

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

**ESTUDO QUIMIOSSISTEMÁTICO DE ESPÉCIES DE *HORTIA*
(RUTACEAE) E BUSCA DE FUNGICIDAS À *Guignardia citricarpa***

SÂMYA DANIELLE LIMA DE FREITAS*

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

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

*Bolsista: CNPq

São Carlos-SP
2010

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar

F866eq

Freitas, Sâmya Danielle Lima de.

Estudo quimiosistemático de espécies de *Hortia* (Rutaceae) e busca de fungicidas à *Guignardia citricarpa* / Sâmya Danielle Lima de Freitas. -- São Carlos : UFSCar, 2010.

123 f.

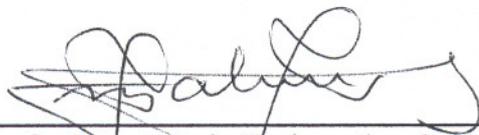
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2010.

1. Produtos naturais. 2. Quimiosistemática. 3. *Hortia*. 4. Rutaceae. 5. *Guignardia citricarpa*. 6. Mancha preta dos citros. I. Título.

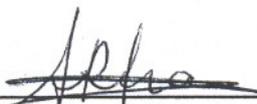
CDD: 547.3 (20^a)

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 da candidata Sâmya Danielle Lima de Freitas, realizada em 26 de agosto de 2010:



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



Prof. Dra. Angela Regina Araújo



Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho

Dedico este trabalho ao meus pais, Edilene Lima de Freitas e Pedro Alves de Freitas, e aos meus irmãos, Samara e Álisson, pelo amor incondicional, pela confiança e apoio em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela sua benção, por me dar força, sabedoria e por me fazer crer que tudo é possível quando lutamos e por estar sempre iluminando a minha vida;

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva, pela confiança, ensinamentos, por ser exemplo de profissional com humildade e com amor pelo que faz, ensina e transmite;

Aos professores doutores do Grupo de Produtos Naturais da UFSCar, João Batista Fernandes, Edson Rodrigues Filho, Paulo Cezar Vieira e Moacir Rossi Forim, pela colaboração, contribuição para a conclusão deste trabalho e pela boa convivência;

Aos professores, Dr. Marcos Antonio Machado e Dra. Ana Carla Oliveira da Silva Pinhati, do Centro de Citricultura “Sylvio Moreira - APTA”, pela colaboração e apoio;

Ao Prof. Dr. Sérgio F. Pascholati e aluna Cris do Laboratório de Fitopatologia da ESALQ – USP, pela colaboração na adaptação das metodologias de ensaios de inibição ao desenvolvimento de *G. citricarpa*, pelos ensinamentos e disponibilidade;

Ao Dr. Leonardo Toffano, pela orientação nos ensaios biológicos realizados neste trabalho, pelos ensinamentos, disponibilidade de ajuda e pela amizade;

À equipe do laboratório de RMN, aos técnicos Paulo e, em especial, Luciana, pela paciência, disponibilidade em ajuda e pelo carinho e ao Prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira, pelos ensinamentos e colaboração;

Aos professores da banca, Dra Angela Regina Araújo e Dr. Edson Rodrigues Filho, pela disponibilidade e pela contribuição na arguição da dissertação;

À Dr. Ana Paula Terezan, pela disponibilidade e pela ajuda nos ensaios biológicos;

Aos meus amigos e colegas do PN, que não citarei nomes por serem muitos, pela ótima convivência, pelas risadas diárias, pelas amizades construídas e pela contribuição direta ou indireta para a conclusão deste trabalho;

À minha amada família, pela base familiar, incentivo, amor, apoio e compreensão em todos os momentos durante esta etapa;

À minha amiga Márcia, pela boa convivência, apoio em todos os momentos, e pelo carinho e amizade;

Ao CNPQ pela bolsa concedida;

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

Muito Obrigada!

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

δ	deslocamento químico
Φ	diâmetro
λ	comprimento de onda
ACN	acetonitrila
AcOEt	acetato de etila
APG	angiosperm phylogeny group
BDA	batata-dextrose-ágar
BOD	biological oxygen demand
CC	cromatografia em coluna
CCDA	cromatografia em camada delgada analítica
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CG-EM	cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
COSY	correlation spectroscopy
CDCl ₃	clorofórmio deuterado
<i>d</i>	dubleto
<i>dd</i>	duplo dubleto
<i>ddd</i>	duplo duplo dubleto
DMSO	dimetilsulfóxido
DMSO- <i>d</i> ₆	dimetilsulfóxido deuterado
EH	extrato hexânico
ED	extrato diclorometânico
EM	extrato metanólico
EMA	extrato hidrometanólico
ESI	ionização por electrospray
Fundecitrus	fundação de defesa da citricultura
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation
HSQC	heteronuclear single quantum coherence
Hz	hertz
<i>J</i>	constante de acoplamento
MeOD	metanol deuterado
MeOH	metanol
MPC	mancha preta dos citros
NOESY	nuclear overhauser enhancement spectroscopy
RMN ¹ H	ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN ¹³ C	ressonância magnética nuclear de carbono-13
MHz	mega-hertz
<i>m</i>	multiplete
<i>m/z</i>	relação massa/carga
SAM	adenosil metionina
<i>s</i>	singleto
<i>s/</i>	singleto largo
<i>t</i>	tripleto
UV-Vis	ultravioleta-visível

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1: Classificação taxonômica do gênero <i>Hortia</i>	3
TABELA 1.2: Derivados do ácido diidrocinâmico isolados de <i>Hortia</i>	5
TABELA 1.3: Derivado do ácido cinâmico isolado de <i>Hortia</i>	7
TABELA 1.4: Alcalóides isolados de <i>Hortia</i>	8
TABELA 1.5: Cumarinas isoladas de <i>Hortia</i>	11
TABELA 1.6: Terpenóides isolados de <i>Hortia</i>	14
TABELA 1.7: Flavonóides e amidas isolados de <i>Hortia</i>	17
TABELA 1.8: Esteróides isolados de <i>Hortia</i>	18
TABELA 3.1: Massas obtidas de material vegetal e extratos de <i>H. brasiliiana</i> e <i>H. oreadica</i>	30
TABELA 3.2: Massa de material vegetal e de extrato obtido de <i>H. superba</i>	31
TABELA 4.1: Dados de RMN ¹ H e ¹³ C de 01 e comparação com a literatura.....	41
TABELA 4.2: Dados de RMN ¹ H de 02 e comparação com a literatura.....	46
TABELA 4.3: Dados de RMN ¹ H de 03 e comparação com a literatura.....	52
TABELA 4.4: Dados de RMN ¹ H de 04 e comparação com a literatura.....	59
TABELA 4.5: Dados de RMN ¹ H de 05 e comparação com a literatura.....	62
TABELA 4.6: Dados de RMN ¹ H de 05 presente na mistura e comparação com a literatura.....	67
TABELA 4.7: Dados de RMN ¹ H de 06 presente na mistura e comparação com a literatura.....	67
TABELA 4.8: Dados de RMN ¹ H de 07 presente na mistura	67
TABELA 4.9: Dados de RMN ¹ H e ¹³ C de 08 e comparação com a literatura.....	77
TABELA 4.10: Dados de RMN ¹ H de 09 e comparação com a literatura.....	82
TABELA 4.11: Dados de RMN ¹ H e ¹³ C de 10 e comparação com a literatura.....	90
TABELA 4.12: Dados de RMN ¹ H em MeOD e DMSO- <i>d</i> ₆ de 11 e comparação com a literatura.....	99
TABELA 4.13: Dados de RMN ¹³ C em DMSO- <i>d</i> ₆ de 11 e comparação com a literatura.....	100

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1: Espécies de (a) <i>Hortia brasiliiana</i> e (b) <i>Hortia oreadica</i>	2
FIGURA 1.2: <i>Guignardia citricarpa</i> em BDA (batata-dextrose-água).....	20
FIGURA 1.3: Sintomas da mancha preta dos citros observadas em frutos.....	23
FIGURA 1.4: Sintomas manifestados em folhas.....	23
FIGURA 4.1: Espectro de RMN ¹ H de 01 (400 MHz, CDCl ₃).....	42
FIGURA 4.2: Espectro de RMN ¹³ C de 01 (100 MHz, CDCl ₃).....	43
FIGURA 4.3: Espectro de RMN ¹ H de 02 (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).....	47
FIGURA 4.4: Expansão de g-COSY de 02 (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).....	48
FIGURA 4.5: Mapa de contorno de HSQC de 02 (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).....	48
FIGURA 4.6: Mapa de contorno de HMBC de 02 (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).....	49
FIGURA 4.7: Espectros de g-NOESY de 02 (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).....	49
FIGURA 4.8: Espectro de RMN ¹ H de 03 (400 MHz, CDCl ₃).....	53
FIGURA 4.9: Ampliação da região δ 9,3 a 7,1 do espectro de RMN ¹ H da substância 03	54
FIGURA 4.10: Ampliação do espectro de COSY na região de δ 9,5 a 7,0 de 03	54
FIGURA 4.11: Ampliação do espectro de COSY na região de δ 4,8 a 1,0 de 03	55
FIGURA 4.12: Espectro de RMN ¹ H de 04 (200 MHz, CDCl ₃).....	60
FIGURA 4.13: Ampliação da região δ 7,80 a δ 6,3 do espectro de RMN ¹ H de 05 ...	62
FIGURA 4.14: Espectro de RMN ¹ H de 05 (200 MHz, CDCl ₃).....	63
FIGURA 4.15: Espectro de RMN ¹ H da mistura das substâncias 05 , 06 e 07 , (400 MHz, CDCl ₃).....	68
FIGURA 4.16: Ampliação dos sinais na região de δ 8,2 a 6,2 do espectro de RMN ¹ H da mistura das substâncias 05 , 06 e 07	69
FIGURA 4.17: Ampliação da região de δ 4,30 a 4,15 do espectro de RMN ¹ H da mistura das substâncias 05 , 06 e 07	69
FIGURA 4.18: Cromatograma da mistura das substâncias 05 , 06 e 07 obtido por CG/MS.....	70
FIGURA 4.19: a) Simulação do padrão isotópico referente à massa de 07 . b) Espectro de Massa obtido por ESI positivo da mistura	70
FIGURA 4.20: Espectro de massa (IE = 70 eV) de 05 (xantotoxina) presente na mistura , (tempo de retenção: 17 min.).....	71

FIGURA 4.21: Espectro de massa (IE = 70 eV) de 06 (isopimpenilina) presente na mistura , (tempo de retenção: 20 min.).....	72
FIGURA 4.22: Espectro de massa IE = 70 eV) de 07 (5-cloro-8-metoxi-furanocumarina) presente na mistura , (tempo de retenção: 19 min.).....	73
FIGURA 4.23: Espectros de g-NOESY da mistura (400 MHz, CDCl ₃).....	74
FIGURA 4.24: Espectro de RMN ¹ H de 08 (200 MHz, CDCl ₃).....	78
FIGURA 4.25: Ampliação da região de δ 8,2 a 6,2 do espectro de RMN ¹ H de 08 ...	79
FIGURA 4.26: Ampliação da região de δ 4,7 a 3,7 do espectro de RMN ¹ H de 08 ...	79
FIGURA 4.27: Mapa de contorno do HSQC de 08 (400 MHz, CDCl ₃).....	80
FIGURA 4.28: Mapa de contorno do HMBC de 08 (400 MHz, CDCl ₃).....	80
FIGURA 4.29: Espectro de RMN ¹ H de 09 (400 MHz, CDCl ₃).....	83
FIGURA 4.30: Ampliação da região de δ 7,9 a 6,3 do espectro de RMN ¹ H de 09 ...	84
FIGURA 4.31: Ampliação da região de δ 4,8 a 3,8 do espectro de RMN ¹ H de 09 ...	84
FIGURA 4.32: Espectro de RMN ¹ H de 10 (200 MHz, CDCl ₃).....	91
FIGURA 4.33: Ampliação da região δ 7,5 a 5,0 do espectro de RMN ¹ H de 10	92
FIGURA 4.34: Ampliação da região δ 3,4 a 2,3 do espectro de RMN ¹ H de 10	92
FIGURA 4.35: Espectro de RMN ¹³ C de 10 (50 MHz, CDCl ₃).....	93
FIGURA 4.36: Espectro de RMN ¹ H de 11 (400 MHz, MeOD).....	101
FIGURA 4.37: Ampliação dos sinais dos hidrogênios aromáticos do anel B no espectro de RMN ¹ H de 11 e os acoplamentos observados.....	102
FIGURA 4.38: Ampliação dos sinais dos hidrogênios aromáticos do anel A no espectro de RMN ¹ H de 11 e os acoplamentos observados.....	102
FIGURA 4.39: Ampliação dos sinais dos hidrogênios alifáticos no espectro de RMN ¹ H de 11 e os acoplamentos observados.....	103
FIGURA 4.40: Espectro de COSY (ampliação) de 11 (400 MHz, MeOD).....	103
FIGURA 4.41: Espectro de RMN ¹³ C de 11 (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).....	104
FIGURA 4.42: Mapa de contorno de HSQC (ampliação) de 11 (400 MHz, MeOD)..	105
FIGURA 4.43: Mapa de contorno de HMBC (ampliação) de 11 (400 MHz, MeOD).....	105
FIGURA 5.1: Substâncias submetidas aos ensaios de inibição frente ao desenvolvimento de <i>G. citricarpa</i>	110
FIGURA 5.2: Metodologia do ensaio de inibição <i>in vitro</i> frente à <i>G. citricarpa</i> pelo método de germinação de esporos em placa de poliestireno.....	111

FIGURA 5.3: Desenvolvimento do ensaio de inibição de *G. citricarpa in vitro* frente ao crescimento micelial: **a)** representa a visualização frontal da placa de Petri onde foi realizado o ensaio com a cumarina, escoparona, na concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$; **b)** N-metil-4-metoxi-2-quinolona ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$); **c)** prangol ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$); **d)** isosakuranetina ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$); t) testemunha (BDA + fungo e DMSO); *) representa o centro de aplicação do inóculo utilizado como referencial para as medidas.....

113

LISTA DE FLUXOGRAMAS

FLUXOGRAMA 3.1: Fluxograma da preparação dos extratos das espécies de <i>Hortia</i>	30
FLUXOGRAMA 3.2: Partição líquido-líquido do extrato EtOH dos galhos de <i>H. superba</i>	32
FLUXOGRAMA 3.3: Resumo do fracionamento da fração EHGHS e de suas subfrações.....	33
FLUXOGRAMA 3.4: Resumo do fracionamento da fração EDGHS e de suas subfrações.....	34
FLUXOGRAMA 3.5: Partição líquido-líquido do extrato (EHDFHB) proveniente da junção dos extratos hexânico e diclorometânico das folhas de <i>H. oreadica</i>	35
FLUXOGRAMA 3.6: Resumo do fracionamento da fração EHDFHB e de suas subfrações.....	36

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 4.1: Proposta biogenética para as substâncias 01 e 02	56
ESQUEMA 4.2: Proposta biogenética para a substância 03	57
ESQUEMA 4.3: Proposta de fragmentação para a xantotoxina (05).....	71
ESQUEMA 4.4: Proposta de fragmentação para a isopimpenilina (06).....	72
ESQUEMA 4.5: Proposta de fragmentação para a 5-cloro-8-metoxi-furanocumarina (07).....	73
ESQUEMA 4.6: Proposta biogenética para a substância 04	85
ESQUEMA 4.7: Proposta biogenética para as substâncias 05 e 06	86
ESQUEMA 4.8: Proposta biogenética para as substâncias 08 e 09	87
ESQUEMA 4.9: Proposta biogenética para as substâncias 10 e 11	106

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 5.1: Efeito dos compostos naturais isolados de espécies de <i>Hortia</i> no crescimento micelial de <i>G. citricarpa</i> . As barras representam a média \pm desvio padrão.....	114
GRÁFICO 5.2: Efeito das substâncias isoladas de <i>Hortia</i> na inibição da germinação de esporos e formação de apressórios de <i>G. citricarpa</i> . 1) escoparona; 2) N-metil-4-metoxi-2-quinolona; 3) Prangol; 4) isosakuranetina. As barras representam a média \pm desvio padrão.....	115

RESUMO

ESTUDO QUIMIOSSISTEMÁTICO DE ESPÉCIES DE *HORTIA* (RUTACEAE) E BUSCA DE FUNGICIDAS À *Guignardia citricarpa* – A classificação do gênero *Hortia* dentro da família Rutaceae é duvidosa. *Hortia*, que já foi posicionada em Cusparieae por De Candolle em 1824, na mais recente classificação morfológica de Engler em 1931 pertence a Toddalieae. Mais recentemente da Silva e colaboradores voltam a propor *Hortia* em Cusparieae. Contudo, o estudo fitoquímico das espécies do gênero *Hortia* ainda não permitem classificá-la corretamente dentro da família. Desta forma, o estudo fitoquímico de *Hortia* descrito neste trabalho, visa contribuir com a quimiossistemática da família Rutaceae e também com a melhor classificação do gênero dentro da mesma. O estudo das espécies *H. oreadica*, *H. brasiliana* e *H. superba* levou ao isolamento e identificação de 11 substâncias, sendo os alcalóides N-metil-4-metoxi-2-quinolona (**01**), integriquinolona (**02**), inédita no gênero *Hortia* e a rutaecarpina (**03**), as cumarinas escoparona (**04**), xantotoxina (**05**), sendo estas descritas pela primeira vez na espécie *H. superba*, isopimpenilina (**06**), inédita no gênero *Hortia*, 5-cloro-8-metoxi-furanocumarina (**07**), inédita na literatura, prangol (**08**) e heraclenol (**09**), e os flavonóides isosakuranetina (**10**) e neoponcirina (**11**), sendo este último inédito no gênero *Hortia*. A presença de metabólitos como alcalóides, cumarinas e flavonóides vêm a confirmar que *Hortia* pertence à família Rutaceae, embora não esteja claro seu exato posicionamento dentro da mesma. Alguns dos compostos isolados foram avaliados frente à inibição do desenvolvimento de *Guignardia citricarpa*, seguindo duas metodologias de ensaios de inibição, uma baseada no ensaio de inibição de *G. citricarpa in vitro* frente ao crescimento micelial, pelo método de incorporação ao meio de cultura e a outra, baseada no ensaio de inibição de *G. citricarpa in vitro* frente à germinação de esporos e formação de apressórios, pelo método de germinação de esporos em placa de poliestireno. Foram submetidas à ambos os ensaios de inibição as substâncias: N-metil-4-metoxi-2-quinolona, escoparona, prangol e isosakuranetina, as quais foram avaliadas quanto sua atividade antifúngica, porém a primeira metodologia avaliou a inibição apenas da formação de micélios, e estes não estão envolvidos diretamente com o processo de infecção das plantas, já a segunda metodologia avaliou a inibição de estruturas reprodutivas do microrganismo (os esporos), responsável pelo processo de infecção. Foram calculadas as médias de

crescimento micelial para todas as substâncias testadas, revelando o alcalóide N-metil-4-metoxi-2-quinolona ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) como o mais eficaz dentre todas as substâncias ensaiadas. Quanto a inibição frente à germinação de esporos e formação de apressórios, os resultados foram bastante satisfatórios, a cumarina escoparona ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) apresentou inibição de 96% para a germinação de esporos e 99% para a formação de apressórios, o alcalóide N-metil-4-metoxi-2-quinolona ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) com 83% e 91%, e o flavonóide isosakuranetina ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) com 71,4% e 80%, respectivamente. Portanto, a partir deste trabalho verificou-se que alguns produtos naturais com potencial antifúngico revelaram importantes fontes na descoberta de novos produtos livres de toxicidade e eficaz como fungicida.

ABSTRACT

CHEMOSYSTEMATIC STUDY OF SPECIES OF HORTIA (RUTACEAE) AND SEARCH OF FUNGICIDES TO *Guignardia citricarpa* - The classification of the *Hortia* genus, belonging to the Rutaceae, is ambiguous. *Hortia*, which has been placed in Cusparieae by De Candolle in 1824, in the most recent morphological classification of Engler in 1931 it belongs to Toddalieae. More recently, Silva and colleagues classified again *Hortia* in Cusparieae. However, the phytochemical study of the species from *Hortia* genus still not allow classify correctly it inside the family. Thus, the phytochemical study of *Hortia* described in this paper aims to contribute with the chemosystematics of the Rutaceae and with the best classification of the genus inside the family. The study of the species *H. oreadica*, *H. brasiliiana* and *H. superba* led to the isolation and identification of 11 substances, the alkaloids N-methyl-4-methoxy-quinolin-2-one (**01**), integriquinolone (**02**), new in the genus *Hortia*, rutaecarpine (**03**), the coumarins scoparone (**04**) xanthotoxin (**05**), which were first described in the species *H. superba*, isopimpinellin (**06**), new in the genus *Hortia*, 5-chloro-8-methoxy-furanocoumarin (**07**), new in the literature, prangol (**08**) and heraclenol (**09**), and the flavonoids isosakuranetin (**10**) and neoponcirin (**11**), the latter being new in the genus *Hortia*. The presence of metabolites such as alkaloids, coumarins and flavonoids confirm that *Hortia* belongs to the Rutaceae family, even so are not clear its accurate positioning. Some of the isolated compounds were tested against the inhibition of *Guignardia citricarpa* following two methods of inhibition assays. One based on inhibition of *G. citricarpa in vitro* against growth mycelial, by the method of incorporation into the culture medium. The other based on the inhibition test to *G. citricarpa in vitro* on spore germination and appressorium formation by the method of germination of spores on plates of polystyrene. The first methodology only evaluated the inhibition of the formation of mycelia and it is not directly involved in the infection process of plants, already the second one evaluated the inhibition of reproductive structures of microorganisms (spores), responsible for the infection process. The average growth mycelial for all substances tested revealed the alkaloid N-methyl-4-methoxy-2-quinolin-2-one ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) as the most effective among all the substances tested. As the inhibition front of spore germination and appressorium formation, the results were quite satisfactory, the coumarin scoparone ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) showed 96% of inhibition spore germination and 99% for the formation

of appressorium, the alkaloid *N*-methyl-4-methoxy-2-quinolin-2-one ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) with 83% and 91%, and the flavonoid isosakuranetin ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) with 71,4% and 80%, respectively. Therefore, from this study it was found that some natural products with antifungal activity revealed important sources in the discovery of new products free of toxicity and effective as a fungicide.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
1.1. Família Rutaceae.....	1
1.2. O gênero <i>Hortia</i> e sua Quimiosistemática.....	2
1.3. Perfil Químico do Gênero <i>Hortia</i>	4
1.4. Doenças Citrícolas.....	18
1.5. Mancha Preta dos Citros.....	19
1.6. <i>Guignardia citricarpa</i>	20
1.7. Sintomas da MPC.....	21
1.8. Controle da MPC.....	23
2. Objetivos.....	25
3. Estudo Fitoquímico das Espécies de <i>Hortia</i>.....	26
3.1. Procedimento Experimental.....	26
3.1.1. Materiais.....	26
3.1.1.1. Material Cromatográfico.....	26
3.1.1.2. Solventes.....	27
3.1.1.2. Reveladores.....	27
3.1.2. Equipamentos.....	27
3.1.2.1. Evaporadores Rotativos.....	27
3.1.2.2. Balança Analítica.....	27
3.1.2.3. Câmara de UV.....	27
3.1.2.4. Cromatógrafo para CLAE.....	28
3.1.2.5. Detectores.....	28
3.1.2.6. Espectrômetros de Massas.....	28
3.1.2.7. Espectrômetros de Ressonância Magnética Nuclear.....	28
3.1.3. Material Botânico.....	29
3.1.4. Obtenção dos Extratos de <i>Hortia brasiliiana</i> e <i>Hortia oreadica</i>	29
3.1.5. Obtenção dos Extratos de <i>Hortia superba</i>	31
3.1.6. Fracionamentos dos Extratos e Isolamento das Substâncias.....	31
3.1.6.1. Fracionamento do Extrato de <i>H. superba</i>	31
3.1.6.2. Fracionamento dos Extratos de <i>H. oreadica</i>	35
3.1.6.3. Fracionamento dos Extratos de <i>H. brasiliiana</i>	36
4. Resultados e Discussões do Estudo Fitoquímico.....	37

4.1. Substâncias Isoladas.....	37
4.2. Alcalóides.....	40
4.2.1. Determinação estrutural da substância 01.....	40
4.2.2. Determinação estrutural da substância 02.....	44
4.2.3. Determinação estrutural da substância 03.....	50
4.2.4. Biogênese dos Alcalóides.....	56
4.3. Cumarinas.....	58
4.3.1. Determinação estrutural da substância 04.....	58
4.3.2. Determinação estrutural da substância 05.....	61
4.3.3. Determinação estrutural da mistura das substâncias 05, 06 e 07.....	64
4.3.4. Determinação estrutural da substância 08.....	74
4.3.5. Determinação estrutural da substância 09.....	81
4.3.6. Biogênese das Cumarinas.....	85
4.4. Flavonóides.....	88
4.4.1. Determinação estrutural da substância 10.....	88
4.4.2. Determinação estrutural da substância 11.....	94
4.4.3. Biogênese dos Flavonóides.....	106
5. Ensaio fungicidas frente à <i>Guignardia citricarpa</i>.....	107
5.1. Procedimento Experimental.....	107
5.1.1. Materiais e Reagentes.....	107
5.1.2. Equipamentos.....	108
5.2. Preparo do inóculo para ensaio.....	108
5.3. Metodologia dos ensaios de inibição ao desenvolvimento de <i>G.citricarpa</i>	109
5.3.1. Ensaio de inibição de <i>G. citricarpa in vitro</i> frente ao crescimento micelial.....	109
5.3.2. Ensaio de inibição de <i>G. citricarpa in vitro</i> frente à germinação de esporos e formação de apressórios.....	110
5.4. Resultados e Discussões.....	112
5.4.1. Efeito dos compostos naturais frente ao crescimento de <i>G. citricarpa</i>	112
5.4.2. Efeito dos compostos naturais frente à inibição da germinação de esporos e formação de apressórios de <i>G. citricarpa</i>	113
6. Conclusões.....	116
7. Referências Bibliográficas.....	118

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Família Rutaceae

A família Rutaceae é pertencente a ordem Sapindales (APG, 2003) e constitui o maior grupo pertencente a esta ordem, a qual compreende cerca de 160 gêneros e 1900 espécies com grande diversidade de características morfológicas e de distribuição mundial (GROPPO, 2008). No Brasil o centro de diversidade é a floresta amazônica e a mata atlântica, onde são citadas aproximadamente 200 espécies (ALBUQUERQUE, 1976).

Do ponto de vista químico, a família Rutaceae é caracterizada por apresentar uma ampla variedade de metabólitos secundários dentre diversas classes, entre eles podem-se destacar os alcalóides, especialmente os derivados do ácido antranílico, as cumarinas, as lignanas, os flavonóides, os terpenóides e os limonóides (WATERMAN, 1999). Com isso, esta família é rica em compostos químicos bioativos que apresentam inúmeras atividades biológicas, como: antimicrobiana, inseticida, herbicida e antifúngica. E assim, este grande potencial desperta para o estudo fitoquímico, visando princípios ativos para diversas atividades biológicas de grande interesse.

Devido à grande diversidade de gêneros relatados para a família Rutaceae, há diversos estudos de filogenia e quimiosistemática para a classificação taxonômica destes gêneros, sendo que ainda existem controvérsias sobre o posicionamento taxonômico de alguns gêneros, estimulando o estudo de espécies ainda não investigadas.

A classificação da família Rutaceae gerou contradições entre os antigos botânicos e o ponto de vista quimiosistemático é de grande importância para a classificação botânica. Assim, o estudo quimiosistemático da família Rutaceae é estudado e revisado com base em vários metabólitos secundários e suas derivações biossintéticas a partir de estudos fitoquímicos (SILVA *et al*, 1988). Neste contexto, foi inserido neste trabalho o estudo quimiosistemático de espécies do gênero *Hortia* e uma consequente contribuição à quimiosistemática da família Rutaceae.

1.2 - O gênero *Hortia* e sua Quimiosistemática



FIGURA 1.1: Espécies de (a) *Hortia brasiliiana* e (b) *Hortia oreadica*
(Fonte: FLICK, 2010)

Hortia é um gênero neotropical pertencente à família Rutaceae e é composto de 10 espécies, distribuídas desde o Panamá e norte da América do Sul (em especial a Amazônia) até o centro leste do Brasil. Vandelli em 1788 descreveu *Hortia* de uma maneira muito sucinta, o que deu margem a confusões na tipificação do gênero. Devido a este erro de interpretação por parte dos autores mais antigos, o gênero permaneceu sem descrição formal o que acarretou confusão na aplicação dos nomes *H. arborea* Engl. e *H. brasiliiana* Vand. Ex DC (GROPPO, 2004). A mesma espécie foi classificada erroneamente por autores distintos como sendo duas espécies diferentes, *H. arborea* e *H. brasiliiana*. Devido à similaridade morfológica, um terceiro espécimen foi classificado como sendo *H. brasiliiana*, porém desta vez tratava-se de uma nova espécie. Em recente trabalho publicado no qual foram utilizadas técnicas de análise macromoleculares, esta problemática foi sanada por Groppo e colaboradores. Assim os autores propuseram que *H. arborea* e *H. brasiliiana* são sinônimas e que o terceiro espécimen classificado como *H. brasiliiana* seria então chamada de *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani. Desta forma, *H. oreadica* foi por muito tempo conhecida na literatura como *H. brasiliiana* Vand. Ex DC. (GROPPO *et. al.*, 2005).

Segundo a classificação taxonômica do gênero *Hortia* (TABELA 1.1), ela é tradicionalmente incluída na subfamília Toddaliioideae e subtribo Toddaliinae.

TABELA 1.1: Classificação taxonômica do gênero *Hortia*, (ENGLER, 1931).

Classificação taxonômica	
Reino:	Plantae
Divisão:	Magnoliophyta
Classe:	Magnoliopsida
Ordem:	Sapindales
Família:	Rutaceae
Subfamília:	Toddalioideae
Tribo:	Toddalieae
Subtribo:	Toddaliinae

De Candolle dividiu a família Rutaceae em duas tribos, Diosmeae e Cusparieae, posicionando o gênero *Hortia* nesta última (DE CANDOLLE, 1824). Bentham & Hooker em 1862 propuseram modificações taxonômicas, tornando a família Rutaceae um pouco mais abrangente e sete tribos foram formadas, adotando-se Cusparieae de onde o gênero *Hortia* foi excluído e posicionado na tribo Toddalieae, mas com comentários de que a classificação era duvidosa (BENTHAM & HOOKER, 1862). O sistema de Engler com as modificações de Scholz é o mais aceito pelos botânicos atuais. Este é bastante semelhante àquele de Bentham & Hooker, e também não esclarece a classificação de *Hortia*, mantendo-o em Toddalieae (ENGLER, 1931; SCHOLZ, 1964). Apesar de esta proposta ser adotada até hoje, dado de diversas fontes têm mostrado que a divisão das subfamílias de Engler (1931) é artificial, especialmente quanto ao reconhecimento de Toddalioideae.

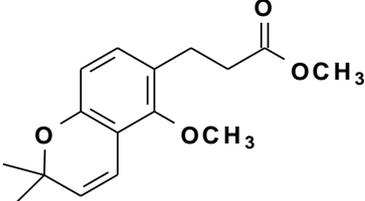
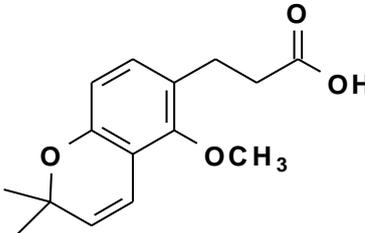
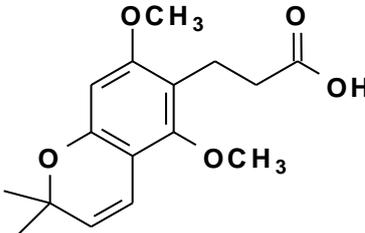
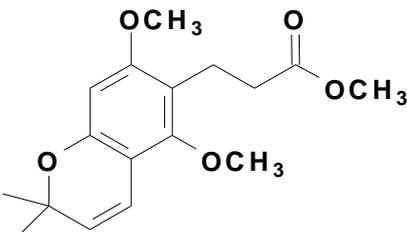
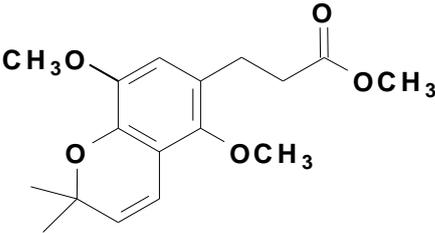
A similaridade química entre as subfamílias Rutoideae e Toddalioideae é tão pronunciada que levou da Silva *et al.* a uni-las em uma única subfamília, Rutoideae, subdividindo-a em 17 tribos (DA SILVA *et al.*, 1988). Os gêneros americanos de Toddalioideae vieram a constituir três tribos dentro de Rutoideae e *Hortia* foi re-posicionada em Cusparieae como fez anteriormente De Candolle. Porém, as justificativas para isto não foram novamente convincentes, mostrando que os dados químicos revelam a mesma dificuldade para o posicionamento de *Hortia*. A única justificativa plausível para re-classificá-la seria que *Hortia* é o único representante americano na subtribo Toddaliinae. Na classificação de Silva *et al.*, Cuspariea (tribo informal "Cusparia") engloba, além de *Hortia*, o gênero Galipea,

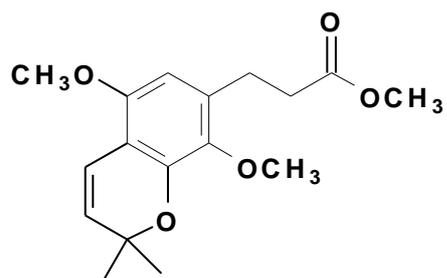
também neotropical. Engler alocou em Toddaliinae gêneros da África, Austrália e América que eram filogeneticamente menos relacionados entre si do que com gêneros de outras tribos e até mesmo de outras subfamílias. Desta forma, *Hortia* estaria mais próxima dos gêneros de Cusparieae do que dos membros de Toddaliinae.

1.3 - Perfil Químico do Gênero *Hortia*

Segundo levantamento bibliográfico há relatos de estudo fitoquímico de 8 espécies de *Hortia*, sendo elas *H. arborea* (ANTONACCIO *et al.*, 1956; PACHTER *et al.*, 1957; PACHTER *et al.*, 1960; FERRACIN, 1992; MONACHE *et al.*, 1976; MONACHE *et al.*, 1977), *H. badinii* (CORRÊA *et al.*, 1975; CORRÊA *et al.*, 1979), *H. longifolia* (CORRÊA *et al.*, 1976; PÁDUA, 1976), *H. colombiana* (SUAREZ *et al.*, 1998; CUCA *et al.*, 1998; SUAREZ *et al.*, 2002), *H. regia* (JACOBS *et al.*, 1986; JACOBS *et al.*, 1987; TINTO, 1992), *H. brasiliana* (PACHTER *et al.*, 1961; BRAGA, 2005; SEVERINO, 2008), *H. oreadica* (BRAGA, 2005; SEVERINO, 2008) e *H. superba* (BRAGA, 2005; SEVERINO, 2008). São relatados para o gênero os derivados do ácido diidrocinâmico (TABELA 1.2), 1 derivado do ácido cinâmico (TABELA 1.3), alcalóides (furoquinolínicos, 2-quinolonas, piranoquinolonas e β -indolopiridoquinazolínicos) (TABELA 1.4), cumarinas (simples, furanocumarinas, piranocumarinas) (TABELA 1.5), terpenos (sesquiterpenos, triterpenos, limonóides) (TABELA 1.6), amidas, flavonóides (TABELA 1.7) e esteróides (TABELA 1.8).

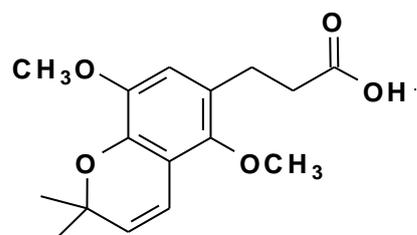
TABELA 1.2: Derivados do ácido diidrocinâmico isolados de *Hortia*.

Composto	Fonte	Referência
	1- <i>Hortia badinni</i> 2- <i>Hortia regia</i> 3- <i>Hortia colombiana</i> 4- <i>Hortia oreadica</i> 5- <i>Hortia brasiliana</i>	1- CORRÊA <i>et. al.</i> , 1975 / CORRÊA <i>et. al.</i> , 1979 2- TINTO <i>et. al.</i> , 1992 3- SUAREZ <i>et. al.</i> , 2002 4- BRAGA, 2005 / SEVERINO, 2008 5- SEVERINO, 2008
	1- <i>Hortia regia</i> 2- <i>Hortia colombiana</i> 3- <i>Hortia oreadica</i>	1- TINTO <i>et. al.</i> , 1992 2- SUAREZ <i>et. al.</i> , 2002 3- BRAGA, 2005 / SEVERINO, 2008
	1- <i>Hortia badinni</i> 2- <i>Hortia oreadica</i> 3- <i>Hortia brasiliana</i>	1- CORRÊA <i>et. al.</i> , 1975 / CORRÊA <i>et. al.</i> , 1979 2- BRAGA, 2005 / SEVERINO, 2008 3- SEVERINO, 2008
	1- <i>Hortia badinni</i> 2- <i>Hortia colombiana</i> 3- <i>Hortia oreadica</i>	1- CORRÊA <i>et. al.</i> , 1975 / CORRÊA <i>et. al.</i> , 1979 2- SUAREZ <i>et. al.</i> , 2002 3- BRAGA, 2005 / SEVERINO, 2008
	1- <i>Hortia colombiana</i> 2- <i>Hortia oreadica</i> 3- <i>Hortia brasiliana</i>	1- SUAREZ <i>et. al.</i> , 2002 2- BRAGA, 2005 / SEVERINO, 2008 3- SEVERINO, 2008



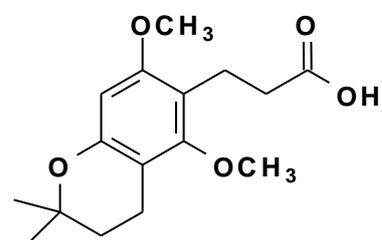
1- *Hortia colombiana*

1- SUAREZ *et. al.*,
2002



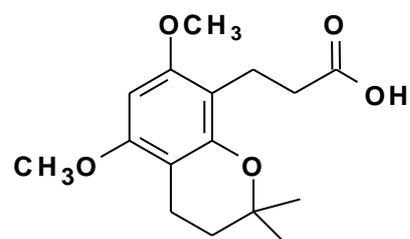
1- *Hortia colombiana*
2- *Hortia oreadica*

1- SUAREZ *et. al.*,
2002
2- SEVERINO, 2008



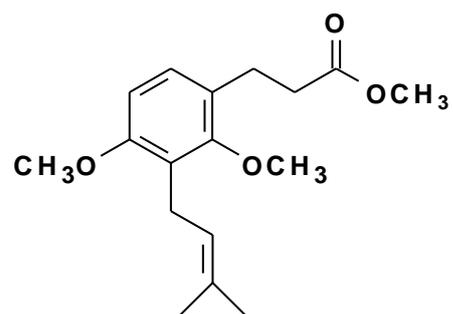
1- *Hortia badinni*

1- CORRÊA *et. al.*,
1975



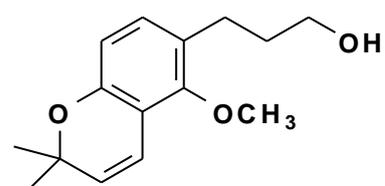
1- *Hortia badinni*

1- CORRÊA *et. al.*,
1975



1- *Hortia badinni*

1- CORRÊA *et. al.*,
1975



1- *Hortia badinni*

1- CORRÊA *et. al.*,
1979

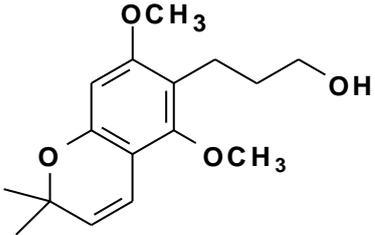
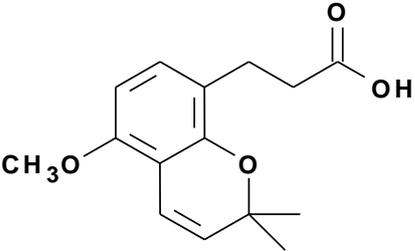
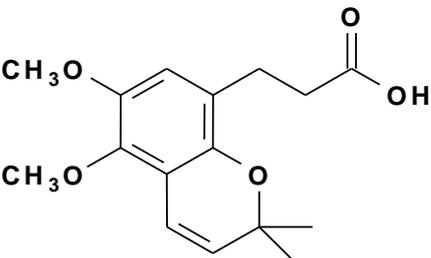
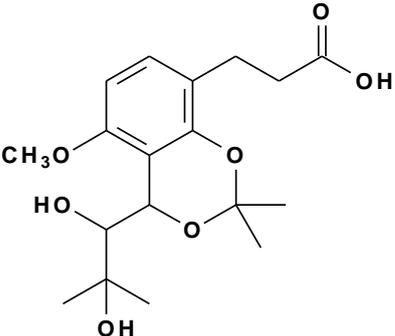
	1- <i>Hortia badinni</i>	1- CORRÊA <i>et. al.</i> , 1979
	1- <i>Hortia brasiliiana</i>	1- BRAGA, 2005
	1- <i>Hortia brasiliiana</i>	1- BRAGA, 2005
	1- <i>Hortia brasiliiana</i>	1- BRAGA, 2005

TABELA 1.3: Derivado do ácido cinâmico isolado de *Hortia*.

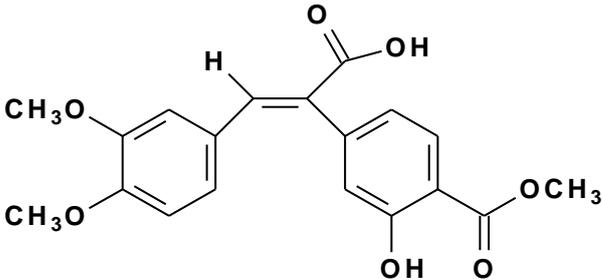
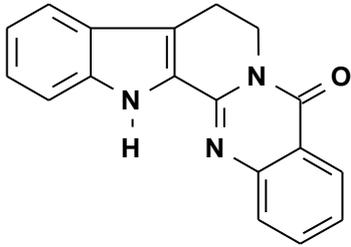
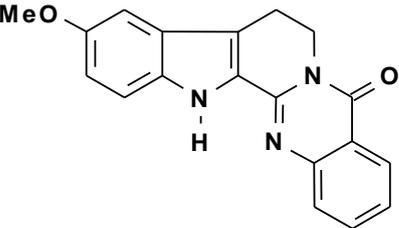
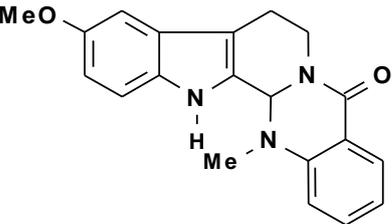
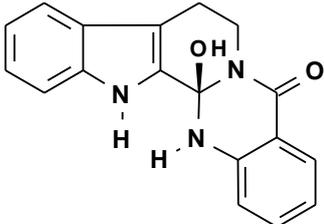
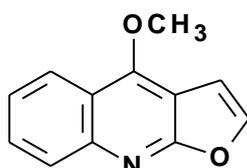
Composto	Fonte	Referência
	1- <i>Hortia oreadica</i>	1- SEVERINO, 2008

TABELA 1.4: Alcalóides isolados de *Hortia*.

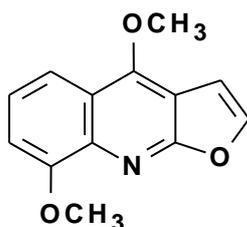
Composto	Fonte	Referência
β-indolopiridoquinazolínicos		
	1- <i>Hortia arborea</i> 2- <i>Hortia badinni</i> 3- <i>Hortia longifolia</i> 4- <i>Hortia colombiana</i> 5- <i>Hortia regia</i> 6- <i>Hortia brasiliiana</i> 7- <i>Hortia oreadica</i> 8- <i>Hortia superba</i>	1- PACHTER <i>et. al.</i> , 1957 / PACHTER <i>et. al.</i> , 1960 / FERRACIN, 1992 2- CORRÊA <i>et. al.</i> , 1975 3- CORRÊA <i>et. al.</i> , 1976 4- CUCA <i>et. al.</i> , 1998 5- JACOBS, <i>et. al.</i> , 1987 6, 7, 8 - BRAGA, 2005 / SEVERINO, 2008
	1- <i>Hortia arborea</i> 2- <i>Hortia badinni</i> 3- <i>Hortia longifolia</i> 4- <i>Hortia colombiana</i> 5- <i>Hortia brasiliiana</i> 6- <i>Hortia oreadica</i>	1- PACHTER <i>et. al.</i> , 1957 / PACHTER <i>et. al.</i> , 1960 2- CORRÊA <i>et. al.</i> , 1975 3- CORRÊA <i>et. al.</i> , 1976 4- CUCA <i>et. al.</i> , 1998 5- BRAGA, 2005 6- BRAGA, 2005 / SEVERINO, 2008
	1- <i>Hortia arborea</i> 2- <i>Hortia brasiliiana</i>	1- PACHTER <i>et. al.</i> , 1957 / PACHTER <i>et. al.</i> , 1960 2- PACHTER <i>et. al.</i> , 1961
	1- <i>Hortia arborea</i>	1- FERRACIN, 1992

Furoquinolínicos



- 1- *Hortia arborea*
- 2- *Hortia longifolia*
- 3- *Hortia oreadica*
- 4- *Hortia superba*

- 1- PACTER *et. al.*, 1960 / FERRACIN, 1992
- 2- CORRÊA *et. al.*, 1976
- 3, 4- BRAGA, 2005 / SEVERINO, 2008



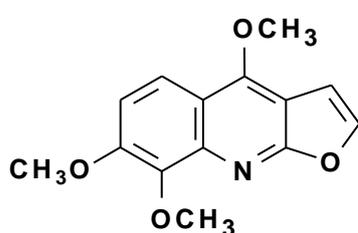
- 1- *Hortia arborea*
- 2- *Hortia colombiana*
- 3- *Hortia oreadica*

- 1- PACTER *et. al.*, 1960
- 2- CUCA *et. al.*, 1998
- 3- BRAGA, 2005



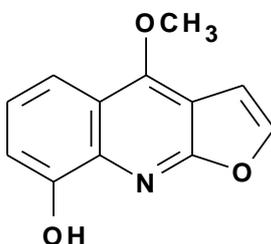
- 1- *Hortia arborea*

- 1- PACTER *et. al.*, 1960



- 1- *Hortia arborea*
- 2- *Hortia regia*
- 3- *Hortia longifolia*
- 4- *Hortia colombiana*
- 5- *Hortia brasiliana*

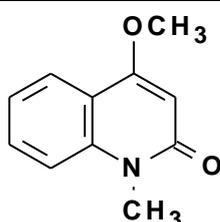
- 1- PACTER *et. al.*, 1960 / FERRACIN, 1992
- 2- JACOBS, *et. al.*, 1987
- 3- CORRÊA *et. al.*, 1976
- 4- CUCA *et. al.*, 1998
- 5- BRAGA, 2005



- 1- *Hortia oreadica*

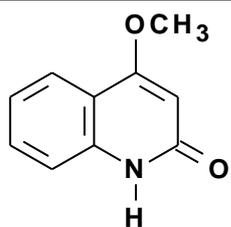
- 1- BRAGA, 2005

2-Quinolona e piranoquinolonas



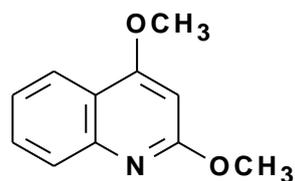
- 1- *Hortia longifolia*
- 2- *Hortia arborea*
- 3- *Hortia superba*

- 1- CORRÊA *et. al.*, 1976
- 2- FERRACIN, 1992
- 3- BRAGA, 2005



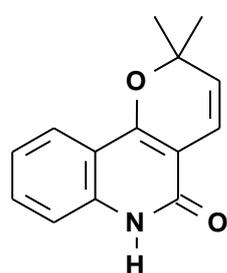
1- *Hortia longifolia*
2- *Hortia superba*

1- PÁDUA, 1976
2- BRAGA, 2005



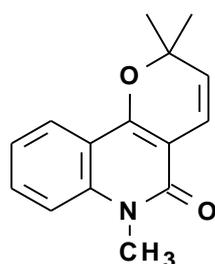
1- *Hortia colombiana*

1- CUCA *et. al*, 1998



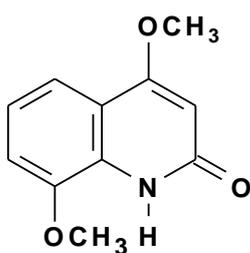
1- *Hortia colombiana*
2- *Hortia superba*

1- CUCA *et. al*, 1998
2- BRAGA, 2005



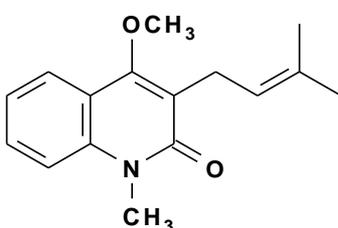
1- *Hortia colombiana*
2- *Hortia superba*

1- CUCA *et. al*, 1998
2- BRAGA, 2005 /
SEVERINO, 2008



1- *Hortia superba*

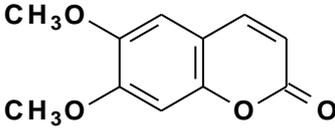
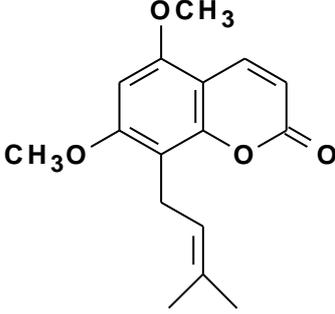
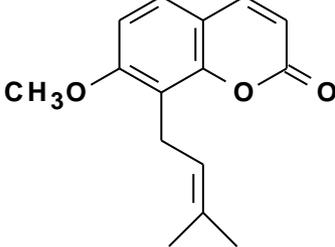
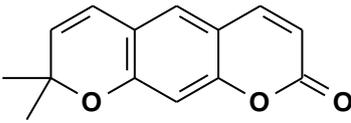
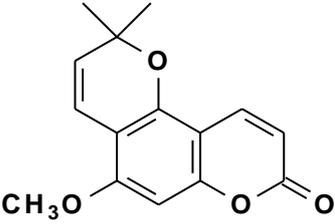
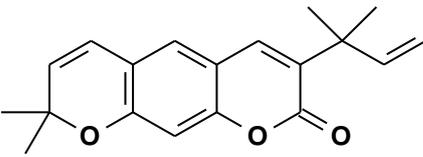
1- BRAGA, 2005

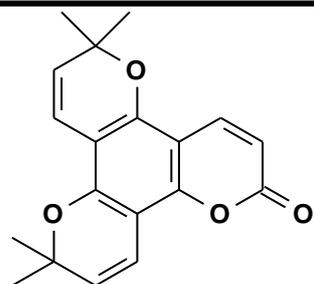


1- *Hortia oreadica*

1- BRAGA, 2005

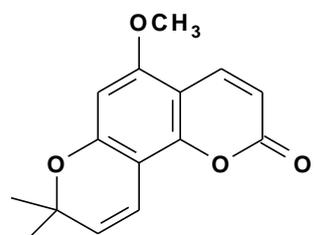
TABELA 1.5: Cumarinas isoladas de *Hortia*.

