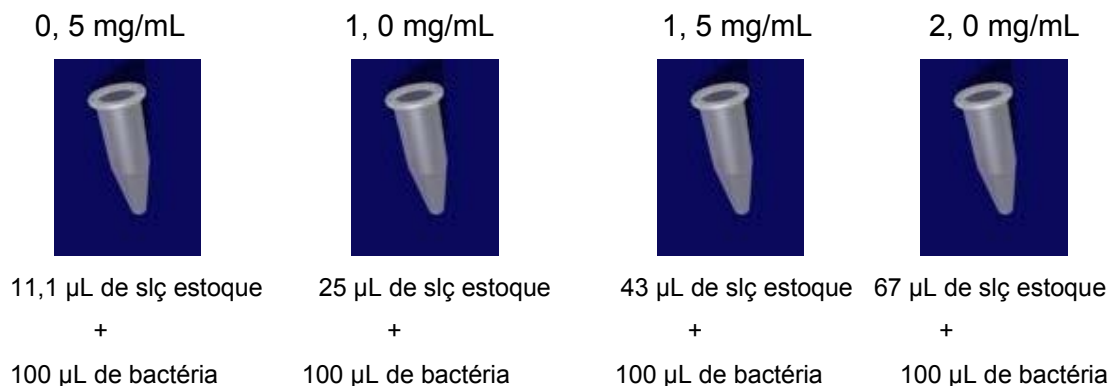


FIGURA 4.2: Eppendorfs com as substâncias ensaiadas nas diferentes concentrações e a solução de *X. fastidiosa*.

Em relação ao controle negativo, composto de DMSO:H₂O e necessário para verificar se o solvente não inibe o crescimento da bactéria, foi necessário vários estudos de otimização para que a menor proporção de DMSO fosse utilizado nos ensaios. Isso porque este solvente é muito tóxico e seu uso em altas doses poderia levar a inibição de *X. fastidiosa*. Desta forma, os primeiros ensaios foram realizados com uma proporção de 1:1 DMSO: H₂O tanto para solubilizar as amostras quanto para o controle negativo, onde observou-se que o crescimento da bactéria era muito baixo. Assim, foi proposto um estudo com proporções de DMSO: H₂O que variassem de 1:1 à 1:4, respectivamente. A TABELA 4.3 (pg 153) ilustra como foi preparado os controles negativos e as soluções estoques (5 mg/mL) a partir das proporções propostas:

TABELA 4.3: Proporções de DMSO: H₂O

PROPORÇÕES	DMSO:H ₂ O (mL) (volume final de 1,0 mL)
1:1	0,5:0,5
1:2	0,33:0,67
1:3	0,25:0,75
1:4	0,2:0,8

Na TABELA 4.4 (pg 154) são apresentados os resultados dos testes com as quatro proporções de solventes, respeitando os cálculos citados acima que fornece o volume de solventes necessários para atingir as concentrações de solução estoque desejadas.

TABELA 4.4: Colônias observadas nos controles negativos para as diferentes concentrações de substâncias ensaiadas

SOLVENTE	1,0 mg/mL	1,2 mg/mL	1,4 mg/mL	1,6 mg/mL
DMSO: H ₂ O 1:1	-	-	-	-
DMSO: H ₂ O 1:2	++	++	+	-
DMSO: H ₂ O 1:3	+++	++	++	++
DMSO: H ₂ O 1:4	++++	++++	++++	+++

++++: Crescimento de muitas colônias

+++: Crescimento de aproximadamente 70 colônias

++: Crescimento de 40 colônias

+: Crescimento de poucas colônias

-: não houve crescimento de colônias

Após este estudo foi observado que quando foi utilizada a proporção de 1:4 de DMSO:H₂O o controle negativo apresentou um crescimento considerável de *X. fastidiosa* e portanto em todos os ensaios realizados utilizou-se esta proporção de solventes.

Assim, para o preparo do controle negativo foi aplicado em eppendorfs 100 µL do meio de *X. fastidiosa* e o valor de cada volume pipetado da solução estoque, porém apenas com DMSO:H₂O (1:4). Em outro eppendorf, adicionou-se apenas 100 µL do meio da *X. fastidiosa* para confirmar a viabilidade celular.

Colocou-se todos os eppendorfs na estufa a 28°C por 24 horas para que houvesse interação entre as substâncias ensaiadas e a bactéria. Após este período, plaqueou-se 100 µL de cada solução em placas de Petri e guardou-as na estufa novamente. A partir de 20 dias observou-se se a bactéria cresceu na concentração correspondente ou se esta foi inibida. Quando a bactéria foi totalmente inibida determinou-se a CIM para a substância ensaiada.

Os experimentos foram realizados em triplicata para a obtenção de um resultado confiável e reprodutivo.

Quando há inibição da bactéria ocorre algumas mudanças na placa de Petri (FIGURA 4.3, pg 155), como por exemplo, a ausência de colônias e a permanência da coloração amarelada. No entanto, quando há o crescimento de *X. fastidiosa* a placa se torna avermelhada, ou seja, o meio sólido muda de cor

devido a presença do reagente Phenol Red que é um indicador de pH. À medida que as células estão crescendo, elas produzem substâncias alcalinas que na presença de Phenol Red provoca a mudança de coloração na placa.

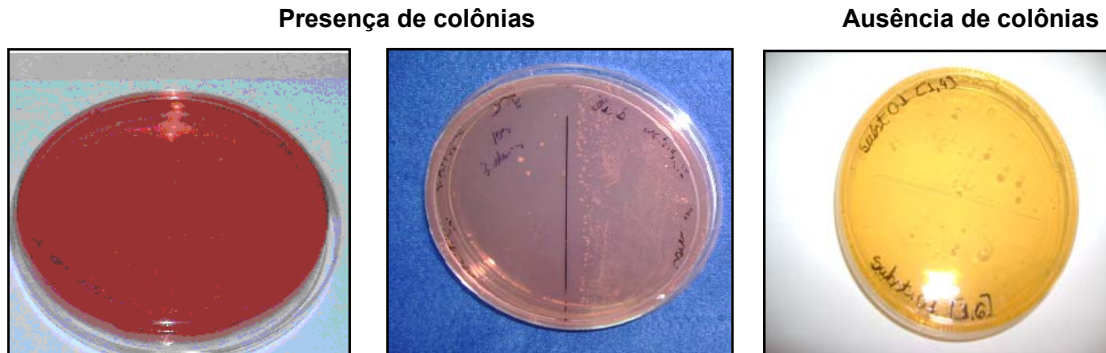


FIGURA 4.3: Placas de Petri com as substâncias ensaiadas

4.1.2- Resultados e Discussão

Não há atualmente um método eficaz e comercial disponível para o controle da bactéria *X. fastidiosa*, agente causal da Clorose Variegada dos Citros (CVC) e de outras doenças, como por exemplo, a Doença de Pierce. Esta bactéria tem causado enormes prejuízos tanto para a citricultura brasileira, como para outras diversas culturas distribuídas mundialmente (FUNDECITRUS, 2008a)

Iniciou-se, então, estudos para a obtenção de substâncias naturais com alto potencial bactericida, as quais não são agressoras ao meio ambiente e ao ser humano. Entretanto, como estas substâncias são obtidas em pequena quantidade das plantas, ensaiou-se primeiramente substâncias sintéticas baseadas em produtos naturais, as quais estavam disponíveis em grande quantidade caso houvesse a necessidade de massa adicional das mesmas para otimizar os ensaios, e posteriormente partiu-se para os ensaios com metabólitos secundários obtidos de plantas.

Diversas concentrações das substâncias foram aplicadas, as quais estão descritas na TABELA 4.5 (pg 156), até que a bactéria fosse totalmente inibida.

Como relatado no procedimento experimental, foi observado que os solventes DMSO:H₂O na proporção de 1:4 não interferiram nos ensaios, havendo crescimento satisfatório de *X. fastidiosa*.

A avaliação da inibição do crescimento bacteriano foi realizada visualmente, por comparação das placas contendo substâncias teste e *X. fastidiosa*, com o controle negativo apenas com os solventes (DMSO:H₂O) e controle onde plaqueou-se apenas *X. fastidiosa*. A CIM foi considerada quando, no máximo, uma colônia foi obtida após plaqueamento da cultura não diluída (BROOUN *et al.*, 2000).

TABELA 4.5: Colônias observadas nas diferentes concentrações de substâncias ensaiadas frente *X. fastidiosa*

Concentração (mg/mL)	09	N-metil-4-metoxi-2-quinolina	01	13	S1	S2	S3	S4
0,4	+++	+++	+++	+++	++	+	+++	++
0,5	++	+++	+++	+++	++	-	+++	+
0,7	+	+++	+++	+++	++	-	+++	+
1,0	-	++	+++	+++	++	-	+++	-
1,2	-	++	+	++	+	-	+	-
1,4	-	+	-	+	+	-	+	-
1,5	-	-	-	-	-	-	-	-
1,7	-	-	-	-	-	-	-	-
1,8	-	-	-	-	-	-	-	-
2,0	-	-	-	-	-	-	-	-

+++ : crescimento intenso, semelhante ao controle

++ : redução parcial de crescimento, comparado ao controle

+ : redução do crescimento com visualização de colônias isoladas

+: redução quase total do crescimento

- : não houve crescimento da bactéria

A partir destes resultados pode-se determinar a CIM de cada substância (FIGURA 4.4, pg 157).

