

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



Estudo fitoquímico de *Rhabdodendron amazonicum*, *Conchocarpus inopinatus* e avaliação dos compostos isolados na inibição da fotossíntese.

Israel Cívico Gil de Sá

Dissertação de Mestrado

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

Estudo fitoquímico de *Rhabdodendron amazonicum*, *Conchocarpus inopinatus* e avaliação dos compostos isolados na inibição da fotossíntese.

ISRAEL CÍVICO GIL DE SÁ*

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

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

*Bolsista FAPESP

São Carlos – SP

2010

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar

S111ef

Sá, Israel Cívico Gil de.

Estudo fitoquímico de *Rhabdodendron amazonicum*,
Conchocarpus inopinatus e avaliação dos compostos
isolados na inibição da fotossíntese / Israel Cívico Gil de Sá.
-- São Carlos : UFSCar, 2010.
111 f.

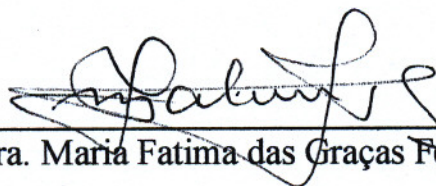
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2010.

1. Produtos naturais. 2. Fitoquímica. 3. Fotossíntese. 4.
Rhabdodendron amazonicum. 5. *Conchocarpus inopinatus*.
I. Título.

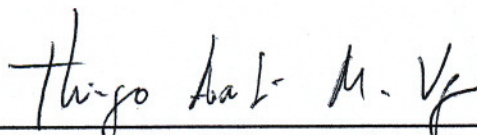
CDD: 547.3 (20^a)

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

Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de dissertação de mestrado acadêmico do candidato Israel Cívico Gil de Sá, realizada em 23 de setembro de 2010:



Profa. Dra. Maria Fatima das Graças Fernandes da Silva



Prof. Dr. Thiago André Moura Veiga



Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus por ter renovado as minhas forças quando eu achava que as tinha perdido, por me dar sempre palavras de esperança através de algumas pessoas que estavam próximas a mim. Mas principalmente agradeço a Ele pelo privilégio de viver.

À minha família, à minha mãe, mesmo tendo partido, deixou grandes ensinamentos que ficaram guardados e se tornaram essência do meu caráter, obrigado pelo grande apoio emocional e financeiro, a distância não impediu a nossa união.

Agradeço à Professora Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva, uma das minhas mães científicas, pela compreensão, paciência e perseverança na orientação deste gratificante trabalho.

Ao professor Dr. Thiago André Moura Veiga, pela implementação do laboratório para os ensaios de inibição da fotossíntese, também pelos conhecimentos transmitidos durante sua presença no DQ/UFSCar, e também pela amizade, realmente foi peça fundamental para a realização deste projeto.

Aos professores do grupo de Produtos Naturais da UFSCar por todos os ensinamentos em várias etapas do desenvolvimento deste projeto. Aos professores do DQ/UFSCar por todas as colaborações, à todos os funcionários da UFSCar, que mesmo sem saber, tiveram a sua parcela de contribuição para o bom desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos: James Almada, Olívia Sampaio, Anayla, Samya Danielle, Marselle, André Sarria, Thiago (HPLC), Beatriz Kíng-Diaz, Douglas Ferreira, Clayton Oliveira, Rodrigo, Murilo, Kátia, Leonardo Toffano, que também contribuíram muito para que este sonho se tornasse realidade. Aos técnicos, professores e alunos dos laboratórios de RMN e PN - massas pelas contribuições nos experimentos.

Aos amigos e colegas do laboratório de Produtos Naturais da UFSCar, pela disposição a ajudar sempre que necessário, mas principalmente pela amizade e bom relacionamento durante este período de trabalho.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) e à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior), pelo financiamento do projeto e bolsas concedidas.

Dedico este trabalho à minha mãe
(jamais a posso esquecer, mesmo que
já tenha partido) à família, amigos e
colegas do Grupo PN/UFSCar.

“Melhor é adquirir a sabedoria do que o ouro”. Prov. 16:16.

“Adiante da honra vai a humildade” Prov. 15:33.

“Vindo a soberba, virá também a afronta; mas com os humildes está a sabedoria”.

Prov 11:2.

PRINCIPAIS ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<i>s</i>	Singleto
<i>dl</i>	Dubleto largo
<i>m</i>	Multipleteo
<i>J</i>	Constante de acoplamento
<i>dd</i>	Duplo dubleto
<i>ddd</i>	Duplo duplo dubleto
δ	deslocamento químico
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CDCl ₃	Clorofórmio Deuterado
<i>C. inopinatus</i>	<i>Conchocarpus inopinatus</i>
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COSY	Correlation Spectroscopy
CR	Centro de Reação
Chl a	Clorofila- <i>a</i>
D1 e D2	Subunidades protéicas do FSII
FSII	Fotossistema II
FSI	Fotossistema I
F ₀	Fluorescência inicial, a 50 μ s.
F _M	Fluorescência máxima.
gNOESY	<i>Gradient Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
MV	Metilviologênio
NOE	<i>Nuclear Overhauser Effect</i>
OEC	<i>Oxygen Evolution Complex</i>
OJIP	Transientes que representam a cinética da fluorescência.
P ₆₈₀	Centro de Reação do FSII
P ₇₀₀	Centro de Reação do FSI
PQ	Plastoquinona

PQH2	Plastoquinol
Q_A	Quinona A
Q_B	Quinona B
<i>R. amazonicum</i>	<i>Rhabdodendron amazonicum</i>
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1	História taxonômica do gênero <i>Rhabdodendron</i> .	3
TABELA 4.1	Dados de RMN ^1H e ^{13}C para a substância 1 .	58
TABELA 4.2	Dados de RMN ^1H e ^{13}C de 2 , comparados com a literatura.	65
TABELA 4.3	Dados RMN ^{13}C do substituinte cinamato para a substância 3 .	70
TABELA 4.4	Dados de RMN ^{13}C para a substância 3 .	72
TABELA 4.5	Dados químicos de RMN ^1H para o composto 4 e comparação com dados da literatura.	78
TABELA 4.6	Dados de RMN ^1H da substância 5 , comparação com os dados da literatura.	81
TABELA 4.7	Dados de RMN ^1H do composto 6 e comparação com os dados da literatura.	83
TABELA 4.8	Dados de RMN ^1H da substância 7 e comparação com dados da literatura.	85
TABELA 4.9	Dados de RMN ^1H para o composto 8 e dados da literatura.	89
TABELA 4.10	Parâmetros de fluorescência OJIP sob a ação do composto 7 , DCMU e Tris.	102

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1	Fotos da <i>Rhabdodendron amazonicum</i> e <i>Rhabdodendron macrophyllum</i>	4
FIGURA 1.2	Compostos isolados do gênero <i>Rhabdodendron</i> relatados na literatura	5
FIGURA 1.3	Folhas e inflorescência da <i>R. amazonicum</i>	6
FIGURA 1.4	Compostos isolados da <i>Rhabdodendron amazonicum</i>	8
FIGURA 1.5	Alcalóides inibidores da fotossíntese isolados de <i>Hortia superba</i> (RUTACEAE).	10
FIGURA 1.6	Substâncias isoladas do gênero <i>Conchocarpus</i>	11
FIGURA 1.7	Substâncias isoladas das folhas de <i>Conchocarpus inopinatus</i>	12
FIGURA 1.8	Gradiente de prótons e transporte de elétrons através dos 4 complexos fotossintéticos principais: FSI, FSII, Citocromo <i>b₆f</i> e ATP-sintase.	16
FIGURA 1.9	Mecanismo de ação de 2 importantes herbicidas: DCMU e PARAQUAT.	18
FIGURA 1.10	Modelo de possíveis destinos da energia luminosa absorvida pelo FSII	20
FIGURA 1.11	Estrutura de alguns alcalóides acridônicos ensaiados na inibição da fotossíntese pelo grupo de Produtos Naturais da UFSCar.	23
FIGURA 3.1	Fracionamento do extrato etanólico das folhas da <i>Rhabdodendron amazonicum</i>	26

FIGURA 3.2	Fracionamento para a obtenção das substâncias da <i>Rhabdodendron amazonicum</i>	27
FIGURA 3.3	Cromatograma para separação da substância 2 por CLAE	29
FIGURA 3.4	Fracionamento para o isolamento das substâncias da <i>Conchocarpus inopinatus</i>	31
FIGURA 3.5	Cromatograma no modo analítico para separação de 7 e 8 . 1 ^a eluição	33
FIGURA 3.6	Cromatograma no modo analítica para a separação de 7 e 8 . 2 ^a eluição	34
FIGURA 3.7	Cromatograma no modo analítico para a separação de 7 e 8 . 3 ^a eluição	34
FIGURA 4.1	Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) da substância 1	42
FIGURA 4.2	Ampliação de sinais do espectro RMN ¹ H da substância 1	43
FIGURA 4.3	Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) da substância 1	44
FIGURA 4.4	Mapa de contorno de HSQC (CDCl ₃ , 400 MHz) para o sinal de ¹ H δ 5,67	45
FIGURA 4.5	Espectro de COSY, RMN ¹ H, (CDCl ₃ , 400 MHz) de 1	45
FIGURA 4.6	Mapa de contorno HMBC (CDCl ₃ , 400 MHz) para o ¹ H δ 5,67	46
FIGURA 4.7	Mapa de contorno HSQC (CDCl ₃ , 400 MHz) para o ¹ H δ 1,76	47

FIGURA 4.8	Mapa de contorno HMBC (CDCl ₃ , 400 MHz) para o ¹ H δ 1,76	47
FIGURA 4.9	Mapa de contorno HSQC (CDCl ₃ , 400 MHz) para o ¹ H δ 1,44 e 1,25	48
FIGURA 4.10	Mapa de contorno HMBC (CDCl ₃ , 400 MHz) para o ¹ H δ 1,44 e 1,25	49
FIGURA 4.11	Espectro de COSY (CDCl ₃ , 400 MHz) da substância 1 , sinal δ 4,30	50
FIGURA 4.12	Espectro de COSY (CDCl ₃ , 400 MHz) da substância 1 , sinal δ 2,43	51
FIGURA 4.13	Mapa de contorno HSQC (CDCl ₃ , 400 MHz) da substância 1	52
FIGURA 4.14	Espectro de COSY (CDCl ₃ , 400 MHz) da substância 1 , δ 1,95	52
FIGURA 4.15	Espectro de COSY (CDCl ₃ , 400 MHz) da substância 1 , sinal δ 1,77	53
FIGURA 4.16	Espectro de COSY (CDCl ₃ , 400 MHz) da substância 1 (δ 1,50)	53
FIGURA 4.17	Estrutura da rhabdodendronlactona	54
FIGURA 4.18	Experimento gNOESY (400 MHz, CDCl ₃) para a substância 1	56
FIGURA 4.19	Experimento gNOESY (400 MHz, CDCl ₃) para a substância 1	57
FIGURA 4.20	Experimento gNOESY (400 MHz, CDCl ₃) para a substância 1	58

FIGURA 4.21	Espectro de Infravermelho do composto 1	59
FIGURA 4.22	Proposta de fragmentação para o composto 1 , m/z 196	60
FIGURA 4.23	Espectro de massas do composto 1	61
FIGURA 4.24	Proposta de biogênese para o composto 1	61
FIGURA 4.25	Espectro de massas do intermediário 1,5,5-trimetil-6 β -hidroxi-6-but-2-enil-ciclohex-1-ene-3-ona (a)1. GC-EM, IE 70 eV	62
FIGURA 4.26	Proposta de fragmentação para o intermediário m/z 208 da rhabdodenronlactona	63
FIGURA 4.27	Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância 2	66
FIGURA 4.28	Ampliação do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) para a substância 2	67
FIGURA 4.29	Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) para a substância 2	68
FIGURA 4.30	Espectro de massas para o composto 2 (blumenol C)	69
FIGURA 4.31	Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) para a substância 3	73
FIGURA 4.32	Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) para a substância 3	74
FIGURA 4.33	Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) para a substância 3 na faixa de deslocamento entre 11,00 a 74,13 ppm	75
FIGURA 4.34	Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) para a substância 3 na faixa de deslocamento entre 118,75 a 166,40 ppm	76

FIGURA 4.35	Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) para o composto 4	79
FIGURA 4.36	Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto 5	80
FIGURA 4.37	Ampliação do espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) da substância 5	81
FIGURA 4.38	Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto 6	84
FIGURA 4.39	Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) para o composto 7	87
FIGURA 4.40	Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) para o composto 8	90
FIGURA 4.41	Espectro de massas IE 70 eV, para a substância 8	91
FIGURA 4.42	Proposta de fragmentação da escopoletina e isoescopoletina para gerar o íon fragmento m/z 177	91
FIGURA 4.43	Efeito do composto 7 no transporte de elétrons desacoplado	94
FIGURA 4.44	Efeito do composto 7 sobre o transporte de elétrons basal	95
FIGURA 4.45	Efeito do composto 7 no fluxo de elétrons fosforilante	95
FIGURA 4.46	Aumento cinético da fluorescência sob ação do composto 7 , DCMU 50 μM , Tris 0,8 M em cloroplastos frescos e intactos isolados de espinafre	98
FIGURA 4.47	Gráfico radar-plot mostra parâmetros de fluorescência da clorofila a sendo afetados pela ação do composto 7 e DCMU	99
FIGURA 4.48	Curva de transientes OJIP normalizada entre F_0 e F_m mostra leve aumento da fluorescência V_j do composto 7 em relação ao controle a 2 ms	102

RESUMO

BUSCA POR METABÓLITOS SECUNDÁRIOS COMO POSSÍVEIS INIBIDORES DA FOTOSSÍNTESE A PARTIR DAS ESPÉCIES *Rhabdodendron amazonicum* (Rhabdodendraceae) e *Conchocarpus inopinatus* (Rutaceae) – A *Rhabdodendron amazonicum* é uma espécie da família monogénica Rhabdodendraceae, cujas espécies estão concentradas na Amazônia, Guianas e no norte da Bahia-Brasil. O estudo fitoquímico do extrato etanólico das folhas da *Rhabdodendron amazonicum* levou ao isolamento de um esteróide esterificado com o ácido cinâmico, o cinamato de sitosterila, dois compostos da classe dos sesquiterpenos iononas, blumenol C, e a rhabdodendronlactona (inérita). Um outro composto nor-ionona foi identificado via a análise CG-EM, selecionando no cromatograma o pico correspondente ao íon m/z 208, o qual foi identificado como 1,5,5-trimetil-6 β -hidroxi-6-but-2-enil-ciclohex-1-eno-3-ona. A identificação deste composto reforça a proposta de biogênese para a rhabdodendronlactona a partir do blumenol C. O estudo fitoquímico do extrato metanólico do caule da *Conchocarpus inopinatus* levou ao isolamento de 3 alcalóides, sendo 1 acridônico (metilarborinina), 1 quinolônico (1-metil-2-fenil-4-quinolona) e 1 furoquinolínico (dictamina); e duas cumarinas: a marmesina e a escopoletina. Todas as substâncias, com exceção da escopoletina, foram submetidas aos ensaios de inibição do transporte de elétrons basal, desacoplado e fosforilante. Mas somente a marmesina apresentou atividade de inibição no transporte de elétrons basal e desacoplado. Através de medidas de fluorescência da clorofila *a*, analisando os parâmetros relacionados aos transientes OJIP, pode-se sugerir a ação da marmesina no pool das quinonas, impedindo o transporte de elétrons a partir desta região. Porém para confirmar tal mecanismo de ação, seria necessário a realização de outras reações parciais envolvendo doadores e aceptores de elétrons, o que não foi possível devido à pouca quantidade do composto isolado.

ABSTRACT

SEARCH FOR SECONDARY METABOLITES AS POSSIBLE INHIBITORS OF PHOTOSYNTHESIS FROM SPECIES *Rhabdodendron amazonicum* (Rhabdodendraceae) and *Conchocarpus inopinatus* (Rutaceae) - The *Rhabdodendron amazonicum* is a species of the monogeneric family Rhabdodendraceae, whose species are concentrated in the Amazon, Guianas and northern Bahia-Brazil. Phytochemical study of ethanolic extract of *Rhabdodendron amazonicum* leaves led to the isolation of a esterified steroid with cinnamic acid, the sitosteril cinnamate, two compounds of the class of ionone sesquiterpenes, Blumenol C and rhabdodendronlactona (unpublished). Another compound nor-ionone was identified via GC-MS analysis, selecting the chromatogram peak corresponding to ion m/z 208, which was identified as 1,5,5-trimethyl-6 β -hydroxy-6-but-2-enyl-cyclohexa-1-ene-3-one. The identification of this compound reinforce the proposed biogenesis for rhabdodendronlactona from Blumenol C. Phytochemical study of methanolic extract of stem *Conchocarpus inopinatus* led to the isolation of three alkaloids: one acridones (methylarborinine), one quinolones (1-methyl-2-phenyl-4-quinolone) and one furoquinoline (dictamnine) and two coumarins, the marmesin and scopoletin. All substances, except for scopoletin were submitted to the inhibition tests of electron transport basal, phosphorylating and uncoupled. But only the marmesin showed inhibitory activity in the basal and uncoupled electron transport. Through measures of chlorophyll fluorescence, analyzing the parameters related to transient OJIP, could suggest the marmesin action in the pool of quinones, inhibiting the transport of electrons from this region. However, to confirm this mechanism of action would require the implementation of other partial reactions involving donors and acceptors of electrons, which were not possible due to the low quantity of isolated compound.

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	2
1.1 – A família Rhabdodendraceae	2
1.2 - Características morfológicas e químicas do gênero <i>Rhabdodendron</i> .	4
1.3 - <i>Rhabdodendron amazonicum</i>	6
1.3.1 - Características morfológicas	6
1.3.2 – Classificação Taxonômica e Características químicas	7
1.4 - A família Rutaceae	9
1.5 - Características químicas e morfológicas do gênero <i>Conchocarpus</i>	10
1.6 - <i>Conchocarpus inopinatus</i>	12
1.7 - As plantas daninhas e agricultura	13
1.8 – Produtos Naturais como Herbicidas	14
1.9 – Herbicidas e a Fotossíntese.	15
1.9.1 – O transporte de elétrons na fotossíntese.	16
1.10 - Fluorescência	19
1.11 - JUSTIFICATIVA	22
2 – OBJETIVOS	24
3 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	25
3.1 – Estudo fitoquímico da <i>Rhabdodendron amazonicum</i>	25
3.1.1 - Coleta do material botânico	25
3.1.2 - Preparação dos extratos	25
3.1.3 - Isolamento das substâncias da <i>Rhabdodendron amazonicum</i>	27
3.2 – Estudo fitoquímico de <i>Conchocarpus inopinatus</i> (Rutaceae)	30
3.2.1 - Coleta do material botânico	30
3.2.2 - Obtenção dos extratos	30

3.2.3 - Isolamento das substâncias de <i>Conchocarpus inopinatus</i>	31
3.3 - <i>Materiais e Métodos</i>	35
3.4.1 - Isolamento dos cloroplastos	36
3.4.2 – Reações de Transporte de elétrons (Basal, Desacoplado e Fosforilante).	38
3.4.3 - Ensaio de medidas de fluorescência da Clorofila a (Chl a)	39
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1 - Determinação Estrutural das substâncias isoladas da <i>Rhabdodendron amazonicum</i>	41
4.1.1 – Determinação estrutural da substância 1	41
4.1.1.1 – Experimento gNOESY (gradient nuclear Overhauser effect spectroscopy)	54
4.1.1.2 - Proposta de Fragmentação da rhabdodendronlactona.	60
4.1.1.3 – Proposta de Biogênese para a rhabdodendronlactona	61
4.1.1.4 – Proposta de fragmentação EM-IE 70 eV do intermediário da biogênese da Rhabdodendronlactona.	63
4.1.2 -Determinação estrutural da substância 2	64
4.1.3 - Determinação estrutural da substância 3	70
4.2 - DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS De <i>Conchocarpus inopinatus</i>	77
4.2.1 - Alcalóides	77
4.2.2 - Determinação estrutural da substância 4	77
4.2.3 - Determinação estrutural da substância 5	80
4.2.4 - Determinação estrutural da substância 6	82
4.2.5 - Determinação estrutural da substância 7	85
4.2.6 - Determinação estrutural da substância 8	88
4.3 – Resultados dos ensaios de inibição da fotossíntese	92
4.3.1 – Efeito do composto 7 sobre o transporte de elétrons (Basal,	

desacoplado e fosforilante)	93
4.3.2 - Fluorescência da clorofila <i>a</i>	95
5 - CONCLUSÕES	104
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106

**ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Rhabdodendron amazonicum*,
Conchocarpus inopinatus e avaliação dos compostos isolados na
inibição da fotossíntese**

1 - INTRODUÇÃO

1.1 – A família Rhabdodendraceae

A família Rhabdodendraceae é uma família monogenérica, sendo constituída apenas pelo gênero *Rhabdodendron*. Hoje está classificada na ordem Caryophyllales e tem uma fascinante história taxonômica (Tabela 1.1).

O gênero *Rhabdodendron* já foi classificado em diferentes famílias, (Tabela 1.1) e suas espécies, coletadas por Gardner e Spruce, na América do Sul, foram consideradas por Bentham em 1853, congêneras com o gênero *Lecostemon* (Candolle) e pertencentes à família Chrysobalanaceae da ordem Rosales (WOLTER-FILHO, *et al.*, 1989). Tal classificação somente foi feita com base no seu estilete ginobásico (PRANCE, 2005). Embora outros autores tenham chamado a atenção para algumas diferenças morfológicas do gênero em relação à outras espécies da família Chrysobalanaceae, separando o gênero *Lecostemon* como uma tribo, subtribo ou subfamília, ou até mesmo referindo pertencer a Phytolaccaceae, ordem Caryophyllales, a classificação do gênero permaneceu a mesma por 50 anos, quando Gilg e Pilger renomearam *Lecostemon sensu* Bentham como *Rhabdodendron* e colocou o gênero perto da tribo Cuspareae de Rutaceae, ordem Rutales. O floema secundário da madeira de duas espécies (*R. macrophyllum* e *R. amazonicum*) é uma característica importante para associação com Rutaceae (PRANCE, 2005).

Dados moleculares mostraram que há uma proximidade taxonômica maior com a família Phytolacaceae do que com Rutaceae e Chrysobalanaceae. Apesar do posicionamento duvidoso, hoje o gênero *Rhabdodendron* foi elevado a nível de família, Rhabdodendraceae (PRANCE, 2005), classificação aceita pelo sistema “APG II” (do inglês *Angiosperm Phylogeny Group*) de 2003.

TABELA 1.1 - História taxonômica do gênero *Rhabdodendron*.

Ordem	Família	Informação adicional	Espécies	Referências
Rosales	Chrysobalanaceae		1 - 4	Bentham, 1853
		Chrysobalaneae		Mueller, 1858
		Chrysobalanoideae*		Baillon, 1868
		Tribo separada		Fritsch, 1888
		Tribo separada		Hallier, 1903
		Chrysobalaninae*		Focke, 1888
			5	Gleason, 1927
		Rhabdodendraceae		Cronquist, 1981
		Rhabdodendraceae	Posição incerta	Dahlgren, 1983
	Rutales	Rutaceae	Cusparieae	7
Rhabdodendreae			6, 8, 10	Huber, 1909
Rhabdodendreae				Krause, 1914
Rhabdodendreae			2	Ducke, 1922
Rhabdodendroieae				Engler, 1931
			6 (=5), 9, 10	Sandwith, 1943
				Maguire, 1948
				Takhtajan, 1969
				Dahlgren, 1980
				Puff, Weber, 1976
		Rhabdodendroideae		Thorne, 1983
	Rhabdodendraceae			Takhtajan, 1980
Caryophyllales	Phytolaccaceae			Record, 1934
	Rhabdodendraceae		6, 8 - 10	Prance, 1968

*Afinidade com Phytolaccaceae sugerida; espécies de *Lecostemon*: 1 *amazonicum*, 2 *crassipes*, 3 *gardneranum*, 4 *macrophyllum*, 5 *sylvestre*; espécies de *Rhabdodendron*: 6 *amazonicum*, 7 *columnare*, 8 *crassipes*, 9 *gardneranum*, 10 *macrophyllum*, 11 *sylvestre*. (WOLTER-FILHO, *et. al.* 1989).

1.2 - Características morfológicas e químicas do gênero *Rhabdodendron*.

O gênero *Rhabdodendron* (Rhabdodendraceae) possui apenas 3 espécies, a *R. macrophyllum* (Spr. ex Benth.) Huber e *R. amazonicum* (Spr. Ex Benth.) Huber (Fig. 1.1), ambas localizadas na Amazônia central e oriental e nas Guianas. A terceira espécie, *R. gardneranum* é encontrada no Norte da Bahia (Brasil) (WOLTER-FILHO *et al.*, 1985).



FIGURA 1.1 - a) *Rhabdodendron amazonicum*; b e c) *Rhabdodendron macrophyllum*.

Fonte: www.rbgekew.org Neotropical Rhabdodendraceae, Prof. Ghilleen Prance.

O gênero *Rhabdodendron* inclui arbustos ou árvores de pequeno porte. Possui espécies cujas folhas são inteiras, glândula-pontilhada, coriáceas com pequenos pêlos peltados sob a superfície, a inflorescência é supra-axilar racemosa panicula ou racêmica. As flores são hermafroditas com receptáculo amplo, levemente côncavo. O fruto é uma pequena drupa, globosa, que encerra um estipe curto em forma de taça; exocarpo fino, endocarpo levemente amadeirado (PRANCE, 2005).

O tipo polínico das espécies do gênero *Rhabdodendron* é caracterizado por grãos 3-colporados, esferoidais, granuloso-punctados. Baseado nesta característica, alguns botânicos apoiaram a exclusão do gênero *Rhabdodendron* da família Rutaceae, entretanto as diferenças das características polínicas em vários gêneros da Rutaceae são tão acentuadas, que não torna justificável o posicionamento do gênero fora ou dentro da família apenas com

base nesta característica (BARTH, 1982).

Há somente um relato de estudo fitoquímico para duas espécies do gênero, a *R. amazonicum* e *R. macrophyllum*, onde foram isolados derivados do ácido elágico das raízes das duas espécies, triterpenos como o ácido arjunólico, ácido oleanólico e 24-metilenocicloartenol (Fig. 1.2).

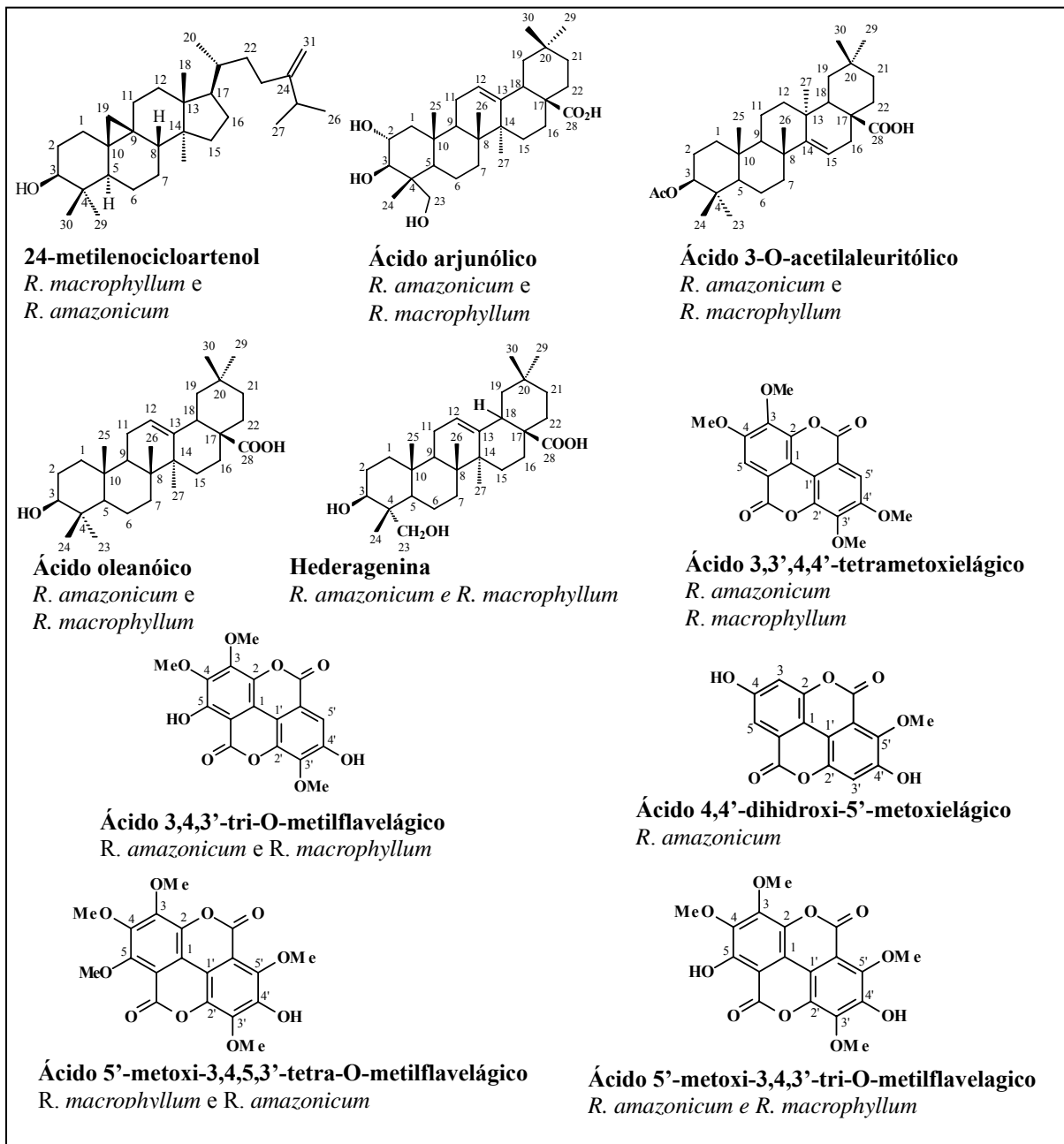


FIGURA 1.2 - Compostos isolados do gênero *Rhabdodendron* relatados na literatura, (WOLTER-FILHO, *et al.*, 1989).

1.3 - *Rhabdodendron amazonicum*

1.3.1 - Características morfológicas

A espécie *Rhabdodendron amazonicum* (Fig. 1.3) vulgarmente denominada Batiputá, pertencente à família Rhabdodendraceae, é representada por uma árvore de pequeno a médio porte. Possui tronco cinza pálido, com rasas fissuras longitudinais com 1-2 mm de profundidade, a casca exterior e entrecasca com 1 mm de espessura, a madeira é clara de cor marrom-amarelada, os ramos jovens possuem pêlos peltados e espalhados, com uma fina casca dura. A madeira possui floema secundário anômalo, semelhante ao floema de algumas espécies da família Rutaceae. As folhas são coriáceas, 20-39 x 30-10 cm, ápice agudo, acuminado, a maioria frequentemente com perspicácia 2-9 mm de comprimento, pecíolos de 1,5-3,5 centímetros de comprimento, com pêlos peltados dispersos, estípulas ausentes. Inflorescência axilar e às vezes panículas terminais. Fruto subgloboso, 6-10 mm de diâmetro; exocarpo glabro, liso, mas enrugado quando seco; mesocarpo muito fino, carnudo, endocarpo fino. A floração e frutificação ocorrem de Maio a dezembro (PRANCE, 2005).



FIGURA 1.3 - Folhas e inflorescência da *Rhabdodendron amazonicum*.
Fonte: Relatório de visita técnica ao INPA.

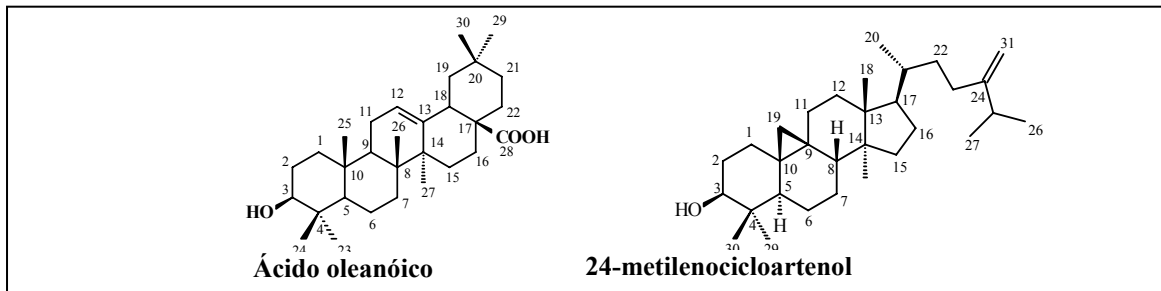
1.3.2 – Classificação Taxonômica e Características químicas



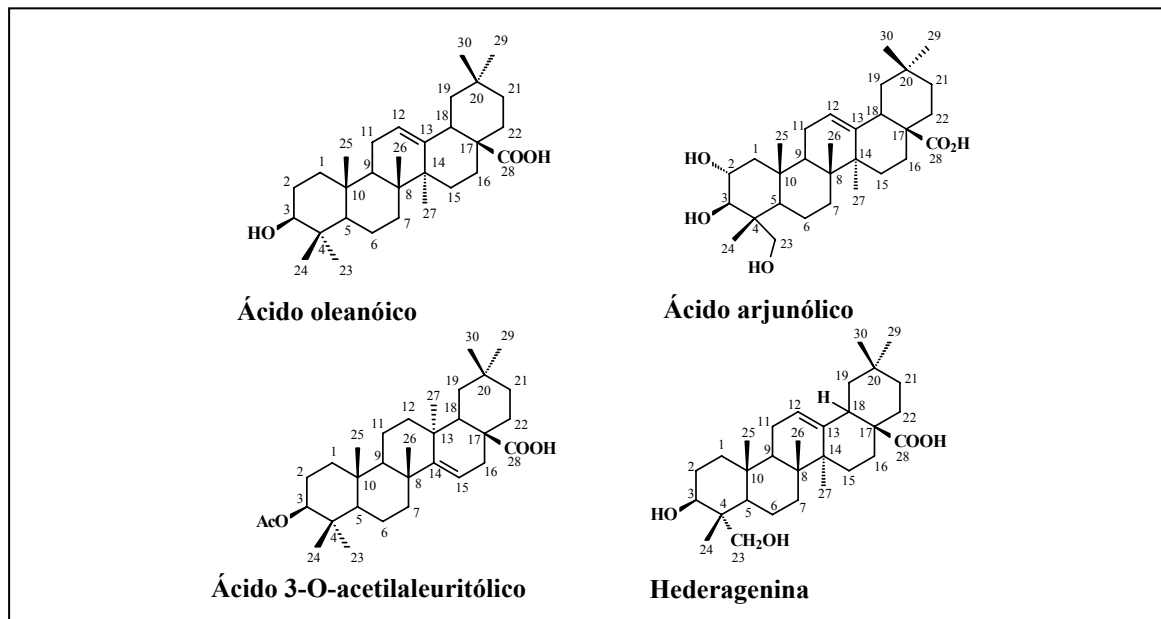
Esta espécie é comum em terra firme, em florestas da região leste de Manaus e fronteira Pará-Maranhão e norte das Guianas. Não ocorre na Amazônia Ocidental.

Existem poucos estudos publicados desta espécie. Segundo levantamento bibliográfico (WOLTER-FILHO, 1989) há relato de estudo químico das folhas, ramos e raízes desta planta, citando o isolamento de triterpenos e de compostos derivados do ácido elágico (Fig. 1.4).

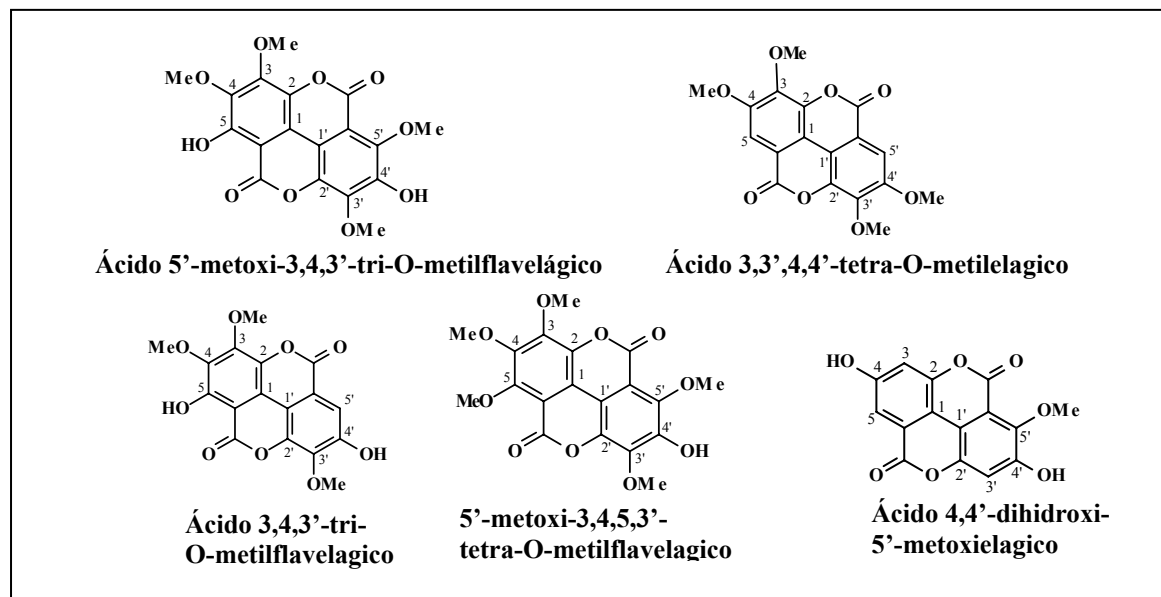
Além de duas substâncias (ácido oleanóico e 24-metilenocicloartenol), não foram encontrados na literatura outros compostos isolados das folhas da *Rhabdodendron amazonicum*. Por isso, foram escolhidas as folhas como parte desta planta a ser trabalhada, a fim também de contribuir com a sua quimiosistemática, já que a sua posição sistemática ainda é muito incerta.



(A)



(B)



(C)

FIGURA 1.4 - Compostos isolados da *R. amazonicum*: (A) Triterpenos isolados das folhas, (B) Triterpenos isolados dos galhos e raízes e (C) Derivados do ácido elágico isolados das raízes. (WOLTER-FILHO, 1989).

1.4 - A família Rutaceae

A família Rutaceae está incluída na ordem Sapindales (sensu Stevens), a qual inclui mais 5 famílias de grande importância na flora neotropical: Anacardiaceae, Burceraceae, Meliaceae, Sapindaceae e Simaroubaceae. Rutaceae é composta por 5 subfamílias, 23 tribos, aproximadamente 150 gêneros e 1600 espécies, distribuídas pelas regiões temperadas e tropicais do mundo todo, sendo mais abundante na América tropical, Sul da África e Austrália (SILVA & PAOLI, 2006). Na região neotropical ocorrem cerca de 52 gêneros e no Brasil, 32 gêneros nativos e 150 espécies, sendo centros de diversidade a floresta Atlântica e a Amazônia (SOUZA & LORENZI, 2005), citado por FARIA *et. al.* (2007).

A família é facilmente distinta pelas folhas com glândulas que aparecem como pontos translúcidos e que secretam óleos essenciais fortemente aromáticos, e pelas folhas essencialmente alternas, opostas em alguns gêneros. A grande maioria das espécies é entomófila, isto é, a polinização é feita principalmente por insetos (PIRANI, 2005). A família possui considerável importância na fruticultura, destacando-se o gênero *Citrus*. Diversas espécies são produtoras de boa madeira como o guaratã, *Esenbeckia leiocarpa* (SOUZA & LORENZI, 2005). Na medicina alopática, algumas espécies do gênero *Pilocarpus*, conhecidas popularmente como Jaborandi, são utilizadas no tratamento de doenças oftálmicas, através de um alcalóide chamado pilocarpina (FARIA, *et al.*, 2007).

A diversidade de classes de metabólitos secundários relatados para Rutaceae, também mostra a importância do estudo de espécies desta família. Foram relatados na literatura a identificação e isolamento de várias classes de substâncias, dentre as quais estão alcalóides dos tipos: acridônicos, 2-arilquinazolínicos, 2-quinolonas, 4-quinolonas, 1-benzilisoquinolínicos,

β -indoloquinazolínicos; cumarinas; flavonóides, lignanas e limonóides. Além disso, foram relatadas na literatura para extratos e compostos destas classes, atividades antibacteriana (NOVAIS *et al.*, 2003), contra larvas do 4º estágio do *Aedes aegypti* (OLIVEIRA *et al.*, 2005 & JANUÁRIO *et al.*, 2009), tripanocida (AMBROZIN *et al.*, 2008). Alcalóides isolados de *Hortia superba* (Rutaceae) (Fig. 1.5), apresentaram atividade inibindo o transporte de elétrons em tilacóides isolados de espinafre (VEIGA, *et al.*, 2008).