Composto	Fonte	Referência
Cumarinas simples		
	1- <i>Hortia regia</i> 2- <i>Hortia longifolia</i> 3- <i>Hortia arborea</i> 4- <i>Hortia oreadica</i>	1- JACOBS, <i>et. al.</i> , 1987 2- CORRÊA <i>et. al.</i> , 1976 3- FERRACIN, 1992 4- BRAGA, 2005
	1- <i>Hortia badinni</i> 2- <i>Hortia longifolia</i>	1- CORRÊA <i>et. al.</i> , 1975 2- CORRÊA <i>et. al.</i> , 1976
	1- <i>Hortia arborea</i>	1- FERRACIN, 1992
Piranocumarinas		
	1- <i>Hortia arborea</i>	1- MONACHE <i>et. al.</i> , 1976
	1- <i>Hortia colombiana</i>	1- SUAREZ <i>et. al.</i> , 2002
	1- <i>Hortia arborea</i>	1- MONACHE <i>et. al.</i> , 1976



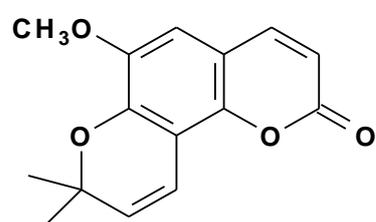
1- *Hortia arborea*

1- MONACHE *et. al.*,
1976



1- *Hortia oreadica*

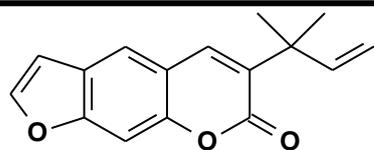
1- BRAGA, 2005 /
SEVERINO, 2008



1- *Hortia oreadica*

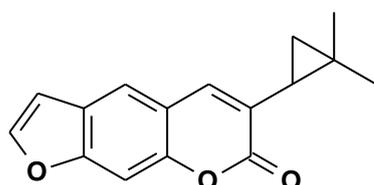
1- BRAGA, 2005

Furanocumarinas



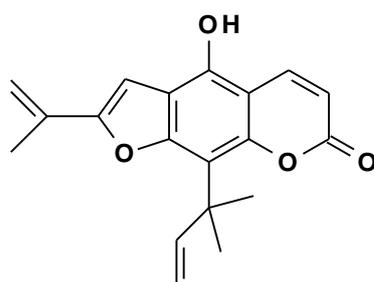
1- *Hortia arborea*

1- MONACHE *et. al.*,
1976



1- *Hortia arborea*

1- MONACHE *et. al.*,
1977



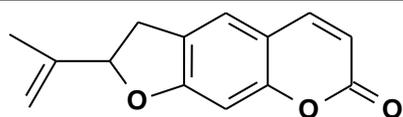
1- *Hortia arborea*

1- MONACHE *et. al.*,
1977



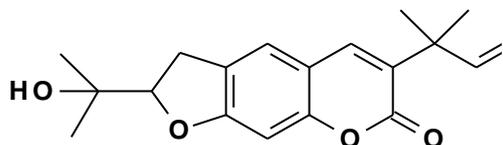
1- *Hortia arborea*

1- MONACHE *et. al.*,
1977



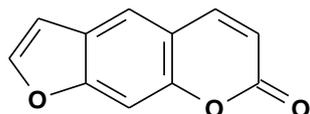
1- *Hortia arborea*

1- MONACHE *et. al.*,
1977



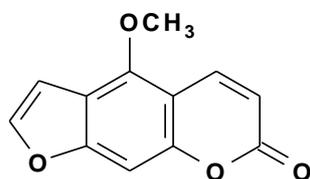
1- *Hortia arborea*

1- MONACHE *et. al.*,
1977



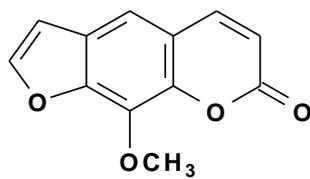
1- *Hortia oreadica*

1- BRAGA, 2005



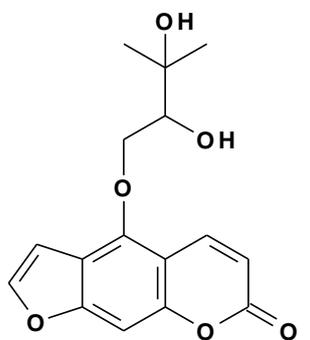
1- *Hortia oreadica*

1- BRAGA, 2005



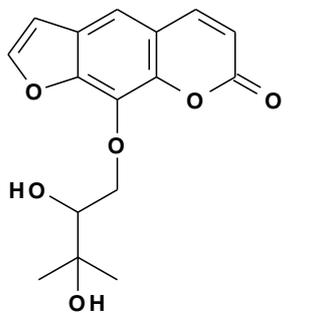
1- *Hortia oreadica*

1- BRAGA, 2005



1- *Hortia superba*

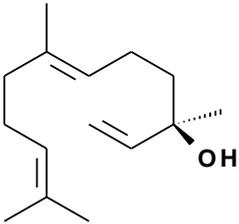
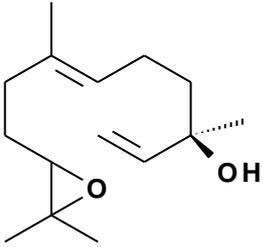
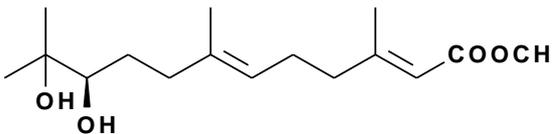
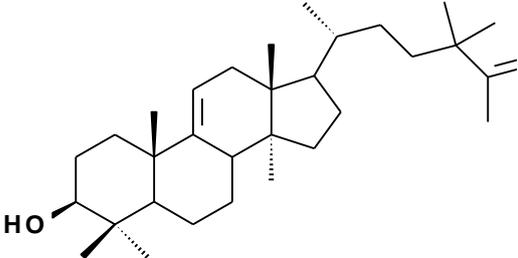
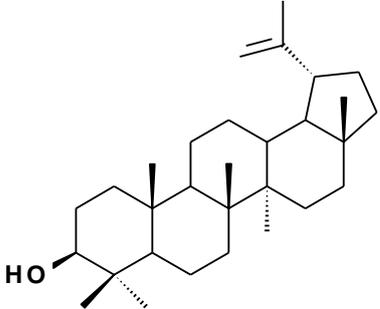
1- BRAGA, 2005

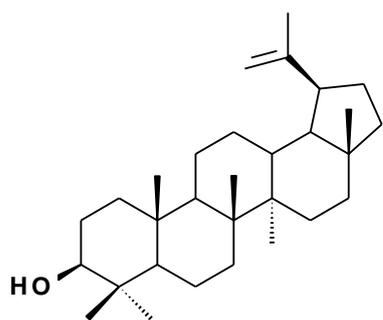


1- *Hortia superba*

1- BRAGA, 2005

TABELA 1.6: Terpenóides isolados de *Hortia*.

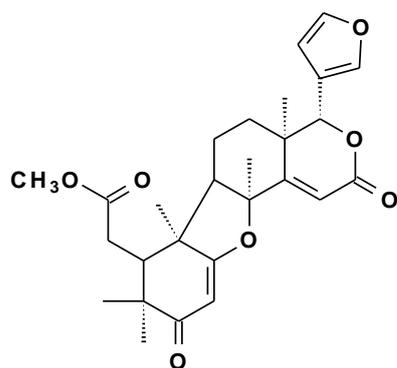
Compostos	Fonte	Referência
Sesquiterpenos		
	1- <i>Hortia colombiana</i>	1- SUAREZ <i>et. al.</i> , 2002
	1- <i>Hortia colombiana</i>	1- SUAREZ <i>et. al.</i> , 2002
	1- <i>Hortia regia</i>	1- JACOBS, <i>et. al.</i> , 1987
Triterpenos (identificados em mistura)		
	1- <i>Hortia arborea</i>	1- FERRACIN, 1992
	1- <i>Hortia arborea</i>	1- FERRACIN, 1992



1- *Hortia arborea*

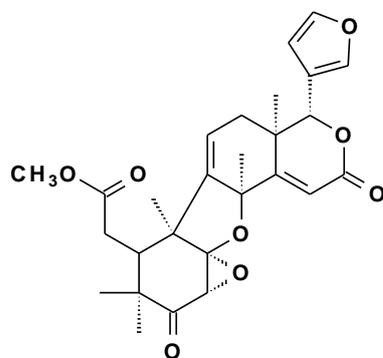
1- FERRACIN, 1992

Limonóides



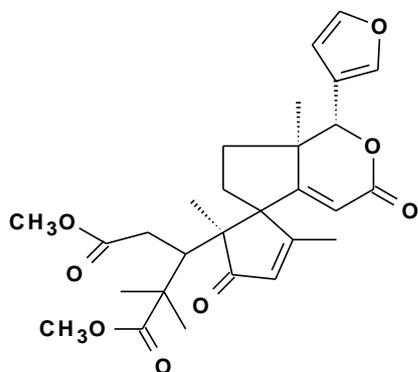
1- *Hortia colombiana*

1- SUAREZ *et. al.*,
1998 / SUAREZ *et.*
al., 2002



1- *Hortia colombiana*

1- SUAREZ *et. al.*,
2002

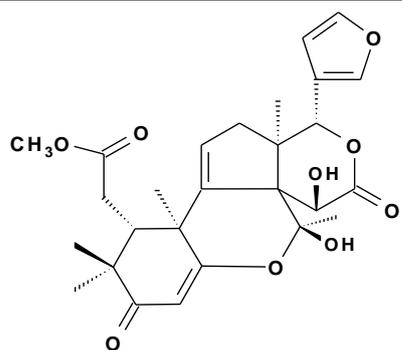


1- *Hortia regia*

2- *Hortia oreadica*

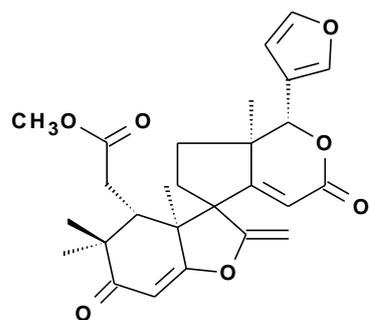
1- JACOBS *et. al.*,
1986

2- BRAGA, 2005 /
SEVERINO, 2008



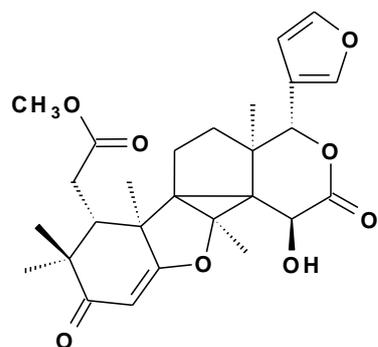
1- *Hortia oreadica*

1- BRAGA, 2005



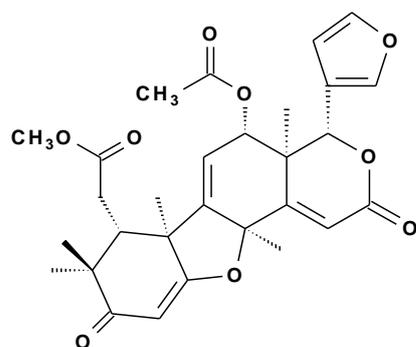
1- *Hortia oreadica*

1- BRAGA, 2005



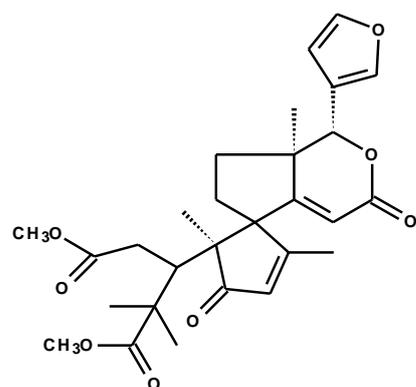
1- *Hortia superba*
2- *Hortia oreadica*

1- BRAGA, 2005 /
SEVERINO, 2008
2- SEVERINO, 2008



1- *Hortia oreadica*

1- BRAGA, 2005



1- *Hortia oreadica*

1- SEVERINO, 2008

TABELA 1.7: Flavonóides e amidas isolados de *Hortia*.

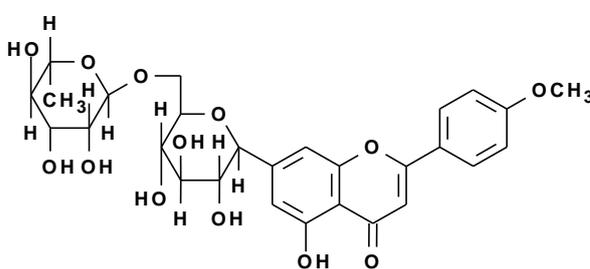
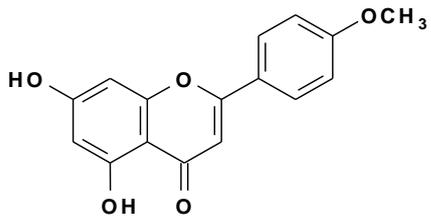
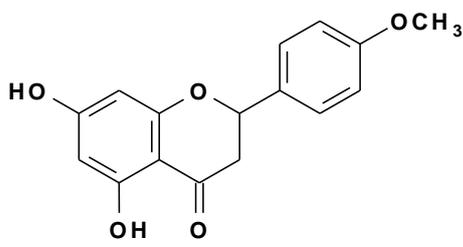
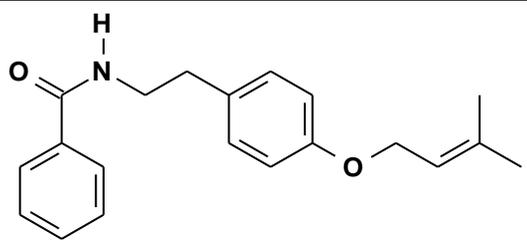
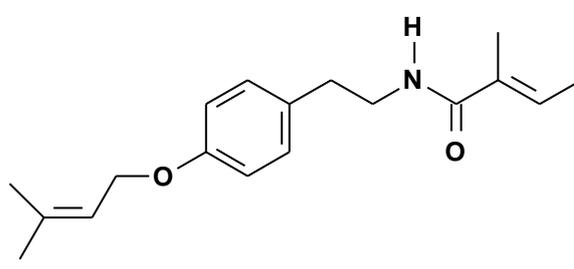
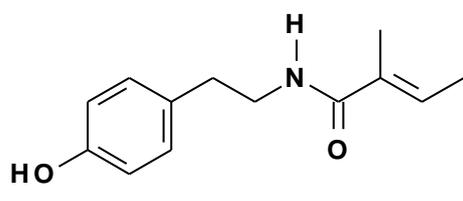
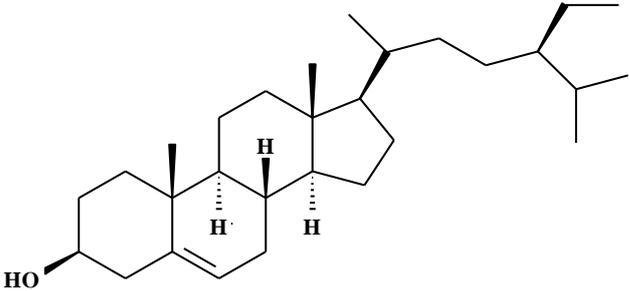
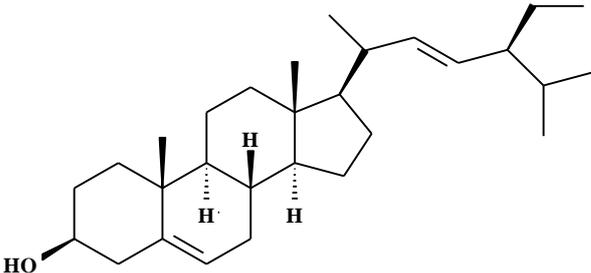
Composto	Fonte	Referência
Flavonóides		
	1- <i>Hortia longifolia</i>	1- PÁDUA, 1976
	1- <i>Hortia superba</i>	1- BRAGA, 2005
	1- <i>Hortia superba</i>	1- BRAGA, 2005
Amidas		
	1- <i>Hortia regia</i>	1- TINTO <i>et. al.</i> , 1992
	1- <i>Hortia colombiana</i>	1- SUAREZ <i>et. al.</i> , 2002
	1- <i>Hortia colombiana</i>	1- SUAREZ <i>et. al.</i> , 2002

TABELA 1.8 : Esteróides isolados de *Hortia*.

Composto	Fonte	Referência
	1- <i>Hortia brasiliana</i>	1- BRAGA, 2005
	1- <i>Hortia brasiliana</i>	1- BRAGA, 2005

1.4 - Doenças Citrícolas

A produção de citros é um alvo constante de diversas doenças e pragas, a qual em condições favoráveis ao seu desenvolvimento podem causar prejuízos graves. As perdas econômicas ocasionadas por doenças de pós-colheita representam um dos principais problemas da citricultura mundial (TUSET, 1987; ECKERT *et al.*, 1989). A maioria dessas doenças desqualifica a fruta para comercialização, como destacado por Eckert em 1993, que mencionou perdas de até 50 % para laranjas, apenas durante o período de comercialização. Vários fatores relacionados com o fruto, o patógeno, o clima e as condições em pós-colheita determinam a incidência e a severidade das doenças (ECKERT; EAKS, 1989). Entre estes, a quantidade de inóculo presente em um ponto do fruto suscetível ocupa um lugar de destaque.

A produção atual de frutas cítricas no mundo é estimada em 60,27 milhões de toneladas, sendo este montante contabilizado em mais de 100 países produtores, nos quais incluem Brasil e Estados Unidos da América, que ocupam o primeiro e segundo lugares, respectivamente. A produção brasileira está em torno de 20,6 milhões de toneladas, correspondendo a 30 % da produção mundial (FAO, 2000). Não obstante a importância que a citricultura representa para o Brasil e, muito

particularmente para o estado de São Paulo, a cultura dos citros é afetada por grande número de doenças, destacando-se a mancha preta ou pinta preta dos frutos cítricos.

Dentre as doenças citrícolas, destaca-se: Leprose dos Citros, Clorose Variegada dos Citros (CVC), Gomose de *Phytophthora*, Greening, Cancro Cítrico, Declínio, Mancha *Alternaria*, Morte Súbita dos Citros (MSC), Pinta Preta, Podridão Floral dos Citros, Rubelose, Tristeza – *Citrus Tristeza Virus* (CTV).

1.5 - Mancha Preta dos Citros

A mancha preta dos citros (MPC) ou pinta preta, causada pelo fungo *Guignardia citricarpa*, foi descrita pela primeira vez em 1895, na Austrália, provocando perdas significativas em laranjeira Valência (FAWCETT, 1936). Essa doença afeta laranjeiras, tangerineiras, limoeiros e pomeleiros, sendo constatada na África (Moçambique, Zimbábwe, Swazilândia e África do Sul), na Ásia (China, Filipinas, Taiwan e Indonésia), na Oceania (Austrália) e na América do Sul (Argentina, Brasil e Peru) (SUTTON *et al.*, 1966; FEICHTENBERGER, 1996; KOTZÉ, 1996). No Brasil a doença surgiu no início da década de oitenta, causando prejuízos significativos nos municípios de São Gonçalo e Itaboraí no Estado do Rio de Janeiro (ROBBS *et al.*, 1980) e ao final desta mesma década, surgiu de forma epidêmica na região citrícola do Vale do Caí no Rio Grande do Sul (ROBBS *et al.*, 1995). No Estado de São Paulo, a MPC foi detectada pela primeira vez em 1992, infectando plantas de limoeiros verdadeiros e laranjeiras-doces de maturação tardia, nos municípios de Conchal e Engenheiro Coelho (GOES *et al.*, 1993) e, atualmente vem se alastrando nas regiões citrícolas paulistas (AGUILAR-VILDOSO, 1997).

Com exceção da laranjeira Azeda (*C. aurantium*) e seus híbridos (Kotzé, 1981), e da limeira ácida Tahiti (*C. latifolia*) (AGUILAR-VILDOSO, 1997), todas as variedades comerciais são suscetíveis, principalmente os limoeiros verdadeiros (*C. limon*), que têm papel fundamental no início das epidemias da doença (KOTZÉ, 1981), e as laranjeiras (*C. sinensis*) de maturação média-tardia (Pêra) a tardia (Natal e Valência). No Brasil, perdas semelhantes têm-se verificado em pomares de tangerineira Rio (*Citrus deliciosa* Tenore) no Estado do Rio de Janeiro (GOES *et al.*, 1990). No Estado de São Paulo já se verificaram até 100% de frutos afetados em áreas onde não se realizou nenhum tipo de controle.

A MPC é de grande importância econômica, pois causa depreciação estética dos frutos e acarreta prejuízos na comercialização dos mesmos *in natura* no mercado externo, em decorrência das barreiras fitossanitárias impostas pelos países como Estados Unidos e a Comunidade Européia. Quando ocorre alta infecção na região do pedúnculo de frutos em desenvolvimento pode haver queda prematura refletindo desta maneira na produção (AGUILAR-VILDOSO *et al.*, 2002).

1.6 - *Guignardia citricarpa*

O fungo causador da MPC foi descrito por McAlpine (1899) na sua forma assexuada e recebeu inicialmente a designação de *Phoma citricarpa* e posteriormente de *Phyllosticta citricarpa*. O estágio sexual do patógeno foi descoberto por Kiely (1948) e foi chamado de *Guignardia citricarpa*, apresentando uma ampla faixa de hospedeiros e compreendendo plantas de dezenas de famílias, sendo que no gênero *Citrus* a doença ocorre em laranjas, tangerinas e limões (GOES, 1998).

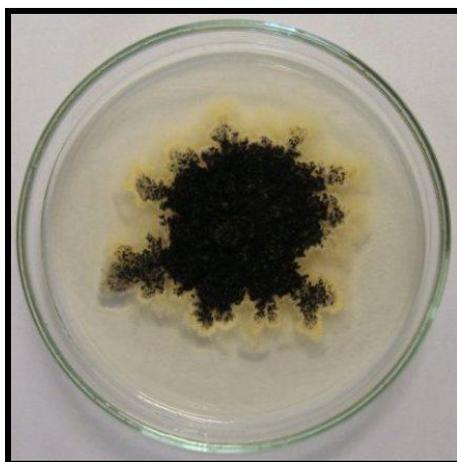


FIGURA 1.2. *Guignardia citricarpa* em BDA (batata-dextrose-ágar); foto obtida por Sâmya Freitas.

A MPC apresenta os ciclos primários e secundários bem distintos. O primeiro representa a fase sexual de *G. citricarpa*, cujas estruturas infectadas são os ascósporos, responsáveis pela introdução do patógeno na área e início das epidemias a cada ciclo da citricultura, sendo os ascósporos mencionados por alguns autores como a principal frente do inóculo. Esses esporos somente são produzidos

em folhas infectadas em decomposição e são disseminados pelo vento.

O ciclo secundário é caracterizado pela fase assexual do fungo (*Phyllosticta citricarpa*), onde os picnidiósporos são responsáveis pelo inóculo da doença na planta e ao seu redor (AGUILAR-VILDOSO *et al.*, 2002). Esses esporos somente são disseminados a curtas distâncias pela ação da água, principalmente por respingos de água.

1.7- Sintomas da MPC

Os órgãos atacados pela MPC podem ser em ordem de frequência: frutos, folhas, pedúnculos, pecíolos, ramos verdes e espinhos. Uma das principais características desta doença é a ausência de sintomas típicos nos tecidos vegetais mesmo estando infectados (AGUILAR-VILDOSO *et al.*, 2002). Nos frutos as lesões produzidas ficam restritas ao flavedo (epicarpo) desfavorecendo a comercialização de frutas *in natura*, porém não alcançam o albedo (mesocarpo) do fruto (GOES, 1998; MAGNANI, 2002).

O surgimento de sintomas pode demorar até um ano (fase latente), dependendo da variedade e das condições ambientais. O aparecimento é favorecido pela luminosidade combinada com altas temperaturas, sendo comum encontrar frutos com maior número de lesões na face exposta à luz do sol. Há vários tipos de lesões, nomeadas de acordo com suas características, que podem variar dependendo do tamanho, fase de maturação do fruto, condições climáticas e tipo de esporo responsável pela infecção (GOES, 1998; FUNDECITRUS, 2000).

Os tipos de sintomas (FIGURA 1.3) que podem ocorrer nos frutos cítricos são:

- a)** Mancha de Falsa Melanose: semelhante à melanose, ocorre em frutos em desenvolvimento. As lesões são minúsculas (cerca de 2 mm), circundadas por pontos pequenos e escuros com aproximadamente 1 mm de diâmetro e numerosas;
- b)** Mancha Dura: manifesta-se geralmente quando os frutos iniciam a fase de mudança de cor da casca, levando à maturação externa. As lesões são circulares com o centro acinzentado e pontos escuros que constituem as frutificações (picnídios). Esta é a lesão mais típica da doença e a mais fácil para sua confirmação,

ocorre principalmente na maturação dos frutos de laranja e em frutos jovens de limão;

c) Mancha Sardenta: é pequena, marrom-avermelhada e desenvolve-se em frutos maduros e em pós-colheita;

d) Mancha Virulenta: caracteriza-se pela formação de lesões grandes, escuras ou de coloração marrom, deprimidas, com ou sem frutificações, de formato irregular, podendo ocupar áreas de vários centímetros quadrados, sendo deprimidas ou não. O centro possui cor cinza e as bordas são salientes, marrom escura ou vermelha escura, com ou sem frutificações. Pode ser resultante da evolução das manchas pretas e aparecem, em geral, no final da safra, quando os frutos estão maduros, e com ocorrência de altas temperaturas;

e) Mancha Trincada: observada desde frutos verdes, ligeiramente saliente e superficial, variável em tamanho, podendo apresentar halo. Quando o fruto amadurece, a lesão trinca e está sempre associada ao ácaro da falsa ferrugem (*Phyllocoptruta oleivora*);

f) Mancha Reticulada: ocorre freqüentemente em frutos imaturos na forma de lesões superficiais de textura lisa e sem bordas definidas. Possui coloração marrom escura a clara e aspecto encharcado (MATTOS-JUNIOR *et al.*, 2005).

As folhas podem apresentar sintomas (FIGURA 1.4) caracterizados por lesões de centro acizentado, com bordos salientes marrom-escuros e circundados por um halo amarelo parecido com aquelas observadas nos frutos com sintomas de mancha dura. As lesões em folhas são freqüentemente observadas em tangerinas e limoeiros verdadeiros, e raramente em plantas de pomelo (GOES, 1998; FUNDECITRUS, 2000).

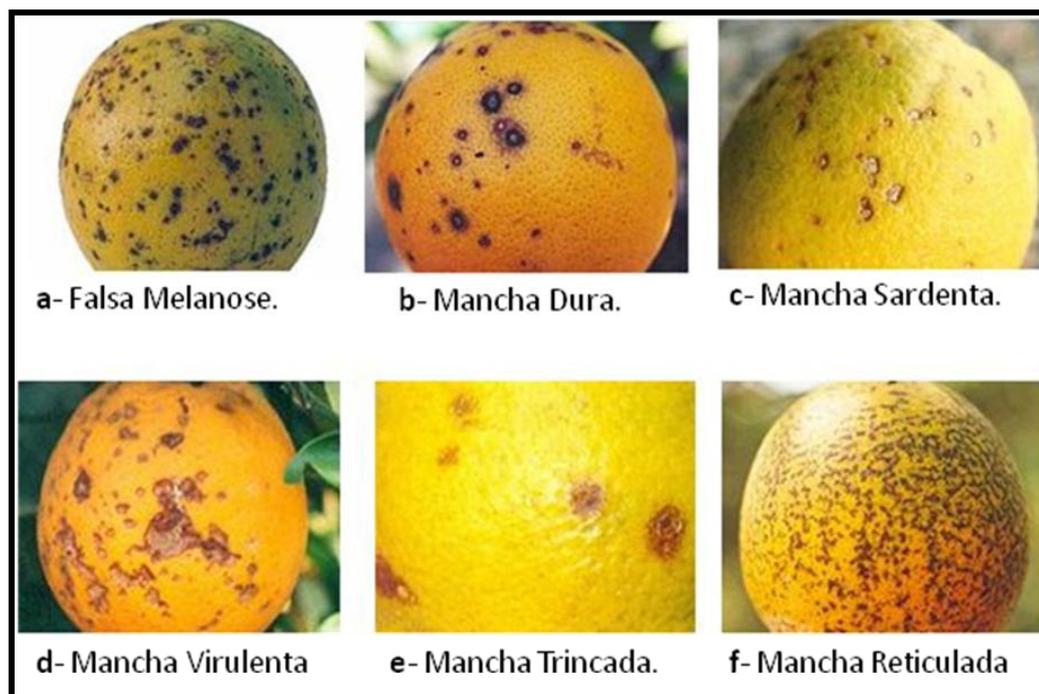


FIGURA 1.3: Sintomas da mancha preta dos citros observadas em frutos.
(Fonte: FUNDECITRUS, 2008)



FIGURA 1.4: Sintomas manifestados em folhas.
(Fonte: FUNDECITRUS, 2008)

1.8- Controle da MPC

Existem várias medidas que podem ser tomadas a fim de minimizar os prejuízos. Estas medidas compreendem a utilização de mudas saudáveis, boas condições de nutrição e sanidade, desinfestação de veículos, máquinas e equipamentos, retirada de restos vegetais e colheita de frutas temporais infectadas, controle de ervas daninhas, utilização de quebra ventos e irrigação nos períodos secos para evitar queda excessiva de folhas (FUNDECITRUS, 2000). Além desses cuidados, inclui-se a utilização de fungicidas protetores ou sistêmicos, isoladamente ou combinados, associados ao óleo mineral ou vegetal, o que, entretanto, eleva o

custo da produção.

O emprego de fungicidas é o principal método de controle utilizado em pré e pós-colheita (GOES, 1998), porém a utilização indiscriminada dos mesmos pode apresentar conseqüências indesejáveis para o ser humano como o acúmulo no organismo e a capacidade de causar câncer e mutações genéticas em descendentes (LIMA *et al.*, 2000).

O desafio para os produtores no controle de doenças tem aumentado cada vez mais com a demanda por produtos livres de resíduos químicos tóxicos e pela percepção do público em geral sobre o impacto das práticas utilizadas no controle de doenças, como o uso de agrotóxicos sobre a saúde dos seres humanos e sobre o meio ambiente. Tais pressões exercidas pela sociedade promoveram estabelecimento de políticas governamentais que restringem a utilização de agrotóxicos (GULLINO *et al.*, 1994; RAGSDALE *et al.*, 1994). Desta forma, agricultores bem como pesquisadores começaram a considerar o uso de métodos alternativos no combate à doenças (PUNJA *et al.*, 2003).

2 - OBJETIVOS

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

- ❖ Quimiosistemática do gênero: A classificação do gênero *Hortia* dentro da família Rutaceae é duvidosa como comentado na introdução. O estudo fitoquímico das espécies do gênero *Hortia* teve como objetivo a avaliação das substâncias isoladas quanto ao seu poder como marcador quimiosistemático para concluir melhor o exato posicionamento de *Hortia* dentro da família Rutaceae.

- ❖ A busca de compostos de partida para novas substâncias fungicidas à *Guignardia citricarpa*, visando o controle químico da mancha preta dos citros, uma doença citrícola de grande importância, e assim avaliar o efeito dos compostos isolados na inibição do desenvolvimento de *G. citricarpa*. Com isso, a implantação dos ensaios frente à *G. citricarpa* junto ao laboratório de Produtos Naturais (PN) da UFSCar.

3 - ESTUDO FITOQUÍMICO DAS ESPÉCIES DE *HORTIA*

Os procedimentos para o estudo fitoquímico como a preparação dos extratos vegetais, isolamento e identificação das substâncias foram realizados no Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

3.1 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1.1- Materiais

3.1.1.1 - Material Cromatográfico

❖ Cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), preparadas em folhas de alumínio com sílica gel 60 F₂₅₄, com 0,2 mm de diâmetro, da Merck.

❖ Cromatografia por adsorção:

- Cromatografia em coluna (CC), utilizando como fase estacionária: Sílica gel 60, 70-230 mesh e 230-400 mesh, da Merck, e Florisil (230-400 mesh ASTM);
- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando como fase estacionária: fase normal Propil-diol [(analítica / 10 µm; 25,0 x 0,46 cm) e (preparativa / 10 µm; 30,0 x 0,78 cm)] e fase reversa coluna Gemini C-18 (fase de sílica modificada com oatecilsilano), preparativa (10 µm, 31,0 x 1,0 cm) e analítica (10 µm; 25,0 x 0,46 cm);
- Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), utilizando como fase estacionária: coluna DB-5 (30m x 0,25 mm x 0,25 µm).

❖ Cromatografia por exclusão:

- Cromatografia em coluna, utilizando com fase estacionária: Sephadex LH-20, da Amersham Pharmacia Biotech AB.

3.1.1.2 - Solventes

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

3.1.1.3 - Reveladores

- ❖ Câmara de luz UV ($\lambda=254$ nm e 365 nm);
- ❖ Solução de Vanilina;
- ❖ Reagente de Dragendorff.

3.1.2 - Equipamentos

3.1.2.1 - Evaporadores Rotativos

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

3.1.2.2 - Balança Analítica

- ❖ Sartorius modelo BP210S.

3.1.2.3 - Câmara de UV

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

3.1.2.4 - Cromatógrafo para CLAE

- ❖ SHIMADZU SCL-10AV (condições analíticas e preparativas com válvula de reciclo) e “loop” de 200 µL;
- ❖ SHIMADZU LC-6AV (condições analíticas e preparativas com válvula de reciclo) e “loop” de 200 µL;
- ❖ SHIMADZU LC-8AV (condições preparativas com válvula de reciclo) e “loop” de 500 µL.

3.1.2.5 - Detectores

- ❖ UV-Vis Shimadzu SPD - 10AV;
- ❖ UV-Vis Shimadzu SPD - 6AV.

3.1.2.6 - Espectrômetros de Massas

- ❖ CG-EM Shimadzu QP 5000 – ionização por impacto eletrônico - DQ/UFSCar;
- ❖ MICROMASS Quattro LC (triplo quadrupolo) equipado com uma fonte ESI/APCI “Z-spray” e gás de arraste argônio, utilizado em inserção direta e acoplado ao cromatógrafo líquido WATERS Alliance 2695 - LaBioMMi- DQ/UFSCar.

3.1.2.7- Espectrômetros de Ressonância Magnética Nuclear

- ❖ Bruker DRX 9,8 T (400 MHz para RMN ^1H e 100 MHz para RMN ^{13}C) - DQ/UFSCar;
- ❖ Bruker ARX 4,9 T (200 MHz para RMN ^1H e 50 MHz para RMN ^{13}C) - DQ/UFSCar.

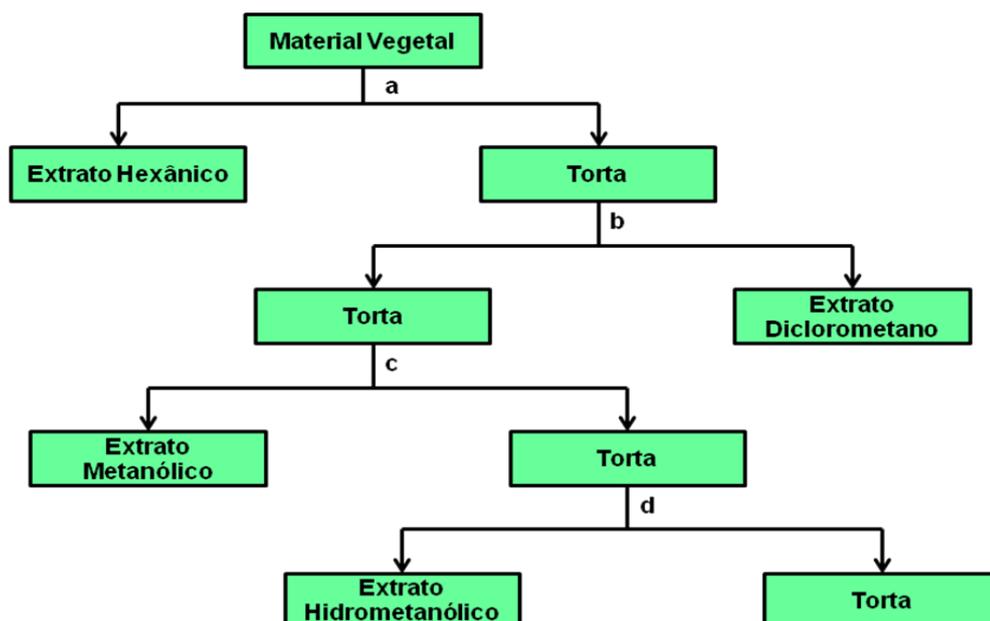
3.1.3 - Material Botânico

A espécie *Hortia brasiliana* Vand. Ex DC foi coletada no município de Linhares, Espírito Santo e a espécie *Hortia oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani foram coletadas na Reserva DUCKE no município de Itacoatiara, Amazonas. A espécie *Hortia superba* Ducke Milton Groppo Jr. 950, E.A. Anunciação & A.T. Mello foi coletada em 20 de dezembro de 2001, em Manaus-AM, no km 31 da rodovia para Itacoatiara. Todas as espécies foram identificadas pelo Prof. Dr. José Rubens Pirani, do Departamento de Botânica, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (USP-SP) e as exsicatas encontra-se depositada no Herbário SPF (Depto de Botânica do IB-USP).

3.1.4 - Obtenção dos Extratos de *Hortia brasiliana* e *Hortia oreadica*

Os extratos de folhas de *H. brasiliana* e *H. oreadica* foram obtidos anteriormente pela Dra Patrícia Aparecida Campos Braga, durante seu doutorado no Departamento de Química da UFSCar no Laboratório de Produtos Naturais.

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



FLUXOGRAMA 3.1: Fluxograma da preparação dos extratos das espécies de *Hortia*.

- a) Extração com Hexano (EH);
- b) Extração com Diclorometano (ED);
- c) Extração com Metanol (EM);
- d) Extração com mistura de Metanol/Água na proporção de 1:1.

Os extratos foram concentrados em rotaevaporador e no caso dos extratos hidroalcológicos liofilizados; a seguir todos os extratos foram conservados em refrigerador para evitar degradação dos mesmos. As massas dos extratos obtidos das folhas das espécies *H. brasiliiana* e *H. oreadica* está descrito na TABELA 3.1.

TABELA 3.1: Massas obtidas de material vegetal e extratos de *H. brasiliiana* e *H. oreadica*.

Material vegetal	Massa vegetal (g)	Massas de extratos obtidos (g)		
		EH	ED	EM
Folhas de <i>H. brasiliiana</i>	655	16	21,7	25,9
Folhas de <i>H. oreadica</i>	3.180	93	161	42

3.1.5 - Obtenção dos Extratos de *Hortia superba*

O extrato dos galhos de *H. superba* foram obtidos a partir dos galhos secos e moídos com 3 extrações com Etanol a cada 200 g da massa vegetal, em Ika Ultra Turrax (T 25) por 5 min., 20.000 rpm à temperatura ambiente a cada extração. O extrato foi filtrado com funil simples com auxílio de papel de filtro e evaporado à secura sob vácuo em evaporador rotativo. A seguir todos os extratos foram conservados em refrigerador para evitar degradação dos mesmos. A massa do extrato obtido dos galhos da espécie *H. superba* está descrito na TABELA 3.2.

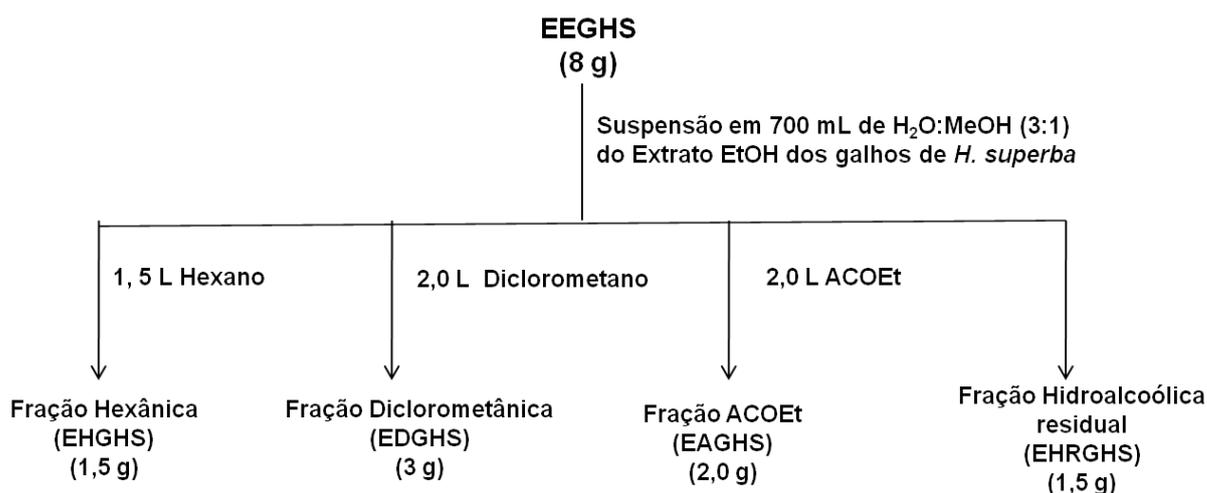
TABELA 3.2: Massa de material vegetal e de extrato obtido de *H. superba*.

Material vegetal	Massa vegetal (g)	Extrato EtOH (g)
Galhos de <i>H. superba</i>	483	46,9

3.1.6 - Fracionamento dos Extratos e Isolamento das Substâncias

3.1.6.1 - Fracionamento do Extrato de *Hortia superba*

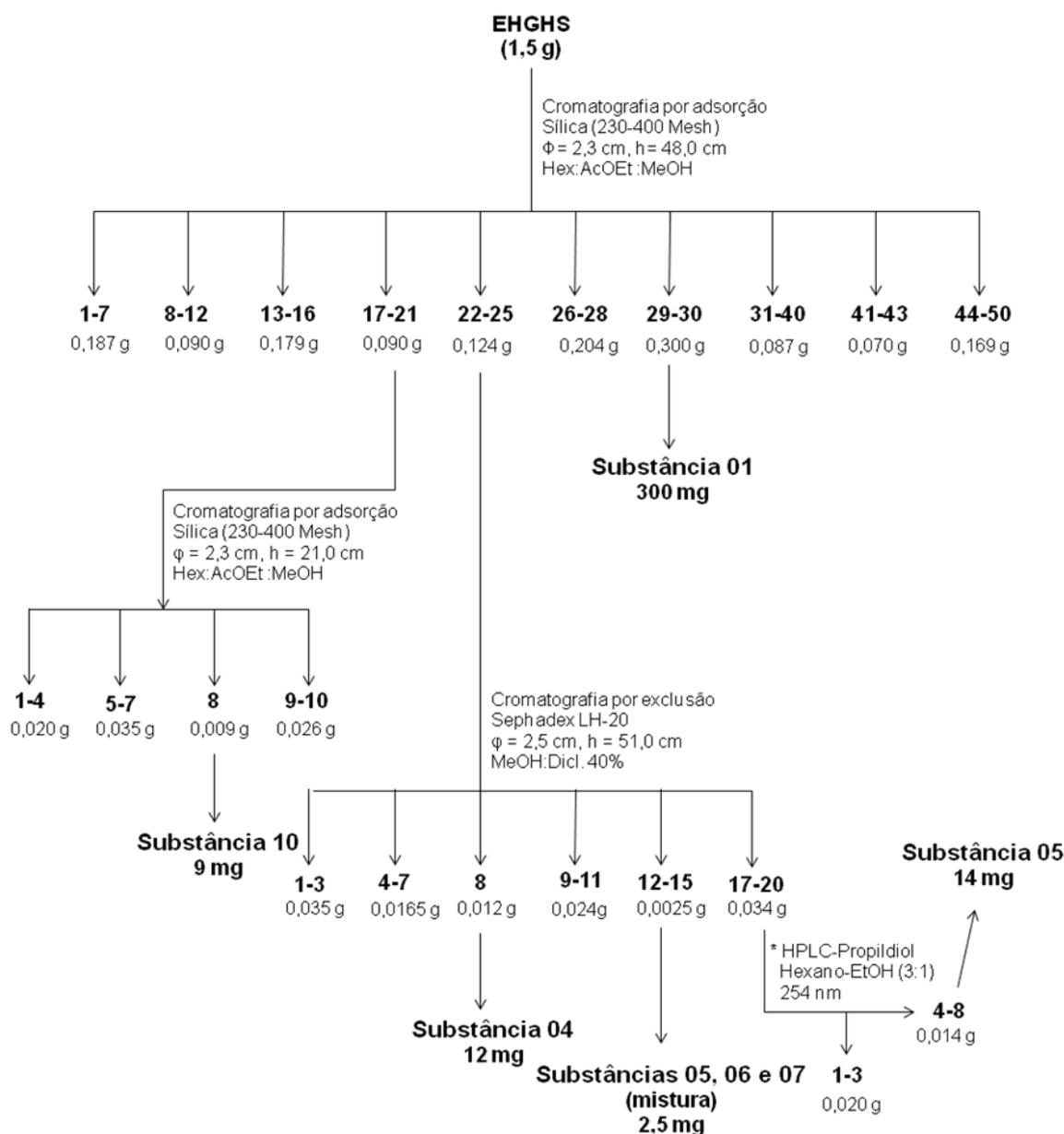
O extrato etanólico dos galhos de *H. superba* foi submetido a uma partição líquido – líquido. A metodologia empregada baseou-se no preparo de uma solução hidroalcoólica do extrato EtOH utilizando uma solução de Metanol/H₂O (1:3) e numa extração utilizando-se uma série de solventes com gradiente crescente de polaridade, como segue: hexano, diclorometano e acetato de etila. Com isso, obteve-se 4 frações (FLUXOGRAMA 3.2): fração hexânica, fração diclorometânica, fração acetato de etila e um resíduo resultante deste processo, a fração residual aquosa. Em seguida, as frações foram concentradas em evaporador rotativo até a eliminação completa dos solventes. As frações obtidas tiveram o seu perfil cromatográfico caracterizado por cromatografia em camada delgada (CCD) comparativa e por RMN de ¹H permitindo uma análise das frações a serem trabalhadas. A seguir todos as frações foram conservadas em refrigerador para evitar degradação.



FLUXOGRAMA 3.2: Partição líquido-líquido do extrato EtOH dos galhos de *H. superba*.

A partir da obtenção de um espectro de RMN de ^1H das 4 frações, a fração hexânica (EHGHS) foi escolhida para estudo devido a presença de sinais interessantes, sendo alguns destes sinais relacionados a uma substância majoritária presente, o alcalóide N-metil-4-metoxi-2-quinolona (**01**), o qual foi isolado em grande quantidade.

A fração hexânica dos galhos de *H. superba* foi fracionada, assim como as subfrações obtidas a partir dela, de acordo com o FLUXOGRAMA 3.3. Esta fração proporcionou o isolamento do alcalóide N-metil-4-metoxi-2-quinolona (**01**), da flavanona isosakuranetina (**10**), das cumarinas escoparona (**04**), xantotoxina (**05**) e da mistura de cumarinas xantotoxina, isopimpenilina e 5-cloro-8-metoxi-furanocumarina (**05**, **06** e **07**), sendo as substâncias **04** e **05** relatadas pela primeira vez na espécie *H. superba*, a substância **06** descrita pela primeira vez no gênero *Hortia* e a substância **07** relatada pela primeira vez na literatura.

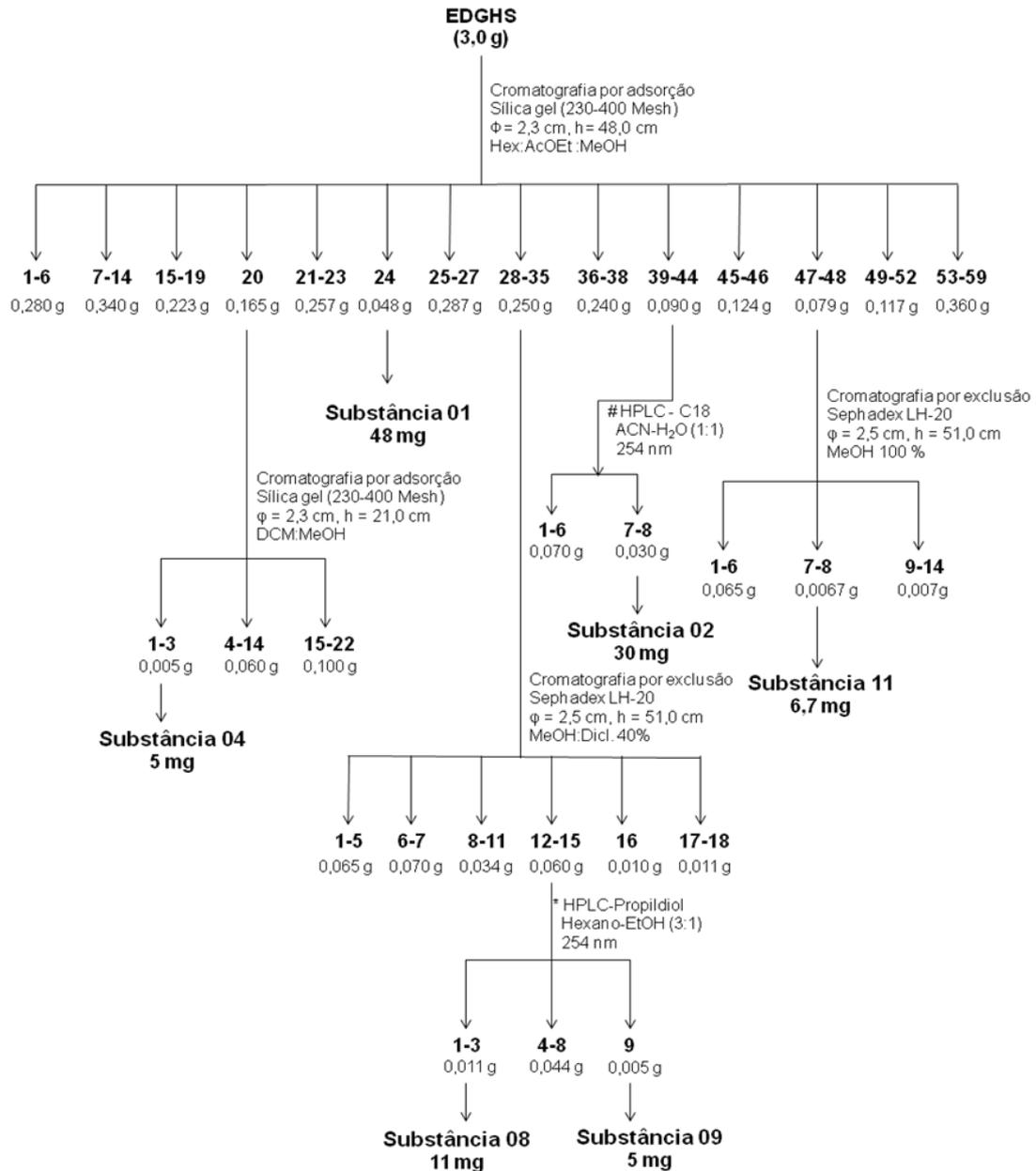


FLUXOGRAMA 3.3: Resumo do fracionamento da fração EHGHS e de suas subfrações.