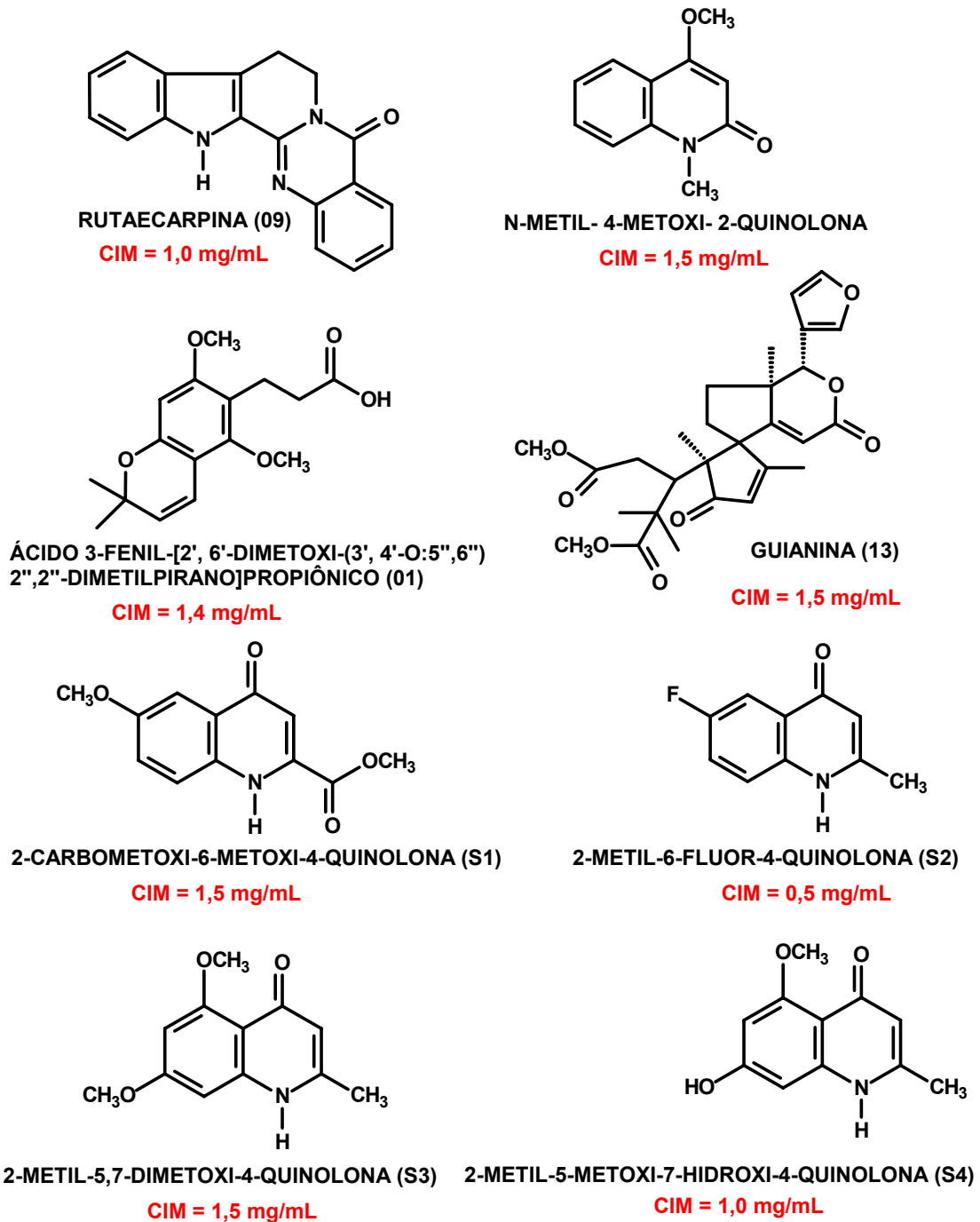


FIGURA 4.4: CIM das substâncias ensaiadas frente à *X. fastidiosa*

O fato de a bactéria na fase estacionária ser mais resistente à antibióticos que as células em crescimento exponencial (fase log) já é bem retratado na literatura (GILBERT *et al.*, 1990); assim, os ensaios foram realizados

com células de *X. fastidiosa* na fase estacionária. Para confirmar se a bactéria estava realmente nesta fase, mediu a densidade óptica (OD_{600nm}) do meio antes de iniciar o ensaio, o qual apresentou OD_{600nm} igual a 0,281 que segundo a literatura (CAMPANHARO *et al.*, 2003) indica a fase estacionária.

Observa-se nos resultados apresentados acima para compostos naturais que na concentração de 1,0 mg/mL a rutaecarpina efetivamente inibiu a proliferação de células de *X. fastidiosa*, enquanto que N-metil-4-metoxi-2-quinolona, ácido 3-fenil-[2',6'-dimetoxi-(3'-4'O:5'',6'')2'',2''-dimetilpirano]propiónico e o limonóide guianina mostraram atividade antibacteriana na faixa de 1,5 mg/mL.

A CIM de rutaecarpina pode ser explicada devido aos elétrons π que estão delocalizados nos dois anéis aromáticos. Esta delocalização é reduzida em N-metil-4-metoxi-2-quinolona e ácido 3-fenil-[2',6'-dimetoxi-(3'-4'O:5'',6'')2'',2''-dimetilpirano]propiónico, e ausente na guianina, indicando que a conjugação apresenta um importante efeito na atividade frente à *X. fastidiosa*, visto que as CIMs foram aumentando de 1,0 mg/mL para a rutaecarpina, 1,4 mg/mL para ácido 3-fenil-[2',6'-dimetoxi-(3'-4'O:5'',6'')2'',2''-dimetilpirano]propiónico e 1,5 mg/mL para N-metil-4-metoxi-2-quinolona e guianina.

Para os compostos sintéticos, nota-se que o composto 2-metil-6-fluor-4-quinolona é o mais efetivo frente à bactéria, inibindo seu crescimento na concentração de 0,5 mg/mL. Ainda não claramente esclarecido na literatura o efeito que o flúor provoca frente à determinados microrganismos como por exemplo bactérias, mas observa-se nestes ensaios que quando o mesmo encontra-se ligado ao anel aromático, confere a mesma maior potencial antibacteriano, quando comparada às demais que possuem outros substituintes no anel.

Uma outra característica importante em uma molécula é o fato de grupos como hidroxila ou metoxila ligados ao anel aromático favorecerem um sistema conjugado estendido, conduzindo a melhores atividades biológicas. Desta forma observa-se para as substâncias sintéticas, que 2-metil-5-metoxi-7-hidroxi-4-quinolona possuindo ambos os grupos citados acima apresenta uma CIM de 1,0 mg/mL enquanto que 2-metil-5,7-dimetoxi-4-quinolona que possui dois grupos metoxílicos e 2-carbometoxi-6-metoxi-4-quinolona que possui apenas um grupo metoxílico apresentam atividade na concentração de 1,5 mg/mL. Entretanto, o papel do sistema conjugado estendido ainda não é claro e características

estruturais necessárias para a atividade frente à *X. fastidiosa* permanecem pouco conhecidas.

De forma geral, os resultados dos ensaios biológicos indicaram que a maioria dos compostos testados *in vitro* frente a linhagem de *X. fastidiosa* 9a5c foram ativos na faixa de concentração de 1,0 a 1,5mg/mL, enquanto que os antibióticos ampicilina (10 µg/mL), kanamicina (2 µg/mL), neomicina (5 µg/mL), penicilina (50 µg/mL), streptomina (10 µg/mL) e tetraciclina (1 µg/mL) foram ativos em concentrações abaixo de 50 µg/mL⁻¹ quando plaqueados utilizando métodos tais como difusão em disco de agar e CIM (linhagem 9a5c, isolada de laranja doce, LACAVA *et al.*, 2001).

Assim, se for assumido que a CIM requerida para continuar as investigações pode ser ≤ 1.50 mg/mL, as CIMs de alguns compostos são significativas. Futuramente então, pretende-se dar seqüência à estes ensaios com os mesmos compostos e outros similares, porém com a bactéria também na fase exponencial e não apenas na fase estacionária, pois acredita-se que a fase exponencial pode ser útil na estimativa de CIMs e com a vantagem da redução do tempo necessário para o crescimento bacteriano.

Sabe-se que na fase estacionária a bactéria encontra-se em sua maior densidade celular. Assim sendo, para inibir o crescimento de *X. fastidiosa* nesta fase seria necessário a aplicação de doses contínuas de substância teste e não apenas uma única dose como foi executado até o momento; assim, futuramente pretende-se empregar esta metodologia com o objetivo de inibir seu crescimento mesmo quando a mesma encontra-se muito resistente.

Portanto, claramente observa-se que este estudo necessita de maiores investigações para se obter modelos moleculares que possam ser considerados como efetivos agentes antibacterianos.

4.2- ENSAIOS BACTERICIDAS FRENTE À PATÓGENOS BUCAIS

Os ensaios biológicos foram realizados na Universidade de Franca (UNIFRAN), sob a colaboração do professor Dr. Carlos Henrique Gomes Martins. Os valores de CIM dos extratos brutos e suas frações foram determinados aplicando a técnica de microdiluição em caldo em microplacas de 96 poços. As seguintes cepas padrões da ATCC (American Type Culture Collection) foram utilizadas: *Enterococcus faecalis* (ATCC 4082), *Streptococcus salivarius* (ATCC 25975), *S. sobrinus* (ATCC 33478), *S. mutans* (ATCC 25175), *S. mitis* (ATCC 49456), *S. sanguinis* (ATCC 10556) and *Lactobacillus casei* (ATCC 11578). A CIM foi determinada como a menor concentração capaz de inibir o crescimento visível do microrganismo ensaiado, após 24 horas de incubação.

4.2.1- Procedimento Experimental

4.2.1.1- Substâncias Ensaídas Frente à Patógenos Bucais

Os ensaios frente à patógenos bucais foram realizados utilizando-se dois extratos de *H. oreadica*, os extratos hexânico e diclorometano do tronco subterrâneo e as substâncias isoladas dos mesmos, sendo quatro derivados do ácido diidrocinâmico (DAD 01 a DAD 04), quatro limonóides sendo, hortiolida C, hortiolida D, hortiolida E (14) e guianina (13) e dois alcalóides, rutaecarpina (09) e dictamina (11)(FIGURA 4.5, pgs 161 a 162). Também foram ensaiadas quatro substâncias quinolinônicas sintéticas sendo, 2-metil-6-fluor-4-quinolona (S2), 2-metil-5,7-dimetoxi-4-quinolona (S4), 2-metil-4-quinolona (S5) e 2-metil-7-hidroxi-4-quinolona (S6) (FIGURA 4.6, pg 162).