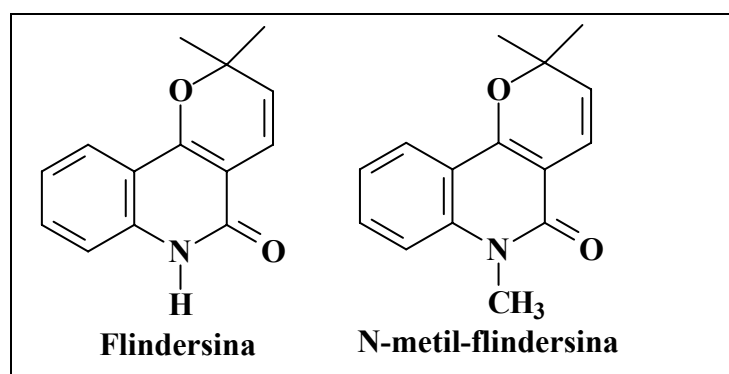


FIGURA 1.5 – Alcalóides inibidores da fotossíntese, isolados da *Hortia superba* (Rutaceae) (VEIGA, *et al.*, 2008).

1.5 - Características químicas e morfológicas do gênero *Conchocarpus*

O gênero *Conchocarpus* (Rutaceae) é formado por 45 espécies, que estão predominantemente distribuídas nas regiões neotropicais, varia de Nicarágua à Bolívia e Brasil. No Brasil foram catalogadas 21 espécies de *Conchocarpus*, com predominância nas regiões nordeste e sudeste do país. Espécies deste gênero geralmente são arbustos ou pequenas árvores de 7 m de altura, constituídas por monocaule ou por caule com poucos ramos relativamente grossos, com folhas nas extremidades (KALLUNGI & PIRANI, 1998).

A sistemática deste gênero foi revista por Kalungi e Pirani, onde

algumas espécies de *Angostura* foram inseridas no gênero *Conchocarpus* (KALLUNGI & PIRANI, 1998). Apesar de não ser um gênero muito explorado quimicamente, relatos na literatura mostram o isolamento de alcalóides acridônicos, quinolônicos, piranoflavonas (AMBROZIN, *et al.*, 2008) (Fig. 1.6), flavonas, cumarinas e triterpenos (VIEIRA, *et al.*, 1992).

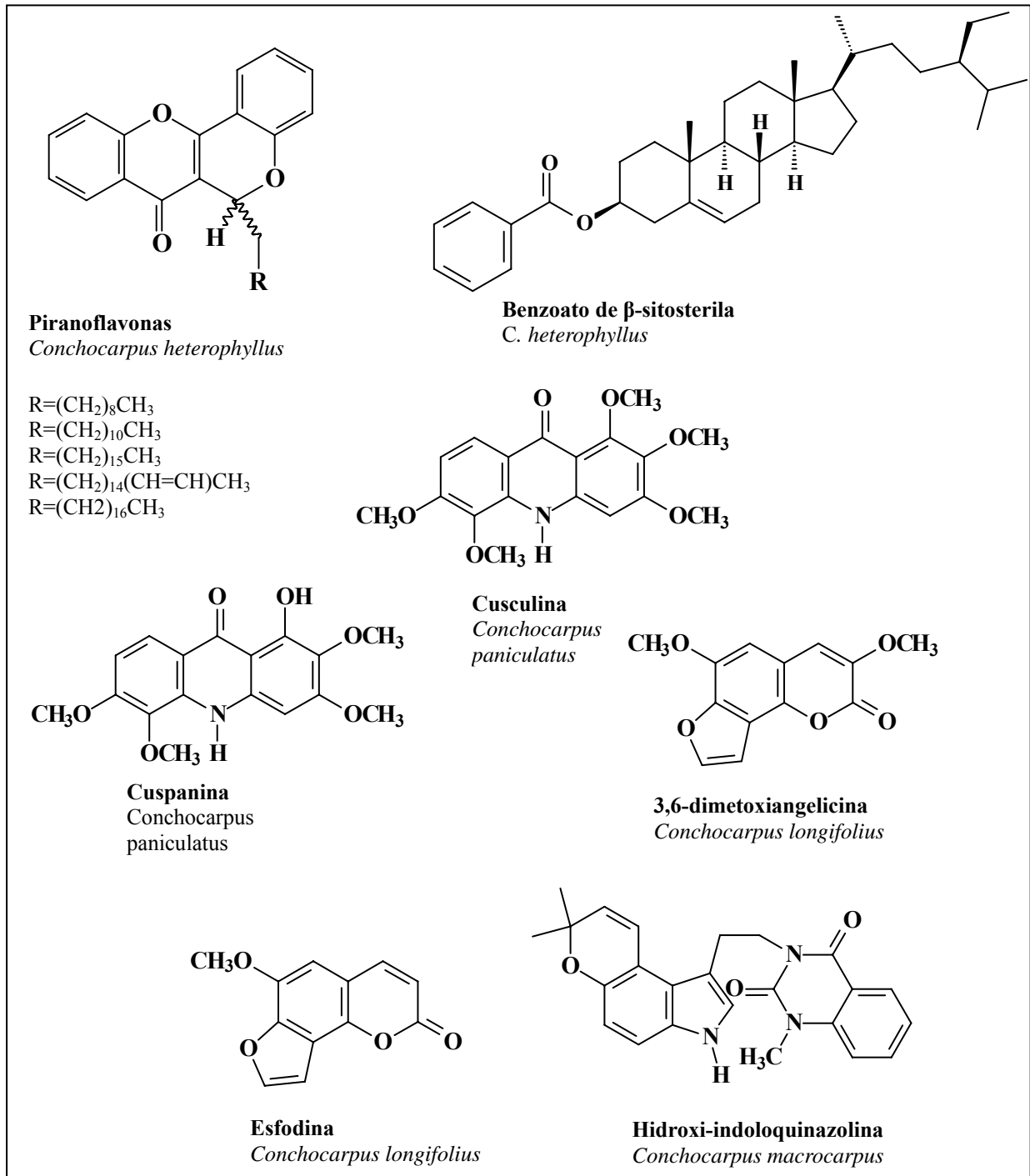


FIGURA 1.6 - Substâncias isoladas do gênero *Conchocarpus* (Rutaceae).

1.6 - *Conchocarpus inopinatus*

A espécie *Conchocarpus inopinatus*, denominada anteriormente como *Angostura samson*, é representada por arvoretas de 0,3 a 1,5 m de altura. As principais características morfológicas distintivas desta espécie, em relação a outras do gênero, estão relacionadas à sua inflorescência, onde as pequenas flores, na qual uma pétala é mais separada do que as outras quatro. A espécie encontra-se localizada principalmente no sul da Bahia, no município de Jussari (KALLUNGI & PIRANI, 1998).

O único relato encontrado, que mostra substâncias isoladas da espécie *Conchocarpus inopinatus*, foi uma tese de doutorado, onde foi feito o estudo fitoquímico apenas das folhas da espécie pelo grupo de produtos naturais da UFSCar. Este estudo levou ao isolamento de alcalóides acridônicos, um seco-acridônico e uma cumarina (Fig. 1.7) (MAFEZOLI, 2002).

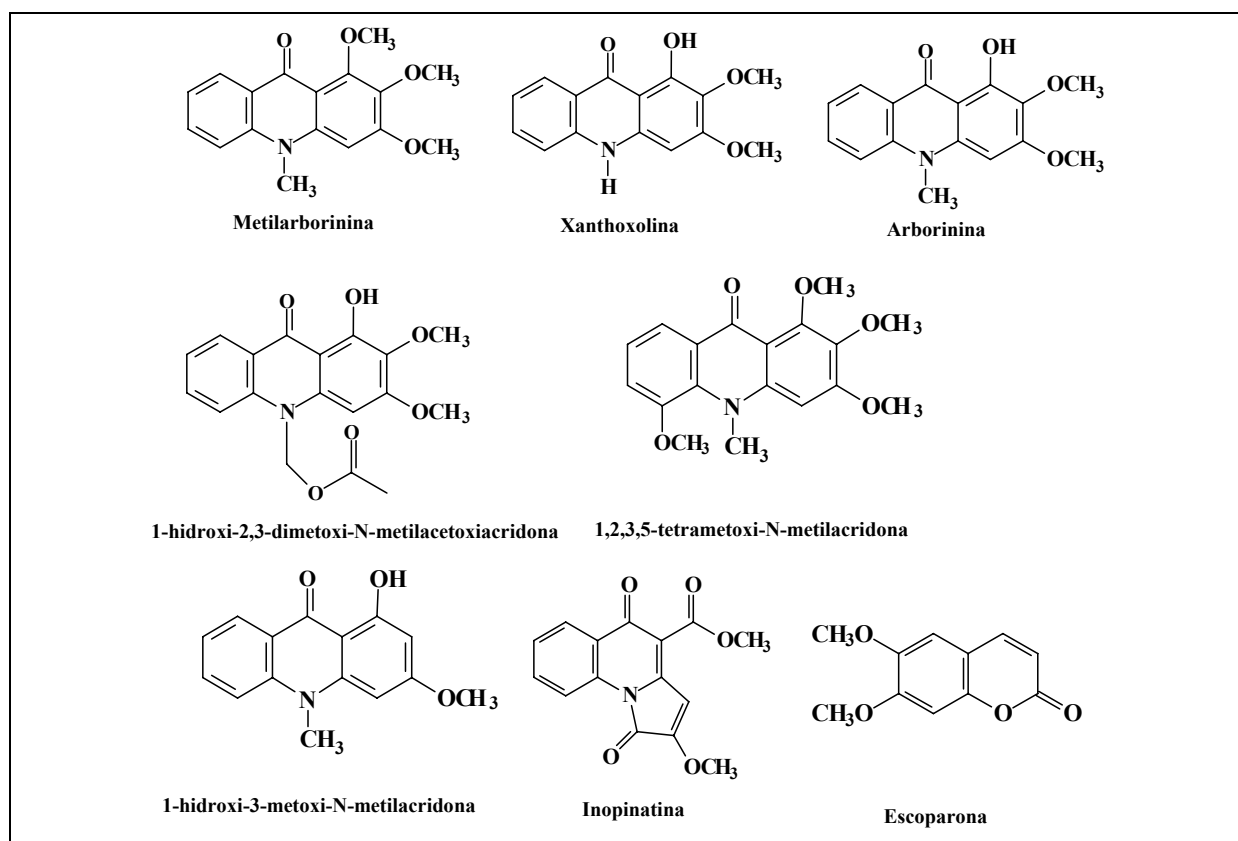


FIGURA 1.7 - Substâncias isoladas das folhas de *Conchocarpus inopinatus* (MAFEZOLI, 2002).

1.7 - As plantas daninhas e a agricultura

Um dos principais problemas na produção agrícola é o surgimento de plantas daninhas, as quais interferem no desenvolvimento das plantas de cultivo através da competição por água, luz e nutrientes, através da alelopatia, do parasitismo e como hospedeiros de pragas e doenças. Este problema se agrava ainda mais nos casos em que se reduz o uso dos agrotóxicos, que se usados de modo descontrolado, prejudicam a saúde humana e o meio ambiente (RAFAELLI *et al.*, 2010).

A agricultura intensiva praticada no Brasil é favorecida pelas condições climáticas do país. Entretanto, o clima tropical é também muito favorável à ocorrência de grandes quantidades de plantas daninhas, que interferem no desenvolvimento e na produtividade de diversas culturas. As perdas na safra de milho, por exemplo, no período entre 2008 e 2009 no Brasil, foram próximas a seis milhões de toneladas, em algumas áreas há estimativas de redução de até 85% na produção desta cultura (ARAÚJO, 2009). Assim, a agricultura brasileira representa um dos grandes mercados mundiais para pesticidas químicos, aplicando cerca de 700 milhões de toneladas de agrotóxicos por ano. O emprego destes agentes químicos resultou no aumento da produtividade, mas por outro lado, trouxe consequências adversas ao homem, visto serem estes agentes nocivos ao homem e ao ambiente (NORONHA, *et al.*, 2010).

A detecção da contaminação ambiental por agroquímicos exige o estabelecimento de políticas ambientais severas, que controlem o uso abusivo e indiscriminado destes produtos e que incentivem a pesquisa por métodos e produtos alternativos para o controle de pragas.

1.8 – Produtos Naturais como Herbicidas

Os produtos naturais são uma das fontes mais ricas e promissoras de novos compostos com atividade fitotóxica e reguladora de crescimento de plantas. Estudos revelam que diversas classes de substâncias naturais como: taninos, glicosídeos cianogênicos, alcalóides, sesquiterpenos, flavonóides, cumarina e ácidos fenólicos possuem atividade alelopática (KING & AMBIKA, 2002; ELJARRAT & BARCELÓ, 2001). Estes produtos naturais fitotóxicos são em geral estruturalmente mais complexos que herbicidas sintéticos e não são obtidos por metodologias sintéticas tradicionais. Por este motivo a diversidade encontrada em produtos naturais para gerar novas classes de compostos em programas sintéticos tradicionais é explorada lentamente (DUKE, *et al.*, 2000).

Os herbicidas representam mais da metade do volume de todos os agrotóxicos aplicados no mundo desenvolvido, por isso há uma potencial preocupação com os danos para a saúde e o impacto ambiental que tais compostos podem gerar (NORONHA, *et al.*, 2010). A elevada dose de agroquímicos afeta o balanço de microorganismos no solo, gerando também uma deficiência de nutrientes e mudança nas propriedades físico-químicas do solo, resultando na redução da produtividade da colheita (ALVES, *et al.*, 2003).

Produtores de culturas orgânicas citam o controle de plantas daninhas como sua maior dificuldade na produção agrícola, porque não é permitido o uso de herbicidas sintéticos neste tipo de cultura (GIANESSI & REIGNER, 2007). A necessidade de novos produtos, com diferentes mecanismos de ação, possuindo espectro mais amplo para controle de plantas daninhas, com menor impacto ambiental torna-se cada vez mais evidente. Isto porque a cada dia, novas espécies de plantas daninhas tolerantes ou resistentes aos herbicidas atuais surgem em nossos campos (ALVES, *et al.*, 2003). Com o objetivo de evitar os possíveis danos e impactos ambientais causados pelos

herbicidas sintéticos, alguns trabalhos vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de obter compostos isolados de plantas para uso potencial na agricultura no controle de plantas daninhas (DAYAN, *et al.*, 2009). Alguns compostos isolados de planta têm mostrado serem possíveis protótipos para herbicidas, como por exemplo alguns furanoditerpenos, cumarina (Fig. 1.8) e alcalóides, os quais se mostraram ativos inibindo a fotossíntese através do bloqueio do transporte de elétrons (KING-DÍAZ, *et al.*, 2010; VEIGA, *et al.*, 2008; VEIGA, *et al.*, 2007).

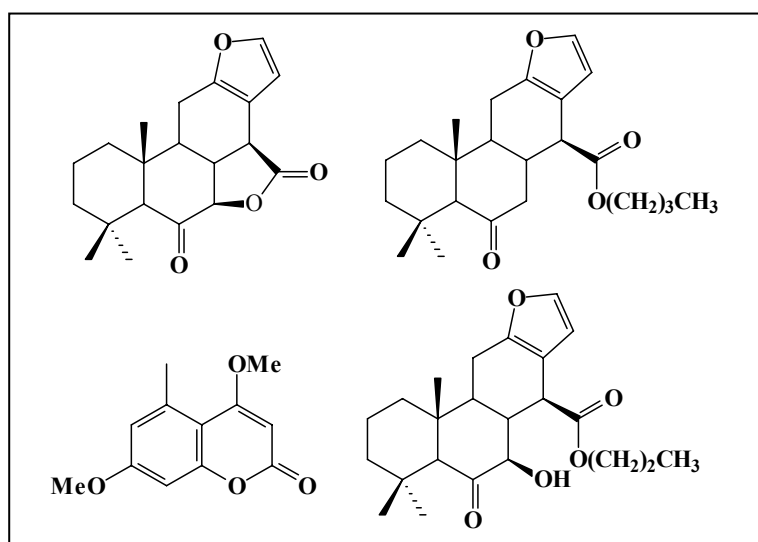


FIGURA 1.8 – Compostos que apresentaram atividade na inibição da fotossíntese.

1.9 – Herbicidas e a Fotossíntese.

Os herbicidas inibidores da fotossíntese são uma classe de pesticidas amplamente empregada na agricultura brasileira nas culturas de milho, cana-de-açúcar, soja, frutíferas, hortaliças, entre outras. Uma das consequências da atuação desses herbicidas ao atuarem na espécie alvo, é o declínio da fixação de CO_2 pela planta daninha através do bloqueio do fluxo de elétrons na cadeia fotossintética. Uma das vantagens destes tipos de compostos que inibem a fotossíntese é que não apresentam problemas de deriva por volatilização, pois possuem pressão de vapor baixa, isto evita perdas dos

compostos e também diminui a possibilidade de intoxicação por inalação do produto, podendo ser aplicado na superfície do solo (GREAVES, 1996).

1.9.1 – O transporte de elétrons na fotossíntese.

Na fotossíntese, a fonte primária de elétrons é a oxidação da água e o aceptor final de elétrons é o NADP^+ . Quase todos os processos que perfazem as reações luminosas da fotossíntese são realizados por quatro principais complexos protéicos: fotossistema II, o complexo citocromo b_6f , fotossistema I e a ATP sintase (Fig. 1.9). A função da luz é excitar uma molécula de clorofila especializada no centro de reação, por absorção direta ou, mais frequentemente, via transferência de energia de um pigmento antena. A primeira reação que converte a energia do elétron em energia química, isto é, o primeiro evento fotoquímico, é a transferência de um elétron do estado excitado de uma clorofila no centro de reação para uma molécula aceptor (Feofitina) (TAIZ & ZEIGER, 2004).

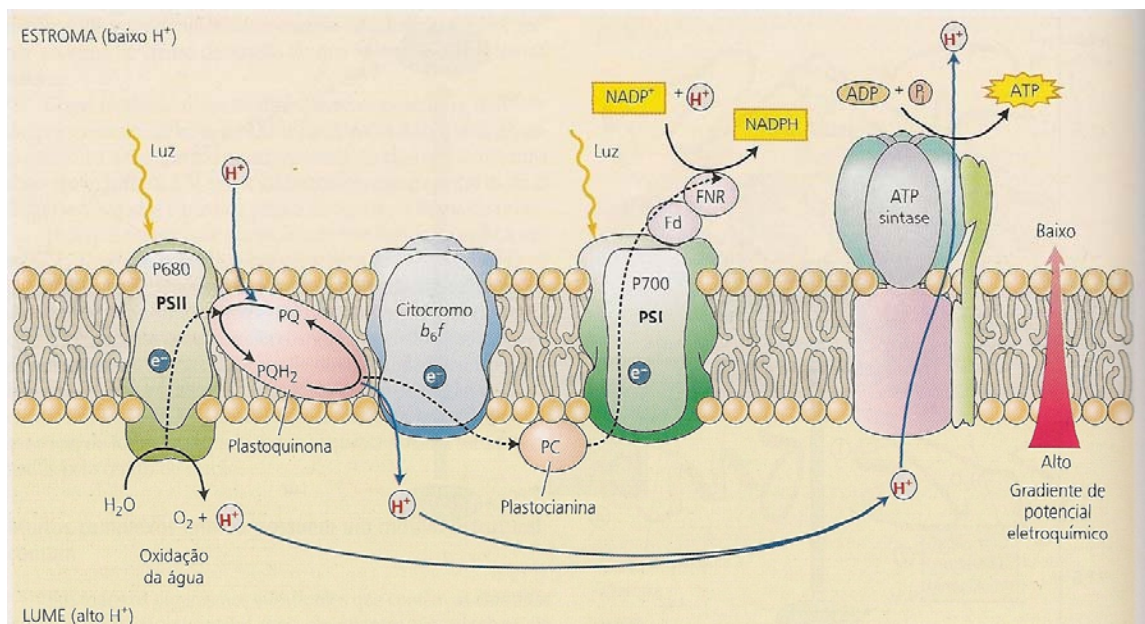


FIGURA 1.9 - Gradiente de prótons e transporte de elétrons através dos 4 complexos fotossintéticos principais: Fotossistema II (PSII), Fotossistema I (PSI), Citocromo b_6f e ATP sintase.

O FSII é constituído por um complexo transmembrana formado por cerca de 22 proteínas. O núcleo do FSII é formado pelas subunidades protéicas D_1 e D_2 que atravessam as membranas dos tilacóides. Os polipeptídios D_1 e D_2 contêm o P680 (dímero de clorofila a), a molécula receptora primária de elétrons (Feofitina) e sítios de ligação para a ancoragem de moléculas carregadoras de elétrons móveis denominadas plastoquinonas (Q_A e Q_B). O FSII interage diretamente com o complexo protéico que catalisa a fotoxidação da água, o complexo de evolução de O_2 (KERBAUY, 2004).

O FSII promove a transferência de elétrons, induzida pela luz, da água para a plastoquinona. Havendo excitação eletrônica, os elétrons do CR do FSII são ejetados a partir de dímeros de clorofila-*a* (P680) e recebidos pela feofitina (molécula receptora primária), que, imediatamente, os transfere para a plastoquinona. A plastoquinona varia intercaladamente de uma forma oxidada (PQ) a uma forma reduzida (PQH_2 , plastoquinol). PQ liga-se aos sítios Q_A e Q_B do FSII e, ao receber elétrons, forma PQH_2 . A forma reduzida da plastoquinona é então liberada dentro do *pool* da membrana (conjunto numeroso de moléculas de plastoquinona). Na seqüência, PQH_2 transfere elétrons ao complexo citocromo *b₆f*, enquanto os prótons (H^+) são lançados para o interior do lúmen dos tilacóides, contribuindo para a geração do gradiente transmembrana entre o lúmen e o estroma dos cloroplastos. PQ volta a ocupar os sítios Q_A e Q_B , dando continuidade ao fluxo local de elétrons entre a feofitina reduzida e o complexo citocromo oxidado pelo CR do FSI ($P700^+$) (KERBAUY, 2004).

Muitos herbicidas inibidores do fotossistema II se ligam à proteína D-1 no sítio onde se prende a plastoquinona “ Q_B ”. Esses herbicidas competem com a plastoquinona “ Q_B ” parcialmente reduzida (Q_BH) pelo sítio na proteína D-1, ocasionando a saída da plastoquinona e interrompendo o fluxo de elétrons entre os fotossistemas. Além da competição em si pelo sítio na proteína, os herbicidas apresentam maior tempo de residência do que a plastoquinona “ Q_B ”,

o que aumenta o seu efeito inibitório (SPADOTTO, 2002). A amicarbazona é um exemplo deste tipo de herbicida, é um potente inibidor do transporte de elétrons, induzindo a fluorescência da clorofila-*a* e interrompendo a evolução de oxigênio. Estudos relatam que, após ser aplicada na raiz da planta, a amicarbazona inibe o transporte de elétrons nas folhas, o que significa a rápida translocação do herbicida das raízes para as folhas. As respostas fenotípicas das plantas sensíveis expostas à amicarbazona incluem clorose, crescimento atrofiado, necrose do tecido foliar e morte de plantas daninhas (DAYAN *et al.*, 2009).

Herbicidas sintéticos como o DCMU, conhecido como diuron, inibem o transporte de elétrons pelo lado aceptor do fotossistema II, bloqueando a redução de Q_B por Q_A . O Metilviologênio, conhecido como paraquat, aceita elétrons no lado aceptor do fotossistema I (Fig. 1.10), evitando a redução do $NADP^+$ a $NADPH$.

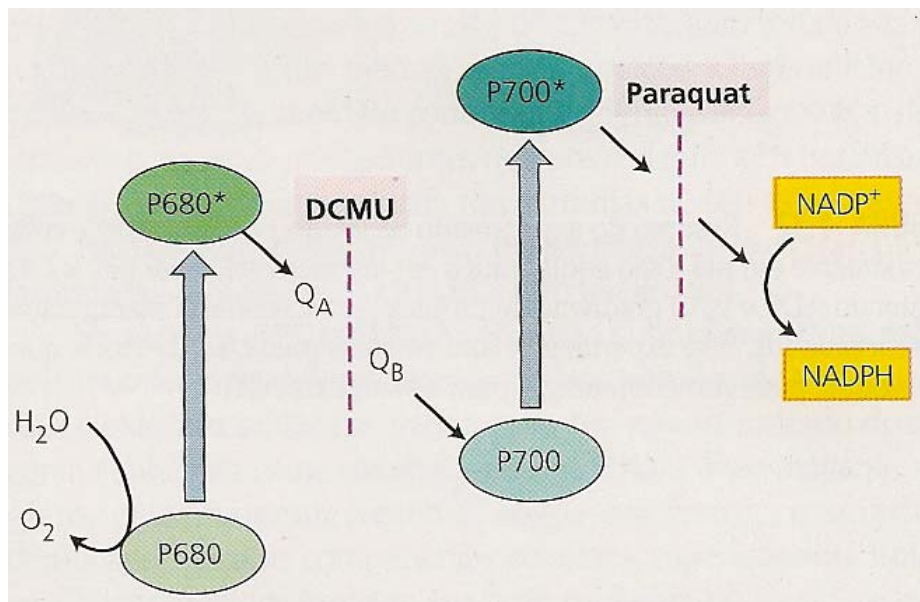


FIGURA 1.10 - Mecanismo de ação de dois importantes herbicidas (DCMU e PARAQUAT) que bloqueiam o fluxo de elétrons fotossintéticos.

1.10 - Fluorescência

A fluorescência é uma das formas de dissipação de energia nos cloroplastos após ocorrer a excitação dos elétrons das moléculas aceptoras. Ocorre primeiramente a absorção de energia eletromagnética, com um comprimento de onda menor do que o emitido na forma de fluorescência. A conversão da energia luminosa em energia química não é um processo perfeito, pois nem todos os elétrons que estão no seu estado excitado são transferidos para os aceptores primários do fotossistema. Estes retornam aos seus estados fundamentais e essa dissipação de energia ocorre na forma calor ou fluorescência (emissão de radiação da região do visível (vermelho e vermelho distante) (KERBAUY, 2004).

O uso da fluorescência da clorofila-*a* para monitorar o desempenho fotossintético em algas e plantas já é bem difundido. Butler desenvolveu um simples modelo para o fotossistema II (PSII) no qual a fotoquímica compete com o processo de fluorescência e a perda de calor por excitação no pigmento antena do PSII (Fig. 1.11) (BAKER, 2008). Um crescimento na razão de perda de calor resulta num *quenching* não fotoquímico. O modelo de Butler prevê que a emissão da fluorescência no PSII pode ser usado para monitorar mudanças na fotoquímica, desde que as constantes de velocidade para fluorescência e perda de calor não alterem.

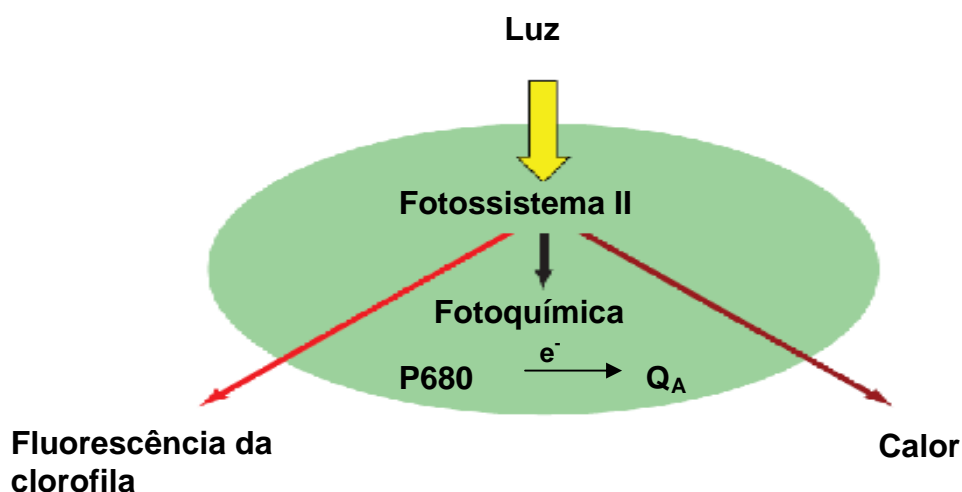


FIGURA 1.11 - Modelo dos possíveis destinos da energia luminosa absorvida pelo FSII.

Entre as técnicas disponíveis para avaliar condições de *stress* em termos de fotossíntese é a medida direta da fluorescência da clorofila-*a*, combinando algumas vantagens: é um método fácil e rápido, de fácil reprodutibilidade, praticidade para processar os dados e reportar os resultados, os instrumentos disponíveis no mercado são relativamente de baixo custo e os procedimentos de medição de fluorescência não são muito dispendiosos (BUSSOTTI *et al.*, 2007).

A progressão ascendente dos transientes, obtida por meio de medidas em cloroplastos adaptados ao escuro, é induzida pela saturação com luz vermelha. Em uma escala logarítmica de tempo, o aumento dos transientes de F_0 (Fluorescência a $50\mu\text{s}$, quando todos os centros de reação do fotossistema II estão abertos, isto é, quando o aceptor primário quinona (Q_A) está totalmente oxidado) para F_P (onde $F_P = F_M$ sob saturação de luz, quando a intensidade de excitação é alta o bastante para garantir o fechamento de todos os centros de reação do fotossistema II), isto é, a total redução de todos os centros de reação tem um comportamento polifásico (BUSSOTTI *et al.*, 2007).

Medidas de fluorescência também podem indicar a ação de algumas

substâncias inibidoras da fotossíntese. O DCMU, herbicida, inibe a transferência de elétrons da Q_A ao acceptor secundário do fotossistema II (PSII), que resulta em uma redução rápida do Q_A e um aumento na fluorescência.

O modelo incluindo os transientes OJIP simula a cinética de fluorescência, a emissão de fluorescência passa de um nível inicial O para um nível máximo P através de transientes intermediários J e I. Cálculos computacionais com variável de integração numérica, de MATLAB, e equações diferenciais, forneceram dados para montar experimentos e teste de hipóteses quanto ao mecanismo subjacente controlando a cinética OJIP e emissão de fluorescência nesses pontos. Simulações com base neste modelo mostraram que J corresponde às concentrações máximas de $Q_A^-Q_B$ (Q_A e Q_B são a primeira e segunda quinona acceptoras de elétrons do FSII, respectivamente) (ZHU *et al.*, 2005). O pico de P coincide com o máximo de concentração de $Q_A^-Q_B^{2-}$ e PQH_2 . Além disso, simulações usando este modelo sugerem que diferentes proporções da antena periférica com a antena do núcleo podem provocar diferenças na emissão de fluorescência em O, sem afetar a emissão de fluorescência em J, I e P. Um aumento na concentração de Q_B não reduzida no FSII, leva a uma maior emissão de fluorescência em O, e conseqüentemente diminui a proporção de fluorescência variável/fluorescência máxima (F_v/F_m) (ZHU *et al.*, 2005).

A fluorescência da *clorofila-a* para examinar a performance fotossintética e *stress* em algas e plantas é agora difundido em estudos fisiológicos e ecofisiológicos. Fluorescência pode então ser um poderoso instrumento para estudo de performance fotossintética (BAKER, 2008).

1.11 - JUSTIFICATIVA

O fato de que uma crise ambiental está diminuindo os recursos de produção de alimentos faz o mundo ficar alarmado. A produção de alimentos em larga escala, principalmente quando se refere a produtos para exportação, exige cada vez mais o uso de controladores de pragas na agricultura para tornar os produtos mais comercializáveis. Entretanto, o uso desses pesticidas, principalmente herbicidas sintéticos, os quais podem gerar produtos de degradação no solo muitas vezes mais tóxicos do que o próprio produto ativo no controle de plantas daninhas, tem agravado o problema de contaminação em águas e solos, tornando-os muitas vezes impróprios para a prática do cultivo (MAMY *et. al.*, 2010).

Em relação à ação dos produtos químicos e mais propriamente dos herbicidas sobre o meio ambiente, vários fatores são conhecidos por influenciar o comportamento desses produtos sobre o meio em que atuam; o destino dos herbicidas é decidido através dos efeitos de vários processos físico-químicos e biológicos, que causam a degradação e o movimento do produto. Muitos herbicidas sintéticos, como o Dalapon, Bromacil, Ametrina, Diuron, por exemplo, apresentam solubilidade relativamente alta em água, o que pode conduzir a danos de contaminação do meio ambiente por lixiviação, contaminando aquíferos e outras fontes de água potável (GUIMARÃES, 1987). Portanto, a busca por produtos naturais para controle de pragas torna-se cada vez mais necessária, uma vez que, pesquisas vêm mostrando para metabólitos secundários os mais variados mecanismos de ação na inibição da fotossíntese (VEIGA, *et al.*, 2007); (MORALES, *et al.*, 2007) e também atuando em enzimas no ciclo C4 de plantas (HAINES, *et al.*, 2005).

Existem poucos estudos fitoquímicos publicados sobre a *Rhabdodendron amazonicum*, espécie cuja sistemática ainda é polêmica, e

também não há relatos sobre ensaios biológicos de extratos ou compostos isolados desta espécie. Além disso, experimentos realizados pelo grupo de Produtos Naturais da UFSCar demonstraram que as frações do extrato etanólico apresentaram atividade na inibição da fotossíntese, com resultados obtidos através de medidas de fluorescência da clorofila-*a* (Chl α), o que despertou o interesse para o estudo fitoquímico desta espécie, a fim de testar a ação dos metabólitos secundários isolados, no sistema fotossintético, além disso, contribuir para a quimiosistemática da Rhabdodendraceae.

Estudos já realizados pelo grupo de Produtos Naturais da UFSCar mostraram que os alcalóides acridônicos constituem uma classe promissora como inibidores da fotossíntese (Fig. 1.12). Com esta informação, foi escolhida também para estudo fitoquímico o extrato do caule de *Conchocarpus inopinatus*, o qual ainda não foi estudado e cujos espectros de RMN ^1H de seus extratos apresentaram sinais característicos de aromáticos. Além disso, apesar de não haver relatos de estudo fitoquímico desta espécie, além do estudo fitoquímico das folhas realizado pelo grupo de Produtos Naturais da UFSCar, a literatura relata o isolamento de alcalóides acridônicos de outras espécies do gênero *Conchocarpus*.

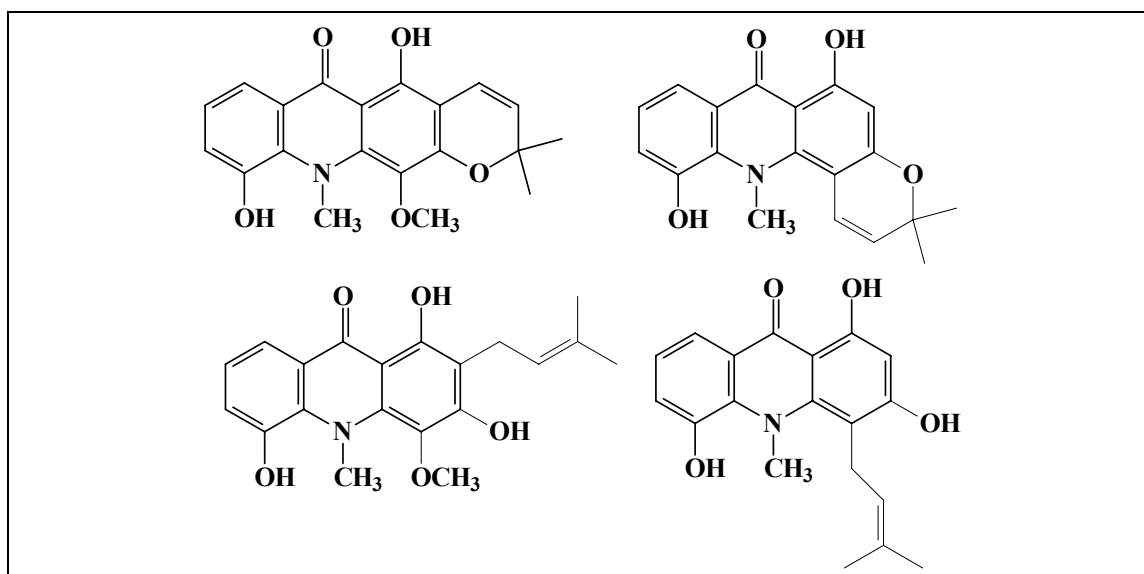


FIGURA 1.12 - Estruturas de alguns alcalóides acridônicos ensaiados na inibição da fotossíntese pelo grupo de PN da UFSCar.

2 – OBJETIVOS

2.1 - Avaliar o perfil químico da *R. amazonicum* visando contribuir para uma melhor classificação do gênero.

2.2 – Isolar e testar os compostos das espécies *Conchocarpus inopinatus* e *Rhabdodendron amazonicum* na inibição do transporte de elétrons (Basal, desacoplado e fosforilante), e caso sejam ativos, elucidar o mecanismo de ação destes compostos frente ao sistema fotossintético.

3 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 – Estudo fitoquímico da *Rhabdodendron amazonicum*.

3.1.1 - Coleta do material botânico

As folhas da *Rhabdodendron amazonicum* foram coletadas na Reserva Florestal Ducke-INPA, localizada no km 26 da estrada Manaus-Itacoatiara. A coleta e identificação foram feitas pelo Prof. Dr. José Rubens Pirani do Departamento de Botânica, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, em 2007.

3.1.2 - Preparação dos extratos

As folhas da espécie *Rhabdodendron amazonicum* foram secas em estufa de circulação a 40 °C durante aproximadamente 8 dias e posteriormente trituradas em moinho. Em seguida, 1,070 Kg do material seco e moído foi submetido a extração à temperatura ambiente com etanol por 9 dias, sendo a troca do solvente feita a cada 3 dias, com 3 agitações por dia. Após a evaporação do solvente, obteve-se 85 gramas do extrato etanólico, esse extrato foi fracionado em coluna via úmida, sob vácuo, com eluição gradiente utilizando Hexano, Diclorometano, Acetato de Etila e Metanol (Fig. 3.1).

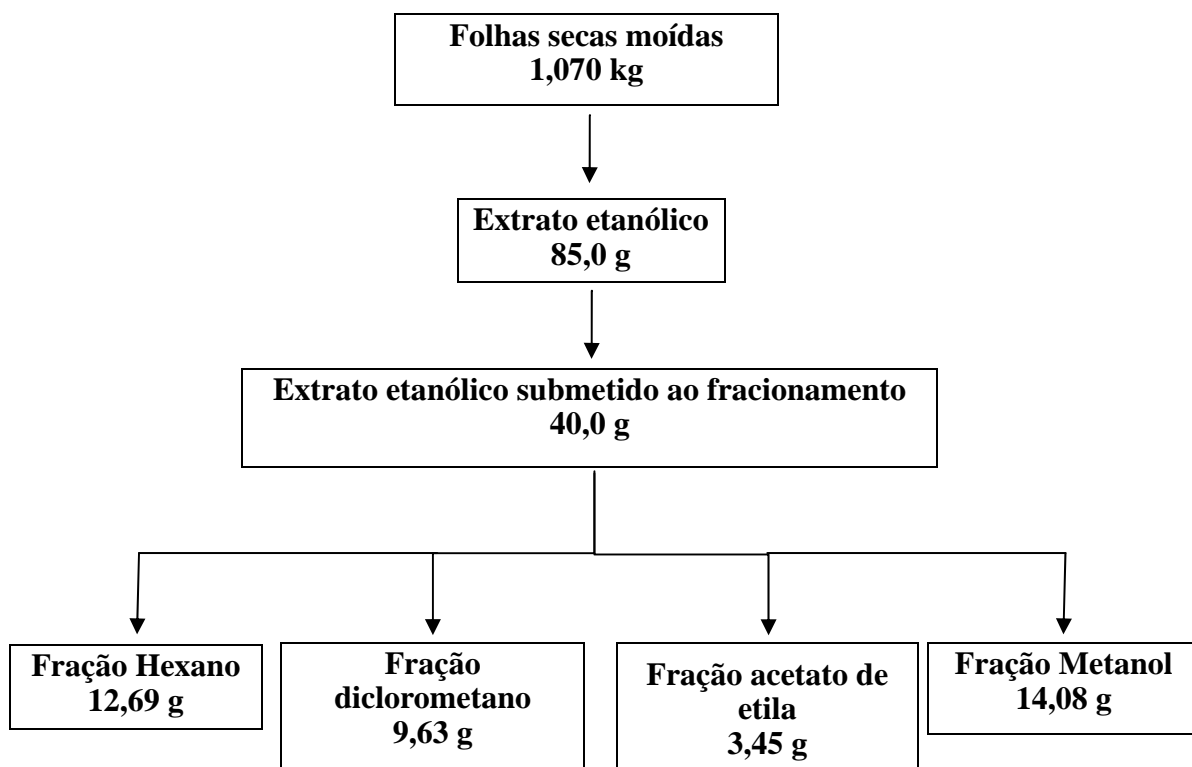


FIGURA 3.1 - Fracionamento do Extrato Etanólico das folhas da *Rhabdodenron amazonicum*.