* Coluna Propil-diol [(analítica / 10 μm; 25,0 x 0,46 cm) e (preparativa / 10 μm; 30,0 x 0,78 cm)], Loop: 200 μL, Fase Normal com Eluição Isocrática: Hexano: EtOH 3:1, Detector UV λ: 254 nm, Vazão: 1 mL/min (analítica) e 4,5 mL/min (preparativa).

A fração diclorometânica dos galhos de *H. superba* (EDGHS) também foi escolhida para estudo devido apresentar sinais interessantes no RMN ¹H e assim, foi fracionada de acordo com o FLUXOGRAMA 3.4. Desta fração, foram isolados os alcalóides N-metil-4-metoxi-2-quinolona (**01**) e integriquinolona (**02**), sendo a substância **02** inédita no gênero *Hortia*, a flavanona glicosilada neoponcirina (**11**), inédita no gênero *Hortia*, e as cumarinas escoparona (**04**), prangol (**08**) e heraclenol

(09). Várias fases estacionárias assim como várias metodologias foram utilizadas para estes fracionamentos.

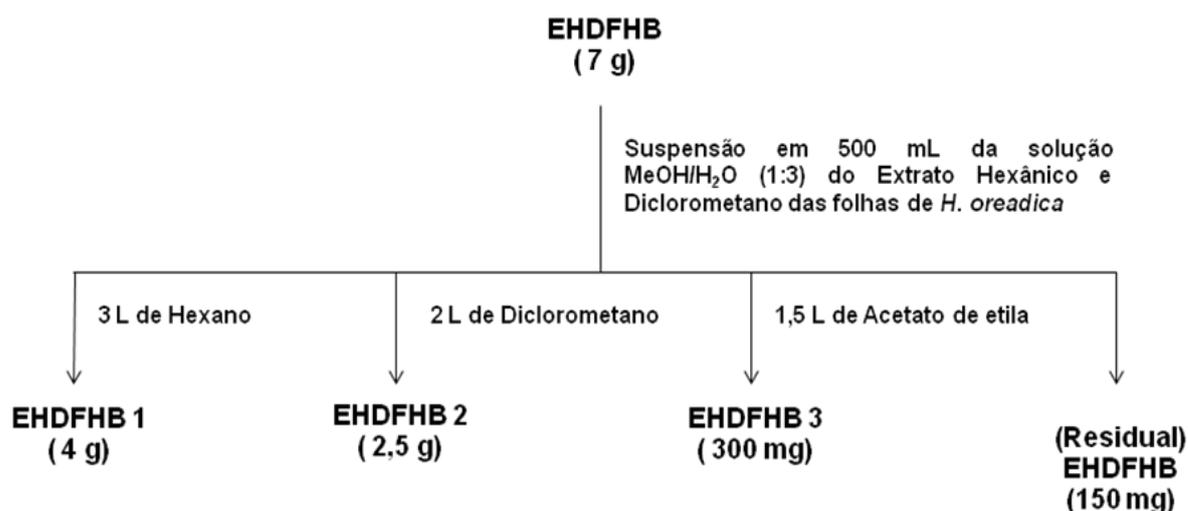


FLUXOGRAMA 3.4: Resumo do fracionamento da fração EDGHS e de suas subfrações.

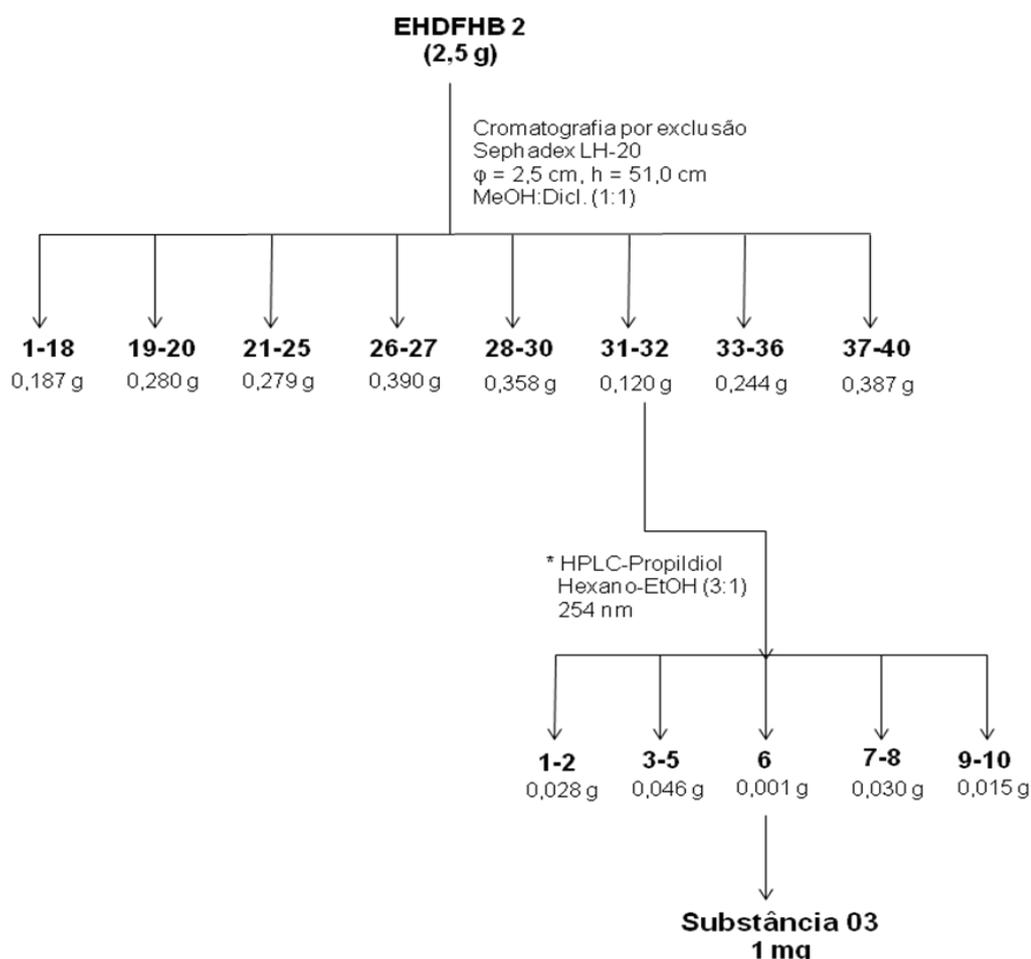
* Coluna **Propil-diol** [(analítica / 10 μm; 25,0 x 0,46 cm) e (preparativa / 10 μm; 30,0 x 0,78 cm)], Loop: 200 μL, Fase Normal com Eluição Isocrática: Hexano: EtOH 3:1, Detector UV λ: 254 nm, Vazão: 1 mL/min (analítica) e 4,5 mL/min (preparativa).
Coluna **C18** [(analítica / 10 μm; 25,0 x 0,46 cm) e (preparativa / 10 μm; 30,0 x 0,78 cm)], Loop: 200 μL (analítica); 500 μL (preparativa), Fase Reversa com Eluição Isocrática: ACN: H₂O 1:1, Detector UV λ: 254 nm, Vazão: 1 mL/min (analítica) e 6,0 mL/min (preparativa).

3.1.6.2- Fracionamento dos Extratos de *Hortia oreadica*

Os extratos hexânico (EHFHB) e diclorometânico (EDFHB) das folhas de *H. oreadica* foram reunidos devido a suas similaridades, com base na análise por RMN ^1H e de CCDA dos mesmos. O extrato (EHDFHB) proveniente da junção dos dois extratos foi submetido a uma partição líquido-líquido, usando a mesma metodologia utilizada para o extrato EtOH de *H. superba*, e assim forneceu 4 subextratos (FLUXOGRAMA 3.5). O subextrato EHDFHB 2 foi escolhido para o refraçãoamento, por apresentar sinais em RMN ^1H relativos à substâncias de interesse como alcalóides e cumarinas. Este subextrato proporcionou o isolamento do alcalóide rutaecarpina (**03**). O subextrato EHDFHB 1 foi refraçãoado, porém nenhuma das frações provenientes foram trabalhadas. O subextrato EDTSHB 3 também foi refraçãoado, mas não forneceu nenhum metabólito puro.



FLUXOGRAMA 3.5: Partição líquido-líquido do extrato (EHDFHB) proveniente da junção dos extratos hexânico e diclorometânico das folhas de *H. oreadica*.



FLUXOGRAMA 3.6: Resumo do fracionamento da fração EHDFHB e de suas subfrações.

* Coluna **Propil-di-ol** [(analítica / 10 µm; 25,0 x 0,46 cm) e (preparativa / 10 µm; 30,0 x 0,78 cm)], Loop: 200 µL, Fase Normal com Eluição Isocrática: Hexano: EtOH 3:1, Detector UV λ: 254 nm, Vazão: 1 mL/min (analítica) e 4,5 mL/min (preparativa).

3.1.6.3 - Fracionamento dos Extratos de *Hortia brasiliana*

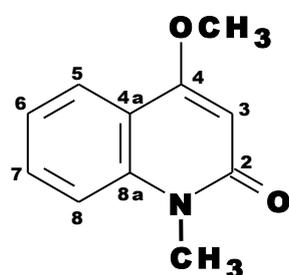
Os extratos hexânico (EHFHA) e diclorometânico (EDFHA) das folhas de *H. brasiliana* foram reunidos devido a suas similaridades, com base na análise de RMN ¹H e de CCDA dos mesmos. O extrato (EHDFHA) obtido a partir da reunião foi fracionado, assim como suas subfrações, mais não forneceu nenhum metabólito de interesse. Os espectros de RMN ¹H apresentaram sinais relativos a uma quantidade elevada de material graxo e também devido o alto teor de clorofila, o que dificultou bastante os diversos fracionamentos, sendo assim, o material foi reservado.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES DO ESTUDO FITOQUÍMICO

4.1 - Substâncias Isoladas

O estudo fitoquímico das espécies de *Hortia* (*H. superba*, *H. oreadica* e *H. brasiliana*) permitiu o isolamento de substâncias pertencentes a diferentes classes: alcalóides, cumarinas e flavonóides. Para facilitar a identificação estrutural dos metabólicos isolados, estes serão discutidos por classes.

Alcalóides:



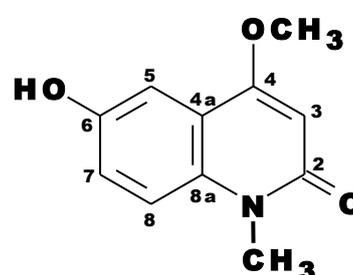
01

N-metil-4-metoxi-2-quinolona

Procedência: *H. superba* (galhos).

Isolamento: p.33 e 34.

Identificação: p.40-43.



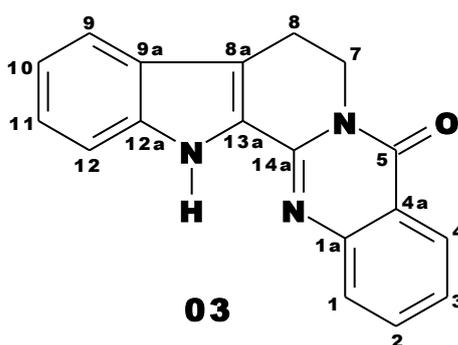
02

Integriquinolona

Procedência: *H. superba* (galhos).

Isolamento: p. 34.

Identificação: p. 44-49.



03

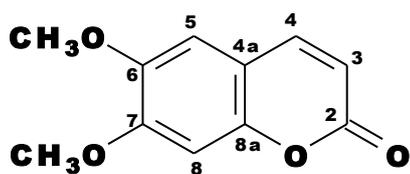
Rutaecarpina

Procedência: *H. oreadica* (folhas)

Isolamento: p.36

Identificação: p. 50-55.

Cumarinas:



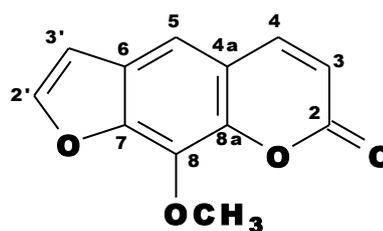
04

Escoparona

Procedência: *H. superba* (galhos)

Isolamento: p. 33 e 34.

Identificação: p. 58-60.



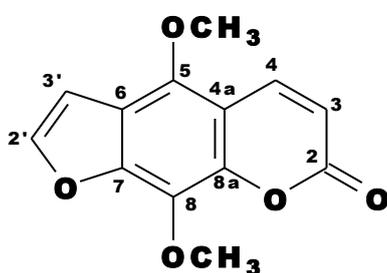
05

Xantotoxina

Procedência: *H. superba* (galhos)

Isolamento: p. 33.

Identificação: p. 61-63.



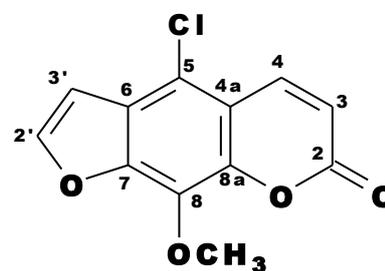
06

Isopimpenilina

Procedência: *H. superba* (galhos)

Isolamento: p. 33.

Identificação: p. 64-74.



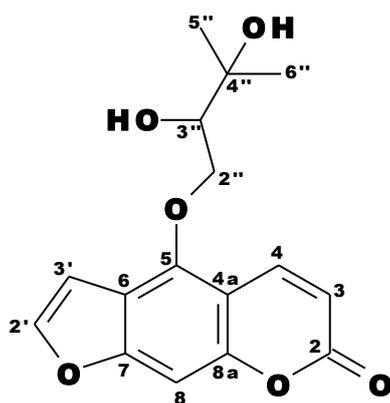
07

5-cloro-8-metoxi-furanocumarina

Procedência: *H. superba* (galhos)

Isolamento: p. 33.

Identificação: p. 64-74.



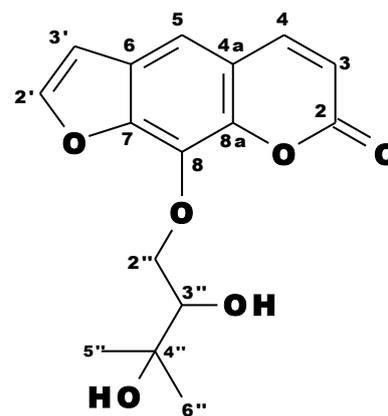
08

Prangol

Procedência: *H. superba* (galhos)

Isolamento: p. 34

Identificação: p. 74-80.



09

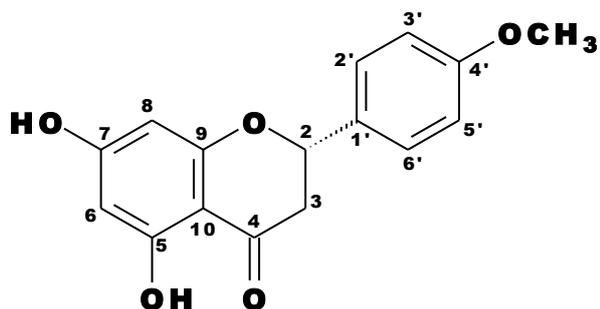
Heraclenol

Procedência: *H. superba* (galhos)

Isolamento: p. 34.

Identificação: p. 81-84.

Flavonóides:



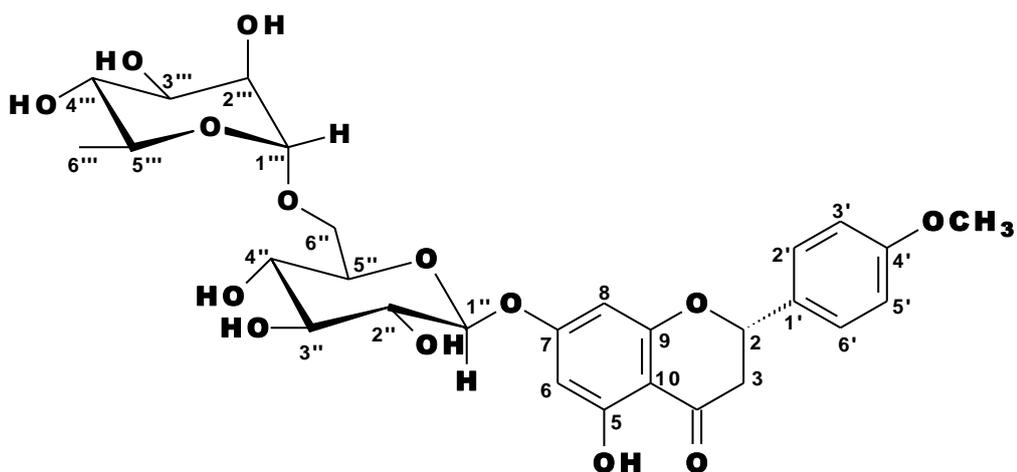
10

Isosakuranetina

Procedência: *H. superba* (galhos)

Isolamento: p. 33

Identificação: p. 88-93.



11

Neoponcirina

Procedência: *H. superba* (galhos)

Isolamento: p. 34.

Identificação: p. 94-105.

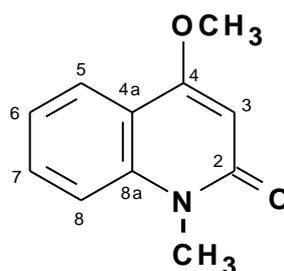
4.2 – Alcalóides

Os alcalóides constituem um vasto grupo de metabólitos secundários com grande diversidade estrutural, representando cerca de 20% das substâncias naturais descritas (HENRIQUES *et al*, 2001). Na família Rutaceae ocorrem diferentes tipos de alcalóides, que são classificados de acordo com sua origem biogenética. Estes são derivados da fenilalanina/tirosina; do triptofano; do ácido antranílico, da histidina e outros de origem não definida, como os carbazóis. No entanto, as plantas pertencentes a esta família são capazes de produzir em sua maioria alcalóides derivados do ácido antranílico, tais como os furoquinolínicos, 2-quinolona, 4-quinolona, piranoquinolonas e acridônicos, dentre outros (WATERMAN, 1999).

Alguns alcalóides são descritos para o gênero *Hortia*, dentre eles os furoquinolínicos (TABELA 1.4, p.9), 2-quinolona (TABELA 1.4, p.9-10), piranoquinolonas (TABELA 1.4, p.10) e os β -indolopiridoquinazolínicos (TABELA 1.4, p.8). Neste estudo foram isolados três alcalóides, sendo dois do tipo 2-quinolona (N-metil-4-metoxi-2-quinolona e integriquinolona) e um β -indolopiridoquinazolínico, a rutaecarpina. O alcalóide integriquinolona é relatado pela primeira vez no gênero *Hortia*.

4.2.1 - Determinação estrutural da substância 01

A substância **01** é um alcalóide do tipo 2-quinolona e foi isolado da fração hexânica (EHGHS) e da fração diclorometânica (EDGHS) proveniente do extrato etanólico dos galhos de *H. superba* e foi identificado por experimentos de RMN ^1H e ^{13}C e também por comparação com dados da literatura (MAFEZOLI, 2001).



01

Analisando o espectro de RMN ^1H de **01** (FIGURA 4.1), é possível observar 4 sinais na região de aromáticos, em δ 7,90 (1H, *dd*, $J=8,0; 2,0$), em δ 7,15 (1H, *ddd*, $J=8,0; 7,2; 1,2$), em δ 7,52 (1H, *ddd*, $J=8,0; 7,2; 2,0$) e em δ 7,28 (1H, *dl*, $J=8,0$), atribuídos aos hidrogênios H-5, H-6, H-7 e H-8, respectivamente. A partir das multiplicidades dos sinais dos hidrogênios aromáticos, é observado que H-5 apresenta um acoplamento em *orto* com H-6 e em *meta* com H-7, o H-6 mostra acoplamento em *orto* com os hidrogênios H-5 e H-7, e *meta* com H-8, da mesma forma o H-7 acopla em *orto* com os hidrogênios H-6 e H-8 e em *meta* com o H-5 e o hidrogênio H-8 mostra um acoplamento em *orto* com H-7. Além disso, foi observado dois sinais em δ 3,89 (3H, *s*) e δ 3,61 (3H, *s*), característicos de metilas ligadas a heteroátomos.

O espectro de RMN ^{13}C (FIGURA 4.2) mostrou sinais para 11 carbonos. Observou-se a presença de um sinal em δ 55,6, característico de carbono oximetílico, verificando a presença de uma metoxila e um outro sinal em δ 29,1, indicando a presença de um grupamento metila ligado ao nitrogênio da molécula. Assim, a substância **01** foi identificada como sendo o alcalóide N-metil-4-metoxi-2-quinolona, que é amplamente encontrado em plantas da família Rutaceae.

TABELA 4.1: Dados de RMN ^1H e ^{13}C de **01** e comparação com a literatura.

$^1\text{H}/^{13}\text{C}$	SUBSTÂNCIA 01 (400/100 MHz, CDCl_3)		MAFEZOLI, 2001 (400/100 MHz, CDCl_3)	
	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm)	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm)
2	-	163,7	-	163,8
3	5,99 (1H, <i>s</i>)	96,2	6,05 (1H, <i>s</i>)	96,5
4	-	162,5	-	162,7
4a	-	116,3	-	116,7
5	7,90 (1H, <i>dd</i> , $J=8,0; 2,0$)	123,1	7,96 (1H, <i>dd</i> , $J=8,0; 1,5$)	123,4
6	7,15 (1H, <i>ddd</i> , $J=8,0; 7,2; 1,2$)	121,5	7,22 (1H, <i>ddd</i> , $J=8,0; 7,1; 1,0$)	121,7
7	7,52 (1H, <i>ddd</i> , $J=8,0; 7,2; 2,0$)	131,0	7,57 (1H, <i>ddd</i> , $J=8,6; 7,1; 1,5$)	131,2
8	7,28 (1H, <i>dl</i> , $J=8,0$)	113,9	7,33 (1H, <i>dl</i> , $J=8,6$)	114,1
8a	-	139,5	-	139,8
O-Me	3,89 (3H, <i>s</i>)	29,1	3,95 (3H, <i>s</i>)	29,1
N-Me	3,61 (3H, <i>s</i>)	55,6	3,68 (3H, <i>s</i>)	55,8

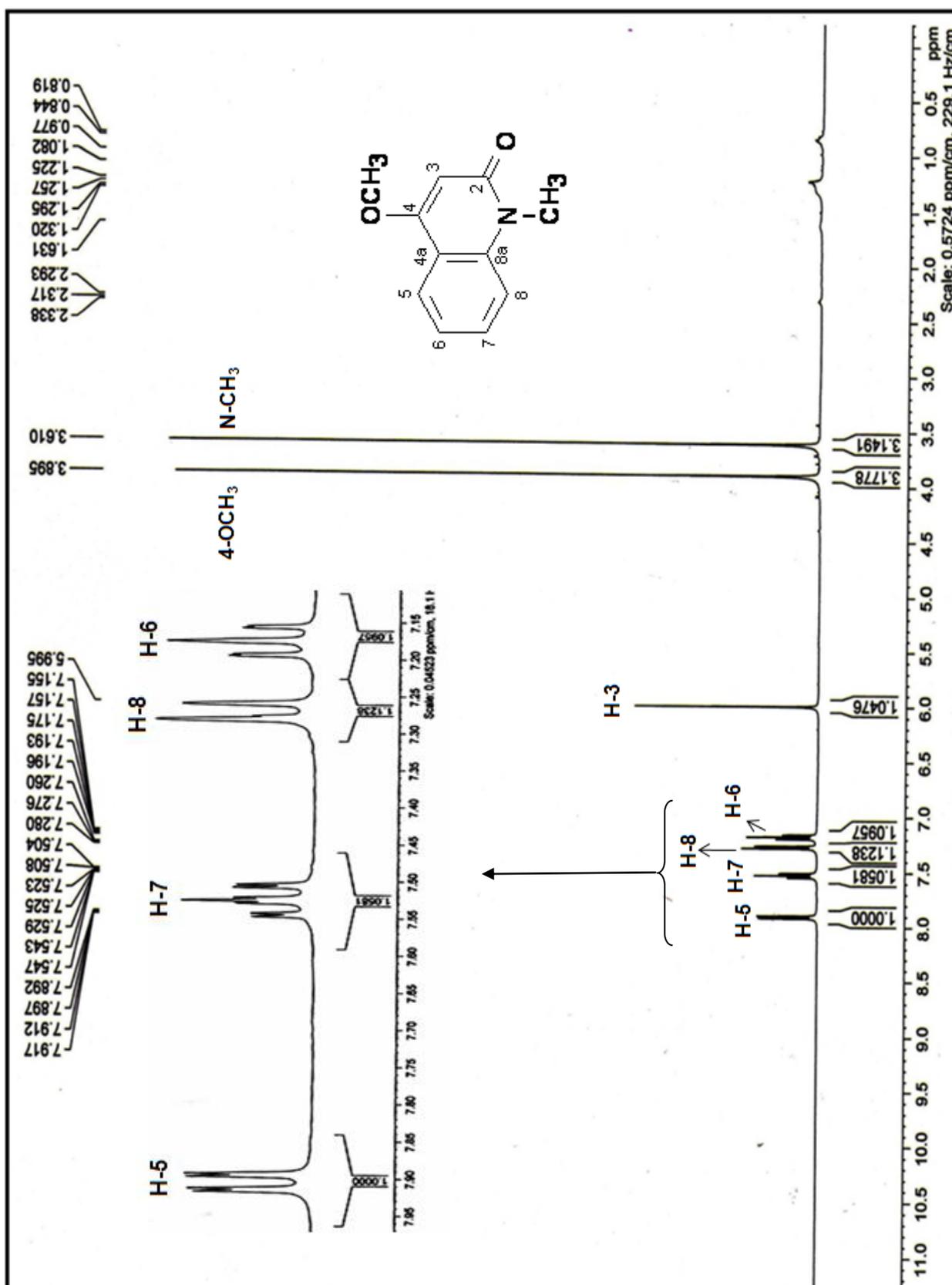


FIGURA 4.1: Espectro de RMN ¹H de **01** (400 MHz, CDCl₃).

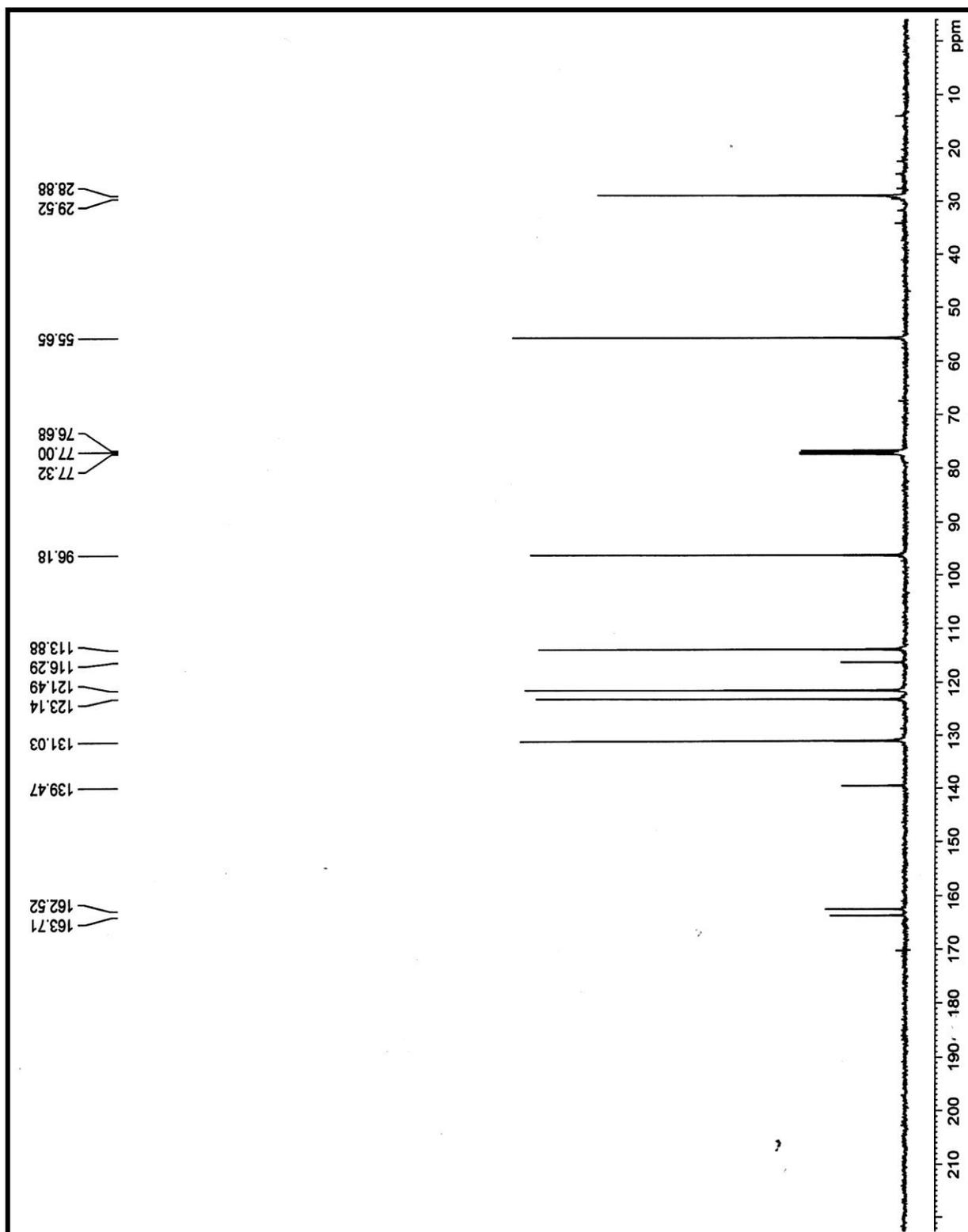
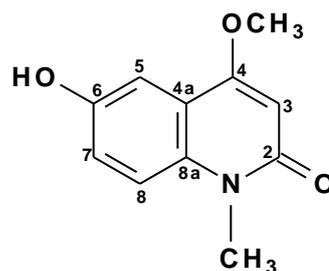


FIGURA 4.2: Espectro de RMN ^{13}C de **01** (100 MHz, CDCl_3).

4.2.1 – Determinação estrutural da substância 02

A substância **02** é um alcalóide do tipo 2-quinolona e foi isolado da fração diclorometânica (EDGHS) proveniente do extrato etanólico dos galhos de *H. superba* e foi identificado através da análise de experimentos de RMN ^1H , HSQC, HMBC, COSY, g-NOESY e também por comparação com dados da literatura (WIJERATNE, *et. al*, 1992).



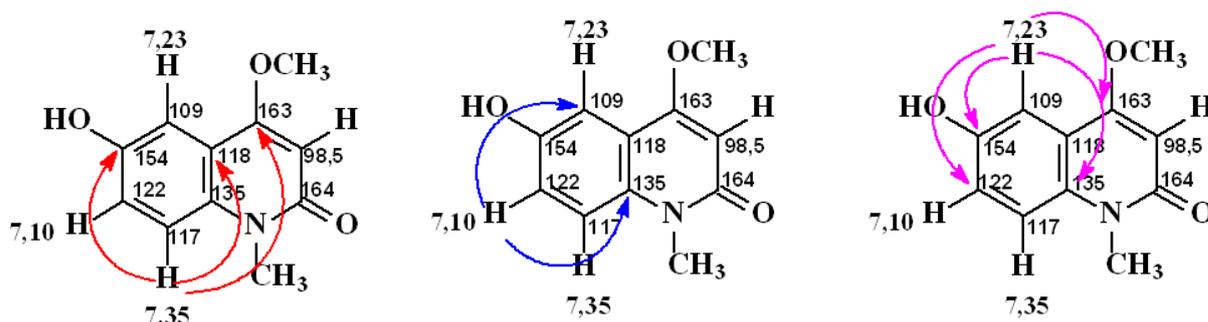
02

O espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.2) de **02** apresenta 3 sinais referentes a hidrogênios aromáticos, um dubleto em δ 7,23 (1H, *d*, $J=3,6$), um duplo dubleto em δ 7,10 (1H, *dd*, $J=8,4$; 3,6) e um dubleto largo em δ 7,35 (1H, *dl*, $J=8,4$), atribuído aos hidrogênios H-5, H-7 e H-8, respectivamente. É observado ainda um singlete em δ 5,98 (1H, *s*), atribuído ao H-3, característico de alcalóides quinolínicos e um singlete largo em δ 9,57, referente a uma hidroxila na estrutura na posição C-6. É ainda possível observar sinais bastante intensos em δ 3,90 (3H, *s*) e δ 3,50 (3H, *s*), os quais confirmam a presença de uma metoxila e de uma metila ligada a um nitrogênio, respectivamente.

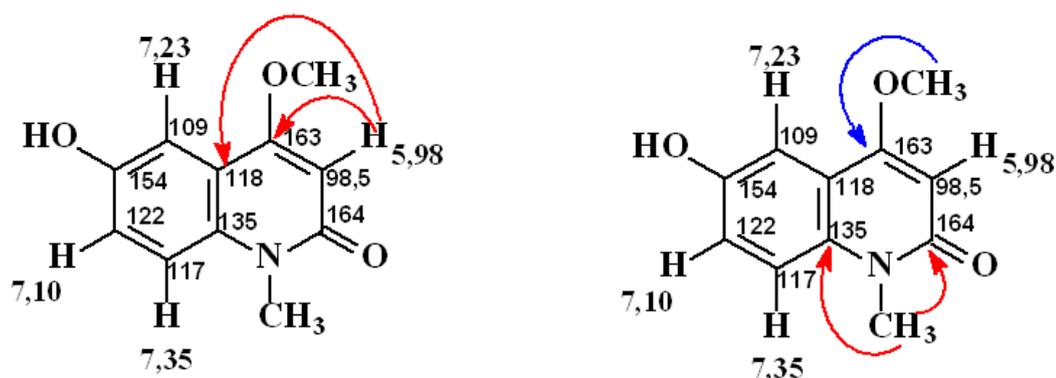
A partir do espectro em 2D de correlação homonuclear de g-COSY (FIGURA 4.4) é observado o acoplamento entre os hidrogênios H-8 (δ 7,35) e H-7 (δ 7,10), confirmando o acoplamento *orto* entre eles.

No espectro de HSQC (FIGURA 4.5) é possível observar a correlação a 1J do sinal em δ 5,98 (H-3) com um sinal em δ 98,5, atribuído ao carbono C-3. Os sinais em δ 7,35, δ 7,23 e δ 7,10 mostram correlação a 1J com os sinais em δ 117,0, δ 109,0 e δ 122,0, respectivamente, referentes aos carbonos C-8, C-5 e C-7. É observado também uma correlação do sinal em δ 3,90 com um sinal em δ 58,0, característico de carbono oximetílico e correlação do sinal em δ 3,50 com um carbono em δ 30,0, confirmando a presença de uma ligação N-Me.

A partir do mapa de correlações do HMBC (FIGURA 4.6) foi possível observar correlações do sinal em δ 7,35 (H-8) a 3J com os sinais em δ 154 e δ 118, os quais foram atribuídos aos carbonos C-6 e C-4a, respectivamente, e uma correlação a 4J com o sinal em δ 163, atribuído ao C-4. Foi observado correlações a 3J do sinal em δ 7,10 (H-7) com o sinal em δ 109 (C-5) e com o sinal em δ 135, atribuído ao carbono C-8a. O sinal em δ 7,23 (H-5) mostra uma correlação a 2J com o sinal em δ 154 (C-6) e correlações a 3J com os sinais em δ 163 (C-4), δ 135 (C-8a) e em δ 122 (C-7).



É possível observar ainda no HMBC correlações do sinal em δ 5,98 (H-3) a 2J com o sinal em δ 163 (C-4) e a 3J com o sinal em δ 118 (C-4a). Já o sinal em δ 3,90 (O-Me) faz uma correlação com o sinal em δ 163 (C-4) e o sinal em δ 3,50 (N-Me) faz correlação com o sinal em δ 135 (C-8a) e com o sinal em δ 164, o qual foi atribuído ao C-2.



Os experimentos de g-NOESY (FIGURA 4.7) confirmam que se trata do alcalóide N-metil-4-metoxi-6-hidroxi-2-quinolona. Quando o sinal dos prótons em δ 3,50 (N-Me) foi irradiado, foi possível observar um incremento no sinal de H-8 (δ

7,35), confirmando a presença da hidroxila na posição C-6, o qual apresenta um acoplamento em *orto* ($J=8.4$ Hz), a hidroxila em C-7 levaria H-8 a mostrar uma acoplamento *meta*, o que não ocorreu. Quando o sinal dos prótons em δ 3,91 (O-Me) foi irradiado, foi possível observar um incremento do sinal de H-3 (δ 7,58), o que vem a confirmar a metoxila em C-4. Com isto a possibilidade da hidroxila estar posicionada em C-7 é descartada. Portanto, a substância **02** foi identificada como sendo a Integriquinolona, primeira vez relatada para o gênero *Hortia*.

TABELA 4.2: Dados de RMN ^1H de **02** e comparação com a literatura.

	SUBSTÂNCIA 02 (400 MHz, DMSO- d_6)	WIJERATNE, <i>et. al</i> , 1992
^1H	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm), J (Hz)
2	-	-
3	5,98 (1H, s)	5,97 (1H, s)
4	-	-
4a	-	-
5	7,23 (1H, <i>d</i> , $J=3,6$)	7,23 (1H, <i>d</i>)
6-OH	9,57 (<i>s</i>)	9,52 (<i>s</i>)
7	7,10 (1H, <i>dd</i> , $J=8,4; 3,6$)	7,10 (1H, <i>dd</i>)
8	7,35 (1H, <i>dl</i> , $J=8,4$)	7,33 (1H, <i>dl</i>)
O-Me	3,90 (3H, s)	3,91 (3H, s)
N-Me	3,50 (3H, s)	3,51 (3H, s)

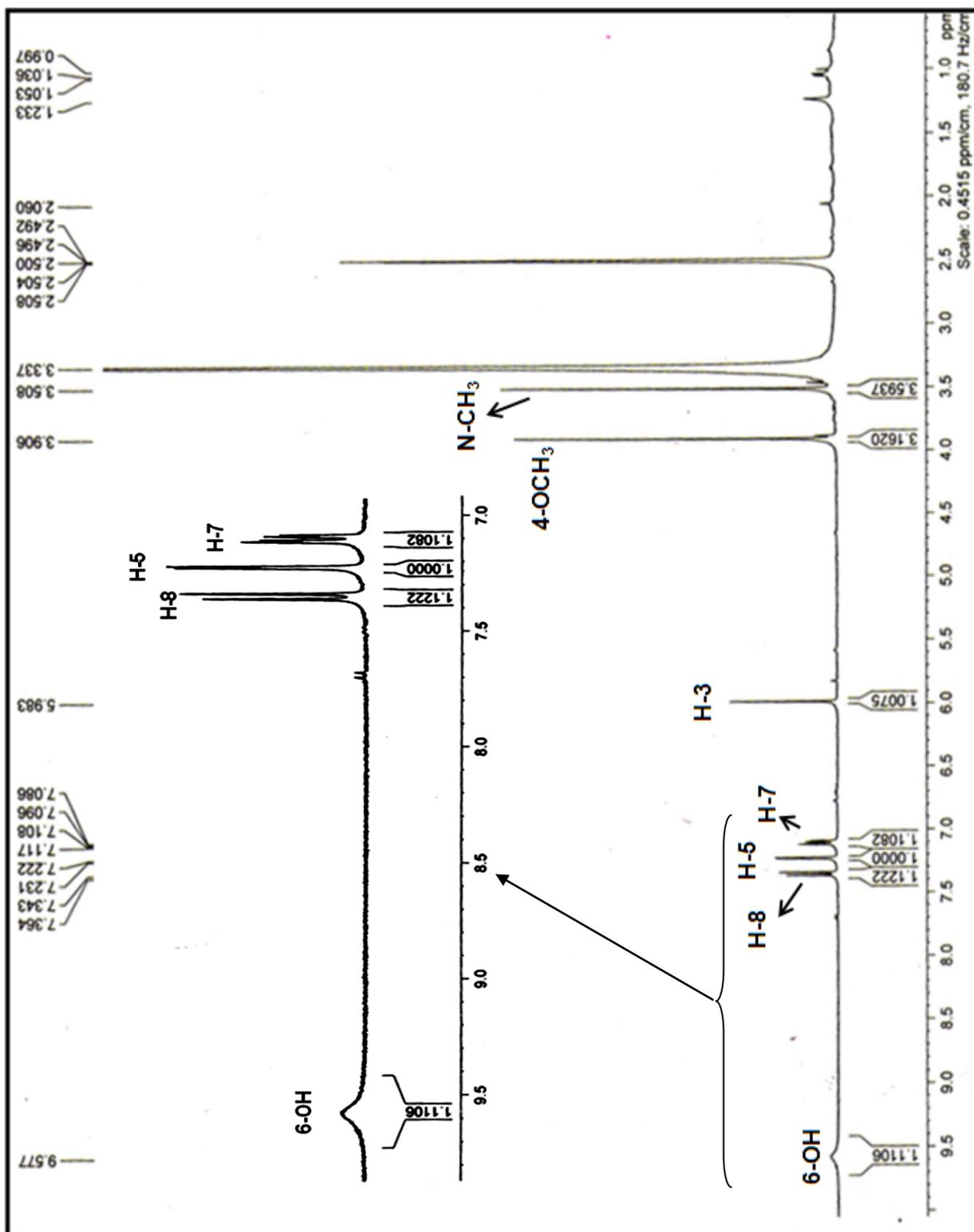


FIGURA 4.3: Espectro de RMN ^1H de **02** (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

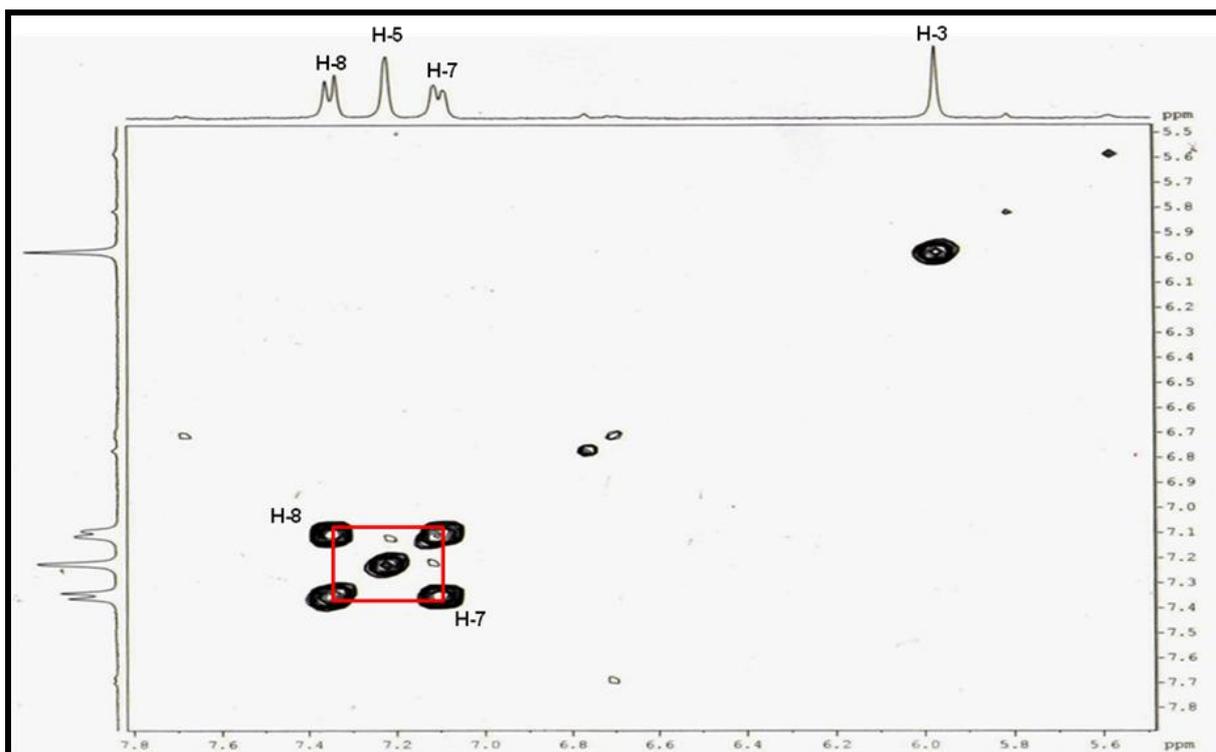


FIGURA 4.4: Expansão de g-COSY de **02** (400 MHz, DMSO- d_6).

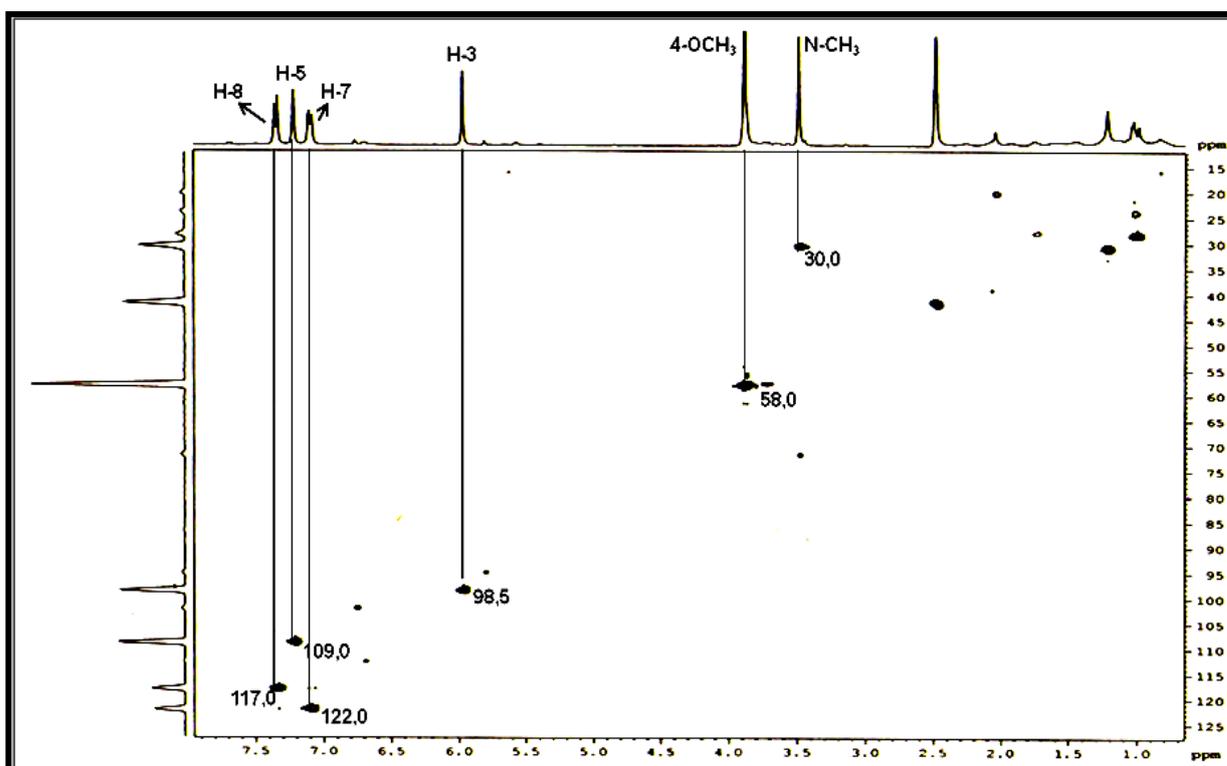


FIGURA 4.5: Mapa de contorno de HSQC de **02** (400 MHz, DMSO- d_6).

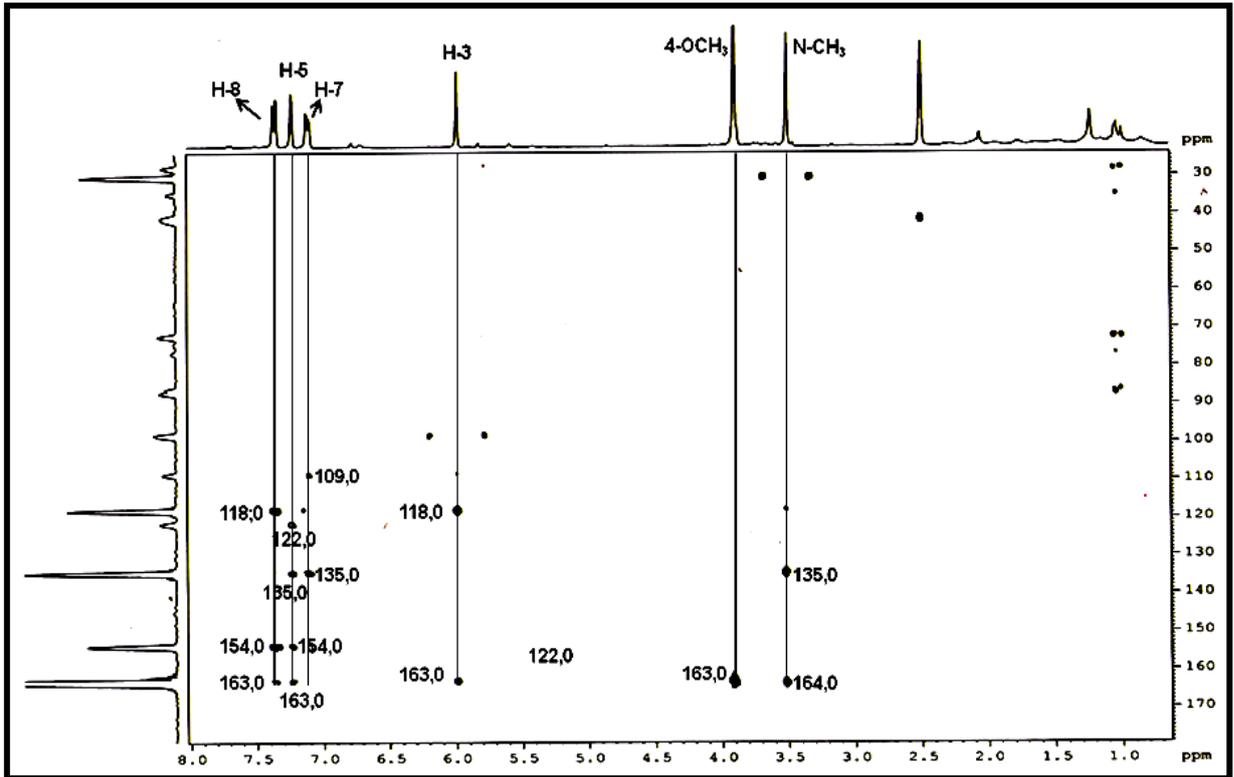


FIGURA 4.6: Mapa de contorno de HMBC de **02** (400 MHz, DMSO- d_6).

