

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

**“ESTUDO QUÍMICO DE PLANTAS DO GÊNERO *Hortia*, DO
FUNGO *Guignardia citricarpa* E AVALIAÇÃO DE SEUS
POTENCIAIS EFEITOS BIOLÓGICOS”**

VANESSA GISELE PASQUALOTTO SEVERINO *

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

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

*Bolsista: FAPESP

São Carlos-SP

2011

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

S498eq

Severino, Vanessa Gisele Pasqualotto.

Estudo químico de plantas do gênero *Hortia*, do fungo *Guignardia citricarpa* e avaliação de seus potenciais efeitos biológicos / Vanessa Gisele Pasqualotto Severino. -- São Carlos : UFSCar, 2011.

394 p.

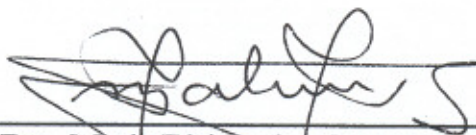
Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Química orgânica. 2. Produtos naturais (Química orgânica). 3. Atividade biológica. 4. Substâncias químicas. 5. Microorganismos. I. Título.

CDD: 547 (20^a)

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

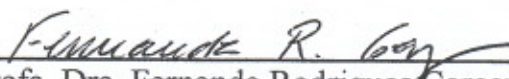
*Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de tese de doutorado da candidata **Vanessa Gisele Pasqualotto Severino**, realizada em 26 de outubro de 2011:*



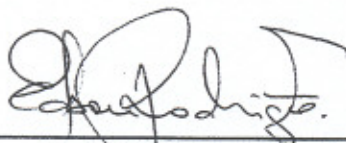
Prof. Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva



Prof. Dra. Angela Regina Araujo



Prof. Dra. Fernanda Rodrigues Garcez



Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho



Prof. Dra. Dulce Helena Siqueira Silva

Dedico esta tese...

*Aos meus pais, Conceição e Celso,
meu irmão, Vinicius, e meu marido Maico, pelo amor, apoio e
dedicação em todos os momentos.*

Morre lentamente ...

“Morre lentamente quem se transforma em escravo do hábito, repetindo todos os dias os mesmos trajetos, quem não muda de marca, não se arrisca a vestir uma nova cor ou não conversa com quem não conhece.

Morre lentamente quem faz da televisão o seu guru.

Morre lentamente quem evita uma paixão, quem prefere o negro sobre o branco e os pontos sobre os “is” em detrimento de um redemoinho de emoções, justamente as que resgatam o brilho dos olhos, sorrisos dos bocejos, corações aos tropeços e sentimentos.

Morre lentamente quem não vira a mesa quando está infeliz com o seu trabalho, quem não arrisca o certo pelo incerto para ir atrás de um sonho, quem não se permite pelo menos uma vez na vida, fugir dos conselhos sensatos.

Morre lentamente quem não viaja, quem não lê, quem não ouve música, quem não encontra graça em si mesmo.

Morre lentamente quem destrói o seu amor-próprio, quem não se deixa ajudar.

Morre lentamente, quem passa os dias queixando-se da sua má sorte ou da chuva incessante.

Morre lentamente, quem abandona um projeto antes de iniciá-lo, não pergunta sobre um assunto que desconhece ou não responde quando lhe indagam sobre algo que sabe.

Evitemos a morte em doses suaves, recordando sempre que estar vivo exige um esforço muito maior que o simples facto de respirar. Somente a perseverança fará com que conquistemos um estágio esplêndido de felicidade.”

Pablo Neruda

AGRADECIMENTOS

À Deus pelas oportunidades concedidas a mim e por iluminar sempre a minha vida.

À professora Dra. Maria Fátima pela orientação, amizade, apoio, confiança e estímulo à pesquisa, sendo, indubitavelmente, um exemplo de vida a seguir.

Aos professores que participaram da banca de defesa desta tese, obrigada pelas considerações e contribuições.

Aos professores do departamento de Química da UFSCar, em especial, aos professores Dr. João Batista Fernandes, Dr. Paulo Cezar Vieira, Dr. Edson Rodrigues Filho e Dr. Moacir Rossi Forim, que direta ou indiretamente participaram da evolução deste trabalho e pela excelente convivência durante todos esses anos.

Aos amigos e professores dos laboratórios de RMN, Síntese Orgânica, Síntese de Produtos Naturais, CLAE, LaBioMMi e Inorgânica do DQ-UFSCar, pela ajuda prestada neste trabalho, amizade e excelente convivência.

Aos amigos do Laboratório de Produtos Naturais da UFSCar, que não citarei nomes por serem muitos, pela amizade, ensinamentos, apoio, prestatividade e imensa colaboração especialmente na etapa final deste trabalho. MUITO OBRIGADA!

*À aluna de Iniciação Científica Daniela, pelo auxílio no estudo químico de *G. citricarpa*, amizade e apoio em todo o trabalho desta tese.*

*À Ana Paula, Sônia e Sâmya, pelo auxílio na implantação dos ensaios biológicos frente ao fungo *G. citricarpa* junto ao laboratório de Produtos Naturais da UFSCar.*

*À Sônia, pela realização dos ensaios biológicos frente ao fungo *G. citricarpa*, amizade e excelente convivência.*

A todo corpo técnico e secretárias do departamento de Química da UFSCar, em especial à Roberta, Priscila, Luciana, Dorai, Paulo e Valdir, pelos serviços prestados, por terem contribuído de forma direta com esta tese através da realização de experimentos, pela amizade e convivência durante estes anos.

Ao Dr. Marcos A. Machado, Dra. Ana Carla Oliveira da Silva Pinhati e toda equipe do Centro de Citricultura APTA Citros “Sylvio Moreira”, Instituto Agrônomo de

Campinas-IAC, Estação de Cordeirópolis-SP pela doação de um isolado de G. citricarpa para os trabalhos desta tese.

Ao professor Dr. Javier Alcides Ellena e a equipe do Laboratório de Cristalografia do Instituto de Física de São Carlos – USP pela realização do experimento de difração de Raio-X.

Ao professor Dr. Norberto Peporine Lopes e ao José Carlos Tomaz da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP, pelas análises em espectrometria de massas de alta resolução.

Ao professor Dr. Sérgio Florentino Pascholati e toda a equipe do Departamento de Fitopatologia da ESALQ- USP- Piracicaba, pela orientação, ensinamentos e imensa contribuição na realização dos ensaios biológicos frente ao fungo G. citricarpa.

Ao professor Dr. Carlos Henrique Gomes Martins e aos alunos do Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada - UNIFRAN, em especial ao Rodrigo Lucarini, pela amizade, ensinamentos, carinho e imensa contribuição na realização dos ensaios biológicos frente às bactérias X. fastidiosa, S. sanguinis, S. salivarius, M. tuberculosis, M. kansasii e M. avium.

Ao professor Dr. Luciano Morais Lião e aos alunos do Laboratório de RMN do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás – Goiânia, pela realização de alguns experimentos apresentados nesta tese.

À Universidade Federal de Goiás – Campus Catalão (UFG-CAC), em especial aos colegas e amigos do departamento de Química, pelo apoio e compreensão na finalização deste trabalho.

À minha família pelo amor, apoio, incentivo e orações.

Ao Maico, pelo amor incondicional, carinho, dedicação, companherismo e compreensão sempre. MEU ETERNO AGRADECIMENTO!

À minha segunda família, família Severino, pelo amor, carinho e apoio.

À FAPESP pela concessão da bolsa.

Aos órgãos de fomento FAPESP, CNPq e CAPES pelo suporte financeiro.

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AcOEt	acetato de etila
BuOH	butanol
CCD	cromatografia em camada delgada
CCDP	cromatografia em camada delgada preparativa
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CL-EM	cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas
CG-EM	cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
CoA	coenzima A
COSY	correlação ^1H - ^1H (CO rrelation S pectroscop Y)
<i>d</i>	dubleto
<i>dd</i>	duplo dubleto
<i>ddd</i>	duplo duplo dubleto
DEPT	espectro de ^{13}C com seleção de carbonos (D istortionless E nhancement by P olarization T ransfer)
<i>dl</i>	dubleto largo
DMAPP	dimetilalil difosfato
DMSO	dimetilsulfóxido
DMSO- <i>d</i> ₆	dimetilsulfóxido deuterado
<i>dt</i>	duplo tripleto
EtOH	etanol
FM	fórmula molecular
h	altura da sílica na coluna de vidro
HMBC	correlação heteronuclear ^1H - ^{13}C a duas e três ligações (H eteronuclear M ultiple B ond C orrelation)

HRESI-MS	espectro de massas de alta resolução com ionização eletrospray (H igh R esolution E lectron S pray I onization M ass S pectra)
HSQC	correlação heteronuclear ^1H - ^{13}C a uma ligação (H eteronuclear S ingle Q uantum C orrelation)
IE	impacto eletrônico
<i>J</i>	constante de acoplamento
<i>m</i>	multiplete
<i>m/z</i>	relação massa/carga
mM	milimolar
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
nm	nanômetro
NOE	efeito nuclear de overhauser (N uclear O verhauser E ffect)
NOESY	espectroscopia de efeito nuclear de overhauser (N uclear O verhauser E ffect S pectroscop Y)
ppm	parte por milhão
<i>s</i>	singleto
SAM	adenosil metionina (S -Adenosyl- M ethionine)
<i>t</i>	tripleto
<i>tl</i>	tripleto largo
t_r	tempo de retenção
UFC	unidade formadora de colônias
v/v	volume/volume
δ	deslocamento químico
Φ	diâmetro

LISTA DE TABELAS

➤ *Capítulo 01: Estudo Químico e Avaliação do Potencial Efeito Biológico de Plantas do Gênero Hortia*

TABELA 1.1: Ocorrência de derivados do ácido diidrocinâmico no gênero <i>Hortia</i> ...	5
TABELA 1.2: Ocorrência de derivado do ácido cinâmico no gênero <i>Hortia</i>	7
TABELA 1.3: Ocorrência de alcaloides no gênero <i>Hortia</i>	8
TABELA 1.4: Ocorrência de cumarinas no gênero <i>Hortia</i>	11
TABELA 1.5: Ocorrência de terpenoides no gênero <i>Hortia</i>	14
TABELA 1.6: Ocorrência de amidas no gênero <i>Hortia</i>	18
TABELA 1.7: Ocorrência de flavonoides no gênero <i>Hortia</i>	19
TABELA 1.8 - Massa obtida de material vegetal e extratos	29
TABELA 1.9: Subextratos provenientes do fracionamento do EMTHO	33
TABELA 1.10: Subextratos provenientes do fracionamento do EMTHS	37
TABELA 1.11: Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e correlações observadas no HMBC para a substância 01	54
TABELA 1.12: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da hortiolida A para comparação com alguns limonoides isolados neste trabalho	55
TABELA 1.13: Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e correlações observadas no HMBC para a substância 02	65
TABELA 1.14: Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e correlações observadas no HMBC para a substância 03	76
TABELA 1.15: Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e correlações observadas no HMBC para a substância 04	83
TABELA 1.16: Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e correlações observadas no HMBC para a substância 05	93
TABELA 1.17: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância 06 e comparação com dados da literatura	103
TABELA 1.18: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância 07 e comparação com dados da literatura	110
TABELA 1.19: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C e correlações observadas no HMBC para a substância 08	117
TABELA 1.20: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância 09 e comparação com dados da literatura	130
TABELA 1.21: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C e correlações observadas no HMBC para a substância 10	145
TABELA 1.22: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 11 e comparação com dados da literatura	164
TABELA 1.23: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 12 e comparação com dados da literatura	168
TABELA 1.24: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 13 e comparação com dados da literatura	172
TABELA 1.25: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 14 e comparação com dados da literatura	178
TABELA 1.26: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 15 e comparação com dados da literatura	182

TABELA 1.27: Dados de RMN ^1H e ^{13}C de 16 e comparação com dados da literatura	186
TABELA 1.28: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 17 e comparação com dados da literatura	190
TABELA 1.29: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 18 e comparação com dados da literatura	195
TABELA 1.30: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 19 e comparação com dados da literatura	204
TABELA 1.31: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 20 e comparação com dados da literatura	208
TABELA 1.32: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 21 e comparação com dados da literatura	212
TABELA 1.33: Composição do meio de cultura líquido PW	232
TABELA 1.34: Composição do meio de cultura sólido PCYE	233
TABELA 1.35: Composição do meio de cultura TSB	236
TABELA 1.36: Composição do meio de cultura BAS	236
TABELA 1.37: Amostras utilizadas no ensaio de inibição de <i>G. citricarpa</i> pelo método de incorporação da amostra no meio de cultura BDA	241
TABELA 1.38: Valores de CIM obtidos dos ensaios biológicos frente à <i>X. fastidiosa</i>	244
TABELA 1.39: Valores de CIM obtidos dos ensaios biológicos frente à <i>S. sanguinis</i> e <i>S. salivarius</i>	246
TABELA 1.40: Valores de CIM obtidos dos ensaios biológicos frente à <i>M. tuberculosis</i> , <i>M. avium</i> e <i>M. kansasii</i>	247
TABELA 1.41: Amostras naturais avaliadas frente à germinação de esporos e formação de apressórios de <i>G. citricarpa</i>	252

➤ **Capítulo 02: Estudo Químico e Avaliação do Potencial Efeito Biológico do Fungo *Guignardia citricarpa***

TABELA 2.1: Composição do Meio Batata/Dextrose (BD)	268
TABELA 2.2: Composição do Meio Czapeck	269
TABELA 2.3: Composição do Meio Czapeck enriquecido com 2% de extrato de malte	269
TABELA 2.4: Condições de eluição do método cromatográfico empregado para os extratos brutos de <i>G. citricarpa</i>	272
TABELA 2.5: Subextratos provenientes do fracionamento do EAML – 25D	277
TABELA 2.6: Subextratos provenientes do fracionamento do EEM – 25D	281
TABELA 2.7: Eluição gradiente utilizada durante as análises via CLAE-EM/EM	285
TABELA 2.8: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 01 e comparação com dados da literatura	296
TABELA 2.9: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 02 e comparação com dados da literatura	313
TABELA 2.10: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 03 e comparação com dados da literatura	318
TABELA 2.11: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 04 e comparação com dados da literatura	319
TABELA 2.12: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 05 e comparação com dados da literatura	332

TABELA 2.13: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 06 e comparação com dados da literatura	332
TABELA 2.14: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 07 e comparação com dados da literatura	340
TABELA 2.15: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 08 e comparação com dados da literatura	346
TABELA 2.16: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 09 e comparação com dados da literatura	352
TABELA 2.17: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 10 e comparação com dados da literatura	359
TABELA 2.18: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 11 e comparação com dados da literatura	364
TABELA 2.19: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 12 e comparação com dados da literatura	369
TABELA 2.20: Ácidos graxos que esterificam o glicerol isolado	374
TABELA 2.21: Valores de CIM dos extratos e subextratos de <i>G. citricarpa</i> avaliados frente à <i>X. fastidiosa</i>	376

LISTA DE FIGURAS

➤ *Capítulo 01: Estudo Químico e Avaliação do Potencial Efeito Biológico de Plantas do Gênero Hortia*

FIGURA 1.1: Estrutura do limonoide Hortiolida A	50
FIGURA 1.2: Espectro de RMN de ^1H de 01 (CDCl_3 , 400 MHz)	56
FIGURA 1.3: Espectro de RMN de ^{13}C de 01 (CDCl_3 , 100 MHz)	57
FIGURA 1.4: Mapa de contorno de g-HSQC de 01 (CDCl_3 , 400 MHz)	58
FIGURA 1.5: Mapa de contorno de g-HMBC de 01 (CDCl_3 , 400 MHz)	59
FIGURA 1.6: Espectro de g-COSY de 01 (CDCl_3 , 400 MHz)	60
FIGURA 1.7: Espectro de massas de 01 (HRESI-MS, modo positivo)	61
FIGURA 1.8: Espectro de RMN de ^1H de 02 (CDCl_3 , 400 MHz)	66
FIGURA 1.9: Espectro de RMN de ^{13}C de 02 (CDCl_3 , 100 MHz)	67
FIGURA 1.10: Mapa de contorno de g-HSQC de 02 (CDCl_3 , 400 MHz)	68
FIGURA 1.11: Mapa de contorno de g-HMBC de 02 (CDCl_3 , 400 MHz)	69
FIGURA 1.12: Espectro de g-COSY de 02 (CDCl_3 , 400 MHz)	70
FIGURA 1.13: Espectro de g-NOESY-1D de 02 irradiando H-17, H-12, Me-30 e Me-19 (CDCl_3 , 400 MHz)	71
FIGURA 1.14: Espectro de massas de 02 (HRESI-MS, modo positivo)	72
FIGURA 1.15: Estruturas obtidas por difração de raios X da substância 03	75
FIGURA 1.16: Conformações obtidas por difração de raios X da substância 03	75
FIGURA 1.17: Espectro de RMN de ^1H de 03 (CDCl_3 , 400 MHz)	77
FIGURA 1.18: Espectro de RMN de ^{13}C de 03 (CDCl_3 , 100 MHz)	78
FIGURA 1.19: Espectro de g-NOESY-1D de 03 irradiando H-15 e Me-30 (CDCl_3 , 400 MHz)	79
FIGURA 1.20: Espectro de massas de 03 (HRESI-MS, modo positivo)	80
FIGURA 1.21: Espectro de RMN de ^1H de 04 (CDCl_3 , 400 MHz)	84
FIGURA 1.22: Espectro de RMN de ^{13}C de 04 (CDCl_3 , 100 MHz)	85
FIGURA 1.23: Mapa de contorno de g-HSQC de 04 (CDCl_3 , 400 MHz)	86
FIGURA 1.24: Mapa de contorno de g-HMBC de 04 (CDCl_3 , 400 MHz)	87
FIGURA 1.25: Espectro de g-COSY de 04 (CDCl_3 , 400 MHz)	88
FIGURA 1.26: Ampliação do espectro de g-COSY de 04 (CDCl_3 , 400 MHz)	88
FIGURA 1.27: Espectro de g-NOESY-1D de 04 irradiando H-15, H-5 e Me-30 (CDCl_3 , 400 MHz)	89
FIGURA 1.28: Espectro de massas de 04 (HRESI-MS, modo positivo)	90
FIGURA 1.29: Espectro de RMN de ^1H de 05 (CDCl_3 , 400 MHz)	94
FIGURA 1.30: Espectro de RMN de ^{13}C de 05 (CDCl_3 , 100 MHz)	95
FIGURA 1.31: Mapa de contorno de g-HSQC de 05 (CDCl_3 , 400 MHz)	96
FIGURA 1.32: Mapa de contorno de g-HMBC de 05 (CDCl_3 , 400 MHz)	97
FIGURA 1.33: Espectro de g-COSY de 05 (CDCl_3 , 400 MHz)	98
FIGURA 1.34: Espectro de g-NOESY-1D de 05 irradiando H-17, H-15, H-11 e H-5 (CDCl_3 , 400 MHz)	99
FIGURA 1.35: Espectro de massas de 05 (HRESI-MS, modo positivo)	100
FIGURA 1.36: Espectro de RMN de ^1H de 06 (CDCl_3 , 400 MHz)	104
FIGURA 1.37: Espectro de RMN de ^{13}C de 06 (CDCl_3 , 100 MHz)	105

FIGURA 1.38: Espectro de g-NOESY-1D de 06 irradiando H-15, H-12b e Me-30 (CDCl ₃ , 400 MHz)	106
FIGURA 1.39: Espectro de massas de 06 (HRESI-MS, modo positivo)	107
FIGURA 1.40: Espectro de RMN de ¹ H de 07 (CDCl ₃ , 400 MHz)	111
FIGURA 1.41: Espectro de RMN de ¹³ C de 07 (CDCl ₃ , 400 MHz)	112
FIGURA 1.42: Espectro de massas de 07 (HRESI-MS, modo positivo)	113
FIGURA 1.43: Espectro de RMN de ¹ H de 08 (CDCl ₃ , 400 MHz)	118
FIGURA 1.44: Espectro de RMN de ¹³ C de 08 (CDCl ₃ , 100 MHz)	119
FIGURA 1.45: Mapa de contorno de g-HSQC de 08 (CDCl ₃ , 400 MHz)	120
FIGURA 1.46: Mapa de contorno de g-HMBC de 08 (CDCl ₃ , 400 MHz)	121
FIGURA 1.47: Espectro 01 de g-COSY de 08 (CDCl ₃ , 400 MHz)	122
FIGURA 1.48: Espectro 02 de g-COSY de 08 (CDCl ₃ , 400 MHz)	123
FIGURA 1.49: Espectro de g-NOESY-1D de 08 irradiando H-15, H-17, H-2, H-5, Me-19, Me-29, Me-18 e Me-28 (CDCl ₃ , 400 MHz)	124
FIGURA 1.50: Espectro de massas de 08 (HRESI-MS, modo positivo)	125
FIGURA 1.51: Espectro de RMN de ¹ H de 09 (CDCl ₃ , 400 MHz)	131
FIGURA 1.52: Espectro de RMN de ¹³ C de 09 (CDCl ₃ , 100 MHz)	132
FIGURA 1.53: Mapa de contorno de g-HSQC de 09 (CDCl ₃ , 400 MHz)	133
FIGURA 1.54: Mapa de contorno de g-HMBC de 09 (CDCl ₃ , 400 MHz)	134
FIGURA 1.55: Espectro de g-COSY de 09 (CDCl ₃ , 400 MHz)	135
FIGURA 1.56: Espectro de RMN de ¹ H de 10 (CDCl ₃ , 400 MHz)	146
FIGURA 1.57: Espectro de RMN de ¹³ C de 10 (CDCl ₃ , 100 MHz).....	147
FIGURA 1.58: Espectro de RMN de DEPT de 10 (CDCl ₃ , 100 MHz)	148
FIGURA 1.59: Mapa de contorno de g-HSQC de 10 (CDCl ₃ , 400 MHz)	149
FIGURA 1.60: Mapa de contorno de g-HMBC de 10 (CDCl ₃ , 400 MHz)	150
FIGURA 1.61: Ampliação 01 do espectro de g-COSY de 10 (CDCl ₃ , 400 MHz)	151
FIGURA 1.62: Ampliação 02 do espectro de g-COSY de 10 (CDCl ₃ , 400 MHz)	151
FIGURA 1.63: Ampliação 03 do espectro de g-COSY de 10 (CDCl ₃ , 400 MHz)	152
FIGURA 1.64: Espectro de g-NOESY-1D de 10 irradiando H-1, H-15, H-5, H-9, Me-28 e Me-30 (CDCl ₃ , 400 MHz)	153
FIGURA 1.65: Espectro de massas de 10 (HRESI-MS, modo positivo)	154
FIGURA 1.66: Espectro de RMN de ¹ H de 11 (CDCl ₃ , 400 MHz)	165
FIGURA 1.67: Espectro de RMN de ¹³ C de 11 (CDCl ₃ , 100 MHz)	166
FIGURA 1.68: Espectro de RMN de ¹ H de 12 (CDCl ₃ , 400 MHz)	169
FIGURA 1.69: Espectro de RMN de ¹³ C de 12 (CDCl ₃ , 100 MHz)	170
FIGURA 1.70: Espectro de RMN de ¹ H de 13 (CDCl ₃ , 400 MHz)	173
FIGURA 1.71: Espectro de RMN de ¹³ C de 13 (CDCl ₃ , 100 MHz)	174
FIGURA 1.72: Espectro de RMN de ¹ H de 14 (200 MHz, CDCl ₃)	179
FIGURA 1.73: Espectro de RMN de ¹³ C de 14 (50 MHz, CDCl ₃)	180
FIGURA 1.74: Espectro de RMN de ¹ H de 15 (200 MHz, CDCl ₃)	183
FIGURA 1.75: Espectro de RMN de ¹³ C de 15 (50 MHz, CDCl ₃)	184
FIGURA 1.76: Espectro de RMN de ¹ H de 16 (CDCl ₃ , 200 MHz)	187
FIGURA 1.77: Espectro de RMN de ¹³ C de 16 (CDCl ₃ , 50 MHz)	188
FIGURA 1.78: Espectro de RMN de ¹ H de 17 (CDCl ₃ , 400 MHz)	191
FIGURA 1.79: Espectro de RMN de ¹³ C de 17 (CDCl ₃ , 100 MHz)	192
FIGURA 1.80: Espectro de RMN de ¹ H de 18 (CDCl ₃ , 400 MHz)	196
FIGURA 1.81: Mapa de contorno de g-HSQC de 18 (CDCl ₃ , 400 MHz)	197

FIGURA 1.82: Mapa de contorno de g-HMBC de 18 (CDCl ₃ , 400 MHz)	198
FIGURA 1.83: Espectro de RMN de ¹ H de 19 (CDCl ₃ , 200 MHz)	205
FIGURA 1.84: Espectro de RMN de ¹³ C de 19 (CDCl ₃ , 50 MHz)	206
FIGURA 1.85: Espectro de RMN de ¹ H de 20 (CDCl ₃ , 200 MHz)	209
FIGURA 1.86: Espectro de RMN de ¹³ C de 20 (CDCl ₃ , 50 MHz)	210
FIGURA 1.87: Espectro de RMN de ¹ H de 21 (CDCl ₃ , 200 MHz)	213
FIGURA 1.88: Espectro de RMN de ¹³ C de 21 (CDCl ₃ , 50 MHz)	214
FIGURA 1.89: Vasos do xilema obstruídos por células de <i>X. fastidiosa</i>	219
FIGURA 1.90: <i>G. citricarpa</i> : a) picnidiósporos, características do apêndice (seta) do gênero <i>Phyllosticta</i> (...)	223
FIGURA 1.91: Ciclos primário e secundário da MPC	224
FIGURA 1.92: Metodologia do ensaio de inibição <i>in vitro</i> frente à <i>G. citricarpa</i> pelo método de germinação de esporos em placa de poliestireno	242
FIGURA 1.93: Conversão da resazurina em resorufina	243
FIGURA 1.94: Ensaio de inibição do crescimento micelial de <i>G. citricarpa in vitro</i> no 21º dia de experimento	249

➤ **Capítulo 02: Estudo Químico e Avaliação do Potencial Efeito Biológico
do Fungo *Guignardia citricarpa***

FIGURA 2.1: Meio de cultura BD com <i>G. citricarpa</i>	270
FIGURA 2.2: Meio de cultura Czapeck com <i>G. citricarpa</i>	270
FIGURA 2.3: Meio de cultura Czapeck enriquecido com 2% de extrato de malte com <i>G. citricarpa</i>	270
FIGURA 2.4: Espectro de RMN de ¹ H de 01 (CDCl ₃ , 500 MHz)	297
FIGURA 2.5: Ampliação 01 do espectro de RMN de ¹ H de 01 (CDCl ₃ , 500 MHz)	298
FIGURA 2.6: Ampliação 02 do espectro de RMN de ¹ H de 01 (CDCl ₃ , 500 MHz)	299
FIGURA 2.7: Ampliação 03 do espectro de RMN de ¹ H de 01 (CDCl ₃ , 500 MHz)	300
FIGURA 2.8: Ampliação 04 do espectro de RMN de ¹ H de 01 (CDCl ₃ , 500 MHz)	301
FIGURA 2.9: Ampliação 05 do espectro de RMN de ¹ H de 01 (CDCl ₃ , 500 MHz)	302
FIGURA 2.10: Espectro de RMN de ¹³ C de 01 (CDCl ₃ , 100 MHz)	303
FIGURA 2.11: Mapa de contorno de g-HSQC de 01 (CDCl ₃ , 500 MHz)	304
FIGURA 2.12: Mapa de contorno de g-HMBC de 01 (CDCl ₃ , 500 MHz)	305
FIGURA 2.13: Ampliação do mapa de contorno de g-HMBC de 01 (CDCl ₃ , 500 MHz)	306
FIGURA 2.14: Espectro de massas “full scan” de 01	307
FIGURA 2.15: Espectro de massas dos íons produtos de <i>m/z</i> 211 (energia de colisão 20 eV)	308
FIGURA 2.16: Espectro de massas de 02	312
FIGURA 2.17: Espectro de massas de 03	316
FIGURA 2.18: Espectro de massas de 04	317
FIGURA 2.19: Espectro de RMN de ¹ H de 02, 03 e 04 (D ₂ O, 400 MHz)	320
FIGURA 2.20: Ampliação 01 do espectro de RMN de ¹ H de 02, 03 e 04 (D ₂ O, 400 MHz)	321
FIGURA 2.21: Ampliação 02 do espectro de RMN de ¹ H de 02, 03 e 04 (D ₂ O, 400 MHz)	322

FIGURA 2.22: Ampliação 03 do espectro de RMN de ^1H de 02, 03 e 04 (D ₂ O, 400 MHz)	323
FIGURA 2.23: Ampliação 04 do espectro de RMN de ^1H de 02, 03 e 04 (D ₂ O, 400 MHz)	324
FIGURA 2.24: Espectro de RMN de ^{13}C de 02, 03 e 04 (D ₂ O, 100 MHz)	325
FIGURA 2.25: Mapa de contorno de g-HSQC de 02, 03 e 04 (D ₂ O, 100 MHz)	326
FIGURA 2.26: Mapa de contorno de g-HMBC de 02, 03 e 04 (D ₂ O, 100 MHz)	327
FIGURA 2.27: Espectro de g-COSY de 02, 03 e 04 (D ₂ O, 400 MHz)	328
FIGURA 2.28: Ampliação do espectro de g-COSY de 02, 03 e 04 (D ₂ O, 400 MHz)	329
FIGURA 2.29: Espectro de RMN de ^1H de 05 e 06 (MeOD, 400 MHz)	333
FIGURA 2.30: Espectro de RMN de ^{13}C de 05 e 06 (MeOD, 100 MHz)	334
FIGURA 2.31: Mapa de contorno de g-HSQC de 05 e 06 (MeOD, 400 MHz)	335
FIGURA 2.32: Mapa de contorno g-HMBC de 05 e 06 (MeOD, 400 MHz)	336
FIGURA 2.33: Espectro de g-COSY de 05 e 06 (MeOD, 400 MHz)	337
FIGURA 2.34: Espectro de RMN de ^1H de 05 e 07 (D ₂ O, 500 MHz)	341
FIGURA 2.35: Ampliação do espectro de RMN de ^1H de 05 e 07 (D ₂ O, 500 MHz) ...	342
FIGURA 2.36: Mapa de contorno de g-HSQC de 05 e 07 (D ₂ O, 500 MHz)	343
FIGURA 2.37: Mapa de contorno g-HMBC de 05 e 07 (D ₂ O, 500 MHz)	344
FIGURA 2.38: Espectro de RMN de ^1H de 08 (D ₂ O, 400 MHz)	347
FIGURA 2.39: Espectro de RMN de ^{13}C de 08 (MeOD, 100 MHz)	348
FIGURA 2.40: Espectro de massas de 08	349
FIGURA 2.41: Espectro de RMN de ^1H de 09 (MeOD, 400 MHz)	353
FIGURA 2.42: Ampliação do espectro de RMN de ^1H de 09 (MeOD, 400 MHz)	354
FIGURA 2.43: Espectro de RMN de ^{13}C de 09 (MeOD, 100 MHz)	355
FIGURA 2.44: Mapa de contorno de g-HSQC de 09 (MeOD, 400 MHz)	356
FIGURA 2.45: Mapa de contorno g-HMBC de 09 (MeOD, 400 MHz)	357
FIGURA 2.46: Espectro de g-COSY de 09 (MeOD, 400 MHz)	358
FIGURA 2.47: Espectro de RMN de ^1H de 10 (CDCl ₃ , 400 MHz)	360
FIGURA 2.48: Espectro de RMN de ^{13}C de 10 (CDCl ₃ , 100 MHz)	361
FIGURA 2.49: Espectro de RMN de ^1H de 11 (200 MHz, CDCl ₃)	365
FIGURA 2.50: Espectro de RMN de ^{13}C de 11 (50 MHz, CDCl ₃)	366
FIGURA 2.51: Espectro de CG-EM de 11 (IE – 70 eV)	367
FIGURA 2.52: Espectro de RMN de ^1H de 12 (MeOD, 500 MHz)	370
FIGURA 2.53: Mapa de contorno de g-HSQC de 12 (MeOD, 500 MHz)	371
FIGURA 2.54: Mapa de contorno de g-HMBC de 12 (MeOD, 500 MHz)	372
FIGURA 2.55: Espectro de RMN de ^1H de 13 (200 MHz, CDCl ₃)	374

LISTA DE FLUXOGRAMAS

➤ *Capítulo 01: Estudo Químico e Avaliação do Potencial Efeito Biológico de Plantas do Gênero Hortia*

FLUXOGRAMA 1.1: Preparação dos extratos das espécies de <i>Hortia</i>	28
FLUXOGRAMA 1.2: Fracionamento do extrato EMTSHO	30
FLUXOGRAMA 1.3: Partição líquido-líquido do extrato EMTHO	33
FLUXOGRAMA 1.4: Refracionamento dos subextratos EMTHO 1 e 2	35
FLUXOGRAMA 1.5: Refracionamento do subextrato EMTHO 3	36
FLUXOGRAMA 1.6: Partição líquido-líquido do extrato EMTHS	37
FLUXOGRAMA 1.7: Refracionamento do subextrato EMCHS 1	38
FLUXOGRAMA 1.8: Refracionamento do subextrato EMTHS 2	39
FLUXOGRAMA 1.9: Fracionamento do extrato EMTHB	40

➤ *Capítulo 02: Estudo Químico e Avaliação do Potencial Efeito Biológico do Fungo *Guignardia citricarpa**

FLUXOGRAMA 2.1: Partição líquido-líquido do EAML – 25D	276
FLUXOGRAMA 2.2: Fracionamento do EAMLH – 25D	277
FLUXOGRAMA 2.3: Fracionamento do EAML D – 25D	278
FLUXOGRAMA 2.4: Fracionamento do EBML – 25D	279
FLUXOGRAMA 2.5: Fracionamento do EBML – 35D	280
FLUXOGRAMA 2.6: Partição líquido-líquido do EEM – 25D	281
FLUXOGRAMA 2.7: Fracionamento do EEMA – 25D	282
FLUXOGRAMA 2.8: Fracionamento do EEMD – 25D/EEMD – 35D	283

LISTA DE GRÁFICOS

➤ *Capítulo 01: Estudo Químico e Avaliação do Potencial Efeito Biológico de Plantas do Gênero Hortia*

GRÁFICO 1.1: Avaliação do crescimento micelial de <i>G. citricarpa</i> na presença de extratos e substâncias isoladas de <i>Hortia</i>	250
GRÁFICO 1.2: Avaliação da germinação de esporos de <i>G. citricarpa</i> (em valor absoluto) na presença de extratos e substâncias isoladas de <i>Hortia</i>	253
GRÁFICO 1.3: Avaliação da germinação de esporos de <i>G. citricarpa</i> (em %) na presença de extratos e substâncias isoladas de <i>Hortia</i>	253
GRÁFICO 1.4: Avaliação da formação de apressórios de <i>G. citricarpa</i> (em valor absoluto) na presença de extratos e substâncias isoladas de <i>Hortia</i>	254
GRÁFICO 1.5: Avaliação da formação de apressórios de <i>G. citricarpa</i> (em %) na presença de extratos e substâncias isoladas de <i>Hortia</i>	254

LISTA DE ESQUEMAS

➤ **Capítulo 01: Estudo Químico e Avaliação do Potencial Efeito Biológico de Plantas do Gênero *Hortia***

ESQUEMA 1.1: Biogênese dos limonoides	155
ESQUEMA 1.2: Proposta de biogênese para os limonoides 9-hidróxi-hortiolida A (substância 01) e 9,11-desidro-12 α -hidróxi-hortiolida A (substância 02)	156
ESQUEMA 1.3: Propostas de biogênese para os limonoides hortiolida C (substância 03) e 6-hidróxi-hortiolida C (substância 04)	157
ESQUEMA 1.4: Propostas de biogênese para o limonoide 11 β -hidróxi-hortiolida C (substância 05)	158
ESQUEMA 1.5: Propostas de biogênese para os limonoides hortiolida D (substância 06), hortiolida E (substância 07) e 12 β -hidróxi-hortiolida E (substância 08)	159
ESQUEMA 1.6: Proposta de biogênese para o limonoide limonina (substância 09) ..	160
ESQUEMA 1.7: Proposta de biogênese para o limonoide (<i>S</i>)-1-acetóxi-7-desoxo-7 α -hidróxi-ichangina (substância 10)	161
ESQUEMA 1.8: Proposta biogenética para os derivados do ácido diidrocinâmico	175
ESQUEMA 1.9: Proposta de biogênese para alcaloides do tipo 2-quinolona	199
ESQUEMA 1.10: Proposta de biogênese para alcaloides do tipo furoquinolínico	200
ESQUEMA 1.11: Proposta de biogênese para alcaloides do tipo indolopiridoquinazolínico	201
ESQUEMA 1.12: Biossíntese da umbelliferona	215
ESQUEMA 1.13: Proposta de biogênese para a furanocumarina bergapteno	216
ESQUEMA 1.14: Proposta de biogênese para as piranocumarinas seselina e 5-metoxiseselina	216

➤ **Capítulo 02: Estudo Químico e Avaliação do Potencial Efeito Biológico do Fungo *Guignardia citricarpa***

ESQUEMA 2.1: Procedimento de cultivo e extração de <i>G. citricarpa</i>	271
ESQUEMA 2.2: Propostas de fragmentações para a substância 01	308
ESQUEMA 2.3: Propostas de fragmentações para a substância 08	349
ESQUEMA 2.4: Reações químicas sofridas pela glicose para a produção de 11	363
ESQUEMA 2.5: Proposta de fragmentação de 11	367

LISTA DE CROMATOGRAMAS

➤ ***Capítulo 02: Estudo Químico e Avaliação do Potencial Efeito Biológico do Fungo *Guignardia citricarpa****

CROMATOGRAMA 2.1: Experimento de “ <i>full scan</i> ” de 01	307
CROMATOGRAMA 2.2: Cromatograma de 02 obtido durante a análise de CL-UV-EM	312
CROMATOGRAMA 2.3: Cromatograma de 03 obtido durante a análise de CL-UV-EM	316
CROMATOGRAMA 2.4: Cromatograma de 04 obtido durante a análise de CL-UV-EM	317

RESUMO

ESTUDO QUÍMICO DE PLANTAS DO GÊNERO *HORTIA*, DO FUNGO *GUIGNARDIA CITRICARPA* E AVALIAÇÃO DE SEUS POTENCIAIS EFEITOS BIOLÓGICOS – O estudo químico de plantas do gênero *Hortia* descrito neste trabalho visou contribuir com a quimiosistemática da família Rutaceae e também com o posicionamento correto do gênero dentro da mesma. O estudo das espécies *H. oreadica* Groppo, Kallunki e Pirani, *H. brasiliiana* Vand. ex DC. e *H. superba* Ducke levou ao isolamento de 21 substâncias: dez limonoides, três derivados do ácido diidrocinâmico, cinco alcaloides (dois furoquinolínicos, um 2-quinolona e dois indoloquinazolínicos) e três cumarinas (uma furano cumarina linear e duas piranocumarinas angulares). A união dos dados de metabólitos secundários do gênero *Hortia* obtidos neste e em estudos prévios permitiu propor um posicionamento para este gênero na intersecção de Rutoideae e Toddalioideae, mas próximo à Flindersioideae. Vários ensaios biológicos foram realizados com extratos vegetais e compostos isolados das três espécies de *Hortia* e as atividades biológicas mais expressivas foram dos alcaloides rutaecarpina (frente à *Xylella fastidiosa* e *Mycobacterium tuberculosis*) e N-metil-4-metóxi-2-quinolona (frente à *Guignardia citricarpa*), dos limonoides hortiolida C (frente à *X. fastidiosa* e *Streptococcus sanguinis*), hortilida D (frente à *Streptococcus salivarius*), hortiolida E (frente à *S. sanguinis* e *S. salivarius*), do derivado do ácido diidrocinâmico ácido 3-[2,6-dimetóxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':4,5)-fenil]-propiônico (frente à *M. tuberculosis* e *G. citricarpa*) e da cumarina 5-metóxi-seselina (frente à *G. citricarpa*). O estudo do fungo fitopatogênico *G. citricarpa* visou contribuir com o conhecimento da química deste micro-organismo. Após estudos de otimização do meio de cultura líquido (batata-dextrose, Czapeck e Czapeck enriquecido com 2% de extrato de malte) e período de crescimento (05 a 45 dias) apropriados para *G. citricarpa*, este fungo foi desenvolvido em escala ampliada em batata-dextrose por um período de 25 e 35 dias. Os extratos brutos foram

submetidos a fracionamentos cromatográficos, obtendo-se treze substâncias de diferentes classes de metabólitos secundários, sendo quatro dicetopiperazinas [ciclo-(prolina-leucina), ciclo-(fenilalanina-tirosina), ciclo-(prolina-tirosina) e ciclo-(prolina-fenilalanina)], uma base nitrogenada (uracila), três nucleosídeos (uridina, 5-metil-uridina e inosina), um aminoácido (triptofano), um álcool aromático (tirosol), um furfuraldeído (5-hidróxi-metil-furfuraldeído), um derivado do ácido benzóico (ácido 4-hidróxi-benzóico) e um triglicerídeo. O isolamento do tirosol neste trabalho instiga novas investigações sobre a possível função do mesmo no evento da patogenicidade em Citros, uma vez que há alguns relatos na literatura sobre estudos da atividade sinalizadora e auto-reguladora desta molécula em alguns fungos endofíticos. Extratos brutos de *G. citricarpa* foram avaliados frente à *X. fastidiosa* e os resultados obtidos revelaram valores de CIM bastante interessantes e promissores, estimulando a continuidade deste estudo. Portanto, a partir do trabalho descrito nesta tese verificou-se que algumas substâncias naturais com propriedades antimicrobianas revelaram-se como importantes fontes na descoberta de novos produtos com potencial bioativo.

ABSTRACT

CHEMICAL INVESTIGATION OF PLANTS BELONGING TO THE GENUS *HORTIA* AND OF THE FUNGUS *GUIGNARDIA CITRICARPA* . EVALUATION OF THEIR POTENTIAL BIOLOGICAL EFFECTS. The chemical investigation of plants belonging to the genus *Hortia* described here aimed at contributing to the chemosystematics of the family Rutaceae as well as to the correct placement of this genus within this family. Study involving the species *H. oreadica* Groppo, Kallunki and Pirani; *H. brasiliiana* Vand. ex DC.; and *H. superba* Ducke led to the isolation of 21 compounds, more specifically ten limonoids, three dihydrocinnamic acid derivatives, five alkaloids (two furan quinolinic, one 2-quinolone, and two indoloquinazolinone) and three coumarins (one linear furanocoumarin and two angular pyranocoumarins). Taking together all the data obtained on secondary metabolites from the genus *Hortia* in the present study as well as in previous works, it was possible to propose the positioning of this genus in the intersection of Rutoideae and Toddalioideae, but close to Flindersioideae. Various biological assays were conducted by using plant extracts and isolated compounds from three *Hortia* species, and the most significant activities were detected for rutaecarpine (against *Xylella fastidiosa* and *Mycobacterium tuberculosis*) and N-methyl-4-methoxy-2-quinolone (against *Guignardia citricarpa*); for the limonoids hortiolide C (against *X. fastidiosa* and *Streptococcus sanguinis*), hortiolide D (against *Streptococcus salivarius*), and hortiolide E (against *S. sanguinis* and *S. salivarius*); for the dihydrocinnamic acid derivative 3-[2,6-dimethoxy-6',6'-dimethylpyran-(2',3':4,5)-phenyl]-propionic acid (against *M. tuberculosis* and *G. citricarpa*); and for the coumarin 5-methoxy-seseline (against *G. citricarpa*). Investigation of the phytopathogenic fungus *G. citricarpa* aimed at acquiring knowledge about the chemistry of this microorganism. After optimization of the liquid culture medium (potato-dextrose, Czapeck and Czapeck enriched with 2% malt extract) and growth period (05 to 45 days) appropriate for *G. citricarpa*, this

fungus was developed at a larger scale using potato-dextrose for 25 to 35 days. The crude extracts were submitted to fractionation by chromatography, which furnished 13 different compounds of different classes of secondary metabolites, namely four diketopiperazines [cyclo-(proline-leucine), cyclo-(phenylalanine-tyrosine), cyclo-(proline-tyrosine), and cyclo-(proline-phenylalanine)], one nitrogen base (uracil), three nucleosides (uridine, 5-methyl-uridine, and inosine), one amino acid (tryptophan), one aromatic alcohol (tyrosol), one furfuraldehyde (5-hydroxy-methyl-furfuraldehyde), one benzoic acid derivative (4-hydroxy-benzoic acid), and one triglyceride. The isolation of tyrosol motivated new investigations on its possible role in pathogenicity events in Citrus, since there are some literature reports on its signaling and autoregulation activities in some endophytic fungi. Crude extracts from *G. citricarpa* were assayed against *X. fastidiosa*. The results revealed promising MIC values, prompting continuation of this study. In conclusion, the work described in this thesis has demonstrated that some natural compounds displaying antimicrobial activity have potential application as lead compounds for the discovery of novel bioactive compounds.

SUMÁRIO

➤ *Capítulo 01: Estudo Químico e Avaliação do Potencial Efeito Biológico de Plantas do Gênero Hortia*

1. Estudo Químico de Plantas do Gênero <i>Hortia</i>	2
1.1 Introdução	2
1.1.1 Posicionamento taxonômico do gênero <i>Hortia</i>	2
1.1.2 Perfil químico do gênero <i>Hortia</i>	4
1.2 Objetivos	23
1.2.1 Objetivos gerais	23
1.2.3 Objetivos específicos	23
1.3 Parte Experimental	25
1.3.1 Materiais	25
1.3.2 Equipamentos	25
1.3.3 Metodologia do estudo químico das espécies de <i>Hortia</i>	27
1.3.3.1 Preparação dos extratos vegetais	27
1.3.3.2 Fracionamento dos extratos vegetais e isolamento das substâncias de <i>H. oreadica</i> Groppo, Kallunki e Pirani, <i>H. superba</i> e <i>H. brasiliana</i> Vand. ex DC	29
1.3.3.2.1 Fracionamento do extrato metanólico do tronco subterrâneo de <i>H. oreadica</i> Groppo, Kallunki e Pirani	29
1.3.3.2.2 Fracionamento do extrato metanólico do tronco de <i>H. oreadica</i> Groppo, Kallunki e Pirani	33
1.3.3.2.2.1 Refracionamento de EMTHO 1 e 2	34
1.3.3.2.2.2 Refracionamento de EMTHO 3	36
1.3.3.2.3 Fracionamento do extrato metanólico do tronco de <i>H. superba</i>	37
1.3.3.2.3.1 Refracionamento do subextrato EMTHS 1	38
1.3.3.2.3.2 Refracionamento do subextrato EMTHS 2	39
1.3.3.2.4 Fracionamento do extrato metanólico do tronco de <i>H. brasiliana</i> Vand. ex DC.	40
1.4 Resultados e Discussões	41
1.4.1 Substâncias isoladas	41
1.4.2 Determinações estruturais dos limonoides isolados de plantas do gênero <i>Hortia</i> ...	47
1.4.2.1 9-hidróxi-hortiolida A – substância 01	49
1.4.2.2 9,11-desidro-12 α -hidróxi-hortiolida A – substância 02	62
1.4.2.3 Hortiolida C – substância 03	73
1.4.2.4 6-hidróxi-hortiolida C – substância 04	81
1.4.2.5 11 β -hidróxi-hortiolida C – substância 05	91
1.4.2.6 Hortiolida D – substância 06	101
1.4.2.7 Hortiolida E – substância 07	108
1.4.2.8 12 β -hidróxi-hortiolida E – substância 08	114
1.4.2.9 Limonina – substância 09	126
1.4.2.10(S)-1-acetóxi-7-desoxo-7 α -hidróxi-ichangina – substância 10	136
1.4.2.11 Biogênese dos limonoides	155

1.4.3 Identificações estruturais dos derivados do ácido diidrocinâmico isolados de plantas do gênero <i>Hortia</i>	162
1.4.3.1 Ácido 3-[3,6-dimetóxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':4,5)-fenil]-propiónico – substância 11	163
1.4.3.2 Ácido 3-[3,4-dimetóxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':5,6)-fenil]-propiónico – substância 12	167
1.4.3.3 Ácido 3-[2,6-dimetóxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':4,5)-fenil]-propiónico – substância 13	171
1.4.3.4 Biogênese dos derivados do ácido diidrocinâmico	175
1.4.4 Identificações estruturais dos alcaloides isolados de plantas do gênero <i>Hortia</i>	176
1.4.4.1 γ -fagarina – substância 14	177
1.4.4.2 Esquimianina – substância 15	181
1.4.4.3 N-metil-4-metóxi-2-quinolona – substância 16	185
1.4.4.4 Rutaecarpina – substância 17	189
1.4.4.5 Hortiacina – substância 18	193
1.4.4.6 Biogênese dos alcaloides	199
1.4.5 Identificações estruturais das cumarinas isoladas de plantas do Gênero <i>Hortia</i>	202
1.4.5.1 Bergapteno – substância 19	202
1.4.5.2 Seselina – substância 20	207
1.4.5.3 5-metóxi-seselina – substância 21	211
1.4.5.4 Biogênese das cumarinas	215
2. Avaliação do Potencial Efeito Biológico de Plantas do Gênero <i>Hortia</i>	217
2.1 Introdução	217
2.1.1 Doenças citrícolas.....	218
2.1.1.1 Clorose Variada dos Citros (CVC)	218
2.1.1.2 Mancha Preta dos Citros (MPC)	221
2.1.2 Doenças relacionadas à patógenos da cárie	226
2.1.3 Doenças respiratórias	227
2.2 Objetivo	229
2.3 Parte Experimental	231
2.3.1 Ensaio biológico frente à <i>X. fastidiosa</i>	232
2.3.1.1 Meios de cultura	232
2.3.1.2 Padronização da densidade de <i>X. fastidiosa</i>	233
2.3.1.3 Preparo dos extratos vegetais e substâncias ensaiadas	234
2.3.2 Ensaio biológico frente à patógenos da cárie	235
2.3.2.1 Meios de cultura	235
2.3.2.2 Padronização da densidade dos inóculos	236
2.3.2.3 Preparo das substâncias ensaiadas	237
2.3.3 Ensaio biológico frente à micobactérias patogênicas	238
2.3.3.1 Meio de cultura e padronização da densidade dos inóculos	238
2.3.3.2 Preparo dos extratos vegetais e substâncias ensaiadas	238
2.3.4 Ensaio biológico frente à <i>G. citricarpa</i>	239
2.3.4.1 Ensaio de inibição do crescimento micelial, <i>in vitro</i> , pelo método de incorporação da amostra no meio de cultura	240
2.3.4.2 Ensaio de inibição de <i>G. citricarpa in vitro</i> pelo método de germinação de esporos e formação de apressórios	241
2.4 Resultados e Discussões	243
2.4.1 Ensaio biológico frente à <i>X. fastidiosa</i>	244

2.4.2 Ensaio biológico frente à patógenos da cárie	246
2.4.3 Ensaio biológico frente à micobactérias patogênicas	247
2.4.4 Ensaio biológico frente à <i>G. citricarpa</i>	248
2.4.4.1 Efeito dos extratos e substâncias naturais frente ao crescimento micelial de <i>G. citricarpa</i>	248
2.4.4.2 Efeito dos extratos e substâncias naturais frente à inibição da germinação de esporos e formação de apressórios de <i>G. citricarpa</i>	251
3. Conclusões do Capítulo 01	255

➤ **Capítulo 02: Estudo Químico e Avaliação do Potencial Efeito Biológico do Fungo *Guignardia citricarpa***

1. Estudo Químico do Fungo <i>Guignardia citricarpa</i>	260
1.1 Introdução	260
1.2 Objetivos	263
1.3 Parte Experimental	265
1.3.1 Materiais	265
1.3.2 Equipamentos	266
1.3.3 Metodologia do estudo químico do fungo <i>G. citricarpa</i>	267
1.3.3.1 Obtenção de <i>G. citricarpa</i>	267
1.3.3.2 Desenvolvimento de <i>G. citricarpa</i>	268
1.3.3.2.1 Escolha do meio de cultura para o desenvolvimento em escala ampliada ...	268
1.3.3.2.1.1 Extração dos metabólitos a partir dos três meios de cultura	271
1.3.3.2.1.2 Análise do perfil químico dos extratos brutos em três diferentes meios de cultura	272
1.3.3.2.2 Determinação do tempo necessário para o desenvolvimento de <i>G. citricarpa</i> no meio de cultura escolhido para o desenvolvimento em escala ampliada	274
1.3.3.2.3 Desenvolvimento de <i>G. citricarpa</i> em escala ampliada	275
1.3.3.3 Fracionamento dos extratos brutos e isolamento das substâncias de <i>G. citricarpa</i>	276
1.3.3.3.1 Fracionamento do extrato AcOEt do meio líquido - 25 Dias	276
1.3.3.3.2 Fracionamento do extrato BuOH do meio líquido - 25 Dias	279
1.3.3.3.3 Fracionamento do extrato BuOH do meio líquido - 35 Dias	280
1.3.3.3.4 Fracionamento dos extratos etanólicos dos micélios - 25 dias e 35 dias	281
1.3.3.4 Reação de transesterificação da substância 13	283
1.3.3.5 Condições utilizadas durante as análises das substâncias isoladas dos extratos de <i>G. citricarpa</i> por CLAE-EM/EM	284
1.4 Resultados e Discussões	287
1.4.1 Substâncias isoladas	287
1.4.2 Identificações Estruturais das Substâncias Isoladas	291
1.4.2.1 Ciclo-(prolina-leucina) – substância 01	291
1.4.2.2 Ciclo-(fenilalanina-tirosina), Ciclo-(prolina-tirosina), Ciclo-(prolina-fenilalanina) – substâncias 02, 03 e 04.....	308
1.4.2.3 Uridina e Uracila – substâncias 05 e 06	330
1.4.2.4 Uridina e Triptofano – substâncias 05 e 07	338
1.4.2.5 5-metil-uridina– substância 08	345
1.4.2.6 Inosina – substância 09	350

1.4.2.7 Tirosol – substância 10	359
1.4.2.8 5-hidróxi-metil-furfuraldeído – substância 11	362
1.4.2.9 Ácido 4-hidróxi-benzóico – substância 12	368
1.4.2.10 Triglicerídeo – substância 13	373
2. Avaliação do Potencial Efeito Biológico do Fungo <i>G. citricarpa</i>	375
2.1 Parte Experimental	375
2.2 Resultados e Discussões	376
3. Conclusões do Capítulo 02	379
Referências	381

*Capítulo 01: Estudo Químico e
Avaliação do Potencial Efeito Biológico
de Plantas do Gênero Hortia*

1. Estudo Químico de Plantas do Gênero *Hortia*

1.1 Introdução

1.1.1 Posicionamento taxonômico do gênero *Hortia*

Hortia é um gênero neotropical da família Rutaceae, tradicionalmente incluído na subfamília Toddalioideae e subtribo Toddaliinae (Engler, 1931). Este gênero é constituído por dez espécies distribuídas do Panamá ao estado de São Paulo (Brasil), sendo que a maioria delas ocorre na região Amazônica (GROPPO *et al.*, 2005). O posicionamento taxonômico do gênero *Hortia* revela contradições entre os antigos botânicos. DE CANDOLLE em 1824 dividiu a família Rutaceae em duas tribos, Diosmeae e Cusparieae, posicionando *Hortia* nesta última (DE CANDOLLE, 1824). BENTHAM & HOOKER em 1862 propuseram modificações taxonômicas, tornando a família Rutaceae um pouco mais abrangente; sete tribos foram formadas, adotando-se Cusparieae, de onde o gênero *Hortia* foi excluído e posicionado na tribo Toddalieae, mas com comentários de que a classificação era duvidosa (BENTHAM e HOOKER, 1862). O sistema de ENGLER proposto em 1931, com as modificações de SCHOLZ é o mais aceito pelos atuais botânicos. Este sistema é bastante semelhante àquele de Bentham & Hooker, e também não esclarece a classificação de *Hortia*, mantendo-o em Toddalieae (ENGLER, 1931; SCHOLZ, 1964). A similaridade química entre as subfamílias Rutoideae e Toddalioideae é tão pronunciada que levou da SILVA *et al.* (1988) a uní-las em uma única subfamília, Rutoideae, subdividindo-a em 17 tribos. Os gêneros americanos de Toddalioideae vieram a constituir três tribos dentro de Rutoideae e *Hortia* foi reposicionada em Cusparieae como fez anteriormente DE CANDOLLE (1824). Porém, as justificativas para isto não foram novamente convincentes, mostrando que os dados químicos revelam a mesma dificuldade para o posicionamento de *Hortia*. A única justificativa plausível para

reclassificá-la seria que *Hortia* é o único representante americano na subtribo Toddaliinae.

VANDELLI (1788) foi o primeiro a descrever o gênero *Hortia*, baseando-se em inúmeras coleções enviadas a ele do estado de Minas Gerais (Brasil), mas sem nomear nenhuma espécie. DE CANDOLLE (1824) descreveu *H. brasiliana* Vand. baseando-se em um espécime de VANDELLI depositado no herbário Jussieu, o qual foi coletado no sudeste de Minas Gerais e Rio de Janeiro. Neste mesmo ano, SAINT-HILAIRE descreveu arbustos coletados em Goiás e oeste de Minas Gerais como *H. brasiliana*. Contudo, ele sabia que este nome tinha sido aplicado a um espécime arborescente por DE CANDOLLE (1824). Porém, SAINT-HILAIRE (1824) comentou que o próprio DE CANDOLLE (1824) não havia coletado o espécime. ENGLER (1874) também atribuiu o nome de *H. brasiliana* a uma espécie arbustiva encontrada no Centro-Oeste do Brasil. Neste mesmo estudo ele descreveu uma espécie arborescente nova como *H. arborea* Engl.. Mais recentemente, GROPPPO *et al.* (2005) mostrou que *H. brasiliana* e *H. arborea* Engl. correspondiam à mesma espécie arborescente, sendo *H. brasiliana* Vand. ex DC. o nome correto, respeitando a nomenclatura botânica em que o nome dado pela primeira identificação é o válido. Portanto, *H. arborea* é um sinônimo de *H. brasiliana* Vand. ex DC. Finalmente, segundo o comentário anterior a espécie arbustiva encontrada no Centro-Oeste do Brasil continuava não nomeada, com isto GROPPPO *et al.* (2005) a denominou *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani.

Gleason (1933) descreveu *H. colombiana*, mas comentou que o exemplar era similar a *H. brasiliana* Vand. ex DC. Segundo GROPPPO *et al.* (2004, 2005) *H. colombiana* e *H. brasiliana* Vand. ex DC. referem-se à mesma espécie, sendo o nome desta última o válido. *H. badinii* M.A. Lisboa foi utilizado para designar um espécime de *Hortia*, mas este erro foi posteriormente corrigido por GROPPPO *et al.* (2005), o qual o reconheceu como *H. brasiliana* Vand. ex DC. Porém, *H. colombiana* Gleason, *H. badinii* M.A. Lisboa e *H.*

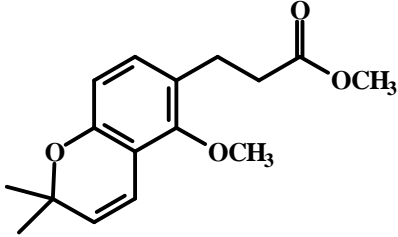
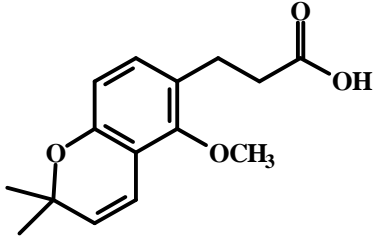
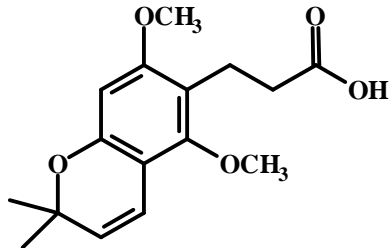
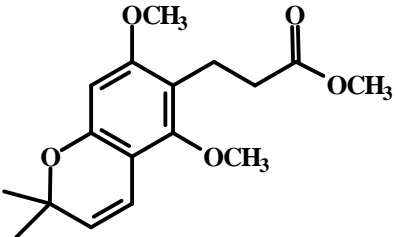
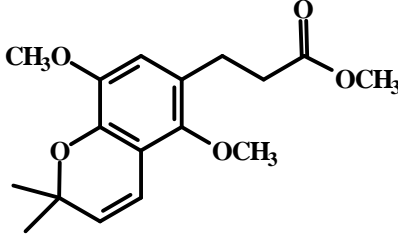
arborea Engl. serão citados nesta tese como eles aparecem na literatura, mas sempre indicando entre parênteses ou no rodapé o nome correto.

Finalmente, as dez espécies de *Hortia* corretamente identificadas são: *H. brasiliana* Vand. ex DC., *H. coccínea* Spruce ex Engl., *H. excelsa* Ducke, *H. longifolia* Spruce ex Engl., *H. neblinensis* Maguire & Boom, *H. nudipetala* Groppo, *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani, *H. regia* Sandwith, *H. superba* Ducke, *H. vandelliana* Groppo (GROPPO *et al.*, 2005, 2008, 2010).

1.1.2 Perfil químico do gênero *Hortia*

Segundo levantamento bibliográfico realizado em junho de 2011, há relato de estudo químico de cinco espécies de *Hortia*, sendo elas: *H. arborea* Engl. (nome correto: *H. brasiliana* Vand. ex DC.) (PACHTER *et al.*, 1957; PACHTER *et al.*, 1960; FERRACIN, 1992; MONACHE *et al.*, 1976; MONACHE *et al.*, 1977), *H. badinii* M.A. Lisboa (nome correto: *H. brasiliana* Vand. ex DC.) (CORRÊA *et al.*, 1975; CORRÊA *et al.*, 1979), *H. longifolia* Spruce ex Engl. (CORRÊA *et al.*, 1976; PÁDUA, 1976), *H. brasiliana* Vand. ex DC. (PACHTER *et al.*, 1961, BRAGA, 2005, SEVERINO, 2008), *H. colombiana* Gleason (nome correto: *H. brasiliana* Vand. ex DC.) (SUAREZ *et al.*, 1998, CUCA *et al.*, 1998, SUAREZ *et al.*, 2002), *H. regia* Sandwith (JACOBS *et al.*, 1986; JACOBS *et al.*, 1987; TINTO *et al.*, 1992), *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani (BRAGA, 2005; SEVERINO, 2008) e *H. superba* Ducke (BRAGA, 2005; SEVERINO, 2008). São relatados para este gênero metabólitos secundários como derivados do ácido diidrocinâmico (TABELA 1.1, ps. 05 a 07), derivado do ácido cinâmico (TABELA 1.2, p. 07), alcaloides (furoquinolínicos, 2-quinolonas e β -indoloquinazolínicos) (TABELA 1.3, ps. 08 a 11), cumarinas (simples, furanocumarinas e piranocumarinas) (TABELA 1.4, ps. 11 a 14), terpenóides (sesquiterpenos, triterpenos e limonoides) (TABELA 1.5, ps. 14 a 18), amidas (TABELA 1.6, ps. 18 a 19) e flavonoides (flavonas e flavanona) (TABELA 1.7, p. 19).

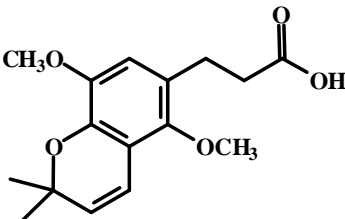
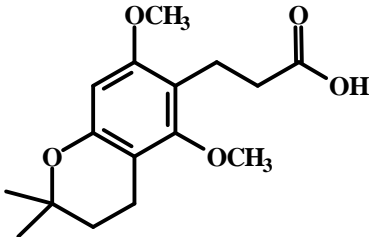
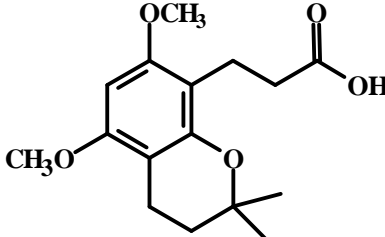
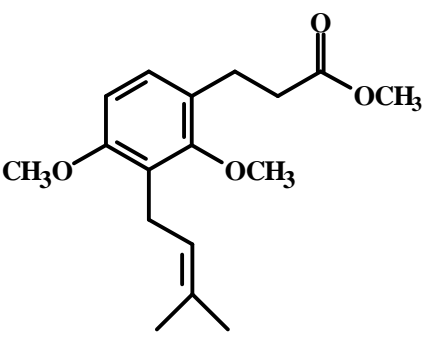
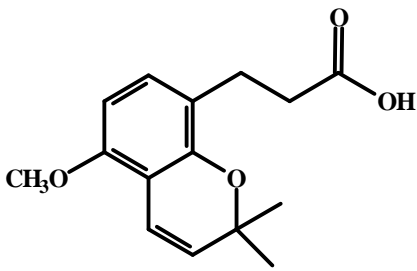
TABELA 1.1: Ocorrência de derivados do ácido diidrocinâmico no gênero *Hortia*

SUBSTÂNCIA	OCORRÊNCIA	REFERÊNCIA
<p>I)</p>  <p>3-[6-metóxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':4,5)-fenil]-propionato de metila</p>	<p>1- <i>H. badinii</i> M.A. Lisboa^a 2- <i>H. regia</i> Sandwith 3- <i>H. colombiana</i> Gleason^b 4- <i>H. oreadica</i> Groppo, Kallunki & Pirani 5- <i>H. brasiliana</i> Vand. ex DC.</p>	<p>1-CORRÊA <i>et al.</i>, 1975; CORRÊA <i>et al.</i>, 1979 2-TINTO <i>et al.</i>, 1992 3-SUAREZ <i>et al.</i>, 2002 4-BRAGA, 2005; SEVERINO, 2008 5-SEVERINO, 2008</p>
<p>II)</p>  <p>ácido 3-[6-metóxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':4,5)-fenil]-propionico</p>	<p>1- <i>H. regia</i> Sandwith 2- <i>H. colombiana</i> Gleason^b 3- <i>H. oreadica</i> Groppo, Kallunki & Pirani</p>	<p>1-TINTO <i>et al.</i>, 1992 2-SUAREZ <i>et al.</i>, 2002 3-BRAGA, 2005; SEVERINO, 2008</p>
<p>III)</p>  <p>ácido 3-[2,6-dimetóxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':4,5)-fenil]-propionico</p>	<p>1- <i>H. badinii</i> M.A. Lisboa^a 2- <i>H. oreadica</i> Groppo, Kallunki & Pirani 3- <i>H. brasiliana</i> Vand. ex DC.</p>	<p>1-CORRÊA <i>et al.</i>, 1975; CORRÊA <i>et al.</i>, 1979 2-BRAGA, 2005; SEVERINO, 2008 3-SEVERINO, 2008</p>
<p>IV)</p>  <p>3-[2,6-dimetóxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':4,5)-fenil]-propionato de metila</p>	<p>1- <i>H. badinii</i> M.A. Lisboa^a 2- <i>H. colombiana</i> Gleason^b 3- <i>H. oreadica</i> Groppo, Kallunki & Pirani</p>	<p>1-CORRÊA <i>et al.</i>, 1975; CORRÊA <i>et al.</i>, 1979 2-SUAREZ <i>et al.</i>, 2002 3-BRAGA, 2005; SEVERINO, 2008</p>
<p>V)</p>  <p>3-[3,6-dimetóxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':4,5)-fenil]-propionato de metila</p>	<p>1- <i>H. colombiana</i> Gleason^b 2- <i>H. oreadica</i> Groppo, Kallunki & Pirani 3- <i>H. brasiliana</i> Vand. ex DC.</p>	<p>1-SUAREZ <i>et al.</i>, 2002 2-BRAGA, 2005; SEVERINO, 2008 3-SEVERINO, 2008</p>

^a*H. badinii* M.A.Lisboa (nome correto é *H. brasiliana* Vand. ex DC.)

