



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

**Estudo Fitoquímico e Quimiosistemático de *Galipea, Swinglea*  
(Rutaceae) e Avaliação do Potencial Biológico dos Compostos  
Isolados**

**CRISTOVAM DO NASCIMENTO CERQUEIRA\***

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

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

\*Bolsista: CAPES

**São Carlos – SP / 2011**

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

C416ef

Cerqueira, Cristovam do Nascimento.

Estudo fitoquímico e quimiosistemático de *Galipea*,  
*Swinglea* (Rutaceae) e avaliação do potencial biológico dos  
compostos isolados / Cristovam do Nascimento Cerqueira. --  
São Carlos : UFSCar, 2014.  
139 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São  
Carlos, 2011.

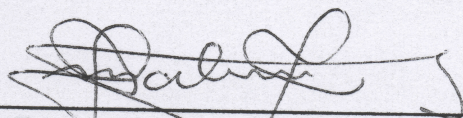
1. Química. 2. Guignardia citricarpa. 3. Angostura. I.  
Título.

CDD: 540 (20<sup>a</sup>)

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

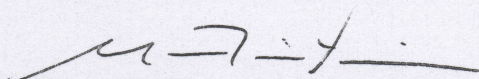
---

*Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de dissertação de mestrado acadêmico do candidato Cristovam do Nascimento Cerqueira, realizada em 07 de junho de 2011:*



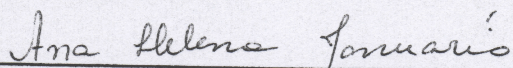
---

Profa. Dra. Maria Fatima das Graças Fernandes da Silva



---

Prof. Dr. Moacir Rossi Forim



---

Profa. Dra. Ana/Helena Januário

## **Agradecimentos**

A Deus por me dar forças quando me sentia fraco, coragem para avançar sempre e nunca ter medo de ser quem sou e discernimento no momentos de confusão;

A Profa. Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva, pelo confiança, ensinamentos e exemplo de profissional pelo amor que tem pelo que faz;

A minha família, que posso com certeza dizer que é melhor família do mundo, pois ama os seus e os apoia independente de qualquer coisa – AMO VOCÊS;

Ao Dr. Leonardo Toffano, pela orientação nos ensaios biológicos, pela disponibilidade, ajuda, paciência e amizade;

A Karla Malaquias, pela grande ajuda nas análises de CG-EM, disponibilidade, caronas e amizade;

A técnica Lu do Laboratório de RMN, pela grande ajuda e compreensão que teve no momento em que o aparelho de RMN estava parado;

Aos professores da banca Dr. Moacir Rossi Forim e Dra. Ana Helena Januário pela disponibilidade, compreensão e arguição na banca;

A Marsele, Murilo e Sâmya que me motivaram e me deram grandes empurrões para a realização desse trabalho;

Aos amigos, melhor dizendo, família do PN que me ajudaram de todas as formas possíveis e estiveram junto comigo nos momentos de ‘Foco’ e “Desfocamento”;

Ao meu amigo José Neto que me ajudou nos gráficos desse trabalho e ao Henrique Koch que nos momentos de tristeza insistia em me levar para o bar para tomar “chá de cevada fermentada gelada”;

A CAPES, pela bolsa concedida;

A todos que de certa forma contribuíram para a realização desse trabalho de forma direta e indireta.

**Muito obrigado!!!**

## ABREVIATURAS E SIMBOLOS

$\delta$	Deslocamento químico
$\Phi$	Diâmetro
$\lambda$	Comprimento de onda
AA	Aveia-ágar
ABECITRUS	Associação Brasileira Exportadores de Citros
AGRIANUAL	Anuário da Agricultura Brasileira
APG	Angiosperm Phylogeny Group
BDA	Batata-dextrose-ágar
BOD	Biological oxygen demand
CCAA	Cromatografia em coluna aberta por adsorção
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa
COSY	Correlation spectroscopy
$\text{CDCl}_3$	Clorofórmio deuterado
<i>d</i>	Dubleto
DCM	Diclorometano
<i>dd</i>	Duplo dubleto
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDic	Extrato diclorometânico
EHex	Extrato hexânico
EMet	Extrato metanólico
Fundecitris	Fundação de defesa da citricultura
Hz	Hertz
$\text{H}_2\text{O}$	Água
<i>J</i>	Constante de acoplamento
<i>m</i>	multipleto
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MeOD	Metanol deuterado
MeOH	Metanol
MHz	Mega-hertz
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence

MPC	Mancha Preta do Citros
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
PCR	Polymerase Chain Reaction
ppm	Parte por milhão
<i>q</i>	Quatrupleto
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância magnética nuclear de carbono
<i>s</i>	Singleto
SIM	Selected ion monitoring
<i>s/</i>	Singleto largo
<i>t</i>	Tripleto
<i>tl</i>	Tripleto largo
UV	Ultravioleta

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. 1 - Substâncias isoladas do gênero <i>Angostura</i> .....	6
Tabela 1. 2 - Substâncias isoladas do gênero <i>Galipea</i> .....	16
Tabela 1. 3 - Substâncias isoladas do gênero <i>Conchocarpus</i> .....	18
Tabela 1. 4 - Substâncias isoladas da <i>S.glutinosa</i> . .....	32
Tabela 3.1 - Massas obtidas do material vegetal seco e dos extratos .....	54
Tabela 4.1 - Dados de RMN <sup>1</sup> H da N- benzoiltiramida e comparação com a literatura. .....	77
Tabela 4. 2 - Dados de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C da N-{2-[4-(3-oxobutoxil)fenil]etil}benzamida e comparação com da N-benzoiltiramida da literatura. ....	86
Tabela 4.3 - Dados de RMN <sup>1</sup> H da Pinostrobinina e comparação com a 5,7-Diidroxi-4'- metoxiflavanona da literatura.....	100
Tabela 4. 4 - - Dados de RMN <sup>1</sup> H da (2Z)-2-Metil-[2,5,5,8a-tetrametildecaidronaftalen- 1-il]but-2-en-1-ol e comparação com literatura .....	109
Tabela 4.5 - Dados de RMN <sup>13</sup> C da 3 α -Hidróxiglutin-5-eno em comparação com 3 β -Hidróxiglutin-5-eno a literatura .....	114
Tabela 4.6 - Dados de RMN <sup>13</sup> C da Friedelina em comparação com a literatura....	119



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. 1 - Espécie <i>Swinglea glutinosa</i> .....	31
Figura 1.2 - Mapa de ocorrência da Mancha Preta do Citros no Brasil (MAPA, 2010). .....	41
Figura 1.3 - Ciclo da pinta-preta (Fundecitrus, 2009). .....	42
Figura 1.4 - Diferentes lesões da Mancha Preta do Citros (Fundecitrus, 2009). .....	44
Figura 1.5 - Substâncias que apresentaram atividade contra a <i>G. citricarpa</i> . .....	46
Figura 4.1 - Cromatograma da Substância 1. Coluna DB-5 (30m x 0,25mm D.I. x 0,25µm de filme), Hélio como gás de arraste. Injetor 250°C; Detector 280°C; Rampa: Iniciou a 200°C sendo mantido por 10 minutos, seguido de aumento de 10°C/minuto até atingir 280°C onde foi mantido por mais 10 minutos. Injeção de 1µL na concentração de 2mg/mL. ....	74
Figura 4.2 - Espectro de massas da Substância 1. Modo SIM de fragmentação, íons selecionados: <i>m/z</i> 51, 77, 105, 120, 134 e 241. ....	74
Figura 4.3 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H da substância 1 (400MHz, CDCl <sub>3</sub> ). ....	76
Figura 4. 4 - Algumas correlações observadas no COSY. ....	78
Figura 4.5 - Algumas correlações observadas no HMBC. ....	79
Figura 4.6 - Mapa de contorno de COSY da substância 2 .....	80
Figura 4.7 - -Mapa de contorno de COSY da substância 2 ampliado na região de δ3,00 a δ6,00. “Spots” de correlação levemente deslocados. ....	81
Figura 4.8 - Mapa de contorno de HSQC da substância 2 .....	81
Figura 4. 9 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H da substância 2 (400MHz, CDCl <sub>3</sub> ). ....	82
Figura 4. 10 - Espectro de RMN <sup>13</sup> C da substância 2 (400MHz, CDCl <sub>3</sub> ). ....	83
Figura 4. 11 - Ampliação da região δ120 a 130 do espectro de RMN <sup>13</sup> C da substância .....	84
Figura 4.12 - Mapa de contorno de HMBC da substância 2.....	84
Figura 4.13 - - Cromatograma da Substância 2. Mesmas condições utilizadas na substância 1. ....	85
Figura 4.14 - Espectro de massas da Substância 2. Modo SIM de fragmentação, íons selecionados: <i>m/z</i> 51, 77, 94, 105, 120, 133,134, 240, 254, 268, 296 e 311....	85
Figura 4.15 - Cromatograma da Substância 3. Mesmas condições utilizadas na Substância 1.....	88

Figura 4. 16 - Espectro de massas da substância 3. Modo SIM de fragmentação, íons selecionados: $m/z$ 51, 77, 120, 254, 328, 311, 341, 356 e 357.....	88
Figura 4. 17 - Cromatograma da Substância 4. Mesmas condições utilizadas na Substância 1.....	89
Figura 4.18 - Espectro de massas da Substância 4. Modo SIM de fragmentação, íons selecionados: $m/z$ 51, 77, 90, 120, 254, 284, 328, 356 e 373.....	90
Figura 4. 19 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ da substância 5 (400MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ .).....	93
Figura 4.20 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ da substância 5 (400MHz, $\text{CDCl}_3$ ). Destaque para os sinais $\delta$ 5,60 (1H,s) e $\delta$ 2,95 (3H,d). ....	94
Figura 4.21 - Espectro de massas da Substância 5. Ionização <i>eletrospray</i> , modo positivo de ionização .....	94
Figura 4.22 - Ampliação da região $\delta$ 5,0 a 6,0 do espectro de RMN $^1\text{H}$ da substância 6. ....	97
Figura 4.23 - Ampliação da região $\delta$ 2,0 a 3,0 do espectro de RMN $^1\text{H}$ da substância 6. ....	98
Figura 4.24 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ da substância 6 (400MHz, $\text{CDCl}_3$ .).....	99
Figura 4.25 - Espectro de massas da Substância 7. Ionização por <i>eletrospray</i> modo positivo de ionização. ....	100
Figura 4.26 - Correlações observadas no HMBC da substância 7.....	103
Figura 4.27 - Mapa de contorno de COSY da substância 7. ....	103
Figura 4. 28 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ da substância 7 (400MHz, $\text{CDCl}_3$ .).....	104
Figura 4. 29 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ da substância 7 (400MHz, $\text{CDCl}_3$ .) .....	105
Figura 4.30 - Ampliação da região $\delta$ 30,0 do espectro de RMN $^{13}\text{C}$ da substância 7. ....	106
Figura 4.31 - Ampliação da região $\delta$ 20,0 do espectro de RMN $^{13}\text{C}$ da substância 7. ....	106
Figura 4.32 - Ampliação da região $\delta$ 20,0 do espectro de RMN $^{13}\text{C}$ da substância 7. ....	106
Figura 4.33 - Mapa de contorno de HSQC da substância 7. ....	107
Figura 4.34 - Mapa de contorno de HSQC da substância 7 ampliado.....	107
Figura 4.35 - Mapa de contorno de HMBC da substância 7.....	108
Figura 4. 36 - Mapa de contorno de HMBC da substância 7.....	108
Figura 4.37 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ da substância 8 (400MHz, $\text{CDCl}_3$ .).....	112
Figura 4.38 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ da substância 8 (400MHz, $\text{CDCl}_3$ .) .....	113

Figura 4.39 - Cromatografia da Substância 9. Mesmas condições utilizadas na Substância 1.....	116
Figura 4. 40 - Espectro de massas da Substância 9. Modo SCAN .....	116
Figura 4.41 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H para as substâncias 9 em mistura com algum composto aromático não identificado .....	117
Figura 4. 42 Espectro de RMN <sup>13</sup> C para as substâncias 9 .....	118
Figura 4. 43 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H para as substâncias 10 e 11 (400MHz, CDCl <sub>3</sub> .) .....	121
Figura 4. 44 - Cromatografia das Substâncias 10 e 11. Mesmas condições utilizadas na Substância 1.....	122
Figura 4.45 - Espectro de massas da Substância 11. Modo Varredura. ....	122
Figura 4.46 - Espectro de massas da Substância 10. ModoVarredura .....	123

## LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 3.1 - Fluxograma de preparação dos extratos das <i>Galipea</i> .....	53
Fluxograma 3.2 - Fluxograma de partição do extrato etanólico da <i>S. glutinosa</i> e as respectivas massas dos extratos obtidos.....	56
Fluxograma 3.3 - Fracionamento da partição hexânica e identificação das substâncias 3 e 4.....	57
Fluxograma 3.4 - Fracionamento da fração 18 e isolamento das substâncias 1 e 2.....	58
Fluxograma 3.5 - Fracionamento da fração 21 e isolamento da substância 2.....	59
Fluxograma 3.6 - Fracionamento da fração 11 e isolamento das substâncias 7 e 8.....	60
Fluxograma 3.7 - Fracionamento da fração 15 e isolamento das substâncias 5, 6, 11 e 12. ....	61
Fluxograma 3.8 - Fracionamento da fração 9-10 e isolamento das substâncias 9... ..	62

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 4.1 - Proposta de fragmentação da amida N-benzoiltiramida.....	75
Esquema 4.2 - Proposta de fragmentação da amida N-{2-[4-(2,3-Diidróxi-3-metil-4-oxobutoxil)fenil]etil}benzamida. ....	89
Esquema 4.3 - Proposta de fragmentação da amida Ác. 4-{4-[2-(benzoilamino)etil]fenoxil}-2,3-diidroxi-2-metilbutanóico.....	90
Esquema 4.4 - Proposta de fragmentação da amida N-Metil-fenilacrilamida. ....	92
Esquema 4.5 - Proposta de biogênese da amida N-{2-[4-(3-Oxobutoxil)fenil]etil}benzamida (2). ....	95
Esquema 4. 6 - Proposta de fragmentação da flavonona Pinostrobina.....	101
Esquema 4.7 - Classe majoritaria de alcaloides nas Rutaceae formado pela combinação de ácido antranílico e acetato (Waterman, 1999).....	124

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 4. 1 – Ensaio de inibição do crescimento micelial da *G. citricarpa*. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão. .... 127
- Gráfico 4. 2 - Efeito dos compostos naturais ensaiados em Abril de 2011 no crescimento micelial de *G. citricarpa*. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão. .... 127
- Gráfico 4. 3 - Efeito dos compostos naturais ensaiados em Fevereiro de 2011 na germinação e formação de apressórios da *G. citricarpa*. 1- Testemunha; 2- Part. butanólica; 3- 3 $\alpha$ -hidróxiglutin-5-eno; 4- Part. hexânica; 5- Part. acetato etílica; 6- Part. hidroalcoólica; 7- Part. metanólica. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão. .... 129
- Gráfico 4. 4 - - Efeito dos compostos naturais ensaiados em Abril de 2011 na germinação e formação de apressórios da *G. citricarpa*. 1- Testemunha; 2- (2Z)-2-metil-[2,5,5,8a-tetrametildecaidronaftalen-1-il]but-2-en-1-ol; 3- N-{2-[4-(3-oxobutoxil)fenil]etil}benzamida; - Efeito dos compostos naturais ensaiados em Abril de 2011 na germinação e formação de apressórios da *G. citricarpa*. 1- Testemunha; 2- (2Z)-2-metil-[2,5,5,8a-tetrametildecaidronaftalen-1-il]but-2-en-1-ol; 3- N-{2-[4-(3-oxobutoxil)fenil]etil}benzamida; As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão. 129

## RESUMO

ESTUDO FITOQUÍMICO E QUIMIOSSISTEMÁTICO DE *GALIPEA*, *SWINGLEA* (RUTACEAE) E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO DOS COMPOSTOS ISOLADOS - A classificação das espécies do gênero *Galipea* tem sido confuso desde a descrição do gênero, não mostrando concordância entre os taxonomistas em vários sistemas de classificação desde 1823. Contudo Kallunki & Pirani retificaram os erros existentes nas antigas classificações botânicas reclassificando varias espécies de *Galipea* como *Conchocarpus* ou *Angostura*. Desta forma, foi escolhida uma espécie de *Galipea* (*G. carinata*) e uma de *Angostura* (*A.bracteata*) que antes pertencia à *Galipea* no intuito de avaliar um possível paralelismo entre a classificação proposta por Kallunki & Pirani com o perfil químico das espécies estudadas. Os estudos fitoquímicos de *A. bracteata* e *G. carinata* não levaram o isolamento de metabólitos secundários, entretanto o levantamento bibliográfico mostrou uma relação de paralelismo entre a classificação botânica baseada na morfologia das espécies do gênero com o perfil químico das mesmas. Contudo, essa relação só foi evidenciada ao se fazer a comparação dos alcaloides já isolados da *Conchocarpus* com aqueles de *Angostura*, em que se averiguou que os alcaloides alquil- e alquilarilquinolinicos presentes na *Angostura*, encontravam-se ausentes em *Conchocarpus*. Por sua vez, os alcaloides acridônicos e indolquinazolínicos encontrados em *Conchocarpus* não eram observados em *Angostura*. A comparação dos gêneros supracitados com *Galipea* não foi discutido devido aos poucos alcaloides relatados (2-quinolona) para as espécies desse gênero não podendo ser classificado como específico desta. A *Swinglea glutinosa*, espécie nativa da Ásia, possui muitos relatos na literatura de alcaloides acridônicos e cumarinas isoladas de seus frutos, tronco, e raízes, entretanto esses metabólitos relatados são provenientes de extratos polares, não possuindo assim conhecimento algum de metabólitos de baixa polaridade. Assim, neste trabalho também se objetivou ampliar o conhecimento do perfil químico dessa espécie. O estudo fitoquímico da *S. glutinosa* levou ao isolamento de dois triterpenos: 3 $\alpha$ -Hidroxi-glutin-5-eno (**08**) e friedelina (**09**); um diterpeno: (2Z)-2-metil-[2,5,5,8a-tetrametil-decaidronaftalen-1-il]but-2-en-1-ol (**07**); dois esteroides: sitosterol (**10**) e estigmasterol (**11**); uma flavanona: pinostrobin (**07**); e três amidas: N-benzoil-tiramida (**01**); N-{2-[4-(3-oxobutoxil)fenil]etil}benzamida (**02**); 2(E)N-metil-fenilacrilamida (**05**), sendo a última

inédita na literatura. A amida N-{2-[4-(2,3-diidroxi-3-metil-4-oxobutoxil)fenil]etil}benzamida **(03)** e o ácido carboxílico **(04)** ácido 4-{4-[2-(benzoilamino)etil]fenoxil}-2,3-diidroxi-2-metilbutanóico foram identificados via CG-EM, onde estes dois metabolitos reforçam a biogênese da amida inédita via O-prenilação seguida a perda de dióxido de carbono devido às varias oxidações na metila terminal. Alguns dos compostos isolados tiveram sua atividade biológica avaliada frente à *Guignardia citricarpa* pelo ensaio de crescimento micelial *in vitro* onde apenas a substância **(08)** apresentou uma inibição de cerca de 50% e a substância **(07)** estimulou o crescimento do fungo. No ensaio de inibição da germinação e formação de apressórios, que avalia a inibição da estrutura reprodutiva do fungo que é a principal forma de infecção, a substância **(08)** apresentou uma inibição de 93,5% na germinação e 96,5% na formação de apressórios, respectivamente. A substância **(02)** inibiu 90,5 % na germinação e 94,5% na formação de apressórios. Sendo assim, neste trabalho verificou-se alguns compostos com potencial fungistático no controle do fungo *G. citricarpa*.



## ABSTRACT

PHYTOCHEMISTRY AND CHEMOSYSTEMATIC STUDY OF *GALIPEA*, *SWINGLEA* (RUATACEAE) AND EVALUATED OF POTENCIAL BIOLOGICAL OF ISOLATED COMPOUNDS - The *Galipea* genus species classifications has been confuse since genus classification. Showing no agreement among taxonomists in several classification systems since 1823. However, Kallunki & Pirani corrected errors exist in the ancient botanical classification reclassify several species of *Galipeas* like *Conchocarpus* or *Angostura*. Thus, it was chosen a specie of *Galipea* (*G. carinata*) and one *Angostura* (*A.bracteata*) which previously belonged to *Galipea* in order to evaluate a possible parallelism between the classification proposed by Kallunki & Pirani with the chemical profile of the species studied. The phytochemical studies of the *A. bracteata* and *G. carinata* no led to the isolation of the secondary metabolites, though the research literature shows a relation of parallelism between the botanical classification based on morphology of species of the genus with the same chemical this one, but this relationship was only apparent when you compare the already isolated *Conchocarpus*'s alkaloids with those of *Angostura*, where it was discovered that the alkyl and alquilarilquinolinicos alkaloids present in *Angostura*, are absent in *Conchocarpus*. In turn, the acridones and indolquinazolínicos alkaloids found in *Conchocarpus* were not observed in *Angostura*. The comparison of the aforementioned genres with *Galipea* was not discussed due to the few reported alkaloid (2-quinolone) for the species of this genus can not be classified as this specific. The *Swinglea glutinosa*, a species native to Asia, possesses many reports acridones alkaloids and coumarins isolated from its fruit, stem and roots, but these metabolites are reported from polar extracts, thus having no knowledge whatsoever of metabolites of low polarity. This work is also aimed at expanding the knowledge of the chemical profile of this species. The phytochemical study of *S. glutinosa* led to the isolation of two triterpenes: 3 $\alpha$ -Hidroxi-glutin-5-ene (**08**) and friedelin (**09**), a diterpene (2Z)-2-methyl-[2,5,5,8 a-tetrametildecadronaftalen-1-yl] but-2-en-1-ol (**07**), two steroids, sitosterol (**10**) and stigmasterol (**11**), a flavanone: pinostrobin (**07**) and three amides: N-benzoyltiramide (**01**), N-{2 - [4 - (3-oxobutoxyl) phenyl] ethyl} benzamide (**02**), 2 (E) N-methyl-fenilacrilamide (**05**), the latter being new in the literature. The amide N-{2 - [4 - (2,3-dihydroxy-3-methyl-4-oxobutoxyl) phenyl] ethyl} benzamide (**03**) and carboxylic acid (**04**) acid 4 - {4 - [2 - (benzoylamino ) ethyl]

phenoxy} -2.3-dihydroxy-2-methylbutanoic was identified by GC-MS, where these two metabolites enhance the biogenesis of novel amide via O-prenylation then the loss due to carbon dioxide in several oxidations methyl terminal. Some of the compounds have their biological activity by testing tested against the *Guignardia citricarpa* of growth either *in vitro* mycelial where only the substance **(08)** showed an inhibition of about 50% and substance **(07)** stimulated the growth of the fungus. In the inhibition test of germination and appressorium formation, which evaluates the inhibition of fungal reproductive structure that is the main way of infection, the substance **(08)** showed an inhibition of 93.5% and 96.5% germination and training appressoria, respectively. The substance **(02)** inhibited 90.5% and 94.5% germination in appressorium formation. Thus, this work took place some fungicidal compounds with potential to control the fungus *G. citricarpa*.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	xi
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Família Rutaceae.....	1
1.2. A Classificação Botânica do Gênero <i>Galipea</i> .....	2
1.3 Perfil químico da Angostura, Conchocarpus e Galipea .....	5
1.4. <i>Swinglea glutinosa</i> e o seu perfil químico.....	31
1.5. Citricultura e Doenças citrícolas .....	39
1.6. Mancha Preta do Citros .....	39
1.7. <i>Guignardia citricarpa</i> .....	41
1.8. Sintomatologia da MPC .....	43
1.9. Medidas de controle da MPC .....	45
2. OBJETIVOS .....	48
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	49
3.1. Estudo Fitoquímico.....	49
3.1.1. Materiais .....	49
3.1.1.1. Material Cromatográfico .....	49
3.1.1.2. Reveladores .....	49
3.1.1.3. Solventes.....	60
3.1.2. Equipamentos.....	61
3.1.2.1. Câmara de UV .....	61
3.1.2.2. Balança analítica .....	61
3.1.2.3. Evaporadores Rotativos .....	61
3.1.2.4. Cromatógrafo Gasoso acoplado a Espectrometro de Massa .....	52
3.1.2.5. Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear .....	52
3.1.2.6. Espectrômetro de Massa.....	52
3.1.3. Coleta do Material vegetal .....	52

3.1.3.1. <i>Galipea carinata</i> e <i>Angostura bracteata</i> ( $\equiv$ <i>G. bracteata</i> ).....	52
3.1.3.2. <i>Swinglea glutinosa</i> .....	52
3.1.4. Preparo do extrato.....	53
3.1.4.1. <i>Galipea carinata</i> e <i>Angostura bracteata</i> ( $\equiv$ <i>G. bracteata</i> ).....	53
3.1.4.2. <i>Swinglea glutinosa</i> .....	54
3.1.5. Fracionamentos e Isolamento das Substâncias.....	55
3.1.5.1. <i>Galipea carinata</i> e <i>Angostura bracteata</i> ( $\equiv$ <i>G. bracteata</i> ).....	55
3.1.5.2. <i>Swinglea glutinosa</i> .....	55
3.2. Ensaio Biológico.....	63
3.2.1. Materiais e Reagentes.....	63
3.2.2. Equipamentos.....	63
3.2.3. Obtenção e identificação do fungo <i>G. citricarpa</i> .....	64
3.2.4. Preparo do inóculo para o ensaio.....	65
3.2.5. Metodologia de avaliação da influência das substâncias isoladas frente ao desenvolvimento da <i>G. citricarpa</i> .....	65
3.2.5.1. Ensaio de crescimento micelial.....	65
3.2.5.2. Ensaio de germinação de esporos e formação de apressórios.....	67
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	81
4.1. Estudo Fitoquímico.....	81
4.1.1. Substâncias isoladas e identificadas.....	81
4.1.1.1. Determinação Estrutural.....	73
4.1.1.1.1. AMIDAS.....	73
4.1.1.1.1.1. Identificação da Substância 1.....	73
4.1.1.1.1.2. Identificação da Substância 2.....	90
4.1.1.1.1.3. Identificação das Substâncias 3 e 4.....	100
4.1.1.1.1.4. Identificação da Substância 5.....	91
4.1.1.1.1.4.1. Proposta de biogênese da amida N-{2-[4-(3-Oxobutoxil)fenil]etil}benzamida.....	95

4.1.1.1.2. FLAVONONA.....	97
4.1.1.1.2.1. Identificação da Substância 6 .....	97
4.1.1.1.3. DITERPENO .....	102
4.1.1.1.3.1. Identificação da Substância 7 .....	102
4.1.1.1.4. TRITERPENO.....	110
4.1.1.1.4.1. Identificação da Substância 8 .....	110
4.1.1.1.4.2. Identificação das Substâncias 9 .....	115
4.1.1.1.5. ESTEROIDES.....	120
4.1.1.1.5.1. Identificação das Substâncias 10 e 11.....	120
4.1.2. Estudo Quimiossistemático .....	123
4.2 Atividade Biológica .....	125
4.2.1. Atividade bilógica dos Compostos Naturais frente ao Crescimento Micelial da <i>Guignardia citricarpa</i> .....	126
4.2.2. Atividade bilógica dos Compostos Naturais frente à germinação de esporos e formação de apressórios da <i>Guignardia citricarpa</i> .....	128
5. CONCLUSÕES .....	130
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	132

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Família Rutaceae

A ordem Sapindales (nova classificação para a antiga ordem Rutales) é formada pelas seguintes famílias: Rutaceae, Meliaceae, Burseraceae, Simaroubaceae, Anacardiaceae, Sapindaceae, Nitrariaceae, Kirkiaceae, Bierbersteiniaceae (APG, 2003).

A família Rutaceae constitui o maior grupo da ordem Sapindales, possuindo cerca de 160 gêneros e 1900 espécies que variam de ervas arbustivas a árvores de (GROPPO *et al.*, 2008), amplamente distribuídas nas regiões tropicais e temperadas do mundo, havendo uma maior ocorrência na América tropical, sul da África, Ásia e Austrália (PORTER e ELIAS, 1979). No Brasil ocorrem 32 gêneros e cerca de 154 espécies, onde o centro de diversidade são a Mata Atlântica e Amazônia (PIRANI, 1999). Esta família é formada pelas subfamílias Spathelioideae, Dictyolomatoideae, Flindersioideae, Aurantioideae, Toddalioideae e Rutoideae, sendo as três últimas subfamílias que abrigam o maior número de gêneros e espécies.

A Rutaceae destaca-se das demais famílias por abrigar espécies de grande importância econômica, como as espécies de gênero *Citrus* que abastecem o mercado mundial com seus frutos (laranjas, limões, tangerinas, limas e outros) destinados às indústrias para produção de sucos e concentrados como também seu consumo *in natura*, e seus óleos essenciais destinados às indústrias de cosméticos e perfumaria (SOUZA, 2001). As espécies do gênero *Pilocarpus* fornecem a pilocarpina, um alcaloide utilizado no tratamento do glaucoma (CHASE, 1999); espécies do gênero *Euxylophora*, *Zantozylum*, *Flindersia* e *Balfoudendron* que utilizadas na indústria madeireira (CARVALHO, 1994; LORENZI, 1992, RICHTER & DALLWITZ, 2000) e as espécies dos gêneros *Boronia*, *Choisya*, *Poncirus*, *Skimmia*, *Clausena*, *Correa*, *Murraya*, *Ravenia* e *Triphasia* são utilizadas como plantas ornamentais (CHASE, 1999; PIRANI, 1999). Outro fator que evidencia essa família, do ponto de vista químico, é a sua vasta variedade de metabólitos secundários que não são comuns nas outras famílias da ordem Sapindales. Os mais representativos são os alcaloides derivados do ácido antranílico, cumarinas, flavonoides e limonoides (WATERMAN, 1999).

## 1.2. A Classificação Botânica do Gênero *Galipea*

*Galipea Aubl.* é um gênero neotropical, com espécies ocorrendo de Costa Rica na América Central ao Brasil e Bolívia. Ele é um dos gêneros que constitui a subtribo Galipeinae (este nome substitui o ilegítimo Cuspariinae), tribo Galipeae, segundo KALLUNKI e PIRANI, 1998. O número de espécies descritas para *Galipea* foi confuso desde a descrição do gênero. *Galipea*, *Conchocarpus*, *Cusparia* e *Angostura* agrupam espécies, as quais não mostram concordância entre os taxonomistas em vários sistemas de classificação desde 1823. SAINT-HILAIRE (1823, 1824, 1825; in KALLUNKI e PIRANI, 1998) considerou *Conchocarpus*, *Cusparia* e *Angostura* como sinônima de *Galipea Aubl.*, e neste período ele descreveu várias espécies novas de *Galipea* as quais hoje pertencem a *Conchocarpus*. Ele também descreveu duas espécies novas de *Ticorea*, as quais hoje são classificadas em *Galipea*. As descrições destes gêneros por Saint-Hilaire foram aceitas por de Candolle (1824), Jussieu (1825) e Bentham & Hooker (1862). Engler, ao descrever Rutaceae em Martius's "Flora Brasiliensis" (1874) e em "Die Natürlichen Pflanzenfamilien" (1931, 1986), definiu esses gêneros um pouco mais amplamente aceitos atualmente. As duas espécies novas de *Ticorea* descritas por Saint-Hilaire foram incluídas em *Galipea*. As espécies de *Conchocarpus* e *Angostura* que Saint-Hilaire considerou sinônima de *Galipea*, Engler as excluiu deste último gênero e as considerou como grupos separados junto aos primeiros, respectivamente. Ou seja, Engler considera os três gêneros *Conchocarpus*, *Galipea* e *Angostura*, contudo, denominando este último de *Cusparia* e ainda confundindo algumas espécies deste último com o primeiro. Ele também falhou ao considerar *Galipea bracteata* (Nees & Mart.) congênera a *C. trifoliata*.

Esses erros foram retificados por KALLUNKI e PIRANI (1998). As espécies excluídas de *Angostura* foram consideradas pertencentes à *Conchocarpus* J. C. Mikan. Três novas espécies de *Angostura* (*A. alipes* Kallunki, *A. quinquefolia* Kallunki, *A. simplex* Kallunki) foram descritas, e três novas combinações nesse gênero foram feitas [*A. bracteata* (Nees e Mart.) Kallunki, *A. granulosa* (Kallunki) Kallunki, *A. longiflora* (K. Krause) Kallunki]. Eles reconheceram sete espécies de *Angostura*, as seis últimas e a espécie considerada típica *A. trifoliata* (Willd.) T. S. Elias.

O sistema Flora brasiliensis (Pirani, [http://florabrasiliensis.cria.org.br/search?taxon\\_id=5912](http://florabrasiliensis.cria.org.br/search?taxon_id=5912)) lista para o gênero *Galipea* as espécies citadas a seguir:

<i>Galipea</i> Aubl.	<i>G. aromatica</i> (Aubl.) Spreng.
<i>G. bracteata</i> (Nees e Mart.) Engl.	<i>G. carinata</i> Pirani
<i>G. ciliata</i> Taub.	<i>G. congestiflora</i> Pirani
<i>G. cuneifolia</i> (Nees e Mart.) A. St.-Hil. ex DC.	<i>G. bracteata</i> (Nees e Mart.) Schult.
<i>G. candolleana</i> A. St.-Hil.	<i>G. cusparia</i> A. St.-Hil. ex DC.
<i>G. davisii</i> Sandwith	<i>G. elegans</i> A. St.-Hil.
<i>G. febrifuga</i> Baill.	<i>G. fissa</i> Miq.
<i>G. fontanesiana</i> A. St.-Hil.	<i>G. gaudichaudiana</i> A. St.-Hil.
<i>G. grandifolia</i> Engl.	<i>G. heterophylla</i> A. St.-Hil.
<i>G. jasminiflora</i> (A. St.-Hil.) Engl.	<i>G. jasminiflora</i> var. <i>febrifuga</i> (A.St.-Hil.) Engl.
<i>G. jasminiflora</i> var. <i>tenuiflora</i> Engl.	<i>G. lasiostemon</i> A. St.-Hil. ex DC.
<i>G. laxiflora</i> Engl.	<i>G. longiflora</i> K. Krause
<i>G. longifolia</i> A. St.-Hil.	<i>G. lucida</i> (Rusby) Kaastra
<i>G. macrophylla</i> (J.C. Mikan) A.St.-Hil.	<i>G. martiana</i> A. St.-Hil.
<i>G. mikaniana</i> A. St.-Hil.	<i>G. multiflora</i> Schultes
<i>G. odoratissima</i> Lindl.	<i>G. officinalis</i> J. Hancock
<i>G. ovata</i> A. St.-Hil. e Tul.	<i>G. pentagyna</i> A. St.-Hil.
<i>G. pentandra</i> A. St.-Hil.	<i>G. ramiflora</i> Pirani
<i>G. resinosa</i> A. St.-Hil. ex DC.	<i>G. revoluta</i> Pirani
<i>G. riedeliana</i> Regel	<i>G. simplicifolia</i> (Nees e Mart.) Engl.
<i>G. stelligera</i> R.S. Cowan	<i>G. stricta</i> Rusby
<i>G. toxicaria</i> Spruce ex Engl.	<i>G. trifoliata</i> Aubl.
<i>G. tubiflora</i> A.C. Sm.	

Um segundo sistema de classificação “on line” Plant Systematics cita as mesmas espécies acima e mais outras mostradas abaixo:

<i>G. arrabidae</i> Steud	<i>G. corymbosa</i> Spreng
<i>G. dasysperma</i> Gómez-Laur. e Q. Jiménez	<i>G. dicatoma</i> Saldanha da Gama
<i>G. granulosa</i> Kallunki	<i>G. guatemalensis</i> Standl. e Steyerl.



*G. nicaraguensis* Standl. e O. Williams

*G. ossana* DC.

*G. pentaphylla* Macfad

*G. oppositifolia* Spruce ex Engl.

*G. panamensis* T. Elias

*G. rufescens* Turcz.

Porém, como comentado acima, Kallunki & Pirani (1998) re-estudaram várias espécies de *Galipea* e as transferiram para *Angostura* ou *Conchocarpus*. Assim, abaixo se encontram as espécies de *Galipea* consideradas sinônima de *Angostura* ou *Conchocarpus*:

*Angostura bracteata* (Nees & Mart.) Kallunki ≡ *Galipea bracteata* (Nees & Mart.) Schult.

*A. trifoliata* (Willd.) T.S. Elias ≡ *G. cusparia* A. St.-Hil ex DC.

*A. trifoliata* (Willd.) T.S. Elias ≡ *G. febrifuga* (Humb.) Baill.

*A. granulosa* ((Kallunki) Kallunki ≡ *G. granulosa* Kallunki

*A. longiflora* (K. Krause) Kallunki ≡ *G. longiflora* K. Krause

*A. trifoliata* (Willd.) T. S. Elias ≡ *G. officinalis* J. Hancock

*Conchocarpus cuneifolius* Nees & Mart. ≡ *G. cuneifolia* (Nees e Mart.) A. St.-Hil. Ex DC.

*C. elegans* (A. St.-Hil.) Kallunki e Pirani ≡ *G. elegans* A. St.-Hil.

*C. fontanesianus* (A. St.-Hil.) Kallunki e Pirani ≡ *G. fontanesiana*

*C. gaudichaudianus* (A. St.-Hil.) Kallunki e Pirani ≡ *G. Gaudichaudiana* A. St.-Hil.

*C. heterophyllus* (A. St.-Hil.) Kallunki e Pirani ≡ *G. heterophylla* A. St.-Hil.

*C. longifolius* (A. St.-Hil.) Kallunki e Pirani ≡ *G. longifolia* A. St.-Hil.

*C. longifolius* (A. St.-Hil.) Kallunki e Pirani ≡ *G. pentagyna* A. St.-Hil.

*C. macrophyllus* J.C. Mikan ≡ *G. macrophylla* (J. C. Mikan) A. St.-Hil.

*C. macrophyllus* J.C. Mikan ≡ *G. mikaniana* A. St.-Hil.

*C. nicaraguensis* (Standl. & L.O. Williams) Kallunki e Pirani ≡ *G. nicaraguensis* Standl. e L.O. Williams

*C. odoratissimus* (Lindl.) Kallunki e Pirani ≡ *G. odoratissima* Lindl.

*C. ovatus* (A. St.-Hil. e Tul.) Kallunki e Pirani ≡ *G. ovata* A. St.-Hil e Tul.

*C. ovatus* (A. St.-Hil. e Tul.) Kallunki e Pirani ≡ *G. riedeliana* Regel

*C. pentandrus* (A. St.-Hil.) Kallunki e Pirani ≡ *G. candolleana* A. St.-Hil.

*C. pentandrus* (A. St.-Hil.) Kallunki e Pirani ≡ *G. pentandra* A. St.-Hil.

*C. ramiflorus* (Spruce ex Engl.) Kallunki & Pirani  $\equiv$  *G. ramiflora* Spruce ex Engl., pro syn.

*C. silvestris* (Nees e Mart.) Kallunki e Pirani  $\equiv$  *G. lasiostemon* A. St.-Hil. ex DC.

*C. toxicarius* (Spruce ex Engl.) Kallunki e Pirani  $\equiv$  *G. toxicaria* Spruce ex Engl., pro syn.

Portanto, à partir dessa reclassificação, são consideradas espécies de *Galipea* apenas aquelas citadas abaixo:

*G. aromatica* (Aubl.) Spreng.

*G. carinata* Pirani

*G. congestiflora* Pirani

*G. dasysperma* Gómez-Laur. e Q. Jiménez

*G. dicatoma* Saldanha da Gama

*G. grandifolia* Engl.

*G. jasminiflora* (A. St.-Hil.) Engl.

*G. lucida* (Rusby) Kaastra

*G. multiflora* Schultes

*G. ossana* DC.

*G. pentaphylla* Macfad

*G. revoluta* Pirani

*G. simplicifolia* (Nees e Mart.) Engl.

*G. stricta* Rusby

*G. tubiflora* A.C. Sm.

*G. arrabidae* Steud

*G. ciliata* Taub.

*G. corymbosa* Spreng

*G. davisii* Sandwith

*G. fissa* Miq.

*G. guatemalensis* Standl. e Steyererm.

*G. laxiflora* Engl.

*G. martiana* A. St.-Hil.

*G. oppositifolia* Spruce ex Engl.

*G. panamensis* T. Elias

*G. resinosa* A. St.-Hil. ex DC.

*G. rufescens* Turcz.

*G. stelligera* R.S. Cowan

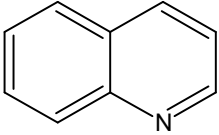
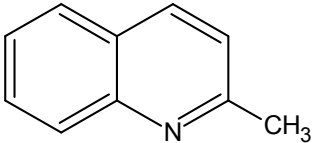
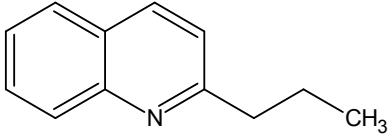
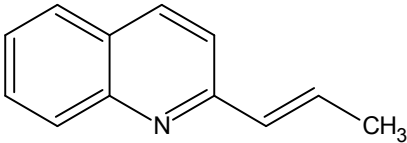
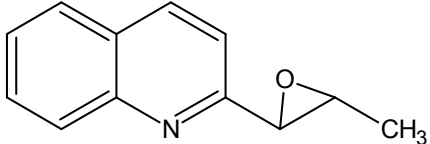
*G. trifoliata* Aubl.

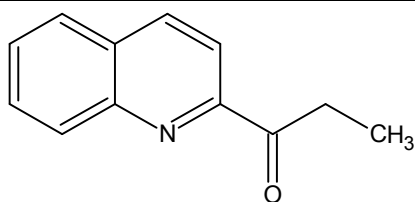
### 1.3 Perfil químico de *Angostura*, *Conchocarpus* e *Galipea*

Algumas espécies do gênero *Galipea* Aubl. já foram estudadas e os constituintes isolados encontram-se nas TABELAS 1.1 e 1.2. Contudo, três das espécies estudadas hoje (*G. longifolia*, *G. bracteata* e *G. officinalis*) são consideradas *Angostura* e apenas *G. carinata*, a qual foi estudada pelo grupo de Produtos Naturais da UFSCar, continua como espécie de *Galipea*. Várias espécies do gênero *Conchocarpus* também já foram estudadas pelo grupo de Produtos

Naturais da UFSCar, e algumas espécies pertencentes hoje a esse gênero já foram incluídas no gênero *Angostura*. Desta forma, de acordo com o levantamento bibliográfico o perfil químico do gênero *Angostura* (TABELA 1.1), é constituído por alcaloides 2-alkil-quinolínicos, 2-alkilaril-quinolínicos, 2-aryl-quinolínicos, furanoquinolínicos e fureno-secoquinolínicos, chalcona, cromona e cumarinas C e O-preniladas. Os alcaloides isolados dessas espécies, as chimaninas B e D demonstraram atividades leishmanicidas (FOURNET *et al.*, 1994) e o alcaloide 2-fenil-quinolínico mostrou-se eficaz no tratamento de úlceras (ZANATTA *et al.*, 2009).

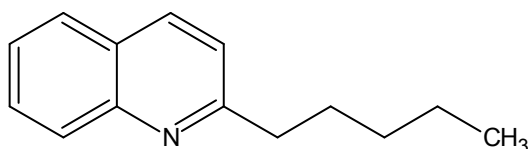
Tabela 1. 1 - Substâncias isoladas do gênero *Angostura*

<b>Alcaloides</b>	
<b>Substância</b>	<b>Espécie</b>
 Quinolina	<i>A. trifoliata</i> (casca) <sup>a,b</sup>
 Quinaldina	<i>A. trifoliata</i> (casca) <sup>a,c</sup>
 2-n-propilquinolína	<i>A. bracteata</i> (galhos) <sup>d</sup> <i>A. longiflora</i> (galhos, casca da raiz e folhas) <sup>e,f</sup>
 Chimanina B	<i>A. longiflora</i> (galhos, casca da raiz e folhas) <sup>e,f</sup>
 Chimanina D	<i>A. longiflora</i> (galhos, casca da raiz e folhas) <sup>e,f</sup>



2-(prop-1'-ona)quinolína

*A. bracteata* (folhas)<sup>g</sup>

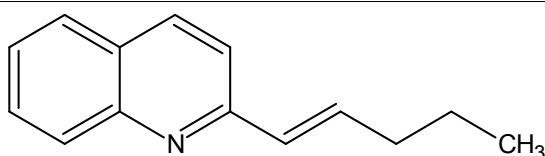


2-n-Pentil-quinolína

*A. trifoliata* (casca e casca do tronco)<sup>a,h</sup>

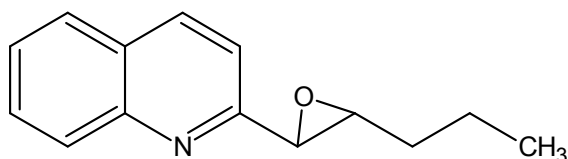
*A. bracteata* (galhos e folhas)<sup>d,g</sup>

*A. longiflora* (galhos, casca da raiz e folhas)<sup>e,f</sup>



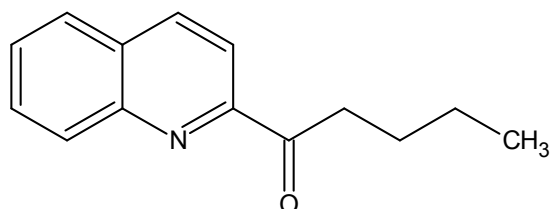
2-(Pent-1'-enil)quinolína

*A. bracteata* (galhos)<sup>d</sup>



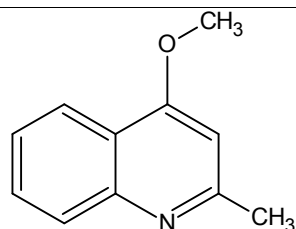
2-(1',2'-*trans*-epóxipentil)quinolína

*A. bracteata* (folhas)<sup>g</sup>



2-(pent-1'-ona)quinolína

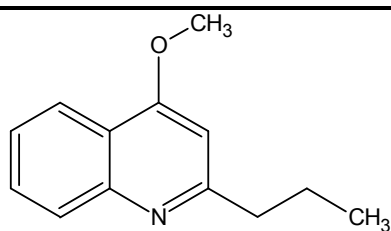
*A. bracteata* (folhas)<sup>g</sup>



4-Metóxiquinaldina

*A. trifoliata* (casca)<sup>i</sup>

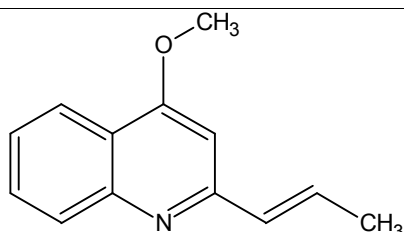
---



Chimanina A

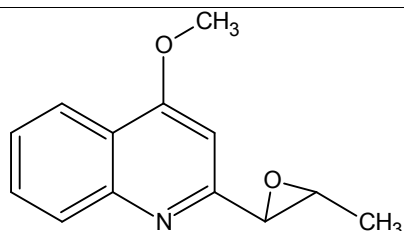
*A. longiflora* (galhos, casca da raíz e folhas)<sup>e,f</sup>

*A. bracteata* (folhas)<sup>g</sup>



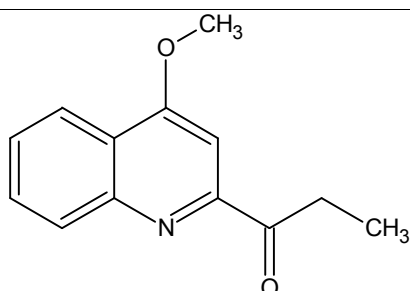
Chimanina C

*A. longiflora* (galhos, casca da raíz e folhas)<sup>e</sup>



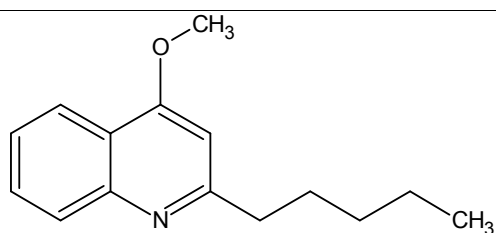
4-Metóxi-2-(1',2'-*trans*-epóxi)propilquinolína

*A. bracteata* (folhas)<sup>g</sup>



4-Metóxi-2-(propano-1'-ona)quinolína

*A. bracteata* (folhas)<sup>g</sup>

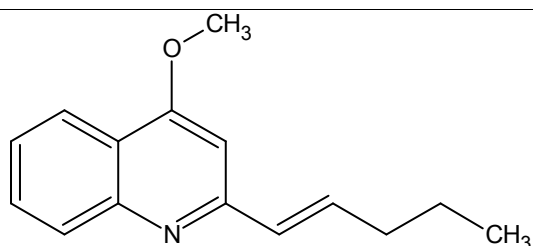


4-metóxi-2-n-pentilquinolína

*A. trifoliata* (casca)<sup>a,j,k</sup>

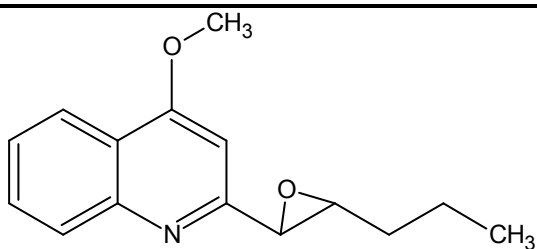
*A. bracteata* (folhas)<sup>g</sup>

*A. longiflora* (galhos, casca da raíz, casca do galho e folhas)<sup>e,f,l</sup>



4-Metóxi-2-(pen-1'-enil)quinolína

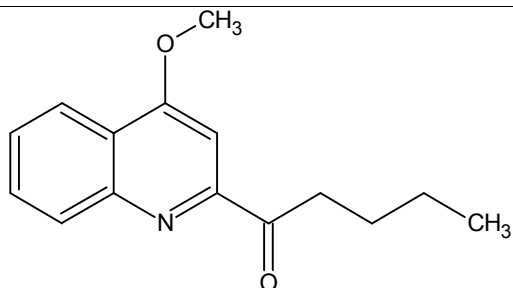
*A. longiflora* (casca do galho)<sup>l</sup>



*A. bracteata* (folhas)<sup>g</sup>

4-Metóxi-2-(1',2'-*trans*-epóxi-pentil)quinolina

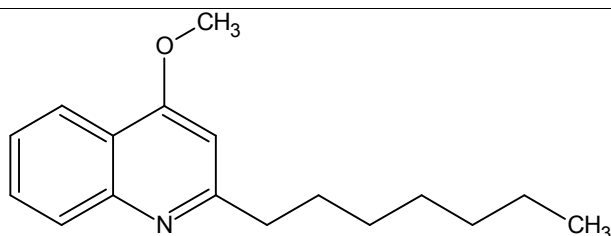
---



*A. bracteata* (folhas)<sup>g</sup>

4-Metóxi-2-(penti-1'-ona)quinolina

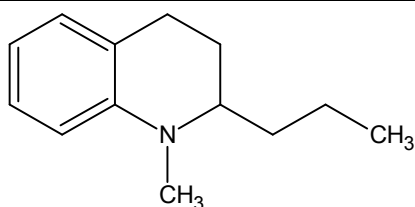
---



*A. bracteata* (folhas)<sup>g</sup>

2-Metóxi-n-heptilquinolina

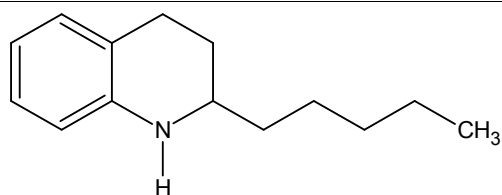
---



*A. trifoliata* (casca do tronco)<sup>h</sup>

1-Metil-2-propil-1,2,3,4-tetraidroquinolina

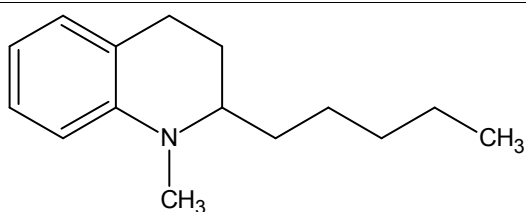
---



*A. trifoliata* (casca do tronco)<sup>h</sup>

2-n-pentil-1,2,3,4-tetraidroquinolina

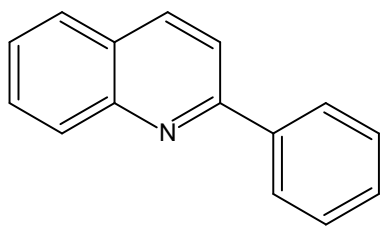
---



*A. trifoliata* (casca do tronco)<sup>h,m,n</sup>

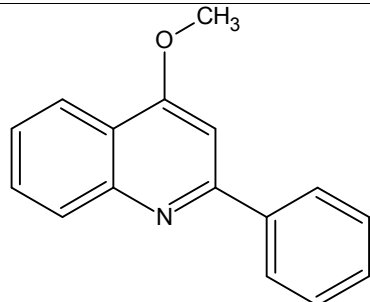
(-) – Angustureína

---



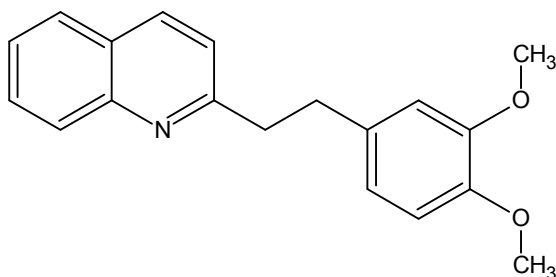
2-Fenilquinolina

*A. longiflora* (galho e casca do caule)<sup>f,o</sup>



4-Metóxi-2-fenilquinolina

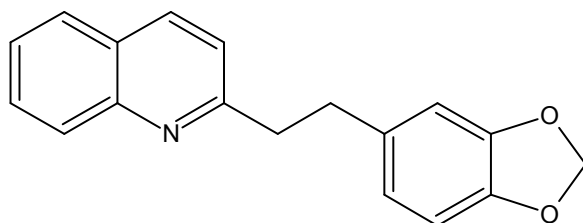
*A. longiflora* (galho e casca do caule)<sup>f,o</sup>



2-(3,4-Dimetóxi-feniletíl)quinolina

*A. longiflora* (galho e casca do caule)<sup>f,o</sup>

*A. trifoliata* (casca do tronco)<sup>h</sup>

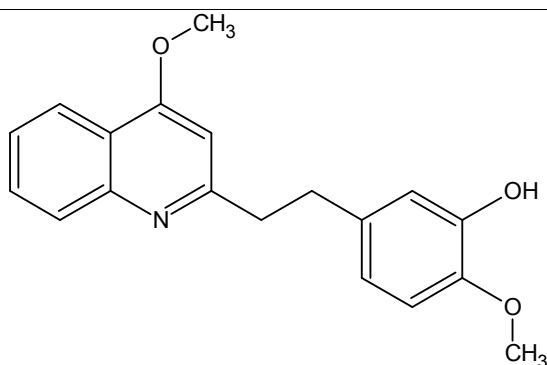


2-(3'4'-Metilendioxifeniletíl)quinolina

*A. trifoliata* (casca do tronco e casca do galho)<sup>h,p</sup>

*A. bracteata* (galhos e folhas)<sup>d,g</sup>

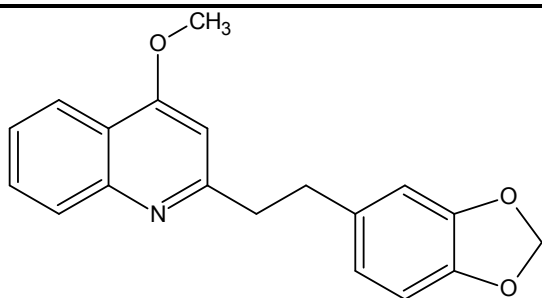
*A. longiflora* (galhos e casca do caule)<sup>f,o</sup>



4-Metóxi-2-(3'-hidróxi-4'-metoxifeniletíl)quinolina

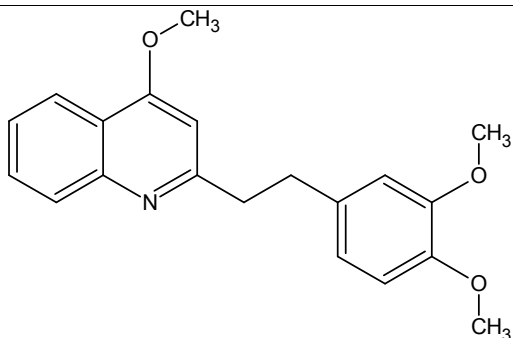
---

*A. trifoliata* (casca do tronco)<sup>h</sup>



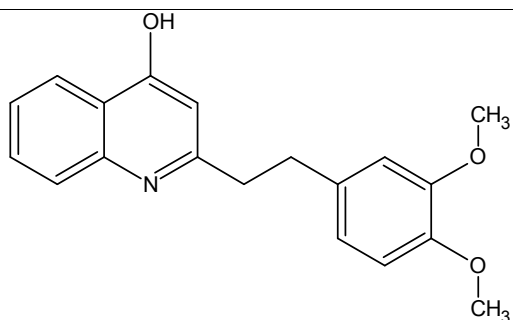
Cusparina

*A. trifoliata* (casca)<sup>a,j,p</sup>  
*A. bracteata* (folhas)<sup>g</sup>  
*A. longiflora* (galhos e casca do caule)<sup>f,o</sup>