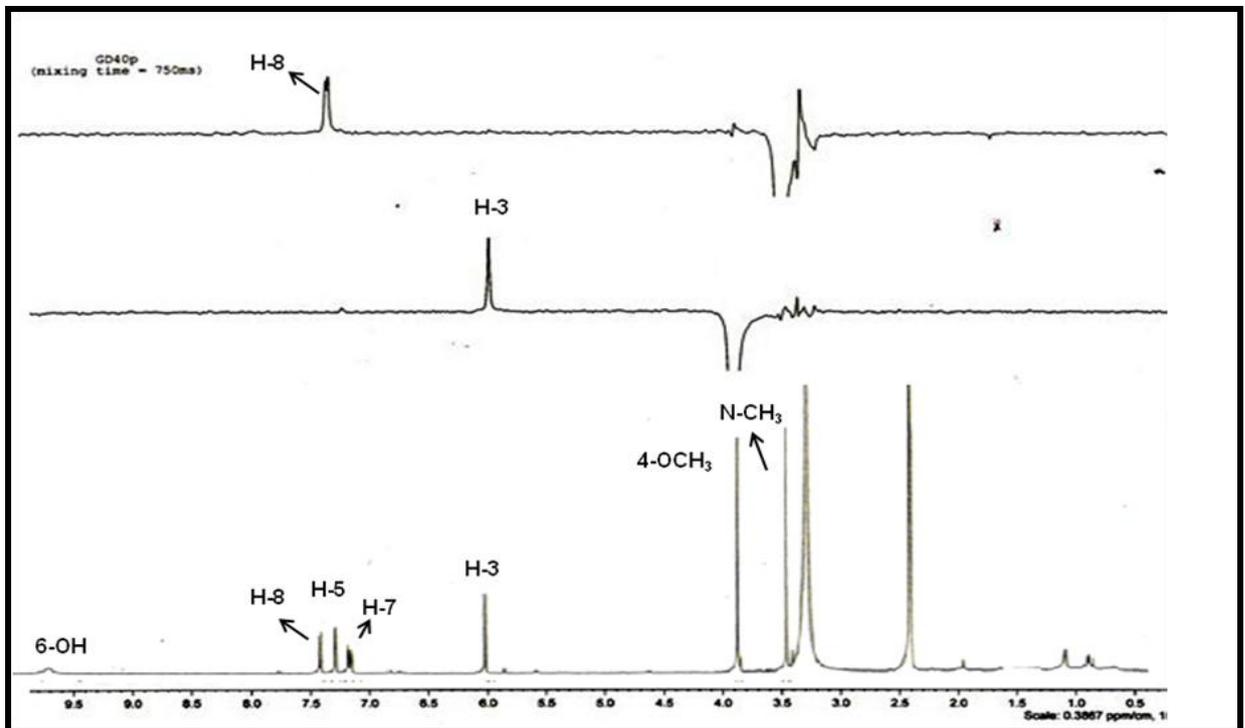
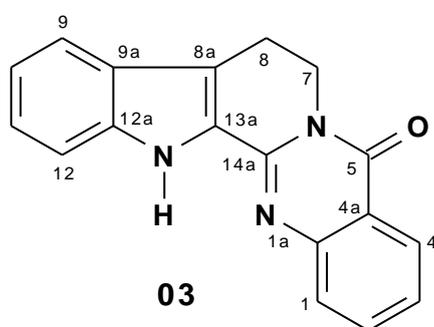


FIGURA 4.7: Espectros de g-NOESY de **02** (400 MHz, DMSO- d_6).

4.2.1- Determinação estrutural da substância 03

A substância **03** é uma alcalóide do tipo β -indolopiridoquinazolínico e foi isolado do subextrato (EHDFHB 2) proveniente do extrato EHDFHB resultante da reunião dos extratos hexânico e diclorometânico das folhas de *H. oreadica* e teve sua estrutura identificada com base em espectros de RMN de ^1H , g-COSY e por comparação com dados da literatura (IKUTA *et al.*, 1998). No entanto, por esta substância ter sido isolada em pequena quantidade, houve dificuldade para se realizar outros experimentos, no entanto por ser uma substância comum no gênero *Hortia* foi de fácil identificação.



O espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.8) de **03** mostrou dois tripletos em δ 3,24 (2H, *t*, $J=7,0$ Hz) e em δ 4,59 (2H, *t*, $J=7,0$ Hz) relativos aos hidrogênios H-8 e H-7, respectivamente, os quais são sinais característicos para alcalóides do tipo β -indolopiridoquinazolínico, e assim estes sinais levaram a sugerir a presença de uma possível estrutura da rutaecarpina. Foi observada na região mais desblindada do espectro, a partir dos valores das integrais, a presença de 8 hidrogênios aromáticos na região entre δ 8,32 a δ 7,19. Em δ 9,12 (s) foi observado o sinal relativo à H-13 ligado ao nitrogênio. Os hidrogênios aromáticos puderam ser atribuídos através da análise conjunta entre RMN ^1H e COSY e a partir da comparação com a literatura.

É possível observar no espectro de RMN ^1H um dubleto em δ 8,32 (1H, *d*, $J=8,0$), atribuído à H-4, o qual acopla com constantes *orto*, *meta* e *para* com H-3, H-2 e H-1, respectivamente. Analisando o espectro de g-COSY (FIGURA 4.9), H-4 mostra correlação com um sinal em δ 7,46 (1H, *m*) atribuído à H-3, o qual apresenta no espectro de RMN ^1H um multiplete referente aos acoplamentos em *orto* com H-2 e H-4 e em *meta* com H-1. O sinal atribuído ao H-3 (δ 7,46) mostra correlação no espectro de g-COSY com um sinal em δ 7,73 (1H, *m*) atribuído ao H-2,

um multiplete que apresenta acoplamento *orto* com H-1 e H-3 e *meta* com H-4. Também foi observado no g-COSY uma correlação do H-2 com um sinal em δ 7,65 (2H, *m*) o qual integra para dois hidrogênios, atribuídos aos hidrogênios H-1 e H-9, este multiplete no RMN ^1H é referente aos acoplamentos em *orto*, *meta* e *para* de H-1 com H-2, H-3 e H-4, respectivamente, e aos acoplamentos de H-9 em *orto*, *meta* e *para* com os hidrogênios H-10, H-11 e H-12, respectivamente.

O multiplete atribuído aos hidrogênios H-1 e H-9 mostrou no g-COSY uma correlação com um sinal em δ 7,19 (1H, *m*) atribuído à H-10, o qual mostra no RMN ^1H um multiplete referente aos acoplamentos em *orto* com H-9 e H-11, e em *meta* com H-12. É observado também uma correlação do H-10 com um sinal em δ 7,36 (1H, *m*) referente ao hidrogênio H-11, o qual apresenta no RMN ^1H um multiplete referente ao acoplamento em *orto* com H-10 e H-12 e em *meta* com H-9. Observou-se também no espectro de g-COSY uma correlação do H-11 com um sinal em δ 7,43 (1H, *m*) atribuído ao hidrogênio H-12, o qual no RMN ^1H apresenta um multiplete o qual acopla com constantes *orto*, *meta* e *para* com H-11, H-10 e H-9, respectivamente.

O espectro de g-COSY (FIGURA 4.11) mostra ainda correlação entre os hidrogênios em δ 3,24 e δ 4,59, sendo atribuídos aos hidrogênios H-8 e H-7, respectivamente. A análise dos espectros de RMN ^1H e g-COSY da substância **03** mostra que a estrutura em questão é a Rutaecarpina.

TABELA 4.3: Dados de RMN ^1H de **03** e comparação com a literatura.

^1H	SUBSTÂNCIA 03	IKUTA, 1998
	(400 MHz, CDCl_3)	(500 MHz, CDCl_3)
	δ (ppm), <i>J</i> (Hz)	δ (ppm), <i>J</i> (Hz)
1	7,65 (<i>m</i>)	7,66
1a	-	-
2	7,73 (<i>m</i>)	7,72
3	7,46 (<i>m</i>)	7,43
4	8,32 (<i>d</i>)	8,32
4a	-	-
5	-	-
7	4,59 (<i>t</i> , $J=7,0$)	4,59 (2H, <i>t</i> , $J=7,0$)
8	3,26 (<i>t</i> , $J=7,0$)	3,24 (2H, <i>t</i> , $J=7,0$)
8a	-	-
9	7,65 (<i>m</i>)	7,65
9a	-	-
10	7,19 (<i>m</i>)	7,18
11	7,36 (<i>m</i>)	7,33
12	7,43 (<i>m</i>)	7,42
12a	-	-
13	9,12 (<i>s</i>)	9,15 (<i>s</i>)
13a	-	-
14a	-	-

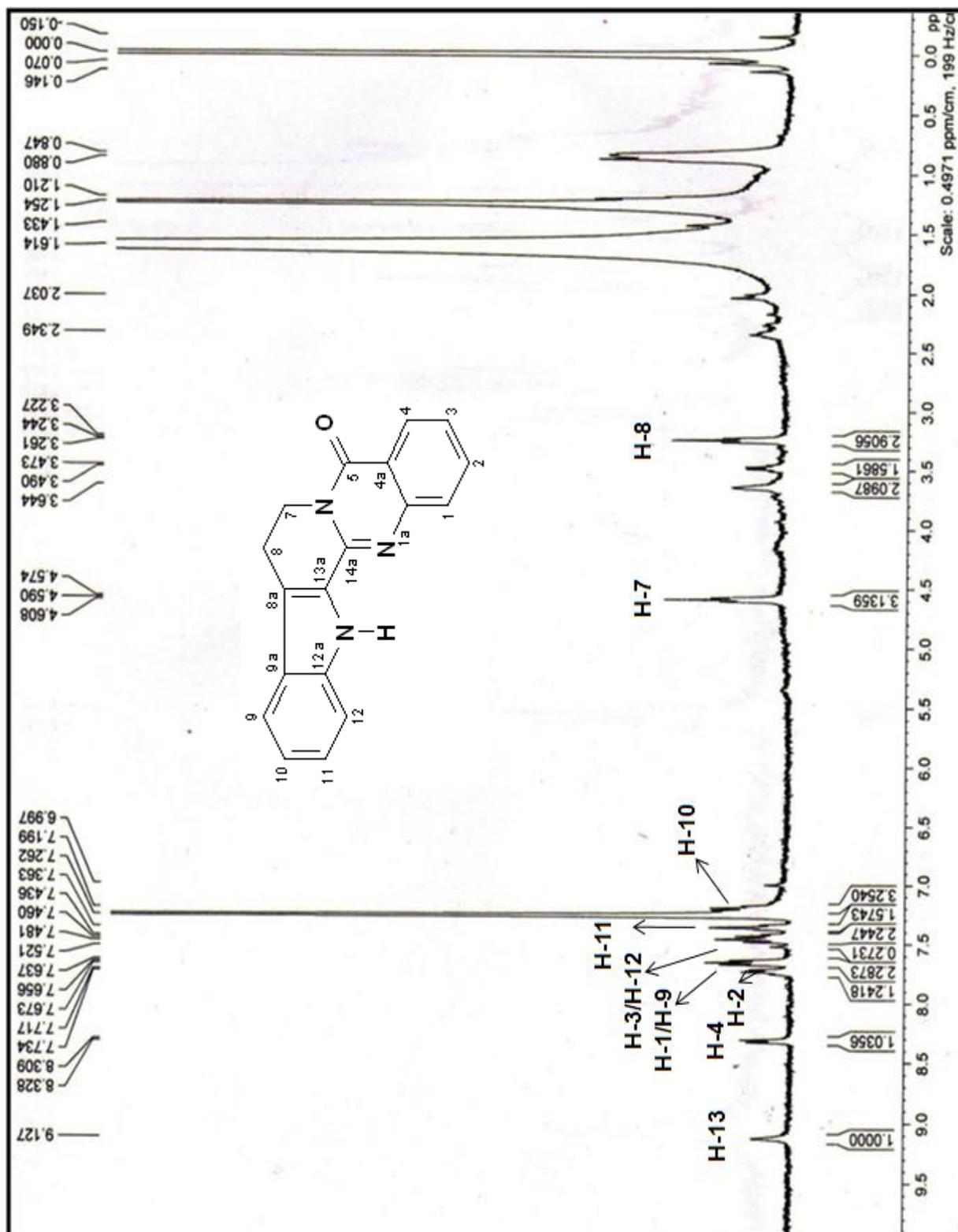


FIGURA 4.8: Espectro de RMN ^1H de **03** (400 MHz, CDCl_3).

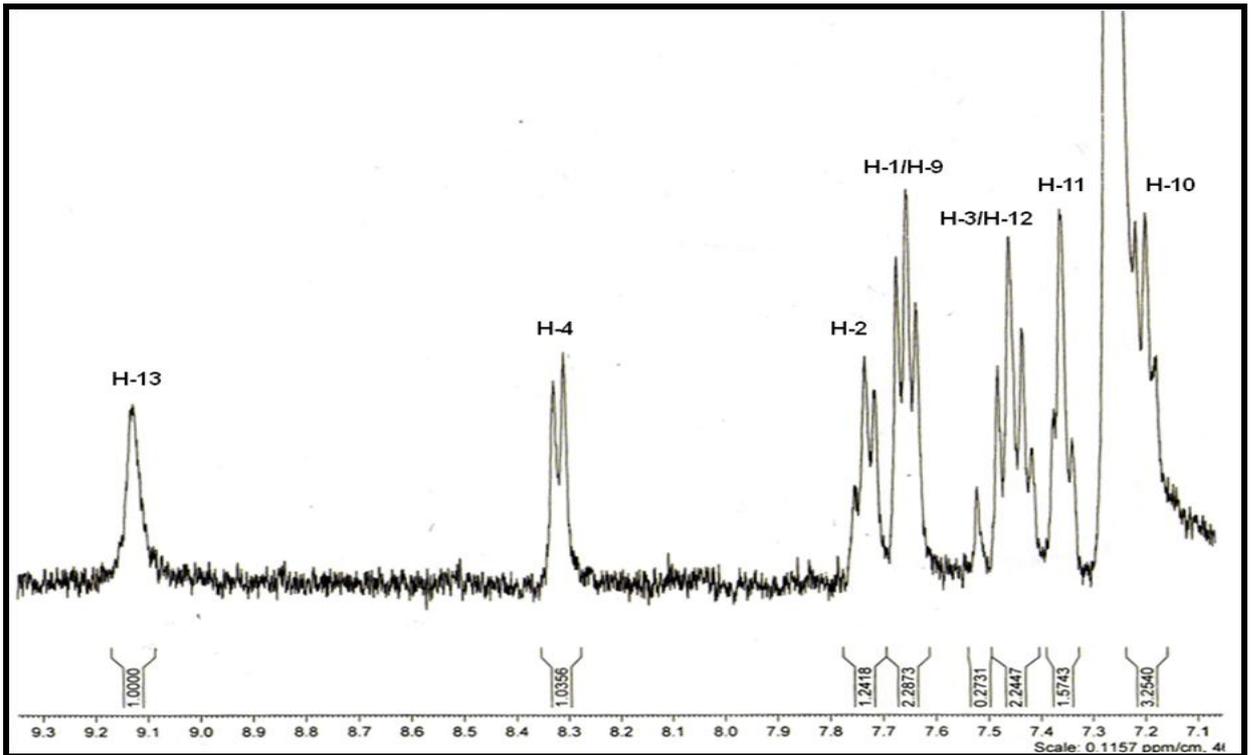


FIGURA 4.9: Ampliação da região δ 9,3 a 7,1 do espectro de RMN ^1H da substância **03**.

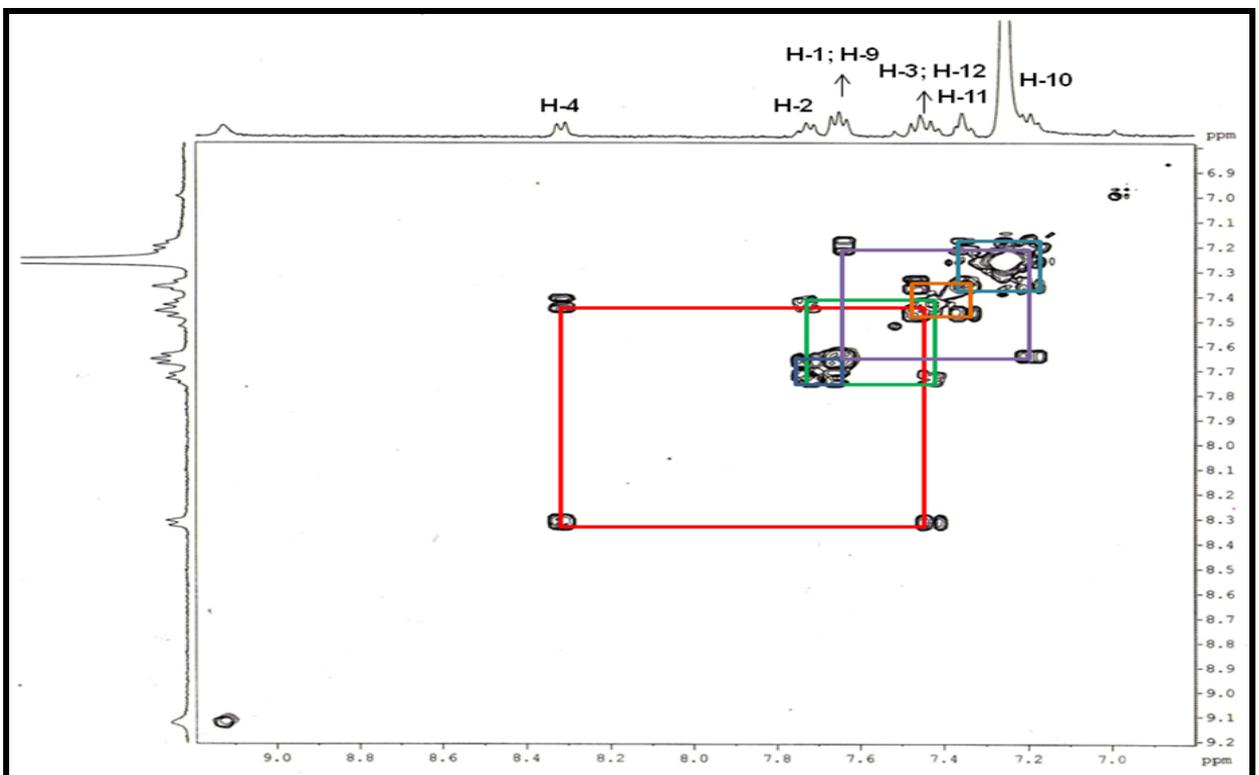


FIGURA 4.10: Ampliação do espectro de COSY na região de δ 9,5 a 7,0 de **03**.

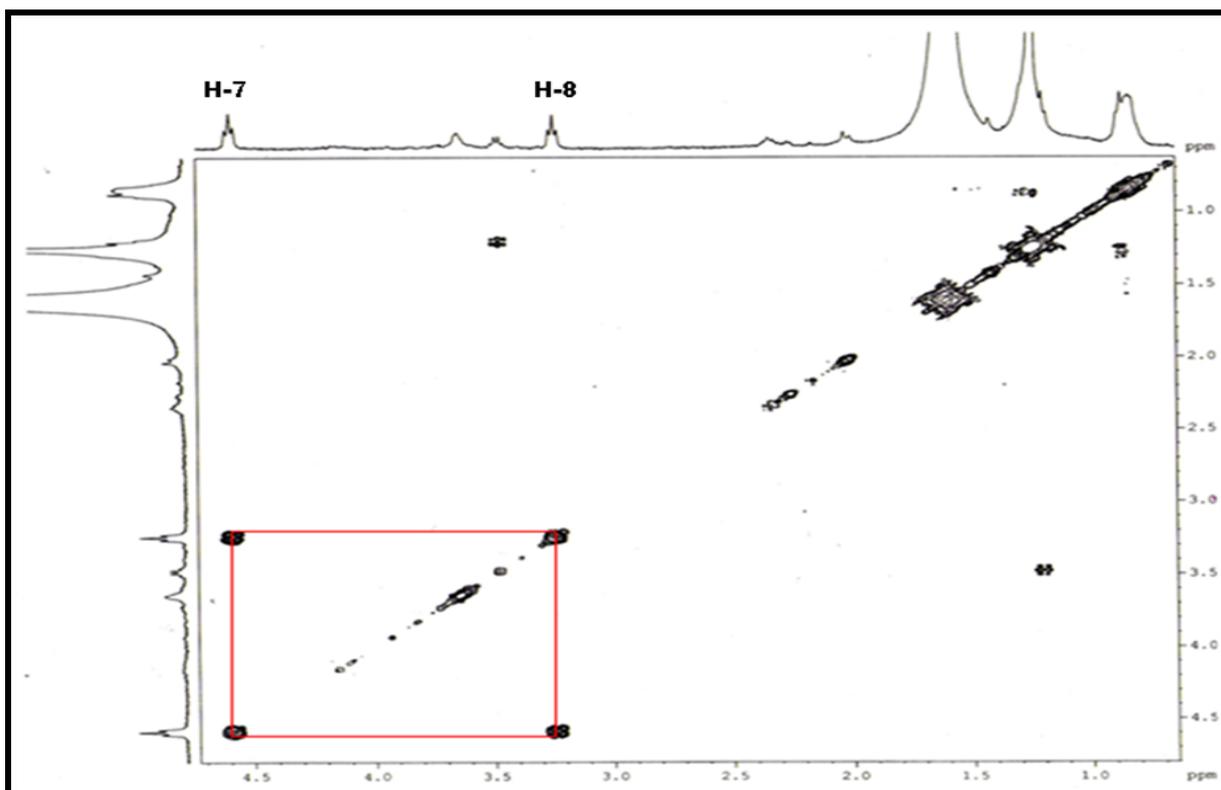
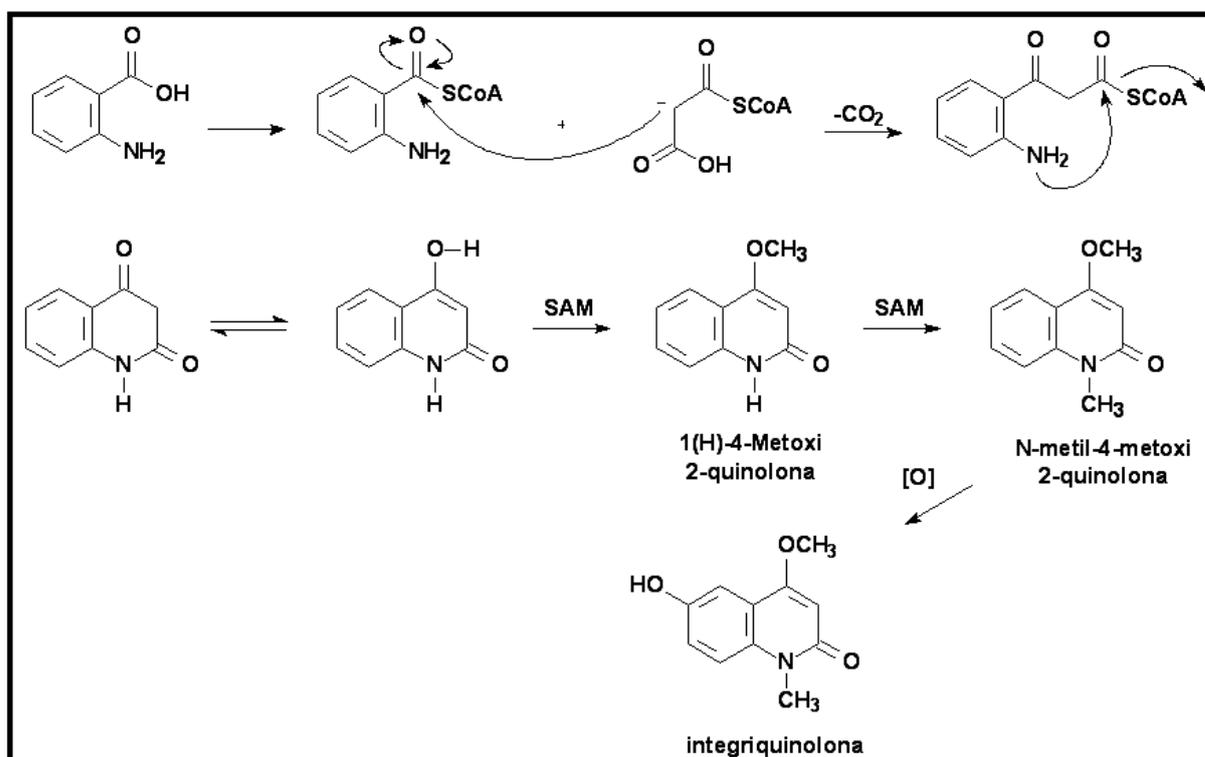


FIGURA 4.11: Ampliação do espectro de COSY na região de δ 4,8 a 1,0 de **03**.

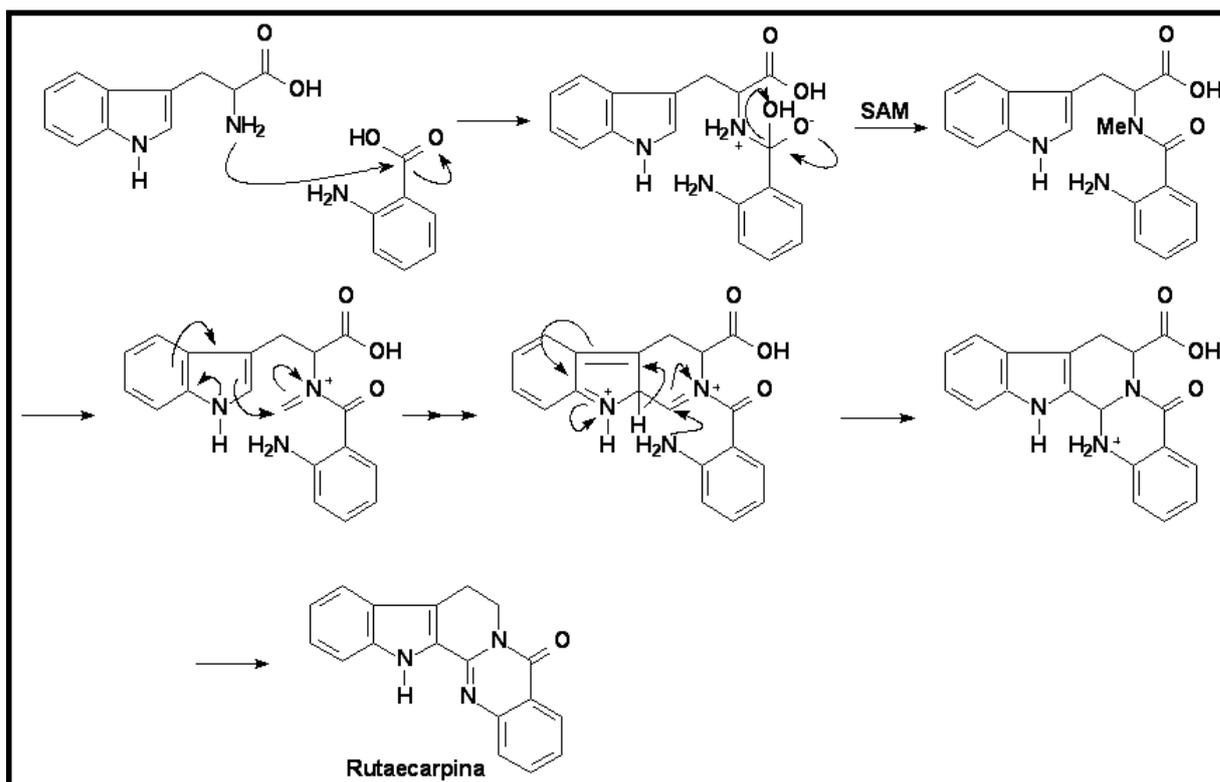
4.2.3 - Biogênese dos Alcalóides

Os alcalóides derivados do ácido antranílico são formados através da combinação do ácido antranílico com uma unidade de malonil-CoA, levando a formação do sistema heterocíclico (DEWICK, 2002). A posterior O- e N-metilações levam à formação do alcalóide N-metil-4-metoxi-2-quinolona (**01**) e a posterior oxidação em C-6 à formação da integriquinolona (**02**), como mostra o ESQUEMA 4.1.



ESQUEMA 4.1: Proposta biogénica para as substâncias **01** e **02**.

Os alcalóides β-indolopiridoquinazolínicos têm origem biossintética mista através da combinação do ácido antranílico e do triptofano. Estes alcalóides são comuns na família Rutaceae, restritos a alguns poucos gêneros, no entanto com relatos atuais em *Taxus chinensis* (Taxaceae) e *Winchia calophylla* (Apocynaceae) (JANUÁRIO *et al.*, 2009). A proposta biogénica para esses alcalóides, como a rutaecarpina (**03**) está descrita no ESQUEMA 4.2.



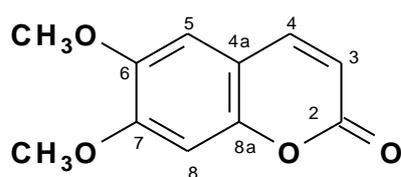
ESQUEMA 4.2: Proposta biogénica para a substância **03**.

4.3 - Cumarinas

Cumarinas são amplamente distribuídas nas plantas, especialmente em Apiaceae e Rutaceae. Em Rutaceae as cumarinas têm sido isoladas de várias partes vegetais. A maior característica na diversificação de cumarinas tanto em Rutaceae quanto em Apiaceae está na incorporação de grupamentos prenilas nos esqueletos (GRAY *et al.*, 1978). Várias cumarinas têm sido isoladas do gênero *Hortia*, tais como cumarinas simples (TABELA 1.5, p.11) e furano e pirano cumarinas angulares e lineares (TABELA 1.5, p.11-13). Neste estudo foram isoladas e identificadas 6 cumarinas sendo 1 simples (escoparona) e 5 furanocumarinas lineares (xantotoxina, isopimpenilina, 5-cloro-8-metoxi-furanocumarina, prangol e heraclenol). Dentre as cumarinas isoladas de espécies de *Hortia* trabalhadas neste projeto, a escoparona e a xantotoxina são descritas pela primeira vez para a espécie *H. superba* e a isopimpenilina é relatada pela primeira vez no gênero *Hortia*. Com isso, apenas a 5-cloro-8-metoxi-furanocumarina é descrita pela primeira vez na literatura, porém por não se tratar de um metabólito comum em plantas, devido a presença de um cloro na estrutura, nos levou a supor a hipótese deste metabólito ser resultante de uma provável interação de algum microrganismo com a planta em estudo, como por exemplo, interação com líquens ou fungos.

4.3.1- Determinação estrutural da substância 04

A substância **04** é uma cumarina simples e foi isolada da fração hexânica (EHGHS) proveniente do extrato EtOH dos galhos de *H. superba* e teve sua estrutura determinada através de experimento de RMN ^1H e através da comparação com dados da literatura (MAFEZOLI, 2001).



04

A partir do espectro de RMN ^1H de **04** (FIGURA 4.12), pode-se observar que a estrutura é uma cumarina devido aos sinais característicos referentes aos hidrogênios H-4 e H-3 do anel lactônico, em δ 7,60 (1H, *d*, $J=9,4$ Hz) e δ 6,27 (1H, *d*, $J=9,4$ Hz), respectivamente, onde o H-4 apresentou-se mais desblindado que o H-3 devido o efeito de ressonância, o qual proporciona uma deficiência eletrônica sobre o carbono a que este hidrogênio está ligado. Observou-se sinais bastante intenso em δ 3,94 (3H, *s*) e δ 3,91 (3H, *s*), característicos de grupos metoxilas na estrutura. Na região de aromáticos, foram observados sinais em δ 6,84 (1H, *s*) e δ 6,83 (1H, *s*) os quais foram atribuídos aos hidrogênios H-5 e H-8, respectivamente. As posições das metoxilas foram atribuídas com base na origem biossintética das cumarinas, que apresentam oxidações em C-7, e assim baseado nos sinais dos hidrogênios aromáticos e a ausência de acoplamentos entre eles, atribuiu-se os sinais em δ 3,94 e δ 3,91 à metoxilas nas posições C-6 e C-7, respectivamente. Além disso, as cumarinas que apresentam substituintes oxigenados na posição C-5, o valor de deslocamento químico de H-4 é bastante desblindado, devido ao efeito anisotrópico da presença da ligação C-O. Assim, a estrutura **04** foi identificada como 6,7 dimetoxicumarina (Escoparona).

TABELA 4.4: Dados de RMN ^1H de **04** e comparação com a literatura.

^1H	SUBSTÂNCIA 04	MAFEZOLI, 2001
	(200 MHz, CDCl_3)	(400 MHz, CDCl_3)
	δ (ppm), <i>J</i> (Hz)	δ (ppm), <i>J</i> (Hz)
2	-	-
3	6,27 (1H, <i>d</i> , $J=9,4$)	6,30 (1H, <i>d</i> , $J=9,5$)
4	7,60 (1H, <i>d</i> , $J=9,4$)	7,63 (1H, <i>d</i> , $J=9,5$)
4a	-	-
5	6,84 (1H, <i>s</i>)	6,86 (1H, <i>s</i>)
6	-	-
7	-	-
8a	-	-
8	6,83 (1H, <i>s</i>)	6,85 (1H, <i>s</i>)
6 -OMe	3,94 (3H, <i>s</i>)	3,96 (3H, <i>s</i>)
7-OMe	3,91 (3H, <i>s</i>)	3,93 (3H, <i>s</i>)

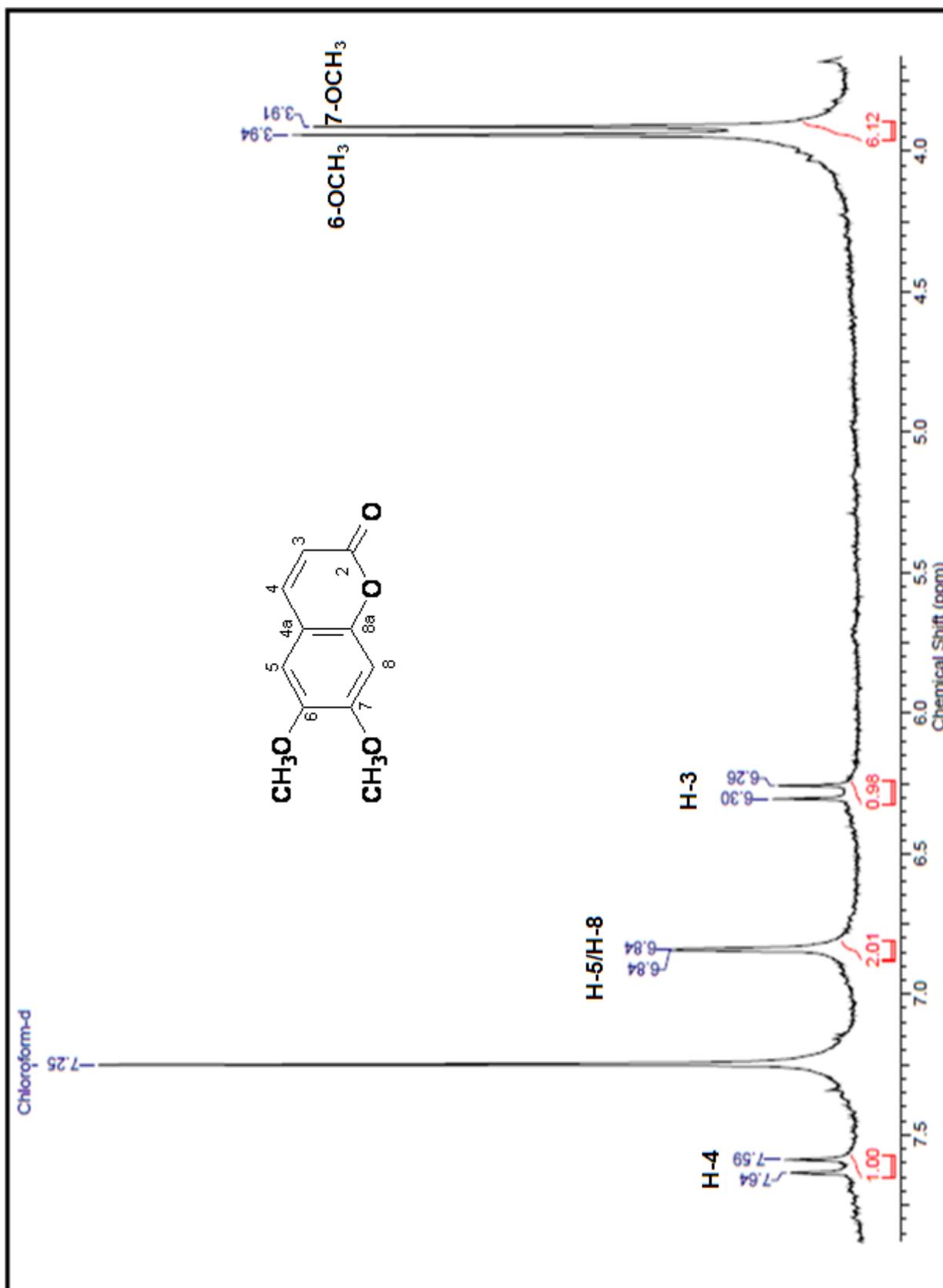
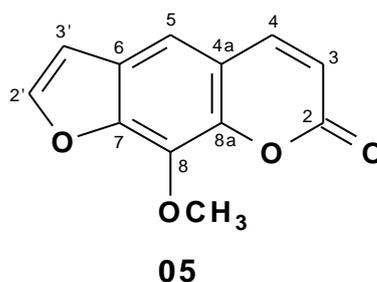


FIGURA 4.12: Espectro de RMN ^1H de **04** (200 MHz, CDCl_3).

4.3.2 - Determinação estrutural da substância 05

A substância **05** foi isolada da fração hexânica (EHGHS) proveniente do extrato EtOH dos galhos de *H. superba* e teve sua estrutura determinada com base no espectro de RMN ^1H e também por comparação com dados da literatura (MASUDA, 1997).



Analisando o espectro de RMN ^1H de **05** (FIGURA 4.14), observou-se sinais relativos aos hidrogênios do anel lactônico, característicos do esqueleto cumarínico, em δ 7,75 (1H, *d*, $J=9,6$ Hz) e δ 6,37 (1H, *d*, $J=9,6$ Hz), referentes aos hidrogênios H-4 e H-3, respectivamente. A presença de anel furânico é evidenciada pelos sinais característicos em δ 7,68 (1H, *d*, $J=2,2$ Hz) e δ 6,81 (1H, *d*, $J=2,2$ Hz) atribuídos aos hidrogênios H-2' e H-3', respectivamente, o qual sugere a presença de uma furanocumarina. O sinal em δ 4,29 mostra a presença de uma metoxila na estrutura. Os deslocamentos químicos dos grupos metoxilas quando maiores que δ 4,15 indicam linearidade nas furanocumarinas e quando menores que δ 4,15 caracterizam furanocumarinas angulares (MURRAY, *et. al.*, 1984).

O deslocamento químico de H-4 em δ 7,76 sugere que a posição C-5 não esteja substituída, o que permite posicionar a metoxila em C-8. Desta forma, o sinal observado em δ 7,34 (1H, *s*) foi atribuído ao H-5. Além disso, a presença de hidrogênio na posição 8 poderia mostrar acoplamentos a longa distância entre os hidrogênios H-4, H-3' e H-8.

A análise dos experimentos de RMN ^1H e os dados obtidos na literatura permitiu atribuir a estrutura **05** à cumarina, 8-metoxi-furanocumarina (Xantotoxina).

TABELA 4.5: Dados de RMN ^1H de **05** e comparação com a literatura.

^1H	SUBSTÂNCIA 05	MASUDA, 1997
	(200 MHz, CDCl_3)	CDCl_3
	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm), J (Hz)
2	-	-
3	6,37 (1H, <i>d</i> , $J=9,6$)	6,37 (1H, <i>d</i> , $J=9,3$)
4	7,75 (1H, <i>d</i> , $J=9,6$)	7,77 (1H, <i>d</i> , $J=9,3$)
4a	-	-
5	7,34 (1H, <i>s</i>)	7,36 (1H, <i>s</i>)
6	-	-
7	-	-
8	-	-
8a	-	-
2'	7,68 (1H, <i>d</i> , $J=2,2$)	7,70 (1H, <i>d</i> , $J=2,4$)
3'	6,81 (1H, <i>d</i> , $J=2,2$)	6,83 (1H, <i>d</i> , $J=2,4$)
8-OMe	4,29 (3H, <i>s</i>)	4,30 (3H, <i>s</i>)

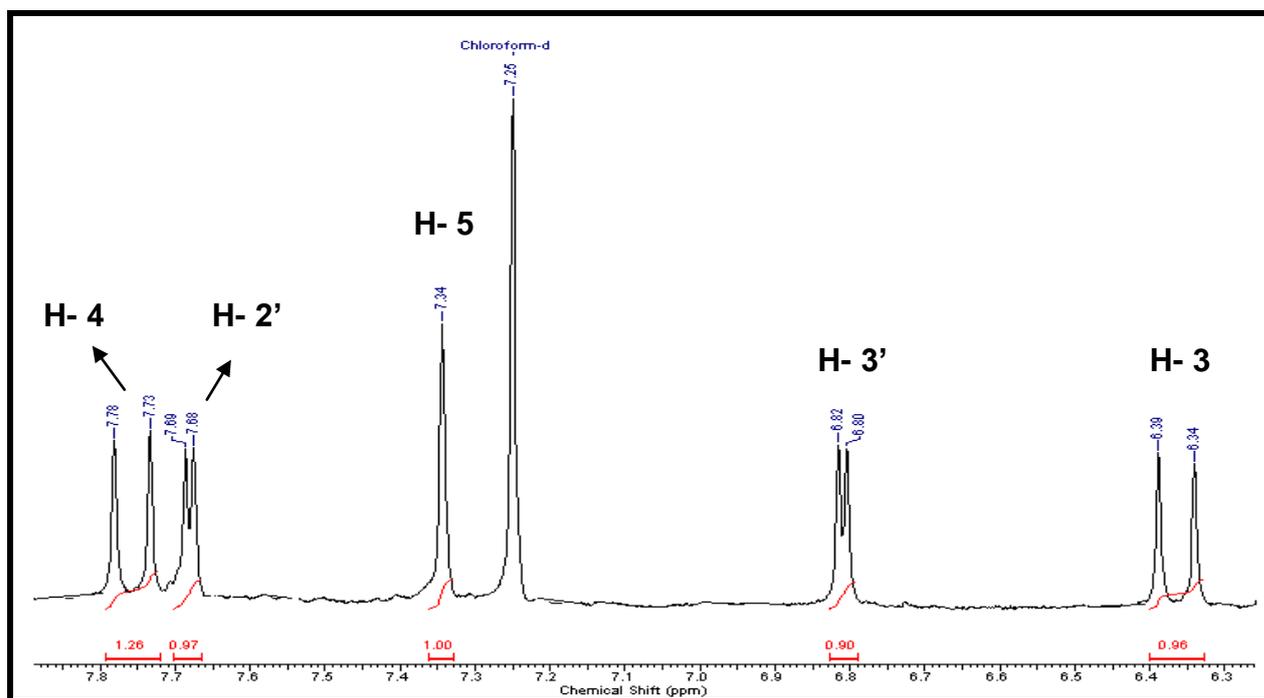


FIGURA 4.13: Ampliação da região δ 7,80 a δ 6,3 do espectro de RMN ^1H de **05**.

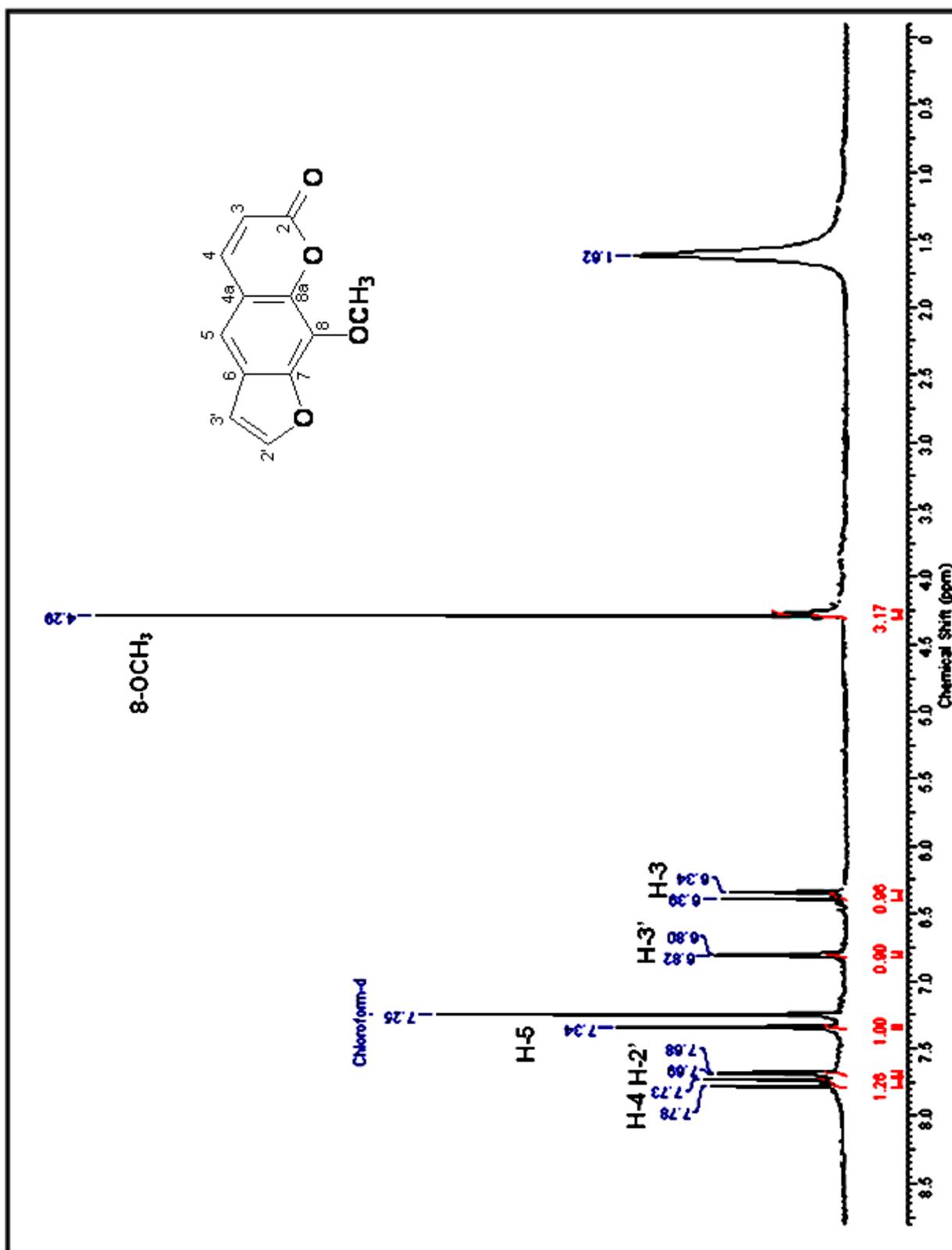
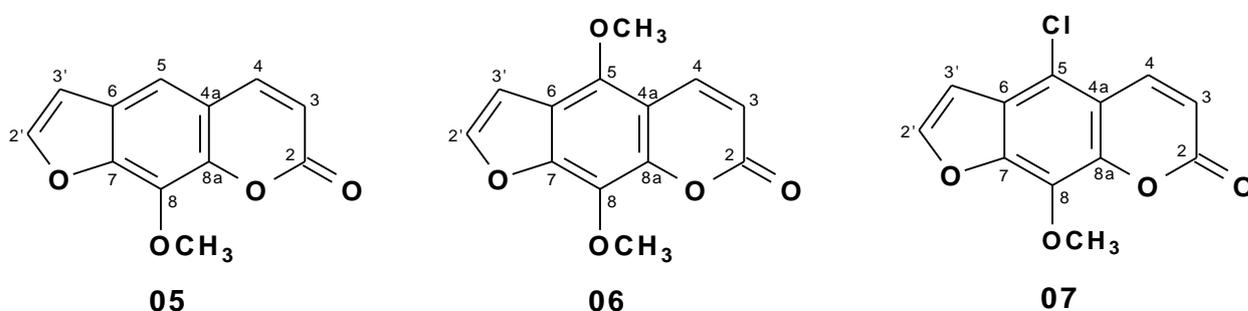


FIGURA 4.14: Espectro de RMN ^1H de **05** (200 MHz, CDCl_3).

4.3.3 - Determinação estrutural das substâncias 05, 06 e 07

As substâncias **05**, **06** e **07** foram obtidas em mistura a partir da fração hexânica (EHGHS) proveniente do extrato EtOH dos galhos de *H. superba*. A mistura não foi submetida a um refractionamento em busca da separação destas substâncias, pois havia uma pequena quantidade de massa, e além disso, elas se encontravam de fácil identificação, sendo que 2 delas já se encontram descritas na literatura. As substâncias tiveram suas estruturas identificadas com base em experimentos de RMN ^1H , *g*-NOESY, CG-MS e ESI/MS e também por comparação com dados da literatura (MASUDA, 1997; MÜLLER, 1994).



Analisando o espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.15), observou-se vários sinais de dubletos, característicos de hidrogênios de esqueleto cumarínico. A partir da quantidade de sinais e suas respectivas integrações, foi verificada a presença de três estruturas de cumarinas. E assim a partir de dados comparativos com a literatura, foi possível a identificação de cada substância presente na mistura. Desta forma, o espectro apresentou sinais referentes aos hidrogênios do anel lactônico dos esqueletos cumarínicos, em δ 7,76 (1H, *d*, $J=9,6$ Hz) e δ 6,37 (1H, *d*, $J=9,6$ Hz) atribuídos aos H-4 e H-3, respectivamente, de **05**, em δ 8,12 (1H, *d*, $J=9,8$ Hz) referente ao H-4 e em δ 6,32 (1H, *d*, $J=9,8$ Hz) referente ao H-3, ambos de **06**, e sinais em δ 8,11 (1H, *d*, $J=9,8$ Hz) e δ 6,29 (1H, *d*, $J=9,8$ Hz) atribuídos aos hidrogênios H-4 e H-3 de **07**, respectivamente.