^b*H. colombiana* Gleason (nome correto é *H. brasiliana* Vand. ex DC.)

TABELA 1.1: continuação

SUBSTÂNCIA	OCORRÊNCIA	REFERÊNCIA
<p>VI)</p>  <p>ácido 3-[3,6-dimetóxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':4,5)-fenil]-propionato de metila</p>	<p>1-<i>H. colombiana</i> Gleason^b 2-<i>H. oreadica</i> Groppo, Kallunki & Pirani</p>	<p>1-SUAREZ <i>et al.</i>, 2002 2-SEVERINO, 2008</p>
<p>VII)</p>  <p>ácido 3-[2,6-dimetóxi-4',5'-desidro-6',6'-dimetilpirano-(2',3':4,5)-fenil]-propiãoico</p>	<p>1-<i>H. badinii</i> M.A. Lisboa^a</p>	<p>1-CORRÊA <i>et al.</i>, 1975</p>
<p>VIII)</p>  <p>ácido 3-[2,4-dimetóxi-4',5'-desidro-6',6'-dimetilpirano-(2',3':5,6)-fenil]-propiãoico</p>	<p>1-<i>H. badinii</i> M.A. Lisboa^a</p>	<p>1-CORRÊA <i>et al.</i>, 1975</p>
<p>IX)</p>  <p>3-[2,4-dimetóxi-3-prenil-fenil] propionato de metila</p>	<p>1-<i>H. badinii</i> M.A. Lisboa^a</p>	<p>1-CORRÊA <i>et al.</i>, 1975</p>
<p>X)</p>  <p>ácido 3-[4-metóxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':5,6)-fenil]-propiãoico</p>	<p>1-<i>H. brasiliana</i> Vand. ex DC.</p>	<p>1-BRAGA, 2005</p>

^a*H. badinii* M.A.Lisboa (nome correto é *H. brasiliana* Vand. ex DC.)

^b*H. colombiana* Gleason (nome correto é *H. brasiliana* Vand. ex DC.)

TABELA 1.1: continuação

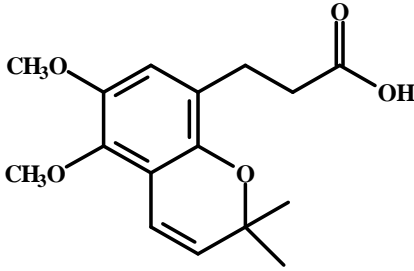
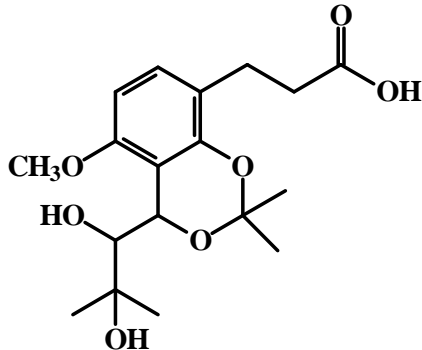
SUBSTÂNCIA	OCORRÊNCIA	REFERÊNCIA
<p>XI)</p>  <p>ácido 3-[3,4-dimetóxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':5,6)-fenil]-propionico</p>	<p>1-<i>H. brasiliiana</i> Vand. ex DC.</p>	<p>1- BRAGA, 2005</p>
<p>XII)</p>  <p>ácido 3-fenil-{2'',2''-dimetil-4''H-2',4''-dioxina-[4''-(2''',3'''-diidróxi-1'''-metil-propil)]}</p>	<p>1-<i>H. brasiliiana</i> Vand. ex DC.</p>	<p>1-BRAGA, 2005</p>

TABELA 1.2: Ocorrência de derivado do ácido cinâmico no gênero *Hortia*

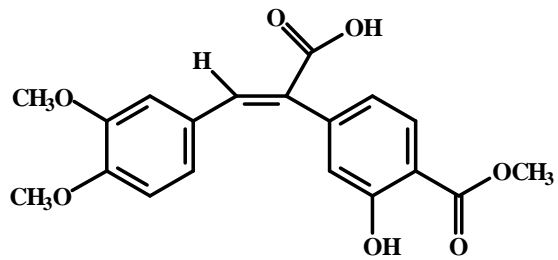
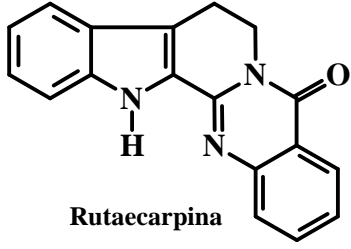
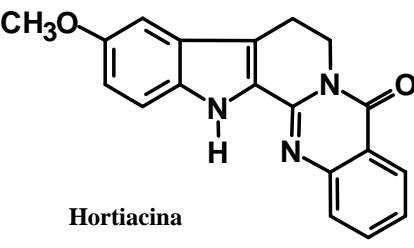
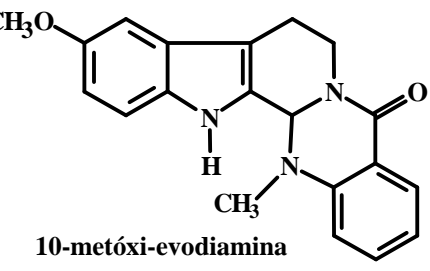
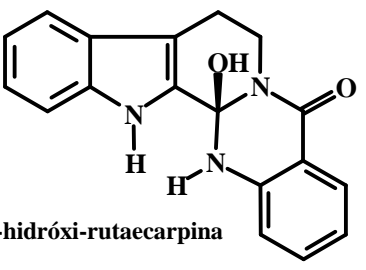
SUBSTÂNCIA	OCORRÊNCIA	REFERÊNCIA
<p>I)</p>  <p><i>E</i>-ácido 3,4-dimetóxi-alfa(3-hidróxi-4-carbometóxi-fenil) cinâmico</p>	<p>1-<i>H. oreadica</i> Groppo, Kallunki & Pirani</p>	<p>1-SEVERINO,2008</p>

TABELA 1.3: Ocorrência de alcaloides no gênero *Hortia*

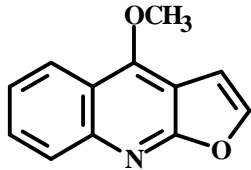
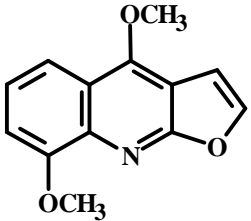
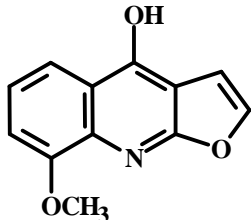
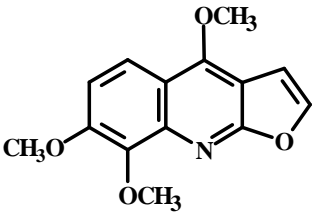
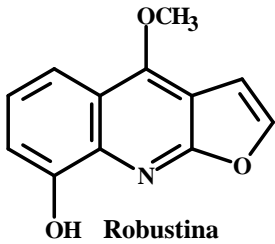
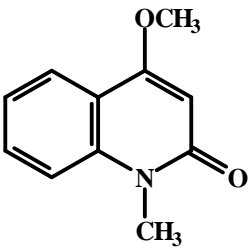
SUBSTÂNCIA	OCORRÊNCIA	REFERÊNCIA
β-INDOLOQUINAZOLÍNICOS		
<p>I)</p>  <p>Rutaecarpina</p>	<p>1-<i>H. arborea</i> Engl.^c 2-<i>H. badinii</i> M.A. Lisboa^a 3-<i>H. longifolia</i> Spruce ex Engl. 4-<i>H. colombiana</i> Gleason^b 5-<i>H. regia</i> Sandwith 6-<i>H. brasiliiana</i> Vand. ex DC. 7-<i>H. oreadica</i> Groppo, Kallunki & Pirani 8-<i>H. superba</i> Ducke</p>	<p>1-PACHTER <i>et al.</i>, 1957; PACHTER <i>et al.</i>, 1960; FERRACIN, 1992 2-CORRÊA <i>et al.</i>, 1975 3-CORRÊA <i>et al.</i>, 1976 4-CUCA <i>et al.</i>, 1998 5-JACOBS <i>et al.</i>, 1987 6, 7, 8-BRAGA, 2005; SEVERINO, 2008</p>
<p>II)</p>  <p>Hortiacina</p>	<p>1-<i>H. arborea</i> Engl.^c 2-<i>H. badinii</i> M.A. Lisboa^a 3-<i>H. longifolia</i> Spruce ex Engl. 4-<i>H. colombiana</i> Gleason^b 5-<i>H. brasiliiana</i> Vand. ex DC. 6-<i>H. oreadica</i> Groppo, Kallunki & Pirani</p>	<p>1-PACHTER <i>et al.</i>, 1957; PACHTER <i>et al.</i>, 1960 2-CORRÊA <i>et al.</i>, 1975 3-CORRÊA <i>et al.</i>, 1976 4-CUCA <i>et al.</i>, 1998 5-BRAGA, 2005; PACHTER <i>et al.</i>, 1961 6-BRAGA, 2005</p>
<p>III)</p>  <p>10-metóxi-evodiamina</p>	<p>1-<i>H. arborea</i> Engl.^c 2-<i>H. brasiliiana</i> Vand. ex DC.</p>	<p>1-PACHTER <i>et al.</i>, 1957; PACHTER <i>et al.</i>, 1960 2-PACHTER <i>et al.</i>, 1961</p>
<p>IV)</p>  <p>14-hidróxi-rutaecarpina</p>	<p>1-<i>H. arborea</i> Engl.^c</p>	<p>1-FERRACIN, 1992</p>

^a*H. badinii* M.A.Lisboa (nome correto é *H. brasiliiana* Vand. ex DC.)

^b*H. colombiana* Gleason (nome correto é *H. brasiliiana* Vand. ex DC.)

^c*H. arborea* Engl. (nome correto é *H. brasiliiana* Vand. ex DC.)

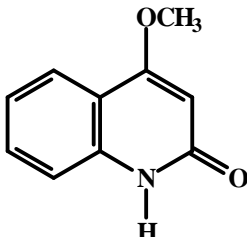
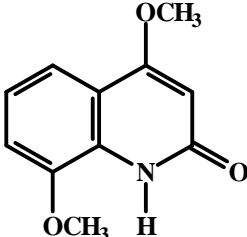
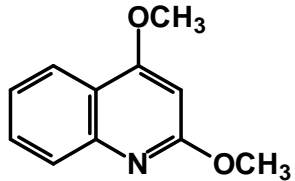
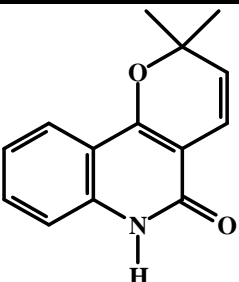
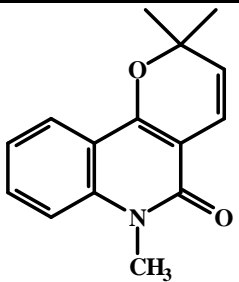
TABELA 1.3: continuação

SUBSTÂNCIA	OCORRÊNCIA	REFERÊNCIA
FUROQUINOLÍNICOS		
<p>V)</p>  <p>Dictamina</p>	<p>1-<i>H. arborea</i> Engl.^c 2-<i>H. longifolia</i> Spruce ex Engl. 3-<i>H. oreadica</i> Groppo, Kallunki & Pirani 4-<i>H. superba</i> Ducke</p>	<p>1-PACHTER <i>et al.</i>, 1960; FERRACIN, 1992 2-CORRÊA <i>et al.</i>, 1976 3, 4-BRAGA, 2005; SEVERINO, 2008</p>
<p>VI)</p>  <p>γ - fagarina</p>	<p>1-<i>H. arborea</i> Engl.^c 2-<i>H. colombiana</i> Gleason^b 3-<i>H. oreadica</i> Groppo, Kallunki & Pirani</p>	<p>1-PACHTER <i>et al.</i>, 1960 2-CUCA <i>et al.</i>, 1998 3-BRAGA, 2005</p>
<p>VII)</p>  <p>Nor-γ-fagarina</p>	<p>1-<i>H. arborea</i> Engl.^c</p>	<p>1-PACHTER <i>et al.</i>, 1960</p>
<p>VIII)</p>  <p>Esquimianina</p>	<p>1-<i>H. arborea</i> Engl.^c 2-<i>H. regia</i> Sandwith 3-<i>H. longifolia</i> Spruce ex Engl. 4-<i>H. colombiana</i> Gleason^b 5-<i>H. brasiliiana</i> Vand. ex DC.</p>	<p>1-PACHTER <i>et al.</i>, 1960; FERRACIN, 1992 2-JACOBS <i>et al.</i>, 1987 3-CORRÊA <i>et al.</i>, 1976 4-CUCA <i>et al.</i>, 1998 5-BRAGA, 2005</p>
<p>IX)</p>  <p>Robustina</p>	<p>1-<i>H. oreadica</i> Groppo, Kallunki & Pirani</p>	<p>1- BRAGA, 2005</p>
2-QUINOLONA		
<p>X)</p>  <p>N-metil-4-metóxi-2-quinolona</p>	<p>1-<i>H. longifolia</i> Spruce ex Engl. 2-<i>H. arborea</i> Engl.^c 3-<i>H. superba</i> Ducke</p>	<p>1-CORRÊA <i>et al.</i>, 1976 2-FERRACIN, 1992 3-BRAGA, 2005</p>

^b*H. colombiana* Gleason (nome correto é *H. brasiliiana* Vand. ex DC.)

^c*H. arborea* Engl. (nome correto é *H. brasiliiana* Vand. ex DC.)

TABELA 1.3: continuação

SUBSTÂNCIA	OCORRÊNCIA	REFERÊNCIA
2-QUINOLONA		
XI)  1(H)-4-metóxi-2-quinolona	1- <i>H. longifolia</i> Spruce ex Engl. 2- <i>H. superba</i> Ducke	1- PÁDUA, 1976 2- BRAGA, 2005
XII)  Edulitina	1- <i>H. superba</i> Ducke	1- BRAGA, 2005
2-QUINOLONA		
XIII)  Montanina	1- <i>H. colombiana</i> Gleason ^b	1-CUCA <i>et al</i> , 1998
XIV)  Flindersina	1- <i>H. colombiana</i> Gleason ^b 2- <i>H. superba</i> Ducke	1- CUCA <i>et al</i> , 1998 2- BRAGA, 2005
XV)  N-metil-flindersina	1- <i>H. colombiana</i> Gleason ^b 2- <i>H. superba</i> Ducke	1- CUCA <i>et al</i> , 1998 2- BRAGA, 2005; SEVERINO, 2008

^b*H. colombiana* Gleason (nome correto é *H. brasiliiana* Vand. ex DC.)

^c*H. arborea* Engl. (nome correto é *H. brasiliiana* Vand. ex DC.)

TABELA 1.3: continuação

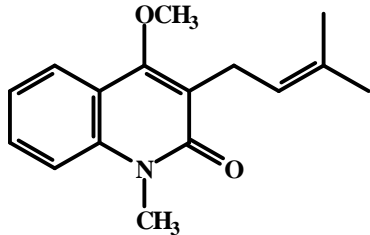
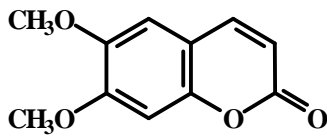
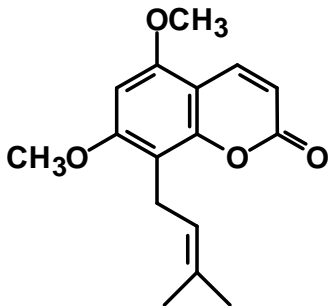
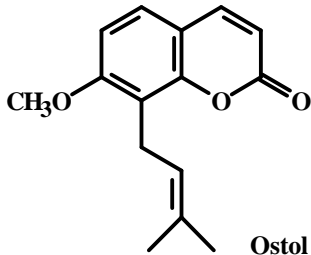
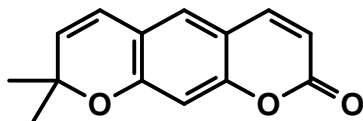
SUBSTÂNCIA	OCORRÊNCIA	REFERÊNCIA
2-QUINOLONA		
<p>XVI)</p>  <p>N-metil-antannina</p>	<p>1-<i>H. oreadica</i> Groppo, Kallunki & Pirani</p>	<p>1- BRAGA, 2005</p>

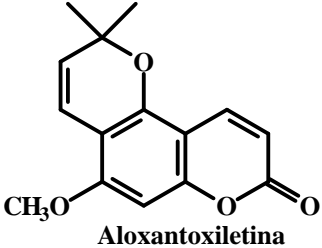
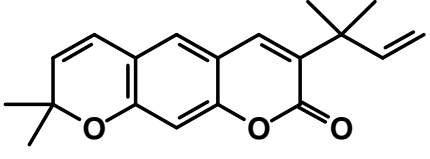
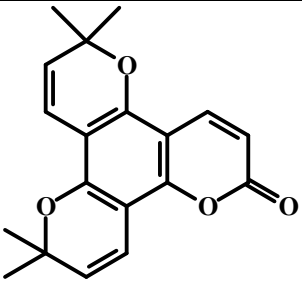
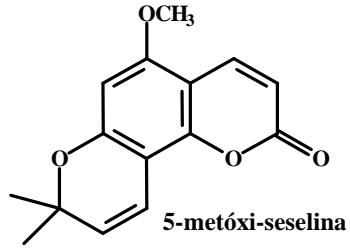
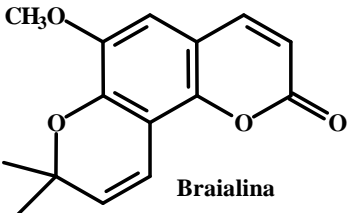
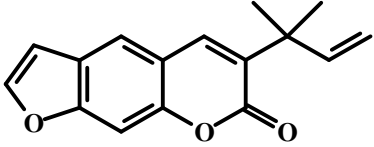
TABELA 1.4: Ocorrência de cumarinas no gênero *Hortia*

SUBSTÂNCIA	OCORRÊNCIA	REFERÊNCIA
SIMPLES		
<p>I)</p>  <p>Escoparona</p>	<p>1-<i>H. regia</i> Sandwith 2-<i>H. longifolia</i> Spruce ex Engl. 3-<i>H. arborea</i> Engl.^c 4-<i>H. oreadica</i> Groppo, Kallunki & Pirani</p>	<p>1-JACOBS <i>et al.</i>, 1987 2-CORRÊA <i>et al.</i>, 1976 3-FERRACIN, 1992 4-BRAGA, 2005</p>
<p>II)</p>  <p>5,7-dimetóxi-8-(3-metilbut-2-en-1-il)- 2H-cromen-2-ona</p>	<p>1-<i>H. badinii</i> M.A. Lisboa^a 2-<i>H. longifolia</i> Spruce ex Engl.</p>	<p>1-CORRÊA <i>et al.</i>, 1975 2-CORRÊA <i>et al.</i>, 1976</p>
<p>III)</p>  <p>Ostol</p>	<p>1-<i>H. arborea</i> Engl.^c</p>	<p>1-FERRACIN, 1992</p>
PIRANOCUMARINAS		
<p>IV)</p>  <p>Xantiletina</p>	<p>1-<i>H. arborea</i> Engl.^c</p>	<p>1-MONACHE <i>et al.</i>, 1976</p>

^a*H. badinii* M.A.Lisboa (nome correto é *H. brasiliiana* Vand. ex DC.)

^c*H. arborea* Engl. (nome correto é *H. brasiliiana* Vand. ex DC.)

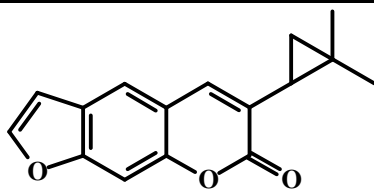
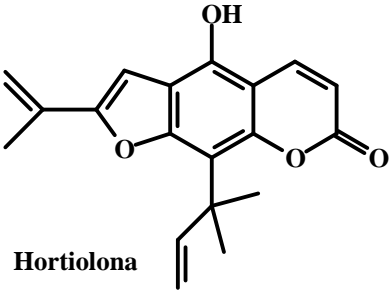
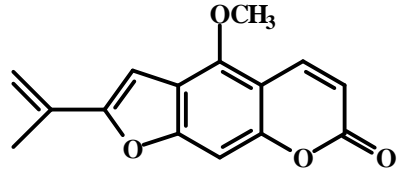
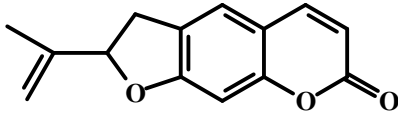
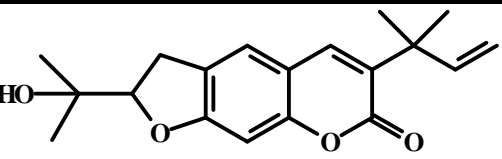
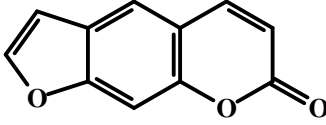
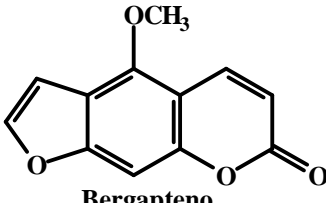
TABELA 1.4: continuação

SUBSTÂNCIA	OCORRÊNCIA	REFERÊNCIA
PIRANOCUMARINAS		
<p>V)</p>  <p style="text-align: center;">Aloxantoxiletina</p>	<p>1-<i>H. colombiana</i> Gleason^b</p>	<p>1-SUAREZ <i>et al.</i>, 2002</p>
<p>VI)</p>  <p style="text-align: center;">3-(1,1-dimetilprop-2-en-1-il)-8,8-dimetil-2H,8H pirano[3,2-g]cromen-2-ona</p>	<p>1-<i>H. arborea</i> Engl.^c</p>	<p>1-MONACHE <i>et al.</i>, 1976</p>
<p>VII)</p>  <p style="text-align: center;">6,6,10,10-tetrametil-2H,6H,10H-dipirano [2,3-f :2'-3'-h]cromen-2-ona</p>	<p>1-<i>H. arborea</i> Engl.^c</p>	<p>1-MONACHE <i>et al.</i>, 1976</p>
PIRANOCUMARINAS		
<p>VIII)</p>  <p style="text-align: center;">5-metóxi-seselina</p>	<p>1-<i>H. oreadica</i> Groppo, Kallunki & Pirani</p>	<p>1-BRAGA, 2005; SEVERINO, 2008</p>
<p>XI)</p>  <p style="text-align: center;">Braialina</p>	<p>1-<i>H. oreadica</i> Groppo, Kallunki & Pirani</p>	<p>1-BRAGA, 2005</p>
FURANOCUMARINAS		
<p>X)</p>  <p style="text-align: center;">3-(1,1-dimetilprop-2-en-1-il)-2H- furo[3,2-g]cromen-2-ona</p>	<p>1-<i>H. arborea</i> Engl.^c</p>	<p>1-MONACHE <i>et al.</i>, 1976</p>

^b*H. colombiana* Gleason (nome correto é *H. brasiliiana* Vand. ex DC.)

^c*H. arborea* Engl. (nome correto é *H. brasiliiana* Vand. ex DC.)

TABELA 1.4: continuação

SUBSTÂNCIA	OCORRÊNCIA	REFERÊNCIA
FURANOCUMARINAS		
<p>XI)</p>  <p>3-(2,2-dimetilciclopropil)-2H-furo[3,2-g]cromen-2-ona</p>	1- <i>H. arborea</i> Engl. ^c	1-MONACHE <i>et al.</i> , 1977
<p>XII)</p>  <p>Hortiolona</p>	1- <i>H. arborea</i> Engl. ^c	1-MONACHE <i>et al.</i> , 1977
<p>XIII)</p>  <p>(5-isopropenil)-5-metóxi-2H-furo[3,2-g]cromen-2-ona</p>	1- <i>H. arborea</i> Engl. ^c	1-MONACHE <i>et al.</i> , 1977
<p>XIV)</p>  <p>(5-isopropenil-4,5-diidro)-2H-furo[3,2-g]cromen-2-ona</p>	1- <i>H. arborea</i> Engl. ^c	1-MONACHE <i>et al.</i> , 1977
<p>XV)</p>  <p>Chalepina</p>	1- <i>H. arborea</i> Engl. ^c	1-MONACHE <i>et al.</i> , 1977
<p>XVI)</p>  <p>Psoraleno</p>	1- <i>H. oreadica</i> Groppo, Kallunki & Pirani	1-BRAGA, 2005
<p>XVII)</p>  <p>Bergapteno</p>	1- <i>H. oreadica</i> Groppo, Kallunki & Pirani	1- BRAGA, 2005

^c*H. arborea* Engl. (nome correto é *H. brasiliiana* Vand. ex DC.)

TABELA 1.4: continuação

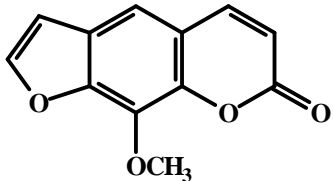
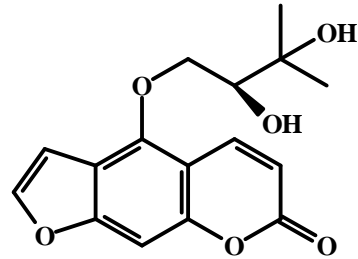
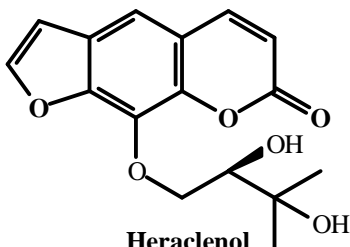
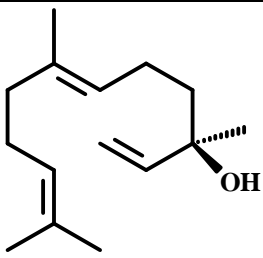
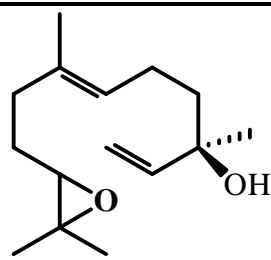
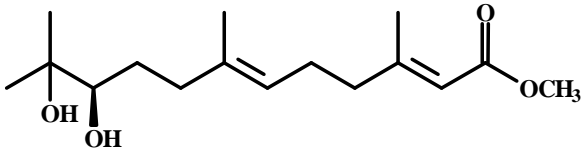
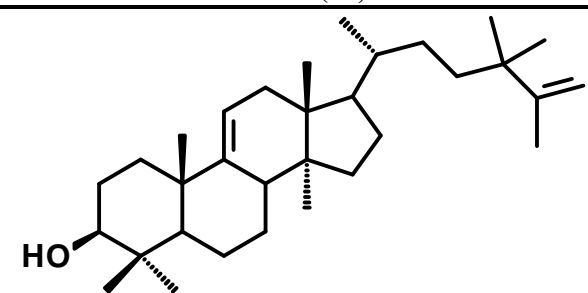
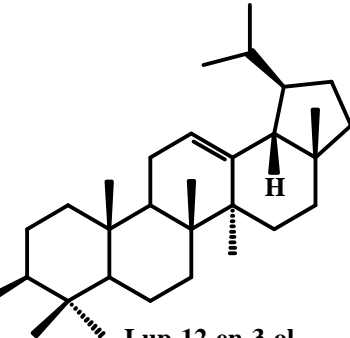
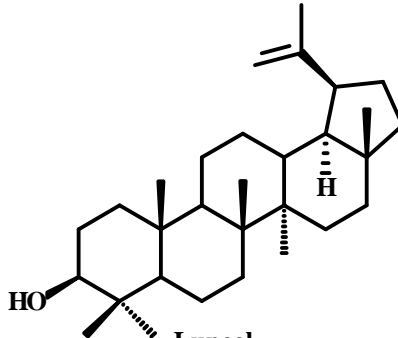
SUBSTÂNCIA	OCORRÊNCIA	REFERÊNCIA
FURANOCUMARINAS		
XVIII)  Xantoxina	1- <i>H. oreadica</i> Groppo, Kallunki & Pirani	1-BRAGA, 2005
XIX)  Prangol	1- <i>H. superba</i> Ducke	1-BRAGA, 2005
XX)  Heraclenol	1- <i>H. superba</i> Ducke	1-BRAGA, 2005

TABELA 1.5: Ocorrência de terpenóides no gênero *Hortia*

SUBSTÂNCIA	OCORRÊNCIA	REFERÊNCIA
SESQUITERPENOS		
D)  Nerolidol	1- <i>H. colombiana</i> Gleason ^b	1-SUAREZ <i>et al.</i> , 2002
II)  Epoxinerolidol	1- <i>H. colombiana</i> Gleason ^b	1-SUAREZ <i>et al.</i> , 2002

^b*H. colombiana* Gleason (nome correto é *H. brasiliana* Vand. ex DC.)

TABELA 1.5: continuação

SUBSTÂNCIA	OCORRÊNCIA	REFERÊNCIA
SESQUITERPENOS		
<p>III)</p>  <p>(2E,6E)-10,11-diidróxi-3,7,11-trimetildodeca-2,6-dienoato de metila</p>	<p>1-<i>H. regia</i> Sandwith</p>	<p>1-JACOBS <i>et al.</i>, 1987</p>
TRITERPENOS (04, 05 E 06 IDENTIFICADOS EM MISTURA)		
<p>IV)</p>  <p>24,24-dimetil-5alfa-lanosta-9(11),25-dien-3beta-ol</p>	<p>1-<i>H. arborea</i> Engl.^c</p>	<p>1-FERRACIN, 1992</p>
<p>V)</p>  <p>Lup-12-en-3-ol</p>	<p>1-<i>H. arborea</i> Engl.^c</p>	<p>1-FERRACIN, 1992</p>
<p>VI)</p>  <p>Lupeol</p>	<p>1-<i>H. arborea</i> Engl.^c</p>	<p>1-FERRACIN, 1992</p>

^b*H. colombiana* Gleason (nome correto é *H. brasiliana* Vand. ex DC.)

^c*H. arborea* Engl. (nome correto é *H. brasiliana* Vand. ex DC.)

TABELA 1.5: continuação

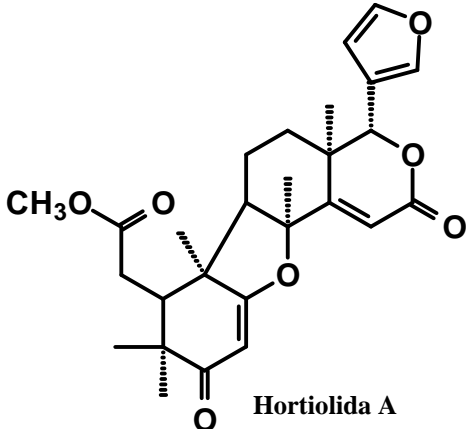
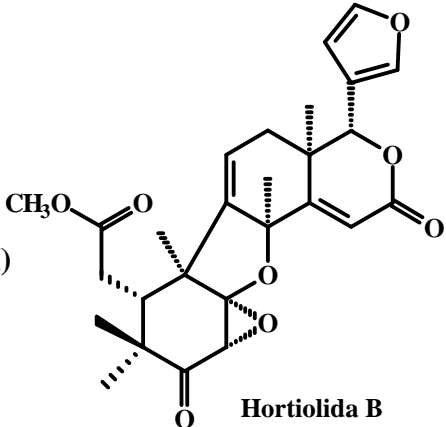
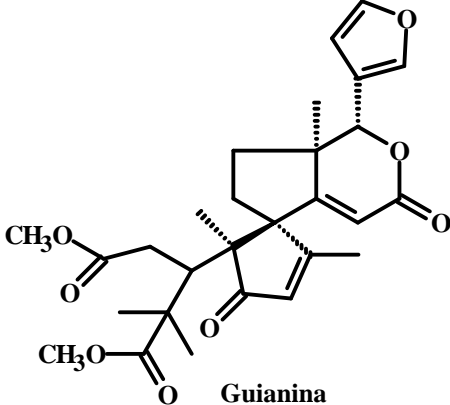
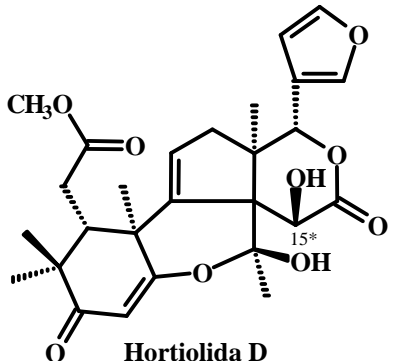
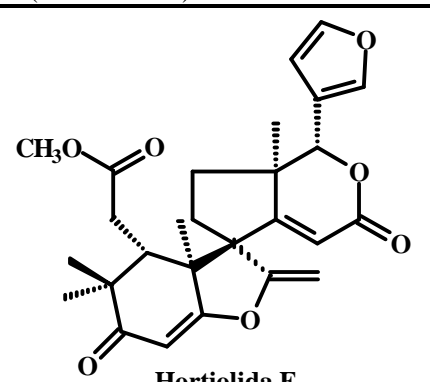
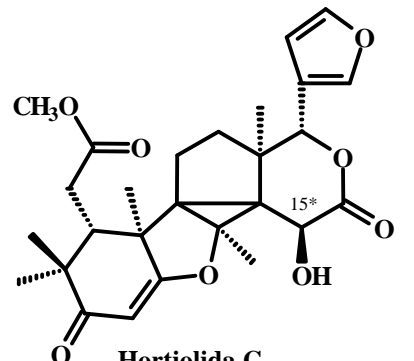
SUBSTÂNCIA	OCORRÊNCIA	REFERÊNCIA
LIMONOIDES		
<p>VII)</p>  <p style="text-align: center;">Hortiolida A</p>	<p>1-<i>H. colombiana</i> Gleason^b</p>	<p>1-SUÁREZ <i>et al.</i>, 1998; SUÁREZ <i>et al.</i>, 2002</p>
<p>VIII)</p>  <p style="text-align: center;">Hortiolida B</p>	<p>1-<i>H. colombiana</i> Gleason^b</p>	<p>1-SUÁREZ <i>et al.</i>, 2002</p>
<p>IX)</p>  <p style="text-align: center;">Guianina</p>	<p>1-<i>H. regia</i> Sandwith 2-<i>H. oreadica</i> Groppo, Kallunki & Pirani</p>	<p>1-JACOBS <i>et al.</i>, 1986 2-BRAGA, 2005; SEVERINO, 2008</p>

TABELA 1.5: continuação

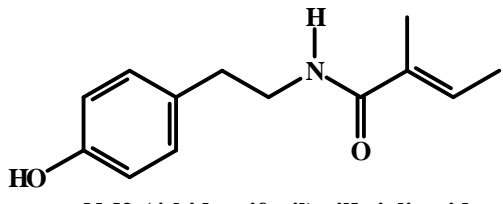
SUBSTÂNCIA	OCORRÊNCIA	REFERÊNCIA
LIMONOIDES		
<p>X)</p>  <p style="text-align: center;">Hortiolida D</p> <p>Observação → esta estrutura foi denominada por BRAGA (2005) de Hortiolida C e neste trabalho de Hortiolida D *A estereoquímica da hidroxila em C-15 foi corrigida nesta tese (substância 06)</p>	<p>1-<i>H. oreadica</i> Groppo, Kallunki & Pirani</p>	<p>1-BRAGA, 2005</p>
<p>XI)</p>  <p style="text-align: center;">Hortiolida E</p> <p>Observação → esta estrutura foi denominada por BRAGA (2005) de Hortiolida D e neste trabalho de Hortiolida E</p>	<p>1-<i>H. oreadica</i> Groppo, Kallunki & Pirani</p>	<p>1-BRAGA, 2005</p>
<p>XII)</p>  <p style="text-align: center;">Hortiolida C</p> <p>Observação → esta estrutura foi denominada por BRAGA (2005) e SEVERINO (2008) de Hortiolida E e neste trabalho de Hortiolida C *A estereoquímica da hidroxila em C-15 foi corrigida nesta tese (substância 03)</p>	<p>1-<i>H. superba</i> Ducke 2- <i>H. oreadica</i> Groppo, Kallunki & Pirani</p>	<p>1-BRAGA, 2005; SEVERINO 2008 2-SEVERINO, 2008</p>

XIII)	<p>9,11-desidro-12alfa-acetóxi-hortiolida A</p>	<p>1-<i>H. oreadica</i> Groppo, Kallunki & Pirani</p>	<p>1-BRAGA, 2005</p>
<p>Observação → esta estrutura foi denominada por BRAGA (2005) de Hortiolida F e neste trabalho de 9,11-desidro-12α-acetóxi-hortiolida A</p>			
XIV)	<p>11alfa-acetóxi-15-desóxi-6-hidróxi-hortiolida C</p>	<p>1-<i>H. oreadica</i> Groppo, Kallunki & Pirani</p>	<p>1-SEVERINO, 2008</p>
<p>Observação → esta estrutura foi denominada por SEVERINO (2008) de Hortiolida G e neste trabalho de 11α-acetóxi-15-desóxi-6-hidróxi-hortiolida C</p>			

TABELA 1.6: Ocorrência de amidas no gênero *Hortia*

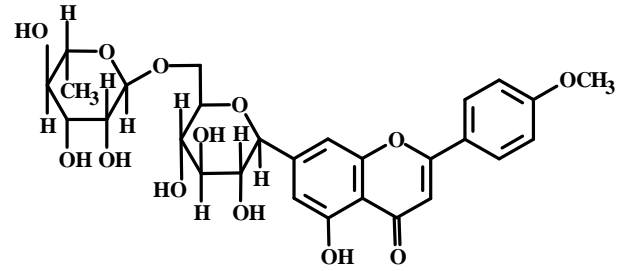
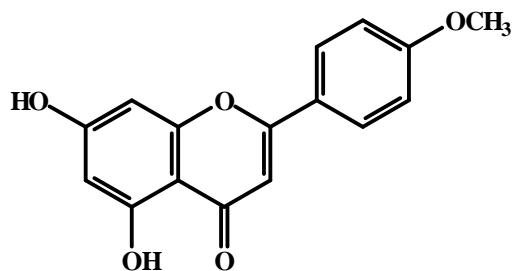
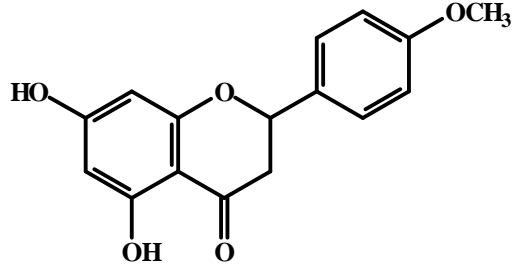
SUBSTÂNCIA	OCORRÊNCIA	REFERÊNCIA
<p>I)</p> <p>N-(2-{3-[(3-metilbut-2-en-1-il)oxi]fenil}etil)benzamida</p>	<p>1-<i>H. regia</i> Sandwith</p>	<p>1-TINTO <i>et al.</i>, 1992</p>
<p>II)</p> <p>N-[2-(4-preniloxifenil)etil]-tigliamida</p>	<p>1-<i>H. colombiana</i> Gleason^b</p>	<p>1-SUAREZ <i>et al.</i>, 2002</p>

^b*H. colombiana* Gleason (nome correto é *H. brasiliana* Vand. ex DC.)

III)	 <p>N-[2-(4-hidroxifenil)etil]-tigliamida</p>	1- <i>H. colombiana</i> Gleason ^b	1-SUAREZ <i>et al.</i> , 2002
------	--	---	----------------------------------

^b*H. colombiana* Gleason (nome correto é *H. brasiliana* Vand. ex DC.)

TABELA 1.7: Ocorrência de flavonoides no gênero *Hortia*

SUBSTÂNCIA	OCORRÊNCIA	REFERÊNCIA
D)  Linarina	1- <i>H. longifolia</i> Spruce ex Engl.	1-PÁDUA, 1976
II)  Acacetina	1- <i>H. superba</i> Ducke	1-BRAGA, 2005
III)  Isosakuranetina	1- <i>H. superba</i> Ducke	1-BRAGA, 2005

Analisando o perfil químico de *Hortia* verifica-se que os ácidos diidrocinâmicos com prenil ou anel pirano parecem ser um marcador do gênero. A análise desta classe na família Rutaceae como um todo não foi encontrado na literatura, estimulando este estudo na presente tese. Os alcaloides (furoquinolínicos, 2-quinolonas e β -indoloquinazolínicos), as cumarinas

(simples, furanocumarinas e piranocumarinas) e mesmo as amidas não são de ocorrência restrita à subfamília Toddalioideae ou Rutoideae, portanto, a presença destes permite classificar *Hortia* em Rutaceae, mas não confirmar o seu melhor posicionamento na primeira ou na segunda subfamília. Os sesquiterpenos, triterpenos e flavonoides citados são de ocorrência ampla na natureza, logo de pouco valor quimiossistemático.

O que estimulou o estudo de espécies de *Hortia* foi a ocorrência até 2002 de apenas três limonoides, sendo um deles (guianina – estrutura **IX**, p. 16) de uma complexidade não comum na família Rutaceae. Em geral, a quimiossistemática mostra que quando para um espécime é citado somente um composto estruturalmente complexo, os intermediários biossintéticos podem estar presentes. Este princípio da quimiossistemática levou o grupo de produtos naturais da Universidade Federal de São Carlos a estudar espécies deste gênero com a certeza de sucesso, o que levou na conclusão de uma tese de doutorado (BRAGA, 2005) com o isolamento de 37 compostos, sendo oito derivados do ácido diidrocinâmico: 3-fenil-[2',6'-dimetóxi-(3',4':5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano] propionato de metila; ácido 3-fenil-[2',6'-dimetóxi-(3',4':5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano] propiônico; 3-fenil-[2',5'-dimetóxi-(3',4':5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano] propionato de metila; 3-fenil-[2'-metóxi-(3',4':5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano] propionato de metila; ácido 3-fenil-[2'-metóxi-(3',4':5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano] propiônico; ácido 3-fenil-[4'-metóxi-(2',3':6'',5'')-2'',2''-dimetilpirano] propiônico; ácido 3-fenil-[4',5'-dimetóxi-(2',3':6'',5'')-2'',2''-dimetilpirano] propiônico e 3-fenil-{2'',2''-dimetil-4''*H*-2',4''-dioxina-[4''-(2''',3'''-diidróxi-1'''-metil-propil)]}; doze alcaloides: rutaecarpina, hortiacina, dictamina, γ -fagarina, esquimianina, robustina, N-metil-antanina, 4-metóxi-2-quinolona, N-metil-4-metóxi-2-quinolona, flindersina, N-metil-flindersina e edulitina; oitos cumarinas: escoparona, psoraleno, bergapteno, xantotoxina, prangol, heraclenol, 5-metóxi-seselina e braialina; dois flavonoides: acacetina e isosakuranetina; cinco

limonoides: guianina, 9,11-desidro-12 α -acetóxi-hortiolida A, hortiolida C, hortiolida D, hortiolida E e a mistura dos esteróides Sitosterol e Stigmasterol; e uma dissertação de mestrado (SEVERINO, 2008) com o isolamento de 15 compostos, sendo seis derivados do ácido diidrocinâmico: ácido 3-fenil-[2',6'-dimetóxi-(3',4'-O:5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano]propiónico, 3-fenil-[2'-metóxi-(3',4'-O:5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano]propionato de metila, 3-fenil-[2',6'-dimetóxi-(3',4'-O:5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano]propionato de metila, 3-fenil-[2',5'-dimetóxi-(3',4'-O:5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano]propionato de metila, ácido 3-fenil-[2'-metóxi-(3',4'-O:5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano]propiónico, ácido 3-fenil-[2',5'-dimetóxi-(3',4'-O:5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano]propiónico; uma cumarina: 5-metóxi-seselina; um derivado do ácido cinâmico: *E*-ácido 3,4-dimetóxi- α (3-hidróxi-4-carbometóxi-fenil)cinâmico; quatro alcaloides: rutaecarpina, 7,8-desidro-rutaecarpina, dictamina e N-metil-flindersina e três limonoides: guianina, hortiolida C e 11 α -acetóxi-15-desóxi-6-hidróxi-hortiolida C (citados na TABELA 1.5 (ps. 14 a 17). Os cinco limonoides citados na TABELA 1.5 (p. 14) oriundos dos estudos de BRAGA (2005) e SEVERINO (2008) confirmaram o princípio quimiossistemático, pois possíveis intermediários biossintéticos da guianina foram encontrados, sendo eles: hortiolida C, 11 α -acetóxi-15-desóxi-6-hidróxi-hortiolida C, hortiolida D e hortiolida E. Contudo, seria interessante para o estudo quimiossistemático verificar se um número maior de derivados destes intermediários estava presente, incentivando a autora da dissertação de mestrado (SEVERINO) dar sequência a estes estudos. Estes limonoides também não esclarecem o posicionamento de *Hortia* em uma determinada subfamília de Rutaceae, demonstrando a necessidade de uma sequência dos estudos.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivos gerais:

O levantamento bibliográfico descrito na introdução mostrou que os dados fitoquímicos ainda não esclarecem com segurança o posicionamento do gênero *Hortia* dentro da família Rutaceae. Com isto, um dos objetivos desta parte do trabalho foi dar continuidade ao estudo fitoquímico das espécies *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani, *H. brasiliana* Vand. ex DC. e *H. superba* Ducke, visando à aplicação dos resultados obtidos na investigação da quimiosistemática deste gênero.

O segundo objetivo geral deste capítulo foi a aplicação dos resultados obtidos do estudo fitoquímico na avaliação do potencial efeito biológico das espécies estudadas de *Hortia*, o qual corresponde ao segundo tópico deste primeiro capítulo.

1.2.2 Objetivos específicos:

Os objetivos específicos deste trabalho são:

1. Realizar o estudo fitoquímico dos extratos metanólicos de *Hortia oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani, *H. brasiliana* Vand. ex DC. e *H. superba* Ducke;
2. Avaliar o potencial efeito biológico dos extratos metanólicos e substâncias isoladas de plantas do gênero *Hortia* na inibição do desenvolvimento de micro-organismos fitopatógenos (como a bactéria *Xylella fastidiosa* e o fungo *Guignardia citricarpa*) e patógenos presentes na cavidade bucal (*Streptococcus sanguinis* e *S. salivarius*) e no sistema respiratório (*Mycobacterium tuberculosis*, *M. avium* e *M. kansasii*).

1.3 Parte Experimental

1.3.1 Materiais:

a) Fase estacionária para Cromatografia em Coluna (CC):

- Sílica gel (230-400 mesh)
- Sephadex LH-20

b) Fase estacionária para Cromatografia em Camada Delgada (CCD):

- Folhas de alumínio (20x20 cm) de sílica gel 60 PF₂₅₄

c) Eluentes para Cromatografia:

- Solventes comerciais destilados no DQ-UFSCar
- Solventes grau HPLC JT Baker

d) Solventes utilizados para a obtenção dos espectros de RMN:

- Deuterados da Merck e Aldrich 98-99,9%

e) Cromatografia em Coluna:

- Colunas de tamanhos variados, dependendo das quantidades das amostras a serem cromatografadas

f) Reveladores empregados:

- Câmara de UV (254 e 365 nm)
- Vanilina em ácido sulfúrico
- Reagente de Dragendorff

g) CLAE → Coluna Cromatográfica:

- Shodex Asahipak Polimérica GS-310 2Ga (460 mm x 25 mm, 10 µm)

1.3.2 Equipamentos:

a) Rotaevaporadores:

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

b) Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear:

- Bruker, modelo DRX 400 (9,4 Tesla)*

- Bruker, modelo ARX 200 (4,7 Tesla)*

* Equipamentos pertencentes ao departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos – São Carlos-SP.

c) Espectrômetro de Massas de Alta Resolução:

Os espectros de massas foram obtidos em um espectrômetro de massas de alta resolução – modelo ultrOTOFO_Q (Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA), utilizando fonte de ionização por *electrospray* em modo positivo. Para a calibração interna do equipamento, empregou-se uma solução de ATF-Na⁺ (ácido trifluoracético com sódio) 10 mg.mL⁻¹. As amostras foram solubilizadas na fase móvel composta por MeOH:H₂O (90%:10%), sendo as soluções introduzidas no espectrômetro de massas utilizando-se bomba de infusão – modelo Cole Parmer com fluxo de 5 µL.min⁻¹ e temperatura de dessolvatação de 150°C. A tensão aplicada no capilar foi de 4500 Volts e a pressão do gás (nitrogênio) de nebulização foi de 2,0 bar. As precisões das massas foram obtidas usando como padrão interno ATF-Na⁺. Os experimentos foram realizados na Universidade de São Paulo-*Campus* de Ribeirão Preto-SP.

d) Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência:

- Shimadzu SCL – 10A, condições preparativas com válvula de reciclo, detector UV-VIS, modelo SPD- 6AV, injetor Rheodyne 7123

e) Difrátômetro de Raio X

A coleta de dados foi realizada à temperatura ambiente em um difratômetro Enraf-Nonius Kappa-CCD (95 mm CCD câmera em κ-goniostat) com monocromador de grafite Mo K α , radiação de 0,71073Å. Os dados foram coletados até 51,36° em 2 θ . Parâmetros finais de célula unitária foram baseados em todas as reflexões. A coleta dos dados foi realizada com o programa COLLECT (Enraf-Nonius, 1997-2000); a

escala e a integração das reflexões foram realizadas com o *software* HKL Denzo-Scalepack (OTWINOWSKI e MINOR, 1997). Não foi aplicada correção de absorção. O experimento foi realizado no instituto de Física da Universidade de São Paulo-*Campus* de São Carlos-SP.

f) Estufa de Secagem e Esterilização:

- FANEN-315 SE

g) Balança Analítica:

- Mettler P163

h) Banho de Ultra-som:

- Branson 1510, Danbury, CT

1.3.3 Metodologia do Estudo Químico das Espécies de *Hortia*:

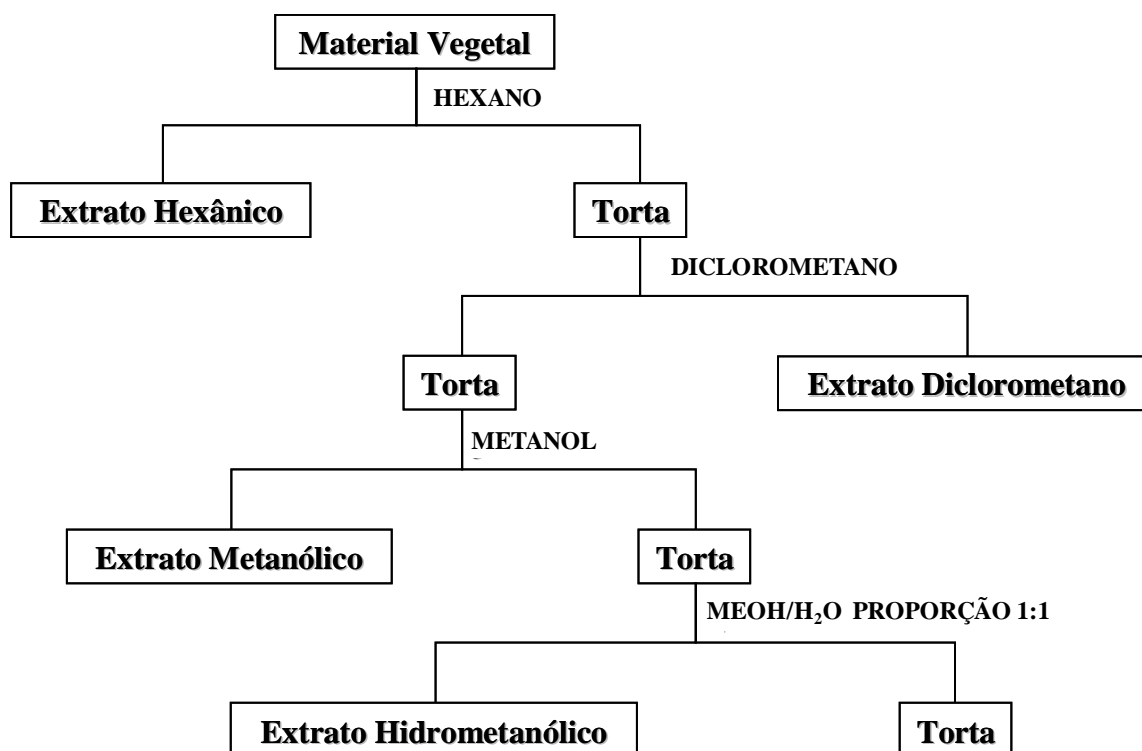
1.3.3.1 Preparação dos Extratos Vegetais:

A espécie *H. brasiliiana* Vand. ex DC. foi coletada em maio de 2000, no município de Linhares – ES. As espécies *H. superba* Ducke e *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani foram coletadas em janeiro de 2001 na Reserva Ducke, localizada próximo à cidade de Manaus – AM e pertencente ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Todas as espécies foram identificadas pelo Prof. Dr. José Rubens Pirani, do Departamento de Botânica, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (USP-SP) e as exsiccatas encontram-se depositadas no mesmo instituto.

Os extratos vegetais foram preparados no período de fevereiro a maio de 2001 pela Dra. Patrícia Aparecida de Campos Braga, que na época realizava seu doutorado no laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos. As partes vegetais das espécies de *Hortia* foram secas em estufa de circulação a 40°C por aproximadamente 10 dias e posteriormente trituradas em moinho. O material seco e moído foi percolado com solventes para extração de metabólitos secundários, em ordem

crescente de polaridade (hexano → diclorometano → metanol e em alguns casos, uma mistura de metanol: água na proporção 1:1) 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. O FLUXOGRAMA 1.1 (p. 28) ilustra o procedimento de preparação dos mesmos.

Os extratos foram concentrados em rotaevaporador e no caso dos extratos hidroalcoólicos liofilizados; posteriormente todos os extratos foram conservados em refrigerador para evitar contaminação e degradação dos compostos constituintes. As massas das partes vegetais e dos extratos obtidos estão descritas na TABELA 1.8 (p. 29).



FLUXOGRAMA 1.1: Preparação dos extratos das espécies de *Hortia*

TABELA 1.8 - Massa obtida de material vegetal e extratos

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

❖ Extratos preparados somente para ensaio biológico;

○ Extratos não preparados;

EH: extrato hexano; **ED:** extrato diclorometano; **EM:** extrato metanólico; **EMA:** extrato metanol:água;

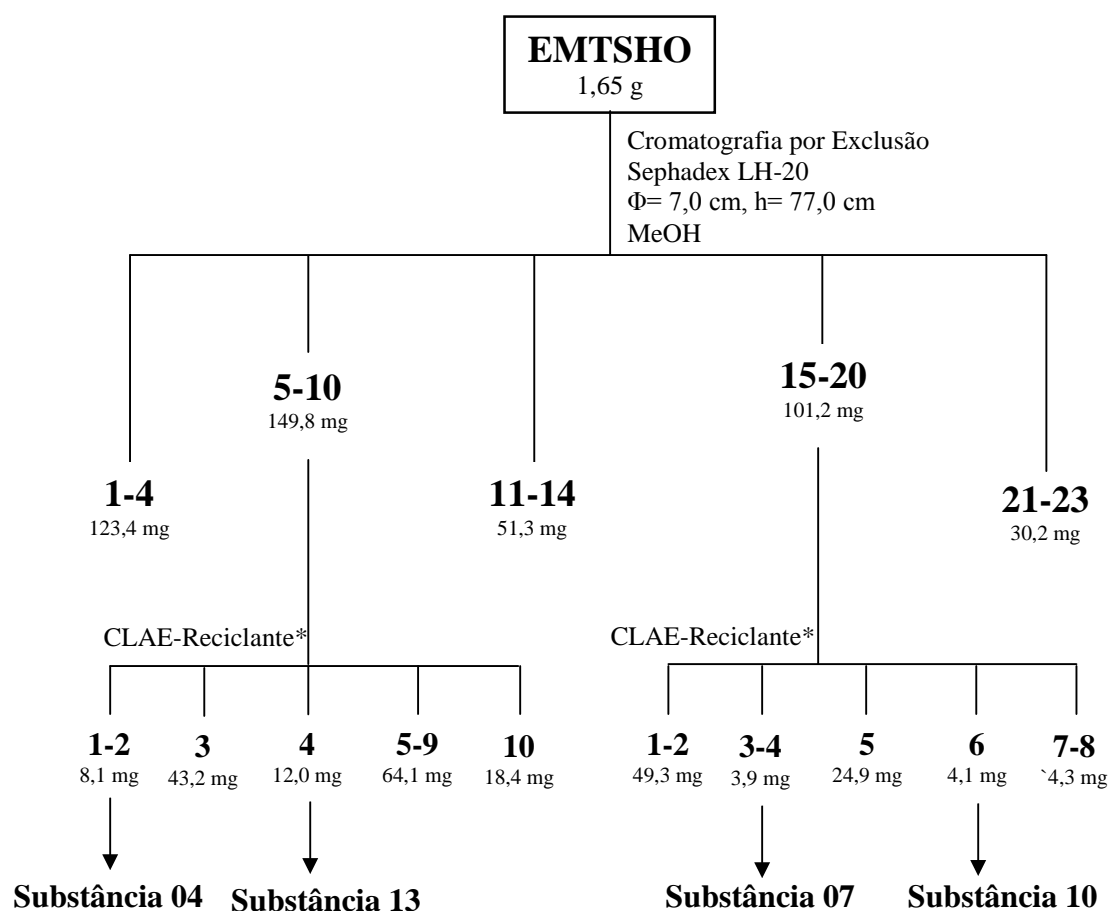
1.3.3.2 Fracionamento dos Extratos Vegetais e Isolamento das Substâncias de *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani, *H. superba* Ducke e *H. brasiliana* Vand. ex DC.

Neste trabalho foram estudados os seguintes extratos metanólicos: do tronco de *H. brasiliana* Vand. ex DC., do tronco e tronco subterrâneo de *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani e do tronco de *H. superba* Ducke.

1.3.3.2.1 Fracionamento do Extrato Metanólico do Tronco Subterrâneo de *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani:

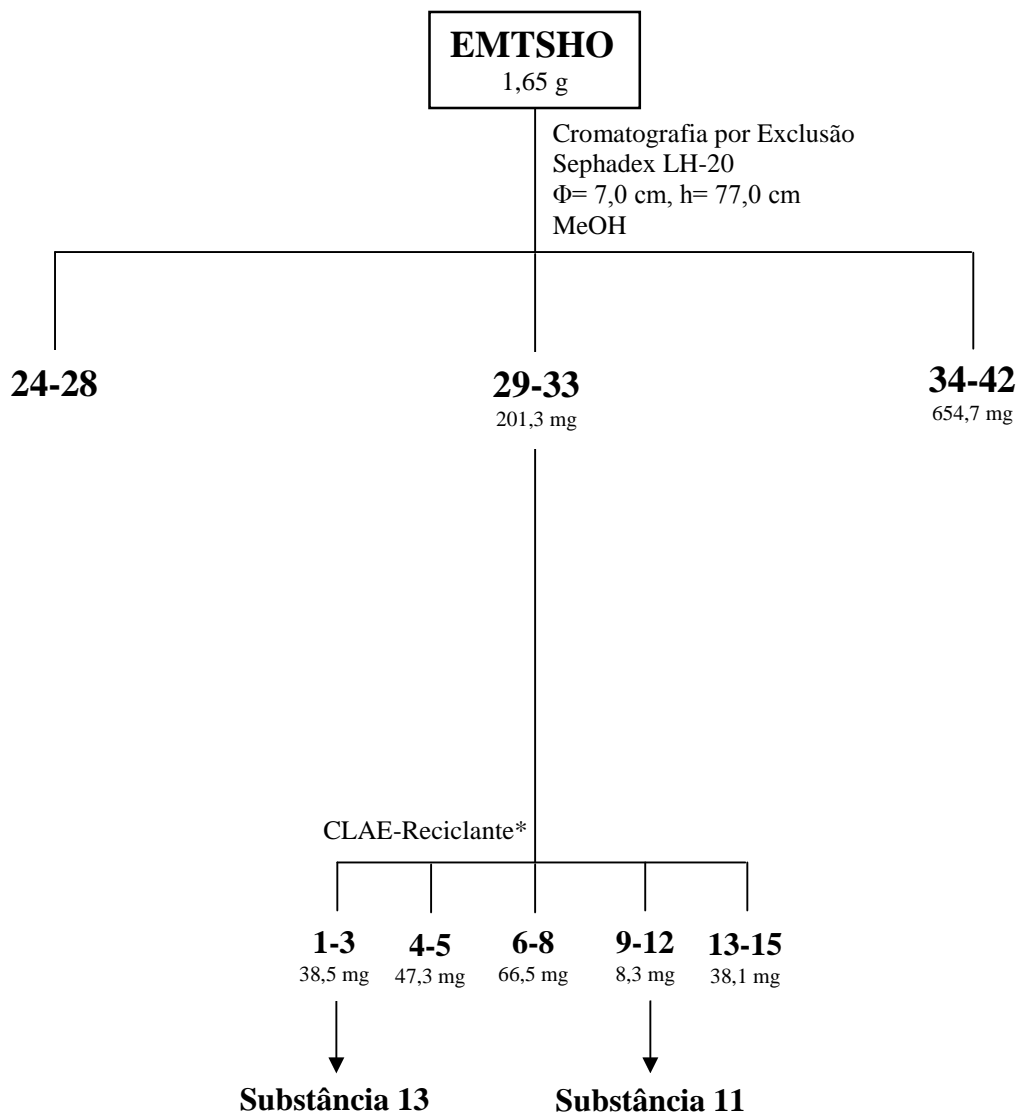
O extrato metanólico do tronco subterrâneo de *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani (EMTSHO) foi fracionado utilizando Cromatografia por Exclusão e as frações obtidas foram submetidas à CCD, sendo possível agrupá-las de acordo com as suas similaridades químicas, como apresentado no

FLUXOGRAMA 1.2 (ps. 30 a 32). Posteriormente, foi realizado experimento de RMN de ^1H de todas as frações agrupadas e foi possível observar a presença de sinais interessantes nas frações 5 a 10, 15 a 20, 24, 25 a 28 e 29 a 33. Portanto, estas frações foram submetidas à Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Cromatografia por Exclusão e foi possível isolar as seguintes substâncias: os limonoides 9-hidróxi-hortiolida A (**SUBSTÂNCIA 01**), 6-hidróxi-hortiolida C (**SUBSTÂNCIA 04**), hortiolida E (**SUBSTÂNCIA 07**), limonina (**SUBSTÂNCIA 09**), (*S*)-1-acetóxi-7-desoxo-7 α -hidróxi-ichangina (**SUBSTÂNCIA 10**) e os derivados do ácido diidrocinâmico ácido 3-[3,6-dimetóxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':4,5)-fenil]-propiónico (**SUBSTÂNCIA 11**) e ácido 3-[2,6-dimetóxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':4,5)-fenil]-propiónico (**SUBSTÂNCIA 13**).



* Coluna Polimérica Preparativa Shodex Asahipak GS-310 2Ga (460 mm x 25 mm, partícula de 10 μm); loop: 500 μL ; fase móvel: MeOH; faixa de detecção: 217 e 254 nm; vazão: 5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; amostras coletadas no 1º ciclo.

FLUXOGRAMA 1.2: Fracionamento do extrato EMTSHO

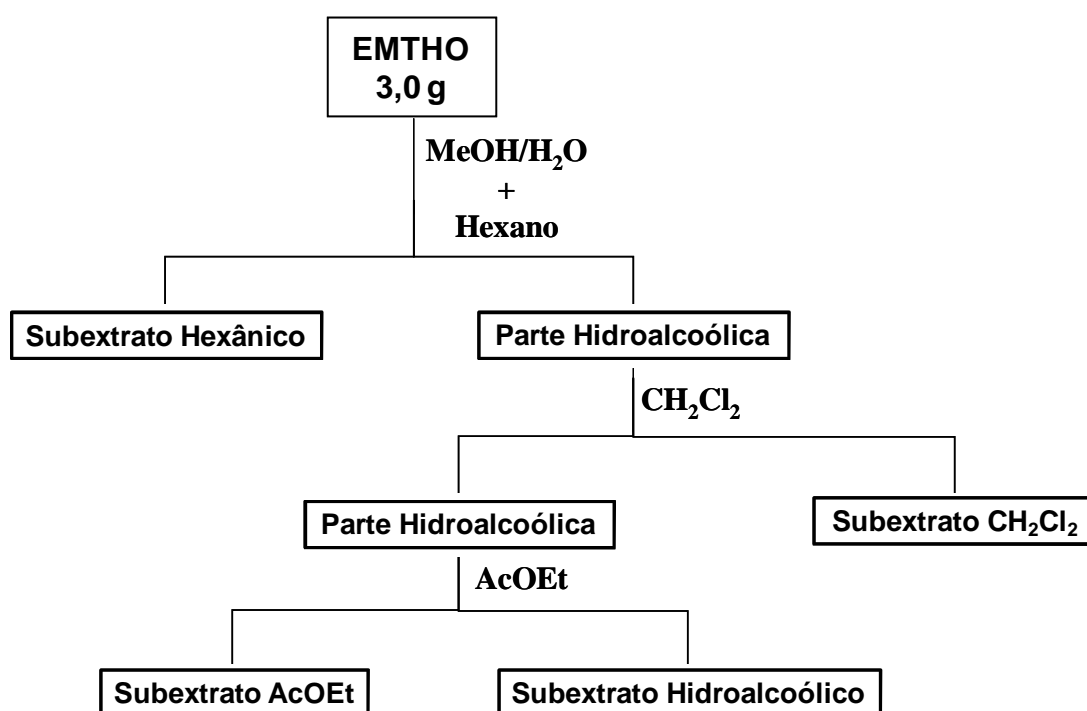


* Coluna Polimérica Preparativa Shodex Asahipak GS-310 2Ga (460 mm x 25 mm, partícula de 10 μ m); loop: 500 μ L; fase móvel: MeOH; faixa de detecção: 217 e 254 nm; vazão: 5 mL.min⁻¹; amostras coletadas no 1º ciclo.