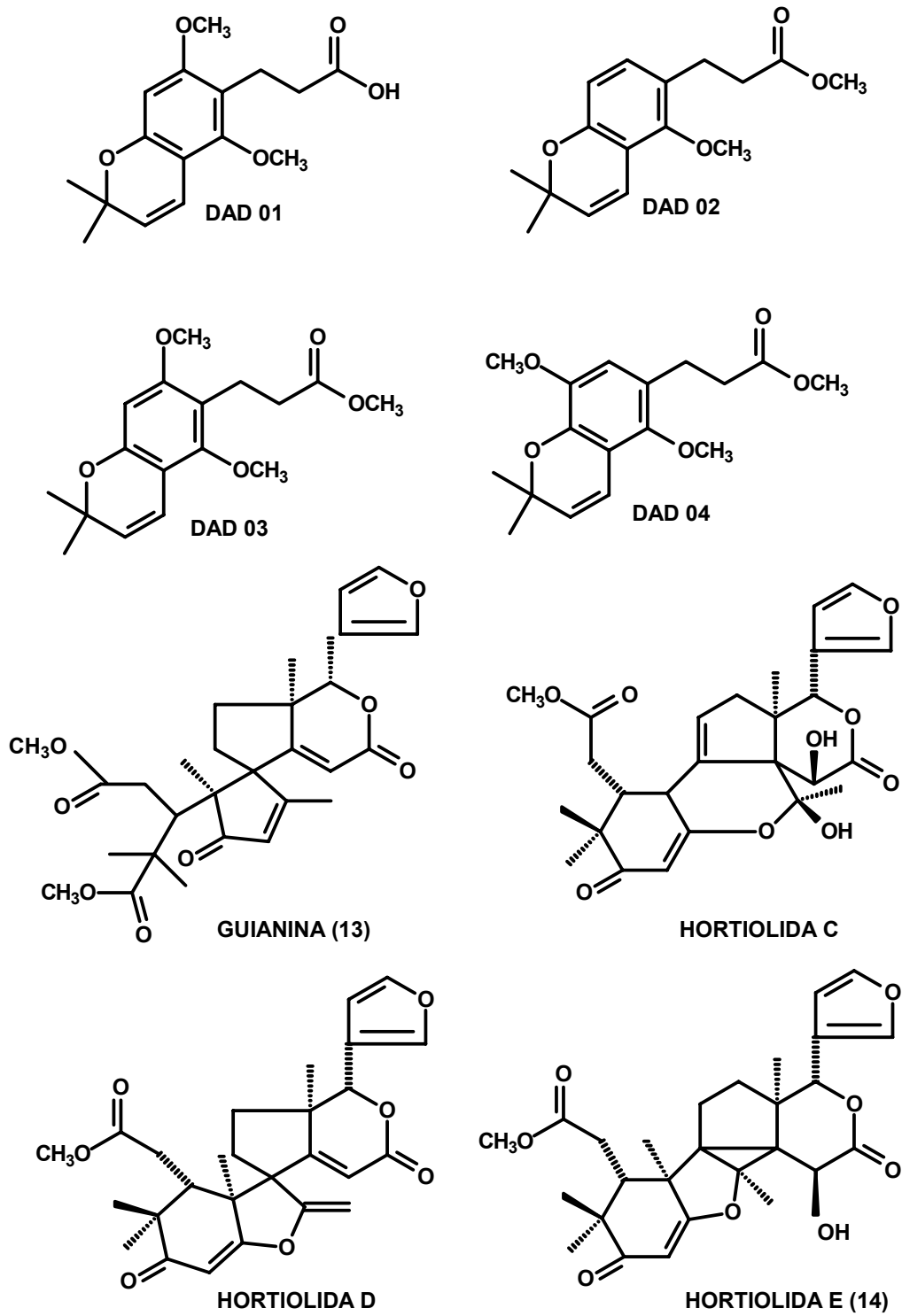


FIGURA 4.5: Estruturas das substâncias naturais ensaiadas

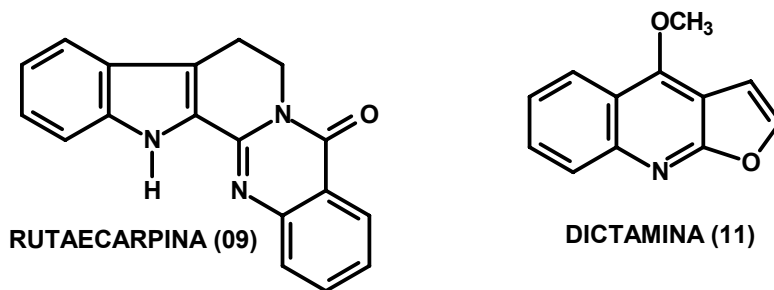


FIGURA 4.5: Estruturas das substâncias naturais ensaiadas (continuação)

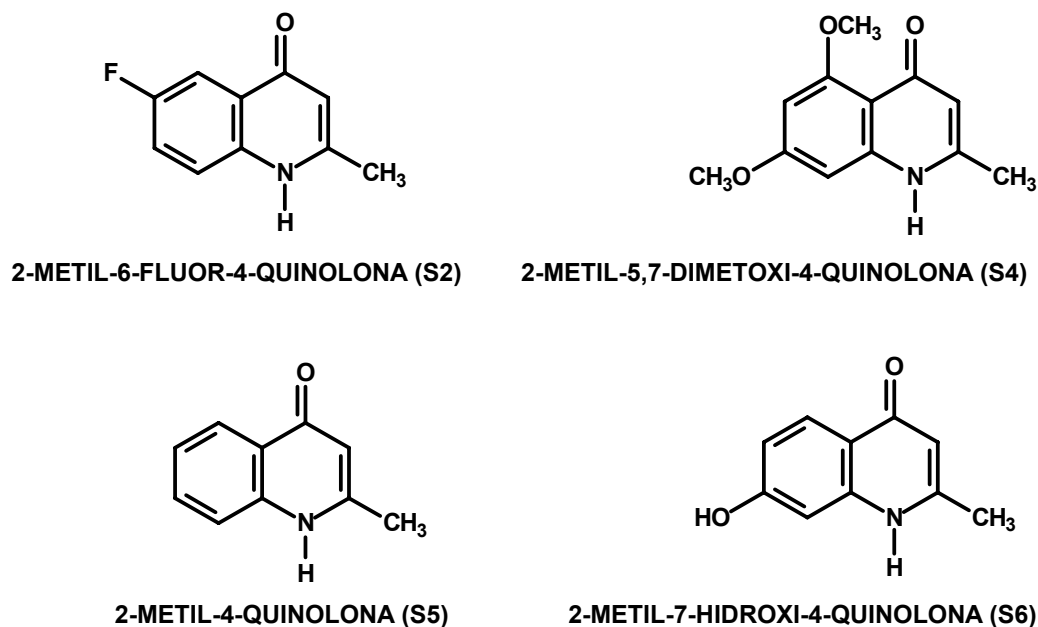


FIGURA 4.6: Estruturas das substâncias sintéticas ensaiadas

4.2.1.2- Metodologia dos Ensaio frente à Patógenos Bucais

Os procedimentos para determinar a concentração inibitória podem ser realizados tanto pelas técnicas de diluição em caldo quanto em ágar. Os agentes antimicrobianos são geralmente testados em diluições consecutivas, e a menor concentração capaz de inibir o crescimento de um organismo é considerada como a CIM. Segundo ANDREWS (2001), as CIMs são consideradas excelentes ferramentas para determinar a susceptibilidade dos microrganismos aos antimicrobianos e portanto usadas para julgar a performance de todos os outros métodos de susceptibilidade. Neste experimento utilizou-se a técnica de

microdiluição em caldo proposta pelo NCCLS (2003) e chamada assim devido ao uso de pequenos volumes de meio líquido colocados em microplacas com fundo em “U” esterilizadas com 96 orifícios (TPP®, EUA), próprias para microdiluição.

Inicialmente foi preparada soluções estoque com os extratos brutos e substâncias, solubilizando 1 mg de cada amostra em 125 µL de DMSO. Posteriormente, cada solução estoque foi diluída em 1875 µL de meio líquido (meio tryptone soya) originando assim a solução mãe e posteriormente pôde-se obter concentrações na faixa de 20 a 400 µg/mL nas microplacas.

A proporção de DMSO aplicada no experimento para solubilizar as amostras foi de 5% (v/v) e esta proporção foi utilizada nos orifícios das microplacas como controle negativo, para confirmar se o solvente não estava inibindo o crescimento dos microrganismos.

A clorexidina, antibiótico comercial, foi utilizado como controle positivo para verificar a viabilidade dos microrganismos, e seu preparo foi feito da seguinte forma: pegou-se 10 mL de água autoclavada e 1 mg da clorexidina para obter uma concentração de 0,1 mg/mL. Posteriormente pipetou-se 1 mL desta solução em 4 mL de meio de cultura (meio líquido) para uma concentração final de 0,02 mg/mL. Diluições em série nas microplacas foram realizadas em meio líquido para obter concentrações na faixa de 0,0115 µg/mL a 5,9 µg/mL, perfazendo 100µL de volume final.

A densidade do inóculo influencia no resultado dos experimentos, e portanto padronizou-se a solução de inóculo a ser utilizada, a fim de assegurar a reprodutibilidade dos ensaios. Inicialmente preparou-se a escala de 0,5 de Mc Farland segundo BIER (1981). Para isso, adicionou-se 0,5 mL de cloreto de bário a 1% em 99,5 mL de ácido sulfúrico a 1%. Em seguida transferiu-se 2 mL dessa suspensão para uma cubeta espectrofotométrica. Para calibrar a transmitância a 100% em um espectrofotômetro a um comprimento de onda de 530 nm, utilizou-se água destilada. Em seguida colocou-se a suspensão de 0,5 de Mc Farland ($1,5 \times 10^8$ CFU/mL), obtendo a transmitância de 88%. Todas as suspensões bacterianas foram ajustadas na mesma transmitância.

Posteriormente, cada orifício da microplaca recebeu um determinado volume de inóculo, meio de cultura líquido e as soluções das amostras em concentrações finais que variaram de 20 a 400 µg/mL, sendo o volume final de 100 µL. Um orifício foi utilizado como controle do crescimento dos microrganismos

no meio e outro orifício apenas com o meio líquido, livre de agentes antimicrobianos, foi usado para assegurar a esterilidade do meio. Logo após a micropipetagem, as microplacas foram tampadas e incubadas a 35°C por 24 horas, sem agitação. Terminado o período de incubação, foram adicionados em cada orifício das microplacas, 30 µL de resazurina a 0,02% em solução aquosa esterilizada e após alguns minutos a leitura foi realizada. A resazurina facilita verificar a presença de crescimento microbiano, a coloração azul indica ausência de crescimento microbiano, enquanto a cor vermelha indica a presença de células viáveis em crescimento. Dessa maneira foi possível determinar a menor concentração de cada amostra capaz de inibir o crescimento dos microrganismos indicadores diluídos.

Um resumo da metodologia empregada no ensaio biológico está representado na FIGURA 4.7 (pg 164).



FIGURA 4.7: Metodologia do ensaio biológico

4.2.2 Resultados e Discussão

O solvente DMSO, utilizado como controle negativo na técnica de microdiluição em caldo, não apresentou atividade antimicrobiana frente a todos os microrganismos testados. A clorexidina, utilizada como controle positivo, foi capaz de inibir o crescimento de todas as bactérias em baixas concentrações, demonstrando a efetividade da técnica.

Os valores de CIM foram determinados em triplicata pela leitura visual após revelação com resazurina, a qual é um indicador de oxido-redução que tem sido utilizado para avaliar a viabilidade de células microbianas (MONTEJANO *et al.*, 2005). A resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido) de cor azul é reduzida na presença de células viáveis a resofurina, substância de coloração vermelha (PALOMINO *et al.*, 2002).

4.2.2.1- Extratos de *H. oreadica*

Os resultados da CIM do extrato hexânico (EHTSHB), do extrato diclorometano (EDTSHB) de *H. oreadica* e do controle positivo são apresentados na TABELA 4.6 (pg 165).

TABELA 4.6: CIM dos extratos ensaiados ($\mu\text{g/mL}$)

Microrganismos	EHTSHB	EDTSHB	clorexidina
<i>S. mitis</i>	300	>400	0,3688
<i>S. mutans</i>	300	>400	0,0922
<i>S. sobrinus</i>	300	>400	0,0922
<i>S. sanguinis</i>	200	>400	0,3688
<i>S. salivarius</i>	200	300	0,0922
<i>Lactobacillus casei</i>	400	>400	0,0922
<i>Enterococcus faecalis</i>	> 400	> 400	0,3688

Nas concentrações de 200 a 300 µg/mL, o extrato hexânico apresentou atividade frente a maioria dos patógenos bucais testados, exceto para *E. faecalis* e *L. casei*. Os microrganismos mais sensíveis ao extrato foram *S. salivarius* e *S. sanguinis* (concentração do extrato= 200 µg/mL).

O extrato diclorometano apresentou atividade em concentrações maiores que o extrato hexânico, como evidenciado pelos valores de CIM. Para alguns microrganismos este extrato não exibiu atividade interessante, com valores de CIM maiores que 400 µg/mL.