Os sinais característicos do anel furânico são observados em δ 7,69 (1H, *d*, $J=2,3$) e δ 6,81 (1H, *d*, $J=2,3$) para **05**, em δ 7,62 (1H, *d*, $J=2,3$) e δ 6,99 (1H, *d*, $J=2,3$) para **06** e em δ 7,70 (1H, *d*, $J=2,2$) e δ 6,92 (1H, *d*, $J=2,2$) para **07**, referentes aos hidrogênios H-2' e H-3', respectivamente. Ainda é possível observar

no espectro de RMN ^1H sinais referentes a metilas ligadas a heteroátomos, os quais são observados em δ 4,29 (3H, s), verificando a presença de uma metoxila em **07**, em δ 4,16 (6H, s), confirmando a presença de duas metoxilas em **06** e em δ 4,27 (3H, s) referente a presença de uma metoxila em **05**.

A substância **05** também apresentou no espectro de RMN ^1H um singlete em δ 7,34 relativo ao hidrogênio aromático atribuído à H-5, pois caso a metoxila estivesse em C-5, esta tornaria o sinal de H-4 mais desblindado, confirmando assim a posição da metoxila de **05** em C-8. A substância **05** foi identificada como a xantotoxina, através de comparação dos dados de RMN ^1H desta substância, juntamente com os dados encontrados na literatura, que estão ilustrados na TABELA 4.6 e também a partir da análise por CG/EM, onde o pico referente ao íon molecular em m/z 216 (FIGURA 4.20) que conferiu com a sua fórmula molecular. No ESQUEMA 4.3 foi apresentada uma proposta de fragmentação desta substância.

Vale ressaltar que, analisando os dados de RMN ^1H para **06**, observa-se que as metoxilas encontram-se nas posições C-5 e C-8, pois segundo a literatura (MÜLLER, 1994), através dos valores de deslocamentos químicos dos grupos metoxílicos, esta substância pode ser facilmente distinguida do seu isômero (angular) a partir dos dados de RMN ^1H , pois no caso do isômero linear são coincidentes e maiores que 4,15 ppm, enquanto no isômero angular são diferentes e menores que 4,15 ppm. Assim, a estrutura da substância **06** foi identificada como sendo a cumarina isopimpenilina, sendo confirmada através da análise da fragmentação (ESQUEMA 4.4) por CG/EM (FIGURA 14.21) onde o pico referente ao íon molecular foi em m/z 246 e por comparação com os dados da literatura e seus dados de RMN ^1H , que estão listados na TABELA 4.7.

A substância **07**, inicialmente, gerou bastante dúvidas analisando apenas os dados de RMN ^1H (TABELA 4.8) devido a ausência de sinais para hidrogênios aromáticos, e a presença de apenas uma metoxila, e assim inicialmente sugeriu-se a presença de uma hidroxila na posição C-5, já que a mesma poderia não apresentar sinal no espectro de RMN ^1H . Para verificar a estrutura de **07** foi realizado um experimento de CG/MS (FIGURA 4.22) para observar a massa relativa e conferir sua fórmula molecular a partir da análise de fragmentação (ESQUEMA 4.5), no entanto, a estrutura **07** apresentou um pico referente ao íon molecular em m/z 250, o qual não entrava em acordo com a estrutura sugerida com a presença de

uma hidroxila na estrutura, e apresentava picos (M+2) bastante intenso de aproximadamente 30% dos picos relativos às massas dos fragmentos, e assim sugeriu-se a presença de um cloro na estrutura.

A desblindagem do hidrogênio H-4 (8,15) de **07** poderia estar relacionada tanto com a presença de uma metoxila na posição C-5 ou mesmo do cloro, e assim houve a necessidade da realização do experimento de g-NOESY, para confirmar a estrutura. Quando o sinal dos prótons em δ 4,29 (O-Me) foi irradiado, não foi observado nenhum incremento no sinal de H-4, confirmando a posição da metoxila em C-8. Observou-se também que quando o sinal de H-4 foi irradiado, não houve nenhum incremento do sinal de O-Me, o que confirmou a presença do cloro na posição C-5. Os experimentos de g-NOESY (FIGURA 4.23) confirma que a estrutura trata-se da 5-cloro-8-metoxi-furanocumarina.

Por se tratar de um metabólito não comum em plantas, houve a necessidade de se confirmar a presença de cloro mais precisamente, e assim foi obtido o espectro de massas por ESI positivo (FIGURA 4.19) da mistura monitorando o pico referente à m/z 251,5 $[M+H]^+$ e obtendo-se a simulação do padrão isotópico do mesmo, e assim é observado no espectro um pico referente ao isótopo $[M+2]$, o qual apresentou uma abundância em torno de 30%, comprovando ser uma estrutura clorada. É possível observar ainda no espectro obtido por ESI, a presença das moléculas protonadas com $m/z = 247,5 [M+H]^+$ referente à isopimpenilina (**06**), m/z 258,5 $[M+H+ACN]^+$, o qual possivelmente é relativo ao aduto formado durante a protonação da estrutura **05**. A estrutura (**07**) deve ser um metabólito proveniente da interação com microrganismos, ou de líquens. Com isso, esta substância foi identificada como 5-cloro-8-metoxi-furanocumarina, primeira vez relatada na literatura como um metabólito proveniente de planta.

TABELA 4.6: Dados de RMN ^1H de **05** presente na **mistura** e comparação com a literatura.

	SUBSTÂNCIA 05 (400 MHz, CDCl_3)	MASUDA, 1998 CDCl_3
^1H	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm), J (Hz)
3	6,37 (1H, <i>d</i> , $J=9,6$)	6,37 (1H, <i>d</i> , $J=9,3$)
4	7,76 (1H, <i>d</i> , $J=9,6$)	7,77 (1H, <i>d</i> , $J=9,3$)
5	7,34 (1H, <i>s</i>)	7,36 (1H, <i>s</i>)
2'	7,69 (1H, <i>d</i> , $J=2,3$)	7,70 (1H, <i>d</i> , $J=2,4$)
3'	6,81 (1H, <i>d</i> , $J=2,3$)	6,83 (1H, <i>d</i> , $J=2,4$)
8-OMe	4,27 (3H, <i>s</i>)	4,30 (3H, <i>s</i>)

TABELA 4.7: Dados de RMN ^1H de **06** presente na **mistura** e comparação com a literatura.

	SUBSTÂNCIA 06 (400 MHz, CDCl_3)	MÜLLER, 1994 (200 MHz, CDCl_3)
^1H	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm), J (Hz)
3	6,29 (1H, <i>d</i> , $J=9,8$)	6,32 (1H, <i>d</i> , $J=9,8$)
4	8,11 (1H, <i>d</i> , $J=9,8$)	8,12 (1H, <i>d</i> , $J=9,8$)
2'	7,62 (1H, <i>d</i> , $J=2,3$)	7,62 (1H, <i>d</i> , $J=2,3$)
3'	6,99 (1H, <i>d</i> , $J=2,3$)	7,12 (1H, <i>d</i> , $J=2,3$)
5-OMe	4,16 (3H, <i>s</i>)	4,17 (3H, <i>s</i>)
8-OMe	4,16 (3H, <i>s</i>)	4,17 (3H, <i>s</i>)

TABELA 4.8: Dados de RMN ^1H de **07** presente na **mistura**.

	SUBSTÂNCIA 07 (400 MHz, CDCl_3)
^1H	δ (ppm), J (Hz)
3	6,45 (1H, <i>d</i> , $J=9,8$)
4	8,15 (1H, <i>d</i> , $J=9,8$)
2'	7,70 (1H, <i>d</i> , $J=2,2$)
3'	6,92 (1H, <i>d</i> , $J=2,2$)
5-OMe	4,29 (3H, <i>s</i>)

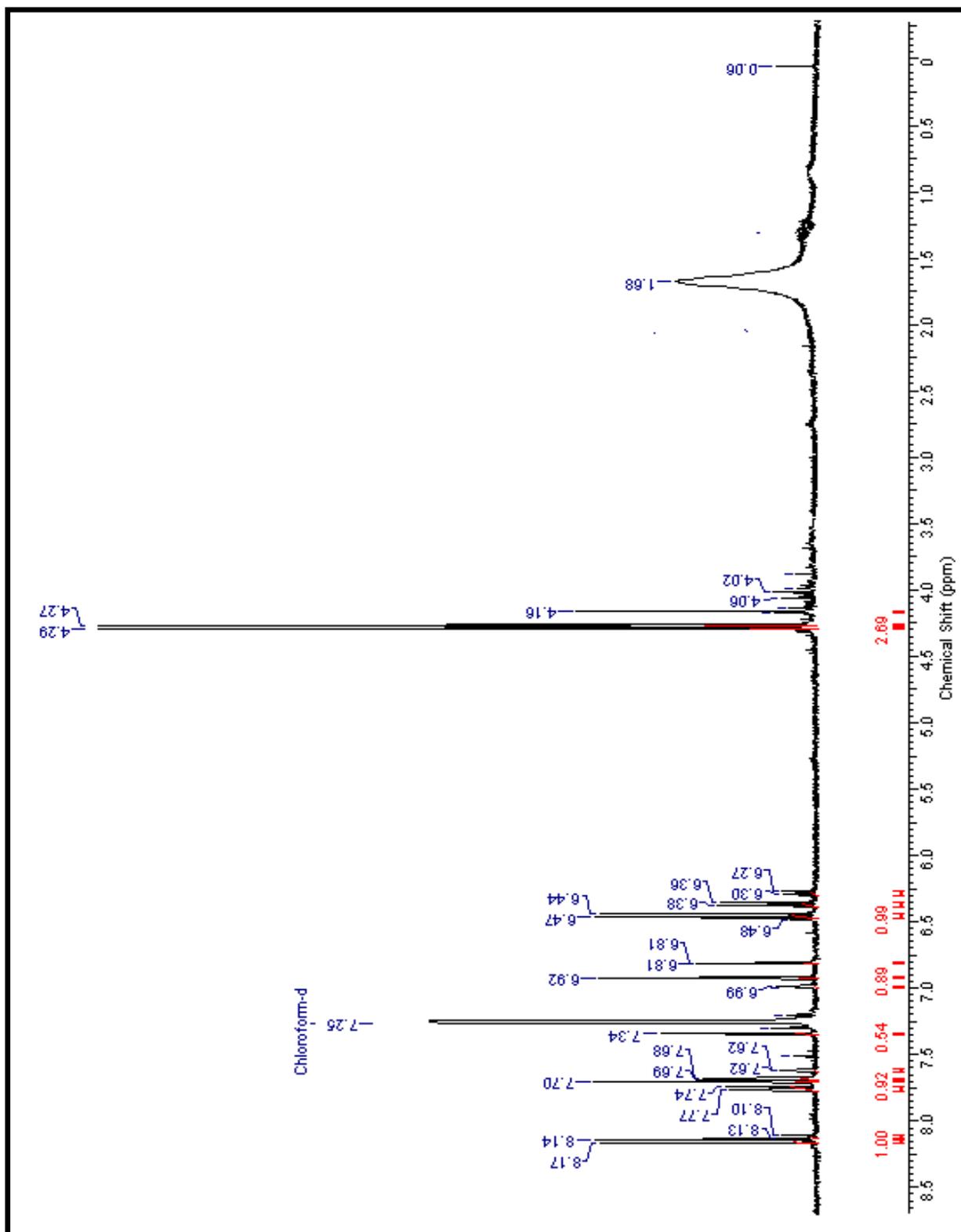


FIGURA 4.15: Espectro de RMN ^1H da mistura das substâncias **05**, **06** e **07**, (400 MHz, CDCl_3).

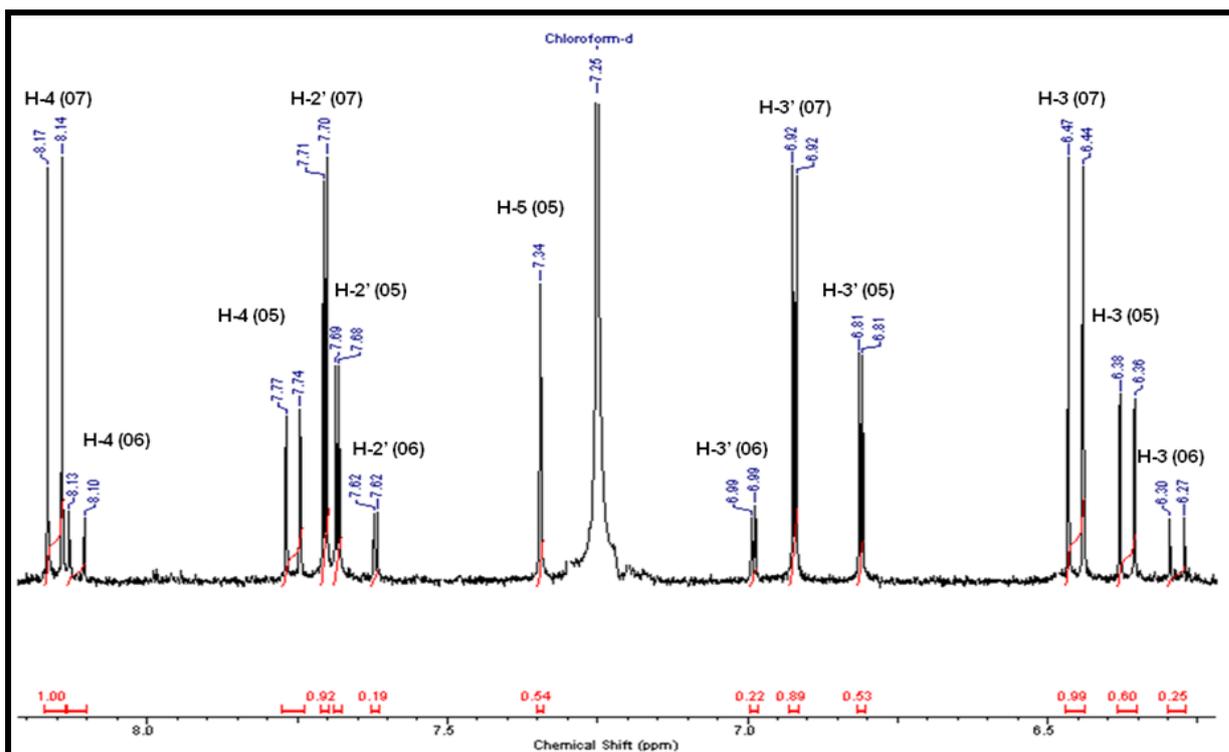


FIGURA 4.16: Ampliação dos sinais na região de δ 8,2 a 6,2 do espectro de RMN ¹H da mistura das substâncias **05**, **06** e **07**.

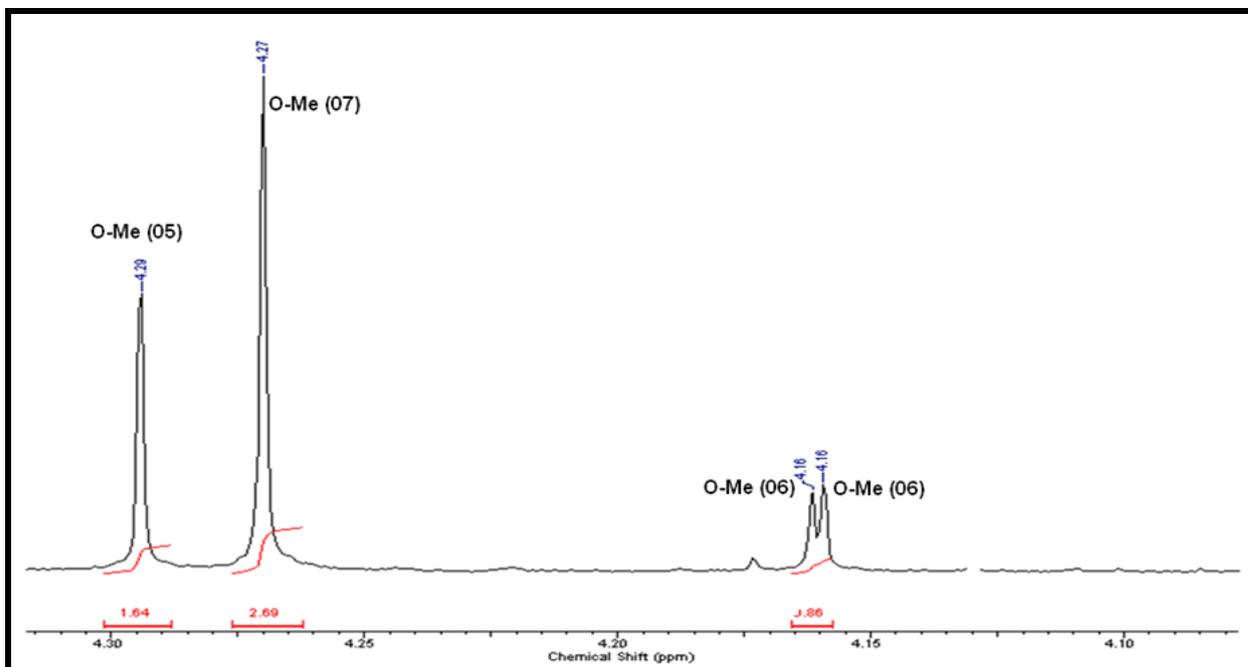


FIGURA 4.17: Ampliação da região de δ 4,30 a 4,15 do espectro de RMN ¹H da mistura das substâncias **05**, **06** e **07**.

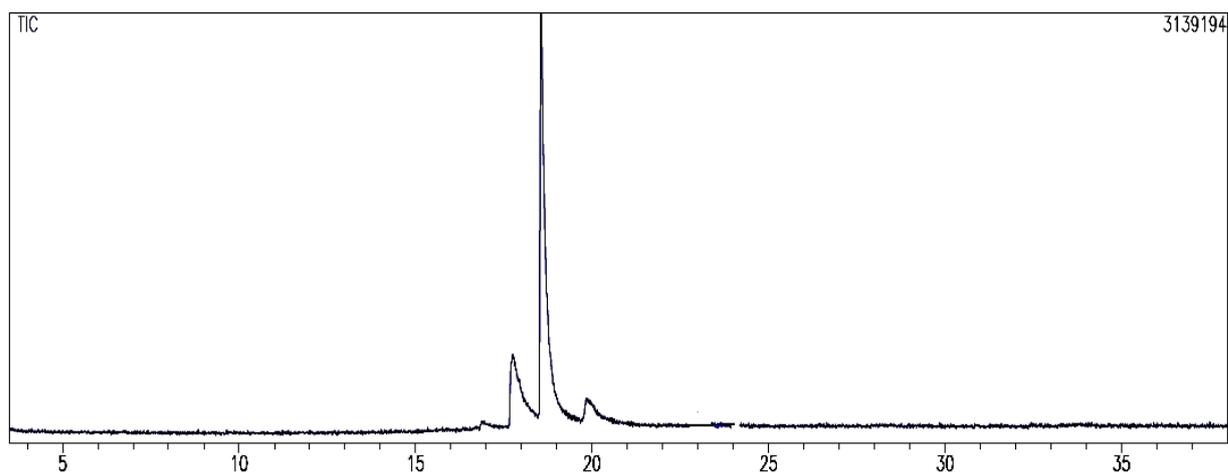


FIGURA 4.18: Cromatograma da mistura das substâncias **05**, **06** e **07** obtido por CG/MS.

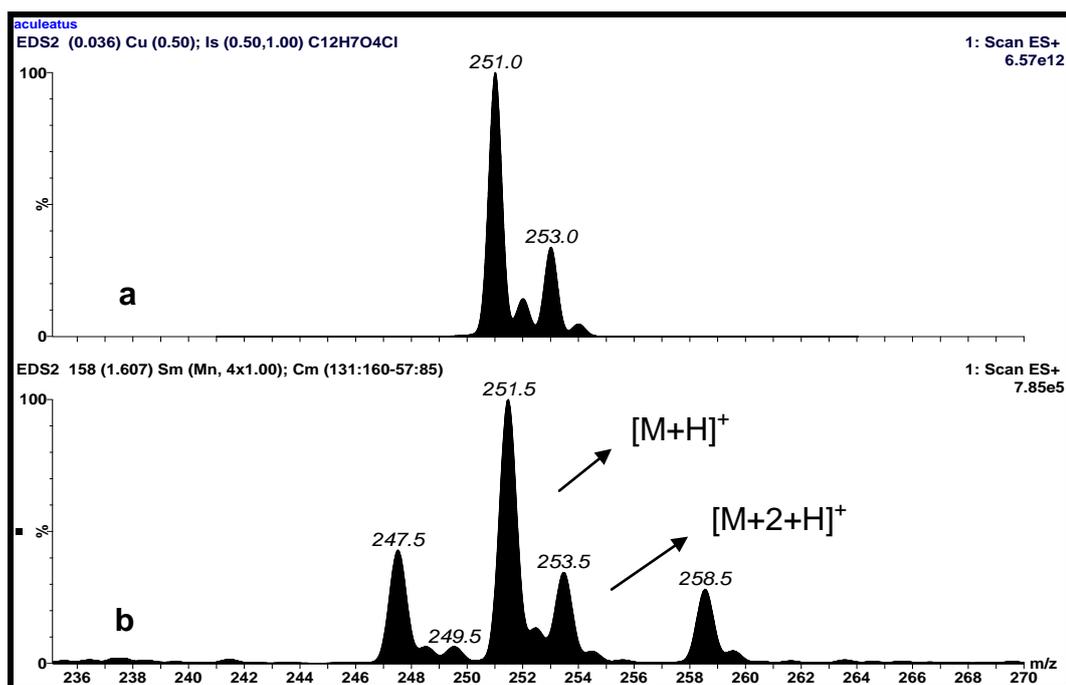


FIGURA 4.19: a) Simulação do padrão isotópico referente à massa de **07**. b) Espectro de Massa obtido por ESI positivo da **mistura**.

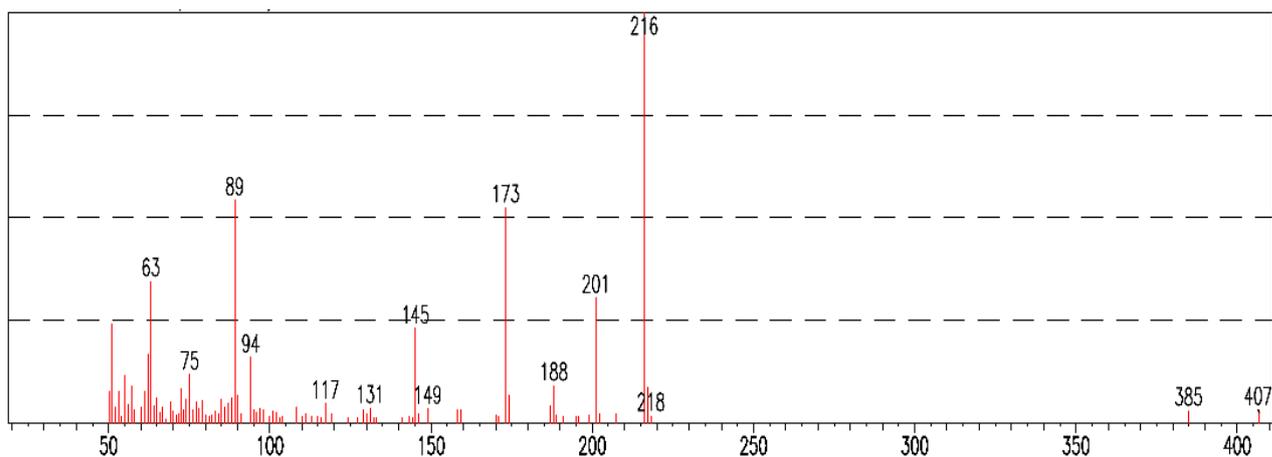
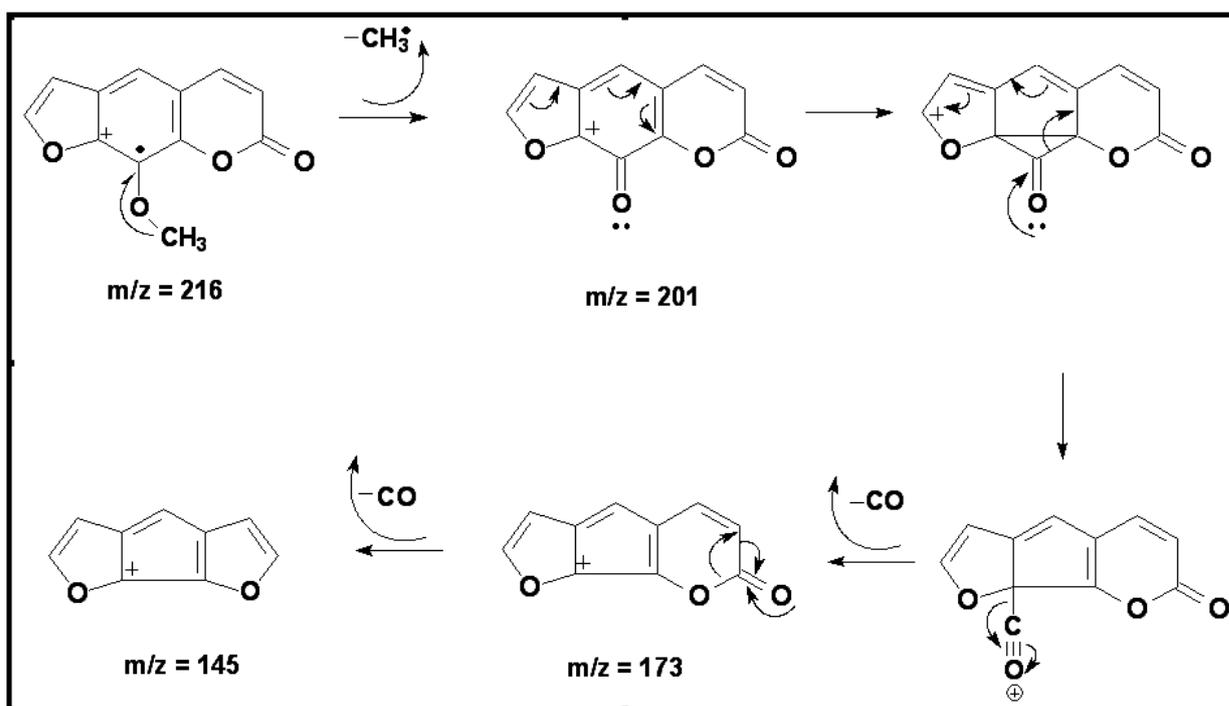


FIGURA 4.20: Espectro de massa (IE = 70 eV) de **05** (Xantotoxina) presente na mistura, (tempo de retenção: 17 min.).



ESQUEMA 4.3: Proposta de fragmentação para a xantotoxina (**05**).

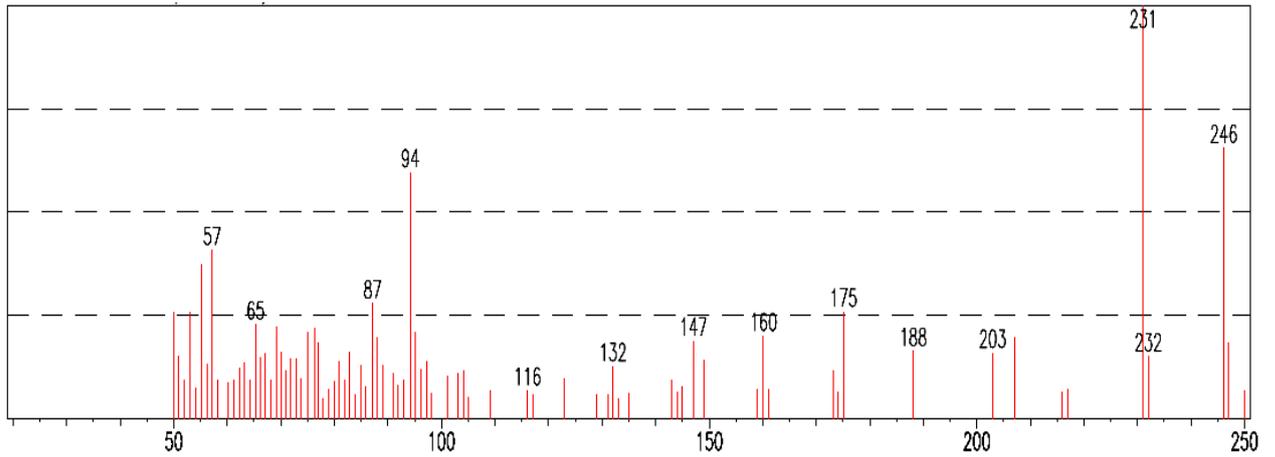
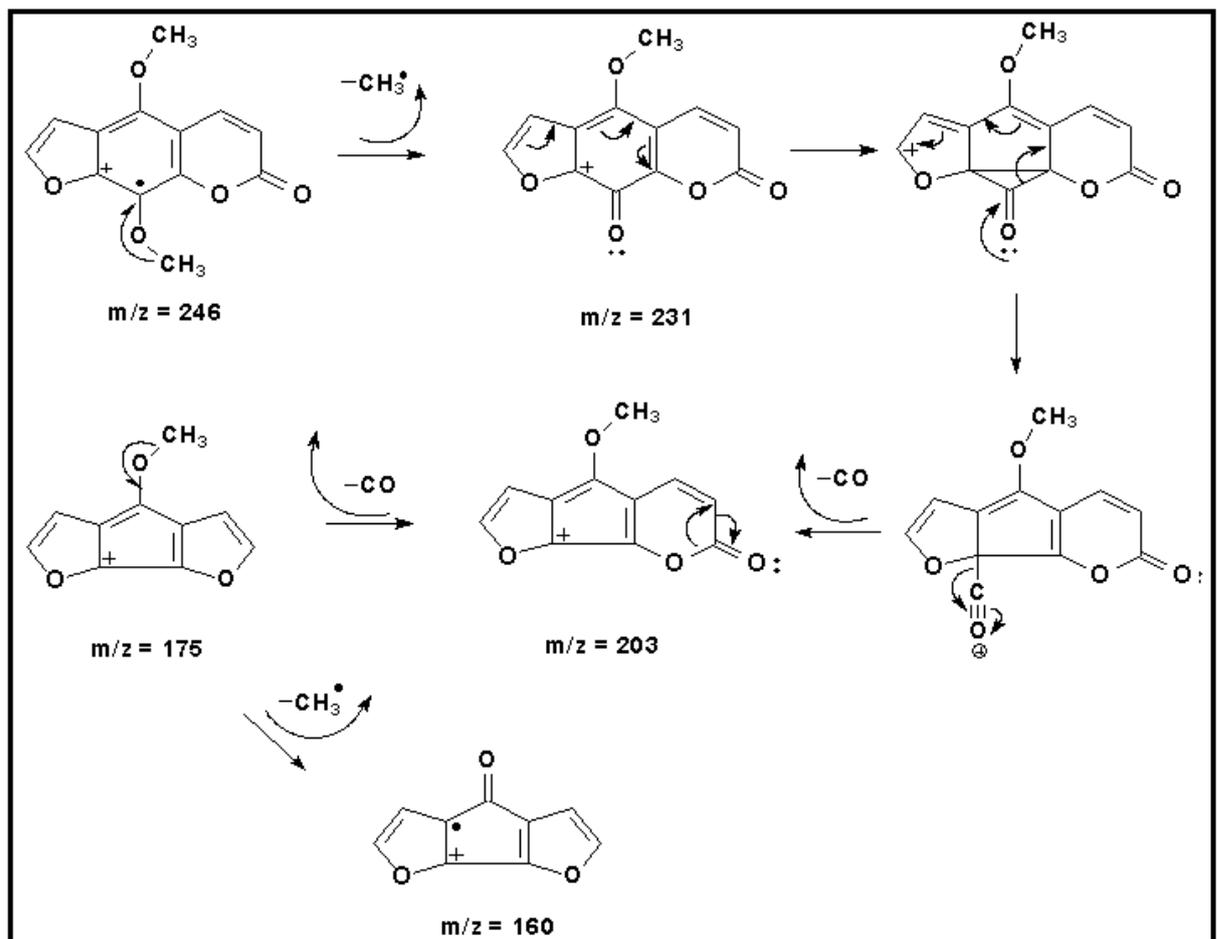


FIGURA 4.21: Espectro de massa (IE = 70 eV) de **06** (isopimpenilina) presente na mistura, (tempo de retenção: 20 min.).



ESQUEMA 4.4: Proposta de fragmentação para a isopimpenilina (**06**).

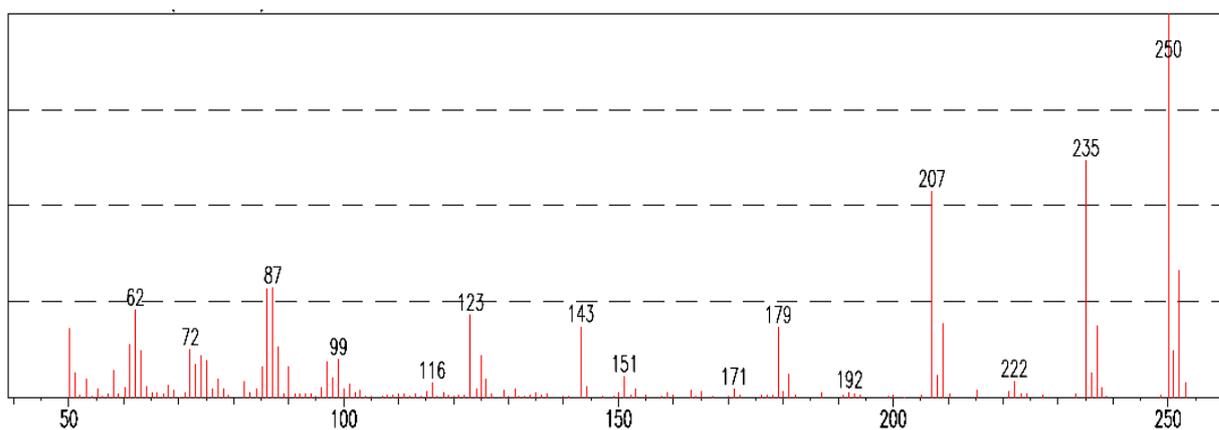
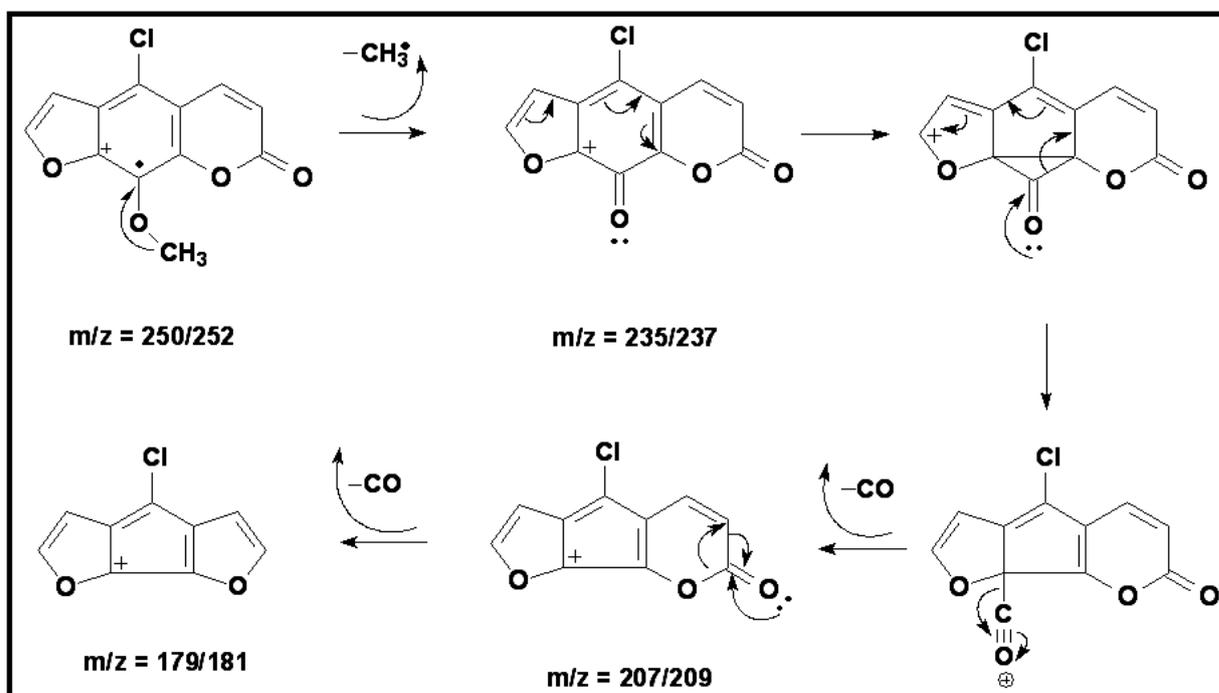


FIGURA 4.22: Espectro de massa IE = 70 eV) de **07** (5-cloro-8-metoxi-furanocumarina) presente na *mistura*, (tempo de retenção: 19 min.).



ESQUEMA 4.5: Proposta de fragmentação para a 5-cloro-8-metoxi-furanocumarina (**07**).

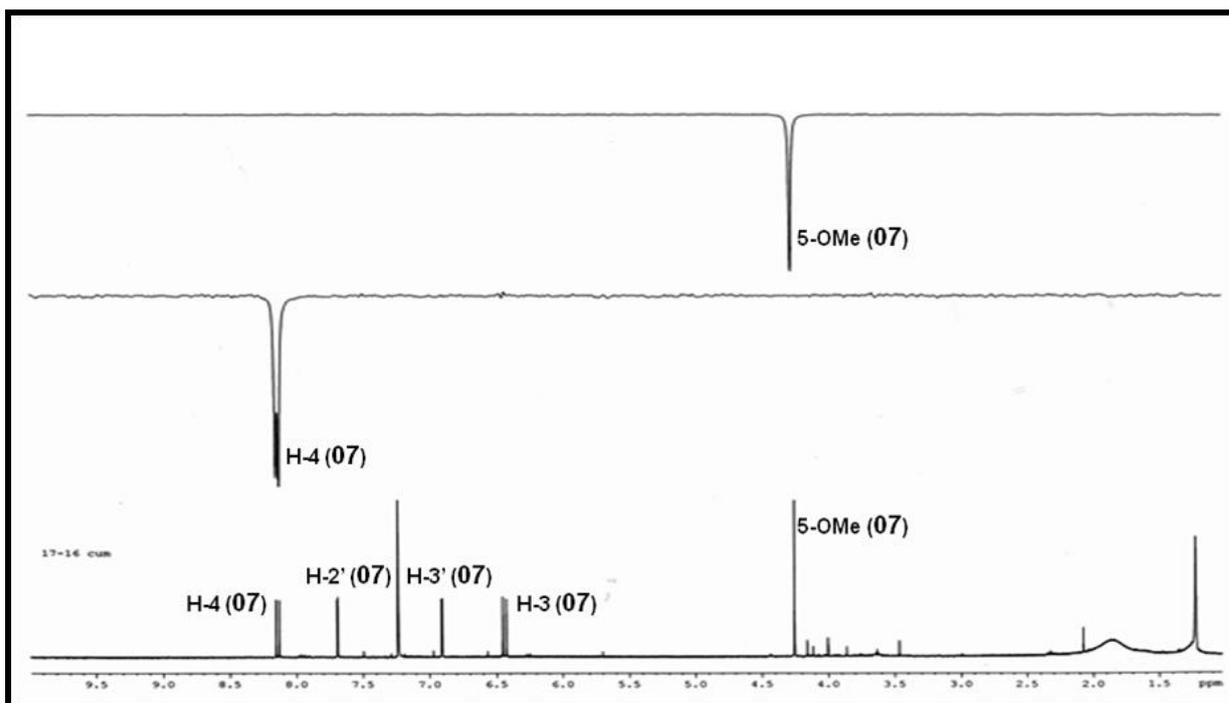
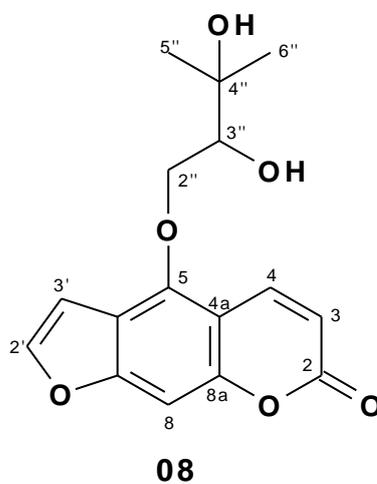


FIGURA 4.23: Espectros de g-NOESY da mistura (400 MHz, CDCl₃).

4.3.4 - Determinação estrutural da substância 08

A substância **08** é uma cumarina do tipo furanocumarina com O-prenilação e foi isolada da fração diclorometânica (EDGHS) proveniente do extrato etanólico dos galhos de *H. superba* e teve sua estrutura determinada a partir dos experimentos de RMN ¹H, HSQC e HMBC e também por comparação com dados da literatura (TESSO, *et. al.*, 2005).



O espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.24), mostra os sinais característicos do esqueleto cumarínico dos hidrogênios H-4 e H-3 do anel lactônico em δ 8,16 (1H, *dd*, $J=9,8; 0,5$ Hz) e δ 6,30 (1H, *d*, $J=9,8$ Hz), indicando uma oxidação na posição C-5, devido a desblindagem do H-4. Observa-se sinais que indicam a presença de um anel furano, em δ 7,61 (1H, *d*, $J=2,4$ Hz) e δ 6,98 (1H, *dd*, $J=2,4; 1,0$ Hz), os quais foram atribuídos aos hidrogênios H-2' e H-3', respectivamente. A multiplicidade observada para H-4 é justificada pelo acoplamento a longa distância com H-8, com constante bastante pequena (0,5 Hz). O mesmo acoplamento a longa distância é observado entre H-3' e H-8, com constante também pequena de 1,0 Hz (LASSAK, *et. al.*, 1967). Estes acoplamentos a longa distância também justificam a presença do substituinte com oxigenação na posição C-5, pois caso estivesse posicionado em C-8, estes acoplamentos a longa distância não seriam observados. Ainda é possível observar no espectro de RMN ^1H a presença de um sinal de hidrogênio aromático em δ 7,19 (1H, *s*), referente ao hidrogênio H-8.

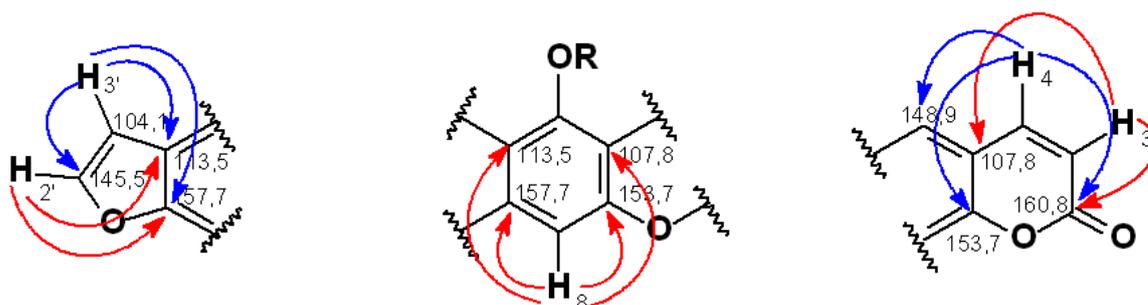
Analisando o espectro de RMN ^1H e baseado em dados comparativos com a literatura (TABELA 4.9) é observado também sinais referentes aos hidrogênios diastereotópicos da posição C-2'' em δ 4,42 (1H, *dd*, $J=9,8; 7,5$ Hz) e δ 4,54 (1H, *dd*, $J=9,8; 3,4$ Hz), atribuídos aos hidrogênios H-2''a e H-2''b do grupamento prenila, respectivamente. O espectro mostra um duplo dubleto em δ 3,90 (1H, *dd*, $J=7,5; 3,4$ Hz) referente ao hidrogênio H-3'', característico de hidrogênio oximetínico, e dois singletos são observados em δ 1,31 e δ 1,35 de metilas terciárias ligadas a carbono carbinólico, referentes as posições C-5'' e C-6'', respectivamente, indicando a presença de um grupamento prenila na estrutura, uma preniloxila.

No espectro de HSQC (FIGURA 4.27) é observado correlações a 1J dos sinais em δ 7,61 (H-2') e em δ 6,98 (H-3') relativos ao anel furano com os carbonos em δ 145,5 (C-2') e δ 104,1 (C-3'), confirmando a presença de uma furanocumarina. Observou-se também correlações dos sinais em δ 6,30 (H-3) e δ 8,16 (H-4) com os carbonos em δ 113,3 (C-3) e δ 139,1 (C-4) e uma correlação do sinal referente ao H-8 (δ 7,19) com o sinal em δ 95,1. Ainda é possível observar no mapa de correlações do HSQC a correlação do sinal em δ 3,90 (H-3'') com o sinal em δ 76,9, confirmando a posição deste hidrogênio no carbono C-3'' e dos sinais em δ 4,42 (H-2''a) e δ 4,54 (H-2''b) com o sinal em δ 74,8 (C-2''), indicando que estes

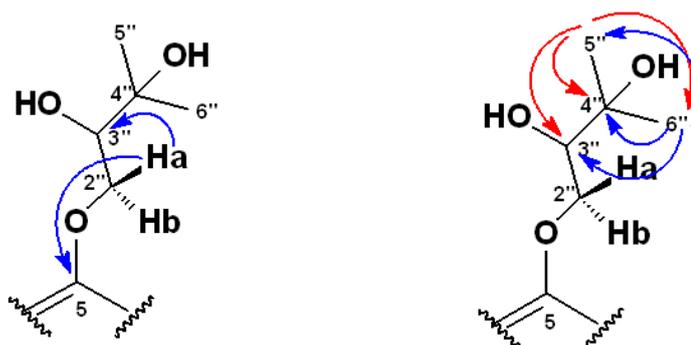
dois hidrogênios estão ligados no mesmo carbono. Foi observado também correlações dos sinais dos grupos metilas em δ 1,31 e δ 1,35 com os carbonos em δ 24,6 (C-5'') e δ 26,4 (C-6''), respectivamente.

Através do mapa de correlações do HMBC (FIGURA 4.28) observa-se uma correlação do sinal em δ 6,30 (H-3) a 2J com o sinal em δ 160,8, atribuído ao C-2 e a 3J com o sinal em δ 107,8 que somente pode ser atribuído ao C-4a. O sinal em δ 8,16 (H-4) mostra correlação a 3J com um sinal em δ 160,8 (C-2) e a 3J com os sinais em δ 148,7 e δ 153,7, atribuídos aos carbonos C-5 e C-8a, respectivamente.

No espectro de HMBC ainda foi possível observar correlações do sinal em δ 7,19 (H-8) a 3J com os sinais em δ 107,8 (C-4a) e δ 113,5 (C-6), a 2J com os sinais em δ 153,7 (C-8a) e δ 157,7 (C-7). O sinal em δ 7,61 (H-2') mostra correlações com os sinais em δ 157,7 (C-7) e δ 113,5 (C-6). O sinal em δ 6,98 (H-3') mostra correlações a 2J com os sinais em δ 113,5 (C-6) e δ 145,5 (C-2') e a 3J com o sinal em δ 157,7 (C-7).



A análise do espectro de HMBC permite observar correlações do sinal de H-2''a (δ 4,42) com o sinal em δ 148,9 (C-5) e com um sinal em δ 76,9 (C-3''). É observado também a correlação dos sinais das metilas com os carbonos C-3'' (δ 76,9) e C-4'' (δ 72,1) e a correlação entre si das metilas. De acordo com estas correlações, pode-se determinar a estrutura do substituinte presente no C-5.



A partir desta correlação com o C-5, foi verificada a presença da preniloxila nesta posição. O fato do deslocamento químico de C-5 ser bastante desblindado e ainda o fato dos hidrogênios H-2''a e H-2''b estar ligado a um carbono carbinólico (δ 74,8) indica que exista uma O-prenilação na estrutura, justificando, ainda o deslocamento de H-4 (δ 8,18) através da existência de uma oxigenação em C-5. Assim, baseado em dados comparativos com a literatura, a estrutura da substância **08** foi identificada como à 5-O-prenil furanocumarina (Prangol).

TABELA 4.9: Dados de RMN ^1H e ^{13}C de **08** e comparação com a literatura.