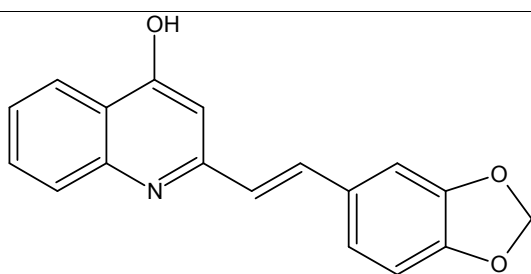
Galipina

*A. trifoliata* (casca, casca do tronco)<sup>a,h,j,k,p</sup>



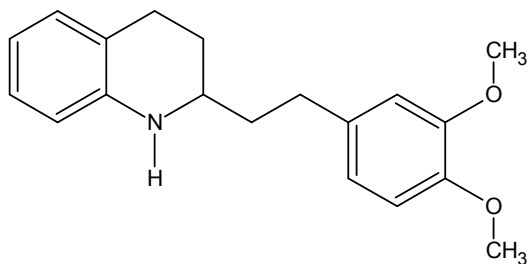
Galipolina

*A. trifoliata* (casca)<sup>a,b</sup>



2-(3',4'-Metilenodióxiestiril)4-metóxiquinolina

*A. longiflora* (casca do caule)<sup>o</sup>

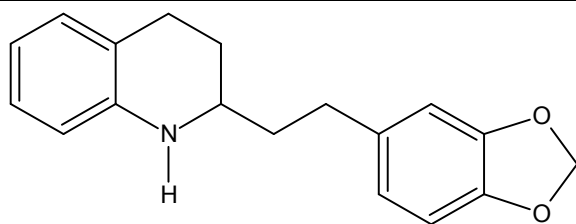


2-(3',4'-Dimetóxiifeniletil)1,2,3,4-tetraidroquinolina

*A. trifoliata* (casca do tronco)<sup>h</sup>

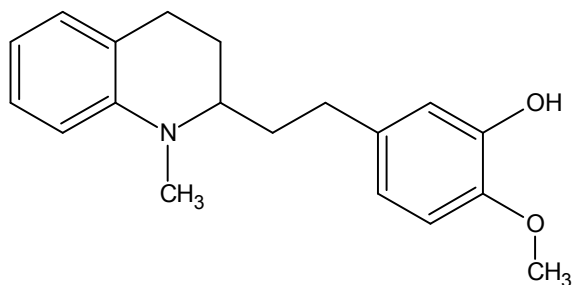
---





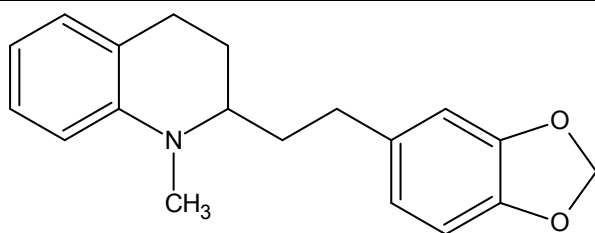
2-(3',4'-Metilenodióxifeniletil)1,2,3,4-tetraidroquinolina

*A. trifoliata* (casca do tronco)<sup>h</sup>



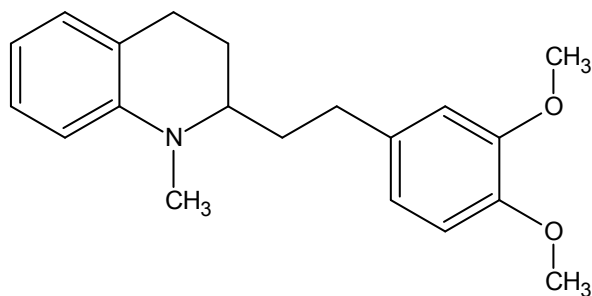
(-)-Galipeina

*A. trifoliata* (casca do tronco)<sup>h,m,n</sup>



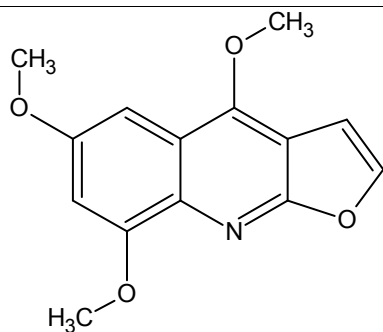
Galipinina

*A. trifoliata* (casca do tronco)<sup>h,j,k,p</sup>



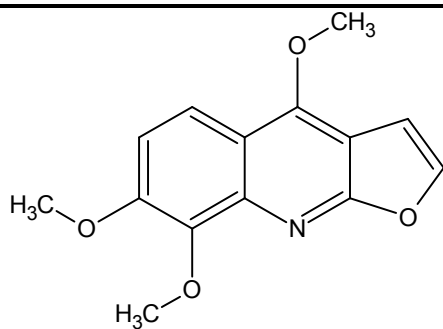
Cuspareina

*A. trifoliata* (casca e casca do tronco)<sup>a,h,j,k,n,p</sup>



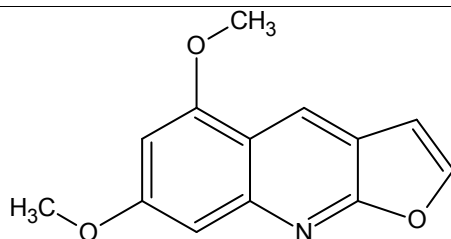
Maculosidina

*A. trifoliata* (casca do tronco)<sup>h</sup>



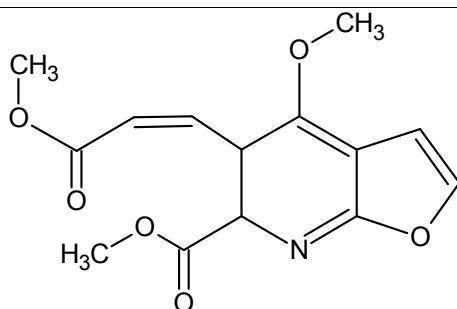
Esquimianina

*A. longiflora* (casca da raiz)<sup>e</sup>



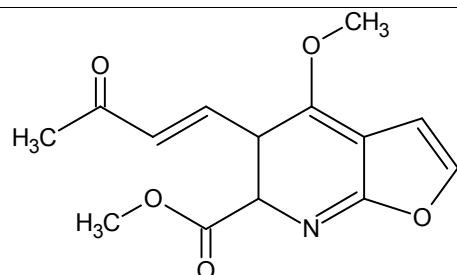
Evolitrina

*A. bracteata* (folhas)<sup>g</sup>



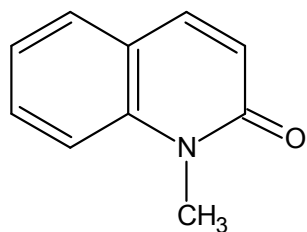
Z-Dimetilrhoifolinati

*A. bracteata* (folhas)<sup>g</sup>



E-Dimetilrhoifolinati

*A. bracteata* (folhas)<sup>g</sup>



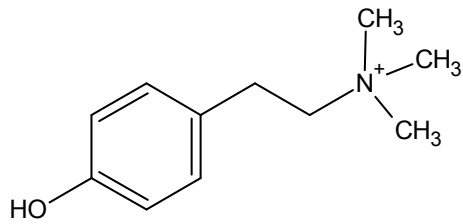
1-Metil-2-quinolona

*A. trifoliata* (casca do tronco)<sup>h,k</sup>

---

## Amina

---



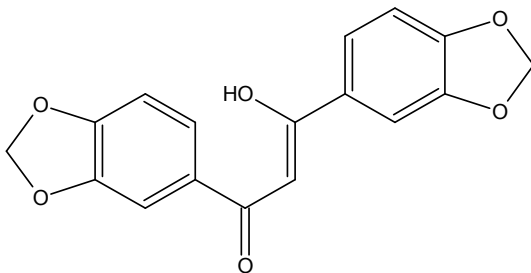
Candicina

*A. trifoliata* (casca do tronco)<sup>h</sup>

---

## Flavonoide

---



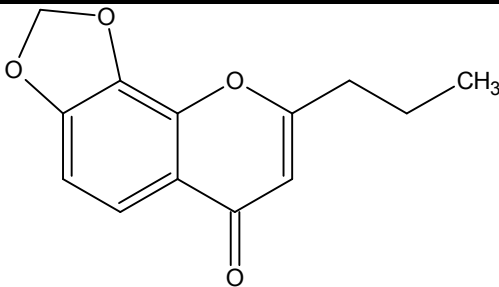
Galiposina

*A. granulosa* (casca)<sup>q</sup>

---

## Cromona

---



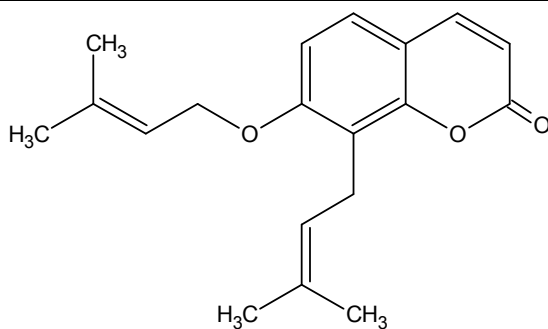
Granulosina

*A. granulosa* (casca)<sup>f</sup>

---

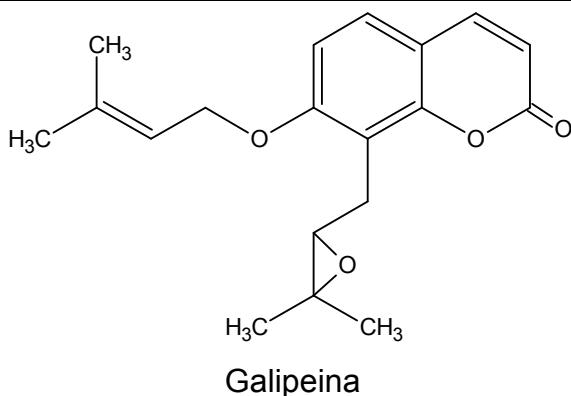
## Cumarinas

---

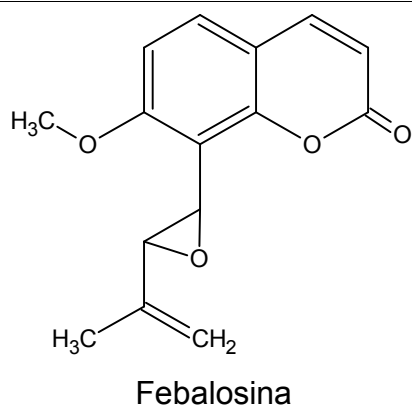


Ramosina

*A. trifoliata* (casca do galho e casca da raiz)<sup>s</sup>



*A. trifoliata* (casca do galho e casca da raiz)<sup>s</sup>



*A. trifoliata* (casca do galho e casca da raiz)<sup>s</sup>

---

**a** - OPENSHAW, 1953; **b** – MESTER, 1973; **c** – MESTER, 1983; **d** - VIEIRA e KUBO,1990; **e** – FOURNET *et al.*, 1993; **f** – FOURNET *et al.*, 1994; **g** – ANDRADE, 2003; **h** – JACQUEMOND-COLLET *et al.*, 2001; **i** – DA SILVA *et al.*, 2007; **j** - AHSAN *et al.*, 1994; **k** – HOUGHTON *et al.*, 1999; **l** – MICHAELI, 1992; **m** – DUFFIELD & JEFFERIES, 1963; **n** - JACQUEMOND-COLLET *et al.*,1999; **o** - FOURNET *et al.*, 1989; **p** - ROKOTOSON *et al.*, 1989; **q** – LÓPEZ *et al.*, 1998; **r** - LÓPEZ e BARRILLAS, 1997; **s** – WIRASUTISNA *et al.*, 1987.

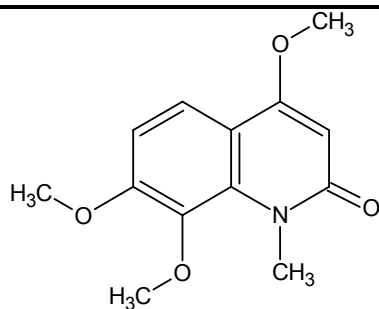
Com a nova classificação botânica proposta por KALLUNKI e PIRANI (1998) o conhecimento do perfil químico do gênero *Galipea* (TABELA 1.2) tornou-se escasso, sendo constituído por alcaloides 2-quinolona e por cumarinas C e O-preniladas. As principais atividades biológicas relatadas das espécies do gênero são os dos seus extratos brutos, onde o extrato clorofórmico das folhas da *G. simplicifolia* mostrou atividade bactericida contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (NOVAIS *et al.*, 2003) e o extrato hexânico e metanólico das folhas e caules da *G. carinata* apresentou atividade tripanocida (AMBROZIN *et al.*, 2004a) e as cumarinas listadas na TABELA 1.2 foram ativas contra a *Leishmania panamensis* (ARANGO *et al.*, 2010).

Tabela 1. 2 - Substâncias isoladas do gênero Galipea

---

### Alcaloides

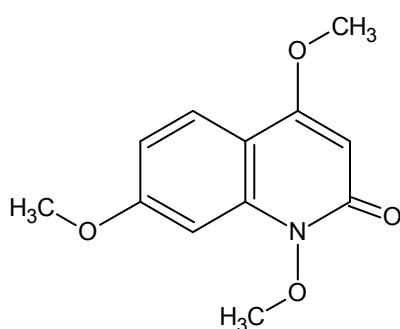
---



*G. carinata* (caule)<sup>a</sup>

N-Metil-4,7,8-trimetóxi-2-quinolona

---



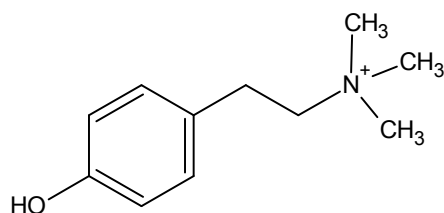
*G. carinata* (caule)<sup>a</sup>

N-4,7-trimetóxi-2-quinolona

---

### Amina

---



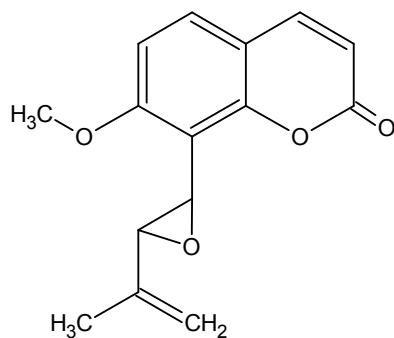
*G. carinata* (caule)<sup>a</sup>

Candicina

---

### Cumarinas

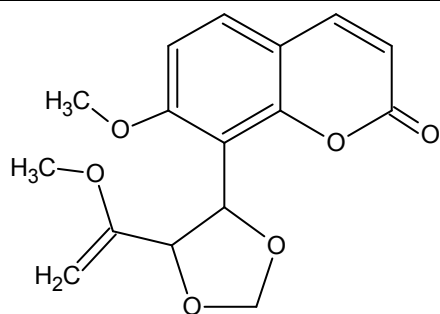
---



*G. panamensis* (folha)<sup>b</sup>

Febalosina

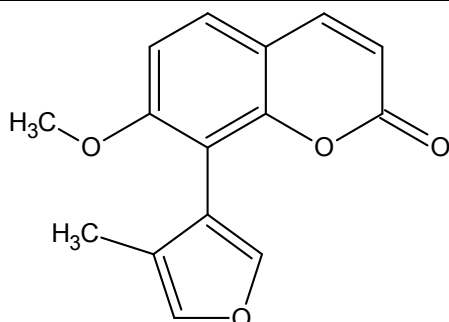
---



*G. panamensis* (folha)<sup>b</sup>

Acetonídeo murrangatina

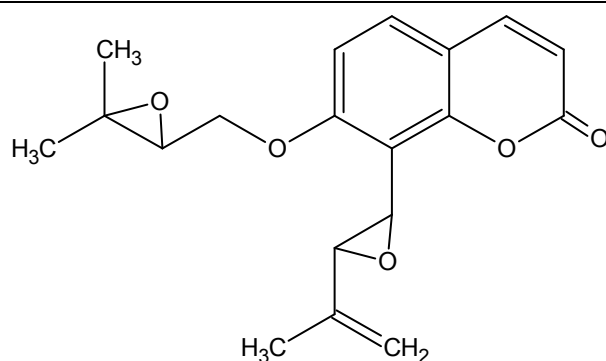
---



*G. panamensis* (folha)<sup>b</sup>

7-Metóxi-8-(4-metil-3-furil)2*H*-cromen-ona

---



*G. panamensis* (folha)<sup>b</sup>

7-[[[(2R)-3,3-Dimetiloxiran-2-il]metóxi]8-[(2R,3R)-3-isopropeniloxiran-2-il]2*H*-cromen-2-ona

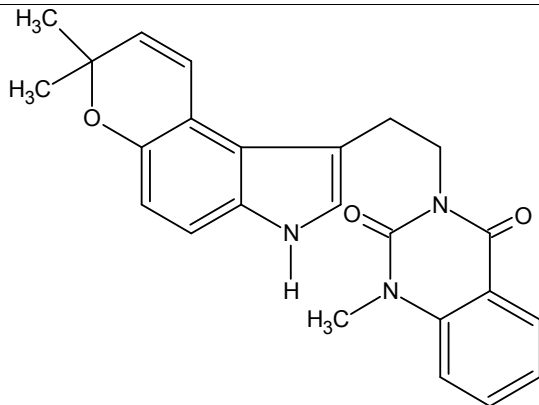
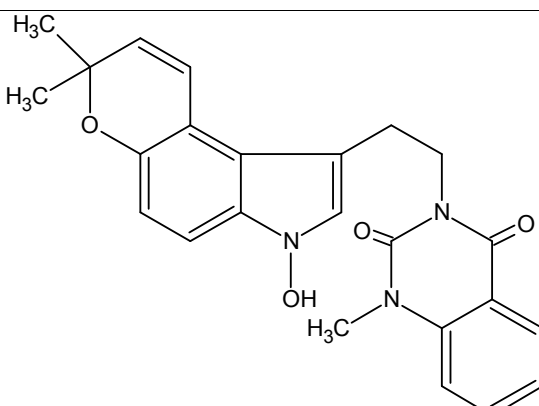
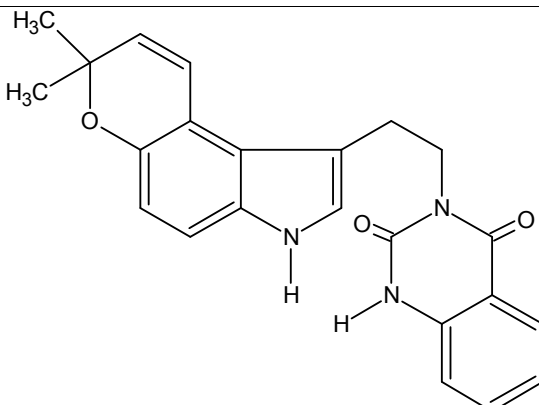
---

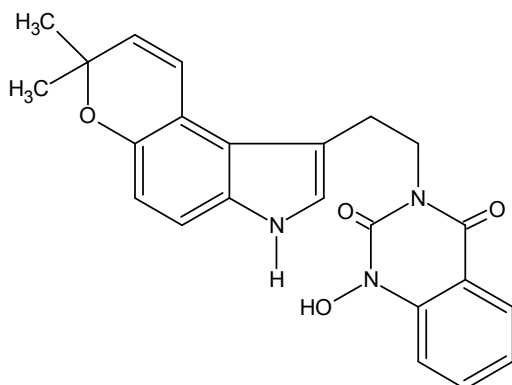
**a** – MARQUES, 2006; **b** – ARANGO, 2010.

Por sua vez, o perfil químico do gênero *Conchocarpus* (TABELA 1.3) é constituído por alcaloides acridônicos polimetoxilados, 3-alkil-2-quinolona, 2-fenil-4quinolona, furanoquinolínicos e indolquinazolínicos, flavonas, piranoflavonas, acetofenonas, amidas, cumarinas simples e piranocumarinas lineares e angulares. O extrato de éter de petróleo da espécie *C. macrophyllus* apresentou atividade tripanocida (ALBARICI, 2006), assim como os alcaloides N-metil-2-fenil-4-quinolona e o alcaloide acridônico haplotusina (AMBROZIN, 2008), os alcaloides acridônicos cuspalina e cusculina obtidos da espécie *C. paniculatus* demonstraram atividade

moluscicida (VIEIRA & KUBO,1992) e o alcaloide 3-alkuil-2-quinolona obtido da espécie *C. gaudichaudianus* subsp. *Bahiensis* apresentou atividade leishmanicida (CORTEZ, 2002).

Tabela 1. 3 - Substâncias isoladas do gênero *Conchocarpus*.

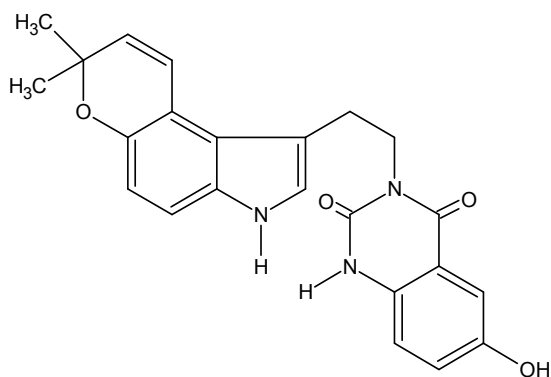
<b>Alcaloides</b>	
	<p><i>C. macrocarpus</i> (caule)<sup>a</sup></p> <p><i>C. gaudichaudianus</i> subsp. <i>Bahiensis</i> (caule e galhos)<sup>b</sup></p>
<p>N-Metil-indolquinazolina-[9,10-(2,2dimetilcromeno)goshyyuamida II]</p>	
	<p><i>C. macrocarpus</i> (caule)<sup>a</sup></p>
<p>Hidróxi-indolquinazolina</p>	
	<p><i>C. gaudichaudianus</i> subsp. <i>Bahiensis</i> (caule e galhos)<sup>b</sup></p>
<p>9,10-(2,2-Dimetilcromeno)14-demetilgoshyyuamida II</p>	



*C. gaudichaudianus*  
subsp. *Bahiensis*  
(galhos)<sup>b</sup>

9,10-(2,2-Dimetilcromeno)14-hidróxi-14-  
demetilgoshyyuamida II

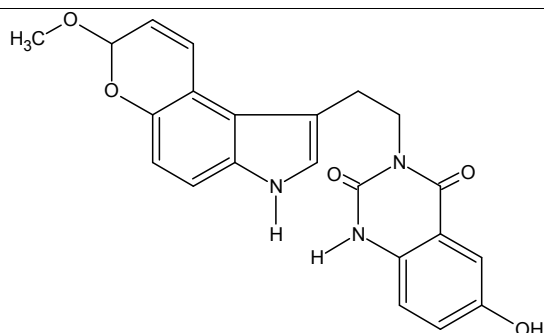
---



*C. gaudichaudianus*  
subsp. *Bahiensis*  
(caule)<sup>b</sup>

9,10-(2,2-Dimetilcromeno)3-hidróxi-14-  
demetilgoshyyuamida II

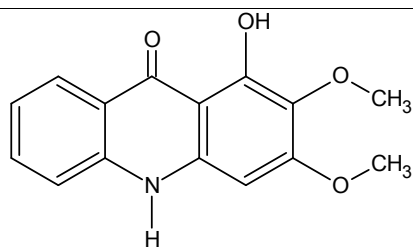
---



*C. gaudichaudianus*  
subsp. *Bahiensis*  
(caule)<sup>b</sup>

9,10-(2-Metóxicromeno)3-hidróxi-14-  
demetilgoshyyuamida II

---

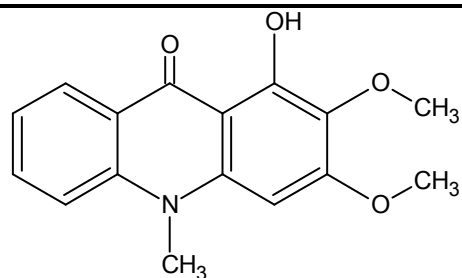


*C. inopinatus*  
(folhas)<sup>c</sup>

Xantoxila

---

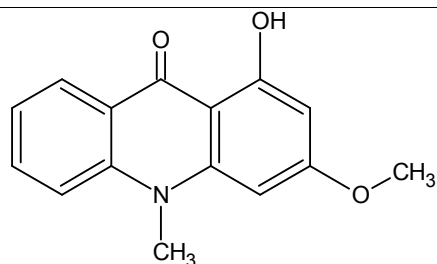




Arborinina

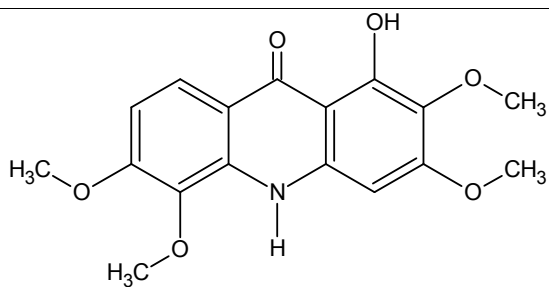
*C. macrophyllus*  
(caule)<sup>a,d</sup>

*C. inopinatus*  
(folhas)<sup>c</sup>



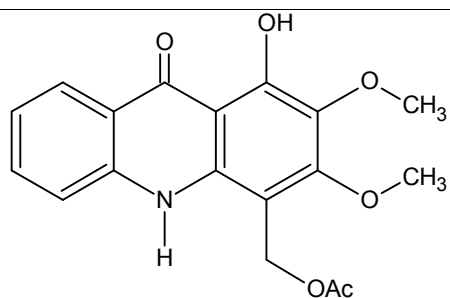
1-Hidroxi-3-metóxi-N-metilacridona

*C. inopinatus*  
(folhas)<sup>c</sup>



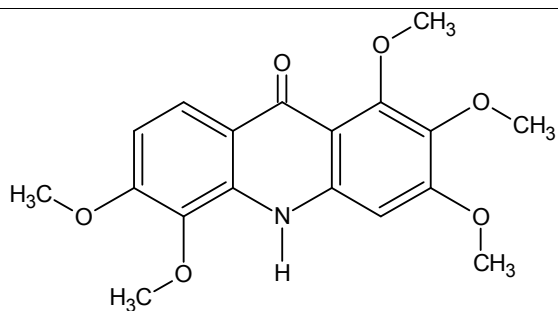
Cuspanina

*C. paniculatus*  
(folhas)<sup>e</sup>



1-Hidroxi-2,3-dimetóxi-N-metilenoacetóxiacridona

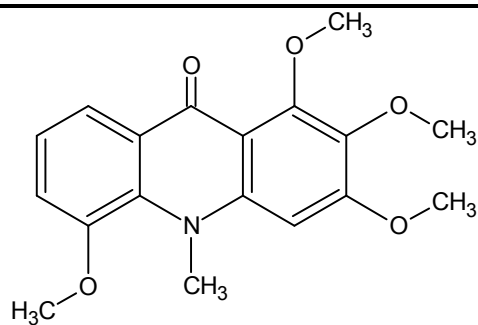
*C. inopinatus*  
(folhas)<sup>c</sup>



Cusculina

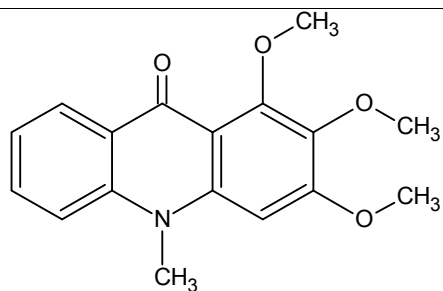
*C. paniculatus*  
(folhas)<sup>e</sup>

---



1,2,3,5-Tetrametóxi-N-metilacridona

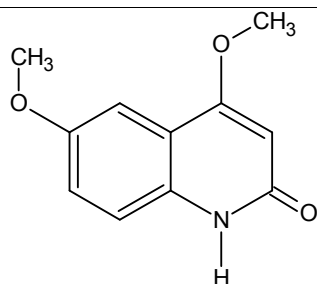
*C. inopinatus*  
(folhas)<sup>c</sup>



Metilarbonina

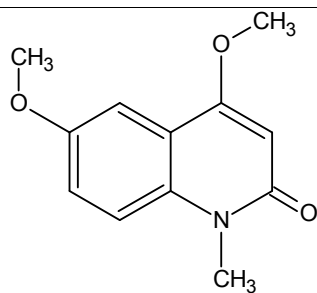
*C. macrophyllus*  
(caule)<sup>d</sup>

*C. inopinatus*  
(folhas e caule)<sup>c,f</sup>



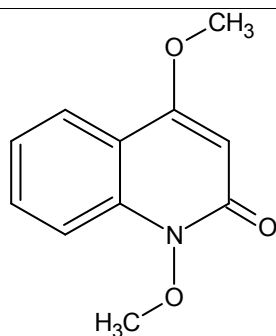
4,6-Dimetóxi-2-quinolona

*C. longifolius*  
(caule)<sup>g</sup>



N-Metil-4,6-dimetóxi-2-quinolona

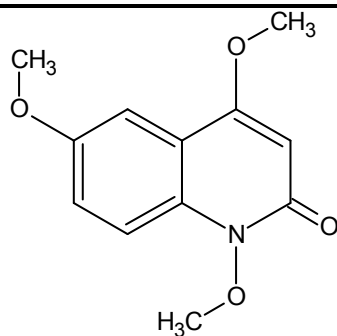
*C. longifolius*  
(caule)<sup>g</sup>



Hplotusina

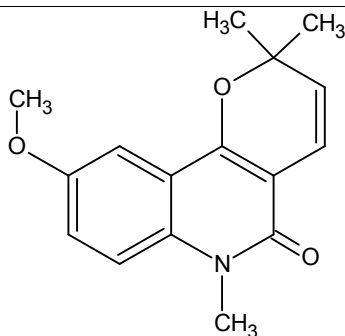
*C. longifolius*  
(caule)<sup>g</sup>

*C. heterophyllus*  
(caule)<sup>h</sup>



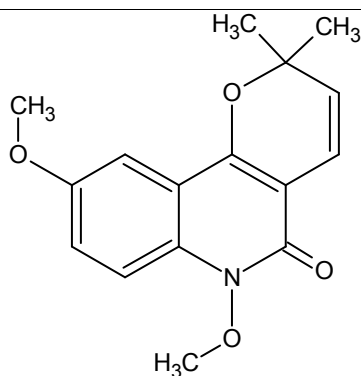
*C. longifolius*  
(caule)<sup>g</sup>

6-Metóxi-haplotusina



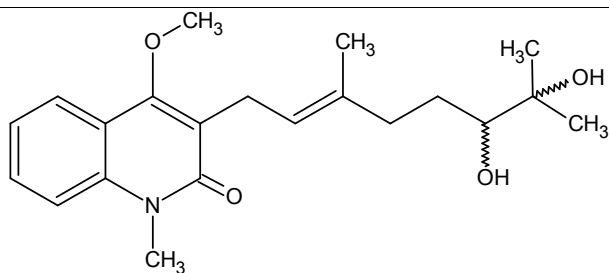
*C. longifolius*  
(caule)<sup>g</sup>

N-Metil-haplamina



*C. longifolius*  
(caule)<sup>g</sup>

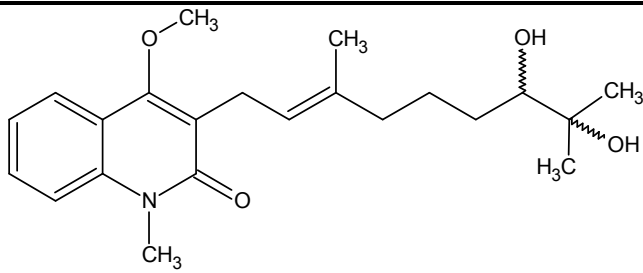
N-Metóxi-haplamina



*C. gaudichaudianus*  
subsp. *Bahiensis*  
(folhas)<sup>b</sup>

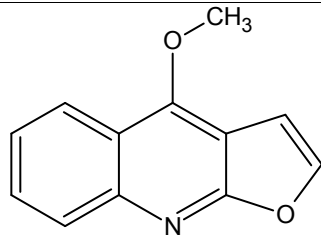
4-Metóxi-1-metil-3-(3',7',-dimetil-6',7'-diidróxi-2'-octenil)2-  
quinolona

---



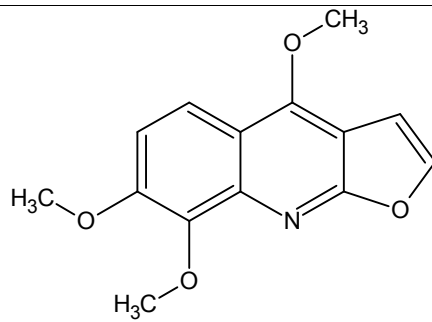
4-Metóxi-1-metil-3-(3',8,-dimetil-7',8'-diidróxi-2'-nonenil)2-quinolona

*C. gaudichaudianus*  
subsp. *Bahiensis*  
(folhas)<sup>b</sup>



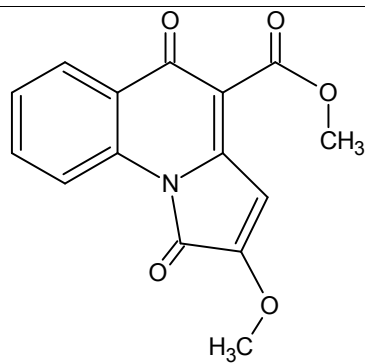
Dictamida

*C. inopinatus*  
(caule)<sup>f</sup>



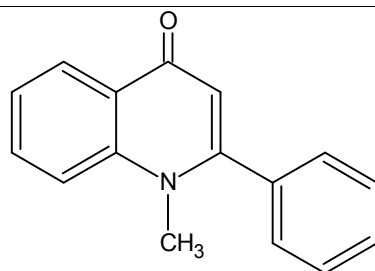
Esquiamina

*C. longifolius*  
(caule)<sup>g</sup>



Inopinatina

*C. inopinatus*  
(folhas)<sup>c</sup>



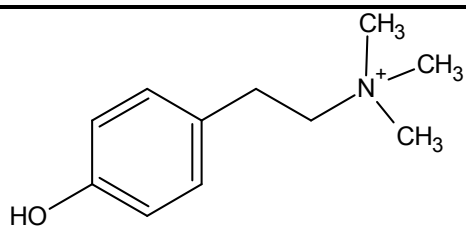
N-Metil-2-fenil-4-quinolona

*C. inopinatus*  
(caule)<sup>f</sup>  
*C. heterophyllus*  
(caule)<sup>h</sup>

---

## Amina

---



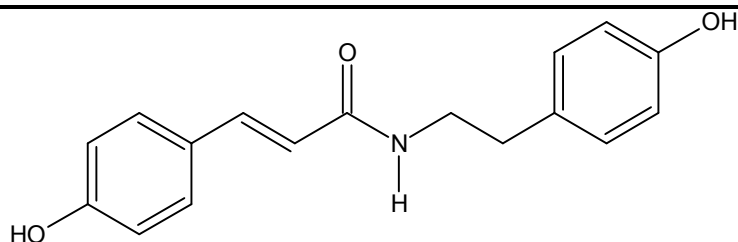
Candicina

*C. longifolius* (caule)<sup>g</sup>

---

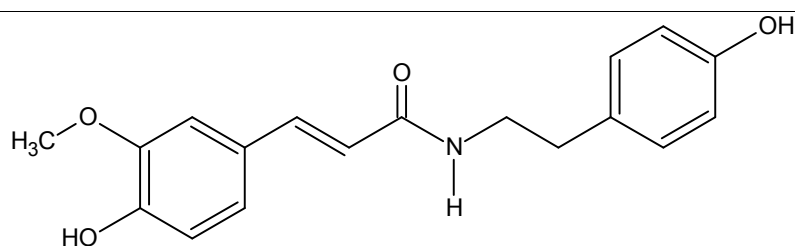
## Amida

---



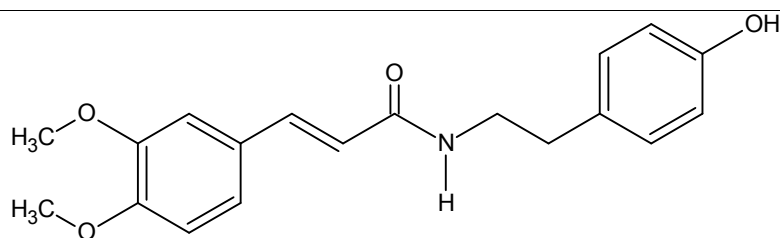
N-trans-cumaroiltiramina

*C. gaudichaudianus*  
subsp. *Bahiensis*  
(galho)<sup>b</sup>



N-trans-feruloiltiramina

*C. gaudichaudianus*  
subsp. *Bahiensis*  
(galho)<sup>b</sup>



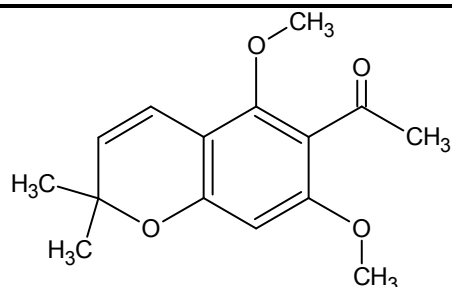
N-trans-4-O-metilferuloiltiramina

*C. gaudichaudianus*  
subsp. *Bahiensis*  
(galho)<sup>b</sup>

---

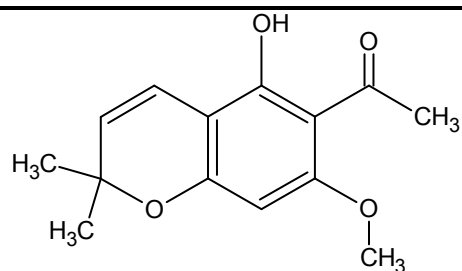
## Acetofenonas

---



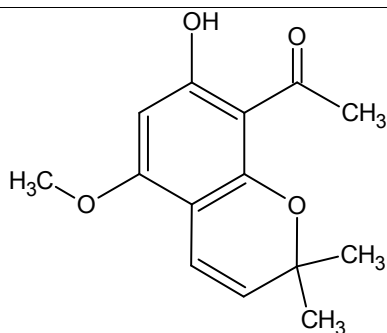
1-(5,7-Dimetóxi-2,2-dimetil-2H-cromen-6-il)etanona

*C. cuneifolius*  
(caule)<sup>a</sup>



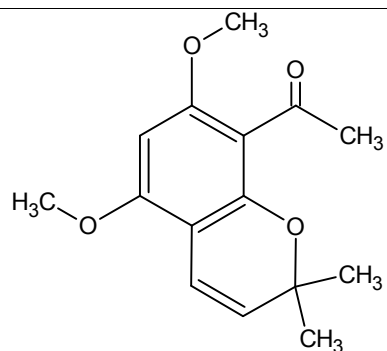
*C. cuneifolius*  
(caule)<sup>a</sup>

1-(5-Hidróxi-7-metóxi-2,2-dimetil-2H-cromen-6-il)etanona



*C. cuneifolius*  
(caule)<sup>a</sup>

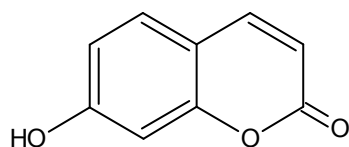
1-(7-Hidróxi-5-metóxi-2,2-dimetil-2H-cromen-8-il)etanona



*C. cuneifolius*  
(caule)<sup>a</sup>

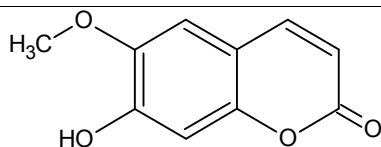
1-(5,7-Dimetóxi-2,2-dimetil-2H-cromen-8-il)etanona

## Cumarinas



Umbeliferona

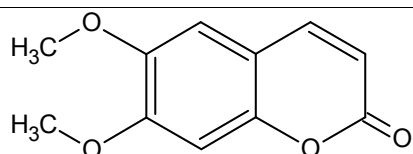
*C. longifolius*  
(pecíolo)<sup>g</sup>



Escopoletina

*C. longifolius*  
(pecíolo)<sup>g</sup>

*C. inopinatus*  
(caule)<sup>f</sup>



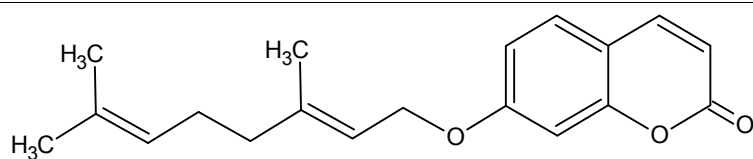
*C. inopinatus*  
(folhas)<sup>c</sup>

*C. longifolius*  
(caules)<sup>g</sup>

---

Escoparona

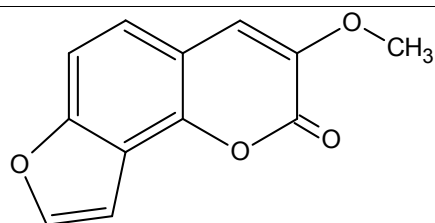
---



C. *longifolius*  
(folhas)<sup>c</sup>

Aurapteno

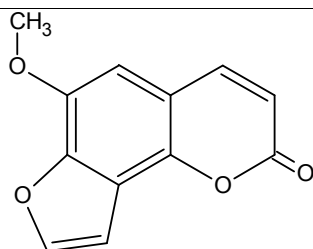
---



C. *longifolius*  
(folhas e pecíolo)<sup>c,g,i</sup>

3-Metóxiangelicina

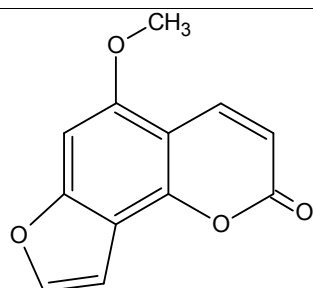
---



C. *longifolius*  
(folhas e pecíolo)<sup>c,g,i</sup>

Esfodina

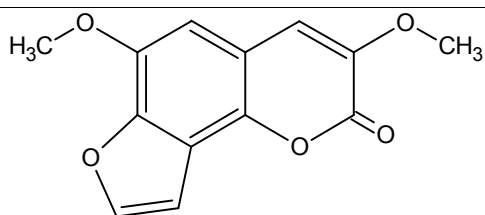
---



C. *longifolius*  
(caule)<sup>g</sup>

Isobergapteno

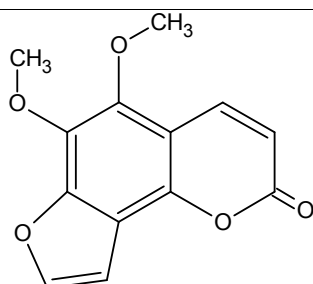
---



C. *longifolius*  
(caules e folhas)<sup>c,g</sup>

3,6-Dimetóxiangelicina

---



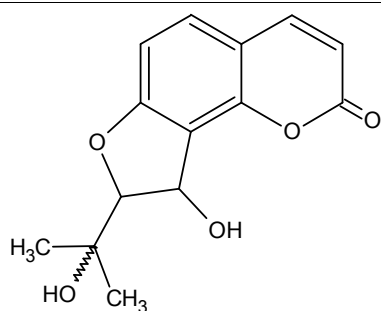
C. *longifolius*  
(folhas e pecíolo)<sup>c,g,i</sup>

---

---

Pimpinelina

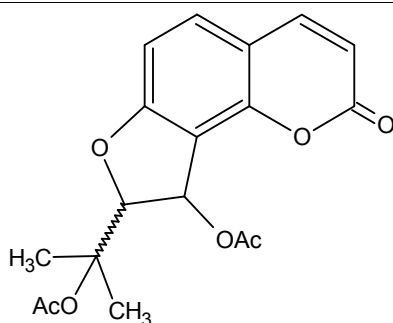
---



*C. longifolius*  
(caule)<sup>g</sup>

3'-Hidróxicolumbianetina

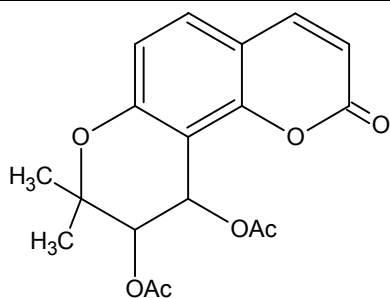
---



*C. longifolius*  
(pecíolo)<sup>g</sup>

Acetato de 8-[1-(acetilóxi)1-metilenil]2-oxo-8,9-diidro-2H-furo-[2,3h]cromen-9-ila

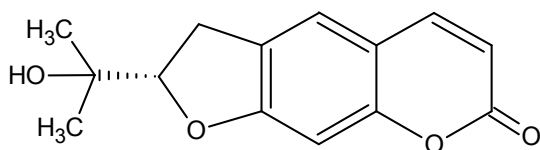
---



*C. longifolius*  
(pecíolo e folhas)<sup>c,i</sup>

Cianocumarina D

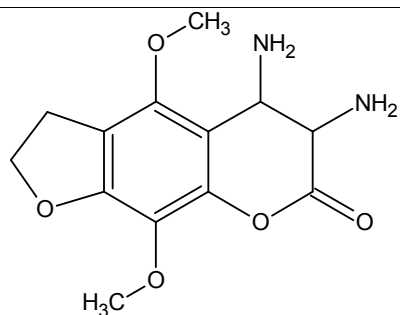
---



*C. inopinatus*  
(caule)<sup>f</sup>

Marmesina

---



*C. longifolius*  
(pecíolo)<sup>g</sup>

5,6-Diamino-4,9-dimetóxi-2,3,5,6-tetraidro-7H-

---



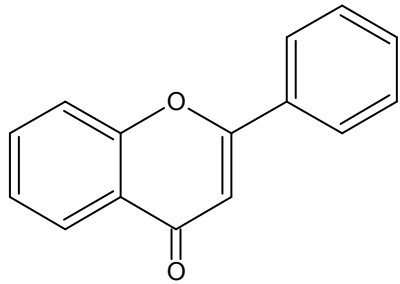
---

furo[3,2g]cromen-7-ona

---

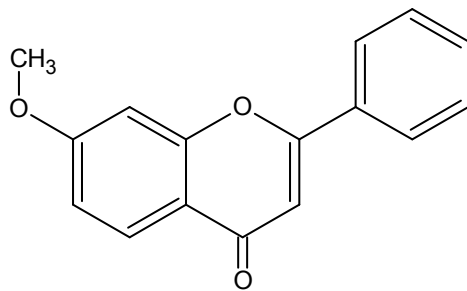
**Flavonoides**

---



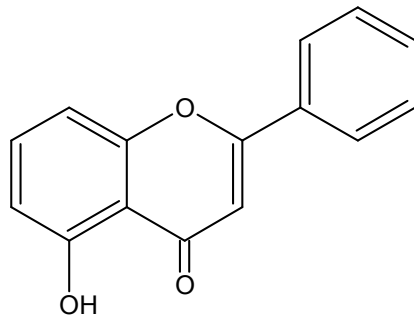
Flavona

*C. heterophyllus*  
(folhas)<sup>h</sup>



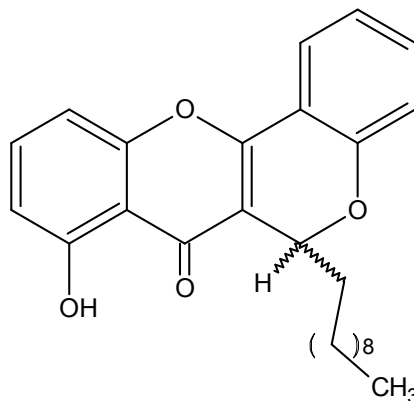
7-Metóxi-flavona

*C. heterophyllus*  
(folhas)<sup>h</sup>



5-Hidróxi-flavona

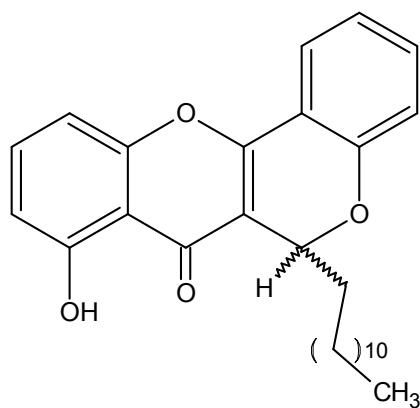
*C. heterophyllus*  
(folhas)<sup>h</sup>



8-Hidróxi-6-decanil-6H,7H-cromeno[4,3-b]cromen-6-ona

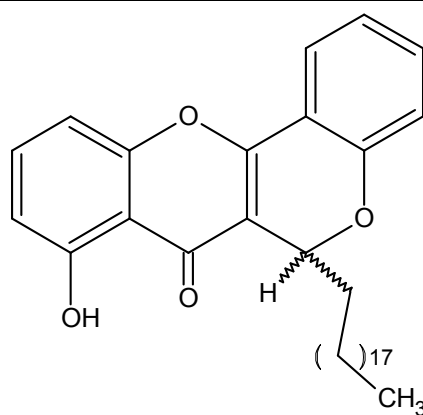
---

*C. heterophyllus*  
(folhas)<sup>h</sup>



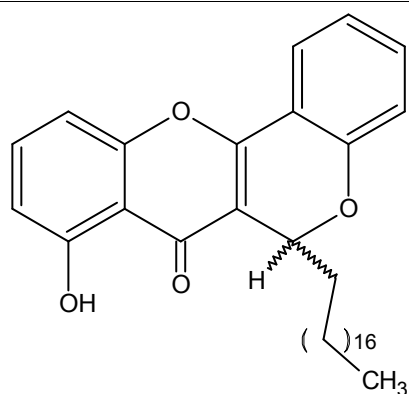
*C. heterophyllus*  
(folhas)<sup>h</sup>

8-Hidróxi-6-dodecanil-6H,7H-cromeno[4,3-b]cromen-6-  
ona



*C. heterophyllus*  
(folhas)<sup>h</sup>

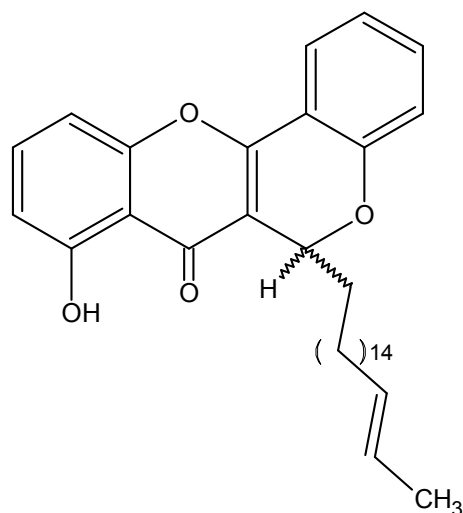
8-Hidróxi-6-heptadecanil-6H,7H-cromeno[4,3-b]cromen-  
6-ona



*C. heterophyllus*  
(folhas)<sup>h</sup>

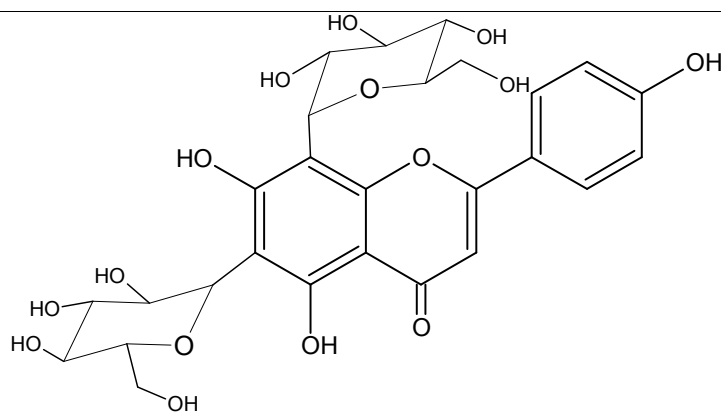
8-Hidróxi-6-octadecanil-6H,7H-cromeno[4,3-b]cromen-6-  
ona

---



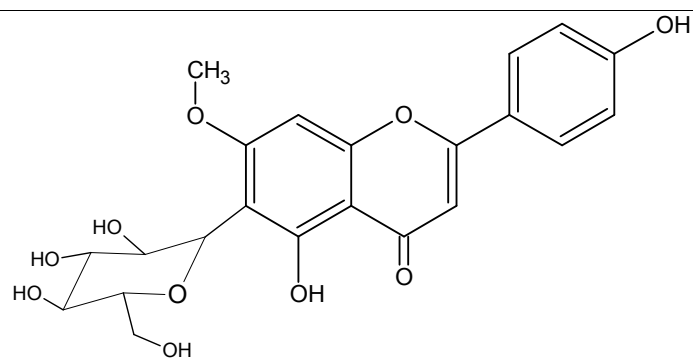
*C. heterophyllus*  
(folhas)<sup>h</sup>

8-Hidróxi-6-octadec-15'-enil-6H,7H-cromeno[4,3-  
b]cromen-6-ona



*C. cuneifolius*  
(caule)<sup>a</sup>

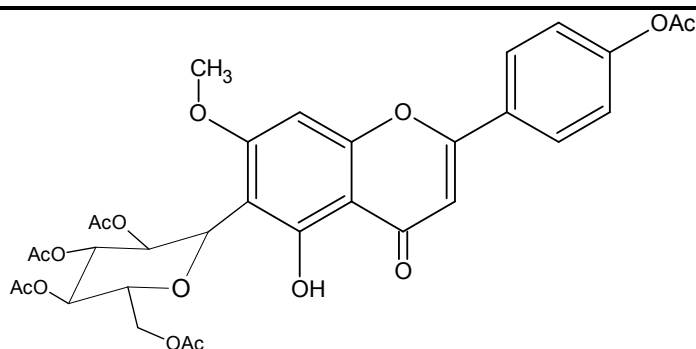
6,8-C-Diglicosil-5,7-diidróxi-flavona



*C. cuneifolius*  
(caule)<sup>a</sup>

6-C-Glicosil-7-metóxi-5-hidróxi-flavona

---



*C. cuneifolius*  
(caule)<sup>a</sup>

6-C-Acetoxilglicosil-7-metóxi-5-hidróxi-acetil-flavona

---

**a** – VELOZO, 1995; **b** – CORTEZ, 2002; **c** – MAFEZOLI, 2001; **d** – ALBARICI, 2006; **e** -VIEIRA e KUBO, 1992; **f** - DE SÁ, 2010; **g** – FACCHINI, 2005; **h** – AMBROZIN, 2004b; **i** – MAGALHÃES, 2001.

#### 1.4. *Swinglea glutinosa* e o seu perfil químico

A *Swinglea glutinosa* Merr. é uma pequena árvore nativa do sudeste da Ásia que foi introduzida na América do Sul pela Colômbia, sendo utilizada como cerca viva (WENIGER *et al.*, 2001). Esta espécie pertence à subfamília Aurantioideae, tribo Citreae, subtribo Balsamocitrinae, sendo única representante do gênero *Swinglea*.



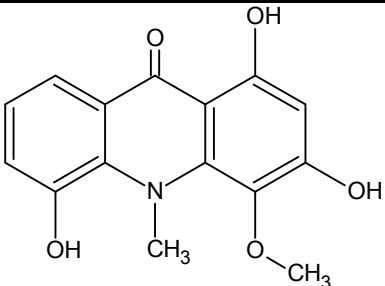
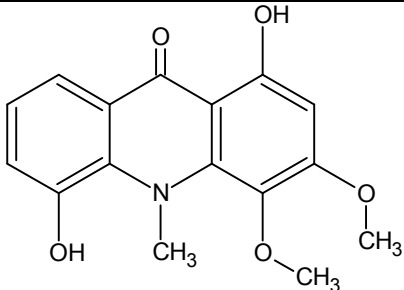
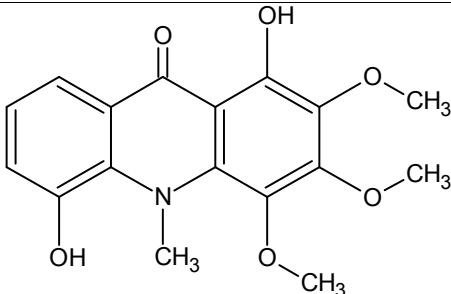
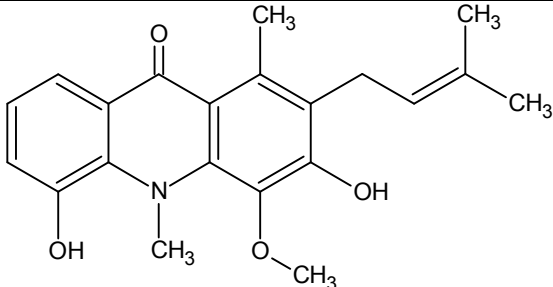
Figura 1. 1 - Espécie *Swinglea glutinosa*.

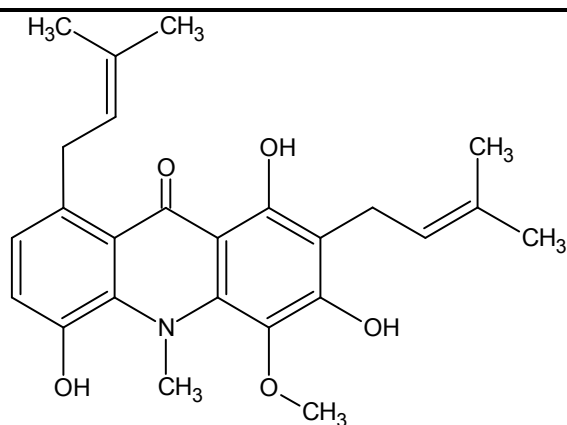
Fontes: **Top Tropicals** e **The Swingle Plant Anatomy Reference Collection**

Da espécie *S. glutinosa* já foram isolados alcalóides acridônicos prenilados, bialcalóides acridônicos, piranocumarinas angulares, amidas O-geranilada, limonoides e flavonoíde prenilado. Os alcalóides isolados desta espécie apresentam atividades biológicas tais como: algicida, antiparasítico, citotóxico e um potente

inibidor contra a Catepsina V (WENIGER *et al.*, 2001; DOS SANTOS *et al.*, 2004, 2009; PURCARO *et al.*, 2009; SEVERINO *et al.*, 2011).

Tabela 1. 4 - Substâncias isoladas da *S.glutinosa*.