FLUXOGRAMA 1.2: continuação

1.3.3.2.2 Fracionamento do Extrato Metanólico do Tronco de *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani:

O extrato metanólico do tronco de *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani (EMTHO) foi fracionado via partição líquido-líquido (FLUXOGRAMA 1.3, p. 33) e após a evaporação dos solventes hexano, CH₂Cl₂, AcOEt e MeOH/H₂O foram obtidos 4 subextratos, conforme descrito na TABELA 1.9 (p. 33).



FLUXOGRAMA 1.3: Partição líquido-líquido do extrato EMTHO

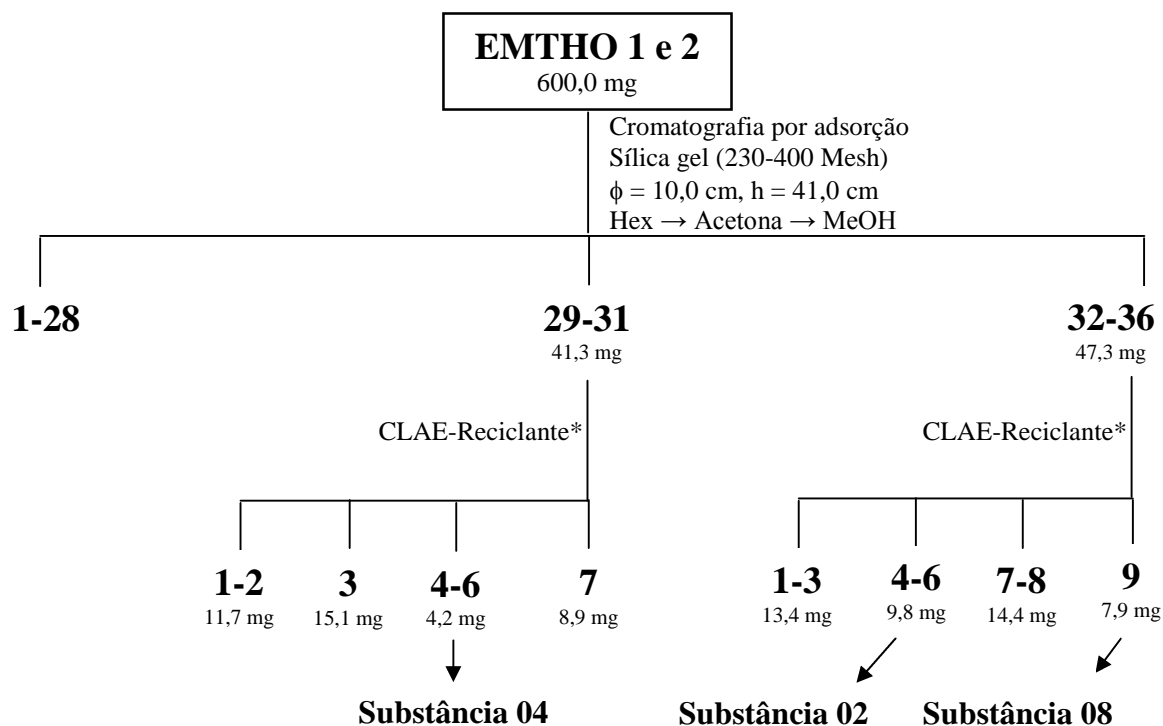
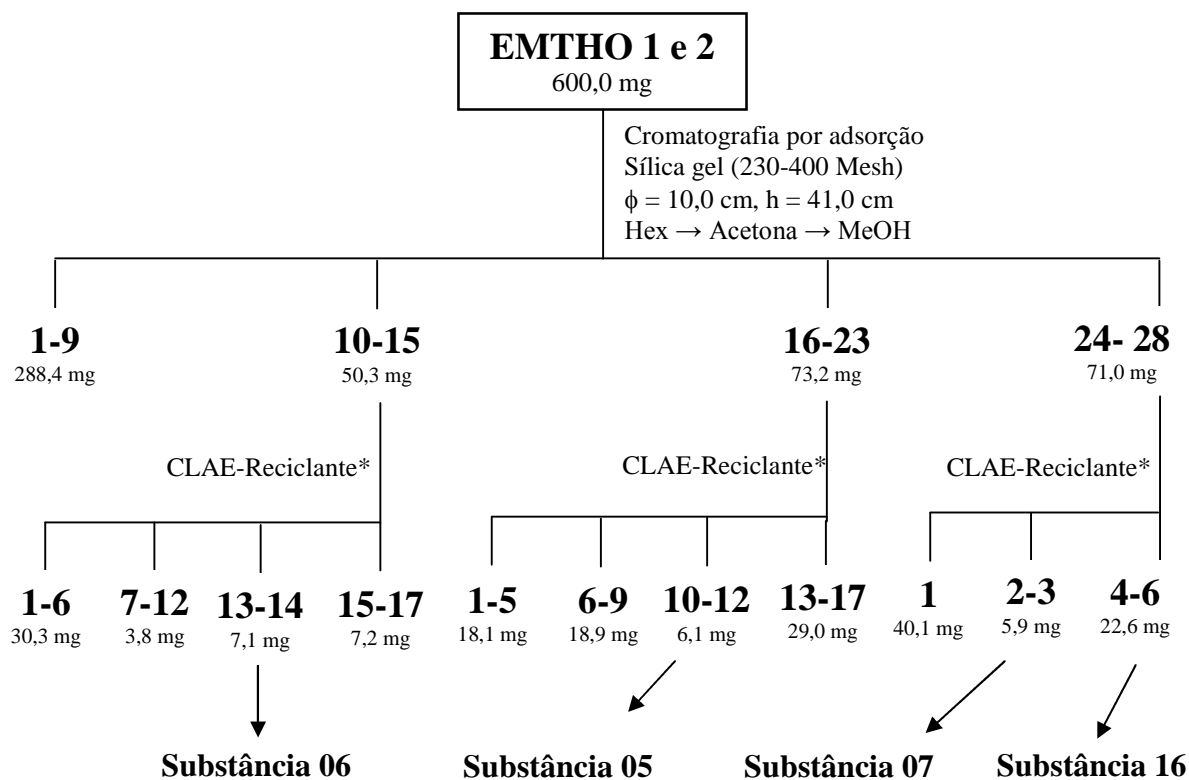
TABELA 1.9: Subextratos provenientes do fracionamento do EMTHO

Extrato Metanólico	Subextrato	Solvente	Massa (g)
EMTHO 3,0 g	EMTHO 1	Hexano	0,280
	EMTHO 2	CH ₂ Cl ₂	0,754
	EMTHO 3	AcOEt	0,897
	EMTHO 4	MeOH/H ₂ O	1,069

Posteriormente foi realizado CCD de cada subextrato, sendo possível visualizar similaridade química entre EMTHO 1 e EMTHO 2 e por isso ambos foram agrupados. Pelo experimento de RMN de ^1H observou-se que todos os subextratos, exceto EMTHO 4, apresentaram sinais característicos de substâncias de interesse e, portanto, os mesmos foram submetidos à refrações, como mostrado a seguir.

1.3.3.2.2.1 Refracionamento de EMTHO 1 e 2:

Os subextratos agrupados EMTHO 1 e 2 foram refrações via Cromatografia por Adsorção, sendo as frações oriundas deste refrações submetidas à CCD e agrupadas de acordo com as similaridades químicas (FLUXOGRAMA 1.4, p. 35). Desta forma, foi possível isolar as seguintes substâncias: os limonoides 9,11-desidro-12 α -hidróxi-hortiolida A (**SUBSTÂNCIA 02**), 6-hidróxi-hortiolida C (**SUBSTÂNCIA 04**), 11 β -hidróxi-hortiolida C (**SUBSTÂNCIA 05**), hortiolida D (**SUBSTÂNCIA 06**), hortiolida E (**SUBSTÂNCIA 07**), 12 β -hidróxi-hortiolida E (**SUBSTÂNCIA 08**) e o alcaloide N-metil-4-metóxi-2-quinolona (**SUBSTÂNCIA 16**).

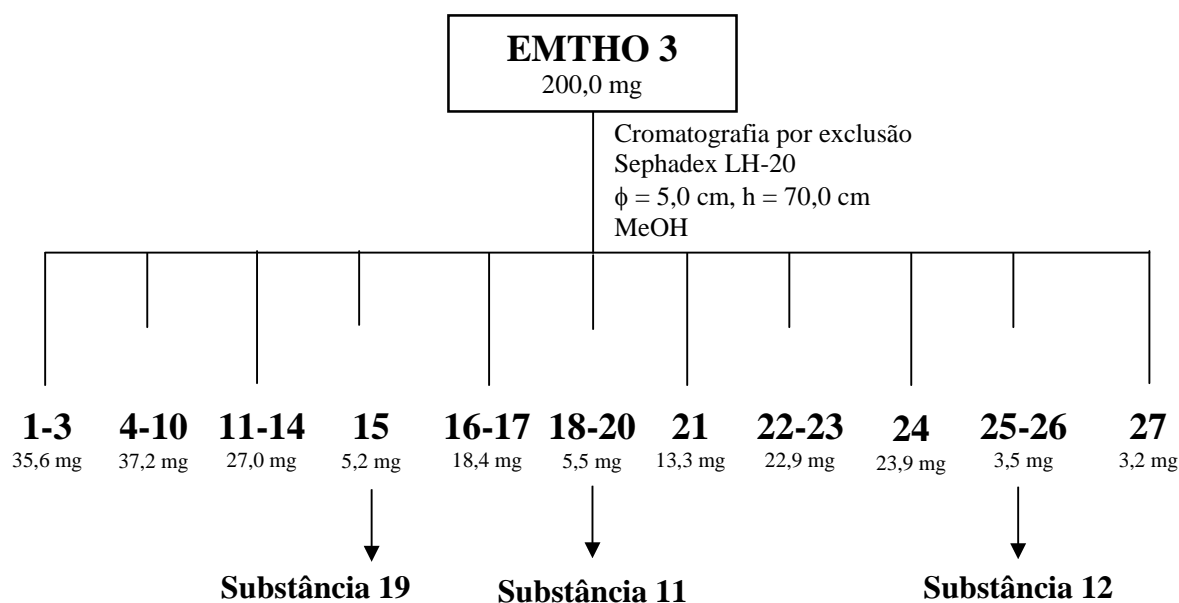


* Coluna Polimérica Preparativa Shodex Asahipak GS-310 2Ga (460 mm x 25 mm, partícula de 10 μ m); loop: 500 μ L; fase móvel: MeOH; faixa de detecção: 217 e 254 nm; vazão: 5 mL.min⁻¹; amostras coletadas no 1º ciclo.

FLUXOGRAMA 1.4: Refracionamento dos subextratos EMTHO 1 e 2

1.3.3.2.2 Refracionamento de EMTHO 3:

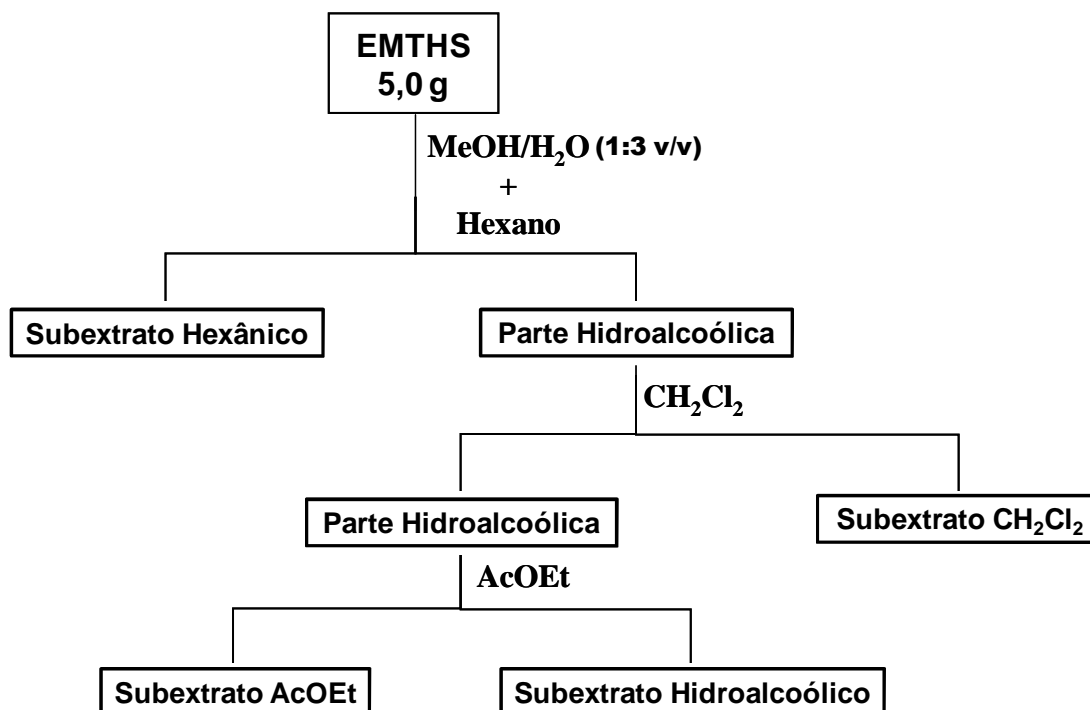
O subextrato EMTHO 3 foi refractionado via Cromatografia por Exclusão, sendo as frações oriundas deste refractionamento submetidas à CCD e agrupadas de acordo com as similaridades químicas (FLUXOGRAMA 1.5, p. 36). Deste subextrato foi possível isolar as seguintes substâncias: os derivados do ácido diidrocinâmico ácido 3-[3,6-dimetóxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':4,5)-fenil]-propionico (**SUBSTÂNCIA 11**), ácido 3-[3,4-dimetóxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':5,6)-fenil]-propionico (**SUBSTÂNCIA 12**) e a cumarina bergapteno (**SUBSTÂNCIA 19**).



FLUXOGRAMA 1.5: Refracionamento do subextrato EMTHO 3

1.3.3.2.3 Fracionamento do Extrato Metanólico do Tronco de *H. superba* Ducke:

O extrato metanólico do tronco de *H. superba* Ducke (EMTHS) foi submetido à partição líquido-líquido (FLUXOGRAMA 1.6, p. 37).



FLUXOGRAMA 1.6: Partição líquido-líquido do extrato EMTHS

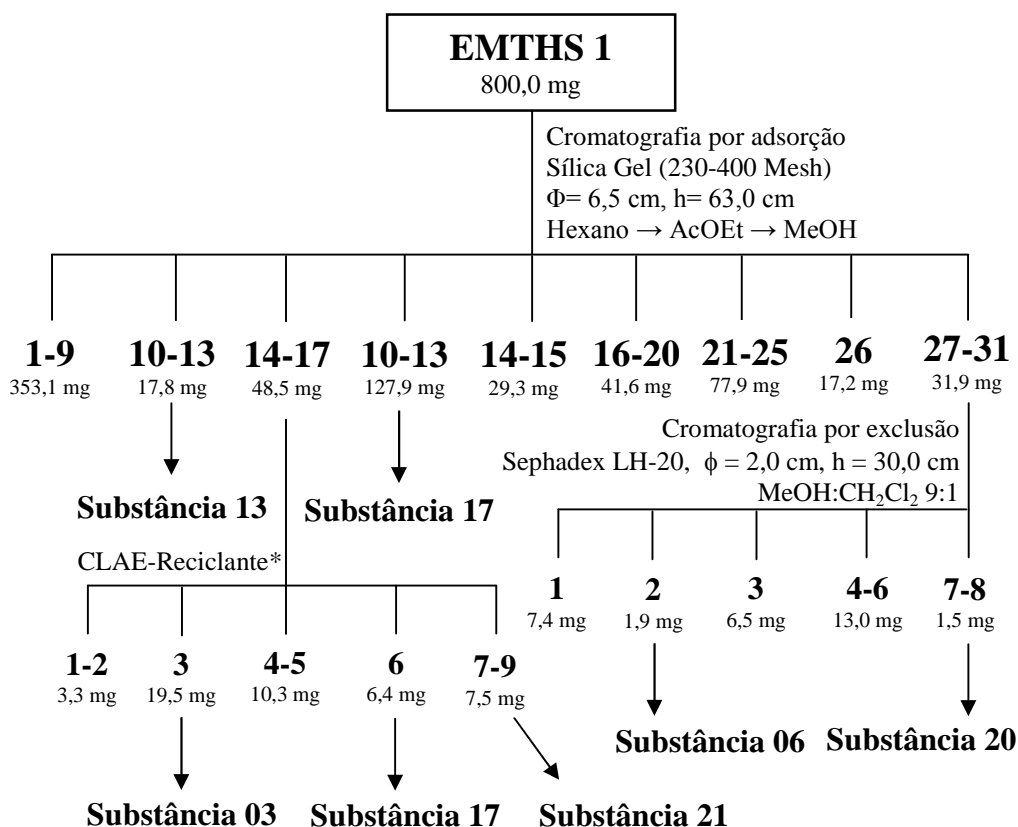
Após a evaporação dos solventes hexano, CH_2Cl_2 , AcOEt e MeOH/ H_2O foram obtidos 4 subextratos (TABELA 1.10, p. 35), dos quais apenas EMTHS 1 e EMTHS 2 apresentaram sinais de substâncias de interesse a partir da análise do espectro de RMN de ^1H , e por isso estes foram refractionados.

TABELA 1.10: Subextratos provenientes do fracionamento do EMTHS

Extrato Metanólico	Subextrato	Solvente	Massa (g)
EMTHS 5,0 g	EMTHS 1	Hexano	1,40
	EMTHS 2	CH_2Cl_2	2,00
	EMTHS 3	AcOEt	0,27
	EMTHS 4	MeOH/ H_2O	1,25

1.3.3.2.3.1 Refracionamento do Subextrato EMTHS 1:

O subextrato EMTHS 1 foi refractionado via Cromatografia por Adsorção, sendo as frações obtidas submetidas à CCD e agrupadas de acordo com as similaridades químicas (FLUXOGRAMA 1.7, p. 38). Este subextrato proporcionou o isolamento dos limonoides hortiolida C (**SUBSTÂNCIA 03**) e hortiolida D (**SUBSTÂNCIA 06**); do derivado do ácido 3-[2,6-dimetóxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':4,5)-fenil]-propiónico (**SUBSTÂNCIA 13**); do alcaloide rutaecarpina (**SUBSTÂNCIA 17**) e das cumarinas seselina (**SUBSTÂNCIA 20**) e 5-metóxi-seselina (**SUBSTÂNCIA 21**).

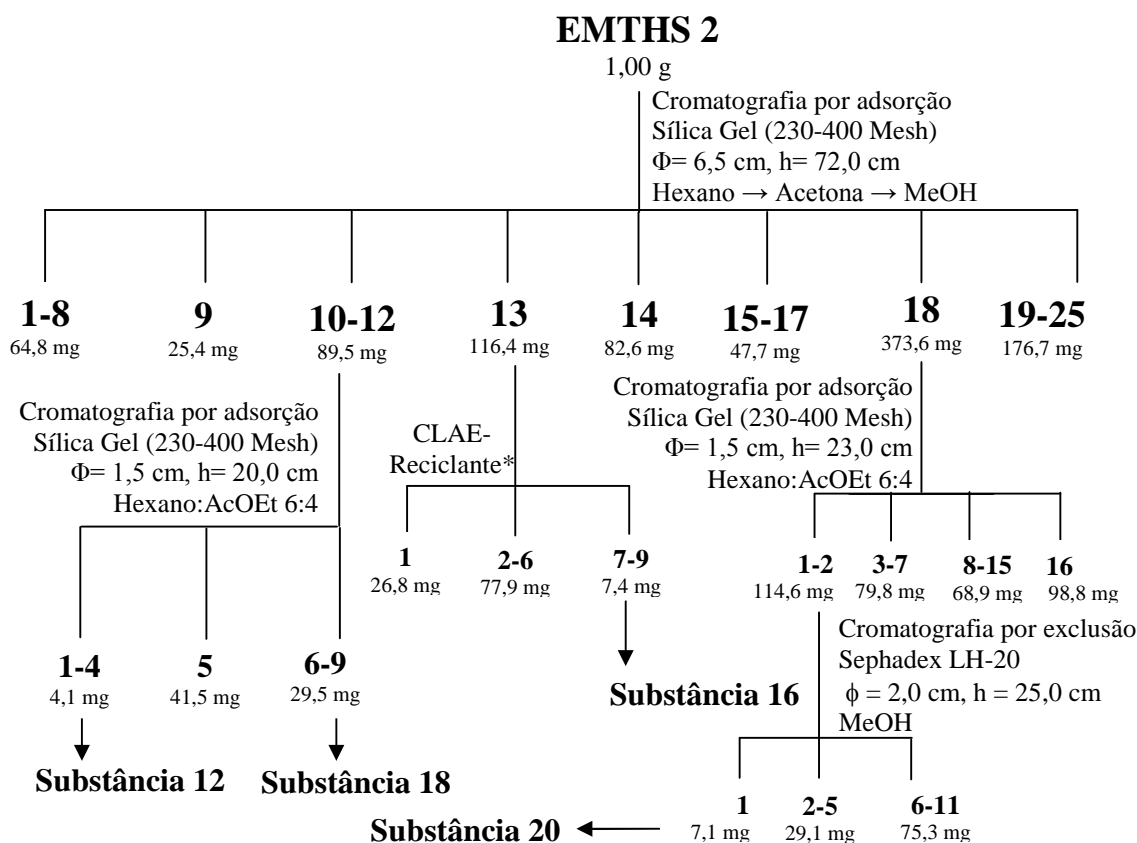


* Coluna Polimérica Preparativa Shodex Asahipak GS-310 2Ga (460 mm x 25 mm, partícula de 10 µm); loop: 500 µL; fase móvel: MeOH:CH₂Cl₂ 8:2; faixa de detecção: 217 e 254 nm; vazão: 5 mL.min⁻¹; amostras coletadas no 1º ciclo.

FLUXOGRAMA 1.7: Refracionamento do subextrato EMCHS 1

1.3.3.2.3.2 Refracionamento do Subextrato EMTHS 2:

O subextrato EMTHS 2 foi refractionado via Cromatografia por Adsorção, sendo as frações obtidas submetidas à CCD e agrupadas de acordo com as similaridades químicas (FLUXOGRAMA 1.8, p. 39). Este subextrato proporcionou o isolamento do derivado do ácido diidrocinâmico ácido 3-[3,4-dimetóxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':5,6)-fenil]- propiônico (**SUBSTÂNCIA 12**), dos alcaloides N-metil-4-metóxi-2-quinolona (**SUBSTÂNCIA 16**) e hortiacina (**SUBSTÂNCIA 18**), e da cumarina seselina (**SUBSTÂNCIA 20**).

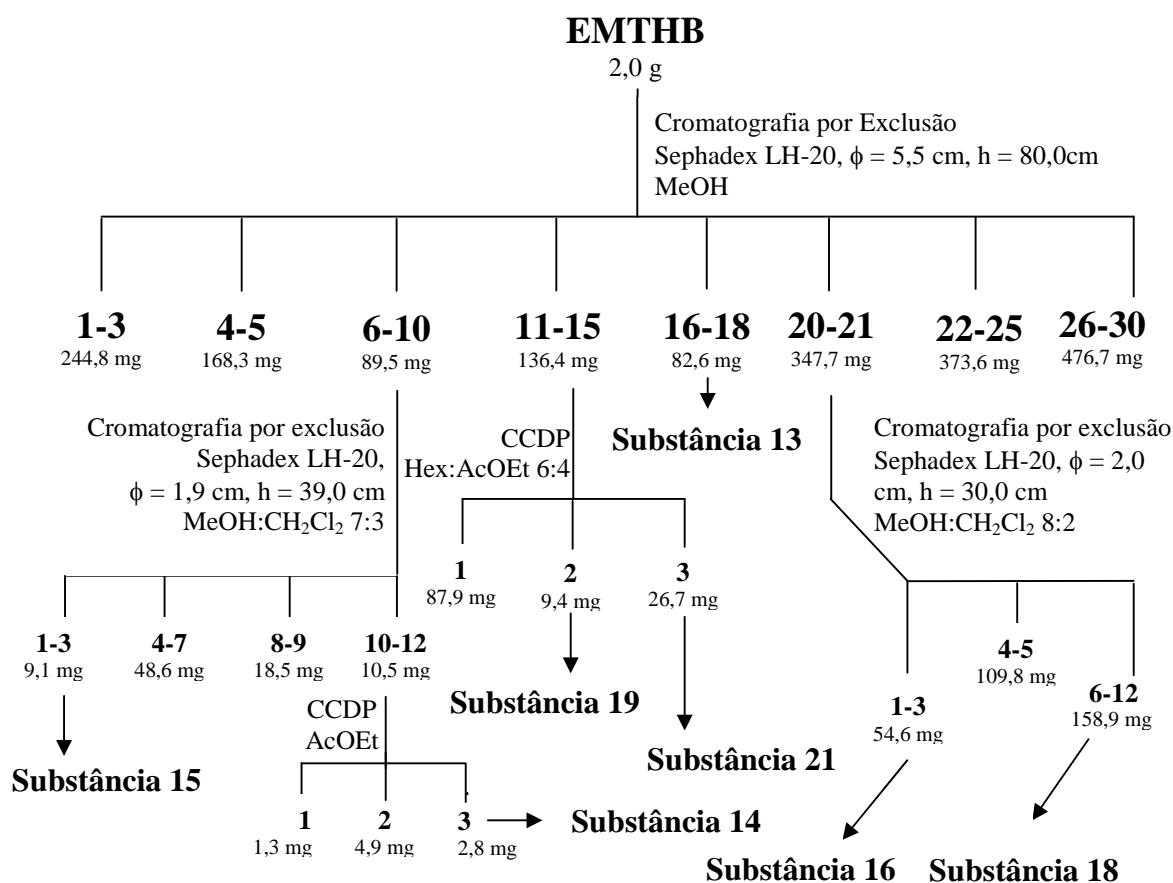


* Coluna Polimérica Preparativa Shodex Asahipak GS-310 2Ga (460 mm x 25 mm, partícula de 10 μm); loop: 500 μL; fase móvel: MeOH; faixa de detecção: 217 e 254 nm; vazão: 5 mL.min⁻¹; amostras coletadas no 1º ciclo.

FLUXOGRAMA 1.8: Refracionamento do subextrato EMTHS 2

1.3.3.2.4 Fracionamento do Extrato Metanólico do Tronco de *H. brasiliiana* Vand. ex DC.:

O extrato metanólico do tronco de *H. brasiliiana* Vand. ex DC. (EMTHB) foi fracionado, assim como as frações obtidas a partir dele, de acordo com o FLUXOGRAMA 1.9 (p. 40). Este extrato proporcionou o isolamento do derivado do ácido diidrocinâmico ácido 3-[2,6-dimetóxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':4,5)-fenil]-propiônico (**SUBSTÂNCIA 13**); dos alcaloides γ -fagarina (**SUBSTÂNCIA 14**), esquimianina (**SUBSTÂNCIA 15**), N-metil-4-metóxi-2-quinolona (**SUBSTÂNCIA 16**) e hortiacina (**SUBSTÂNCIA 18**); das cumarinas bergapteno (**SUBSTÂNCIA 19**) e 5-metóxi-seselina (**SUBSTÂNCIA 21**).

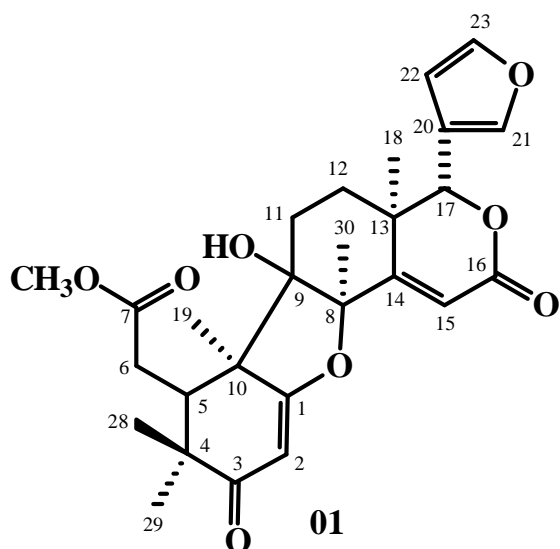


FLUXOGRAMA 1.9: Fracionamento do extrato EMTHB

1.4 Resultados e Discussões

Neste estudo foram isolados 21 metabólitos secundários das espécies *H. brasiliiana* Vand. ex DC., *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani e *H. superba* Ducke, sendo 10 limonoides (substâncias de **01** a **10**), 3 derivados do ácido diidrocinâmico (substâncias de **11** a **13**), 5 alcaloides (substâncias de **14** a **18**) e 3 cumarinas (substâncias de **19** a **21**). Todas as estruturas moleculares estão representadas a seguir.

1.4.1 Substâncias Isoladas:

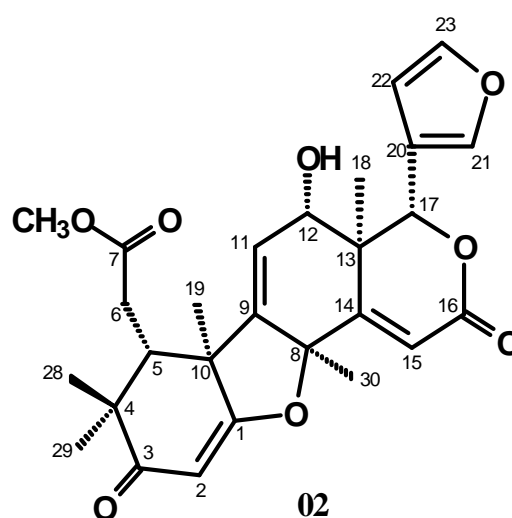


9-hidróxi-hortiolida A

Origem: extrato metanólico do tronco subterrâneo de *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani

Isolamento: p. 29

Determinação estrutural: p. 49

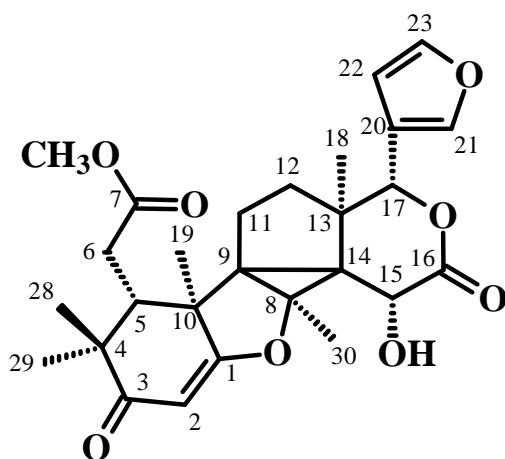


9,11-desidro-12 α -hidróxi-hortiolida A

Origem: extrato metanólico do tronco de *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani

Isolamento: p. 34

Determinação estrutural: p. 62



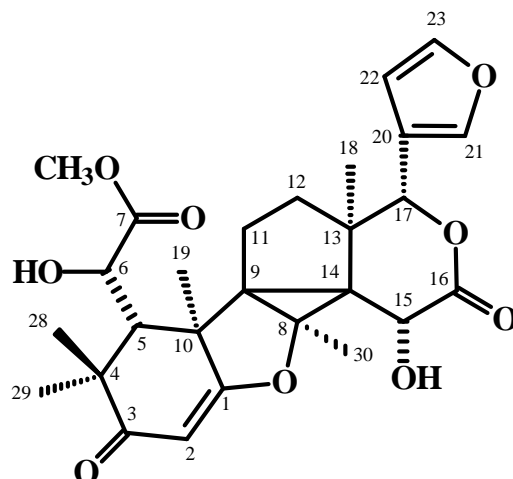
03

hortiolida C

Origem: extrato metanólico do tronco de *H. superba* Ducke

Isolamento: p. 38

Determinação estrutural: p. 73



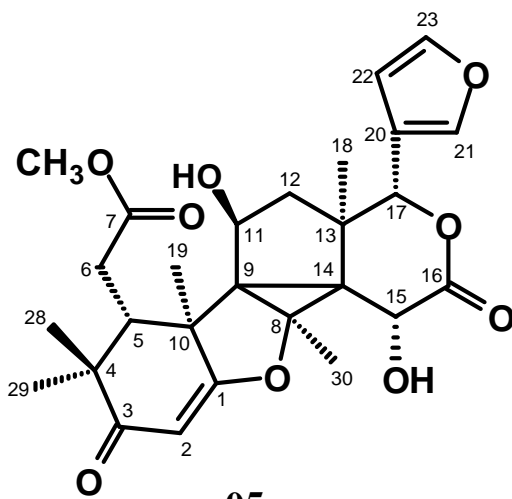
04

6-hidróxi-hortiolida C

Origem: extratos metanólicos do tronco e tronco subterrâneo de *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani

Isolamento: ps. 29 e 34

Determinação estrutural: p. 81



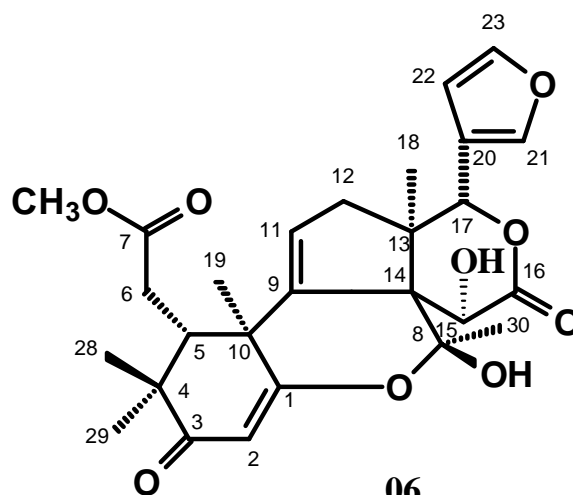
05

11β-hidróxi-hortiolida C

Origem: extrato metanólico do tronco de *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani

Isolamento: p. 34

Determinação estrutural: p. 91



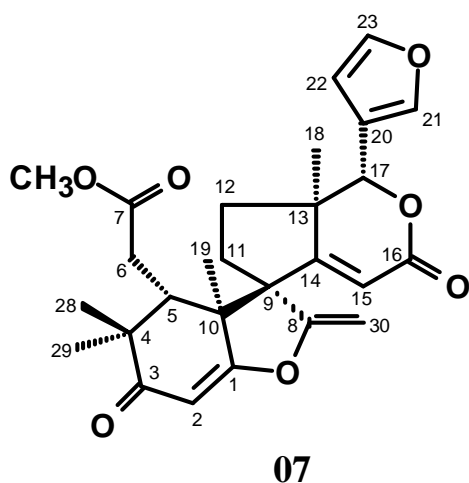
06

hortiolida D

Origem: extratos metanólicos dos troncos de *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani e *H. superba* Ducke

Isolamento: ps. 34 e 38

Determinação estrutural: p. 101

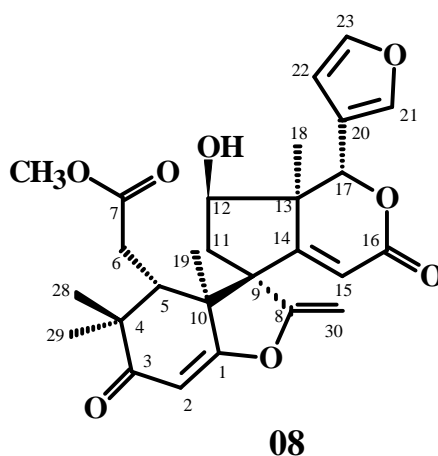


hortiolida E

Origem: extratos metanólicos do tronco e tronco subterrâneo de *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani

Isolamento: ps. 29 e 34

Determinação estrutural: p. 108

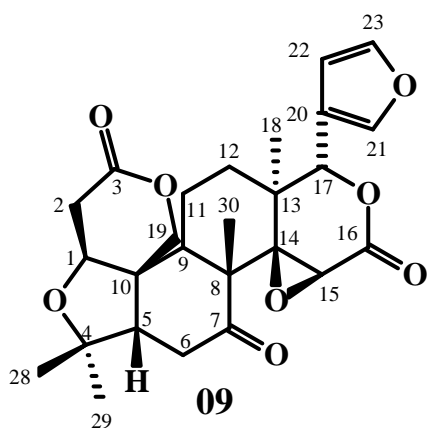


12β-hidróxi-hortiolida E

Origem: extrato metanólico do tronco de *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani

Isolamento: p. 34

Determinação estrutural: p. 114

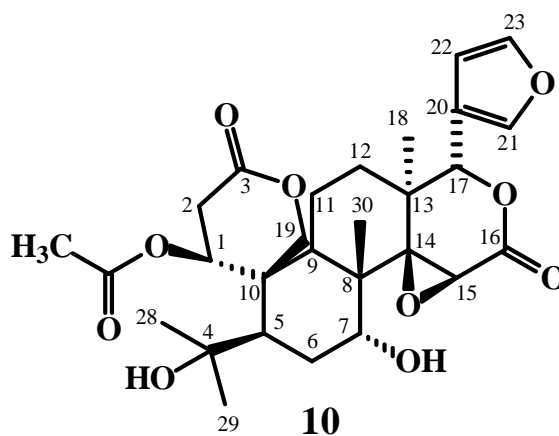


limonina

Origem: extrato metanólico do tronco de *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani

Isolamento: p. 29

Identificação estrutural: p. 126

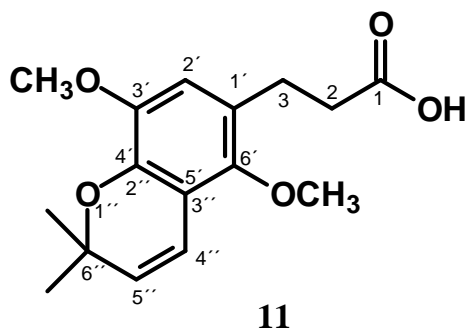


(S)-1-acetóxi-7-desoxo-7α-hidroxi-ichangina

Origem: extrato metanólico do tronco subterrâneo de *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani

Isolamento: p. 29

Determinação estrutural: p. 136

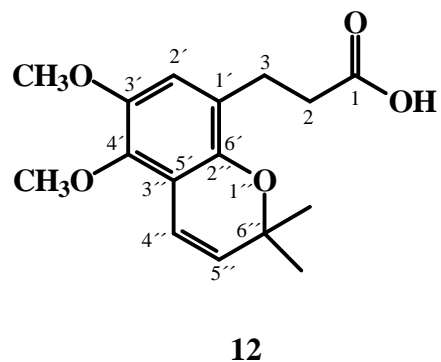


ácido 3-[3,6-dimetóxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':4,5)-fenil]-propionico

Origem: extratos metanólicos do tronco e tronco subterrâneo de *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani

Isolamento: ps. 29 e 36

Identificação estrutural: p. 163

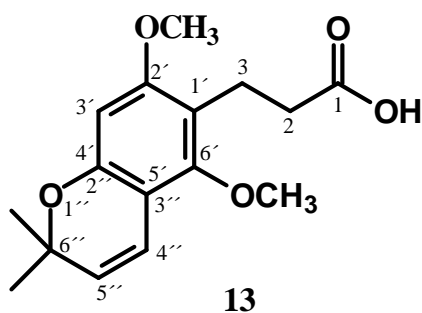


ácido 3-[3,4-dimetóxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':5,6)-fenil]-propionico

Origem: extratos metanólicos dos troncos de *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani e *H. superba* Ducke

Isolamento: ps. 36 e 39

Identificação estrutural: p. 167

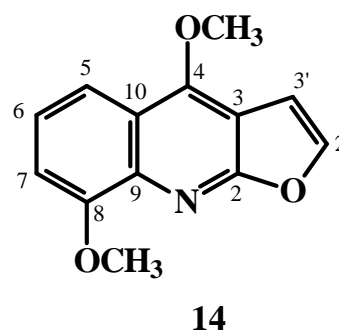


ácido 3-[2,6-dimetóxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':4,5)-fenil]-propionico

Origem: extratos metanólicos dos troncos de *H. brasiliana* Vand. ex DC. e *H. superba* Ducke e do tronco subterrâneo de *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani

Isolamento: ps. 29, 38 e 40

Identificação estrutural: p. 171

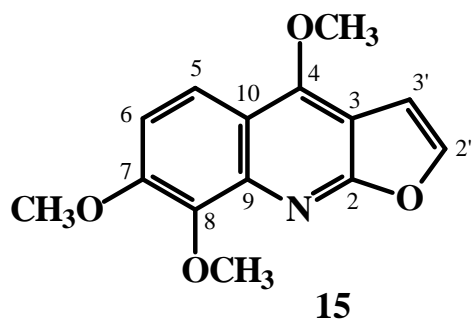


γ-fagarina

Origem: extrato metanólico do tronco de *H. brasiliana* Vand. ex DC.

Isolamento: p. 40

Identificação estrutural: p. 177

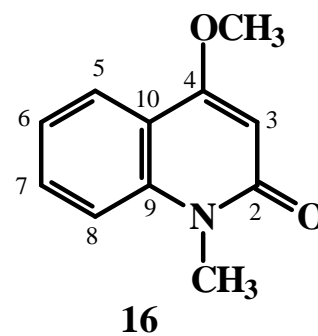


esquimianina

Origem: extrato metanólico do tronco de *H. brasiliiana* Vand. ex DC.

Isolamento: p. 40

Identificação estrutural: p. 181



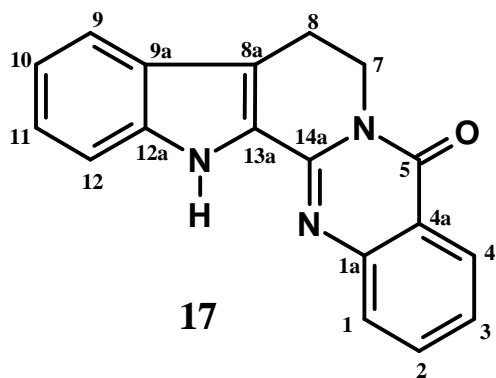
N-metil-4-metóxi-2-quinolona

Origem: extratos metanólicos dos troncos de *H. brasiliiana* Vand. ex DC., *H. oreadica* Groppo,

Kallunki & Pirani e *H. superba* Ducke

Isolamento: ps. 34, 39 e 40

Identificação estrutural: p. 185

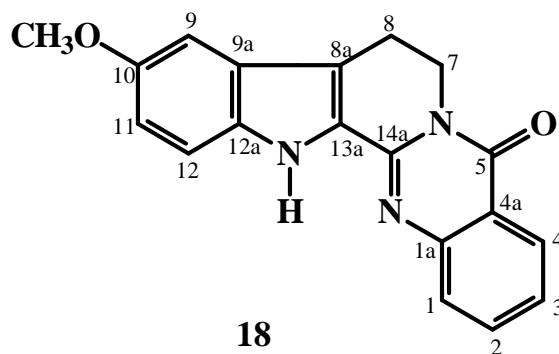


rutaecarpina

Origem: extrato metanólico do tronco de *H. superba* Ducke

Isolamento: p. 38

Identificação estrutural: p. 189

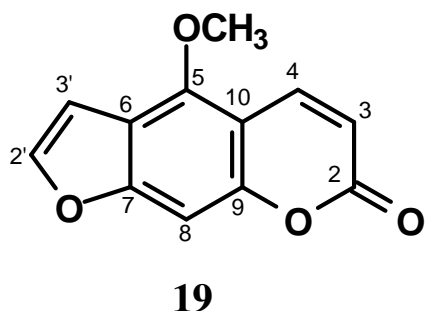


hortiacina

Origem: extratos metanólicos dos troncos de *H. brasiliiana* Vand. ex DC. e *H. superba* Ducke

Isolamento: ps. 39 e 40

Identificação estrutural: p. 193

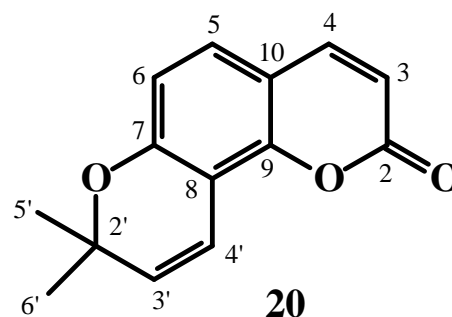


bergapteno

Origem: extratos metanólicos dos troncos de *H. brasiliiana* Vand. ex DC. e *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani

Isolamento: ps. 36 e 40

Identificação estrutural: p. 202

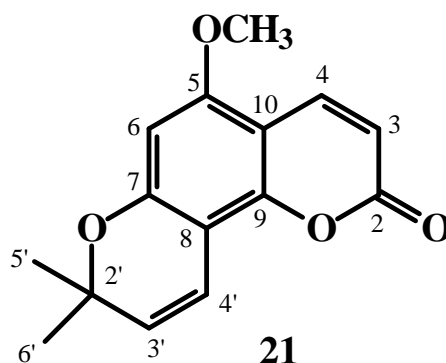


seselina

Origem: extrato metanólico do tronco de *H. superba* Ducke

Isolamento: ps. 38 e 39

Identificação estrutural: p. 207



5-metóxi-seselina

Origem: extratos metanólicos dos troncos de *H. brasiliiana* Vand. ex DC. e *H. superba* Ducke

Isolamento: ps. 38 e 40

Identificação estrutural: p. 21

1.4.2 Determinações Estruturais dos Limonoides Isolados de Plantas do Gênero *Hortia*:

Alguns limonoides têm sido relatados para o gênero *Hortia*. O primeiro limonoide descrito na literatura para o gênero, chamado de guianina (estrutura **IX**, p. 16), foi isolado de *H. regia* Sandwith em 1986 (JACOBS *et al.*, 1986). Este limonoide, por apresentar um esqueleto muito complexo, sugeria a presença de outros limonoides no gênero.

Em 1998 foi isolado da espécie *H. colombiana* Gleason (nome correto: *H. brasiliana* Vand. ex DC.) o limonoide denominado hortiolida A (estrutura **VII**, p. 16) cuja estrutura é bem mais simples em relação ao primeiro isolado (SUAREZ *et al.*, 1998). Em 2002 foi isolado desta mesma espécie o limonoide denominado hortiolida B (estrutura **VIII**, p. 16) cuja estrutura é bastante similar à hortiolida A (SUAREZ *et al.*, 2002).

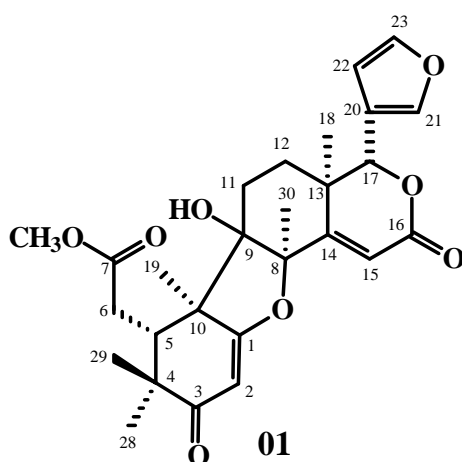
Em 2005 foram isolados da espécie *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani três limonoides inéditos na literatura, sendo eles: 9,11-desidro-12 α -acetóxi-hortiolida A (estrutura **XIII**, p. 17), hortiolida D (estrutura **X**, p. 17) e hortiolida E (estrutura **XI**, p. 17) (BRAGA, 2005), além do limonoide guianina, já descrito para *Hortia*. BRAGA (2005) isolou de *H. superba* Ducke o limonoide hortiolida C (estrutura **XII**, p. 17), também inédito na literatura. Em 2008, foram isolados pela primeira vez da espécie *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani os limonoides hortiolida C, 11 α -acetóxi-15-desóxi-6-hidróxi-hortiolida C (estrutura **XIV**, p. 18), inédito na literatura, além do limonoide guianina (SEVERINO, 2008).

No presente trabalho, que deu continuidade ao estudo químico de *H. brasiliana* Vand. ex DC., *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani e *H. superba* Ducke, foram isolados dez limonoides das espécies *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani e *H. superba* Ducke, sendo: 9-hidróxi-hortiolida A (**substância 01**), 9,11-desidro-12 α -hidróxi-hortiolida A (**substância 02**),

hortiolida C (**substância 03**), 6-hidróxi-hortiolida C (**substância 04**), 11 β -hidróxi-hortiolida C (**substância 05**), hortiolida D (**substância 06**), hortiolida E (**substância 07**), 12 β -hidróxi-hortiolida E (**substância 08**), limonina (**substância 09**) e (*S*)-1-acetóxi-7-desoxo-7 α -hidróxi-ichangina (**substância 10**). Destes, os compostos **06** e **07** já haviam sido obtidos nos estudos anteriores com o mesmo espécime de *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani (BRAGA, 2005) e **03** dos espécimes de *H. superba* Ducke e *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani (BRAGA, 2005; SEVERINO, 2008). Neste estudo foi proposta a correção da estereoquímica da hidroxila ligada no C-15 para as estruturas **03** (p. 73) e **06** (p. 101), pois segundo dados da literatura (BRAGA, 2005 e SEVERINO, 2008) as hidroxilas destes compostos foram posicionadas na face β da molécula e desta forma, no presente trabalho foi reposicionada na face α , baseado em dados do experimento de g-NOESY-1D.

1.4.2.1 9-Hidróxi-hortiolida A – substância 01

A substância **01** foi isolada do extrato metanólico do tronco subterrâneo de *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani e teve sua estrutura determinada através de experimento de RMN de ^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC, COSY e EM de alta resolução (HRESI-MS). A determinação estrutural também foi baseada em comparação dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C com aqueles da hortiolida A (TABELA 1.12, p. 55) (SUAREZ *et al.*, 2002). Não há descrição desta estrutura na literatura.



A substância **01** apresentou características espectrais similares à hortiolida A ($\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_7$) (FIGURA 1.1, p. 50). Pelo espectro de massas de **01** (FIGURA 1.7, p. 61) foi possível observar os íons m/z 485,2173 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) e m/z 507,1984 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) que estão de acordo com a massa molecular real (484,2097) e fórmula molecular $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_8$, indicando a presença de um grupo hidroxila adicional em comparação a hortiolida A.

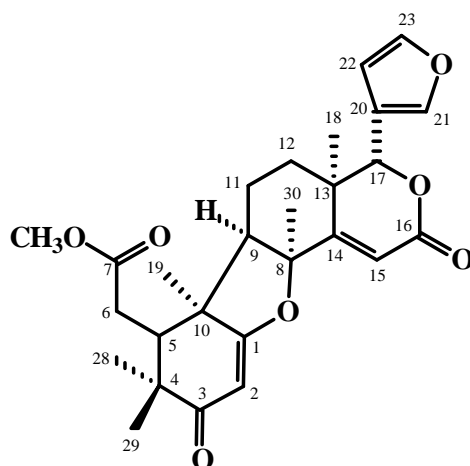


FIGURA 1.1: Estrutura do limonoide Hortiolida A

(Fonte: SUAREZ *et al.*, 2002)

A análise do espectro de RMN ^1H de **01** (FIGURA 1.2, p. 56) mostrou sinais dos hidrogênios do anel furano H-21, H-23 e H-22 em δ 7,53 (1H, *sl*), δ 7,45 (1H, *sl*) e δ 6,51 (1H, *dd*, $J = 1,7$ Hz e 0,4 Hz) respectivamente.

A análise conjunta dos espectros de RMN de ^{13}C (FIGURA 1.3, p. 57) e HSQC (FIGURA 1.4, p. 58) permitiu atribuir todos os carbonos do esqueleto (TABELA 1.11, p. 54), sendo os sinais em δ 142,0, δ 143,2 e δ 110,5 relativos aos carbonos C-21, C-23 e C-22 do anel furano, respectivamente.

A observação no espectro de HMBC (FIGURA 1.5, p. 59) da correlação do sinal de hidrogênio carbinólico em δ 5,13 (1H, *s*), referente ao H-17, com os sinais dos carbonos C-20, C-21 e C-22 do anel furano permitiu confirmar a presença de lactona no anel D. O sinal de H-17 ainda mostrou correlações com os sinais em δ 25,9 (H-12), δ 21,5 atribuído a Me-18, δ 37,2 e δ 168,4.

O sinal da Me-18 em δ 1,21 (3H, *s*) correlacionou-se no HMBC com um sinal em δ 79,6 (C-17), com um sinal em δ 25,9 (C-12) e com os sinais em δ 37,2 e δ 168,4, cujo H-17 também correlacionou-se, sendo, portanto atribuídos ao C-13 e C-14, respectivamente.

Os sinais de hidrogênios em δ 1,79 (1H, *m*) e δ 1,65 (1H, *m*) mostraram correlação via HSQC com o sinal em δ 25,9, com o qual a Me-18 também se correlacionou através do experimento de HMBC, confirmando ser o C-12. No espectro de HMBC foi possível observar a correlação do sinal em δ 1,79 com o sinal de C-17 (δ 79,6).

A análise do espectro de COSY (FIGURA 1.6, p. 60) mostrou o acoplamento dos sinais de H-12 com dois sinais, sendo um em δ 1,41 (1H, *m*) e outro em δ 1,26 (1H, *m*). Estes sinais foram atribuídos aos hidrogênios H-11a e H-11 b, respectivamente, os quais mostraram correlação via HSQC com um sinal em δ 29,8. Pelo HMBC, o sinal de H-11b mostrou correlação com um sinal em δ 25,9, atribuído anteriormente ao C-12.

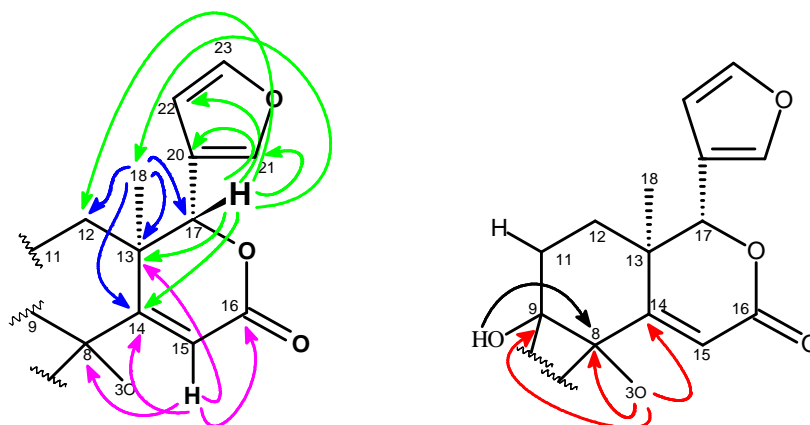
O sinal em δ 6,37 (1H, *s*), que correlacionou-se no HSQC com um sinal em δ 116,8, mostrou no HMBC correlações com os sinais em δ 37,2 (C-13); δ 168,4 (C-14) e com um sinal em δ 164,5 relativo ao C-16, o que permitiu atribuí-lo ao H-15. Este sinal ainda mostrou correlação com um sinal de carbono carbinólico em δ 90,2, sendo possível atribuí-lo ao C-8.

Pelo HMBC, a correlação do sinal em δ 1,71 (3H, *s*) com o sinal de C-8 (δ 90,2) permitiu atribuí-lo a Me-30, que ainda mostrou correlação com C-14 (δ 168,4) e com um sinal em δ 80,5 atribuído ao C-9.

O fato deste sinal ser relativo a um carbono tetrassubstituído, aliado à diferença de deslocamento químico do carbono metínico C-9 da hortiolida A (δ 56,4) (SUAREZ *et al.*, 2002) para C-9 (tetrassubstituído) desta substância indicou a existência de um grupo hidroxila neste carbono. Além disso, pelo HMBC foi possível observar a correlação de um sinal em δ 2,94 (1H, *s*), atribuído a hidrogênio ligado a oxigênio devido à ausência de correlação deste sinal no HSQC, com o sinal de C-8 (δ 90,2), confirmando a presença da hidroxila em C-9. Além disso, foram observadas desproteção dos sinais de C-8 (δ 90,2) e C-11 (δ 29,8) e proteção do sinal de C-12 (δ 25,9) desta molécula em

relação aos respectivos carbonos da hortiolida A [C-8 (δ 89,3), C-11 (δ 21,8) e C-12 (δ 30,3)] que confirmam a localização da hidroxila em C-9 na substância **01**.

As principais correlações descritas anteriormente são apresentadas a seguir.



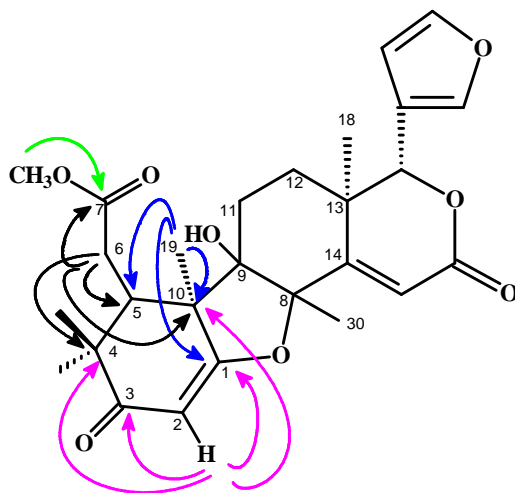
A presença do sinal relativo à metoxila em δ 3,72 (3H, *s*), correlacionando-se via HMBC com o sinal em δ 174,7, sugeriu o anel B *seco*. O sinal em δ 2,61 (H-5, 1H, *m*) que mostrou no HSQC correlação com o sinal em δ 42,3, correlacionou-se no HMBC com os sinais de C-6 (δ 31,5), C-4 (δ 44,9) e com um sinal em δ 50,6 que pôde ser atribuído somente ao C-10. Os sinais relativos aos hidrogênios H-6 em δ 2,57 (*m*) mostraram correlação via HSQC com um sinal em δ 31,5 e via HMBC com os sinais de C-5 (δ 42,3), C-4 (δ 44,9) e C-10 (δ 50,6). Além disso, o sinal de H-6 mostrou correlação com um sinal em δ 174,7, o qual a metoxila em δ 3,72 também correlacionou-se, sendo, portanto este sinal atribuído ao C-7.

O espectro de HMBC mostrou duas metilas com deslocamentos químicos de δ 1,19 (3H, *s*) e δ 1,11 (3H, *s*) correlacionando-se com o sinal de C-3 em δ 202,0, com os sinais em δ 44,9 (C-4) e δ 42,3 (C-5) e entre si, o que permitiu atribuí-las às metilas Me-28 e Me-29, respectivamente. A presença do singlete em δ 5,45 (1H) correlacionando-se no HSQC com o sinal em δ 102,3

indicou a presença de uma ligação dupla entre C-1 e C-2. O sinal atribuído ao H-2 em δ 5,45 mostrou correlação no HMBC com C-4 (δ 44,9), C-10 (δ 50,6), C-1 (δ 178,8) e C-3 (δ 202,0).

No espectro de HMBC ainda foi possível observar a correlação de mais um sinal referente à metila em δ 1,52 (3H, s) com o sinal atribuído a C-9. Este sinal que pôde ser atribuído somente a Me-19 ainda mostrou correlação com C-1 (δ 178,8), C-10 (δ 50,6), C-5 (δ 42,3).

Algumas correlações descritas anteriormente são apresentadas a seguir.



Portanto, a análise conjunta dos espectros de RMN e EM permitiu definir a estrutura da substância **01** como sendo a do limonoide 9-hidróxi-hortiolida A.

Vários experimentos de g-NOESY foram realizados até o presente momento; no entanto em nenhum deles foi possível obter resultados que permitissem estabelecer a estereoquímica da hidroxila em C-9, pois o hidrogênio da mesma mostra NOE com todas as metilas da molécula, tanto aquelas que estão em α quanto em β . Novos experimentos estão sendo realizados variando alguns parâmetros, visando à obtenção de dados mais promissores.