3.1.3 - Isolamento das substâncias da *Rhabdodendron amazonicum*

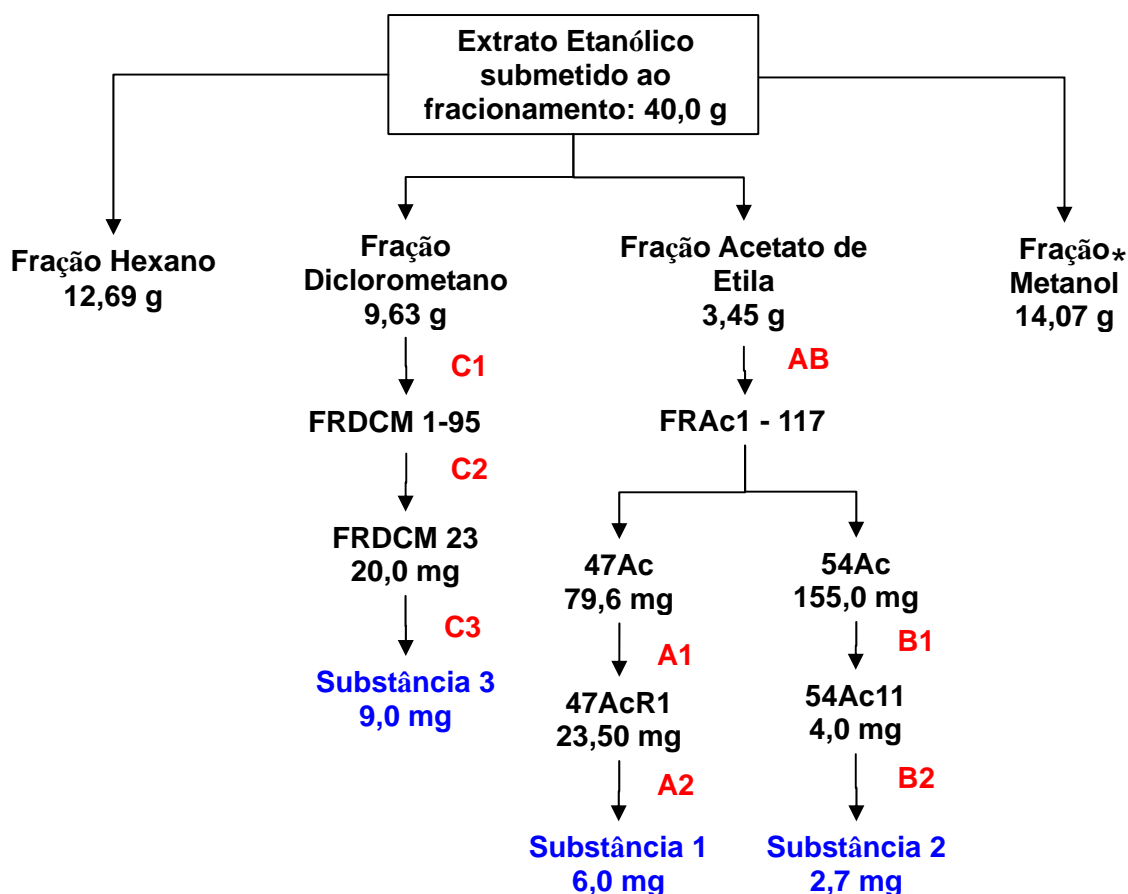


FIGURA 3.2 - Fracionamento para a obtenção das substâncias de *Rhabdodendron amazonicum*.

- **Isolamento da substância 1.**

AB - Coluna de sílica gel 60 (230 – 400 mesh), $\theta \times h$ (5,0 cm x 28 cm), Hexano : Diclorometano (9:1 v/v), Hexano : Diclorometano (7:3 v/v), Hexano : Diclorometano (1:1 v/v), Hexano : Diclorometano (3:7 v/v), Hexano : Diclorometano (1:9 v/v), Diclorometano puro, Diclorometano : Acetato de Etila (8:2 v/v), Diclorometano : Acetato de Etila (6:4), Diclorometano : Acetato de Etila (4:6 v/v), Diclorometano : Acetato de Etila (2:8 v/v), Acetato de Etila puro, Acetato de Etila : Metanol (9:1 v/v), Acetato de Etila : Metanol (7:3 v/v), Acetato de Etila : Metanol (1:1 v/v). Após este fracionamento, o qual gerou 117

frações, foram feitas as reuniões de algumas frações semelhantes com base em análises com a utilização de cromatografia em camada delgada. Em, analisando os espectros de RMN ^1H , foram selecionadas as frações 47 Ac e 54 Ac para serem trabalhadas.

A1- Sephadex LH-20, Eluente: Metanol : Diclorometano (8:2 v/v).

A2- Coluna de sílica gel 60 (230 – 400 mesh), θ x h (1,5 cm x 11 cm). Modo de eluição: isocrático. Eluente: Hexano/Acetato de Etila 3:7.

- **Isolamento da substância 2.**

AB – Mesmo fracionamento utilizado para a substância 1 (ver acima).

B1- Sephadex LH-20, Eluente: Metanol : Diclorometano (75:25 % v/v).

B2- HPLC SHIMADZU SCL-10A. Detector UV em comprimento de onda de 254 nm. Coluna θ x h 31,0 X 1,0 cm, utilizando como fase estacionária C18, octadecilsiloxano. Modo Reverso de eluição isocrática, usando como fase móvel: MeOH/H₂O 6:4. Volume de injeção: 200 μL . Fluxo: 6 mL/min (Fig. 2.3).

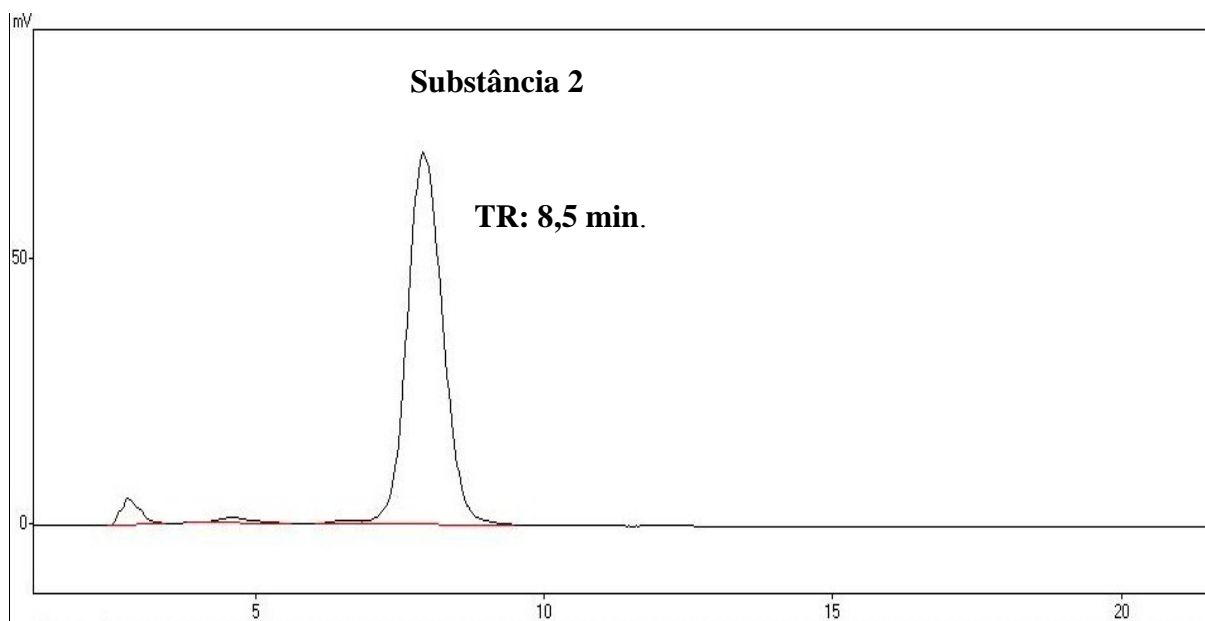


FIGURA 3.3 - Cromatograma para separação da substância 2, por CLAE.

- **Isolamento da substância 3.**

C1- Coluna de sílica gel 60 (230 – 400 mesh), $\theta \times h$ (5,0 cm x 28 cm). Modo gradiente de eluição. Fase móvel: Hexano/Acetato de Etila 9:1; 8:2; 7:3; 6:4; 1:1. Massa fracionada: 3,3537 g.

C2- Após reuniões por CCD e análise de RMN ^1H das frações DCM-1 a DCM-95, a fração DCM-23 foi selecionada como prioridade.

C3- Separação por precipitação, gotejando com EtOH a fração FRDCM23 previamente solubilizada em diclorometano. O precipitado branco foi a substância 3.

3.2 – Estudo fitoquímico de *Conchocarpus inopinatus* (Rutaceae).

3.2.1 - Coleta do material botânico

A espécie *Conchocarpus inopinatus* Kallunki, foi coletada no estado da Bahia, município de Jussari, estrada para Palmira, por J. A. Kallunki e colaboradores. As espécimes-testemunhas foram depositadas nos herbários SPF (Herbário do Departamento de Botânica da USP), exsicata de nº 433.

3.2.2 - Obtenção dos extratos

O extrato metanólico do caule da *Conchocarpus inopinatus* já se encontrava preparado no laboratório de Produtos Naturais da UFSCar, e foi preparado da seguinte maneira, segundo MAFEZOLI (2002):

O material vegetal foi seco em estufa com ar circulante a uma temperatura em torno de 60 °C durante uma semana, triturado mecanicamente e extraído com metanol, com 3 extrações com um intervalo mínimo de 2 dias entre cada uma delas. O extrato foi concentrado, por destilação do solvente sob pressão reduzida, em evaporadores rotativos da Buchi modelos R-114 e EL-131.

3.2.3 - Isolamento das substâncias de *Conchocarpus inopinatus*

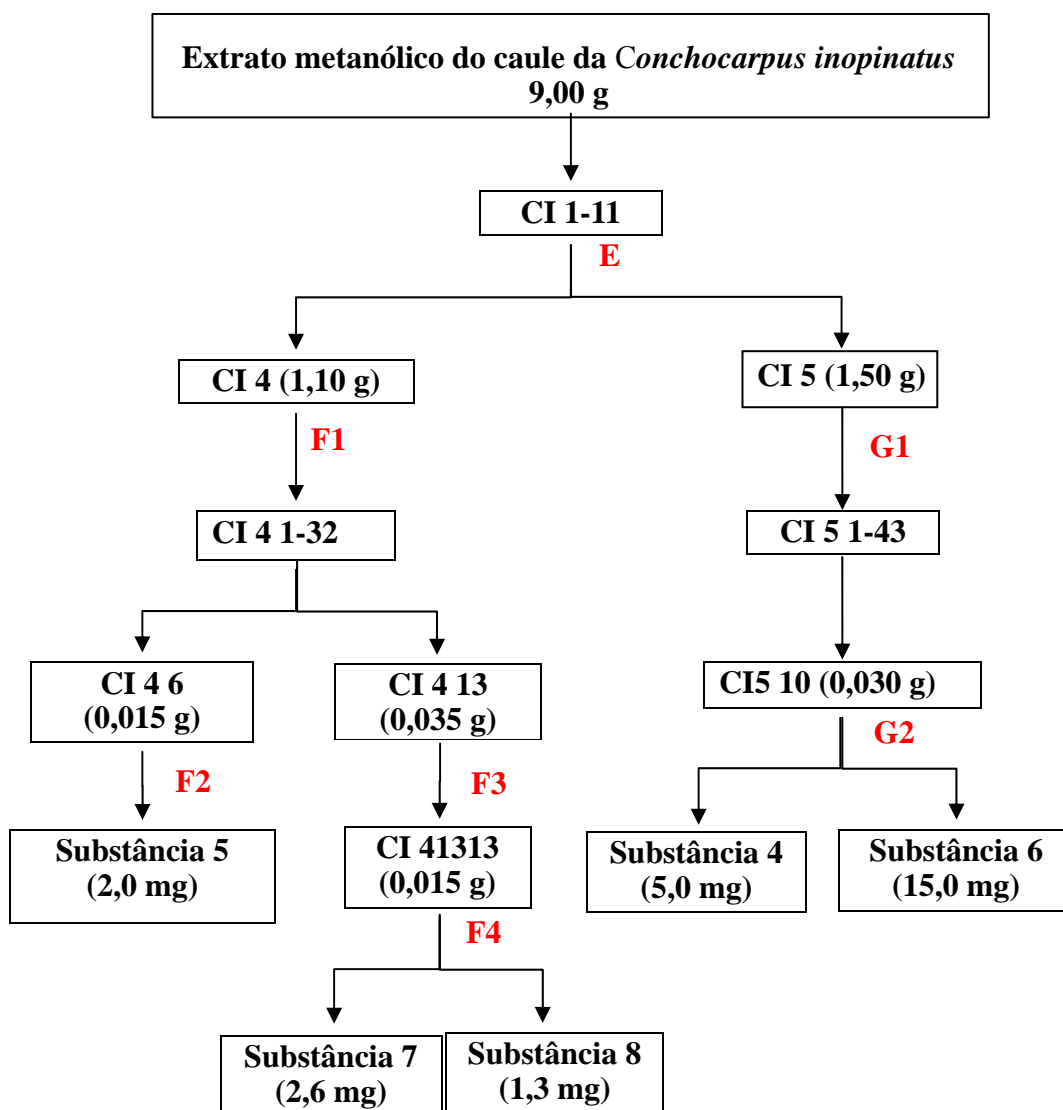


FIGURA 3.4 - Fracionamento para isolamento das substâncias de *Conchocarpus inopinatus*.

E- Sephadex LH-20, Eluente: Metanol. Na busca por alcalóides, foram selecionadas dentre as 11 frações, as frações CI-4 e CI-5 a partir de análises de CCD, utilizando como reveladores a luz UV λ 254nm e 365 nm e o reagente Dragendorff, e também a partir da análise dos espectros de RMN ^1H .

- **Isolamento das substância 4 e 6.**

G1- Coluna de sílica gel 60 (230 – 400 mesh), θ x h (3,5 cm x 13,0 cm). Modo isocrático de eluição. Fase móvel: Hexano/Acetato de Etila (1:2).

G2- Separação em CLAE preparativo, utilizando como fase estacionária sílica modificada com octadecilsilano (C18); coluna θ x h (1,0 cm x 31,0 cm); fase móvel: ACN/H₂O 2:8.

- **Isolamento da substância 5.**

F1- Coluna de sílica gel 60 (230 – 400 mesh), θ x h (3,5 cm x 20,0 cm). Modo isocrático de eluição. Fase móvel: Acetato de Etila/Diclorometano no 3:1. Dentre as frações CI 4 -1 a CI 4-32, após a reunião das frações semelhantes, foram selecionadas as frações CI4-6 e CI4-13 para serem trabalhadas, uma vez que mostraram características de substâncias aromáticas no espectro de RMN ¹H e também revelaram em Dragendorff, dando indícios que poderia ser alcalóide.

F2- Coluna de sílica gel 60 (230 – 400 mesh), θ x h (1,5 cm x 10,0 cm). Modo isocrático de eluição. Fase móvel: Hexano/Acetato de Etila 3:1.

- **Isolamento das substâncias 7 e 8.**

F3- Coluna de sílica gel 60 (230 – 400 mesh), θ x h (3,5 cm x 10,0 cm). Modo isocrático de eluição. Fase móvel: Hexano/Acetato de Etila 1:1.

F4- Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Fase estacionária: Propildiol. Coluna: 10 μ , θ x h (30,0 x 0,78cm). Eluição isocrática, modo normal. Fase: Hexano/EtOH % v/v (9:1) grau HPLC .

- **CLAE analítico para otimização das condições de separação das substâncias 6 e 9.**

Os seguintes parâmetros foram iguais para todas as análises:

I- Fase estacionária: sílica modificada com propildiol

II- Coluna analítica: 10 μ , θ x h (25,0 x 0,46cm).

III-Concentração da fração CI41313: 1mg/m

IV-Volume de injeção: 10 μ L.

V- Vazão da fase móvel: 1 mL/min.

1ª Eluição:

Fase móvel: Hexano/Etanol 3:1.

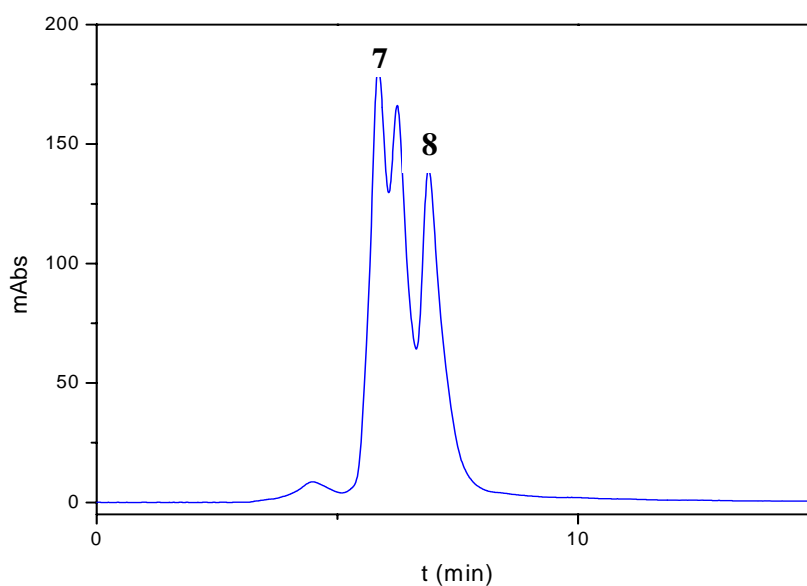


FIGURA 3.5 - Cromatograma no modo analítico para separação dos compostos 7 e 8. Fase móvel: Hexano/Etanol 3:1, Detector UV, $\lambda=365$ nm.

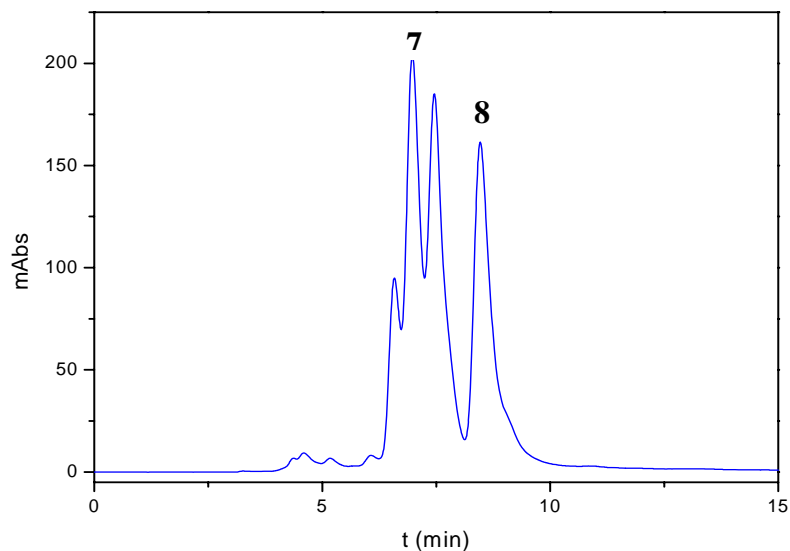
2ª Eluição. Fase móvel: Hexano/Etanol 4:1.

FIGURA 3.6 - Cromatograma modo analítico para separação dos compostos 7 e 8. Fase móvel: Hexano/Etanol 4:1, Detector UV, $\lambda=365$ nm.

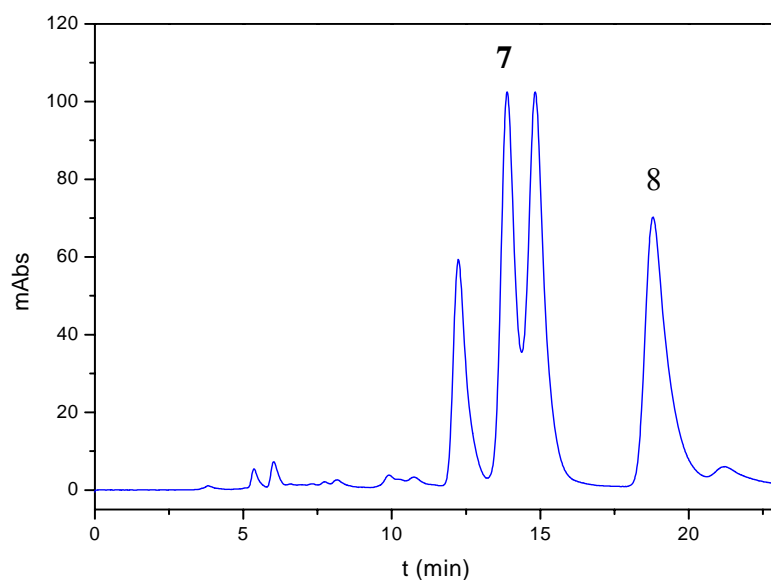
3ª Eluição: Fase móvel: Hexano/ Etanol 9:1.

FIGURA 3.7 - Cromatograma modo analítico para separação de 7 e 8. Fase móvel: Hexano/Etanol 9:1, Detector UV, $\lambda=365$ nm.

3.3 - *Materiais e Métodos*

Métodos cromatográficos

No fracionamento do extrato e frações foram utilizadas as técnicas cromatográficas por adsorção em coluna aberta e cromatografia por exclusão com a utilização das seguintes fases estacionárias:

- **Cromatografia em coluna (CC):**

- I. Sílica Gel 60 (70-230 mesh e 230-400 mesh) de procedência Merck
- II. Sephadex LH-20 de procedência Amersham Pharmacia Biotech AB

- **Cromatografia em camada delgada analítica (CCDA):**

A CCDA foi utilizada como método de monitoração de fracionamentos, as placas com sílica gel 60 F₂₅₄, $\phi = 0,2$ mm, de procedência Merck. Como reveladores empregou-se: absorção UV $\lambda = 254$ e 365 nm e reagentes de Dragendorff e Vanilina ácida.

Solventes necessários no fracionamento, análise CG-EM e RMN das frações:

Solventes comerciais destilados no DQ – UFSCar;

Solventes grau HPLC;

Solventes deuterados.

Equipamentos

Espectrômetros de Ressonância Magnética Nuclear, Massas e Fluorescência

Bruker ARX 4,9 T (200 MHz para RMN ¹H)

Bruker DRX 9,8T (400 MHz para RMN ¹H e 100 MHz para ¹³C).

CG-EM: Shimadzu QP 5000- Ionização por Impacto Eletrônico-DQ/UFSCar

FEMTO (D2), espectrofotômetro 700 plus- DQ/UFSCar

HANSATECH HANDY PEA (*Plant Efficient Analyzer*)- DQ/UFSCar

Evaporadores rotativos

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

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

3.4 - Procedimentos experimentais para os ensaios de inibição da fotossíntese.

3.4.1 - Isolamento dos cloroplastos

Para avaliação da inibição do transporte de elétrons, foram utilizados cloroplastos isolados das folhas de espinafre (*Spinacea oleracea L.*).

O isolamento dos cloroplastos de espinafre foi realizado com a trituração das folhas em liquidificador submersas no seguinte meio de

isolamento: sacarose (400 mmol/L), MgCl₂ (5 mmol/L), KCl 10 mmol/L e K⁺ - tricina (30 mmol/L) em pH 8,0 (KOH 1,0 mol/L). O meio, após a trituração, foi filtrado com 4 camadas de gaze. O filtrado foi então centrifugado a 4000 rpm, 4 °C durante 5 minutos, e em seguida, após descartar o sobrenadante, o sólido contendo os cloroplastos foi dissolvido em 1,5 mL do mesmo meio de isolamento utilizado para a extração dos cloroplastos.

Para determinar a concentração da clorofila, foram preparadas duas soluções contendo cada uma 20 µL da solução de cloroplastos dissolvidos em 5,0 mL de Acetona 80%. Após 5 minutos em repouso, as soluções foram centrifugadas e mediu-se a absorvância do sobrenadante em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 645 nm e 663 nm. A concentração da clorofila foi medida de acordo com Strain et al. (1971), utilizando a equação abaixo:

$$\text{Massa de Clorofila } (\mu\text{g}) = (20,29 \times A_{645} + 8,02 \times A_{663}) \times 5$$

3.4.2 – Reações de Transporte de elétrons (Basal, Desacoplado e Fosforilante).

O transporte de elétrons não-cíclico foi determinado pela captura de oxigênio utilizando-se um microeletrodo de Clark (Orion modelo 8103) conectado a um oxímetro Corning modelo 12, com escala expandida, e registrador Gilson. Todos os transportes de elétrons foram feitos no seguinte meio reacional: clorofila (20 µg/mL), sacarose (100 mmol/L), MgCl₂·6H₂O (5 mmol/L), KCl (10 mmol/L) e KCN 0,5mM (K⁺ - tricina) 15 mmol/L, pH8,0 ajustado com KOH, como acceptor de elétrons foi utilizado 50 µM de MV (dicloreto de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridínio (dicloreto de paraquat), já adicionado no meio reacional.

- Transporte de elétrons Basal: adicionou-se ao meio reacional citado acima 60µg de clorofila para o controle, e em seguida os compostos isolados.
- Transporte de elétrons fosforilante: foi adicionada, além do meio reacional usado no transporte Basal, uma solução contendo 1 mmol L⁻¹ de ADP e 3 mmol L⁻¹ de K₂HPO₄.KCN (0,1 mmol L⁻¹) para inibir a atividade catalítica.
- Transporte de elétrons desacoplado: foram adicionados, além do meio reacional contendo os cloroplastos, 60 µL de uma solução 0,25 mM de NH₄Cl.

Todas as reações ocorreram sob iluminação durante 3 minutos com luz saturante de 350 Watts.

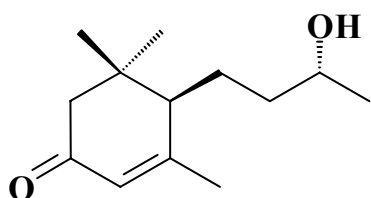
3.4.3 - Ensaios de medidas de fluorescência da Clorofila a (Chl a)

Para monitorar os transientes da fluorescência da Chl *a*, alíquotas de tilacóides adaptado ao escuro contendo 20 µg de Chl foram transferidos a um papel de filtro. Para gerar homogeneidade e reprodutibilidade dos tilacóides no papel de filtro. Em seguida o material foi adicionado, imediatamente, em 3,00 mL do mesmo meio utilizado para o transporte de elétrons Basal (item 3.4.2). As amostras já no meio reacional contendo os cloroplastos foram mantidas no escuro durante 5 minutos, e posteriormente foram realizadas as leituras dos parâmetros cinéticos. Utilizando-se três diodos que emitem luz a 650 nm, foi possível obter um rendimento de fluorescência máxima. A duração do pulso foi de 1s. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. As curvas de indução da Chl *a* foram medidas a temperatura ambiente, utilizando o fluorímetro Hansatech Handy PEA.

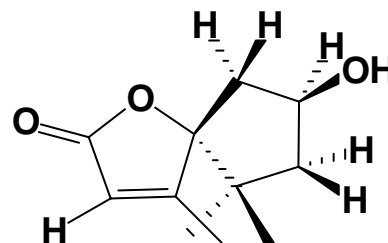
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

• Substâncias isoladas

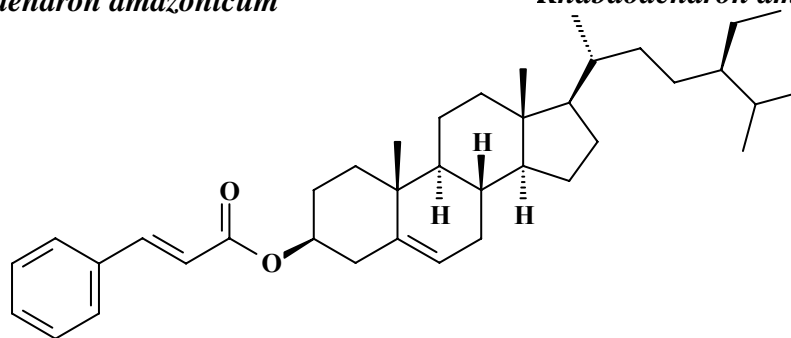
Terpenos



Blumenol C
Rhabdodendron amazonicum

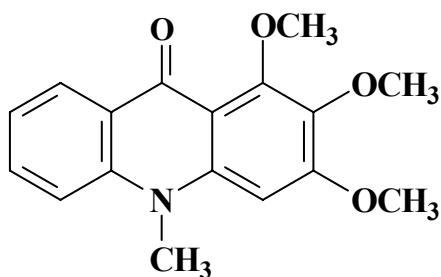


Rhabdodendronlactona
Rhabdodendron amazonicum

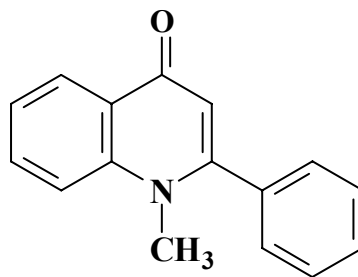


Cinamato de β -sitosterila
Rhabdodendron amazonicum

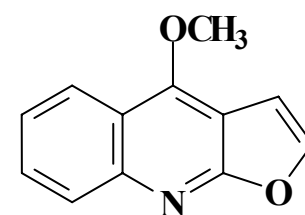
Alcalóides



Metilarborinina
Conchocarpus inopinatus

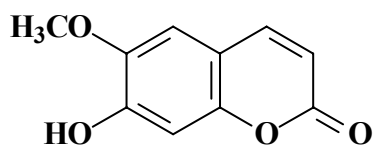


2-fenil-4-quinolona
Conchocarpus inopinatus

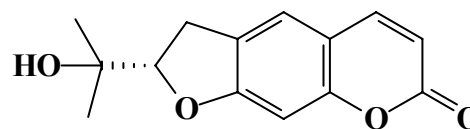


Dictamina
Conchocarpus inopinatus

Cumarinas



Escopoletina
Conchocarpus inopinatus

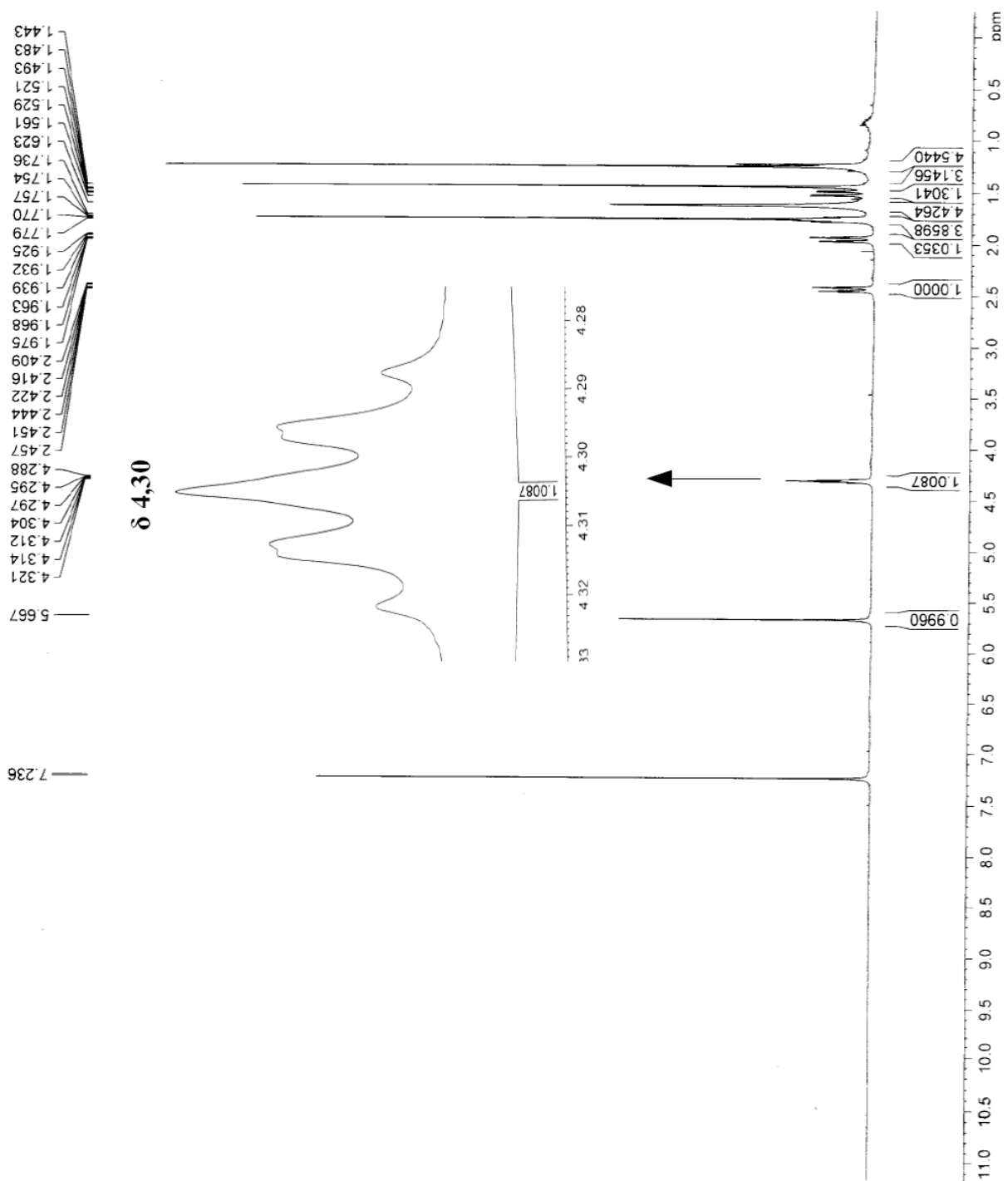


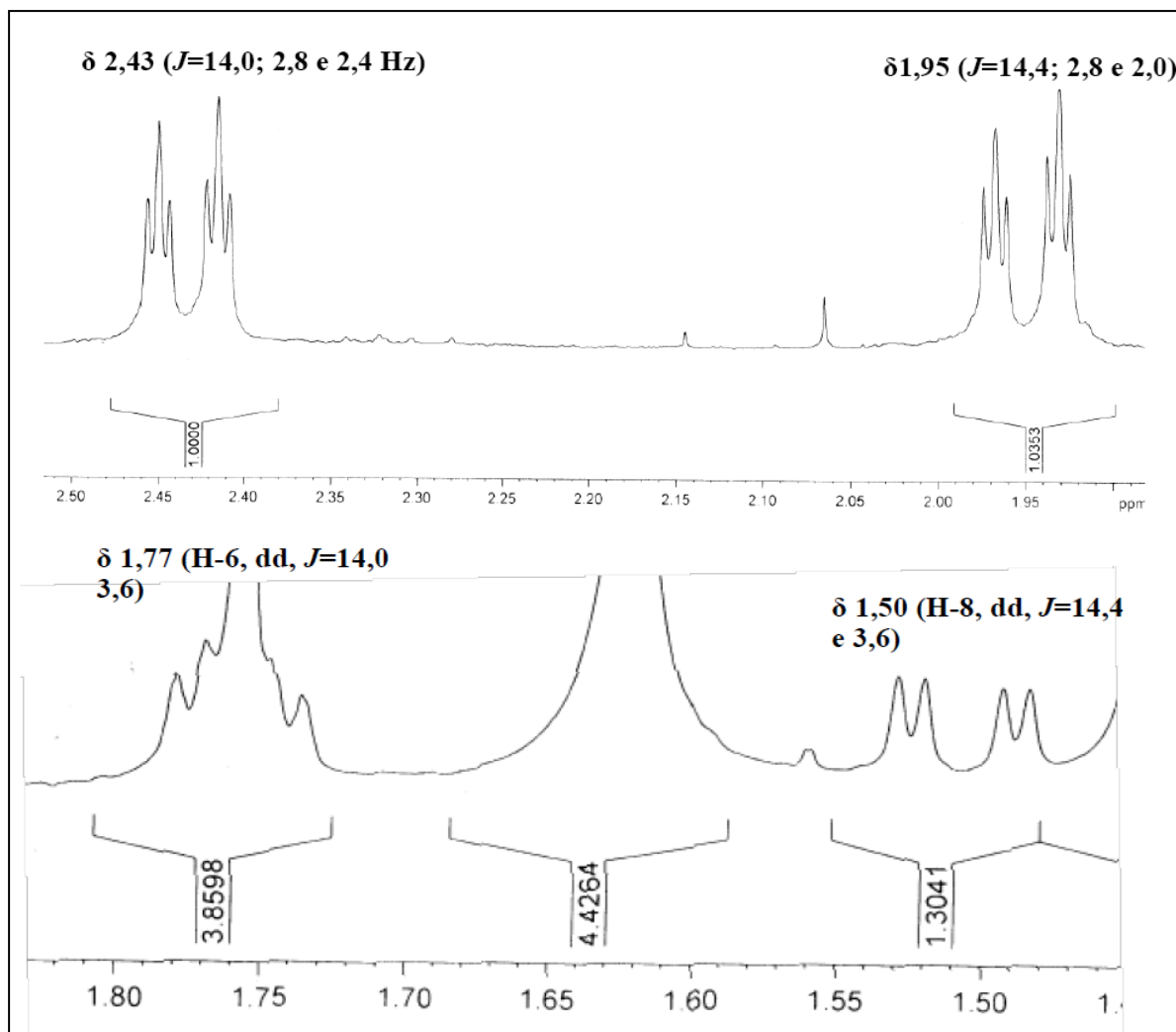
Marmesina
Conchocarpus inopinatus

4.1 - Determinação Estrutural das substâncias isoladas da *Rhabdodendron amazonicum*

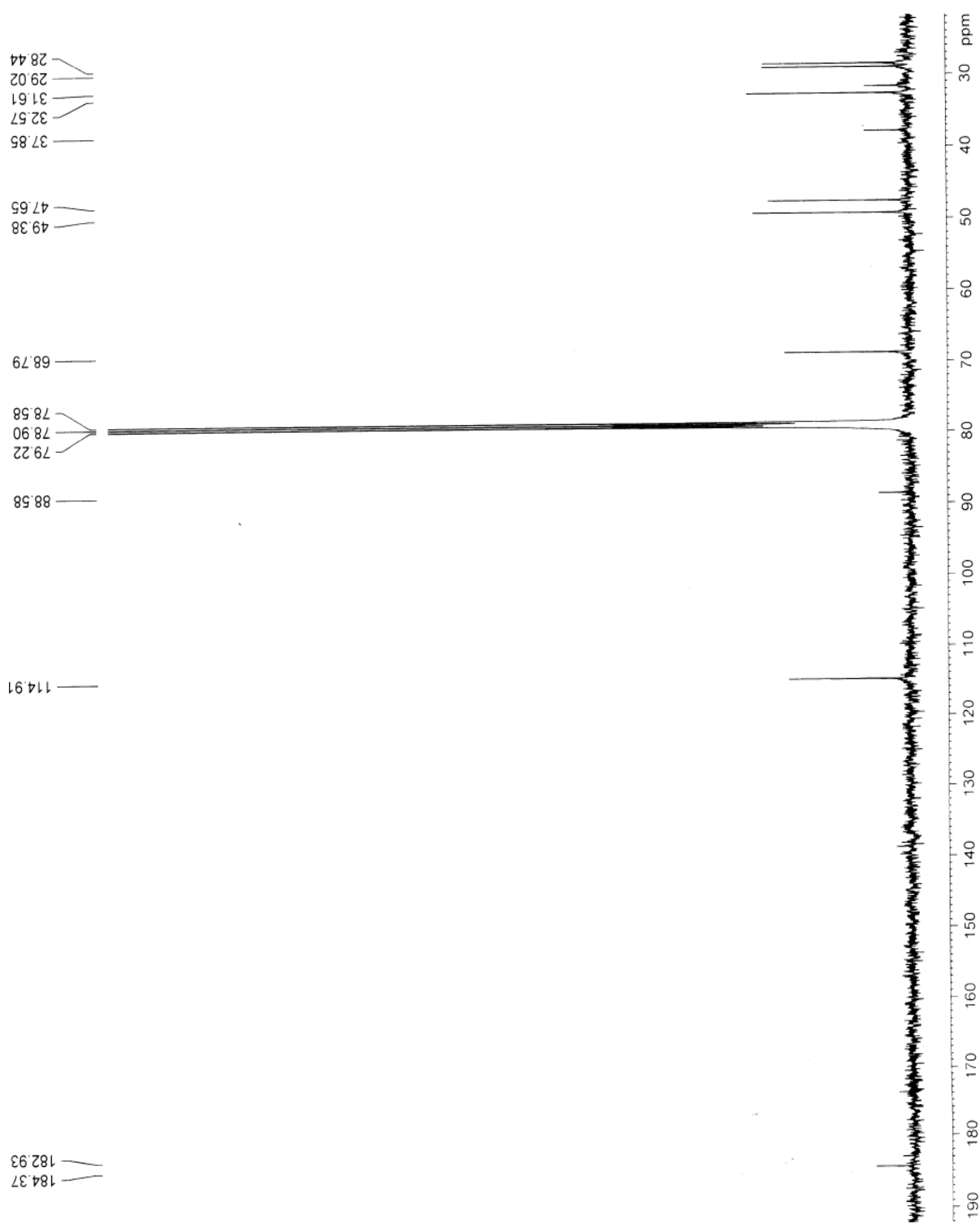
4.1.1 – Determinação estrutural da substância 1

A substância 1 foi isolada a partir da fração acetato de etila, apresentou-se como um sólido amorfo de cor branca. Seu espectro de RMN ^1H (Fig. 4.1 e Fig. 4.2), apresentou um total de 9 sinais e 11 sinais no RMN ^{13}C (Fig. 4.3). Na região mais desblindada do espectro, nota-se um sinal em δ 5,67 (H-3), deslocamento característico de hidrogênio olefínico alfa carboxílico. O experimento HSQC (Fig. 4.4) mostra que o hidrogênio referente a este sinal está ligado a um carbono que absorve a uma frequência de 114,9 ppm (C-3). Analisando este sinal em δ 5,67 no espectro de COSY (Fig. 4.5), observa-se uma correlação com um sinal em δ 1,76 (H-10), o qual integra para 3 hidrogênios, indicando ser um sinal de grupo metila que se apresenta como dubleto com constante de acoplamento pequena ($J = 1,2$ Hz), característico de um acoplamento alílico. No experimento HMBC (Fig. 4.6), o sinal em δ 5,67 faz correlações com δ 37,8 (C-9); 88,6 (C-5); 173,8 (C-4) e 184,4 (C-2).