^1H	Substância 08 (200 MHz, CDCl_3)		TESSO, 2005 (400 MHz, CDCl_3)	
	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm)	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm)
2	-	160,8	-	161,0
3	6,30 (1H, <i>d</i> , $J=9,8$)	113,3	6,34 (1H, <i>d</i> , $J=10,0$)	113,5
4	8,16 (1H, <i>dd</i> , $J=9,8; 0,5$)	139,1	8,11 (1H, <i>d</i> , $J=10,0$)	139,1
4a	-	107,8	-	107,6
5	-	148,9	-	148,5
6	-	113,5	-	113,5
7	-	157,7	-	158,7
8	7,19 (1H, <i>s</i>)	95,1	7,20 (1H, <i>s</i>)	95,0
8a	-	153,7	-	153,7
2'	7,61 (1H, <i>d</i> , $J=2,4$)	145,5	7,63 (1H, <i>d</i> , $J=2,5$)	145,5
3'	6,98 (1H, <i>dd</i> , $J=1,0; 2,4$)	104,1	7,03 (1H, <i>d</i> , $J=2,5$)	104,0
2''a	4,42 (1H, <i>dd</i> , $J=7,5; 9,8$)	74,8	4,46 (1H, <i>dd</i> , $J=10,0; 8,0$)	74,8
2''b	4,54 (1H, <i>dd</i> , $J=3,4; 9,8$)		4,51 (1H, <i>dd</i> , $J=10,0; 3,0$)	
3''	3,90 (1H, <i>dd</i> , $J=3,4; 7,5$)	76,9	3,91 (1H, <i>m</i>)	70,0
4''	-	72,1	-	76,9
5''	1,31* (3H, <i>s</i>)	24,6*	1,31 (3H, <i>s</i>)	24,6
6''	1,35* (3H, <i>s</i>)	26,4*	1,36 (3H, <i>s</i>)	26,2
3''-OH	---	-	2,81(<i>s</i>)	-
4''-OH	---	-	---	-

*Valores intercambiáveis

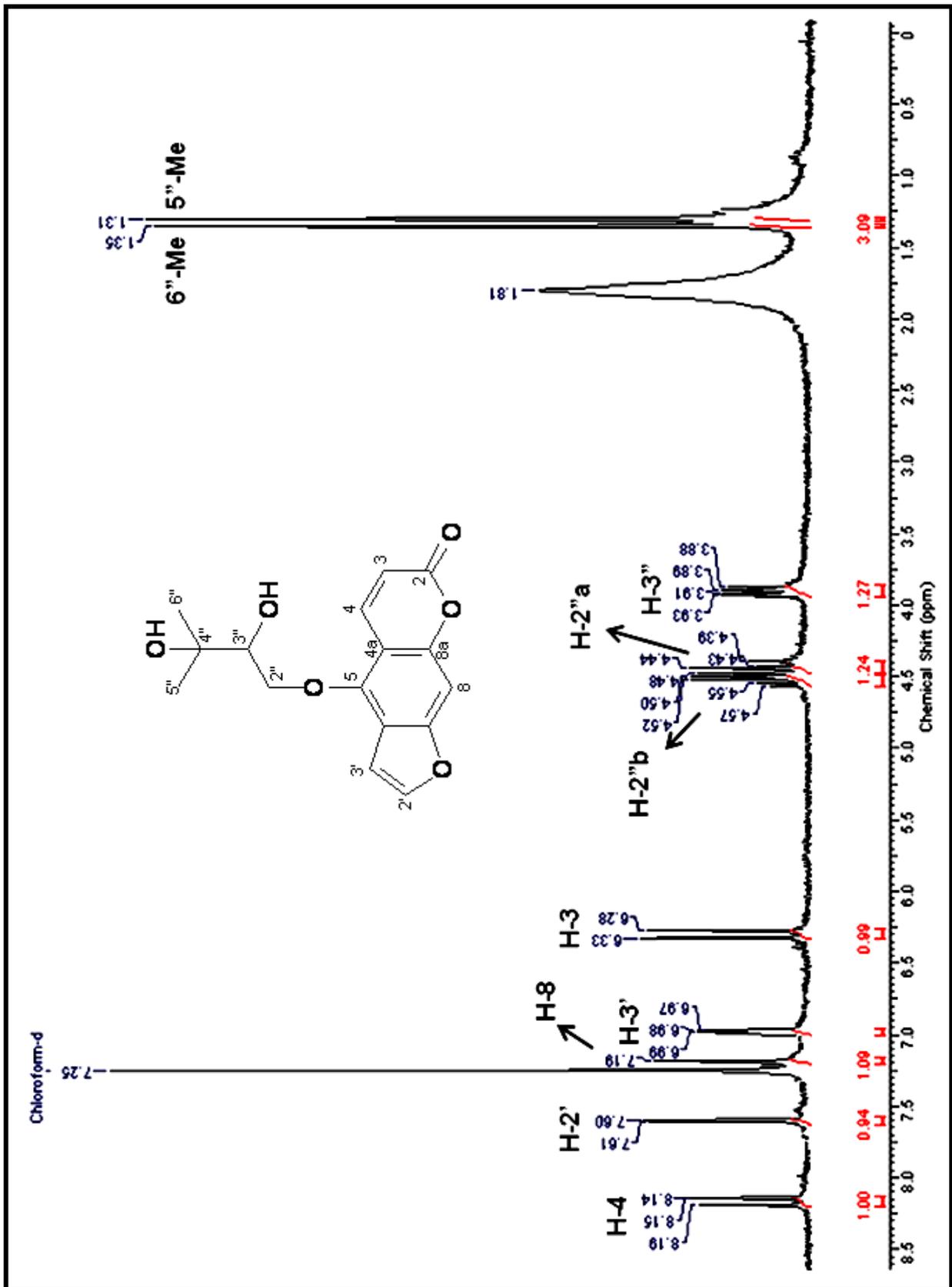


FIGURA 4.24: Espectro de RMN ^1H de **08** (200 MHz, CDCl_3).

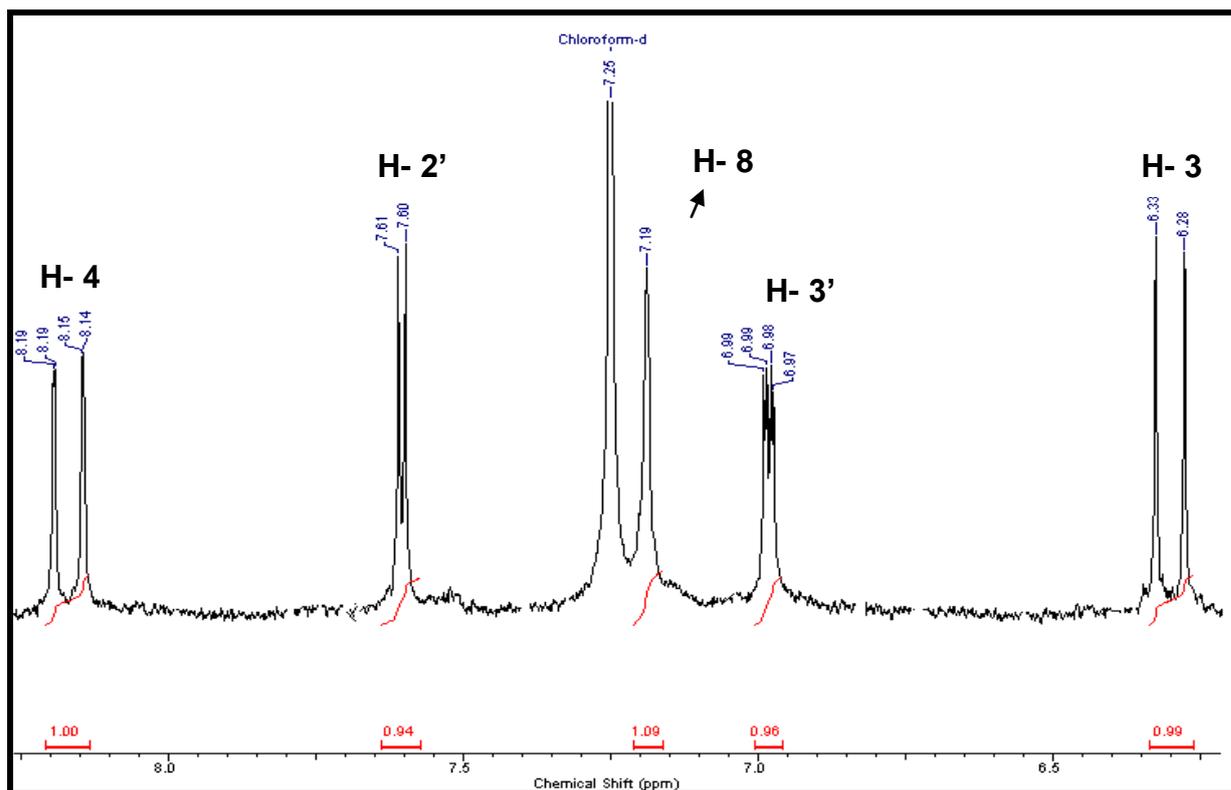


FIGURA 4.25: Ampliação da região de δ 8,2 a 6,2 do espectro de RMN ^1H de **08**.

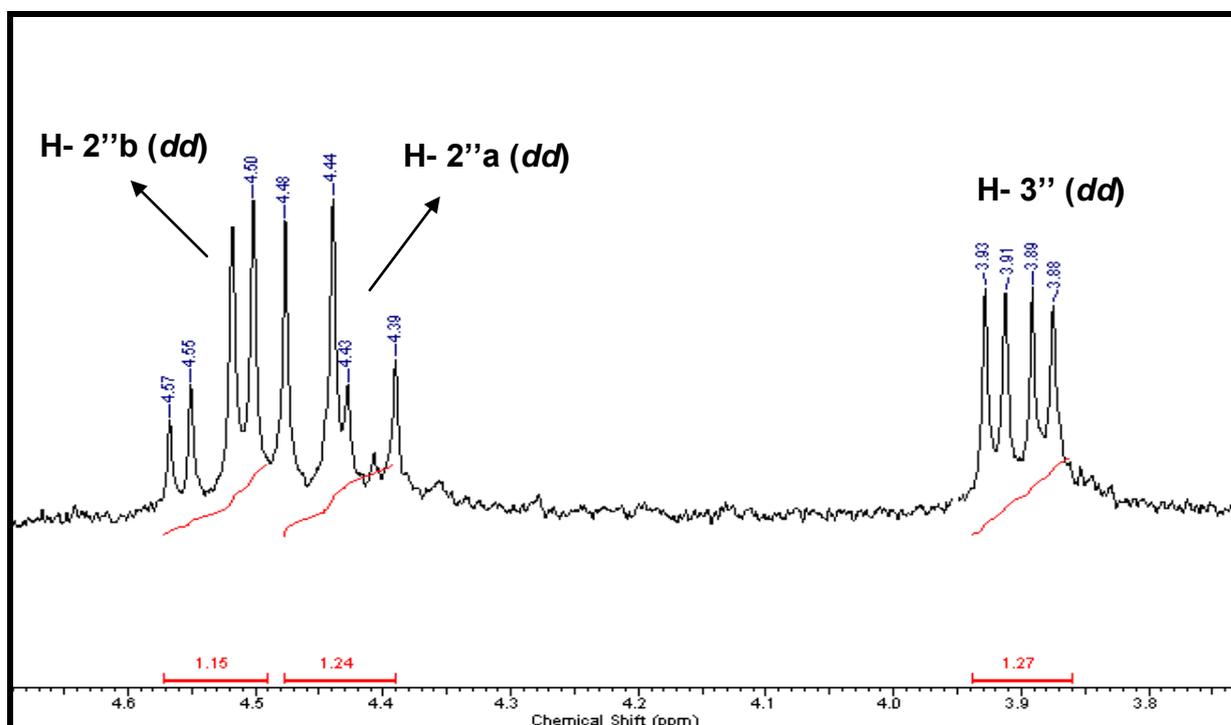


FIGURA 4.26: Ampliação da região de δ 4,7 a 3,7 do espectro de RMN ^1H de **08**.

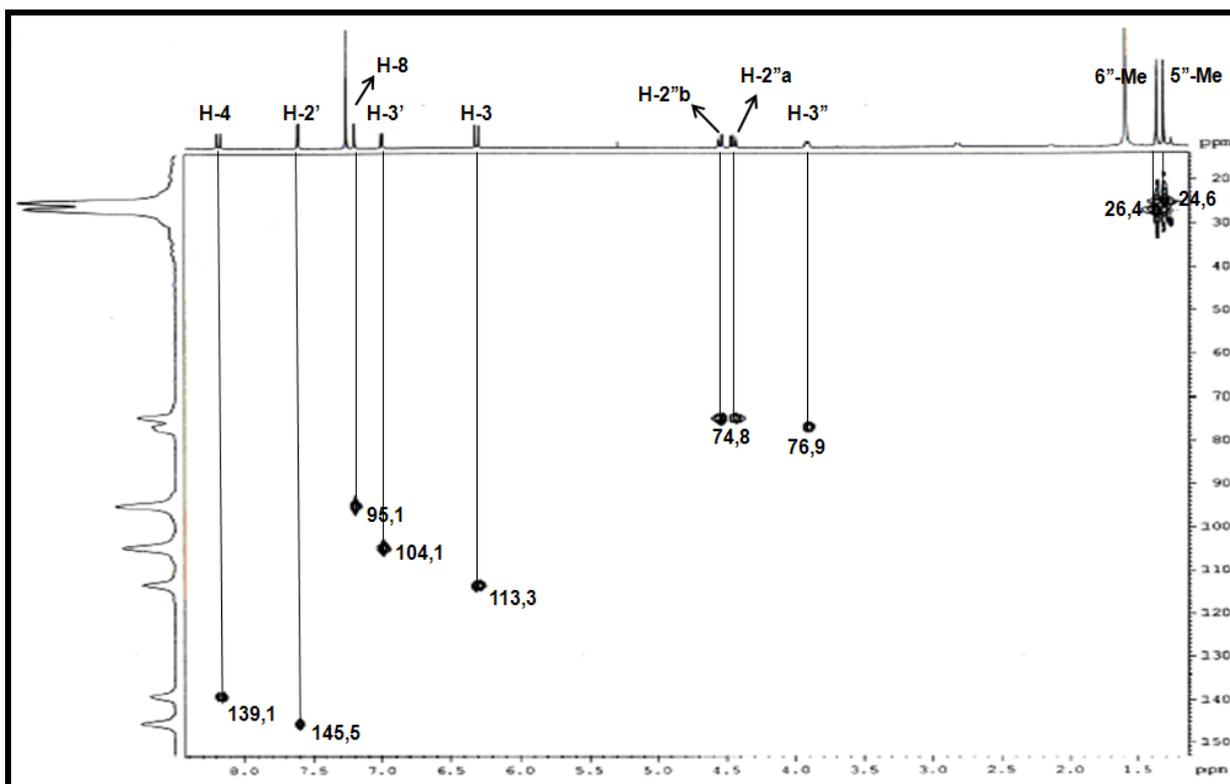


FIGURA 4.27: Mapa de contorno do HSQC de **08** (400 MHz, CDCl₃).

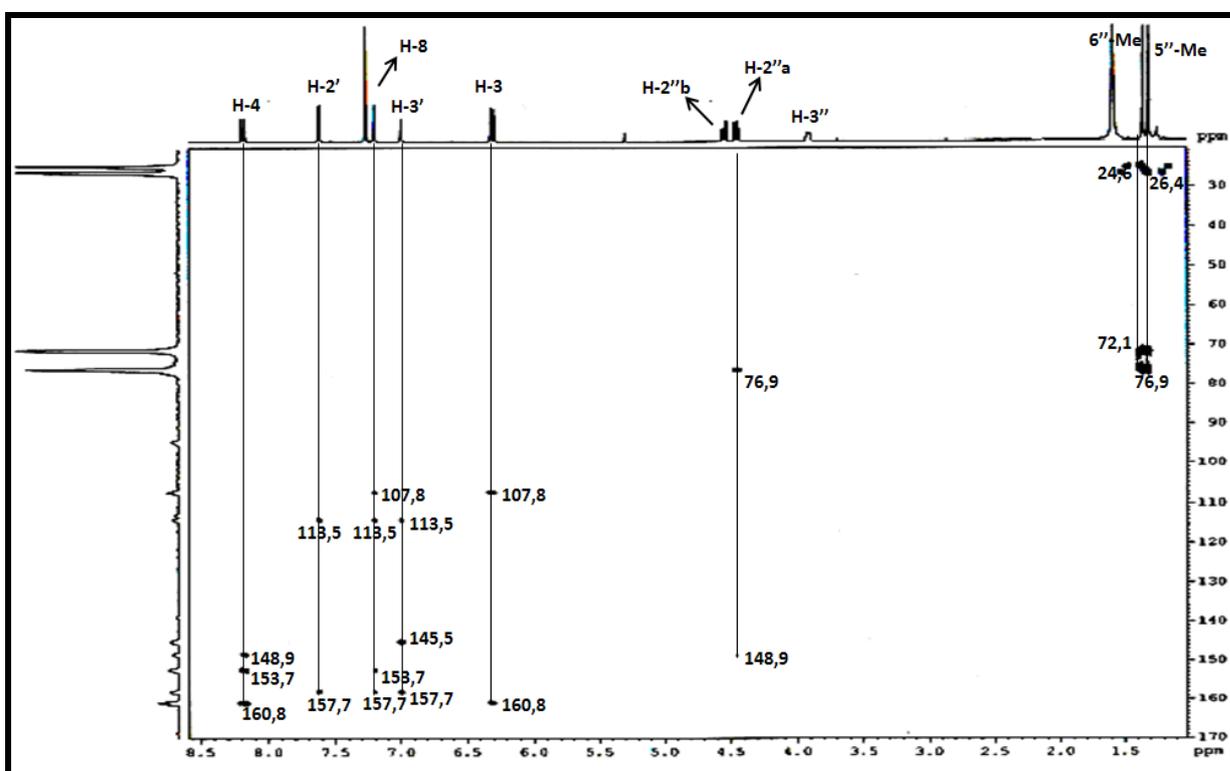
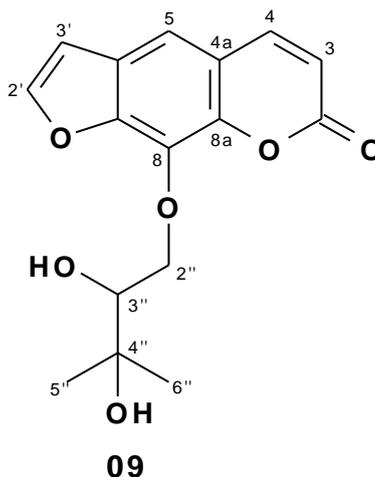


FIGURA 4.28: Mapa de contorno do HMBC de **08** (400 MHz, CDCl₃).

4.3.5 - Determinação estrutural da substância 09

A substância **09** é uma cumarina do tipo furanocumarina com O-prenilação e foi isolada da fração diclorometânica (EDGHS) proveniente do extrato etanólico dos galhos de *H. superba* e teve sua estrutura determinada com base nos experimentos de RMN ^1H e por comparação com dados da literatura (HARKAR, 1984).



O espectro de RMN ^1H de **09** (FIGURA 4.29), mostra os sinais característicos do esqueleto cumarínico dos hidrogênios H-4 e H-3 em δ 7,78 (1H, *dl*, $J=9,6$) e δ 6,39 (1H, *dl*, $J=9,6$), respectivamente. Os sinais relativos ao anel furano encontram-se em δ 7,71 (1H, *dd*, $J=2,2$) e δ 6,83 (1H, *d*, $J=2,2$), sendo referentes aos hidrogênios H-2' e H-3', respectivamente. Ainda é possível observar no espectro de ^1H a presença de um sinal de hidrogênio aromático em δ 7,41 (1H, *s*), sinais em δ 4,77 (1H, *dd*, $J=10,2; 2,8$), em δ 4,39 (1H, *dd*, $J=10,2; 7,8$), δ 3,86 (1H, *dd*, $J=7,8; 2,8$) e sinais de metilas em δ 1,34 (3H, *s*) e δ 1,30 (3H, *s*), indicando a presença de um grupamento prenila na estrutura.

O deslocamento químico de H-4 em δ 7,78 sugere que a posição C-5 não esteja substituída, o que permite posicionar o grupo prenila em C-8. Ainda pode-se observar que neste caso, não havendo hidrogênio disponível em C-8, não há o acoplamento a longa distância entre H-4, H-3' e H-8. A presença da preniloxila em C-8 e ausência de substituinte em C-5 leva a concluir que a furanocumarina **09** é a 8-O-prenil-furanocumarina (Heraclenol).

TABELA 4.10: Dados de RMN ^1H de **09** e comparação com a literatura.

	SUBSTÂNCIA 09 (200 MHz, CDCl_3)	HARKAR, 1984 (250 MHz, CDCl_3)
^1H	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm), J (Hz)
2	-	-
3	6,39 (1H, <i>dl</i> , $J=9,6$)	6,36 (1H, <i>d</i> , $J=9,0$)
4	7,78 (1H, <i>dl</i> , $J=9,6$)	7,76 (1H, <i>d</i> , $J=9,0$)
4a	-	-
5	7,41 (1H, <i>s</i>)	7,36 (1H, <i>s</i>)
6	-	-
7	-	-
8	-	-
8a	-	-
2'	7,71 (1H, <i>dd</i> , $J=2,2$)	7,72 (1H, <i>d</i> , $J=2,2$)
3'	6,83 (1H, <i>d</i> , $J=2,2$)	6,82 (1H, <i>dd</i> , $J=2,2$)
2''a	4,39 (1H, <i>dd</i> , $J=10,2; 7,8$)	4,56 (2H, <i>m</i>)
2''b	4,77 (1H, <i>dd</i> , $J=10,2; 2,8$)	
3''	3,86 (1H, <i>dd</i> , $J=7,8; 2,8$)	3,90 (1H, <i>m</i>)
4''	-	-
5''	1,30 (3H, <i>s</i>)	1,30 (3H, <i>s</i>)
6''	1,34 (3H, <i>s</i>)	1,32 (3H, <i>s</i>)
3''-OH	2,57 (1H, <i>s</i>)	2,73
4''-OH	3,36 (1H, <i>s</i>)	3,53

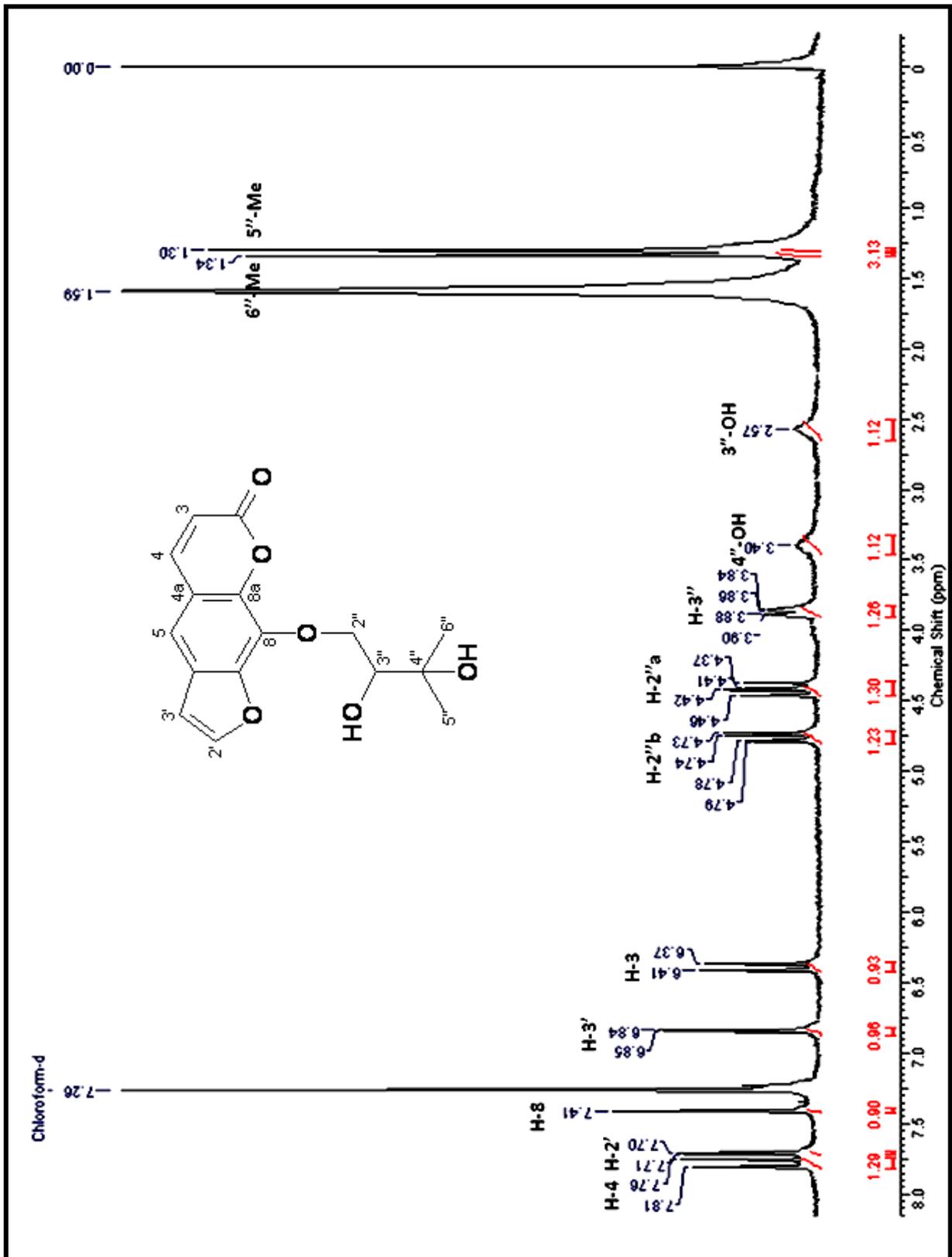


FIGURA 4.29: Espectro de RMN ^1H de **09** (400 MHz, CDCl_3).

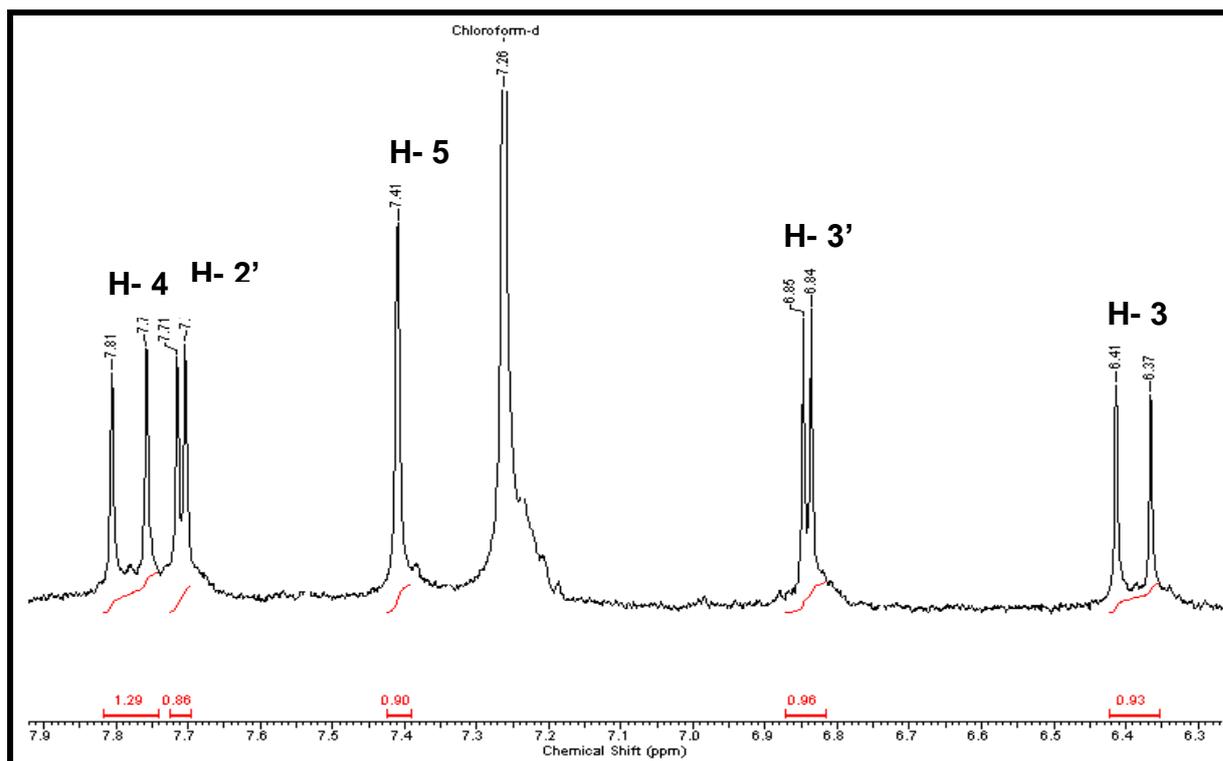


FIGURA 4.30: Ampliação da região de δ 7,9 a 6,3 do espectro de RMN ^1H de **09**.

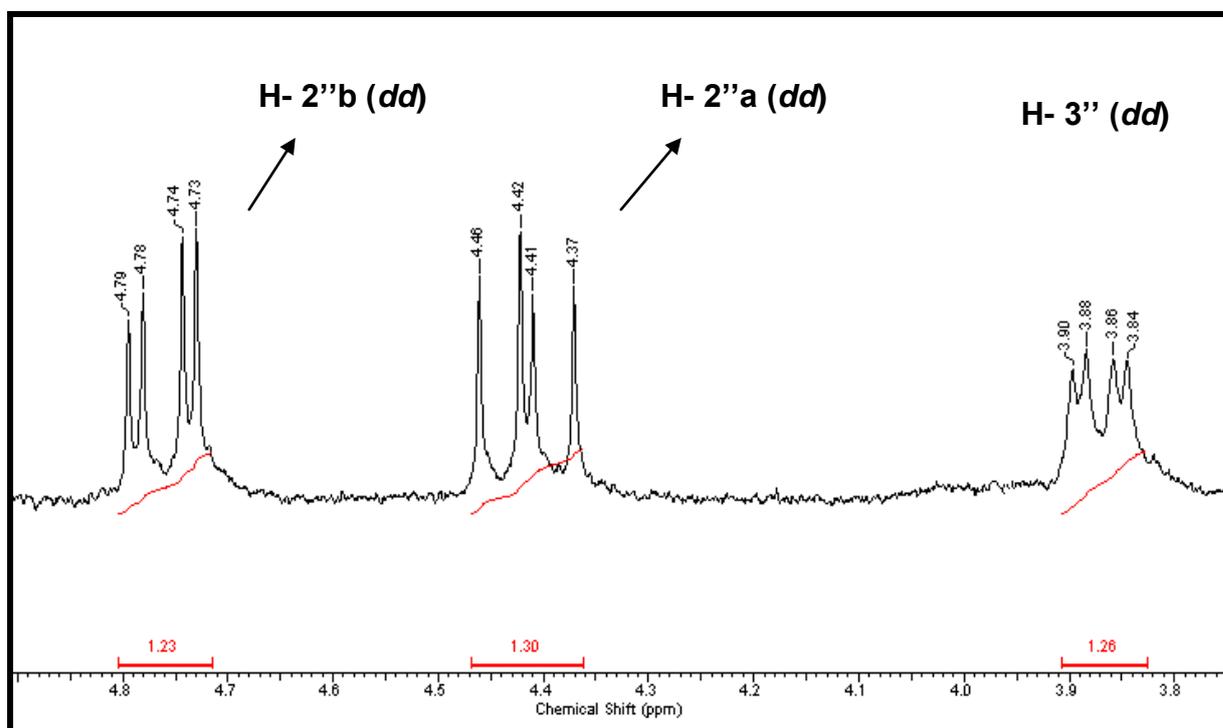
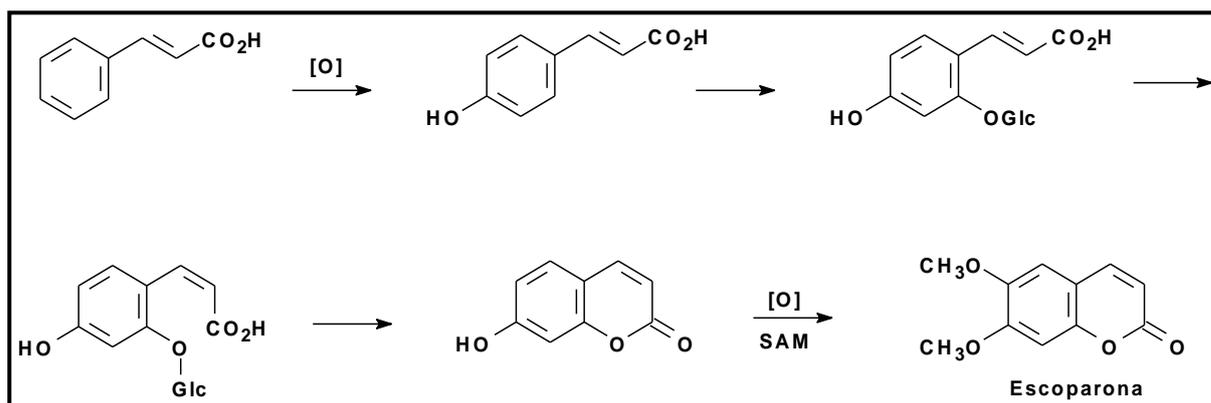


FIGURA 4.31: Ampliação da região de δ 4,8 a 3,8 do espectro de RMN ^1H de **09**.

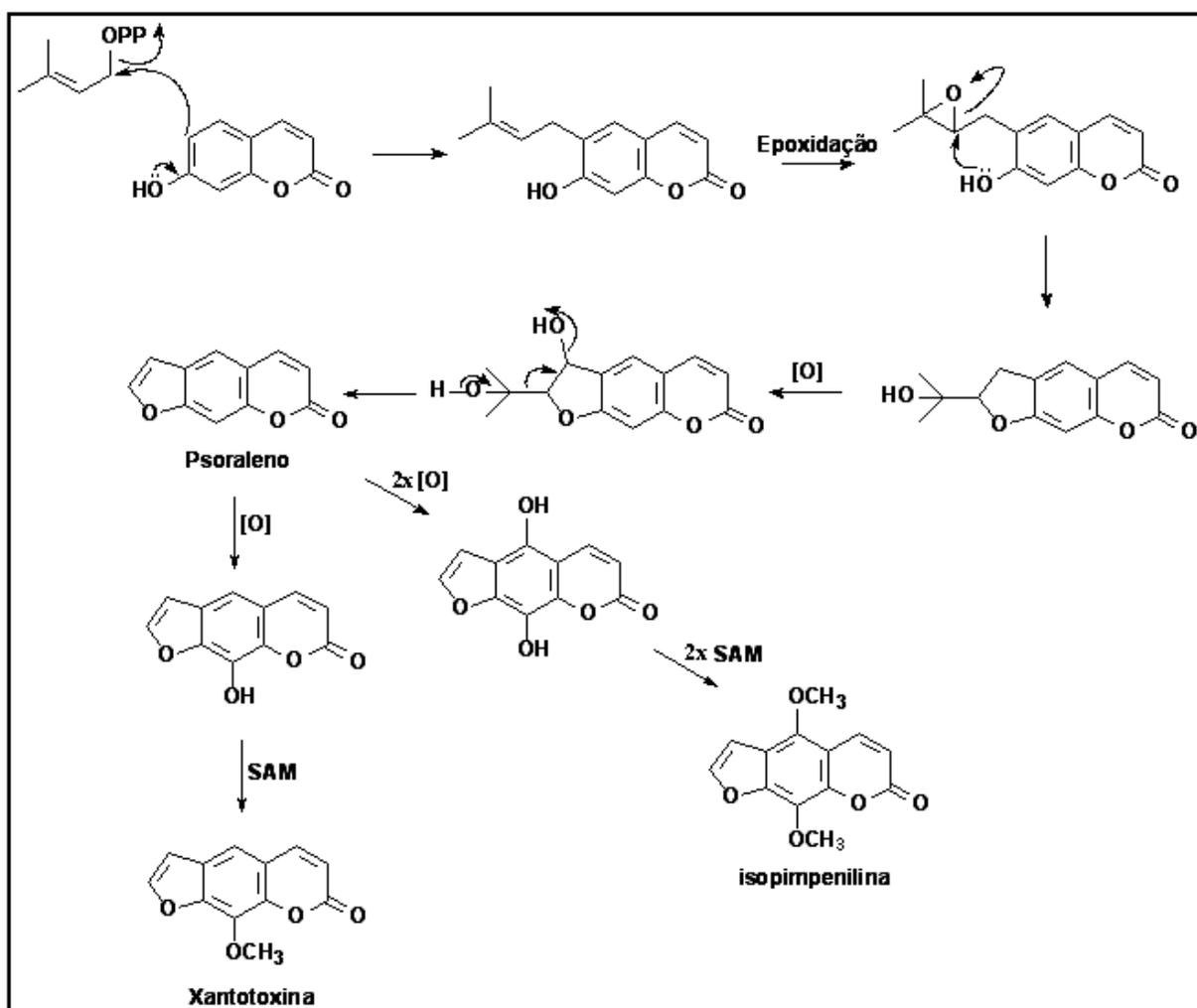
4.3.6 - Biogênese das Cumarinas

As cumarinas são derivadas do ácido *trans*-cinâmico que por oxidação resulta no ácido *p*-cumárico. Em seguida sofre uma *orto*-oxidação, glicosilação e isomerização no seu correspondente *cis*, o qual por ciclização, forma a cumarina, como mostra o ESQUEMA 4.6, que apresenta a proposta biogenética para a cumarina escoparona isolada de *Hortia* (DEWICK, 2002).

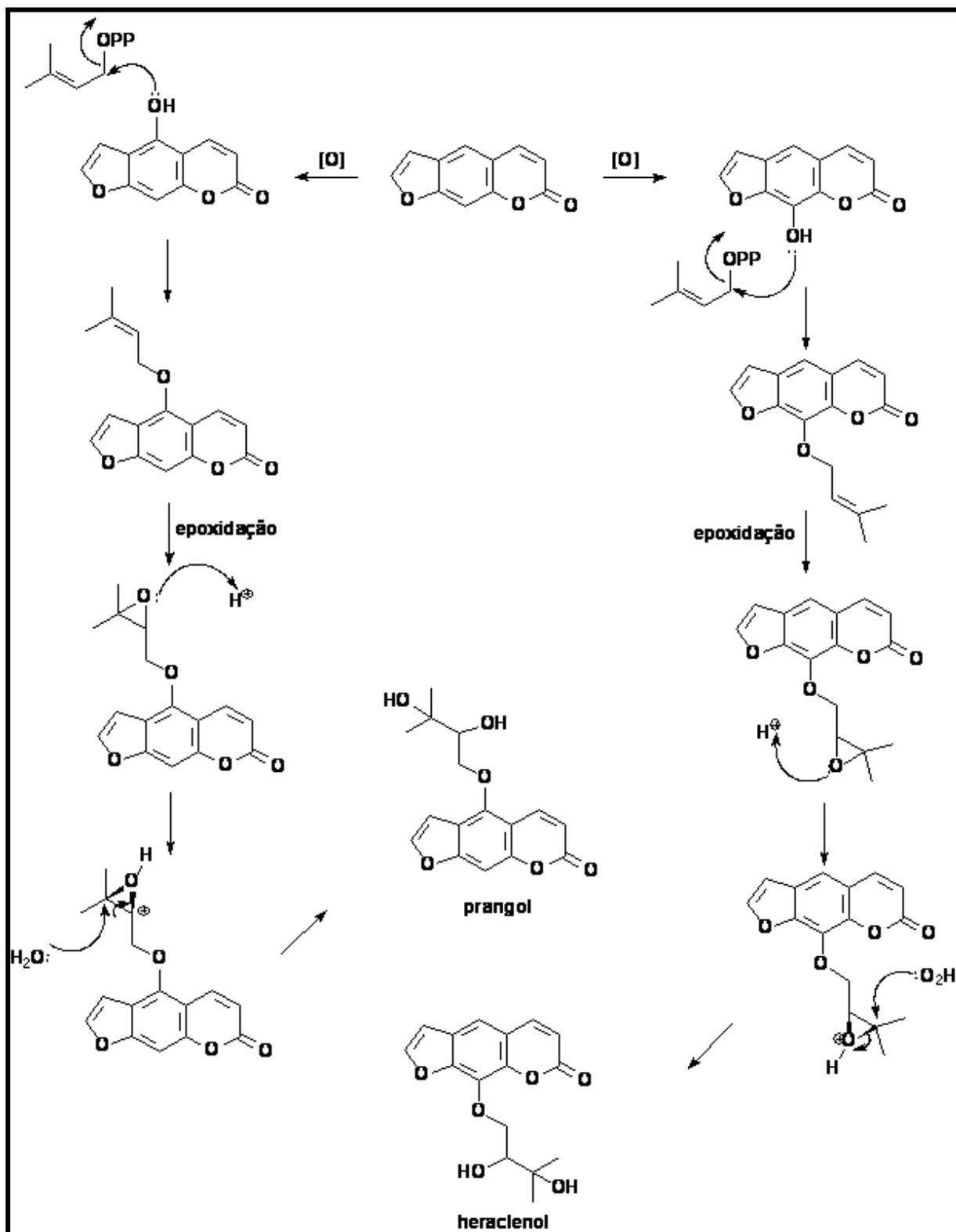


ESQUEMA 4.6: Proposta biogenética para a substância **04**.

A principal característica na diversificação das cumarinas é a incorporação de unidades prenila enzimaticamente controlada. As prenilações nas posições C-6 ou C-8 do anel de uma 7-hidroxi-cumarina leva a formação de furanocumarinas. O ESQUEMA 4.7 e o ESQUEMA 4.8 mostra a representação biogenética de algumas das furanocumarinas isoladas, xantotoxina (**05**), isopimpenilina (**06**), prangol (**08**) e heraclenol (**09**). Uma vez incorporado ao esqueleto cumarínico o grupo prenila pode sofrer um grande número de modificações secundárias, geralmente iniciadas com a epoxidação da ligação dupla da unidade prenila (MIKOLAJACZAK *et. al.*, 1988).



ESQUEMA 4.7: Proposta biogênica para as substâncias **05** e **06**.



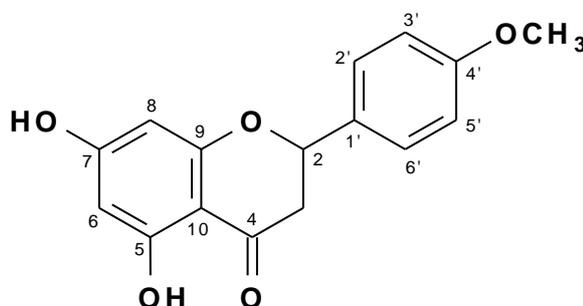
ESQUEMA 4.8: Proposta biogenética para as substâncias 08 e 09.

4.4 – Flavonóides

Os flavonóides constituem um grupo de metabólitos secundários de ampla distribuição na natureza. São conhecidos mais de 4.200 flavonóides, sendo que os de origem natural apresentam-se frequentemente oxigenados e um grande número ocorre conjugado com açúcares (ZUANAZZI, 2001). Os flavonóides estão amplamente presentes na vida diária do ser humano, ingeridos através das frutas, verduras, legumes e ervas medicinais. A importância desta enorme classe é devida suas diversas funções biológicas e fisiológicas, principalmente como antioxidante, anti-inflamatórios, propriedades estrogênicas e antiviral (HARBONE & WILLIAMS, 2000). Há relatos de três flavonóides isolados no gênero *Hortia*, uma flavanona (BRAGA, 2005), uma flavona (BRAGA, 2005), e um flavona ramnoglicosilada cuja parte glucosídica é do tipo rutinosídeo (PÁDUA, 1976). O estudo fitoquímico da espécie *Hortia superba* proporcionou o isolamento de dois flavonóides, sendo uma flavanona, isosakuranetina, e uma flavanona ramnoglicosilada cuja parte glucosídica é do tipo rutinosídeo, a neoponcirina, relatada pela primeira vez para o gênero *Hortia*.

4.4.1 – Determinação estrutural da substância 10

A substância **10** foi isolada da fração hexânica (EHGHS) e da fração diclorometânica (EDGHS) proveniente do extrato etanólico dos galhos de *H. superba* e teve sua estrutura determinada através de experimentos de RMN ^1H e ^{13}C assim como também através da comparação com dados da literatura (VASCONCELOS *et. al.*, 1998).



10

Analisando o espectro de RMN ^1H de **10** (FIGURA 4.32) pode-se observar um sinal em δ 12,1 (1H, s) indicando a presença de hidrogênio de hidroxila

quelatogênica em C-5. Observa-se também dubletos em δ 7,38 (2H, *d*, $J=8,7$ Hz) relativos aos hidrogênios H-2' e H-6' e δ 6,95 (2H, *d*, $J=8,7$ Hz) relativos aos hidrogênios H-3'' e H-5' do anel B do esqueleto do flavonóide, sinais estes no mesmo deslocamento químico devido a simetria do anel B e sua livre rotação, proporcionando a presença do mesmo ambiente químico, e assim estes hidrogênios são considerados equivalentes.

Em δ 3,84 (3H, *s*) foi observado um sinal bastante intenso atribuído à metoxila ligada ao C-4' do anel B. É observado também sinais em δ 5,98 (1H, *d*, $J=2,1$ Hz) e em δ 5,96 (1H, *d*, $J=2,1$ Hz), os quais foram atribuídos aos hidrogênios H-6 e H-8, respectivamente, caracterizando o padrão de substituição do anel A, indicando que as posições C-5 e C-7 estão substituídas por hidroxilas. Os sinais em δ 5,37 (1H, *dd*, $J=13,0$ e $2,9$ Hz), δ 3,10 (1H, *dd*, $J=13,0$ e $17,1$ Hz) e δ 2,79 (1H, *dd*, $J=17,1$ e $2,9$ Hz) foram atribuídos respectivamente aos hidrogênios H-2, H-3 α e H-3 β do anel C do flavonóide, caracterizando uma flavanona.

A partir da análise dos espectros de RMN ^{13}C (FIGURA 4.35) foi possível confirmar e atribuir todos os carbonos do esqueleto da flavanona. Baseado na literatura a presença dos sinais em δ 96,7 e 95,5 Hz, foram atribuídos aos carbonos C-6 e C-8, respectivamente, característicos de carbonos aromáticos. Os sinais em δ 43,1 e δ 79,0 foram atribuídos aos carbonos C-3 e C-2, característico de carbono metilênico característico do esqueleto de uma flavanona e do carbono oximetínico, respectivamente. Já os sinais em δ 114,3 e δ 127,7 foram atribuídos aos carbonos C-3' e 5' e C-2' e 6', respectivamente. Também foi observado sinais bastante desblindados, em δ 164,9 atribuído ao C-5, em δ 164,3 é referente ao C-7 e o sinal em δ 163,3 ao C-9, característico de carbonos ligado a oxigênio. Um sinal em δ 103,1 foi atribuído ao carbono C-10 e um sinal em δ 196,1 ao C-4 da carbonila. De acordo com a literatura o sinal em δ 130,3 é atribuído ao C-1'. O C-4' apresentou um sinal em δ 160,0 bastante desblindado devido ao efeito da metoxila presente, e o sinal em δ 55,4 foi caracterizado pelo o carbono oximetílico presente no grupo metoxila. Assim, a estrutura **10** foi identificada como 5,7-diidroxil-4'-metoxiflavanona, Isosakuranetina.

TABELA 4.11: Dados de RMN ^1H e ^{13}C de **10** e comparação com a literatura.

H/C	SUBSTÂNCIA 10 (200, 50 MHz, CDCl_3)		VASCONCELOS, 1998 (300, 75 MHz, CDCl_3)	
	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm)	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm)
2	5,37 (1H, <i>dd</i> , $J=13,0$; 2,9)	79,0	5,36 (<i>dd</i> , $J=13,0$; 3,1)	78,9
3 α	3,10 (1H, <i>dd</i> , $J=17,1$; 13,0)	43,1	3,10 (<i>dd</i> , $J=17,2$; 13,5)	43,1
3 β	2,79 (1H, <i>dd</i> , $J=17,2$; 2,9)		2,79 (<i>dd</i> , $J=17,2$; 3,5)	
4	-	196,1	-	196,1
5	-	164,9	-	164,3
6	5,98 (1H, <i>d</i> , $J=2,1$)	96,7	6,00 (<i>d</i> , $J=2,3$)	96,7
7	-	164,3	-	164,9
8	5,96 (1H, <i>d</i> , $J=2,1$)	95,5	5,98 (<i>d</i> , $J=2,3$)	95,5
9	-	163,3	-	163,2
10	-	103,1	-	103,0
1'	-	130,3	-	130,3
2'				
6'	7,38 (2H, <i>d</i> , $J=8,7$)	127,7	7,38 (<i>d</i> , $J=8,7$)	127,7
3'				
5'	6,95 (2H, <i>d</i> , $J=8,7$)	114,3	6,95 (<i>d</i> , $J=8,7$)	114,2
4'	-	160,0	-	160,0
4'Ome	3,84 (3H, <i>s</i>)	55,4	3,84 (<i>s</i>)	55,4
5-OH	12,1 (1H, <i>s</i>)	-	12,1 (<i>s</i>)	-

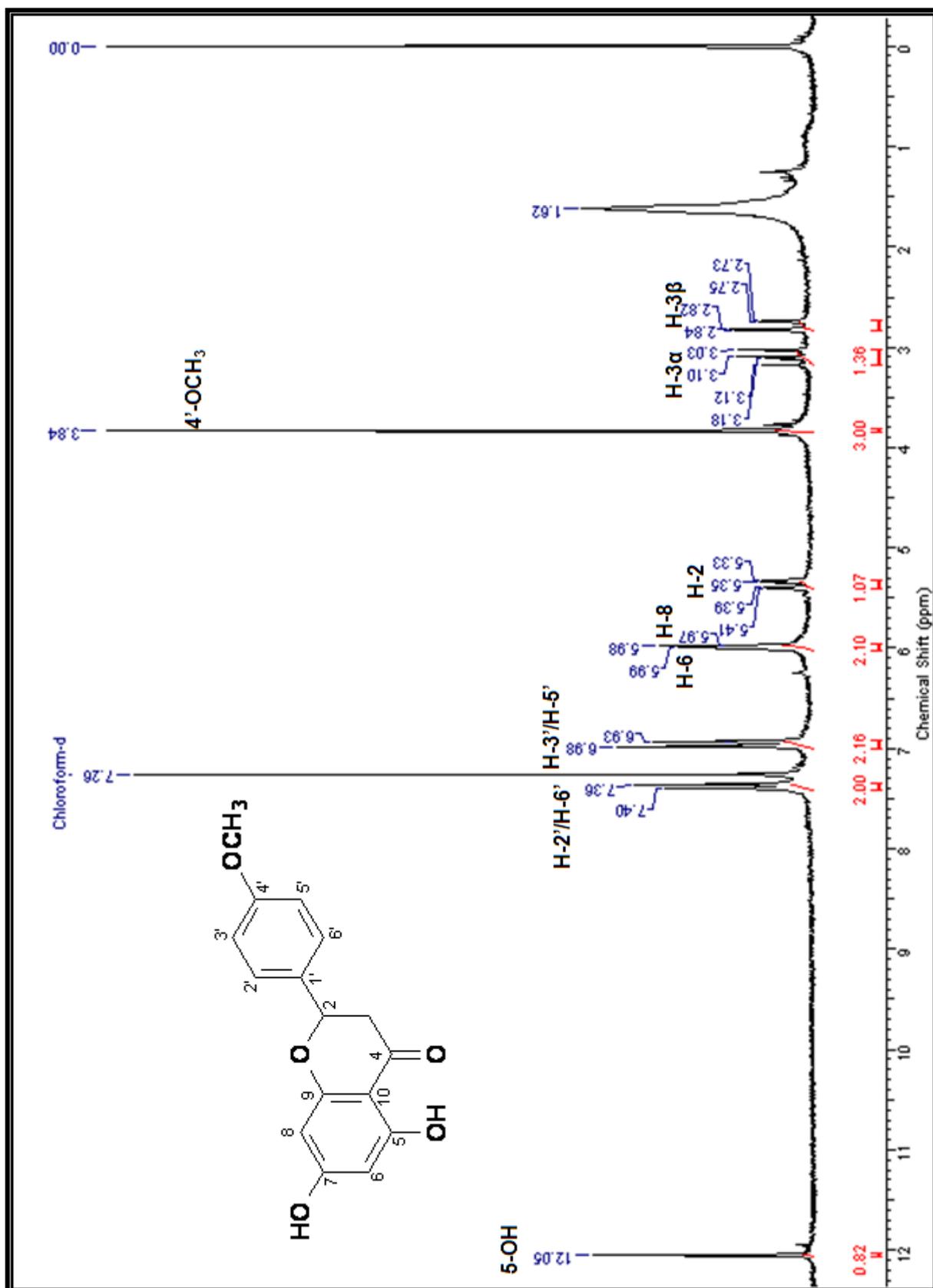


FIGURA 4.32: Espectro de RMN ¹H de **10** (200 MHz, CDCl₃).