TABELA 1.11: Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e correlações observadas no HMBC para a substância **01**

H/C	Substância 01 (400/100 MHz, CDCl_3)		Correlações observadas no HMBC
	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm)	
1	-	178,8	-
2	5,45 (1H, <i>s</i>)	102,3	C-1, C-3, C-4 e C-10
3	-	202,0	-
4	-	44,9	-
5	2,61 (1H, <i>m</i>)	42,3	C-4, C-6 e C-10
6	2,57 (1H, <i>m</i>)	31,5	C-4, C-5, C-7 e C-10
7	-	174,7	-
8	-	90,2	-
9	-	80,5	-
10	-	50,6	-
11a	1,41 (1H, <i>m</i>)	29,8	C-12
11b	1,26 (1H, <i>m</i>)		
12a	1,79 (1H, <i>m</i>)	25,9	C-17
12b	1,65 (1H, <i>m</i>)		
13	-	37,2	-
14	-	168,4	-
15	6,37 (1H, <i>s</i>)	116,8	C-8, C-13, C-14 e C-16
16	-	164,5	-
17	5,13 (1H, <i>s</i>)	79,6	C-12, C-13, C-14, C-18, C-20, C-21 e C-22
Me-18	1,21 (3H, <i>s</i>)	21,5	C-12, C-13, C-14 e C-17
Me-19	1,52 (3H, <i>s</i>)	19,1	C-1, C-5, C-9 e C-10
20	-	119,7	-
21	7,53 (1H, <i>sl</i>)	142,0	C-17, C-20, C-22 e C-23
22	6,51 (1H, <i>dd</i> , $J= 1,7$ e $0,4$)	110,5	C-20, C-21 e C-23
23	7,45 (1H, <i>sl</i>)	143,2	C-20 e C-21
Me-28	1,19 (3H, <i>s</i>)	22,7	C-3, C-4, C-5 e C-29
Me-29	1,11 (3H, <i>s</i>)	27,0	C-3, C-4, C-5 e C-28
Me-30	1,71 (1H, <i>s</i>)	27,0	C-8, C-9 e C-14
7-OMe	3,72 (3H, <i>s</i>)	52,3	C-7
9-OH	2,94 (1H, <i>s</i>)	-	C-8

TABELA 1.12: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da hortiolida A para comparação com alguns limonoides isolados neste trabalho

Hortiolida A (300/75 MHz, CDCl_3) (SUAREZ <i>et al.</i> , 2002)		
H/C	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm)
1	-	179,7
2	5,44 (<i>s</i>)	101,3
3	-	202,2
4	-	44,3
5	2,56 (<i>dd</i> , $J= 10$ e 1,6)	42,3
6a	2,70 (<i>dd</i> , $J= 15,5$ e 10,0)	32,6
6b	2,27 (<i>dd</i> , $J= 15,5$ e 1,6)	
7	-	173,2
8	-	89,3
9	2,11 (<i>dd</i> , $J= 12,7$ e 4,4)	56,4
10	-	48,0
11	1,78 (<i>m</i>)	21,8
12a	1,93 (<i>dd</i> , $J= 13,0$ e 4,5)	30,3
12b	1,12 (<i>m</i>)	
13	-	37,7
14	-	167,1
15	6,37 (<i>s</i>)	116,0
16	-	164,3
17	5,20 (<i>s</i>)	78,9
Me-18	1,20 (<i>s</i>)	20,9
Me-19	1,50 (<i>s</i>)	25,8
20	-	119,6
21	7,53 (<i>s</i>)	142,0
22	6,50 (<i>s</i>)	110,4
23	7,45 (<i>t</i> , $J= 1,7$)	143,0
Me-28	1,22 (<i>s</i>)	22,7
Me-29	1,07 (<i>s</i>)	27,0
Me-30	1,82 (<i>s</i>)	31,1
7-OMe	3,72 (<i>s</i>)	52,0

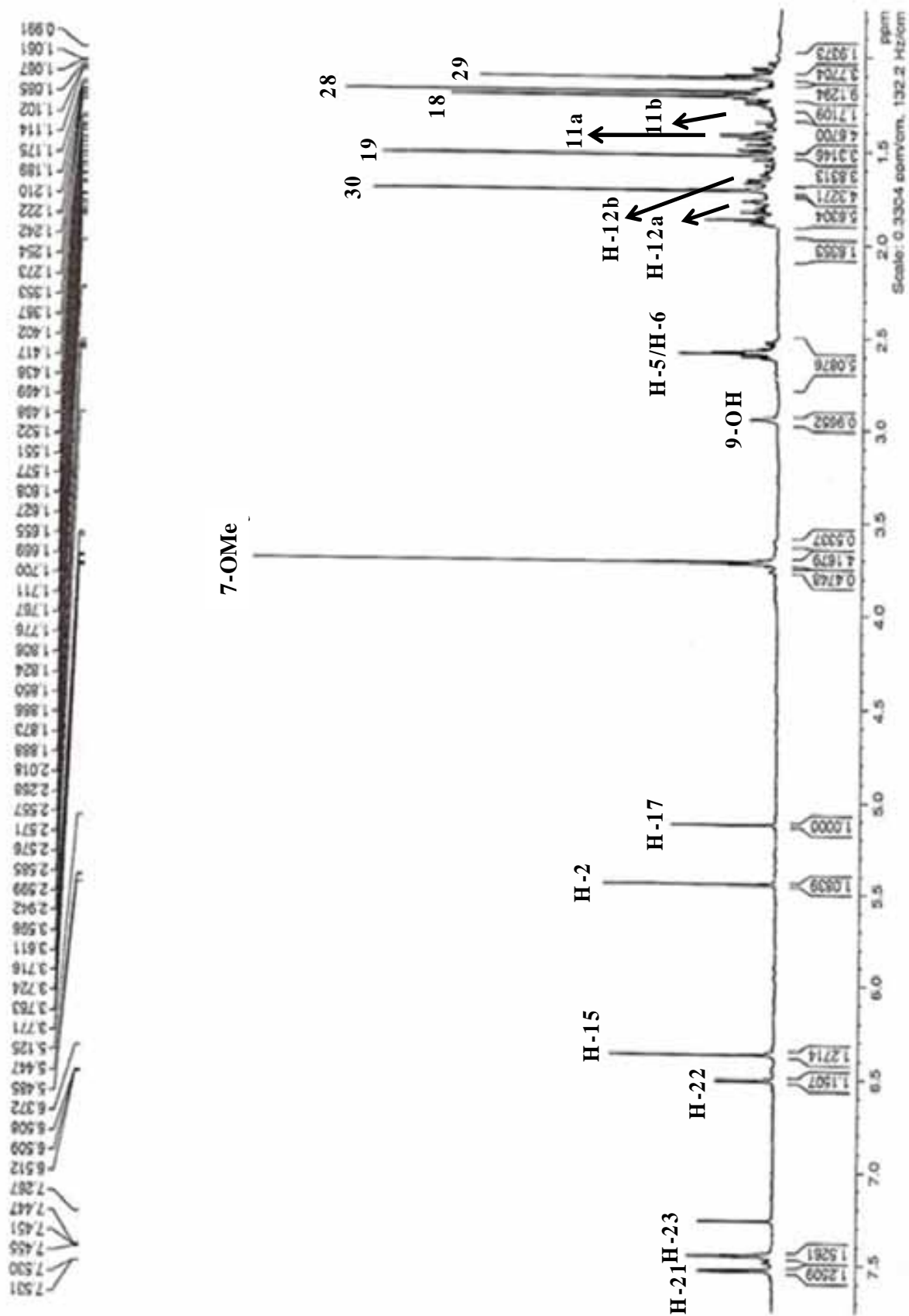


FIGURA 1.2: Espectro de RMN de ^1H de **01** (CDCl_3 , 400 MHz)

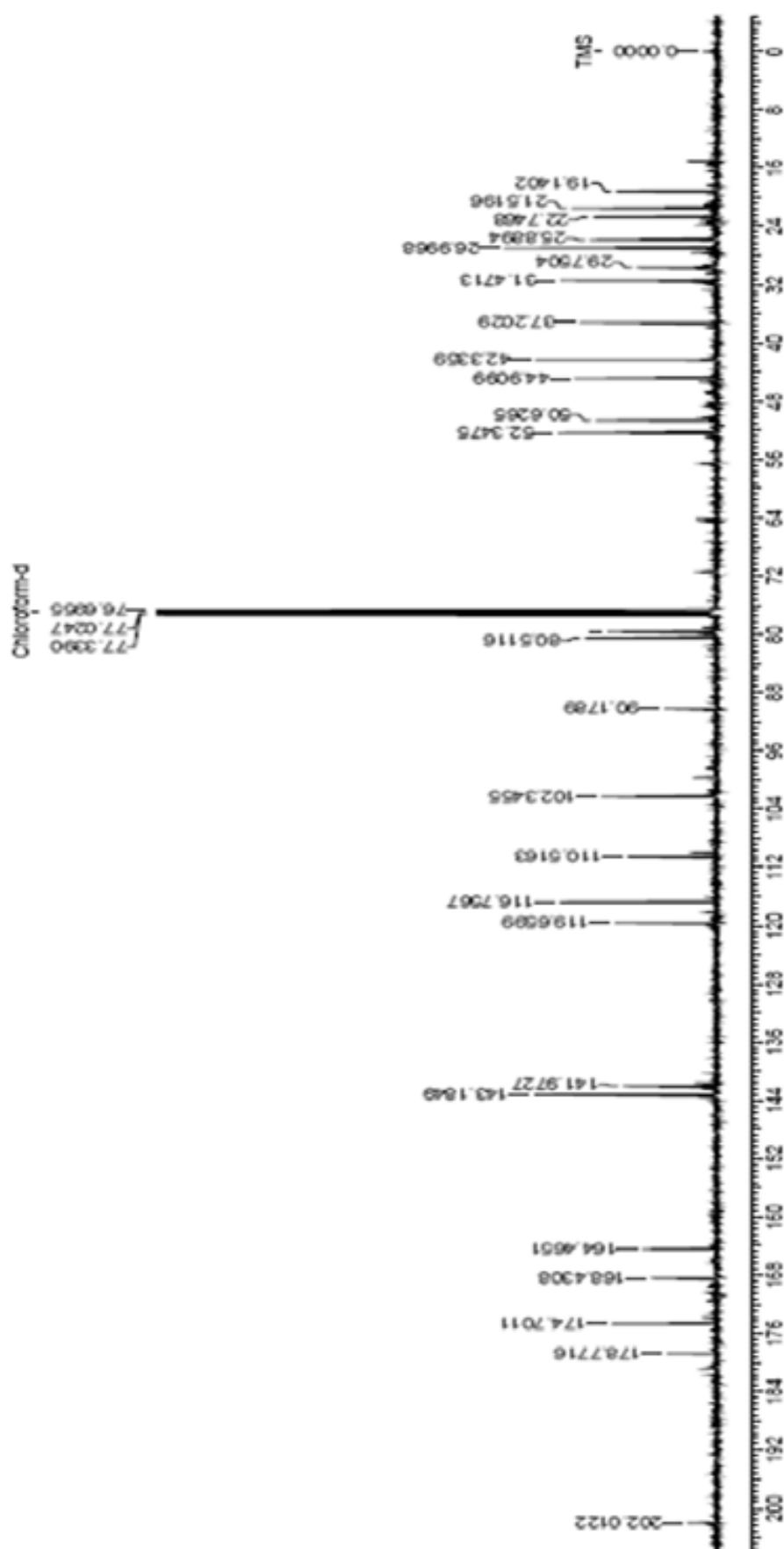


FIGURA 1.3: Espectro de RMN de ¹³C de **01** (CDCl₃, 100 MHz)

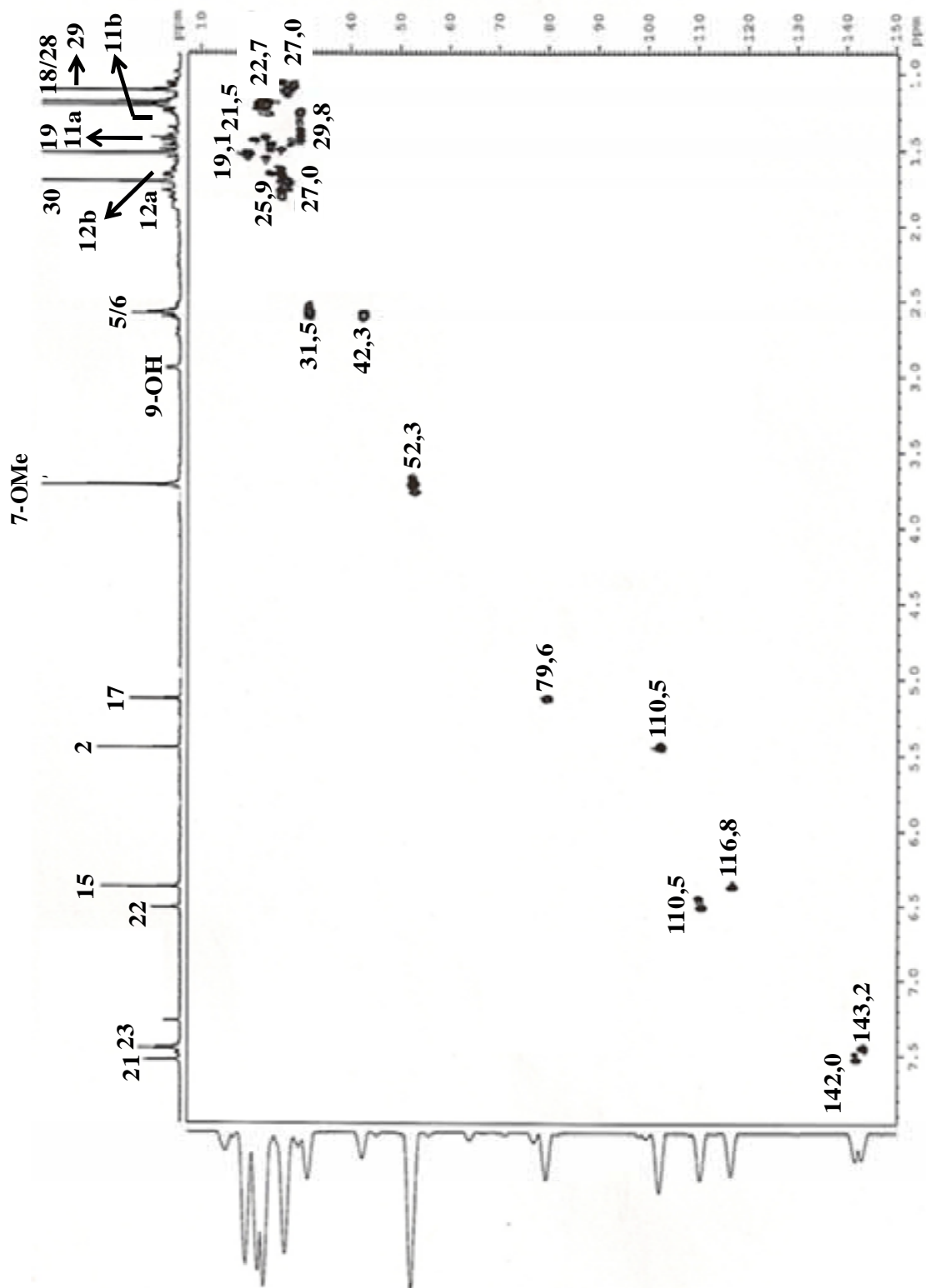


FIGURA 1.4: Mapa de contorno de g-HSQC de **01** (CDCl₃, 400 MHz)

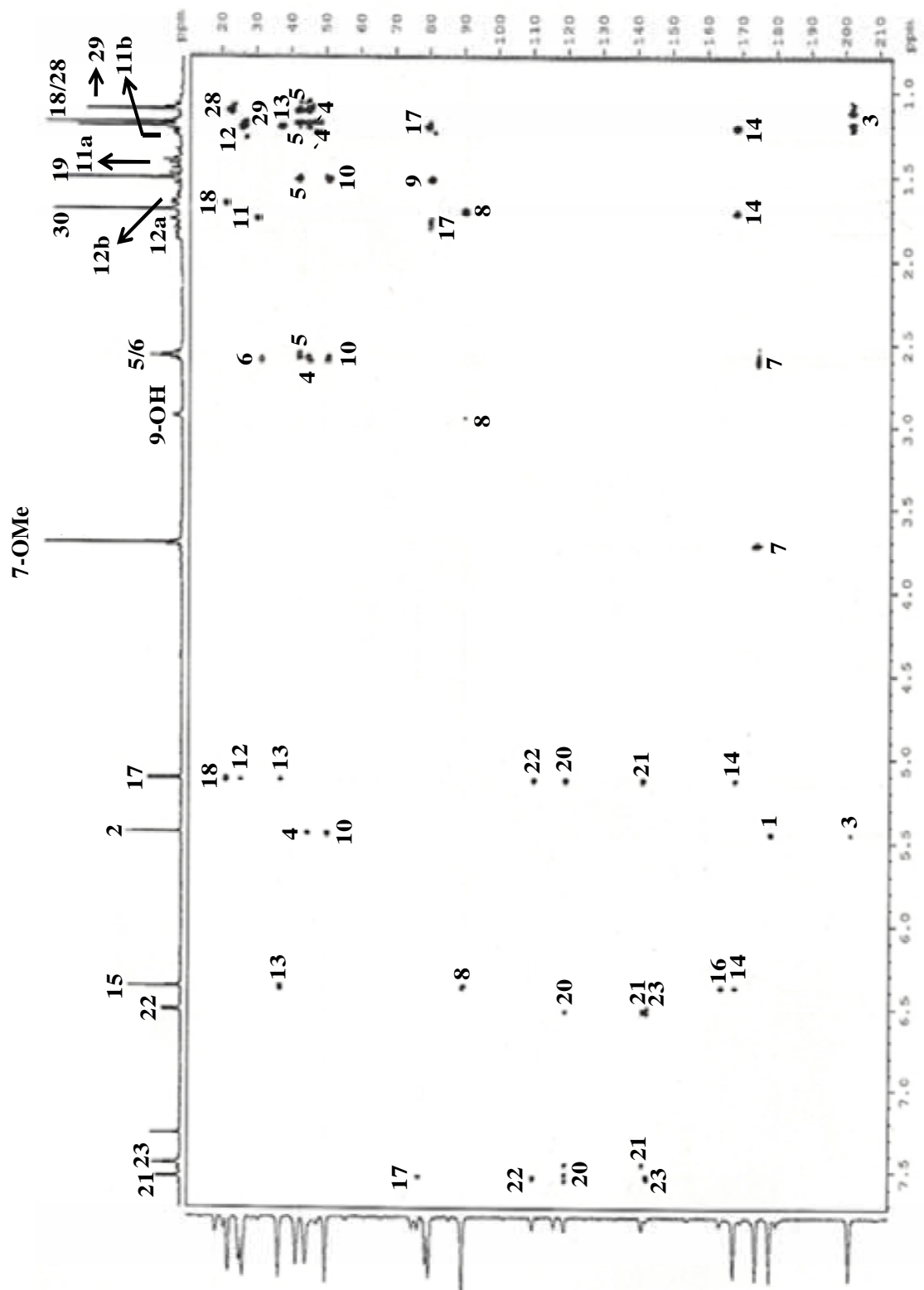


FIGURA 1.5: Mapa de contorno de g-HMBC de **01** (CDCl₃, 400 MHz)

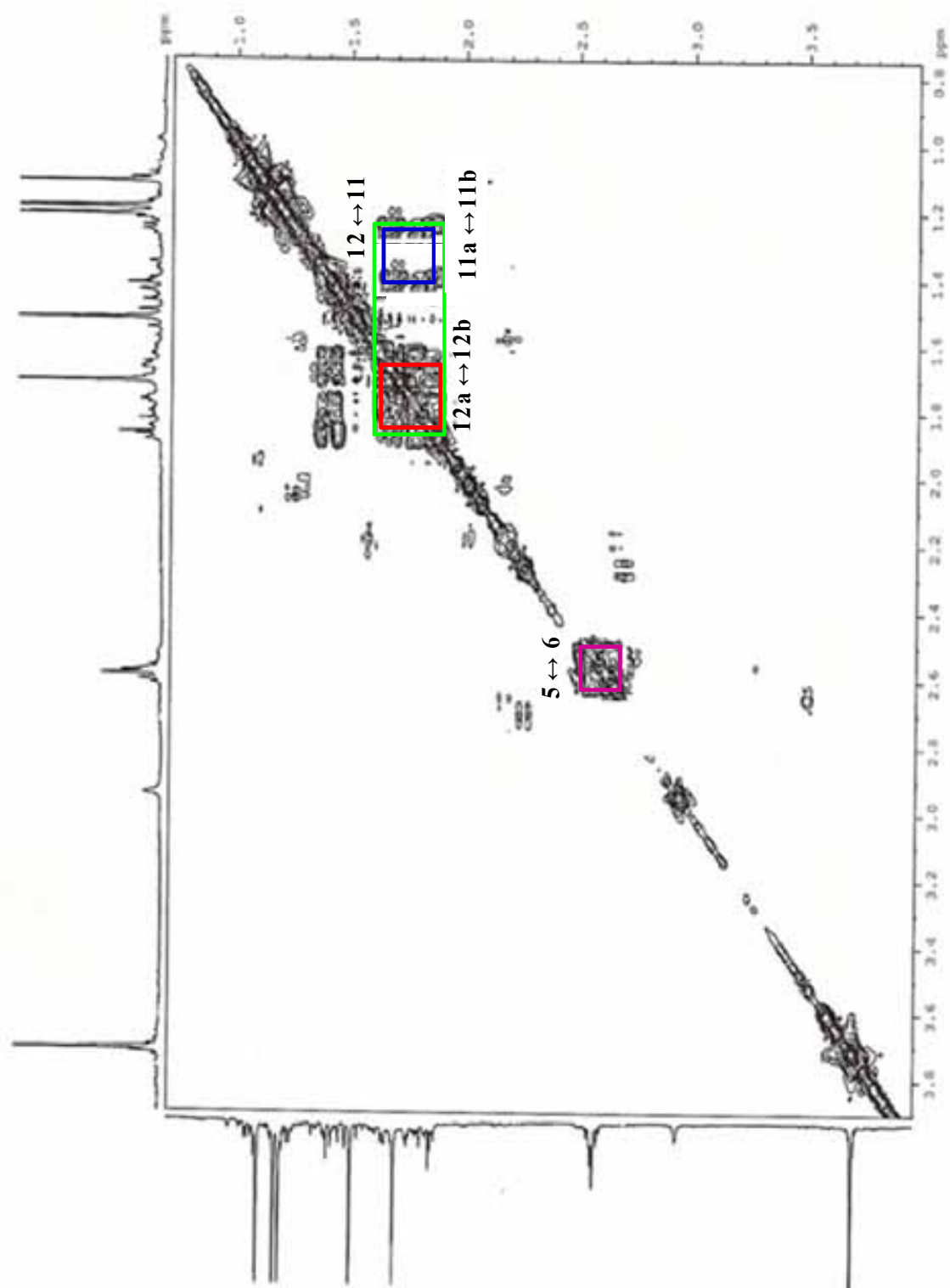


FIGURA 1.6: Espectro de g-COSY de **01** (CDCl₃, 400 MHz)

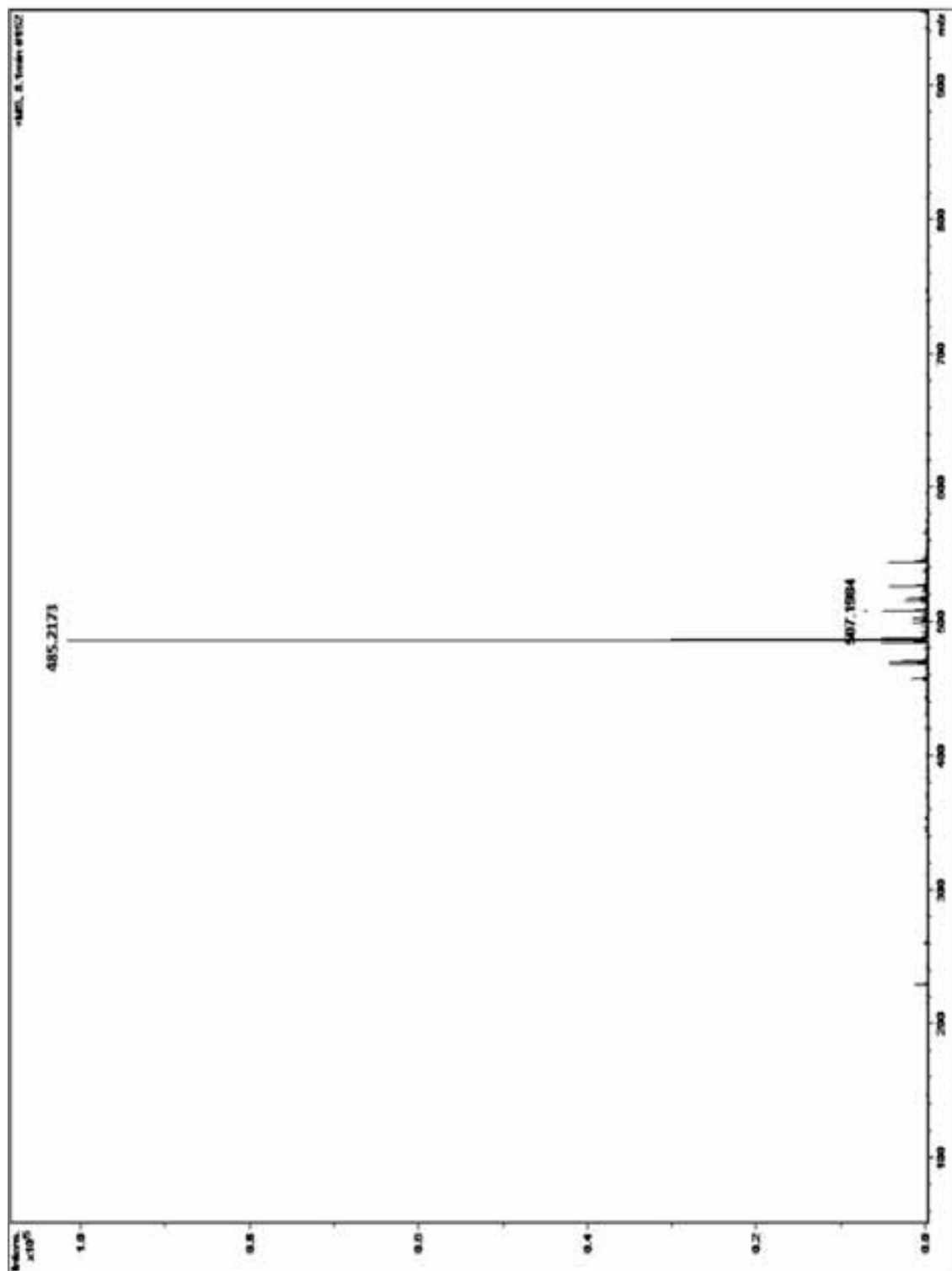
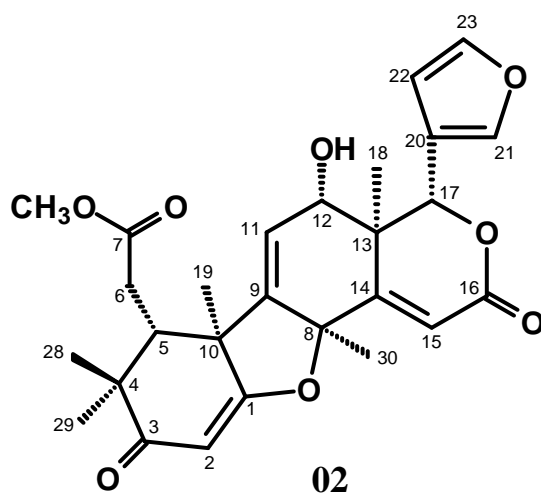


FIGURA 1.7: Espectro de massas de **01** (HRESI-MS, modo positivo)

1.4.2.2 9,11-Desidro-12 α -hidróxi-hortiolida A – substância 02

A substância **02** foi isolada do extrato metanólico do tronco de *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani e teve sua estrutura determinada através de experimento de RMN de ^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC, COSY, g-NOESY-1D e EM de alta resolução (HRESI-MS). A determinação estrutural também foi baseada em comparação com os dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C da substância 9,11-desidro-12 α -acetóxi-hortiolida A (estrutura **XIII**, p. 17) (BRAGA, 2005). Não há descrição desta estrutura na literatura.



A substância **02** apresentou características espectrais similares às da 9,11-desidro-12 α -acetóxi-hortiolida A ($\text{C}_{29}\text{H}_{32}\text{O}_9$). Pelo espectro de massas de **02** (FIGURA 1.14, p. 72) foi possível observar os íons m/z 483,2010 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), m/z 505,1845 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) e m/z 521,1590 ($[\text{M}+\text{K}]^+$) que estão de acordo com a massa molecular real (482,1941) e fórmula molecular $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_8$, sugerindo a presença de um grupo hidroxila em substituição ao grupo acetoxila de 9,11-desidro-12 α -acetóxi-hortiolida A.

A análise dos espectros de RMN de ^1H (FIGURA 1.8, p. 66), ^{13}C (FIGURA 1.9, p. 67) e HSQC (FIGURA 1.10, p. 68) de **02** permitiu atribuir todos os hidrogênios e carbonos do esqueleto (TABELA 1.13, p. 65).

A observação no espectro de HMBC (FIGURA 1.11, p. 69) da correlação do sinal de hidrogênio carbinólico em δ 4,91 (1H, s), referente ao H-

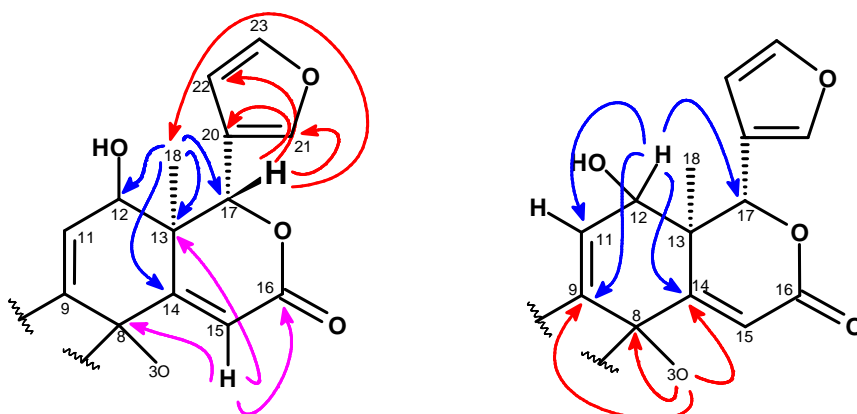
17, com os sinais dos carbonos C-20, C-21 e C-22 do anel furano permitiu confirmar a presença de lactona no anel D. O sinal de H-17 ainda mostrou correlação com o sinal de uma metila em δ 15,6 que pôde ser atribuída somente a Me-18.

A análise do espectro de COSY (FIGURA 1.12, p. 70) mostrou o acoplamento do hidrogênio carbinólico H-12 em δ 4,25 com o sinal do hidrogênio olefínico em δ 6,20 (1H, *d*, $J=6,8$ Hz). Este sinal somente pôde ser atribuído ao H-11 e tanto sua multiplicidade quanto seu deslocamento químico indicaram a presença de uma insaturação entre os carbonos C-11 e C-9 no anel C. O sinal de H-11 (δ_{H} 6,20; δ_{C} 120,7) correlacionou-se no HMBC com o sinal de C-12 (δ 66,0) e com os sinais em δ 43,1, δ 47,0 e δ 86,5. Devido às correlações observadas para Me-18 e H-11 com o sinal em δ 43,1, o mesmo pôde ser atribuído somente ao carbono C-13. A desproteção deste carbono em relação ao mesmo carbono na estrutura de hortiolida A (estrutura **VII**, p. 16) (δ_{C} 37,7) é compatível com a localização do grupo hidroxila em C-12. Da mesma forma as correlações simultâneas de H-12 e Me-18 com um sinal em δ 167,3 permitiram atribuí-lo ao carbono C-14.

O sinal em δ 6,07 (1H, *s*), que correlacionou-se no HSQC com o sinal em δ 109,8, mostrou no HMBC correlações com C-13 (δ 43,1) e com o sinal em δ 163,5 relativo ao C-16, o que permitiu atribuí-lo ao H-15. Este sinal ainda mostrou correlação com o sinal de carbono carbinólico em δ 86,5, cujo H-11 também correlacionou-se, sendo possível atribuí-lo somente ao C-8 para justificar a correlação simultânea dos dois sinais de hidrogênios.

A correlação do sinal em δ 2,01 (3H, *s*) relativo a uma metila, com o sinal de C-8 (δ 86,5) permitiu atribuí-lo a Me-30, que ainda mostrou correlação com C-14 (δ 167,3) e com o mesmo sinal em δ 153,3 que H-12 correlacionou-se no HMBC, sendo, portanto este sinal atribuído ao C-9. A presença de um dubleto para o C-12 com um deslocamento químico em 4,25

indicou que este carbono sustenta um grupo hidroxila. Algumas correlações descritas anteriormente são mostradas a seguir:



A presença do sinal em δ 3,76 (3H, s), correlacionando-se com o sinal em δ 173,6, sugeriu o anel B *seco*. O sinal em δ 2,73 (H-5, 1H, *m*) que mostrou no HSQC correlação com o sinal em δ 45,4, correlacionou-se no HMBC com os sinais de C-7 em δ 173,6, δ 32,2 relativo ao CH₂ de C-6 e δ 47,0 que pôde ser atribuído somente ao C-10, justificando também a correlação de H-11 (δ 6,20) com o mesmo. Os sinais relativos aos hidrogênios H-6a em δ 2,77 (*m*) e H-6b em δ 2,70 (*m*) mostraram correlação com C-5 (δ 45,4) e com C-10 (δ 47,0).

Pelo experimento de g-NOESY-1D (FIGURA 1.13, p. 71), quando o sinal de H-17 em δ 4,91 foi irradiado, observou-se NOE com o sinal em δ 4,25 atribuído ao H-12, sugerindo uma proximidade espacial entre H-17 β e H-12 e indicando que o grupo hidroxila em C-12 está posicionado *anti* (α) a H-17 (β).

Portanto, a análise conjunta dos espectros de RMN e EM permitiu definir a estrutura da substância **02** como sendo a do limonoide 9,11-desidro-12 α -hidróxi-hortiolida A.

TABELA 1.13: Dados de RMN de ^1H , ^{13}C da substância **02** e comparação com dados da literatura

H/C	Substância 02 (400/100 MHz, CDCl_3)		BRAGA (2005) (400/100 MHz, CDCl_3)	
	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm)	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm)
1	-	178,0	-	177,6
2	5,49 (1H, <i>s</i>)	101,8	5,52 (1H, <i>s</i>)	102,1
3	-	201,8	-	201,7
4	-	45,1	-	44,2
5	2,73 (1H, <i>m</i>)	45,4	2,72 (<i>d</i> , $J=0,9$)	45,4
6a	2,77 (1H, <i>m</i>)	32,2	2,75 (<i>m</i>)	32,1
6b	2,70 (1H, <i>m</i>)		2,64 (<i>m</i>)	
7	-	173,6	-	173,3
8	-	86,5	-	86,3
9	-	153,3	-	155,1
10	-	47,0	-	47,0
11	6,20 (1H, <i>d</i> , $J=6,8$)	120,7	6,18 (1H, <i>d</i> , $J=6,9$)	118,1
12	4,25 (1H, <i>d</i> , $J=6,8$)	66,0	5,28 (1H, <i>d</i> , $J=6,9$)	67,3
13	-	43,1	-	42,1
14	-	167,3	-	166,0
15	6,07 (1H, <i>s</i>)	109,8	6,10 (1H, <i>d</i> , $J=0,3$)	110,3
16	-	163,5	-	163,1
17	4,91 (1H, <i>s</i>)	79,8	4,98 (1H, <i>s</i>)	79,6
Me-18	1,43 (3H, <i>s</i>)	15,6	1,35 (3H, <i>s</i>)	15,6
Me-19	1,58 (3H, <i>s</i>)	22,8	1,54 (3H, <i>s</i>)	22,9
20	-	119,9	-	119,2
21	7,53 (1H, <i>m</i>)	142,2	7,57 (1H, <i>m</i>)	142,4
22	6,52 (1H, <i>m</i>)	110,3	6,51 (1H, <i>dd</i> , $J=1,6$ e $0,6$)	110,1
23	7,47 (1H, <i>t</i> , $J=1,6$)	143,7	7,48 (1H, <i>t</i> , $J=1,6$)	143,8
Me-28	1,06 (3H, <i>s</i>)	25,9	1,06 (3H, <i>s</i>)	25,9
Me-29	1,23 (3H, <i>s</i>)	22,6	1,22 (3H, <i>s</i>)	22,6
Me-30	2,01 (1H, <i>s</i>)	27,3	1,97 (1H, <i>s</i>)	26,8
7-OMe	3,76 (3H, <i>s</i>)	52,3	3,77 (3H, <i>s</i>)	52,4
OCOMe	-	-	2,02 (1H, <i>s</i>)	20,8

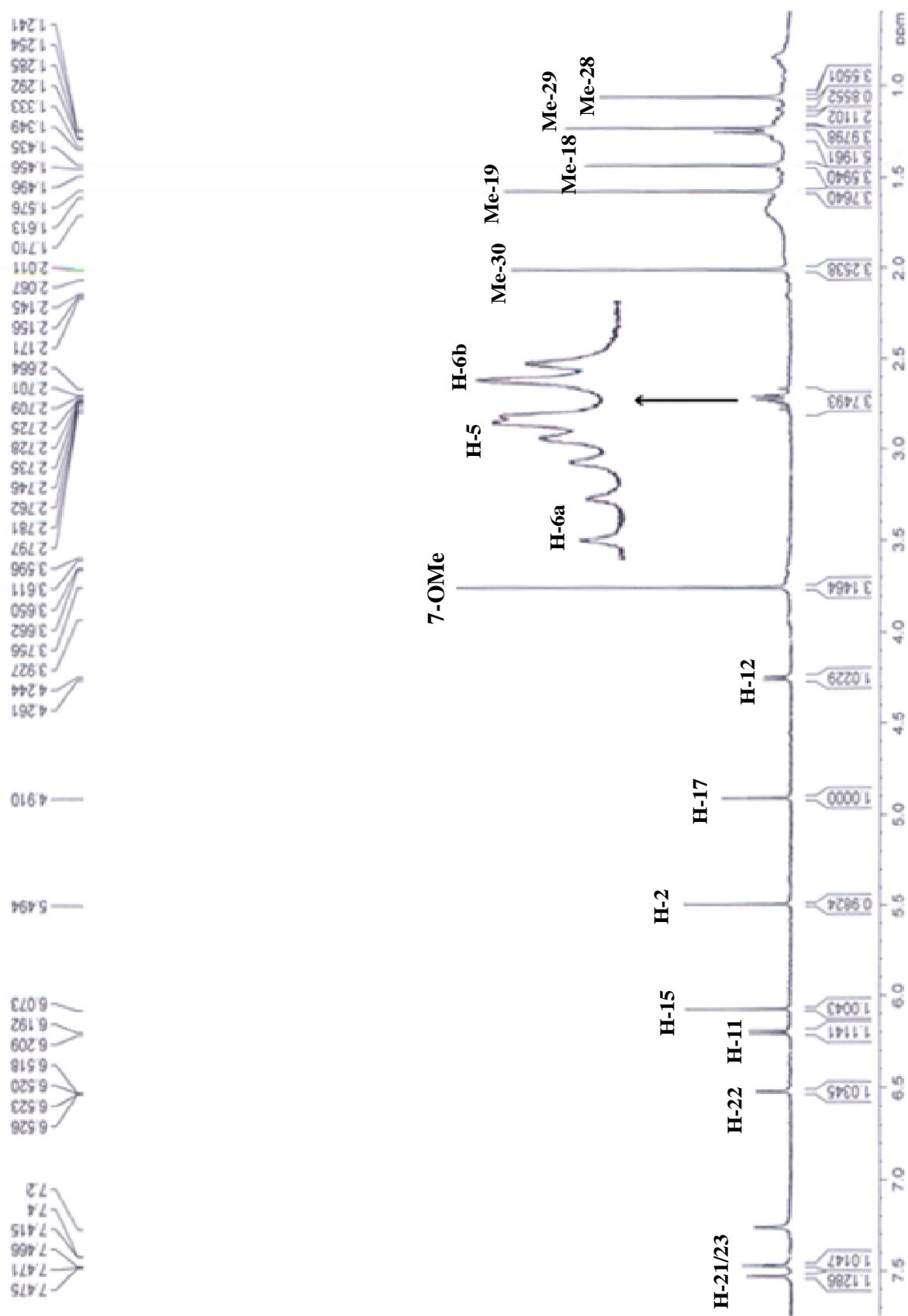


FIGURA 1.8: Espectro de RMN de ^1H de **02** (CDCl_3 , 400 MHz)

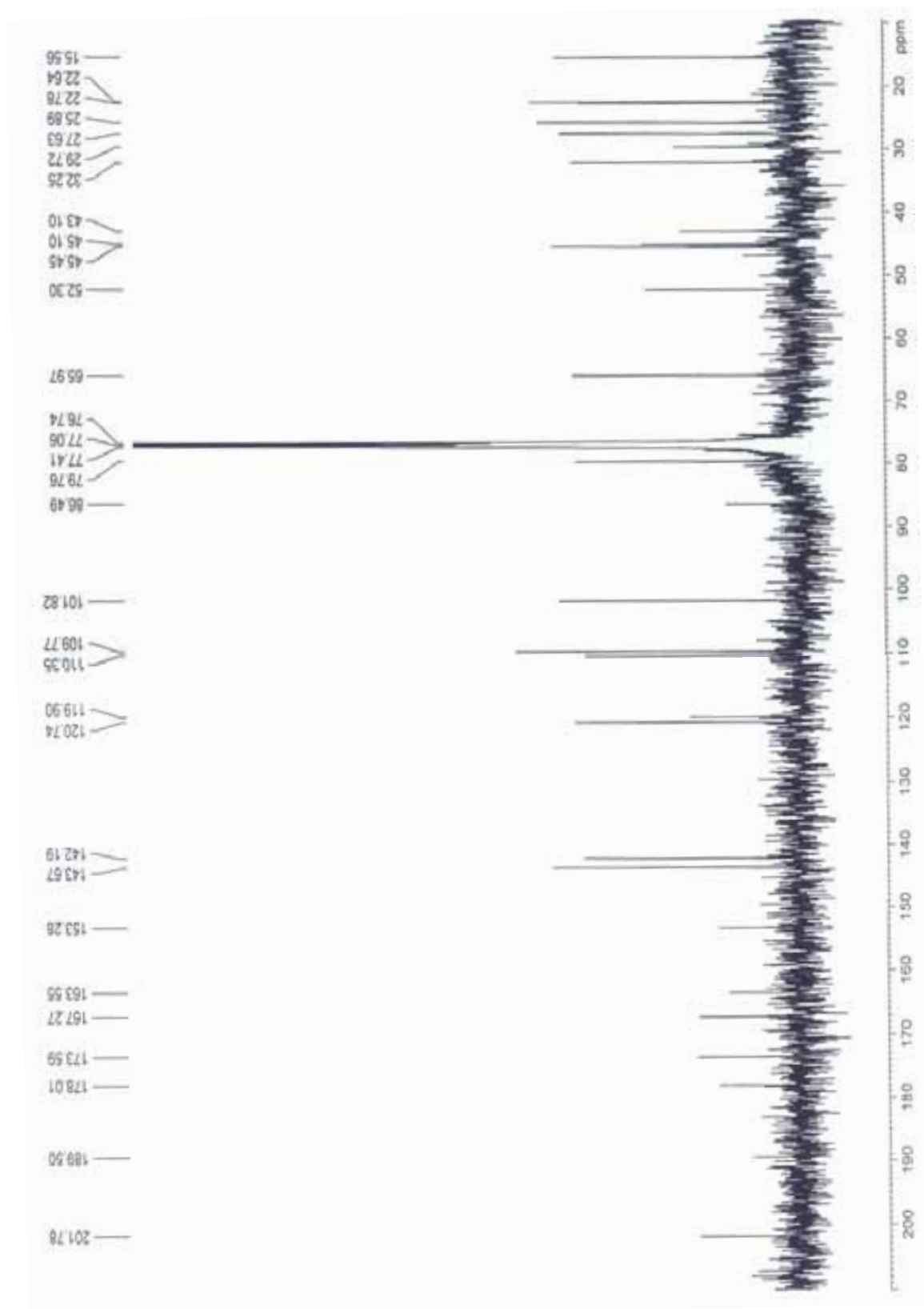


FIGURA 1.9: Espectro de RMN de ^{13}C de **02** (CDCl_3 , 100 MHz)

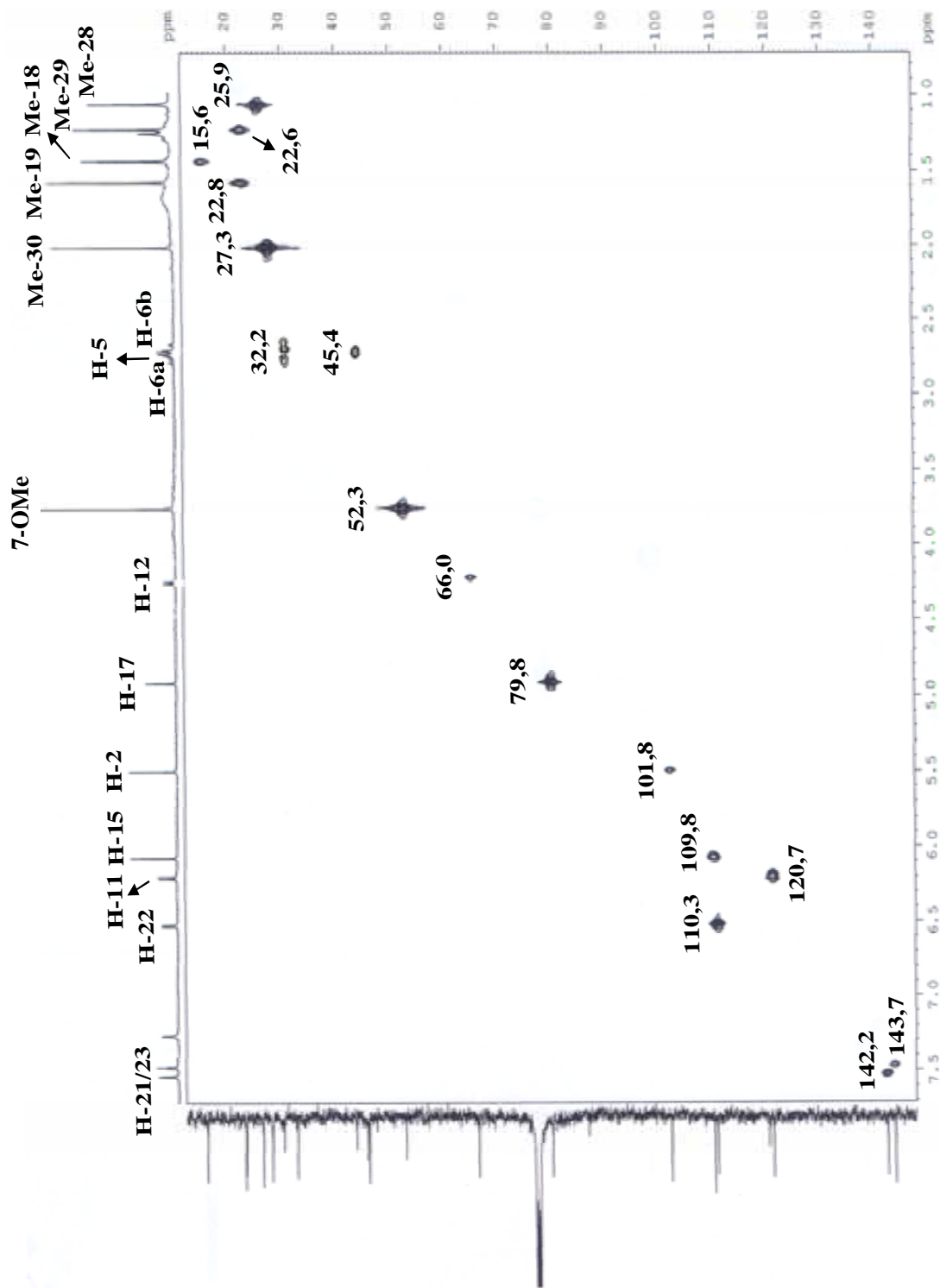


FIGURA 1.10: Mapa de contorno de g-HSQC de **02** (CDCl₃, 400 MHz)

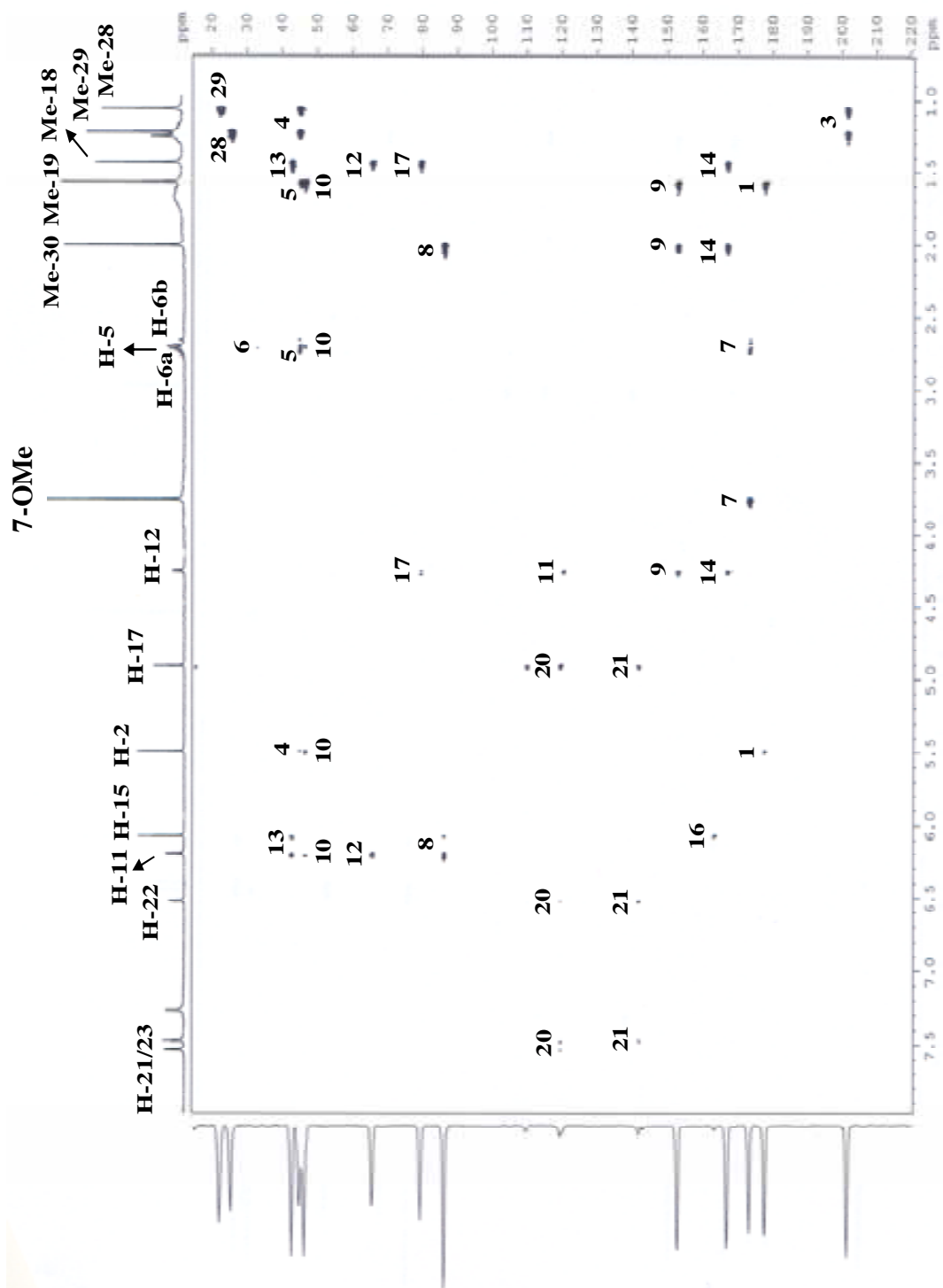


FIGURA 1.11: Mapa de contorno de g-HMBC de **02** (CDCl₃, 400 MHz)

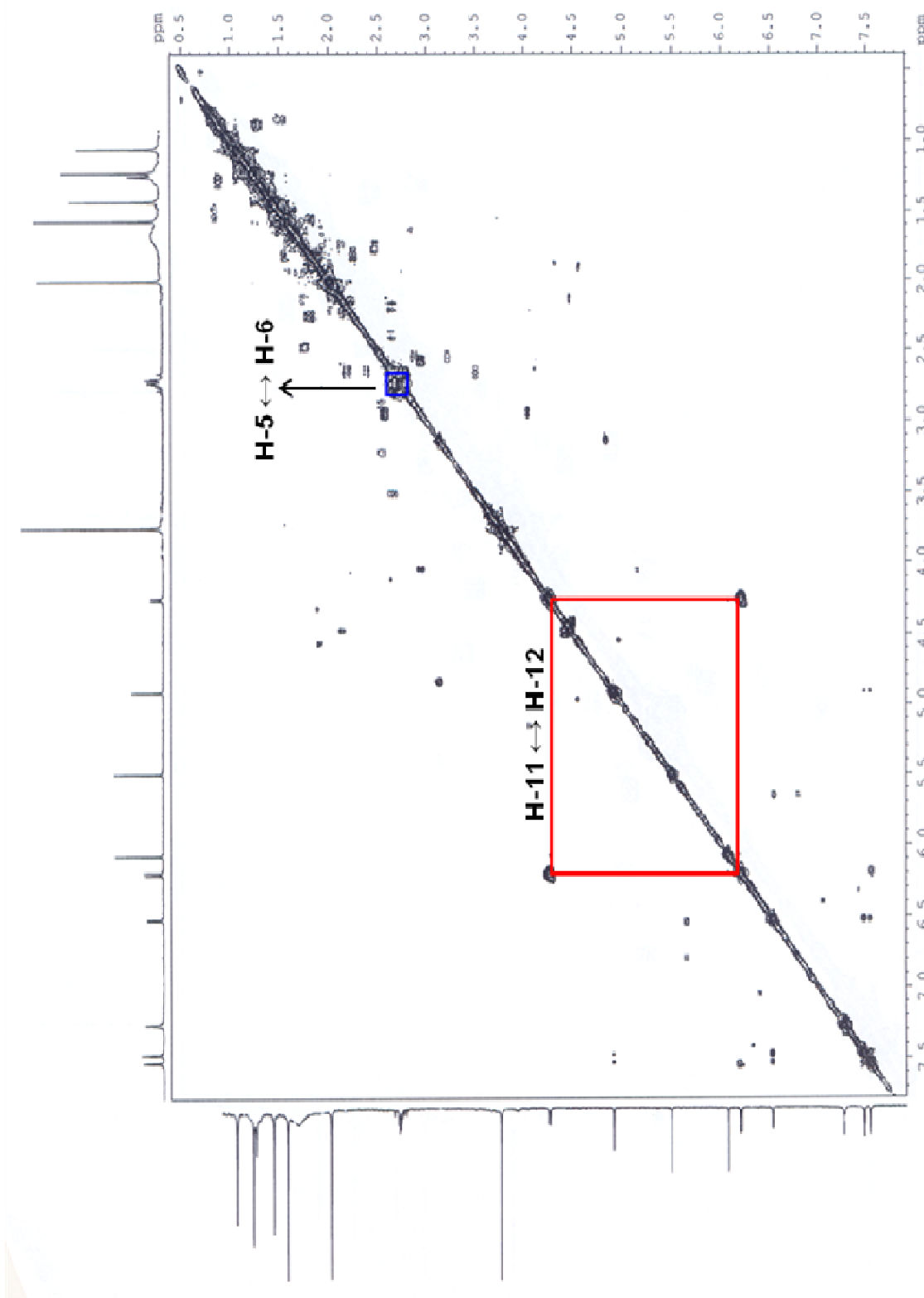


FIGURA 1.12: Espectro de g-COSY de **02** (CDCl₃, 400 MHz)

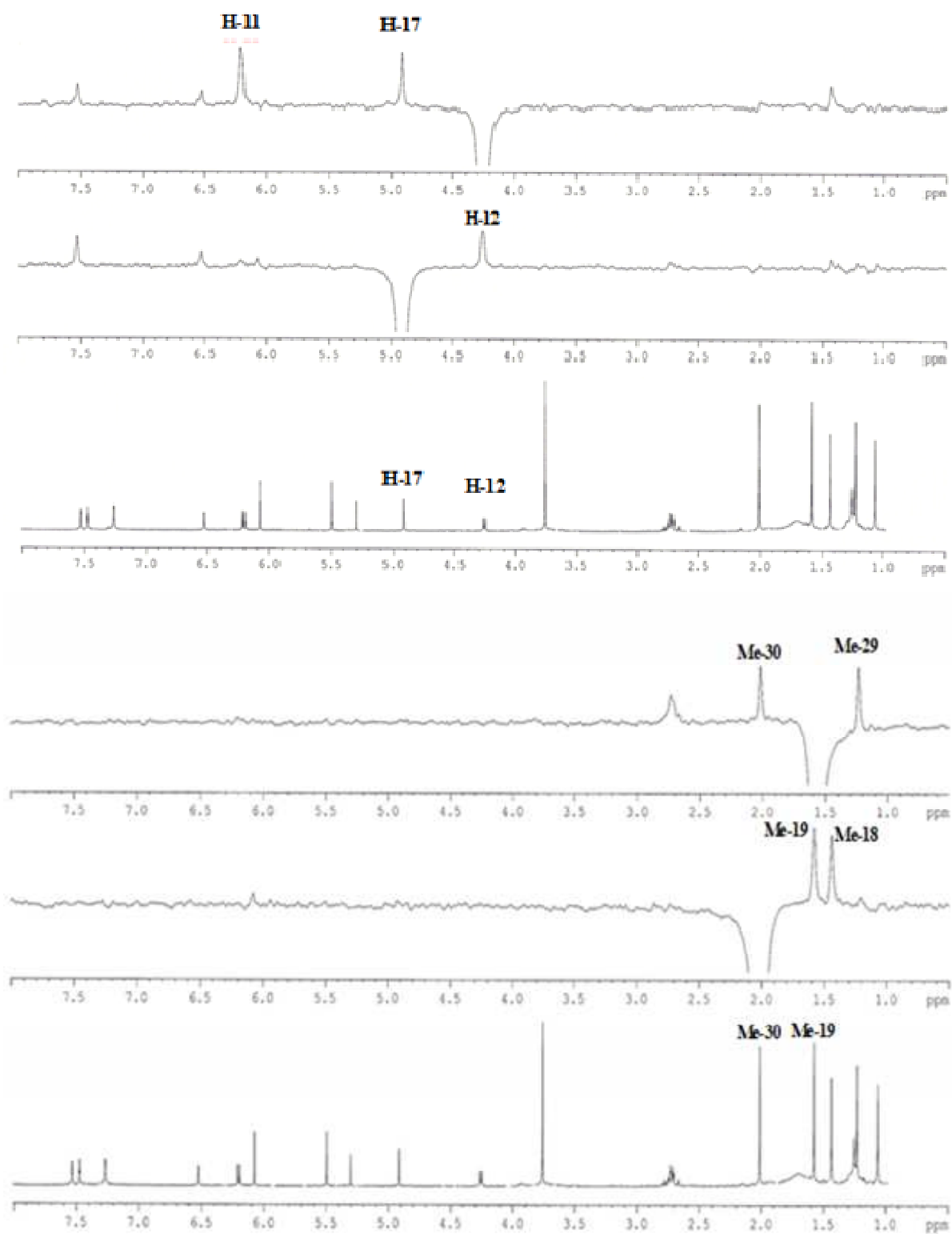


FIGURA 1.13: Espectro de g-NOESY-1D de **02** irradiando H-17, H-12, Me-30 e Me-19 (CDCl₃, 400 MHz)

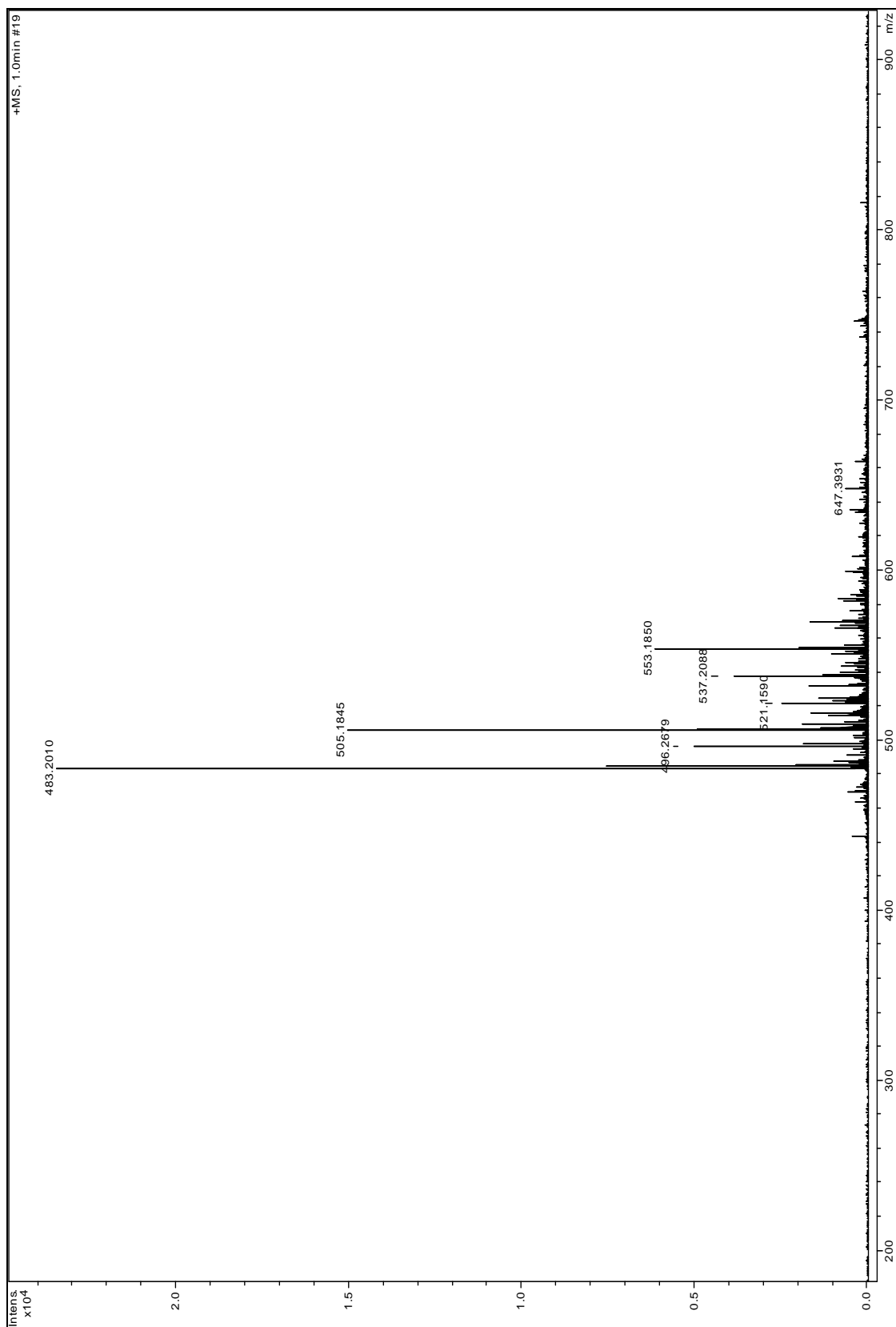
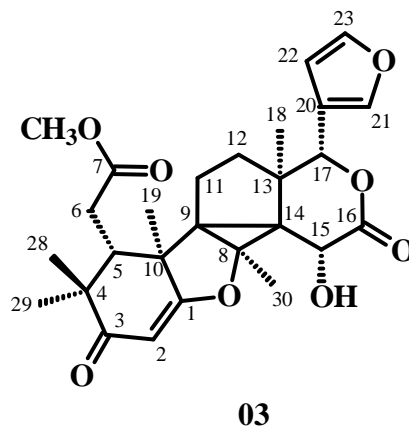


FIGURA 1.14: Espectro de massas de **02** (HRESI-MS, modo positivo)

1.4.2.3 Hortiolida C – substância 03

A substância **03**, com estrutura mais complexa que a das substâncias 01 e 02, foi isolada e sua estrutura determinada previamente por BRAGA (2005), e re-isolada posteriormente por SEVERINO (2008) de *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani e *H. superba* Ducke, sendo denominada de hortiolida E. Neste trabalho, a substância **03** foi novamente isolada do extrato metanólico do tronco de *H. superba* Ducke, identificada através de experimento de RMN de ^1H , ^{13}C , g-NOESY-1D e EM de alta resolução (HRESI-MS) e denominada de hortiolida D. Além disso, neste estudo foi realizado o experimento de difração de raio X, visando à confirmação da presença do anel de três membros na molécula. Pela análise do espectro de g-NOESY-1D foi proposta a correção da estereoquímica da hidroxila em C-15 para a face α da molécula, a qual havia sido posicionada equivocadamente por BRAGA (2005) e SEVERINO (2008) na face β .



A análise dos espectros de RMN de ^1H (FIGURA 1.17, p. 77) e ^{13}C (FIGURA 1.18, p. 78) de **03** permitiu atribuir todos os hidrogênios e carbonos do esqueleto, cujos valores estão descritos na TABELA 1.14 (p. 76).

A estereoquímica relativa de **03** foi determinada através de experimentos de g-NOESY-1D (FIGURA 1.19, p. 79). Ao irradiar o sinal referente ao H-15 em δ 4,40 foi possível observar NOE com o sinal de H-5 em δ

2,52 indicando que H-15 e H-5 estão na mesma face e que, portanto, a hidroxila em C-15 está na face α . Quando a metila Me-30 foi irradiada observou-se NOE com os sinais relativos às metilas Me-19 (δ 1,42) e Me-18 (δ 1,18), o que sugeriu o posicionamento da metila Me-30 na face α da molécula.

Pelo espectro de massas de alta resolução (FIGURA 1.20, p. 80) foi possível observar os íons m/z 485,2170 ($[M+H]^+$) e m/z 507,1986 ($[M+Na]^+$) que estão de acordo com a massa molecular real (484,2097) e fórmula molecular $C_{27}H_{32}O_8$, confirmando, portanto a estrutura **03**.

A confirmação final da estrutura **03** foi obtida através da análise por difração de raios X (FIGURA 1.15, p. 75). Na temperatura de $-173,15$ °C a estrutura cristalina da hortiolida C apresentou-se como duas moléculas de hortiolida C, uma molécula de CH_3OH e uma molécula de água por unidade assimétrica. As duas conformações da hortiolida C foram muito similares, mostrando apenas mudanças conformacionais pequenas entre os grupos terminais acetato (FIGURA 1.16, p. 75). Tanto a conformação molecular como a estrutura cristalina foram estabilizadas pela presença de ligações de hidrogênio fortes $O-H\cdots O$ intra e intermoleculares. Em ambos os casos, foi observada uma ligação de hidrogênio intramolecular entre 15-OH \cdots 16-O=CR₂ (O5-H \cdots O4). Em relação à interação intermolecular, no confômero A houve o envolvimento de uma ligação de hidrogênio entre seu grupo OH e o solvente da molécula, (15-OH \cdots O1S [O5A-H(51A) \cdots O1S]). O grupo hidroxila do confômero B interagiu com o grupo carbonila de outra molécula de hortiolida C, (15-OH \cdots 3-O=CR₂) [O5B-H(51B) \cdots O1A]. Esta diferença no padrão de ligação de hidrogênio foi a principal causa da presença de dois confômeros na estrutura cristalina.

Portanto, a análise conjunta dos experimentos de RMN, EM e difração de raio X permitiu definir a estrutura da substância **03** como sendo a do limonoide hortiolida C.