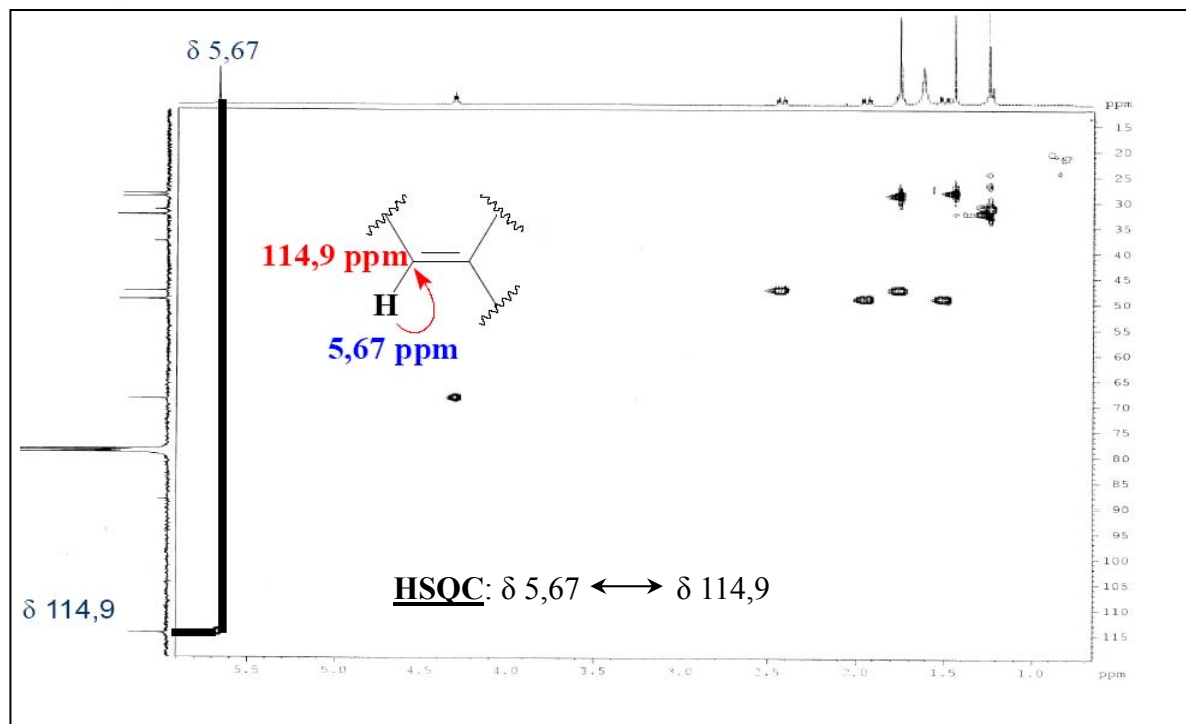
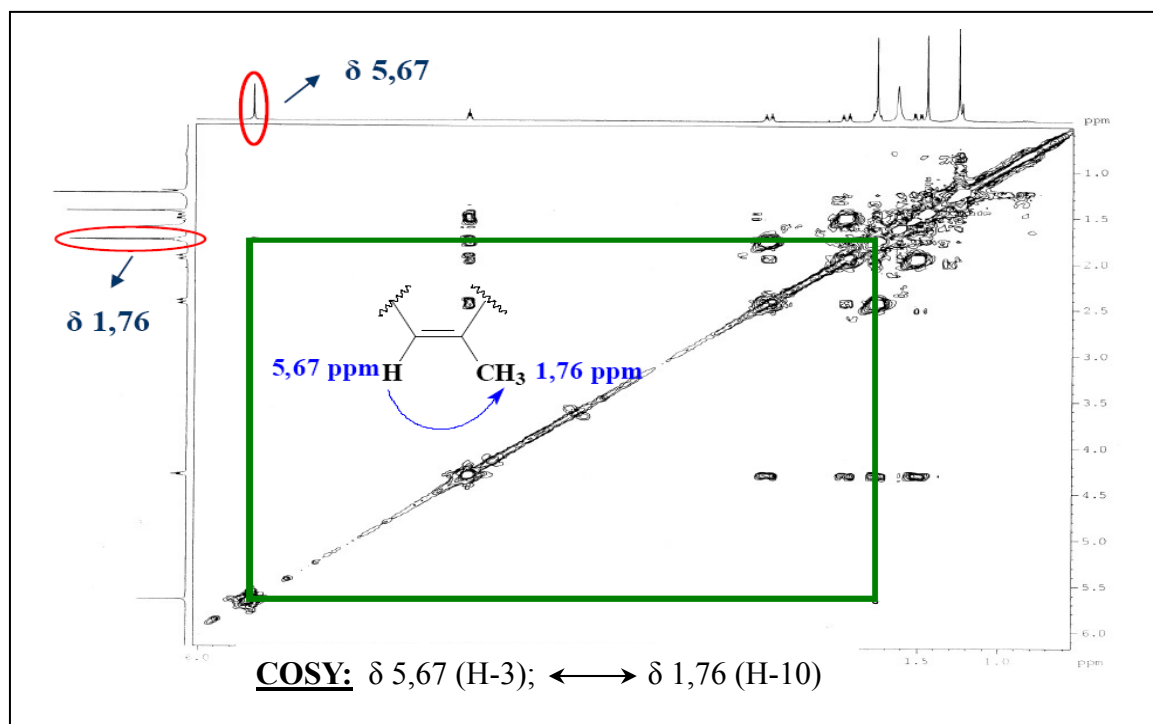
FIGURA 4.1 – Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância **1**.

FIGURA 4.2 – Ampliação de sinais do espectro RMN ^1H da substância 1.

Resultados e discussão

FIGURA 4.3 – Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da substância 1.

Resultados e discussão

FIGURA 4.4 - Mapa de contorno de HSQC (CDCl_3 , 400 MHz) para o sinal de ^1H $\delta 5,67$.FIGURA 4.5 - Espectro de COSY, RMN ^1H , (CDCl_3 , 400 MHz) de **1**.

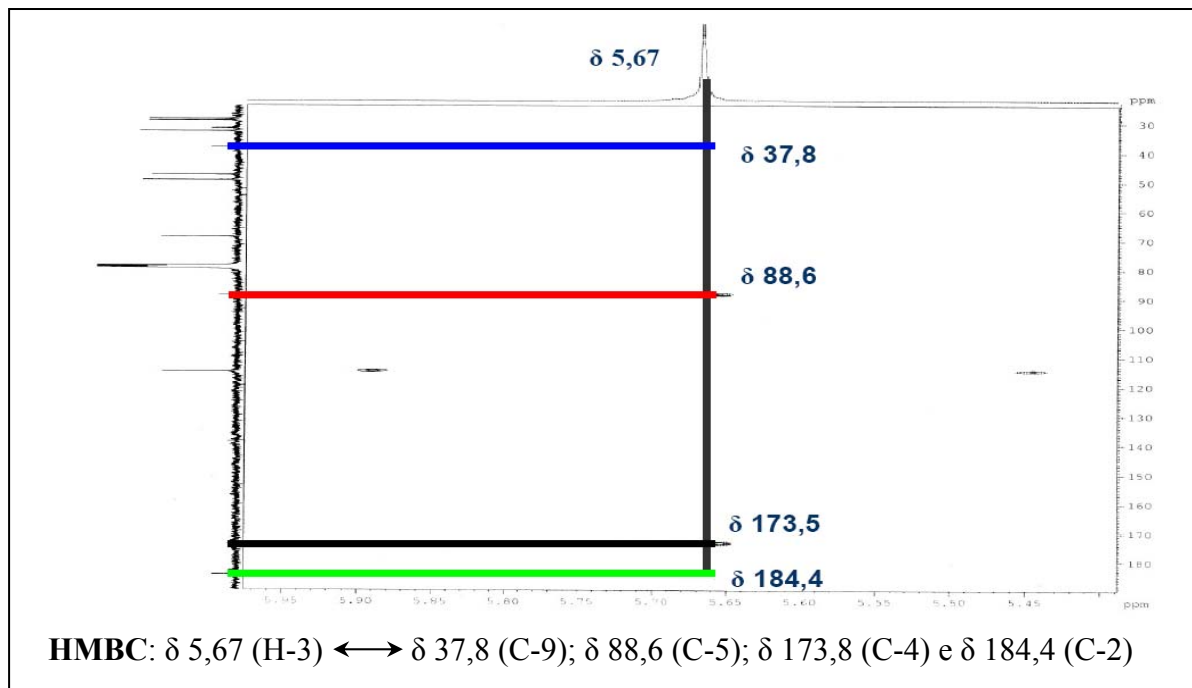


FIGURA 4.6 - Mapa de contorno HMBC (CDCl₃, 400 MHz) para o ¹H δ 5,67.

No espectro de RMN ¹H também observaram-se 3 sinais característicos de metilas, em δ 1,76 (H-10), δ 1,44 (H-12) e δ 1,25 (H-11). O sinal em δ 1,76 apresenta correlação no experimento HSQC (Fig. 4.7) com um sinal de carbono em δ 29,0 (C-10), e no HMBC (Fig. 4.8) com os sinais δ 88,6 (C-5) e δ 184,3 (C-2), os quais também fazem correlações com o sinal em δ 5,67, o que indica a proximidade desta metila em δ 1,76 com esse hidrogênio olefínico (δ 5,67).

Resultados e discussão

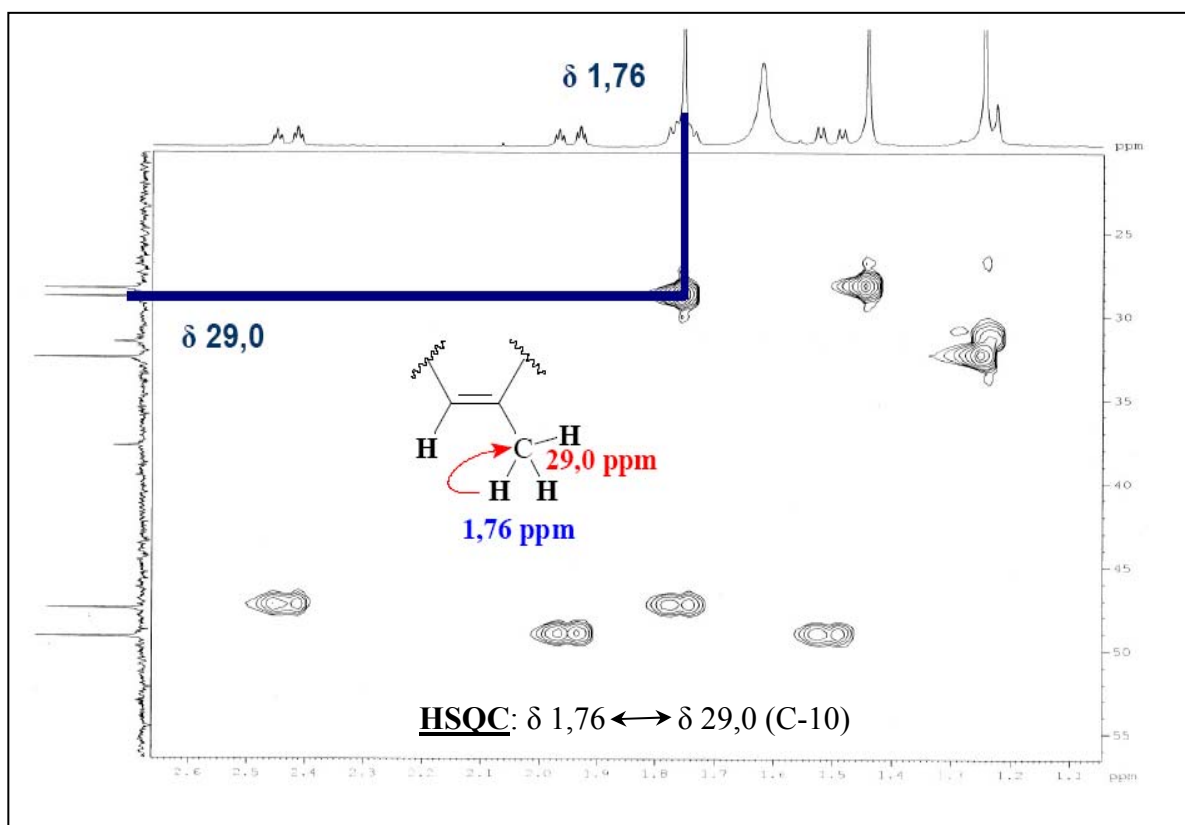


FIGURA 4.7 - Mapa de contorno HSQC (CDCl_3 , 400 MHz) para o ^1H δ 1,76.

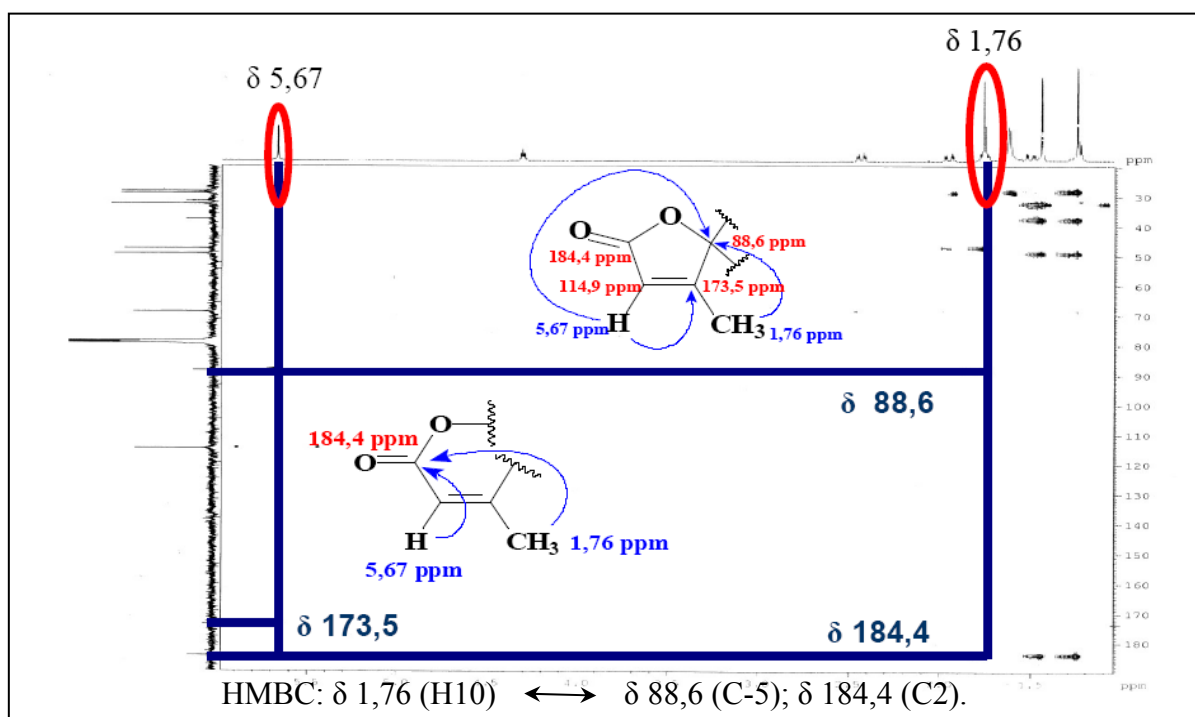


FIGURA 4.8 - Mapa de contorno HMBC (CDCl_3 , 400 MHz) para o ^1H δ 1,76.

Resultados e discussão

As correlações no experimento de HSQC (Fig. 4.9) mostram que os hidrogênios metílicos que apresentam sinais em δ 1,44 (H-12) e 1,25 (H-11), estão ligados aos carbonos que apresentam sinais em δ 28,4 (C-12) e 32,6 (C-11), respectivamente. No experimento HMBC (Fig. 4.10) o sinal em δ 1,44 faz correlações com os sinais de carbono em δ 32,6 (C-11); 37,8 (C-9); 49,4 (C-8) e 184,4 (C-2). Há semelhança para essas correlações em relação ao sinal em δ 1,25 (H-11), o qual faz correlações com os sinais em δ 28,4 (C-12); 37,8 (C-9); 49,4 (C-8) e 184,4 (C-2). Estas correlações sugerem as estruturas parciais apresentadas na figura 4.8. Não há correlações no experimento COSY para essas metilas.

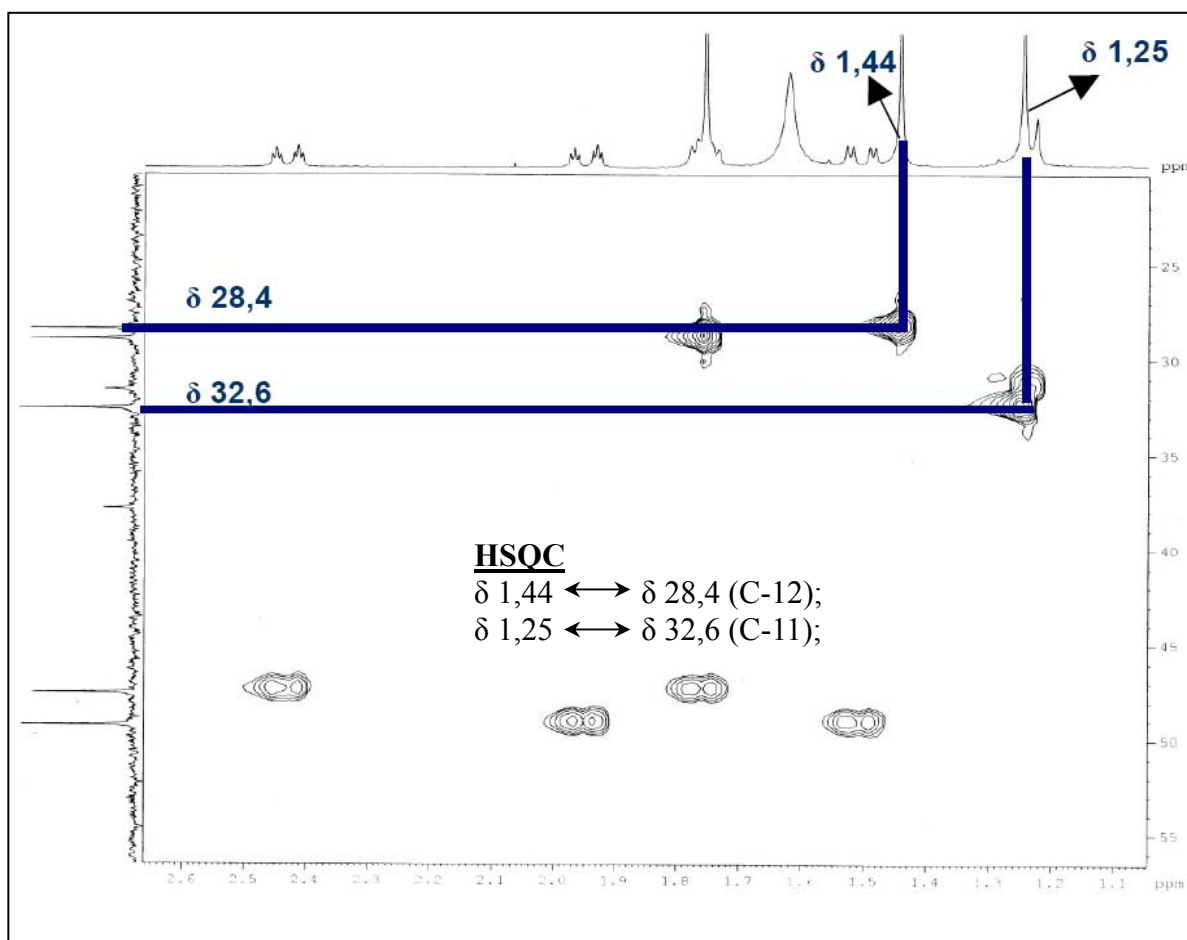


FIGURA 4.9 - Mapa de contorno HSQC (CDCl₃, 400 MHz) para o ¹H δ 1,44 e δ 1,25.

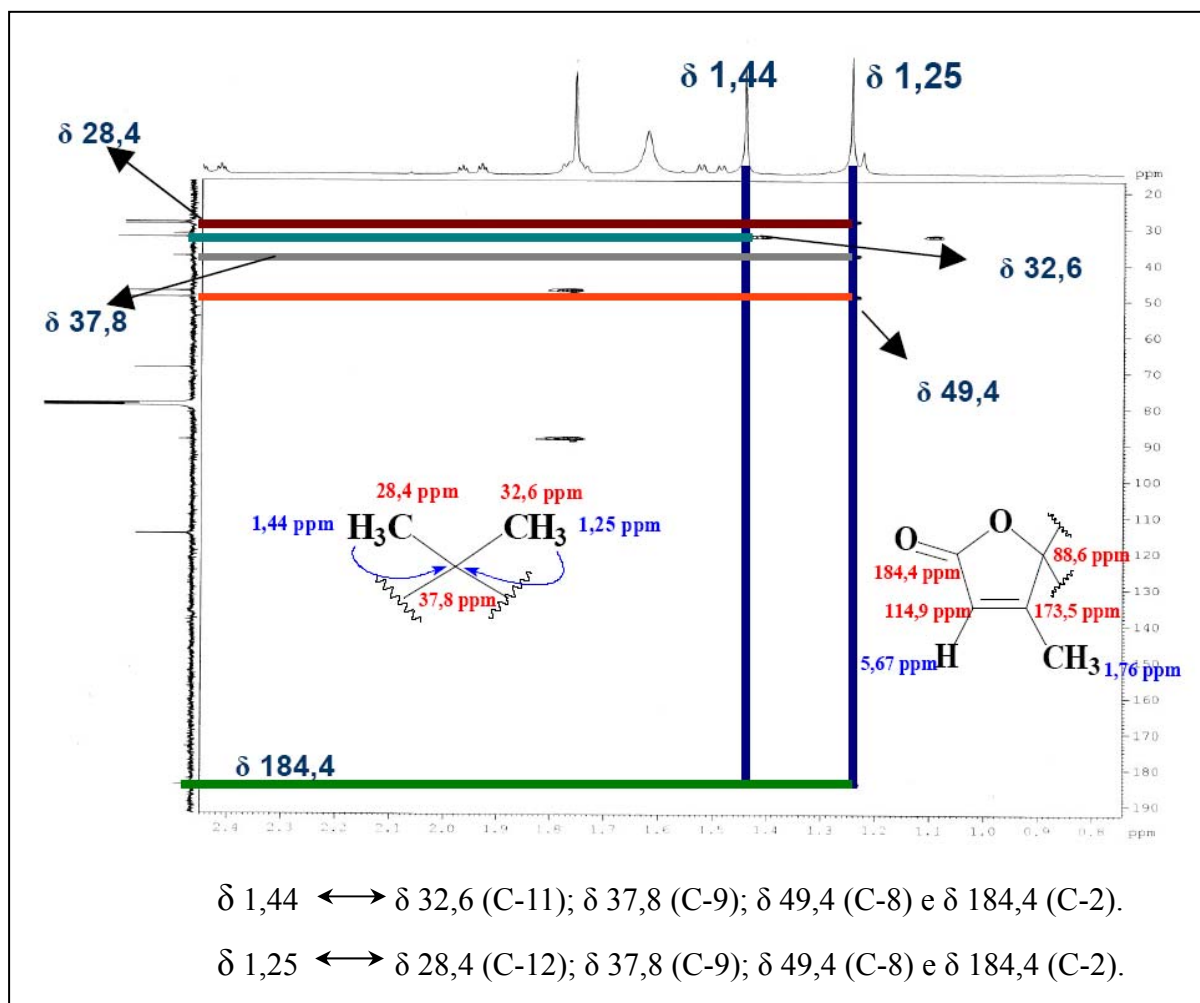


FIGURA 4.10 - Mapa de contorno HMBC (CDCl_3 , 400 MHz) para o ^1H δ 1,44 e δ 1,25.

O espectro de RMN ^1H também mostra um sinal de hidrogênio oximetínico em δ 4,30 (H-7), o qual mostra acoplamentos no experimento COSY (Fig. 4.11) com os sinais em δ 1,77 H-6 (*dd* 1H, $J=14,0$; 3,6), 1,95 H-8 (*dt* 1H, $J=14,4$; 2,8 e 2,4); 2,43 H-6 (*dt* 1H, $J=14,0$; 2,8 e 2,4); e 1,50 (*dd* 1H, $J=14,4$; 3,6), e no HSQC, com um sinal de carbono em δ 68,8 (C-7).

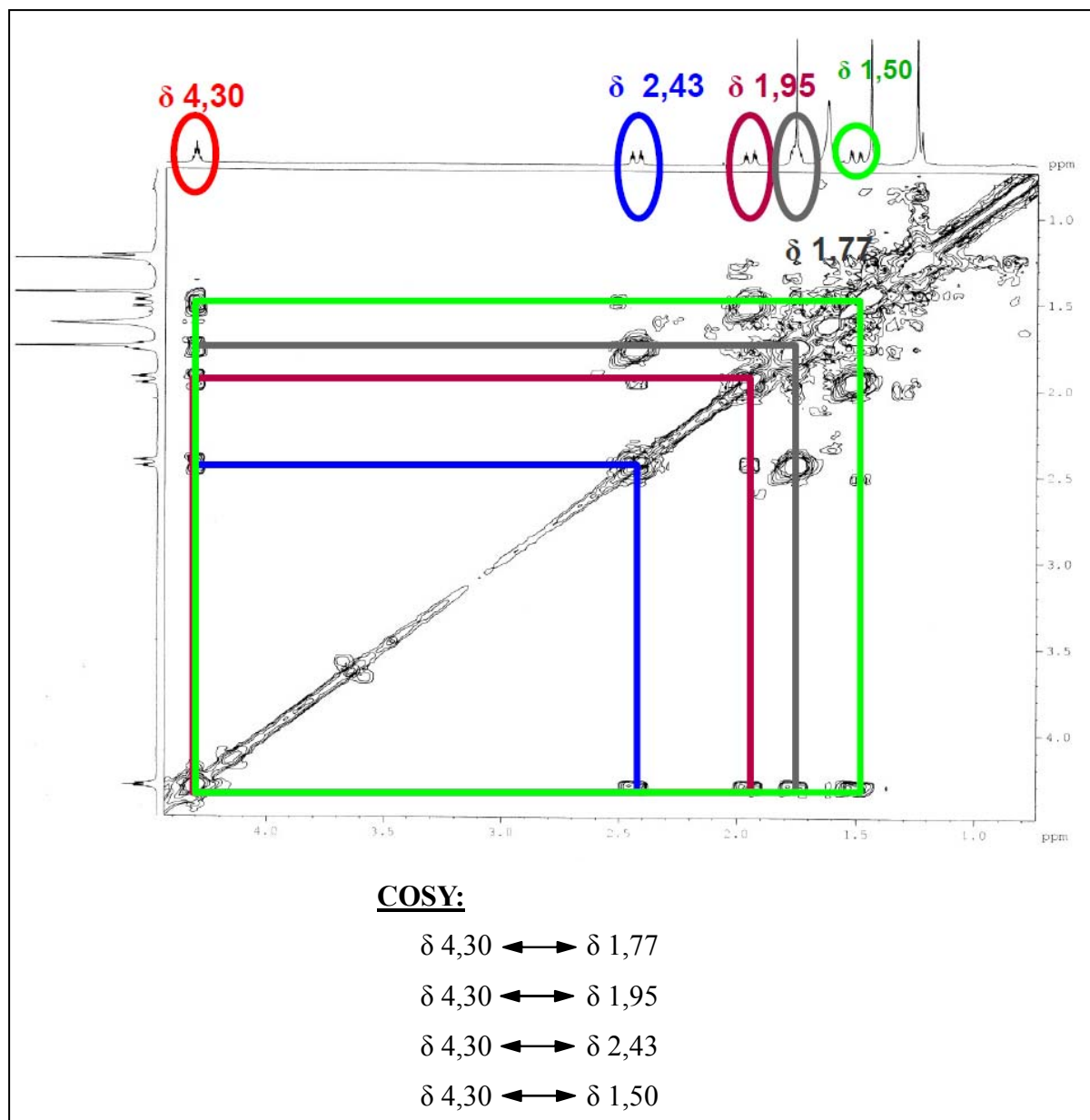


FIGURA 4.11 - Espectro de COSY (CDCl_3 , 400 MHz) da substância **1**, sinal $\delta 4,30$.

O sinal em $\delta 2,43$ (H-6), no experimento COSY (Fig. 4.12) apresenta acoplamentos com os sinais em $\delta 4,30$ (H-7); 1,95 (H-8) e 1,77 (H-6). O experimento HSQC (Fig. 4.13) indica que o hidrogênio responsável por este sinal em $\delta 2,43$ está ligado a um carbono que ressona na frequência de $\delta 47,6$ (C-6); o fato de outro hidrogênio ($\delta 1,77$) também apresentar correlação com

Resultados e discussão

esse mesmo sinal de carbono, indica que o mesmo é um carbono metilênico (CH_2). O mesmo ocorre para o sinal de carbono em δ 49,4 (C-8), o qual está ligado à dois hidrogênios que apresentam sinais em δ 1,95 e 1,50 (Fig. 4.13). O que faz esses hidrogênios metilênicos apresentarem diferentes multiplicidades é o fato de serem diastereotópicos, isto é, estão próximos a um centro estereogênico, o carbono oximetínico em δ 68,8. O hidrogênio com sinal em δ 1,95 faz correlações no experimento COSY (Fig. 4.14) com os hidrogênios cujos sinais estão em δ 4,30; 2,43 e 1,50. O hidrogênio com sinal em δ 1,77 acopla com os hidrogênios que ressonam em δ 4,30 e 2,43 (Fig. 4.15). O sinal de hidrogênio em δ 1,50 mostra no experimento COSY (Fig. 4.16) acoplamentos com os hidrogênios de sinais em δ 4,30 e δ 1,95.

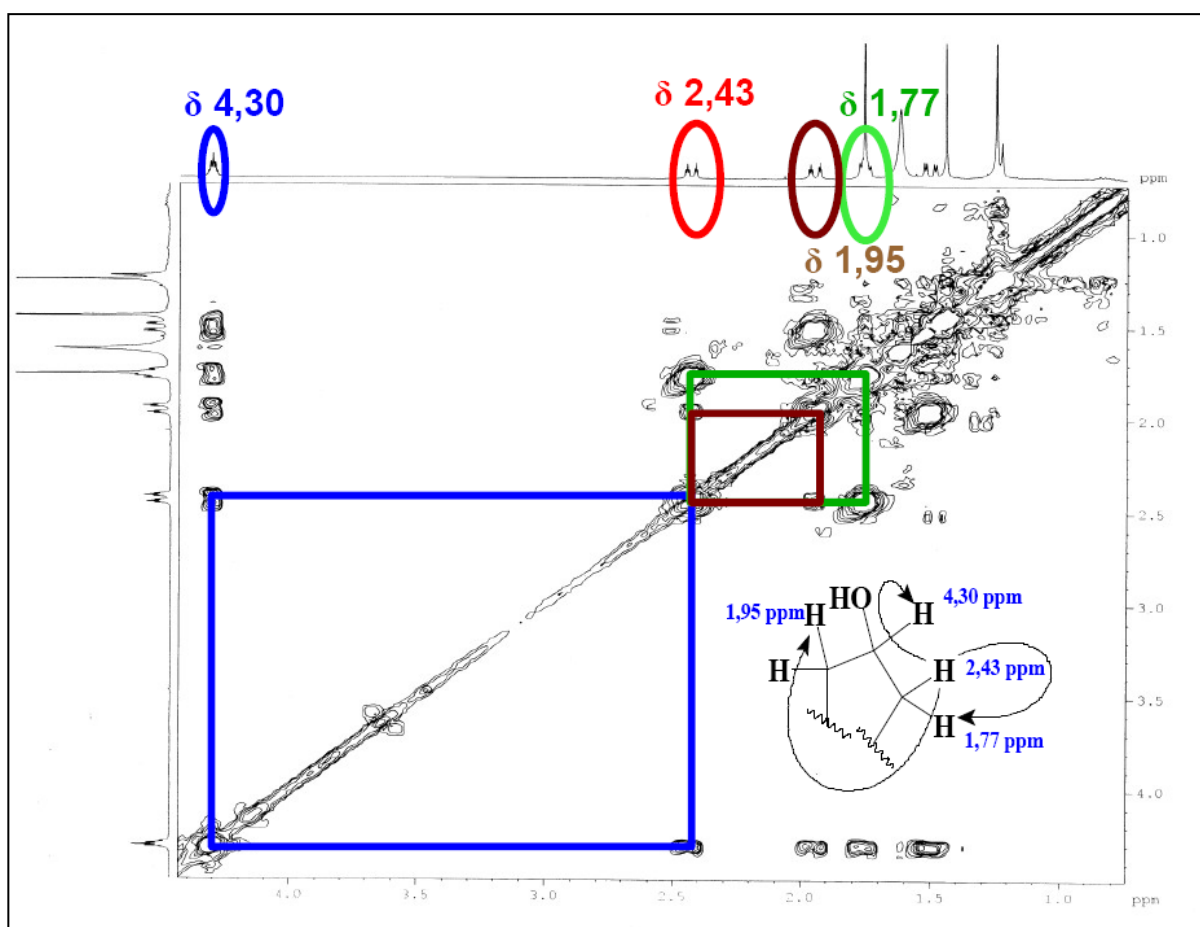
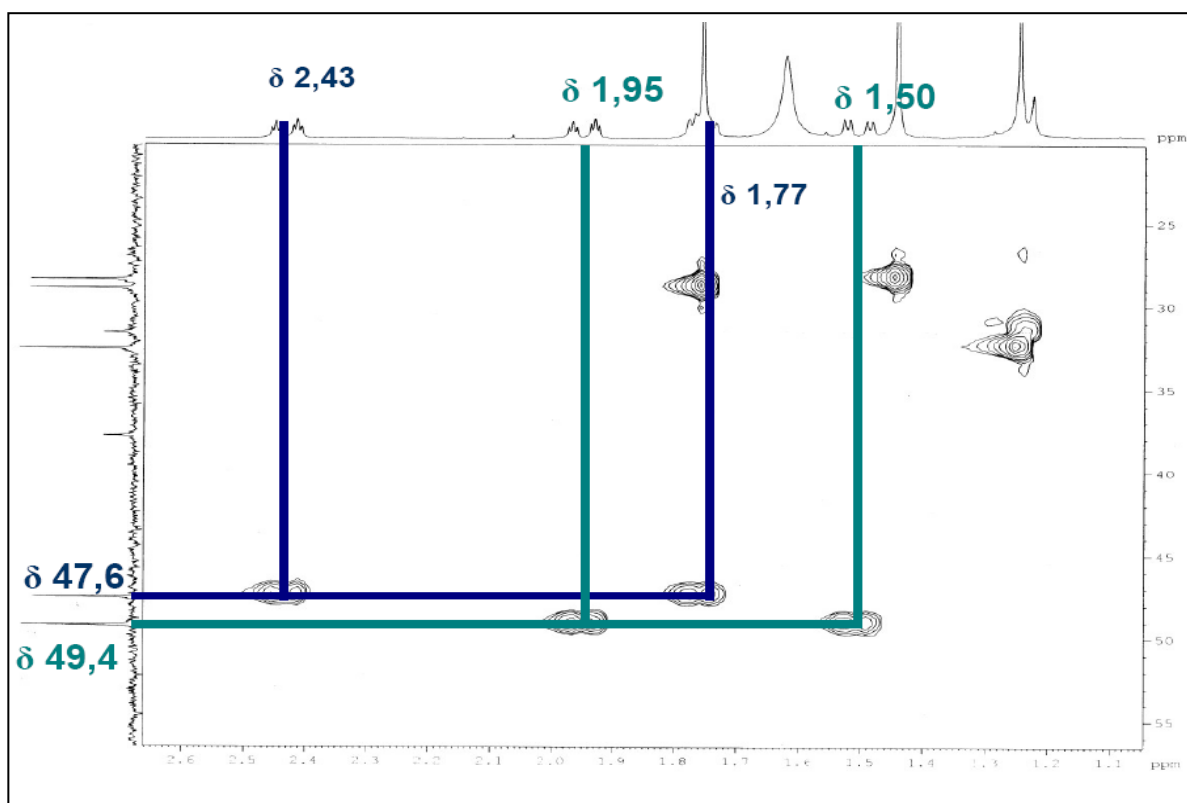
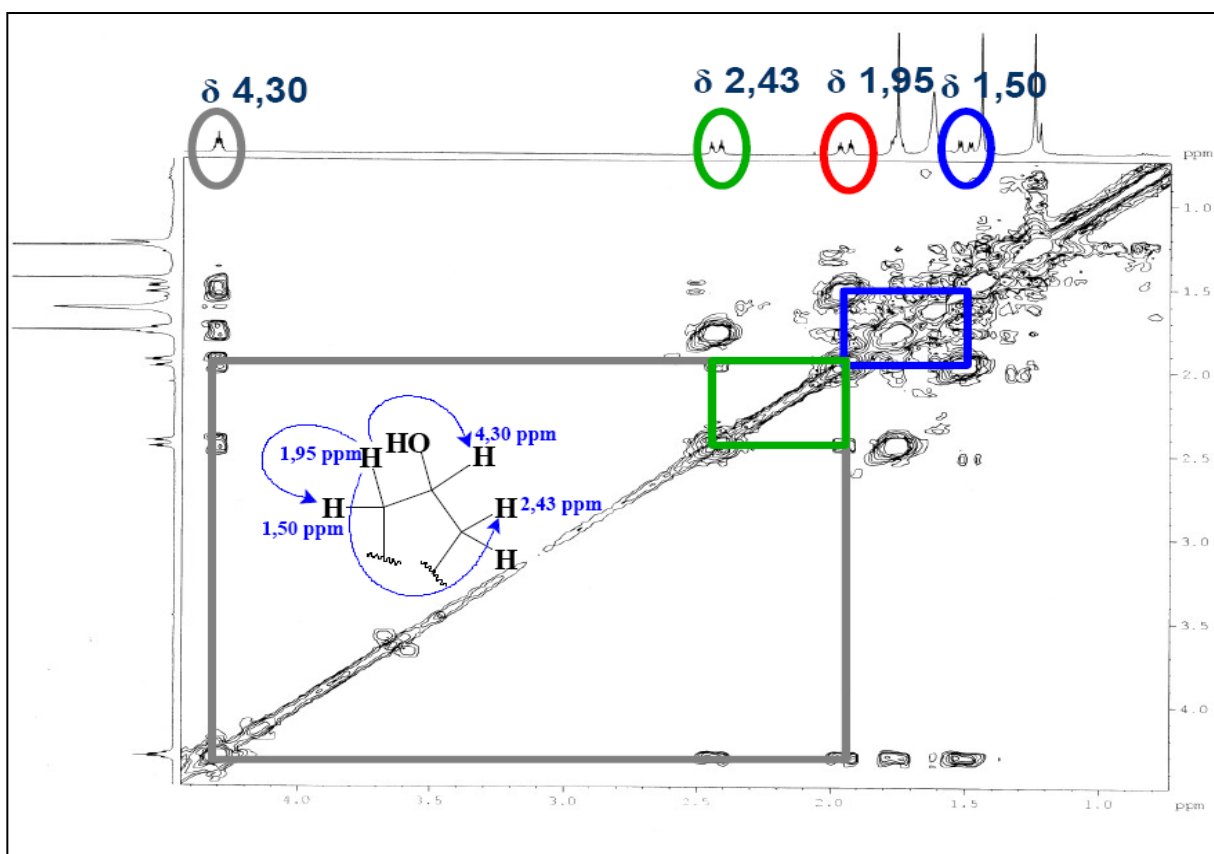


FIGURA 4.12 - Espectro de COSY (CDCl_3 , 400 MHz) da substância **1**, sinal δ 2,43.

Resultados e discussão

FIGURA 4.13 – Mapa de contorno HSQC (CDCl_3 , 400 MHz) da substância 1.FIGURA 4.14 - Espectro de COSY (CDCl_3 , 400 MHz) da substância 1, δ 1,95.