O fato do extrato hexânico ter sido mais ativo frente aos microrganismos, pode ser explicado pela presença de compostos lipofílicos, principalmente ácidos graxos, que são os constituintes majoritários deste extrato. Lipofilicidade está intimamente ligada a permeação através da camada lipídica das bactérias (TOKUYAMA *et al.* 2001). Entretanto, o efeito destes constituintes são potencializados por efeitos de sinergismo e aditivo de outros constituintes químicos minoritários presentes também no extrato.

4.2.2.2- Substâncias isoladas de *H. oreádica*

O efeito das substâncias químicas isoladas de *H. oreádica* no crescimento dos patógenos bucais estão mostradas na TABELA 4.7, 4.8 e 4.9 (pgs 166 a 167).

TABELA 4.7: CIM dos derivados do ácido diidrocinâmico (µg/mL)

Microrganismos	DAD 01	DAD 02	DAD 03	DAD 04	clorexidina
<i>S. salivarius</i>	300	300	400	400	0,0922
<i>S. sanguinis</i>	> 400	> 400	> 400	> 400	0,3688
<i>S. mitis</i>	> 400	> 400	> 400	> 400	0,3688
<i>S. mutans</i>	> 400	> 400	> 400	> 400	0,0922
<i>S. sobrinus</i>	> 400	> 400	> 400	> 400	0,0922
<i>L. casei</i>	> 400	> 400	> 400	> 400	0,0922
<i>E. faecalis</i>	> 400	> 400	> 400	> 400	0,3688

TABELA 4.8: CIM dos limonóides ($\mu\text{g/mL}$)

Microrganismos	guianina (13)	hortiolida C	hortiolida D	hortiolida E (14)	clorexidina
<i>S. salivarius</i>	> 400	400	400	> 400	0,0922
<i>S. sanguinis</i>	> 400	> 400	400	400	0,3688
<i>S. mitis</i>	300	> 400	> 400	> 400	0,3688
<i>S. mutans</i>	400	> 400	> 400	> 400	0,0922
<i>S. sobrinus</i>	300	> 400	> 400	> 400	0,0922
<i>L. casei</i>	200	> 400	> 400	> 400	0,0922
<i>E. faecalis</i>	> 400	> 400	> 400	> 400	0,3688

TABELA 4.9: CIM dos alcalóides ($\mu\text{g/mL}$)

Microrganismos	rutaecarpina (09)	dictamina (11)	clorexidina
<i>S. salivarius</i>	> 400	> 400	0,0922
<i>S. sanguinis</i>	400	400	0,3688
<i>S. mitis</i>	> 400	> 400	0,3688
<i>S. mutans</i>	> 400	400	0,0922
<i>S. sobrinus</i>	> 400	> 400	0,0922
<i>L. casei</i>	> 400	100	0,0922
<i>E. faecalis</i>	> 400	> 400	0,3688

Os valores similares de CIM atribuídos aos derivados do ácido diidrocinâmico são possivelmente explicados pela semelhança das estruturas químicas, que apresentam diferenças apenas na posição da metoxila e na função ácido ou éster da cadeia lateral, mantendo seu esqueleto básico intacto. Em relação ao limonóides avaliados, guianina (13) apresentou o mais alto nível de inibição quando comparado aos demais limonóides. A presença de duas funções éster na molécula pode ter contribuído para a atividade inibitória deste limonóide. Os alcalóides rutaecarpina (09) e dictamina (11), embora com estruturas químicas muito diferentes, apresentaram valores de CIM semelhantes, exceto para o patógeno *L. casei*, em que dictamina mostrou maior atividade inibitória.

4.2.2.3- Substâncias Quinolinônicas Sintéticas

Os valores de CIM para as substâncias quinolinônicas sintéticas são mostrados na TABELA 4.10 (pg 168).

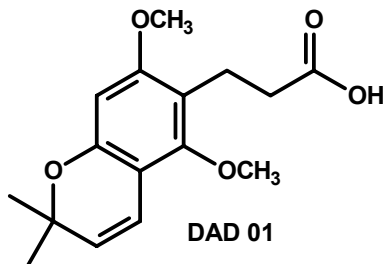
TABELA 4.10: CIM das substâncias quinolinônicas sintéticas ($\mu\text{g/mL}$)

Microrganismos	S2	S4	S5	S6	clorexidina
<i>S. salivarius</i>	400	> 400	> 400	> 400	0,0922
<i>S. sanguinis</i>	> 400	400	400	400	0,3688
<i>S. mitis</i>	> 400	> 400	> 400	> 400	0,3688
<i>S. mutans</i>	> 400	> 400	> 400	> 400	0,0922
<i>S. sobrinus</i>	> 400	> 400	> 400	> 400	0,0922
<i>L. casei</i>	> 400	400	> 400	> 400	0,0922
<i>E. faecalis</i>	> 400	> 400	> 400	> 400	0,3688

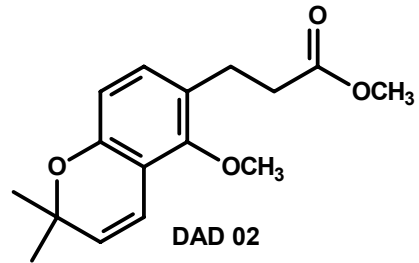
Ao se analisar as estruturas sintéticas, percebe-se que a substância 2-metil-4-quinolona (S5) é a molécula padrão na qual foram realizadas reações para introduzir substituintes diferentes. Ao se ensaiar estas substâncias, o objetivo foi averiguar a atividade antibacteriana das mesmas e verificar se os substituintes presentes aumentaria ou diminuiria a atividade. Entretanto, a análise dos resultados obtidos, apresentados na tabela acima, mostra que as substâncias em questão apresentaram atividades antibacteriana similares frente a todos os microrganismos testados, com a maioria dos valores de CIM sendo superior a 400 $\mu\text{g/mL}$. Porém, comparando as estruturas e resultados, percebe-se que a substância 2-metil-5,7-dimetoxi-4-quinolona (S4) foi a mais efetiva dentre todas, inibindo o crescimento de dois microrganismos, *S. sanguinis* e *L. casei*. Este resultado sugere que a presença de dois grupos polares no anel aromático é benéfico para a atividade antimicrobiana.

A partir destes resultados pode-se determinar a CIM de algumas substâncias frente à determinados patógenos (FIGURA 4.8 , pgs 169 a 171), sendo que para outros patógenos certas substâncias apresentaram potencial de inibição acima de 400 $\mu\text{g/mL}$, não sendo interessante então ensaios adicionais em uma faixa de concentração maior, como por exemplo de 400 a 800 $\mu\text{g/mL}$, para a

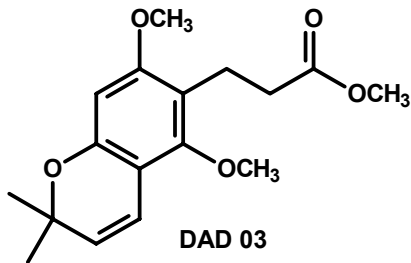
determinação exata da CIM, pois o que se busca numa substância é eficácia em inibir um microrganismo à concentrações cada vez menores.



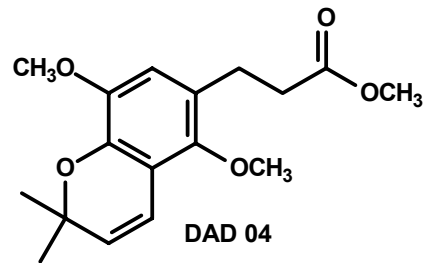
***S. salivarius* → CIM: 300 µg/mL**



***S. salivarius* → CIM: 300 µg/mL**

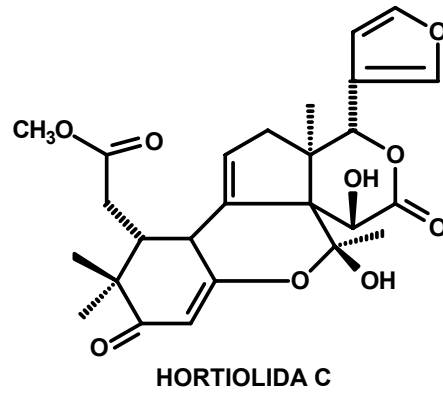
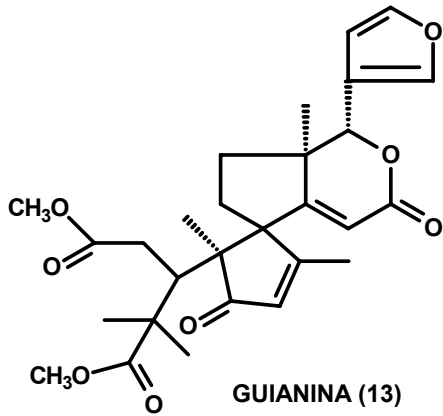


***S. salivarius* → CIM: 400 µg/mL**



***S. salivarius* → CIM: 400 µg/mL**

FIGURA 4.8: CIM das substâncias ensaiadas frente à patógenos bucais



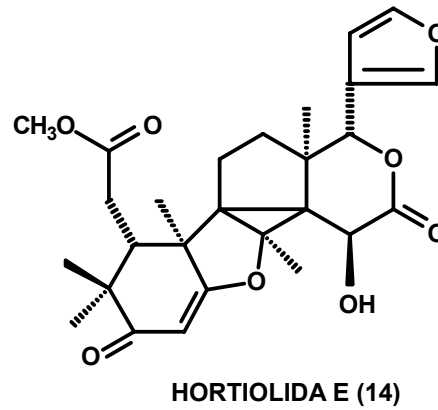
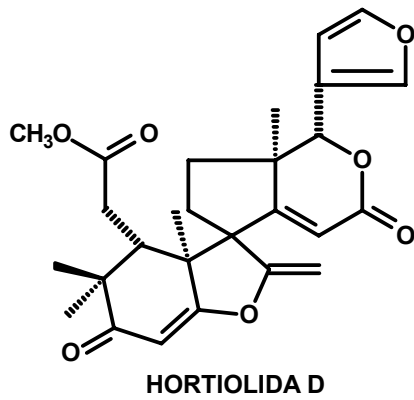
S. mitis → CIM: 300 µg/mL

S. mutans → CIM: 400 µg/mL

S. sobrinus → CIM: 300 µg/mL

L. casei → CIM: 200 µg/mL

S. salivarius → CIM: 400 µg/mL

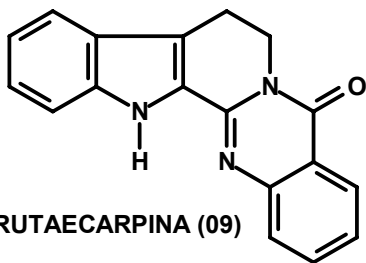


S. salivarius → CIM: 400 µg/mL

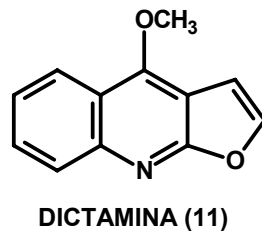
S. sanguinis → CIM: 400 µg/mL

S. sanguinis → CIM: 400 µg/mL

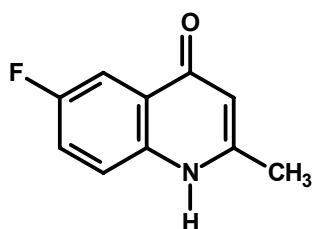
FIGURA 4.8: CIM das substâncias ensaiadas frente à patógenos bucais
(continuação)