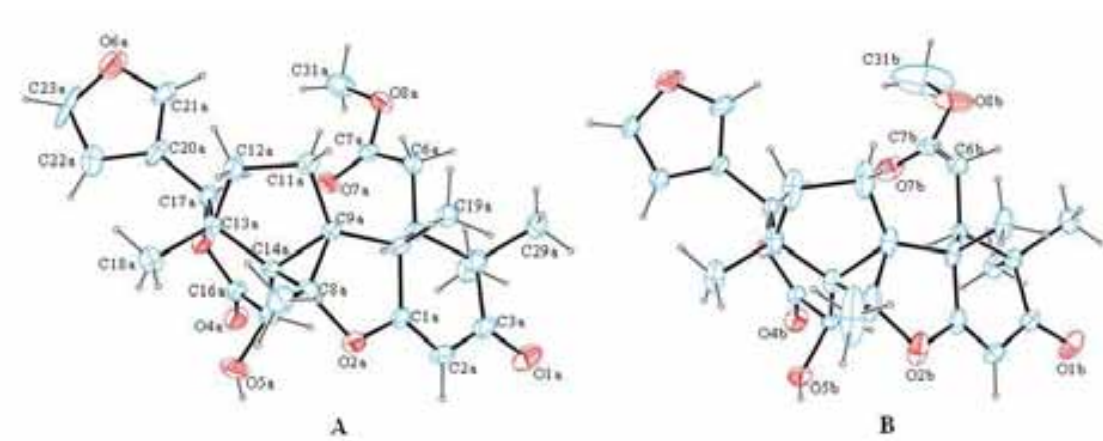
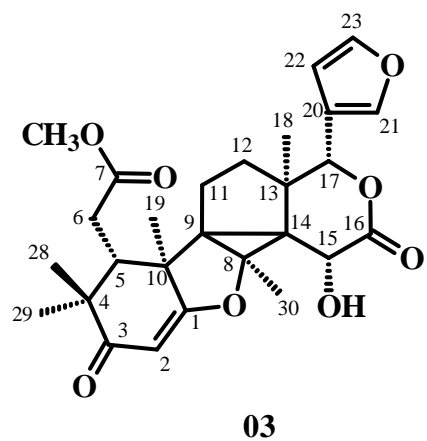


FIGURA 1.15: Estruturas obtidas por difração de raios X da substância **03**

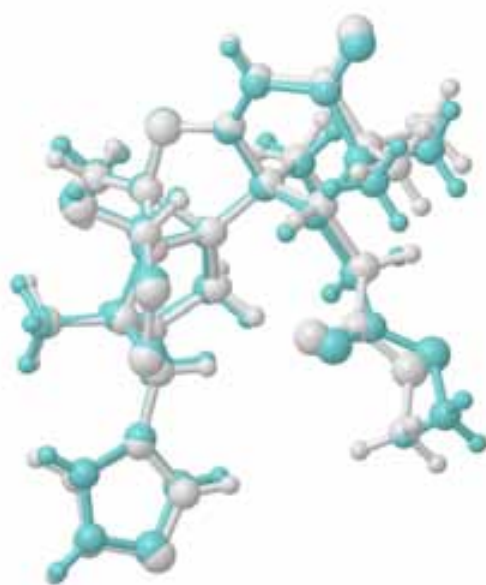


FIGURA 1.16: Conformações obtidas por difração de raios X da substância **03**

TABELA 1.14: Dados de RMN de ^1H , ^{13}C da substância **03** e comparação com dados da literatura

H/C	Substância 03 (400/100 MHz, CDCl_3)		BRAGA, 2005 (400/100 MHz, CDCl_3)	
	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm)	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm)
1	-	180,6	-	180,6
2	5,48 (1H, <i>s</i>)	99,7	5,50 (1H, <i>s</i>)	99,8
3	-	201,8	-	201,9
4	-	44,9	-	44,9
5	2,52 (1H, <i>t</i> , $J=4,7$)	45,4	2,52 (1H, <i>t</i> , $J=4,7$)	45,4
6a	2,74(1H, <i>dd</i> , $J=17,2$; 4,7)	31,8	2,74 (1H, <i>dd</i> , $J=17,2$ e 4,7)	31,8
6b	2,66 (1H, <i>dd</i> , $J=17,2$; 4,7)		2,66 (1H, <i>dd</i> , $J=17,2$ e 4,7)	
7	-	173,8	-	173,9
8	-	75,4	-	75,5
9	-	46,8	-	46,8
10	-	47,6	-	47,6
11a	2,25 (1H, <i>m</i>)	23,2	2,25 (<i>m</i>)	23,2
11b	2,04 (1H, <i>m</i>)		2,04 (<i>dd</i> , 13,3 e 8,8)	
12a	1,60(1H, <i>m</i>)	29,7	1,60(<i>m</i>)	29,7
12b	1,27 (1H, <i>m</i>)		1,27 (<i>m</i>)	
13	-	45,4	-	45,5
14	-	48,2	-	48,2
15	4,40 (1H, <i>s</i>)	64,2	4,40 (1H, <i>d</i> , $J=1,2$)	64,1
16	-	171,4	-	171,5
17	5,31 (1H, <i>s</i>)	79,9	5,35 (1H, <i>s</i>)	79,9
Me-18	1,19 (3H, <i>s</i>)	15,1	1,18 (3H, <i>s</i>)	15,0
Me-19	1,42 (3H, <i>s</i>)	22,8	1,42 (3H, <i>s</i>)	22,8
20	-	120,3	-	120,4
21	7,49 (1H, <i>m</i>)	141,6	7,49 (1H, <i>m</i>)	141,7
22	6,45 (1H, <i>m</i>)	110,0	6,44 (1H, <i>dd</i> , $J=1,8$ e 1,0)	110,0
23	7,44 (1H, <i>sl</i>)	143,4	7,44 (1H, <i>t</i> , $J=1,7$)	143,4
Me-28	1,19 (3H, <i>s</i>)	22,8	1,19 (3H, <i>s</i>)	22,9
Me-29	1,09 (3H, <i>s</i>)	27,7	1,11 (3H, <i>s</i>)	27,6
Me-30	1,89 (3H, <i>s</i>)	15,1	1,87 (1H, <i>s</i>)	15,1
7-OMe	3,71 (3H, <i>s</i>)	52,5	3,71 (3H, <i>s</i>)	52,6
15-OH	-	-	3,03 (1H, <i>d</i> , $J=1,8$)	-

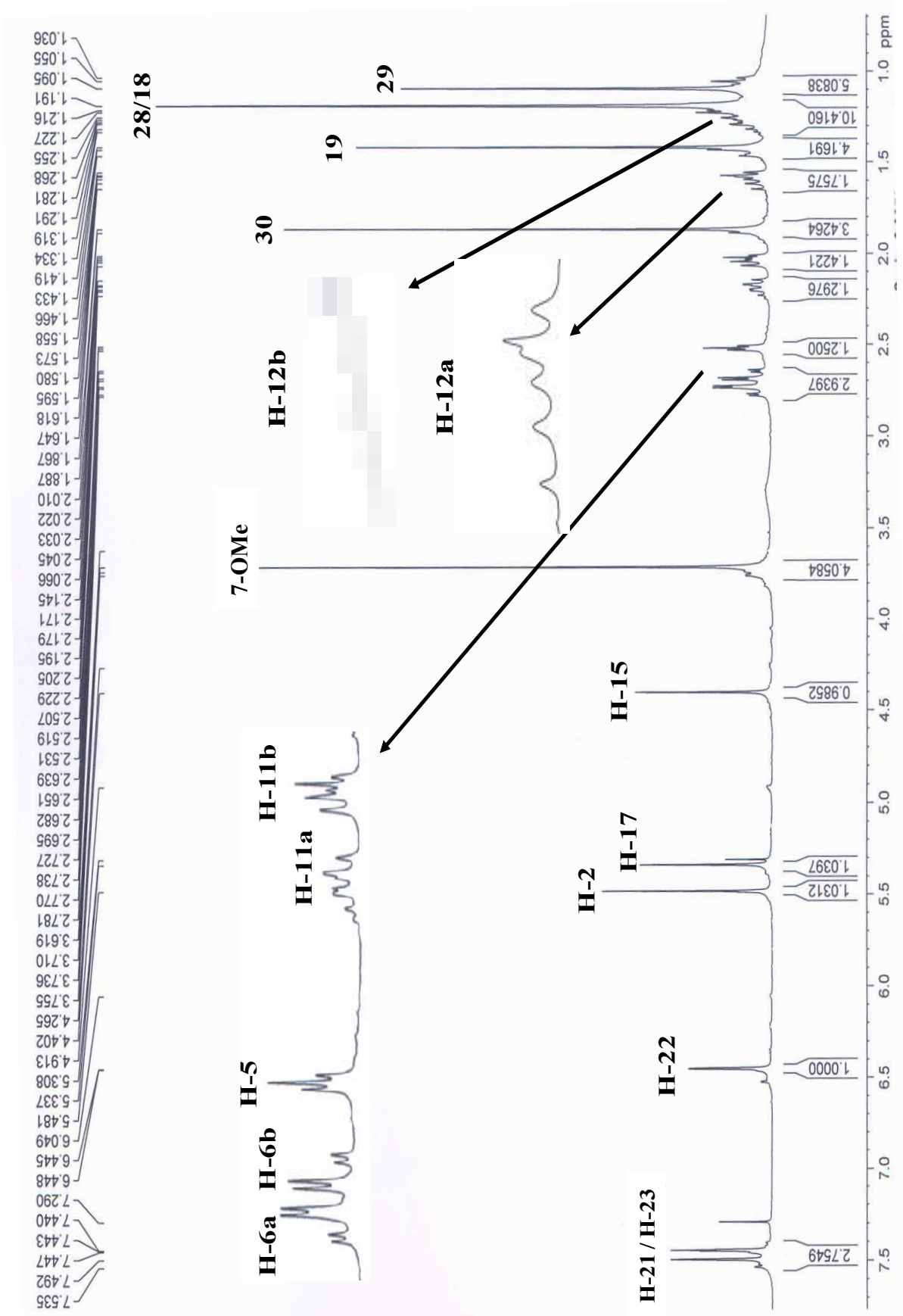


FIGURA 1.17: Espectro de RMN de ^1H de **03** (CDCl_3 , 400 MHz)

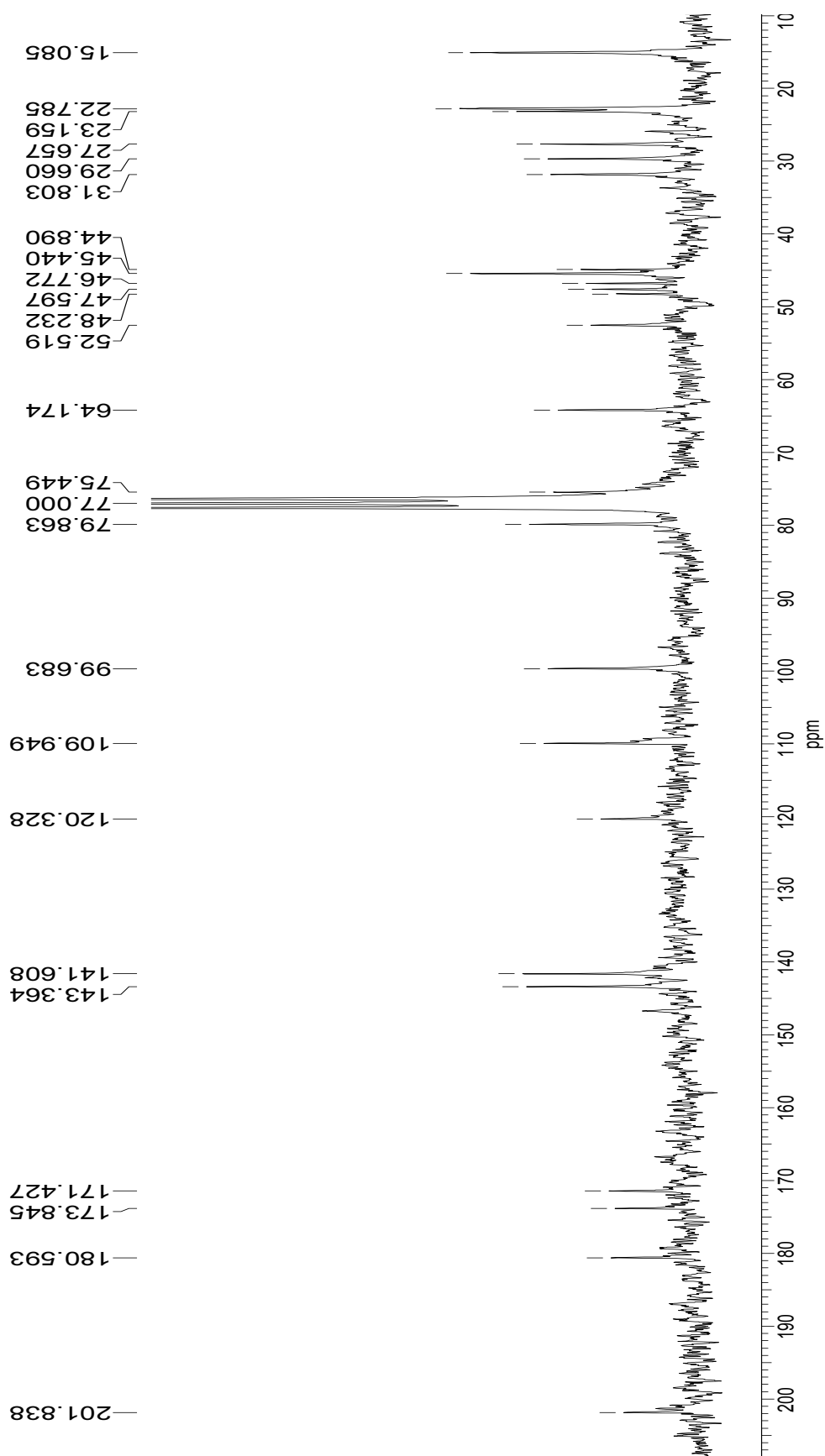


FIGURA 1.18: Espectro de RMN de ^{13}C de **03** (CDCl_3 , 100 MHz)

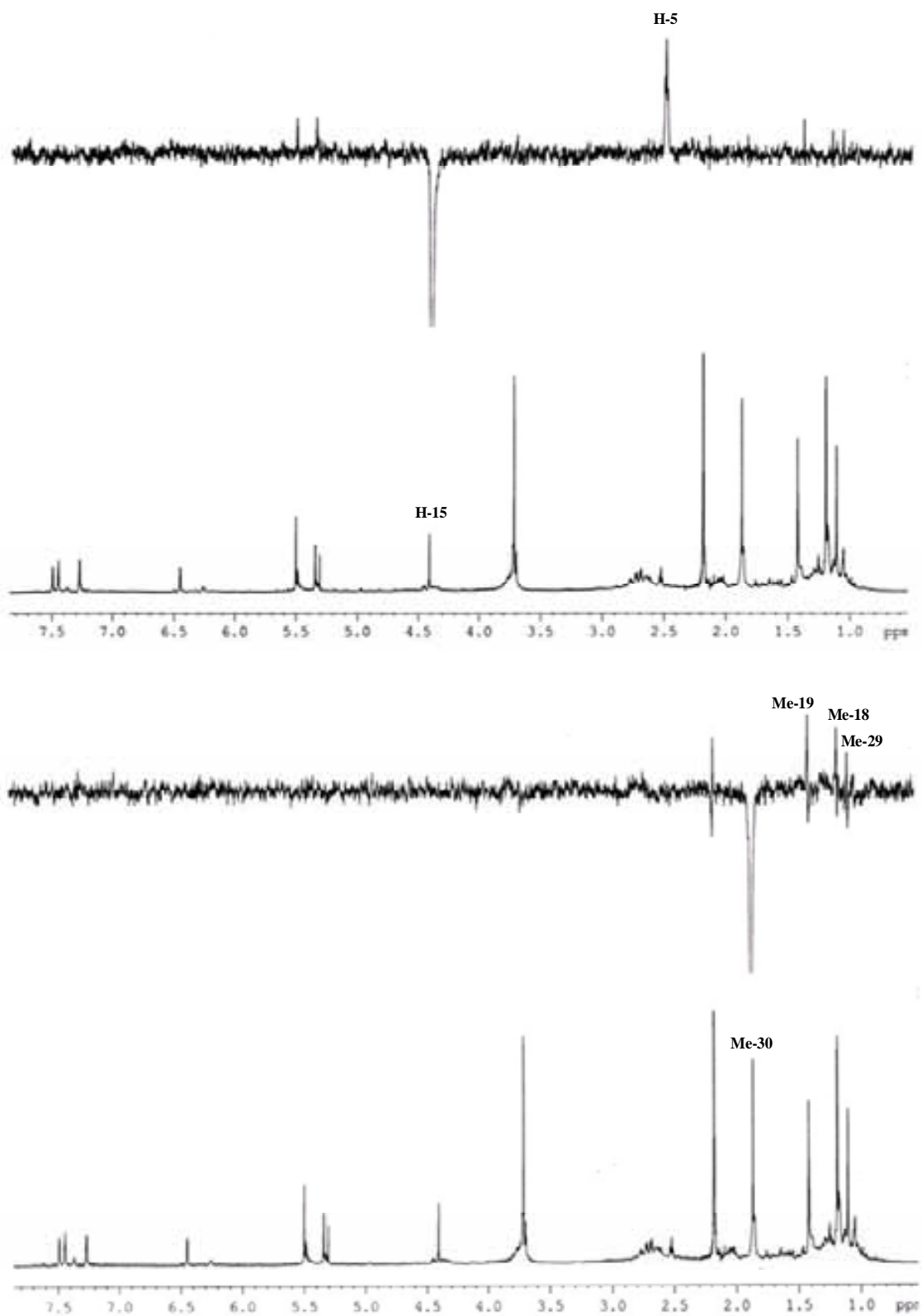


FIGURA 1.19: Espectro de g-NOESY-1D de **03** irradiando H-15 e Me-30 (CDCl₃, 400 MHz)

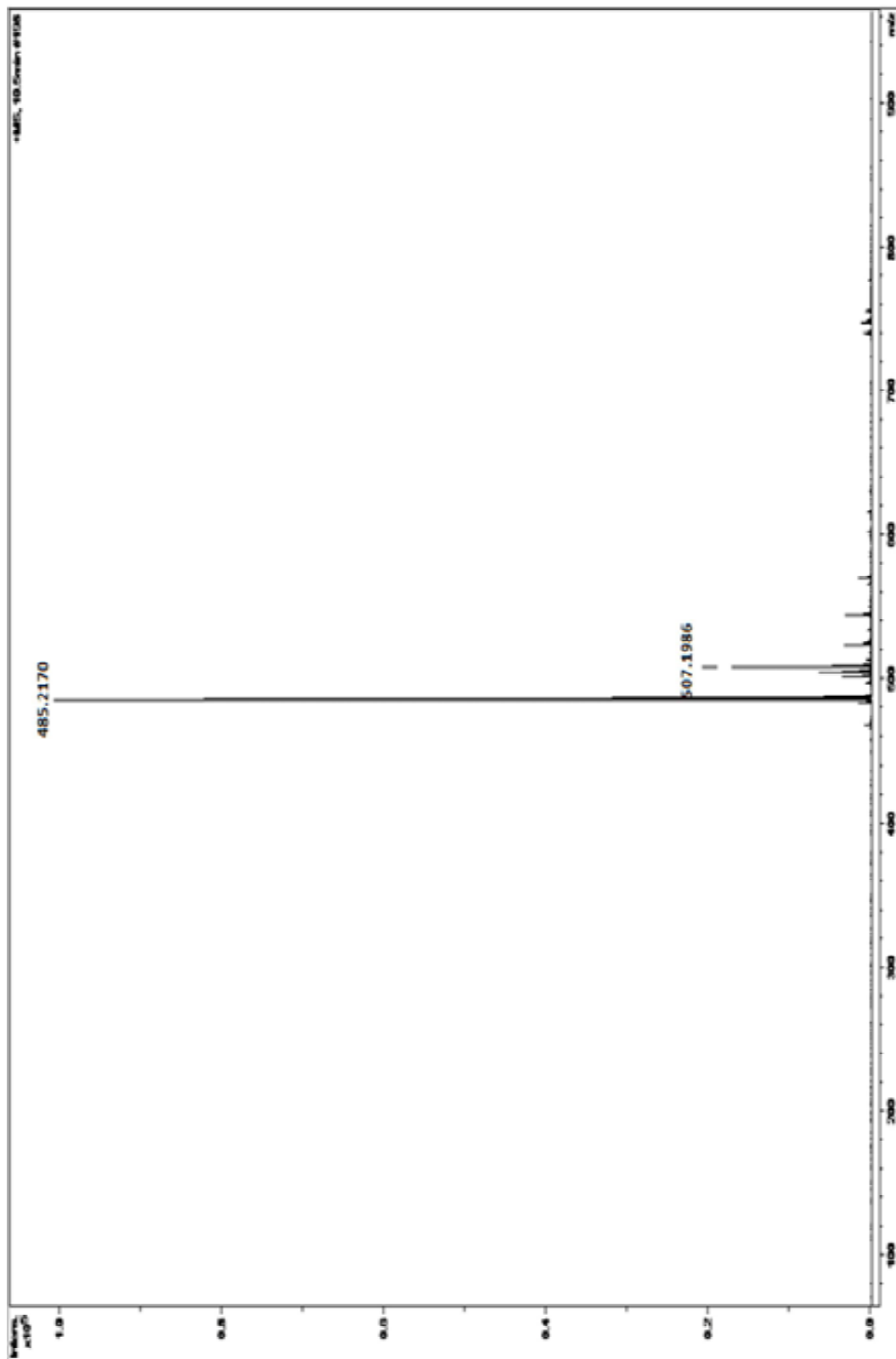
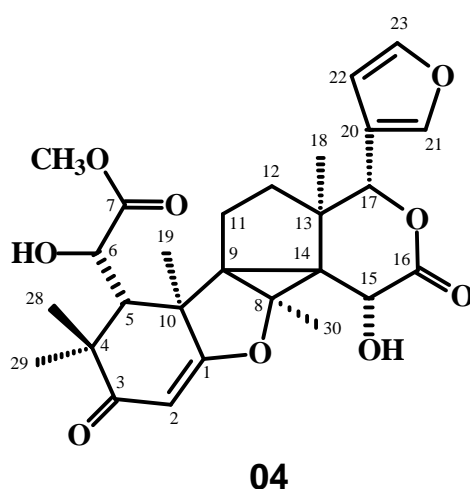


FIGURA 1.20: Espectro de massas de **03** (HRESI-MS, modo positivo)

1.4.2.4 6-Hidróxi-hortiolida C – substância 04

A substância **04** foi isolada do extrato metanólico do tronco subterrâneo de *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani e teve sua estrutura determinada através de experimento de RMN de ^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC, COSY, g-NOESY-1D, EM de alta resolução (HRESI-MS) e comparação com dados da literatura (BRAGA, 2005) da substância **03**. Não há descrição desta estrutura na literatura.



A substância **04** apresentou características espectrais similares às da substância **03** ($\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_8$). O espectro de massas (FIGURA 1.28, p. 90) revelou íons m/z 501,2109 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) e m/z 523,1926 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) que estão de acordo com a massa molecular real (500,2046) e fórmula molecular $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_9$ para a substância **04**, indicando a presença de um grupo hidroxila adicional em relação a **03**.

A análise dos espectros de RMN de ^1H (FIGURA 1.21, p. 84), ^{13}C (FIGURA 1.22, p. 85) e HSQC (FIGURA 1.23, p. 86) de **04** permitiu atribuir todos os hidrogênios e carbonos do esqueleto (TABELA 1.15, p. 83).

A principal diferença no espectro de RMN de ^1H da estrutura **04** em relação ao de **03** foi a presença de um sinal em δ 4,89 (1H, *s*), o qual mostrou correlação a J^I com o sinal de carbono em δ 71,4 e foi atribuído à H-6/C-6. A confirmação desta atribuição foi realizada analisando a correlação via HMBC

(FIGURA 1.24, p. 87) do sinal de H-6 com o sinal da carboxila (C-7) de éster em δ 175,4. A multiplicidade e a desproteção do sinal de H-6 (δ 4,89, *sl*) de **04** em relação aos sinais de H-6 de **03** [H-6a (δ 2,74, *dd*) e H-6b (δ 2,66, *dd*)], sugeriu a presença de um grupo hidroxila em C-6. Ainda foi possível observar para o hidrogênio H-6 a correlação via HMBC com sinais em δ 45,8 e δ 51,8, e este último no espectro de HSQC (FIGURA 1.23, p. 86) correlacionou-se a J' com o sinal do hidrogênio em δ 2,24 (1H, *d*, $J= 1,6$ Hz) sugerindo que o mesmo fosse atribuído ao hidrogênio H-5.

Pelo experimento de g-NOESY-1D (FIGURA 1.27, p. 89), quando o sinal de H-5 em δ 2,24 foi irradiado observou-se NOE com o sinal em δ 4,37 atribuído ao H-15, indicando que o mesmo encontra-se na face β da molécula assim como H-5; conseqüentemente o grupamento hidroxila presente em C-15 está posicionado na face α . Quando a Me-30 em δ 1,89 foi irradiada, observou-se NOE com a Me-19 em δ 1,65, indicando que ambas encontram-se na face α da molécula.

Portanto, a análise conjunta dos experimentos de RMN e EM permitiu definir a estrutura da substância **04** como sendo a do limonoide 6-hidróxi-hortiolida C.

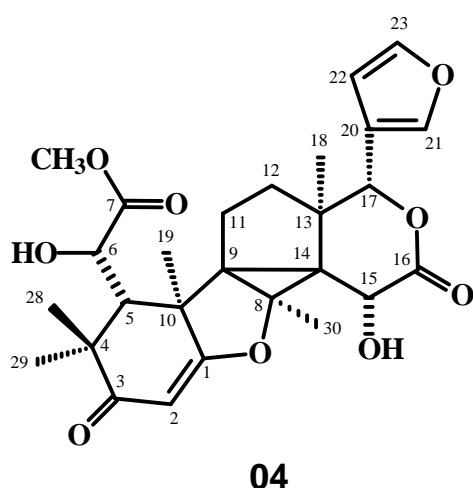


TABELA 1.15: Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e correlações observadas no HMBC para a substância **04**

H/C	Substância 04 (400/100 MHz, CDCl_3)		Correlações observadas no HMBC
	δ (ppm), <i>J</i> (Hz)	δ (ppm)	
1	-	182,2	-
2	5,42 (1H, <i>s</i>)	98,2	C-1, C-3, C-4 e C-10
3	-	202,5	-
4	-	45,8	-
5	2,24 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =1,6)	51,8	C-4, C-7, C-10, C-29 e C-28
6	4,89 (1H, <i>sl</i>)	71,4	C-4, C-5 e C-7
7	-	175,4	-
8	-	76,2	-
9	-	45,8	-
10	-	48,8	-
11a	2,37 (1H, <i>m</i>)	24,5	C-9 e C-12
11b	2,18 (1H, <i>m</i>)		C-10 e C-14
12a	1,69 (1H, <i>m</i>)	30,0	C-13, C-14 e C-17
12b	1,35 (1H, <i>m</i>)		-
13	-	46,5	-
14	-	47,7	-
15	4,37 (1H, <i>s</i>)	64,5	C-13, C-14 e C-16
16	-	170,4	-
17	5,08 (1H, <i>s</i>)	81,6	C-12, C-14, C-18, C-20, C-21 e C-22
Me-18	1,21 (3H, <i>s</i>)	15,7	C-12, C-13, C-14 e C-17
Me-19	1,65 (3H, <i>s</i>)	24,1	C-1, C-5, C-9 e C-10
20	-	120,3	-
21	7,47 (1H, <i>m</i>)	141,2	C-20, C-22 e C-23
22	6,45 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =1,6; 0,8)	110,0	C-20, C-21 e C-23
23	7,45 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> =1,6)	143,5	C-20 e C-21
Me-28	1,04 (3H, <i>s</i>)	29,4	C-3, C-4, C-5, C-10 e C-29
Me-29	1,47 (3H, <i>s</i>)	23,9	C-3, C-5 e C-28
Me-30	1,89 (1H, <i>s</i>)	14,7	C-8, C-9 e C-14
7-OMe	3,76 (3H, <i>s</i>)	53,2	C-7
15-OH	3,16 (1H, <i>sl</i>)	-	C-14 e C-16

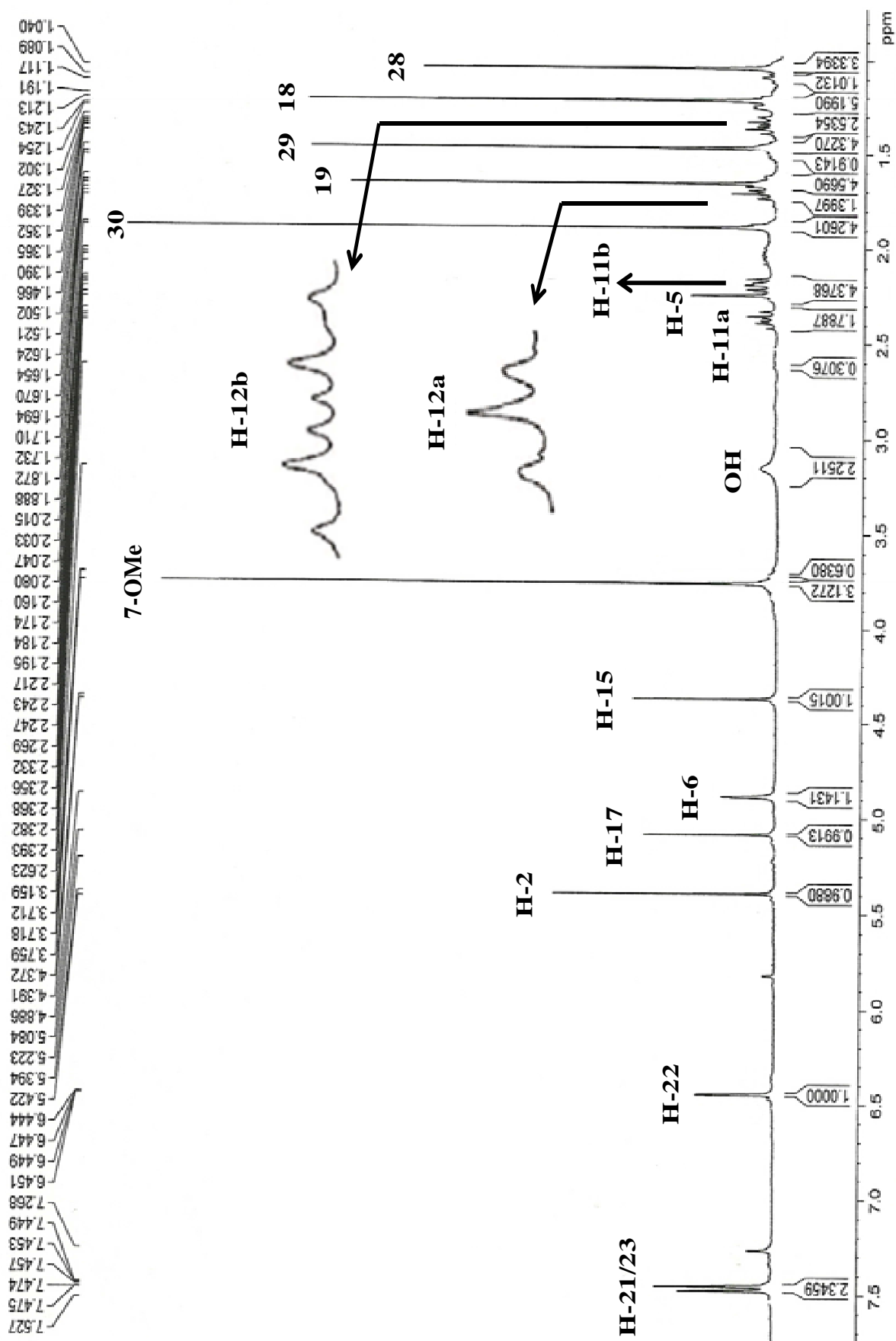


FIGURA 1.21: Espectro de RMN de ^1H de **04** (CDCl_3 , 400 MHz)

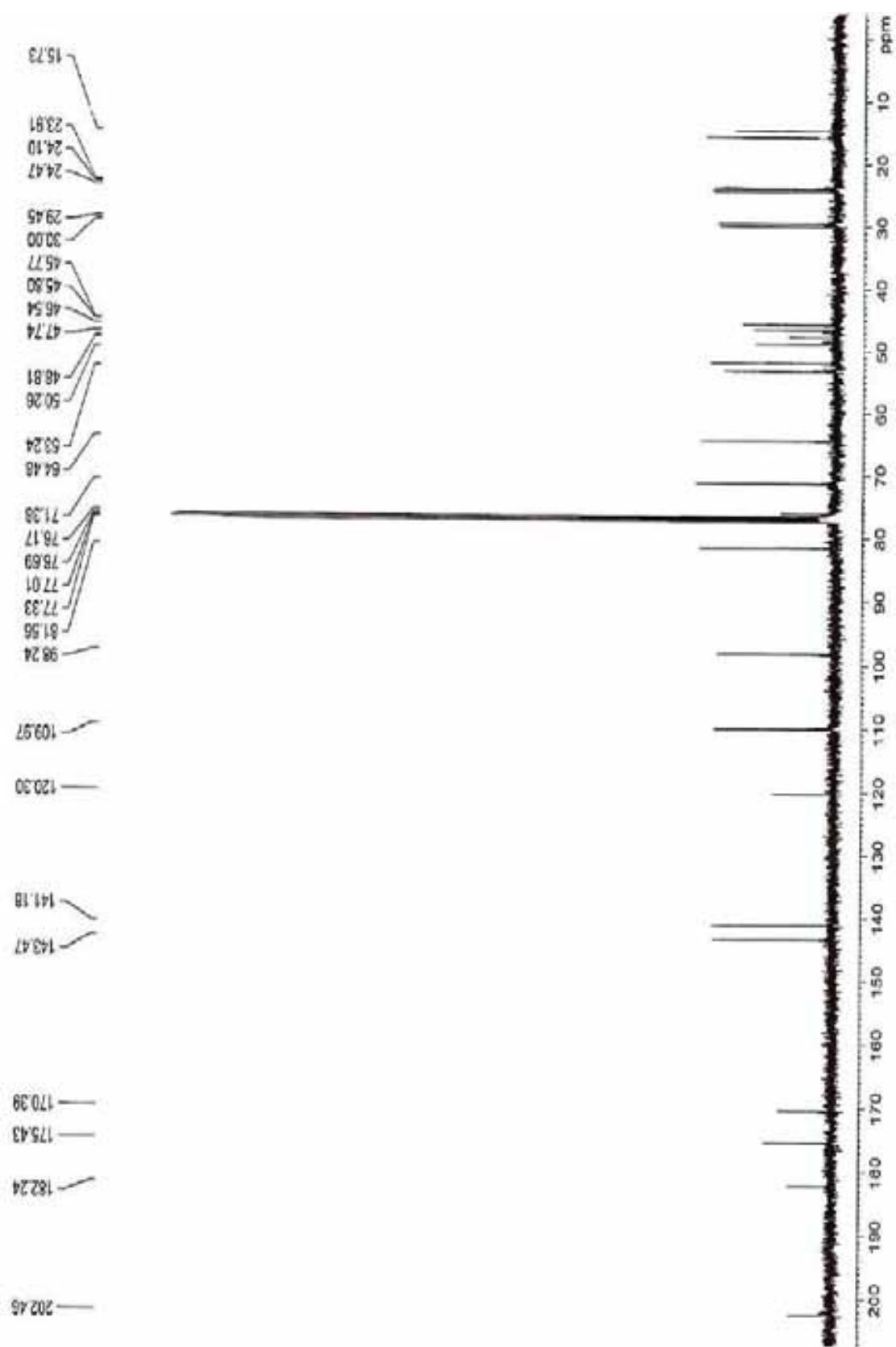


FIGURA 1.22: Espectro de RMN de ^{13}C de **04** (CDCl_3 , 100 MHz)

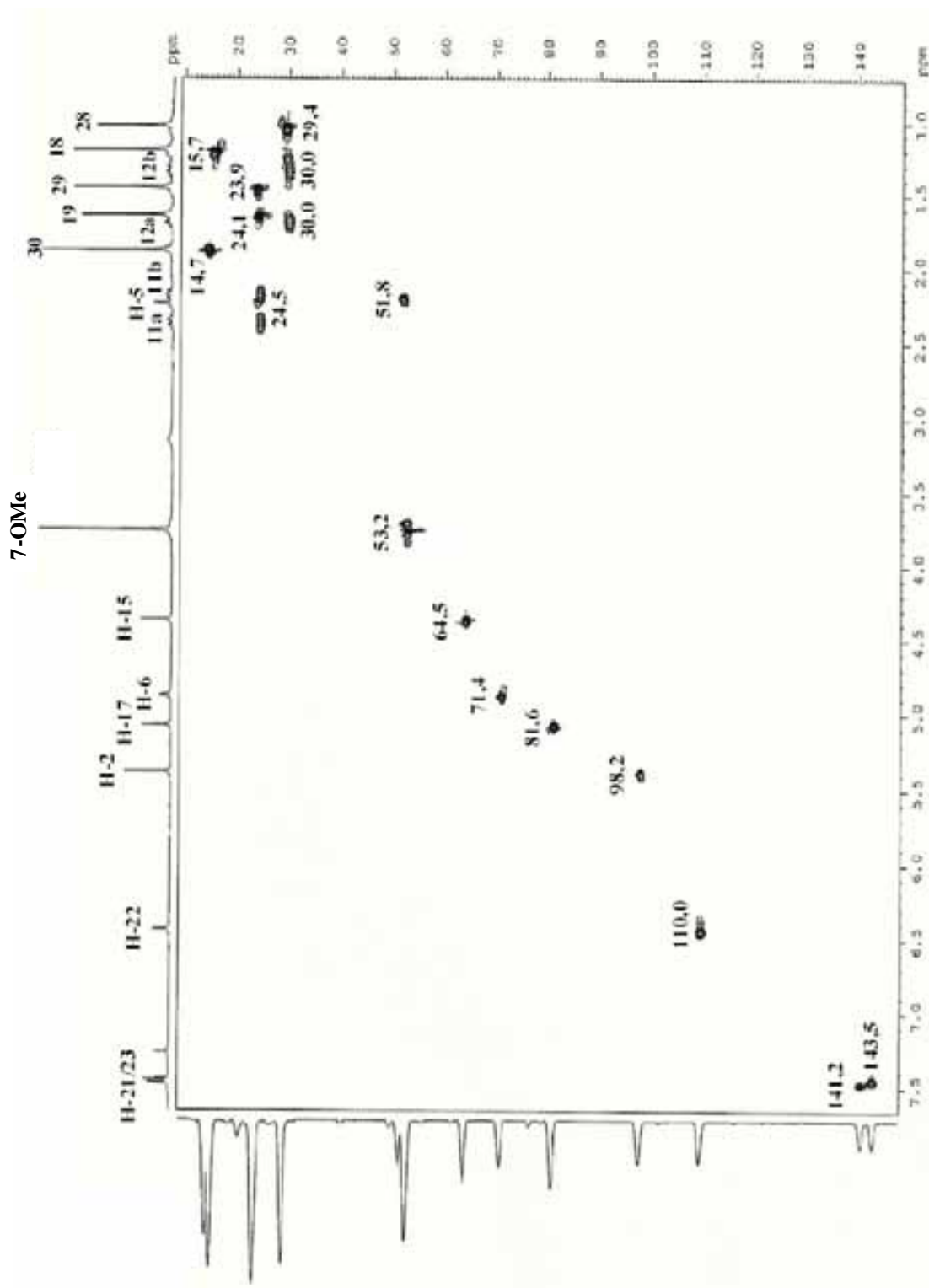


FIGURA 1.23: Mapa de contorno de g-HSQC de **04** (CDCl₃, 400 MHz)

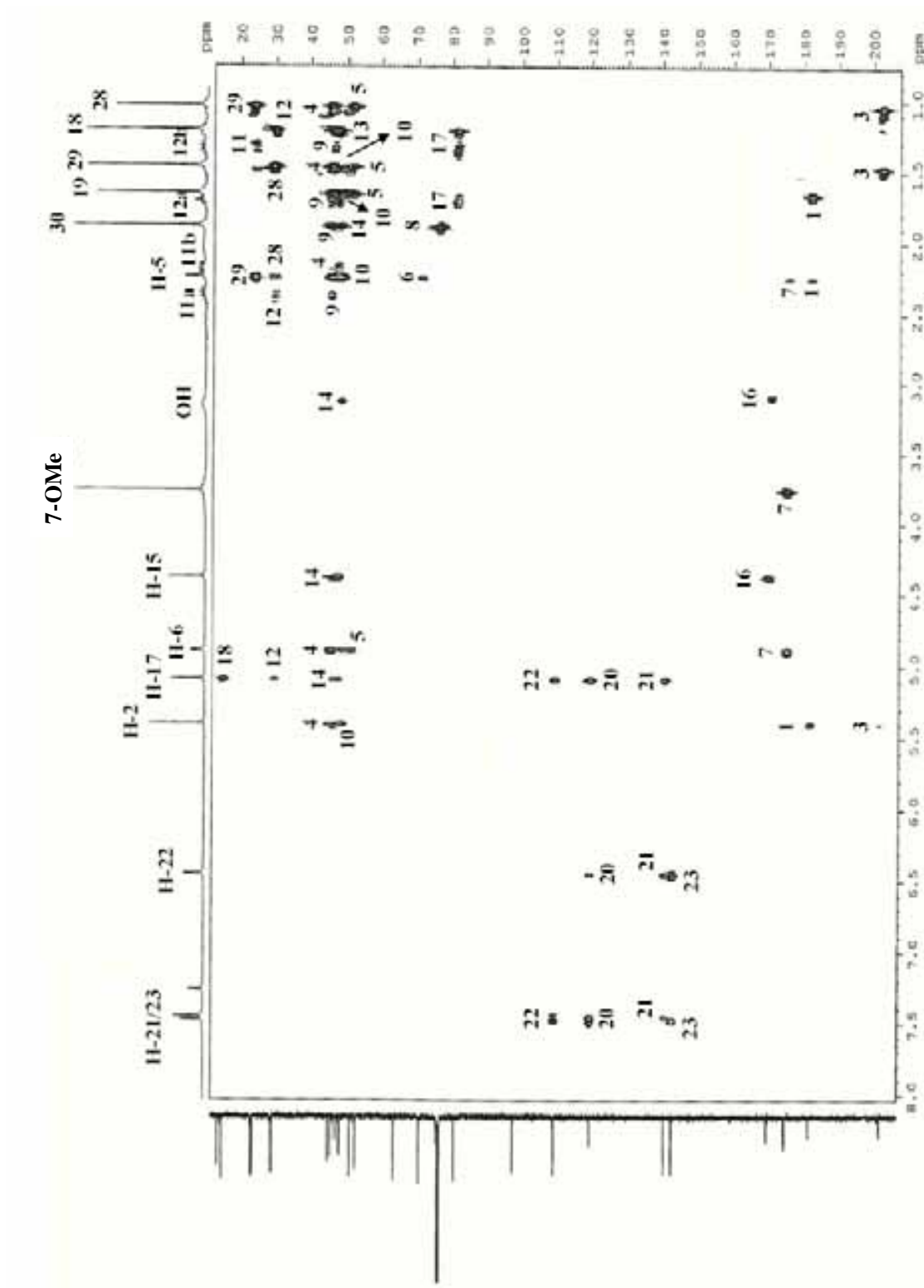


FIGURA 1.24: Mapa de contorno de g-HMBC de **04** (CDCl₃, 400 MHz)

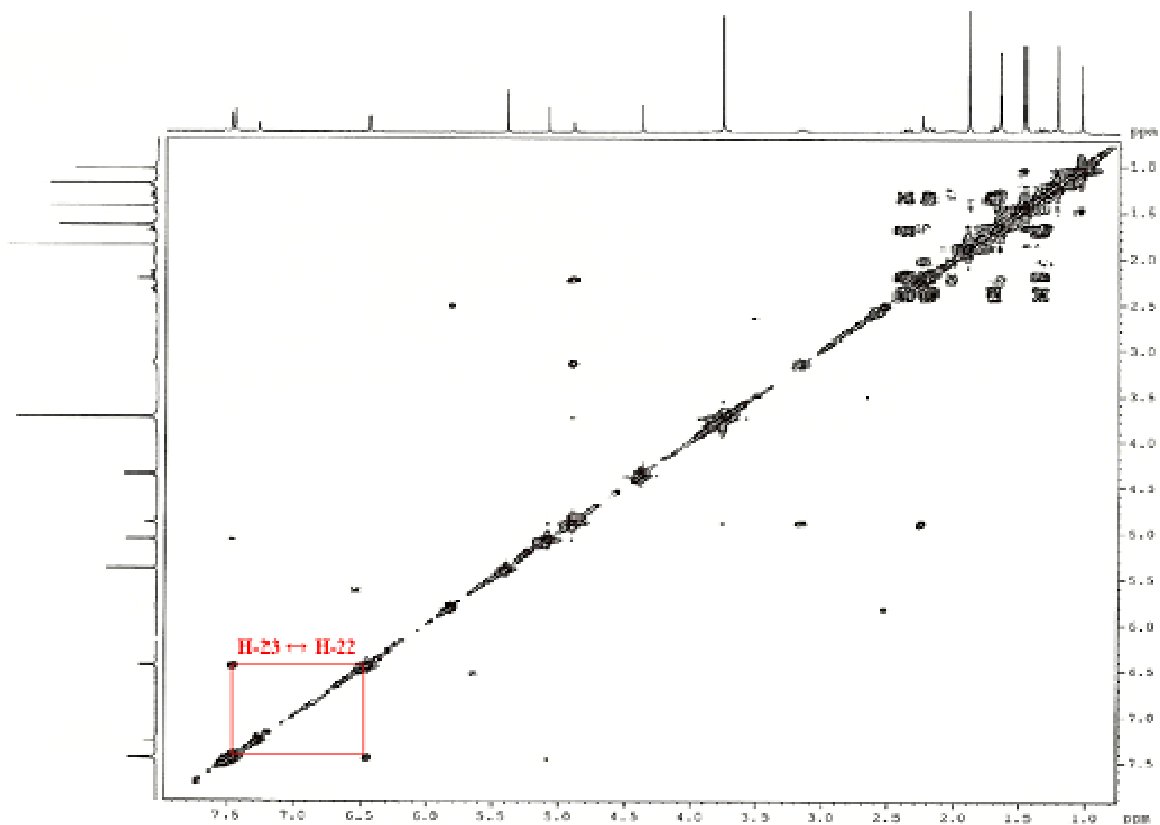


FIGURA 1.25: Espectro de g-COSY de **04** (CDCl₃, 400 MHz)

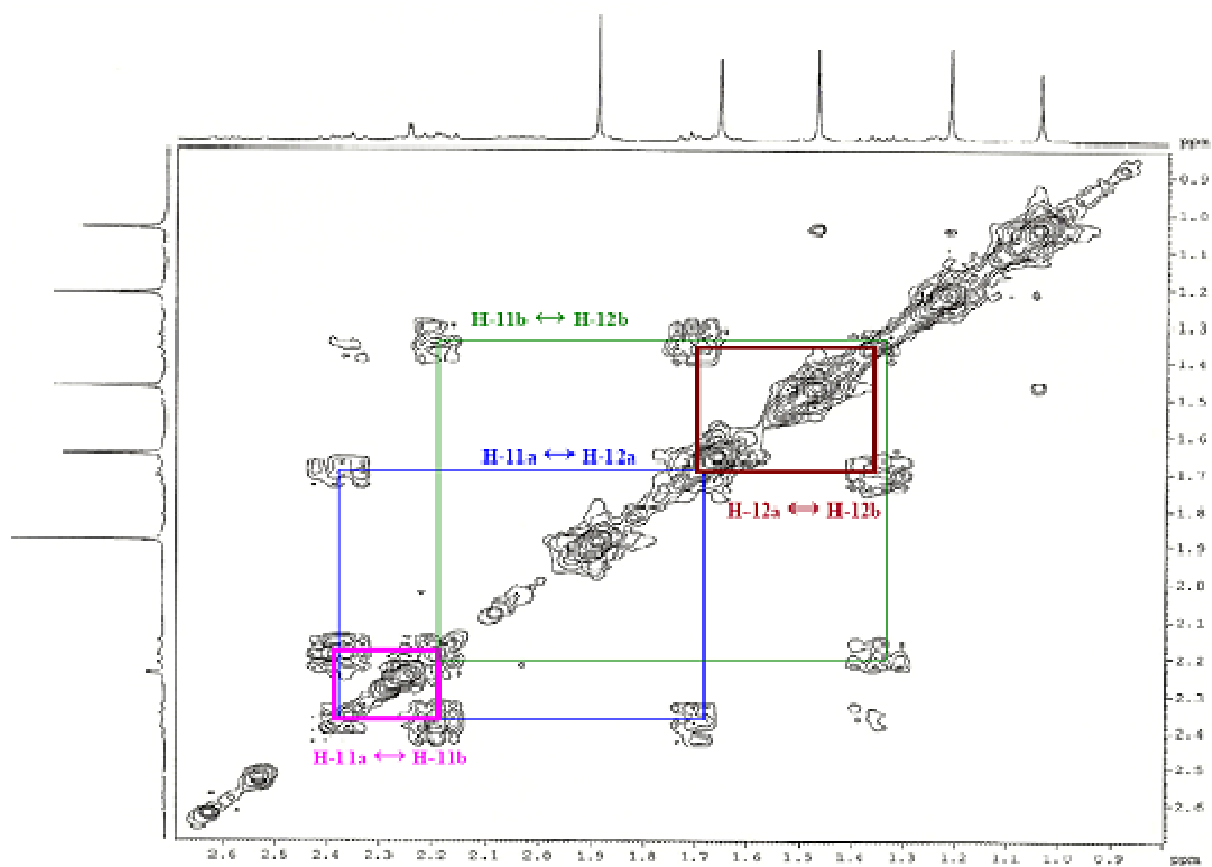


FIGURA 1.26: Ampliação do espectro de g-COSY de **04** (CDCl₃, 400 MHz)

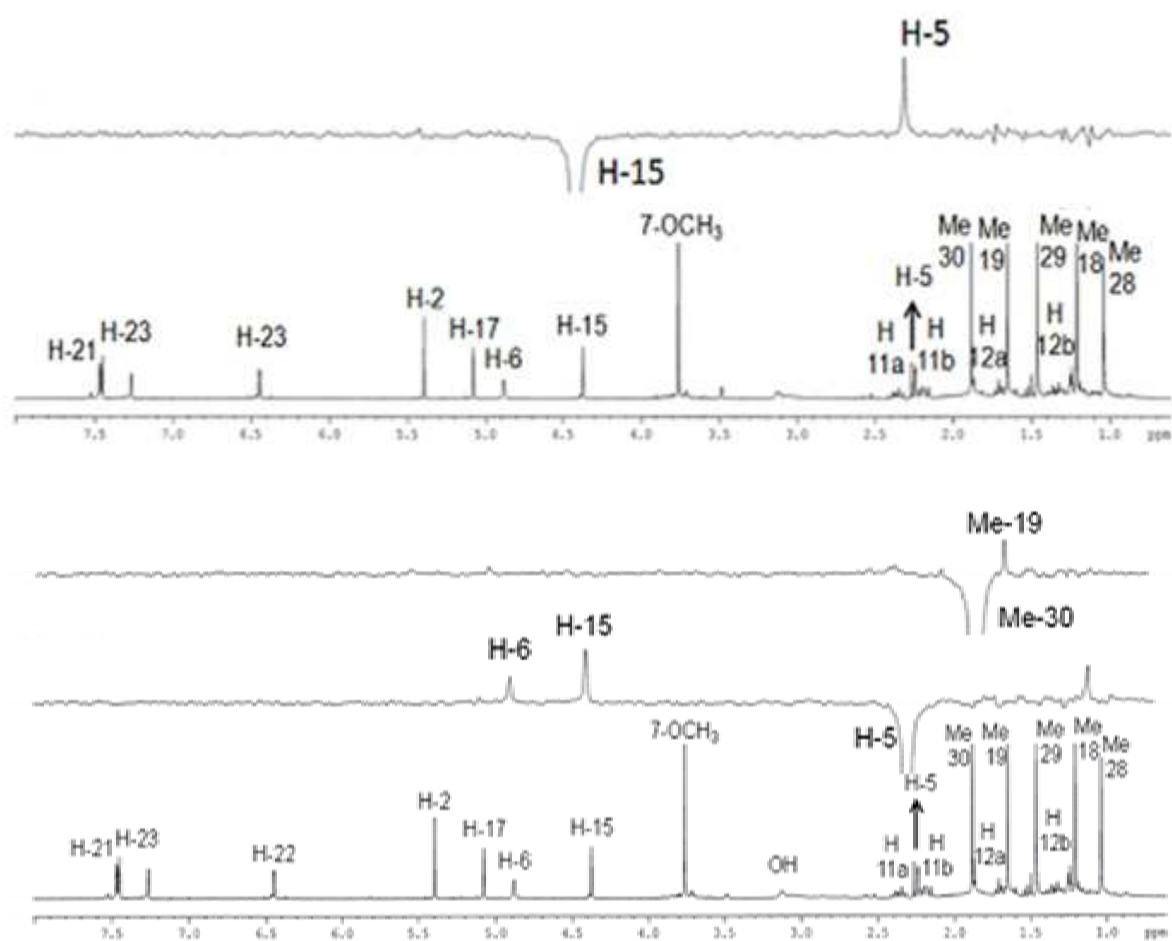


FIGURA 1.27: Espectro de g-NOESY-1D de **04** irradiando H-15, H-5 e Me-30 (CDCl₃, 400 MHz)

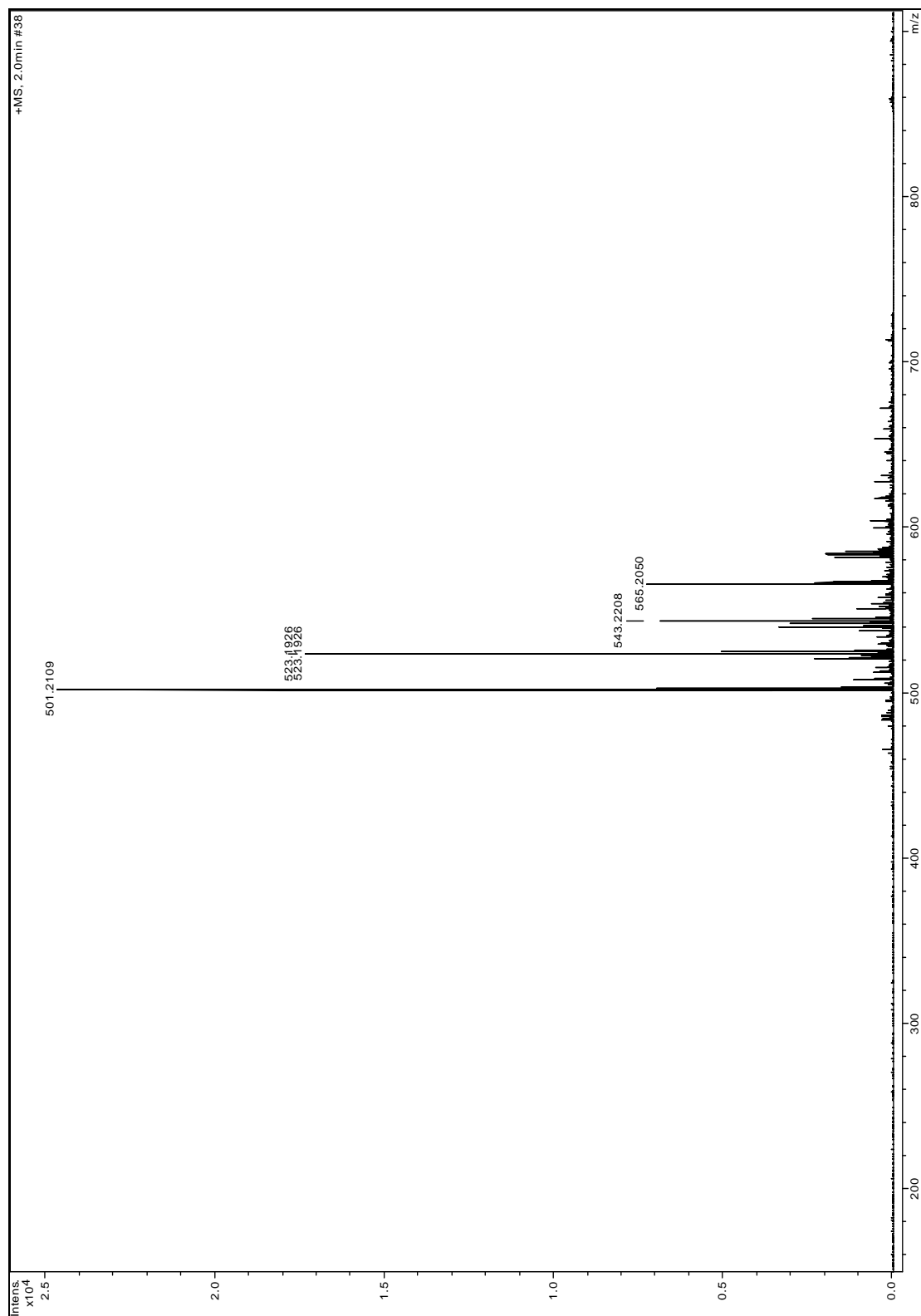
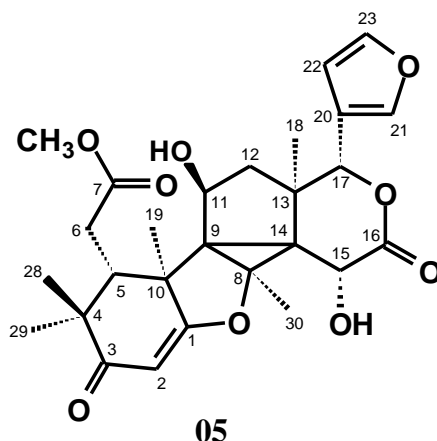


FIGURA 1.28: Espectro de massas de **04** (HRESI-MS, modo positivo)

1.4.2.5 11 β -Hidróxi-hortiolida C – substância 05

A substância **05** foi isolada do extrato metanólico do tronco de *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani e teve sua estrutura determinada através de experimento de RMN de ^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC, COSY, g-NOESY-1D, EM de alta resolução (HRESI-MS) e comparação com dados da literatura (BRAGA, 2005) da substância **03**. Não há descrição desta estrutura na literatura.



A substância **05** mostrou características espectrais similares aquelas das substâncias **03** e **04**. Pelo espectro de massas (FIGURA 1.35, p. 100) foi possível observar íons m/z 501,2119 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) e m/z 523,1950 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) que estão de acordo com a massa molecular real (500,2046) e fórmula molecular $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_9$, indicando que nesta estrutura também há um grupo hidroxila a mais em relação a **03**.

Pelos espectros de RMN de ^1H (FIGURA 1.29, p. 94), ^{13}C (FIGURA 1.30, p. 95) e HSQC (FIGURA 1.31, p. 96) de **05** foi possível atribuir todos os hidrogênios e carbonos do esqueleto, cujos valores estão descritos na TABELA 1.16 (p. 93).

O sinal da metila Me-18 (δ 1,15; δ 14,8) mostrou correlação com o sinal de C-17 (δ 80,5) e com os sinais em δ 42,7, δ 45,3 e δ 48,6. No espectro de HSQC foi possível observar que o sinal em δ 42,7 mostrou correlação a J' com δ 1,68, e foi atribuído ao C-12. No espectro de COSY (FIGURA 1.33, p. 98) foi possível observar o acoplamento dos hidrogênios H-12 com o sinal em δ 4,43

(*d*, *J*= 4,8 Hz), o qual foi atribuído ao hidrogênio H-11. A desproteção do sinal de H-11 de **05** em relação aos sinais de H-11a (δ 2,25) e H-11b (δ 2,04) de **03** sugeriu um grupo hidroxila em C-11. Além disso, a presença de um sinal relativo à hidroxila em δ 2,88 (1H, *sl*) correlacionando-se via HMBC com os sinais em δ 42,7 (C-12) e δ 49,1 (C-9) confirmou o posicionamento desta hidroxila em C-11.

Na proposta de biogênese para **05**, descrita no ESQUEMA 1.4 (p. 158), ocorre uma adição eletrofílica na carboxila do éster (anel D), seguida da formação do anel de três membros entre C-8, C-9 e C-14 (contração do anel C) e adição nucleofílica de uma molécula de água na posição 11.

No experimento de g-NOESY-1D (FIGURA 1.34, p. 99), quando o sinal de H-17 em δ 5,72 foi irradiado, observou-se NOE com o sinal em δ 4,55 (H-15), indicando que o mesmo encontra-se, assim como H-17, na face β da molécula; conseqüentemente o grupamento hidroxila presente em C-15 foi posicionado na face α . A irradiação do sinal em δ 4,43 referente ao hidrogênio H-11 mostrou NOE com os sinais das metilas Me-30 (δ 1,80) e Me-19 (δ 1,54), confirmando que estão na mesma face da molécula, ou seja, na face α . Desta forma, a hidroxila ligada ao C-11 está na face β da molécula.

Portanto, a análise conjunta dos experimentos de RMN e EM permitiu definir a estrutura da substância **05** como sendo o do limonoide 11 β -hidróxi-hortiolida C.

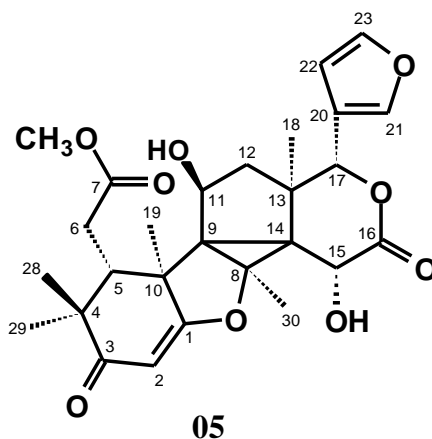


TABELA 1.16: Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e correlações observadas no HMBC para a substância **05**

H/C	Substância 05 (400/100 MHz, CDCl_3)		Correlações observadas no HMBC
	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm)	
1	-	182,2	-
2	5,49 (1H, <i>s</i>)	99,2	C-1, C-4 e C-10
3	-	202,7	-
4	-	45,0	-
5	2,71 (1H, <i>dd</i> , $J= 5,7; 3,3$)	43,9	C-7, C-10, C-14 e C-19
6a	3,43 (1H, <i>dd</i> , $J= 18,8; 5,7$)	32,0	C-5 e C-7
6b	2,41 (1H, <i>dd</i> , $J= 18,8; 3,3$)		
7	-	174,8	-
8	-	75,0	-
9	-	49,1	-
10	-	50,3	-
11	4,43 (1H, <i>d</i> , $J= 4,8$)	71,0	C-9, C-10, C-13, C-14
12	1,68 (2H, <i>m</i>)	42,7	C-11, C-13 e C-14
13	-	45,3	-
14	-	48,6	-
15	4,55 (1H, <i>s</i>)	64,2	C-9, C-13, C-14 e C-16
16	-	172,0	-
17	5,72 (1H, <i>s</i>)	80,5	C-13, C-14, C-20, C-21 e C-22
Me-18	1,15 (3H, <i>s</i>)	14,8	C-12, C-13, C-14 e C-17
Me-19	1,54 (3H, <i>s</i>)	22,1	C-1, C-5, C-9 e C-14
20	-	120,4	-
21	7,42 (1H, <i>m</i>)	141,6	C-20, C-22 e C-23
22	6,46 (1H, <i>t</i> , $J= 1,6$)	110,4	C-20, C-21 e C-23
23	7,42 (1H, <i>m</i>)	143,1	C-20 e C-22
Me-28	1,10 (3H, <i>s</i>)	28,3	C-3, C-5 e C-29
Me-29	1,19 (3H, <i>s</i>)	23,1	C-3, C-5 e C-28
Me-30	1,80 (1H, <i>s</i>)	15,4	C-8, C-9 e C-14
7-OMe	3,63 (3H, <i>s</i>)	52,0	C-7
11-OH	2,88 (1H, <i>sl</i>)	-	C-9 e C-12
15-OH	3,09 (1H, <i>sl</i>)	-	C-14 e C-16

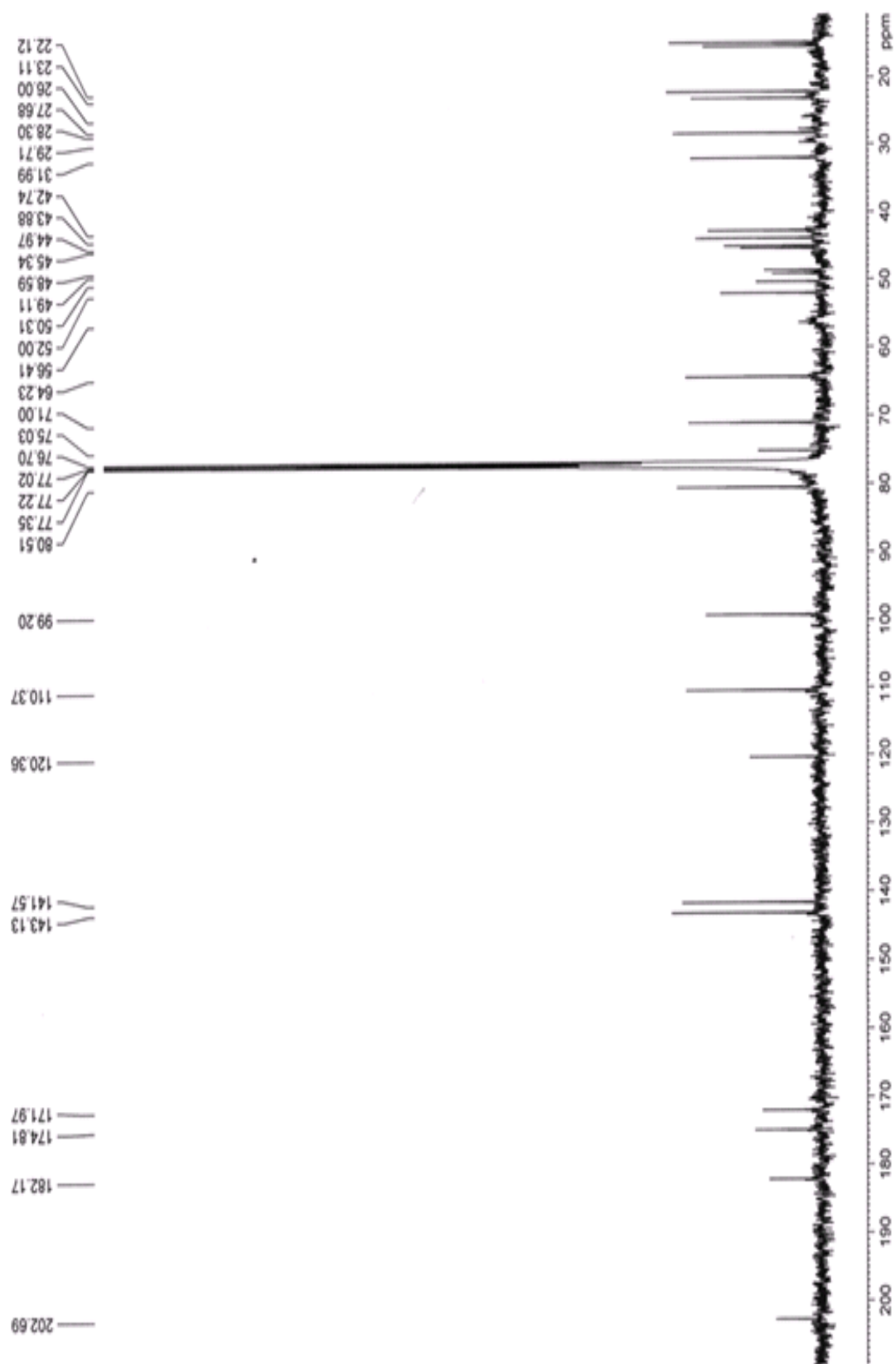


FIGURA 1.30: Espectro de RMN de ^{13}C de **05** (CDCl_3 , 100 MHz)

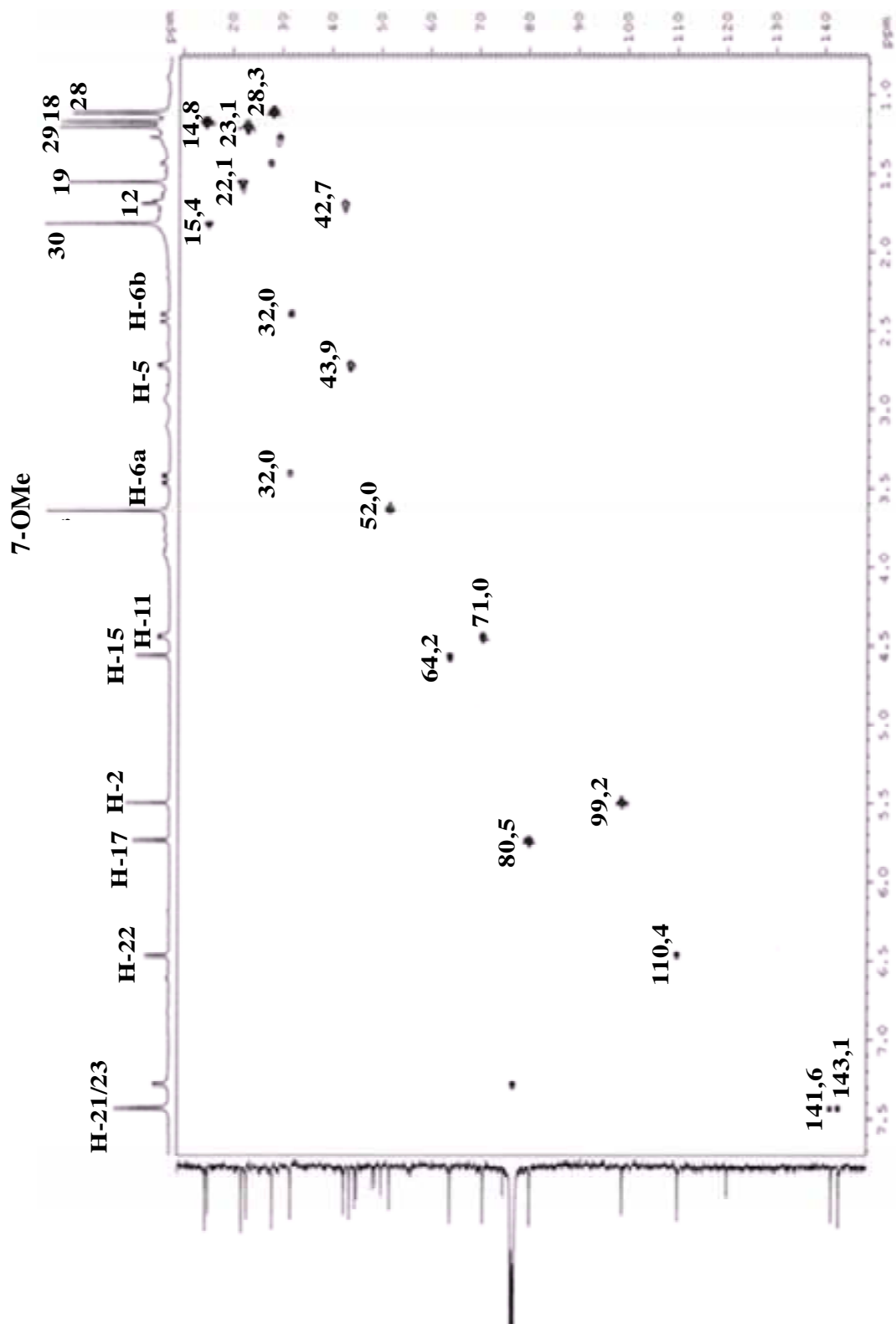
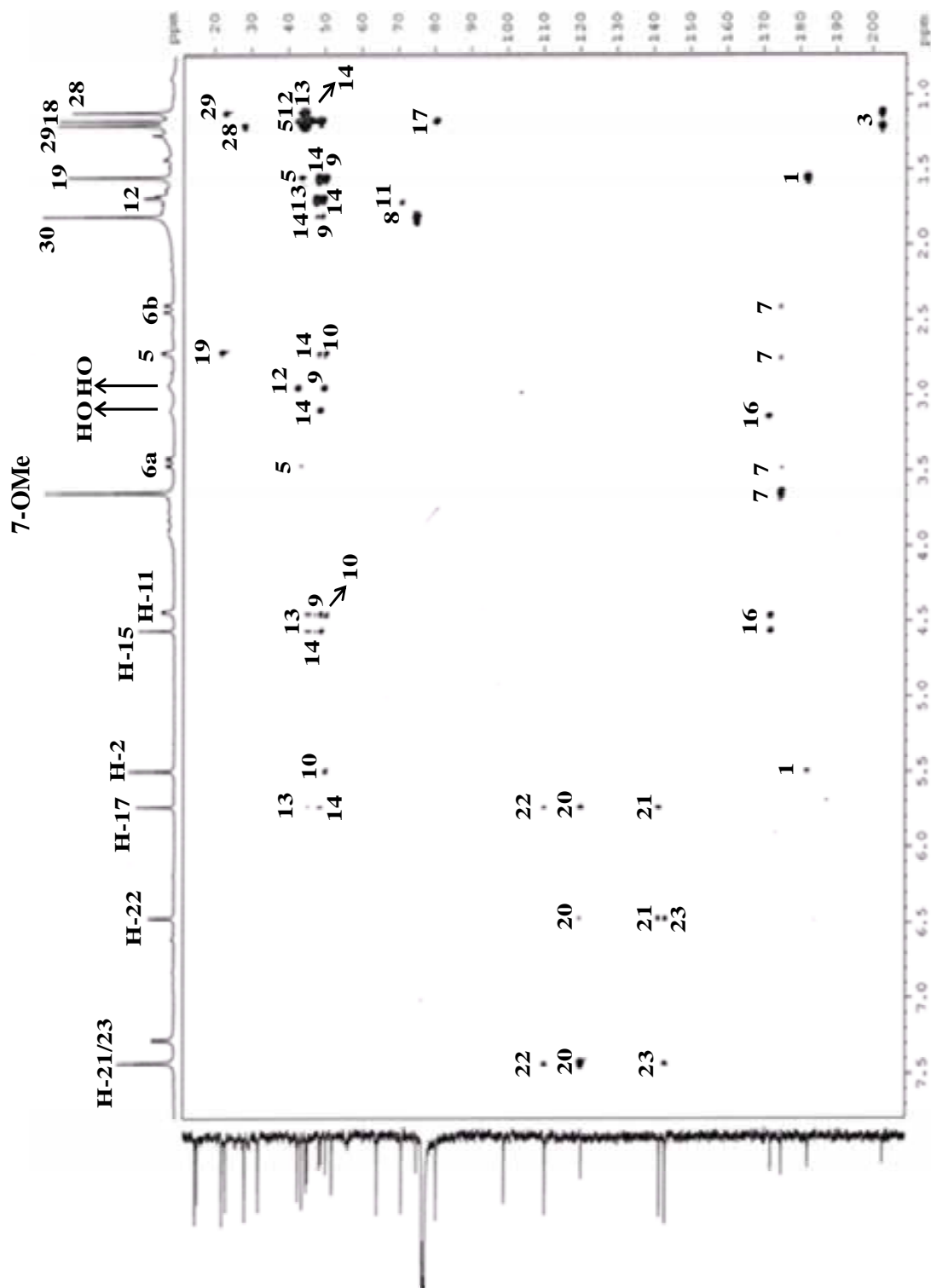