Resultados e discussão

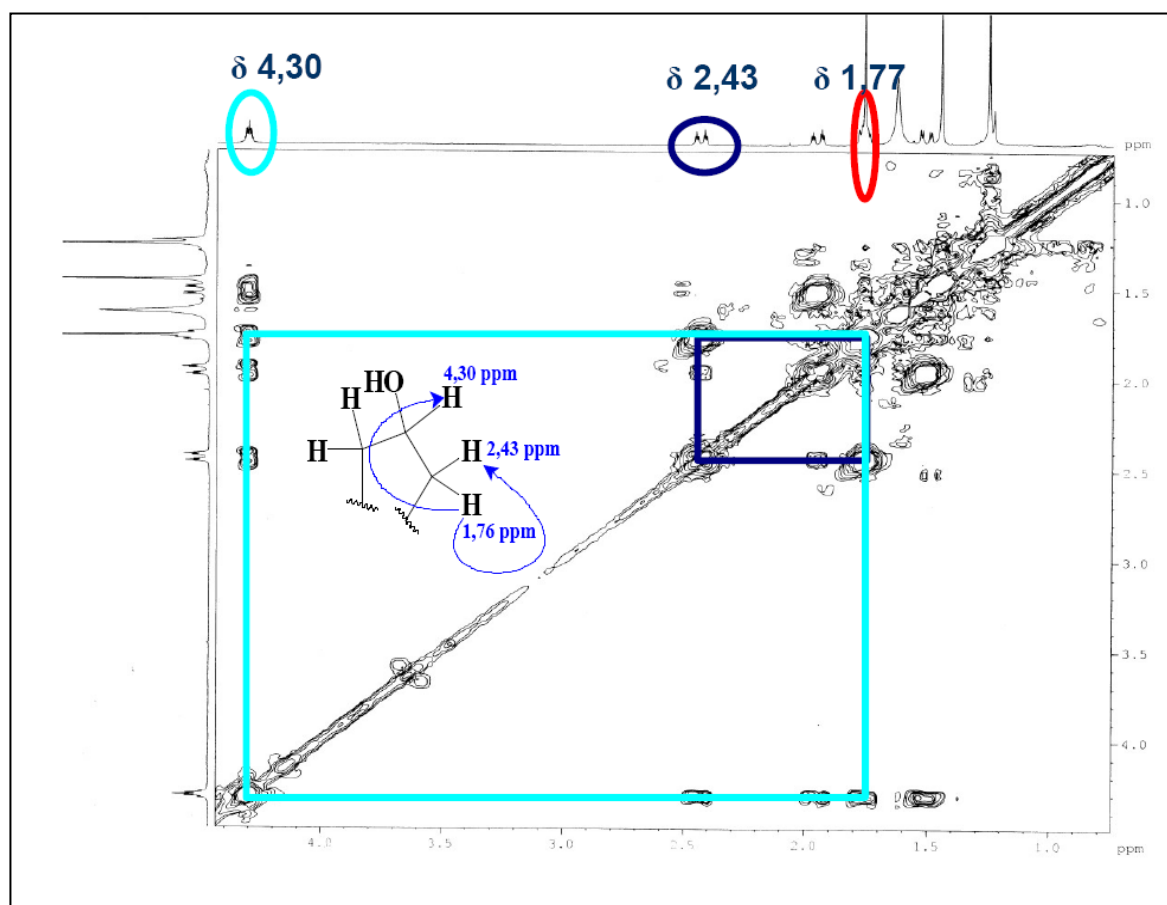


FIGURA 4.15 - Espectro de COSY (CDCl_3 , 400 MHz) da substância 1, sinal δ 1,77.

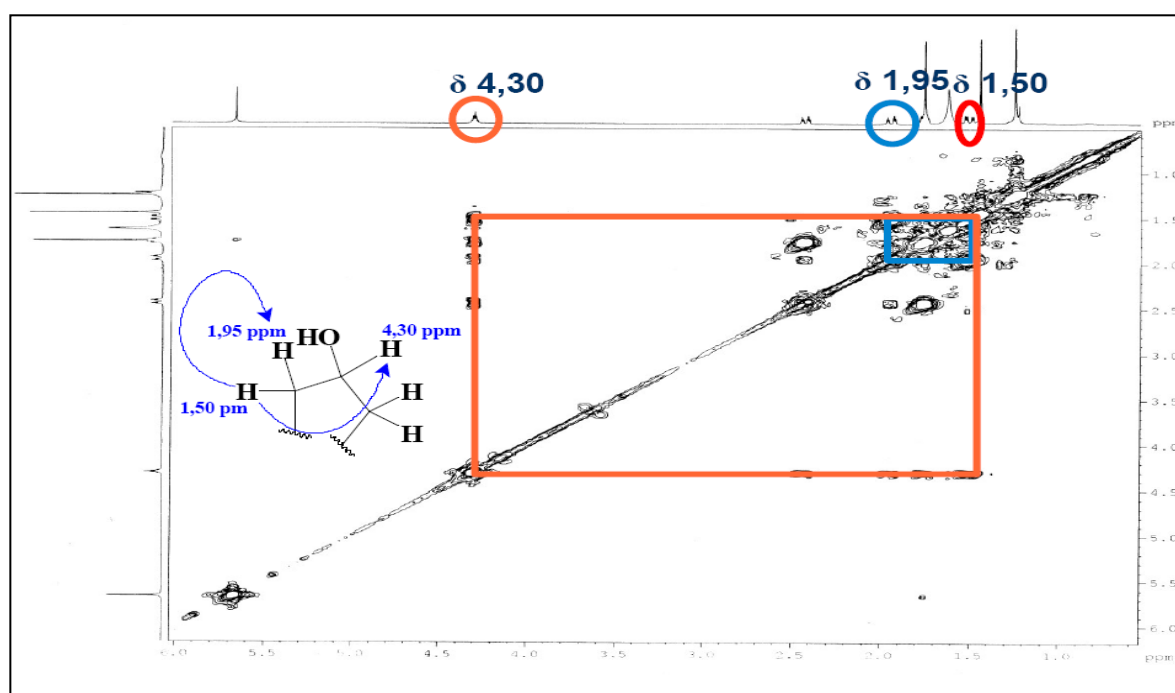
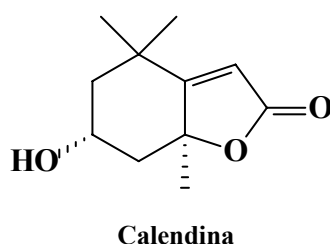


FIGURA 4.16 - Espectro de COSY (CDCl_3 , 400 MHz) da substância 1 (δ 1,50).

A análise da maioria dos dados de RMN poderia sugerir para o composto **1**, a estrutura de uma substância já descrita na literatura, a calendina (JONES, et al., 2000). Porém o experimento de COSY do composto **1** (Fig. 4.5) mostra um acoplamento entre os hidrogênios da metila que está ligada ao carbono vinílico (H-10) e o hidrogênio olefínico (H-3), $J=1,2$ Hz. Este acoplamento não foi observado para a estrutura da calendina, conforme dados da literatura (MARINO, et al., 2006; SCHLEGL, 2009; JONES, 2000).



Finalmente, os dados permitem propor para a estrutura **1**, a espiro[4,4]-5-(2,2-dimetil-4 β -hidroxi)-ciclopentanoil-4-metil- γ -lacto-3-eno (Fig. 4.17), denominada rhabdodendronlactona. Esta estrutura é inédita na literatura.

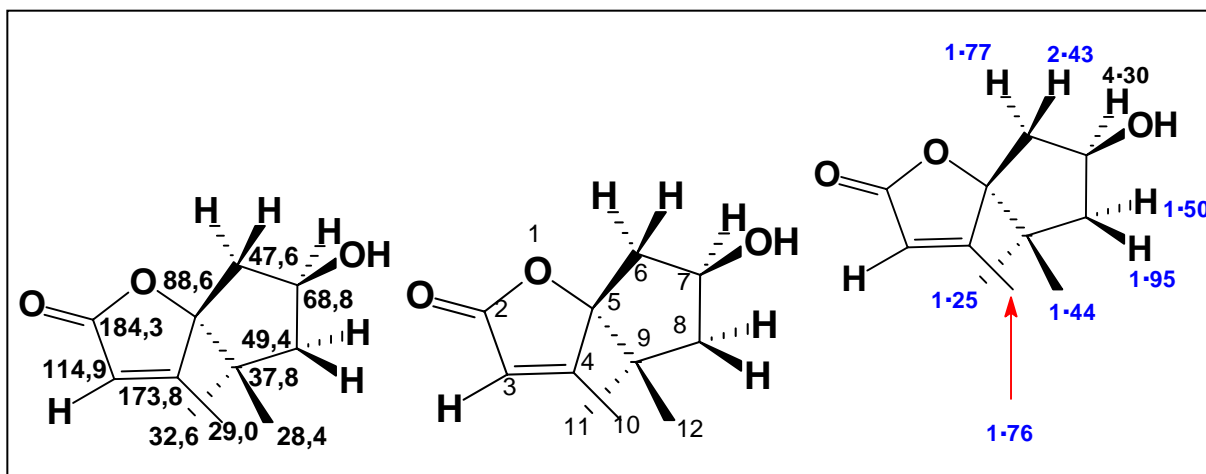


FIGURA 4.17 - Estrutura da rhabdodendronlactona.

4.1.1.1 – Experimento gNOESY (gradient nuclear Overhauser effect spectroscopy)

Para verificar a estereoquímica dos átomos de hidrogênio na substância **1**, foi realizado o experimento gNOESY (Fig. 4.18 – 4.20), onde é

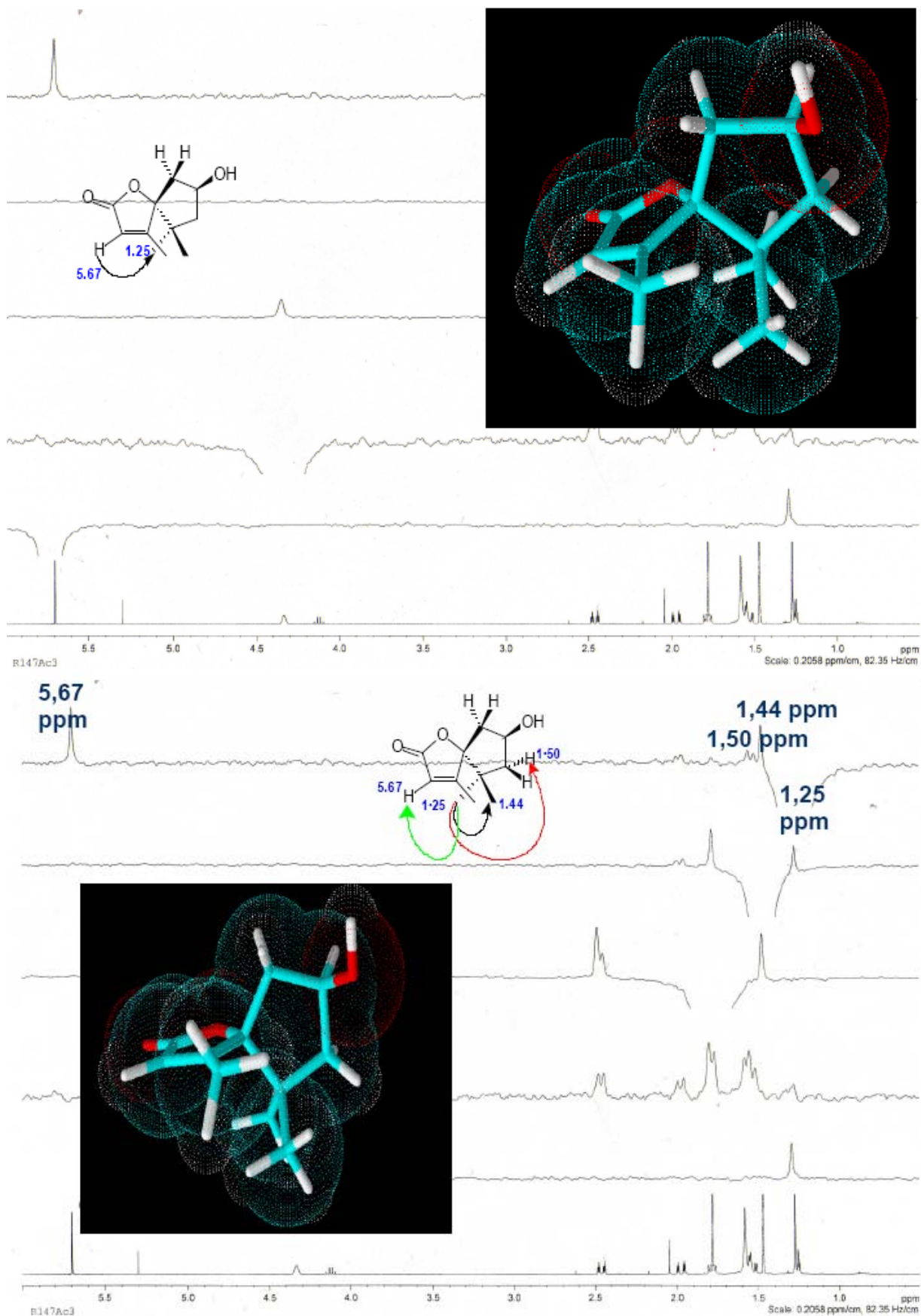
Resultados e discussão

possível ver a proximidade ^1H ^1H na molécula usando o efeito nuclear Overhauser através do espaço. Um hidrogênio que estiver a uma pequena distância daquele irradiado, será afetado pelo NOE, esteja ele acoplado ou não ao hidrogênio irradiado. Quando o hidrogênio olefínico em δ 5,67 é irradiado, o sinal de metila em δ 1,25 sofre o NOE e aumenta o seu sinal, o que indica que esses hidrogênios encontram-se na mesma face da molécula. Irradiando o hidrogênio em δ 1,25, percebe-se um incremento dos sinais em δ 5,67 e 1,44 (hidrogênio metílico) que, por estar ligado ao mesmo carbono que a metila em δ 1,25, também sofre NOE (Fig. 4.18). Agora, irradiando o hidrogênio metílico em δ 1,44, o sinal de hidrogênio metilênico em δ 1,95 sofre aumento, o que indica que eles estão na mesma face da molécula, além desse hidrogênio metilênico, os sinais em δ 1,25 e δ 1,76 também sofrem NOE. Quando a irradiação é feita no hidrogênio em δ 1,77 (metilênico), os sinais em δ 2,43 (geminal), e em δ 4,30 (oximetínico) sofre aumento por NOE (Fig. 4.19), indicando que os hidrogênios em δ 1,77 e em δ 4,30 estão na mesma face na molécula; e finalmente, quando o hidrogênio oximetínico em δ 4,30 é irradiado, os sinais em δ 1,77 e δ 1,50 sofrem aumento, indicando compartilharem a mesma face da molécula (Fig. 4.20).

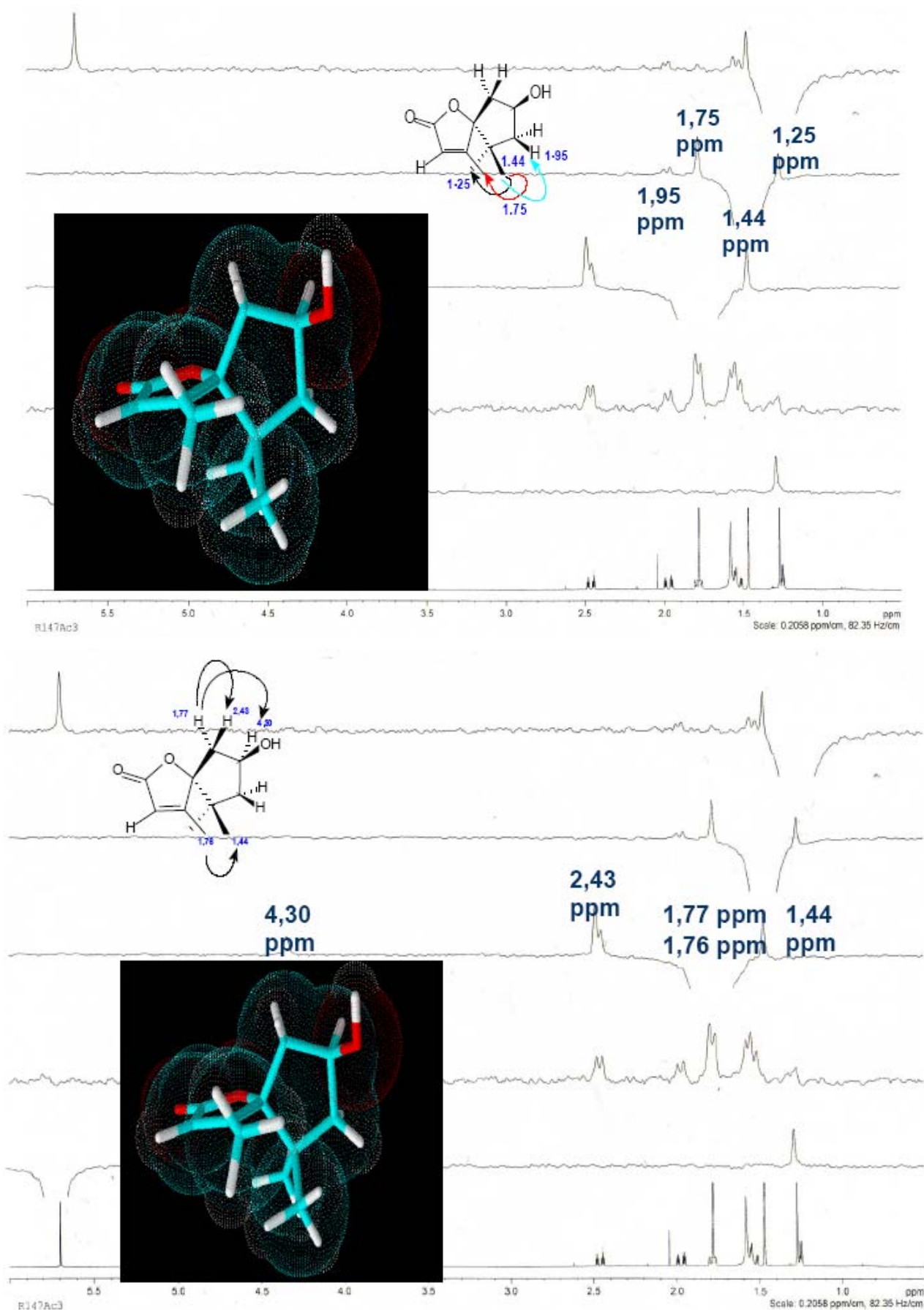
Estes experimentos permitem definir o composto **1** como espiro[4,4]-5-(2,2-dimetil-4 β -hidroxi)-ciclopentanoil-4-metil- γ -lacto-3-eno.

O que ocorre no gNOESY é a polarização (alteração na população dos níveis de energia) provocada pela irradiação em um átomo de hidrogênio através do espaço, o que provoca um aumento na população do nível de energia mais alto no hidrogênio vizinho não-irradiado. Esse excesso de população sofre relaxação T_1 a um nível de energia mais baixo, aumentando assim a intensidade do sinal dos hidrogênios vizinhos (SILVERSTEIN et al., 2006).

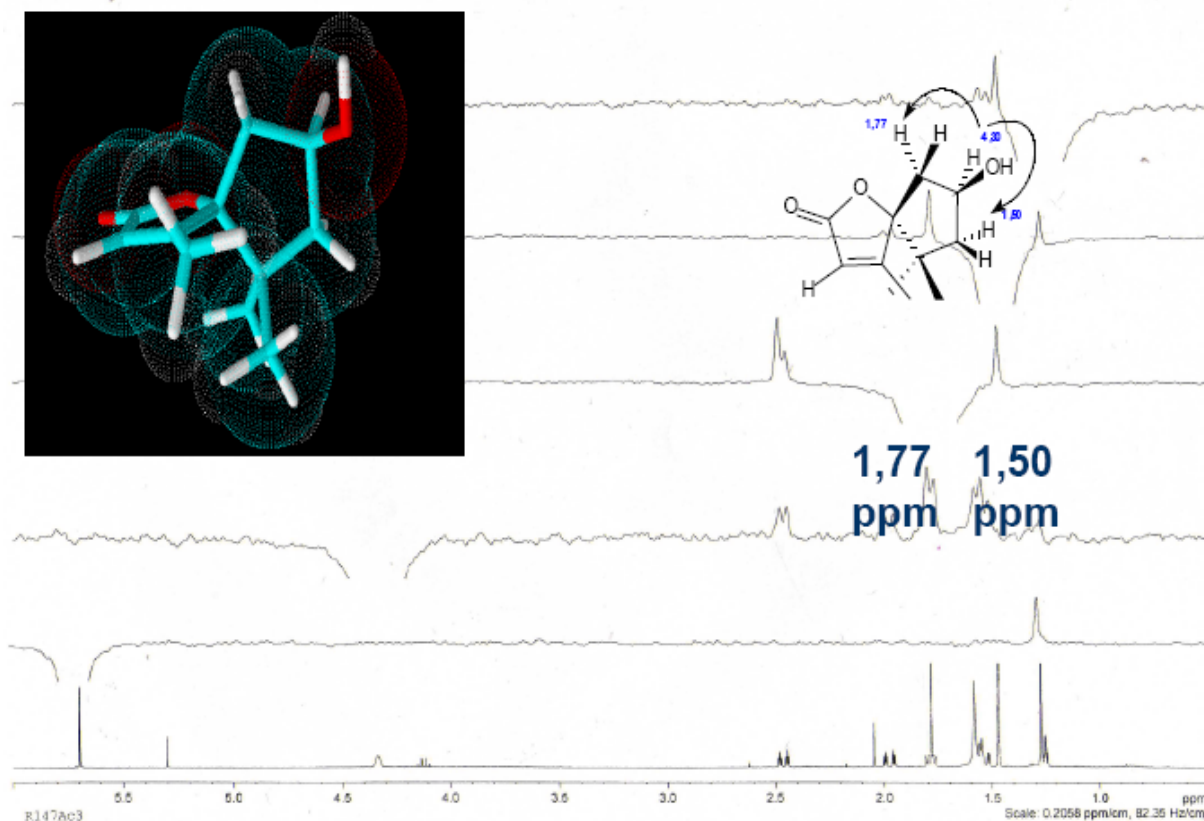
Resultados e discussão

FIGURA 4.18 – Experimento gNOESY (400 MHz, CDCl₃) para a substância 1.

Resultados e discussão

FIGURA 4.19 – Experimento gNOESY (400 MHz, CDCl₃) para a substância 1.

Resultados e discussão

FIGURA 4.20 – Experimento gNOESY (400 MHz, CDCl_3) para a substância 1.TABELA 4.1 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C para a substância 1.

Posição	δ em ppm RMN ^1H	δ em ppm RMN ^{13}C
1	-	-
2	-	184,4
3	5,67 (1H, <i>s</i>)	114,9
4	-	173,8
5	-	88,6
6	2,43 (1H, <i>dt</i> , $J=14,0$; 2,8 e 2,4 Hz) e 1,77 (1H, <i>dd</i> , $J=14,0$ e 3,6 Hz)	47,6
7	4,30 (1H, <i>m</i>)	68,8
8	1,95 (1H, <i>dt</i> , $J=14,4$; 2,8 e 2,0 Hz) e 1,50 (1H, <i>dd</i> , $J=14,4$; e 3,6 Hz)	49,4
9	-	37,8
10	1,76 (3H, <i>d</i> , $J=1,2$ Hz)	29,0
11	1,25 (1H, <i>s</i>)	32,6
12	1,44 (1H, <i>s</i>)	28,4

RMN ^1H e ^{13}C feitos em CDCl_3 , 9,8T.

Resultados e discussão

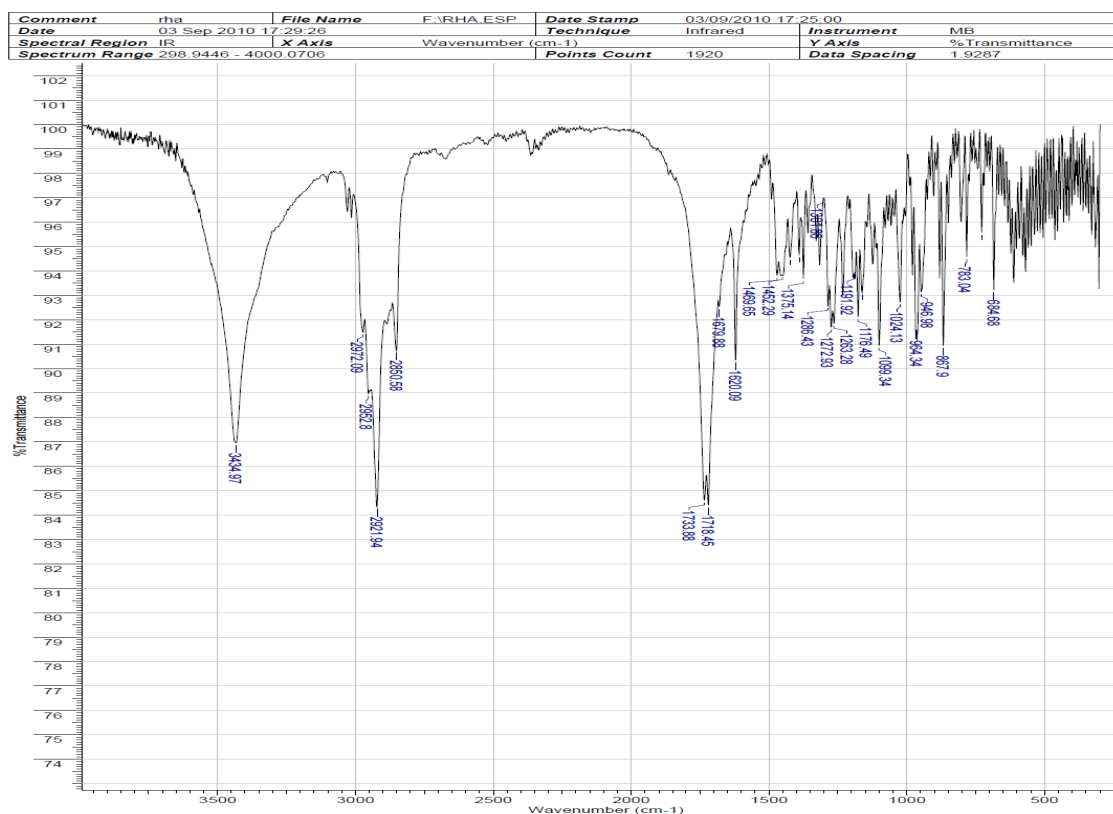


FIGURA 4.21 – Espectro de Infravermelho do composto 1.

Analisando o espectro de infravermelho do composto 1 (Fig. 4.21) observa-se em 1718 e 1733 cm^{-1} uma banda com ponta dupla, característica de vibrações de deformação axial C=O. Esse dublete pode ser explicado pela ressonância de Fermi por combinações com absorção de grupos α à carboxila. As γ -lactonas saturadas (anéis de 5 átomos) absorvem em frequências maiores do que os ésteres ou do que as δ -lactonas, entre 1795-1760 cm^{-1} . A insaturação α à carboxila diminui a frequência de absorção, no caso 1733 e 1718 cm^{-1} (Silverstein, 2006). A banda em 3434 cm^{-1} , confirma a presença da hidroxila no composto 1, pois é característica de vibrações de deformação axial de grupo O-H. Entre 2950 e 2972 observa-se bandas intensas referentes a vibrações de deformação axial de ligações C-H de grupos metila e metilenos (SILVERSTEIN, 2006).

4.1.1.2 - Proposta de Fragmentação da Rhabdodendron lactona.

Analisando o espectro de massas do composto **1** (Fig. 4.23), obtido via CG-EM (70 eV), pode-se propor as fragmentações abaixo. Todas elas reforçam a estrutura proposta para o composto **1**.

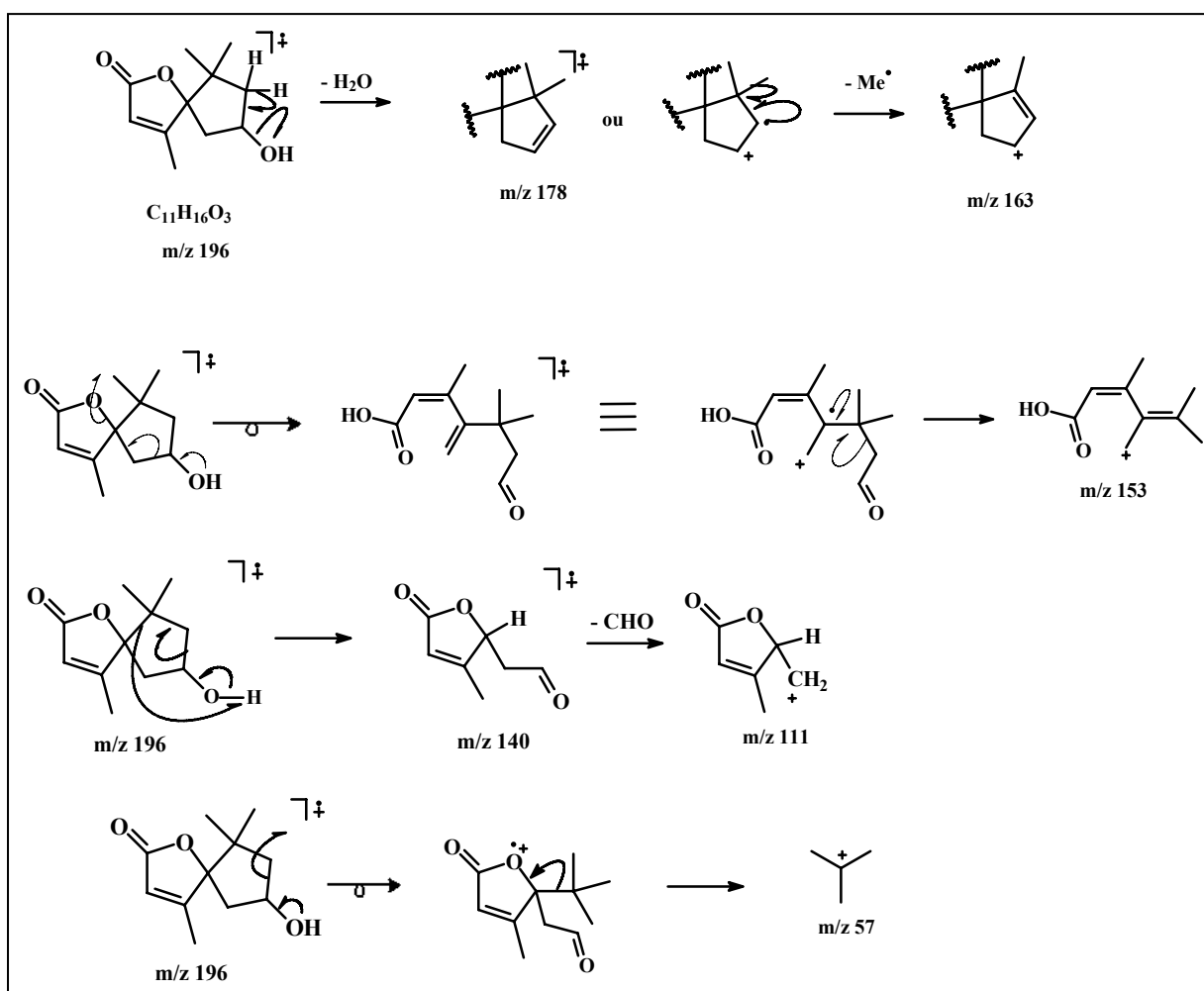


FIGURA 4.22 – Proposta de fragmentação para o composto **1**, m/z 196.

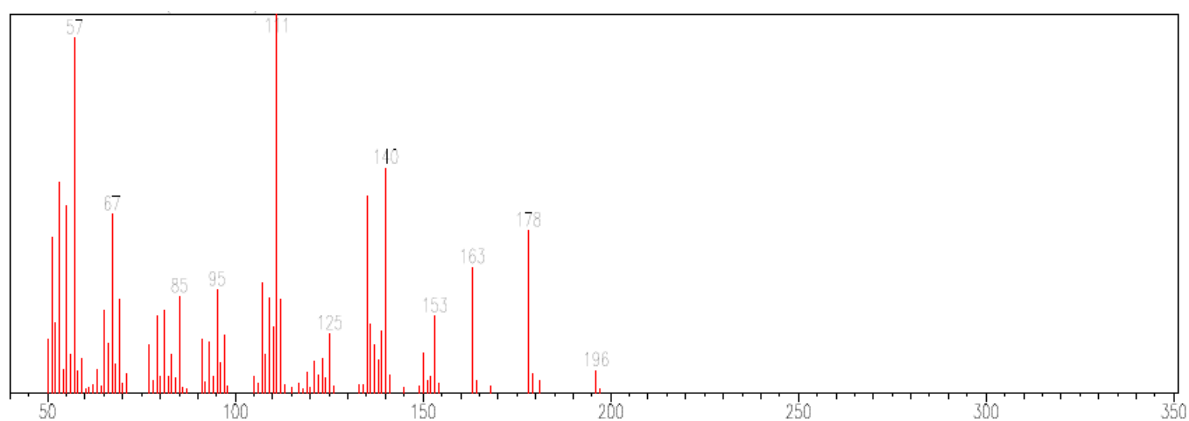


FIGURA 4.23 – Espectro de massas do composto 1.

4.1.1.3 – Proposta de Biogênese para a rhabdodendronlactona

Foi isolado do mesmo extrato, um norsesquiterpene do tipo ionona 1,5,5-trimetil-6-(3-hidroxi-n-butil-ciclohex-1-ene-3-ona, denominada blumenol C (ver ítem 4.2). Este norsesquiterpene pode ser o precursor da rhabdodendronlactona via o caminho biogênico proposto abaixo.

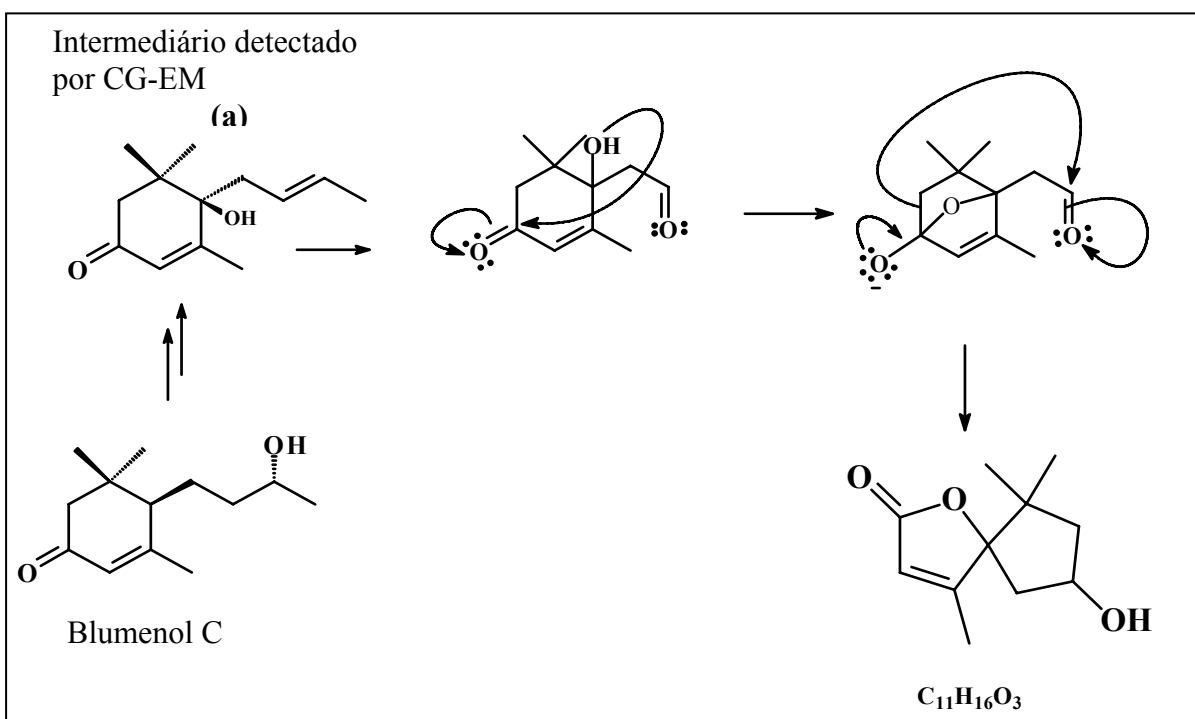


FIGURA 4.24 – Proposta de biogênese para o composto 1.

Resultados e discussão

Com o objetivo de reforçar a proposta de biogênese para a rhabdodendronlactona, foi realizada uma busca por análise CG-EM do íon molecular m/z 208, correspondente à massa molecular de um dos intermediários propostos. Para isso, uma alíquota da mesma fração da qual foi isolado o composto **1**, foi analisada por espectrometria de massas por impacto eletrônico de 70 eV, onde foi possível detectar no cromatograma, um pico cujo íon molecular foi m/z 208. Este íon pode ser atribuído ao intermediário 1,5,5-trimetil-6 β -hidroxi-6-but-2-enil-ciclohex-1-ene-3-ona (a) da figura 4.24. A proposta de fragmentação (Fig. 4.26) para o intermediário foi coerente com os sinais de fragmentos do espectro de massas (Fig. 4.25).

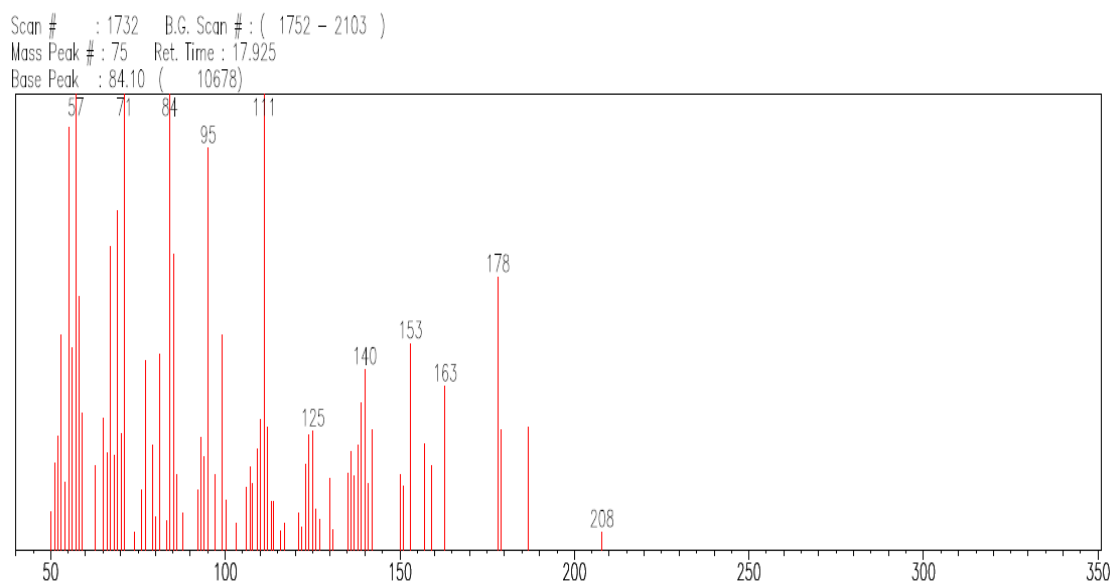


FIGURA 4.25 – Espectro de massas do intermediário 1,5,5-trimetil-6 β -hidroxi-6-but-2-enil-ciclohex-1-ene-3-ona (a)1. GC-EM, IE 70 eV.

4.1.5 – Proposta de fragmentação EM-IE 70 eV do intermediário da biogênese da Rhabdodendronlactona.

A proposta de fragmentação abaixo para o possível intermediário 1,5,5-trimetil-6β-hidroxi-6-but-2-enil-ciclohex-1-ene-3-ona (a) confirma a sua participação na rota biogênética proposta para o composto **1**. A literatura cita a biossíntese de derivados do blumenol C (MALER et. al., 1998), e os resultados são concordantes com a proposta feita para o composto **1**.