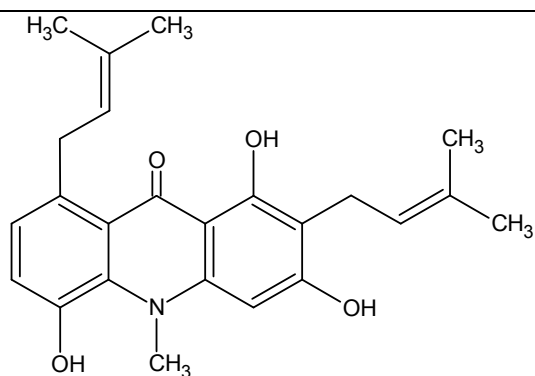
<b>Alcaloides</b>	
	Tronco, raíz e casca do caule <sup>a,b,c</sup>
<b>Citrusinina-II</b>	
	Tronco e raíz <sup>b,c</sup>
<b>Citrusinina-I</b>	
	Tronco e raíz <sup>b,c</sup>
<b>Citribasina</b>	
	Tronco, raíz e casca do caule <sup>a,b,c</sup>
<b>Glicocitrina-IV</b>	



Tronco<sup>b</sup>

1,3,5-Triidroxi-2,8-diprenil-4-metóxi-N-metilacridona

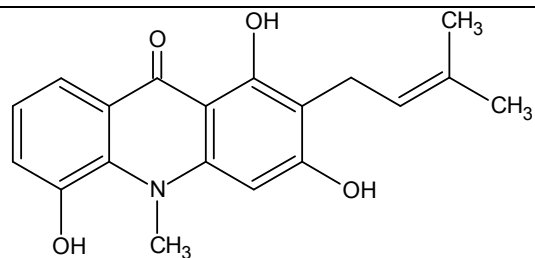
---



Tronco e casca  
do caule<sup>a,b</sup>

1,3,5-Triidroxi-2,8-diprenil-N-metilacridona

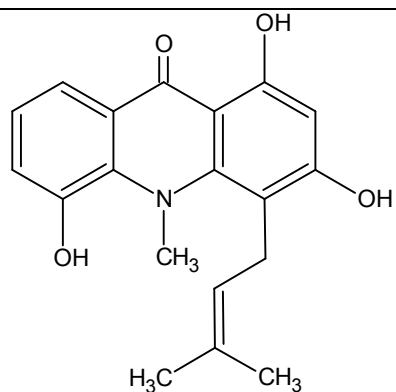
---



Raíz<sup>c</sup>

1,3,5-Triidroxi-2-prenil-N-metilacridona

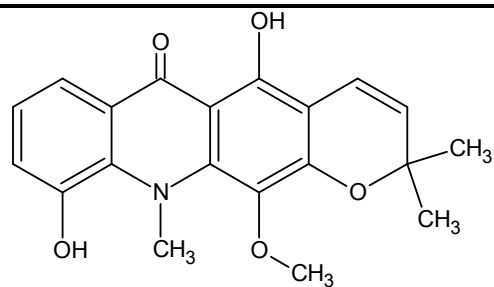
---



Tronco e raíz<sup>c,d</sup>

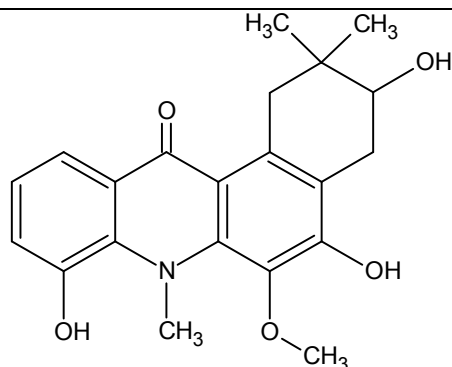
1,3,5-Triidroxi-4-prenil-N-metilacridona

---



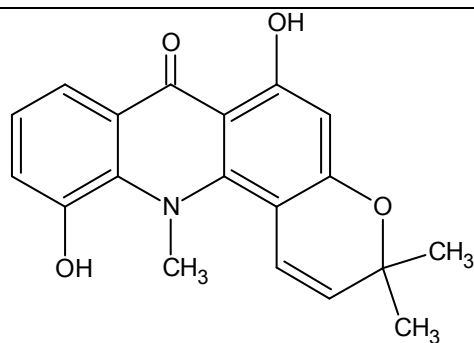
Tronco e raiz<sup>b,c</sup>

Piranifulina



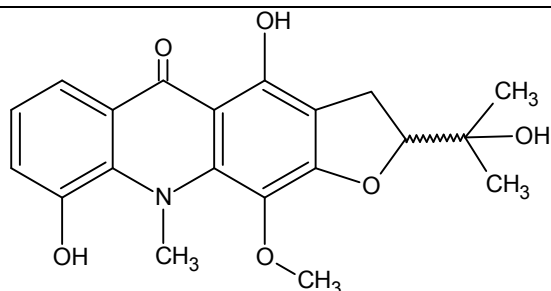
Tronco<sup>b</sup>

3,5-Diidróxi-1-(2'-hidróxi-3',3'-dimetilcromeno)-4-metóxi-N-metilacridona



Tronco, raiz e casca do caule<sup>a,b,c</sup>

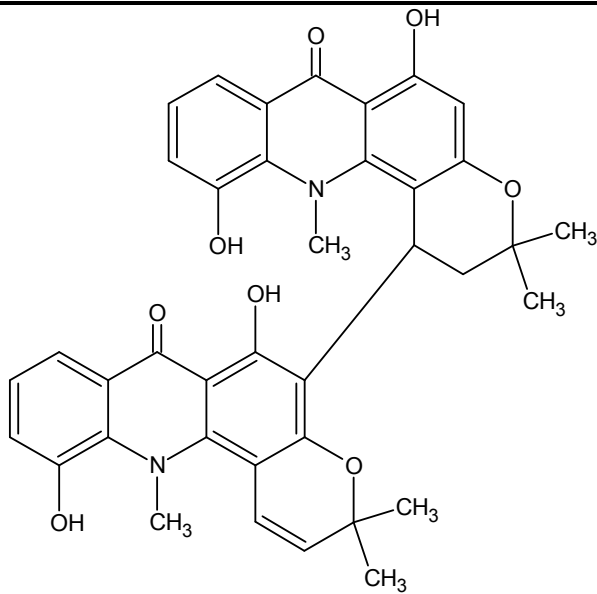
5-Hidróxi-acronicina



Tronco e raiz<sup>b,c</sup>

1,5-Diidróxi-4-metóxi-2,3-diidrofurano-N-metil-2'-hidroxiisopropilacridona

---



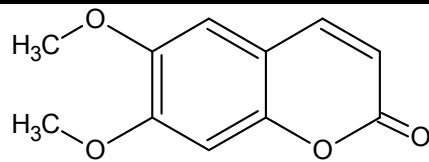
Bis-5-hidroxiacronicina

Tronco<sup>b</sup>

---

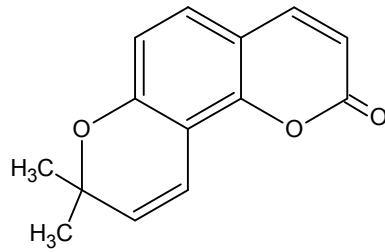
### Cumarinas

---



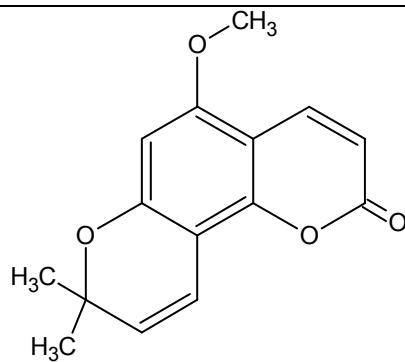
Escoparona

Frutos<sup>d</sup>



Seselina

Raíz<sup>c</sup>

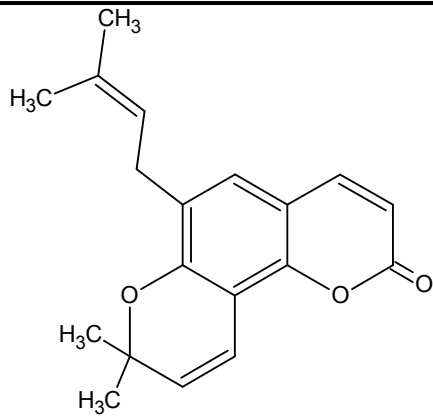


5-Metóxi-seselina

Raíz<sup>c</sup>

---





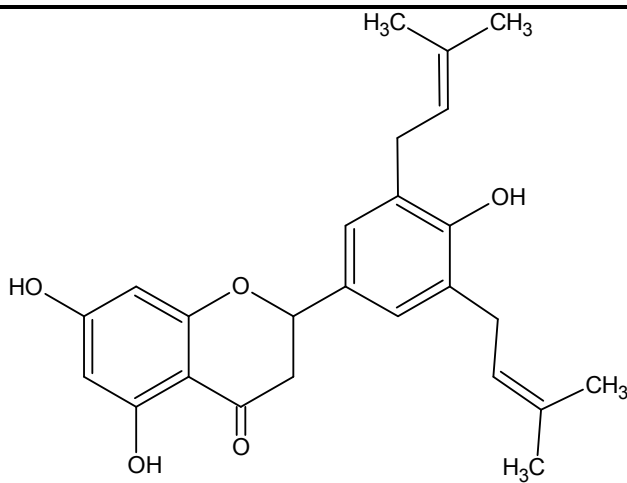
Frutos e raíz<sup>c,d</sup>

6-Prenil-seselin

---

### Flavonoide

---



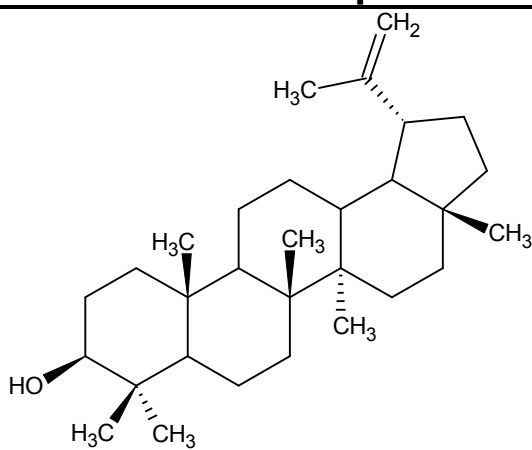
Frutos<sup>d</sup>

5,7,4'-Triidróxi-3',5'-diprenil-flavanona

---

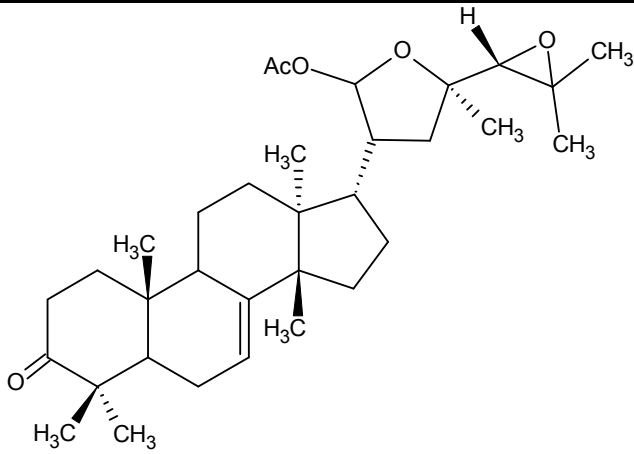
### Terpenoides

---



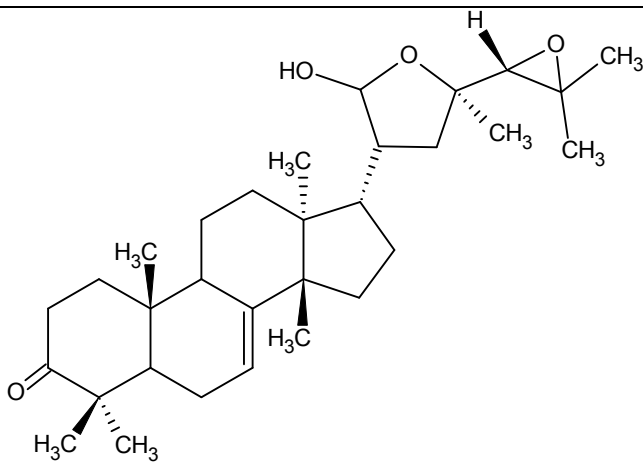
Frutos<sup>d</sup>

Lupeol



21β-Acetil-Melianona

Frutos<sup>d</sup>



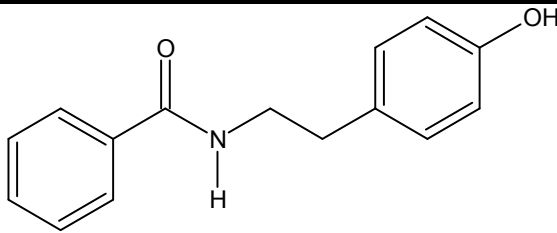
Melianona

Frutos<sup>d</sup>

---

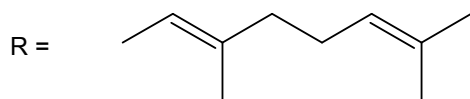
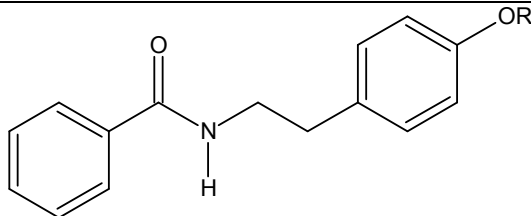
### Amidas

---



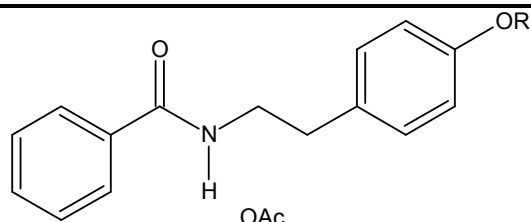
N-Benzoitiramina

Frutos<sup>d</sup>

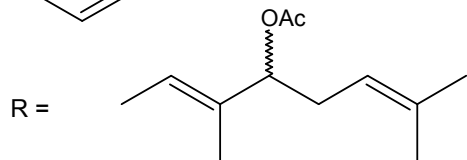


N-Benzoi-O-geraniltiramina

Frutos<sup>d</sup>

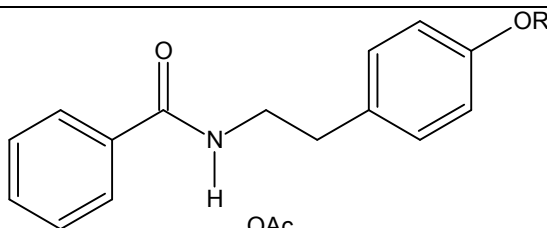


Frutos<sup>d</sup>

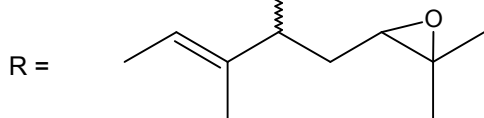


N-Benzoil-4''-acetóxi-O-geraniltiramina

---

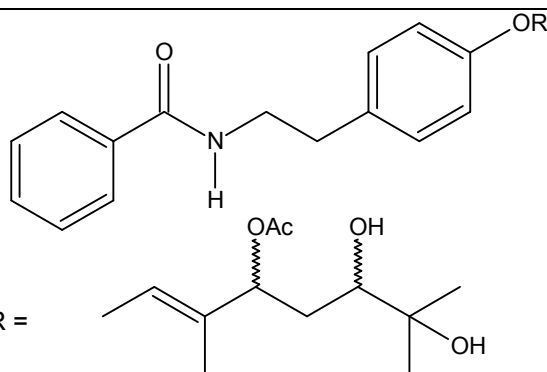


Frutos<sup>d</sup>

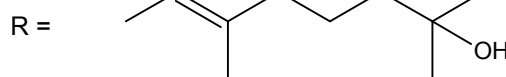


4''-Acetilseverina

---

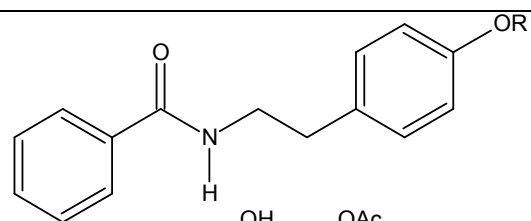


Frutos<sup>d</sup>

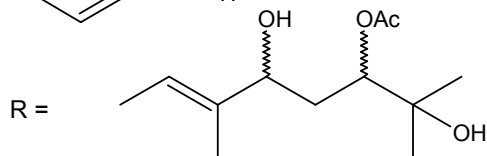


N-Benzoil-6'',7''-diidróxi-4''-acetóxi-O-geraniltiramina

---



Frutos<sup>d</sup>



N-Benzoil-4'',7''-diidróxi-6''-acetóxi-O-geraniltiramina

---

**a** – WENIGER *et al.*, 2001; **b** – DOS SANTOS *et al.*, 2009; **c** - PURCARO *et al.*, 2009; **d** – DOS SANTOS, 2005.

## 1.5. Citricultura e Doenças citrícolas

Entre os principais grupos de frutas no mundo os citros se destacam em volume de produção, estando em primeiro lugar, seguido das culturas de banana, uva e maçã. Os países que se destacam como maiores produtores mundiais de citros são: Brasil representando 37,0%, Estados Unidos 20,4%, China 12,6%, México 8,8% e Espanha com representatividade de 8,6% (FAO, 2010). Neste contexto, o Brasil assumiu nas últimas décadas a liderança mundial na produção de laranjas, onde na safra de 2008/09 produziu 16 milhões de toneladas, seguido pelos Estados Unidos e União Europeia, destacando-se também como maior produtor e exportador de suco concentrado (AGRIANUAL, 2010). A citricultura da laranja no Brasil rende uma parcela equivalente do PIB de US\$ 5 bilhões de dólares, tendo o estado de São Paulo como o maior produtor do país representando 71,2% da produção nacional. (ABECITROS, 2010; AGRIANUAL, 2010).

Como toda cultura, a citricultura é alvo de várias doenças e pragas que causam a diminuição da produção e da qualidade dos frutos e sem medidas de controle pode tornar o pomar improdutivo ou até mesmo levar a sua irradicação. As principais doenças citrícolas que causam danos significativos são: Leprose dos Citros, Clorose Variegada dos Citros (CVC), Gomose de *Phytophthora*, Huanglongbing (HLB), Cancro Cítrico, Declínio, Mancha *Alternaria*, Morte Súbita dos Citros (MSC), Podridão Floral dos Citros, Rubelose, Tristeza – *Citrus Tristeza Virus* (CTV) e Mancha Preta do Citros (MPC), dando destaque para a última que é considerada uma fitopatologia quarentenária A1 nos Estados Unidos e União Europeia, o que constitui um fator limitante nas exportações brasileiras, onde causou grandes rechaços de cargas em 2003 (MAPA, 2010).

## 1.6. Mancha Preta do Citros

A Mancha Preta do Citros ou Pinta Preta do Citros é de grande importância econômica, pois causa depreciação estética dos frutos, originando lesões principalmente nas cascas dos frutos e acarreta prejuízos na comercialização dos mesmos *in natura* no mercado externo. Quando ocorre alta infecção na região do pedúnculo de frutos em desenvolvimento pode haver um amadurecimento precoce e queda prematura refletindo desta maneira na produção (TIMMER, 1999; AGUILAR-

VILDOSO *et al.*, 2002). No Estado de São Paulo já se verificou até 100% de frutos afetados em áreas onde não se realizou nenhum tipo de controle e a queda acentuada dos frutos pode ocasionar 80% da perda da produção (KLOTZ, 1978).

A MPC afeta laranjeiras, tangerineiras, limas, limoeiros e pomeleiros. 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).

Essa doença foi descrita pela primeira vez em 1895, na Austrália, provocando perdas significativas em laranjeira Valência tanto na fase de pré como pós-colheita (FAWCETT, 1936). Atualmente ela já foi detectada na África: África do Sul, Moçambique, Zimbábue, Swazilândia, Quênia, Zâmbia, Nigéria e Rodésia (BAAYEN *et al.*, 2002; FEICHTENBERGER *et al.*, 1997; MAPA, 2010; SUTTON & WATERSTON, 1966); Ásia: China, Hong-Kong, Filipinas, Indonésia, Taiwan, Japão e Butão (MAPA, 2010; SUTTON & WATERSTON, 1966; TIMMER *et al.*, 2000); Oceania: Austrália, Nova Zelândia e Vanatu (MAPA, 2010; SUTTON & WATERSTON, 1966); Europa: Rússia (MAPA, 2010); América: Argentina, Peru, Uruguai, Caribe, Brasil e recentemente Estados Unidos na Flórida (ADASKAVEG *et al.*, 2010; FEICHTENBERGER, 1996; KOTZÉ, 1996; MAPA, 2010).

No Brasil essa doença foi detectada pela primeira vez em frutos cítricos de feiras livres de Piracicaba no estado de São Paulo em 1937 (AVERNA-SACCÁ, 1940), mas só foi relatado causando grandes prejuízos em 1980 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 (DE GOES *et al.*, 1993) e, atualmente vem se alastrando nas regiões citrícolas paulistas (AGUILAR-VILDOSO, 1997). Atualmente essa fitopatologia ocorre em quase todo o Brasil com exceção da região Nordeste e alguns estados da região Norte, FIGURA 1.2

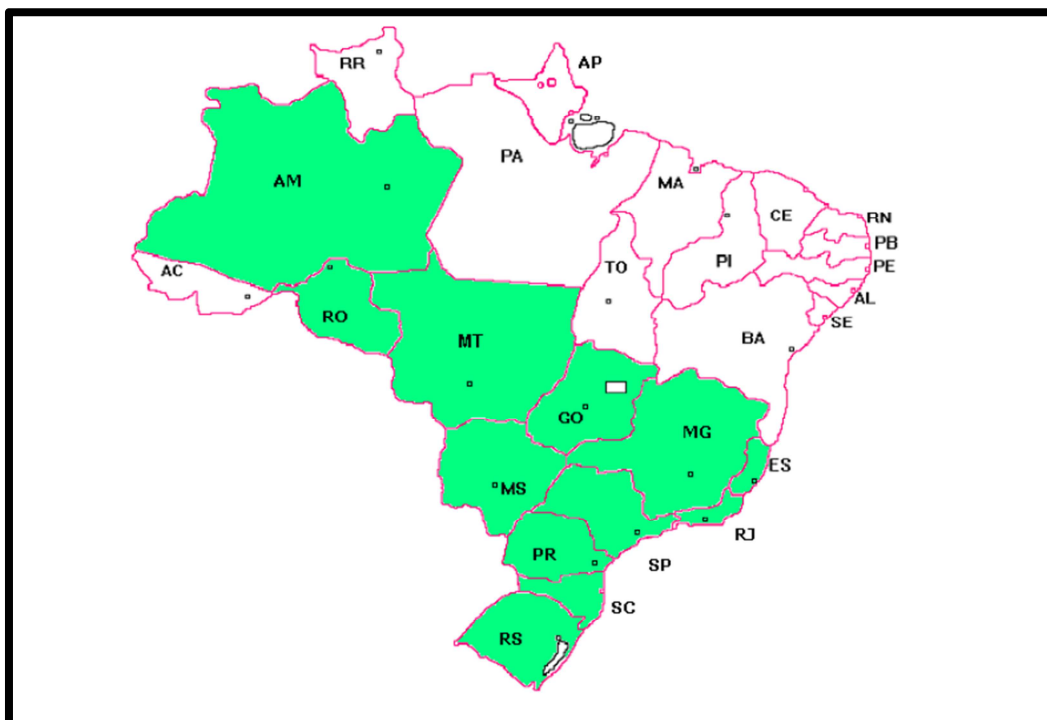


Figura 1.2 - Mapa de ocorrência da Mancha Preta do Citros no Brasil (MAPA, 2010).

### 1.7. *Guignardia citricarpa*

A MPC, causada pelo fungo fitopatogênico *Guignardia citricarpa*, foi descrita pela primeira vez na sua forma assexuada por McAlpine em 1889 sendo nomeada primeiramente como *Phoma citricarpa* e posteriormente como *Phyllosticta citricarpa* (MCONIE, 1964). O estágio sexual do patógeno foi descoberto por Kiely, em 1948, e foi chamado de *Guignardia citricarpa* (KOTZÉ, 1981, 1996). Em 1964 foi descrita duas variantes da *G. citricarpa* morfologicamente idênticas, contudo apenas uma apresentava patogenicidade ao hospedeiro e a outra endofítica (MCONIE, 1964), atualmente já é sabida que a forma endofítica trata-se de outra espécie de fungo a *Guignardia mangifera* (BAAYEN *et al.*, 2002).

A *G. 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 (DE GOES, 1998). O ciclo reprodutivo do fungo ocorre de duas formas bem distintas: a primeira é representada pela fase sexual do fungo (*G. citricarpa*) que de acordo com muitos autores é a principal forma de inoculação do fungo, em que os ascósporos são a principal forma de introdução do fitopatogênico na área e início das epidemias a cada ciclo da citricultura, pois eles podem ser disseminados até a 25 Km atingindo outras plantas

(AGUILAR-VILDOSO *et al.*, 2002; KLOTZ, 1973). O ciclo secundário é caracterizado pela fase assexual do fungo (*P. citricarpa*), onde os picnidiósporos são responsáveis pelo inóculo da doença na planta e ao seu redor (AGUILAR-VILDOSO *et al.*, 2002). O patógeno pode permanecer no estado latente podendo levar de 5 a 30 anos para os primeiros sintomas serem percebidos e infectar mais de 90% das folhas em pomares altamente infectados (KOTZÉ, 1981; 1996; MATTOS-JUNIOR *et al.*, 2005).

A doença manifesta-se em três estágios distintos, como pode ser observado na FIGURA 1.3. No estágio 1, as folhas infectadas em decomposição no solo permitem a formação dos ascósporos, que são levados pelo vento podendo infectar folhas, frutos e ramos. No estágio 2, formam-se lesões nos frutos nos quais são produzidos picnidiósporos (esporos assexuais), que levados à curta distância pela água (chuva, orvalho, irrigação), podem infectar outros frutos, ramos e folhas. Já no estágio 3, as folhas infectadas ao caírem no solo formam novos ascósporos, dando continuidade ao ciclo (FUNDECITRUS, 2009).

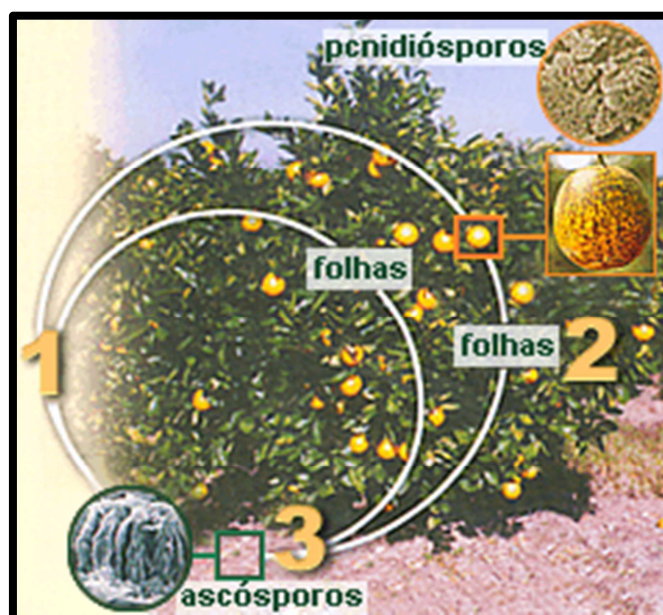


Figura 1.3 - Ciclo da pinta-preta (Fundecitrus, 2009).

Fatores que provoquem queda de folhas ou debilitem a planta, como pragas e doenças, abandono dos tratos culturais e desequilíbrios nutricionais, favorecem o desenvolvimento da pinta preta (FUNDECITRUS, 2009).

## 1.8. Sintomatologia da MPC

O patógeno *G. citricarpa* causa lesões em frutos, folhas, pedúnculos, pecíolos, ramos verdes e espinhos. As lesões de mancha preta nos frutos normalmente são circulares, com poucos milímetros de diâmetro, e não se estendem para mais do que poucas camadas de células dentro da área do albedo (mesocarpo), sendo restrita ao flavedo (epicarpo) desfavorecendo a comercialização de frutas *in natura* (DE GOÉS, 1998; KOTZÉ, 1981, 1996; MCONIE, 1967). Como já foi descrito a MPC pode permanecer em estado latente até os sintomas surgirem. O estado de latência depende das condições ambientais e da variedade da espécie atacada. 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). Na literatura internacional são citados quatro tipos diferentes de sintomas associados a MPC: mancha dura, falsa melanose, mancha sardenta e mancha virulenta (HERBERT, 1989; TIMMER *et al.*, 2000). No Brasil já foram descritos seis tipos diferentes de sintomas:

1. *Mancha dura* – a mais comum e típica das lesões e a mais fácil para sua confirmação, ocorre principalmente na maturação dos frutos de laranja e em frutos jovens de limão. Em geral aparece quando os frutos iniciam a maturação. Em frutos verdes, um halo amarelado aparece circundando as lesões, enquanto que no caso de frutos maduros ocorre o contrário, sendo produzido um halo verde ao redor das lesões, que apresentam o centro deprimido de cor marrom claro ou cinza escuro e as bordas salientes, de coloração marrom escura. No interior dessas lesões aparecem pequenas pontuações negras, que são os picnídios do fungo (HERBERT, 1989);
2. *Falsa melanose* - ocorre em frutos em desenvolvimento. Aparecem quando o fruto encontra-se com cerca de 4-5 meses após a queda das pétalas, ainda verdes. As lesões são minúsculas (cerca de 2 mm), circundadas por pontos pequenos e escuros com aproximadamente 1 mm de diâmetro e numerosas normalmente sem textura áspera ao tato, podendo ser confundido com outra doença fúngica, a melanose (*Diaporthe citri*) (HERBERT, 1989);



3. *Mancha sardenta* - é pequena, marrom-avermelhada e desenvolve-se em frutos maduros e em pós-colheita;
4. *Mancha virulenta* - lesões aparecem como resultado do desenvolvimento e coalescência dos diferentes tipos de lesões, dando origem a grandes lesões deprimidas, de centro acinzentado e bordas salientes de coloração marrom-escuro ou vermelho-escuro, atingindo portanto grande áreas do fruto. Desenvolvem-se normalmente no final da safra, quando os frutos estão maduros e as temperaturas mais elevadas, e podem também ocorrer após a colheita, durante o transporte e o armazenamento dos frutos (FUNDECITROS, 2009);
5. *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*);
6. *Mancha reticulada* - ocorre frequentemente 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).

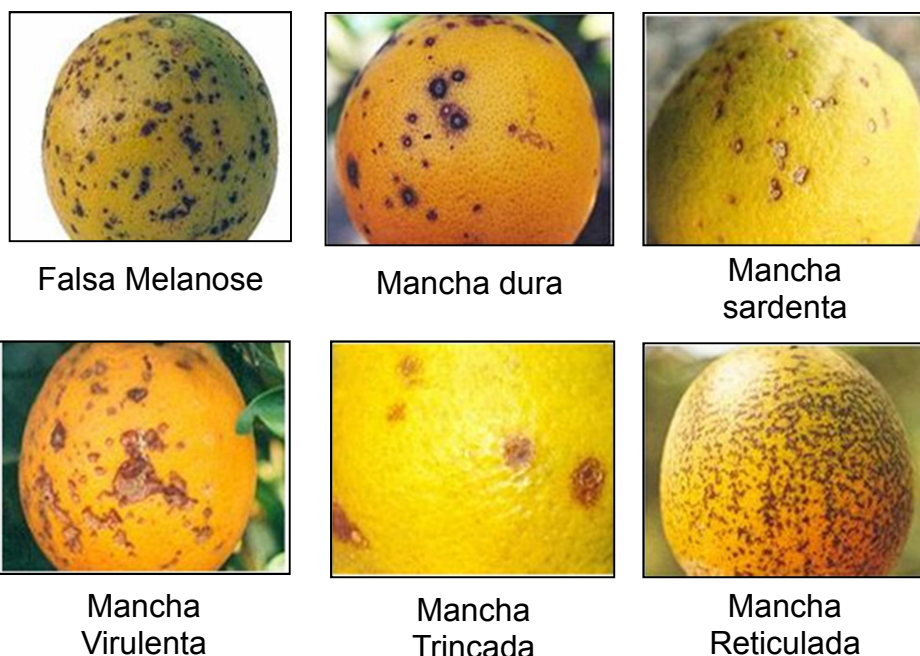


Figura 1.4 - Diferentes lesões da Mancha Preta do Citros (Fundecitrus, 2009).

## 1.9. Medidas de controle da MPC

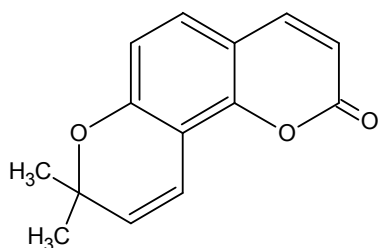
As medidas de controles utilizadas para prevenir e controlar a doença são: aquisição de mudas sadias, desinfestação, implantação de quebra-ventos para reduzir as quedas das folhas, desinfestação de máquinas e equipamentos, retiradas de restos vegetais, coletas de frutas temporãs infectadas e monitoramento da sanidade, nutrição dos pomares e irrigação do pomar no período seco para evitar a queda excessiva das folhas. Além dos métodos preventivos inclui-se a utilização de fungicidas protetores (ditiocarbamatos e cúpricos) ou sistêmicos (estrobirulinas e benzimidazóis), isoladamente ou combinados, associados ao óleo mineral ou vegetal, o que, entretanto, eleva o custo da produção (MAPA, 2010).

Além da problemática do aumento dos custos da produção, os fungicidas ao serem utilizados de forma indiscriminada podem apresentar efeitos indesejados devido aos resíduos químicos tóxicos, como ataque a espécies não-alvo, causando desequilíbrio ecológico; problemas à saúde humana, devido ao acúmulo desses resíduos químicos, podendo causar câncer e mutações genéticas em gerações posteriores; e poluição do meio ambiente (LIMA *et al.*, 2000). Devido ao grande impacto desses fungicidas ao meio ambiente e à saúde, foram estabelecidas medidas governamentais restringindo o uso indiscriminado desses agrotóxicos (GULLINO & KUIJPERS, 1994). Desta forma, o desafio para os produtores no controle de doenças tem aumentado cada vez mais com a demanda por produtos livres de resíduos químicos tóxicos. Seguindo essa premissa, produtores e pesquisadores tem considerado o uso de métodos alternativos no combate à doença, tendo sua atenção voltada para o uso de produtos de origem natural no controle e combate dessas pragas agrícolas.

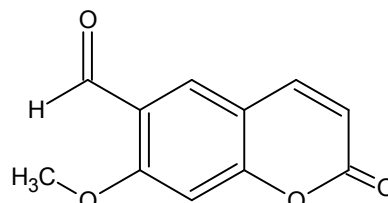
Os resultados obtidos no controle da MPC com produtos naturais foram os seguintes:

- TOFFANO em 2005 observou que os extratos aquosos do albedo (*Citrus sinensis*), flavedo (*Citrus aurantifolia*), *Lentinola edodes* e *Agaricus blazei* diminuíram o aparecimento de novas lesões nos frutos de citros causadas pela *G. citricarpa*;
- Em 2006, RIBEIRO obteve uma inibição superior a 98% na germinação dos esporos da *G. citricarpa* com as cumarinas seselina (1) e crenulatina (2) (FIGURA 1.5);

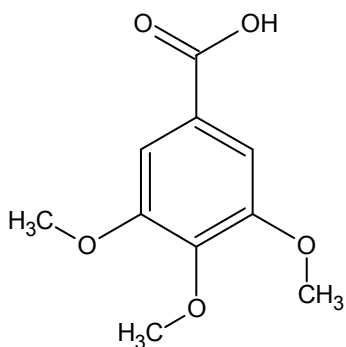
- MAGNANI (2007) avaliando os derivados de ácido benzoico, ácido 3,4,5-trimetóxi benzoico (3) e o ácido 3,4-dimetóxi benzoico (4), e também os flavonoides naringina (5) e rutina (6) conseguiu uma inibição de mais de 99% da germinação de esporos com cada um desses compostos;
- TOFFANO (2010) obteve 100% de inibição da germinação dos esporos do fungo com as substâncias 2-metil-1-butanol (7) e 3-metil-1-butanol (8), provenientes da levedura *Saccharomyces cerevisiae*;
- Ainda em 2010, DE FREITAS avaliando a cumarina escoparona (9) e o alcaloide N-metil-4-metóxi-2-quinolona (10) verificou uma inibição de 90 e 99%, respectivamente na formação de apressórios do fungo.



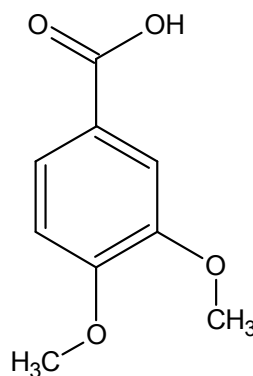
Seselina (1)



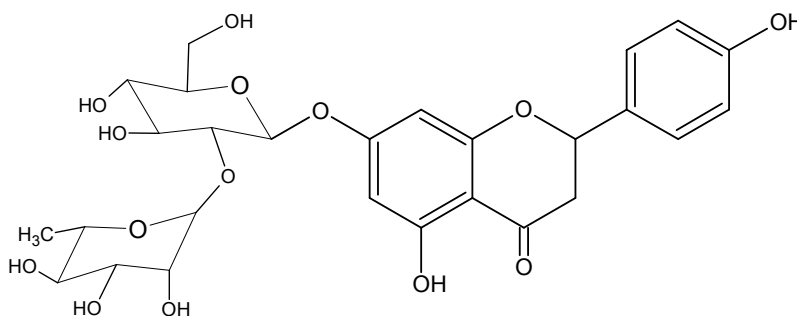
Crenulatina (2)



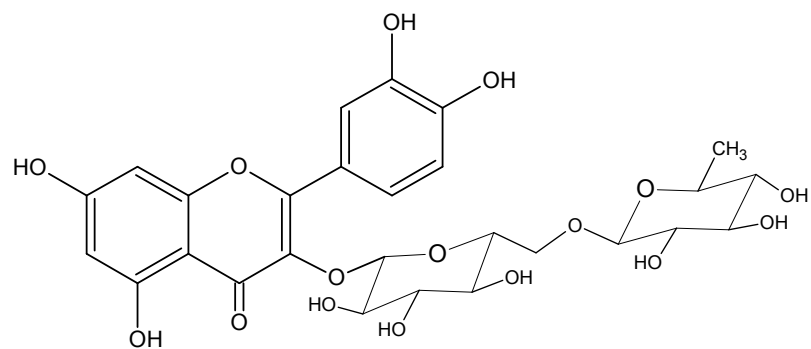
Ác. 3,4,5-Trimetóxi benzoico (3)



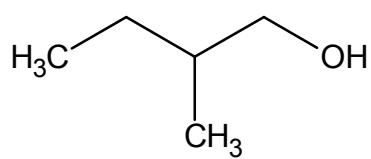
Ác. 3,4-Dimetóxi benzoico (4)



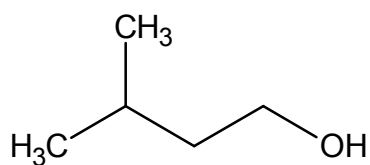
Naringina (5)



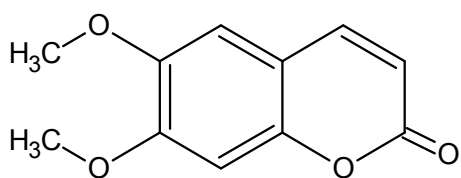
Rutina (6)



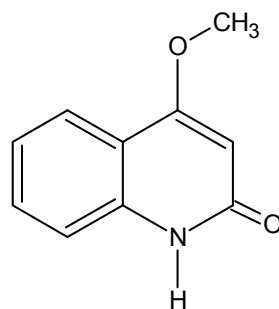
2-Metil-1-butanol (7)



3-Metil-1-butanol (8)



Escoparona (9)



N-Metil-4-metóxi-2-quinolona (10)

Figura 1.5 - Substâncias que apresentaram atividade contra a *G. citricarpa*.

## 2. OBJETIVOS

- Realizar o estudo fitoquímico das flores da *A. bracteata* (= *G. bracteata*), das folhas da *G. carinata* e das folhas da *S. glutinosa*;
- Ampliar o conhecimento químico da espécie *S. glutinosa*;
- Avaliar o perfil químico das substâncias isoladas da *G. carinata* e da *A. bracteata* (= *G. bracteata*) visando analisar um provável paralelismo entre a reclassificação botânica feita por de Kallunki e Pirani baseada na morfologia e os metabólitos secundários já isolados das espécies;
- Avaliar a atividade biológica das substâncias isoladas frente ao fungo *G. citricarpa* visando o controle da MPC uma das doenças mais importantes da citricultura brasileira.

## 3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

### 3.1. Estudo Fitoquímico

#### 3.1.1. Materiais

##### 3.1.1.1. Material Cromatográfico

- Cromatografia em coluna aberta por adsorção (CCAA)
  - Sílica comum (70-230 mesh) - Merck;
  - Sílica *flash* (230-400 mesh) - Merck.
- Cromatografia em coluna aberta por exclusão (CCAE)
  - Sephadex LH-20<sup>®</sup> - Amersham Pharmacia Biotech AB.
- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)
  - Coluna propil-diol Phenomenex<sup>®</sup> [analítica (25,0 mm x 0,46mm; 10 μm) e preparativa(30,0 mm x 0,78 mm; 10 μm)].
- Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)
  - Coluna DB-5 poli (5% difenil, 95%dimetilsiloxano), 30 m x 0,25 mm D.I. x 0,25 μm de filme.
- Cromatografia em camada delgada analítica (CCDA)
  - Suportes de folhas de alumínio com sílica gel 60 F<sub>254</sub>, θ = 0,2 mm - Merck.

##### 3.1.1.2. Reveladores

- Solução de vanilina ácida;
- Reagent de Dragendorff;
- Câmara de luz UV (λ = 254 e 365nm) .

### 3.1.1.3. Solventes

- Solventes destilados do Departamento de Química da UFSCar:
  - Metanol;
  - Etanol;
  - Acetato de etila;
  - Acetona;
  - Hexano;
  - Diclorometano;
  - Água destilada e MilQ.
  
- Solventes grau HPLC da MERCK e da J. T. BECKER:
  - Metanol;
  - Etanol;
  - Hexano;
  - Dimetilsulfóxido (DMSO)
  - Acetonitrila;
  - Isopropanol;
  - Butanol.
  
- Solventes deuterados da MERCK e ALDRICH:
  - Metanol;
  - Óxido de deutério;
  - Acetona;
  - Piridina;

- Clorofórmio;

### **3.1.2. Equipamentos**

#### **3.1.2.1. Câmara de UV**

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

#### **3.1.2.2. Balança analítica**

- Satorius Modelo BP210S.

#### **3.1.2.3. Evaporadores Rotativos**

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

#### **1.1.2.4. Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência**

- SHIMADZU SLC - 10 AV (modo de separação analítico e preparativo), válvula reciclo e válvula de amostragem de 200 µL; detector UV - Vis SHIMADZU SPD -10 AV (opera com dois comprimentos de onda diferentes simultaneamente);
- SHIMADZU LC - 6 AV (modo de separação analítico e preparativo), válvula reciclo e válvula de amostragem de 200 µL; detector UV - Vis SHIMADZU SPD - 6 AV;
- SHIMADZU SLC - 8 AV (modo de separação preparativo), válvula reciclo e válvula de amostragem de 500 µL; detector UV - Vis SHIMADZU SPD - 6 AV.



#### **3.1.2.4. Cromatógrafo Gasoso acoplado a Espectrometro de Massas**

- SHIMADZU QP 5000 - ionização por impacto eletrônico - DQ/UFSCar.

#### **1.1.2.5. Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear**

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

#### **1.1.2.6. Espectrômetro de Massas**

- AB/MDS Sciex API 2000 [triplo quadrupolo (QqQ)] equipado com fonte de ionização ESI Turboblou Spray e APCI. Gás de arraste  $\text{N}_2$ . Operado no modo de inserção direta e acoplado a cromatógrafo líquido Agilent 1200 – DQ/UFSCar.

### **1.1.3. Coleta do Material vegetal**

#### **3.1.3.1. *Galipea carinata* e *Angostura bracteata* ( $\equiv$ *G. bracteata*)**

As flores da espécie *G. bracteata* (Nees & Martius) Kallunki (*A. bracteata*) foram coletadas no dia 20 de Fevereiro de 1995, no município de Linhares – ES, na estrada de Jurana a Sorotema, sob numero de coleta J.R. Pirani *et al.* 3670 depositados nos Herbários SPF e NY. Por sua vez, as folhas da espécie *G. carinata* foram coletadas no dia 18 de Maio de 2000, no município de Guarapari, ramal da Rodovia do Sol – estrada que liga a Praia do Sol e de Setiba à BR101, sob o número de coleta J.R. Pirani *et al.* 4722 depositados no Herbários SPF e NY

#### **3.1.3.2. *Swinglea glutinosa***

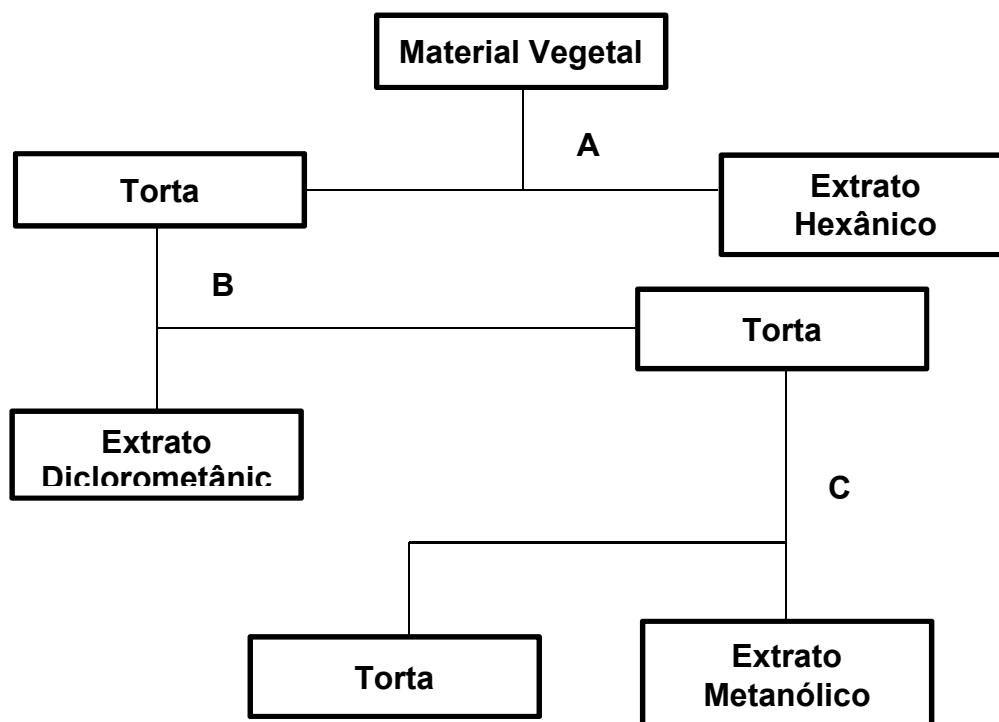
A espécie *Swinglea glutinosa* foi coletada em Campinas – SP no Instituto Agrônomo de Campinas, Fazenda Santa Elisa, Campinas –SP, no mês de Maio de 2010 e foi identificada pela botânica Profa. Dra. Maria Inês S. Lima. Número da

coleta não informado.

#### 1.1.4. Preparo do extrato

##### 3.1.4.1. *Galipea carinata* e *Angostura bracteata* ( $\equiv$ *G. bracteata*)

Os extratos obtidos foram preparados pela técnica Dorai Periotto Zandonai no mesmo ano da coleta (sem dados sobre o mês do preparo). As partes das plantas foram submetidas à secagem em estufa de circulação a 40°C durante aproximadamente 10 dias e posteriormente trituradas no moinho. O material seco e moído foi perclorado com solventes em ordem crescente de polaridade, hexano (EHex), diclorometano (EDic) e metanol (EMet), a temperatura ambiente com três agitações por dia. A extração para cada solvente perpassou-se três dias com uma troca de solvente por dia, totalizando doze dias, sendo três para cada solvente.



Fluxograma 3.1 - Fluxograma de preparação dos extratos das *Galipea*

#### Simbologia:

**A** – Extração com hexano (EHex);

**B** - Extração com diclorometano (EDic);

**C** - Extração com metanol (EMet).

Todos os extratos foram concentrados à vácuo em rotaevaporador a 35°C sendo, em seguida, armazenados em refrigerador para evitar a degradação e ataques por fungos e bactérias. As massas obtidas dos extratos seguem na tabela abaixo:

Tabela 3.1 - Massas obtidas do material vegetal seco e dos extratos

Material vegetal	Massa vegetal seca(g)	Massa do extrato obtido (g)		
		EHex	EDic	EMet
<b>Flores de <i>G. bracteata</i></b>	55,00	0,34	0,68	3,84
<b>Folhas de <i>G. carinata</i></b>	265,00	2,67	7,91	16,18

Após a obtenção dos extratos, estes foram submetidos à análise comparativa de cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) pelas semelhanças das cores e fatores de retenção ( $R_f$ ) e por comparação de espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$ . A análise em CCDA foi realizada com diclorometano 100% como fase móvel e revelada na luz UV nos comprimentos de ondas de 254 e 365nm e com solução de vanilina ácida. Os extratos hexânico e diclorometânico das folhas da *G. carinata* foram reunidos devido às semelhanças observadas tanto na CCDA quanto no espectro de RMN $^1\text{H}$ , passando a ser nomeado como extrato diclorometânico (EDic) e possuindo 10,58 g de massa.

#### 3.1.4.2. *Swinglea glutinosa*

O material vegetal da espécie *S. glutinosa* foi separado em galhos, folhas, raízes e frutos, onde somente as folhas foram selecionadas para o estudo e estas foram submetidas à secagem em estufa de circulação a 40°C durante aproximadamente 10 dias e posteriormente trituradas no moinho, rendendo 2,12 kg de material vegetal seco. A extração que foi realizada para as folhas da *S. glutinosa* é semelhante à realizada pelo método clássico descrito anteriormente. Contudo, o que difere ela da clássica é que esta foi realizada com etanol como solvente e o processo de extração é sob agito contínuo com o aparelho Ika Ultra Turrax (T 25)

por 5 minutos, 13.000 rpm à cada extração. Esse procedimento com o Ultra Turrax foi efetuado dez vezes para cada 300 g de material vegetal. Depois desse período de extração o extrato etanólico concentrado à vácuo em rotaevaporador a 35°C. O extrato etanólico foi congelado em nitrogênio líquido e em seguida liofilizado para remoção dos traços de água, rendendo 90g de extrato.

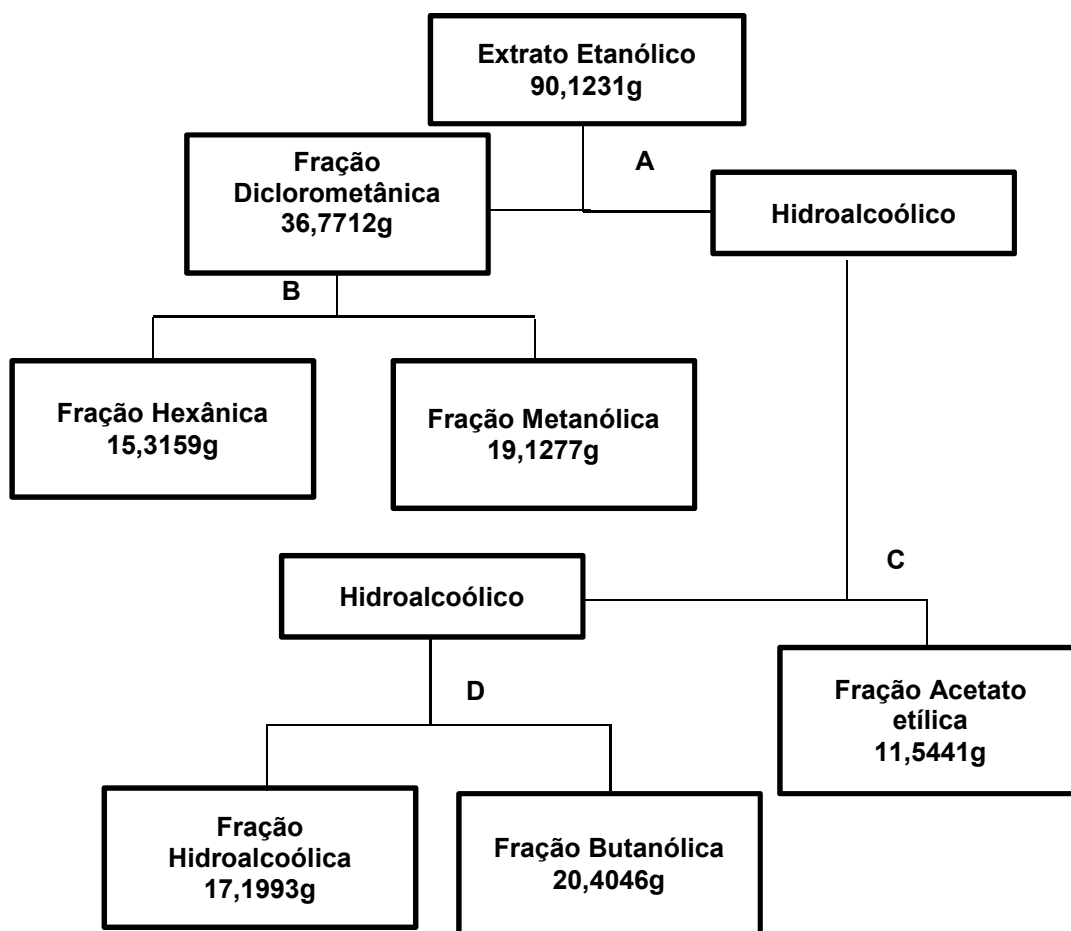
### **1.1.5. Fracionamentos e Isolamento das Substâncias**

#### **3.1.5.1. *Galipea carinata* e *Angostura bracteata* ( $\equiv$ *G. bracteata*)**

O extrato EDic da espécie *G. carinata* se apresentou pobre em metabólitos secundários e com uma alta concentração de material graxo e triglicerídeos não sendo possível o isolamento de qualquer substância. O extrato EMet era extremamente pobre em metabólitos secundários contendo majoritariamente açúcares. Este mesmo problema ocorreu com os extratos EHex, EDic e EMet das flores da espécie *A. bracteata*, além destes dois primeiros extratos possuírem uma massa muito pequena, ou seja, menor que 1g. Uma provável explicação para este perfil químico pobre em metabólitos secundários seria o tempo em que estes extratos foram preparados, onde o extrato da *G. carinata* tinha 10 anos e o extrato da *A. bracteata* 15 anos, logo neste tempo os possíveis metabolitos secundários dessas espécies teriam degradado.

#### **3.1.5.2. *Swinglea glutinosa***

O extrato etanólico obtido foi particionado solubilizando cerca de 30g deste em 500mL de solução hidroalcoólica de metanol/água 1:3 v/v e particionado em funil de separação com 400mL de outro solvente imiscível (diclorometano, acetato de etila e butanol), conforme o Fluxograma 2. Os extratos particionados foram, concentrados sob vácuo em rotaevaporadores a 35°C, para os extratos diclorometânico e acetato etílico, e a 50°C para os extratos butanólicos e hidroalcoólico. A fração diclorometânica obtido foi dissolvido em metanol e particionado, em funil de separação, com hexano e novamente concentradas sob vácuo em rotaevaporadores a 35°C



Fluxograma 3.2 - Fluxograma de partição do extrato etanólico da *S. glutinosa* e as respectivas massas dos extratos obtidos.

**Simbologia:**

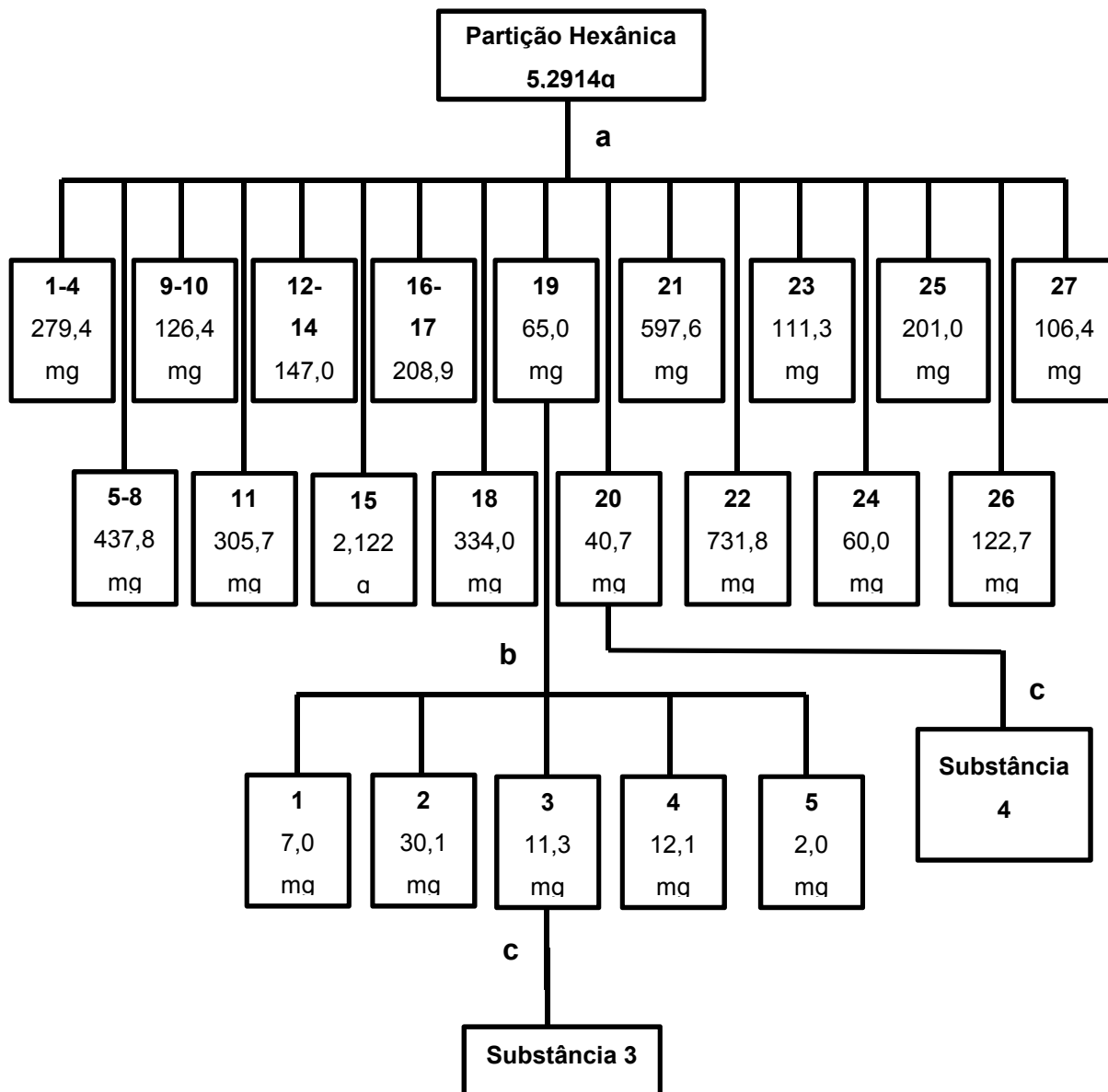
- A** – Solubilizado em MeOH/H<sub>2</sub>O 1:3 v/v e particionado com diclorometano;
- B** - Solubilizado em MeOH e particionado com hexano;
- C** – Particionado com acetato de etila;
- D** - Particionado com butanol.

No final se obteve cinco frações: hexânica, metanólica, acetato etílica, butanólica e hidroalcoólica. Todos os extratos foram armazenados em congeladores para evitar a degradação e ataques de fungos. As massas das frações obtidas se encontram no Fluxograma 3.2.

As frações obtidas tiveram o seu perfil cromatográfico caracterizado através de cromatografia em camada delgada (CCD) comparativa e através de RMN de <sup>1</sup>H permitindo uma análise das partições a serem trabalhadas.

De acordo com levantamento bibliográfico (DOS SANTOS, 2005; DOS SANTOS *et al.*, 2009; PURCARO *et al.*, 2009; WENIGER *et al.*, 2001) não há relatos

de trabalho das partes foliares dessa espécie. As demais partes do vegetal foram estudadas em extratos metanólicos (vide TABELA 1.4). Com isto, no presente trabalho foi escolhida a partição hexânica para o estudo, visando o isolamento de metabólitos secundários de baixa polaridade.