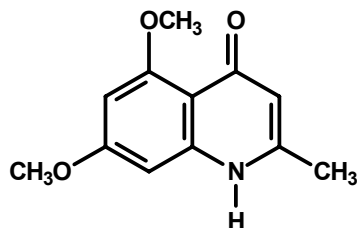
S. sanguinis → CIM: 400 µg/mL



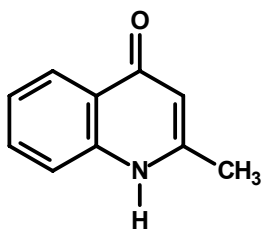
S. mutans → CIM: 400 µg/mL
S. sanguinis → CIM: 400 µg/mL
L. casei → CIM: 100 µg/mL



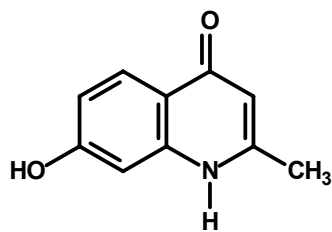
S. salivarius → CIM: 400 µg/mL



S. sanguinis → CIM: 400 µg/mL
L. casei → CIM: 400 µg/mL



S. sanguinis → CIM: 400 µg/mL



S. sanguinis → CIM: 400 µg/mL

FIGURA 4.8: CIM das substâncias ensaiadas frente à patógenos bucais
 (continuação)

4.3- ENSAIOS BACTERICIDAS FRENTE À PATÓGENOS DE ORIGEM ALIMENTAR

Os ensaios biológicos foram realizados na Universidade de Franca (UNIFRAN), com a colaboração do professor Dr. Carlos Henrique Gomes Martins. As seguintes cepas padrões da ATCC (American Type Culture Collection) foram utilizadas: *Vibrio cholerae* (ATCC 9458), *Salmonella choleraesuis* (ATCC 10708) e *Bacillus cereus* (ATCC 14579).

4.3.1- Procedimento Experimental

4.3.1.1- Substâncias Ensaçadas Frente à Patógenos de Origem Alimentar

Os ensaios frente à patógenos de origem alimentar foram realizados utilizando-se uma substância isolada de *H. oreadica*, o limonóide guianina; um policetídeo isolado de um fungo patogênico, a lasiodiplodina, e quatro substâncias quinolinônicas sintéticas, sendo 2-metil-6-fluor-4-quinolona (S2), 2-metil-5,7-dimetoxi-4-quinolona (S4), 2-metil-4-quinolona (S5) e 2-metil-7-hidroxi-4-quinolona (S6) (FIGURA 4.9, pgs 172 a 173).

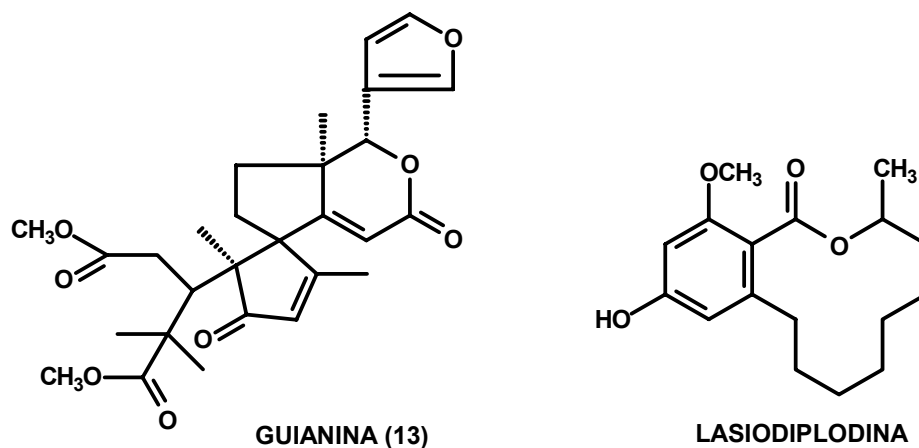


FIGURA 4.9: Estruturas das substâncias ensaiadas frente à patógenos de origem alimentar

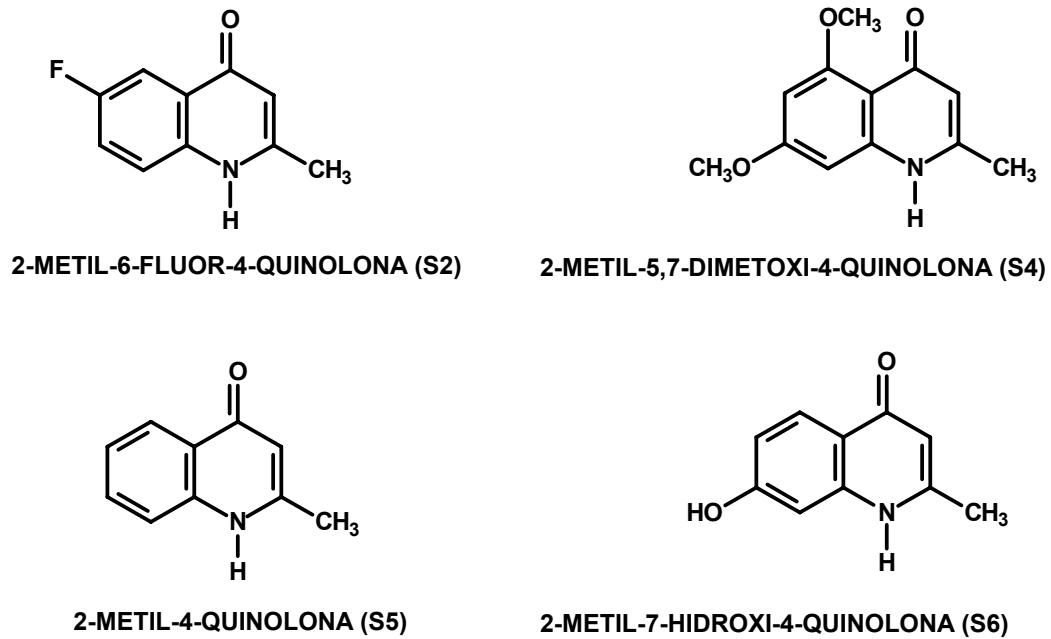


FIGURA 4.9: Estruturas das substâncias ensaiadas frente à patógenos de origem alimentar (continuação)

4.3.1.2 Metodologia dos Ensaio frente à Patógenos de Origem Alimentar

O procedimento para determinar a CIM dos patógenos de origem alimentar foi o mesmo utilizado para patógenos bucais, ou seja, utilizou-se a técnica de diluição em caldo em microplacas de 96 poços. Entretanto, ao invés de utilizar a clorexidina como controle positivo, utilizou-se a gentamicina para *Vibrio cholerae* e *Salmonella choleraesuis* e a vancomicina para *Bacillus cereus*, utilizando um procedimento experimental semelhante ao da clorexidina para prepará-las.

4.3.2- Resultados e Discussão

Assim como para os patógenos bucais, o solvente DMSO utilizado como controle negativo não apresentou atividade antimicrobiana frente aos microrganismos testados.

Em relação aos controles positivos, a gentamicina inibiu o crescimento das bactérias em baixas concentrações, sendo 0,3688 $\mu\text{g/mL}$ para *V. cholerae* e 1,475 $\mu\text{g/mL}$ para *S. choleraesuis* e a vancomicina inibiu o crescimento de *Bacillus cereus* na concentração de 0,0922 $\mu\text{g/mL}$, demonstrando a efetividade da técnica.

Os valores de CIM foram determinados em triplicata pela leitura visual, após revelação com 30 μL de solução de resazurina. A FIGURA 4.10 (pg 174) ilustra uma microplaca contendo duas das substâncias ensaiadas e o patógeno *B. cereus*. A coloração rosa indica que não houve inibição da bactéria e a coloração azul indica inibição do crescimento de bactéria.

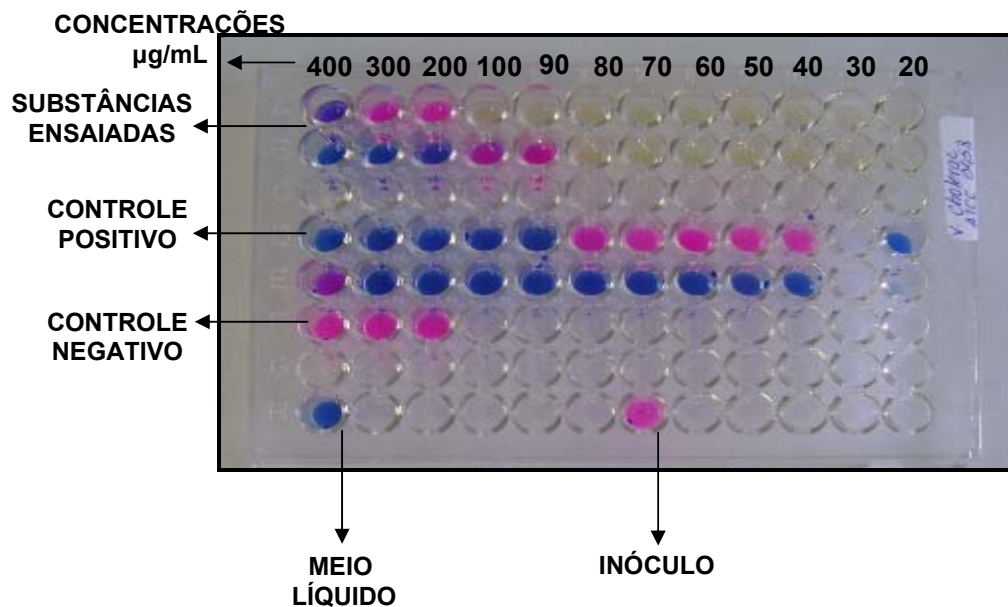


FIGURA 4.10: Microplaca após revelação com resazurina

Os resultados da CIM das substâncias ensaiadas e dos controles positivos são apresentados nas TABELAS 4.11, 4.12 e 4.13 (pg 175).