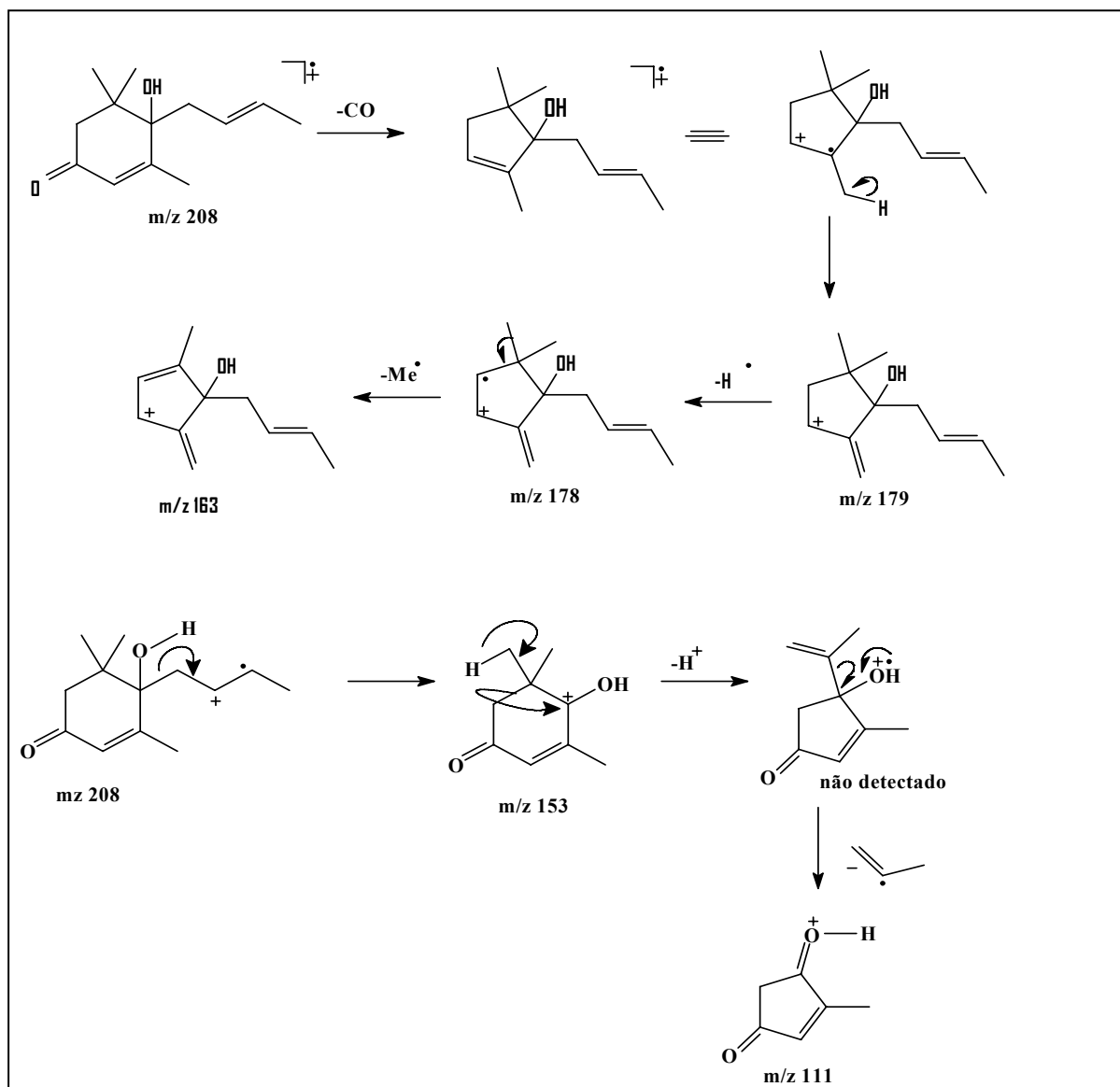
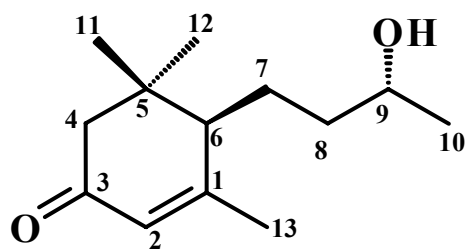


FIGURA 4.26 – Proposta de fragmentação para o intermediário m/z 208 da rhabdodendronlactona.

4.1.2 - Determinação estrutural da substância 2.

A substância **2** foi determinada utilizando RMN ^1H e ^{13}C e espectrometria de massas. O espectro de RMN ^1H apresentou sinais característicos de metila, hidrogênio olefínico, oximetínico, metilênicos e metínico (Fig. 4.27 - 4.28) (Tab. 4.2). O sinal em δ 5,83 é característico de hidrogênio olefínico alfa-carbonila, o sinal em δ 3,77 é referente a um hidrogênio oximetínico. Em δ 2,40 e 2,06 existem dois dubletos, integrando para 1 hidrogênio cada, com uma constante de acoplamento de 17,0 Hz, indicando uma constante geminal de um grupo CH_2 isolado. O sinal em δ 1,99 (3H, $J = 1,2$ Hz) com constante de acoplamento característico de acoplamento alílico, é de uma metila que provavelmente acopla com o hidrogênio que apresenta sinal em δ 5,83. Estes dados indicam a presença de uma ciclohexanona α,β -insaturada com uma metila no carbono β . É possível ainda notar um sinal em δ 1,21 (3H, d $J = 5,2$), sinais de CH_2 entre δ 1,50 e 1,76 e dois sinais de metila em δ 1,07 (3H) e δ 1,02 (3H). O dubleto da metila em δ 1,21 sugere uma hidroxila no penúltimo carbono de uma cadeia lateral, podendo ser este o oximetínico, cujo sinal de hidrogênio aparece em δ 3,77. Com estes dados e mais aqueles do espectro de RMN ^{13}C (Fig. 4.29), pode-se propor para a substância **2** a estrutura 1,5,5-trimetil-6-(3-hidroxi)-butenil-ciclohex-1-eno-3-ona. Comparando com os dados da literatura, verificou-se tratar do norsesquiterpeno blumenol C (ITO & ETHO, 1996) e (LIMA, 2005).

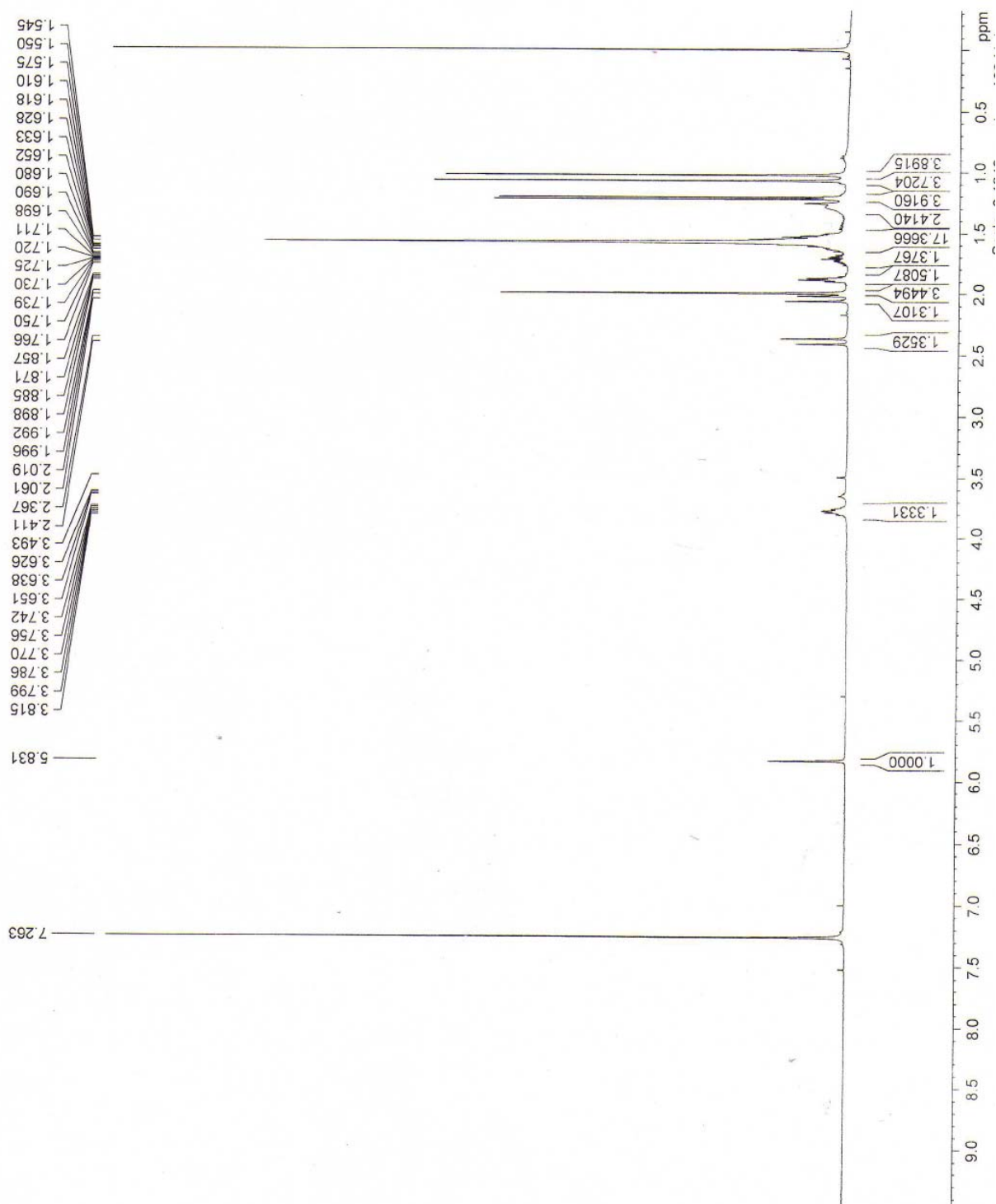
O espectro de massas para este composto (Fig. 4.30) mostra os mesmos picos encontrados para o blumenol C [(m/z IE 70 eV: 55 (28), 69 (49), 79 (32), 84 (28), 93 (69), 108 (92), 123 (36), 135 (82), 150 (24), 177 (20), 192 (3), 195 (2), 210 (17, M^+)] (WINTERHALTER, 1990).



Blumenol C

TABELA 4.2 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C de 2, comparados com a literatura.

Carbono	δ H (ppm)	δ H (ppm) literatura (ITO & ETHO, 1996)	δ ^{13}C (ppm)	δ ^{13}C (ppm) literatura (LIMA, 2005)
1	-	-	165,3	165,9
2	5,83 (1H, s)	5,84 (1H, s)	125,2	125,3
3	-	-	199,8	199,8
4	2,06 (1H, d, $J=17$) e 2,40 (1H, d, $J=17$)	2,03 (1H, d, $J=17$) e 2,39 (1H, d, $J=17$)	47,2	47,1
5	-	-	36,3	36,3
6	1,86 a 1,90 (1H, m)	1,30 – 2,10 (5 H, m)	51,2	51,1
7	1,52 a 1,77 (2H, m)		26,3	26,2
8	1,52 a 1,77 (2H, m)		38,7	38,6
9	3,77 (1H, m)	3,77 (1H, m)	68,4	68,1
10	1,21 (3H, d, $J=5,2$)	1,22 (3H, d, $J=6$)	23,7	23,8
11	1,07 (3H, s)	1,07 (3H, s)	27,2	27,2
12	1,02 (3H, s)	1,02 (3H, s)	28,8	28,8
13	1,99 (3H, d, $J=1,2$)	2,00 (3H, d, $J=1,2$)	24,7	24,7

FIGURA 4.27 – Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância **2**.

Resultados e discussões

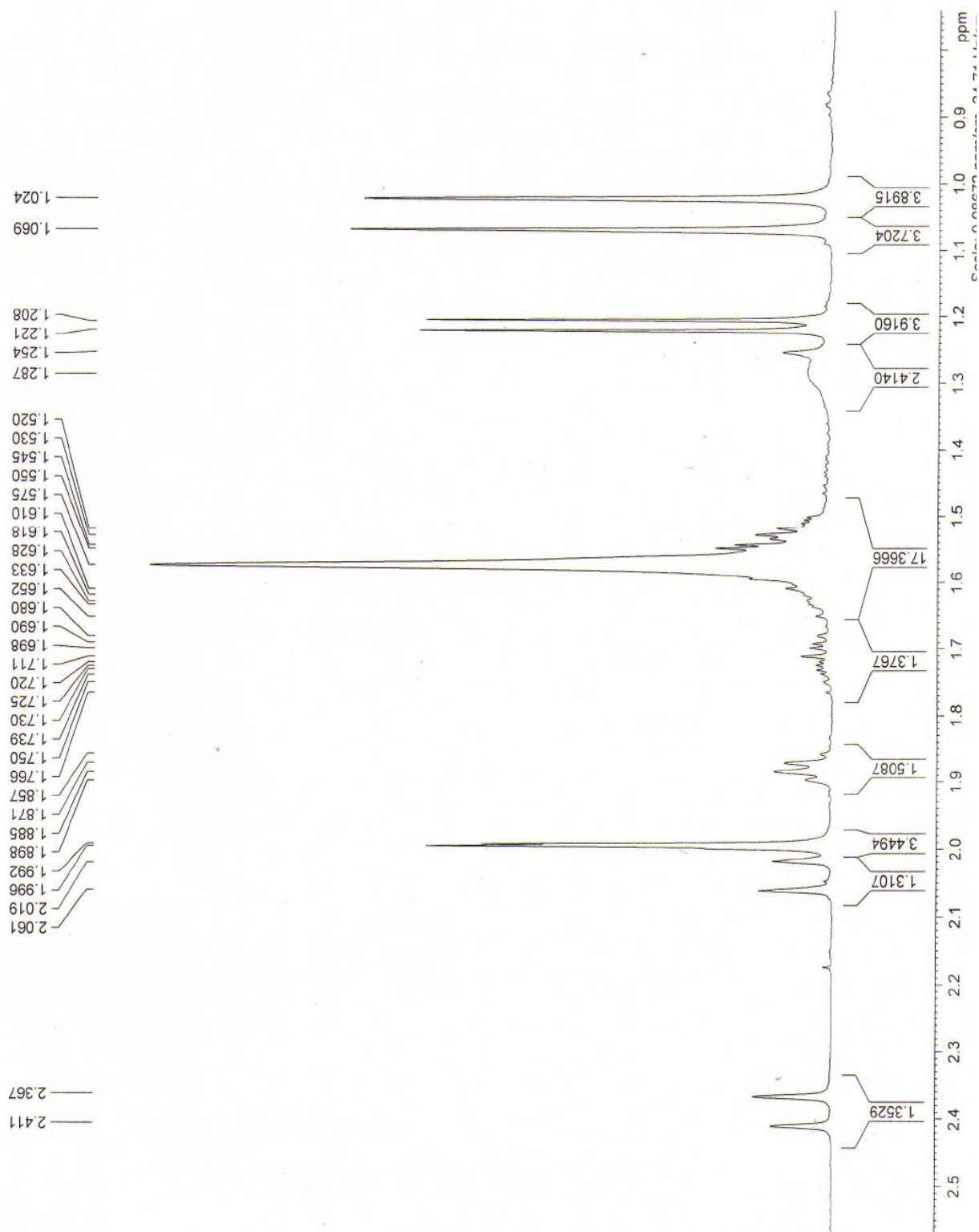
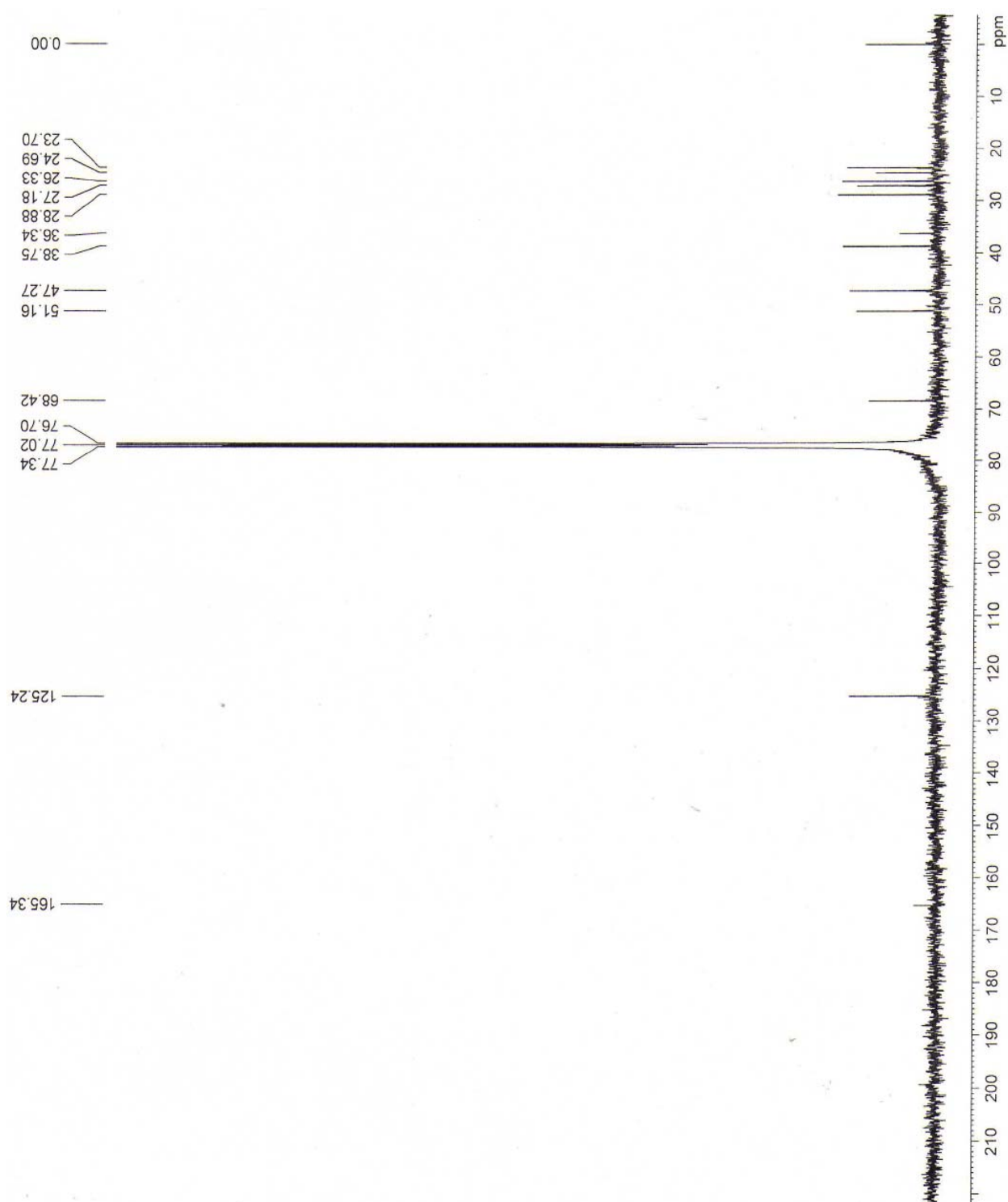


FIGURA 4.28 – Ampliação do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) para a substância **2**.

Resultados e discussões

FIGURA 4.29 – Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) para a substância 2.

Resultados e discussões

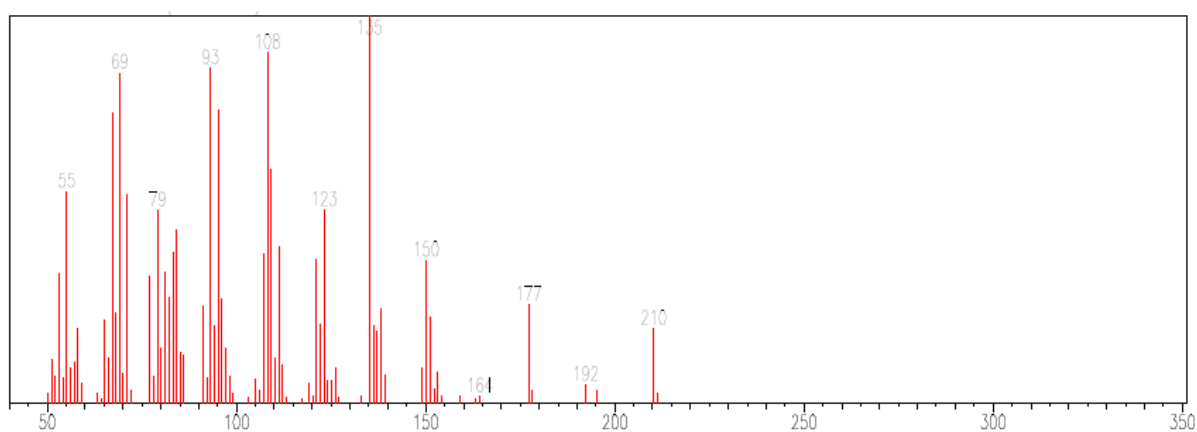


FIGURA 4.30 - Espectro de massas para o composto **2** (blumenol C).

4.1.3 - Determinação estrutural da substância 3.

A substância **3** foi obtida da fração diclorometano do extrato etanólico das folhas da *Rhabdodendron amazonicum*, e foi caracterizada por RMN ^1H e ^{13}C (Fig. 4.31 – 4.34) e por comparação com os dados da literatura (TABELA 4.3 e TABELA 4.4). Apresentou-se como um sólido branco amorfo, e no UV absorveu no comprimento de onda de 254nm.

No espectro de RMN ^1H de **3**, foram observados os sinais em δ 5,41 (*dl*, $J = 4,4$ Hz) e na região entre δ 0,69 e 2,01, sinais semelhantes ao do β -sitosterol. Entretanto, a desblindagem do H-3 de δ 3,53 para 4,75, a presença de um conjunto de sinais na região de aromáticos, típicos de anel aromático monossustituído e sinais em δ 6,43 ($J = 16,0$ Hz) e 7,67 ($J = 16,0$ Hz) sugeriram a esterificação da posição **3** por um grupo cinamato.

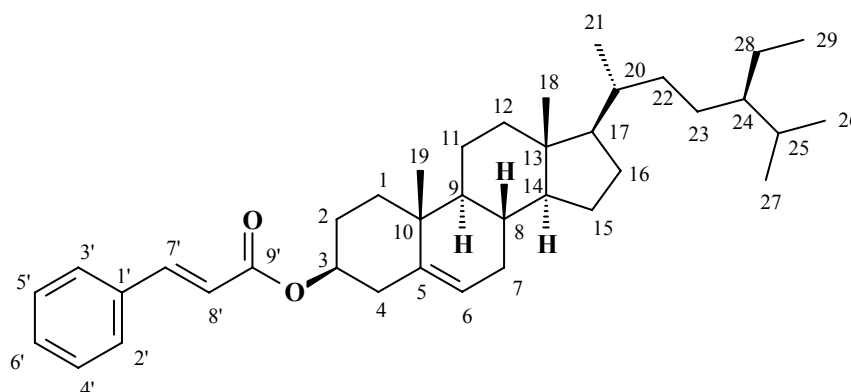
TABELA 4.3 – Dados RMN ^{13}C do substituinte cinamato para a substância **3**.

Posição	δ ^{13}C (ppm) de 3 ^(a)	δ ^{13}C (ppm) literatura ^(b)
1'	134,58	134,50
2'	128,05	128,05
3'	128,88	129,05
4'	130,16	130,50
5'	128,88	129,05
6'	128,05	128,05
7'	144,42	144,51
8'	118,75	118,77
9'	166,42	166,00

(a) CDCl_3 , 9,8 T. (b) CDCl_3 (BARRETO *et. al.*, 1998).

Resultados e discussão

O espectro de RMN ^{13}C apresentou 36 sinais de carbonos, sendo os sinais em δ 128,9 e 128,1 relativos a 2 carbonos em ambientes quimicamente iguais para cada sinal, totalizando 38 carbonos para esta substância. Na região mais blindada do espectro, observou-se sinais que por comparação com valores de deslocamentos dados na literatura foi possível atribuí-los como sendo do esqueleto esteroidal do β -sitosterol. Os sinais em δ 166,4 (C-9'), 144,4 (C-7'), 134,6 (C-1'), 130,2 (C-4'), 128,9 (C-3'; C-5') e 128,1 (C-2'; C-6') e 118,8 (C-8') (TABELA 4.3), por comparação com dados da literatura (BARRETO *et al.*, 1998), foram atribuídos aos carbonos do esqueleto do substituinte cinamato .



Substância 3 – Cinamato de β -sitosterila.

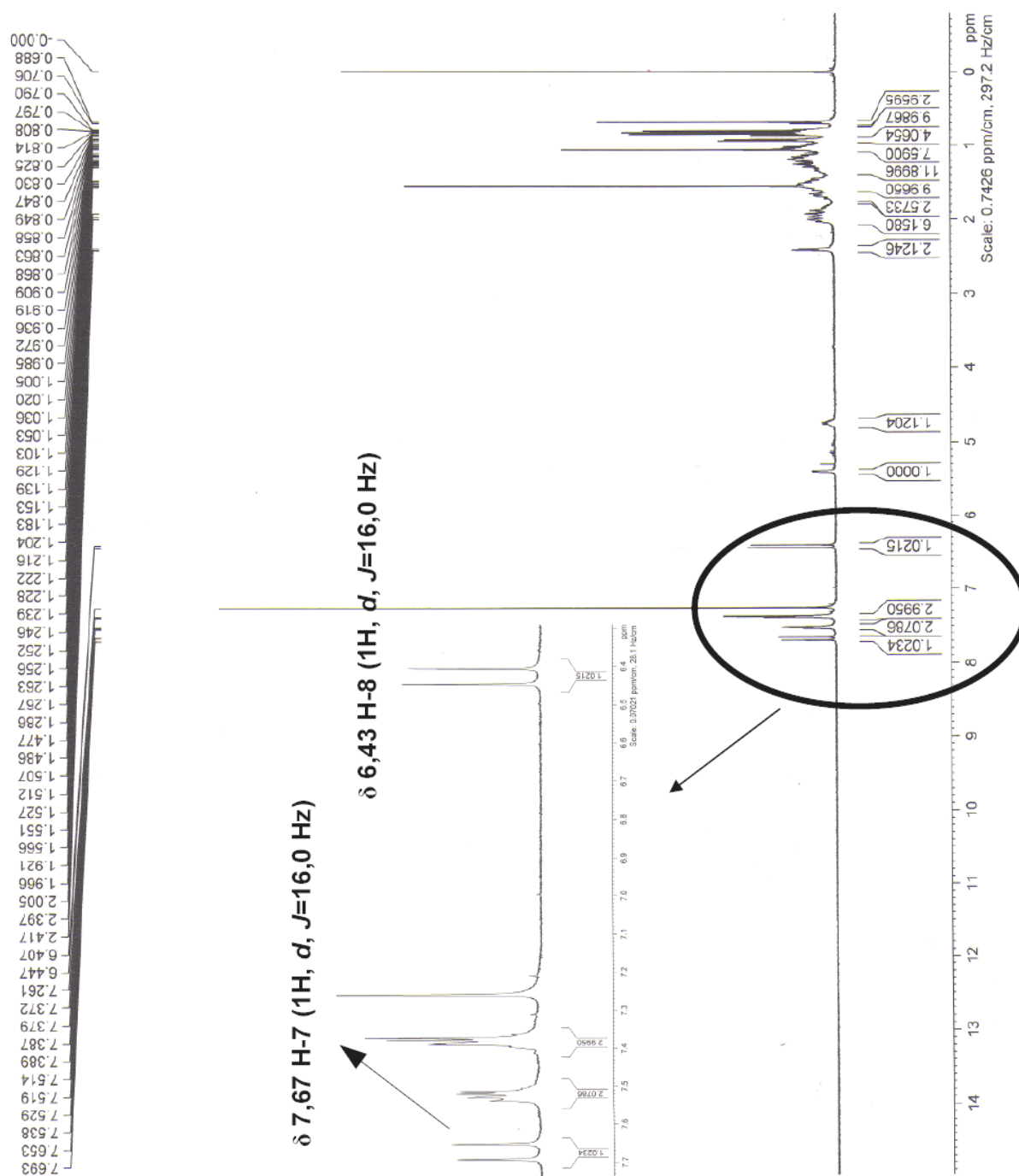
Resultados e discussão
TABELA 4.4 – Dados de RMN ^{13}C para a substância 3.

Posição	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) de 3^(a)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) literatura^(c)
1	37,06	37,05
2	33,98	34,75
3	74,13	73,70
4	38,26	38,20
5	139,72	139,77
6	122,73	122,57
7	31,91	31,93
8	31,95	31,93
9	50,09	50,10
10	36,67	36,64
11	21,07	21,07
12	39,76	39,78
13	42,35	42,36
14	56,73	56,74
15	24,32	24,31
16	28,27	28,25
17	56,07	56,11
18	11,89	11,87
19	19,38	19,33
20	36,18	36,18
21	18,81	18,81
22	33,98	34,01
23	26,12	26,20
24	45,88	45,92
25	29,19	29,26
26	19,84	19,81
27	19,06	19,08
28	23,10	23,13
29	12,01	12,00

(b) Devido não ter encontrado relatos na literatura do cinamato de β -sitosterol, os dados de carbono foram comparados com os dados do benzoato de β -sitosterol (AMBROZIN, 2004).

(a) e (c) – CDCl_3 , 9,8 T.

Resultados e discussão

FIGURA 4.31 – Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) para a substância **3**.

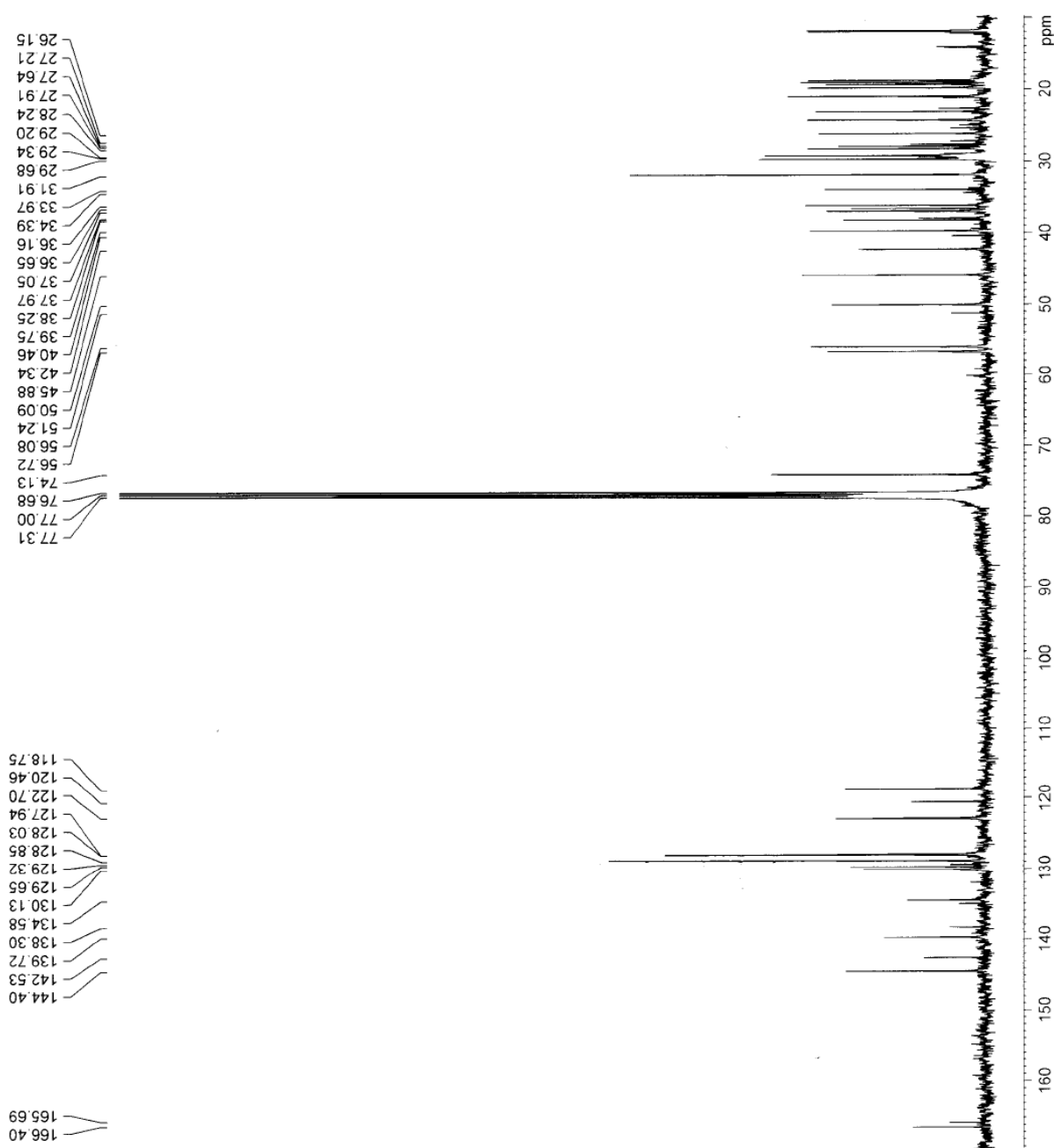


FIGURA 4.32 – Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) para a substância **3**.

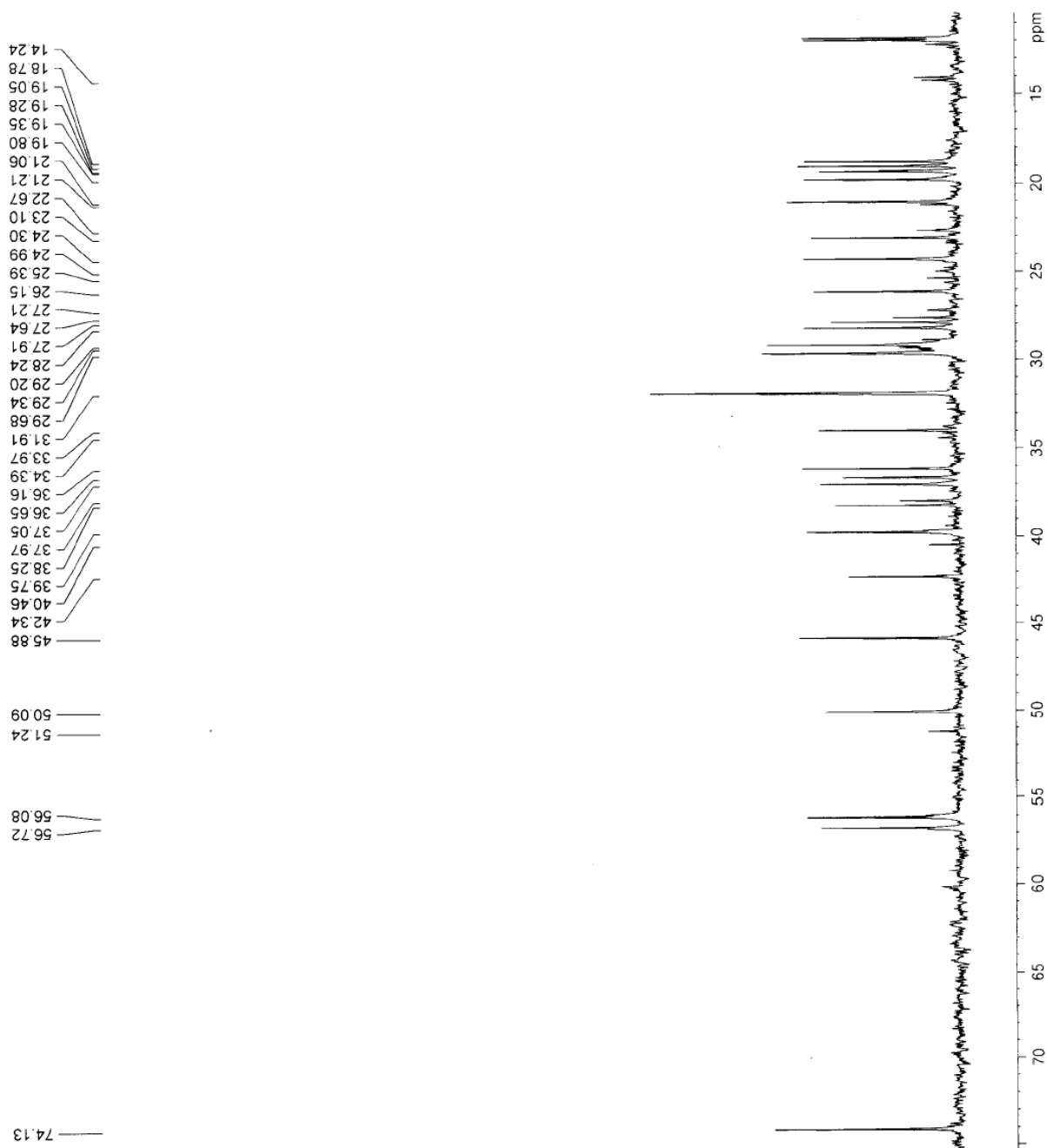


FIGURA 4.33 – Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) para a substância **3** na faixa de deslocamento entre 11,00 a 74,13 ppm.

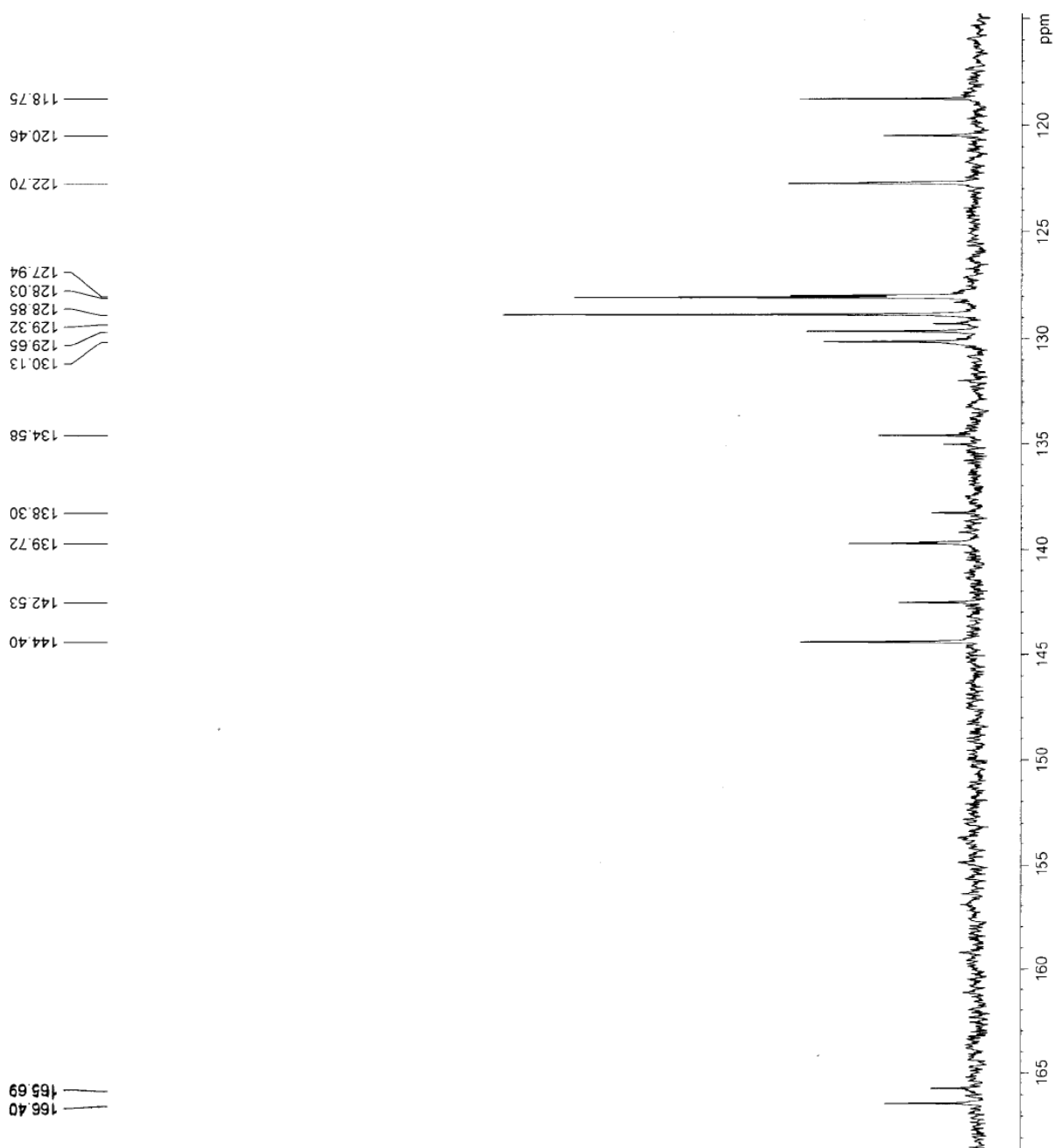


FIGURA 4.34 – Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) para a substância **3** na faixa de deslocamento entre 118,75 a 166,40 ppm.

4.2 - DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS De *Conchocarpus inopinatus*.

4.2.1 - Alcalóides

Plantas que contêm alcalóides têm servido à humanidade desde épocas antigas. Há milhares de anos, os grupos indígenas em todo mundo descobriram através da auto-experimentação, que macerados de algumas plantas poderiam ser usados para várias aplicações, desde captura de presas, cura de doenças, dentre outras. Conheceu-se também que o uso de algumas plantas deveriam ser evitado por serem altamente tóxicas. Hoje já é conhecida a toxicidade e altas atividades biológicas de vários alcalóides (BUCKINGHAM *et al.*, 2010).

Diversas atividades biológicas já foram relatadas na literatura para alcalóides derivados do ácido antranílico, desde antimicrobiana até atividade tripanocida. Neste trabalho foram isolados 1 alcalóide derivado do ácido antranílico, conhecido como alcalóide acridônico, 1 alcalóide furoquinolínico e 1 alcalóide do tipo quinolônico.

4.2.2 - Determinação estrutural da substância 4

No espectro de RMN ^1H (Fig. 4.35) os sinais em δ 8,52 (1H, *dd*, $J = 8,2$ e $1,4$ Hz; H-5), 7,45 (1H, *tl*, $J = 1,0$ Hz; H-6), 7,74 (1H, *ddd*, $J = 7,2$ e $1,6$ Hz; H-7), 7,57 (1H, *dl*, $J = 8,5$; H-8), são de hidrogênios aromáticos referentes ao anel A do esqueleto quinolônico. O sinal em δ 6,34 (1H, *s*; H-3) é do anel B. Em δ 7,42 e δ 7,52, observa-se multipletos referentes aos hidrogênios do grupo fenila que está ligado ao carbono 2 do esqueleto quinolônico, e o sinal em δ 3,63 (3H, *s*) corresponde ao grupo metila ligado ao nitrogênio do alcalóide, posição 1. Comparando os deslocamentos dos sinais no espectro de RMN ^1H e os

Resultados e discussão

valores das constantes de acoplamento, com dados da literatura (Biavatti et. al., 2002) (Tabela 4.5), a substância foi então identificada como sendo o alcalóide 1-metil-2-fenil-4-quinolona.