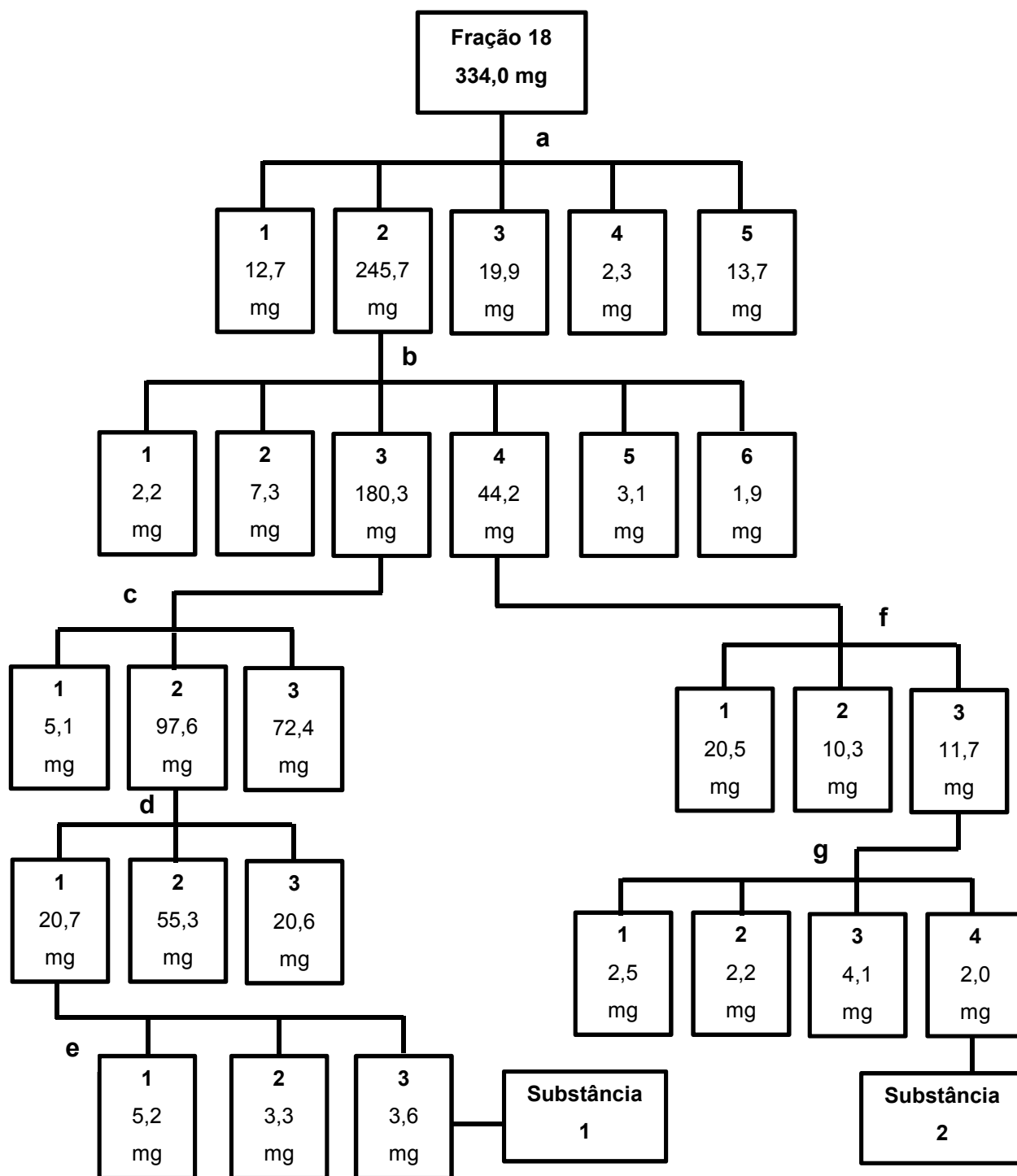
Fluxograma 3.3 - Fracionamento da fração hexânica e identificação das substâncias 3 e 4.

**Simbologia:**

a – Cromatografia por adsorção, sílica gel 60 (230-400 mesh), coluna de vidro (h = 50,0cm,  $\theta$  = 5,5cm), sistema gradiente de eluição: Hexano 100%; Hexano/DCM 1:1 (v/v); DCM 100%; DCM/Acetato de etila 1:1 (v/v); Acetato de etila 100%; Acetato de etila/Acetona 1:1 (v/v); Acetona 100%; Metanol 100%;

**b** – Cromatografia por exclusão, Sephadex LH-20, coluna de vidro (h = 65,0cm,  $\theta$  = 3,5cm), sistema isocrático de eluição: DCM/Metanol 1:1 (v/v);

**c** – CG-EM, coluna DB-5 30m x 0,25mm D.I. x 0,25 $\mu$ m de filme, Hélio como gás de arraste. Injetor 250°C; Detector 280°C; Rampa: Iniciou a 200°C sendo mantido por 10 minutos, seguido de aumento de 10°C/minuto até atingir 280°C onde foi mantido por mais 10 minutos. Injeção de 1 $\mu$ L na concentração de 2mg/mL, modo split.



Fluxograma 3.4 - Fracionamento da fração 18 e isolamento das substâncias 1 e 2.

**Simbologia:**

**a** – Cromatografia por exclusão, Sephadex LH-20, coluna de vidro (h = 140,0cm,  $\theta$  = 2,0cm), sistema isocrático de eluição: Metanol 100%;

**b** – Cromatografia por adsorção, sílica gel 60 (230-400 mesh), coluna de vidro (h = 30,5cm,  $\theta$  = 3,0cm), sistema gradiente de eluição: Hexano 100%; Hexano/DCM 1:1 (v/v); DCM 100%; DCM/Acetato de etila 1:1 (v/v); Acetato de etila 100%; Acetato de etila/Acetona 1:1 (v/v); Acetona 100%; Metanol 100%;

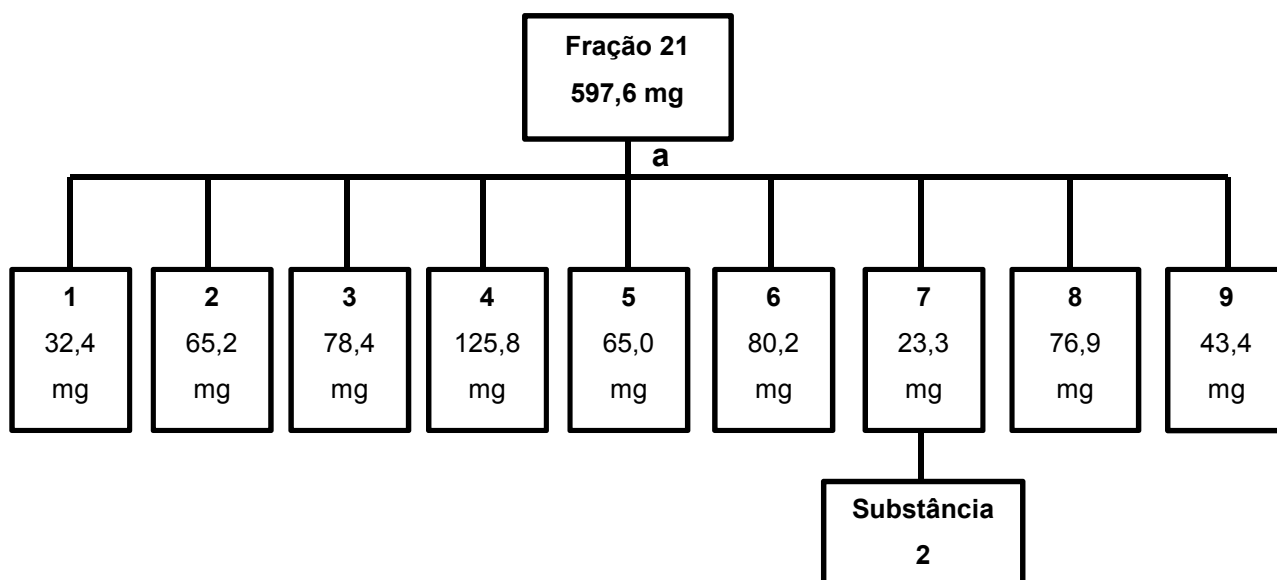
**c** – Cromatografia por adsorção, sílica gel 60 (230-400 mesh), coluna de vidro (h = 30,0cm,  $\theta$  = 2,5cm), sistema gradiente de eluição: DCM 100%; DCM/Acetato de etila 1:1 (v/v); Acetato de etila 100%; Acetato de etila/Acetona 1:1 (v/v); Acetona 100%; Metanol 100%;

**d** - Cromatografia por adsorção, sílica gel 60 (230-400 mesh), coluna de vidro (h = 17,0cm,  $\theta$  = 2,5cm), sistema gradiente de eluição: DCM 100%; DCM/Acetato de etila 1:1 (v/v); Acetato de etila 100%; Acetato de etila/Acetona 1:1 (v/v); Acetona 100%; Metanol 100%;

**e** – CLAE, coluna Propil-Diol, vazão de 2,5mL/minuto, injeção de 200 $\mu$ L, concentração de 20mg/mL, sistema isocrático de eluição: Hexano/Etanol 9:1 (v/v);

**f** - Cromatografia por exclusão, Sephadex LH-20, coluna de vidro (h = 65,0cm,  $\theta$  = 3,5cm), sistema isocrático de eluição: Metanol/DCM 1:1 (v/v);

**g** - Cromatografia por adsorção, sílica gel 60 (230-400 mesh), coluna de vidro (h = 20,0cm,  $\theta$  = 1,5cm), sistema gradiente de eluição: DCM 100%; DCM/Acetato de etila 1:1 (v/v); Acetato de etila 100%; Acetato de etila/Acetona 1:1 (v/v); Acetona 100%; Metanol 100%

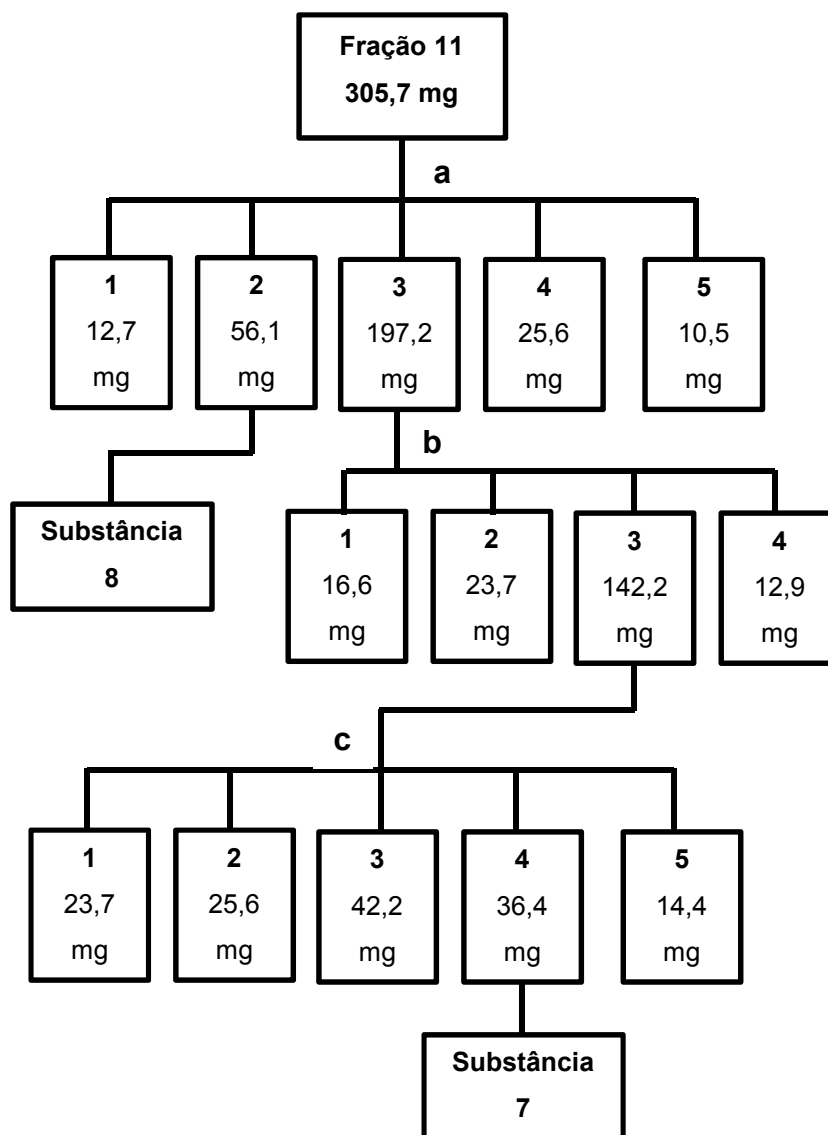


Fluxograma 3.5 - Fracionamento da fração 21 e isolamento da substância 2.

**Simbologia:**

**a** – Cromatografia por adsorção, sílica gel 60 (230-400 mesh), coluna de vidro (h = 22,0cm,  $\theta$  = 3,5cm), sistema gradiente de eluição: Hexano 100%; Hexano/DCM 1:1 (v/v); DCM 100%; DCM/Acetato de etila 1:1 (v/v); Acetato de etila 100%; Acetato de etila/Acetona 1:1 (v/v); Acetona 100%; Metanol 100





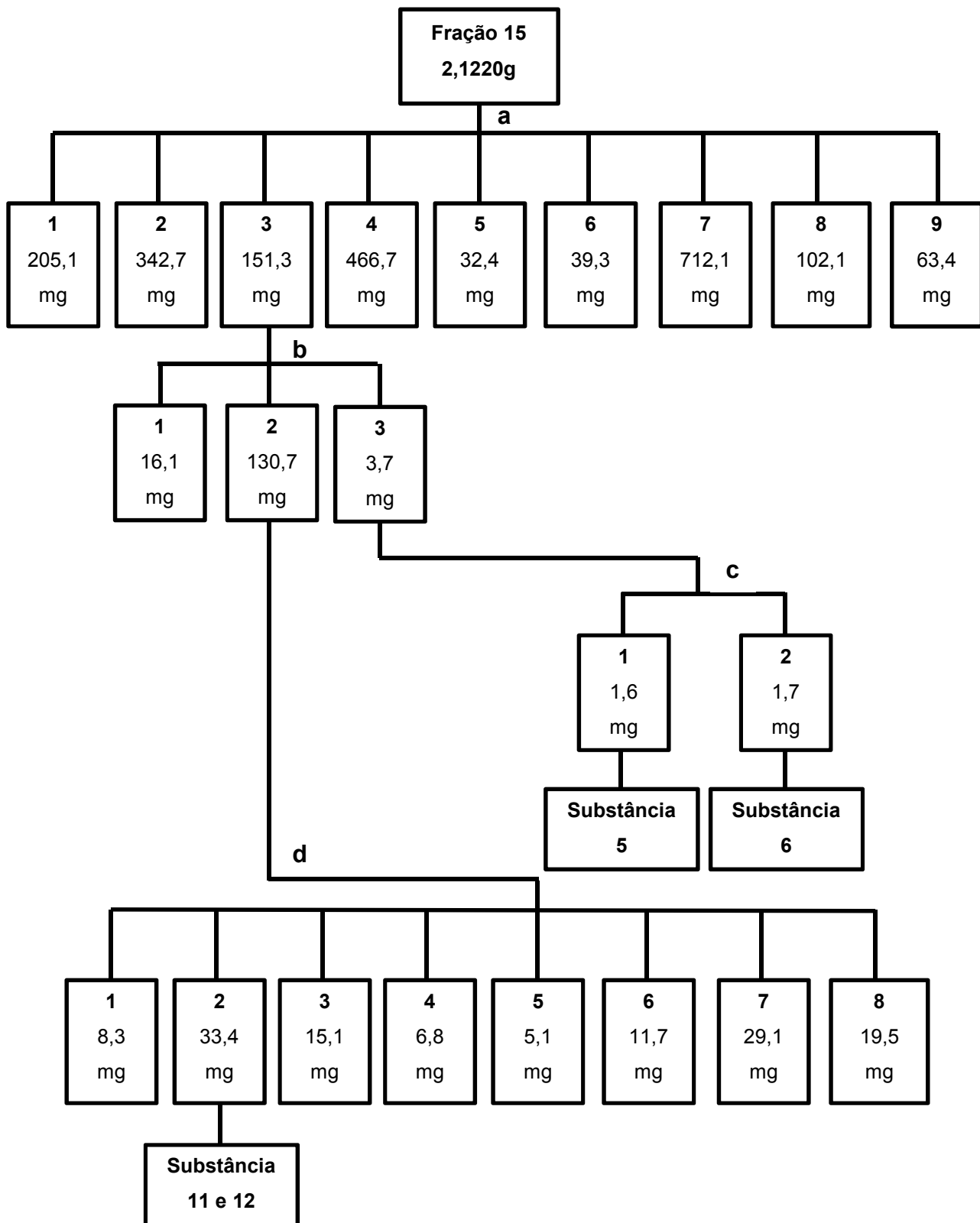
Fluxograma 3. 6 - Fracionamento da fração 11 e isolamento das substâncias 7 e 8

**Simbologia:**

**a** – Cromatografia por adsorção, sílica gel 60 (230-400 mesh), coluna de vidro (h = 28,0cm,  $\theta$  = 2,5cm), sistema gradiente de eluição: Hexano 100%; Hexano/DCM 1:1 (v/v); DCM 100%; DCM/Acetato de etila 1:1 (v/v); Acetato de etila 100%; Acetato de etila/Acetona 1:1 (v/v); Acetona 100%; Metanol 100%;

**b** – Cromatografia por adsorção, sílica gel 60 (230-400 mesh), coluna de vidro (h = 23,5cm,  $\theta$  = 2,5cm), sistema isocrático de eluição: Hexano/DCM 2:3 (v/v);

**c** – Cromatografia por adsorção, sílica gel 60 (230-400 mesh), coluna de vidro (h = 27,5cm,  $\theta$  = 2,5cm), sistema isocrático de eluição: Hexano/DCM 2:3 (v/v);



Fluxograma 3.7 - Fracionamento da fração 15 e isolamento das substâncias 5, 6, 10 e 11.

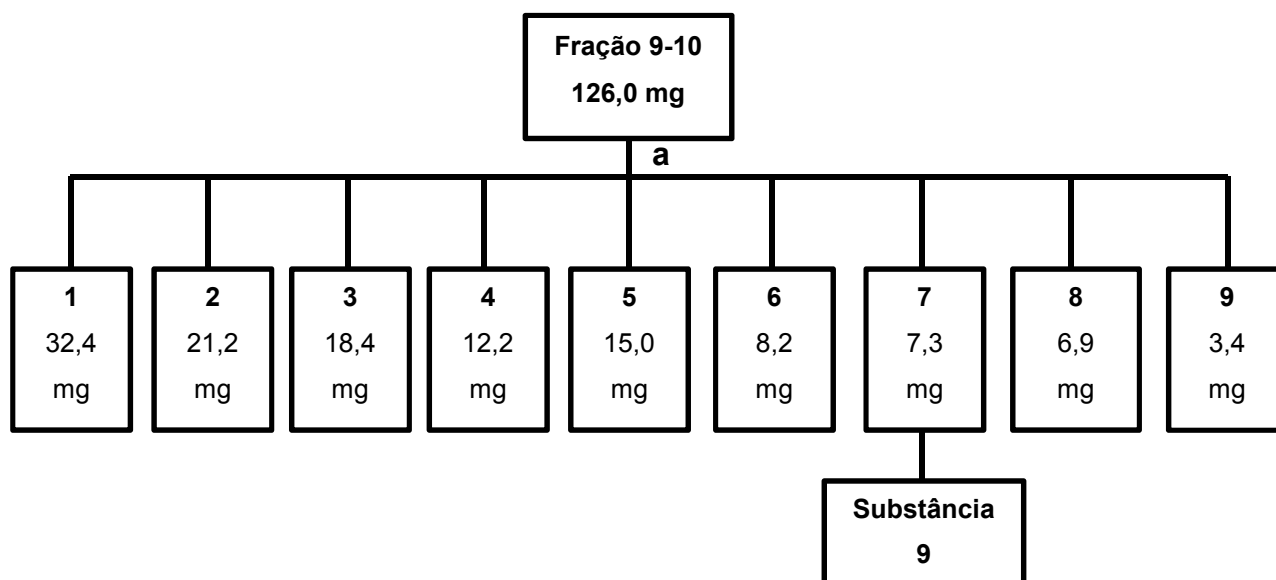
**Simbologia:**

**a** – Cromatografia por adsorção, sílica gel 60 (230-400 mesh), coluna de vidro (h = 60,0cm,  $\theta$  = 4,0cm), sistema gradiente de eluição: Hexano 100%; Hexano/DCM 1:1 (v/v); DCM 100%; DCM/Acetato de etila 1:1 (v/v); Acetato de etila 100%; Acetato de etila/Acetona 1:1 (v/v); Acetona 100%; Metanol 100%;

**b** – Cromatografia por exclusão, Sephadex LH-20, coluna de vidro (h = 140,0cm,  $\theta$  = 2,0cm), sistema isocrático de eluição: Metanol 100%;

**c** – CLAE, coluna Propil-Diol, vazão de 2,5mL/minuto, injeção de 200 $\mu$ L, concentração de 6mg/mL, sistema isocrático de eluição: Hexano/Etanol 9:1 (v/v);

**d** - Cromatografia por adsorção, sílica gel 60 (230-400 mesh), coluna de vidro (h = 30,0cm,  $\theta$  = 2,5cm), sistema isocrático de eluição: Hexano/DCM 2:3 (v/v).



Fluxograma 3.8 - Fracionamento da fração 9-10 e isolamento das substâncias 9.

**Simbologia:**

**a** – Cromatografia por adsorção, sílica gel 60 (230-400 mesh), coluna de vidro (h = 30,0cm,  $\theta$  = 2,5cm), sistema gradiente de eluição: Hexano 100%; Hexano/DCM 1:1 (v/v); DCM 100%; DCM/Acetato de etila 1:1 (v/v); Acetato de etila 100%; Acetato de etila/Acetona 1:1 (v/v); Acetona 100%; Metanol 100%;

## 1.2. Ensaio Biológico

Os ensaios biológicos foram realizados no Laboratório de Bioensaio do Departamento de Química da UFSCar, sob a orientação do Dr. Leonardo Toffano. Neste trabalho os ensaios biológicos avaliaram a influência dos compostos isolados frente ao crescimento micelial e germinação de esporos e formação de apressórios da *G. citricarpa in vitro*.

### 3.2.1. Materiais e Reagentes

- BDA (Batata-Dextrose-Ágar) comercial – Acumedia;
- Água destilada;
- DMSO grau HPLC – Tedia Brazil;
- Lactofenol;
- Placas de Petri ( $\phi = 9$  e  $7$  cm);
- Placas de Poliestireno ( $\phi = 9$  cm);
- Eppendorf BD (1,5 mL);
- Filtro  $0,2\mu\text{m}$  - Micropore;
- Pipetas volumétricas;
- Lamínula (18 x 18 x 0.13-0.17mm);
- Paquímetro;
- Alça de Drigalski;
- Filme PVC transparente;
- Câmara de Neubauer ( $0,002 \text{ mm}^2 / 0,100 \text{ mm}$ ) – New Optik.

### 3.2.2. Equipamentos

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

### 3.2.3. Obtenção e identificação do fungo *G. citricarpa*

O isolado do fungo foi obtido a partir de lesões do fruto *Citrus sinensis* infectado, em meio ágar-água, e posteriormente foi repicado e cultivado no meio BDA. A identificação do fungo foi realizada pelo teste do meio de AA (Aveia-Ágar) descrito na literatura (BAAYEN *et al.*, 2002; BALDASAARI *et al.*, 2008; WICKERT *et al.*, 2009), onde os fungos, endofítico (*G. mangiferae*) e o patógeno (*G. citricarpa*), apresentam respostas diferentes nesse meio de cultivo. A distinção é feita pela presença de um halo amarelo que é típica do fungo *G. citricarpa* ou a ausência desse halo que é típico da *G. mangiferae* (FIGURA 3.1).

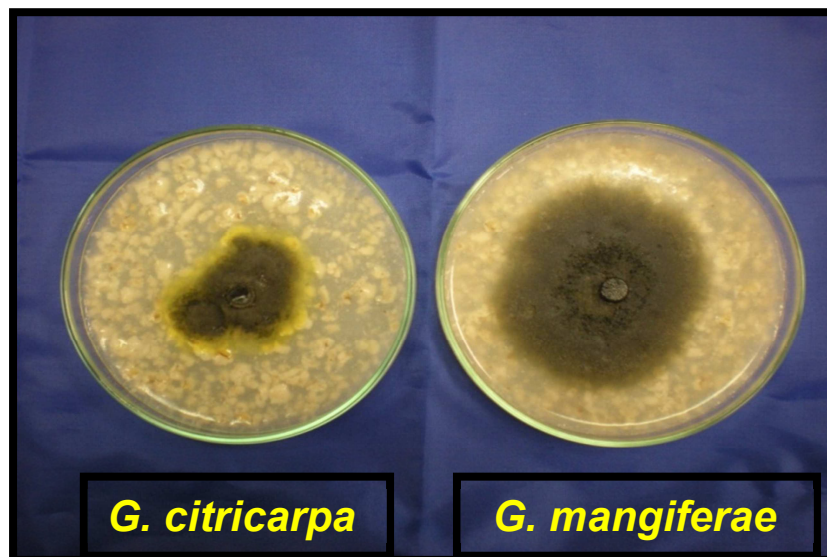


Figura 3.1 - Diferentes respostas dos fungos da espécie *Guignardia* crescidos em meio de AA. Fungo patógeno apresenta um halo amarelo. Foto tirada pelo Dr. Leonardo Toffano.

Para uma maior confiabilidade na identificação, o DNA do fungo foi amplificado pela técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) com o *primer* específico da *G. citricarpa*, e o DNA amplificado foi submetido a eletroforese gel, confirmando a identidade do fungo isolado.

O processo de isolamento e identificação do fungo *G. citricarpa* foi feita pelo Dr. Leonardo Toffano.

### **3.2.4. Preparo do inóculo para o ensaio**

Todos os cultivos do fungo foram feitos em meio BDA com água na concentração de 39 g/L (m/v). A solução do meio de cultura foi preparada pesando a massa desejada de BDA de acordo com o volume final a ser trabalhado. O BDA pesado foi solubilizado em água destilada em um Erlenmeyer e agitado até a total homogeneização e em seguida esterilizado em autoclave por 20 minutos a 120°C. Logo após o meio à  $\pm 50^\circ\text{C}$  foi vertido em placa de Petri de 9 cm de diâmetro em câmara de fluxo laminar com total assepsia e mantido até a solidificação do meio. Depois do meio solidificado os fungos repicados foram adicionados neste e encubados em BOD com fotoperíodo de 12h à temperatura de 25°C no período de 21 dias. Após esse período os fungos da *G. citricarpa* estavam aptos aos ensaios.

### **3.2.5. Metodologia de avaliação da influência das substâncias isoladas frente ao desenvolvimento da *G. citricarpa***

#### **3.2.5.1. Ensaio de crescimento micelial**

Os ensaios foram realizados pelo método de incorporação da substância avaliada ao meio de cultura, sendo feito com quatro repetições para cada tratamento. Para cada tratamento foi dissolvido 2,34 g de BDA em 60 mL de água destilada e em seguida o meio foi esterilizado em autoclave por 20 minutos a 120°C. A substância avaliada (6 mg) foi dissolvida em 500  $\mu\text{L}$  de DMSO e incorporada diretamente ao meio de cultura fundente ( $\pm 50^\circ\text{C}$ ) através do filtro milipore para a retenção de resíduos e quaisquer organismos (bactérias ou fungos) e homogeneizado obtendo-se uma concentração de 0,1mg/mL de solução de BDA. Posteriormente, o meio foi vertido em placas de Petri de 7 cm de diâmetro e mantidas em fluxo laminar com total assepsia e até a solidificação do meio. Para cada avaliação foi realizado um controle positivo que consistia do meio de cultura com 500  $\mu\text{L}$  de DMSO também em quatro repetições.

Após a solidificação dos meios, foram inoculados discos de micélios de 0,5 cm de diâmetro do fungo (cultivados em BDA) no meio das placas contendo BDA incorporado com a substância e BDA incorporado apenas com DMSO (controle

positivo). As placas com os fungos inoculados foram encubadas em BOD com fotoperíodo de 12h à temperatura de 25°C.

As avaliações do crescimento micelial foram realizadas de 2 em 2 dias utilizando-se paquímetro para a obtenção das medidas verticais e horizontais das placas. A medida foi realizada até o momento em que um dos tratamentos os fungos ocupassem toda a placa. Foram calculadas as médias do crescimento micelial horizontal e vertical e dessas médias foram calculadas as médias das repetições de cada tratamento. Foram avaliadas todas as frações obtidas e também de algumas substâncias isoladas da partição hexânica da *S. glutinosa*: o triterpeno **3- $\alpha$ -hidroxiglutin-5-eno (8)**, o diterpeno **3-metil-5-(2,5,5,8a-tetrametildecaidronaftalen-1-il)pent-2-en-1-ol (7)** e a amida **N-{2-[4-(3-oxobutoxi)fenil]etil}benzamida (2)** (FIGURA 3.2).

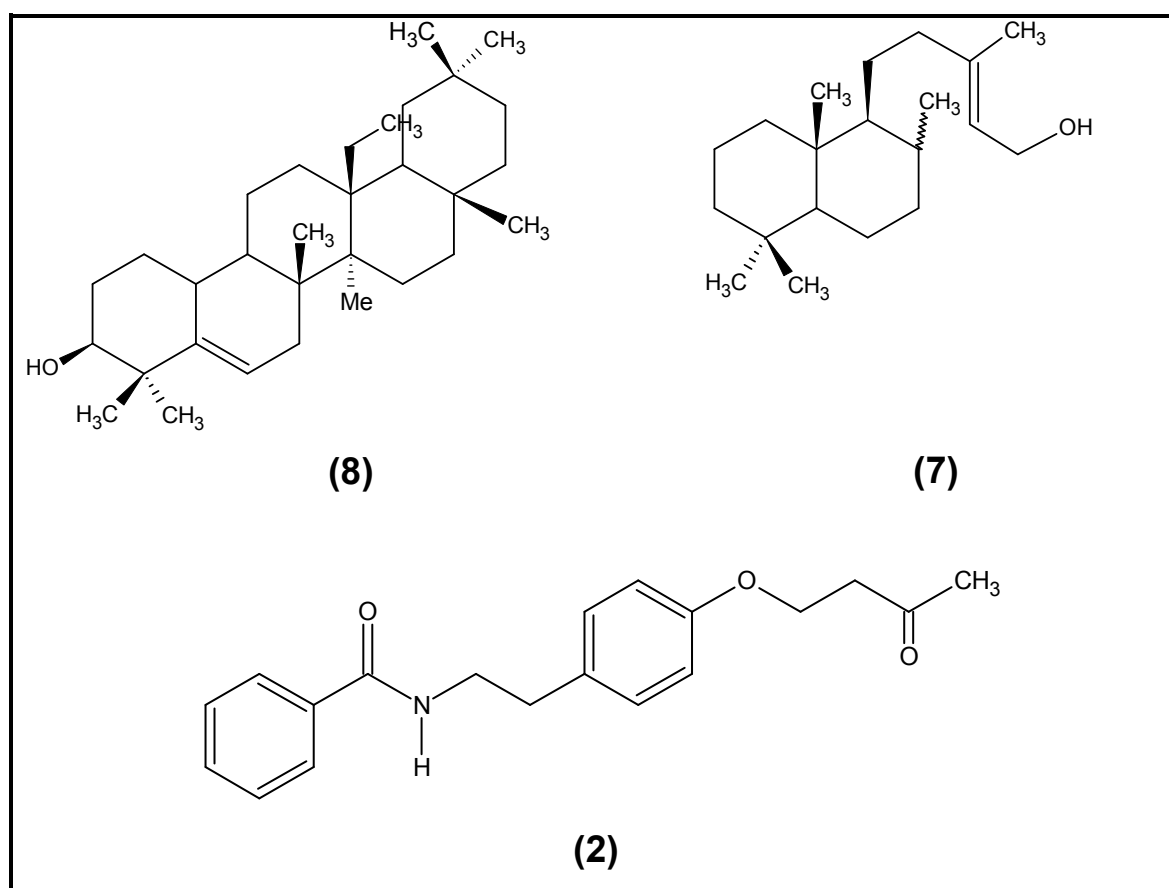


Figura 3.2 - Substâncias que foram avaliadas contra a *G. citricarpa*.

### 3.2.5.2. Ensaio de germinação de esporos e formação de apressórios

Para o ensaio de germinação de esporos e formação de apressórios foi preparada uma solução de suspensão de esporos que foi obtida a partir de uma cultura do fungo de *G. citricarpa* em meio BDA, onde com auxílio de uma alça de Drigalski foram retirados esporos do fungo e suspenso em 10 mL de água destilada estéril. Os esporos foram contabilizados em câmara de Neubauer com auxílio de um microscópio ótico onde se obteve uma suspensão de  $10^5$  esporos/mL. Em seguida preparou-se soluções estoque das substâncias ensaiadas, nos quais foram solubilizados 1mg de cada substância em 50  $\mu$ L de DMSO e a solução diluída em 5 mL de água destilada, resultando em uma concentração de 0,2mg/mL.

Assim como no ensaio de crescimento micelial este ensaio também foi feito com quatro repetições por tratamento desta maneira, foram aplicadas quatro gotas de 20  $\mu$ L da suspensão de esporos em placas de poliestireno e a essas gotas foram adicionados mais 20  $\mu$ L da solução da substância avaliada resultando numa concentração de 0,1 mg/mL, concentração esta igual ao que foi utilizada no ensaio de crescimento micelial. Para cada avaliação foi realizado um controle positivo que consistia da solução de 5 mL de água com 50  $\mu$ L de DMSO também em quatro repetições. As placas foram vedadas com filme PVC transparente com o objetivo de manter a umidade e foram encubadas em BOD com fotoperíodo de 12h à temperatura de 25°C por 24h. Após este período a porcentagem de germinação e formação de apressórios foi avaliada através de microscópio ótico (aumento 100 vezes). Foram considerados como germinados os esporos com tubo germinativo de tamanho igual ou superior ao comprimento dos esporos não germinados.

As substâncias submetidas a este ensaio foram as mesmas que foram ensaiadas no crescimento micelial.

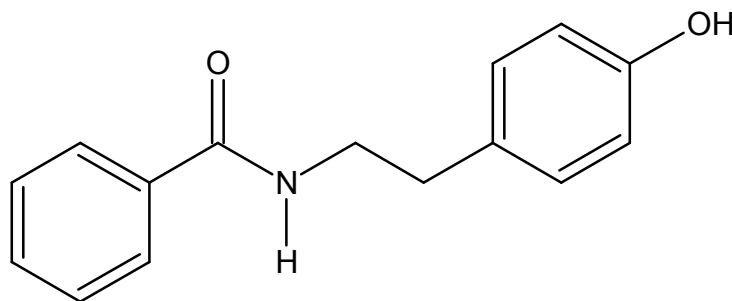


## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1. Estudo Fitoquímico

#### 4.1.1. Substâncias isoladas e identificadas

O estudo fitoquímico da fração hexânica das folhas da espécie *S. glutinosa* levou ao isolamento de 10 substâncias e à identificação de outras duas via CG-EM, pertencentes às classes de flavonoides, terpenoides e amidas.

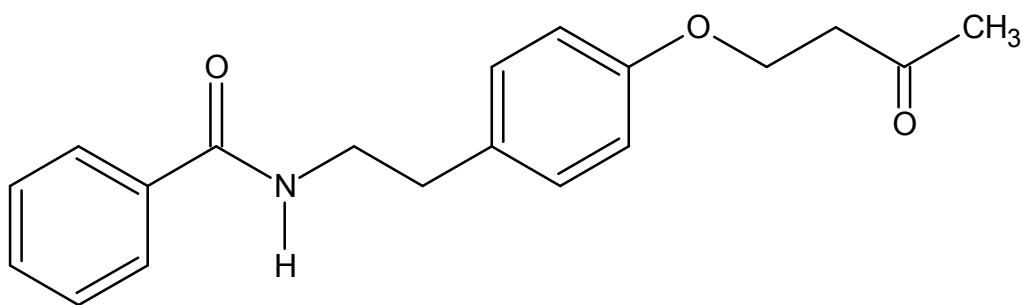


**Substância (1):** N-Benzoyltiramina

**Procedência:** Folhas *S. glutinosa*

**Identificação:** p. 86

**Isolamento:** p. 70

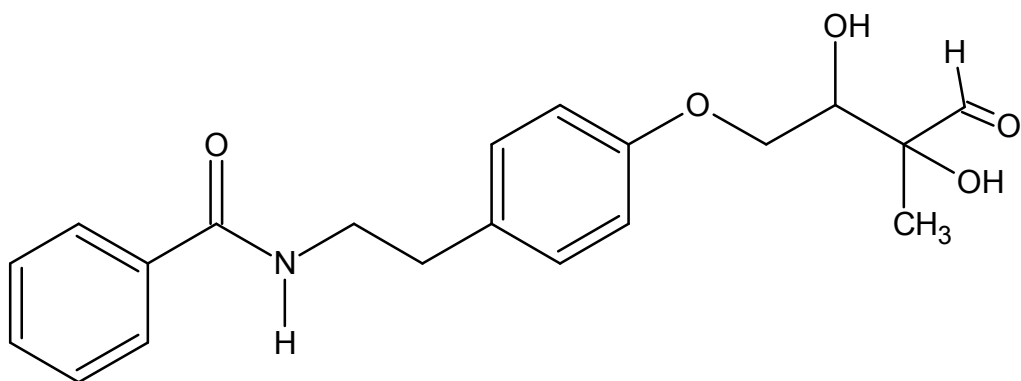


**Substância (2):** N-{2-[4-(3-Oxobutoxil)fenil]etil}benzamida

**Procedência:** Folhas *S. glutinosa*

**Identificação:** p. 90

**Isolamento:** p 70 e 72

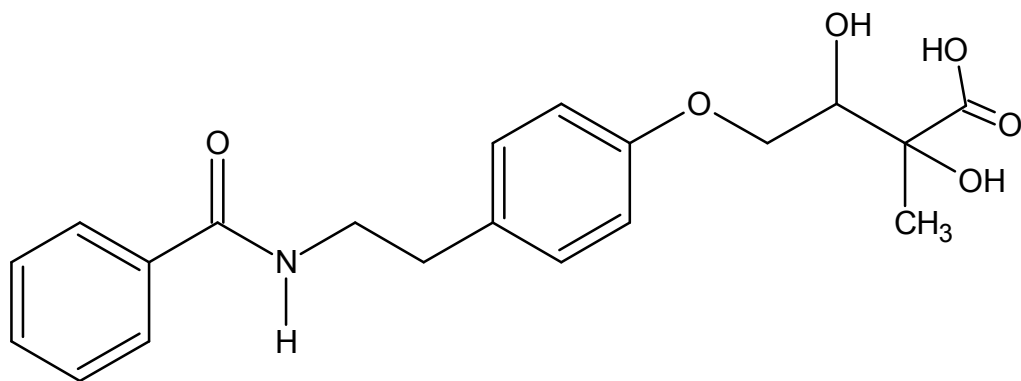


**Substância (3):** N-[2-[4-(2,3-Diidróxi-3-metil-4-oxobutoxil)fenil]etil]benzamida

**Procedência:** Folhas *S. glutinosa*

**Identificação:** p. 96

**Isolamento:** p. 68

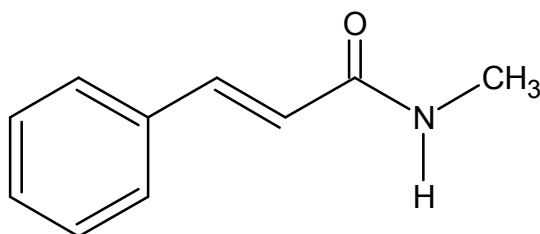


**Substância (4):** Ác. 4-{4-[2-(benzoilamino)etil]fenoxil}-2,3-diidróxi-2-metilbutanóico

**Procedência:** Folhas *S. glutinosa*

**Identificação:** p. 100

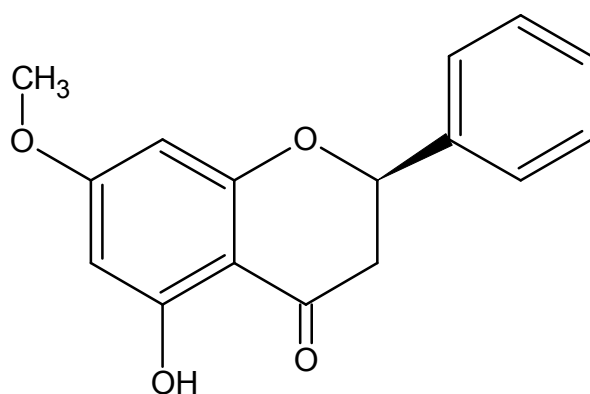
**Isolamento:** p. 68



**Substância (5):** (2E)-N-Metil-fenilacrilamida

**Procedência:** Folhas *S. glutinosa*

**Identificação:** p. 104 **Isolamento:** p. 74

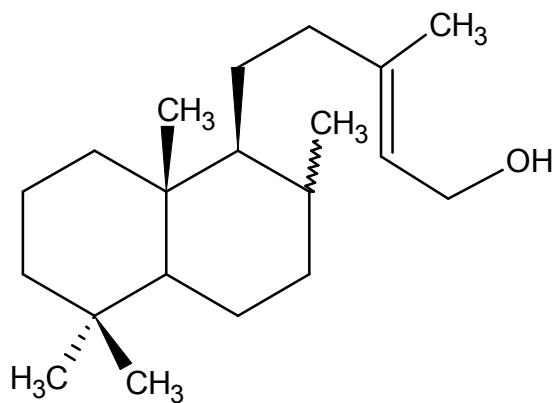


**Substância (6):** Pinostrobin

**Procedência:** Folhas *S. glutinosa*

**Identificação:** p. 109

**Isolamento:** p. 74

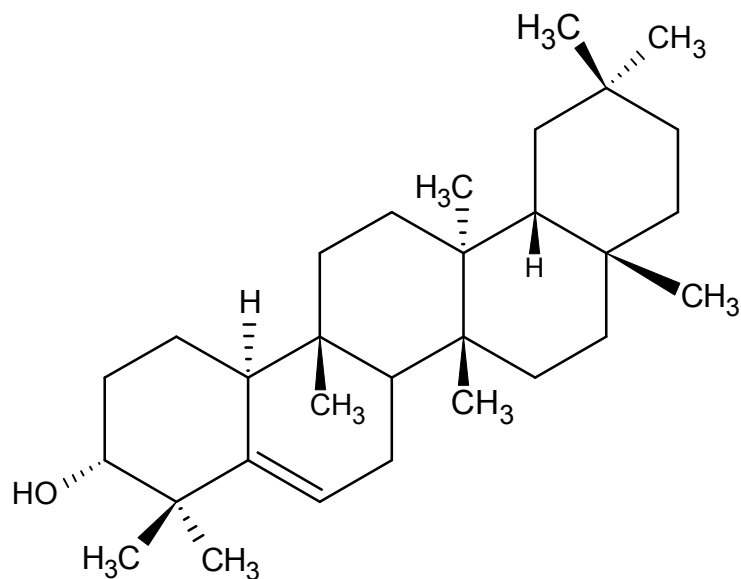


**Substância (7):** (2E)-2-Metil-[2,5,5,8a-tetrametildecadronaftalen-1-il]but-2-en-1-ol

**Procedência:** Folhas *S. glutinosa*

**Identificação:** p. 113

**Isolamento:** p. 73

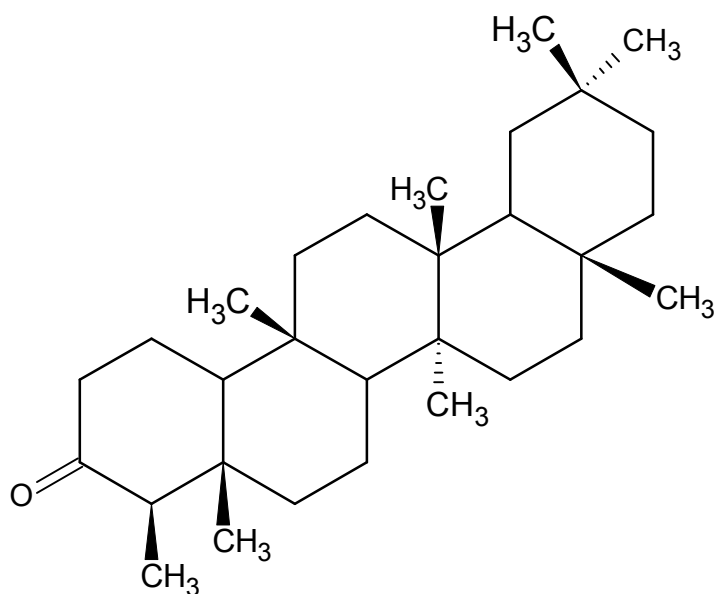


**Substância (8):** 3α-Hidróxiglutin-5-eno

**Procedência:** Folhas *S. glutinosa*

**Identificação:** p. 122

**Isolamento:** p. 73

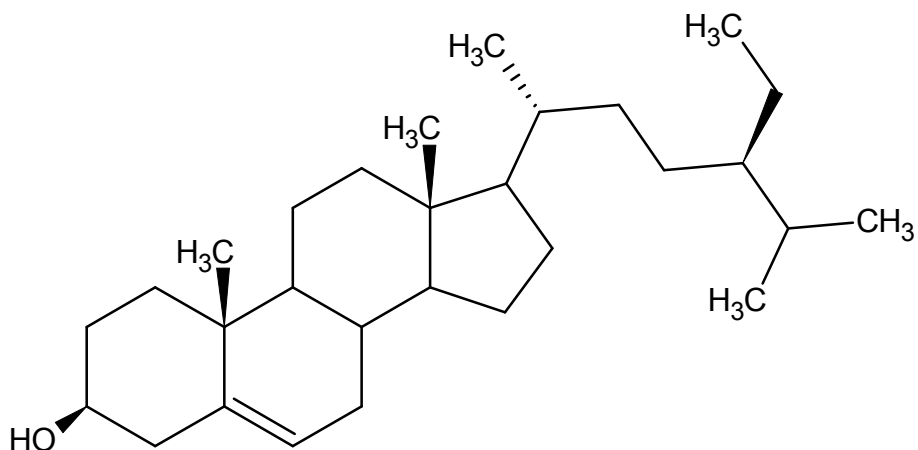


**Substância (09):** Friedelina

**Procedência:** Folhas *S. glutinosa*

**Identificação:** p. 127

**Isolamento:** p. 75

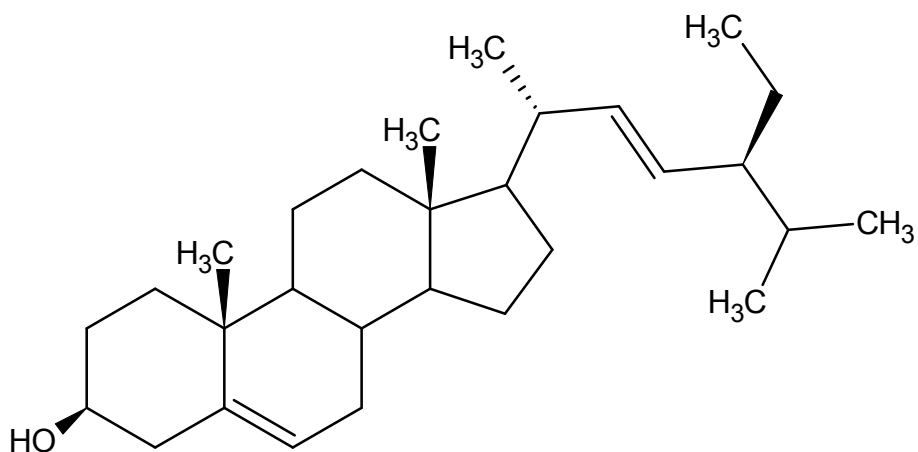


**Substância (10):**β-Sitosterol

**Procedência:** Folhas *S. glutinosa*

**Identificação:** p. 132

**Isolamento:** p. 74



**Substância (11):**Estigmasterol

**Procedência:** Folhas *S. glutinosa*

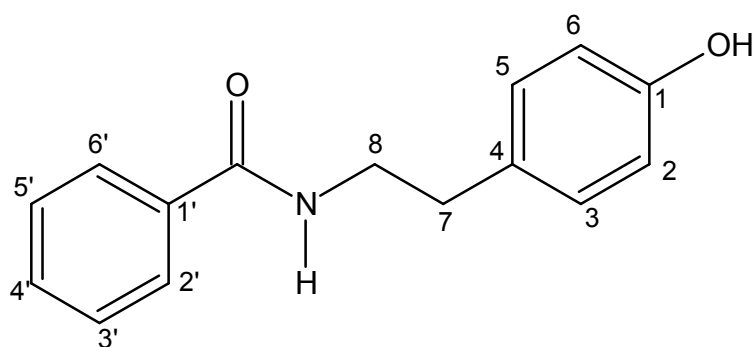
**Identificação:** p. 132

**Isolamento:** p. 74

## 4.1.1.1. Determinação Estrutural

### 4.1.1.1.1 AMIDAS

#### 4.1.1.1.1.1. Identificação da Substância 1



A substância 1 foi isolada como um sólido amorfo branco e teve sua estrutura elucidada através de espectro de RMN  $^1\text{H}$ , CG-EM e por comparação com a literatura (DO SANTOS, 2005).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (FIGURA 4.3) revelou dois singletos largos,  $\delta$  6,10 (1H, *s*) e  $\delta$  5,00 (1H, *s*), referentes a N-H e O-H, respectivamente. Os dois dubletos integrando para dois hidrogênios,  $\delta$  7,10 (2H, *d*,  $J= 8,5\text{Hz}$ ) e  $\delta$  6,60 (2H, *d*,  $J= 8,5\text{Hz}$ ), com acoplamento *orto* são característicos de anel aromático dissustituído e foram atribuídos aos H-2/6 e H-3/5, respectivamente. Os sinais H-2/6 ( $\delta$  7,10) e H-3/5 ( $\delta$  6,60) possuem os mesmos deslocamentos químicos devido ao mesmo ambiente químico deles que é resultado da livre rotação do anel aromático sendo assim, são considerados equivalentes. Os sinais,  $\delta$  7,68 (2H, *d*,  $J= 6,8\text{Hz}$ ),  $\delta$  7,48 (1H, *m*) e  $\delta$  7,40 (2H, *d*,  $J= 7,4\text{Hz}$ ) apresentam um perfil característico de grupo fenila com livre rotação, sendo assim foram atribuídos respectivamente aos H-2'/6', H-4' e H-3'/5'. Os hidrogênios metilênicos apresentaram seus sinais como um tripleto, integrando para dois hidrogênios, em  $\delta$  2,87 (2H, *t*,  $J= 6,8\text{Hz}$ ) atribuído ao H-7, e um quadrupeto integrando para dois hidrogênios, em  $\delta$  3,69 (2H, *q*,  $J= 6,8\text{Hz}$ ) atribuído ao H-8. Esses dados foram comparados com a literatura (Dos Santos, 2005), indicando que a substância 1 como sendo da amida N-benzoiltiramina, sendo confirmada por CG-EM (FIGURAS 4.1 e 4.2).

Foi observado o pico do íon molecular com  $m/z$  de 241 Daltons confirmando a massa da N-benzoiltiramina. Os fragmentos  $m/z = 51, 77, 105, 120$  e  $134$  Daltons forneceram mais detalhes da estrutura, confirmando a estrutura da amida N-benzoiltiramina, como pode ser averiguado na proposta de fragmentação do ESQUEMA 4.1.

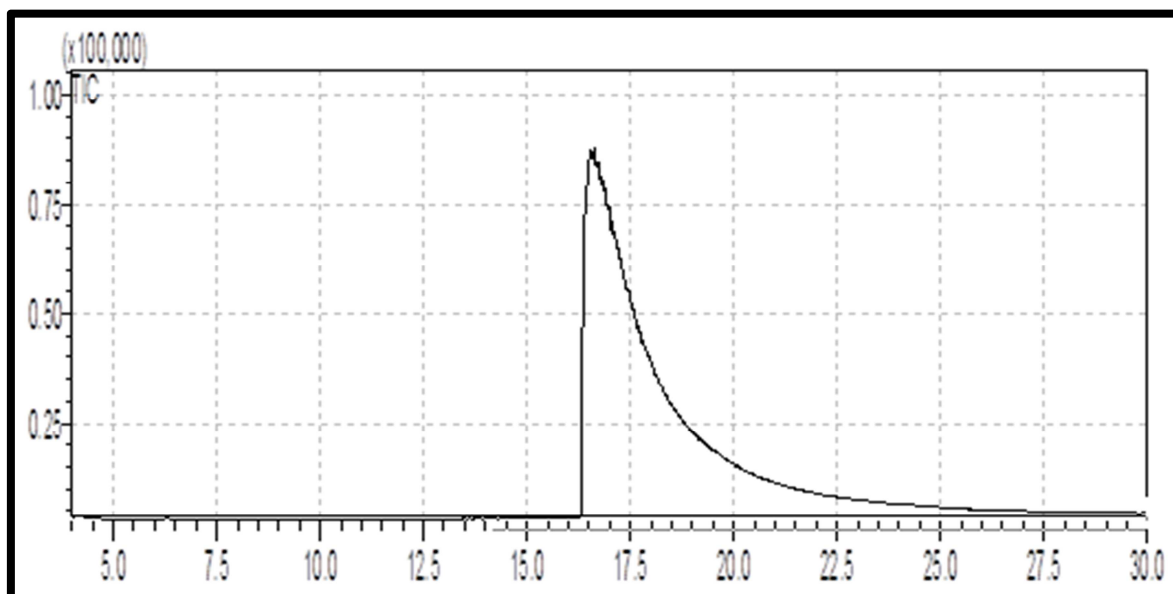


Figura 4.1 - Cromatograma obtido em CG/EM da Substância 1. Coluna DB-5 30m x 0,25mm D.I. x 0,25 $\mu$ m de filme, Hélio como gás de arraste. Injetor 250°C; Detector 280°C; Rampa: Iniciou a 200°C sendo mantido por 10 minutos, seguido de aumento de 10°C/minuto até atingir 280°C onde foi mantido por mais 10 minutos. Injeção de 1 $\mu$ L na concentração de 2mg/mL.

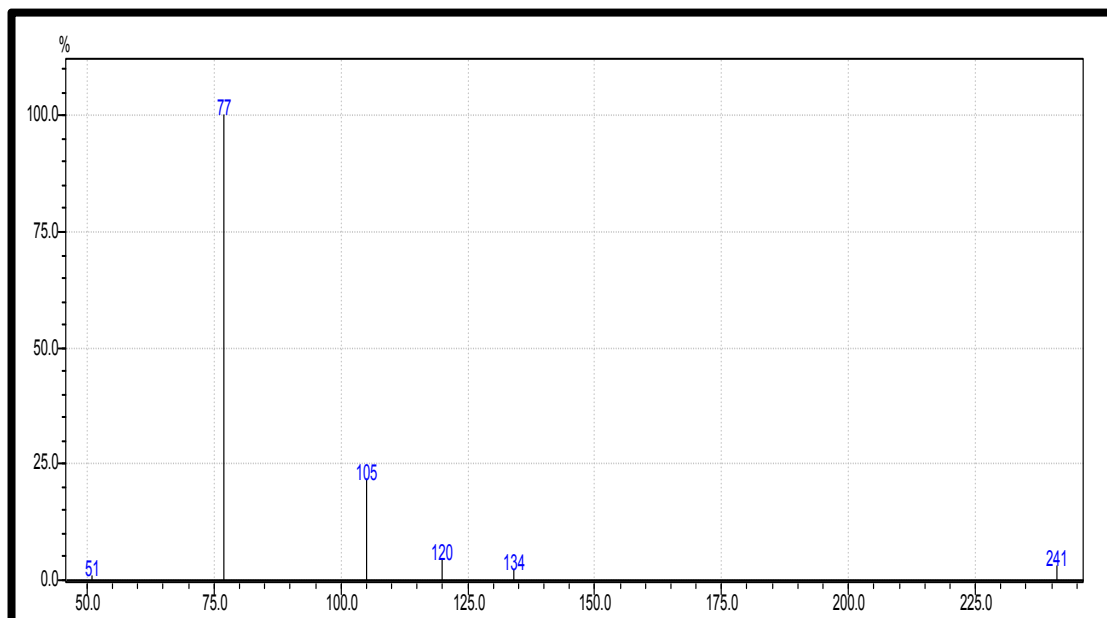
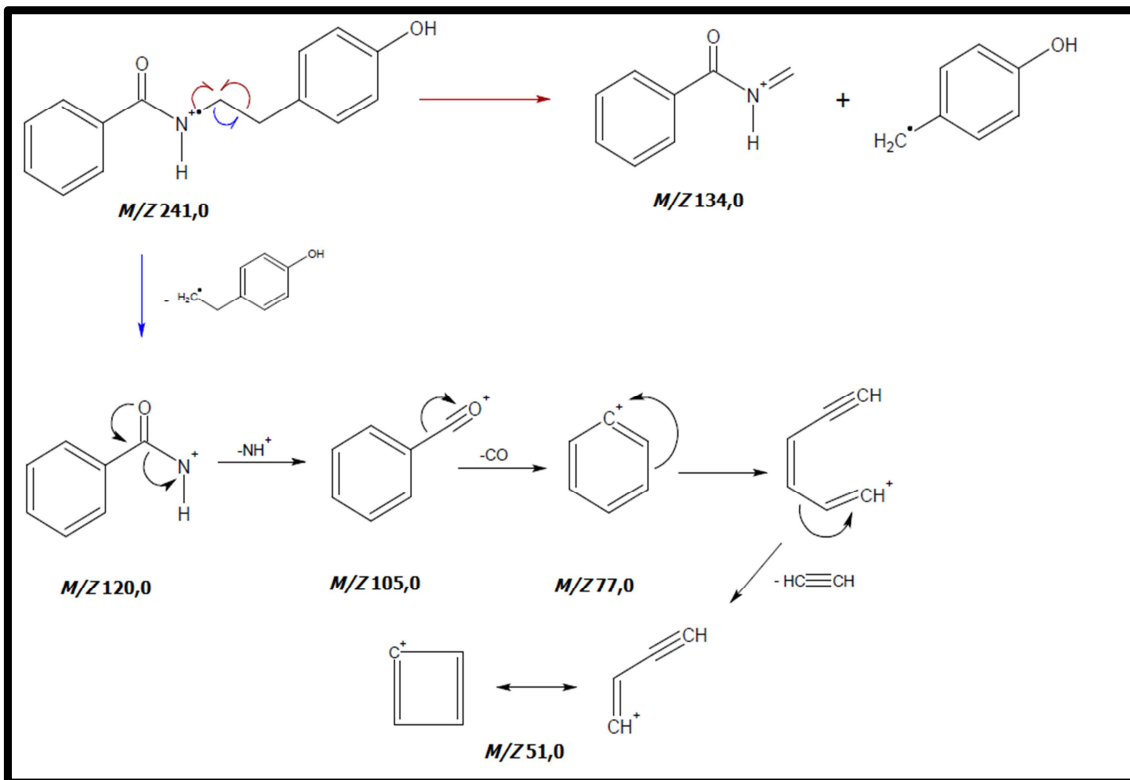


Figura 4.2 - Espectro de massas da Substância 1. Modo SIM de fragmentação, íons selecionados: m/z 51, 77, 105, 120, 134 e 241.