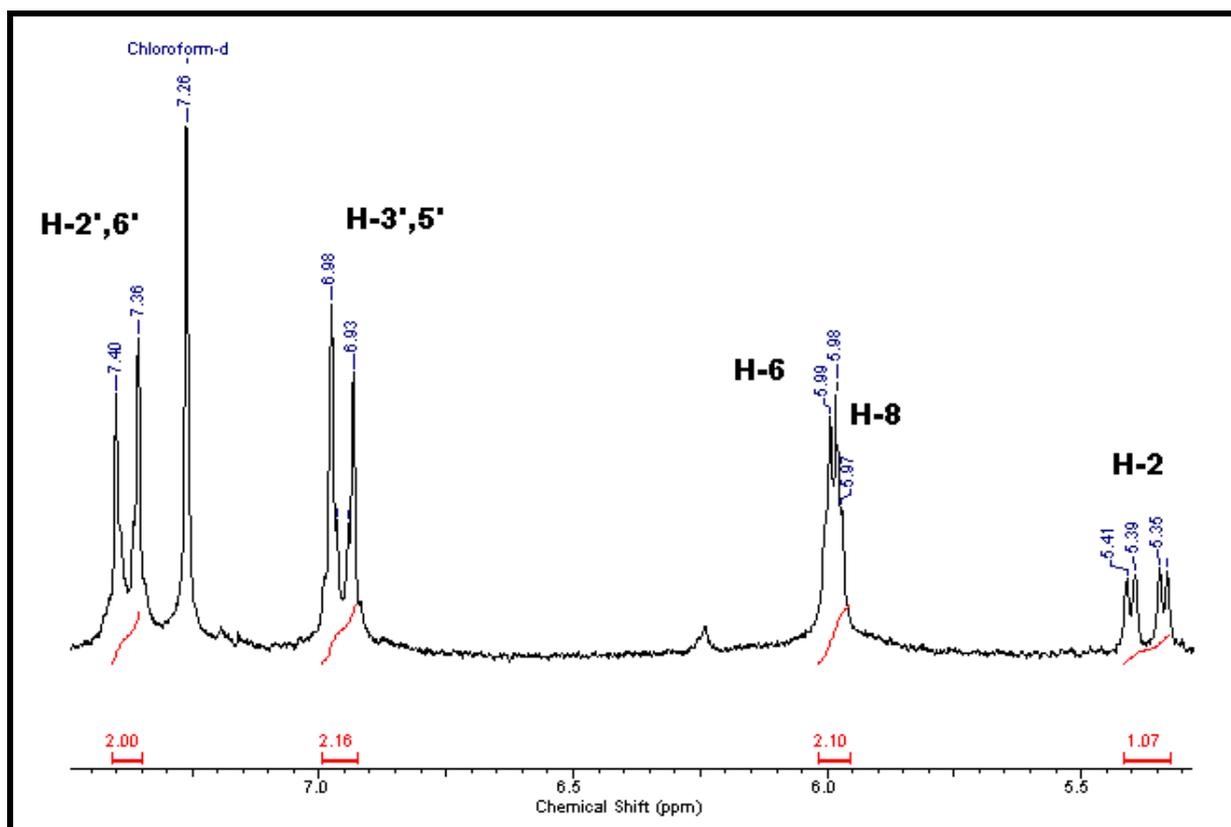


FIGURA 4.33: Ampliação da região δ 7,5 a 5,0 do espectro de RMN ¹H de **10**.

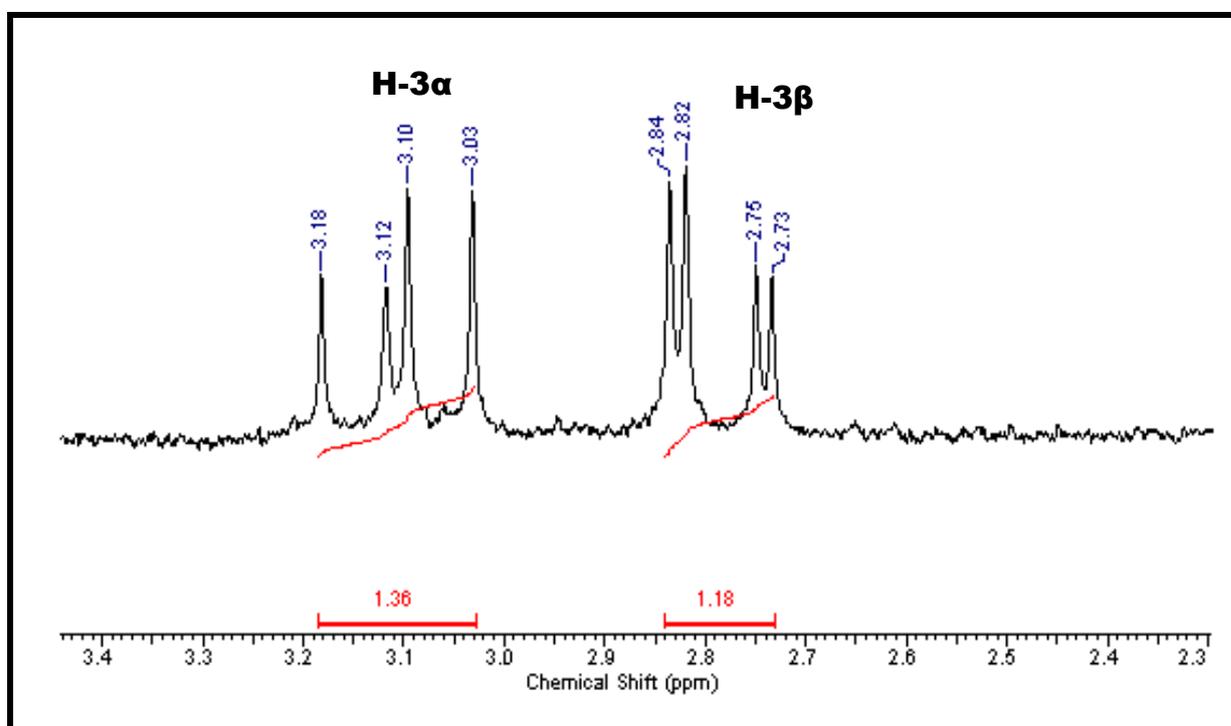


FIGURA 4.34: Ampliação da região δ 3,4 a 2,3 do espectro de RMN ¹H de **10**.

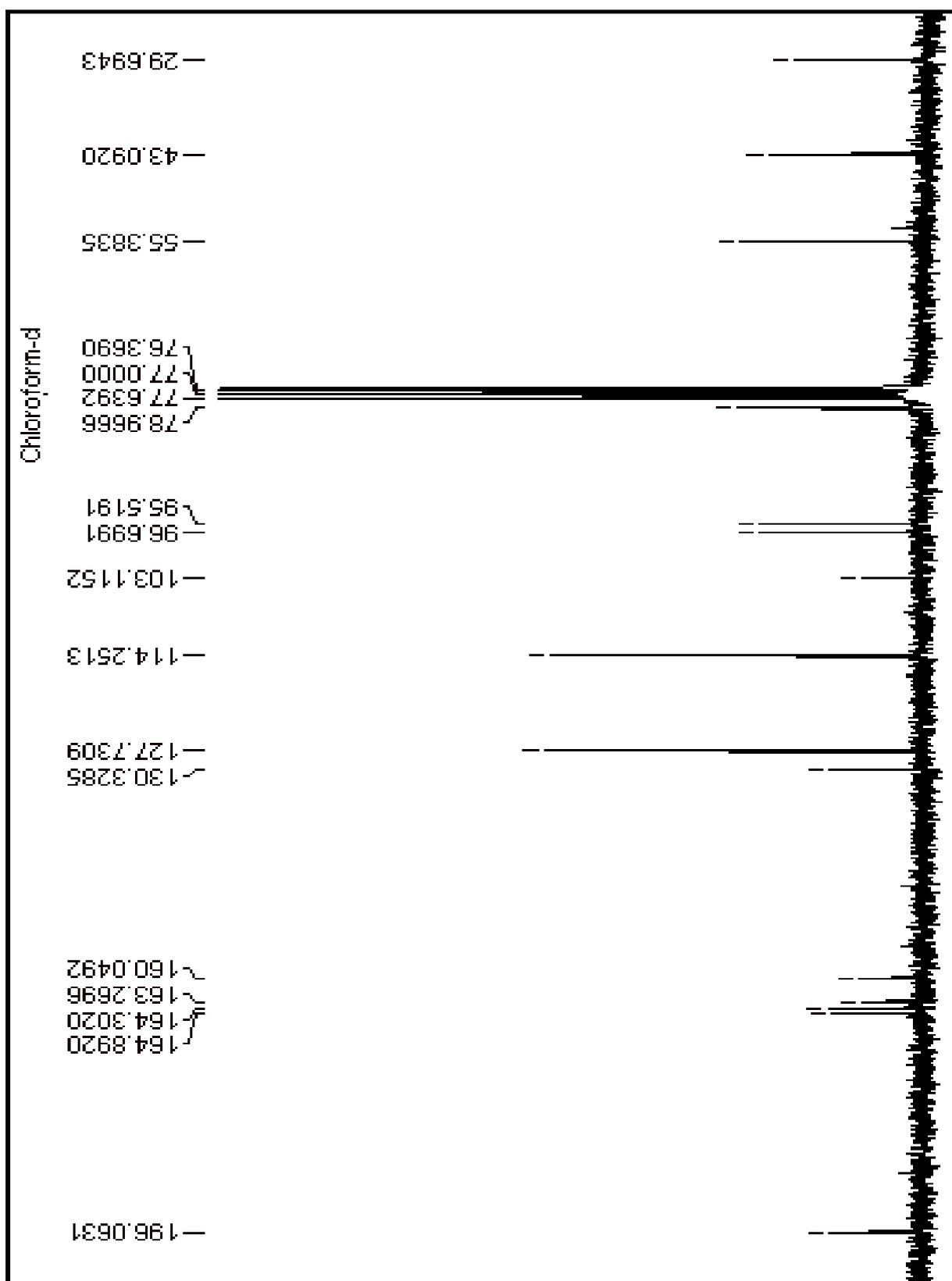
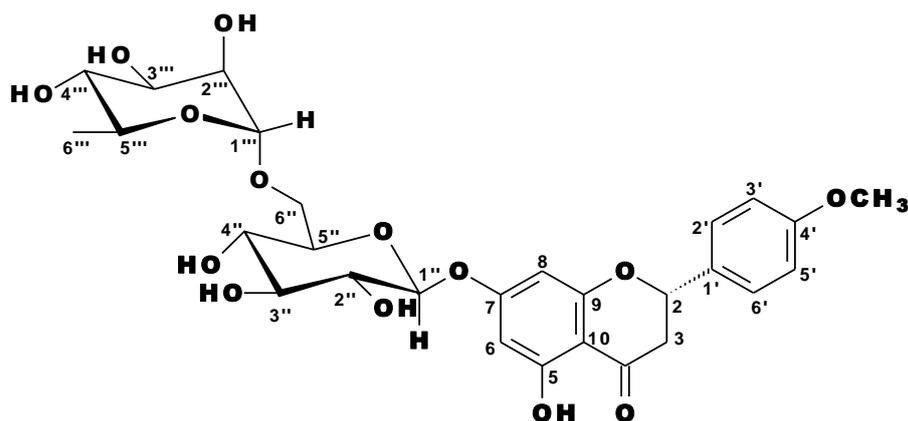


FIGURA 4.35: Espectro de RMN ^{13}C de **10** (50 MHz, CDCl_3).

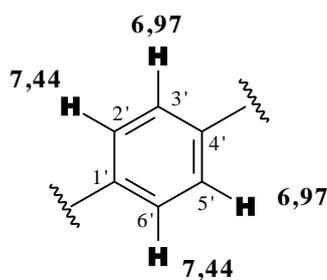
4.4.2 – Determinação estrutural da substância 11

A substância **11** foi isolada da fração diclorometânica (EDGHS) proveniente do extrato etanólico dos galhos de *H. superba* e teve sua estrutura determinada através de experimentos de RMN ^1H e ^{13}C , HSQC, HMBC e g-COSY, assim como também através da comparação com dados da literatura (KIM, 2007).



11

A partir do espectro de RMN de ^1H (FIGURA 4.36) foi observado dois doubletos bastante intenso na região de aromáticos, o qual mostra o padrão de substituição do anel B do flavonóide em questão, sinais estes em δ 7,44 (2H, *d*, $J=8,8$ Hz) relativos aos hidrogênios H-2' e H-6' e em δ 6,97 (2H, *d*, $J=8,8$ Hz) relativos aos hidrogênios H-3' e H-5'. Este padrão de substituição é caracterizado por apresentar sinais em um mesmo deslocamento químico, devido a simetria do anel B e sua livre rotação e assim, o mesmo ambiente químico, sendo estes hidrogênios considerados na literatura como equivalentes.

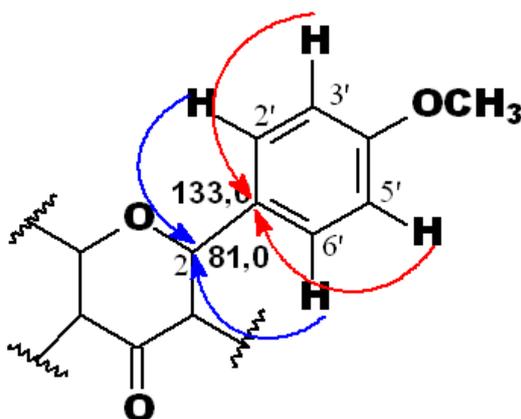


No espectro em 2D de correlação homonuclear de g-COSY foram observados as correlações existentes entre os hidrogênios H-2' e H-3' com os

hidrogênios H-5' e H-6'. O espectro de HSQC (FIGURA 4.42) mostra a correlação dos hidrogênios em δ 7,44 com os carbonos em δ 129,0 (C-2' e C-6') e dos hidrogênios em δ 6,97 com os carbonos em δ 115,0 (C-3' e C-5'). A análise do espectro de HMBC mostra a correlação do sinal em δ 7,44 à 3J com o carbono em δ 162,0 e a correlação à 2J do sinal em δ 6,97 com este mesmo carbono, sendo atribuído ao carbono C-4'.

Foi observado um sinal bastante intenso no espectro de RMN 1H em δ 3,80, característico de hidrogênio de grupo metoxila, e a partir da análise do HSQC foi observado a presença de uma correlação deste sinal em δ 3,80 com um carbono em δ 56,0 característico de carbono oximetílico, confirmando a presença de uma metoxila na estrutura. E assim, o espectro de HMBC mostrou uma correlação do sinal em δ 3,80 com o carbono em δ 162,0 levando a confirmar a substituição do C-4' por uma metoxila.

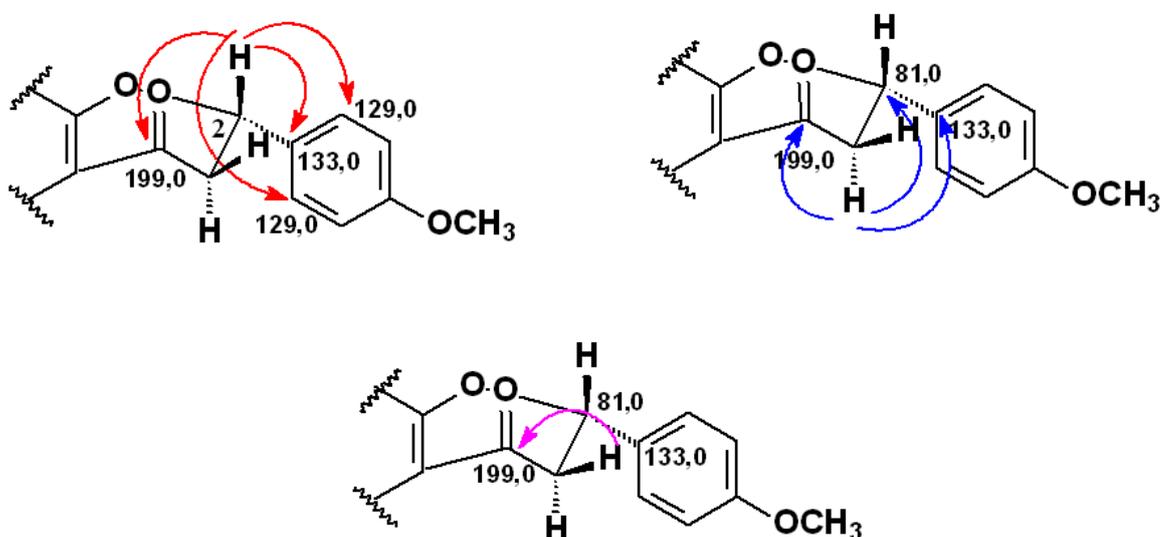
A partir da análise do espectro de HMBC foi observado correlações à 3J dos hidrogênios em δ 6,97 com um carbono em δ 133,0 (C-1'), e correlações à 3J dos hidrogênios em δ 7,44 com o carbono em δ 81,0 (C-2), carbono este característico de carbono oximetínico, que levou a sugerir a presença de uma flavanona.



O esqueleto do anel C da flavanona foi confirmado no espectro de RMN 1H pela presença de sinais característicos, principalmente pela presença de sinais na região de hidrogênios alifáticos: δ 3,17 (*dd*, $J = 17,2$ e $12,4$ Hz), δ 2,77 (*dd*, $J = 17,2$ e $2,4$ Hz) e um *dd* em δ 5,46 ($J = 12,4$ e $2,4$ Hz), que foram atribuídos aos hidrogênios H-3 α , H-3 β e H-2, respectivamente. O acoplamento geminal entre os

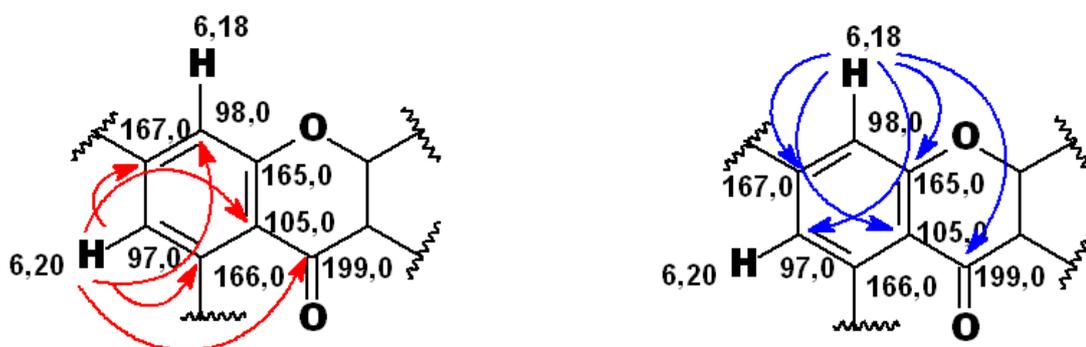
hidrogênios alifáticos (H-3 α e H-3 β) e o acoplamentos entre os hidrogênios H-3 α e H-3 β com o hidrogênio H-2 é observado no espectro de g-COSY (FIGURA 4.40).

No espectro de HMBC foi observado correlações à 2J do hidrogênio em δ 5,46 (H-2) com o carbono em δ 133,0 (C-1'), à 3J com os carbonos em δ 129,0 (C-2' e C-6') e à 3J em δ 199,0 (C-4). Observou-se correlações do hidrogênio em δ 3,17 (3 α) à 2J com o carbono em δ 81,0 (C-2), à 2J com o carbono em δ 199,0 (C-4) e à 3J com o carbono em δ 133,0 (C-1'). Já o hidrogênio em δ 2,77 (3- β) mostrou apenas uma correlação à 2J com o carbono em δ 199,0 (C-4).



O padrão de substituição do anel A da flavanona foi reconhecido pelos dois dubletos com acoplamento *meta* em δ 6,20 (1H, *d*, $J=2,4$ Hz) e em δ 6,18 (1H, *d*, $J=2,4$ Hz) mostrados no espectro de RMN ^1H . Analisando o espectro de HSQC foi observado uma correlação do hidrogênio em δ 6,20 com o carbono em δ 98,0 (C-6) e a correlação do hidrogênio em δ 6,18 com o carbono em δ 97,0 (C-8). Analisando o espectro de HMBC foi observado correlações do hidrogênio em δ 6,20 à 2J com os carbonos em δ 166,0 (C-5) e δ 167,0 (C-7), à 3J com os carbonos em δ 98,0 (C-8) e δ 105,0 (C-10) e uma correlação à 4J com o carbono da carbonila em δ 199,0 (C-4). A correlação do hidrogênio em δ 6,20 com o carbono em δ 166,0, confirmou o deslocamento do H-6, pois o H-8 não faz esta correlação com este carbono. E assim, o sinal em δ 6,18 mostrou correlações à 2J com os carbonos em δ 167,0 (C-7) e δ 165,0 (C-9), à 3J com os carbonos em δ 97,0 (C-6) e δ 105,0 (C-10) e uma correlação à 4J com o carbono da carbonila em δ 199,0 (C-4). A correlação

observada no HMBC do sinal em δ 6,18 com o carbono em δ 165,0 confirmou o deslocamento químico para o H-8. Estas correlações podem ser observadas abaixo:



Devido os experimentos de RMN ^1H , HSQC, HMBC e COSY ter sido realizados em MeOD impossibilitou a observação de algum hidrogênio de hidroxila quelatogênica que poderia estar presente na posição C-5 do anel A da flavanona e assim foi realizado um experimento de RMN ^1H utilizando como solvente DMSO- d_6 , e com isso, foi observado um sinal em δ 12,0 indicando a presença de uma hidroxila na posição C-5.

A presença de dois resíduos de açúcares na estrutura desta substância foi confirmada devido a presença dos sinais em δ 4,69 (*d*, $J=1,6$ Hz) e δ 4,94 (*d*, $J = 6,8$ Hz) que são característicos de hidrogênios anoméricos atribuídos a H-1''' e H-1'', respectivamente. A constante de acoplamento dos sinais dos hidrogênios anoméricos, freqüentemente, indica a configuração do glicosídeo ligado na aglicona, e assim foi observado a presença de uma β -glicose devido apresentar um dubleto com uma alta constante de acoplamento, isso é devido ao acoplamento diaxial do H-1''' com H-2'', e uma α -ramnose que apresentou um dubleto com uma constante bastante pequena, e isso é devido ao seu acoplamento diequatorial do H-1''' com o H-2''', no entanto no caso da ramnose esta diferença de configuração não é tão evidente, e foi confirmada em comparação aos dados da literatura.

Os demais hidrogênios carbinólicos da unidade glucosídica estão entre δ 3,30-4,10 e um dubleto em δ 1,12 (3H, H-6''', $J = 6,4$ Hz) é correlacionado a metila da unidade da ramnose. A principal dificuldade enfrentada para caracterizar a estrutura deste flavonóide glicosilado, utilizando principalmente os dados de COSY, envolveu a confirmação dos sinais de hidrogênio das unidades de açúcares. Analisando o espectro de HMBC (FIGURA 4.43) foi observado uma correlação do hidrogênio anomérico da β -glicose em δ 4,94 com o carbono em δ 167,0 e assim, foi

confirmada a substituição de uma unidade de β -glicose no C-7 como açúcar primário. O valor do deslocamento do C-7 alto em δ 167,0, indica a presença de uma unidade O-glicosídica que provoca esta alta desblindagem. Foi observado também correlações no HMBC (FIGURA 4.43) do hidrogênio anomérico da ramnose em δ 4,69 com os carbonos em δ 66,7, δ 70,0, e δ 72,3, confirmando a unidade de ramnose como açúcar secundário ligado à glicose pela posição C-6'', numa ligação O-glicosídica, isso é confirmado devido a desblindagem do carbono C-6'' em δ 66,7, que geralmente quando não há substituintes nesta posição são blindados em torno de δ 60,0.

Foi realizado o experimento de RMN ^{13}C (FIGURA 4.41) em DMSO- d_6 afim de dados comparativos com a literatura, e assim a partir de comparação dos deslocamentos químicos em DMSO- d_6 da substância 11 com dados descritos na literatura para a neoponcirina revelou dados praticamente idênticos, mostrando ser a mesma substância. O espectro de RMN ^{13}C corrobora com o exposto anteriormente, uma vez que apresenta sinais característicos de flavanona, como uma carbonila referente ao C-4 em δ 197,1 e o CH_2 em δ 41,9 referente ao C-3 da flavanona. Assim, a estrutura 11 foi identificada como a flavanona, 7-O-rutinosídeo-5-hidroxi-4'-metoxiflavanona, neoponcirina, primeira vez relatada para o gênero *Hortia*.

TABELA 4.12: Dados de RMN ¹H em MeOD e DMSO-*d*₆ de **11** e comparação com a literatura.

	SUBSTÂNCIA 11 (400 MHz, MeOD)	SUBSTÂNCIA 11 (200 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	KIM, 2007 (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)
¹ H	δ (ppm), <i>J</i> (Hz)	δ (ppm), <i>J</i> (Hz)	δ (ppm), <i>J</i> (Hz)
2	5,46 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =12,4; 2,4)	5,57 (<i>dd</i> , <i>J</i> =12,6; 2,9)	5,57 (<i>dd</i> , <i>J</i> =12,6; 2,9)
3α	3,17 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =17,2; 12,4)	3,13 (<i>dd</i> , <i>J</i> =17,2; 12,6)	3,13 (<i>dd</i> , <i>J</i> =17,2; 12,6)
3β	2,77 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =17,2; 2,4)	2,78 (<i>dd</i> , <i>J</i> =17,2; 2,9)	2,78 (<i>dd</i> , <i>J</i> =17,2; 2,8)
4	-	-	-
5	-	-	-
6	6,20 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =2,4)	6,12 (<i>d</i>)	6,13 (<i>d</i> , <i>J</i> =2,8)
7	-	-	-
8	6,18 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =2,4)	6,12 (<i>d</i>)	6,13 (<i>d</i> , <i>J</i> =2,8)
9	-	-	-
10	-	-	-
1'	-	-	-
2'	-	-	-
6'	7,44 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> =8,8)	7,47 (<i>d</i> , <i>J</i> =8,8)	7,47 (<i>d</i> , <i>J</i> =8,8)
3'	-	-	-
5'	6,97 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> =8,8)	6,98 (<i>d</i> , <i>J</i> =8,8)	6,98 (<i>d</i> , <i>J</i> =8,8)
4'	-	-	-
4'Ome	3,80 (3H, <i>s</i>)	3,76 (<i>s</i>)	3,77 (<i>s</i>)
5-OH	-	12,0 (<i>s</i>)	12,0 (<i>s</i>)
1''	4,94 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =6,8)	4,98 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =6,9)	4,98 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =7,4)
1'''	4,69 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =1,6)	4,51(<i>s</i>)	4,52 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =0,8)
6'''	1,19 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> =6,4)	1,08 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> =5,8)	1,08 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> =6,2)
prótons glicosídico s	3.30-4.00 (<i>m</i>)	3.16–3.43 (<i>m</i>)	3.16–3.43 (<i>m</i>)

TABELA 4.13: Dados de RMN ^{13}C em DMSO- d_6 de **11** e comparação com a literatura.

^{13}C	SUBSTÂNCIA 11	KIM, 2007
	(100 MHz, DMSO- d_6)	(100 MHz, DMSO- d_6)
	δ (ppm)	δ (ppm)
1	197,0	197,1
2	78,3	78,3
3	41,9	41,7
4	-	-
5	163,0	163,0
6	96,5	96,5
7	165,1	165,1
8	95,5	95,5
9	162,6	162,5
10	103,3	103,3
1'	130,5	130,3
2'; 6'	128,5	128,5
3'; 5'	113,9	113,9
4'	159,5	159,5
OCH ₃	55,2	55,2
1''	100,7	100,6
2''	73,0	73,0
3''	75,5	75,6
4''	69,7	69,6
5''	76,2	76,2
6''	66,0	66,0
1'''	99,4	99,4
2'''	70,3	-
3'''	70,8	70,7
4'''	72,1	72,1
5'''	68,3	68,3
6'''	17,8	17,8

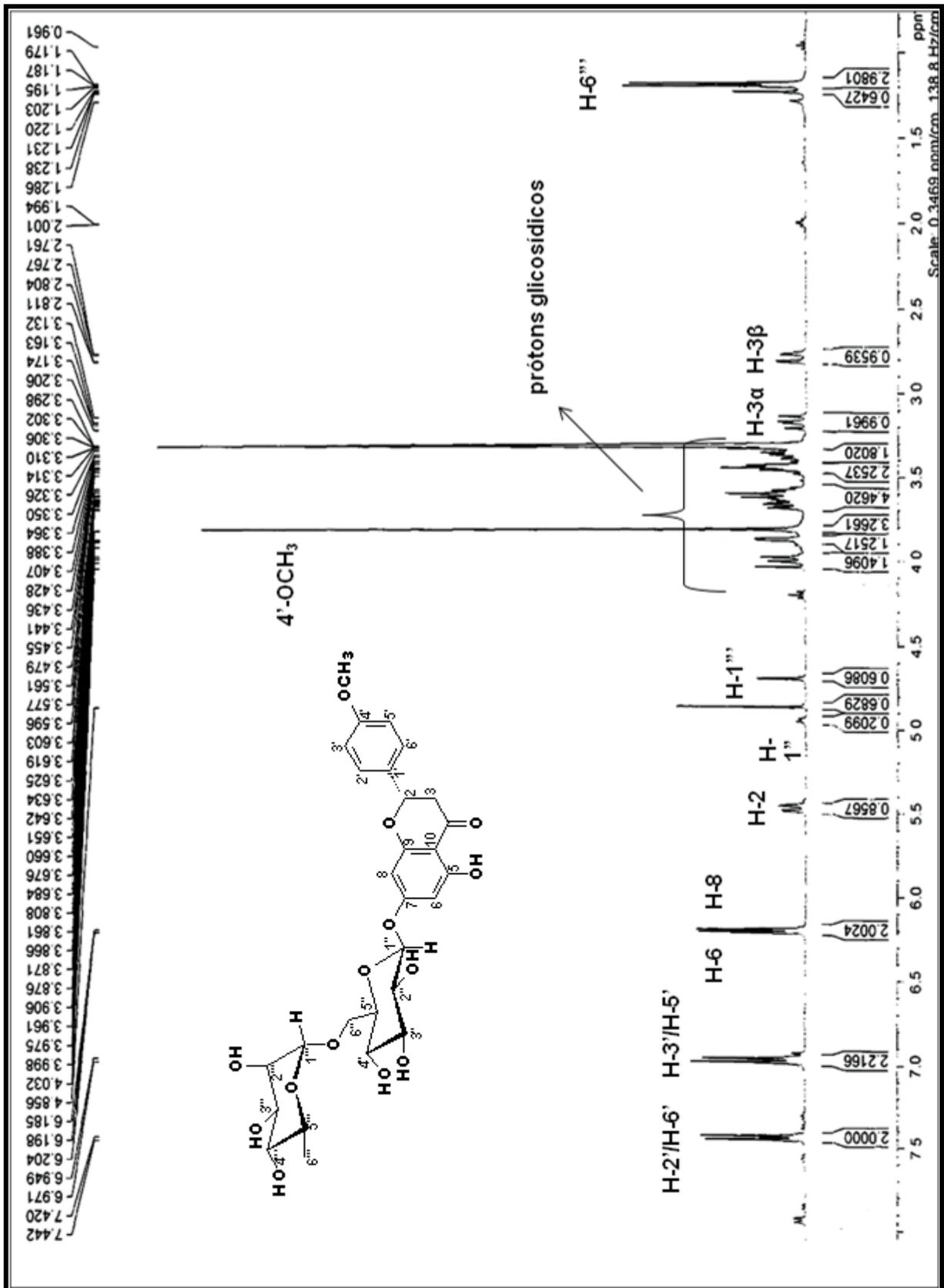


FIGURA 4.36: Espectro de RMN ^1H de **11** (400 MHz, MeOD).

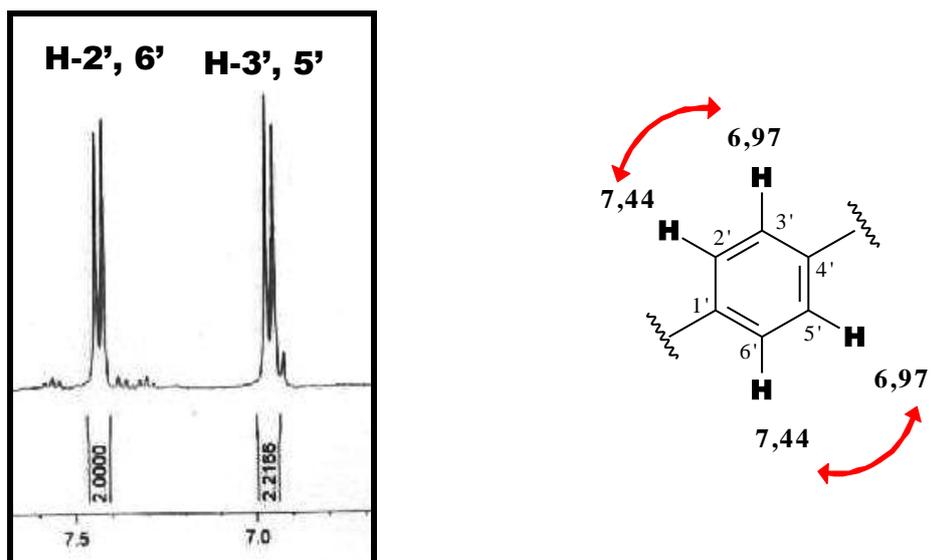


FIGURA 4.37: Ampliação dos sinais dos hidrogênios aromáticos do anel B no espectro de RMN ^1H de **11** e os acoplamentos observados.

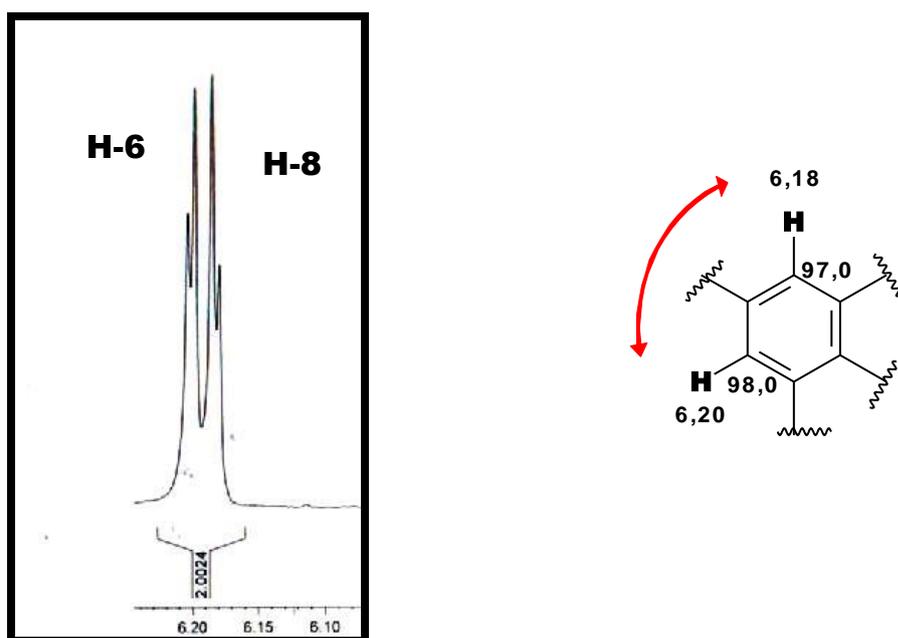


FIGURA 4.38: Ampliação dos sinais dos hidrogênios aromáticos do anel A no espectro de RMN ^1H de **11** e os acoplamentos observados

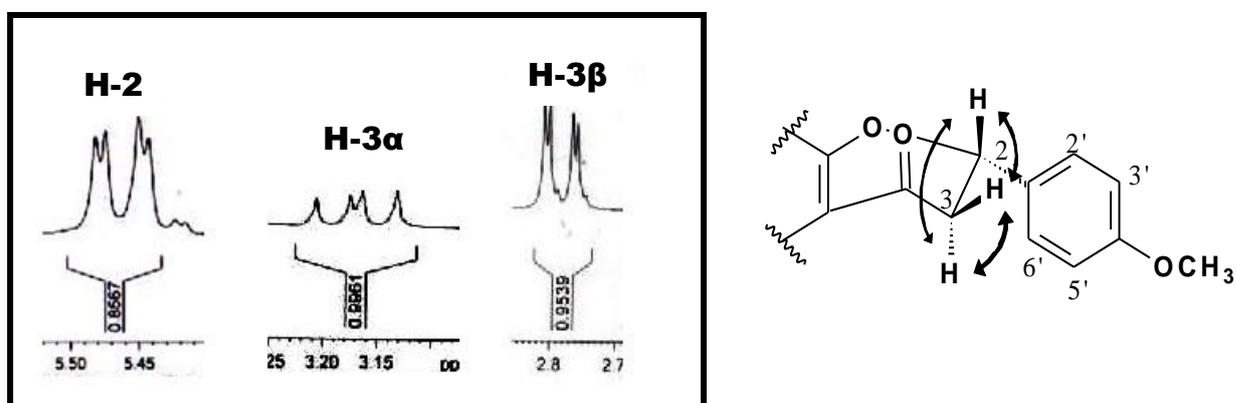


FIGURA 4.39: Ampliação dos sinais dos hidrogênios alifáticos no espectro de RMN ^1H de **11** e os acoplamentos observados.

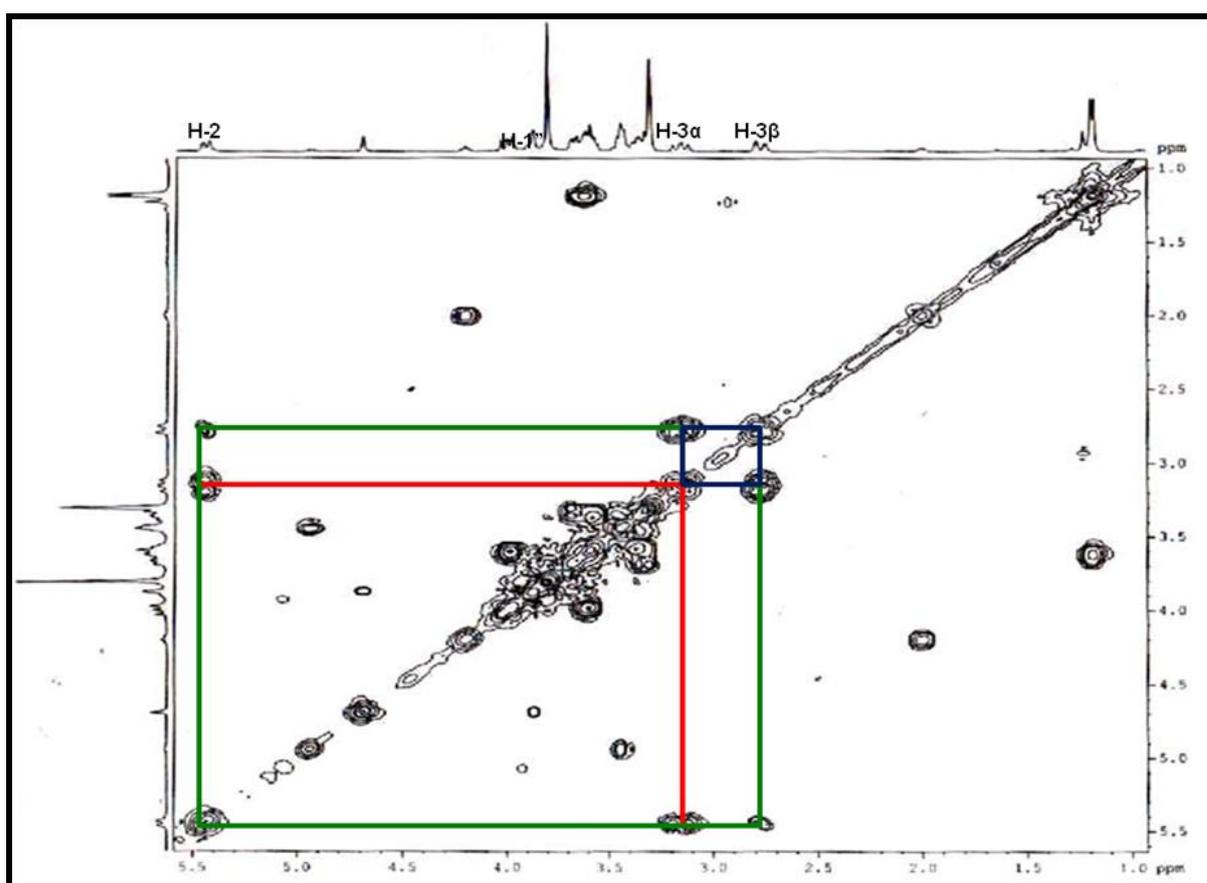


FIGURA 4.40: Espectro de g-COSY (ampliação) de **11** (400 MHz, MeOD).

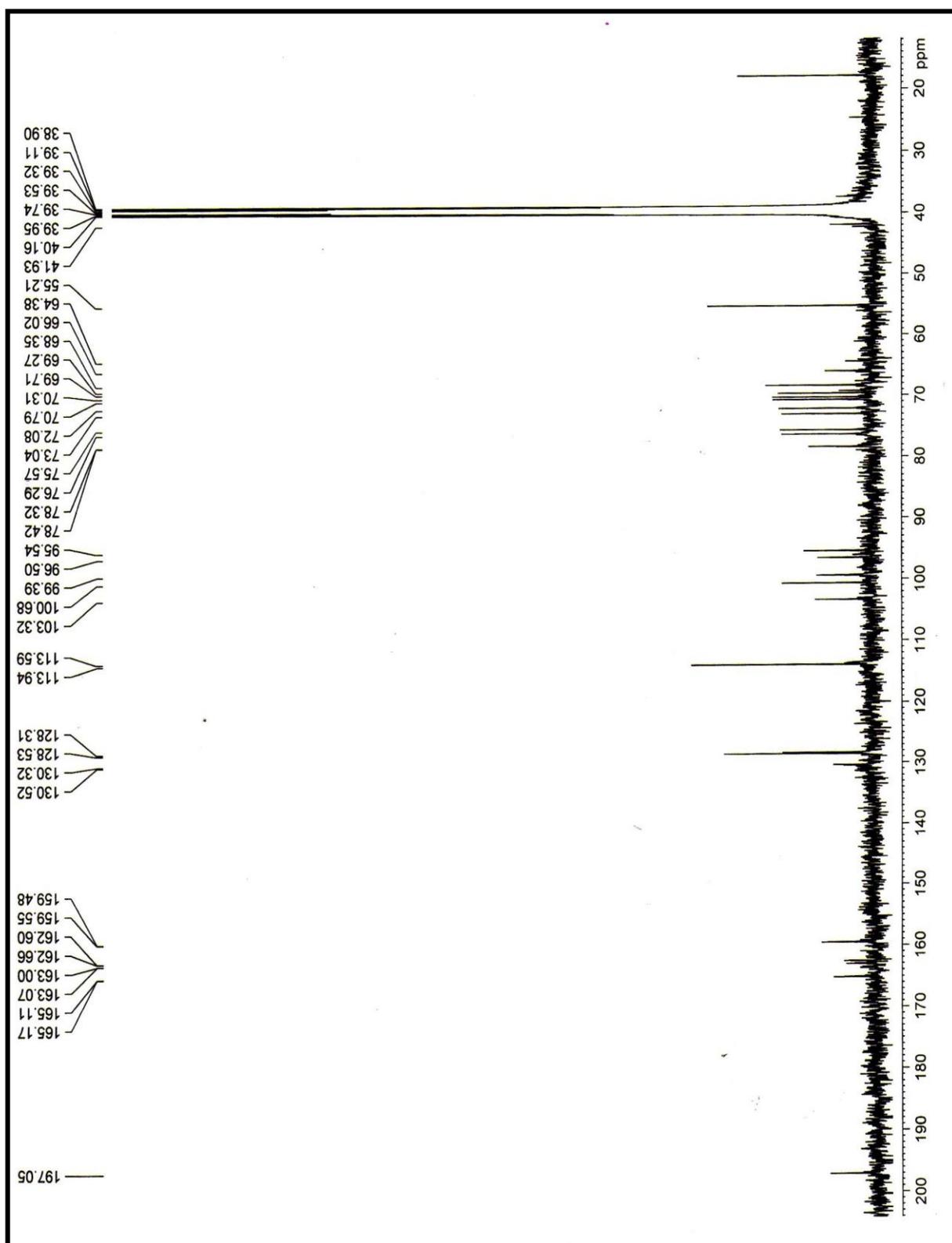


FIGURA 4.41: Espectro de RMN ^{13}C de **11** (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

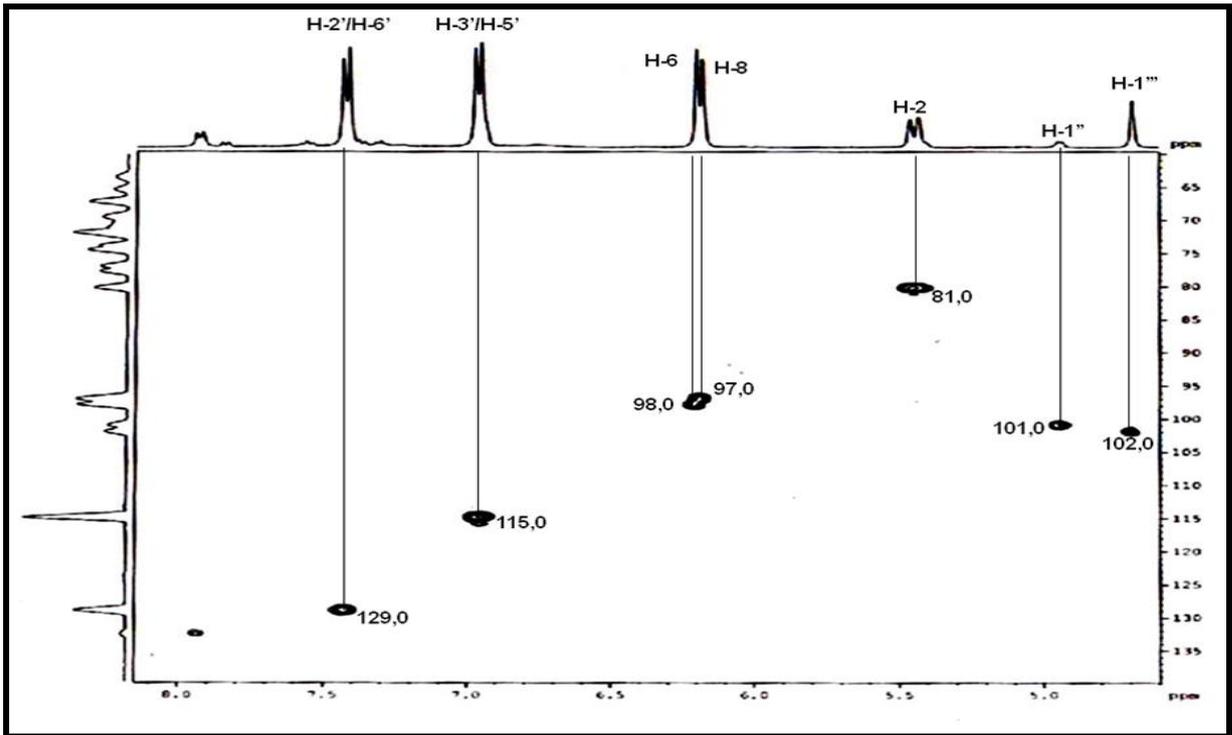


FIGURA 4.42: Mapa de contorno de HSQC (ampliação) de 11 (400 MHz, MeOD).

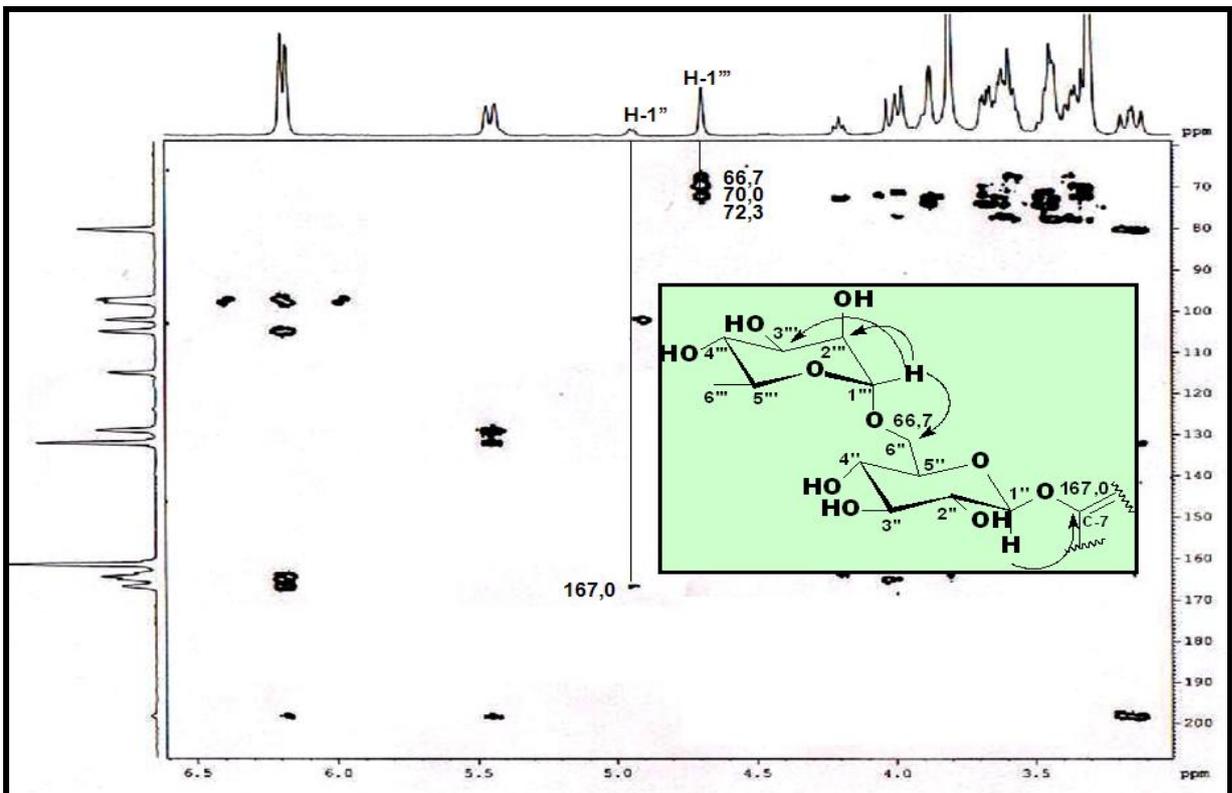
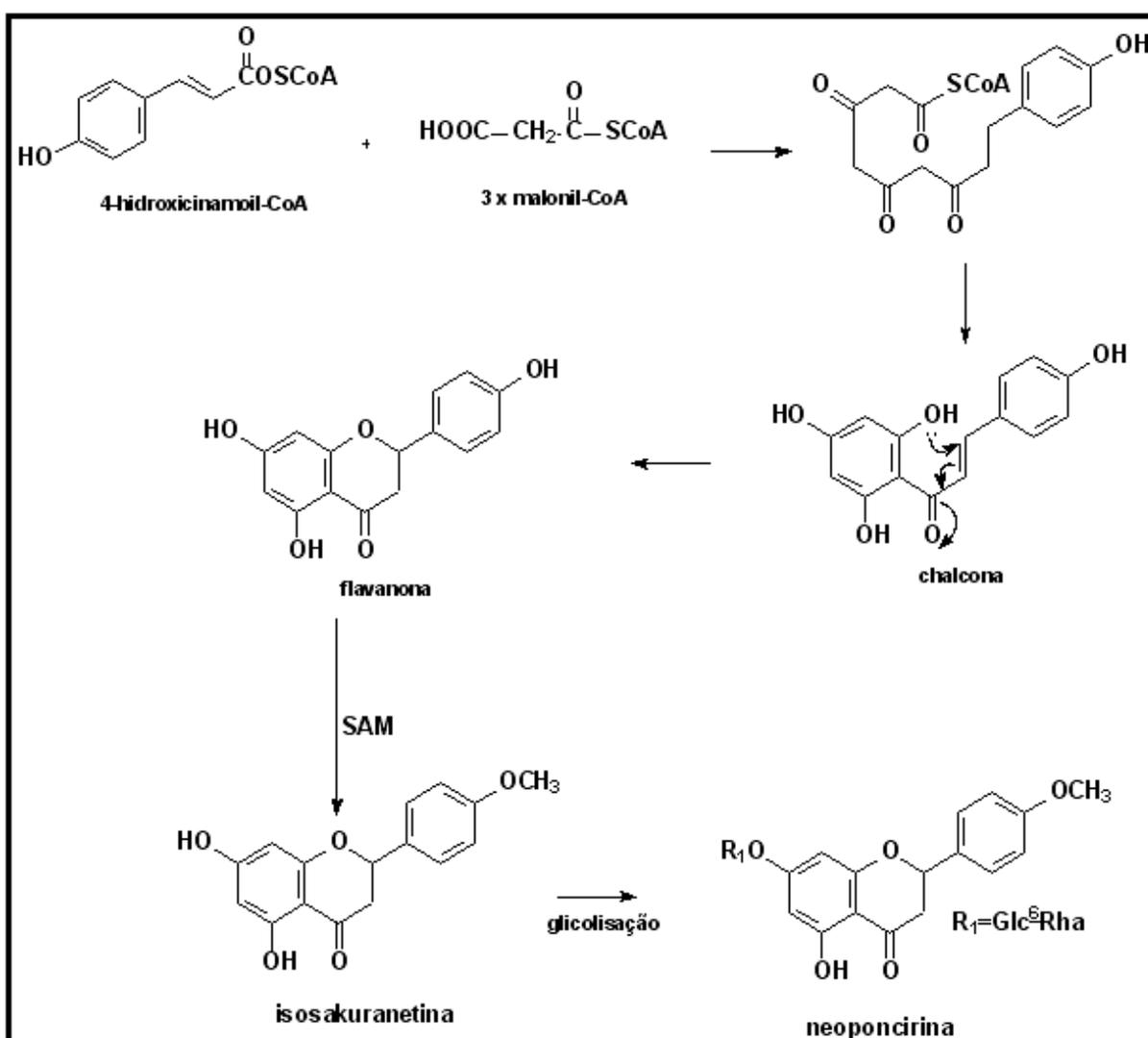


FIGURA 4.43: Mapa de contorno de HMBC (ampliação) de 11 (400 MHz, MeOD).