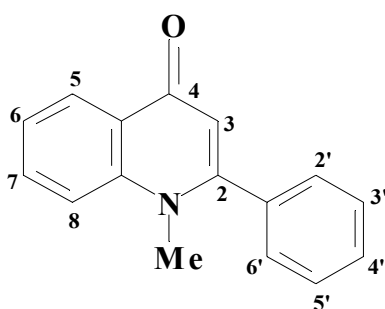
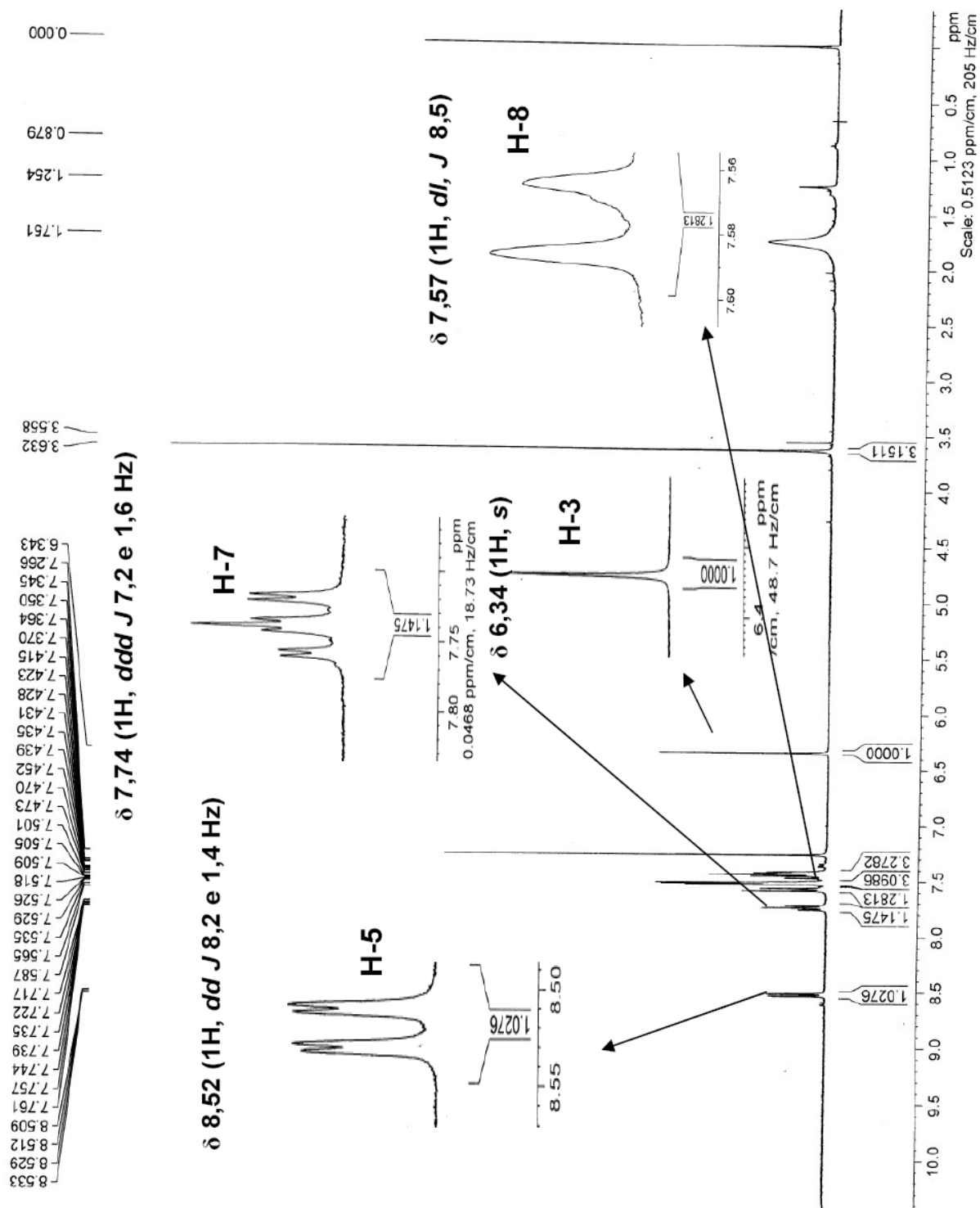


Tabela 4.5 - Dados químicos de RMN ^1H para o composto 4 e comparação com dados da literatura.

Posição	δ H J (Hz) ^(a)	δ H J (Hz) lit. ^(b)
2	-	-
3	6,34 s	6,31 s
4	-	-
5	8,52 dd (8,2; 1,4)	8,51 dd J (8,0;1,4)
6	7,45 tl (1,0)	7,45 tl (1,0)
7	7,74 ddd (7,2; 1,6)	7,73 ddd (7,8; 1,6)
8	7,57 dl (8,5)	7,57 d (8,5)
9	-	-
10	-	-
1'	-	-
2'	7,42 m	7,42 m
3'	7,52 m	7,52 m
4'	7,52 m	7,52 m
5'	7,52 m	7,52 m
6'	7,42 m	7,42 m
N-Me	3,63 s	3,62 s

(a) CDCl_3 , 400 MHz; (b) CDCl_3 (400 MHz) (BIAVATTI et al., 2002).

Resultados e discussão

FIGURA 4.35 – Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) para o composto **4**.

4.2.3 - Determinação estrutural da substância 5

O espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) (Fig. 4.36 e 4.37) da substância **5** apresenta dois dubletos em δ 7,64 e 7,10 ($J=2,8$ Hz) que indicam a presença de um anel furano. Um singlete em δ 4,47 (3H), é característico de metoxila na posição 4 de alcalóides furoquinolínicos. O espectro mostra ainda sinais em δ 8,29 (1H, *dd*, $J=8,4$ e 1,4 Hz), 7,72 (1H, *ddd*, $J=8,4$; 8,4 e 1,4), 7,45 (1H, *ddd*, $J=8,4$; 8,4 e 1,4) e um dubleto largo em δ 8,01 ($J=8,4$), sugerindo um anel aromático *orto* dissustituído.

A análise dos dados e a comparação com dados da literatura (PUSSET et al., 1991) indicam que a substância **5** é o alcalóide furoquinolínico conhecido como dictamina que é amplamente distribuído em plantas da família Rutaceae. Os dados de RMN ^1H da substância **5** e os dados da literatura estão apresentados na tabela 4.6.

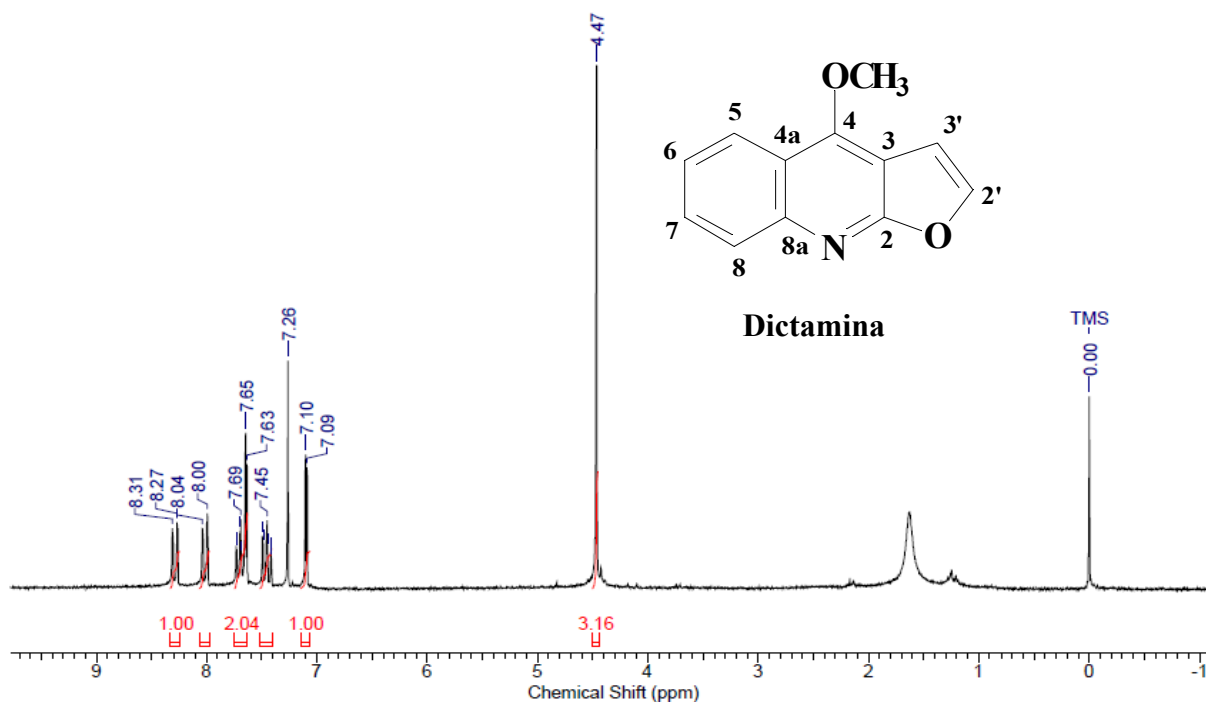


FIGURA 4.36 – Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto **5**.

Resultados e discussão

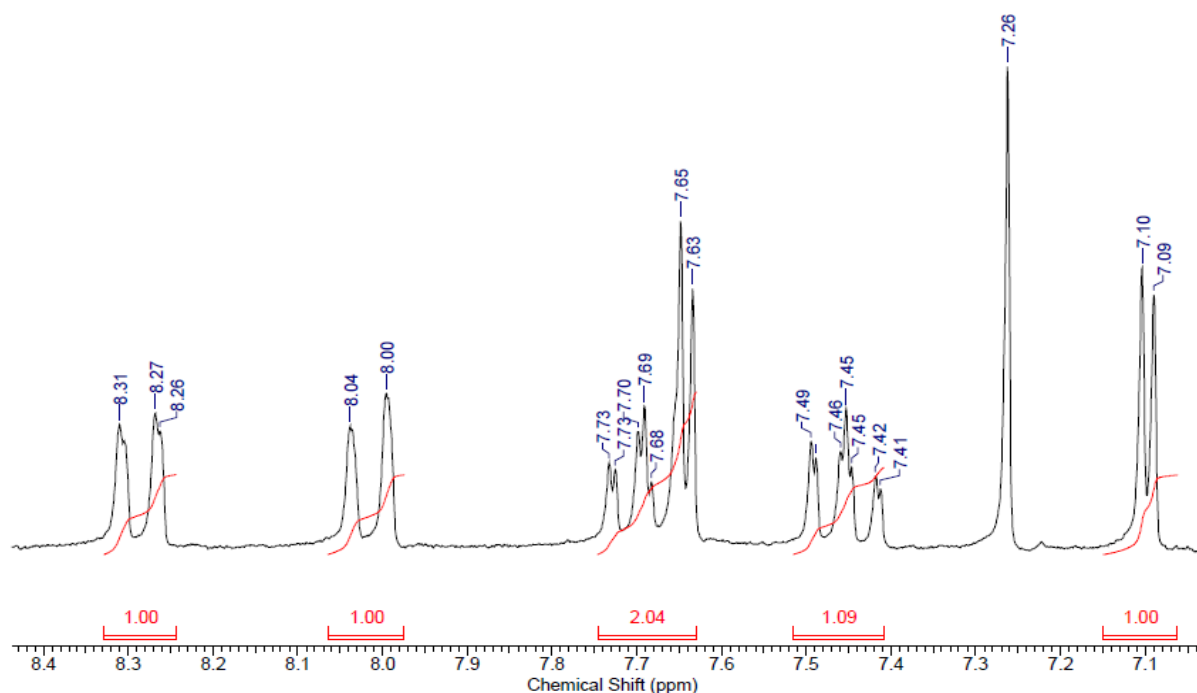


FIGURA 4.37 – Ampliação do espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) da substância 5.

TABELA 4.6 – Dados de RMN ^1H da substância 5, comparação com os dados da literatura.

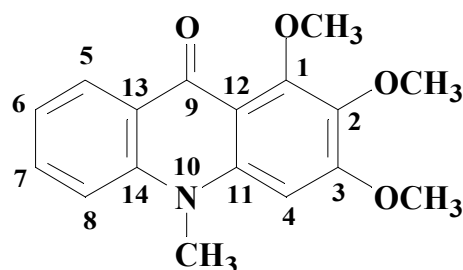
Posição	δ H (ppm) de 5 ^(a)	δ H (ppm) literatura ^(b)
5	8,29 (1H, <i>dd</i> , $J=8,4$ e 1,4 Hz)	8,27 (1H, <i>dd</i> , $J=8,4$ e 1,7 Hz)
6	7,45 (1H, <i>ddd</i> , $J=8,4$; 8,4 e 1,4 Hz)	7,45 (1H, <i>ddd</i> , $J=8,4$; 8,4 e 1,7 Hz)
7	7,69 (1H, <i>ddd</i> , $J=8,4$; 8,4 e 1,4 Hz)	7,68 (1H, <i>ddd</i> , $J=8,4$; 8,4 e 1,4 Hz)
8	8,01 (1H, <i>dl</i> , $J=8,4$ Hz)	8,01 (1H, <i>dl</i> , 8,4 e 1,4 Hz)
2'	7,64 (1H, <i>d</i> , $J=2,8$ Hz)	7,69 (1H, <i>d</i> , $J=2,8$ Hz)
3'	7,10 (1H, <i>d</i> , $J=2,8$ Hz)	7,08 (1H, <i>d</i> , $J=2,8$ Hz)
4-OCH ₃	4,47 (3H, <i>s</i>)	4,45 (3H, <i>s</i>)

(a) CDCl_3 , 200 MHz; (b) CDCl_3 , 200 MHz (PUSSET *et al.*, 1991).

4.2.4 - Determinação estrutural da substância 6.

A substância **6**, um sólido amarelo, amorfo, em CCDA apresentou fluorescência sob a luz UV no comprimento de onda 365 nm, coloração amarela quando revelada em vanilina e alaranjada quando reage com dragendorff, dados característicos de alcalóides.

Analisando o espectro de RMN ^1H (Fig. 4.38), observou-se sinais em δ 8,51 (1H, *ddd*, $J=8,0$; 1,6 e 0,4 Hz), 7,66 (1H, *ddd*, $J=8,8$; 7,0 e 1,6 Hz), 7,45 (1H, *dl*, $J=8,8$ Hz) e 7,28 (1H, *ddd*, $J=8,0$; 7,0 e 0,8 Hz), os quais foram atribuídos como sendo de um anel aromático *orto* dissubstituído. O espectro de RMN ^1H também apresenta os sinais em δ 6,63 (1H, *s*) de um hidrogênio de anel aromático pentassubstituído, e sinais em δ 4,05 (3H, *s*), 4,04 (3H, *s*), 3,93 (3H, *s*), 3,86 (3H, *s*) associados a hidrogênios de metilas ligadas a oxigênio, e um sinal em δ 3,66 (3H, *s*) de hidrogênios de metila ligada a nitrogênio. Esses dados sugerem a presença de um alcalóide acridônico. A ausência de sinal na região entre δ 12,00 e 14,00, que seria de uma hidroxila quelada com o oxigênio da carbonila, indicou a presença de um grupo metoxila na posição *peri* a carbonila do esqueleto acridônico. Com a comparação destes dados com a literatura, verificou-se que a substância **6** refere-se ao alcalóide metilarborinina.



1,2,3-trimetoxi-N-metilacridona
(metilarborinina)

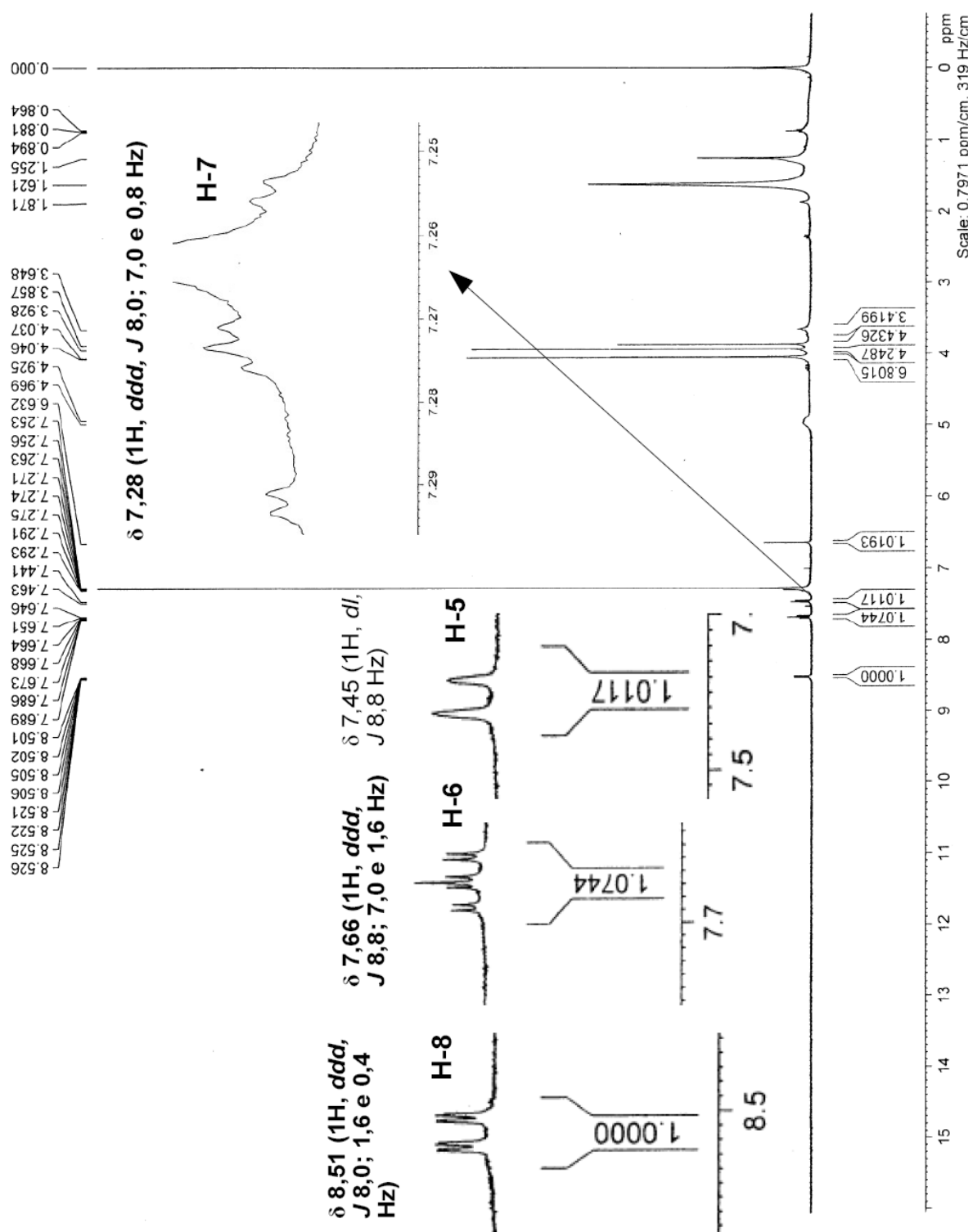
Resultados e discussão

 TABELA 4.7 – Dados de RMN ^1H do composto **6** e comparação com os dados da literatura.

Posição	RMN ^1H δ (ppm) ^(a)	RMN ^1H δ (ppm) ^(b)
1 -OMe	4,05 (3H, <i>s</i>)	4,03 (3H, <i>s</i>)
2 -OMe	3,93 (3H, <i>s</i>)	3,90 (3H, <i>s</i>)
3 -OMe	4,04 (3H, <i>s</i>)	3,98 (3H, <i>s</i>)
4	6,63 (1H, <i>s</i>)	6,50 (1H, <i>s</i>)
5	7,45 (1H, <i>dl</i> , $J=8,8$)	7,31 (1H, <i>dl</i> , $J=8,6$)
6	7,66 (1H, <i>ddd</i> , $J=8,8$; 7,0 e 1,6 Hz)	7,56 (1H, <i>ddd</i> , $J=8,7$; 7,0 e 1,7 Hz)
7	7,28 (1H, <i>ddd</i> , $J=8,0$; 7,0 e 0,8 Hz)	7,19 (1H, <i>ddd</i> , $J=8,0$; 7,0 e 0,9 Hz)
8	8,51 (1H, <i>ddd</i> , $J=8,0$; 1,6 e 0,4 Hz)	8,44 (1H, <i>ddd</i> , $J=8,0$; 1,7 e 0,4)
N-Me	3,66 (3H, <i>s</i>)	3,70 (3H, <i>s</i>)

 (a) CDCl_3 , 400 MHz; (b) CDCl_3 , 400 MHz (MAFEZOLI, 2002).

Resultados e discussão

FIGURA 4.38 – Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto 6.

4.2.5 - Determinação estrutural da substância 7.

O espectro de RMN ^1H de 7 (Fig. 4.39) apresentou sinais característicos de esqueleto cumarínico. Observou-se sinais em δ 7,60 (1H, *d*, *J* 9,5 Hz; H-4) 6,22 (1H, *d*, *J* 9,5 Hz; H-3) referentes a hidrogênios nas posições 4 e 3, respectivamente, em δ 7,22 (1H, *t*, *J* 1,2 Hz; H-5) e δ 6,75 (1H, *s*) associados a hidrogênios aromáticos em posição *para*, um em relação ao outro, indicando a linearidade de 7, o hidrogênio em δ 7,22 acopla com os hidrogênios em δ 3,22 (H-3'). Os sinais em δ 3,22 (2H, *m*) associados aos hidrogênios β -diidrofurânicos ou benzílicos, e o sinal em δ 4,74 (1H, *dd*, *J*=9,4 e 8,9 Hz) de um hidrogênio ligado ao carbono 2' oximetínico, indicando a presença de um anel diidrofurano linear no esqueleto cumarínico. Observa-se ainda 2 sinais em δ 1,38 (3H, *s*) e 1,24 (3H, *s*), de duas metilas geminais ligadas ao carbono 4' do substituinte do anel furânico ligado ao esqueleto cumarínico.

TABELA 4.8 – Dados de RMN ^1H da substância 7 e comparação com dados da literatura.

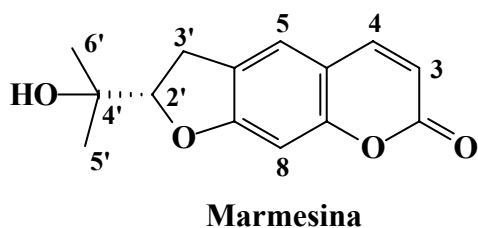
Posição	RMN ^1H δ (ppm) ^(a)	RMN ^1H δ (ppm) literatura ^(b)
3	6,22 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =9,5 Hz)	6,14 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =9,5 Hz)
4	7,60 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =9,5 Hz)	7,56 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =9,5 Hz)
5	7,22 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> =1,2 Hz)	7,16 (1H, <i>s</i>)
8	6,75 (1H, <i>s</i>)	6,76 (1H, <i>s</i>)
2'	4,74 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =9,4 e 8,4 Hz)	4,71 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> =9,0 Hz)
3'	3,22 (2H, <i>m</i>)	3,20 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> =9,0 Hz)
5'	1,38 (3H, <i>s</i>)	1,35 (3H, <i>s</i>)
6'	1,24 (3H, <i>s</i>)	1,22 (3H, <i>s</i>)
-OH	1,80 (1H, <i>sl</i>)	2,20 (1H, <i>s</i>)

(a) CDCl_3 , 400 MHz; (b) CDCl_3 (JIMÉNEZ, *et al.*, 2000).

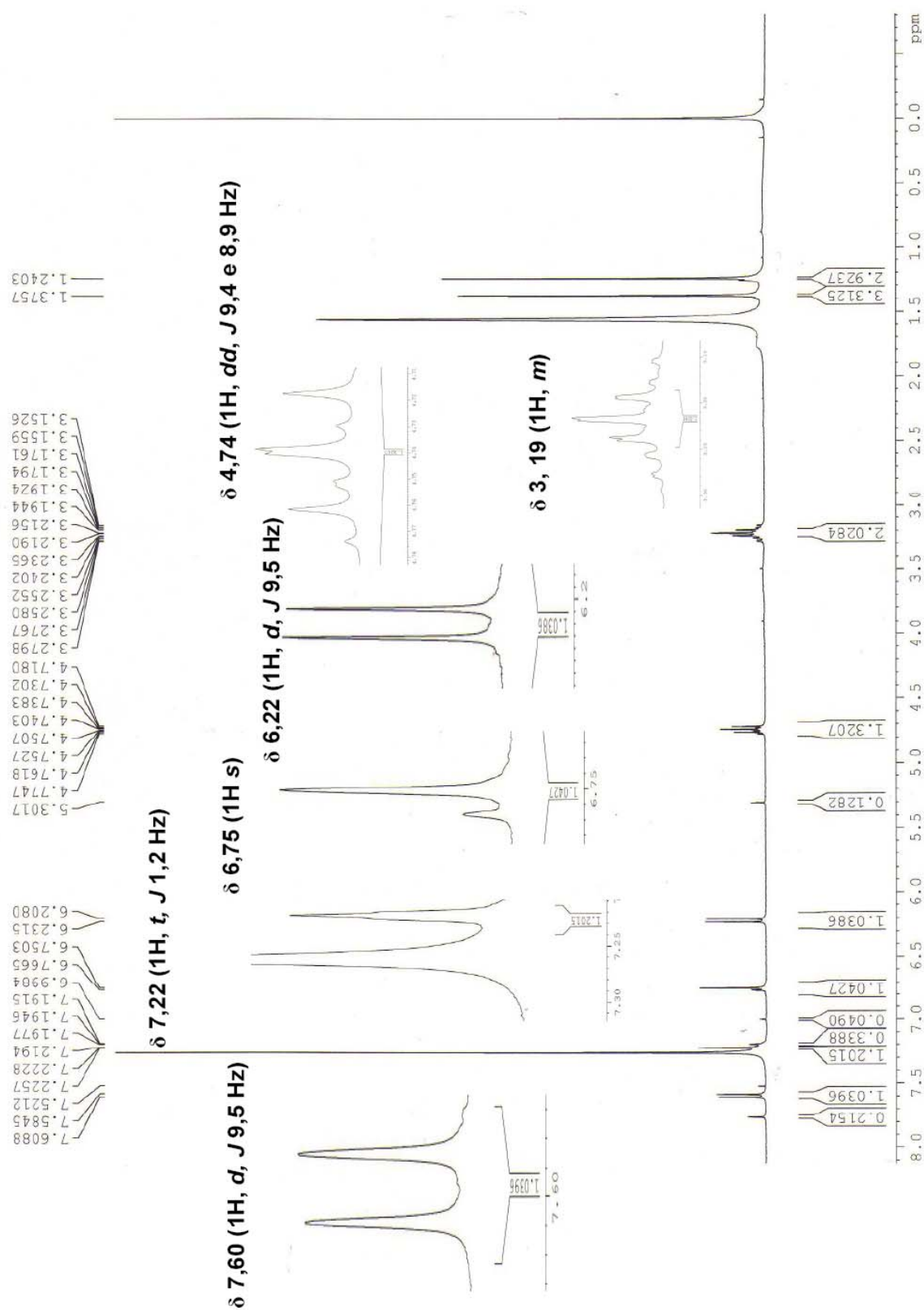
Resultados e discussão

O espectro de massas de **7** apresentou o pico do íon molecular com razão m/z em 246 daltons e fórmula molecular $C_{14}H_{14}O_4$.

A partir dos dados obtidos e da comparação com os valores de deslocamento e constantes de acoplamento com dados da literatura (JIMÉNEZ et. al., 2000) (TABELA 4.8), foi confirmada a estrutura da marmesina para a substância **7**.



Resultados e discussão


 FIGURA 4.39 – Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) para o composto 7.

4.2.6 - Determinação estrutural da substância 8

O espectro de RMN ^1H da substância **8** (Fig. 4.40), apresenta na região de hidrogênios aromáticos dubletos em δ 7,60 (1H, $J=9,5$ Hz) e 6,27 (1H, $J=9,5$ Hz), característicos de hidrogênios 3 e 4 de esqueleto cumarínico. O espectro mostra ainda dois singletos em δ 6,93 e 6,85, ambos integrando pra 1 hidrogênio, sugerindo um anel aromático 1,2,4,5 substituído, tais singletos foram atribuídos aos hidrogênios H-5 e H-8, respectivamente. A presença de apenas um sinal singlete em δ 3,96 indica a presença de uma metoxila, o que sugere que o outro substituinte no anel seja uma hidroxila. Desta forma, duas estruturas podem ser propostas, a 7-hidroxi-6-metoxicumarina, comumente conhecida como escopoletina ou o seu isômero 6-hidroxi-7-metoxicumarina (isoescopoletina). Os dados de RMN ^1H foram coerentes com os da literatura (PAULA *et al.*, 1995) (TABELA 4.9)

A distinção dos isômeros pode ser feita com base na análise do espectro de massas, onde a escopoletina apresenta um sinal m/z 177, cuja abundância relativa é em torno de 60-70% (AMBROZIN, 2004), ao passo que seu isômero pode apresentar o mesmo pico, no entanto com uma intensidade não tão alta, em torno de 16%. Isso ocorre pelo fato de que o íon formado pela escopoletina pode ser mais estabilizado do que o formado pela isoescopoletina (SALLES, 1995).

O espectro de massas da substância **8** apresentou o pico 192 m/z como sendo do íon molecular (Fig. 4.41), coerente com a massa molecular da estrutura proposta. Porém o reconhecimento da substância como sendo a escopoletina e não o seu isômero, isoescopoletina foi possível através do pico 177 m/z , o qual apresentou intensidade relativa de 62 %, característico do tipo de fragmentação da escopoletina, onde é possível a maior estabilização desse fragmento iônico pelo tipo de conjugação dos pares eletrônicos do oxigênio e

Resultados e discussão

das ligações π (Fig. 4.42). A partir destes dados e também da comparação com os dados da literatura, foi possível atribuir a estrutura da escopoletina para a substância **8**.

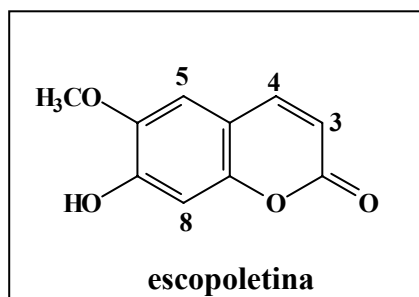


TABELA 4.9 – Dados de RMN ^1H para o composto **8** e dados da literatura.

Posição	δ H (ppm) de 8 ^(a)	δ H (ppm) literatura ^(b)
3	6,27 (1H, <i>d</i> , $J=9,5$ Hz)	6,26 (1H, <i>d</i> , $J=9,3$ Hz)
4	7,60 (1H, <i>d</i> , $J=9,5$ Hz)	7,58 (1H, <i>d</i> , $J=9,3$ Hz)
5	6,93 (1H, <i>s</i>)	6,91 (1H, <i>s</i>)
8	6,85 (1H, <i>s</i>)	6,84 (1H, <i>s</i>)
OCH ₃	3,96 (3H, <i>s</i>)	3,94 (1H, <i>s</i>)

(a) CDCl₃, 200 MHz; (b) CDCl₃, 400 MHz (PAULA *et al.*, 1995).

Resultados e discussão

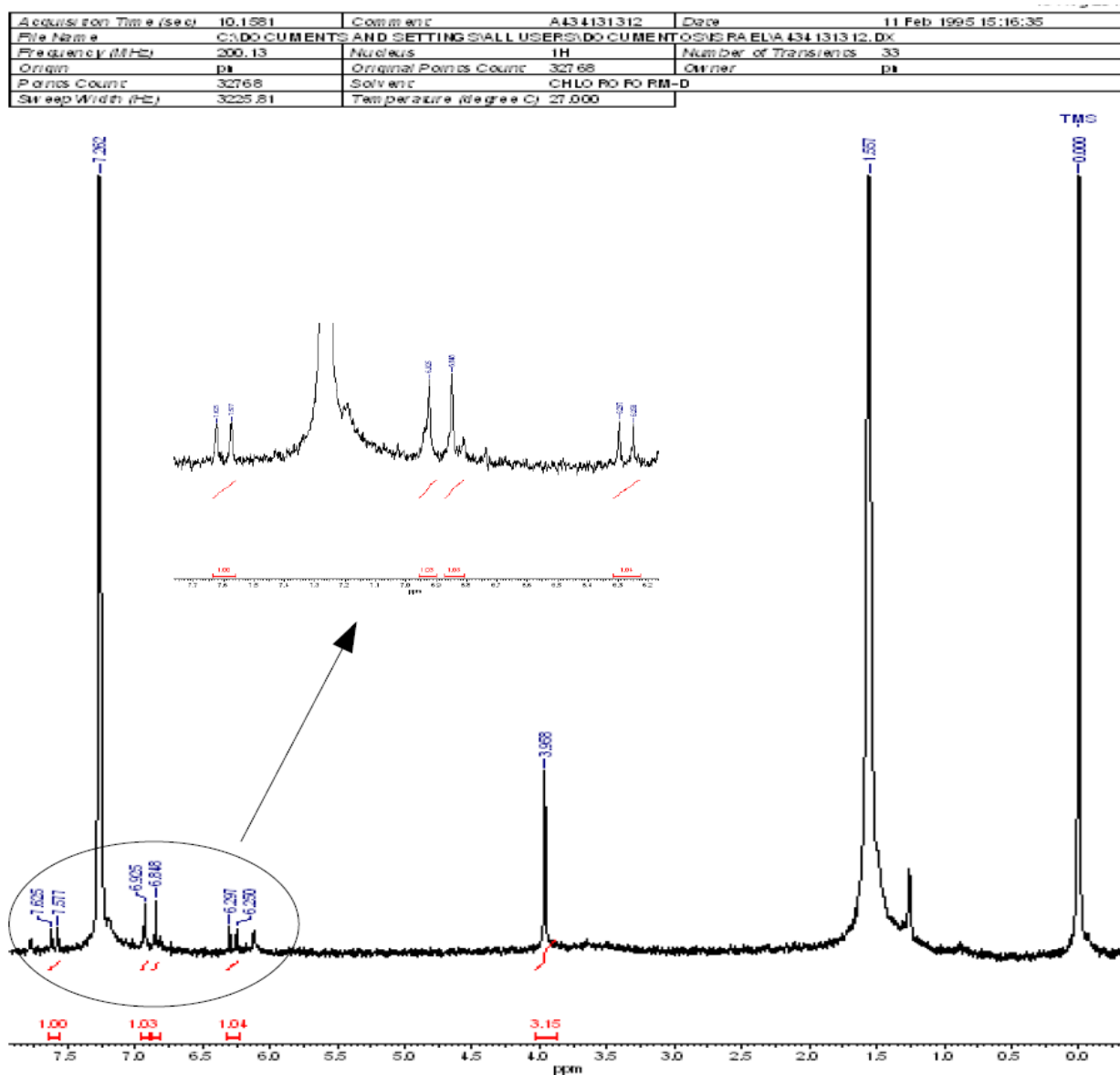


FIGURA 4.40 – Espectro de RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) para o composto **8**.

Resultados e discussão

Scan # : 2089 B.G. Scan # : (2110 - 2232)
 Mass Peak # : 36 Ret. Time : 20.900
 Base Peak : 69.05 (4037)

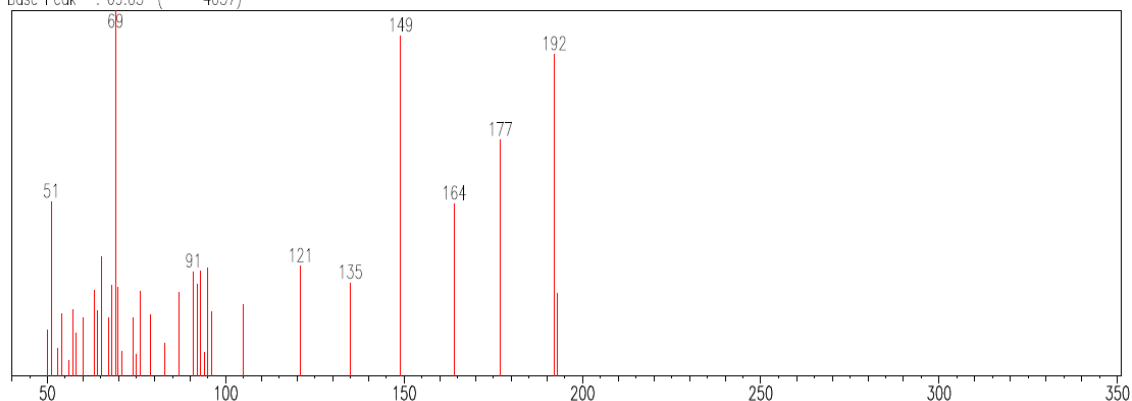


FIGURA 4.41 – Espectro de massas IE 70 eV, para a substância **8**.

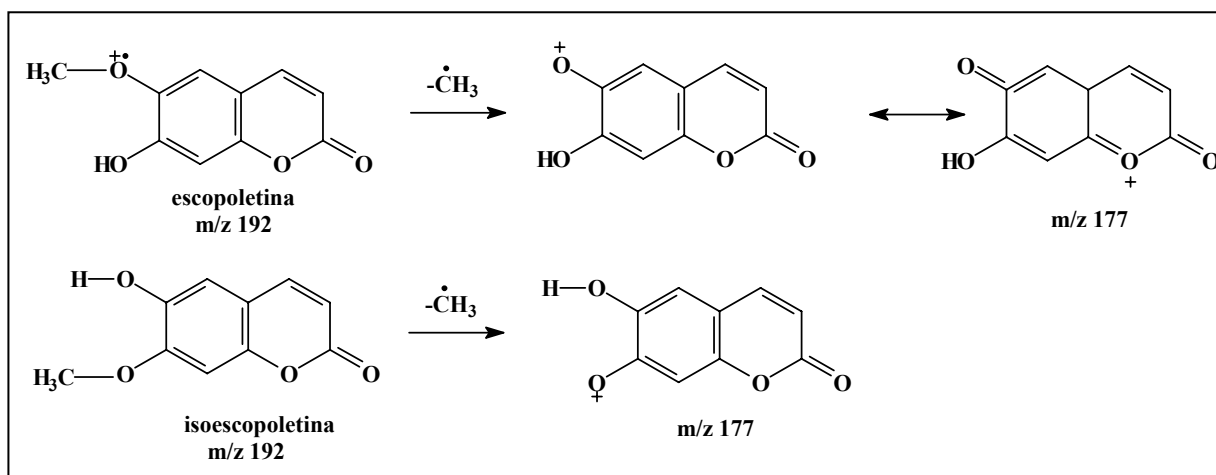
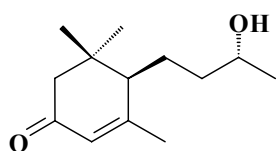


FIGURA 4.42 – Proposta de fragmentação da escopoletina e isoescopoletina para gerar o íon fragmento m/z 177.

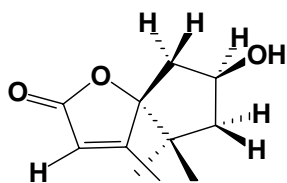
4.3 – Resultados dos ensaios de inibição da fotossíntese.

As substâncias isoladas das duas espécies, *Rhabdodendron amazonicum* e *Conchocarpus inopinatus*, foram ensaiadas sobre o transporte de elétrons, medidos da água ao metilviologênio, o qual foi utilizado como aceptor de elétrons. Foram ensaiadas as substâncias de 1 a 7, a substância 8 foi isolada em quantidade insuficiente para a realização dos ensaios. No entanto, dentre as substâncias ensaiadas, apenas o composto 7 apresentou atividade na inibição do transporte de elétrons basal e desacoplado, sendo provavelmente um inibidor da transdução de energia (YOUNIS & MOHANTY, 1980) e afetou parâmetros de fluorescência da clorofila *a* no fotossistema II.

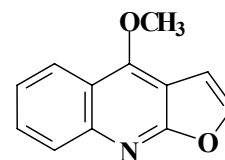
- **Substâncias submetidas aos ensaios de inibição do transporte de elétrons:**



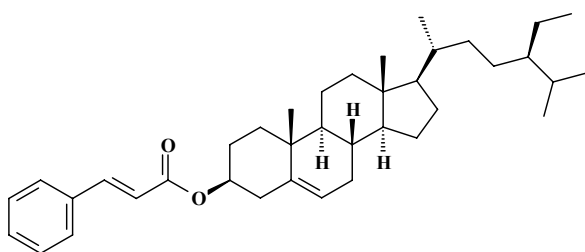
Blumenol C
Rhabdodendron amazonicum



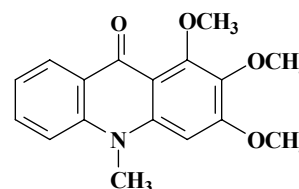
Rhabdodendronlactona
Rhabdodendron amazonicum



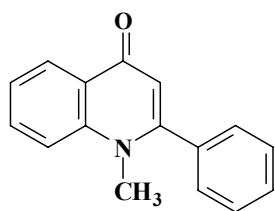
Dictamina
Conchocarpus inopinatus



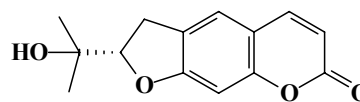
Cinamato de β -sitosterila
Rhabdodendron amazonicum



Metilarborinina
Conchocarpus inopinatus



2-fenil-4-quinolona
Conchocarpus inopinatus



Marmesina
Conchocarpus inopinatus

4.3.1 – Efeito do composto 7 sobre o transporte de elétrons (Basal, desacoplado e fosforilante).