Esquema 4.1 - Proposta de fragmentação da amida N-benzoiltiramida



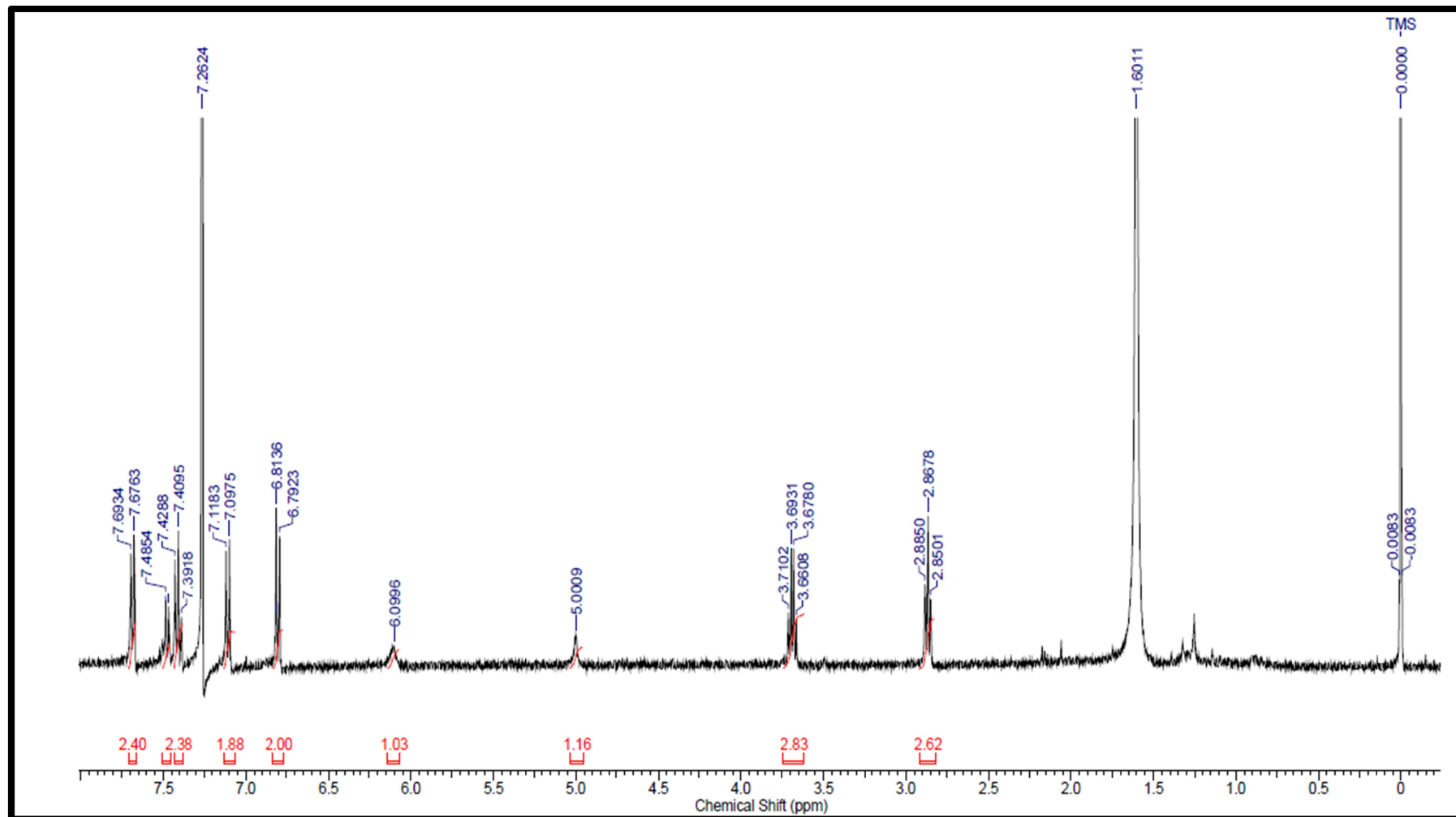
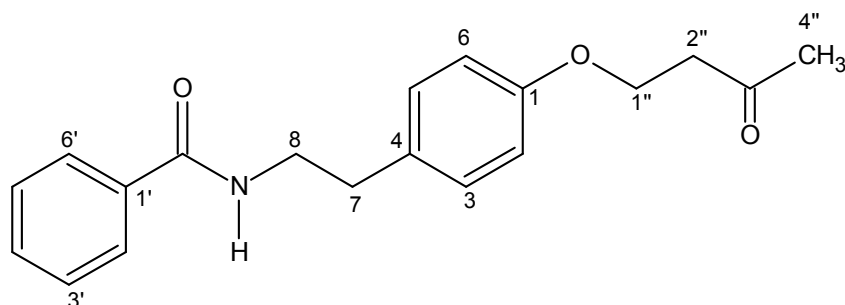


Figura 4.3 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância 1 (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ .)

Tabela 4.1 - Dados de RMN <sup>1</sup>H da N- benzoiltiramida e comparação com a literatura.

N-Benzoiltiramina (1) (400MHz, CDCl <sub>3</sub> )		Dos Santos, 2005 (200MHz, CDCl <sub>3</sub> )	
H	δ(ppm), J(Hz)	H	δ(ppm), J(Hz)
<b>2</b>	7,10 (2H, <i>d</i> , J= 8,3)	<b>2</b>	7,07 (2H, <i>d</i> , J= 8,5)
<b>3</b>	6,78 (2H, <i>d</i> , J= 8,5)	<b>3</b>	6,78 (2H, <i>d</i> , J= 8,5)
<b>5</b>	6,78 (2H, <i>d</i> , J= 8,5)	<b>5</b>	6,78 (2H, <i>d</i> , J= 8,5)
<b>6</b>	7,10 (2H, <i>d</i> , J= 8,3)	<b>6</b>	7,07 (2H, <i>d</i> , J= 8,5)
<b>7</b>	2,87 (2H, <i>t</i> , J= 6,8)	<b>7</b>	2,85 (2H, <i>t</i> , J= 6,9)
<b>8</b>	3,69 (2H, <i>q</i> , J= 6,8)	<b>8</b>	3,67 (2H, <i>q</i> , J= 6,8)
<b>2'</b>	7,68 (2H, <i>d</i> , J= 6,8)	<b>2'</b>	7,67 (2H, <i>d</i> , J= 7,2)
<b>3'</b>	7,40 (2H, <i>t</i> , J= 7,0)	<b>3'</b>	7,37 (2H, <i>d</i> , J= 7,2)
<b>4'</b>	7,48 (1H, <i>m</i> )	<b>4'</b>	7,46 (1H, <i>m</i> )
<b>5'</b>	7,40 (2H, <i>t</i> , J= 7,0)	<b>5'</b>	7,37 (2H, <i>d</i> , J= 7,2)
<b>6'</b>	7,68 (2H, <i>d</i> , J= 6,8)	<b>6'</b>	7,67 (2H, <i>d</i> , J= 7,2)
<b>N-H</b>	6,10 (1H, <i>sl</i> )	<b>N-H</b>	6,10 (1H, <i>sl</i> )
<b>O-H</b>	5,00 (1H, <i>sl</i> )	<b>O-H</b>	-

#### 4.1.1.1.2. Identificação da Substância 2



A substância 2 foi isolada como um sólido amorfo branco e teve sua estrutura elucidada através de espectro de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , COSY, HSQC, HMBC, CG-EM

e por comparação com a literatura (DOS SANTOS, 2005).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (FIGURA 4.9) mostrou um padrão de sinais semelhante da substância 1, desta forma a substância 2 poderia tratar de uma amida com núcleo N-benzoiltiramida. Entretanto o tripleto que integrava para dois hidrogênios em  $\delta$  2,89 na substância 1 foi substituído por um quintupletto que integra para quatro hidrogênios em  $\delta$  2,89. Ao analisar o espectro de COSY (FIGURA 4.6 e 4.7) foi observado que esse quintupletto correlacionava-se com dois sinais: tripleto em  $\delta$  4,22 (2H, *t*,  $J=6,34$ ) e um quatrupleto em  $\delta$  3,68 (2H, *q*,  $J=6,96$ ). Pela ampliação do espectro de COSY na região de  $\delta$  3,00 a  $\delta$  6,00 foi constatado que os “spots” de correlação do quintupletto em  $\delta$  2,89 estavam levemente deslocados levando a crer que esse sinal tratava-se de dois tripletos ( $\delta$  2,87 e  $\delta$  2,91), integrando para dois cada, com deslocamentos químicos muito próximos desta forma, gerando o quintupletto de forma assimétrica, pois o sinal em  $\delta$  2,87 é referente ao H-7 e este se correlaciona com o sinal em  $\delta$  3,68 referente ao H-8 e este último com o sinal  $\delta$  6,09 do N-H (FIGURA 4.4), confirmando assim o núcleo N-benzoiltiramida.

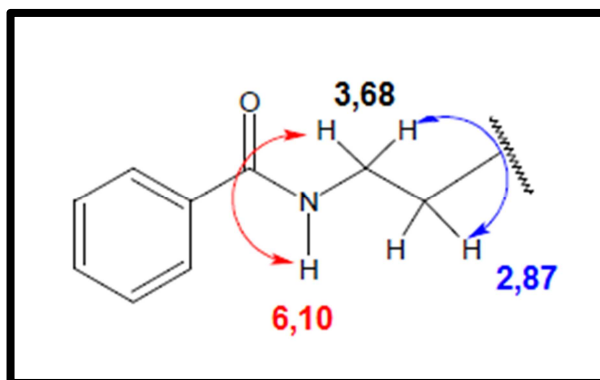


Figura 4. 4 - Algumas correlações observadas no COSY.

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (FIGURA 4.10 e 4.11) foram observados 15 sinais de carbonos, onde oito situavam-se na região de  $\delta$  125, a  $\delta$  140 tratando-se, portanto de carbonos de sistema aromático, foi observado um sinal em  $\delta$  167,4 característico de carbono de carboxila (na molécula em questão caboxila de amida) e na região de  $\delta$  30,0 a 40,0 observou-se 4 sinais, destacando os sinais  $\delta$  41,2 e  $\delta$

34,7. Esses sinais citados aos serem comparados com a literatura (TABELA 4.2), confirmou parte do esqueleto da substância 2 tendo o núcleo N-benzoiltiramide.

Os quatro sinais de carbono restante tinham o deslocamento químico de  $\delta$  62,9 que é comum de carbonos carbinólicos,  $\delta$  206,4 típico de carbonila e  $\delta$  42,9 e  $\delta$  30,5 característicos de carbonos metilênicos. Pelo HSQC (FIGURA 4.8), foi atribuído os hidrogênios nos quais esses carbonos estavam correlacionados, onde o sinal  $\delta$  62,9 estava correlacionado com o  $\delta$  4,22 (2H, *t*,  $J= 6,34$ ), o  $\delta$  42,9 com  $\delta$  2,91 (2H, *t*,  $J= 6,36$ ) e o sinal em  $\delta$  30,5 com o singlete integrando para três hidrogênios em  $\delta$  2,24 (3H, *s*), onde o deslocamento químico desse singlete refere-se a de uma metila ligada à carbonila pois, deslocamentos químicos de hidrogênios dessa magnitude é característico de metilas ligadas à carbonos olefínicos sofrendo conjugação ou ligados a carbonos carbonílicos.

Pelo HMBC (FIGURA 4.5 e 4.12) foi confirmado que a metila em  $\delta$  2,24 estava ligada à carbonila devido a sua correlação com o sinal em  $\delta$  206,4. O HMBC também revelou que o carbono metilênico que se desdobrava em um tripleto em  $\delta$  2,91 se correlacionava à carbonila e ao carbono em  $\delta$  62,9 referente ao hidrogênio  $\delta$  4,22. Para finalizar este sinal em  $\delta$  4,22 correlacionava-se com o sinal em  $\delta$  157,2 que é característico de carbono de sistema aromático ligado a heteroátoma, no caso desta substância ligado à oxigênio.

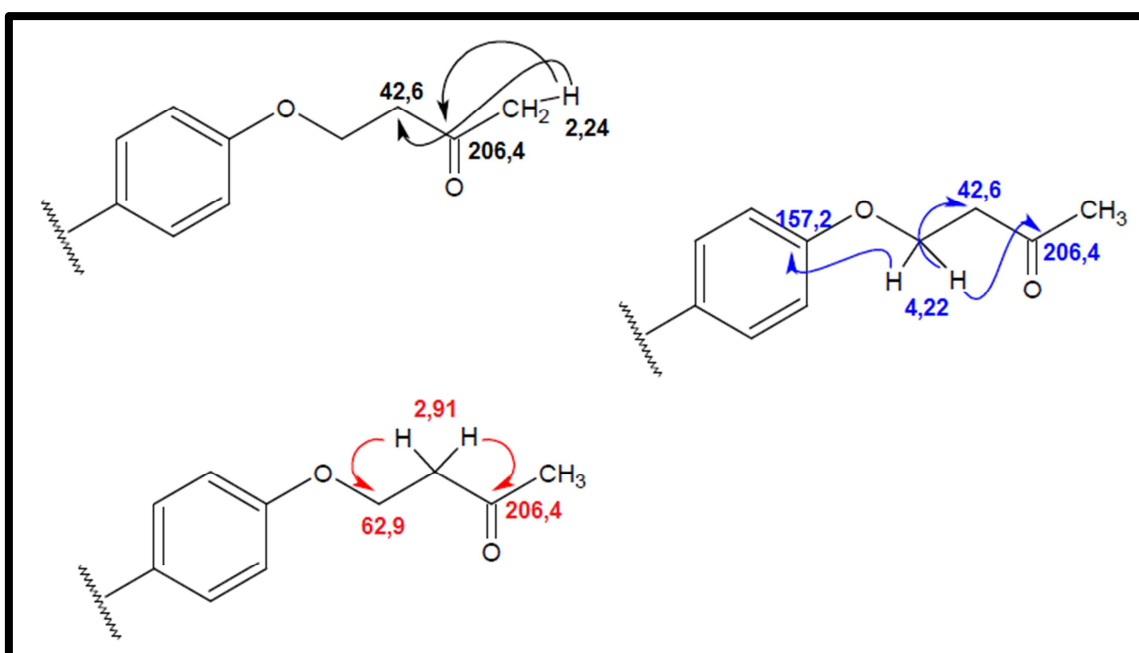


Figura 4.5 - Algumas correlações observadas no HMBC.

Desta forma a substância 2 tratava-se da amida N-{2-[4-(3-oxobutoxil)fenil]etil}benzamida que é inédita na literatura. Sua estrutura foi confirmada por CG-EM (FIGURA 4.13 e 4.14) em que foi observado o pico do íon molecular com  $m/z$  de 311 Daltons confirmando a massa desta substância

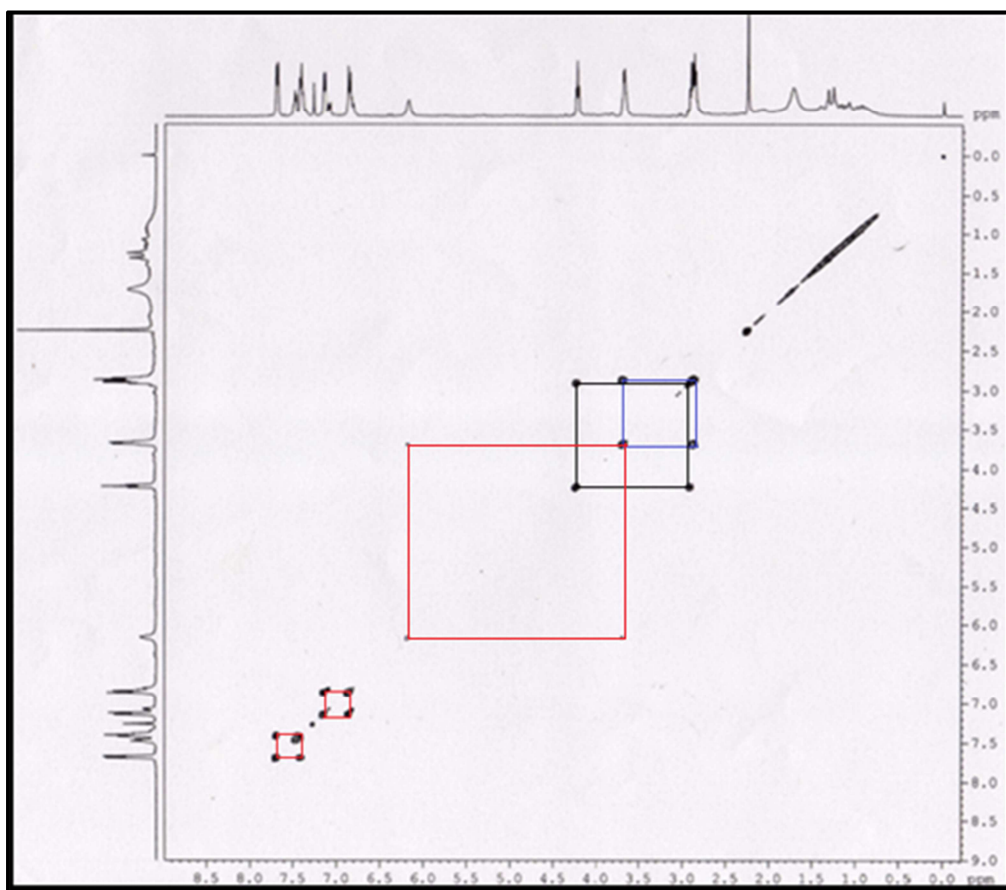


Figura 4.6 - Mapa de contorno de COSY da substância 2

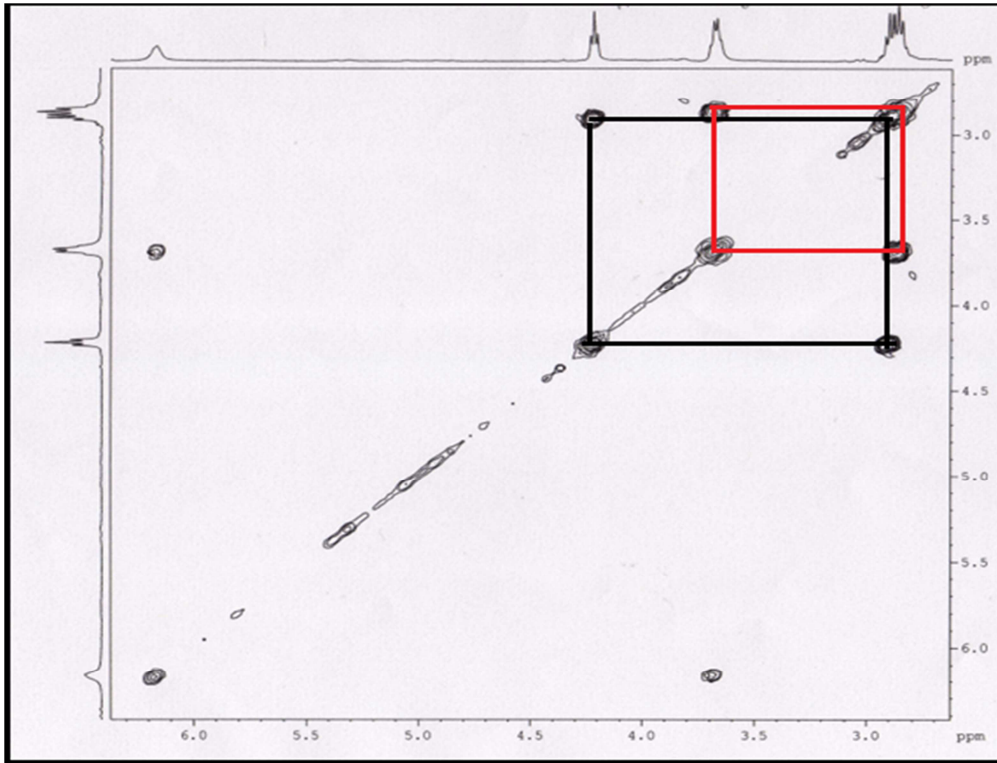


Figura 4.7 - Mapa de contorno de COSY da substância 2 ampliado na região de  $\delta$ 3,00 a  $\delta$ 6,00. "Spots" de correlação levemente deslocados.

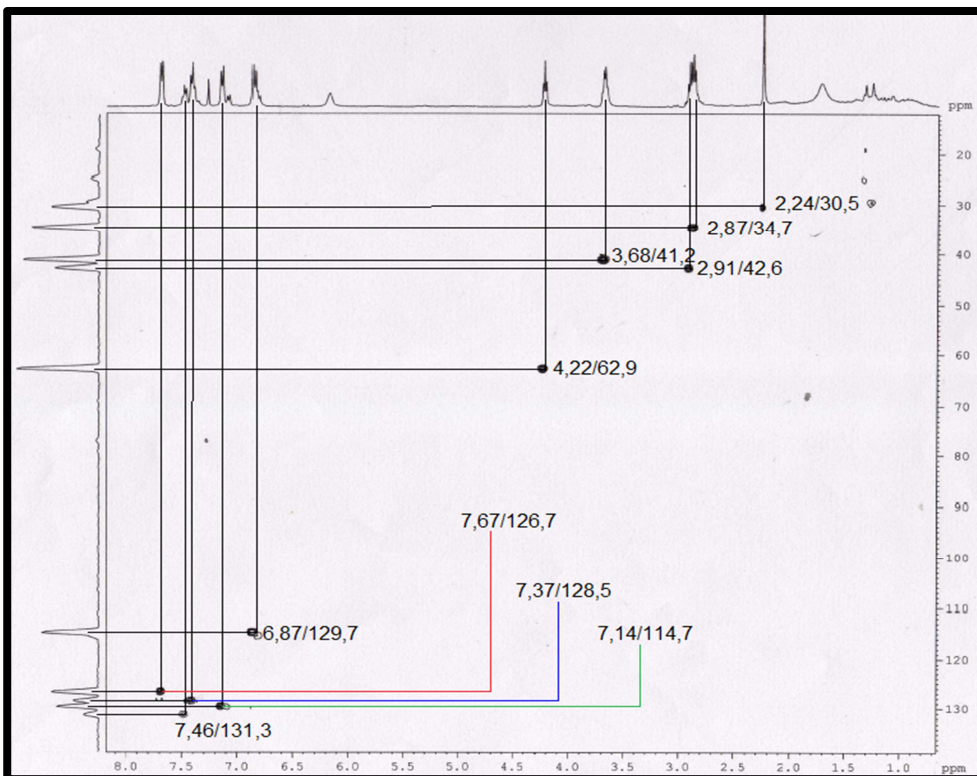


Figura 4.8 - Mapa de contorno de HSQC da substância 2

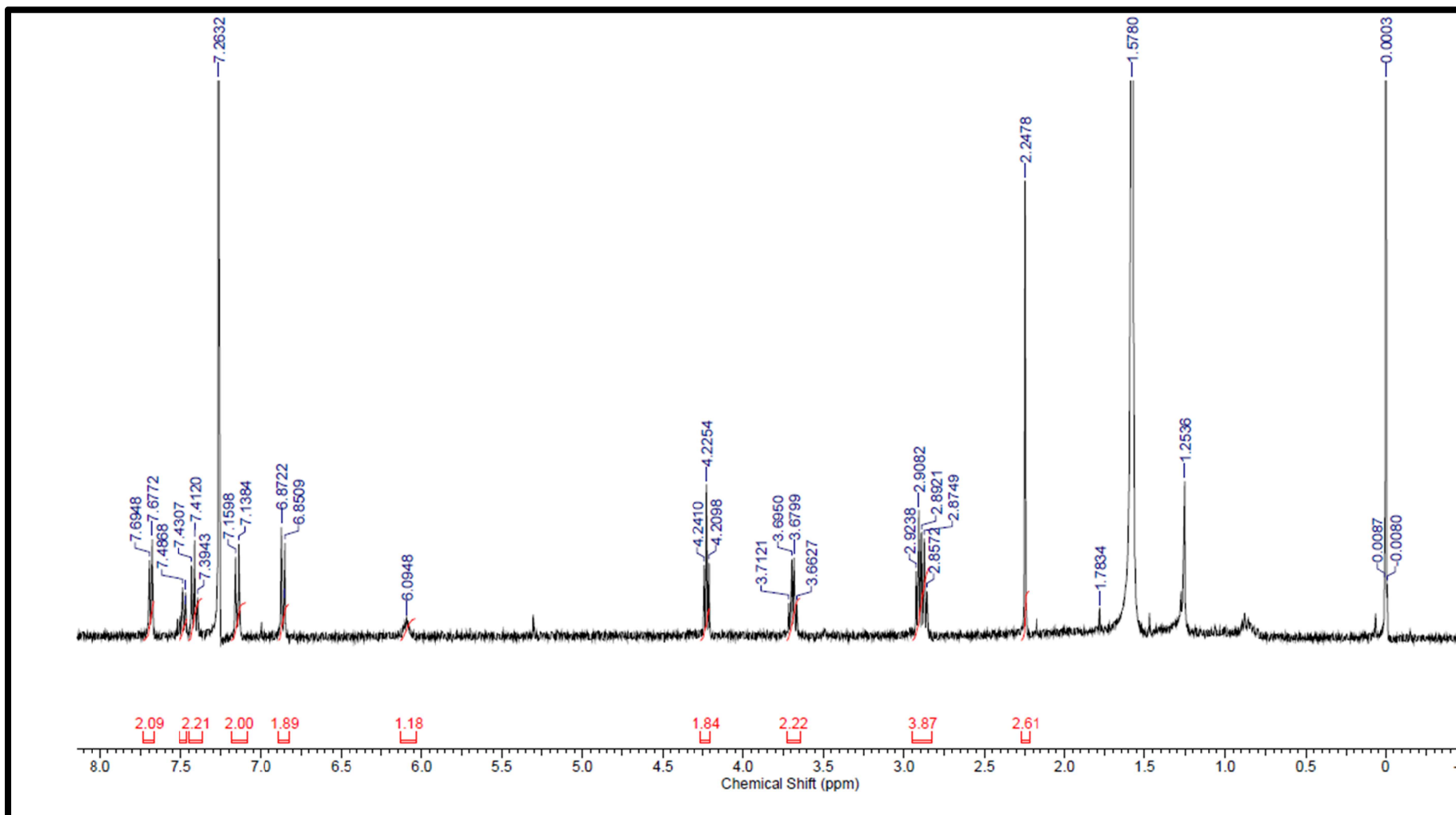


Figura 4. 9 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância 2 (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ .)

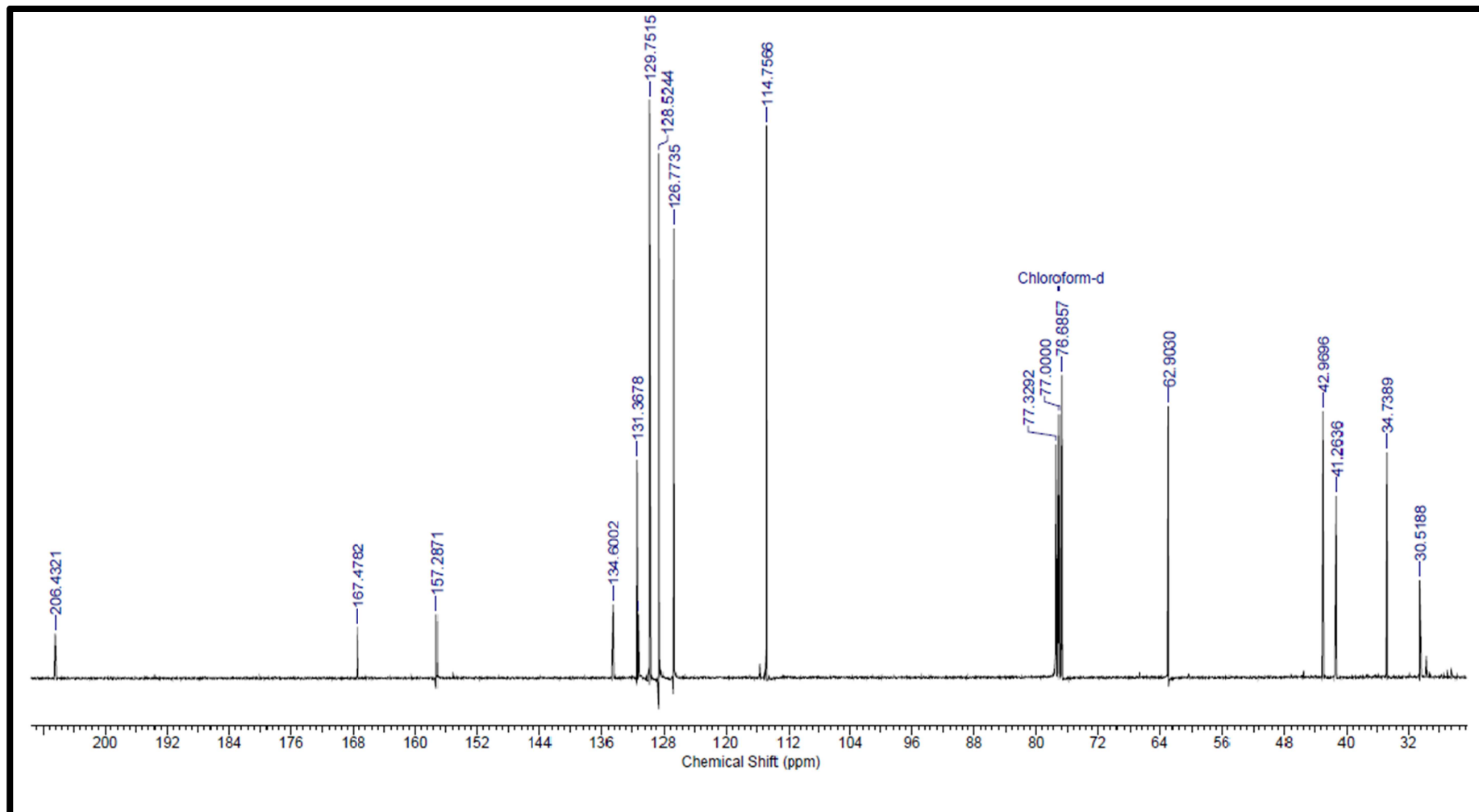


Figura 4. 10 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da substância 2 (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ .)



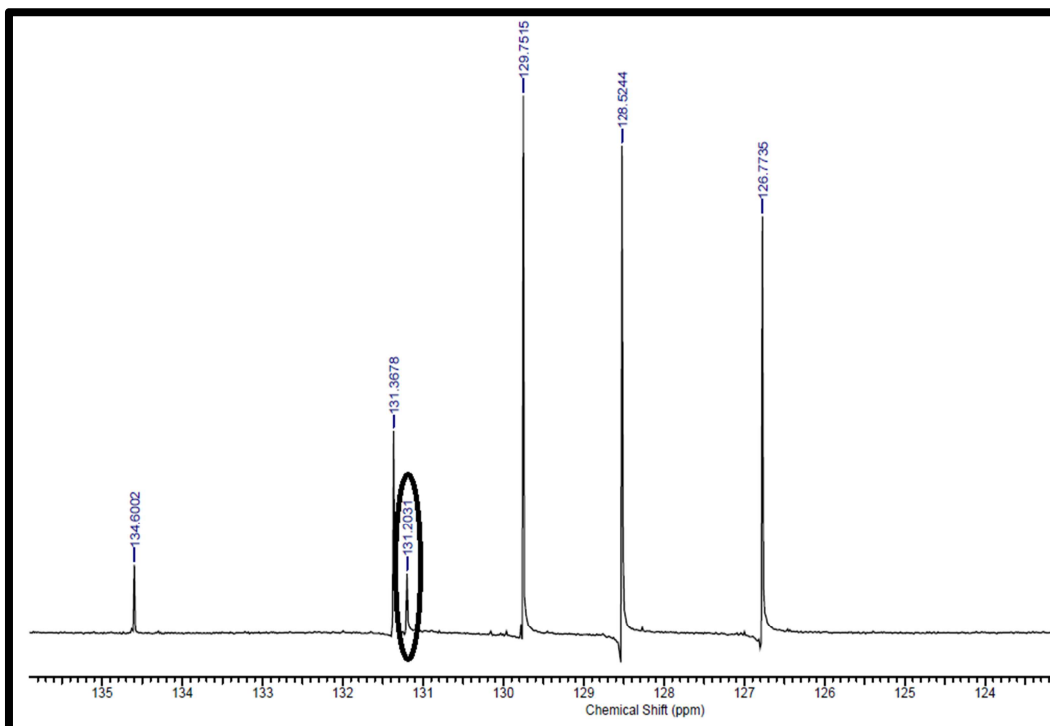


Figura 4. 11 - Ampliação da região  $\delta 120$  a  $\delta 130$  do espectro de RMN<sup>13</sup>C da substância

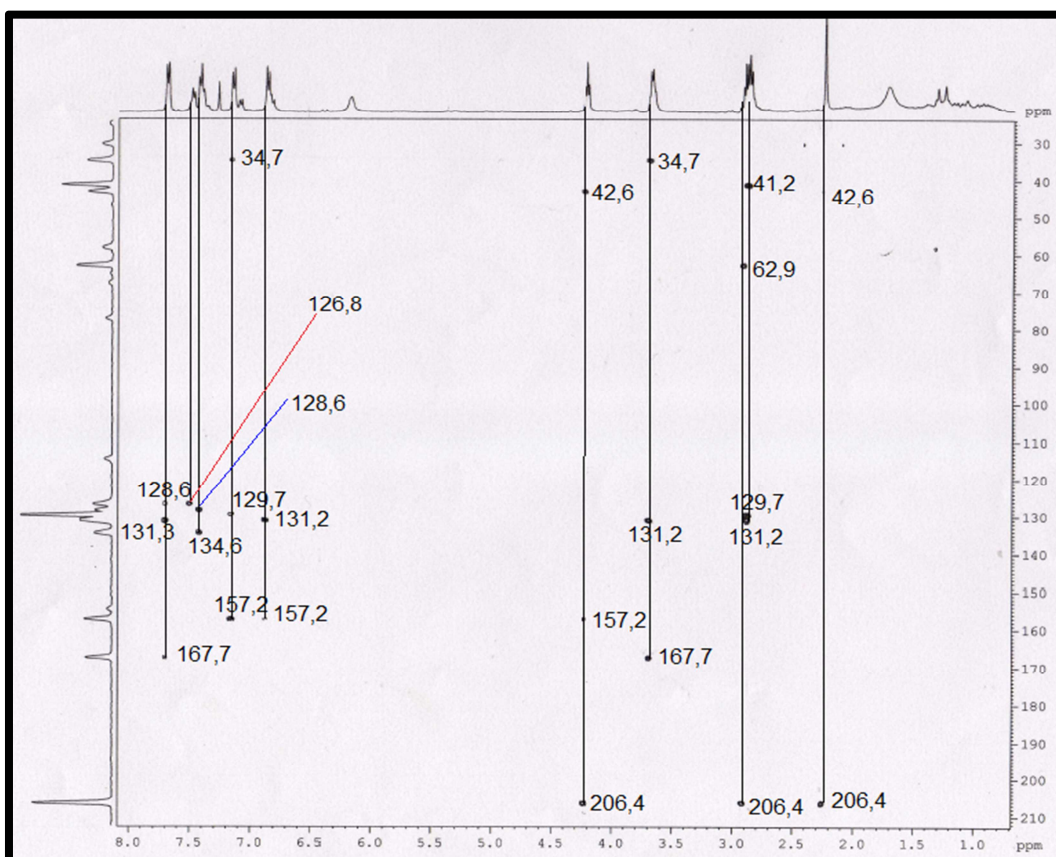


Figura 4.12 - Mapa de contorno de HMBC da substância 2

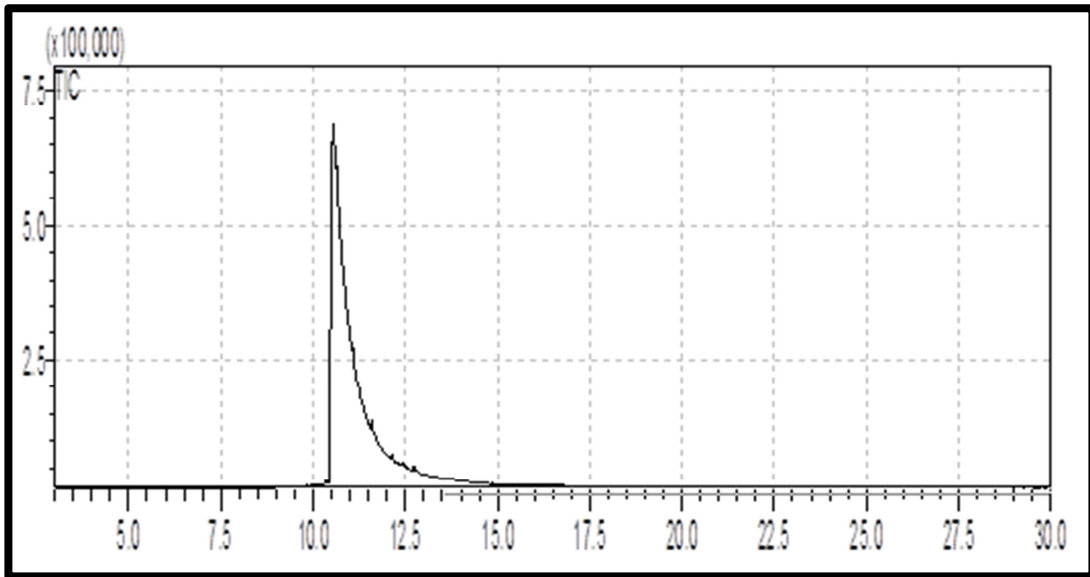


Figura 4.13 - - Cromatograma obtido em CG/EM da Substância 2. Mesmas condições utilizadas na substância 1.

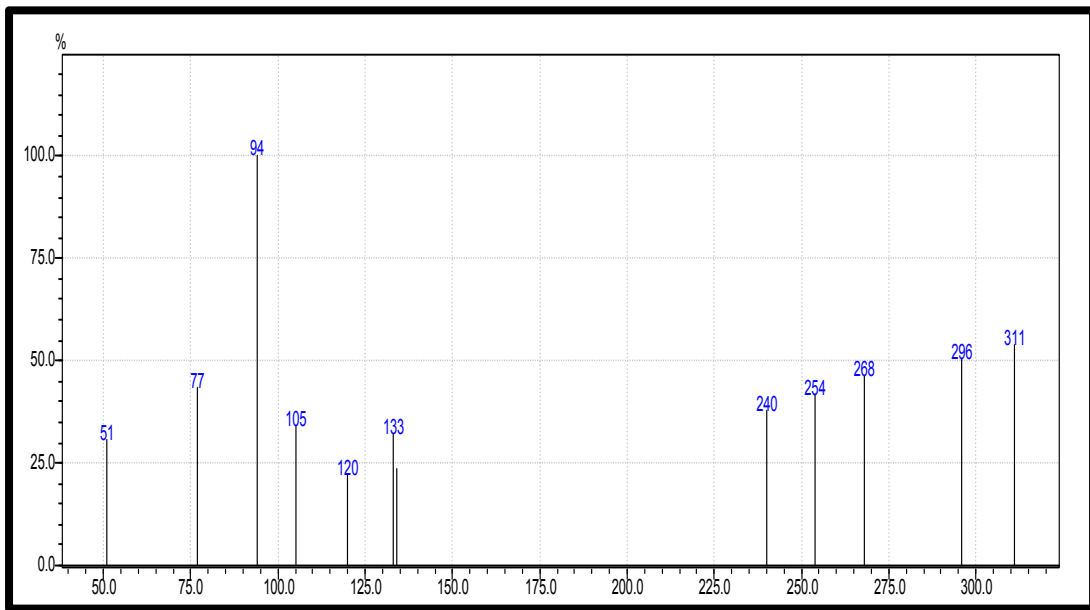
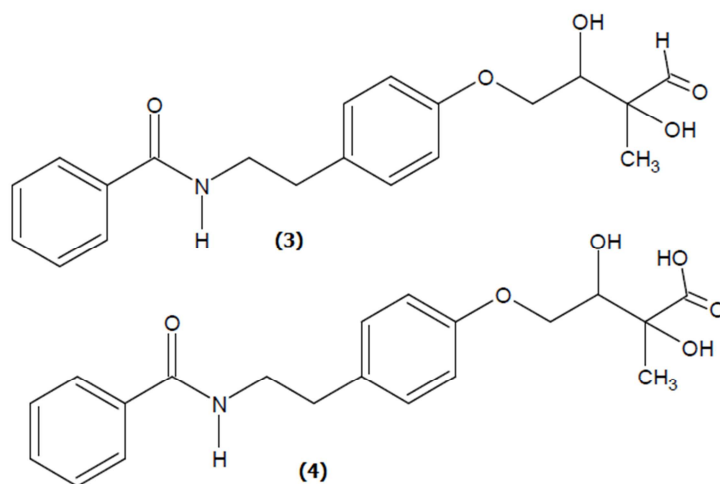


Figura 4.14 - Espectro de massas da Substância 2. Modo SIM de fragmentação, íons selecionados:  $m/z$  51, 77, 94, 105, 120, 133, 134, 240, 254, 268, 296 e 311.

Tabela 4. 2 - Dados de RMN<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C da N-{2-[4-(3-oxobutoxil)fenil]etil}benzamida e comparação com da N-benzoiltiramida da literatura.

N-{2-[4-(3-oxobutoxil)fenil]etil}benzamida (2), (CDCl <sub>3</sub> )			DOS SANTOS, 2005 N-benzoiltiramida, (CDCl <sub>3</sub> )		
H/C	$\delta_H$ (ppm), J(Hz), 400MHz	$\delta_C$ (ppm), 100MHz	H/C	$\delta_H$ (ppm), J(Hz), 400MHz	$\delta_C$ (ppm), 100MHz
1	-	157,2	1	-	154,2
2	7,14 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 8,5)	114,7	2	7,07 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 8,5)	115,3
3	6,87 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 8,5)	129,7	3	6,78 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 8,5)	129,7
4	-	131,2	4	-	130,0
5	6,87 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 8,5)	129,7	5	6,78 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 8,5)	129,7
6	7,14 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 8,5)	114,7	6	7,07 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 8,5)	115,3
7	2,87 ( <i>t</i> , <i>J</i> = 6,9)	34,7	7	2,85 ( <i>t</i> , <i>J</i> = 6,9)	34,7
8	3,68 ( <i>q</i> , <i>J</i> = 6,9)	41,2	8	3,67 ( <i>q</i> , <i>J</i> = 6,8)	41,2
9	-	167,7	9	-	167,5
1'	-	134,6	1'	-	134,3
2'	7,67 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 7,2)	126,7	2'	7,67 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 7,2)	127,3
3'	7,37 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 7,2)	128,5	3'	7,37 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 7,2)	128,2
4'	7,46 ( <i>m</i> )	131,3	4'	7,46 ( <i>m</i> )	131,3
5'	7,37 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 7,2)	128,5	5'	7,37 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 7,2)	128,2
6'	7,67 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 7,2)	126,7	6'	7,67 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 7,2)	127,3
1''	4,22 ( <i>t</i> , <i>J</i> = 6,3)	62,9			
2''	2,91 ( <i>t</i> , <i>J</i> = 6,3)	42,6			
3''	-	206,4			
4''	2,24 ( <i>s</i> )	30,5			
N-H	6,09 ( <i>sl</i> )	-	N-H	6,10 ( <i>sl</i> )	-

#### 4.1.1.1.3. Identificação das Substâncias 3 e 4



As substâncias 3 e 4 foram identificadas por CG-EM pelo modo SIM de ionização. Para a identificação dessas substâncias foi feita uma busca nas frações anteriores e posteriores da qual foi isolada a amida

inérita N-{2-[4-(3-oxobutoxil)fenil]etil}benzamida (2). Tais frações foram submetidas ao modo Scan de fragmentação no intuito de detectar os fragmentos comuns desse tipo de amida com núcleo N-benzoiltiramina que são os que estão listados no ESQUEMA 4.1 da substância 1. Desta maneira foi possível encontrar nas frações S3-3 e C1-20 fragmentos típicos das amidas, subsequentemente as frações foram submetidas novamente a análise via CG-EM no modo SIM de ionização, onde, para a substância 3 foram selecionados os seguintes íons:  $m/z$  51, 77, 120, 254, 311, 341, 356 e 357.

Na fração S3-3 foi detectado o íon molecular  $m/z$  357 (ESQUEMA 4.2) que confirmou a massa esperada para a amida 3 e o fragmento  $m/z$  356 [M-1] deu um indicativo de que se tratava da amida com função aldeído na cadeia lateral já que nas substâncias com esta função é comum perder hidrogênio radicalar resultando em um fragmento [M-1], (Silverstein *et al.*, 2005). A partir do fragmento  $m/z$  356 houve a perda de uma unidade de monóxido de carbono sendo evidenciada pelo pico  $m/z$  328 sendo também muito comum. Desta forma com base nesses fragmentos e nos outros foi proposta que a substância 3 tratava-se da amida N-{2-[4-(2,3-Diidróxi-3-metil-4-oxobutoxil)fenil]etil}benzamida.

Na fração C1-20 foi detectado o íon molecular  $m/z$  373 (ESQUEMA 4.3) que confirmou a massa esperada para a amida 4 os picos  $m/z$  90 e 284 foram formados através de um rearranjo de McLafferty e forneceu a base para propor que a substância 4 tratava-se do ácido 4-{4-[2-(benzoilamino)etil]fenoxil}-2,3-diidróxi-2-metilbutanóico.

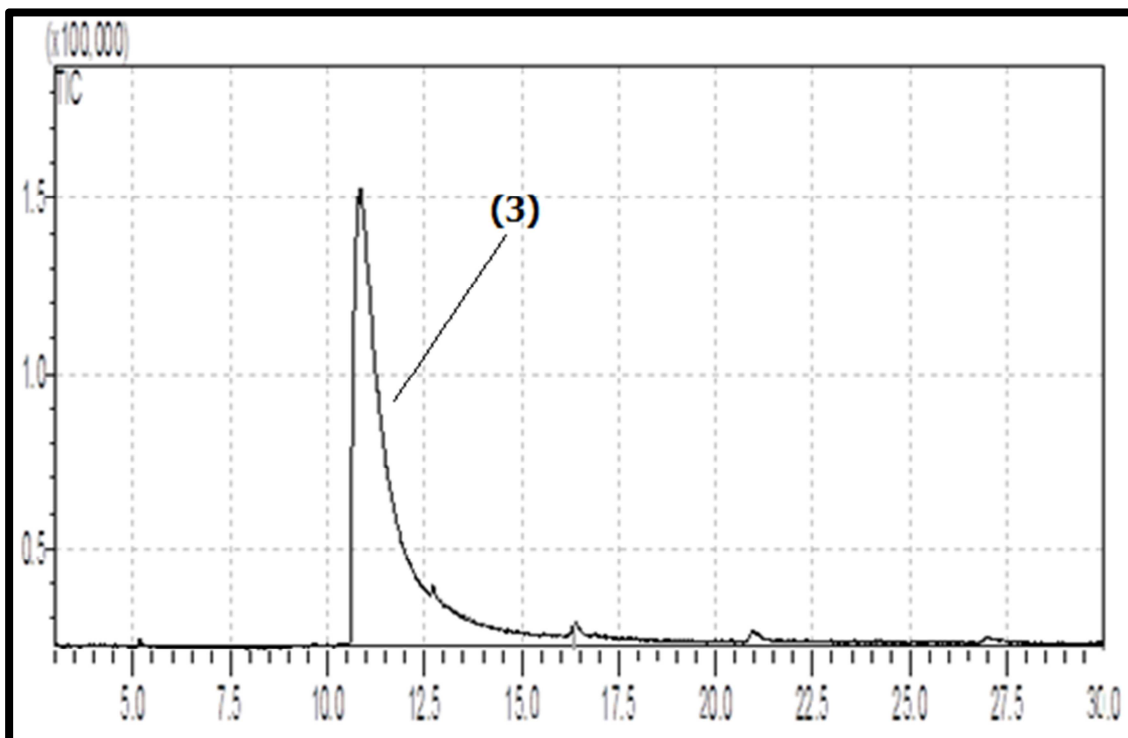


Figura 4.15 - Cromatograma obtido em CG/EM da Substância 3. Mesmas condições utilizadas na Substância 1.

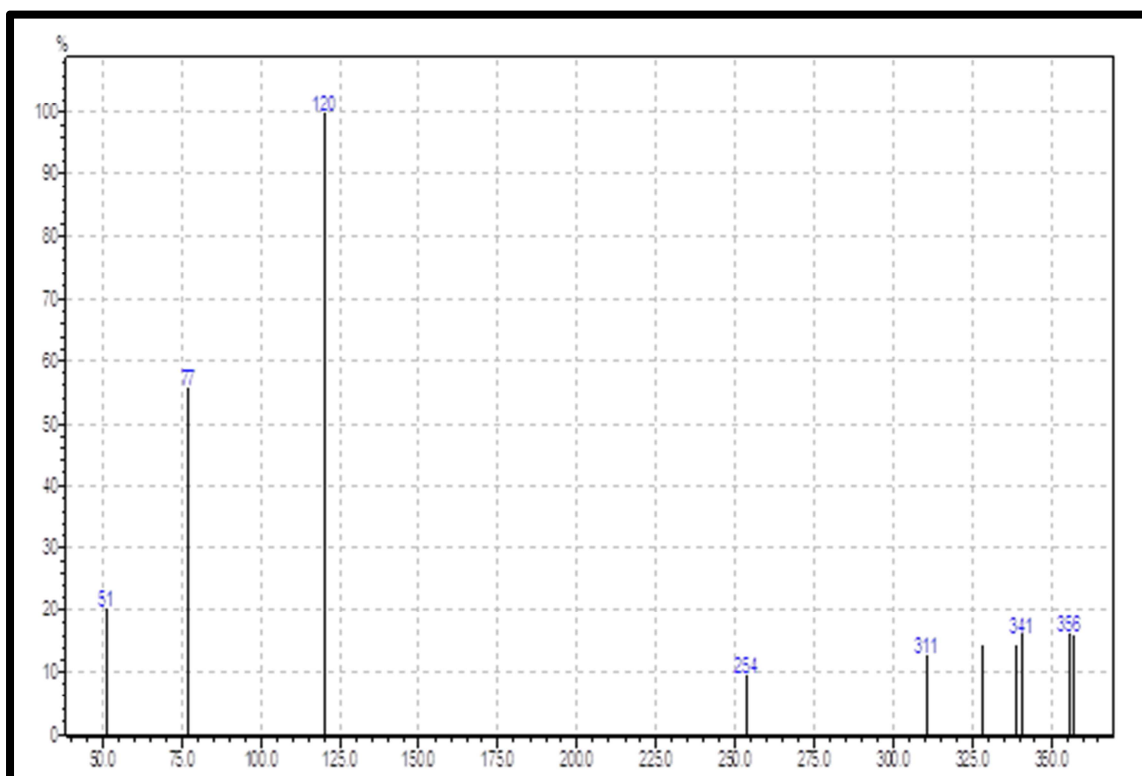
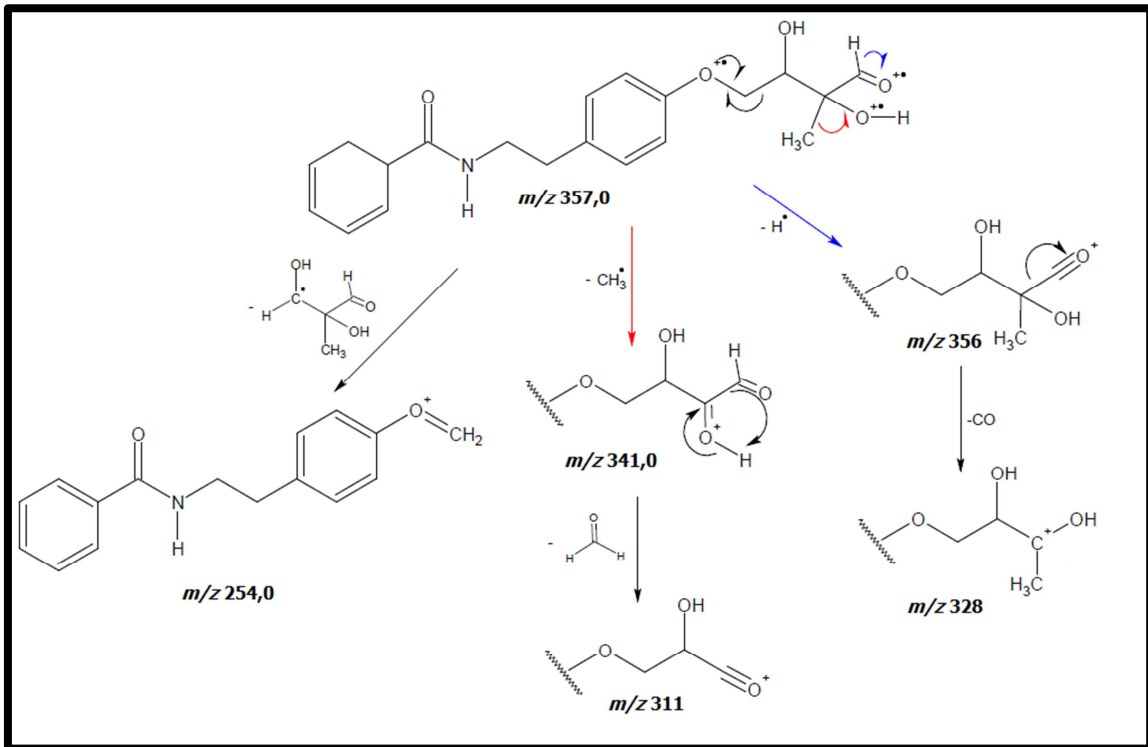


Figura 4.16 - Espectro de massas da substância 3. Modo SIM de fragmentação, íons selecionados:  $m/z$  51, 77, 120, 254, 328, 311, 341, 356 e 357.



Esquema 4.2 - Proposta de fragmentação da amida  $N\text{-}\{2\text{-}[4\text{-}(2,3\text{-Dihidroxi-3-metil-4-oxobutoxil})\text{fenil}]\text{etil}\}\text{benzamida}$ .

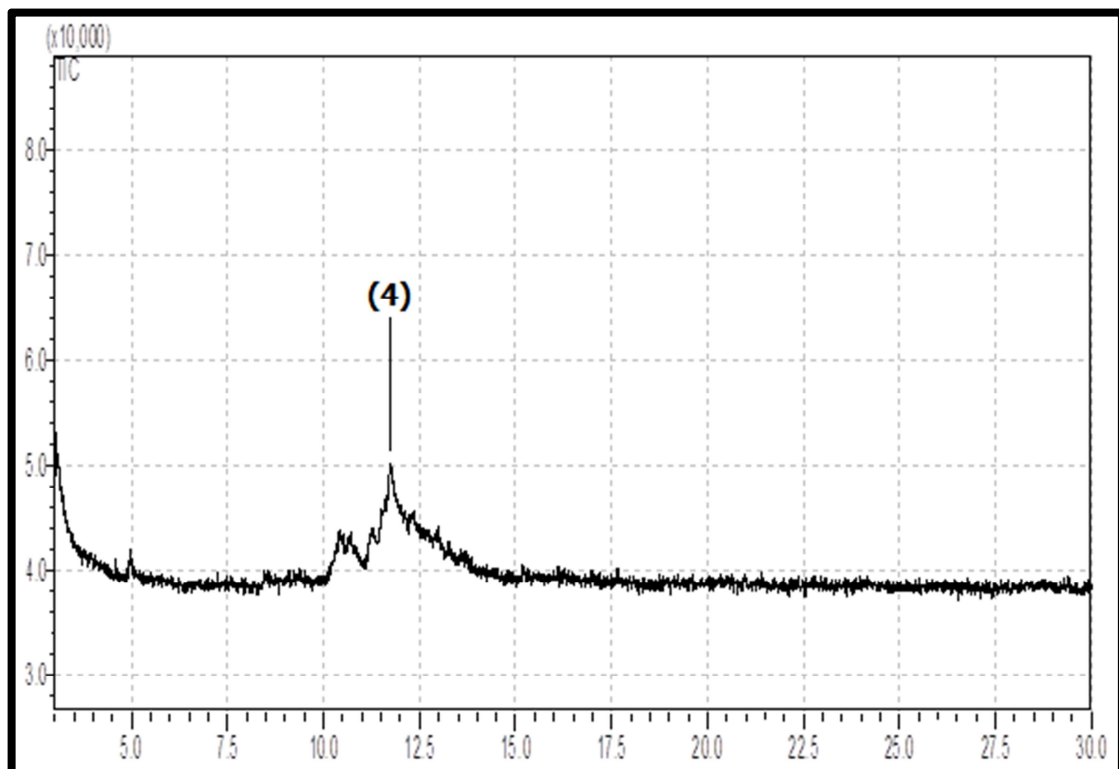


Figura 4. 17 - Cromatograma da Substância 4. Mesmas condições utilizadas na Substância 1.