4.4.3. Biogênese dos Flavonóides

Os flavonóides são originários de uma rota biossintética mista. Eles são biossintetizados a partir da condensação de uma unidade de 4-hidroxicinamoil-CoA originada do caminho chiquimato com três unidades de malonil-CoA integrantes da rota do acetato, e assim são formadas as chalconas sob ação da enzima chalcona sintase. A partir da chalcona, todos os demais derivados dos flavonóides são formados (DEWICK, 2002). Uma representação da biogênese dos flavonóides isolados encontra-se no ESQUEMA 4.9.



ESQUEMA 4.8: Proposta biogênica para as substâncias 10 e 11.

5 - ENSAIOS FUNGICIDAS FRENTE à *Guignardia citricarpa*

O isolado do fungo *Guignardia citricarpa* foi cedido pela Dra. Ana Carla Oliveira da Silva Pinhati juntamente com o Prof. Dr. Marcos Antonio Machado do Centro de Citricultura “Sylvio Moreira - APTA”, localizado em Cordeirópolis-SP. O fungo foi trazido em placa de Petri contendo meio de cultura BDA (batata - dextrose - ágar) e a adaptação da metodologia de ensaio foi realizada no Laboratório de Fitopatologia da ESALQ/USP (Piracicaba-SP), sob colaboração do Prof. Dr. Sérgio F. Pascholati. Foram realizados estudos de otimização dos melhores meios de cultura para seu melhor crescimento, assim como ambiente e temperatura adequada. Segundo levantamento bibliográfico (MAGNANI, 2002; RIBEIRO, 2006; TOFFANO, 2005), foram realizados ensaios biológicos frente à *G. citricarpa* de duas formas: primeiro realizou-se o ensaio de inibição de *G. citricarpa in vitro* pelo método de difusão em ágar, e em seguida, o ensaio de inibição de *G. citricarpa in vitro*, pelo método de germinação de esporos em placas de poliestireno.

Os ensaios biológicos frente à *G. citricarpa* realizados neste trabalho basearam-se na inibição de *G. citricarpa in vitro* frente ao crescimento micelial utilizando o método de incorporação em meio de cultura e inibição de *G. citricarpa in vitro* pelo método de germinação de esporos em placas de poliestireno.

5.1- Procedimento Experimental

Os ensaios biológicos foram realizados no Laboratório de Bioensaios do Departamento de Química da UFSCar, sob orientação do Dr. Leonardo Toffano.

5.1.1- Materiais e Reagentes

- ❖ BDA comercial da acumedia;
- ❖ H₂O destilada;
- ❖ DMSO grau HPLC, da TEDIA Brazil;
- ❖ Lactofenol;
- ❖ Etanol 70%;
- ❖ Placas de Petri ($\Phi = 9$ cm) e de ($\Phi = 7$ cm);

- ❖ Placas de poliestireno;
- ❖ Eppendorf BD (1,5 mL);
- ❖ Pipetas volumétricas;
- ❖ Lamínula (18 x 18 mm) (0.13-0.17MM);
- ❖ Paquímetro;
- ❖ Alça de Drigalski;
- ❖ Filme PVC transparente;
- ❖ Câmara de Neubauer New Optik (0,002 mm²/0,100 mm);

5.1.2- Equipamentos

- ❖ Câmara de fluxo laminar Veco VL FS-12M;
- ❖ Estufa com fotoperíodo e termoperíodo / B.O.D Eletrolab;
- ❖ Autoclave vertical Phoenix AV 75;
- ❖ Microscópio óptico (até 1000 x) L 2000A;
- ❖ Balança analítica Modelo AND202.

5.2 - Preparo do inóculo para ensaio

Todos os fungos foram cultivados em meio BDA comercial (39 g/1L de H₂O). Para o preparo dos meios, primeiramente, o meio sólido foi pesado de acordo com o volume final de meio desejado, adicionando-se a massa necessária e solubilizando-a com água destilada, em agitação até a homogeneização.

Em seguida, a solução de meio BDA foi adicionada em frascos de Erlenmeyer, sendo a mesma esterilizada em autoclave por 20 minutos a 120 °C. Posteriormente, em meio fudente (\pm 50 °C), foi vertido em placas de Petri (Φ =9 cm), em câmara de fluxo laminar com total assepsia, e logo após a solidificação dos meios, o fungo foi repicado e adicionado nas placas com o meio sólido e posteriormente mantido BOD sob luz fluorescente, à 25 °C. Para os ensaios com a *G. citricarpa* foram necessários de 21 dias de cultivo. Após isso, os fungos estavam aptos para os testes de inibição frente ao crescimento micelial, germinação e formação de apressórios.

5.3 - Metodologia dos ensaios de inibição ao desenvolvimento de *G. citricarpa*

5.3.1 - Ensaio de inibição de *G. citricarpa in vitro* frente ao crescimento micelial

Para a avaliação da inibição do crescimento micelial de *G. citricarpa* frente aos compostos naturais, foi utilizado o método de incorporação em meio de cultura. O meio sólido de cultura utilizado foi BDA e para cada tratamento realizou-se uma solução da substância pura utilizando 6 mg de substância dissolvida em 300 μL de DMSO para um total de 5 repetições. A incorporação foi realizada diretamente ao meio fundente ($\pm 50\text{ }^{\circ}\text{C}$), após a autoclavagem, durante o experimento no fluxo laminar, onde a solução da amostra foi incorporada em 60 mL de meio BDA, resultando numa concentração da amostra de aproximadamente $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (amostra/mL de BDA). Para cada tratamento foi realizado um controle positivo, que consistiu em 300 μL de DMSO em 60 mL de meio BDA fundente, para 5 repetições. O sistema incorporado foi vertido em um total de 5 placas de Petri ($\Phi = 7\text{ cm}$). Após a solidificação dos meios, discos de micélio de 0,5 cm de diâmetro do fungo (cultivados em BDA) foram transferidos para o centro das placas contendo BDA mais substância incorporada e BDA acrescido de 300 μL de DMSO, no caso da testemunha. As placas foram mantidas à $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, sob luz fluorescente com fotoperíodo de 12 h.

As avaliações do crescimento micelial foram realizadas a cada 3 dias, utilizando-se paquímetro e subtraindo-se o diâmetro do disco de micélio inicial, totalizando 21 dias. Foram calculadas as médias de crescimento micelial para os compostos ensaiados. Esta metodologia de ensaio foi aplicada para 4 substâncias naturais, escoparona (**01**), N-metil-4-metoxi-2-quinolona (**02**), prangol (**03**) e isosakuranetina (**04**), representadas na FIGURA 5.1, todas isoladas de espécies de *Hortia* em estudo.

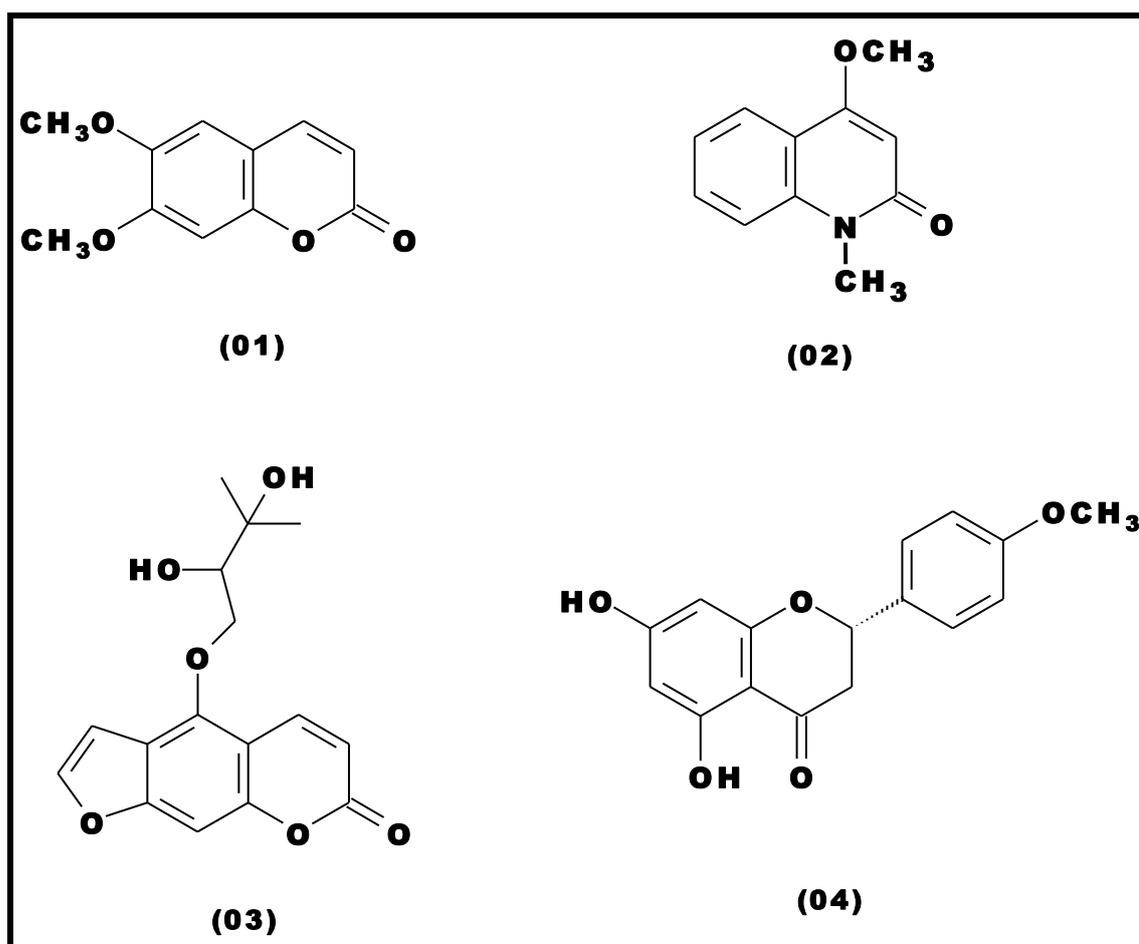


FIGURA 5.1: Substâncias submetidas aos ensaios de inibição frente ao desenvolvimento de *G. citricarpa*.

5.3.2 - Ensaio de inibição de *G. citricarpa in vitro* frente à germinação de esporos e formação de apressórios

Para a obtenção de uma suspensão de esporos de *G. citricarpa* (10^5 esporos.mL⁻¹) utilizou-se um cultivo de *G. citricarpa* em meio BDA. Em seguida, realizou-se soluções estoques dos compostos naturais ensaiados, o qual utilizou-se 1 mg de substância pura, solubilizada em 50 µL de DMSO, em 10 mL de água destilada esterilizada, obtendo uma concentração de 100 µg.mL⁻¹ (substância/H₂O). Logo após, as placas de poliestireno receberam 30 µL da solução de cada substância e 30 µL da suspensão de esporos de *G. citricarpa* (10^5 esporos.mL⁻¹), totalizando 4 repetições por placa. Como testemunha foi preparada uma solução de 10 mL de água destilada esterilizada, contendo 50 µL de DMSO. As placas foram vedadas com filme PVC transparente a fim de manter a umidade, e conservada a 25° C, sob luz fluorescente com fotoperíodo de 12h, por 24 h. Após este período, a

porcentagem da germinação e formação de apressórios foi avaliada através da observação em microscópio óptico (aumento de 100 x). Foram considerados como germinados os esporos com tubo germinativo de tamanho igual ou superior ao comprimento dos esporos não germinados.

Para esta metodologia (FIGURA 5.2), foram testadas as mesmas substâncias ensaiadas frente ao crescimento micelial, representadas na FIGURA 5.1.

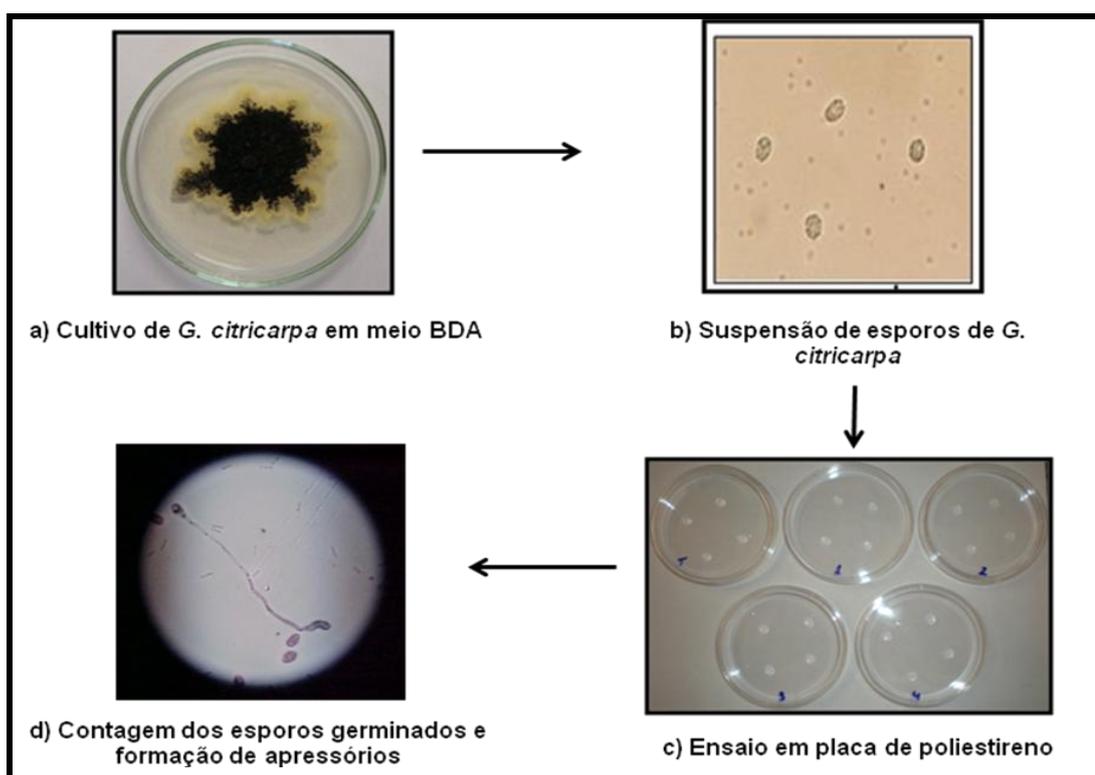


FIGURA 5.2: Metodologia do ensaio de inibição *in vitro* frente à *G. citricarpa* pelo método de germinação de esporos em placa de poliestireno.

5.4 – Resultados e Discussões

A partir dos estudos de otimização para o desenvolvimento de *Guignardia citricarpa*, foi observado que seu desenvolvimento é favorecido em boas condições de luminosidade, uma temperatura ideal em torno de 25° C, e em meio de cultura BDA. O aparecimento das lesões da mancha preta dos citros é favorecido pela luminosidade combinada com altas temperaturas, sendo comum encontrar frutos com maior número de lesões na face exposta à luz do sol (FUNDECITRUS, 2008).

Todos as substâncias ensaiadas foram isoladas de espécies de *Hortia* a partir do estudo fitoquímico realizado neste trabalho, no entanto, apenas algumas delas foram ensaiadas, pois algumas substâncias apresentaram contaminação e insuficiência de massa para a realização dos ensaios.

As substâncias submetidas aos ensaios foram solubilizadas em DMSO, já que o mesmo em pequena quantidade não tem efeito no desenvolvimento de *G. citricarpa*, e devido a grande dificuldade em solubilizar os compostos em uma solução aquosa, ideal para o ensaio. Foram realizados ensaios preliminares sob o efeito do DMSO e possível interferência nos resultados, e em quantidade mínima foi possível sua utilização.

5.4.1 - Efeito dos compostos naturais frente ao crescimento de *G. citricarpa*

As avaliações do crescimento micelial foram realizadas a cada 3 dias conforme ilustrado na FIGURA 5.3, onde se baseou no centro de aplicação do inóculo como referencial para as medidas, já que o crescimento não é uniforme. Dessa forma, realizou-se a medida na horizontal e na vertical em centímetros, e subtraiu em cada medida o diâmetro do inóculo aplicado inicialmente. Assim, realizou-se a média de crescimento micelial para cada placa analisada. É visualizado a partir do GRÁFICO 5.1, a média de crescimento micelial calculada para os compostos naturais ensaiados, observada em 21 dias de ensaio, obtida a partir da média das 5 repetições em cada avaliação realizada para cada tratamento.

Todos os compostos ensaiados apresentaram uma inibição frente ao crescimento micelial de *G. citricarpa*, porém não deram uma atividade tão

significativa, no entanto, este ensaio avalia apenas o crescimento micelial, e este não está envolvido diretamente com o processo de infecção nas plantas. O alcalóide N-metil-4-metoxi-2-quinolona ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foi o que apresentou o melhor resultado, inibindo cerca de 50% o crescimento do micélio, como pode ser observado na (GRÁFICO 5.1) o seu efeito inibitório durante o crescimento micelial.

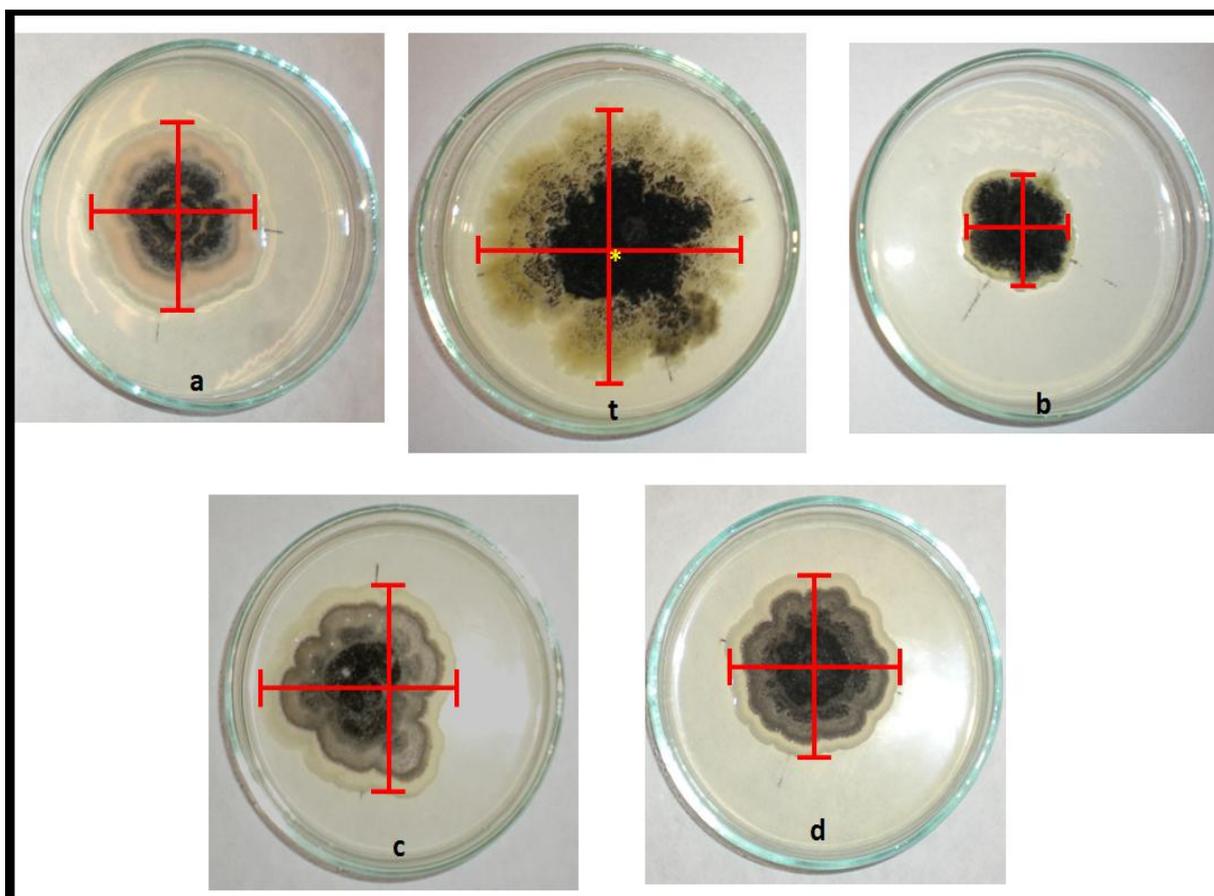


FIGURA 5.3: Desenvolvimento do ensaio de inibição de *G. citricarpa in vitro* frente ao crescimento micelial: **a)** representa a visualização frontal da placa de Petri onde foi realizado o ensaio com a cumarina, escoparona, na concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$; **b)** N-metil-4-metoxi-2-quinolona ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$); **c)** prangol ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$); **d)** isosakuranetina ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$); **t)** testemunha (BDA + fungo e DMSO); *) representa o centro de aplicação do inóculo utilizado como referencial para as medidas.

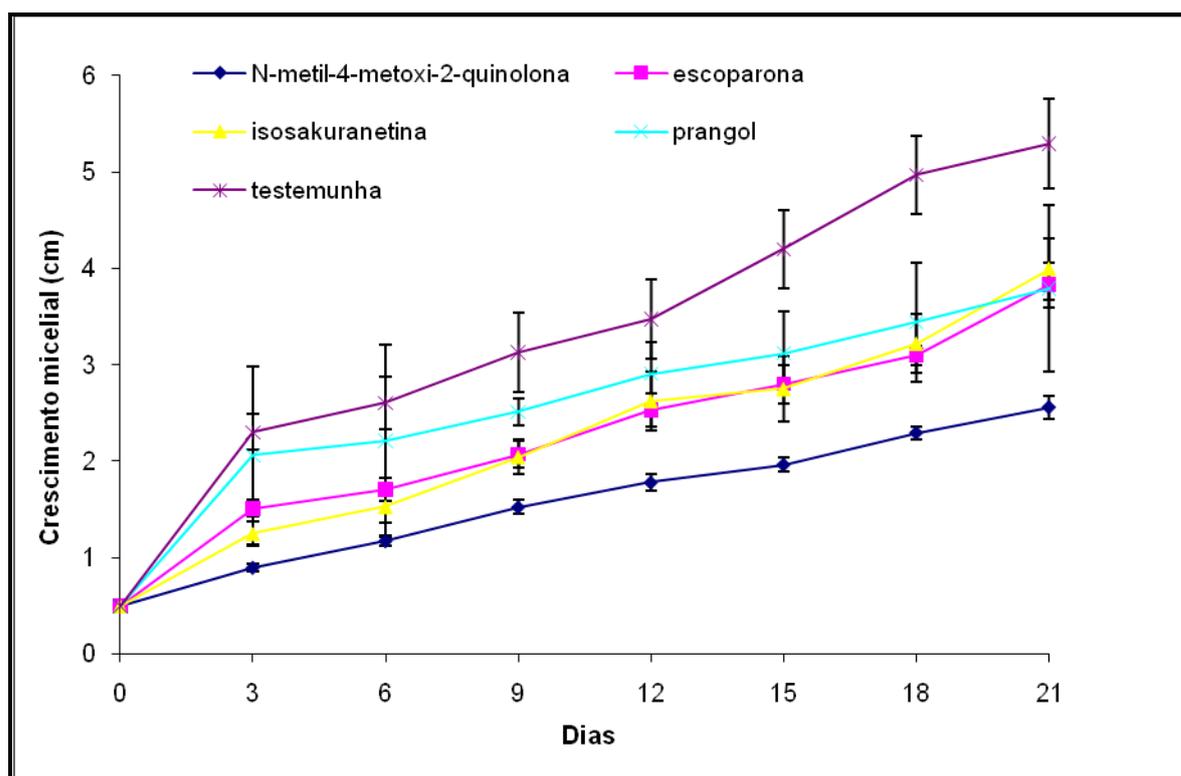


GRÁFICO 5.1: Efeito dos compostos naturais isolados de espécies de *Hortia* no crescimento micelial de *G. citricarpa*. As barras representam a média \pm desvio padrão.

5.4.2 - Efeito dos compostos naturais frente à inibição da germinação de esporos e formação de apressórios de *G. citricarpa*

A partir dos dados quantitativos obtidos para os compostos naturais ensaiados frente ao crescimento micelial, pretendia-se ter um dado quantitativo mais direcionado com as estruturas reprodutivas do microrganismo em que se dá a infecção nas plantas, e assim foi realizado o ensaio de inibição frente à germinação de esporos e formação de apressórios.

As substâncias ensaiadas foram as mesmas utilizadas no ensaio de inibição do crescimento micelial, com o intuito de se ter um resultado complementar e mais preciso. E assim, observou-se a partir do GRÁFICO 5.2 que a escoparona ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (01) foi a substância que apresentou o melhor resultado, onde inibiu 96% a germinação de esporos e 99% a formação de apressórios, um resultado bastante promissor. A literatura mostra inúmeros trabalhos, onde frutos cítricos, em pós-colheita, têm mecanismos de resistência ativados, como as fitoalexinas (escoparona e escopoletina), em resposta a diferentes tipos de indutores bióticos e

abióticos (ARRAS, 1996; RODOV *et al.*, 1994; ALI *et al.*, 1991), levando a uma redução nos sintomas das doenças, e assim esta cumarina se torna uma substância promissora, uma vez que ela impede a formação de tubos germinativos, e conseqüentemente a formação de apressórios que são unidades responsáveis pelo início do processo de infecção, os quais provocam os sintomas da mancha preta dos citros.

O alcalóide N-metil-4-metoxi-2-quinolona ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (**02**) e o flavonóide Isosakuranetina ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (**04**) também apresentaram uma atividade muito considerável uma vez que inibiu cerca de 83% e 71,4% à germinação de esporos e cerca de 91% e 80% a formação de apressórios, respectivamente, demonstrando ser substâncias ativas frente ao desenvolvimento germinativo de *G. citricarpa*. Já a cumarina prangol ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (**03**) não mostrou nenhum efeito sob o desenvolvimento germinativo de *G. citricarpa*, apresentando um efeito insignificante em torno de 19,2% de inibição à germinação de esporos e 32,3% à formação de apressórios, os quais apresentaram inibição abaixo de 50%.

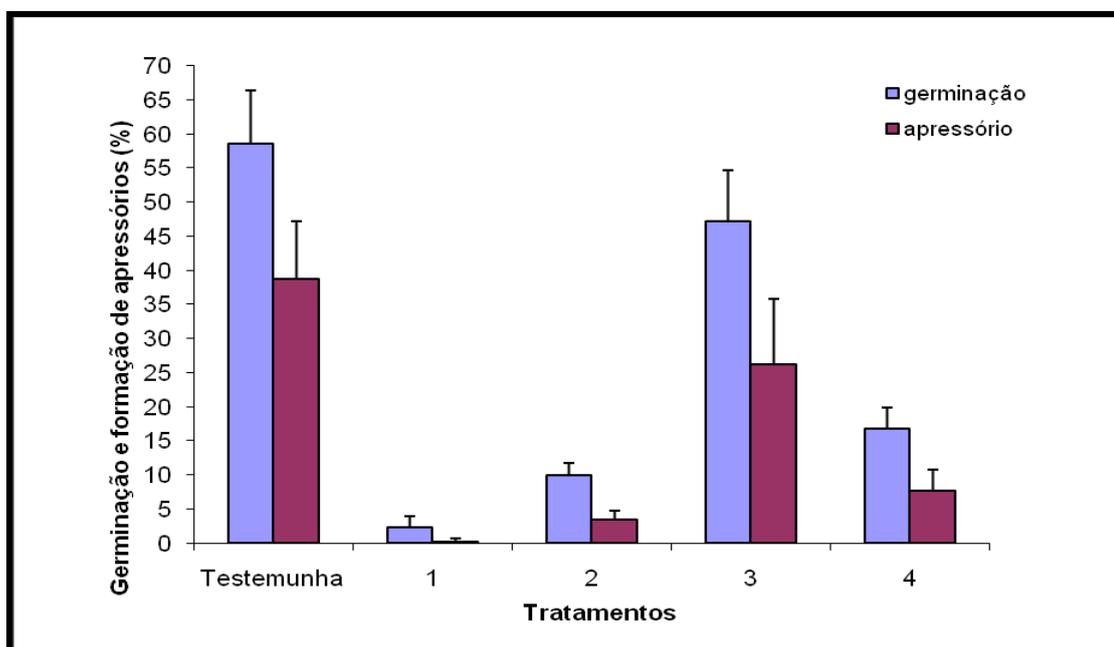


GRÁFICO 5.2: Efeito das substâncias isoladas de *Hortia* na inibição da germinação de esporos e formação de apressórios de *G. citricarpa*. 1) escoparona; 2) N-metil-4-metoxi-2-quinolona; 3) Prangol; 4) isosakuranetina. As barras representam a média \pm desvio padrão.

6 - CONCLUSÕES

O estudo fitoquímico das espécies de *H. superba*, *H. brasiliiana*, *H. oreadica* proporcionou o isolamento e identificação de 11 metabólitos secundários sendo três alcalóides, dois do tipo 2-quinolona (N-metil-4-metoxi-2-quinolona **01** e integriquinolona **02**) e um do tipo β -indoloquinazolínico (rutaecarpina **03**), cumarinas, sendo uma simples (escoparona **04**), uma mistura de três furanocumarinas (xantotoxina **05**, isopimpenilina **06** e 5-cloro-8-metoxi-furanocumarina **07**), 3 furanocumarinas (xantotoxina **05**, prangol **08** e heraclenol **09**) e dois flavonóides do tipo flavanona, (isosakuranetina **10** e neoponcirina **11**).

Segundo levantamento bibliográfico realizado para o estudo quimiosistemático de espécies de *Hortia*, das espécies estudadas neste trabalho *H. superba* apresenta alcalóides do tipo 2-quinolona preferencialmente, sendo relatado apenas um na espécie *H. oreadica*, e assim foi isolado o N-metil-4-metoxi-2-quinolona em grande quantidade proveniente da espécie *H. superba*, do qual já havia sido relatado para esta espécie, e é um alcalóide bastante encontrado em plantas da família Rutaceae. A integriquinolona foi isolada da espécie *H. superba* e é relatada pela primeira vez no gênero *Hortia*, enquanto que o alcalóide do tipo β -indoloquinazolínico, a rutaecarpina está presente em todas as espécies estudadas, e neste estudo foi isolada de *H. oreadica*. As cumarinas têm sido relatadas em grande quantidade em *Hortia oreadica* e apenas duas foram relatadas para *H. superba*, e assim neste estudo as cumarinas, escoparona e xantotoxina, isoladas de *H. superba*, foram relatadas pela primeira vez para a esta espécie. A cumarina isopimpenilina, identificada na espécie *H. superba*, é descrita pela primeira vez no gênero *Hortia*. Já a cumarina 5-cloro-8-metoxi-furanocumarina, é relatada pela primeira vez na literatura, no entanto, não se sabe qual sua verdadeira origem, possivelmente de uma interação de microrganismos com a planta da qual foi originada. Segundo levantamento, existem apenas três flavonóides relatados no gênero *Hortia*, sendo dois deles encontrados na espécie *H. superba*. A neoponcirina isolada de *H. superba*, é relatada pela primeira vez no gênero *Hortia*.

Neste estudo, foram isolados e identificados metabólitos secundários característicos de Rutaceae, e assim a presença destes metabólitos como alcalóides, cumarinas e flavonóides vêm a confirmar que *Hortia* pertence a família Rutaceae, embora não esteja claro seu exato posicionamento dentro da mesma. E

assim, faz-se necessário novos estudos com espécies do gênero para concluir melhor sua classificação quimiosistemática.

Os ensaios biológicos frente à *Guignardia citricarpa*, fitopatógeno responsável pela MPC, permitiu a avaliação da inibição de *G. citricarpa in vitro* frente ao crescimento micelial e frente à germinação de esporos e formação de apressórios a partir de substâncias naturais isoladas de espécies de *Hortia*, dentre três classes distintas, compostos os quais não haviam sido ensaiados. As substâncias testadas frente à inibição do crescimento micelial não apresentaram atividades muito relevantes, sendo o alcalóide N-metil-4-metoxi-2-quinolona ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) a substância que apresentou o melhor resultado, inibindo cerca de 50% o crescimento do micélio. No entanto, vale ressaltar que este ensaio trata-se de um dado importante, porém não direcionado as estruturas reprodutivas do microrganismo responsável pela infecção nas plantas citrícolas. De forma geral, as substâncias ensaiadas foram mais promissoras frente ao ensaio de inibição da germinação de esporos e formação de apressórios, dando destaque maior a escoparona ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) que apresentou 96% de inibição frente a germinação dos esporos e 99% de inibição frente à formação de apressórios. O alcalóide N-metil-4-metoxi-2-quinolona ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e o flavonóide isosakuranetina ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) apresentaram também resultados bastante promissores para esta avaliação, de 83% e 71,4% à germinação de esporos e cerca de 91% e 80% a formação de apressórios, respectivamente.

A partir dos resultados obtidos com os ensaios de inibição frente ao desenvolvimento de *G. citricarpa*, observa-se que fitopatógenos são alvos bastante resistentes, um problema de elevada significância, principalmente por não se ter um controle químico eficaz para a doença. No entanto, as substâncias naturais ensaiadas à germinação de esporos e formação de apressórios foram bastantes promissoras e assim, a busca por compostos naturais de partida para atividade fungicida constitui de grande importância para a descoberta de novos produtos com potencial antifúngico.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILAR-VILDOSO, C.I. Pinta preta espalha-se por São Paulo. *Citricultura Atual*, **1** (2), 8, 1997.
- AGUILAR-VILDOSO, C. I.; RIBEIRO, J. G. B.; FEICHTENBERGER, E.; GOES, A. DE; SPÓSITO, M. B. Manual técnico de procedimentos da mancha preta dos citros. Brasília: MAPA/DAS/DDIV, 2002.
- ALBUQUERQUE, B. W. P. "Revisão das Rutaceae do estado do Amazonas". *Acta Amazônica*, **6** (3) suppl: 1-67, 1976.
- ANTONACCIO, L. D. & TOLMASQUIM, E., "O alcalóide de *Hortia arborea* (Rutáceas)", *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, **28**: 182-188, 1956.
- APG [Angiosperm Phylogeny Group]. 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society* **141**: 399 – 436.
- ARRAS, G. Mode of action of an isolate of *Candida famata* in biological control of *Penicillium digitatum* in orange fruits. *Postharvest Biology and Technology*, Amsterdam, v. **8**, p. 191-198, 1996.
- BENTHAM, G.; HOOKER, J. D.; *Genera Plantarum*, Vol. **1**, L. Reeve & Co., London, 1862.
- BRAGA, P. A. C. *Estudo fitoquímico de espécies de Hortia (Rutaceae), importância quimiossistemática e atividades biológicas dos constituintes isolados*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2005. Tese de doutorado.
- CORREA, D. B., GOTTLIEB, O. R. & PADUA, A. P., "Dihydrocinnamic acids from *Hortia badinni*"; *Phytochemistry*, **14**: 2059-2060, 1975.
- CORREA, D. B., GOTTLIEB, O. R., PADUA, A. P. & ROCHA, A. I., "Constituents of *Hortia longifolia*"; *Rev. Latinoamer. Quím.*, **7**:43, 1976.
- CORREA, D. B., GOTTLIEB, O. R. & PADUA, A. P., "Dihydrocinnamyl alcohols from *Hortia badinni*"; *Phytochemistry*, **18**: 351, 1979.
- CUCA, L. E., MARTÍNEZ, J. C. & MONACHE, F. D. "Alcaloides presentes en *Hortia colombiana*"; *Revista Colombiana de Química*, **27**(1): 23-30, 1998.
- DE CANDOLLE, A. P. *Aurantiaceae e Rutaceae. Prodomus sistmaticis naturalis regni vegetabilis*, Paris, v. **1**, 1824.
- DEWICK, P.M.; *Medicinal Natural Products: a Biosynthetic Approach*; England, John Wiley & Sons, 2002.
- ECKERT, J.W. Post-harvest diseases of citrus fruits. **Agriculture Outlook**,

Washington, v. 54, p. 225-232, 1993.

ECKERT, J.W.; EAKS, I.L. Postharvest disorders and diseases of citrus fruits. In: The Citrus Industry. REUTER, W.; CALAVAN, E.C.; CARMAN, G.E. (Ed.). University of California Press, Berkeley, CA, EE UU, v. 5, p. 179-260, 1989.

ENGLER, A. - Rutaceae. In: Engler, A. Von & Prantl. K.. Die. Natürlichen Pflanzfamilien, 1931, 2ª ed. v. 19a, 187-359; 458-459.

FAO. Base de Dados Estatísticos. Disponível em: < Internet; <http://apps.fao.org> > Acesso em 05, Fev. 2000.

FAWCETT, H.S. Citrus diseases and their control, 656 pp. McGraw-Hill Publishing Company, London, UK, 1936.

FEICHTENBERGER, E. Mancha-preta dos citros no Estado de São Paulo. Laranja, v. 17, p. 93-108, 1996.

FERRACIN, R. J. *Estudo fitoquímico de Hortia arborea: Uma contribuição a quimio sistemática de Cusparieae*. São Carlos, Programa de Pós-graduação em Química – UFSCar, 1992. Dissertação de mestrado.

FLICK, 2010. Disponível em <http://www.flickr.com/photos/cerrados/with/4228653403/>, Acesso em maio de 2010.

FUNDECITRUS. Manual técnico sobre pinta preta. Araraquara, 2000, 10 p. (Boletim Técnico).

FUNDECITRUS, 2008. Disponível em: www.fundecitrus.com.br/doencas/pinta_preta.html, Acesso em abril de 2008.

GOES, A. de; GRAÇA, J.; MONTEIRO de BARROS, J.C.S., PINHEIRO, J.E. Controle da pinta preta em frutos de tangerina Rio (*Citrus deliciosa*) ocasionada por *Phyllosticta citricarpa* (*Guignardia citricarpa*). Fitopatologia Brasileira, Brasília, 15 (1), 73-75, 1990.

GOES, A. DE; FEICHTENBERGER, E. Ocorrência da mancha preta causada por *Phyllosticta citricarpa* (Mc Alp) Van der Aa (*Guignardia citricarpa* Kiely) em pomares cítricos do Estado de São Paulo. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, 18, 318, 1993.

GOES, A. de. Controle da mancha-preta dos frutos cítricos. Laranja, 19, 2, 305-320, 1998.

GRAY, A. I., WATERMAN, P. G., "Coumarins in the Rutaceae", *Phytochemistry*, 17: 845-864, 1978.

GROPPO, M. – Filogenia de Rutaceae e revisão de *Hortia* VAND. – Tese de doutorado, Universidade Estadual de São Paulo (USP), São Paulo, 2004.

GROPPO, M., KALLUNKI, J. A. & PIRANI, J. R., "synonymy of *Hortia arborea* with *H. brasiliana* (Rutaceae) and a new species from Brazil", *Brittonia*, 57(1): 28-34, 2005.

- GROPPO, M., PIRANI, J. R., SALATINO, M. L. F., BLANCO, S.R., KALLUNKI, J. A. Phylogeny of Rutaceae based on two noncoding regions from cpDNA. *Am. J. Bot.* **95**, 985-1005, 2008.
- GULLINO, M. L.; KUIJPERS, L. A. M. Social and political implications of managing plant diseases with restricted fungicides in Europe. *Annual Review of Phytopathology*, **32**, 559-579, 1994.
- HARBONE, J. B., & WILLIAMS, C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, **55**, 481–504.
- HARKAR, S., RAZDAN, T. K., WAIGHT, E. S., “Steroids, chromone and coumarins from *Angelica officinalis*”, *Phytochemistry*, **23**(2): 419-426, 1984.
- HENRIQUES, A.T.; KERBER, V.A.; MORENO, P.R.H. “Alcalóides: generalidades e aspectos básicos” IN: *Farmacognosia da Planta ao Medicamento*, Editora UFSC, 3ª edição, cap 29, 2001, 651p.
- IKUTA, A.; NAKAMURA, T.; URABE, H. “Indolopyridoquinazoline, furoquinoline and canthinone type alkaloids from *Phellodendron amurense* callus tissues”. *Phytochemistry*, **48**(2): 285-291,1998.
- JACOBS, H. & RAMADAYAL, F. “Constituents of *Hortia regia*: 6,7-dimethoxycoumarin, rutaecaerpine, skimmianine, and (+)-methyl (E,E)-10,11-dihydroxy-3,7,11-trimethyl-2,6-dodecadienoate”; *Journal of Natural Products*, **50**(3): 507-509, 1987.
- JACOBS, H. & RAMDAYAL, F., “Guyanin, a novel tetranortriterpenoid. Structure elucidation by 2-D NMR spectroscopy”; *Tetrahedron Letters*, **27**(130): 1453-1456, 1986.
- JANUÁRIO, A. H., VIEIRA, P. C., DA SILVA, M. F. G. F., FERNANDES, J. B., CONSERVA, L. M. Alcalóides β -indolopiridoquinazolínicos de *Esenbeckia grandiflora* MART. (Rutaceae). *Química Nova*, **32** (8): 2034-2038, 2009.
- LASSAK, E., V., PINHEY, J. T., “The proton magnetic resonance of some coumarins and 2,2-dimethyl-chromens: further examples of inter-ring spin-spin coupling”, *J. Chem. Soc. (C)*, 2000-2001, 1967.
- LIMA, L. H. C.; MARCO, J. L. de; FELIX, C. R. Enzimas hidrolíticas envolvidas no controle biológico por micoparasitismo. In: Melo, I. S.; Azevedo, J. L. (Ed.). Controle biológico. Jagariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, **2**, 263-304, 2000.
- MAFEZOLI, J., *Atividade tripanocida e antimicrobiana de plantas da família Rutaceae* - São Carlos, Programa de Pós-graduação em Química – UFSCar, 2001. Tese de doutorado.
- MAGNANI, R. F. “Contribuições ao entendimento do conceito de “microrganismos endofíticos”: biotransformação de ácido abiético por *Fusarium graminearum*; estudo químico de *Pestalotiopsis sp.*; e estudo da doença “pinta preta” em *citrus* causada

pelo fungo *Guignardia citricarpa*". São Carlos, Programa de Pós-graduação em Química - UFSCar, 2002. Dissertação de Mestrado.

MASUDA, T.; TAKASUGI, M.; ANETAI, M.: "Psarolen and other linear furanocoumarins as phytoalexins in *Glehnia littoralis*". *Phytochemistry*, **47**(1): 13-16, 1997.

MATTOS-JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. Citros. Campinas: Instituto Agrônômico e Fundag, 929, 2005.

MIKOLAJACZAK, K. L.; WEISLEDER, D.; PARKANYL, L.; CLARDY, J. *Journal of Natural Products* **51** (3), 606, 1988.

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

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

MURRAY, R. H. & JORGE, D., "A simple method for differentiating between angular and linear 5-metoxifuranocoumarins", *Phytochemistry*, **23**(3): 697-699, 1984.

PACHTER, I. J.; RAFFAUF, R. F.; ULLYOT, G. E.; RIBEIRO, O.; "Die trennung und identifizierung der alkaloiden von *Hortia arborea*."; *Angew. Chem.*, **69**(21): 687,1957.

PACHTER, I. J.; RAFFAUF, R. F.; ULLYOT, G. E; RIBEIRO, O. "The alkaloids of *Hortia arborea* Engl."; *J. Am. Chem. Soc.*, **82**: 5187-5193, 1960.

PACHTER, I. J.; MOHRBACHER, J.; ZACHARIAS, D. E. "The chemistry of hortiamine and 6-metoxyrhetsinine"; *J. Am. Chem. Soc.*, **63**: 635-642, 1961.

PÁDUA, A. P. - Estudo químico de *Hortia badinii* e *Hortia longifolia* - Tese de doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 1976.

PUNJA, Z. K.; UTKHEDE, R. S. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. *Trend in Biotechnology*, **21**, 400-407, 2003.

KIM, C. Y., LEE, H. J., LEE, M. K., AHN, M. J., KIM, J., J. One step purification of flavanone glycosides from *Poncirus trifoliata* by centrifugal partition Chromatography. *J. Sep. Sci.* 2007, **30**, 2693 – 2697.

KOTZÉ, J.M. Epidemiology and control of citrus black spot in South Africa. *Plant Disease Reporter* **65**, 945-950, 1981.

KOTZÉ, J. M. History and epidemiology of citrus black spot in South Africa. In: International Citrus Congress, 8, Sun City, 1996. Proceedings. *Sun City: International Society of Citriculture*, 1296-1299, 1996.

RAGSDALE, N. N; SISLER, H.D. Social and political implications of managing plant

diseases with decreased availability of fungicides in the United States. *Annual Review of Phytopathology*, **32**, 545-557, 1994.

RIBEIRO, A. B. - *Fitoquímica do Enxerto de Citrus sinensis sobre Citrus limonia e da Espécie Nycticalanthus speciosus (Rutaceae) e Biossíntese de Cumarinas Preniladas* – São Carlos, Programa de Pós-graduação em Química – UFSCar, 2006. Tese de Doutorado.

ROBBS, C. F.; PIMENTEL, J. P.; RIBEIRO, R.L. A mancha preta dos citros causada por *Phoma citricarpa*. *Fitopatologia Brasileira*, **15**, 455, 1980. Suplemento Apresentado ao 13 Congresso de Fitopatologia, Rio de Janeiro, 1980-Resumo.

ROBBS, C. F.; BITTENCOURT, A. M. A mancha preta dos frutos: um dos fatores limitantes à produção citrícola do Estado do Rio de Janeiro. Guaratiba: EMBRAPA/CTAt, **5**, 1995 (Comunicado Técnico, 19).

RODOV, S.; BEN-YEHOSHUA, D.; D'HALLEWIN, G.; CASTIA, T. Accumulation of phytoalexins scoparone and scopoletin in citrus fruits subjected to various postharvest treatments. *Acta Horticulturae*, The Hague, v. **1**, n. 381, p. 517-523, 1994.

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

SEVERINO, V. G. P. “*Estudo fitoquímico e avaliação do potencial antimicrobiano de espécies de Hortia (Rutaceae): H. oreadica, H. brasiliana e H. superba*”. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2008. Dissertação de Mestrado.

SILVA, M. F. DAS G. F. DA; GOTTLIEB O.R.; EHRENDORFER, F. “Chemosystematics of the Rutaceae: suggestions for a more natural taxonomy and evolutionary interpretation of the family”. *Plant. Syst. Evol.*, **161**: 97-134, 1988.

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

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

SUTTON, B.C.; WATERSTON, J.M. *Guignardia citricarpa*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria n. 85. CAB International, Wallingford, UK, 1966.

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

TESSO, H.; KONIG, W. A.; KUBECZKA, M. B.; GLOWNIAK, K. “Secondary metabolites of *Peucedanum tauricum* fruits”. *Phytochemistry* **66** (2005) 707–713.

TOFFANO, L. “*Doenças pós-colheita em citros: potencial do Lentinula edodes*,”

Agaricus blazei, ácido jasmônico, albedo (*Citrus sinensis* var. Valência) e flavedo (*Citrus aurantifolia* var. Tahiti) no controle e na indução de resistência”. Piracicaba, Universidade de São Paulo - USP/ESALQ, 2005. Dissertação de Mestrado.

TUSET J. J. Podredumbres de los frutos cítricos. Conselleria d' Agricultura i Pesca. Generalitat Valenciana. Valencia, 1987. 206 p.

VASCONCELOS, J. M. J., SILVA, A. M. S., CAVALEIRO, J. A. S., "Chromones and flavanones from *Artemisia campestris* subsp. maritima, *Phytochemistry*, **49**(5): 1421-1424, 1998.

ZUANAZZI, J. A. S., "Flavonóides" – Farmacognosia: da planta ao medicamento 3ª edição, Porto Alegre/Florianópolis, Editora da UFSC, 2001, cap. 23, 499-526p.

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

WIJERATNE, E. M. K., BANDARA, B. M. R., GUNATILAKA, A. A. L. Chemical constituents of three Rutaceae species from SRI LANKA; *Journal of Natural Products*, **55** (9): 1261-1269, 1992.