TABELA 4.11: CIM das substâncias ensaiadas frente à *V. cholerae* (µg/mL)

Substâncias	<i>V. cholerae</i> (gentamicina 0,3688)
guianina (13)	> 400
lasiodiplodina	200
S2	300
S4	> 400
S5	> 400
S6	> 400

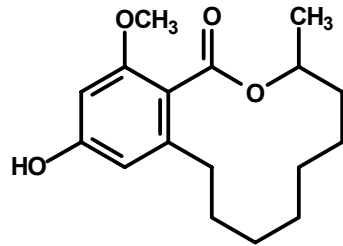
Tabela 4.12: CIM das substâncias ensaiadas frente à *S. choleraesuis* (µg/mL)

Substâncias	<i>S. choleraesuis</i> (gentamicina 1,475)
guianina (13)	> 400
lasiodiplodina	400
S2	400
S4	300
S5	> 400
S6	> 400

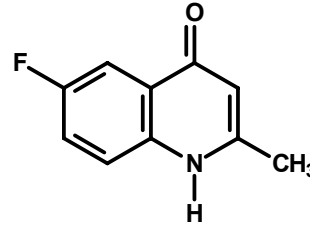
TABELA 4.13: CIM das substâncias ensaiadas frente à *B. cereus* (µg/mL)

Substâncias	<i>B. cereus</i> (vancomicina 0,0922)
guianina (13)	> 400
lasiodiplodina	400
S2	> 400
S4	> 400
S5	> 400
S6	400

Portanto, com este experimento determinou-se a CIM de determinadas substâncias (FIGURA 4.11, pg 176).



LASIODIPLODINA



2-METIL-6-FLUOR-4-QUINOLONA (S2)

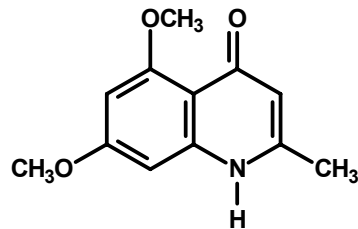
V. cholerae → CIM: 200 µg/mL

V. cholerae → CIM: 300 µg/mL

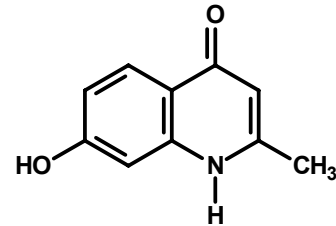
S. choleraesuis → CIM: 400 µg/mL

S. choleraesuis → CIM: 400 µg/mL

B. cereus → CIM: 400 µg/mL



2-METIL-5,7-DIMETOXI-4-QUINOLONA (S4)



2-METIL-7-HIDROXI-4-QUINOLONA (S6)

S. choleraesuis → CIM: 300 µg/mL

B. cereus → CIM: 400 µg/mL

FIGURA 4.11: CIM da lasiodiplodina, 2-metil-6-fluor-4-quinolona (S2), 2-metil-5,7-dimetoxi-4-quinolona (S4) e 2-metil-7-hidroxi-4-quinolona (S6) frente à patógenos de origem alimentar

De acordo com os valores de CIM, nota-se que a lasiodiplodina foi a substância mais eficaz dentre todas as ensaiadas frente aos patógenos de origem alimentar, sendo que a melhor CIM obtida foi para *V. cholerae* (200 µg/mL). Possivelmente, uma justificativa que confere a esta substância maior atividade que as demais, é o fato de ela ser um metabólito isolado de fungo. Estudos relatam que fungos produzem substâncias potencialmente capazes de inibir o crescimento de outros microrganismos.

Em contraste com o que ocorre para os patógenos bucais, o limonóide guianina (13) isolado de *H. oreadica*, não apresentou resultados interessantes frente às bactérias ensaiadas, sendo que os valores de CIM foram maiores que 400 µg/mL.

Para as substâncias quinolinônicas sintéticas, o melhor valor de CIM foi atribuído às substâncias 2-metil-6-fluor-4-quinolona (S2) e 2-metil-5,7-dimetoxi-4-quinolona (S4) (CIM= 300 µg/mL). A substância 2-metil-5,7-dimetoxi-4-quinolona (S4) destacou-se também para os patógenos bucais *S. sanguinis* e *L. casei* (CIM= 400 µg/mL), como apresentado anteriormente. Estes resultados reforçam o fato que a presença de grupos polares no anel aromático, como metoxilas, possivelmente contribui para a atividade antimicrobiana.

Verificou-se que para algumas substâncias a concentração de inibição é superior a 400 µg/mL, não sendo interessante portanto realizar ensaios adicionais com uma faixa de concentração mais ampla como por exemplo de 400 a 800 µg/mL para determinar a CIM exata, pois o que se busca neste ensaio é encontrar substâncias com CIM cada vez menores, ou seja, compostos com potenciais elevados de inibição frente à patógenos de origem alimentar.

As substâncias que proporcionaram a determinação da CIM com valores entre 100 e 300 µg/mL em ensaios com patógenos bucais ou de origem alimentar, serão selecionadas para dar continuidade aos estudos realizando modificações estruturais nas mesmas ou então buscando novos modelos moleculares similares aos já ensaios, visando a descoberta de compostos com alto potencial antibacteriano frente à estes microrganismos.

5. CONCLUSÃO

O estudo fitoquímico das espécies de *H. oreadica*, *H. brasiliana* e *H. superba* proporcionou o isolamento e identificação de 15 metabólitos secundários sendo seis derivados do ácido diidrocinâmico {ácido 3-fenil-[2',6'-dimetoxi-(3',4'-O:5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano]propiónico **01**, 3-fenil-[2'-metoxi-(3',4'-O:5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano]propionato de metila **02**, 3-fenil-[2',6'-dimetoxi-(3',4'-O:5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano]propionato de metila **03**, 3-fenil-[2',5'-dimetoxi-(3',4'-O:5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano]propionato de metila **04**, a mistura de **01** e o ácido 3-fenil-[2'-metoxi-(3',4'-O:5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano]propiónico **05**, ácido 3-fenil-[2',5'-dimetoxi-(3',4'-O:5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano]propiónico **06**}; a mistura de **03** e a cumarina 5-metoxiseselina **07**; um derivado do ácido cinâmico [ácido 3,4-dimetoxi- α (3-hidroxi-4-carbometoxifenil)cinâmico **08**]; quatro alcalóides, sendo dois do tipo β -indoloquinazolínicos (rutaecarpina **09** e 7,8-desidrorutaecarpina **10**), um quinolínico (dictamina **11**) e um 2-quinolônico (N-metilflindersina **12**) e três limonóides (guianina **13**, hortiolida E **14** e hortiolida G **15**). Segundo o estudo fitoquímico realizado, os derivados do ácido diidrocinâmico estão presentes preferencialmente nas espécies *H. oreadica* e *H. brasiliana*, enquanto que o alcalóide do tipo β -indoloquinazolínico rutaecarpina está presente em todas as espécies estudadas. A guianina, primeiro limonóide descrito em literatura para o gênero *Hortia*, foi isolado apenas dos extratos de *H. oreadica*; já o limonóide hortiolida E foi encontrado tanto em *H. superba* como em *H. oreadica*, sendo inédito para esta última espécie. Como mencionado no capítulo 3, ainda não é possível propor a classificação correta do gênero *Hortia* dentro da família Rutaceae, pois faz-se necessário o estudo de todos os extratos do gênero para então concluir melhor sobre o seu exato posicionamento quimiosistemático.

Os ensaios biológicos frente à bactéria *X. fastidiosa*, agente causal da CVC, possibilitou a determinação da CIM de algumas classes de substâncias naturais bem como de uma série sintética, as quais ainda não haviam sido ensaiadas. As substâncias com maior potencial inibitório foram as quinolinônicas sintéticas 2-metil-6-fluor-4-quinolona (S2) e 2-metil-5-metoxi-7-hidroxi-4-quinolona (S4) e o alcalóide rutaecarpina, com CIMs entre 0,5 e 1,0 mg/mL. Desta forma, este trabalho indicou novas perspectivas para o controle da CVC até então não utilizadas, como a inibição direta e ecologicamente correta do microrganismo causal da doença a partir de produtos naturais e derivados dos mesmos.

A investigação do potencial antimicrobiano de extratos e substâncias isoladas de *Hortia* bem como substâncias sintéticas permitiu a determinação da CIM frente a alguns patógenos bucais. Dentre os extratos testados, o extrato hexânico foi o mais promissor frente às cepas ensaiadas. Todas as substâncias naturais ensaiadas apresentaram atividade inibitória frente a pelo menos um microrganismo. Os melhores valores de CIM foram obtidos para o limonóide guianina e o alcalóide dictamina, sendo 200 e 100 µg/mL respectivamente, frente ao patógeno *L. casei*. O patógeno *E. faecalis* foi o que apresentou maior resistência, não sendo inibido na faixa de concentração ensaiada por nenhuma substância. Entre as substâncias sintéticas, a 2-metil-5,7-dimetoxi-4-quinolona (S4) foi a mais efetiva, inibindo o crescimento dos microrganismos *S. sanguinis* e *L. casei* em 400 µg/mL.

Os ensaios frente à patógenos de origem alimentar revelaram que as substâncias lasiodiplodina, 2-metil-6-fluor-4-quinolona (S2) e 2-metil-5,7-dimetoxi-4-quinolona (S4) foram as mais eficazes dentre todas as ensaiadas. Já o limonóide guianina não apresentou resultados interessantes frente às bactérias ensaiadas, sendo que os valores de concentração inibitória foram maiores que 400 µg/mL.

Como conclusão geral dos ensaios realizados com patógenos e fitopatógeno, observa-se que bactérias resistentes a antibióticos continuam emergindo rapidamente, constituindo um problema de elevada significância no Brasil. Assim, plantas nativas, produtos naturais e substâncias sintéticas com propriedades antibacterianas constituem uma importante e valiosa fonte na descoberta de novos produtos com potencial antimicrobiano.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELNUR, P.V. *Estudo Fitoquímico de Citrus: Resistência a Xylella fastidiosa e Interação com Oncometopia facialis*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2006. Dissertação de Mestrado, 275p.

AGRIOS, G.N. *Plant Pathology*, 4^a ed. San Diego:Academic Press, 1997, 635 p.

ANDREWS, J.M. “Determination of minimum inhibitory concentrations”. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **48**: 5–16, 2001.

ALVES, E. *Xylella fastidiosa - adesão e colonização em vasos do xilema de laranja doce, cafeeiro, ameixeira, fumo e espécies de cigarrinhas vetoras e formação de biofilme sobre película de poliestireno*. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – USP, 2003. Tese de doutorado, 122p.

ANTONACCIO, L. D. & TOLMASQUIM, E. “O alcalóide de *Hortia arborea* (Rutaceae)”, *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, **28**: 182-188, 1956.

AYRES, A. J. *Intensidade da clorose variegada dos citros em pomares comerciais de laranja do estado de São Paulo e sul do triângulo mineiro*. Jaboticabal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, 2000. Dissertação de mestrado, 59p.

BENTHAM, G.; HOOKER, J. D.; *Genera Plantarum*, Vol. 1, L. Reeve & Co., London, 1862.

BIER, O. *Bacteriologia e imunologia: em suas aplicações à medicina e à higiene*, Ed. Melhoramentos: São Paulo, 1981.

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

BROOUN, A.; LIU, S.; LEWIS, K.; “A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **44**, 640-646, 2000.

CAMPANHARO, J. C.; LEMOS, M. V. F. ; LEMOS, E. G. M. ; “Groth optimization procedures for the phytopathogen *Xylella fastidiosa*”. *Current Microbiology*, **46**, 99-102, 2003.