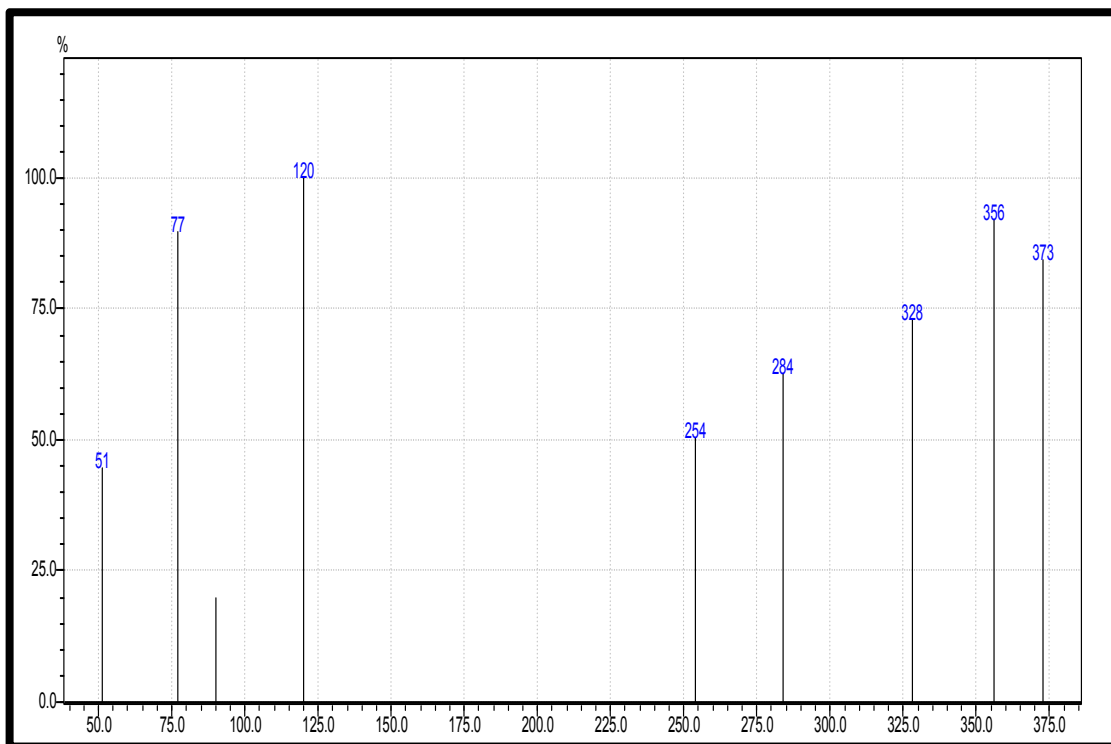
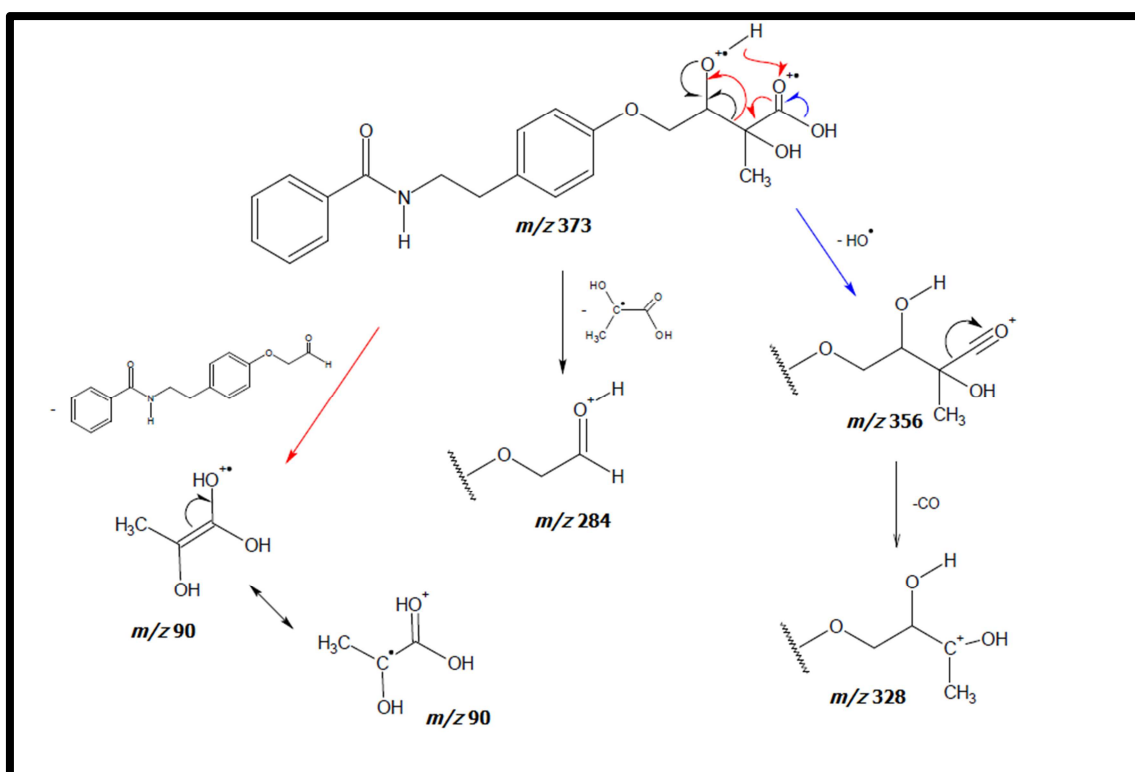


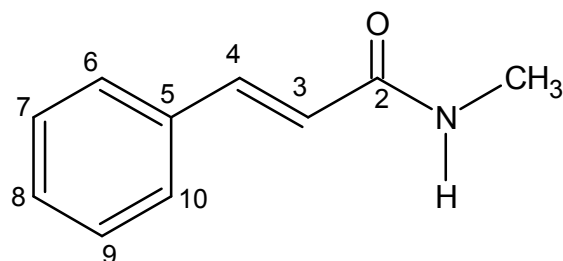
Figura 4.18 - Espectro de massas da Substância 4. Modo SIM de fragmentação, íons selecionados:  $m/z$  51, 77, 90, 120, 254, 284, 328, 356 e 373.



Esquema 4.3 - Proposta de fragmentação da amida Ác. 4-{4-[2-(benzoilamino)etil]fenoxil}-2,3-diidróxi-2-metilbutanóico.

#### 4.1.1.1.4. Identificação da Substância 5

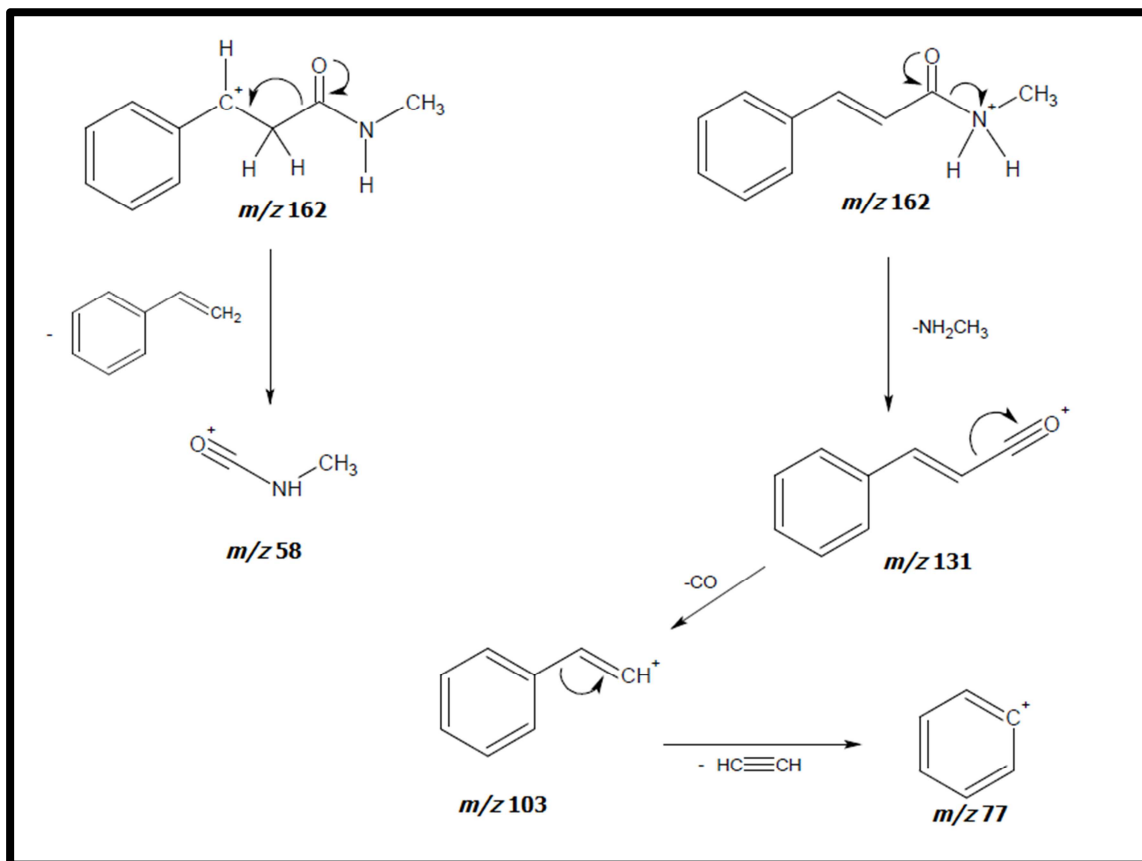
A substância 5 foi isolada como um sólido amorfo branco e teve sua estrutura elucidada através de espectro de RMN  $^1\text{H}$  e por EM.



No espectro de RMN $^1\text{H}$  (FIGURA 4.19) observou-se dois sinais  $\delta$  7,36 (3H, *m*) e  $\delta$  7,54 (2H, *dd*,  $J = 8,42$  e  $2,00\text{Hz}$ ), perfil típico de sistema aromático do tipo fenila com livre rotação, sendo estes sinais referentes aos H-7/8/9 e H-6/10, respectivamente. Os sinais H-7 a H-9 ( $\delta$  7,36) e H-6 e H-10 ( $\delta$  7,54) possuem os mesmos deslocamentos químicos devido ao mesmo ambiente químico deles que é resultado da livre rotação do anel aromático sendo assim, são considerados equivalentes.

Também se observou a presença de dois dubletos,  $\delta$  7,51 (1H, *d*,  $J = 16,0\text{Hz}$ ) e  $\delta$  6,57 (1H, *d*,  $J = 16,0\text{ Hz}$ ), referentes a hidrogênios olefínicos em relação *trans*, representando os H-4 e H-3, e ainda o grande deslocamento químico do H-4 revelou uma possível conjugação dessa ligação dupla da molécula indicando a presença de uma carbonila ou carboxila. Constatou-se também o sinal  $\delta$  2,84 (3H, *s*) referente a metila ligada a N ou a O. O espectro feito em  $\text{CDCl}_3$  revelou um singlete largo em  $\delta$  5,60 (1H, *s*) típico de hidrogênio ligado a N que não estava presente no espectro feito em metanol deuterado devido a troca de H ligado ao nitrogênio por D. Com esse dado do hidrogênio ligado ao N, foi proposto que a conjugação sofrida pela ligação dupla era com uma carboxila de amida e que a metila também estava ligada ao N, já que o singlete integrando para três hidrogênio no metanol deuterado estava se desdobrando em um dubleto,  $\delta$  2,95 (3H, *d*), no clorofórmio deuterado pelo mesmo motivo descrito acima, sendo assim o H metílico estava acoplado com o H ligado ao N. Desta maneira a substância proposta foi o (2E)-N-metil-fenilacrilamida. A estrutura foi confirmada por EM no modo positivo de ionização (FIGURA 4.21) onde foi observado o pico do íon molecular com  $m/z$  de 162  $[\text{M}+1]^+$  Daltons confirmando a massa da (2E)-N-Metil-fenilacrilamida que é de 161. Os fragmentos  $m/z = 58, 77, 103$  e  $131$  Daltons forneceram mais detalhes da estrutura, confirmando ser esta a amida (2E)-N-Metil-fenilacrilamida, como pode ser averiguado na proposta de fragmentação do ESQUEMA 4.4.





Esquema 4.4 - Proposta de fragmentação da amida N-Metil-fenilacrilamida.

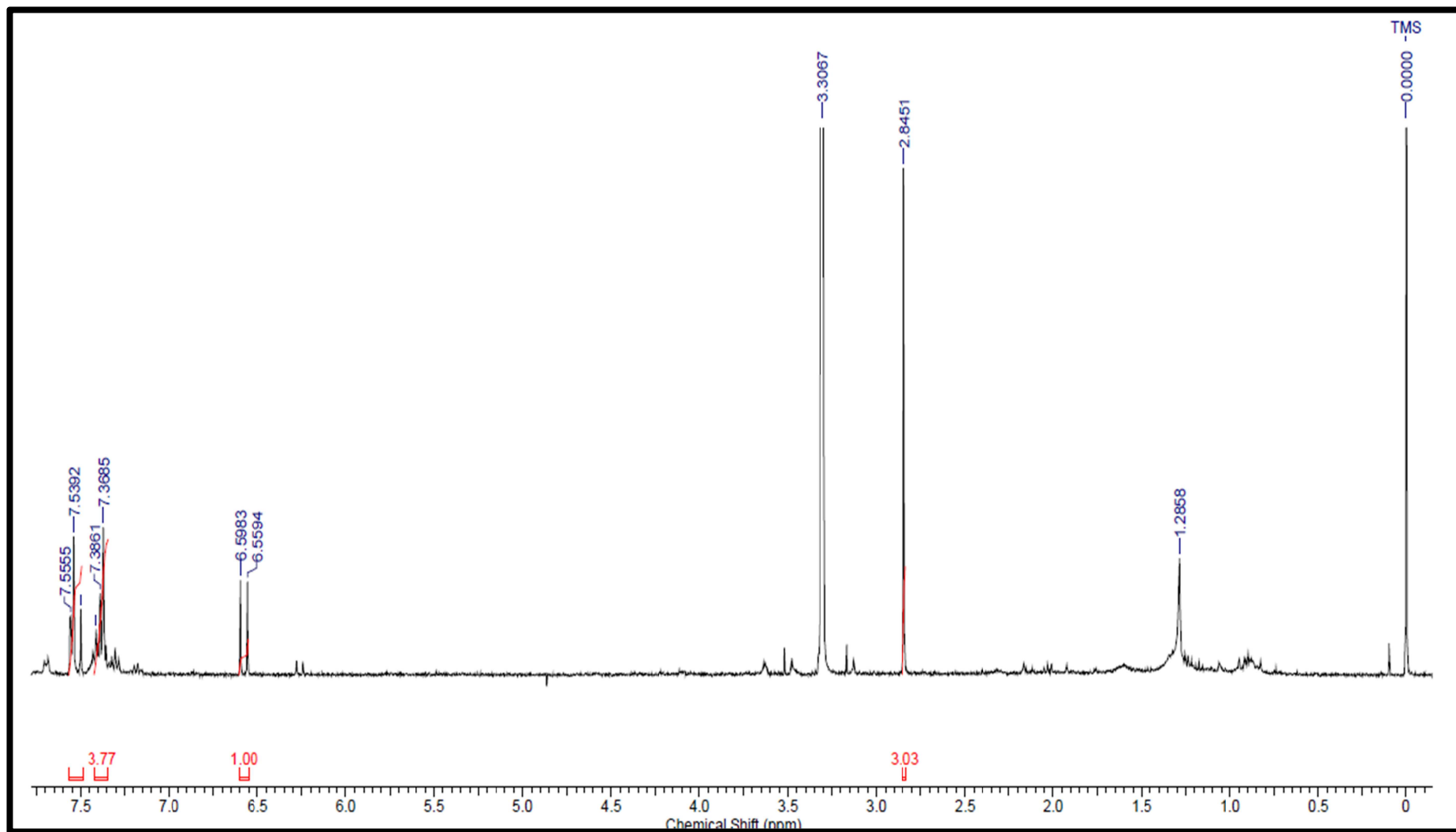


Figura 4. 19 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H da substância 5 (400MHz, CD<sub>3</sub>OD.)

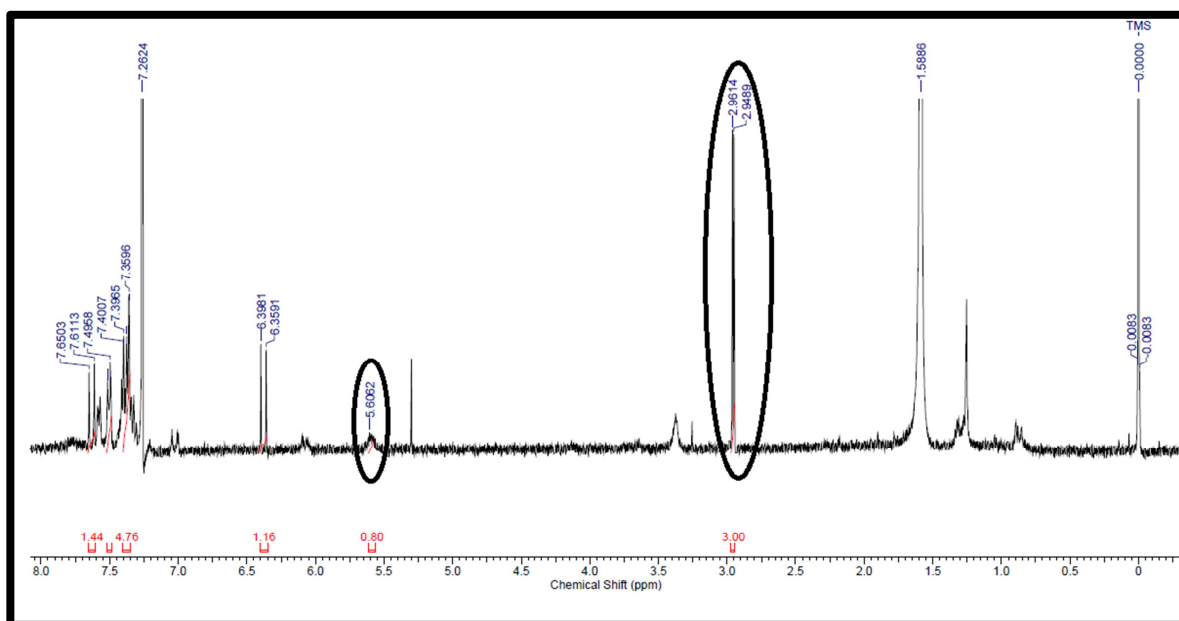


Figura 4.20 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância 5 (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ). Destaque para os sinais  $\delta$  5,60 (1H,s) e  $\delta$  2,95 (3H,d).

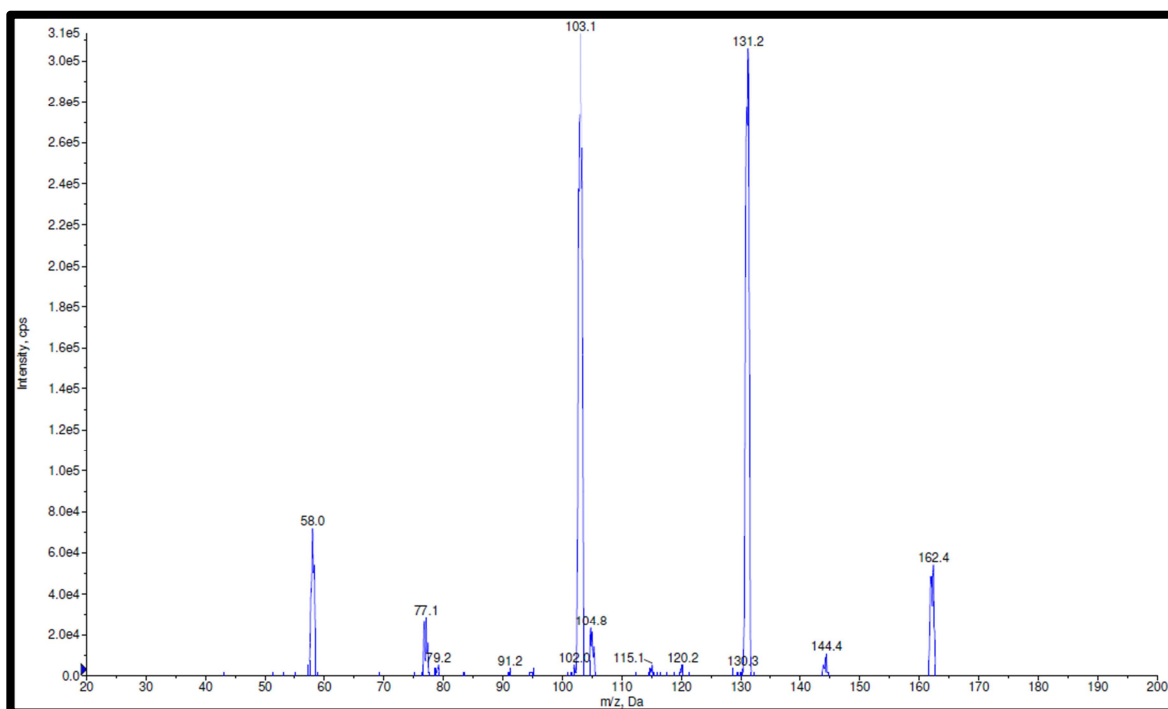
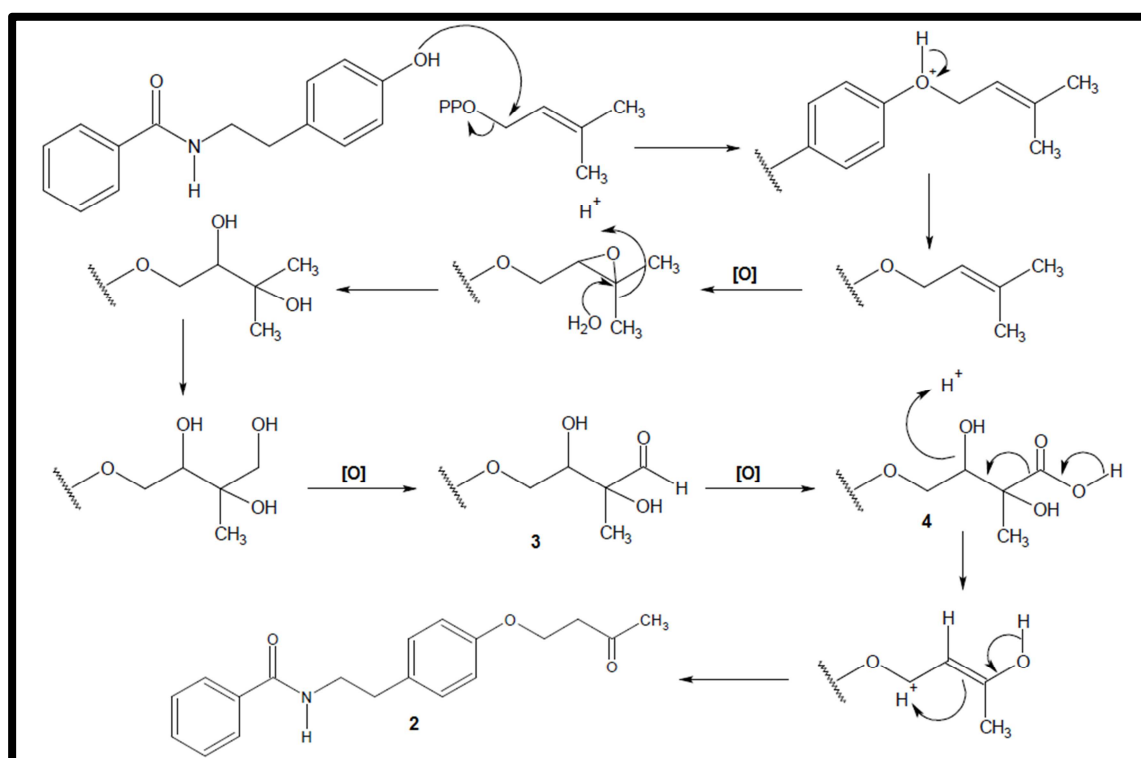


Figura 4.21 - Espectro de massas da Substância 5. Ionização eletrospray, modo positivo de ionização

#### 4.1.1.1.4.1. Proposta de biogênese da amida N-{2-[4-(3-Oxobutoxil)fenil]etil}benzamida

Segundo o levantamento bibliográficos (Weniger *et al.*, 2001; Dos Santos *et al.*, 2009; Purcaro *et al.*, 2009) das substâncias já isolados percebe-se a capacidade dessa espécie em prenilar seus metabolitos secundários onde já foi relatado alcaloides acridônicos prenilados, flavona prenilada, cumarinas preniladas e amidas geraniladas. Seguindo essa premissa e baseado nas amidas identificadas por CG-EM foi proposta a seguinte biogênese para a amida inédita N-{2-[4-(3-Oxobutoxil)fenil]etil}benzamida (ESQUEMA 4.5).



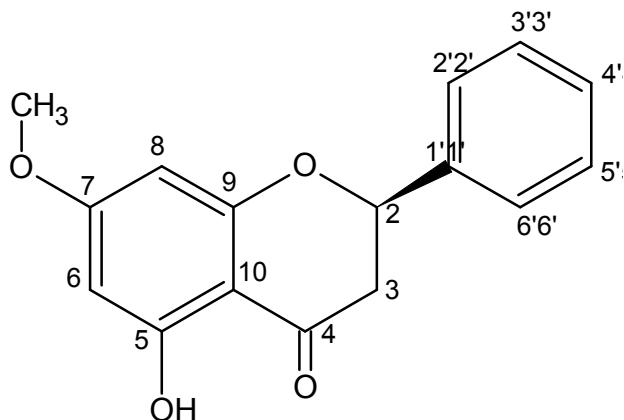
Esquema 4.5 - Proposta de biogênese da amida N-{2-[4-(3-Oxobutoxil)fenil]etil}benzamida (2).

De acordo com o esquema nota-se que houve uma O-prenilação que ocorreu via uma reação  $S_N2$ , onde o grupo abandonador difosfato foi eliminado da unidade dimetilalil pelo ataque do par de elétrons da hidroxila da amida N-benzoil-tiramina, perdendo um próton logo em seguida estabilizando o oxigênio que tinha uma carga positiva. Logo em seguida essa amida prenilada sofreu uma epoxidação por oxidação, o epóxido é aberto por uma molécula de água formando um diol. Na próxima etapa uma das metilas dessa amida sofre várias oxidações até formar um

ácido carboxílico, onde após todas essas etapas a molécula passa por uma descarboxilação oxidativa perdendo dióxido de carbono seguindo de perda de água. Por fim, através do equilíbrio ceto-enólico a amida é formada. Esta proposta foi confirmada com a detecção dos intermediários 3 e 4 nas frações do extrato em estudo via experimento de íon selecionado (SIM) em CG-EM.

#### 4.1.1.1.2. FLAVONONA

##### 4.1.1.1.2.1. Identificação da Substância 6



A substância 6 foi isolada como um sólido branco amorfo e teve sua estrutura elucidada através de espectro de RMN <sup>1</sup>H, por EM e por comparação com dados da literatura (VASCONCELOS *et al.*, 1998).

Ao se analisar o espectro de RMN <sup>1</sup>H (FIGURA 4.22, 4.23 e 4.24) foi constatado um multiplete na região de  $\delta$  7,49 a 7,46 (5H, *m*) típico de sistema aromático monossustituído com livre rotação, sendo este sinal referentes aos H-2' a H-6'. Foram constatados também dois sinais  $\delta$  6,09 (1H, *d*,  $J = 2,28\text{Hz}$ ) e  $\delta$  6,07 (1H, *d*,  $J = 2,28\text{Hz}$ ) com  $J$  característicos de acoplamento meta referentes aos H-6 e H-8, respectivamente, caracterizando um padrão de substituição do anel A, indicando que as posições C-5 e C-7 estão com substituintes. Estes substituintes foram atribuídos através do sinal  $\delta$  12,02 (1H, *s*) que é característico de hidrogênio de hidroxila quelatogênica em C-5, e pelo sinal  $\delta$  3,81 (3H, *s*) que é típico de metoxila, estando ligada ao C-7.

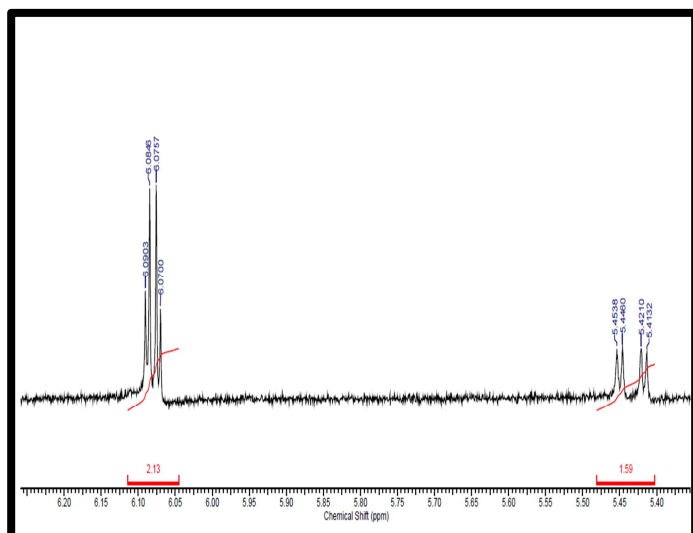


Figura 4.22 - Ampliação da região  $\delta$  5,0 a 6,0 do espectro de RMN <sup>1</sup>H da substância 6.

Os sinais em  $\delta$  5,43 (1H, *dd*,  $J= 13,32$  e  $3,12\text{Hz}$ ),  $\delta$  3,11 (1H, *dd*,  $J= 17,28$  e  $13,32\text{Hz}$ ) e  $\delta$  2,83 (1H, *dd*,  $J= 17,28$  e  $3,12\text{Hz}$ ) são característicos de anel C de flavanona, pois o alto valor de  $J$  indica um acoplamento do tipo pseudo axial-axial dos hidrogênios axiais H-2 e H-3 ax., e o  $J$  pequeno de acoplamento pseudo axial equatorial do H-2 com o H-3 eq., conforme o exemplo abaixo:

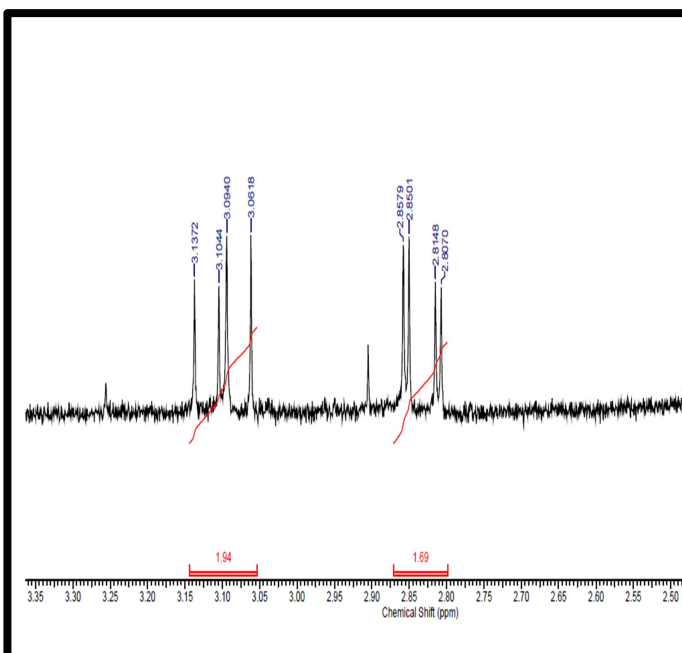
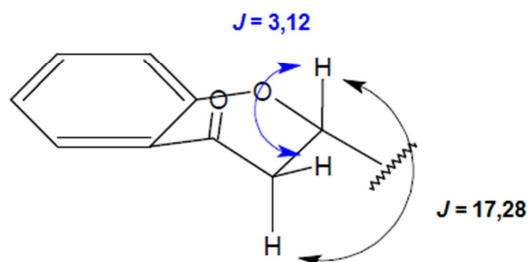


Figura 4.23 - Ampliação da região  $\delta$  2,0 a 3,0 do espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância 6.



Sendo assim, os sinais supracitados foram atribuídos respectivamente aos hidrogênios H-2, H-3 $\alpha$  e H-3 $\beta$  do anel C do flavonoide, caracterizando a flavonova Pinostrobin. Os deslocamentos químicos de hidrogênios dos anéis A e C foram comparados a flavonova 5,7-Diidroxi-4'-metoxiflavanona da literatura (VASCONCELOS *et al.*, 1998). A estrutura foi confirmada por EM no modo positivo de ionização (FIGURA 4.25) onde foi observado o pico do íon molecular com  $m/z$  de 271  $[\text{M}+1]^+$  Daltons confirmando a massa da Pinostrobin que é de 270. Os fragmentos  $m/z = 103$ , 131 e 167 Daltons forneceram mais detalhes da estrutura, confirmando ser esta a flavonova Pinostrobin, como pode ser averiguado na proposta de fragmentação da ESQUEMA 4.6

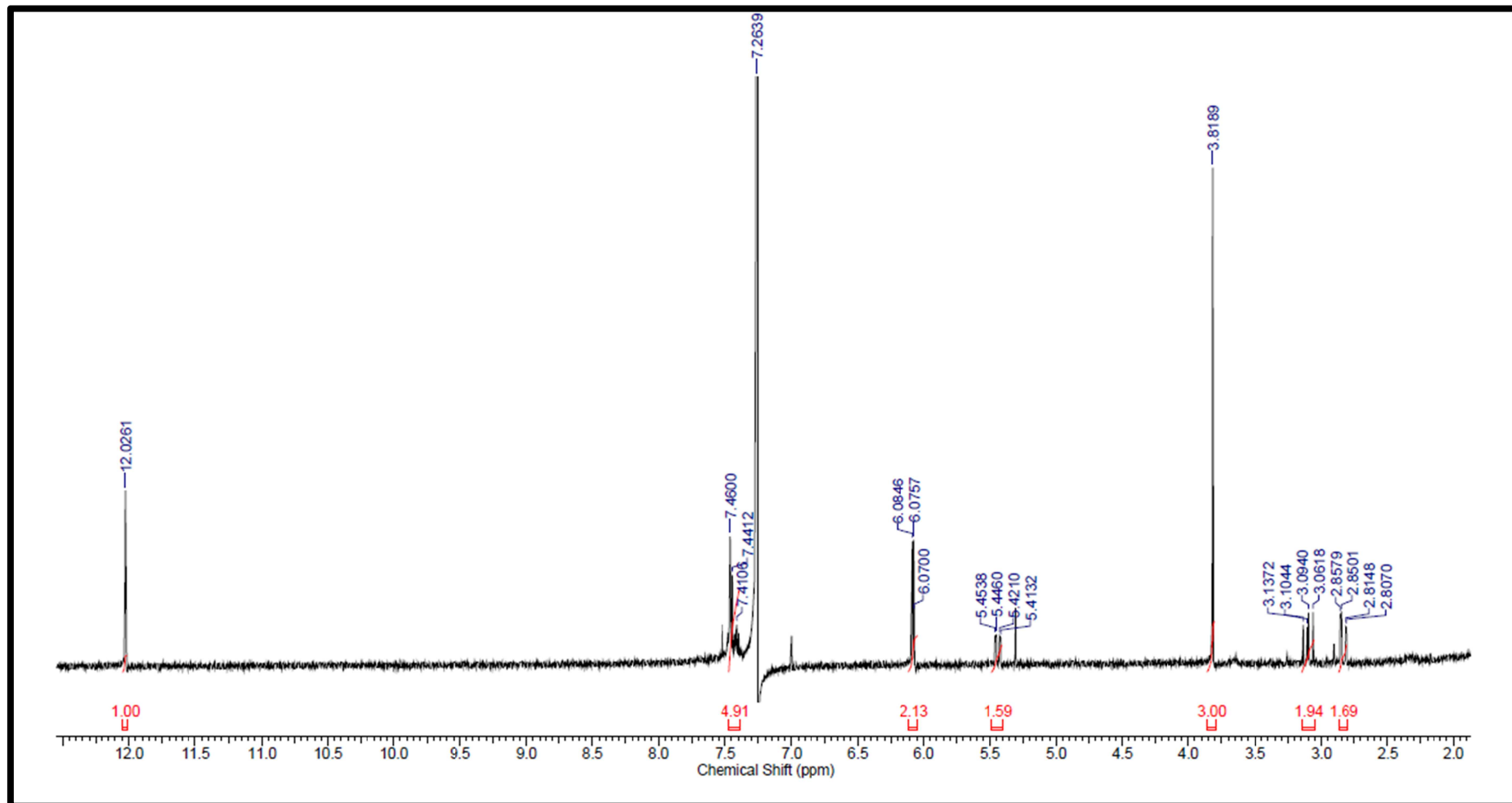


Figura 4.24 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância 6 (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ .)



Tabela 4.3 - Dados de RMN<sup>1</sup>H da Pinostrobinina e comparação com a 5,7-Diidroxi-4'-metoxiflavanona da literatura

Pinostrobinina ( <b>06</b> ) (400MHz, CDCl <sub>3</sub> )		5,7-Diidroxi-4'-metoxiflavanona (300MHz, CDCl <sub>3</sub> ) VASCONCELOS,1998	
H	δ(ppm), J(Hz)	H	δ(ppm), J(Hz)
<b>2</b>	5,43 ( <i>dd</i> , <i>J</i> =13,3; 3,12)	<b>2</b>	5,36 ( <i>dd</i> , <i>J</i> =13,0; 3,1)
<b>3α</b>	3,11 ( <i>dd</i> , <i>J</i> =17,2; 13,3)	<b>3α</b>	3,10 ( <i>dd</i> , <i>J</i> =17,2; 13,5)
<b>3β</b>	2,83 ( <i>dd</i> , <i>J</i> =17,2; 3,12)	<b>3β</b>	2,79 ( <i>dd</i> , <i>J</i> =17,2; 3,5)
<b>6</b>	6,09 ( <i>d</i> , <i>J</i> =2,28)	<b>6</b>	6,00 ( <i>d</i> , <i>J</i> =2,3)
<b>8</b>	6,07 ( <i>d</i> , <i>J</i> =2,48)	<b>8</b>	5,98 ( <i>d</i> , <i>J</i> =2,3)
<b>2'</b>	7,49-7,46 ( <i>m</i> )	<b>2'</b>	7,38 ( <i>d</i> , <i>J</i> =8,7)
<b>3'</b>	7,49-7,46 ( <i>m</i> )	<b>3'</b>	6,95 ( <i>d</i> , <i>J</i> =8,7)
<b>4'</b>	7,49-7,46 ( <i>m</i> )	<b>4'</b>	-
<b>5'</b>	7,49-7,46 ( <i>m</i> )	<b>5'</b>	6,95 ( <i>d</i> , <i>J</i> =8,7)
<b>6'</b>	7,49-7,46 ( <i>m</i> )	<b>6'</b>	7,38 ( <i>d</i> , <i>J</i> =8,7)
<b>OMe</b>	3,81( <i>s</i> )	<b>OMe</b>	3,84 ( <i>s</i> )
<b>OH</b>	12,0 ( <i>s</i> )	<b>OH</b>	12,1 ( <i>s</i> )

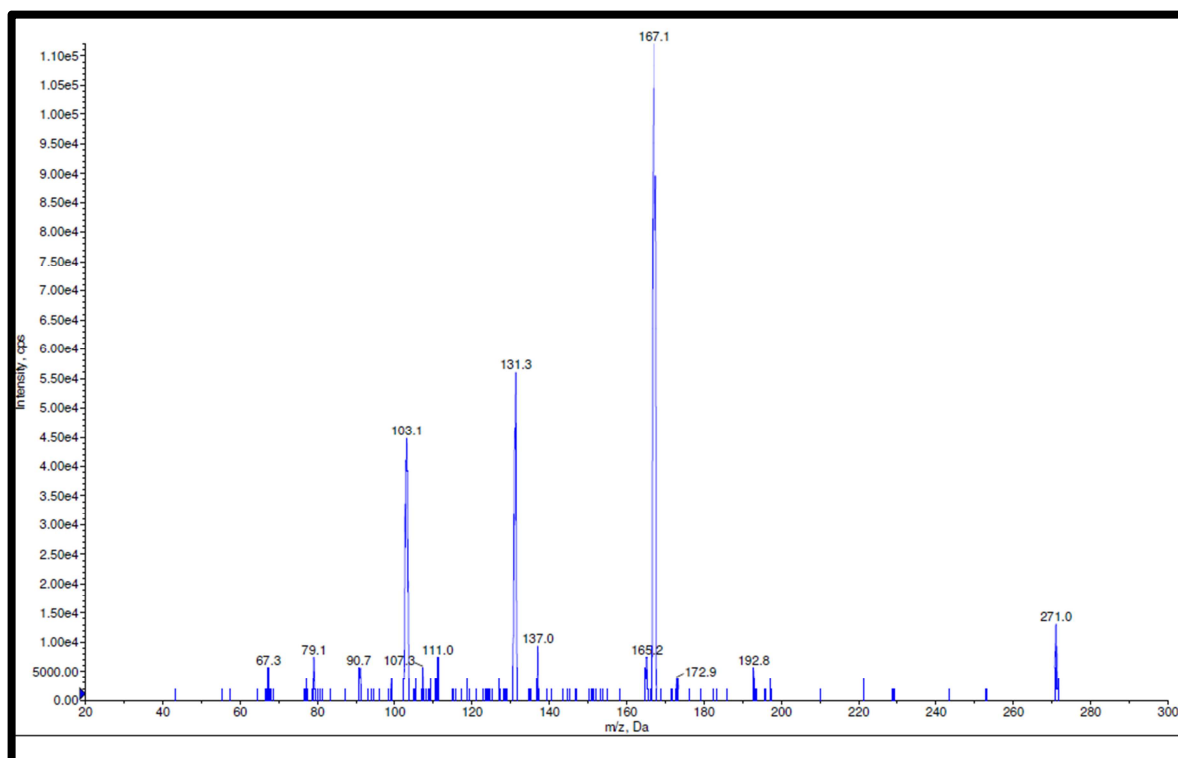
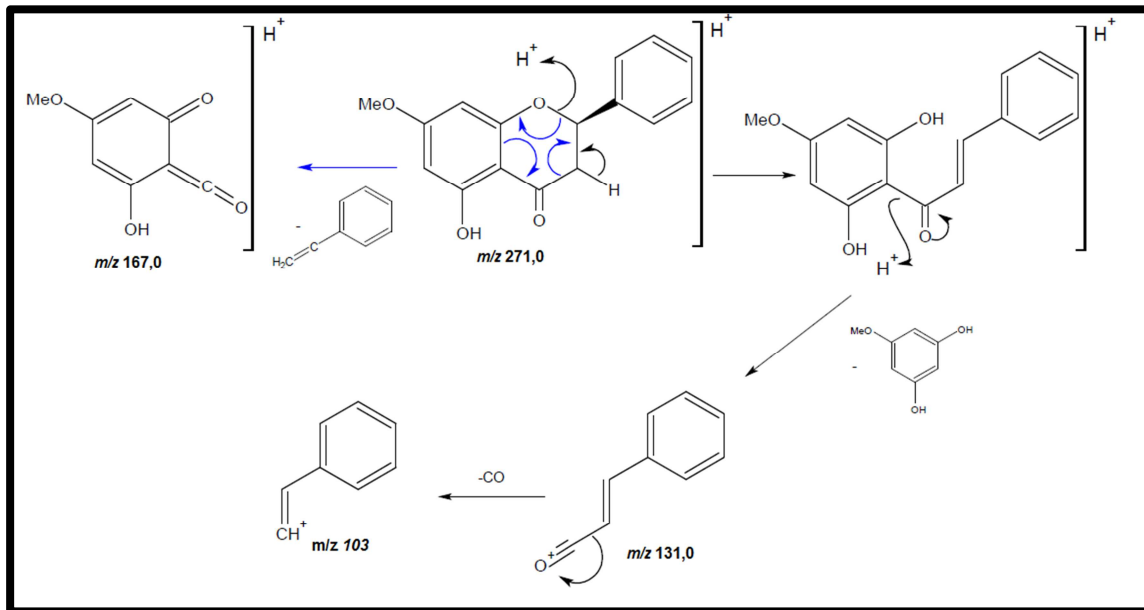


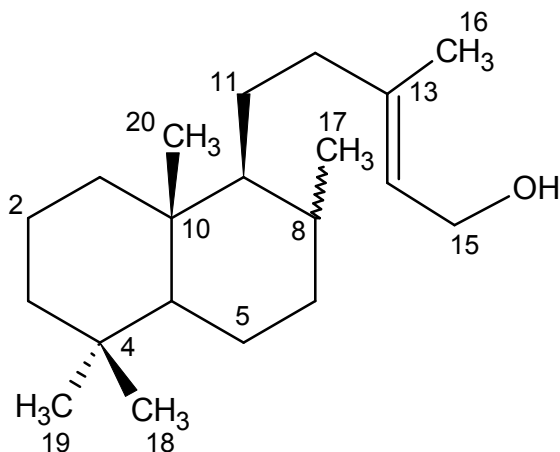
Figura 4.25 - Espectro de massas da Substância 7. Ionização por *eletrospray* modo positivo de ionização.



Esquema 4. 6 - Proposta de fragmentação da flavonona Pinostrobin.

### 4.1.1.1.3. DITERPENO

#### 4.1.1.1.3.1. Identificação da Substância 7



A substância 7 foi isolada como um óleo amarelo claro e teve sua estrutura elucidada através de espectro de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , COSY, HSQC, HMBC e por comparação com a literatura (PACHECO *et al.*, 2009). O Seu espectro de RMN  $^1\text{H}$  (FIGURA 4.28) apresentou sinais característicos de diterpeno do tipo labdano. Foram observados três

singletos integrando para três hidrogênios em  $\delta$  0,87;  $\delta$  0,86;  $\delta$  0,85, referentes a metilas ligadas a carbono quaternário, um dubleto integrando para três hidrogênios em  $\delta$  0,84 (3H, *d*,  $J=2,6$ ) típico de metila ligada a carbono terciário e um singlete em  $\delta$  1,66 característico de metilas ligada a carbono olefínico, essas cinco metilas e o perfil do espectro de RMN $^1\text{H}$  sugerem a substância 8 tratar-se de um diterpeno. Na região de hidrogênios olefínicos também foi observado um tripleto largo  $\delta$  5,40 (1H, *tl*,  $J=5,8$ ) que representa o H-14 e um dubleto em  $\delta$  4,14 (2H, *d*,  $J=7,0$ ) típico de hidrogênio oximetilênico representando o H-15.

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (FIGURA 4.29 – 4.32) foram observados 20 sinais de carbono o que confirma a substancia sendo um diterpeno e pelo dubleto integrando para três em  $\delta$  0,84 trata-se de um diterpeno do tipo labdano. O sinal em  $\delta$  59,2 confirmou a presença do carbono ligado ao oxigênio e os sinais em  $\delta$  140,0 e  $\delta$  123,0 a presença de carbonos olefínicos.

Pelo espectro de COSY (FIGURA 4.27) foi observado o sinal  $\delta$  5,40 correlacionando com  $\delta$  4,14 confirmando que o hidrogênio oximetilênico está vizinho do hidrogênio olefínico. Também são observados no COSY os sinais  $\delta$  5,40 e  $\delta$  4,14 correlacionando o sinal  $\delta$  1,66 referente à metila ligada ao carbono olefínico e a uma tripleto em  $\delta$  1,89 (2H) . Na região menos congestionada do espectro de HSQC (FIGURA 4.33) foi possível associar alguns hidrogênios para os carbonos Tabela 4.9. No HMBC (FIGURA 4.35 e 4.36) foi possível associar os carbonos restantes com o esqueleto do diterpeno podendo ser observado na TABELA 4.4, contudo os

sinais  $\delta$  37,2;  $\delta$  37,3;  $\delta$  36,6;  $\delta$  32,6;  $\delta$  24,7;  $\delta$  24,4;  $\delta$  22,5;  $\delta$  19,6 não tiveram suas posições atribuídas na estrutura devido ao grande congestionamento observado tanto nos espectros de HSQC e HMBC. Baseado na comparação da cadeia lateral do diterpeno clerodano (5R, 8R, 9S, 10R)-*ent*-Clerod-3,13-dien-15-ol[ $\Delta^{13,14}$ -kolavenol] foi proposto a identidade do diterpeno como sendo o (2E)-2-Metil-[2,5,5,8a-tetrametildecadronaftalen-1-il]but-2-en-1-ol, onde já foi encontrado na espécie *Cistus labdaniferus* (PALDUGIN, 1981)

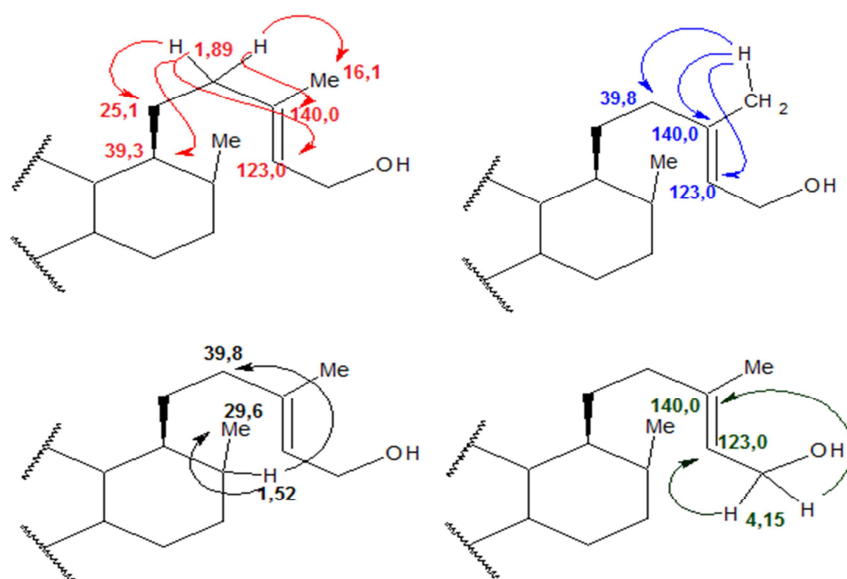


Figura 4.26 - Correlações observadas no HMBC da substância 7.

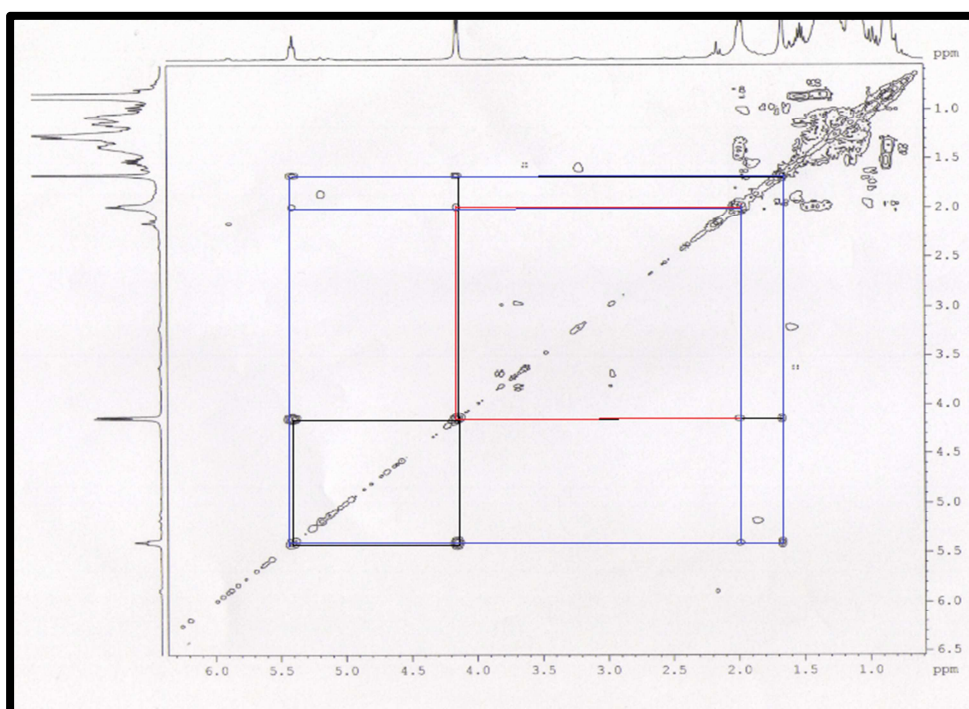


Figura 4.27 - Mapa de contorno de COSY da substância 7.

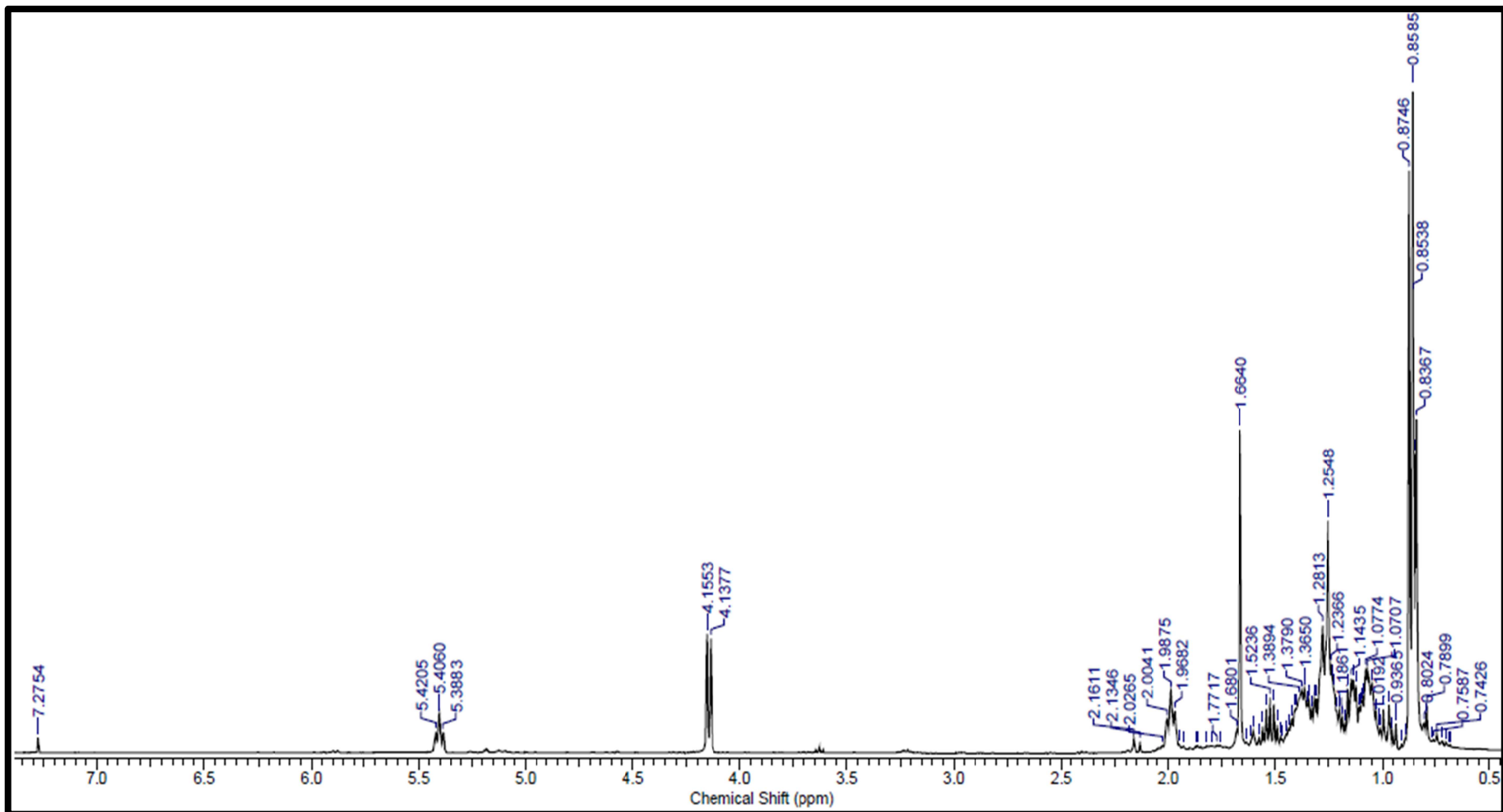


Figura 4. 28 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância 7 (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ .)

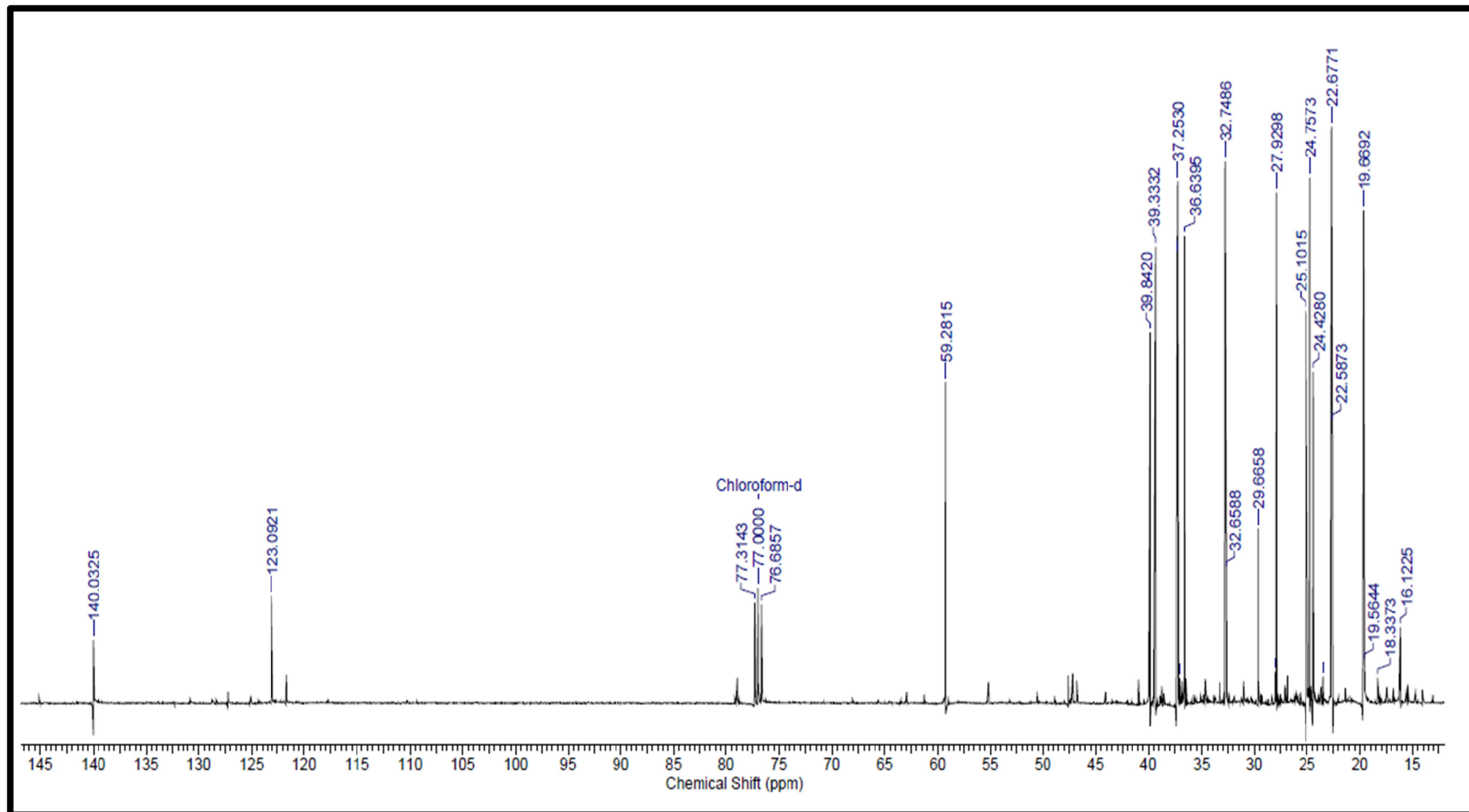


Figura 4. 29 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da substância 7 (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ .)