FIGURA 1.31: Mapa de contorno de g-HSQC de **05** (CDCl₃, 400 MHz)



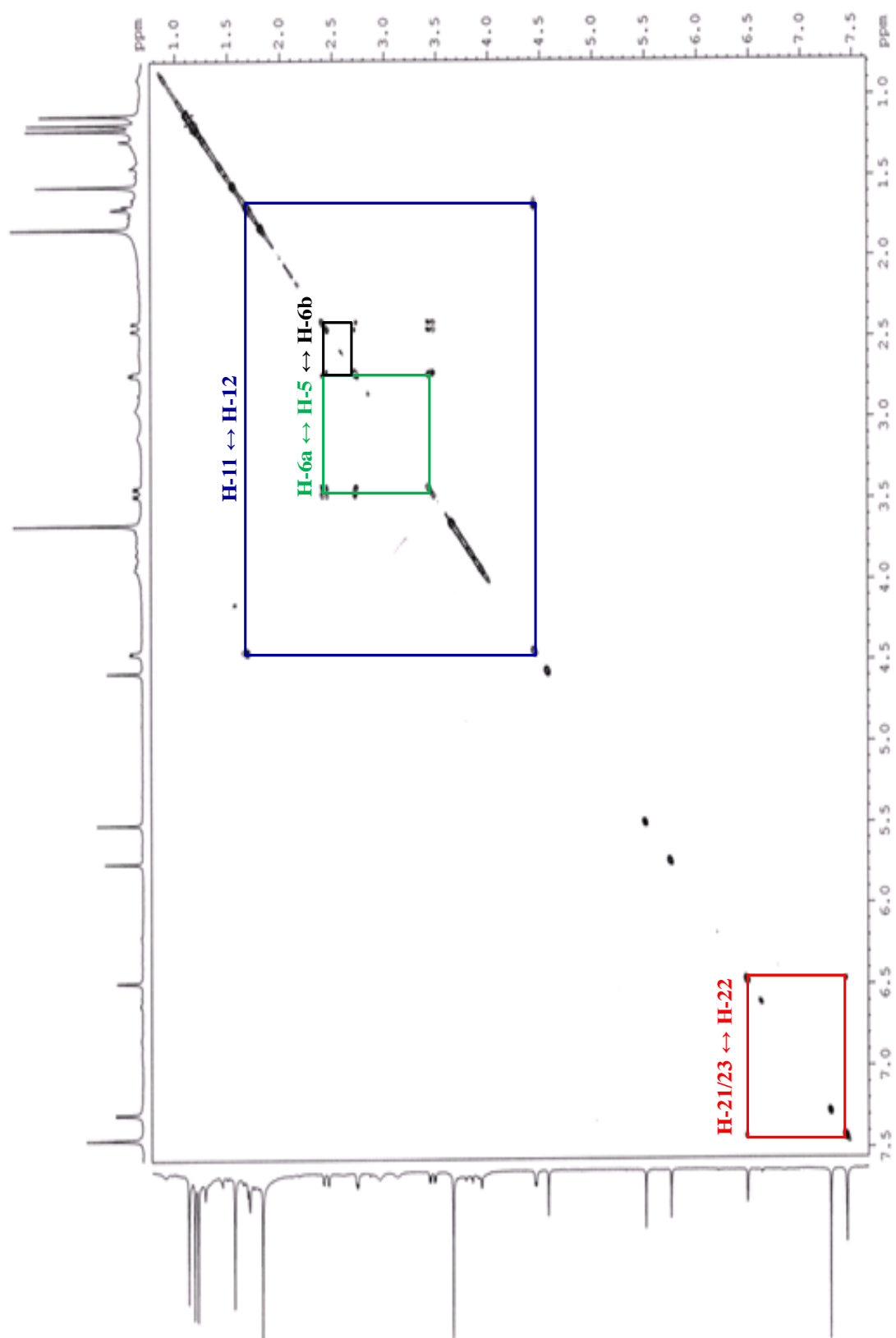


FIGURA 1.33: Espectro de g-COSY de **05** (CDCl₃, 400 MHz)

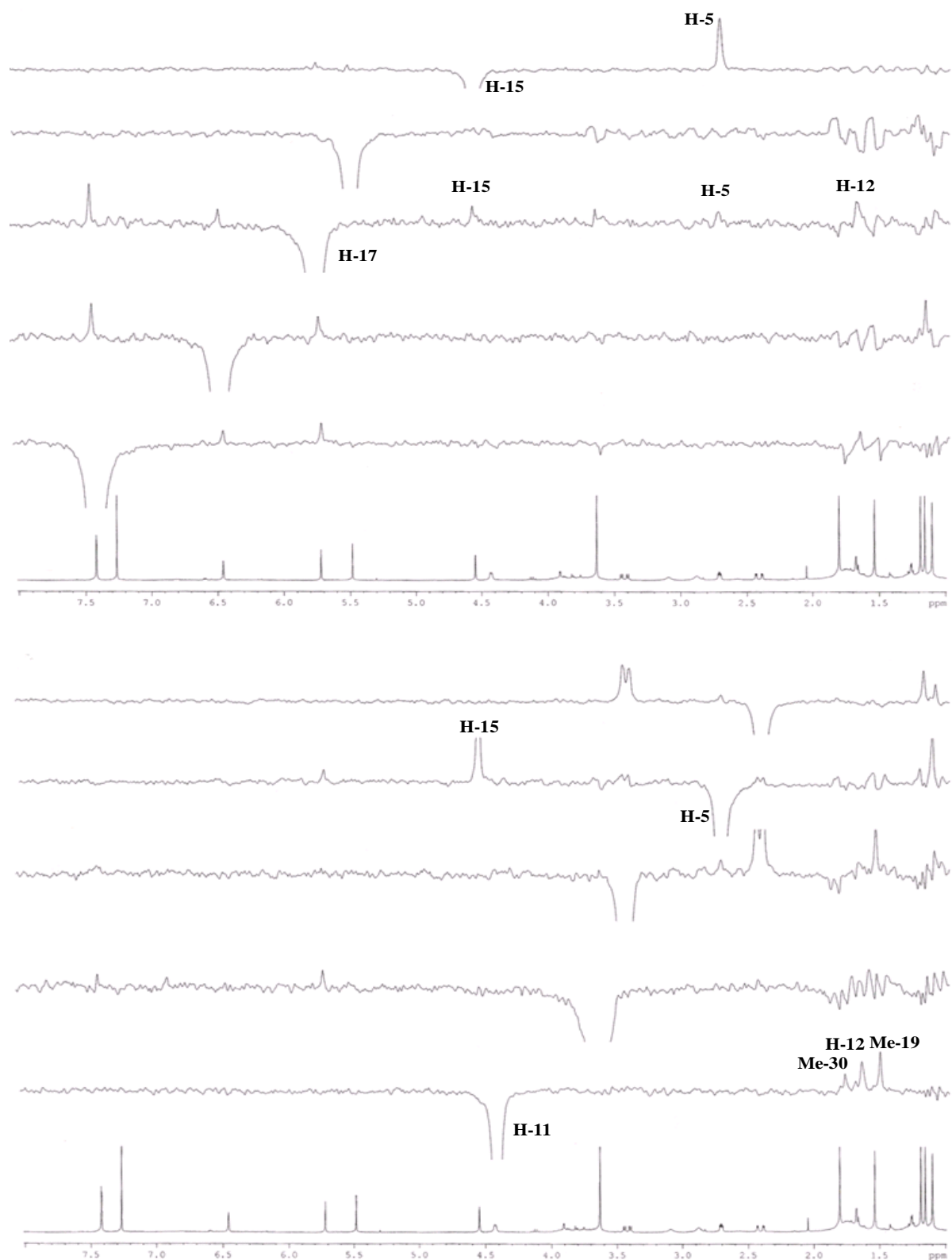


FIGURA 1.34: Espectro de g-NOESY-1D de **05** irradiando H-17, H-15, H-11 e H-5 (CDCl₃, 400 MHz)

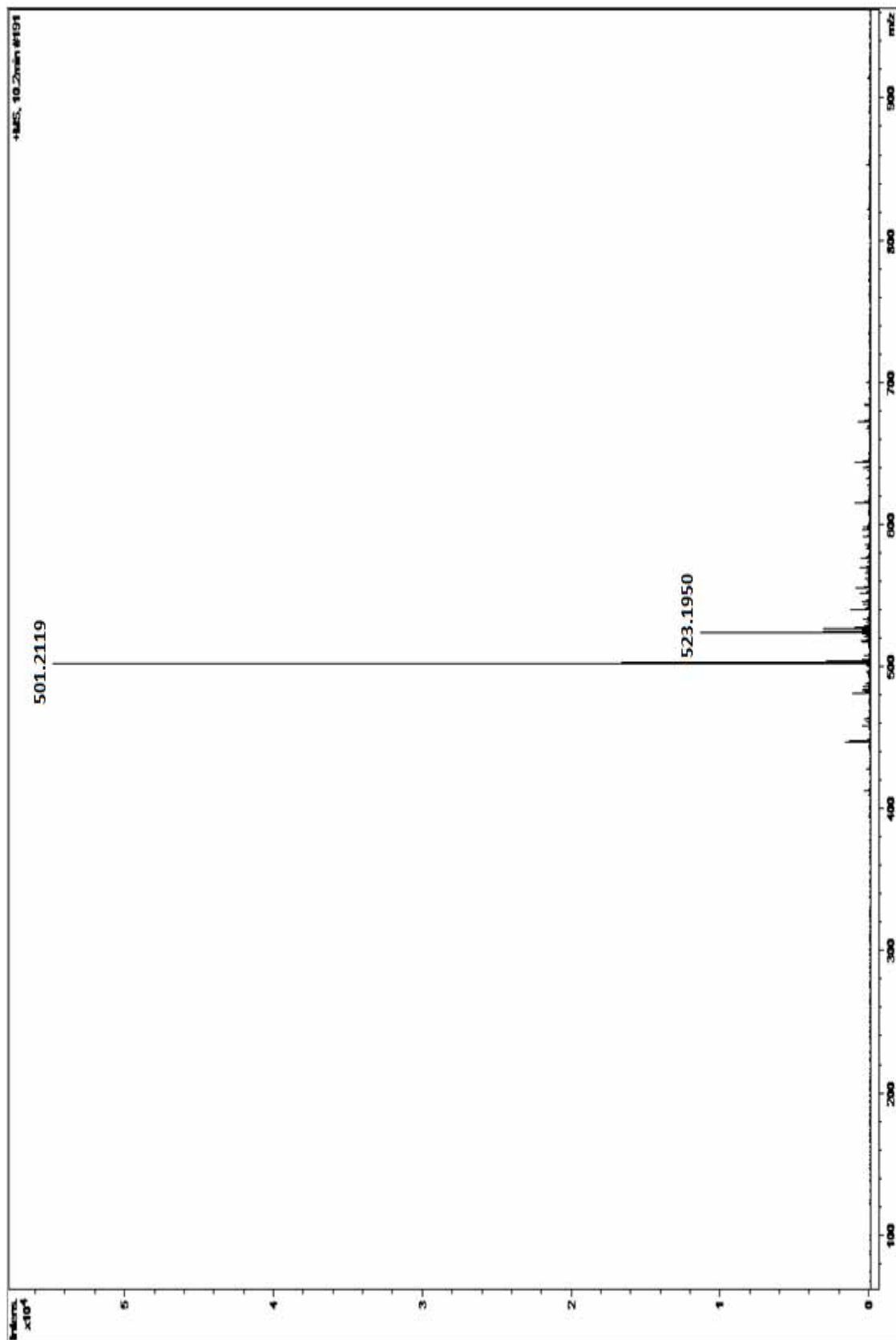
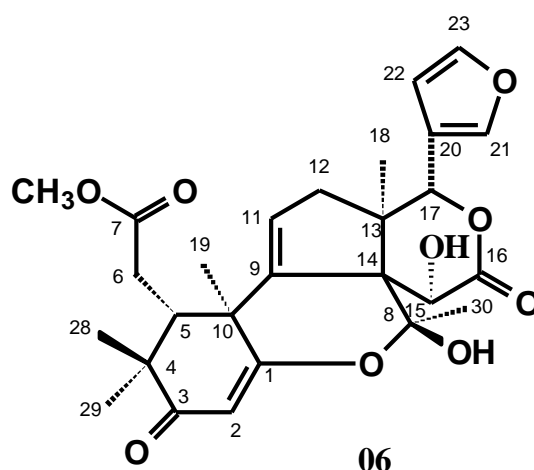


FIGURA 1.35: Espectro de massas de **05** (HRESI-MS, modo positivo)

1.4.2.6 Hortiolida D – substância 06

A substância **06** foi isolada anteriormente por BRAGA (2005) de *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani e recebeu o nome de hortiolida C. Neste trabalho, **06** foi isolada novamente dos extratos metanólicos dos troncos de *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani e *H. superba* Ducke, identificada através de experimento de RMN de ^1H , ^{13}C , g-NOESY-1D e denominada de hortiolida D. Além destes experimentos, neste trabalho também foi realizado o experimento de EM de alta resolução (HRESI-MS). Pela análise do espectro de g-NOESY-1D foi proposta a correção da estereoquímica da hidroxila em C-15 para a face α da molécula, a qual havia sido posicionada equivocadamente por BRAGA (2005) na face β .



A análise dos espectros de RMN da substância **06** indicou a presença dos anéis A e D e a cadeia lateral C-6/C7 similar ao limonoide **03**. Pelo espectro de massas (FIGURA 1.39, p. 107) foi possível observar íons m/z 501,1533 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) e m/z 523,1575 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) que estão de acordo com a massa molecular real (500,2203) e fórmula molecular ($\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_9$), exigindo a presença de mais um grupo hidroxila em relação a **03** ($\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_8$).

Pela análise dos espectros de RMN de ^1H (FIGURA 1.36, p. 104) e ^{13}C (FIGURA 1.37, p. 105) de **06** foi possível atribuir todos os hidrogênios e carbonos do esqueleto (TABELA 1.17, p. 103).

Pelo experimento de g-NOESY-1D (FIGURA 1.38, p. 106), o NOE observado foi similar àquele encontrado para o limonoide **03**. Ao irradiar H-15 foi possível observar NOE com o hidrogênio H-5, indicando que a hidroxila em C-15 está na face α . Ao irradiar a Me-30 (δ 1,73) foi possível observar NOE com a Me-18 (δ 1,42) indicando que ambas estão na mesma face, ou seja, na face *sin* (α).

Portanto, após a análise conjunta dos espectros de RMN, EM e comparação com dados da literatura (BRAGA, 2005) foi possível definir a estrutura da substância **06** como sendo a do limonoide hortiolida D.

TABELA 1.17: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância **06** e comparação com dados da literatura

H/C	Substância 06 (400/100 MHz, CDCl_3)		BRAGA, 2005 (400/100 MHz, CDCl_3)	
	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm)	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm)
1	-	175,7	-	175,7
2	5,93 (1H, <i>s</i>)	116,6	5,92 (1H, <i>s</i>)	116,6
3	-	202,7	-	202,7
4	-	45,2	-	45,3
5	2,80 (1H, <i>dd</i> , $J=7,3; 3,6$)	45,9	2,80 (1H, <i>dd</i> , $J=7,2; 3,6$)	45,9
6a	2,63 (1H, <i>dd</i> , $J=17,2; 7,3$)	30,3	2,65 (1H, <i>dd</i> , $J=17,4; 7,2$)	30,4
6b	2,52 (1H, <i>dd</i> , $J=17,2; 3,6$)		2,53 (1H, <i>dd</i> , $J=17,4; 3,6$)	
7	-	174,0	-	174,0
8	-	116,7	-	116,8
9	-	141,4	-	141,5
10	-	43,6	-	43,7
11	5,77 (1H, <i>t</i> , $J=2,5$)	131,5	5,79 (1H, <i>t</i> , $J=2,6$)	131,5
12a	2,37 (1H, <i>dd</i> , $J=18,4; 2,5$)	42,0	2,38 (1H, <i>dd</i> , $J=18,4; 2,6$)	42,0
12b	2,17 (1H, <i>dd</i> , $J=18,4; 2,5$)		2,18 (1H, <i>dd</i> , $J=18,4; 2,6$)	
13	-	48,5	-	48,6
14	-	64,7	-	64,8
15	5,25 (1H, <i>s</i>)	70,7	5,25 (1H, <i>s</i>)	70,7
16	-	168,7	-	168,6
17	5,17 (1H, <i>s</i>)	79,1	5,17 (1H, <i>s</i>)	79,1
Me-18	1,42 (3H, <i>s</i>)	16,7	1,42 (3H, <i>s</i>)	16,8
Me-19	1,55 (3H, <i>s</i>)	25,0	1,55 (3H, <i>s</i>)	25,1
20	-	120,1	-	120,2
21	7,45 (1H, <i>m</i>)	141,6	7,45 (1H, <i>m</i>)	141,7
22	6,46 (1H, <i>t</i> , $J=1,4$)	110,2	6,46 (1H, <i>t</i> , $J=1,4$)	110,2
23	7,45 (1H, <i>m</i>)	143,2	7,45 (1H, <i>m</i>)	143,2
Me-28	1,21 (3H, <i>s</i>)	28,2	1,20 (3H, <i>s</i>)	28,3
Me-29	1,22 (3H, <i>s</i>)	22,7	1,22 (3H, <i>s</i>)	22,7
Me-30	1,73 (3H, <i>s</i>)	24,3	1,73 (3H, <i>s</i>)	24,3
7-OMe	3,67 (3H, <i>s</i>)	52,1	3,67 (3H, <i>s</i>)	52,1

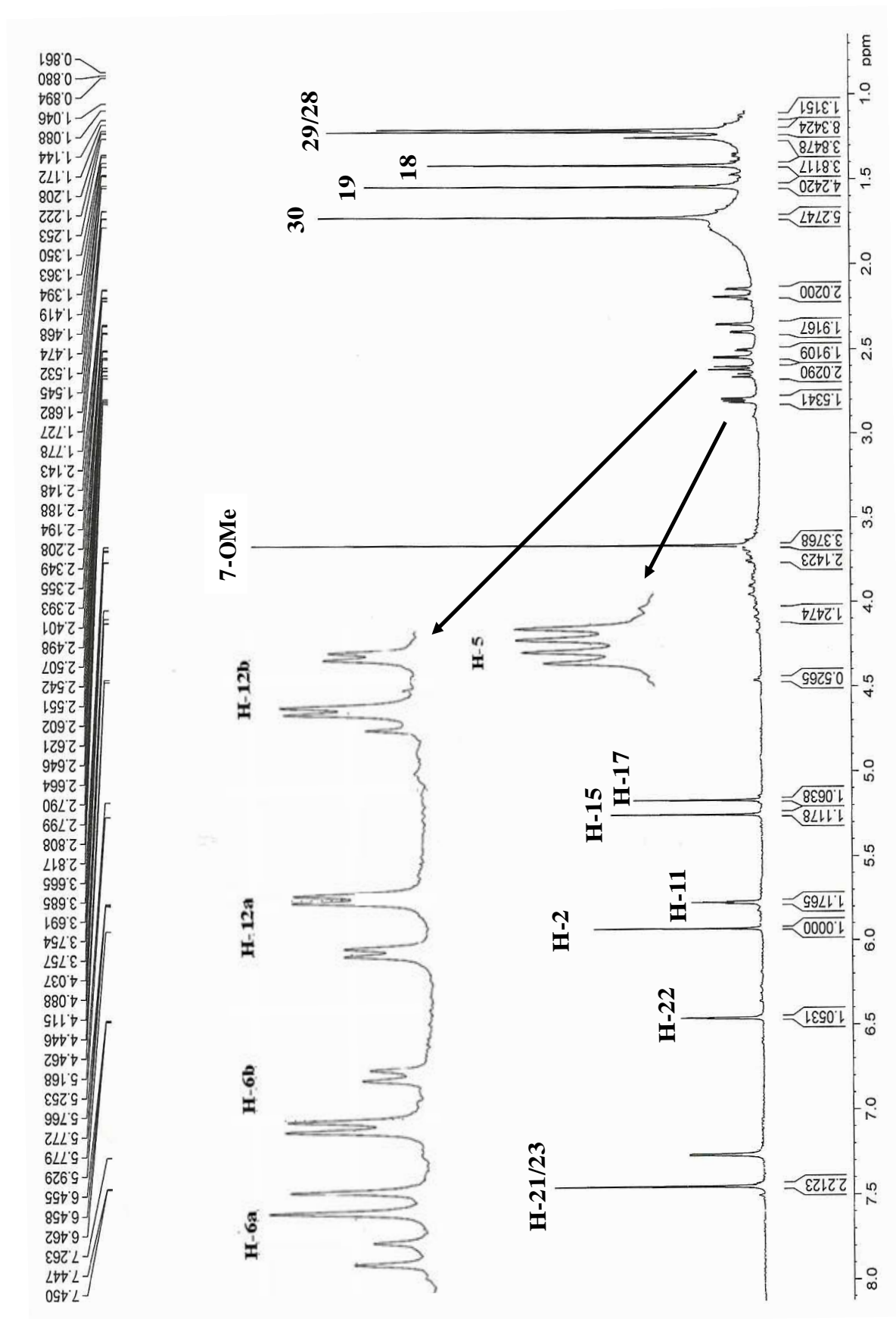


FIGURA 1.36: Espectro de RMN de ^1H de **06** (CDCl_3 , 400 MHz)

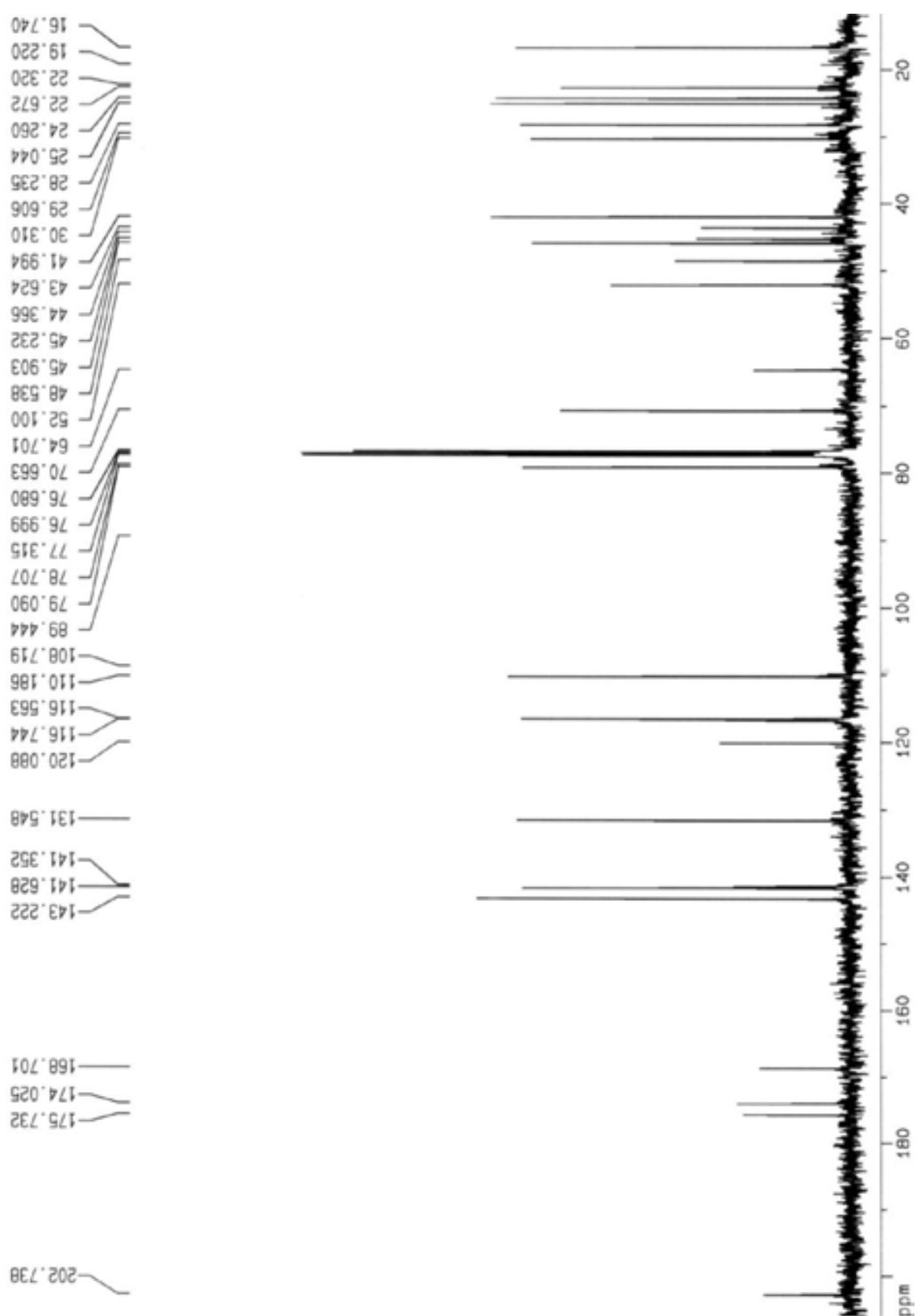


FIGURA 1.37: Espectro de RMN de ¹³C de **06** (CDCl₃, 100 MHz)

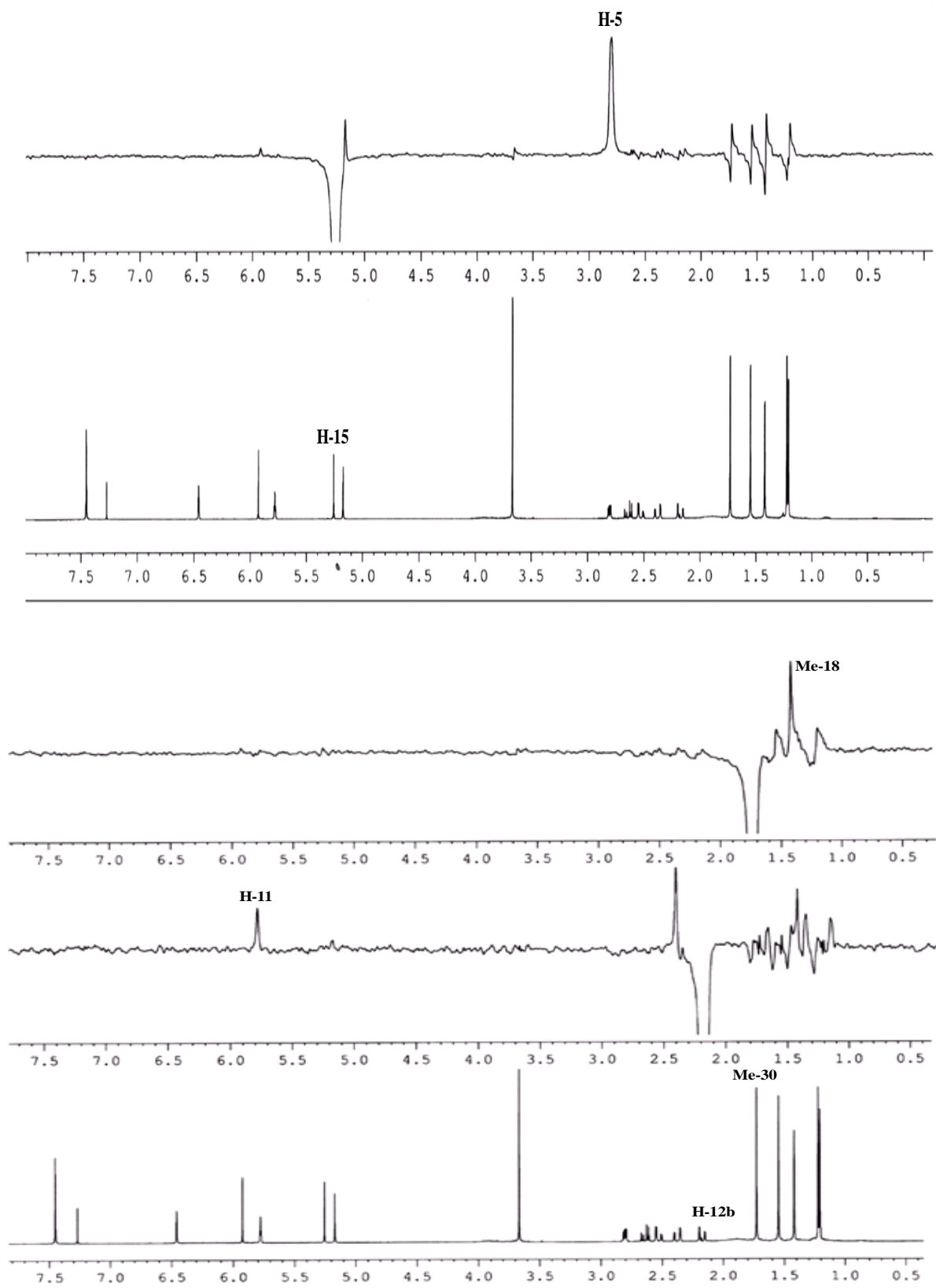


FIGURA 1.38: Espectro de g-NOESY-1D de **06** irradiando H-15, H-12b e Me-30 (CDCl₃, 400 MHz)

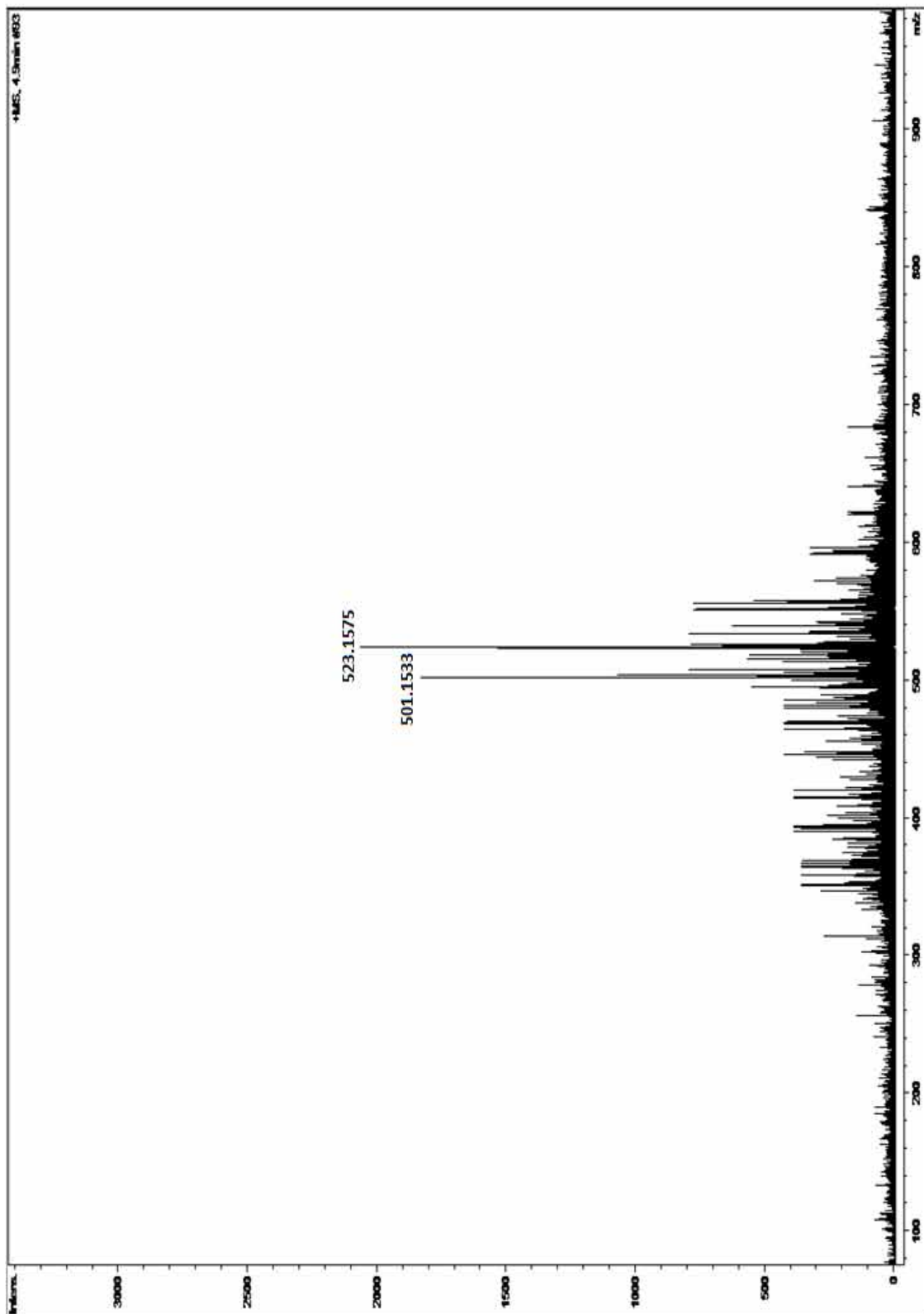
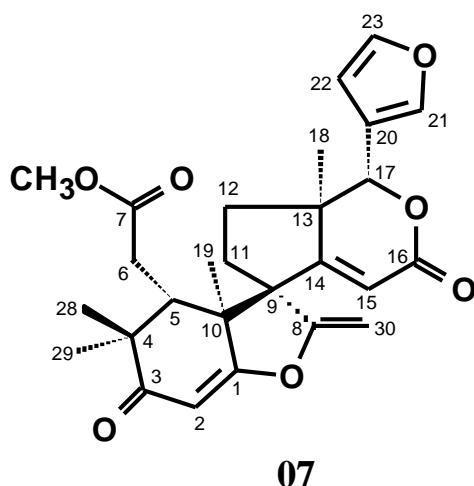


FIGURA 1.39: Espectro de massas de **06** (HRESI-MS, modo positivo)

1.4.2.7 Hortiolida E – substância 07

A substância **07** foi isolada dos extratos metanólicos do tronco e tronco subterrâneo de *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani e teve sua estrutura identificada através de experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C , EM de alta resolução (HRESI-MS) e comparação com dados da literatura (BRAGA, 2005). Esta substância, isolada anteriormente de *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani, por BRAGA (2005) foi denominada de hortiolida D. Neste trabalho, a substância **07** recebeu o nome de hortiolida E.



Os espectros de RMN da substância **07** indicaram claramente a presença de anéis C e D similares aos da guianina (estrutura **IX**, p. 16), primeiro limonoide isolado do gênero *Hortia* (*H. regia* Sandwith) (JACOBS *et al.*, 1986), e anel A com cadeia lateral C-6/C7 similar à substância **03**.

A análise dos espectros de RMN de ^1H (FIGURA 1.40, p. 111) e ^{13}C (FIGURA 1.41, p. 112) de **07** permitiu atribuir todos os hidrogênios e carbonos do esqueleto, cujos valores estão descritos na TABELA 1.18 (p. 110).

A principal diferença observada no espectro de RMN de ^1H da substância **07** em relação a **03** foi a presença de sinais de dois hidrogênios metilênicos em δ 4,92 e δ 4,56 (*d*, $J = 3,9$ Hz). A análise do espectro de HSQC

mostrou que ambos os hidrogênios relativos aos sinais mencionados anteriormente estavam ligados ao mesmo carbono (δ 89,4), confirmando a presença de uma ligação dupla terminal. Ambos os sinais mostraram no espectro de HMBC uma correlação com um sinal em δ 162,5 indicando serem vicinais ao C-8. O sinal mais desblindado (δ 4,92) mostrou ainda correlação com o sinal em δ 62,2. Desta forma, o sinal em δ 89,4 foi atribuído ao C-30 e este deslocamento químico é justificado pela presença do oxigênio no anel de 5 membros que doa densidade eletrônica, levando a blindagem do mesmo.

A presença de apenas quatro metilas (δ 1,04, δ 1,14, δ 1,21 e δ 1,35) indicou que o limonoide **07** foi formado via o limonoide **03** por um mecanismo concertado envolvendo a perda de um hidrogênio da Me-30, abertura do anel ciclopropano e 1,4-desidratação (15-OH) favorecendo a formação do sistema conjugado e fornecendo o sistema espiro [$4^{10,1,0,8},4^{11-14}$], sendo o C-9 o carbono espiro (ESQUEMA 1.5, p. 159).

O espectro de massas (FIGURA 1.42, p. 113) apresentou íons m/z 467,1747 ($[M+H]^+$), e m/z 505,1374 ($[M+K]^+$) que estão de acordo com a massa molecular real (466,1991) e fórmula molecular $C_{27}H_{30}O_7$, confirmando a estrutura **07** para a substância proposta.

A estereoquímica do carbono C-9 espiro foi inferida neste trabalho baseado no próximo limonoide a ser discutido (substância **08**, p. 114), para o qual foi feito o experimento de g-NOESY-1D.

Desta forma, pôde-se definir a estrutura da substância **07** como sendo a do limonoide hortiolida E.

TABELA 1.18: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância **07** e comparação com dados da literatura

H/C	Substância 07 (400/100 MHz, CDCl_3)		BRAGA, 2005 (400/100 MHz, CDCl_3)	
	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm)	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm)
1	-	176,8	-	176,7
2	5,68 (1H, <i>s</i>)	102,2	5,67 (1H, <i>s</i>)	102,2
3	-	201,0	-	201,1
4	-	45,2	-	45,2
5	2,96 (1H, <i>dd</i> , $J=10,0$; 0,9)	41,0	2,96 (1H, <i>dd</i> , $J=10,0$; 1,0)	41,1
6a	2,68 (1H, <i>dd</i> , $J=16,0$; 10,0)	31,8	2,68 (1H, <i>dd</i> , $J=16,0$; 10,0)	31,8
6b	2,19 (1H, <i>dd</i> , $J=16,0$; 0,9)		2,19 (1H, <i>dd</i> , $J=16,0$; 1,0)	
7	-	173,4	-	173,4
8	-	162,5	-	162,5
9	-	62,2	-	62,2
10	-	50,0	-	50,1
11	2,25 (1H, <i>m</i>)	28,5	2,26 (1H, <i>m</i>)	28,4
12	1,67 (1H, <i>m</i>)	33,6	1,67 (1H, <i>m</i>)	33,6
13	-	47,7	-	47,7
14	-	171,2	-	171,2
15	5,82 (1H, <i>s</i>)	114,0	5,82 (1H, <i>s</i>)	114,0
16	-	164,2	-	164,2
17	5,71 (1H, <i>s</i>)	80,0	5,71 (1H, <i>s</i>)	79,9
Me-18	1,14 (3H, <i>s</i>)	18,7	1,13 (3H, <i>s</i>)	18,7
Me-19	1,35 (3H, <i>s</i>)	19,3	1,35 (3H, <i>s</i>)	19,3
20	-	120,7	-	120,7
21	7,50 (1H, <i>m</i>)	140,6	7,50 (1H, <i>m</i>)	140,5
22	6,35 (1H, <i>dd</i> , $J=1,6$; 0,6)	108,8	6,35 (1H, <i>dd</i> , $J=1,6$; 0,6)	108,7
23	7,43 (1H, <i>t</i> , $J= 1,6$)	143,3	7,44 (1H, <i>t</i> , $J= 1,6$)	143,3
Me-28	1,04 (3H, <i>s</i>)	25,7	1,04 (3H, <i>s</i>)	25,8
Me-29	1,21 (3H, <i>s</i>)	23,1	1,21 (3H, <i>s</i>)	23,1
30a	4,92 (1H, <i>d</i> , $J= 3,9$)	89,4	4,92 (1H, <i>d</i> , $J= 3,9$)	89,4
30b	4,56 (1H, <i>d</i> , $J= 3,9$)		4,56 (1H, <i>d</i> , $J= 3,9$)	
7-OMe	3,72 (3H, <i>s</i>)	52,3	3,71 (3H, <i>s</i>)	52,5

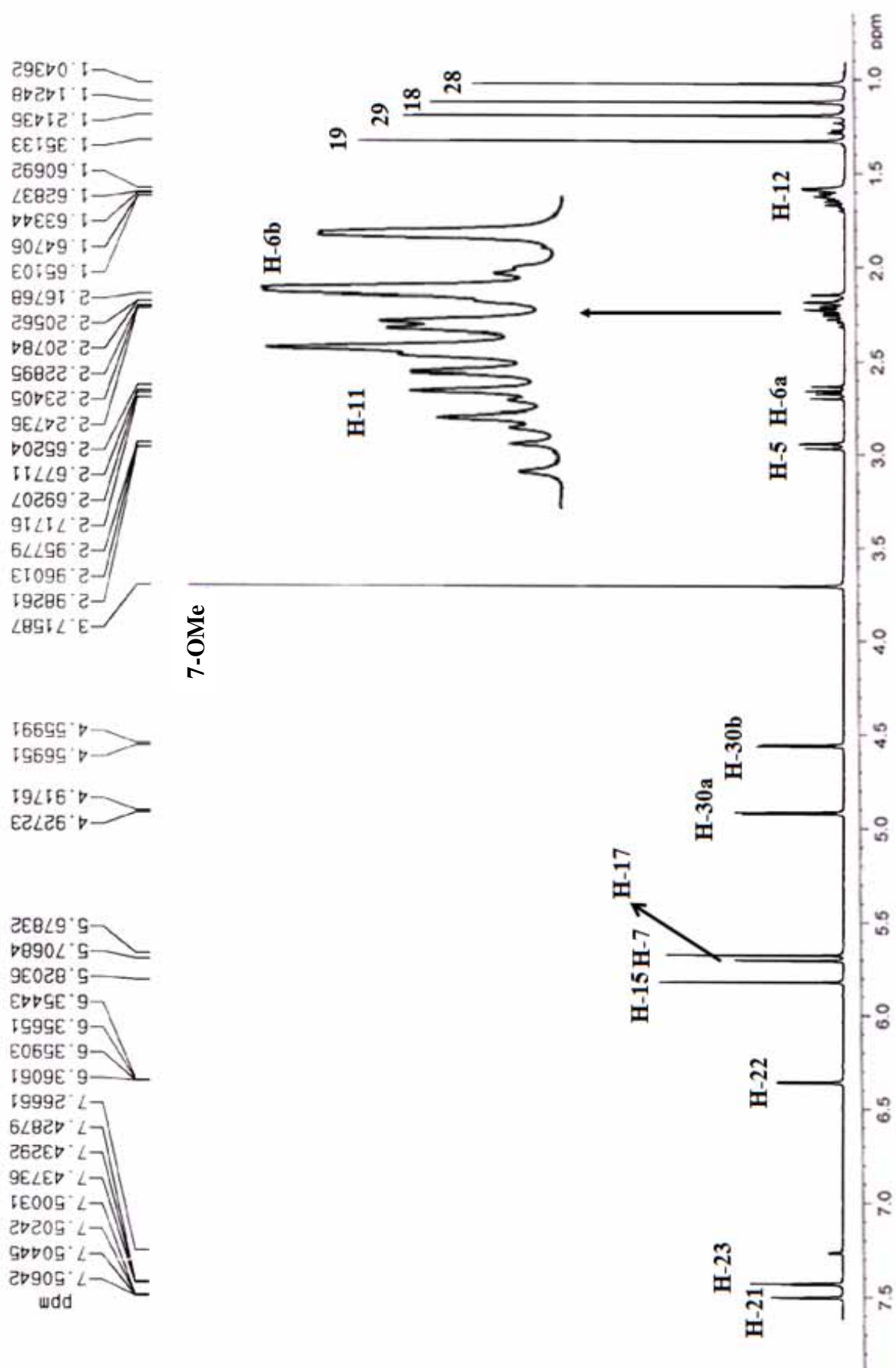


FIGURA 1.40: Espectro de RMN de ^1H de **07** (CDCl_3 , 400 MHz)

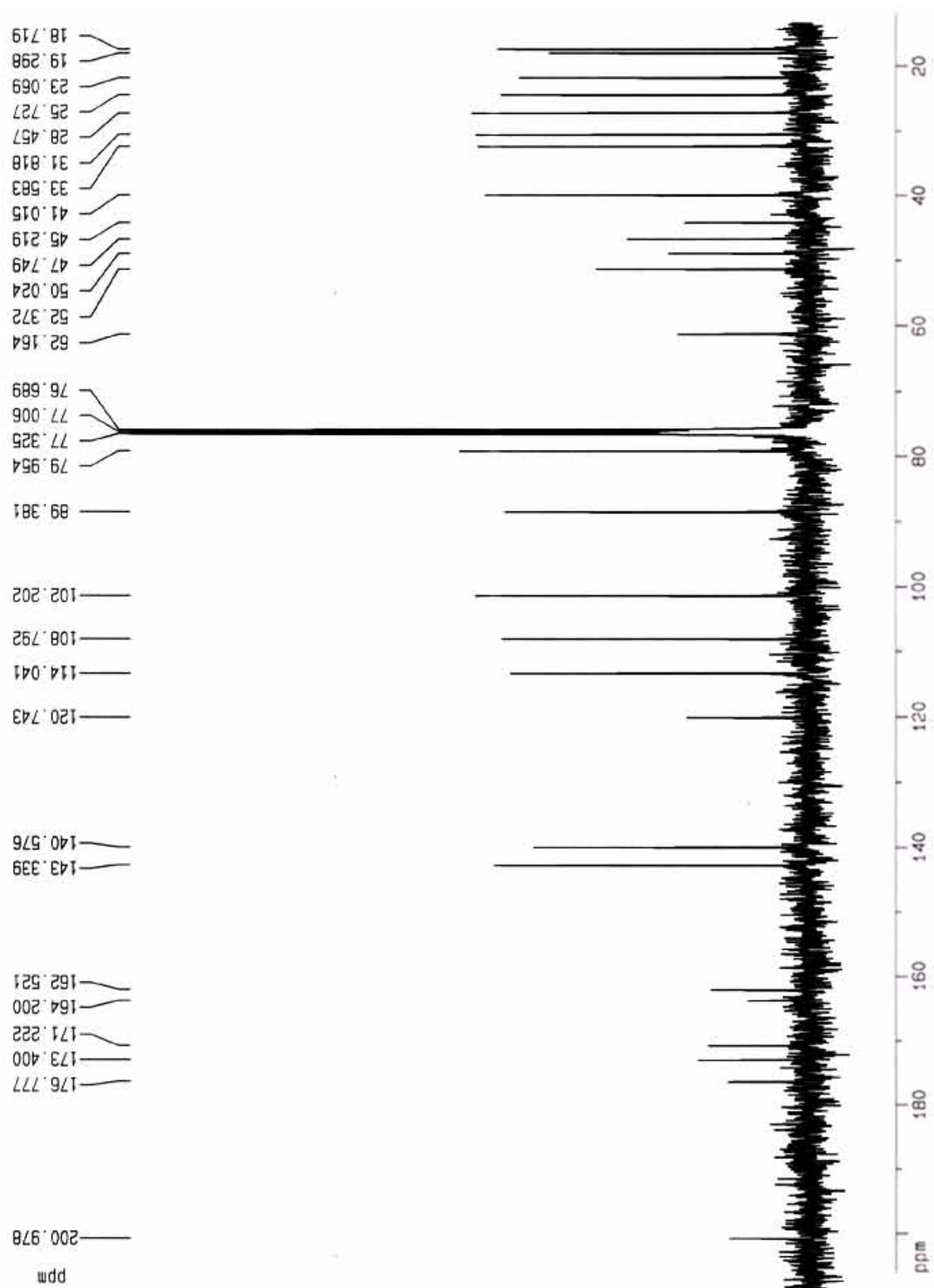


FIGURA 1.41: Espectro de RMN de ^{13}C de **07** (CDCl_3 , 400 MHz)

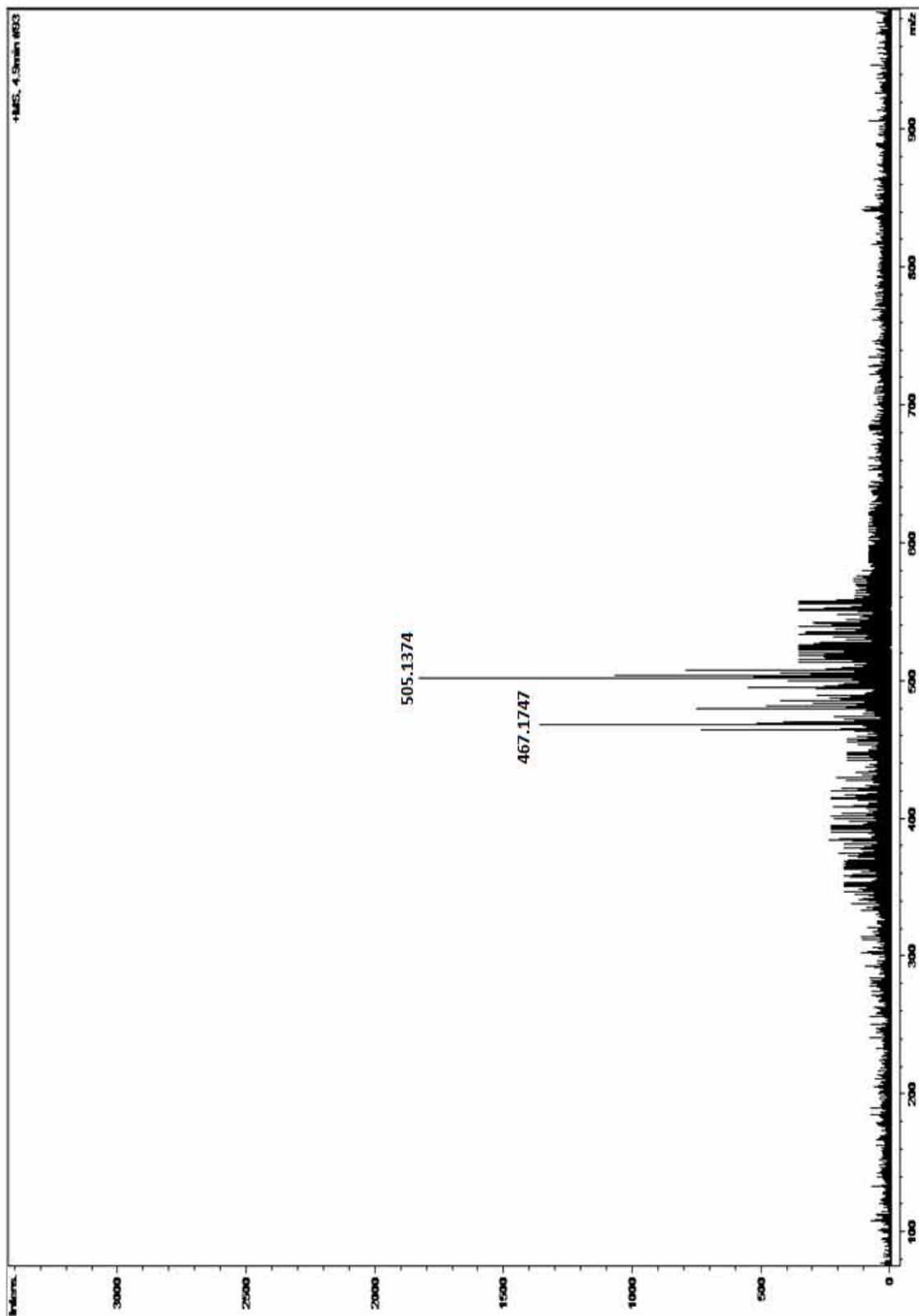
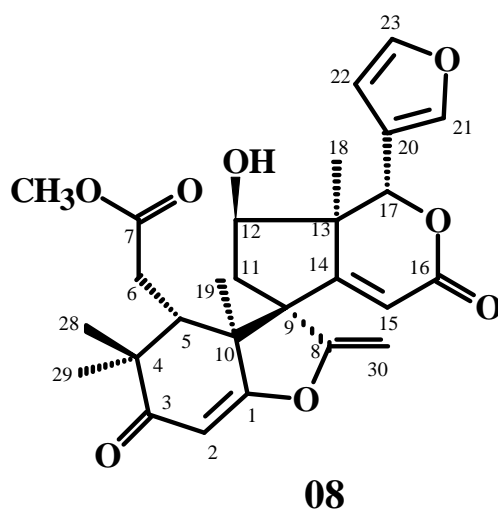


FIGURA 1.42: Espectro de massas de **07** (HRESI-MS, modo positivo)

1.4.2.8 12 β -Hidroxi-hortiolida E – substância 08

A substância **08** foi isolada do extrato metanólico do tronco de *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani e teve sua estrutura determinada através de experimento de RMN de ^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC, COSY, g-NOESY, EM de alta resolução (HRESI-MS) e comparação com dados da literatura da Hortiolida E (substância **07**) (BRAGA, 2005). Não há descrição desta estrutura na literatura.



A substância **08** revelou características espectrais similares às daquelas da substância **07** ($\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_7$). O espectro de massas da substância **08** (FIGURA 1.50, p. 125) apresentou os íons m/z 483,2013 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) e m/z 505,1836 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) que estão de acordo com a massa molecular real (482,1941) e fórmula molecular $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_8$, indicando a presença de um grupo hidroxila adicional em relação à **07**.

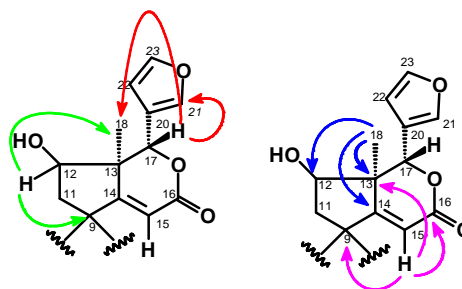
A análise dos espectros de RMN de ^1H (FIGURA 1.43, p. 118), ^{13}C (FIGURA 1.44, p. 119) e HSQC (FIGURA 1.45, p. 120) de **08** permitiu atribuir todos os hidrogênios e carbonos do esqueleto, cujos valores estão descritos na TABELA 1.19 (p. 117).

O sinal em δ 4,12 (1H, *t*, $J = 5,5$ Hz) relativo a um hidrogênio carbinólico, no espectro de HSQC mostrou correlação com o mesmo deslocamento químico (δ 76,5) atribuído ao C-17, sugerindo a presença de uma hidroxila em C-12. Este hidrogênio carbinólico em δ 4,12, no espectro de

HMBC (FIGURA 1.46, p. 121) mostrou correlação com o sinal da Me-18 (δ 19,4). No experimento de COSY (FIGURAS 1.47 a 1.48, ps. 122 a 123), este sinal em δ 4,12 mostrou acoplamento com o sinal em δ 2,64 (1H, *dd*, $J= 16,6$ Hz e 5,5 Hz) e o sinal em δ 2,64 mostrou correlação com o sinal em δ 2,39 (1H, *d*, $J= 16,6$ Hz). Pelo HSQC os sinais em δ 2,64 e δ 2,39 corresponderam a um mesmo sinal em δ 39,9, permitindo atribuí-los aos hidrogênios H-11a, H-11b e C-11, respectivamente. Pelo HMBC o sinal em δ 2,64 mostrou correlação com C-10 (δ 49,6) e δ 61,5 que pôde ser atribuído somente a C-9. O sinal em δ 2,39 correlacionou-se com os sinais em δ 49,6 (C-10), δ 52,1 (C-13), δ 61,5 (C-9), δ 76,5 (C-12) e com um sinal em δ 169,3 que pôde ser atribuído somente ao C-14. O sinal em δ 2,80 não apresentou correlação no experimento de HSQC, sugerindo corresponder a um hidrogênio hidroxílico, podendo ser atribuído a 12-OH.

Pela comparação dos espectros de RMN de ^{13}C das substâncias **07** e **08**, foi possível observar diferenças nos deslocamentos químicos de C-17 (δ 80,0 para **07** e δ 76,5 para **08**). Esta diferença deve-se ao efeito γ do grupo 12 β -OH (ASAKAWA *et al.*, 1977).

O sinal em δ 5,92 (1H, *s*) foi atribuído ao H-15 e mostrou correlação via HMBC com o sinal em δ 52,1 (C-13), com um sinal em δ 61,5 (C-9) e com um sinal em δ 163,7 ainda não atribuído. Pelo HSQC o sinal em δ 5,92 correlacionou-se com um sinal em δ 115,6, indicando a presença de uma ligação dupla entre C-14 e C-15. Desta forma, o sinal em δ 163,7 foi atribuído ao C-16. Porém, a correlação de H-15 com C-9 (δ 61,5) sugeriu uma contração do anel C, como mostrado a seguir.



No espectro de RMN de ^1H foi possível observar ainda dois sinais em δ 4,96 (1H, *d*, $J= 4,0$ Hz) e 4,56 (1H, *d*, $J= 4,0$ Hz) relativos aos hidrogênios geminais em ligação dupla. A análise do espectro de HSQC mostrou ambos os hidrogênios relativos aos sinais mencionados anteriormente ligados ao mesmo carbono com sinal de deslocamento químico em δ 90,3, confirmando, portanto a presença de uma ligação dupla terminal. Ambos os sinais mostraram correlação com os sinais em δ 163,1 e δ 61,5 no espectro de HMBC. Desta forma o sinal em δ 90,3 foi atribuído ao C-30 e este deslocamento químico é justificado pela presença do oxigênio no anel de cinco membros que doa densidade eletrônica, levando a blindagem do mesmo.

As correlações de H-11a e H-11b, H-5, Me-19, H-15 e dos sinais em δ 4,96 e δ 4,56 com C-9 em δ 61,5 somente pôde ser justificada com a contração do anel C e com a desidrogenação da Me-30, levando a formação da ligação dupla terminal.

Pelo experimento de *g*-NOESY-1D (FIGURA 1.49, p. 124), quando o sinal de H-15 em δ 5,92 foi irradiado observou-se NOE com o sinal em δ 3,24 atribuído ao H-5, indicando que o mesmo encontra-se na face β da molécula. A irradiação do sinal em δ 1,11 referente a Me-18 mostrou NOE com o sinal em δ 4,12 (H-12), confirmando que ambos estão na mesma face da molécula, ou seja, na face α ; portanto, a hidroxila presente em C-12 encontra-se anti a Me-18, na face β da molécula. Além disso, a irradiação do sinal da Me-18 em δ 1,11 também mostrou NOE com o sinal em δ 4,56 de H-30b, permitindo posicionar CH_2 -30 *sin* (face α) a Me-18. O experimento de *g*-NOESY contribuiu na elucidação da configuração relativa de C-9, o qual apresentou estereoquímica similar à do limonoide guianina (estrutura **IX**, p. 16) (McLEAN *et al.*, 1988).

Portanto, a análise conjunta dos espectros de RMN e EM permitiu definir a estrutura da substância **08** como sendo a do limonoide 12 β -hidróxi-hortiolida E.

A biogênese de **08** parece ser via oxidação de **07** no C-12 (ESQUEMA 1.5, p. 159).