CHAGAS, C. M; ROSSETI, V.; BERETTA, M. J. “Electron microscopy studies of a xylem-limited bacterium in sweet orange affected with citrus variegated chlorosis disease in Brazil”. *Phytopathology*, **134**, 306-312, 1992.

CHAMPAGNE, D. E.; KOUL, O.; ISMAN, M. B.; SCUDDER, G. G. E.; TOWERS, G. H. N.; “Biological activity of limonoids from the Rutales”, *Phytochemistry*, **31**(2): 377-394, 1992.

CORREA, D. B., GOTTLIEB, O. R. & PADUA, A. P. “Dihydrocinnamic acids from *Hortia badinni*”; *Phytochemistry*, **14**: 2059-2060, 1975.

- CORREA, D. B., GOTTLIEB, O. R. & PADUA, A. P. "Dihydrocinnamyl alcohols from *Hortia badinni*"; *Phytochemistry*, **18**: 351, 1979.
- CORREA, D. B., GOTTLIEB, O. R., PADUA, A. P. & ROCHA, A. I. "Constituents of *Hortia longifolia*"; *Revista Latinoamericana de Química*, **7**:43, 1976.
- COSTA, A.S. "Present status of the tristeza diseases of *Citrus* in South America"; *FAO Plant Protection Bulletin*, **v.4**, 97-105, 1956.
- COSTERTON, J.W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D.E.; KORBER, D.R.; LAPIN-SCOTT, H.M. "Microbial biofilms". *Annu. Rev. Microbiol.*, **49**: 711-745, 1995.
- COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.; *Patologia Estrutural e Funcional*. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.
- CUCA, L. E.; MARTÍNEZ, J. C.; MONACHE, F. D. "Alcaloides presentes en *Hortia colombiana*"; *Revista Colombiana de Química*, **27**(1): 23-30, 1998.
- DA SILVA, M. F. G. F.; GOTTLIEB, O. R. "Evolution of quassinoids and limonoids in the Rutales", *Biochemical Systematics and Ecology*, **15**: 85-103, 1987.
- DA SILVA, M. F. G. F. DA, GOTTLIEB, O. R., EHRENDORFER, F., "Chemosystematics of the Rutaceae: suggestions for a more natural taxonomy and evolutionary interpretation of the family", *Plant. Syst. Evol.* **161**: 97-134, 1988.
- DAVIS, M. J., FRENCH, W. J., SCHAAD. N. W. Axenic culture of the bacteria associated with phony disease of peach and plum leaf scald, *Current Microbiology*, **6** (5), p. 309-314, 1981.
- DE CANDOLLE, A. P. *Aurantiaceae e Rutaceae. Prodomus sistmaticis naturalis regni vegetabilis*, Paris, vol. 1, 1824.
- DENNIS, C. Microbiology of Fruits and Vegetables. In: Norris, J., R. & Prttipher, G., L. (eds), *Essays in Agricultural and Food Microbiology*, New York, 1987.
- DE SOUZA, A.A.; TAKITA, M.A.; COLETTA-FILHO, H.D.; CALDANA, C.; YANAI, G.M.; MUTO, N.H.; COSTA DE OLIVEIRA, R.; NUNES, L.R.; MACHADO, M.A. "Gene expression profile of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* during biofilm formation *in vitro*". *FEMS Microbiol. Lett.*, **237**: 341-353, 2004.
- DEWICK, P.M.; *Medicinal Natural Products: a Biosynthetic Approach*; England, John Wiley & Sons, 2002.
- DOYLE, P. M.; CLIVER, D. O. *Escherichia coli* In: CLIVER, D. O (ed.) 1990, Foodborne Diseases London: Academy Press, p. 209-215.
- ENGLER, A.; Rutaceae. In: Engler, A. Von & Prantl. K. Die. Natürlichen Pflanzfamilien, 1931, 2^a ed. vol. 19a, 187-359;458-459

FERRACIN, R. J. *Estudo fitoquímico de Hortia arborea: Uma contribuição a quimiosistemática de Cusparieae* – Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 1992. Dissertação de mestrado, 135p.

FUNDECITRUS, Descobertos mais seis vetores da CVC. *Revista Fundecitrus*, **94**:8, 1999.

FUNDECITRUS, *Clorose Variegada dos Citros – CVC*. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/doencas/cvc.html>> Acesso em 06/02/2008a.

FUNDECITRUS, *Estatísticas da CVC*. Disponível em: <http://www.fundecitrus.com.br/est_cvc_br.html> Acesso em 06/02/2008b.

FUNDECITRUS, *Manual de CVC – Clorose Variegada dos Citros*. Disponível em: <http://www.fundecitrus.com.br/manuais/fdc_manual_cvc_0406.pdf> Acesso em 06/02/2008c.

FUNDECITRUS, *Manual de viveiros*. Disponível em: <http://www.fundecitrus.com.br/manuais/fundec_manual_viveiros.pdf> Acesso em 06/02/2008d.

FUNDACION ANNA VÁSQUEZ; *Salmonella*. Disponível em: <<http://fundacionannavazquez.wordpress.com/2007/10/page/2/>> Acesso em 10/12/2007.

GELB, M. H., & HOL, W. G. J., “Drugs to combat tropical protozoan parasites”, *Science*, **297**: 343-344, 2002.

GROPPO, M. – *Filogenia de Rutaceae e Revisão de Hortia VAND.* São Paulo, USP, 2004, Tese de Doutorado, 212p.

GERIG, J. T.; REINHEIMER, J. D. “Nuclear Magnetic Resonance studies of the interaction on *trans*-cinnamate with α -chymotrypsin”, *Journal of the American Chemical Society*, **92**(10):3146-3150, 1970.

GILBERT, P. S.; COLLIER, P. J.; BROWN, M. R.; “Influence of growth rate on susceptibility to antimicrobial agents: biofilms, cell cycle, dormancy, and stringent response”, *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, **34**, 1865-1868, 1990.

HENRIQUES, A.T.; KERBER, V.A.; MORENO, P.R.H. “Alcalóides: generalidades e aspectos básicos” IN: *Farmacognosia da Planta ao Medicamento*, Editora UFSC, 3ª edição, cap 29, 2001, 651p.

IKUTA, A.; NAKAMURA, T.; URABE, H. “Indolopyridoquinazoline, furoquinoline and canthinone type alkaloids from *Phellodendron amurense* callus tissues”. *Phytochemistry*, **48**(2):285-291, 1998.

JACKMAN, L. M.; WILEY, R. H. “Studies in Nuclear Magnetic Resonance. Part II.* Application to Geometric Isomerism about the Ethylenic Double Bond”, *J. Chem. Soc.*, 2881-2886, 1960.

- JACOBS, H.; RAMADAYAL, F. "Constituents of *Hortia regia*: 6,7-dimethoxycoumarin, rutaecaerpine, skimmianine, and (+)-methyl (E,E)-10,11-dihydroxy-3,7,11-trimethyl-2,6-dodecadienoate"; *Journal of Natural Products*, **50**(3): 507-509, 1987.
- JACOBS, H. & RAMDAYAL, F. "Guyanin, a novel tetranortriterpenoid. Structure elucidation by 2-D NMR spectroscopy"; *Tetrahedron Letters*, **27**(130): 1453-1456, 1986.
- JANUÁRIO, A. H.; DA SILVA, M. F. G. F.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B. "Dammarane and cycloartane triterpenoids from three *Rapanea* species"; *Phytochemistry*, **31**(4): 1251-1253, 1992.
- KAMPERDICK, C., VAN, N. H., SUNG, T. V. & ADAM, G. "Bisquinolinone alkaloids from *Melicope ptelefolia*", *Phytochemistry*, **50**: 177-181, 1999.
- KRÜGNER, R., LOPES, M. T. V. C., SANTOS, J. S., BERETTA, M. J. G., AND LOPES, J. R. S. "Transmission efficiency of *Xylella fastidiosa* by sharpshooters and identification of two new vector species". *Anais da 14th Conf. Int. Org. Citrus Virol. Brazil*, 1998, p. 81.
- LACAVA, P. T.; ARAÚJO, W. L.; MACCHERONI JR., W.; AZEVEDO, J. L.; "RAPD profile and antibiotic susceptibility of *Xylella fastidiosa*, causal agent of citrus variegated chlorosis", *Letters in Applied Microbiology*, **33**, 302-306, 2001.
- LARANJEIRA, F. F.; GOTTWALD, T. R.; AMORIM, L.; BERGER, R. D.; BERGAMIN FILHO, A. "Spatio-temporal dynamics of citrus variegated chlorosis: a preliminary analysis". *Anais da 14th Conf. Int. Org. Citrus Virol, Brazil*. 2000, p. 223-231.
- LARANJEIRA, F. F.; POMPEU Jr., J.; HARAKAVA, R.; FIGUEIREDO, J. O.; CARVALHO, S. A.; COLETTA FILHO, H. D. "Cultivares e espécies cítricas hospedeiras de *Xylella fastidiosa* em condições de campo". *Fitopatol. Brás.*, **23**, 147-154, 1998.
- LI, W.; DONADIO, L. C.; HE, C.; SEMPIONATO, O. R. "Método de avaliação de resistência à clorose variegada dos citros". *Laranja*, **17**, 56-67, 1996.
- LINDHE, J.; KARRING, T.; LANG, N.P.; (ed) *Tratado de periodontia clínica e implantologia oral*. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005.
- LOPES, J. R. S.; BERETTA, M. J. G.; HARAKAVA, R.; ALMEIDA, R. P. P.; KRÜGNER, R.; GARCIA JUNIOR, A. "Confirmação da transmissão por cigarrinhas do agente causal da clorose variegada dos citros, *Xylella fastidiosa*". *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.**21**(Suplemento), p.343, 1996.
- LOPES, S. A.; RIBEIRO, D. M.; ROBERTO, P. G.; FRANÇA, S. C.; SANTOS, J. M. "*Nicotiana tabacum* as an experimental host for the study of plant-*Xylella fastidiosa* interactions". *Plant Dis.* **84**, 827-830, 2000.

LOPES, S. A.; SOUZA, V. “Colonização de plantas de fumo pela *Xylella fastidiosa* dos citros e transmissão do patógeno por cigarrinhas (*Ferrariana trivittata*)”. *Fitopatol. Bras*, **26**, 305, 2001.

MACHADO, M. A.; TARGON, M. L.; BERETTA, M. J. G.; LARANJEIRA, F. F.; CARVALHO, S. A. “Detecção de *Xylella fastidiosa* em espécies e variedades de citros sobre-enxertadas em laranja pêra com clorose variegada dos citros (CVC)”. *Fitopatol. Bras*, **22**, 30-33, 1997.

MARCOTTE, H.; LAVOIE, M.C. “Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A”. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **62**: 71–109, 1998.

MARQUES, L.L.R.; CERI, H.; MANFIO, G.P.; REID, D.M.; OLSON, M.E. “Characterization of biofilm formation by *Xylella fastidiosa* in vitro”. *Plant Diseases*, **86**: 633–638, 2002.

MESQUINI, M. A.; MOLINARI, S. L.; PRADO, I. M. M. “Educação em saúde bucal: uma proposta para abordagem no Ensino Fundamental e Médio”. *Arq Mudi*. 2006;10(3):16-22.