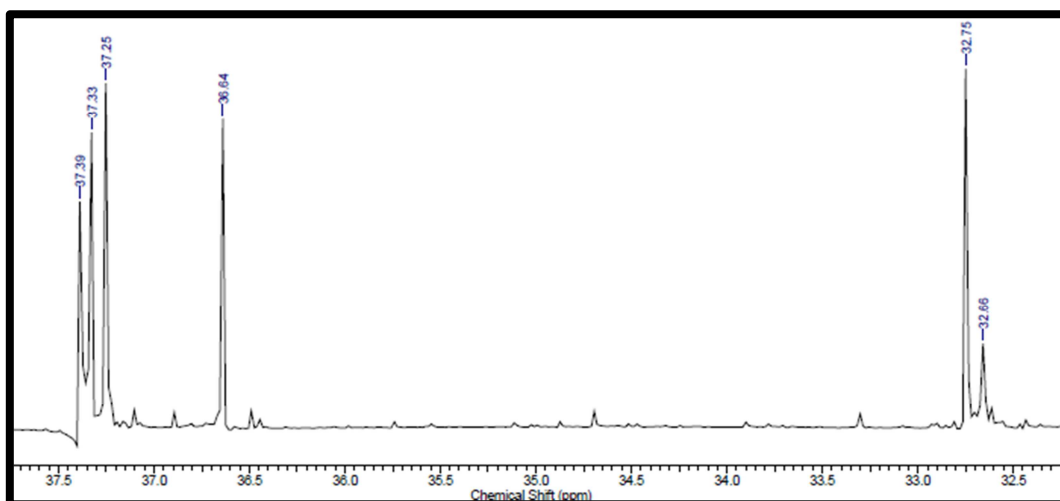


Figura 4.30 - Ampliação da região  $\delta$ 30,0 do espectro de RMN<sup>13</sup>C da substância 7.

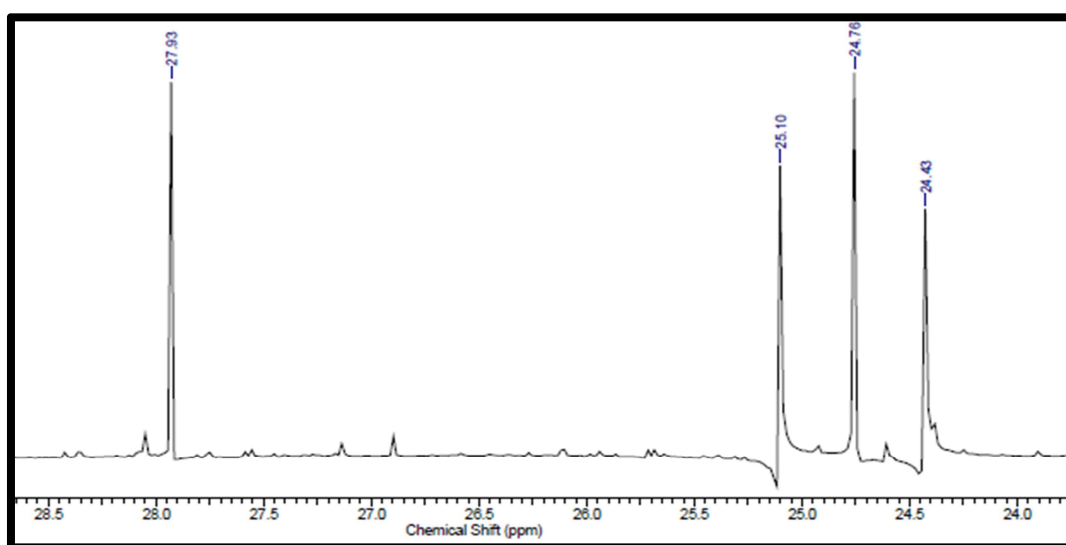


Figura 4.31 - Ampliação da região  $\delta$ 20,0 do espectro de RMN<sup>13</sup>C da substância 7.

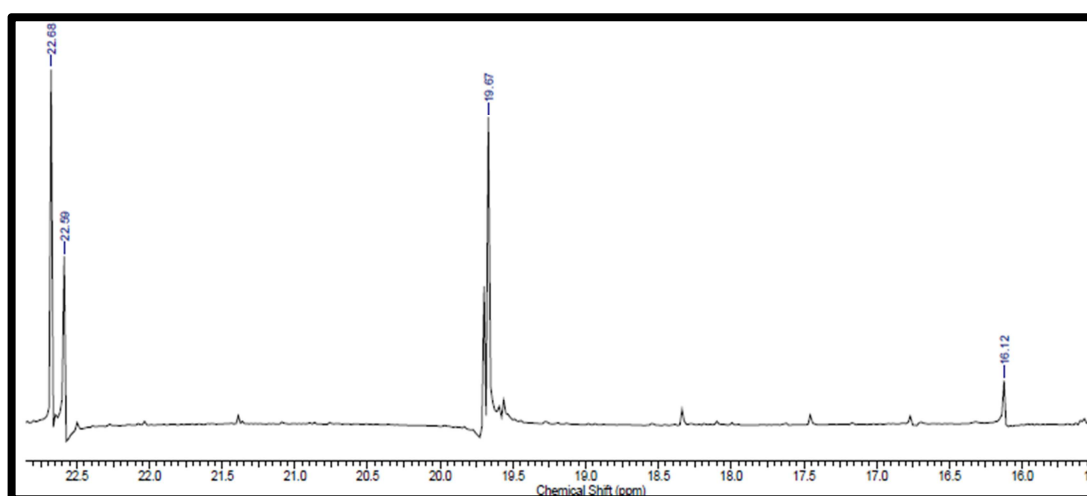


Figura 4.32 - Ampliação da região  $\delta$ 20,0 do espectro de RMN<sup>13</sup>C da substância 7.

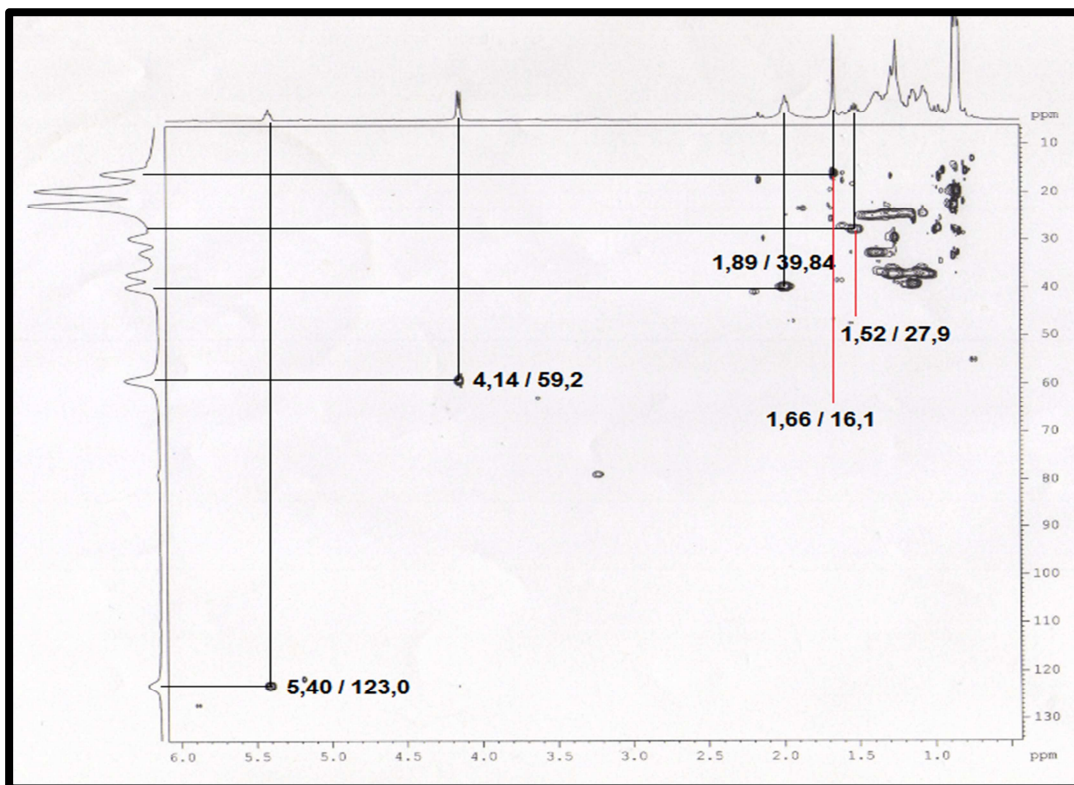


Figura 4.33 - Mapa de contorno de HSQC da substância 7.

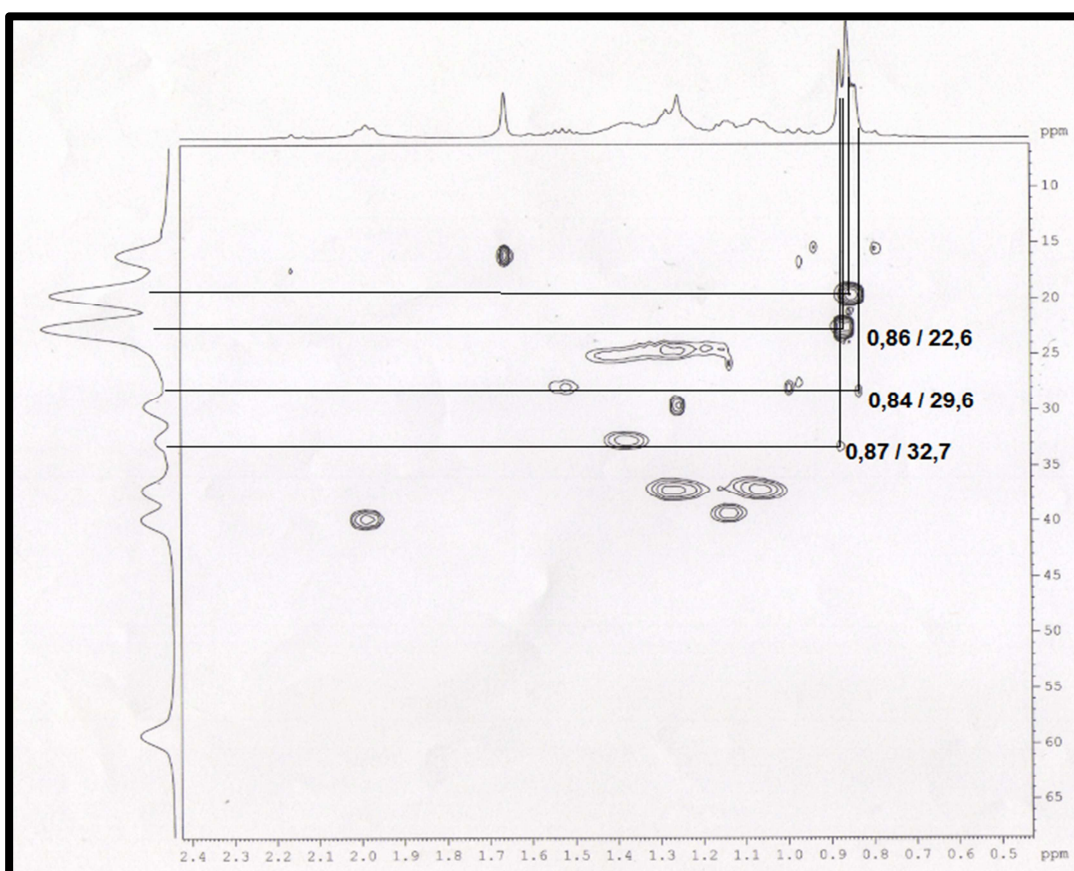


Figura 4.34 - Mapa de contorno de HSQC da substância 7 ampliado.



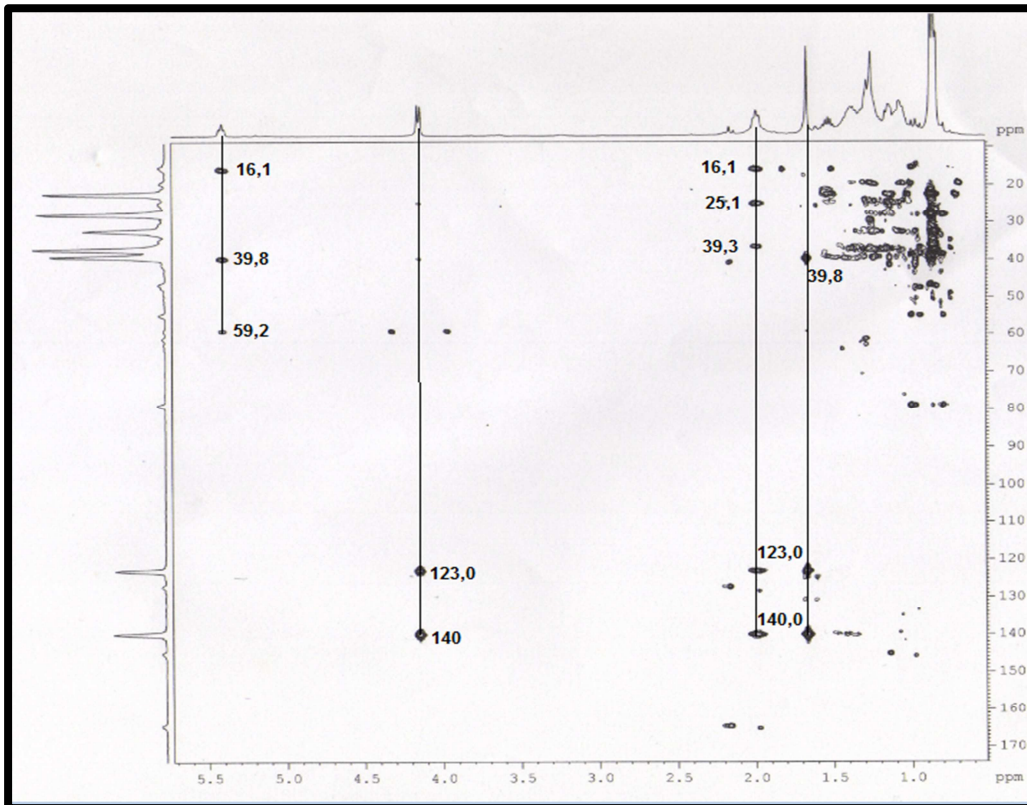


Figura 4.35 - Mapa de contorno de HMBC da substância 7.

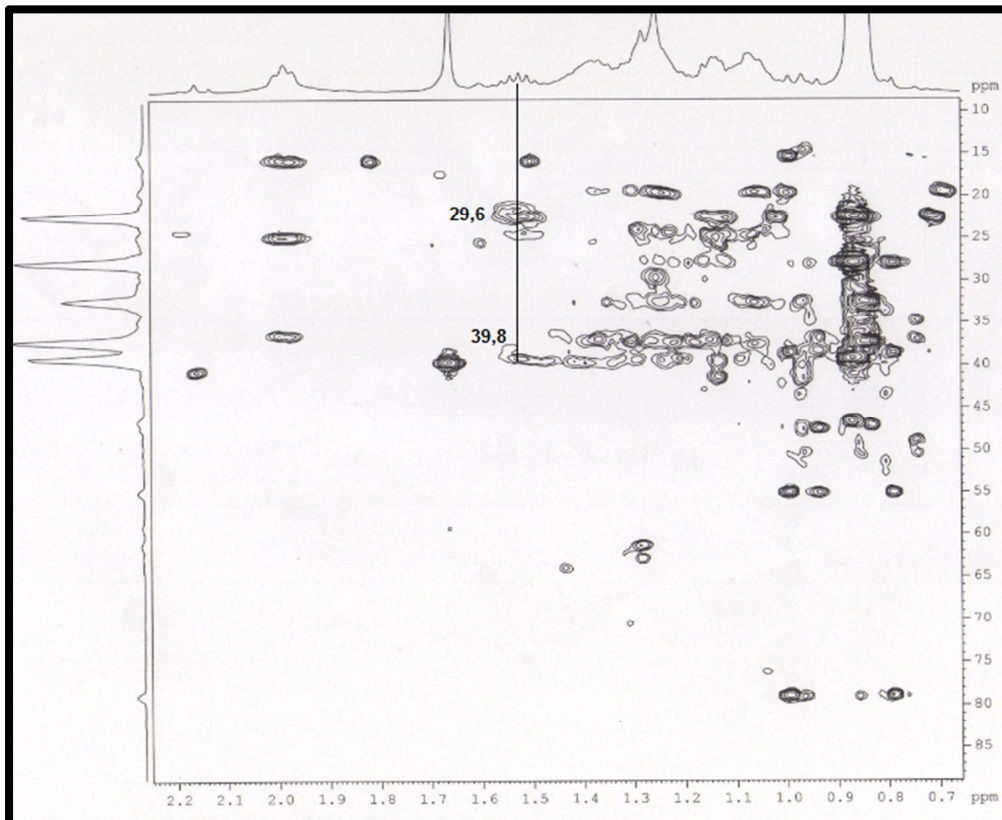
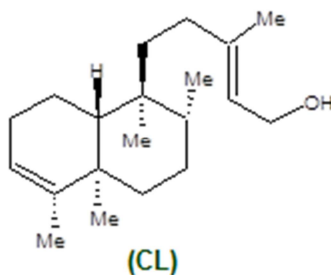


Figura 4. 36 - Mapa de contorno de HMBC da substância 7.

Tabela 4. 4 - - Dados de RMN<sup>1</sup>H da (2Z)-2-Metil-[2,5,5,8a-tetrametildecaidronaftalen-1-il]but-2-en-1-ol e comparação com literatura.

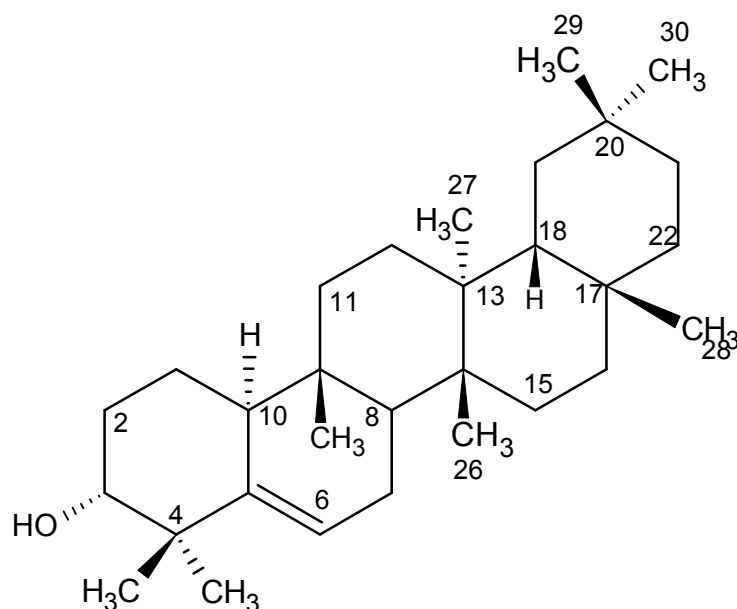
(2Z)-2-metil-[2,5,5,8a-tetrametildecaidronaftalen-1-il]but-2-en-1-ol (07),(100MHz, CDCl <sub>3</sub> )		PACHECO <i>et al.</i> , 2009 (Não informado o equipamento, CDCl <sub>3</sub> )	
C	δ(ppm)	C	δ(ppm)
1	-	1	18,3
2	-	2	26,9
3	-	3	120,0
4	-	4	144,6
5	-	5	38,2
6	-	6	36,9
7	-	7	27,6
8	27,9	8	36,3
9	39,3	9	38,7
10	-	10	46,5
11	25,1	11	36,6
12	39,8	12	32,9*
13	140,0	13	140,9*
14	123,0	14	123,1*
15	59,2	15	59,5*
16	16,1	16	16,5*
17	29,6	17	16,0
18	32,7	18	18,4
19	29,6	19	20,0
20	19,6	20	18,7

\*Apenas esses dados foram utilizados para comparação devido a igualdade da cadeia lateral da (5R, 8R, 9S, 10R)-*ent*-Clerod-3,13-dien-15-ol[Δ<sup>13,14</sup>-kolavenol] (CL).



#### 4.1.1.1.4. TRITERPENO

##### 4.1.1.1.4.1. Identificação da Substância 8

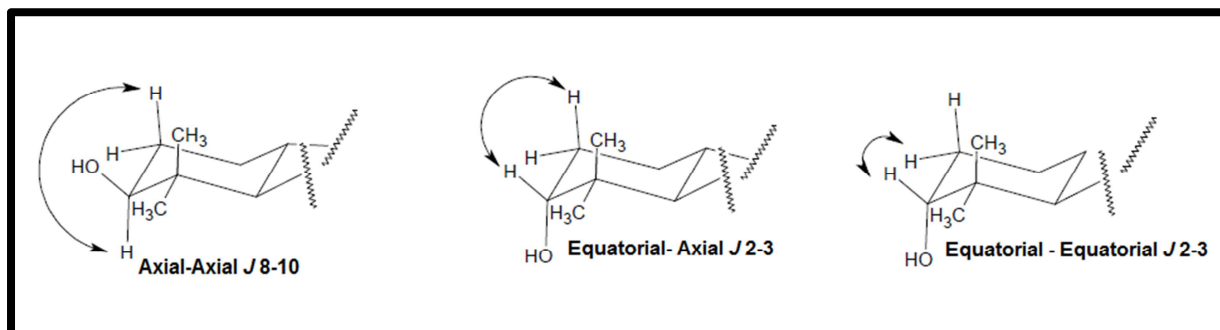


A substância 8 foi isolada como um sólido branco amorfo e teve sua estrutura elucidada através de espectro de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C e por comparação com dados da literatura (GONZÁLEZ *et al.*, 1987). Seu espectro de RMN <sup>1</sup>H (FIGURA 4.37) apresentou sinais característicos de triterpeno do tipo glutinol. Foram observados oito

singletons integrando pra três hidrogênios em  $\delta$  1,16;  $\delta$  1,14;  $\delta$  1,09;  $\delta$  1,04;  $\delta$  1,00;  $\delta$  0,98;  $\delta$  0,95 e  $\delta$  0,85 referentes a metilas. Na região de hidrogênios olefínicos também foi observado um dubleto largo  $\delta$  5,62 (1H, *dl*,  $J$ = 6,0 Hz) que representa o H-6, e um tripleto largo  $\delta$  3,43 (1H, *tl*,  $J$ = 2,72 Hz) típico de hidrogênio oximetínico representando o H-3.

No espectro de RMN <sup>13</sup>C (FIGURA 4.38) foram observados trinta sinais de carbonos que confirmaram que a substância tratava-se de um triterpeno, os sinais  $\delta$  141,6 e  $\delta$  122,0 na região de carbono olefínicos confirmaram a presença de um ligação dupla e o sinal  $\delta$  76,3 confirmou a presença do carbono ligado à hidroxila. Após levantamento bibliográfico foi constatado que a substância 8 já foi isolada a partir de *Maytenus horrida* (GONZÁLEZ *et al.*, 1987), da *Raputia praetermissa* (VEIGA, 2008) e *Syneilesis palmata* (LEE *et al.*, 2005) e sua estrutura foi elucidada por comparação do dados de RMN <sup>13</sup>C da substância 8 com a literatura (GONZÁLEZ *et al.*, 1987) como pode ser observado na TABELA 4.5 Desta maneira foi constatado que a substância 8 poderia se tratar do triterpeno 3 $\beta$  - hidróxiglutin-5-eno pois, os dados de carbono e hidrogênios comparados na literatura são muito semelhantes contudo, para esse tipo de triterpeno ter um grupo hidroxila em  $\beta$  no C-3 que equivale a posição equatorial a constante de acoplamento deveria ser alta pois o

hidrogênio axial do C-3 acoplaria com o hidrogênio equatorial do C-2 resultando em um  $J$  grande. De acordo com Silverstein e colaboradores (2005), a constante tipicamente observada para acoplamentos desse tipo seria de 8-10 Hz, enquanto que o  $J$  de hidrogênios equatorial-equatorial ou equatorial-axial normalmente observado é de 2-3. De acordo com essas informações proposto que a substância 8 se trata do isômero  $3\alpha$  - hidróxiglutin-5-eno por apresentar o tripleto largo ( $\delta$  3,43) com  $J= 2,72$  e não o  $3\beta$  - hidróxiglutin-5-eno que deveria ter o  $J$  em torno de 12. Desta forma, o autor desse trabalho acredita que a substância  $3\alpha$  - hidróxiglutin-5-eno relatada por GONZÁLEZ *et al.* (1987), VEIGA (2008) e LEE *et al.* (2005) tenham se equivocado ao identifica-la como  $3\beta$  - hidróxiglutin-5-eno.



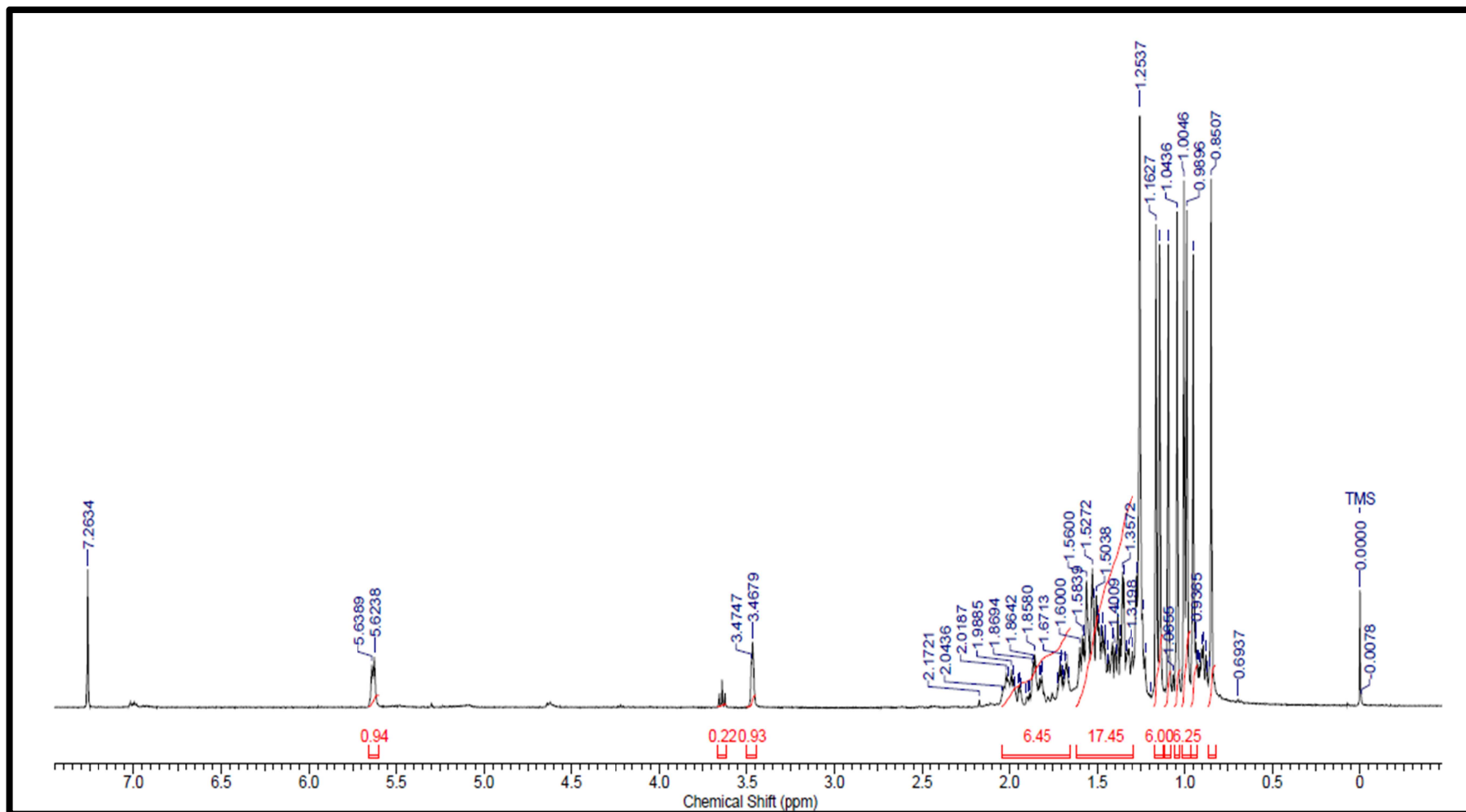


Figura 4.37 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância 8 (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ .)

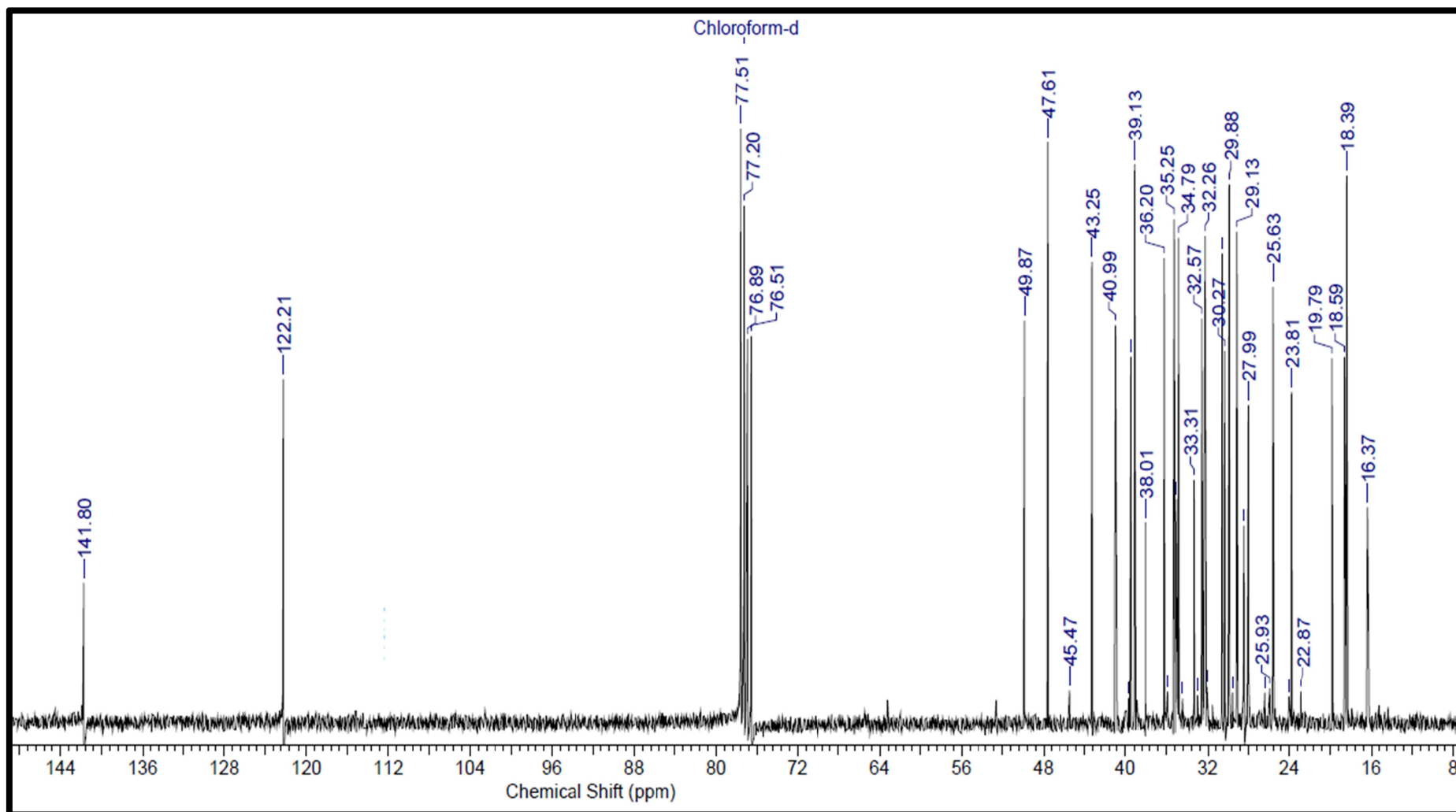


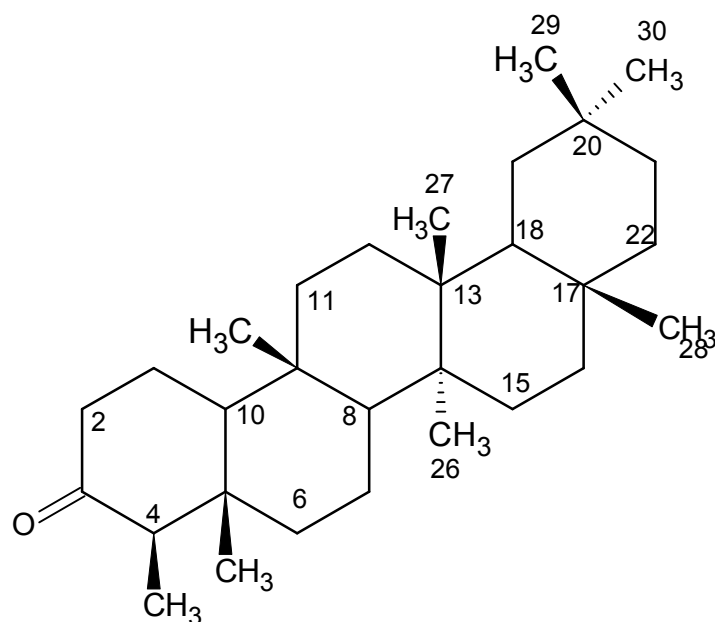
Figura 4.38 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da substância 8 (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ .)

Tabela 4.5 - Dados de RMN<sup>13</sup>C da 3 α -Hidróxiglutin-5-eno em comparação com 3 β -Hidróxiglutin-5-eno a literatura

3α -Hidróxiglutin-5-eno ( <b>08</b> ) (100MHz, CDCl <sub>3</sub> )		GONZÁLEZ <i>et al.</i> , 1987 (Não informado o equipamento, CDCl <sub>3</sub> )	
<b>C</b>	<b>δ(ppm)</b>	<b>C</b>	<b>δ(ppm)</b>
<b>1</b>	18,1	<b>1</b>	18,3
<b>2</b>	27,7	<b>2</b>	27,9
<b>3</b>	76,5	<b>3</b>	76,4
<b>4</b>	40,7	<b>4</b>	40,9
<b>5</b>	141,6	<b>5</b>	141,7
<b>6</b>	122,0	<b>6</b>	122,1
<b>7</b>	23,6	<b>7</b>	23,7
<b>8</b>	47,4	<b>8</b>	47,5
<b>9</b>	34,8	<b>9</b>	34,9
<b>10</b>	49,6	<b>10</b>	49,8
<b>11</b>	33,1	<b>11</b>	33,2
<b>12</b>	30,3	<b>12</b>	30,4
<b>13</b>	37,8	<b>13</b>	37,9
<b>14</b>	39,2	<b>14</b>	39,4
<b>15</b>	34,5	<b>15</b>	34,7
<b>16</b>	36,0	<b>16</b>	35,1
<b>17</b>	30,0	<b>17</b>	30,1
<b>18</b>	43,0	<b>18</b>	43,2
<b>19</b>	35,0	<b>19</b>	35,1
<b>20</b>	28,3	<b>20</b>	28,3
<b>21</b>	32,0	<b>21</b>	32,2
<b>22</b>	38,9	<b>22</b>	39,0
<b>23</b>	28,9	<b>23</b>	29,0
<b>24</b>	25,4	<b>24</b>	25,5
<b>25</b>	16,1	<b>25</b>	16,2
<b>26</b>	18,3	<b>26</b>	18,4
<b>27</b>	19,5	<b>27</b>	19,6
<b>28</b>	32,3	<b>28</b>	32,4
<b>29</b>	32,0	<b>29</b>	32,1
<b>30</b>	34,5	<b>30</b>	34,6

#### 4.1.1.1.4.2. Identificação das Substâncias 9

A substância 9 foi determinada com outra substância em mistura. Sua estrutura foi elucidada através de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , CG-EM e por comparação com a



literatura (NORDBY & MCDONALD, 1994). No seu espectro de RMN  $^1\text{H}$  (FIGURA 4.41) foram observados seis singletos integrando pra três hidrogênios em  $\delta$  1,18;  $\delta$  1,05;  $\delta$  1,00;  $\delta$  1,01;  $\delta$  0,95;  $\delta$  0,72 e um singlete integrando para seis hidrogênios em  $\delta$  0,87, sendo todos esses sinais referentes a metilas de triterpenos. O espectro de RMN  $^1\text{H}$  revelou

ainda dois dubletos integrando para dois  $\delta$  7,97 (2H, *d*,  $J=8,9$ ) e  $\delta$  6,91 (2H, *d*,  $J=8,9$ ) característicos de anel aromática *para*-disubstituído, três singletos largos  $\delta$  5,47 (1H, *s*),  $\delta$  5,08 (1H, *s*),  $\delta$  4,58 (2H, *s*) e um singlete integrando para três hidrogênios  $\delta$  3,88 (3H, *s*) típico de metila ligada a heteroátomo. Os sinais da metila característicos de triterpenos mais os sinais na região dos aromáticos, dos hidrogênios olefínicos e de metila ligada a heteroátomo davam indicativo da substância 9 ser um protolimonoide, entretanto a demasiada quantidade de metilas (oito metilas) não condiz com a estrutura de um prolimonoide que apresenta apenas sete metilas ou menos em seu esqueleto. A substância ao ser submetida à CG-EM revelou em seu cromatograma (FIGURA 4.39) que se tratava de uma mistura onde o espectro de massas (FIGURA 4.40) do constituinte majoritário tinha um íon molecular de  $m/z = 426,0$  e o perfil de fragmentação ao ser comparada com a biblioteca NIST indicou como constituinte majoritário o triterpeno friedelina.

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (FIGURA 4.42) da substância comparada com literatura (TABELA 4.6) confirmou a identidade da molécula como sendo o triterpeno Friedelina. Os sinais de carbono na região de aromáticos, olefínicos e carbinólico tratam-se da substância não identificada que está em mistura com a friedelina.



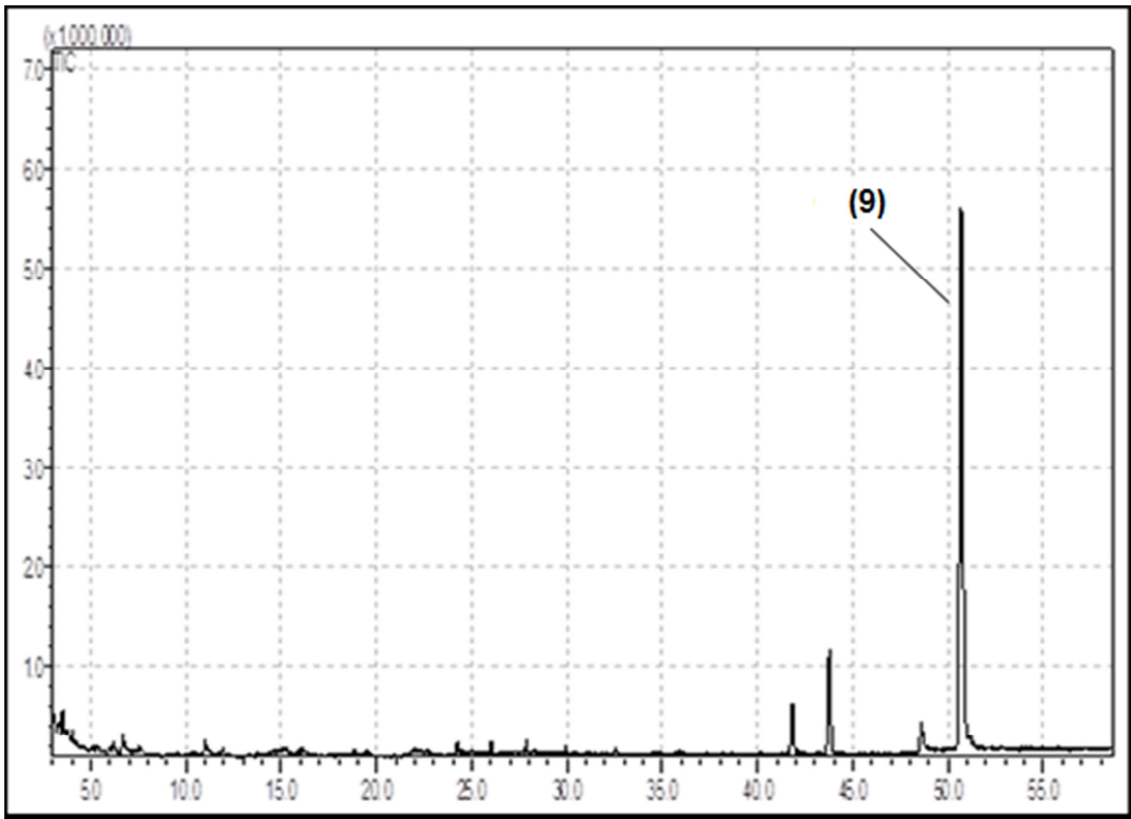


Figura 4.39 - Cromatografia da Substância 9. Mesmas condições utilizadas para Substância 1.

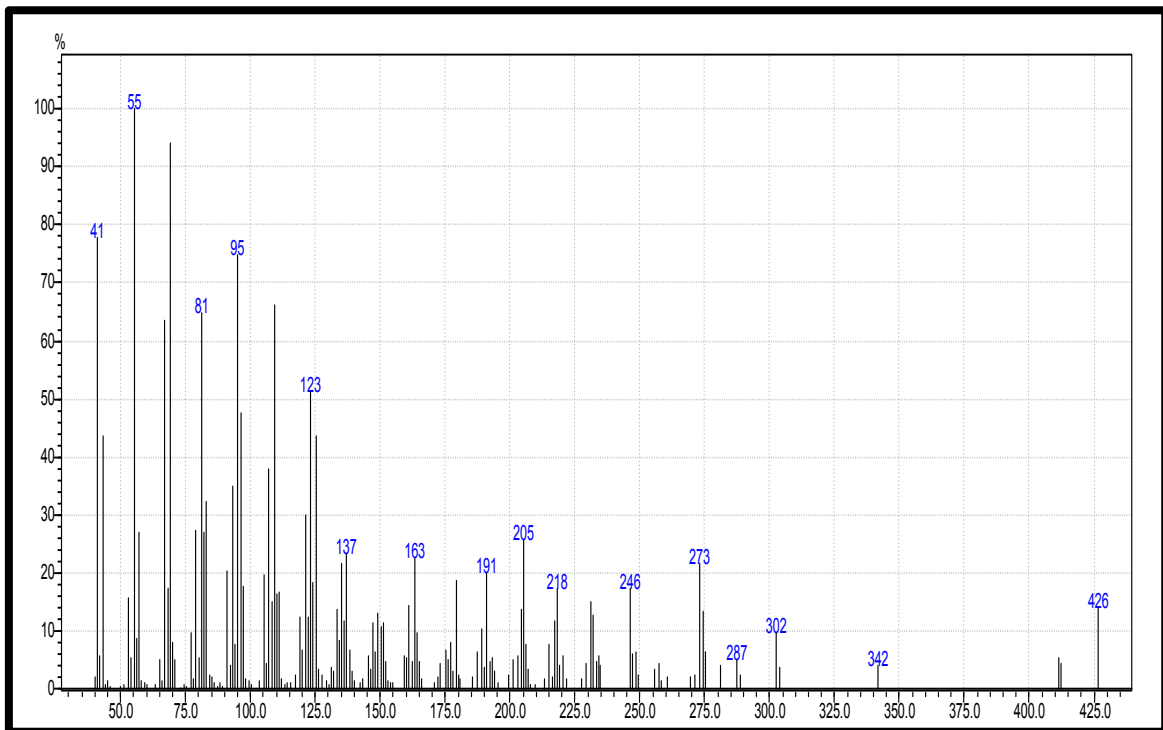


Figura 4. 40 - Espectro de massas da Substância 9. Modo SCAN

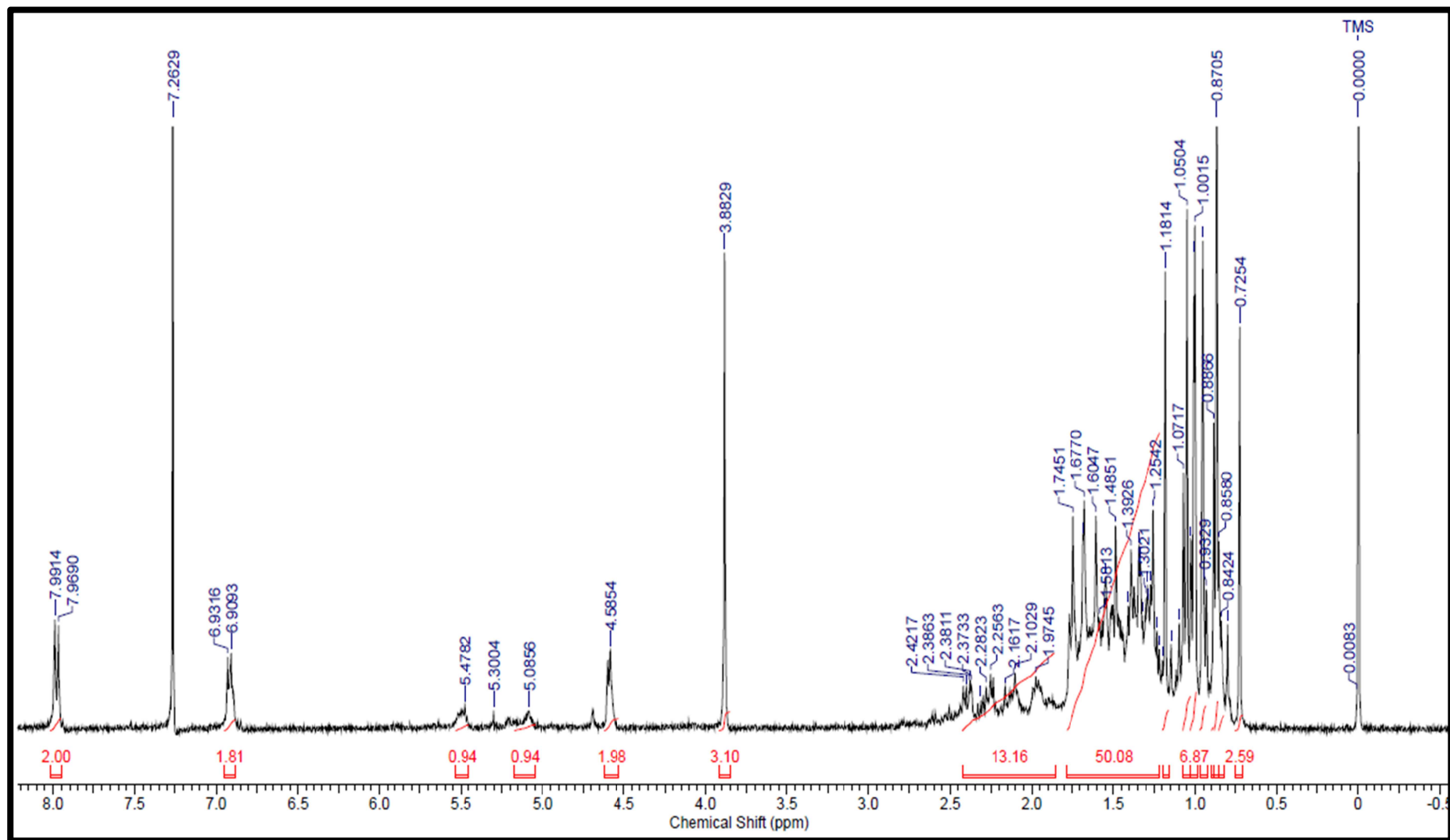


Figura 4.41 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  para as substâncias 9 em mistura com algum composto aromático não identificado

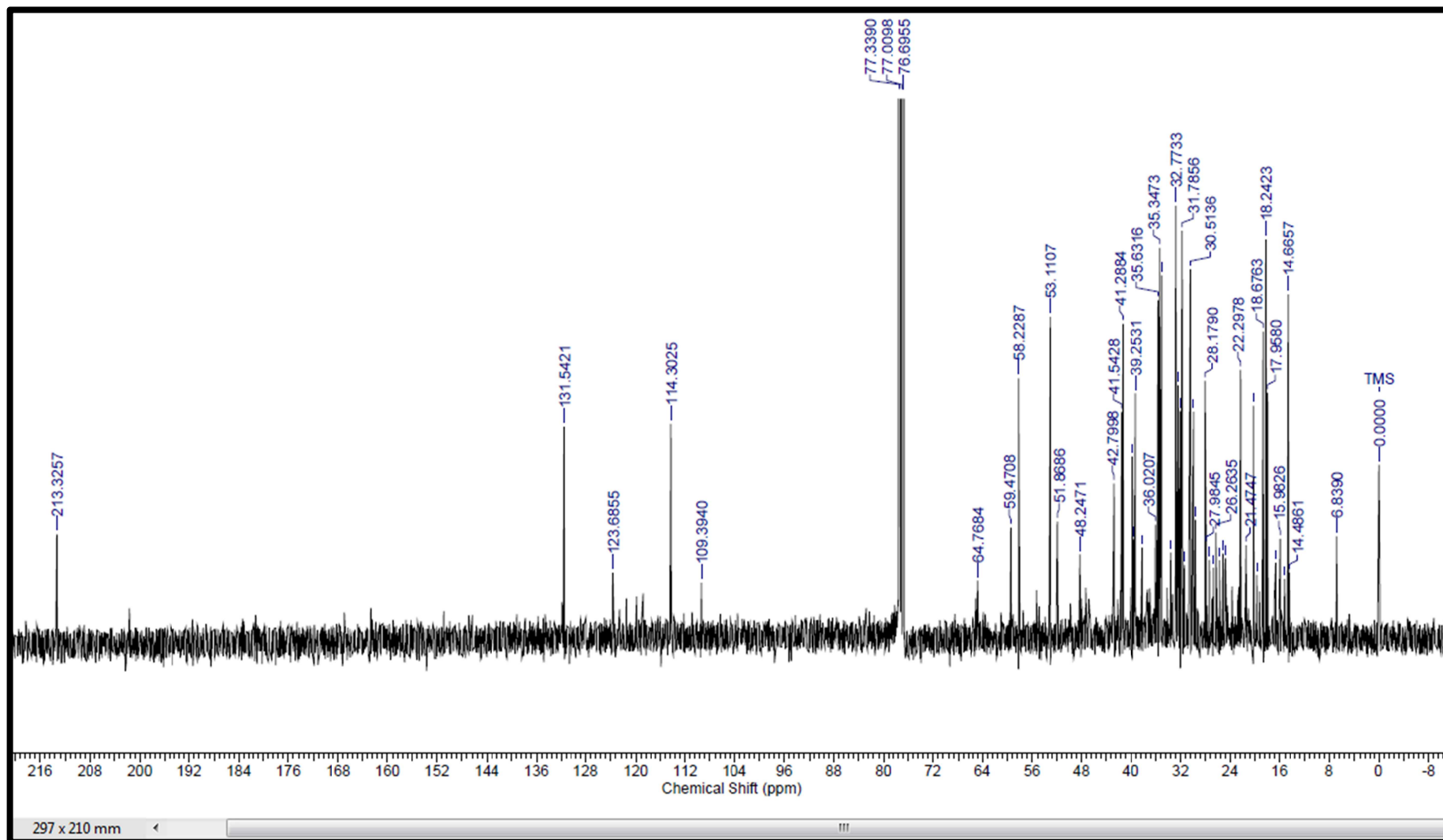


Figura 4. 42 Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  para as substâncias 9 em mistura com algum composto aromático não identificado

Tabela 4.6 - Dados de RMN<sup>13</sup>C da Friedelina em comparação com a literatura.

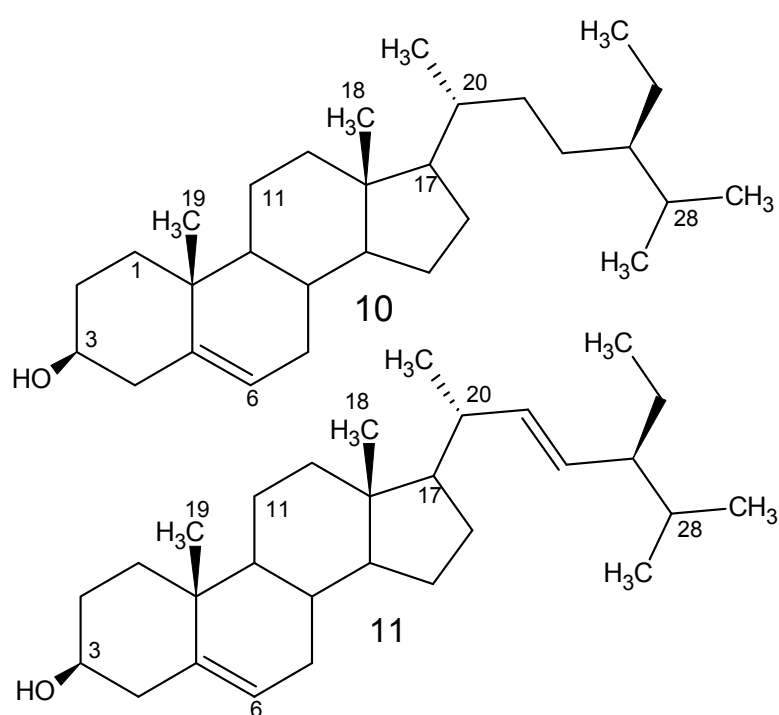
Friedelina ( <b>09</b> ) (100MHz, CDCl <sub>3</sub> )		NORDBY & MCDONALD, 1994 (Não informado o equipamento, CDCl <sub>3</sub> )	
<b>C</b>	$\delta$ (ppm)	<b>C</b>	$\delta$ (ppm)
<b>1</b>	22,2	<b>1</b>	22,3
<b>2</b>	41,5	<b>2</b>	41,5
<b>3</b>	213,3	<b>3</b>	213,2
<b>4</b>	58,2	<b>4</b>	58,2
<b>5</b>	Nd*	<b>5</b>	42,1
<b>6</b>	41,2	<b>6</b>	41,3
<b>7</b>	18,2	<b>7</b>	18,2
<b>8</b>	53,1	<b>8</b>	53,1
<b>9</b>	Nd*	<b>9</b>	37,4
<b>10</b>	59,4	<b>10</b>	59,4
<b>11</b>	35,6	<b>11</b>	35,6
<b>12</b>	30,5	<b>12</b>	30,5
<b>13</b>	39,6	<b>13</b>	39,7
<b>14</b>	38,1	<b>14</b>	38,3
<b>15</b>	32,0	<b>15</b>	32,7
<b>16</b>	36,0	<b>16</b>	36,0
<b>17</b>	30,0	<b>17</b>	30,0
<b>18</b>	42,7	<b>18</b>	42,8
<b>19</b>	35,3	<b>19</b>	35,3
<b>20</b>	28,1	<b>20</b>	28,2
<b>21</b>	32,4	<b>21</b>	32,4
<b>22</b>	39,2	<b>22</b>	39,2
<b>23</b>	6,83	<b>23</b>	6,80
<b>24</b>	14,6	<b>24</b>	14,6
<b>25</b>	17,9	<b>25</b>	17,9
<b>26</b>	20,2	<b>26</b>	20,2
<b>27</b>	18,6	<b>27</b>	18,6
<b>28</b>	32,7	<b>28</b>	32,1
<b>29</b>	31,7	<b>29</b>	31,8
<b>30</b>	35,0	<b>30</b>	35,0

\* Sinal não detectado.

#### 4.1.1.1.5. ESTEROIDES

##### 4.1.1.1.5.1. Identificação das Substâncias 10 e 11

As substâncias foram determinadas em mistura e seu isolado se apresentou como um sólido branco cristalino. Suas estruturas foram elucidadas através de RMN



<sup>1</sup>H e CG-EM.

No espectro de RMN <sup>1</sup>H (FIGURA 4.43) da mistura foram observados sinais com deslocamento químico na região de  $\delta_H$  2,67 a 2,30 referentes a hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos que são característicos de esqueleto esteroidal. Também foram observados a presença de um dubleto largo em  $\delta_H$  5,35 (*dl*,  $J = 5,16\text{Hz}$ ) e um multiplete em  $\delta_H$  3,52 (*m*), referentes aos hidrogênios H-6 e H-3 dos esteroides  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol. Notou-se também a presença de dois duplos dubletos em  $\delta_H$  5,02 (*dd*,  $J = 8,80, 15,16\text{Hz}$ ) e em  $\delta_H$  5,14 (*dd*,  $J = 8,56, 15,16\text{Hz}$ ) que são característicos de hidrogênios vinílicos da cadeia lateral do estigmasterol.

A identificação da mistura de esteroides foi confirmada por CG-EM, em que nos espectros de massas (FIGURA 5.44-4.46) foi constatado os picos dos íons moleculares com  $m/z$  de 414 e 412 Daltons, que são compatíveis ao  $\beta$ -sitosterol (**10**) e ao estigmasterol (**11**), respectivamente.

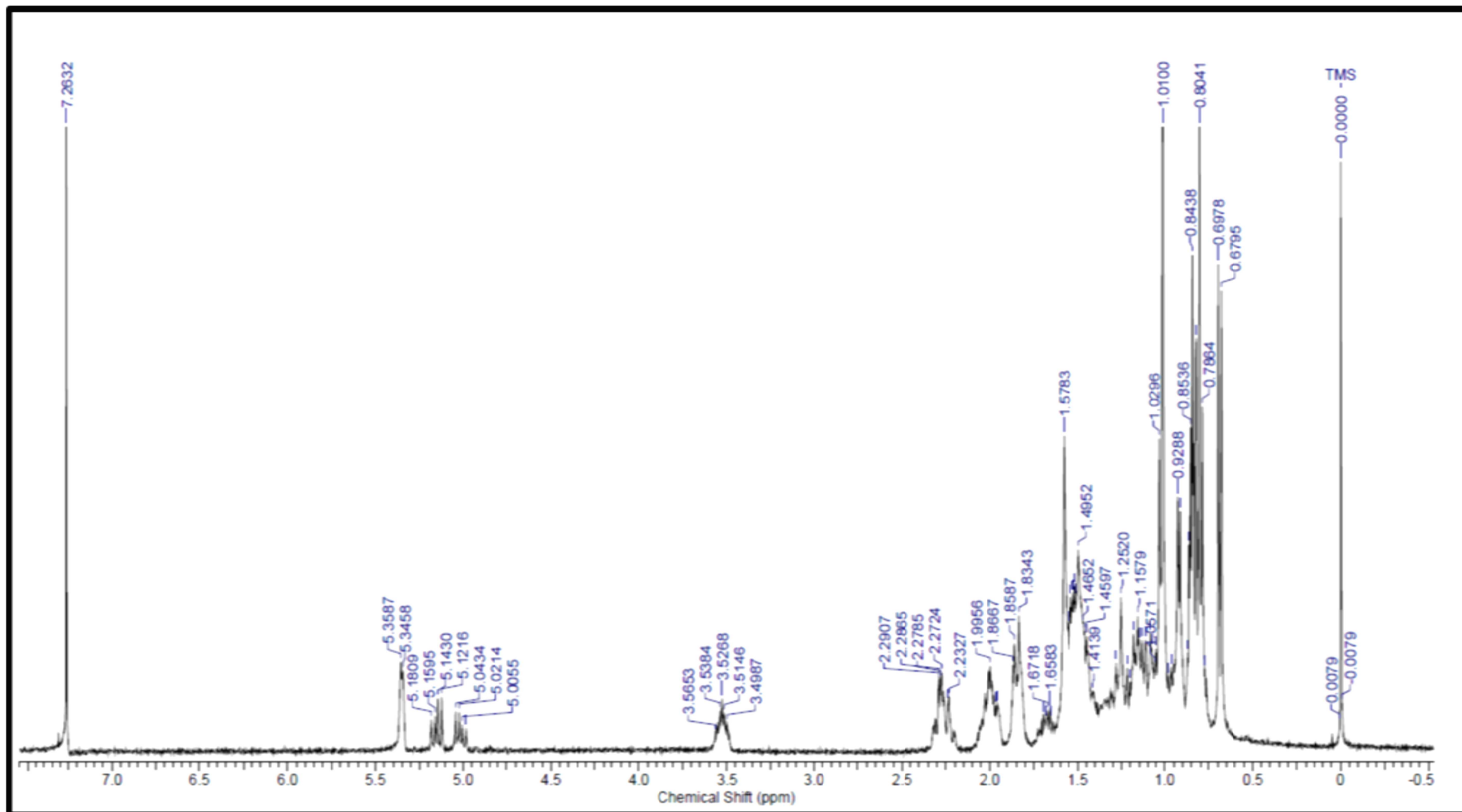


Figura 4. 43 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  para as substâncias 10 e 11 (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ .)