TABELA 1.19: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C e correlações observadas no HMBC para a substância **08**

H/C	Substância 08 (400/100 MHz, CDCl_3)		Correlações observadas no HMBC
	δ (ppm), <i>J</i> (Hz)	δ (ppm)	
1	-	177,3	-
2	5,67 (1H, <i>s</i>)	101,8	C-1, C-4 e C-10
3	-	201,4	-
4	-	45,5	-
5	3,24 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =9,2; 1,0)	40,2	C-4, C-6, C-7, C-9, C-10, Me-19, Me-28, Me-29
6a	2,90 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =17,2; 1,0)	31,3	C-4, C-5, C-7, C-10
6b	2,53 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =17,2; 9,2)		
7	-	174,3	-
8	-	163,1	-
9	-	61,5	-
10	-	49,6	-
11a	2,64 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =16,6; 5,5)	39,9	C-8, C-9, C-10, C-12, C-13, C-14
11b	2,39 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 16,6)		
12	4,12 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 5,5)	76,5	C-9, C-14, Me-18
13	-	52,1	-
14	-	169,3	-
15	5,92 (1H, <i>s</i>)	115,6	C-9, C-13, C-16
16	-	163,7	-
17	5,79 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 0,8)	76,5	C-13, C-14, C-20, C-22, C-23, Me-18
Me-18	1,11 (3H, <i>s</i>)	19,4	C-12, C-13, C-14, C-17
Me-19	1,35 (3H, <i>s</i>)	19,4	C-1, C-5, C-9, C-10
20	-	120,7	-
21	7,54 (1H, <i>m</i>)	140,9	C-17, C-20, C-22, C-23
22	6,50 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =1,8; 0,8)	109,3	C-20, C-21, C-23
23	7,43 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> =1,8)	143,4	C-20, C-21, C-22
Me-28	1,07 (3H, <i>s</i>)	25,6	C-3, C-4, Me-29
Me-29	1,19 (3H, <i>s</i>)	23,2	C-3, C-4, C-5, Me-28
30a	4,96 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 4,0)	90,3	C-8, C-9
30b	4,56 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 4,0)		
7-OMe	3,65 (3H, <i>s</i>)	52,2	C-7
12-OH	2,80 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 5,5)	-	C-13

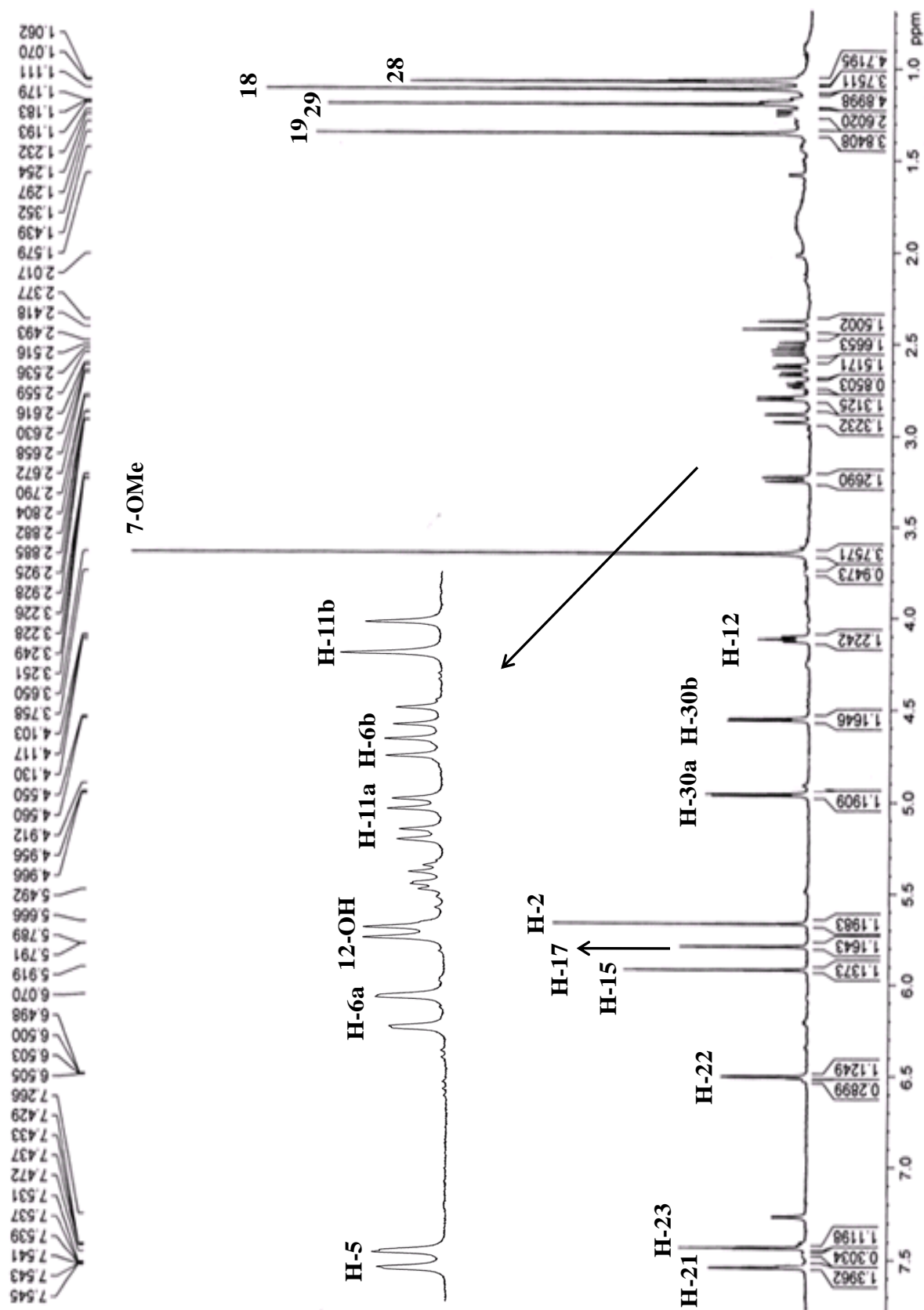


FIGURA 1.43: Espectro de RMN de ^1H de **08** (CDCl_3 , 400 MHz)

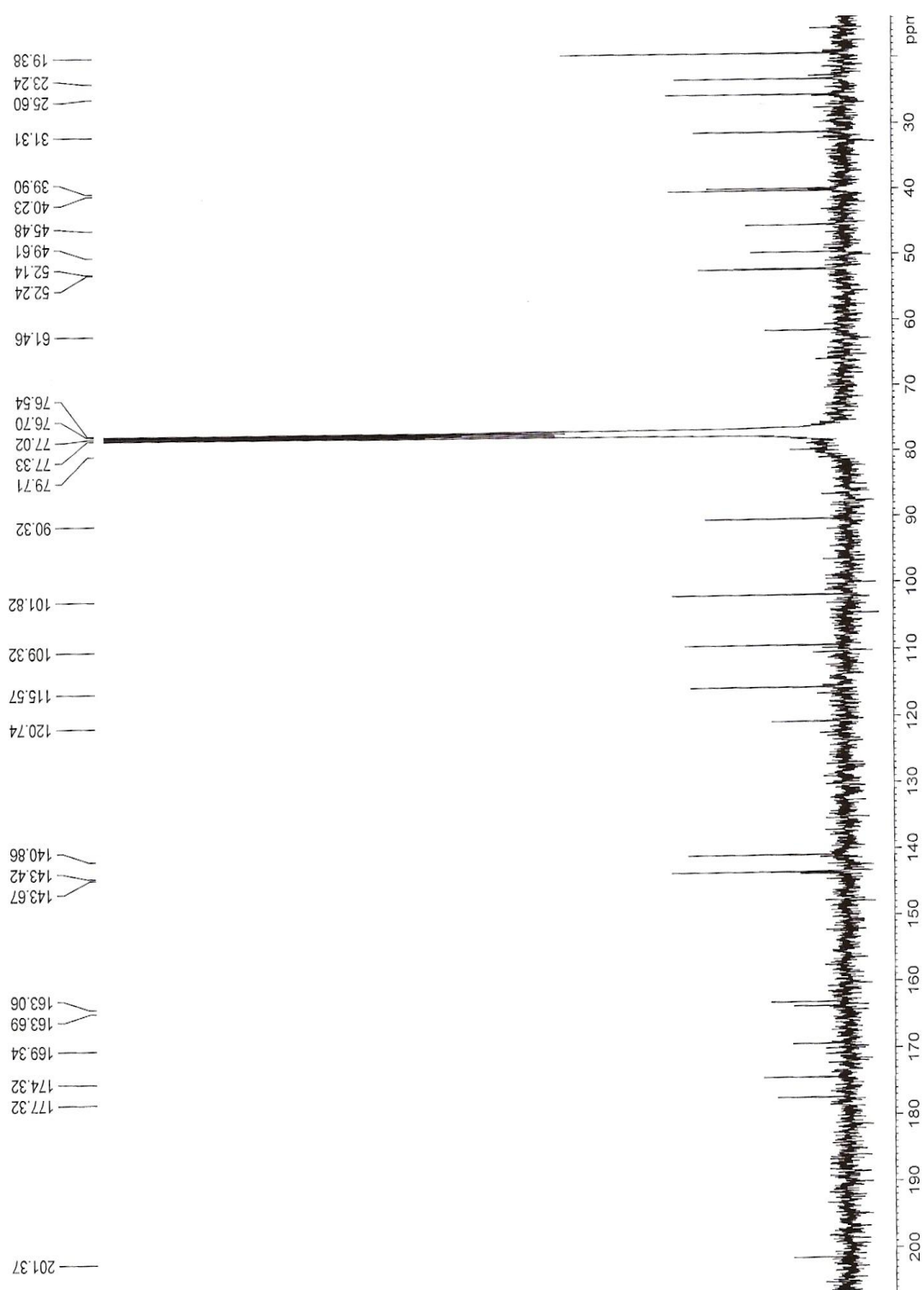


FIGURA 1.44: Espectro de RMN de ¹³C de **08** (CDCl₃, 100 MHz)

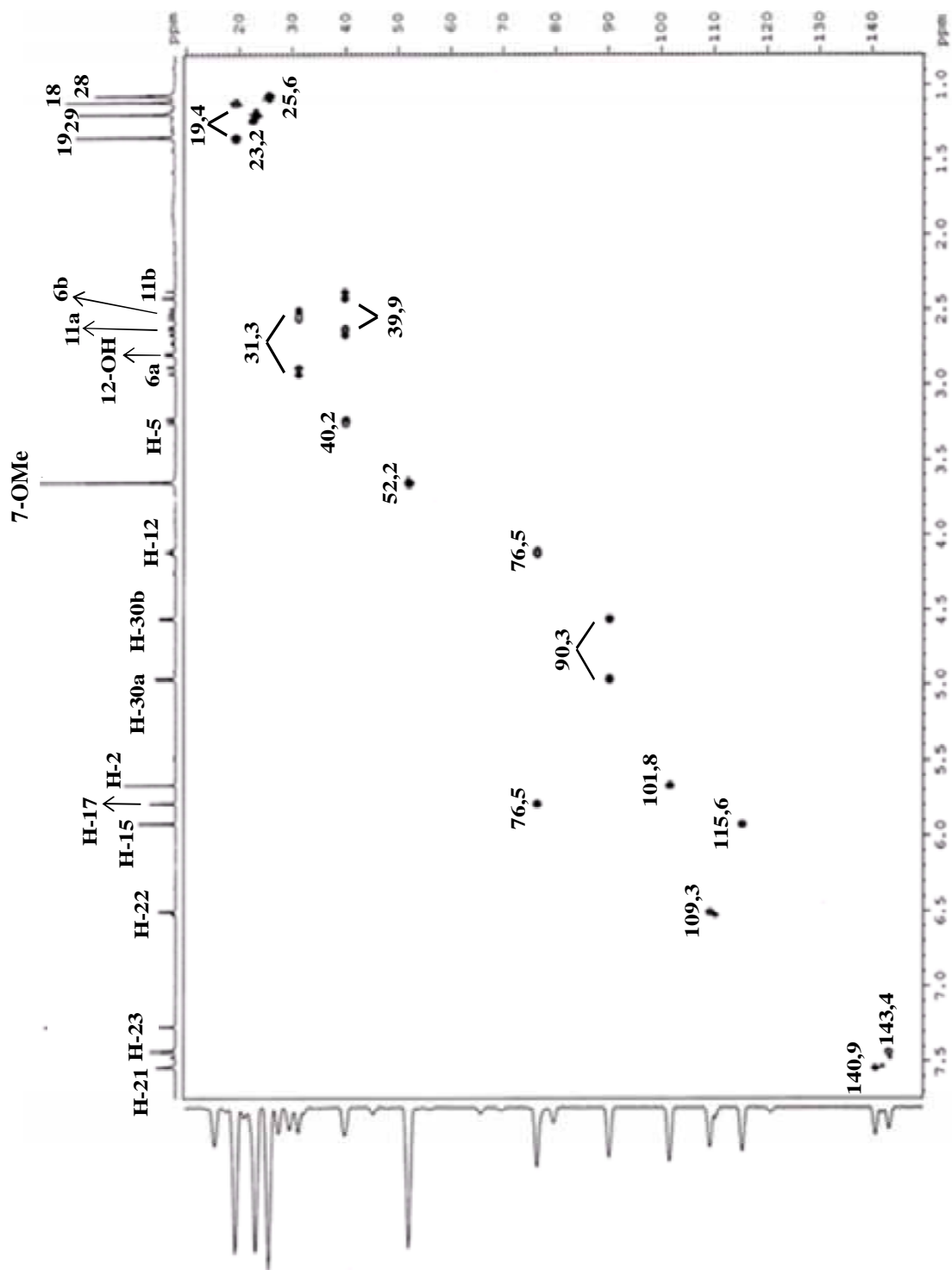


FIGURA 1.45: Mapa de contorno de g-HSQC de **08** (CDCl₃, 400 MHz)

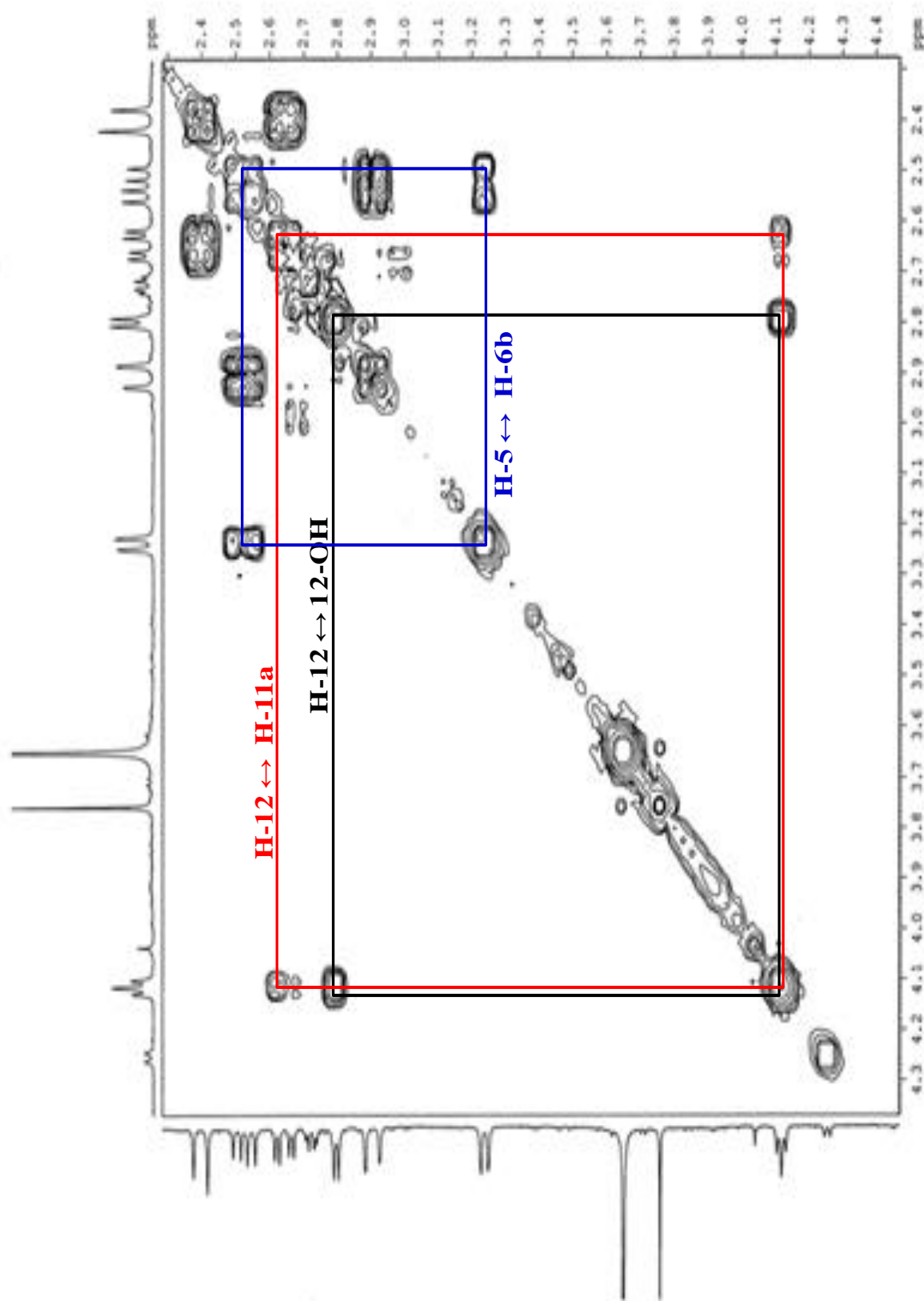


FIGURA 1.47: Espectro 01 de g-COSY de **08** (CDCl₃, 400 MHz)

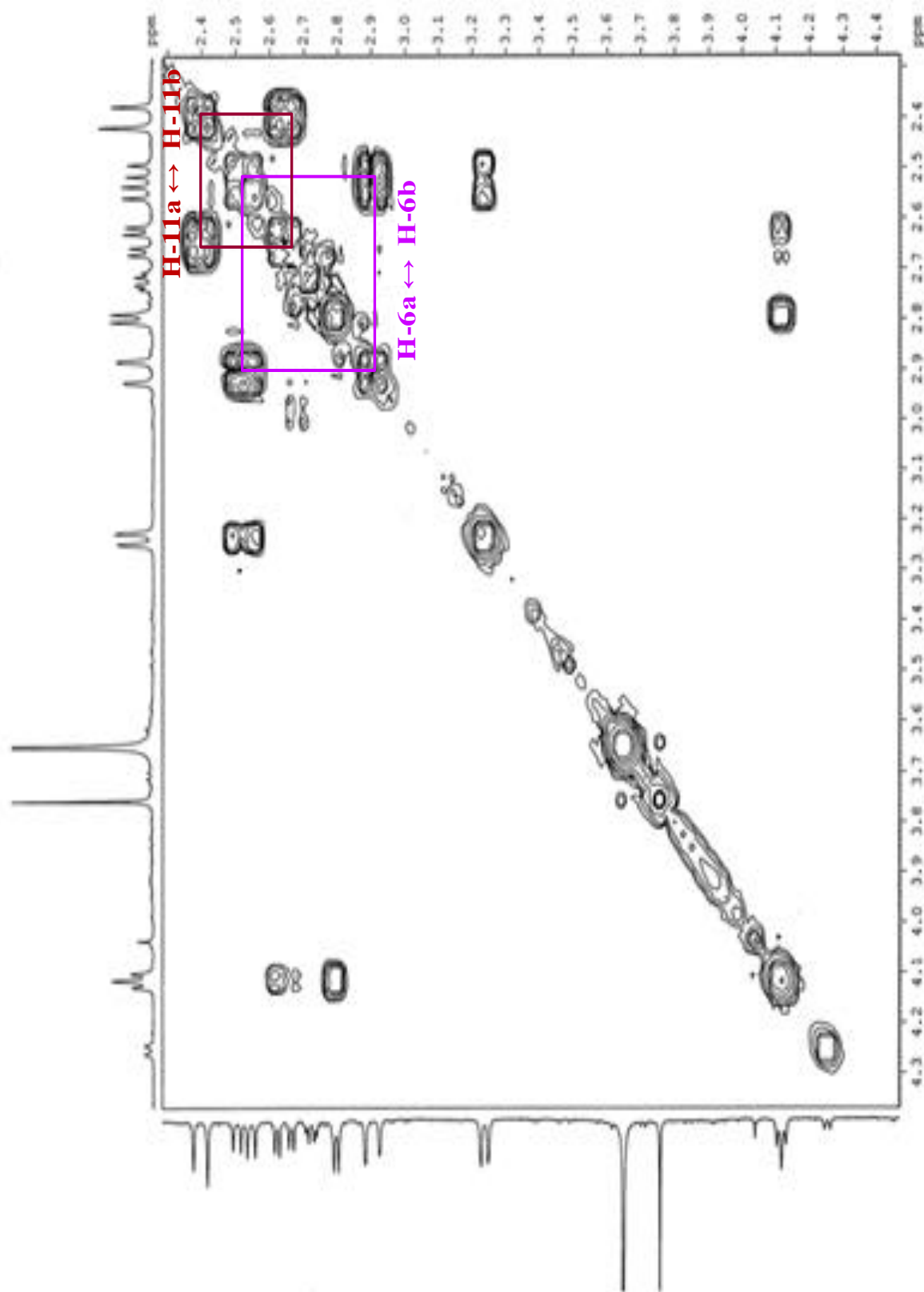


FIGURA 1.48: Espectro 02 de g-COSY de **08** (CDCl₃, 400 MHz)

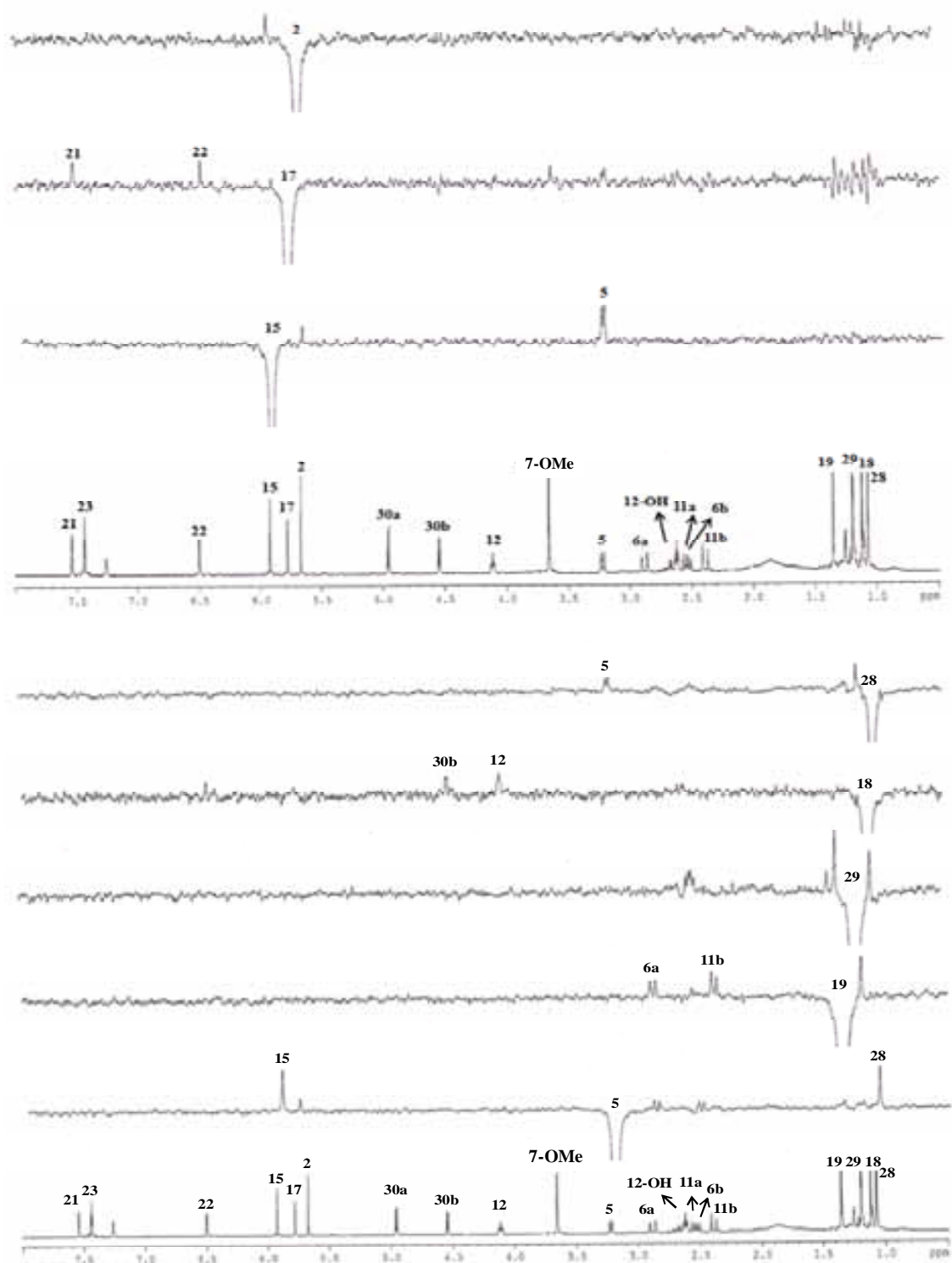


FIGURA 1.49: Espectro de g-NOESY-1D de **08** irradiando H-15, H-17, H-2, H-5, Me-19, Me-29, Me-18 e Me-28 (CDCl₃, 400 MHz)

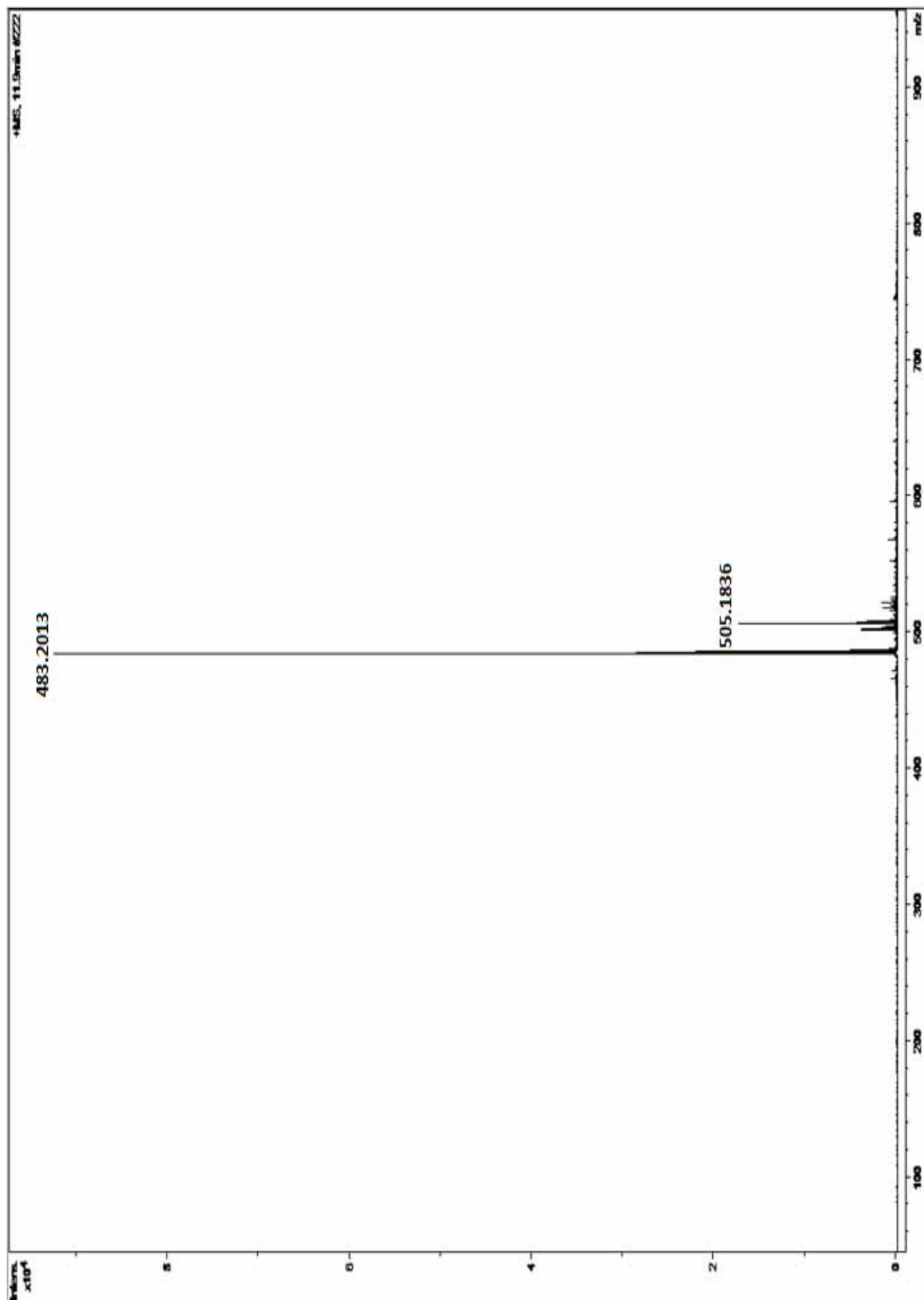
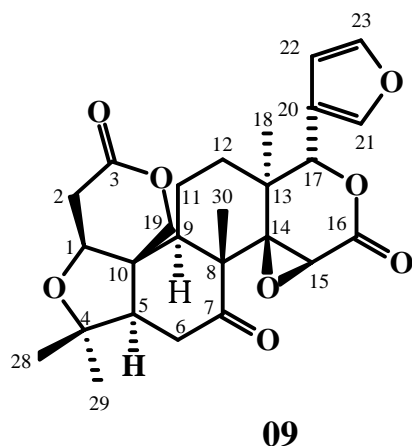


FIGURA 1.50: Espectro de massas de **08** (HRESI-MS, modo positivo)

1.4.2.9 Limonina – substância 09

A substância **09** foi isolada do extrato metanólico do tronco subterrâneo de *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani e teve sua estrutura identificada através de experimento de RMN de ^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC, COSY e comparação com dados da literatura (RIBEIRO *et al.*, 2005).



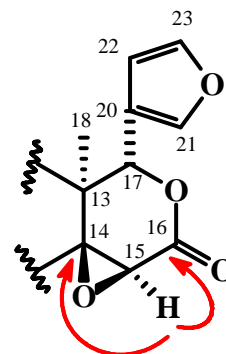
A análise dos espectros de RMN de ^1H de **09** (FIGURA 1.51, p. 131) permitiu atribuir os sinais em δ 7,42 (1H, *dd*, $J = 1,6$ Hz e 0,8 Hz), δ 7,41 (1H, *t*, 1,6 Hz) e δ 6,34 (1H, *dd*, $J = 1,6$ Hz e 0,8 Hz) aos hidrogênios do anel furano H-21, H-23 e H-22, respectivamente.

O espectro de HSQC (FIGURA 1.53, p. 133) mostrou a correlação dos hidrogênios H-21, H-23 e H-22 com os carbonos em δ 141,1, δ 143,3 e δ 109,7, respectivamente. Pelo espectro de HMBC (FIGURA 1.54, p. 134), H-21 e H-23 correlacionaram-se com o sinal em δ 120,0 relativo a C-20.

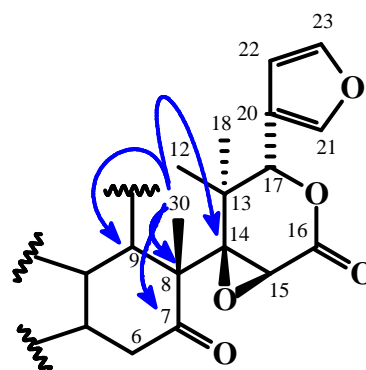
O sinal de hidrogênio em δ 5,47 (1H, *s*) foi atribuído ao H-17 do anel δ -epoxilactona, pois através do espectro de HMBC observou-se a correlação deste sinal com C-20, C-21 e C-22. Este sinal mostrou ainda correlação com os sinais em δ 20,8 referente a Me-18, δ 37,9 (C-13) e δ 65,7 (C-14).

O espectro de HSQC mostrou a correlação do sinal em δ 4,04 (1H, *s*) com um sinal em δ 53,8. Pelo HMBC este sinal de hidrogênio mostrou correlação com os sinais em δ 65,7 (C-14) e δ 166,6 (C-16), permitindo,

portanto a atribuição do sinal em questão ao H-15 e indicando a presença de um epóxido entre C-14 e C-15, como apresentado a seguir:

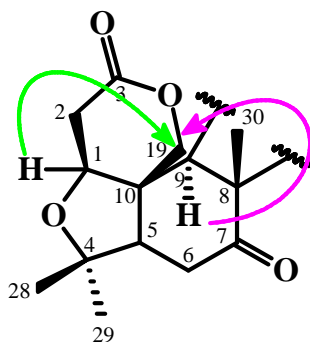


Pelo HMBC foi possível observar que o sinal em δ 1,07 (3H, *s*, δ_c 17,6) correlacionou-se com o sinal de C-14, sugerindo atribuir este sinal a Me-30. O sinal desta metila correlacionou-se ainda com os sinais de carbonos em δ 206,2 (C-7), δ 48,2 (C-9), δ 51,4 (C-8).



A presença de sinais em δ 4,77 (1H, *dd*, $J=$ 13,2 Hz e 0,8 Hz) e δ 4,46 (1H, *d*, $J=$ 13,2 Hz) atribuídos aos hidrogênios geminais de C-19 (δ_c 65,3) sugeriram tratar-se de um limonoide com anel A *seco*. Pelo HMBC, o sinal de hidrogênio em δ 4,77 (H-19a) correlacionou-se com um sinal em δ 169,0 indicando a presença de uma lactona em C-19.

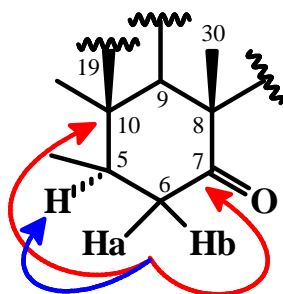
O HMBC mostrou correlações a J^3 dos sinais de H-1 em δ 4,04 (1H, *sl*) e H-9 em δ 2,55 (1H, *dd*, $J=$ 12,4 Hz e 2,8 Hz) com C-19 (δ 65,3) como apresentado a seguir:



Os espectros de RMN de ^{13}C (FIGURA 1.52, p. 132) e HSQC revelaram a presença de cinco sinais de carbonos metilênicos em δ 19,0 (C-11), δ 30,9 (C-12), δ 35,7 (C-2), δ 36,4 (C-6) e δ 65,3 anteriormente atribuído ao C-19. Pelo espectro de COSY (FIGURA 1.55, p. 135) foi possível observar acoplamento dos sinais de H-11a em δ 1,90 (1H, *m*) com o sinal de H-9 em δ 2,55 e de H-11b em 1,78 (1H, *m*) com o sinal de H-12b em δ 1,51 (1H, *m*).

Os sinais em δ 2,68 (1H, *dd*, $J= 16,6$ Hz e 2,0 Hz) e δ 2,99 (1H, *dd*, $J= 16,6$ Hz e 3,4 Hz) referentes à H-2a e H-2b, respectivamente, correlacionaram-se via HSQC com um sinal em δ 35,7. Pelo HMBC estes sinais de hidrogênios correlacionaram-se com o sinal em δ 169,0 (C-3) e o sinal de H-2a correlacionou-se com os sinais em δ 46,0 (C-10) e δ 79,1 (C-1).

Pelo espectro de RMN de ^1H foi possível atribuir os sinais de hidrogênios diastereotópicos em δ 2,86 (1H, *dd*, $J= 15,8$ Hz e 14,6 Hz) e 2,47 (1H, *dd*, $J= 14,6$ Hz e 3,2 Hz) a H-6a e H-6b respectivamente. Pelo HMBC estes sinais mostraram correlações com os sinais em δ 46,0 (C-10) e δ 206,2 (C-7). O espectro de COSY apresentou acoplamento entre os sinais em δ 2,86 e δ 2,47 com δ 2,23, sendo este último referente à H-5 (1H, *dd*, $J= 15,8$ Hz e 3,2 Hz).



Os singletos em δ 1,19 e δ 1,30 foram corretamente atribuídos com o auxílio dos espectros de HSQC e HMBC. Pelo HMBC, o sinal em δ 1,19 (3H) (δ_C 21,4) mostrou correlação com os sinais em δ 30,2 (C-28), δ 60,7 (C-5) e δ 80,3 (C-4) e foi atribuído a Me-29. O sinal em δ 1,30 (3H) (δ_C 30,2) mostrou correlação com os sinais de C-4, C-5 e C-29 (δ 21,4), sendo atribuído a Me-28.

Portanto, a análise conjunta dos espectros de RMN permitiu identificar a estrutura da substância **09** como sendo a do limonoide limonina.

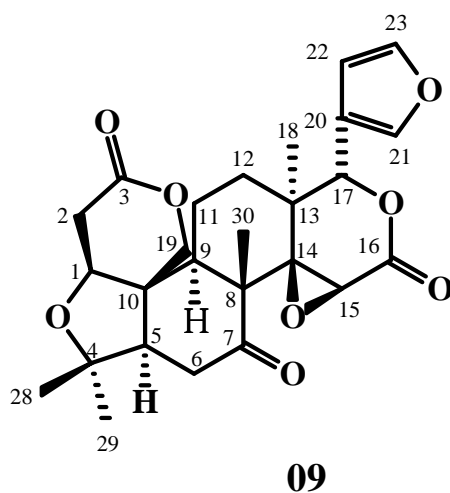


TABELA 1.20: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância **09** e comparação com dados da literatura

H/C	Substância 09 (400/100 MHz, CDCl_3)		RIBEIRO <i>et al.</i> , 2005 (200/50 MHz, CDCl_3)	
	δ (ppm), <i>J</i> (Hz)	δ (ppm)	δ (ppm), <i>J</i> (Hz)	δ (ppm)
1	4,04 (1H, <i>sl</i>)	79,1	4,03 (1H, <i>s</i>)	79,1
2a	2,68 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =16,6; 2,0)	35,7	2,66 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =16,8; 1,8)	35,6
2b	2,99 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =16,6; 3,4)		2,98 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =16,8; 3,8)	
3	-	169,0	-	169,1
4	-	80,3	-	80,2
5	2,23 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =15,8; 3,2)	60,7	2,23 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =15,8; 3,2)	60,4
6a	2,86 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =15,8; 14,6)	36,4	2,85 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =15,8)	36,3
6b	2,47 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =14,6; 3,2)		2,46 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =15,8 e 3,2)	
7	-	206,2	-	206,1
8	-	51,4	-	51,3
9	2,55 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =12,4; 2,8)	48,2	2,56 (1H, <i>m</i>)	48,1
10	-	46,0	-	45,9
11a	1,90 (1H, <i>m</i>)	19,0	1,81 (1H, <i>m</i>)	18,8
11b	1,78 (1H, <i>m</i>)		-	
12a	1,84 (1H, <i>m</i>)	30,9	-	30,1
12b	1,51 (1H, <i>m</i>)		1,50 (1H, <i>m</i>)	
13	-	37,9	-	37,9
14	-	65,7	-	65,6
15	4,04 (1H, <i>s</i>)	53,8	4,03 (1H, <i>s</i>)	53,8
16	-	166,6	-	167,0
17	5,47 (1H, <i>s</i>)	77,8	5,47 (1H, <i>s</i>)	77,7
Me-18	1,18 (3H, <i>s</i>)	20,8	1,17 (1H, <i>s</i>)	21,3
19a	4,77 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =13,2; 0,8)	65,3	4,46 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =13,0)	65,3
19b	4,46 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =13,2)		4,47 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =13,0)	
20	-	120,0	-	119,9
21	7,42 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 1,6; 0,8)	141,1	7,40 (1H, <i>m</i>)	141,1
22	6,34 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 0,8)	109,7	6,35 (1H, <i>m</i>)	109,8
23	7,41 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> =1,6)	143,3	7,40 (1H, <i>m</i>)	143,2
Me-28	1,30 (3H, <i>s</i>)	30,2	1,30 (3H, <i>s</i>)	30,8
Me-29	1,19 (3H, <i>s</i>)	21,4	1,17 (3H, <i>s</i>)	20,7
Me-30	1,07 (3H, <i>s</i>)	17,6	1,07 (3H, <i>s</i>)	17,6

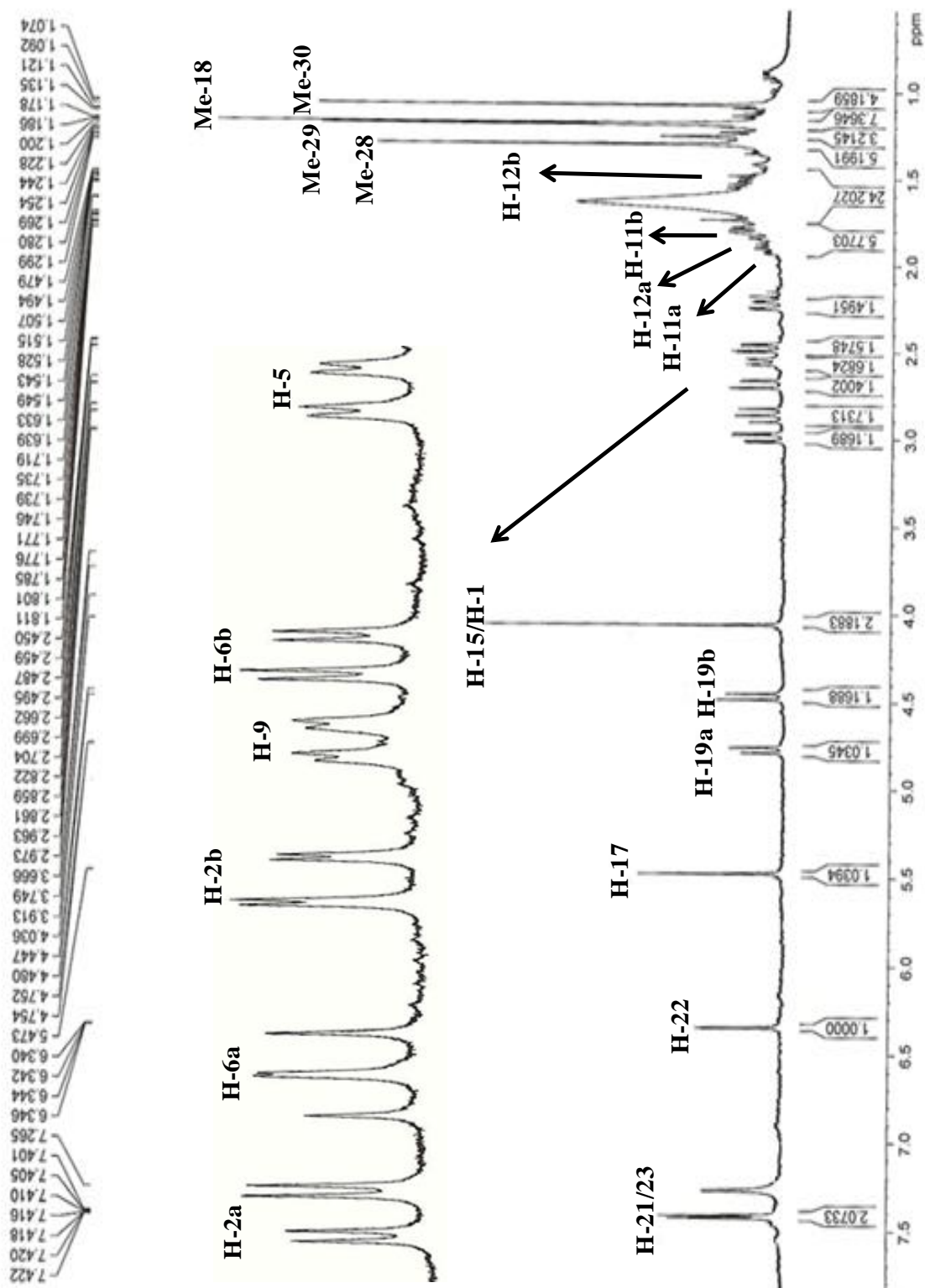


FIGURA 1.51: Espectro de RMN de ^1H de **09** (CDCl_3 , 400 MHz)

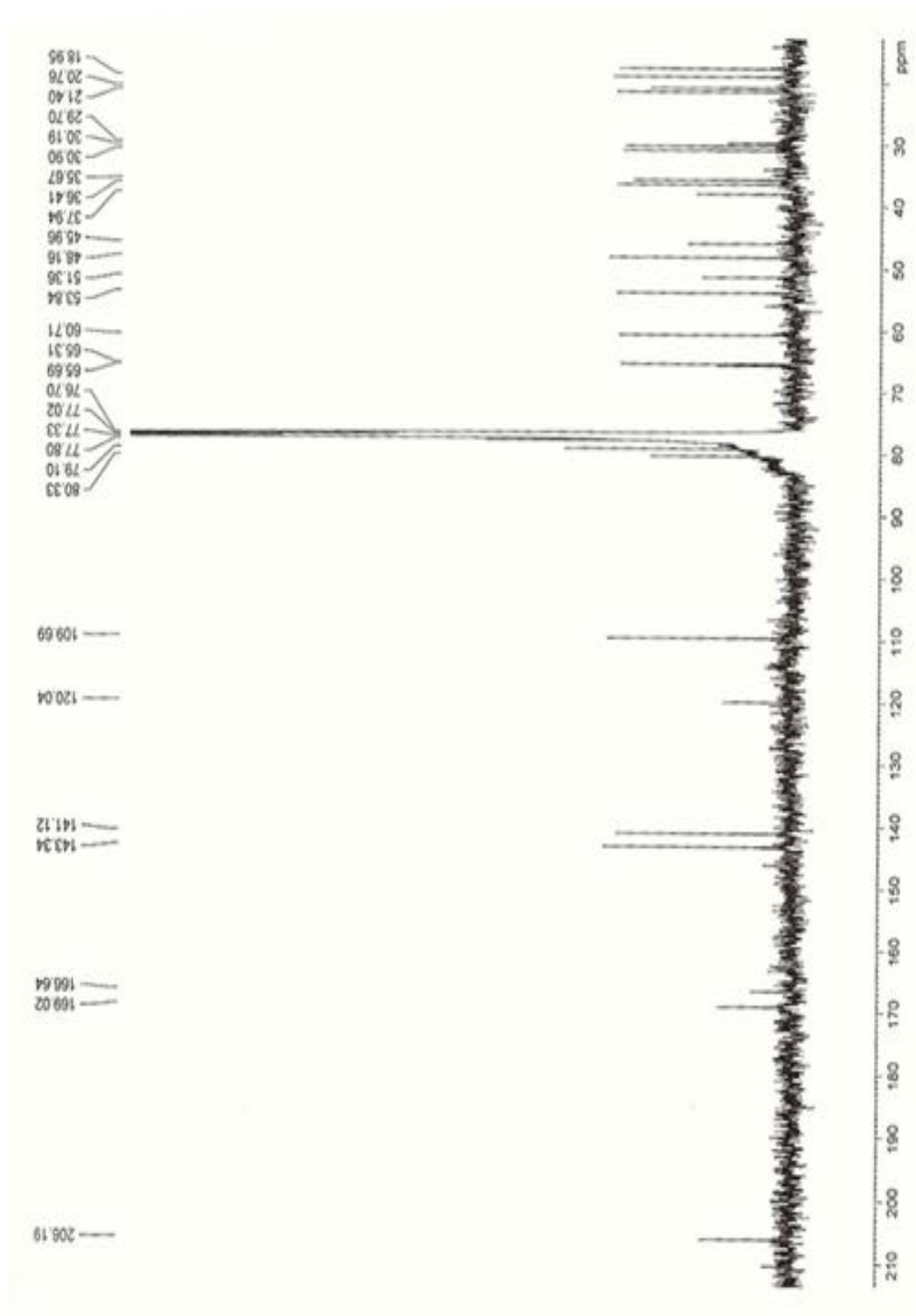


FIGURA 1.52: Espectro de RMN de ^{13}C de **09** (CDCl_3 , 100 MHz)

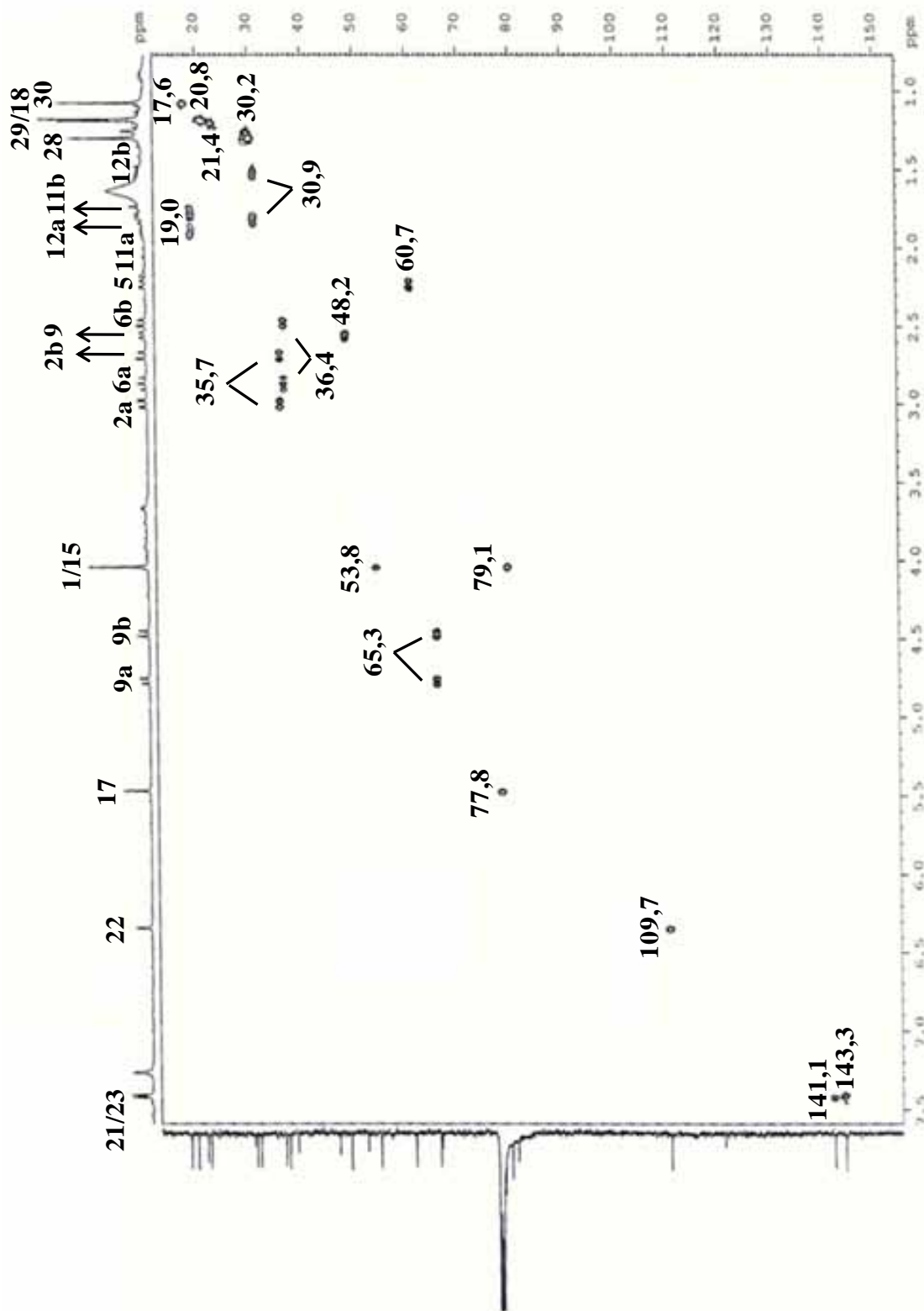


FIGURA 1.53: Mapa de contorno de g-HSQC de **09** (CDCl₃, 400 MHz)

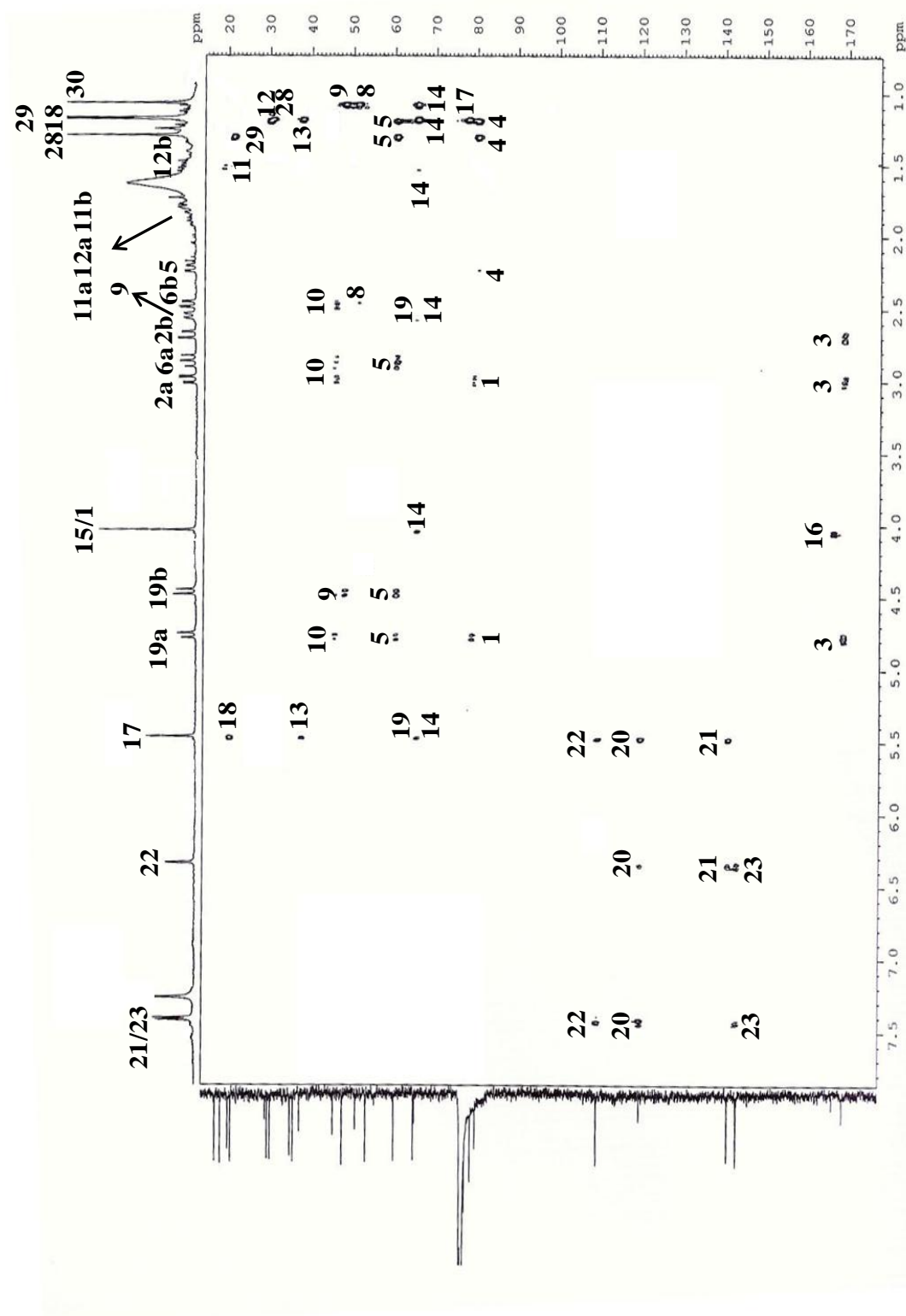


FIGURA 1.54: Mapa de contorno de g-HMBC de **09** (CDCl_3 , 400 MHz)

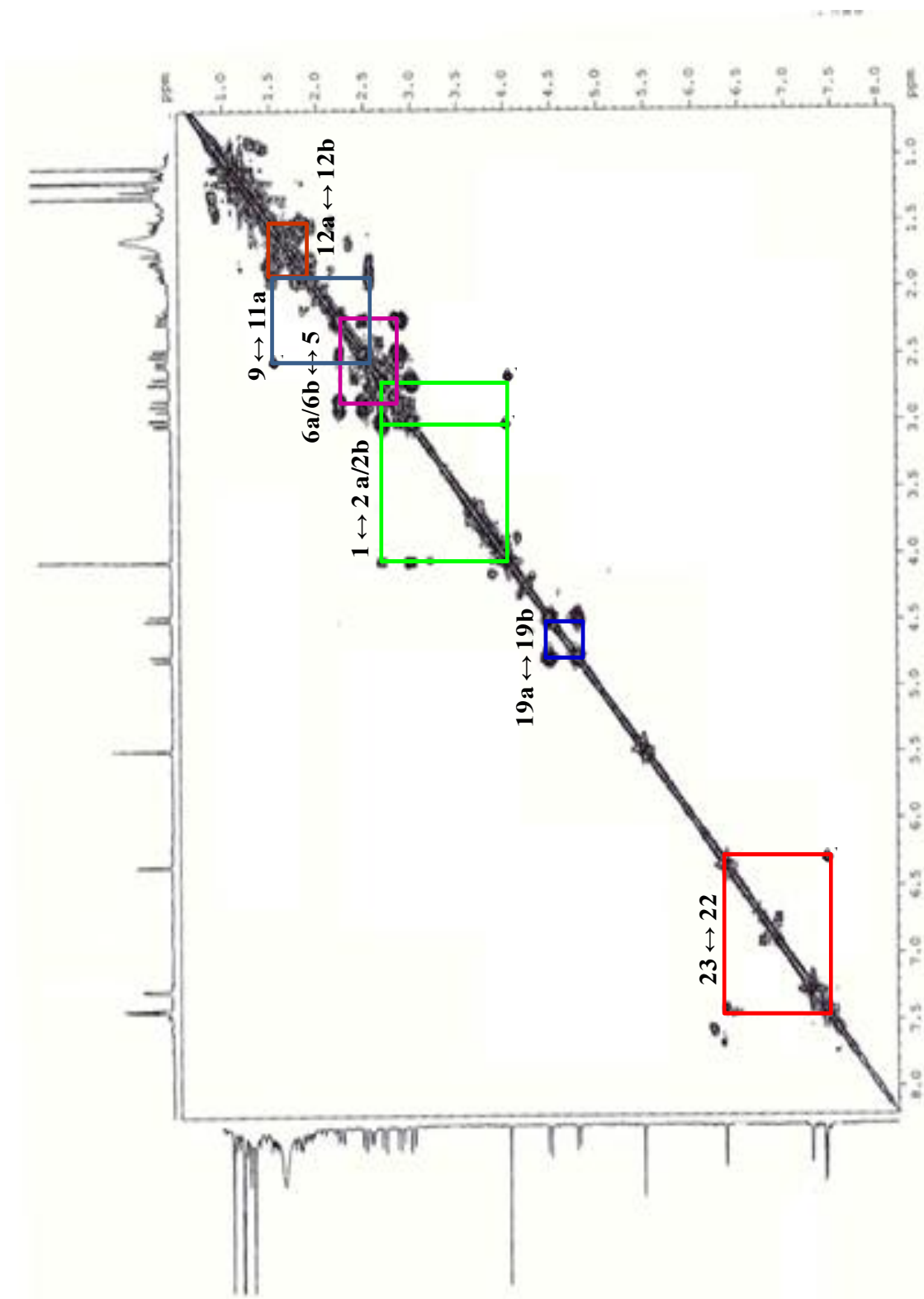
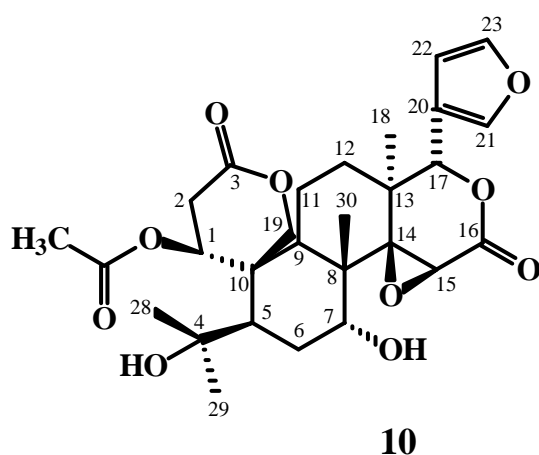


FIGURA 1.55: Espectro de g-COSY de **09** (CDCl₃, 400 MHz)

1.4.2.10 (S)-1-acetóxi-7-desoxo-7 α -hidróxi-ichangina – substância 10

A substância **10** foi isolada do extrato metanólico do tronco subterrâneo de *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani e teve sua estrutura determinada através de experimento de RMN de ^1H , ^{13}C , DEPT-135, HSQC, HMBC, COSY, g-NOESY-1D, EM de alta resolução (HRESI-MS) e comparações com dados da literatura de duas substâncias similares denominadas ichangina (KHALIL *et al.*, 2003) e 11 β ,19 α -diidróxi-7-desoxo-7 α -acetóxi-ichangina (ROSAS, 2005). Não há descrição desta estrutura na literatura.



Foram analisados os sinais apresentados nos espectros de RMN de ^1H (FIGURA 1.56, p. 146), ^{13}C (FIGURA 1.57, p. 147) e EM (FIGURA 1.65, p. 154) e neste último foram observados os íons m/z 533,2250 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), m/z 555,2088 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) e m/z 571,1839 ($[\text{M}+\text{K}]^+$) que estão coerentes com a massa molecular real (532,2308) da estrutura proposta e sua fórmula molecular $\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{O}_{10}$. Pelo espectro de RMN de ^1H foi possível atribuir os sinais em δ 7,42 (1H, *sl*), δ 7,41 (1H, *sl*) e δ 6,33 (1H, *t*, $J = 1,4$ Hz) aos hidrogênios do anel furano H-21, H-23 e H-22, respectivamente.

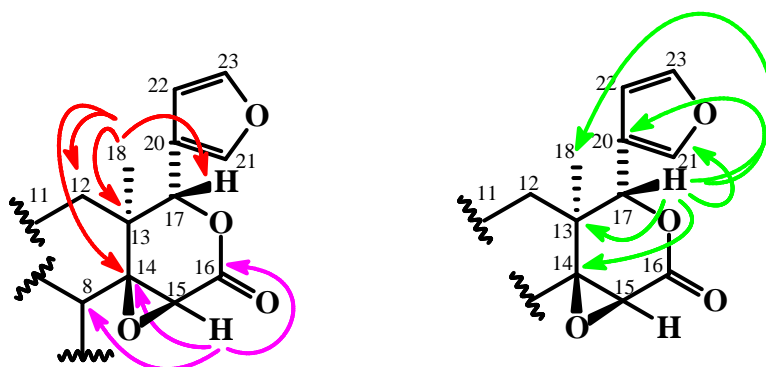
A análise conjunta dos espectros de RMN de ^{13}C , DEPT-135 (FIGURA 1.58, p. 148) e HSQC (FIGURA 1.59, p. 149) permitiu atribuir todos os carbonos do esqueleto. Os valores dos sinais de hidrogênios e carbonos estão descritos na TABELA 1.21 (p. 145).

O experimento de HMBC (FIGURA 1.60, p. 150) revelou as correlações de H-21 (δ_c 141,3) com C-23 em δ 143,3, C-22 em δ 109,8 e C-20 em δ 120,2; de H-23 (δ_c 143,3) com C-22 em δ 109,8, C-21 em δ 141,3 e C-20 em δ 120,2 e de H-22 (δ_c 109,8) com C-20 em δ 120,2, C-21 em δ 141,3 e C-23 em δ 143,3.

O sinal em δ 5,59 (1H, *s*) atribuído ao H-17, correlacionou-se no HSQC com um sinal em δ 78,1. No experimento de HMBC este sinal apresentou correlações com os sinais de C-12 (δ 25,8), C-13 (δ 38,8), C-14 (δ 68,9), C-20 (δ 120,2), C-21 (δ 141,3), C-22 (δ 109,8) e Me-18 (δ 17,5).

O sinal da Me-18 (δ_H 1,29; δ_c 17,5) correlacionou-se no HMBC com os sinais de C-12 (δ 25,8), C-13 (δ 38,8), C-14 (δ 68,9) e C-17 (δ 78,1).

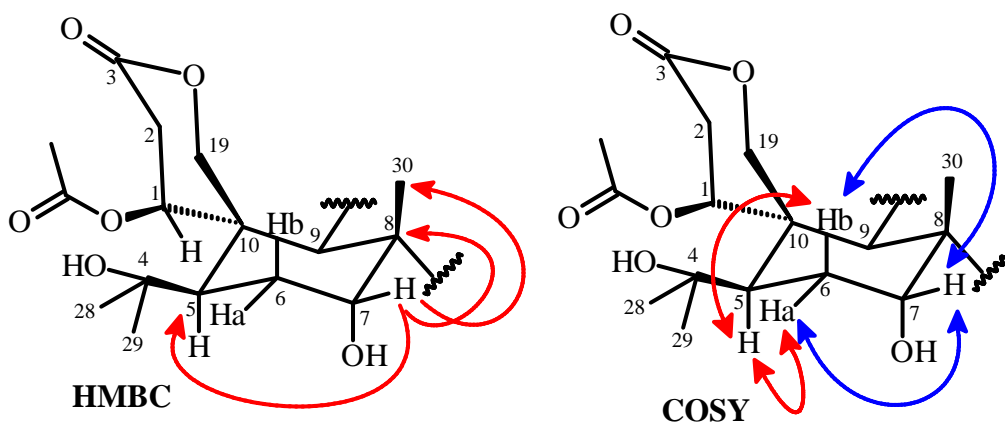
No espectro de carbono foi possível observar um sinal em δ 56,6 que correlacionou-se via HSQC com um sinal de hidrogênio em δ 3,51 (1H, *s*); estes valores levaram a supor a presença de um epóxido. Pelo HMBC, o sinal em δ 3,51 correlacionou-se com os sinais em δ 43,0 (C-8), δ 68,9 (C-14) e δ 167,0. O valor deste último deslocamento de carbono e o valor de H-17 (δ 5,59) sugeriram a presença de uma lactona no anel D. O valor do deslocamento em δ 167,0 foi atribuído ao C-16 e o sinal em δ 56,6 ao C-15. As principais correlações são apresentadas a seguir:



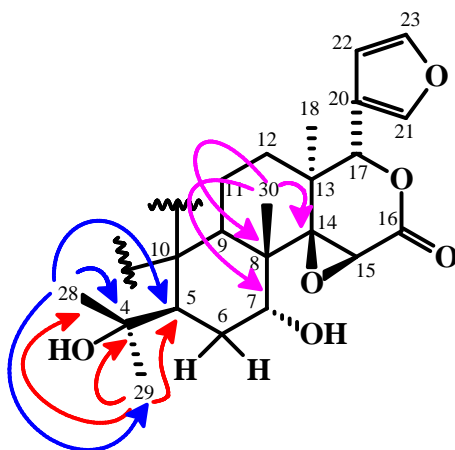
O sinal de hidrogênio da Me-30 (δ_H 0,95, δ_c 18,4) mostrou correlações via HMBC com os sinais de C-8 (δ 43,0), C-14 (δ 68,9) e C-7

(δ 73,2), sendo que estas duas últimas correlações garantiram que o sinal em δ 0,95 correspondia ao da Me-30.

Com base no conhecimento da biossíntese dos limonoides, sabe-se que eles são oxigenados em C-7 e, portanto atribuiu-se o valor de deslocamento em δ 73,2 ao C-7. O deslocamento químico de hidrogênio para este carbono em δ 4,56 (1H, *t*, $J= 2,6$ Hz) sugeriu a função álcool. Este deslocamento apresentou correlação no HMBC com os sinais de C-5 em δ 53,6, C-8 em δ 43,0 e Me-30 em δ 18,4. Pelo espectro de COSY (FIGURAS 1.61 a 1.63, ps. 151 a 152) foi verificado o acoplamento do sinal de hidrogênio de H-7 com os sinais em δ 1,88 (1H, *dt*, $J= 2,6$ Hz) e δ 1,78 (1H, *m*), os quais pelo HSQC e DEPT-135 mostraram serem os hidrogênios de um grupo $-\text{CH}_2-$ (δ_c 23,5) e foram atribuídos aos H-6b e H-6a, respectivamente. Pelo espectro de COSY foi observado o acoplamento de H-6a e H-6b com um sinal em δ 2,25 (1H, *dd*, $J= 13,7$ Hz e 2,6 Hz), o qual via HSQC correspondeu ao deslocamento em δ 53,6 (CH no DEPT-135), sendo, portanto atribuído ao C-5.

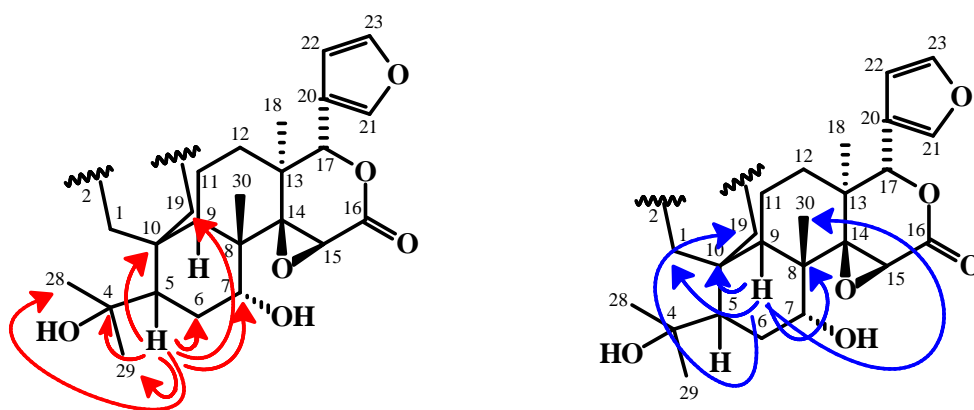


Pelo espectro de HMBC foi possível observar o sinal de C-5 correlacionando-se com hidrogênios de duas metilas. A Me-29 (δ_H 1,24, δ_c 30,3) correlacionou-se via HMBC com os sinais de C-4 em δ 80,7, C-5 em δ 53,6 e Me-28 (δ 21,1); o sinal da Me-28 (δ_H 1,12, δ_c 21,1) mostrou correlação com os sinais da Me-29, C-4 e C-5, conforme apresentado a seguir:



O sinal de C-4 em δ 80,7 sugeriu a existência de um oxigênio e indicou o anel A *seco*. O sinal em δ 45,6 que correlacionou-se via HMBC com o sinal de H-5 em δ 2,25 foi atribuído ao C-10.