MINSAVAGE, G. V.; THOMPSON, C. M.; HOPKINS, D. L.; LEITE, R. M. V. B.; STALL, R. E.; “Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue”, *Phytopathology*, **84**, 456-461, 1994.

MONACHE, F. D.; MARLETTI, F.; MARINI-BETTOLO, G. B. “Coumarins of *Hortia arborea* (Rutaceae): Hortiline and Hortiolone”. *Gazz. Chim. Ital.* **106**: 681, 1976.

MONACHE, F. D.; VALERA, G. C.; MARINI-BETTOLO, G. B.; MELLO, J. F.; DE LIMA, O. G. “Coumarins of *Hortia arborea* (Rutaceae). II. Hortiolone and Hortionone”. *Gazz. Chim. Ital.* **107**: 399, 1977.

MONTEJANO, H. A.; GERVALDO, M.; BERTOLOTTI, S. G.; *Dyes and Pigments* 2005, **64**, 117.

MORETTI, P.E.; Projeto Microrganismos. Disponível em:
<http://www.fam.br/microrganismos/bacteriologia_microbiota_humana_oral.htm>
Acesso em 10/12/2007.

NASCIMENTO, M. M.; LEMOS, J. A. C.; ABRANCHES, J.; GONÇALVES, R. B.; BURNE, R. A.; Adaptive Acid Tolerance Response of *Streptococcus sobrinus*, *Journal Of Bacteriology*, **186**, 19, 6383–6390, 2004.

NCCLS - NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARD, “Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically”, *Approved Standard - M7-A6*, ed. 6, v. 23, 2003.

NEWMAN, M.G.; TAKEI, H.H.; CARRANZA, F.A.; *Periodontia clínica*. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.

- OSIRO, D.; COLNAGO, L.A.; OTOBONI, A.M.M.B.; LEMOS, E.G.M.; SOUZA, A.A.; COLETTA-FILHO, H.D.; MACHADO, M.A. "A kinetic model for *Xylella fastidiosa* adhesion, biofilm formation, and virulence". *FEMS Microbiol. Lett.* **236**: 313–318, 2004.
- PACHTER, I. J.; MOHRBACHER, J.; ZACHARIAS, D. E. "The chemistry of hortiamine and 6-metoxyrhetsinine"; *J. Am. Chem. Soc.*, **63**: 635-642, 1961.
- PACHTER, I. J.; RAFFAUF, R. F.; ULLYOT, G. E.; RIBEIRO, O.; "Die trennung und identifizierung der alkaloiden von *Hortia arborea*."; *Angew. Chem.*, **69**(21): 687, 1957.
- PACHTER, I. J.; RAFFAUF, R. F.; ULLYOT, G. E.; RIBEIRO, O. "The alkaloids of *Hortia arborea* Engl."; *J. Am. Chem. Soc.*, **82**: 5187-5193, 1960.
- PÁDUA, A. P. Estudo químico de *Hortia badinij* e *Hortia longifolia*. Belo Horizonte: UFMG, 1976. Tese de doutorado, 195p.
- PALOMINO, J.C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, S. "Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*". *Antimicrob Agents Chem*, **46**:2720–2722, 2002.
- PELCZAR, M., REID, R. & CHAN, E.C.S.; *Microbiologia*; McGraw-Hill, Vol.1 e 2, S. Paulo, Brasil, 1980.
- POOLER, M. R.; HARTUNG, J. S.; "Genetic relationship among strains of *Xylella fastidiosa* based on RAPD-PCR data", *Curr. Microbiol.*, **31**, 134-137, 1995.
- PURCELL, A. H.; HOPKINS, D. L. "Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens", *Annu. Rev. Phytopath.*, **34**, 131-51, 1996.
- QUEIROZ-VOLTAN, R. B.; PARADELA FILHO, O. "Caracterização de estruturas anatômicas de citros infectados com *Xylella fastidiosa*". *Laranja*, **20**(1), 55-76, 1999.
- RAHMANI, M.; TAUFIQYAP, Y. H.; ISMAIL, H. B. M.; SUKARI, A.; WATERMAN, P. G. "New coumarin and dihydrocinnamic acid derivatives from 2 Malaysian populations of *Micromelum-minutum*", *Phytochemistry*, **37**(2): 561-564, 1994.
- RASHID, M. A.; ARMSTRONG, J. A.; GRAY, A. I.; WATERMAN, P. G.; "Alkaloids, flavonoids and coumarins from *Drummondia Hassellii* and *D. calida*", *Phytochemistry*, **31**(4): 1265-1269, 1992.
- RASHID, M. A.; ARMSTRONG, J. A.; GRAY, A. I.; WATERMAN, P. G. "5,7-Dioxygenated coumarins from the aerial parts of *Geleznovia-verrucosa* (Rutaceae)", *Biochemical Systematic and Ecology*, **19**(8): 698-698, 1991.
- RIBEIRO, A. B. *Fitoquímica do Enxerto de Citrus sinensis sobre Citrus limonia e da Espécie Nycticalanthus speciosus (Rutaceae) e Biossíntese de Cumarinas*

Preniladas. São Carlos: Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2006. Tese de doutorado, 262.

ROBERTO, S.R.; COUTINHO, A.; LIMA, J.E.O. de; MIRANDA, V.S.; CARLOS, E.F. “Transmissão de *Xylella fastidiosa* pelas cigarrinhas *Dilobopterus costalimai*, *Acrogonia terminalis* e *Oncometopia facialis* em citros”. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, **21**(4), p.517-518, 1996.

RODRIGUEZ, O.; VÉGAS, F.; POMPEU, J. R.; AMARO, J. ; SEMPIONATO, O.R. *Citricultura Brasileira*, Segunda Edição, Fundação Cargil, 1991.

ROSSETTI, V. ; GARNIER, M. ; BOVE, J. M. ; BERETTA, M. J. G. ; TEIXEIRA, A. R. R. “Présence de bactéries dans le xylème d’orangers atteints de chlorose varié, une nouvelle maladie des agrumes au Bresil”. *C. R. Acad. Sci.*, **310**, 345-349, 1990.

ROSSETTI, V. ; DE NEGRI, J.D. “Clorose Variegada dos Citros – Revisão”. *Laranja*, **11**, 1-14, 1990.

SARKER, S. D.; ARMSTRONG, J. A.; GRAY, A. I.; WATERMAN, P. G. “Sesquiterpenyl coumarins and geranyl benzaldehyde derivatives from the aerial parts of *Eriostemon myoporoides*”, *Phytochemistry*, **37**(5): 1287-1294, 1994a.

SARKER, S. D.; ARMSTRONG, J. A.; GRAY, A. I.; WATERMAN, P. G. “Pyranocoumarins from *Eriostemon apiculatus*”, *Biochemical Systematic and Ecology*, **22**(6): 641-644, 1994b.

SARKER, S. D.; WATERMAN, P. G.; ARMSTRONG, J. A. “3,4,8-Trimethoxy-2-quinolone - a new alkaloid from *Eriostemon gardneri*”, *Journal of Natural Products-Lloydia*, **58**(4): 574-576, 1995a.

SARKER, S. D.; WATERMAN, P. G.; ARMSTRONG, J. A. “Coumarin glycosides from 2 species of *Eriostemon*”, *Journal of Natural Products-Lloydia*, **58**(7): 1109-1115, 1995b.

SCHOLZ, H. Reihe Rutales, reihe Sapindales. In: *A Engler's syllabus der pflazenfamilien*, 1964, ed. 12. Gebruder Borntraeger, Berlin.

SIMPSON, A. J. *et al*, “The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. The *Xylella fastidiosa* Consortium of the Organization for Nucleotide Sequencing and Analysis”. *Nature*, **406**(6792), 151-7, 2000.

SOUZA, A. A.; TAKITA, M. A.; COLETTA-FILHO, H.D.; CALDANA, C.; GOLDMAN, G. H.; YANAI, G.M.; *et al*. “Analysis of gene expression in two growth states of *Xylella fastidiosa* and its relationship with pathogenicity”. *Mol Plant-Microb Interact*, **16**: 867–875, 2003.

SOUZA, A. A.; TAKITA, M. A.; PEREIRA, E. O.; COLETTA-FILHO, H.D.; MACHADO, M. A.; “Expression of pathogenicity-related genes of *Xylella fastidiosa* *in vitro* and *in planta*”, **50**, 223-228, 2005.

SUAREZ, L. E. C.; CASABÓ, J.; MONACHE, F. D.; MOLINS, E.; ESPINOSA, E.; MIRAVITLLES, C. "Hortiolida A, a novel limonoid from *Hortia colombiana*", *Anales de Química*, **94**: 307-310, 1998.

SUAREZ, I. E. C.; MENICHINI, F.; MONACHE, F. D. "Tetranorterpenoids and Dihydrocinnamic Acid from *Hortia colombiana*", *J. Braz. Chem. Soc.*, **13**(3): 339-344, 2002.

TINTO, W. F.; McLEAN, S.; REYNOLDS, W. "Hortiamide, a new tyramine alkaloid from *Hortia regia*", *Journal of Natural Products*, **55**(11): 1676-1678, 1992.

TOKUYAMA, R.; TAKAHASHI, Y.; TOMITA, Y.; TSOBOUCHI, M.; YOSHIDA, T.; IWASAKI, N.; KADO, N.; OKEZAKI, E.; NAGATA, O.; "Structure-activity relationship (SAR) studies on oxazolidinone antibacterial agents. 2. Relationship between lipophilicity and antibacterial activity in 5-thiocarbonyl oxazolidinones", *Chem Pharm Bull*, **49**: 353-360, 2001.

TUBELIS, A. "Difusão da clorose em pomares de São Paulo e Minas Gerais". *Inf. Coopercitrus*, **72**, 24-30, 1992.

VIEIRA, P. C.; ALVARENGA, M. A.; GOTTLIEB, O. R.; McDOUGALL, M. N. V.; REIS, F. A. M. "Estructural confirmation of dihydrocinnamic acids from *Adiscanthus fusciflorus* by ^{13}C NMR", *Phytochemistry*, **19**: 472-473, 1980.

WATERMAN, P. G. "Phytochemical diversity in the order Rutales". IN: *Phytochemical Potential of Tropical Plants*, New York, 1983, Plentium, p.203-233.

WATERMAN, P. J. "The chemical systematic of alkaloids: a review emphasizing the contribution of Robert Hegnauer", *Biochemical Systematic and Ecology*, **27**(4): 395-406, 1999.

YAMAMOTO, P. T.; ROBERTO, S. R.; PRIA, W. D. Jr.; FELIPPE, M. R.; MIRANDA, V. S.; TEIXEIRA, D. C.; LOPES, J. R. S. "Transmissão de *Xylella fastidiosa* por cigarrinhas *Acrogonia virescens* e *Homalodisca ignorata* (Hemiptera: Cicadellidae) em plantas cítricas". *Summa Phytopathol.* **28**, 178-181, 2002.

WIKIPÉDIA, *Bacillus cereus*. Disponível em:
<http://pt.wikipedia.org/wiki/Bacillus_cereus> Acesso em 10/12/2007.