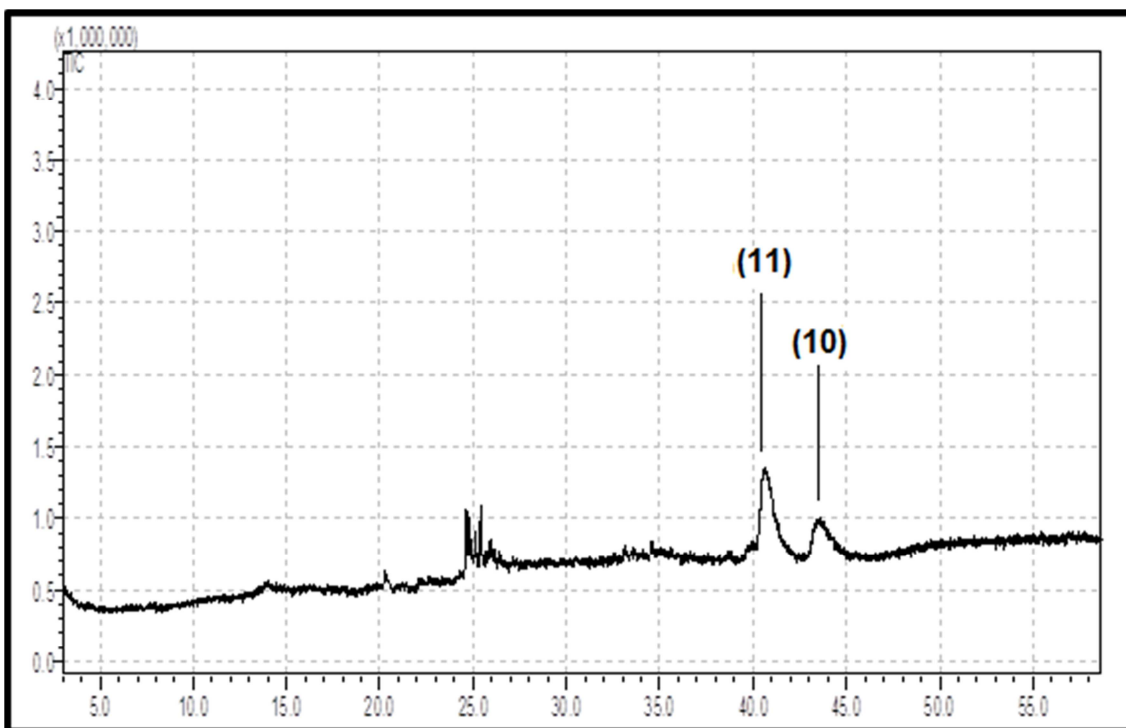


Figura 4.44 - Cromatografia das Substâncias 10 e 11. Mesmas condições utilizadas na Substância 1.

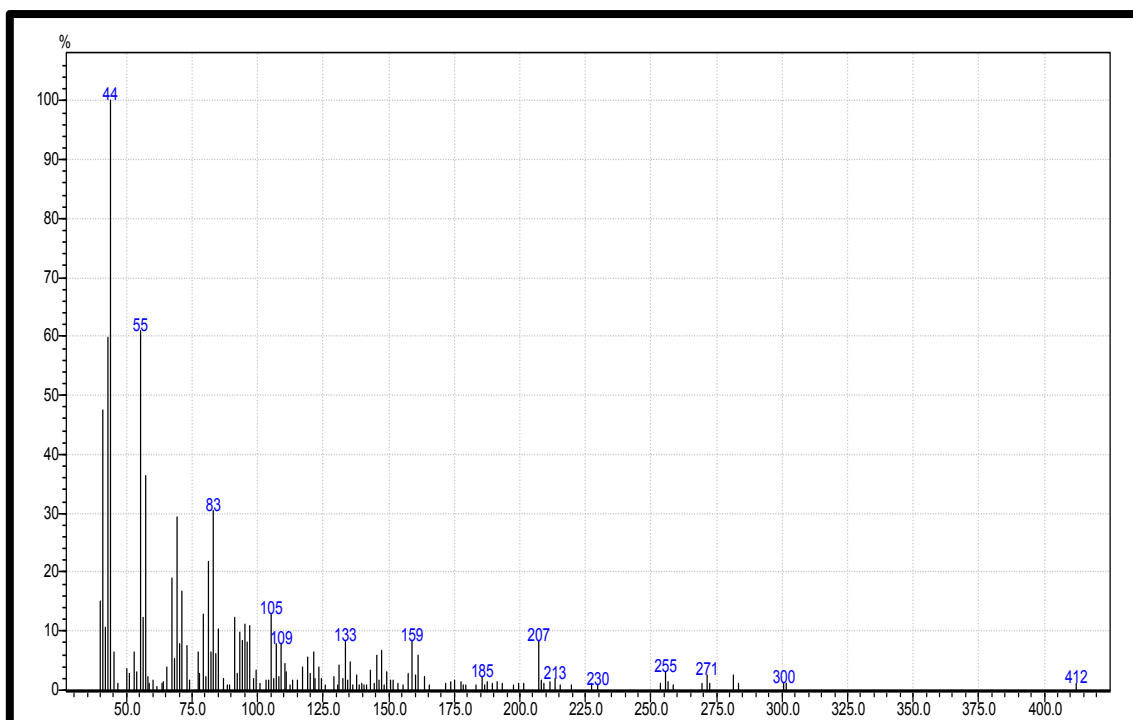


Figura 4.45 - Espectro de massas da Substância 11. Modo SCAN.

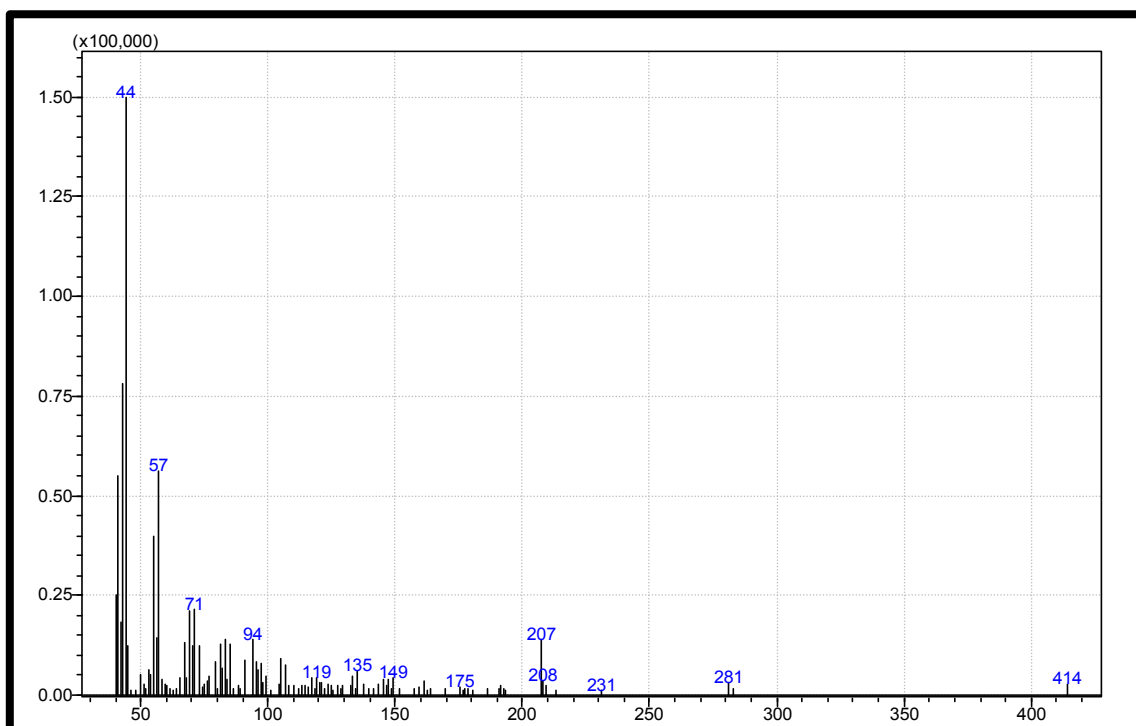


Figura 4.46 - Espectro de massas da Substância 10. Modo SCAN.

#### 4.1.2. Estudo Quimiosistemático

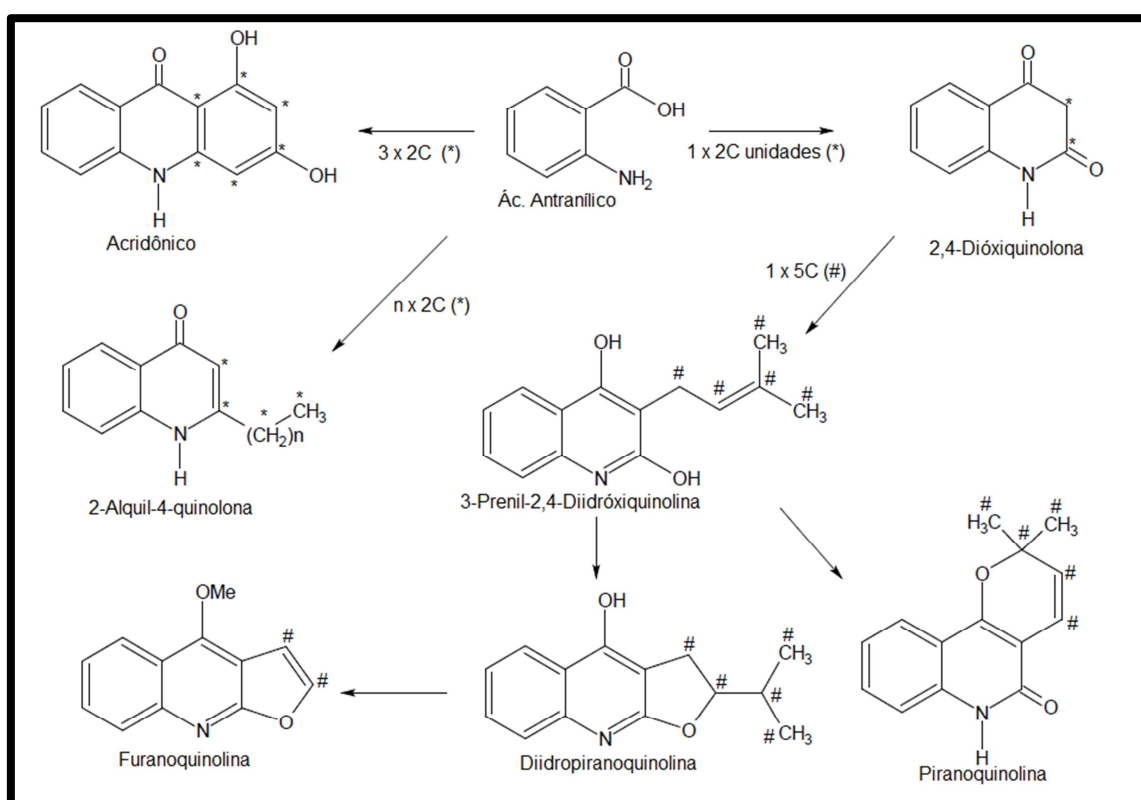
Como não foi possível o isolamento de substâncias das espécies de *Angostura bracteata* e *Galipea carinata*, possivelmente devido ao tempo em que os extratos das mesmas foram preparados a mais de 10 anos, foi realizado um levantamento bibliográfico dos metabólitos secundários isolados das espécies dos gêneros *Conchocarpus*, *Angostura* e *Galipea*. O gênero *Conchocarpus* foi incluso no levantamento bibliográfico porque com a nova classificação botânica proposta por Kallunki e Pirani (1998) muitas espécies antes pertencente ao gênero *Galipea* foram reclassificadas para o gênero *Angostura* e também para o gênero *Conchocarpus*.

De acordo com o levantamento bibliográfico o perfil químico do gênero *Conchocarpus* (TABELA 1.3) é constituído por alcaloides acridônicos polimetoxilados, 3-alkil-2-quinolona, 2-fenil-4-quinolona, furanoquinolínicos e indolquinazolínicos, flavonas, piranoflavonas, acetofenonas, amidas, cumarinas simples e piranocumarinas lineares e angulares. O gênero *Angostura* (TABELA 1.1), é constituído por alcaloides 2-alkil-quinolínicos, 2-alkilaril-quinolínicos, 2-aryl-quinolínicos, furanoquinolínicos e secofuranoquinolínicos, chalcona, cromona e



cumarinas C e O-preniladas. Por fim, gênero *Galipea* (TABELA 1.2) é constituído por alcaloides 2-quinolona e por cumarinas C e O-preniladas.

Os alcaloides relatados na literatura para *Angostura* e *Galipea* tem sua origem biossintética na combinação do ácido antranílico com uma ou mais unidades de acetato ESQUEMA 4.7. Em *Angostura* os alcaloides isolados além da combinação da unidade acetato com ácido antranílico também há a participação de unidade C-5 proveniente de prenilas levando à biossíntese dos alcaloides furano- e piranoquinolínicos. Por sua vez, os alcaloides relatados para a *Galipea* provém da união do ácido antranílico com uma unidade acetato levando aos alcaloides 2-quinolonas entretanto, devido ao pouco estudo das espécies desses gênero não há como propor um paralelismo entre a classificação baseada na morfologia com os metabólitos secundários isolados dessas espécies que justifiquem a diferenciação.



Esquema 4.7 - Classe majoritaria de alcaloides nas Rutaceae formado pela combinação de ácido antranílico e acetato (Waterman, 1999).

Por fim, o gênero *Conchocarpus* apresenta uma variedade de alcaloides que também são relatados nos gêneros discutidos acima como, os alcaloides 2-quinolonas (*Galipea*), furanoquinolínicos e piranoquinolínicos (*Angostura*). Contudo,

nota-se que na *Conchocarpus* a ausência de alcaloides alquil- e alquiarilquinolinicos que está presente na *Angostura*, o que sugere que as espécies desse gênero não conseguem utilizar várias unidades de acetato para biossintetizar esse tipo de alcaloides, como pode ser visto no ESQUEMA 4.7. Esse fato é reforçado devido ao relato de alcaloides acridônicos para as espécies de *Conchocarpus* já que esse tipo é biossintetizado pela união do ácido antranílico com apenas três unidades de acetato. Outro dado que reforça, em termos quimiossistematicos, a distinção do gênero *Conchocarpus* dos gêneros discutidos acima é a presença de alcaloides indolquinazolínicos ausente nos demais gêneros, e que tem a sua origem biossintética na combinação do triptofano com ácido antranílico. Fazendo um comparativo do perfil químico de *Conchocarpus* com o de *Angostura* e *Galipea* é possível notar que há um paralelismo entre a classificação baseada na morfologia com os metabólitos secundários já isolados dessas espécies. Esse paralelismo também é evidenciado pelo fato da variedade de alcaloides presente no gênero *Conchocarpus* com a afirmação de KALLUNKI e GROppo (2007), onde algumas espécies desse gênero são filogeneticamente mais próximas de *Almeida* do que de outros *Conchocarpus*, justificando essa variedade dos alcaloides dentro desse gênero.

## 4.2 Atividade Biológica

Todas as substâncias ensaiadas foram isoladas da espécie de *Swinglea glutinosa* a partir do estudo fitoquímico realizado neste trabalho, no entanto, apenas algumas delas foram avaliadas, pois algumas delas apresentaram contaminação e insuficiência de massa para a realização dos ensaios. Devido a pouca quantidade de substâncias ensaiadas também foi realizado o ensaio das partições do extrato etanólico. As substâncias e as partições 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 e algumas partições em uma solução aquosa, ideal para o ensaio.

#### **4.2.1. Atividade biológica dos Compostos Naturais frente ao Crescimento Micelial da *Guignardia citricarpa***

As avaliações de crescimento micelial foram realizadas a cada dois dias, e como o crescimento dos fungos não foram uniformes as medidas foram baseadas no centro de aplicação do inóculo como referencial. Desta maneira, realizou-se a medida vertical e horizontal em centímetros e dessas medidas foram feitas médias para cada placa analisada. Foram feitos dois ensaios de crescimento micelial do fungo um em Fevereiro de 2011 com as partições hexânica, metanólica, acetato etílico, butanólica, hidroalcoólica e com o triterpeno 3 $\alpha$ -hidróxiglutin-5-eno, e o outro ensaio foi realizada em Abril de 2011 com o diterpeno (2E)-2-metil-[2,5,5,8a-tetrametildecaidronaftalen-1-il]but-2-en-1-ol e com a amida N-{2-[4-(3-oxobutoxil)fenil]etil}benzamida. Os resultados do experimento pode ser é visualizado a partir dos GRÁFICO 4.1 e 4.2, a média de crescimento micelial foi calculada para os compostos naturais ensaiados, observada em 16 dias de ensaio, obtida a partir da média das 5 repetições em cada avaliação realizada para cada tratamento. Conforme os GRÁFICOS 4.1 e 4.2 nenhum dos compostos avaliados resultaram atividade significativa na inibição do crescimento micelial. No entanto, este ensaio avalia apenas o crescimento micelial, e este não está envolvido diretamente com o processo de infecção nas plantas.

Nenhuma das partições apresentaram atividade significativa na inibição do crescimento micelial da *G. citricarpa*, onde a partição Metanólica que apresentou maior atividade de inibição, em relação as outras partições, teve uma inibição menor que 50 %. Sendo a partição que apresentou maior atividade é possível que nela estejam presentes os alcaloides acridônicos que segundo a literatura apresentam atividades tais como: algicida, antiparasítico, citotóxico e um potente inibidor contra a Catepsina V (WENIGER *et al.*, 2001; DOS SANTOS *et al.*, 2004, 2009; PURCARO *et al.*, 2009; SEVERINO *et al.*, 2011). Por sua vez, as partições hidroalcoólica e acetato etílico estimularam o crescimento do fungo, tal fenômeno pode ser atribuído ao fato destas partições por serem de alta polaridade serem ricas em açúcares sendo estes fonte de nutrientes para o fungo.

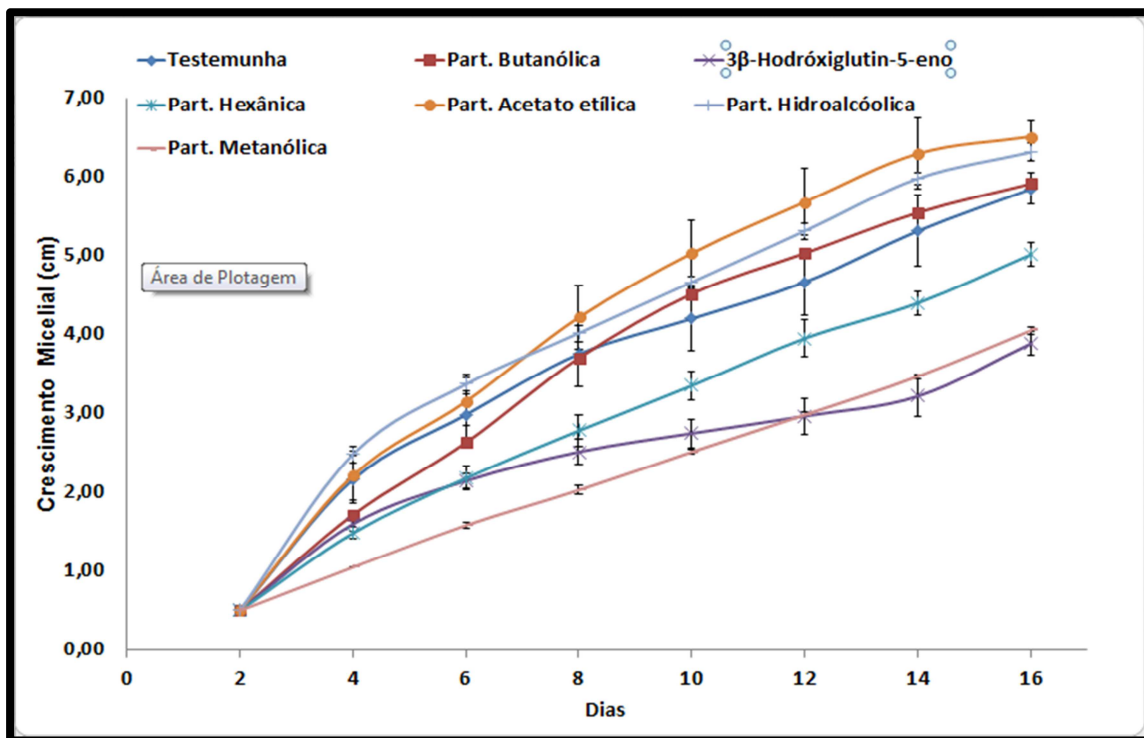


Gráfico 4. 1 - Ensaio de inibição do crescimento micelial da *G. citricarpa*. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão.

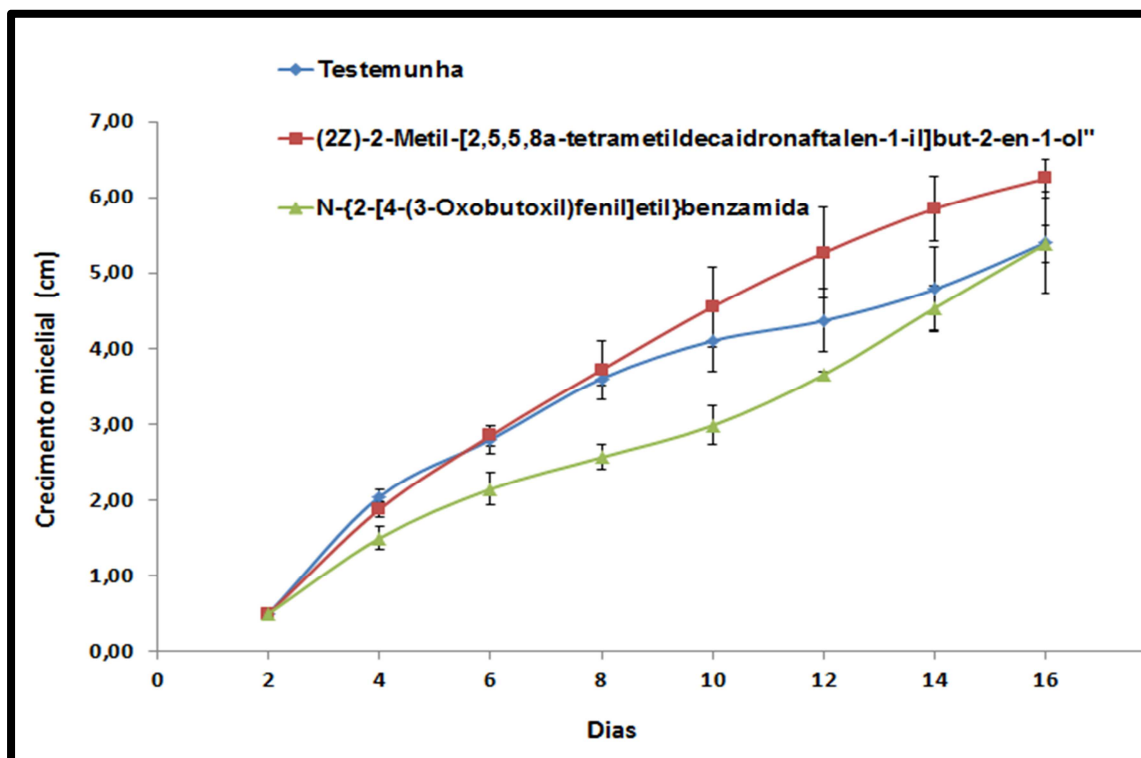


Gráfico 4. 2 - Ensaio de inibição do crescimento micelial da *G. citricarpa*. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão.

Entre as substâncias ensaiadas apenas o triterpeno 3 $\alpha$ -hidróxiglutin-5-eno apresentou uma inibição no crescimento micelial de cerca de 50%. O diterpeno (2E)-2-metil-[2,5,5,8a-tetrametildecaidronaftalen-1-il]but-2-en-1-ol por sua vez, estimulou o crescimento micelial do fungo em cerca de 20 %. Analisando estes dados pode-se propor a hipótese de que o fungo *G. citricarpa* possui um sistema enzimático capaz de degradar terpenoide de unidade C-20 biotransformando ele em um metabólito menos nocível ou até favorável ao crescimento do fungo mas, não consegue fazer o mesmo com terpenoides de unidade C-30, pois foi observado que o triterpeno teve uma pequena inibição no crescimento micelial.

#### **4.2.2. Atividade biológica dos Compostos Naturais frente à germinação de esporos e formação de apressórios da *Guignardia citricarpa***

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. Esse experimento também foi feito em dois ensaios de crescimento micelial do fungo um em Fevereiro de 2011 com as partições hexânica, metanólica, acetato etílico, butanólica, hidroalcoólica e com o triterpeno 3 $\beta$ -hidróxiglutin-5-eno, e o outro ensaio foi realizado em Abril de 2011 com o diterpeno (2E)-2-metil-[2,5,5,8a-tetrametildecaidronaftalen-1-il]but-2-en-1-ol e com a amida N-{2-[4-(3-oxobutoxil)fenil]etil}benzamida.

Ao analisar os GRÁFICOS 4.3 e 4.4, nota-se que das partições ensaiadas apenas a metanólica e hexânica apresentaram uma inibição maior que 50%. A Partição Hexânica teve uma inibição de 81,25% na germinação e 86,75% na formação de apressórios, enquanto a partição metanólica apresentou inibição de germinação e formação de apressórios de 88,5% e 93,25%, respectivamente. Das substâncias ensaiadas apenas o diterpeno (2E)-2-metil-[2,5,5,8a-tetrametildecaidronaftalen-1-il]but-2-en-1-ol teve uma inibição menor que 50%, a amida N-{2-[4-(3-oxobutoxil)fenil]etil}benzamida teve uma inibição de 90,5 % na germinação e de 94,5% na formação de apressórios por sua vez, o triterpeno apresentou uma inibição de 93,5% e 96,5% na germinação e formação de apressórios.

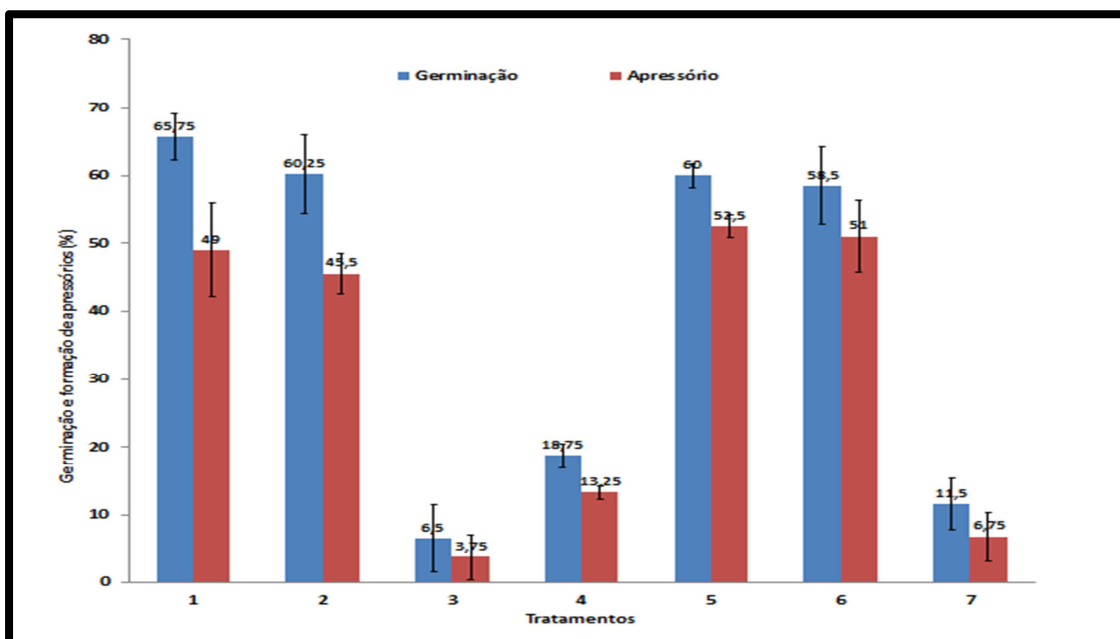


Gráfico 4. 3 - Efeito dos compostos naturais ensaiados em Fevereiro de 2011 na germinação e formação de apressórios da *G. citricarpa*. 1- Testemunha; 2- Part. butanólica; 3- 3α -hidroxiglutin-5-eno; 4- Part. hexânica; 5- Part. acetato etílico; 6- Part. hidroalcoólica; 7- Part. metanólica. As barras representam a média ± desvio padrão.

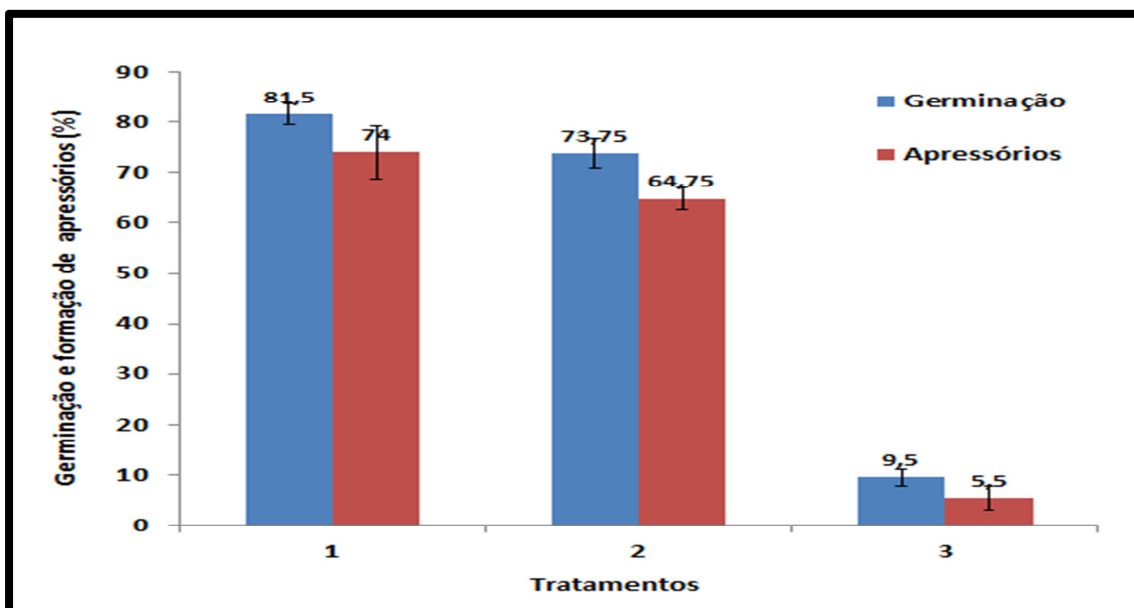


Gráfico 4. 4 - - Efeito dos compostos naturais ensaiados em Abril de 2011 na germinação e formação de apressórios da *G. citricarpa*. 1- Testemunha; 2- (2E)-2-metil-[2,5,5,8a-tetrametildecadronaftalen-1-il]but-2-en-1-ol; 3- N-{2-[4-(3-oxobutoxil)fenil]etil}benzamida; - Efeito dos compostos naturais ensaiados em Abril de 2011 na germinação e formação de apressórios da *G. citricarpa*. 1- Testemunha; 2- (2Z)-2-metil-[2,5,5,8a-tetrametildecadronaftalen-1-il]but-2-en-1-ol; 3- N-{2-[4-(3-oxobutoxil)fenil]etil}benzamida; As barras representam a média ± desvio padrão.

## 5. CONCLUSÕES

O estudo fitoquímico das espécies *Angostura bracteata* e *Galipea carinata* não levou ao isolamento de substâncias provavelmente devido ao tempo que os extratos das mesmas foram preparados, cerca de 10 anos cada. Entretanto, o levantamento bibliográfico dos alcaloides já isolados dos gêneros supracitados e do gênero *Conchocarpus* deu indícios de haver certo paralelismo entre a classificação botânica, proposta por Kallunki & Pirani (1998), baseada na morfologia das espécies com o perfil químico destas. Esse paralelismo é constatado apenas entre *Conchocarpus* e *Angostura*, já que nesses dois gêneros há um demasiado relato de alcaloides isolados, onde fica evidente a capacidade do gênero *Angostura* em biossintetizar alcaloides 2-alkil e 2-alkylarilquinolínicos, que não estão presentes no gênero *Conchocarpus*. Por sua vez, as espécies de *Conchocarpus* tem a capacidade de biossintetizar alcaloides acridônicos e indolquinazolínicos que não estão presentes em *Angostura*. O gênero *Galipea*, devido à nova classificação, passou a possuir poucos relatos de substâncias isoladas impossibilitando afirmar se os seus alcaloides 2-quinolona são restrito nas espécies desse gênero, além do fato desse tipo já ter sido isolado tanto em *Angostura* como na *Conchocarpus*, podendo ser um metabólito secundário comum na subtribo Galipeinae. Sendo assim, fica claro a necessidade de estudos fitoquímicos para um maior conhecimento do perfil químico deste gênero.

O estudo fitoquímico da *Swinglea glutinosa* levou ao isolamento de dois triterpenos: 3 $\alpha$ -Hidroxi-glutin-5-eno (**08**) e friedelina (**09**); um diterpeno: (2E)-2-metil-[2,5,5,8a-tetrametil-decaidronaftalen-1-il]but-2-en-1-ol (**07**); dois esteroides: sitosterol (**10**) e estigmasterol (**11**); uma flavanona: pinostrobin (**07**); e três amidas: N-benzoil-tiramida (**01**); N-{2-[4-(3-oxobutoxil)fenil]etil}benzamida (**02**); 2(E)N-metil-fenilacrilamida (**05**), sendo esta última amida inédita na literatura. A amida N-{2-[4-(2,3-diidróxi-3-metil-4-oxobutoxil)fenil]etil}benzamida (**03**) e o ácido carboxílico (**04**) ácido 4-{4-[2-(benzoilamino)etil]fenoxil}-2,3-diidróxi-2-metilbutanóico foram identificados via CG-EM, onde estes dois metabolitos reforçam a biogênese da amida inédita via O-prenilação seguida de perda de dióxido de carbono devido às várias oxidações na metila terminal.

Nos ensaios de atividade biológica frente à *Guignardia citricarpa in vitro*, das substâncias avaliadas [amida (**02**), diterpeno (**07**) e triterpeno (**08**)] no crescimento

micelial nenhuma apresentou atividade significativa, a substância que mais apresentou melhor atividade contra o crescimento micelial foi o triterpeno **(08)** com uma inibição de cerca de 50%, já o diterpeno **(07)** estimulou o crescimento do fungo. A hipótese proposta seria pela ação de algum sistema enzimático presente no fungo que é capaz de biotransformar terpenoides de unidades C-20 em metabólitos menos nocível ou até favorável ao crescimento do fungo mas, não consegue fazer o mesmo com terpenoides de unidade C-30.

No entanto, vale ressaltar que este ensaio trata-se de um dado importante, porém não direcionado às 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, destacando o triterpeno **(08)** que apresentou uma inibição de 93,5% e 96,5% na germinação e formação de apressórios e a amida **(02)** que apesar de não apresentar atividade no crescimento micelial inibiu 90,5 % na germinação e 94,5% na formação de apressórios. De acordo com os resultados de inibição frente ao crescimento micelial obtidos nota-se que o fitopatógeno MPC apresenta certa resistência às substâncias ensaiadas o que o torna um problema de elevada significância, principalmente por não haver um controle químico eficaz e livre de resíduos tóxicos para o meio ambiente e espécies não-alvo. Contudo, os ensaios frente à germinação e formação de apressórios foram mais significativos onde fica claro que as substâncias ensaiadas atuaram como um fungistático podendo ser protótipos promissores no desenvolvimento de compostos mais ativos.



## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABECITROS [Associação Brasileira Exportadores de Citros], 2010. (www.abecitrus.com.br), acessado 15/01/2011.

ADASKAVEG, J.; KORSTEIN, L.; AGOSTINI, J.P.; LEVY, L.; BULLUCK, R.; MILES, A.; CARROL, G.; PALM, M.; DEWDNEY, M.; PERES, N.; EL-LISSY, O.; SCHUBERT, T.; GOTTWALD, T.; SEAVER, D.; HANDERSON, M.; SPÓSITO, M.B.; HOLLINGSWORTH, C.; TIMMER, P.; HORNBY, P.; ZELLER, K.; HORNIAK, M.; “*Guignardia citricarpa* (Citrus Black Spot, CBS) technical working group final report”. United States Department of Agriculture (USDA), Animal Plant Health Inspection Service (APHIS), Plant Protection and Quarantine (PPQ), Center for Plant Health Science and Technology (CPHST). Washington, 1-12, 2010.

AGRIFANUAL; “Anuário da agricultura brasileira”. São Paulo: Agra FNP. *Pesquisas*, 520, 2010.

AGUILAR-VILDOSO, C.I.; “Pinta preta espalha-se por São Paulo”. *Citricultura Atual*, Cordeirópolis, 1, 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, 1, 14-25, 2002.

AHSAN, M.; GRAY, A.I.; WATERMAN, P.G.; ARMSTRONG, J.A.; “4-Quinolinone, 2-Quinolinone, 9-Acridanone, and Furoquinoline Alkaloids from the Aerial Parts of *Boronia bowmanii*”. *J. Nat. Prod.* **57**, 670-672, 1994.

ALBARICI, T.R.; “Estudo fitoquímico de *Rauia sp.* e *Conchocarpus macrophyllus* (Rutaceae) e Avaliação de atividade antiparasitária de extratos e substâncias isoladas. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química, UFSCar, Tese de Doutorado, 2004, 15-20p.

AMBROZIN, A.R.P.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; DA SILVA, M. F. DAS G.; DE ALBUQUERQUE, S.; “Tripanocidal activity of Meliaceae and Rutaceae Plant Extracts”. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **99**, 227-231, 2004a.

AMBROZIN, A.R.P.; “Estudo fitoquímico de plantas das famílias Rutaceae, Meliaceae visando o isolamento de substâncias protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos antichagásicos e antileishmanioses”. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química, UFSCar, Tese de Doutorado, 2004b, 19-22p..

AMBROZIN, A.R.P.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; DA SILVA, M. F. DAS G.; DE ALBUQUERQUE, S.; “Piranoflavonas inéditas e atividades tripanocidas das substâncias isoladas de *Conchocarpus heterophyllus*”. *Química Nova*, **31**, 740 – 743, 2008.

APG [Angiosperm Phylogeny Group]; “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, 2003.

ARANGO, V.; ROBLEDO, S.; SÉON-MÉNIEL, B.; FIGADÈRE, B.; CARDORA, W.; SÁEZ, J.; OTÁLVARO, F.; “Coumarins from *Galipea panamensis* and their activity against *Leishmania panamensis*” *J. Nat. Prod.*, **73**, 1012, 2010.

AVERNA-SACCÁ, R. “Pústulas pretas sobre laranjas doces produzidas pelo *Phoma citricarpa*”. *Revista de Agricultura*, Piracicaba, **15**, 668-674, 1940.

BAAYEN, R. P.; BONANTS, P. J. M.; VERKLEY, G.; CARROLL, G. C.; VAN DER AA, H. A.; DE WEERDT, M.; VAN BROUWERSHAVEN, I. R.; SCHUTTE, G. C.; MACCHERONI, W. JR.; GLIENKE DE BLANCO, C.; AZEVEDO, J. L. “Nonpathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitan endophyte of woody plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*)”. *Phytopathology*, **92**, 464 – 477, 2002.

BALDASSARI, R. B.; WICKERT, E.; GOES, A.; “Pathogenicity, colony morphology and diversity of isolates of *Guignardia citricarpa* and *G. mangiferae* isolated from *Citrus* spp”. *European Journal of Plant Pathology*, **120**, 103 – 110, 2008.

CARVALHO, P.E.R. “Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira”. Brasília: EMBRAPA, 640, 1994.

CHASE, M.W.; MORTON, C.M.; KALLUNLI, J.A.; “Phylogenetic relationships of Rutaceae: cladistics analysis of the subfamilies using evidence from rbcL and aptB sequence variation”. *American Journal of Botany*, **89**, 1191-1199, 1999.

CORTEZ, L.E.R.; “Estudo fitoquímico de *Conchocarpus gaudichaudianus* subsp. *Bahiensis* e *Almeida coerulea*. A busca de compostos biologicamente ativos”. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química, UFSCar, Tese de Doutorado, 2002, 22-35p.

DE ANDRADE, M.R.; “Alcaloides de Rutaceae: química e atividade biológica”. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química, UFSCar, Tese de Doutorado, 2003, 12-18p.

DA SILVA, M. F. das G. F.; SOARES, M. F.; FERNANDES, J. B.; VIERA, P. C.; “Alkyl, Aryl, Alkylarylquinoline, and Related Alkaloids” In “The Alkaloids: Chemistry and Biology” (G. A. CORDELL, editor), Academic Press, London, **64**, 139-214, 2007.

DE FREITAS, S.D.L.; “Estudo quimiosistemático de espécies de *Hortia* (Rutaceae) e busca de fungicidas à *Guignardia citricarpa*”. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química, UFSCar, Dissertação de Mestrado, 2010, 20-21p.

DE GÓES, A.; 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.

DE GÓES, A.; “Controle da mancha-preta dos frutos cítricos”. *Laranja*, **19**, 305-320, 1998.

DE SÁ, I.C.G.; “Estudo fitoquímico de *Rhabdodendron amazonicum*, *Conchocarpus inopinatus* e avaliação dos compostos isolados na inibição de fotossíntese”. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química, UFSCar, Dissertação de Mestrado, 2010, 12-16p.

DOS SANTOS, D. A. P.; “Busca de metabólitos bioativos em plantas, da família Biognoniaceae e Rutaceae contra parasitas causadores de doenças tropicais”. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química, UFSCar, Tese de Doutorado, 2005, 13-14p.

DOS SANTOS, D. A. P.; VIEIRA, P. C.; DA SILVA, M. F. DAS G.; FERNANDES, J. B.; RATTRAY, L.; CROFT, S.; “Antiparasitic Activities of Acridone Alkaloids from *Swinglea glutinosa* (Bl.) Merr”. *J. Braz. Chem. Soc.*, **20** (4): 644-651, 2009.

DOS SANTOS, D. A. P.; BRAGA, P. A. C.; VIEIRA, P. C.; DA SILVA, M. F. DAS G.; FERNANDES, J. B., *In: XXVI REUNIÃO ANUAL SOBRE EVOLUÇÃO, SISTEMÁTICA E ECOLOGIA MICROMOLECULARES*, 2004, *Instituto de Química*, Universidade Federal Fluminense “Novos Alcalóides Acridônicos e suas Atividades em Células Cancerígenas”. Niteroi, 2004.

DUFFIELD, A.M.; JEFFERIES, P.R.; “The Chemistry of the Western Australian Rutaceae. III. The Alkaloids of *Boronia ternata* Endl”. *Aust. J. Chem.* **16**, 292-294, 1963.

FACCHINI, P.H.; “Química biomonitorada de *Protium Heptaphyllum*, *Tapirira Guianensis*, *Rauia* sp. e *Conchocarpus longifolius*: Atividades de extratos e constituintes isolados contra bactérias, saúva-limão e seu fungo simbiote”. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química, UFSCar, Tese de Doutorado, 2005. 16-20p.

FAO [Food and Agriculture Organization of the United States]. 2010. (<http://faostat.fao.org/>) acessado 19/01/2011.

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

FEICHTENBERGER, E.; “Mancha-preta dos citros no Estado de São Paulo”. *Laranja*, Cordeirópolis, **17**, 93-108. 1996.

FEICHTENBERGER, E.; MULLER, G.W.; GUIRADO, N.; “Doenças dos Citros” *In: Manual de Fitopatologia*. (Kimati, H.; Amorim, L.; Bergamin filho, A.; Camargo, L.E.A.; Rezende, J.A.M.; Editores.) São Paulo: Ceres, 261-296, 1997.

FOURNET, A.; VAGNEUR, B.; RICHOMME, P.; BRUNETON, J.; “Aryl-2 et alkyl-2 quinoléines nouvelles isolées d’une rutacée bolivienne: *Galipea longiflora*” *Can. J. Chem.*, **67**, 2116, 1989.

- FOURNET, A.; HOCQUEMILLER, R.; ROBLLOT, F.; CAVÉ, A.; RICHOMME, P.; BRUNETON, J.; “Les chimanines, nouvelles quinoleines substituees en 2, isolees d’une plante bolivienne antiparasitaire: *Galipea longiflora*” *J. Nat. Prod.*, **56**, 1547-1552, 1993.
- FOURNET, A.; BARRIOS, A.A.; MUÑOZ, V. HOCQUEMILLER, R.; ROBLLOT, F.; CAVÉ, A.; RICHOMME, P.; BRUNETON, J.; “Antiprotozoal activity of quinolone alkaloids isolated from *Galipea longiflora*, a Bolivian plant used as a treatment for cutaneous leishmaniasis” *Phytother. Res.* **8**, 174, 1994.
- FUNDECITRUS, 2009. ([www.fundecitrus.com.br/doencas/pinta\\_preta.html](http://www.fundecitrus.com.br/doencas/pinta_preta.html)), acessado 12/03/2009.
- GONZÁLEZ, A.G.; FERRO, E.A.; RAVELO, A.G.; “Triterpenes from *Maytenus hórrida*”. *Phytochemistry*, **26**, 2785, 1987.
- GROPPO, M.; PIRANI, J.R.; SALATINO, M.L.F.; BLANCO, S.R.; KALLUNKI, J.A.; “Phylogeny of Rutaceae based of two noncoding regions from cpDNA”. *American Journal of Botany*, **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*, Palo Alto, **32**, 559-579, 1994.
- HERBERT, J.A.; “Citrus black spot”. Citrus and Subtropical Fruit Research Institute, Nelspruit. Citrus H. 30, 1989.
- HOUGHTON, P.J.; WOLDEMARIAN, T.Z.; WATANABE, Y.; YATES, M.; “Activity against *Mycobacterium tuberculosis* of alkaloids constituents of *Angostura* bark, *Galipea officinalis*” *Planta Med.* **65**, 250, 1999.
- JACQUEMOND-COLLET, I.; HANNEDOUCHE, S.; FABRE, N.; FOURASTÉ, I.; MOULIS, C.; “Two tetrahydroquinoline alkaloids from *Galipea officinalis*” *Phytochemistry*, **51**, 1167, 1999.
- JACQUEMOND-COLLET, I.; BESSIÈRE, J.M.; HANNEDOUCHE, S.; BETRAND, C.; FOURASTÉ, I.; MOULIS, C.; “Identification of the alkaloids of *Galipea officinalis* by Gas Chromatography-Mass Spectrometry”. *Phytochem. Anal.* **12**, 312, 2001.
- KALLUNKI, J. A.; PIRANI, J. R.; “Synopsis of *Angostura* Roem. & Schult. And *Conchocarpus* J. C. Mikan (Rutaceae)”. *Kew Bull.* **53**, 257-334, 1998
- KALLUNKI, J. A.; GROPPPO, M.; “Phylogenetic analyses of the subtribe Galipeinae (Rutaceae)” *In*: “Plant Biology and Botany”, Program and Abstract Book, Chicago, 180-181, 2007.
- KLOTZ, L. J.; “Color handbook of citrus disease”. 4. ed. Berkeley: University of California, Division of Agricultural Sciences, 122, 1973.
- KLOTZ, L.J.; “Fungal, bacterial and nonparasitic nursery and injuries originating in the seedbed, nursery and orchard”. *In*: “The citrus industry” (Reuther, W.; Calavan, E.C.; Carman, G.E. – Editores), California, University of California, 1-66, 1978.

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”. Proceedings of International Society of Citriculture, Berkeley: University of California, **2**, 1296-1299, 1996.

LEE, K.H.; CHOI, S.U.; LEE, K.R.; “Sesquiterpenes from *Syneilesis palmate* and their cytotoxicity against human cancer cell lines *In vitro*”. *Arch. Pharm. Res.*, **28**, 280-284, 2005.

LIMA, L. H. C.; MARCO, J. L. DE; FELIX, C. R.; “Enzimas hidrolíticas envolvidas no controle biológico por micoparasitismo”. In: “Controle biológico” (Melo, I. S.; Azevedo, J. L. - Editores). Jagariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, **2**, 263-304, 2000.

LÓPEZ, J.A.; BARRILLAS, W.; “Granulosin, a new chromone from *Galipea granulosa*” *J. Nat. Prod.* **60**, 24, 1997.

LÓPEZ, J.A.; BARRILLAS, W.; GOMEZ-LAURITO, J.; MARTÍN, G.E.; LIN, F.; ALREHAILY, A.J.; ZEMAITIS, M.A.; SCHIFF, JR., P.L.; “Galiposin: A new  $\beta$ -hydroxychalcone from *Galipea granulosa*” *Planta Med.* **64**, 76, 1998.

LORENZI, H. “Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil”. Nova Odessa: Ed. Plantarum, 351, 1992.

MAFEZOLI, J.; “Atividade tripanocida e antimicrobiana de plantas da família Rutaceae”. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química, UFSCar, Tese de Doutorado, 2001, 21-25p.

MAGNANI, R.F.; “Aspectos químicos envolvidos nas interações de *Citrus* com fitopatógenos”. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química, UFSCar, Tese de Doutorado, 2007, 18-21p.

MAPA [Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento]; “Programas oficiais de combate a pragas quarentenárias presentes”. ([www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br)), acessado 03/02/2010.

MARQUES, A.S.F.; “Estudo fitoquímico de três espécies de rutaceae e avaliação biológica de produtos naturais em modelos celulares e bioquímicos de tripanossomatídeos”. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química, UFSCar, Tese de Doutorado, 2006, 14-16p.

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

MCONIE, K. C.; “The latent occurrence in citrus and others hosts of a *Guignardia easiluy* confused with *G. citricarpa*, the citrus black spot pathogens”. *Phytopathology*, Lancaster, **54**, 40-43, 1964.

MESTER, I.; “The occurrence of the alkaloids in Rutaceae.” *Fitoterapia*, **44**, 123, 1973.

MESTER, I.; "Structural diversity and distribution of the alkaloids in the Rutales" *In* "Chemistry and Chemical taxonomy of the Rutales". (P.G. WATERMAN e M.F. GRUDON, editores), Academic Press, London, 31, 1983.

MAGALHÃES, C.M.I.; "Avaliação da atividade antimicrobiana de plantas da família Rutaceae". Rio Claro. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Dissertação de Mestrado, 2001, 20-22.

MICHAEL, J.P.; "Quinoline, quinazoline, and acridone alkaloids". *Nat. Prod. Rep.* **9**, 25, 1992.

NORDBY, H. E.; NAGY, S.; "Friedelin, the major component of grapefruit Epicuticular Wax". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **42**, 708-713, 1994.

NOVAIS, T.S.; COSTA, J.F.O.; DAVID, J.P.L.; DAVID, J.M.; QUEIROZ, L.P.; FRANÇA, F.; GIULIETTI, A.M.; SOARES, M.B.P.; SANTOS, R.R.; "Atividade antibacteriana de alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro". *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **13**, 5-8, 2003.

OPENSHAW, H.T.; *in* "The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology". (R.H.F. MANSKE & H.L. HOLMS, editores) Vol. III, p.65. Academic Press, NY, 1953.

PACHECO, A.G.; DE OLIVEIRA, P.M.; PILÓ-VELOSO, D.; ALCÂNTARA, A. F. DE C.; "13C-NMR data of diterpenes isolated from *Aristolochia* species" *Molecules*, **14**, 1245-1262, 2009.

PALDUGIN, V. A.; "Empirical correlation between the structure and optical activity of *Cistus labdaniferus* diterpenoids". *Khimiya Prirodnykh Soedinenii*. **2**, 169-174, 1981.

PIRANI, J.R.; "Estudos taxonômicos em Rutaceae.: Revisão de *Helietta* e *Balfourodendron* (Pteleinae), Análise cladística de Pteleinae, Sinopse de Rutaceae do Brasil" São Paulo, Universidade de São Paulo, Tese de Doutorado, 1999 35-39p.

PIRANI, J.R., F. F. BEGALE, SILVA F.G.; "*Rutaceae in Flora brasiliensis* revisitada". ([http://florabrasiliensis.cria.org.br/search?taxon\\_id=5912](http://florabrasiliensis.cria.org.br/search?taxon_id=5912)), acessado 25/03/2009.

Plant Systematics (<http://www.plantsystematics.org/taxpage/0/genus/Galipea.html>), acessado 12/11/2009.

PORTER, D.M.; ELIAS, T.S.; "Flora of Panamá: Rutaceae". *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **66**, 123-164, 1979.

PURCARO, R.; SCHRADER, K. K.; BURANDT, C.; DELLAGRECA, M.; MEEPAGALA, K. M.; "Algicide Constituents from *Swinglea glutinosa*". *J. Agric. and Food Chem.* **57**, 10632-10634, 2009.

RAKOTOSON, J.H.; FABRE, N.; JACQUEMOND-COLLET, I.; HANNEDOUCHE, S.; FOURASTÉ, I.; MOULIS, C.; "Alkaloids from *Galipea officinalis*" *Planta Med.* **64**, 762, 1998.

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, Tese de Doutorado, 2006, 17-18p.

RICHTER, H.G.; DALLWITZ, M.J. “Madeiras Comerciais: Descrições, Ilustrações, Identificação e Informação” 2000. (<http://delta-intkey.com/wood/pt/index.htm>), acessado 15/12/2010.

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 13º 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).

SEVERINO, R. P.; GUIDO, R. V. C.; MARQUES, E. F.; BRÖMME, D.; DA SILVA, M. F. DAS G.; FERNANDES, J. B.; ADRICOPULO, A. D.; VIEIRA, P. C.; “Acridone alkaloids as potent inhibitors of cathepsin V”. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **19**, 1477–1481, 2011.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J.; “Spectrometric identification of organic compounds”, 6ª ed, John Wiley & Sons, 1-35, 2005.

SOUZA, A.C.; “Frutas cítricas: singularidades do Mercado”. *Preços Agrícolas* 8-10, 2001.

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

The Swingle Plant Anatomy Reference Collection (<http://www.bio.miami.edu/whitlock/Swingle.html>), acessado 23/04/2010.

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, Dissertação de Mestrado, 2005, 19-21p.

TOFFANO, L.; “Efeito dos extratos do albedo de *Citrus sinensis*. *Lentinula edodes*, *Agaricus blazei* e dos compostos orgânicos voláteis produzidos por *Saccharomyces cerevisiae* no controle da mancha preta do citros”. Piracicaba, Universidade de São Paulo - USP/ESALQ, Tese de Doutorado, 2010, 24-17p.

Top Tropicals ([http://toptropicals.com/cgi-bin/store/tt\\_search.cgi](http://toptropicals.com/cgi-bin/store/tt_search.cgi)), acessado 17/09/2010.

TIMMER, L.W.; GARNSEY, S.M.; GRAHAM, J.H.; “Compendium of citrus diseases”. 2 ed., St. Paul: APS Press, 92, 2000.

VASCONCELOS, J.M.J.; SILVA, A.M.S.; CAVALEIRO, J.A.S.; "Chromones and flavonones from *Artemisia campestris* subsp. *marítima*". *Phytochemistry*, **49**, 1421-1424, 1998.

VEIGA, T.A.M.; "Fitoquímica de *Raputia praetermissa* (Rutaceae) e busca por candidatos a herbicidas inibidores da fotossíntese a partir de produtos naturais". São Carlos, Programa de Pós-graduação em Química, UFSCar, Tese de Doutorado, 2008, 25-27p.

VELOZO, E. DA S.; "Fitoquímica comparada dos gêneros *Angostura*, *Almeida* e *Rauia* (Rutaceae)". São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química, UFSCar, Tese de Doutorado, 1995.

VIEIRA, P.C.; KUBO, I.; "Moluscicidal quinoline alkaloids from *Galipea bracteata*". *Phytochemistry*, **29**, 813, 1990, 25-29p.

VIEIRA, P.C.; KUBO, I.; "Moluscicidal quinoline alkaloids from *Angostura paniculata*: isolation structure and synthesis". *J. Nat. Prod.* **55**, 1112, 1992.

WATERMAN, P.G.; "The chemical systematic of alkaloids: a review emphasizing the contribution of Robert Hegnauer". *Biochem. Syst. Ecol.*, **26**, 395, 1999.

WENIGER, B.; UM, B-H.; VALENTIN, A.; ESTRADA, A.; LOBSTEIN, A.; ANTON, R.; MAILLÉ, M.; SAUVAIN, M.; "Bioactive Acridone Alkaloids from *Swinglea glutinosa*". *J. Nat. Prod.*, **64**, 1221-1223, 2001.

WENIGER, B.; UM, B-H.; VALENTIN, A.; ESTRADA, A.; LOBSTEIN, A.; ANTON, R.; MAILLÉ, M.; SAUVAIN, M.; "Bioactive Acridone Alkaloids from *Swinglea glutinosa*". *J. Nat. Prod.*, **64**, 1221-1223, 2001.

WICKERT, E.; DE GOES, A.; LEMOS, E.G. DE M.; DE SOUZA, A.; DA SILVEIRA, E.R.; PEREIRA, F.D.; RINALDO, D.; "Relações filogenéticas e diversidade de isolados de *Guignardia* spp. oriundos de diferentes hospedeiros nas regiões ITS1-5,8S-ITS2". *Ver. Bras. Frutic.* **31**, 360-380, 2009.

WIRASUTISNA, K.R.; GLEYE, J.; MOULIS, C.; STANILAS, E.; MORETTI, C.; "Galipein, a new coumarin from *Galipea trifoliata*". *Phytochemistry*, **26**, 3372, 1987.

ZANATTA, F.; GANDOLFI, R.B.; LEMOS, M.; TICONA, J.C.; GIMENEZ, A.; CLASEN, B.K.; CECHINEL FILHO, V.; DE ANDRADE, S.F.; "Gastroprotective activity of alkaloids extract and 2-phenylquinoline obtained from the bark of *Galipea longiflora* Krause (Rutaceae)". *Chemico-Biological Interactions*, **180**, 312-317, 2009.