A fotofosforilação é acoplada com o transporte de elétrons que ocorre na membrana dos tilacóides. Desta forma, a formação de ATP pode ser inibida por qualquer bloqueio no transporte de elétrons, por inibição direta do complexo H^+ -ATPase, ou por desacoplamento do processo de síntese de ATP a partir do transporte de elétrons. O efeito do composto 7 (marmesina) sobre o transporte não-cíclico de elétrons, foi testado em três diferentes condições, basal, desacoplado e fosforilante.

Sob determinadas circunstâncias, é conhecido que pode ocorrer um fluxo cíclico de elétrons do lado redutor do fotossistema I, isso ocorre através do uso de um elétron da cadeia transportadora para reduzir a plastoquinona que então captura prótons do estroma para o lúmen dos tilacóides, e depois tais prótons retornam ao estroma através do complexo ATP-sintase. Esse gradiente de prótons acoplado ao fluxo de elétrons, gera um potencial eletroquímico para fornecer energia para a síntese de ATP. A presença de um reagente desacoplador como o NH_4Cl , aumenta a permeabilidade de prótons H^+ na membrana dos tilacóides, e nessas condições, o fluxo linear de elétrons ocorre a altas vazões. O transporte de elétrons desacoplado foi inibido pelo composto 7 com um I_{50} de 126 μM (Fig. 4.43), e o transporte de elétrons Basal foi totalmente inibido a 150 μM com I_{50} de 43 μM (Fig. 4.44).

O transporte de elétrons medido da H_2O a MV (metilviologênio) foi inibido com ou sem a presença do desacoplante cloreto de amônio NH_4Cl (0,25M), porém não inibiu na presença do ADP e fosfato inorgânico (P_i). Esses resultados sugerem que durante o transporte de elétrons basal e desacoplado, o sítio de interação na membrana com o composto 7 esteja em uma conformação que permita uma maior interação, o que não ocorreria no transporte de elétrons

Resultados e discussão

fosforilante (na presença de ADP e P_i), onde a mudança da conformação do sítio de interação pode estar impossibilitando uma maior interação com o composto **7** (MORALES, 2007).

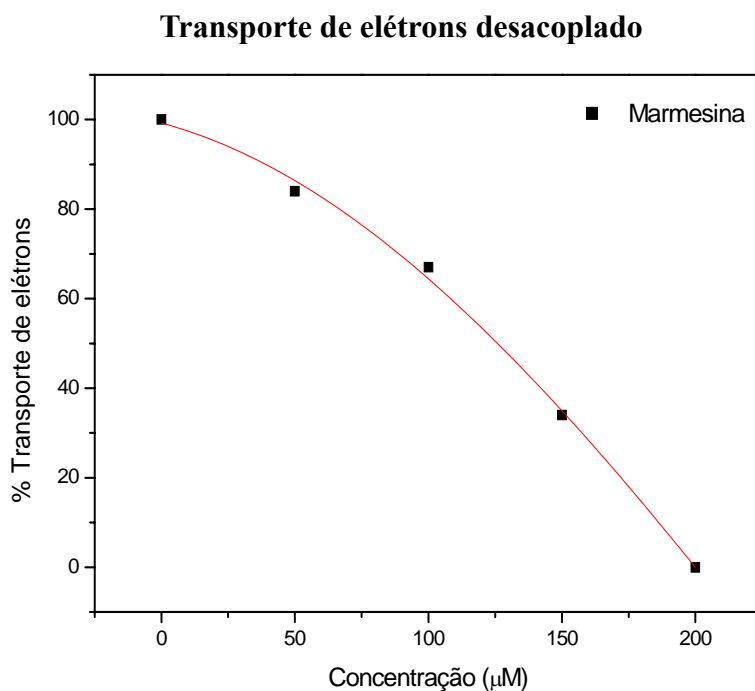


FIGURA 4.43 - Efeito do composto **7** no transporte de elétrons desacoplado da água ao metilviologênio em cloroplastos de espinafre. A razão de transporte de elétrons para o controle foi $500 \mu\text{equiv} e^- \cdot \text{h} \cdot \text{mg Chl}^{-1}$.

Transporte de elétrons basal

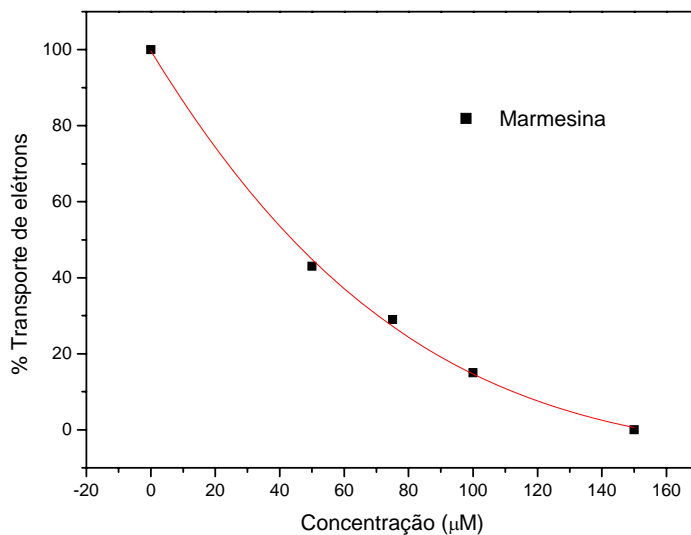


FIGURA 4.44 - Efeito do composto **7** sobre o transporte de elétrons basal da água ao metilviologênio (MV); a razão de transporte de elétrons para o controle foi de $223 \mu\text{equiv} e^{-} \text{h} \cdot \text{mg Chl}^{-1}$.

Transporte de elétrons forforilante

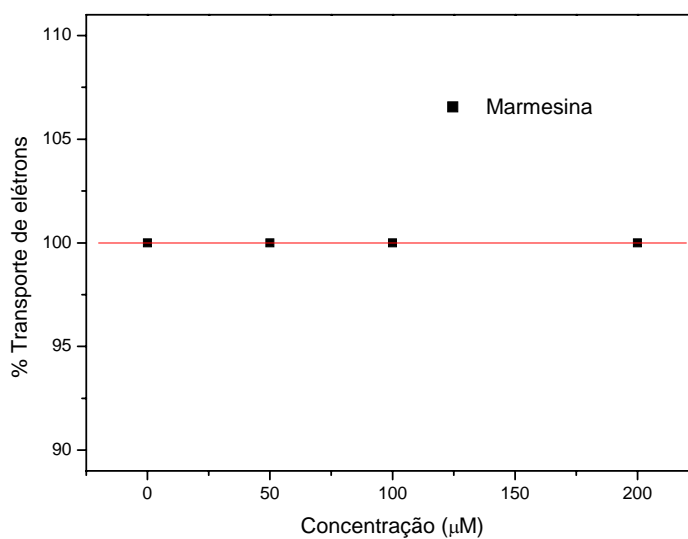


FIGURA 4.45 – Efeito do composto **7** no fluxo de elétrons fosforilante ($\text{H}_2\text{O-MV}$). A razão para o transporte de elétrons para o controle foi $600 \mu\text{equiv} e^{-} \text{h} \cdot \text{mg Chl}^{-1}$.

4.3.2 - Fluorescência da clorofila *a*

Entre as técnicas disponíveis para avaliar condições de stress em termos de fotossíntese, a medida direta da fluorescência da clorofila-*a* e a análise do teste JIP são as melhores técnicas, combinando algumas vantagens: é um método fácil e rápido, de fácil reprodutibilidade, praticidade para processar os dados e reportar os resultados, os instrumentos disponíveis no mercado são relativamente de baixo custo e os procedimentos de medição de fluorescência não são muito dispendiosos (BUSSOTTI *et al.*, 2007)

A progressão ascendente dos transientes [JIP], obtida por meio de medidas em folhas adaptadas ao escuro, é induzida pela saturação com luz vermelha. Em uma escala logarítmica de tempo, o aumento dos transientes de F_0 (Fluorescência a $50\mu\text{s}$, quando todos os centros de reação do fotossistema II estão abertos, isto é, quando o acceptor primário quinona (Q_A) está totalmente oxidado) para F_P (onde $F_P = F_M$ sob saturação de luz, quando a intensidade de excitação é alta o bastante para garantir o fechamento de todos os centros de reação do fotossistema II, isto é, a total redução de todos os centros de reação) teve um comportamento polifásico (BUSSOTTI *et al.*, 2007) (YUSUF *et al.*, 2010).

Através de medidas de fluorescência foi analisada a ação do composto 7 no fotossistema II dos cloroplastos do espinafre.

Para colaborar com os dados polarográficos medidos para o transporte de elétrons nos estados basal, desacoplado e fosforilante, diferentes parâmetros da curva de transientes OJIP foram avaliados (Fig.4.46 e 4.47)(Tab. 4.10):

- $S_m = \text{área} / (F_m - F_0)$
- $N = S_m / S_s$

Resultados e discussão

- $S_s = V_j / M_o$
- $PI_{ABS} = (RC/ABS) (\psi_{P_o}/1 - \psi_{P_o})(\Psi_o/1 - \Psi_o)$
- K_n
- K_p
- V_j
- Di_o/RC
- dv/dt_o
- ET_o/RC
- F_m
- Área

Para análise comparativa dos parâmetros, foram utilizados dois controles positivos: DCMU 50 μ M, Tris 0,8 M, um controle negativo (cloroplastos intactos em meio reacional), e sob a ação do composto 7 (marmesina) sobre o fotossistema II (PSII). Com a concentração de 100 μ M, a área sobre a curva de fluorescência normalizada entre F_0 e F_m , que é proporcional à quantidade de aceptores Q_A no pool de quinonas do PSII decresceu para 74 % e para 83 % a 400 μ M em relação ao controle (branco). Além disso, os parâmetros S_m e N (Fig. 4.47) (Tab. 4.10), que representam o número de vezes que a Q_A é reduzida, diminuíram.

O controle dos tilacóides mostra uma curva de fluorescência polifásica com uma sequência OJIP (JOLY & CARPENTIER, 2007). A adição de 50 μ M do herbicida DCMU, usado como controle positivo, inibe a transferência de elétrons da Q_A aoceptor secundário do fotossistema II (Q_B), que resulta em uma redução rápida do Q_A , o acúmulo de Q_A^- (forma reduzida) induz um rápido aumento do rendimento da fluorescência durante os primeiros 2 ms (milisegundos) de iluminação; isto transforma a sequência regular OJIP numa curva OJ (ACHNINE *et al.*, 1999).

Resultados e discussão

Quando os cloroplastos são tratados com Tris, o conhecido lado doador inibidor do FSII, a forma da curva de indução de fluorescência é reduzida, e isto resulta numa redução no rendimento máximo da fluorescência, nessas condições, todos os níveis, J e I estão ausentes no transiente (STRASSER, 1997) citado por VEIGA *et al.*, (2007).

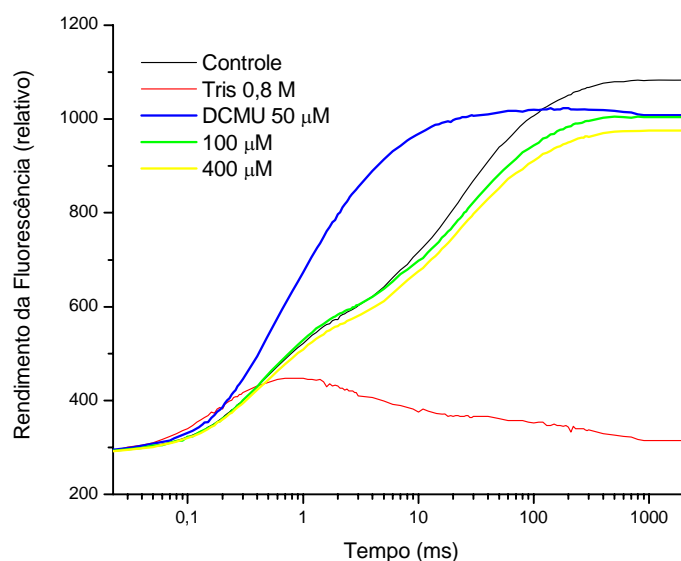


FIGURA 4.46 - Aumento cinético da fluorescência sob ação do composto 7, DCMU 50 μ M, Tris 0,8 M em cloroplastos frescos e intactos isolados de espinafre.

O modelo incluindo os transientes OJIP simula a cinética de fluorescência, a emissão de fluorescência passa de um nível inicial O para um nível máximo P através de transientes intermediários J e I. Segundo ZHU *et al.*, (2005), cálculos computacionais com variável de integração numérica, de MATLAB, e equações diferenciais, forneceram dados para montar experimentos para testar hipóteses quanto ao mecanismo subjacente controlando a cinética OJIP e emissão de fluorescência nesses pontos. Simulações com base neste modelo mostraram que J corresponde às concentrações máximas de $Q_A^-Q_B$ (Q_A e Q_B são a primeira e segunda quinona aceptoras de elétrons do FSII, respectivamente). A fase J-I coincide com o máximo de concentração de $Q_A^-Q_B^{2-}$

Resultados e discussão

e PQH₂. Alterações na fotoquímica relacionada a oxidação-redução do pool de quinonas, leva a uma maior emissão de fluorescência em O, e conseqüentemente diminui a proporção de fluorescência variável/fluorescência máxima (Fv/Fm) (ZHU, 2005). O decréscimo da fluorescência nas fases I e P (Fig. 4.46) sob a ação do composto 7, e a diminuição do parâmetro Fv/Fm (Tab. 4.10) sugere que este pode afetar as reações fotoquímicas que ocorrem para a redução da PQ a PQH₂.

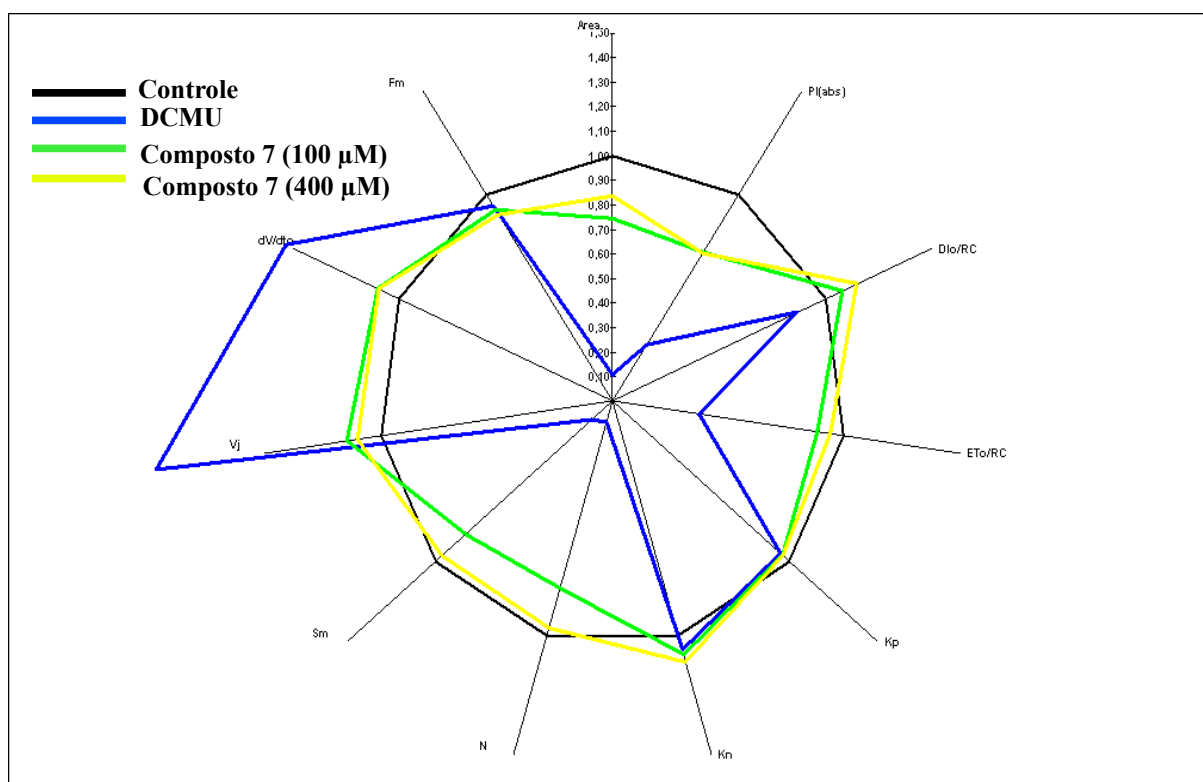


FIGURA 4.47 – Gráfico radar-plot mostra parâmetros de fluorescência da clorofila a sendo afetados pela ação do composto 7 e DCMU.

O nível F_m corresponde ao estado totalmente fechado do FSII. De acordo com evidências experimentais e simulações teóricas, o aumento polifásico da fluorescência entre F₀ e F_m é paralelo à progressiva redução de específicos intermediários transportadores de elétrons no FSII. A maioria dos estudos concordam que a fase O-J corresponde à redução fotoquímica da quinona (aceitador primário de elétrons) do FSII, a Q_A. Vários autores

propuseram que as fases J-I ou I-P deve refletir a emissão dos quenching não-fotoquímicos (NPQ), exercida pelas moléculas de plastoquinona oxidada (JOLY & CARPENTIER, 2007). Baseado nessas informações e com a análise dos parâmetros DI_0/RC e dv/dt_0 relacionados à dissipação de energia não-fotoquímica pelos centros de reação do PSII, onde percebe-se, conforme a figura 4.47, um aumento nesses parâmetros indicando uma maior emissão de energia não-fotoquímica, pode-se dizer sobre a possibilidade da ação do composto **7** no pool de quinonas, porém antes do citocromo b_6/f , já que não apresentou o rápido aumento da fluorescência a 300 ms, como o Tris (Fig. 4.48) que seria observado se o composto atuasse no lado doador (OEC) do fotossistema II. A emissão de energia não-fotoquímica pode ocorrer quando há um acúmulo de transportadores de elétrons na forma reduzida, o que ocorre devido a algum bloqueio no transporte de elétrons, a energia que seria utilizada para o transporte de elétrons é então dissipada na forma de calor ou fluorescência como forma de proteção para evitar o colapso energético na membrana dos cloroplastos, o que pode ocorrer pela formação de radicais livres e peróxidos.

Observa-se ainda na figura 4.47, um acentuado decréscimo no valor de $PI_{(ABS)}$ sob a ação do composto **7**, o que significa uma supressão no desempenho fotossintético, que está relacionado com a quantidade de absorção por centro de reação ativo no PSII. O valor de K_n expressa a constante de emissão de energia não fotoquímica, relacionada à dissipação de energia sob a forma de calor (uma forma de defesa da planta para evitar o colapso dos cloroplastos), ocorre também um leve aumento nessa constante ao mesmo tempo em que a taxa para reações fotoquímicas (K_n) diminui (Fig. 4.45). A variação desses valores k_n e k_p revela a ação do composto **7**, agindo no FSII diminuindo a ocorrência de reações fotoquímicas de oxido-redução que movem o processo fotossintético. O parâmetro F_M é a fluorescência máxima, quando praticamente todos os centros de reação do fotossistema II estão totalmente fechados, e o pool

Resultados e discussão

de quinonas totalmente reduzidos (KING-DÍAZ *et al.*, 2010). Observa-se conforme a tabela 4.10 e figura 4.46, que o composto **7** faz com que a fluorescência máxima seja atingida mais rapidamente. O alto valor de V_J (fluorescência relativa a 2ms na fase J) para o DCMU indica a ação desse composto no sítio de transporte de elétrons entre Q_A e Q_B , o que provoca a redução de Q_A a Q_A^- . Esse valor é mais um indicativo de que o composto **7** atua no pool de quinonas, uma vez que semelhantemente ao DCMU provoca um leve aumento da fluorescência variável na fase J (V_j) (Fig. 4.48), isto não significa que ele atua também entre Q_A e Q_B , mas sim que pode estar impedindo a reoxidação da PQ, causando um acúmulo de Q_A^- , Q_B^- e PQH_2 . O parâmetro ET_0/RC indica a taxa transporte de elétrons após a feofitina por RC ativo, o qual diminui frente ao DCMU e sob a ação do composto **7** a 100 μM , mas não tanto para 400 μM , o que indica que há uma concentração ideal para a inibição da fotossíntese para o composto **7**.

Resultados e discussão

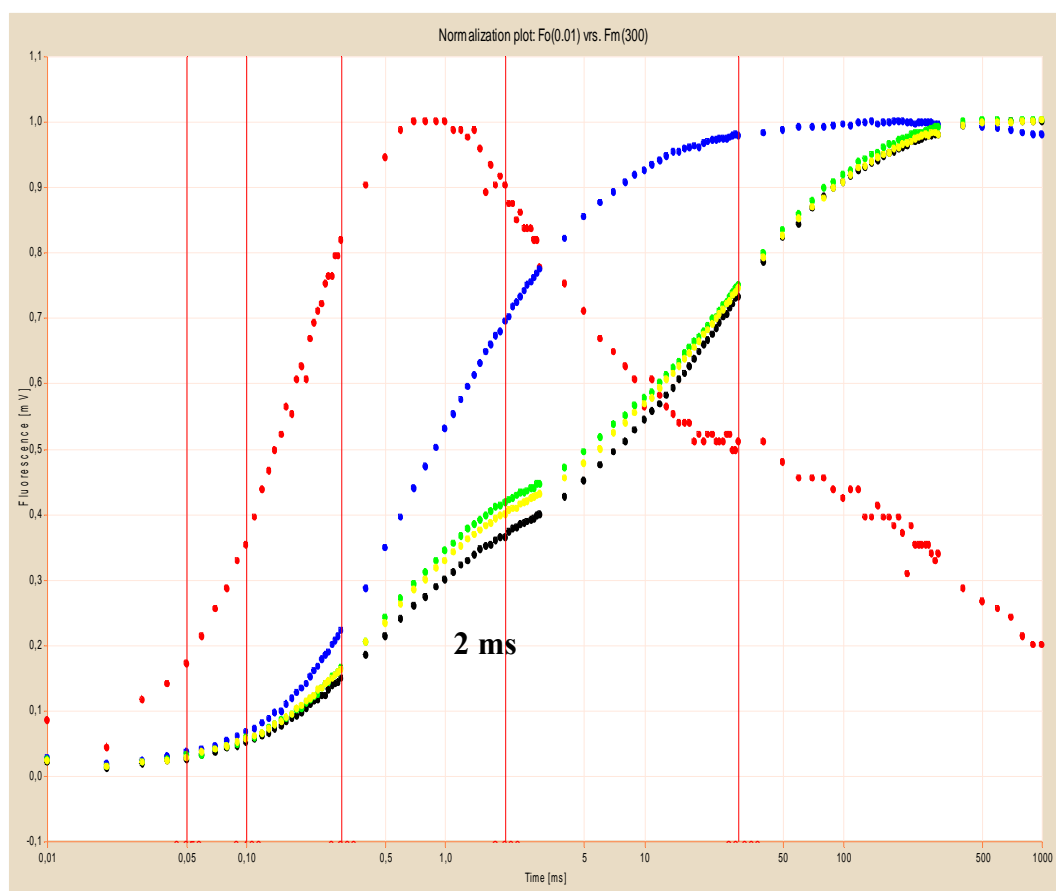


FIGURA 4.48 – Curva de transientes OJIP normalizada entre F_o e F_m mostra leve aumento da fluorescência V_j do composto 7 em relação ao controle a 2ms.

TABELA 4.10 – Parâmetros de fluorescência OJIP sob a ação do composto 7, DCMU e Tris.

Composto	$F_{50\mu s}$	$F_{300\mu s}$	F_{2ms}	F_M	F_V/F_M	area	N	S_M
Controle	302	400	573	1082	0,739	27494	51,0	35
Tris	310	417	431	447	0,369	29	0,7	0
DCMU	308	446	797	1023	0,724	2892	5	4
7 (100 μ M)	304	401	583	1003	0,719	20456	40	29
7 (400 μ M)	301	394	559	975	0,711	22976	49	34

Observando a tabela 4.10, pode-se notar uma diminuição nos parâmetros área e S_M , que refletem o grau de redução de Q_A através da área normalizada sobre a curva de transientes OJIP (VEIGA, 2008). Além disso, o N

Resultados e discussão

(indicador do número de vezes que a Q_A é reduzida) também diminui com a ação do composto **7**. Estes dados reforçam a proposta de ação do composto **7** no pool das quinonas, porém para confirmar o mecanismo de ação desse composto na inibição da fotossíntese, seria necessário realizar outras reações parciais utilizando doadores e aceptores artificiais que agem em diferentes regiões dos quatro complexos fotossintéticos principais (PSII, PSI, Citocromo *b₆f* e ATP-sintase). Como o composto **7** foi isolado em pouca quantidade, não foi possível a realização dos demais ensaios de reações parciais.

5 - CONCLUSÕES

O estudo fitoquímico do extrato etanólico da *Rhabdodendron amazonicum* levou ao isolamento de um esteróide esterificado com o ácido cinâmico, o cinamato de sitosterila (substância 3), dois compostos da classe dos sesquiterpenos iononas, blumenol C, e a rhabdodendronlactona (inérita). Um outro composto nor-ionona foi identificado via a análise CG-EM, selecionando no cromatograma o pico correspondente ao íon m/z 208, o qual foi identificado como 1,5,5-trimetil-6 β -hidroxi-6-but-2-enil-ciclohex-1-eno-3-ona. A identificação deste composto reforça a proposta de biogênese para a rhabdodendronlactona a partir do blumenol C. Ainda não há relatos na literatura sobre o isolamento, ou até mesmo identificação desses 4 compostos na família Rhabdodendraceae, e a rhabdodendronlactona foi isolada e identificada pela primeira vez neste trabalho, uma vez que não há relatos na literatura para esta estrutura, nem sobre isolamento da mesma como produto natural nem como produto de síntese.

Infelizmente os compostos isolados não permitem inferir sobre a classificação do gênero *Rhabdodendron*. Um derivado de sesquiterpeno, nor-ionona, o ácido (7E,3R*,5S*,6R*)-3,6-diidroxi-10-normegastigm-7-en-9-oic, já foi isolado de *Glycosmis arborea* (RUTACEAE) (CHAKRAVARTY). Contudo, a informação de uma única co-ocorrência de tipos estruturais, é pouco relevante para inferências quimiosistemáticas.

O estudo fitoquímico do extrato metanólico do caule da *Conchocarpus inopinatus* levou ao isolamento de 3 alcalóides, sendo 1 acridônico (metilarborinina), 1 quinolônico (2-fenil-4-quinolona) e 1 furoquinolínico (dictamina); e duas cumarinas: a marmesina e a escopoletina.

Todas as substâncias foram submetidas aos ensaios de inibição do transporte de elétrons basal, desacoplado e fosforilante. Mas somente o

Conclusões

composto **7** (marmesina) apresentou atividade de inibição no transporte de elétrons basal e desacoplado, podendo agir como inibidor da transdução de energia. O fato de não ter inibido o transporte de elétrons fosforilante, sugere possíveis mudanças na conformação do sítio de interação do composto **7** no sistema fotossintético, na presença de ADP e fosfato inorgânico (Pi). Através de medidas de fluorescência da clorofila *a*, analisando os parâmetros relacionados aos transientes OJIP, foi possível notar a mudança daqueles relacionados às reações de oxido-redução da Q_A (N , S_M , area) sofreram decréscimo em relação ao controle (branco), indicando que o composto **7** evitou a reoxidação da aceptora primária do fotossistema II (Q_A) para receber mais elétrons. Além disso, os parâmetros relacionados à emissão de energia não-fotoquímica (D_i / RC e K_n) pelo PSII foram aumentados com a ação de **7**. A emissão de energia não-fotoquímica é uma das maneiras que a planta tem para evitar o excesso de energia que é prejudicial às organelas dos cloroplastos. Observou-se ainda decréscimos dos valores de fluorescência nas fases J-I e I-P, os quais, segundo JOLY (2005), podem estar relacionados às interferências nas reações de oxidação-redução da PQ. Analisando todos estes parâmetros, pode-se sugerir a ação do composto **7** no pool de quinonas, impedindo o transporte de elétrons a partir desta região, entre a proteína D1 e o complexo b_6f . Entretanto, para comprovar o mecanismo de ação sugerido através dos testes de fluorescência da clorofila *a*, é necessária a realização de outras reações parciais utilizando doadores e aceptores de elétrons em cada parte do fotossistema, o que não foi possível devido à massa do composto isolado ser insuficiente para a realização dos demais ensaios.

Pretende-se porém, após o término deste trabalho, isolar mais desse composto ativo (marmesina) a fim de conhecer o seu mecanismo de inibição do transporte de elétrons basal e desacoplado.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHNINE, L.; MORENO-SÁNCHEZ, R.; IGLESIAS-PRieto, R.; PEREDA-MIRANDA, R.; LOTINA-HENNSSEN, B. “Tricolorin A, a potent natural uncoupler and inhibitor of photosystem II acceptor side of spinach chloroplasts”. *Physiologia Plantarum*, **106**: 246-252, 1999.

ALVES, C. C. F.; ALVES, J. M.; SILVA, T. M. S. da; CARVALHO, M. G. de; NETO, J. J. “Atividade alelopática de alcalóides glicosilados de *Solanum crinitum* Lam”. *Floresta e Ambiente*, **10** (1): 93 - 97, 2003.

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

AMBROZIN, A. R. P.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B. F.; SILVA, M. F. das G. da. “Piranoflavonas inéditas e atividades tripanocidas das substâncias isoladas de *Conchocarpus heterophyllus*”. *Química Nova*, **31** (4) 740-743, 2008.

ARAÚJO, C. “Plantas daninhas causam danos evitáveis nas lavouras de milho”. Disponível em: <http://www.agrosoft.org.br>, acesso em setembro de 2010.

BAKER, NEIL R.. Chlorophyll Fluorescence A Probe of Photosynthesis In Vivo. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **59**: 89-113, 2008.

BARRETO, A. de S.; CARVALHO, M. G. de; NERY, I. de A.; GONZAGA, L. & KAPLAN, M. A. C. “Chemical constituents from *Himatanthus articulata*”. *J. Braz. Chem. Soc.*, **9** (5): 430-434, 1998.

BARTH, O. M. “Variações polínicas em espécies brasileiras da família Rutaceae”. *Paleobotânica e Paleontologia na América do Sul – Bol. IG. Instituto de Geociências, USP*, **13** (43): 129-134, 1982.

BIAVATTI, M. W.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. da; FERNANDES, J. B. VICTOR, S. R.; PAGNOCCA, F. C.; ALBUQUERQUE, S.; CARACELLI, I. & ZUKERMAN-SCHPECTOR, J. Biological activity of quinoline alkaloids from *Raulinoa echinata* and X-ray structure of flindersiamine. *J. Braz. Chem. Soc.* **13** (1): 66-7, 2002.

BUCKINGHAM, J.; BAGGALEY, K. H.; ROBERTS, A. D.; SZABÓ, L. F. Dictionary of alkaloids. 2^a ed. CRC Press, NY. 2010. 2292p.

CARVALHO, F. T.; PEREIRA, F. A. R.; PERUCHI, M. & PALAZZO, R. R. B. “Manejo químico das plantas daninhas *Euphorbia heterophylla* e *Bidens pilosa* em sistema de plantio direto da cultura de soja”. *Planta Daninha*, Viçosa-MG, **20** (1): 145-150, 2002.

CHAKRAVARTY, A. K.; DAS, B.; MASUDA, K. & AGETA, H. “Glycoric acid possessing a new 10-normegastigmane skeleton from *glycosmis arborea*”. *Chem. Pharm. Bull.* 44 (7): 1421-1423, 1996.

DAYAN, F. E.; CANTRELL, C. L.; DUKE, S. O. “Natural products in crop protection”. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **17**: 4022–4034, 2009

DAYAN, F. E.; TRINDADE, M. L. B. & VELINI, E. D. “Amicarbazone, a new photosystem II inhibitor”. *Weed Science*, **57**: 579–583, 2009

DUKE, S. O.; ROMAGNI, J. G.; DAYAN, F. E. “Natural products as sources for new mechanisms of herbicidal action”. *Crop Protection*, **19**: 583-589, 2000.

ELJARRAT, E. & BARCELÓ, D. “Sample handling and analysis of allelochemical compounds in plants”. *Trends in analytical chemistry*, **20** (10): 584-590, 2001

FARIA, M. dos S.; SOMNER, G. V. & ROSA, M. M. T. da. “Rutaceae Juss. da Marambaia, RJ”. *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, **5** (2): 291-293, 2007.

GIANESSI, L. P. & REIGNER, N. P.. “The value of herbicides in U.S. Crop Production”. **21**, 559-566, 2007.

GREAVES, M. P. “Microbial herbicides: Factors in development”. *Crop Protection Agents from Nature: Natural Products and Analogues*, Cambridge, RCS, **501**: 444-467 1996.

GUIMARÃES, G. L. “Impactos ecológicos do uso de herbicidas ao meio ambiente”. *Série Técnica IPEF*, **4** (12), 159-180, 1987.

HAINES, D. S.; BURNELL, J. N.; DOYLE, J. R.; LLEWELLYN, L. E.; MOTTI, C. A. & TAPIOLAS D. M. "Translation of in Vitro Inhibition by Marine Natural Products of the C₄ acid cycle pyruvate P_i dikinase to in vivo C₄ plant tissue death". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**: 3856-3862, 2005.

ITO, N. & ETOH, T. "Reactions of endocyclic linearly conjugated dienolates with Michael acceptors leading to bicycle [2,2,2] octane derivatives. Application to the synthesis of C₁₃ degradation products of carotenoids". *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **1**: 2397-2405, 1996.

JANUÁRIO, A. H.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. das G. F. da; FERNANDES, J. B. "Alcalóides β-indolopiridoquinazolínicos de *Esenbeckia grandiflora* MART. (Rutaceae)". *Química Nova*, **32** (8): 2034-2038, 2009.

JIMÉNEZ, B.; GRANDE, M. C.; ANAYA, J.; TORRES, P. & GRANDE, M. "Coumarins from *Ferulago capillaris* and *F. brachyloba*". *Phytochemistry*, **53**:1025-1031, 2000.

JOLY, D. & CARPENTIER, R. "The oxidation/reduction kinetics of the plastoquinone pool controls the appearance of the I-peak in the O-J-I-P chlorophyll fluorescence rise: Effects of various electron acceptors". *Journal of Photochemistry and Photobiology.*, **88**: 43-50, 2007.

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

KERBAUY, G. B. *Fisiologia Vegetal*. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro-RJ, 2004. 451p.

KING, S. R.; AMBIKA, R. "Allelopathic plants. *Chromolaena odorata* (L)". *Allelopathy Journal*, **9** (1): 35-41, 2002.

LIMA, V. B. de. Estudo fitoquímico de *Himatanthus obovatus* (Mueli. Arg.) Woodson (Apocynaceae): isolamento, elucidação estrutural e atividade biológica. Campinas, SP, Instituto de Química da UNICAMP, 2005. Tese de doutorado, 172p.

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

MAMY, L.; GABRIELLE, B.; BARRIUSO, E. “Comparative environmental impacts of glyphosate and conventional herbicides when used with glyphosate-tolerant and non-tolerant crops”. *Environmental Pollution*, **158**: 3172-3178, 2010.

MALER, W.; SCHNEIDER, B. & STRACK, D. “Biosynthesis of sesquiterpenoid cyclohexenone derivatives in mycorrhizal barley roots proceeds via the glyceraldehydes 3-phosphate\pyruvate pathway”. *Tetrahedron Letters*, **39** (7): 521-524, 1998.

MORALES-FLORES, F.; AGUILAR, M. I.; KING-DÍAZ, B.; SANTIAGO-GÓMEZ, J. R. de.; LOTINA-HENNSSEN, B. “Natural diterpenes from *Croton ciliatoglanduliferus* as photosystem II and photosystem I inhibitors in spinach chloroplasts”. *Photosynth. Res.*, **91**: 71-80, 2007.

NORONHA, S; ORTIZ, L.; SCHLESINGER, S. “Agronegócio e biocombustíveis, uma mistura explosiva”. Rio de Janeiro, Núcleo de Amigos da Terra/Brasil, 2006, 24p.

NOVAIS, T. S.; COSTA, J. F. O.; DAVID, J. P. L.; DAVID, J. M.; QUEIROZ, L. P.; FRANÇA, F.; GIULLIETI, A. M.; SOARES, M. B. P.; SANTOS, R. R.. “Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro”. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **13** (2): 05-08, 2003.

OLIVEIRA, P. E. S.; CONSERVA, L. M.; BRITO, A. C.; LEMOS, R. P. L. “Coumarin derivatives from *Esenbeckia grandiflora* and its larvicidal activity against *Aedes aegypti*”. *Pharmaceutical Biology (Formerly International Journal of Pharmacognosy)*, **43** (1): 53-57, 2005.

PAULA, V. F.; BARBOSA, L. C. A.; DEMUNER, A. J. “Constituintes químicos de *Ochroma lagopus* Swartz”. *Química Nova* **19** (3): 225-229, 1995.

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

- PRANCE, G. T. “Flora da Reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Rhabdodendraceae”. *Rodriguésia*, **56** (86): 183-185, 2005.
- PUSSET, J.; LOPEZ, J. L.; PAIS, M.; NEIRABEYEH, M. A. & VEILLON, J. M. “Isolation and 2D NMR studies of alkaloids from *Comptonella sessilifoliola*”. *Planta Med.*, **57**: 153-155, 1991.
- RAFFAELLI, M; FONTANELLI, M.; FRASCONI, C.; GINANNI, M. & PERUZZI, A. Physical weed control in protected leaf-beet in central Italy. *Renewable Agriculture and Food Systems*. **25**: 1-8, 2010.
- SALLES, L. V. O. Evolução de limonóides em Meliaceae e estudo fitoquímico de *Khaya senegalensis* (Meliaceae). Programa de Pós-Graduação em Química, UFSCar, 1995, Tese de doutorado.
- SILVA, L. L. da; PAOLI, A. A. S. “Morfologia e anatomia da semente de *Balfourodendron riedelianum* (ENGLER) ENGLER-RUTACEAE”. *Revista Brasileira de Sementes*, **28** (1): 16-20, 2006.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. Trad. ALENCASTRO, R. B. 7ª ed. LTC, RJ, 2007. 490p.
- SOUZA & LORENZI. Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 640p.
- SPADOTTO, C.A. Uso de Herbicidas no Brasil. Comitê de Meio Ambiente, Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas. 2002. [online] Disponível:
<http://www.cnpma.embrapa.br/herbicida>.
- STRASSER, R. J. “Donor site capacity of photosystem II probed by chlorophyll *a* transients”. *Photosynth. Res.*, **52**: 147-155 1997.
- TAIZ, LINCOLN; ZEIGER, EDUARDO. Fisiologia Vegetal. Trad. Eliane Romanato Santarém [et. al.], 3ª ed. Artmed. Porto Alegre, 2004.
- VEIGA, T. A. M.; GONZÁLEZ-VÁZQUEZ, R.; NETO, J. O.; SILVA, M. F. G. F. da.; KÍNG-DÍAZ, B.; LOTINA-HENNSSEN, B. Siderina from *Toona ciliata* (Meliaceae) as photosystem II inhibitor on spinach thylakoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **465**: 38-43, 2007.

VEIGA, T. A. M.; GONZÁLEZ-VÁSQUEZ, R.; BRAGA, P. A. C.; SILVA, M. F. das G. F. da; KING-DÍAZ, B. & LOTINA-HENNSEN, B. "Alkaloids isolated from *Hortia superba* (Rutaceae) interact with spinach thylakoids inhibiting the electron transport chain". *Allelopathy Journal*, **21** (1): 133-144, 2008.

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

WINTERHALTER, P. "Bound terpenoids in the juice of the purple passion fruit (*Passiflora edulis Sims*)". *J. Agric. Food Chem.* **38** (2), 452-455, 1990.

WOLTER FILHO, W.; ROCHA, A. I. da; YOSHIDA, M. & GOTTLIEB, O. R. "Ellagic acid derivatives from *Rhabdodendron macrophyllum*". *Phytochemistry*, **24** (9): 1991-1993, 1985.

WOLTER FILHO, W.; ROCHA, A. I. da; YOSHIDA, M. & GOTTLIEB, O. T. "Chemosystematics of *Rhabdodendron*". *Phytochemistry*, **28** (9): 2355-2357, 1989.

YOUNI, H. M. & MOHANTY, P. "Inhibition of electron flow and energy transduction in isolated spinach chloroplasts by the herbicide dinoseb". *Chemical-biological interactions*, **32** (1-2): 179-186, 1980.

YUSUF, M. A.; KUMAR, D.; RAJWANSHI, R.; STRASSER, R. J.; TSIMILLI-MICHAEL, M. GOVINDJEE; SARIN, N. B. "Overexpression of γ -tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: Physiological and chlorophyll a fluorescence measurements". *Biochimica et Biophysica Acta*. **8**: 11, 2010.

ZHU, X.; BAKER, N. R.; STURLER, E. de.; ORT., D. R.; LONG, S. P. "Chlorophyll *a* fluorescence induction kinetics in leaves predicted from a model describing each discrete step of excitation energy and electron transfer associated with Photosystem II". *Planta*, **223**: 114-136, 2005.