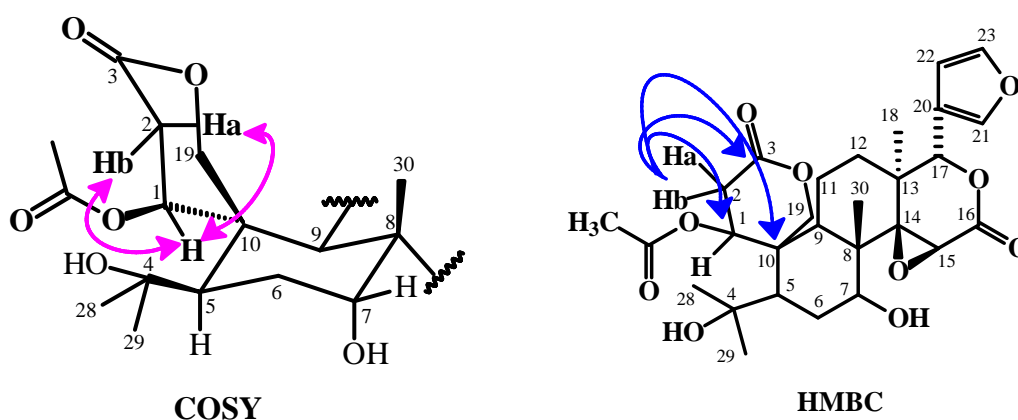
O sinal em δ 2,72 (1H, *dd*, $J= 12,6$ Hz e 6,6 Hz) correlacionou-se com os sinais de C-1 (δ 80,0), C-5 (δ 53,6), C-8 (δ 43,0), C-10 (δ 45,6), C-14 (δ 68,9), C-19 (δ 65,6) e Me-30 (δ 18,4), sugerindo ser este o H-9. As principais correlações são mostradas a seguir:



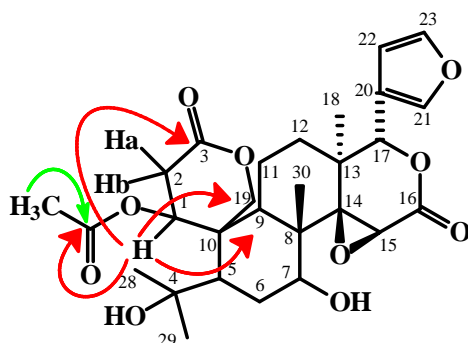
Pela análise do espectro de COSY foi possível observar que H-9 (δ 2,72) acoplou com dois sinais, sendo um em δ 1,92 (1H, *m*) e o outro em δ 1,83 (1H, *m*), os quais foram atribuídos ao H-11a e H-11b, respectivamente. Este último acoplou com dois sinais de hidrogênios diastereotópicos de um grupo -CH₂- em δ 1,69 (1H, *m*) e δ 1,64 (1H, *m*) que no HSQC correlacionaram com

um sinal em δ 25,8, sendo que este foi anteriormente atribuído ao C-12 devido à correlação com a Me-18.

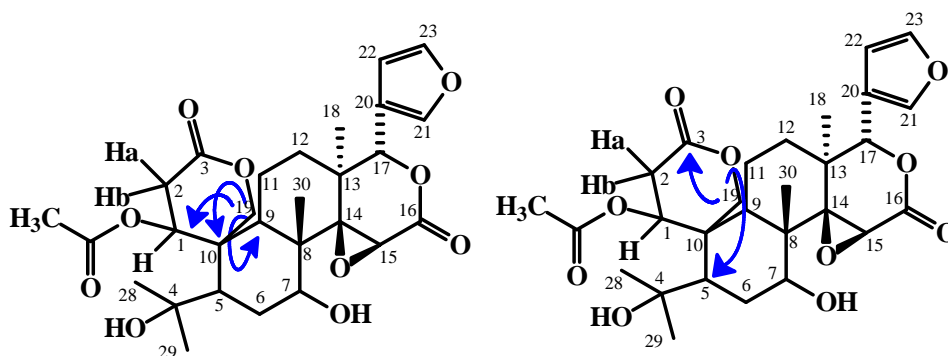
O sinal de carbono em δ 80,0 (C-1) correlacionou-se via HSQC com um sinal em δ 4,04 (1H, *dl*, $J= 4,2$ Hz) e este sinal acoplou via COSY com os hidrogênios H-2 [(H-2a, δ 2,94, *dd*, $J= 16,8$ Hz e 4,2 Hz e H-2b, δ 2,58, *dd*, $J= 16,8$ Hz e 1,4 Hz)]. Pelo HMBC, estes sinais de hidrogênios diastereotópicos mostraram correlações com os sinais em δ 45,6 (C-10), δ 80,0 (C-1) e com um sinal de carbono de lactona em δ 169,4 (C-3), conforme mostrado a seguir:



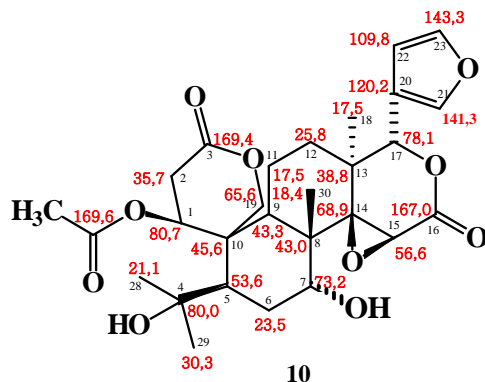
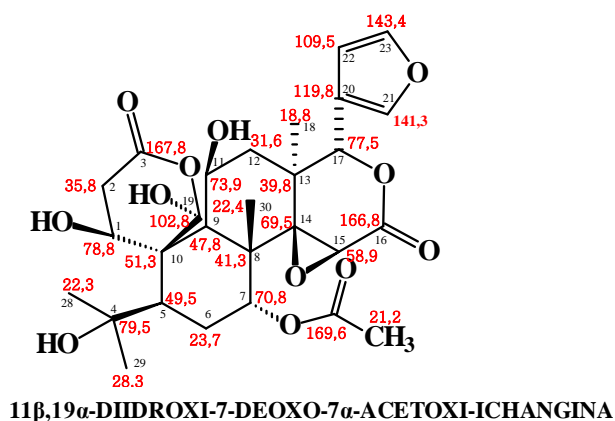
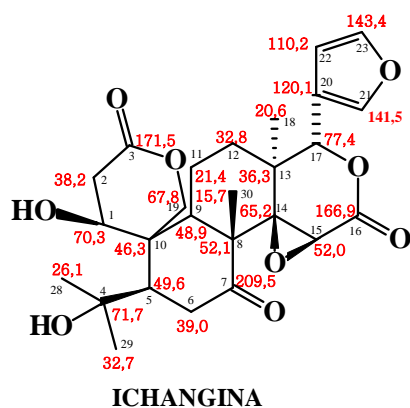
O deslocamento químico de H-1 (δ 4,04) sugeriu a presença de uma função éster em C-1. Esta suposição foi confirmada após a análise do espectro de HMBC, o qual indicou a correlação do sinal em δ 4,04 com um sinal em δ 169,6, característico de carbono de carboxila com função éster. Além disso, o espectro de hidrogênio apresentou um sinal em δ 2,15 (3H, *s*, δ_c 21,4) correlacionando-se com o mesmo sinal em δ 169,6 que H-1 correlacionou-se, confirmando, portanto a presença de um grupo acetato em C-1.



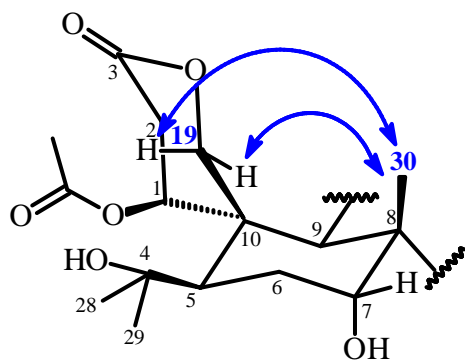
O sinal em δ 65,6 atribuído anteriormente ao C-19 correlacionou-se via HSQC com dois sinais de hidrogênios, sendo H-19a em δ 4,49 (1H, *d*, $J=13,0$ Hz) e H-19b em δ 4,42 (1H, *d*, $J=13,0$ Hz). Pelo HMBC estes hidrogênios correlacionaram-se com os sinais em δ 43,3 (C-9), δ 45,6 (C-10), δ 53,6 (C-5), δ 80,0 (C-1) e δ 169,4 (C-3). As correlações descritas anteriormente são apresentadas a seguir:



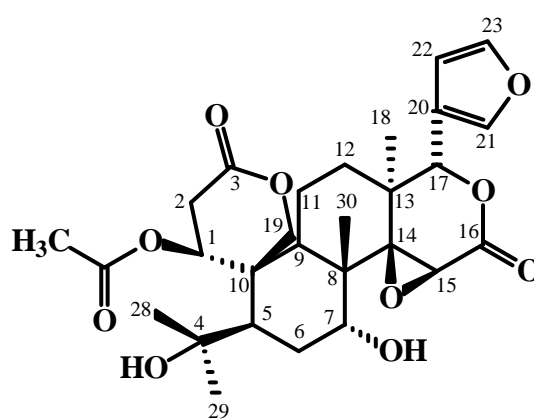
A substância **10** apresentou o mesmo esqueleto básico das substâncias ichangina, isolada de *Citrus reticulata* (KHALIL *et al.*, 2003) e 11 β ,19 α -diidroxí-7-deoxo-7 α -acetoxi-ichangina, isolada de *Raputia praetermissa* (ROSAS, 2005). As três estruturas são apresentadas a seguir com seus deslocamentos químicos de ^{13}C [ichangina em $\text{DMSO-}d_6$ (125 MHz), 11 β ,19 α -diidroxí-7-deoxo-7acetoxi-ichangina e **10** em CDCl_3 (100 MHz)].



A estereoquímica da substância **10** foi sugerida com base no experimento de g-NOESY-1D (FIGURA 1.64, p. 153). A Me-30 (δ 0,95) que pela biossíntese encontra-se na face β , mostrou NOE com os sinais de H-19 (4,49 e δ 4,42) sugerindo que ambos estão na mesma face da molécula. Portanto, o anel espiro possui C-19 na face β da molécula. Logo, entre C-10 e C-1 o anel espiro estaria em α .

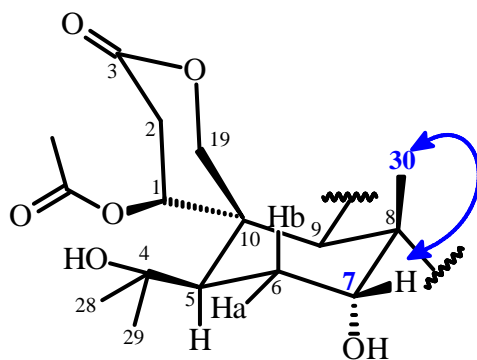


NOE observado entre hidrogênios da Me-30 e H-19



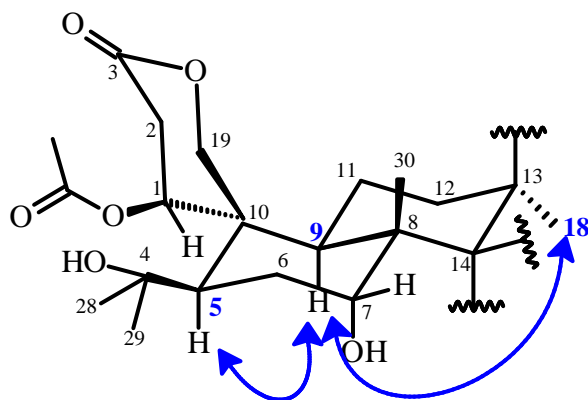
10

A Me-30 ainda mostrou NOE com o sinal em δ 4,56 de H-7, sugerindo que ambos estão na mesma face da molécula e conseqüentemente a hidroxila se encontra na face α . Outro fator que pode justificar a posição da hidroxila na face α é o acoplamento com J pequeno entre H-7 e H-6b ($J= 2,6$ Hz), sendo que o H-7 está posicionado em equatorial e o H-6b em axial.



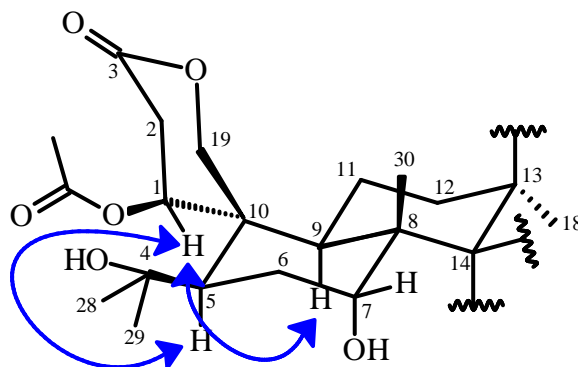
NOE observado entre hidrogênios da Me-30 e H-7

O sinal em δ 2,72 (H-9) mostrou NOE com o sinal de H-5 (δ 2,25) e com o sinal da metila Me-18, que pela biossíntese encontra-se na face α da molécula, indicando, portanto que o substituinte em C-5 encontra-se na face β da molécula, ou seja, C-4.



NOE observado entre H-9, H-5 e hidrogênios de Me-18

O sinal de H-1 (δ 4,04) mostrou NOE com os sinais de H-5 (δ 2,25) e H-9 (δ 2,72), indicando que todos estão na mesma face, e como H-5 encontra-se na face α , pôde-se propor o mesmo para H-1 e H-9. Ou seja, os dados acima permitiram concluir que a estereoquímica relativa de C-1 seria *S*. A conformação do anel espiro foi denominada de pseudo-cadeira, devido ao fato de C-3 ser um carbono com hibridização sp^2 .



NOE observado entre
H-1, H-5 e H-9

Portanto, a análise conjunta dos espectros de RMN e EM permitiu denominar a substância **10** como sendo o limonoide (*S*)-1-acetóxi-7-desoxo-7 α -hidróxi-ichangina.

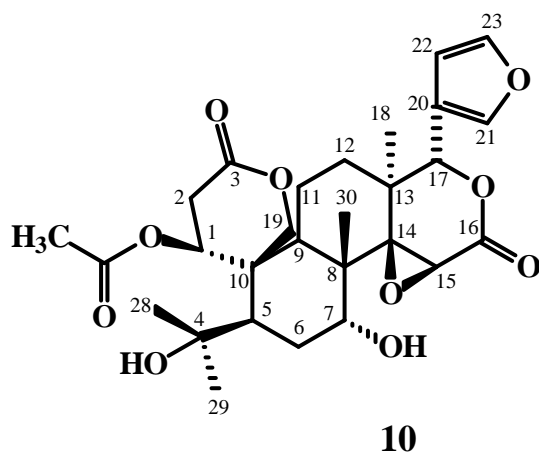


TABELA 1.21: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C e correlações observadas no HMBC para a substância **10**

H/C	Substância 10 (400/100 MHz, CDCl_3)		Correlações observadas no HMBC
	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm)	
1	4,04 (1H, <i>dl</i> , $J= 4,2$)	80,0	C-1, C-8, C-19 e OCOMe
2a	2,94 (1H, <i>dd</i> , $J= 16,8; 4,2$)	35,7	C-1, C-3 e C-10
2b	2,58 (1H, <i>dd</i> , $J= 16,8; 1,4$)		
3	-	169,4	-
4	-	80,7	-
5	δ 2,25(1H, <i>dd</i> , $J= 13,7; 2,6$)	53,6	C-4, C-6, C-7, C-9, C-10, C-19, Me-28 e Me-29
6a	1,78 (1H, <i>m</i>)	23,5	C-5, C-7 e C-10
6b	1,88 (1H, <i>dt</i> , $J= 2,6$)		
7	4,56 (1H, <i>t</i> , $J= 2,6$)	73,2	C-5, C-8 e Me-30
8	-	43,0	-
9	2,72 (1H, <i>dd</i> , $J= 12,6; 6,6$)	43,3	C-1, C-5, C-8, C-10, C-14, C-19 e Me-30
10	-	45,6	-
11a	1,92 (1H, <i>m</i>)	17,5	C-10 e C-12
11b	1,83 (1H, <i>m</i>)		
12a	1,69 (1H, <i>m</i>)	25,8	C-13, C-14 e Me-18
12b	1,64 (1H, <i>m</i>)		
13	-	38,8	-
14	-	68,9	-
15	3,51 (1H, <i>s</i>)	56,6	C-8, C-14 e C-16
16	-	167,0	-
17	5,59 (1H, <i>s</i>)	78,1	C-12, C-13, C-14, C-20, C-21, C-22 e Me-18
Me-18	1,29 (3H, <i>s</i>)	17,5	C-12, C-13, C-14 e C-17
19a	4,49 (1H, <i>d</i> , $J= 13,0$)	65,6	C-1, C-3, C-5, C-9, C-10
19b	4,42 (1H, <i>d</i> , $J= 13,0$)		
20	-	120,2	-
21	7,42 (1H, <i>sl</i>)	141,3	C-20, C-22 e C-23
22	δ 6,33 (1H, <i>t</i> , $J= 1,4$)	109,8	C-20, C-21 e C-23
23	δ 7,41 (1H, <i>sl</i>)	143,3	C-20, C-21 e C-22
Me-28	1,12 (3H, <i>s</i>)	21,1	C-4, C-5 e Me-29
Me-29	1,24 (3H, <i>s</i>)	30,3	C-4, C-5 e Me-28
Me-30	0,95 (1H, <i>s</i>)	18,4	C-7, C-8 e C-14
1-OC(O)Me	2,15 (3H, <i>s</i>)	21,4	OCOMe
1-OC(O)Me	-	169,6	-

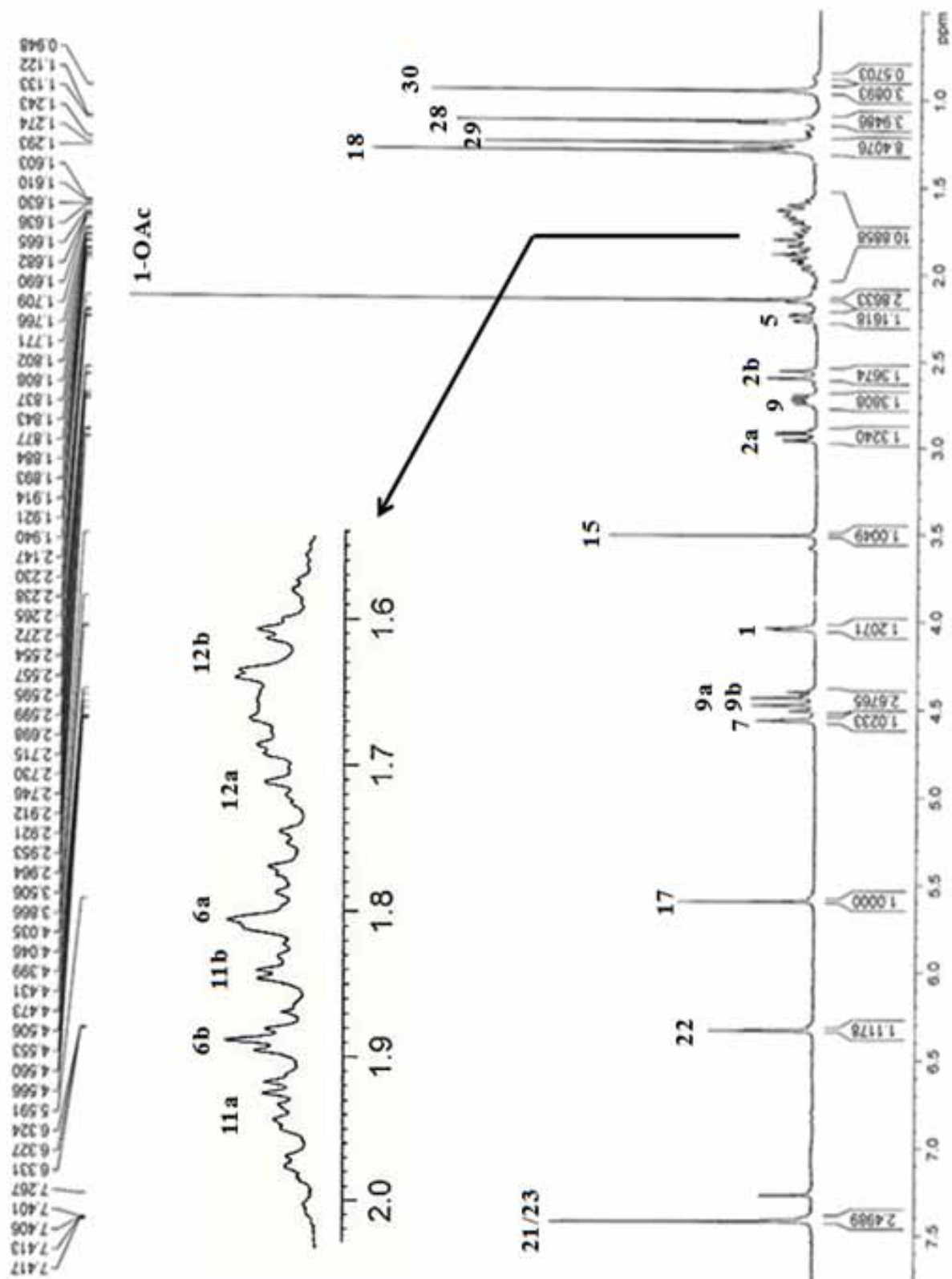


FIGURA 1.56: Espectro de RMN de ^1H de **10** (CDCl_3 , 400 MHz)

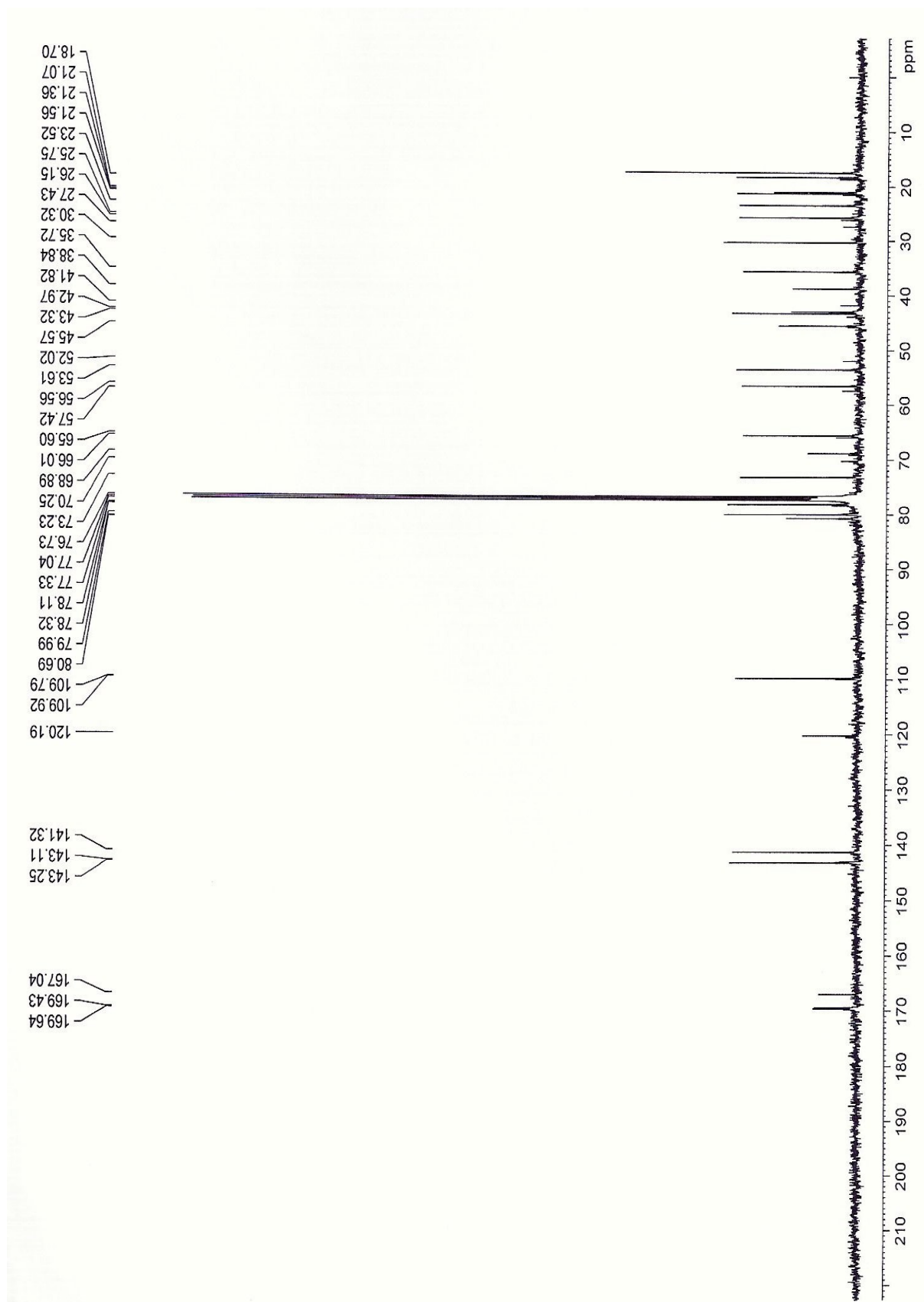


FIGURA 1.57: Espectro de RMN de ^{13}C de **10** (CDCl_3 , 100 MHz)

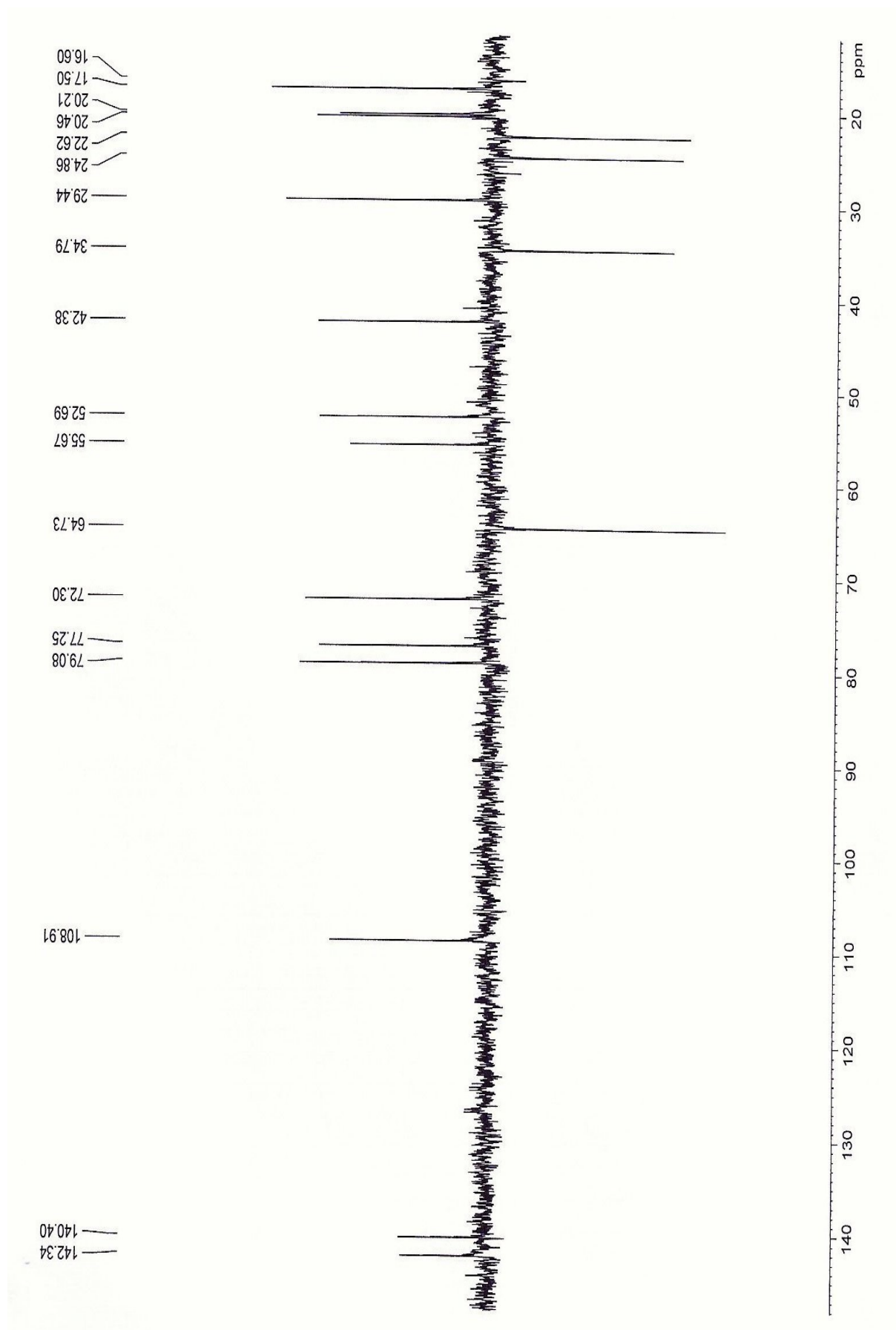


FIGURA 1.58: Espectro de RMN de DEPT-135 de **10** (CDCl₃, 100 MHz)

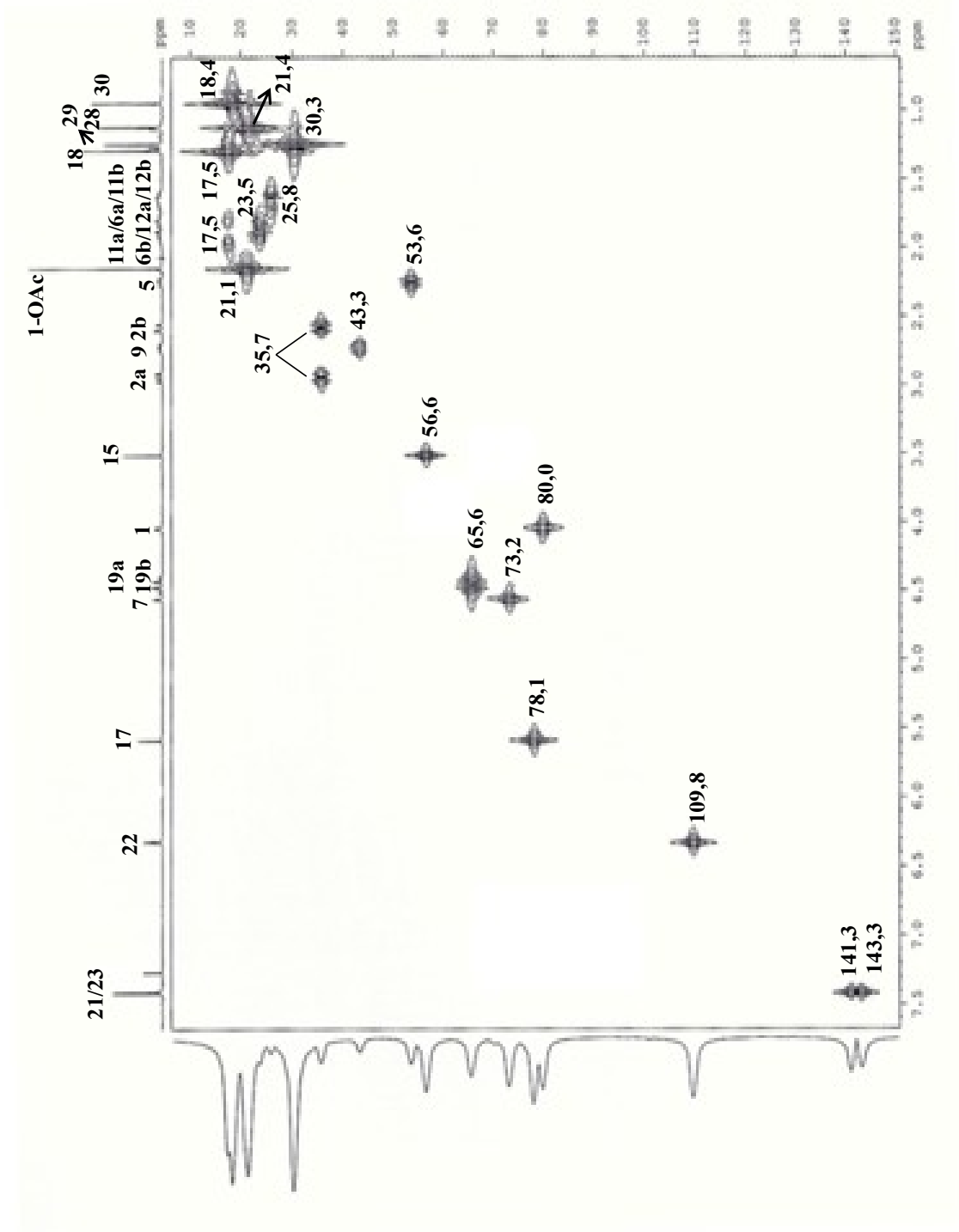


FIGURA 1.59: Mapa de contorno de g-HSQC de **10** (CDCl₃, 400 MHz)

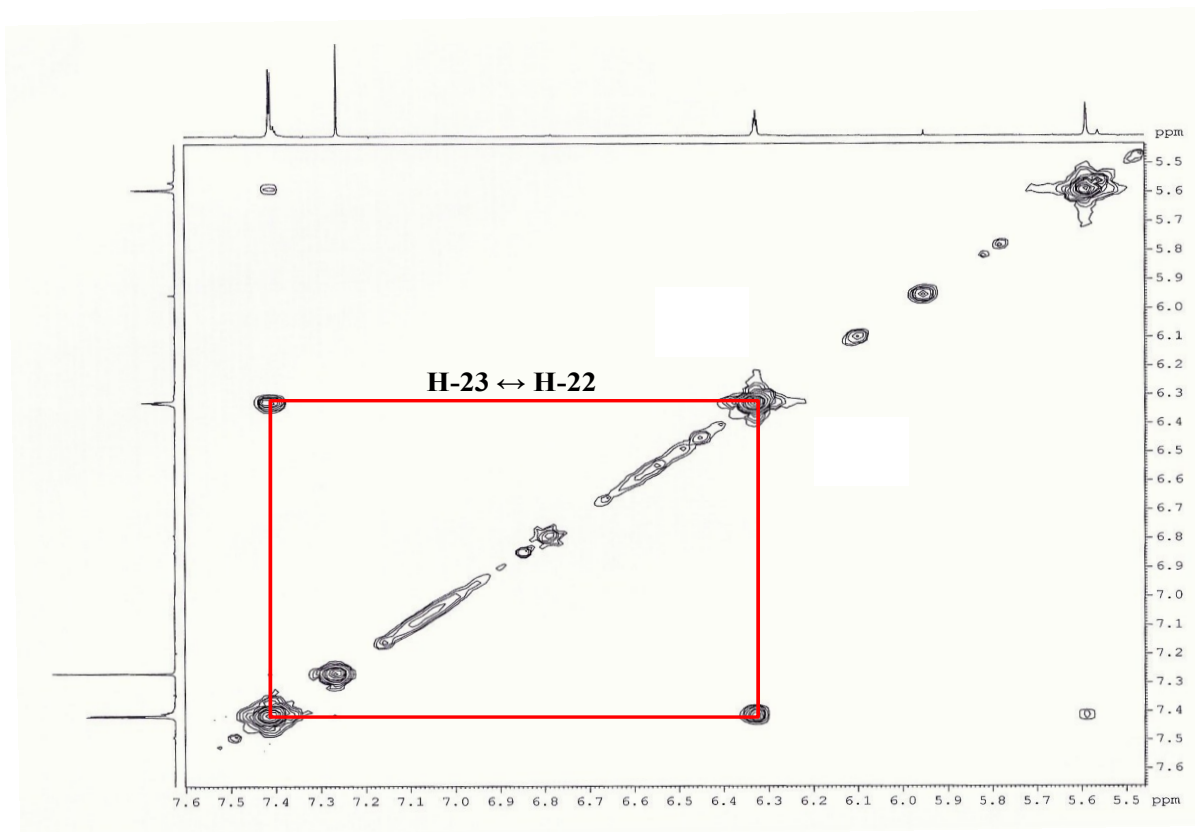


FIGURA 1.61: Ampliação 01 do espectro de g-COSY de **10** (CDCl₃, 400 MHz)

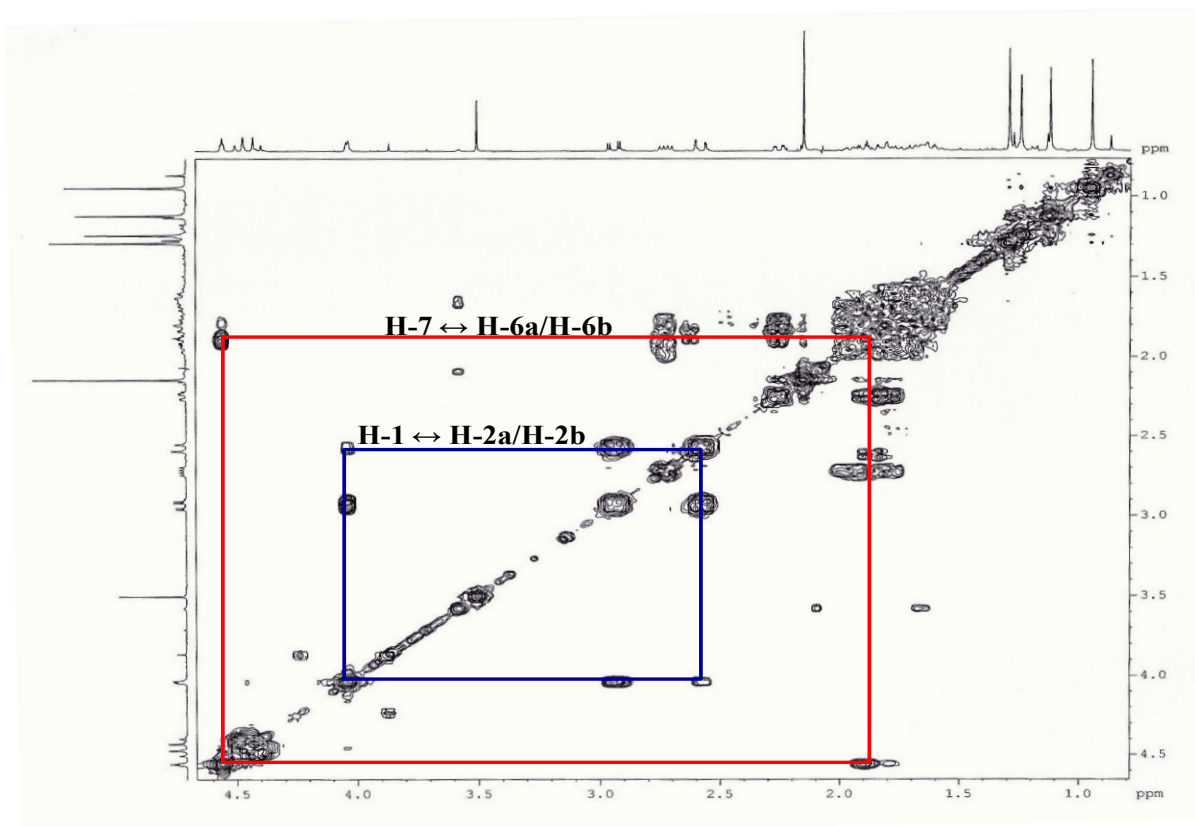


FIGURA 1.62: Ampliação 02 do espectro de g-COSY de **10** (CDCl₃, 400 MHz)

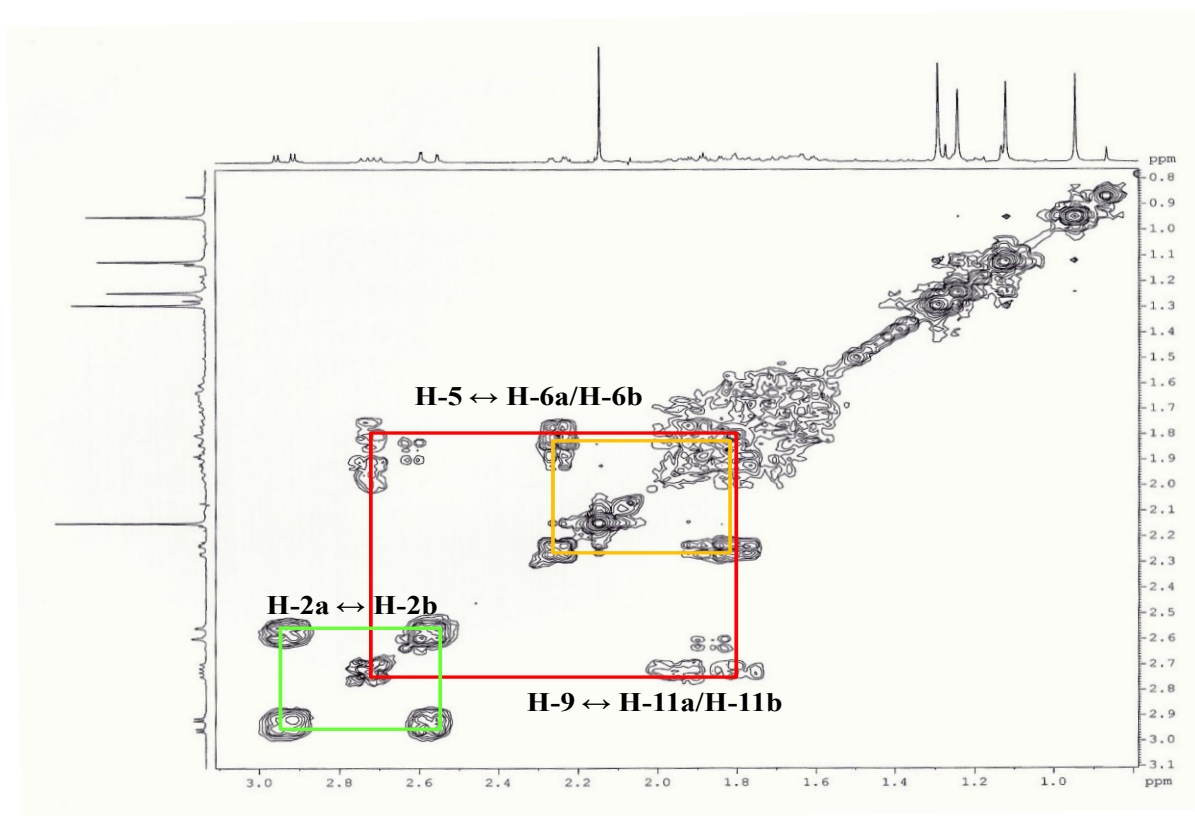


FIGURA 1.63: Ampliação 03 do espectro de g-COSY de **10** (CDCl₃, 400 MHz)

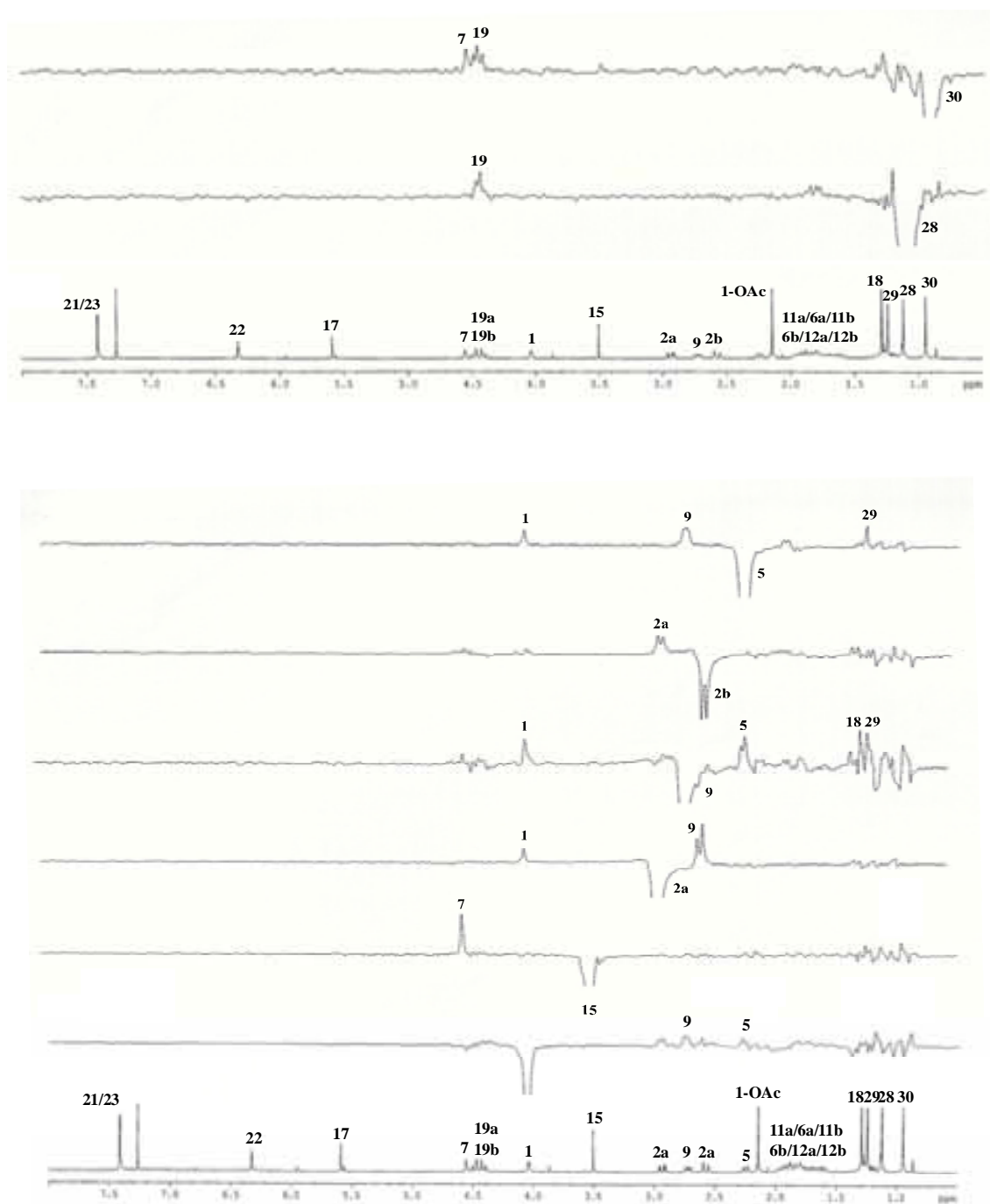


FIGURA 1.64: Espectro de g-NOESY-1D de **10** irradiando H-1, H-15, H-5, H-9, Me-28 e Me-30 (CDCl₃, 400 MHz)

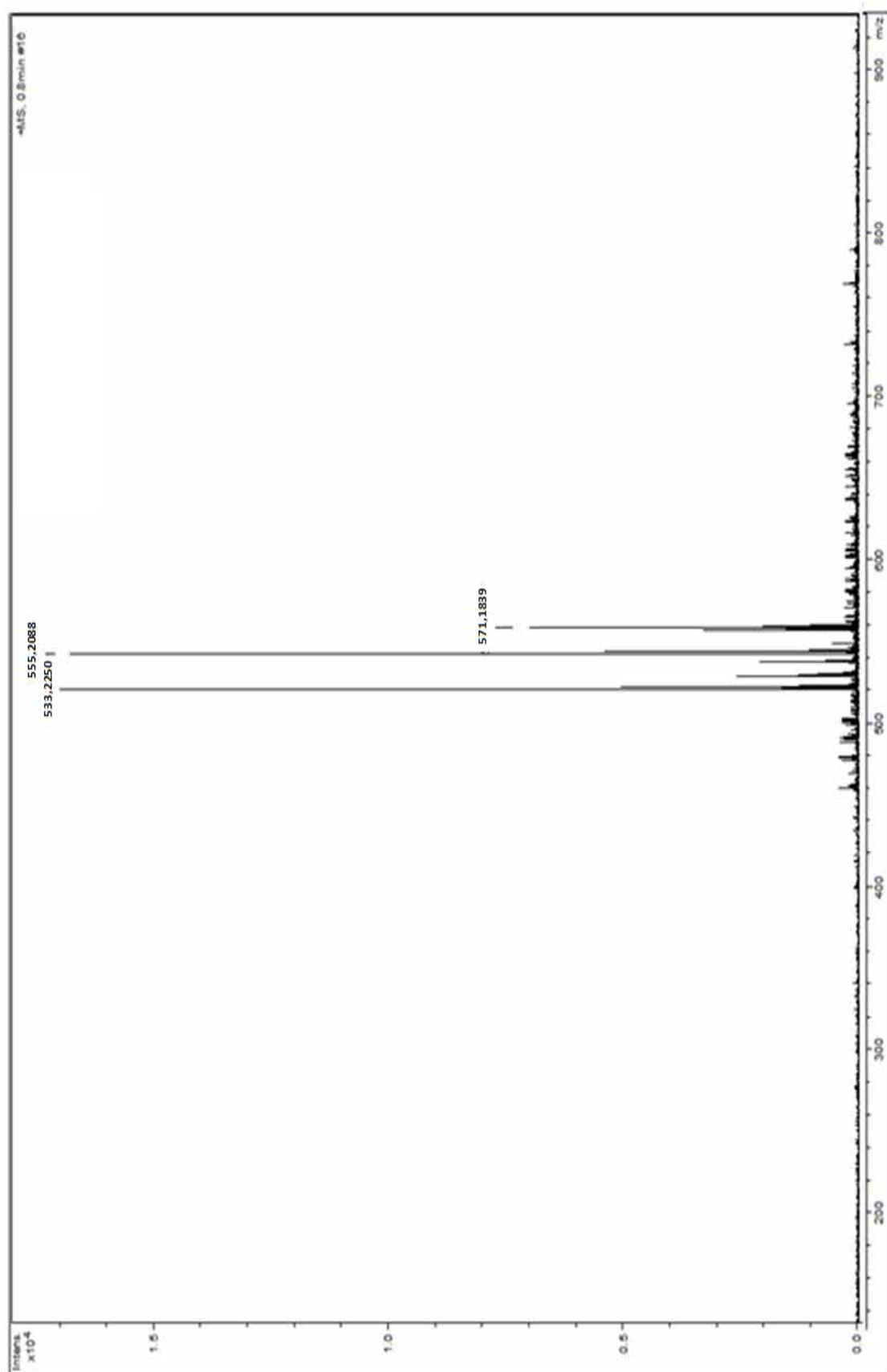
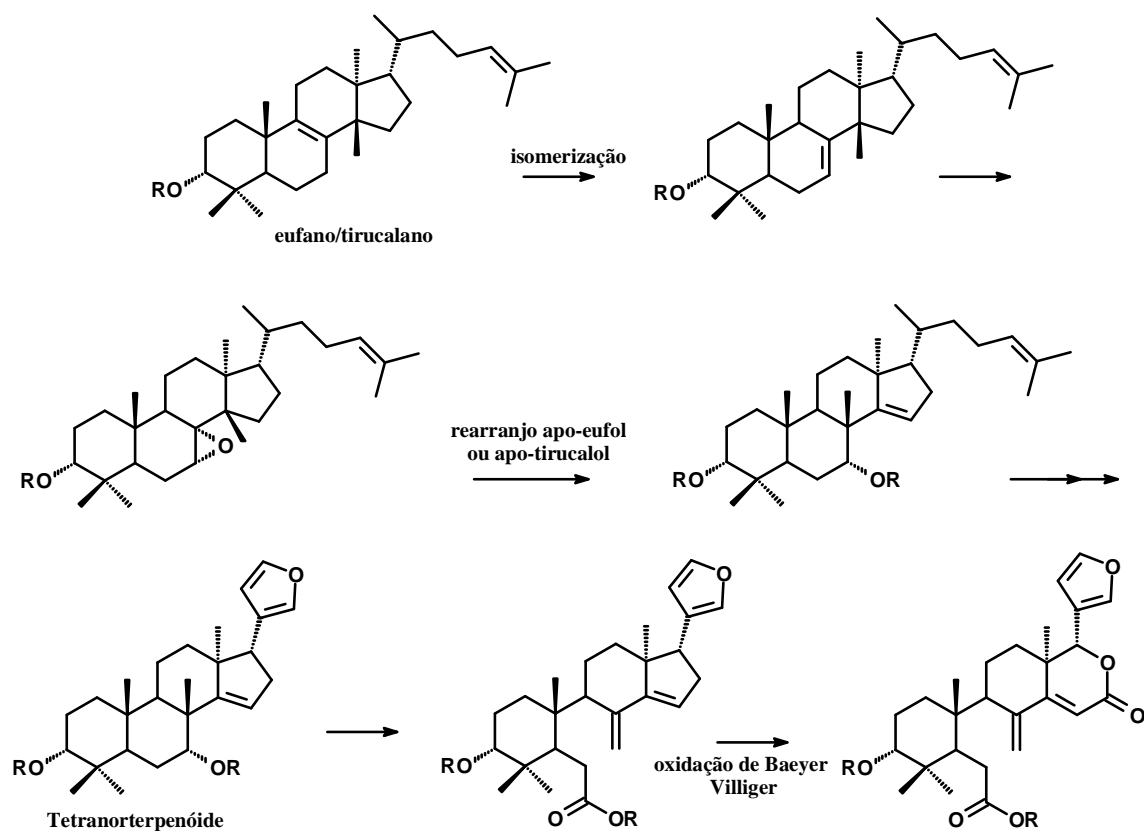


FIGURA 1.65: Espectro de massas de **10** (HRESI-MS, modo positivo)

1.4.2.11 Biogênese dos Limonoides

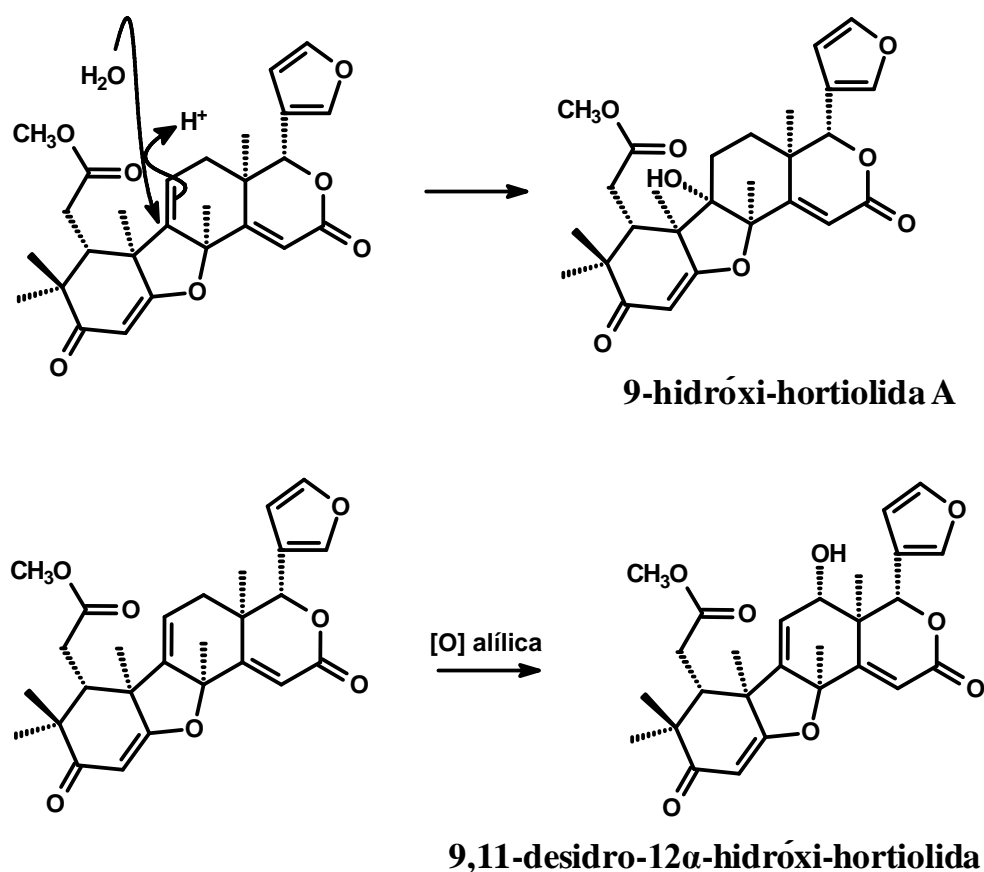
Os limonoides têm sua origem biogenética nos triterpenos do tipo tirucalanos (H-20/C-20R) ou eufanos (H-20/C-20S). De acordo com a biogênese geralmente descrita, há formação de epóxido entre C-7 e C-8 que abre levando a uma hidroxila na posição C-7 e induzindo a formação da ligação dupla em C-14 e C-15. Em seguida, há a ciclização da cadeia lateral com perda de quatro unidades de carbono levando à formação do anel 17 α furano, como mostra o ESQUEMA 1.1 (p. 155). Comumente o anel D é oxidado à lactona, processo que envolve a introdução de uma carbonila em C-16 seguida de uma oxidação Baeyer-Villiger (CHAMPAGNE *et al.*, 1992). Todos os limonoides descritos para o gênero *Hortia*, inclusive os isolados neste trabalho, apresentam o anel D lactonizado.



ESQUEMA 1.1: Biogênese dos limonoides

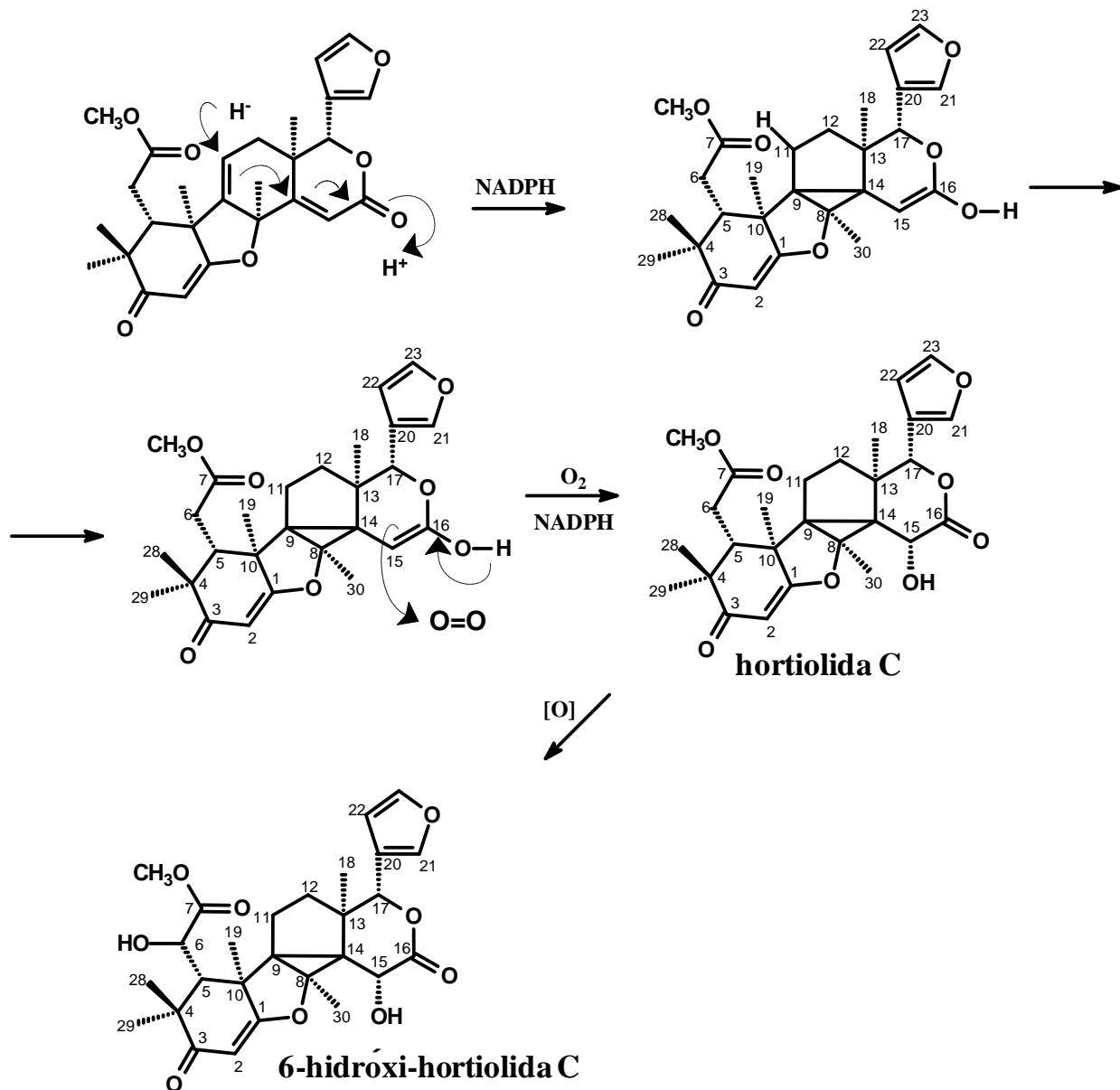
As propostas de biogênese para as estruturas de limonoides de **01** a **08**, isolados neste trabalho, possuem como precursor inicial o limonoide 9,11-desidro-hortiolida A e, em algumas propostas, vários intermediários que foram isolados por BRAGA (2005), SEVERINO (2008) e neste trabalho também. Este fato confirma o princípio da quimiosistemática que aponta que, geralmente, quando para um espécime é citado somente um composto estruturalmente complexo, neste caso do gênero *Hortia* a substância guianina (estrutura **IX**, p. 16), os intermediários biossintéticos podem estar presentes.

As propostas de biogênese para os limonoides 9-hidróxi-hortiolida A (**substância 01**) e 9,11-desidro-12 α -hidróxi-hortiolida A (**substância 02**) estão esquematizadas no ESQUEMA 1.2 (p. 156).



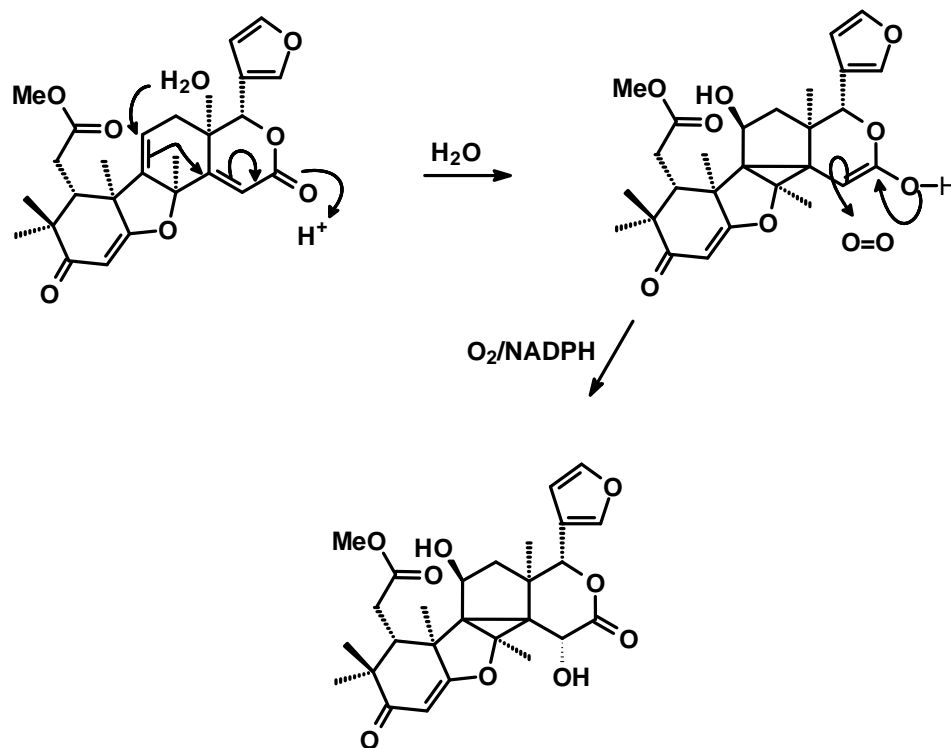
ESQUEMA 1.2: Proposta de biogênese para os limonoides 9-hidróxi-hortiolida A (**substância 01**) e 9,11-desidro-12 α -hidróxi-hortiolida A (**substância 02**)

As propostas de biogênese para os limonoides hortiolida C (**substância 03**) e 6-hidróxi-hortiolida C (**substância 04**) estão esquematizadas no ESQUEMA 1.3 (p. 157).



ESQUEMA 1.3: Propostas de biogênese para os limonoides hortiolida C (**substância 03**) e 6-hidróxi-hortiolida C (**substância 04**)

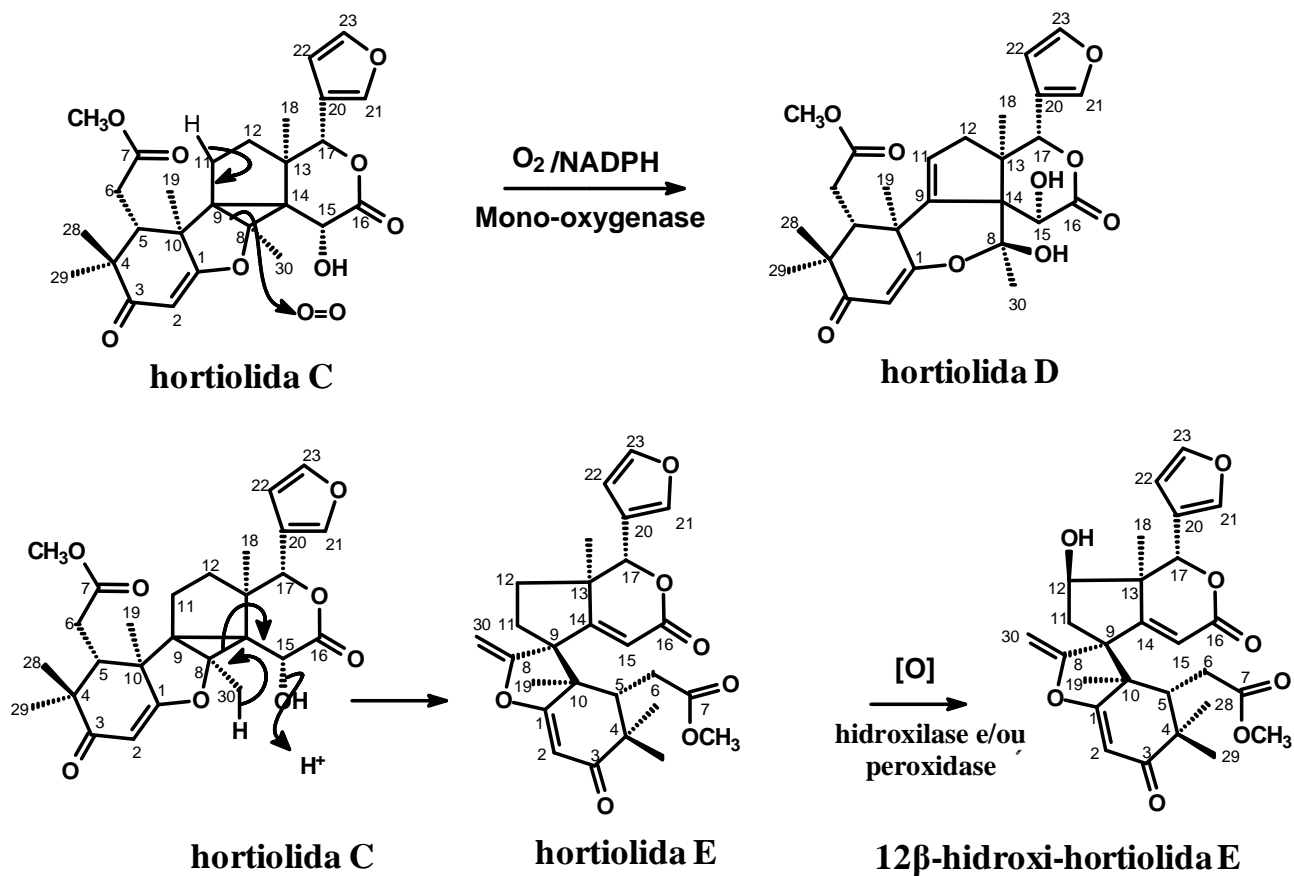
A proposta de biogênese para o limonoide 11 β -hidróxi-hortiolida C (**substância 05**) está esquematizada no ESQUEMA 1.4 (p. 158).



11 β -hidróxi-hortiolida C

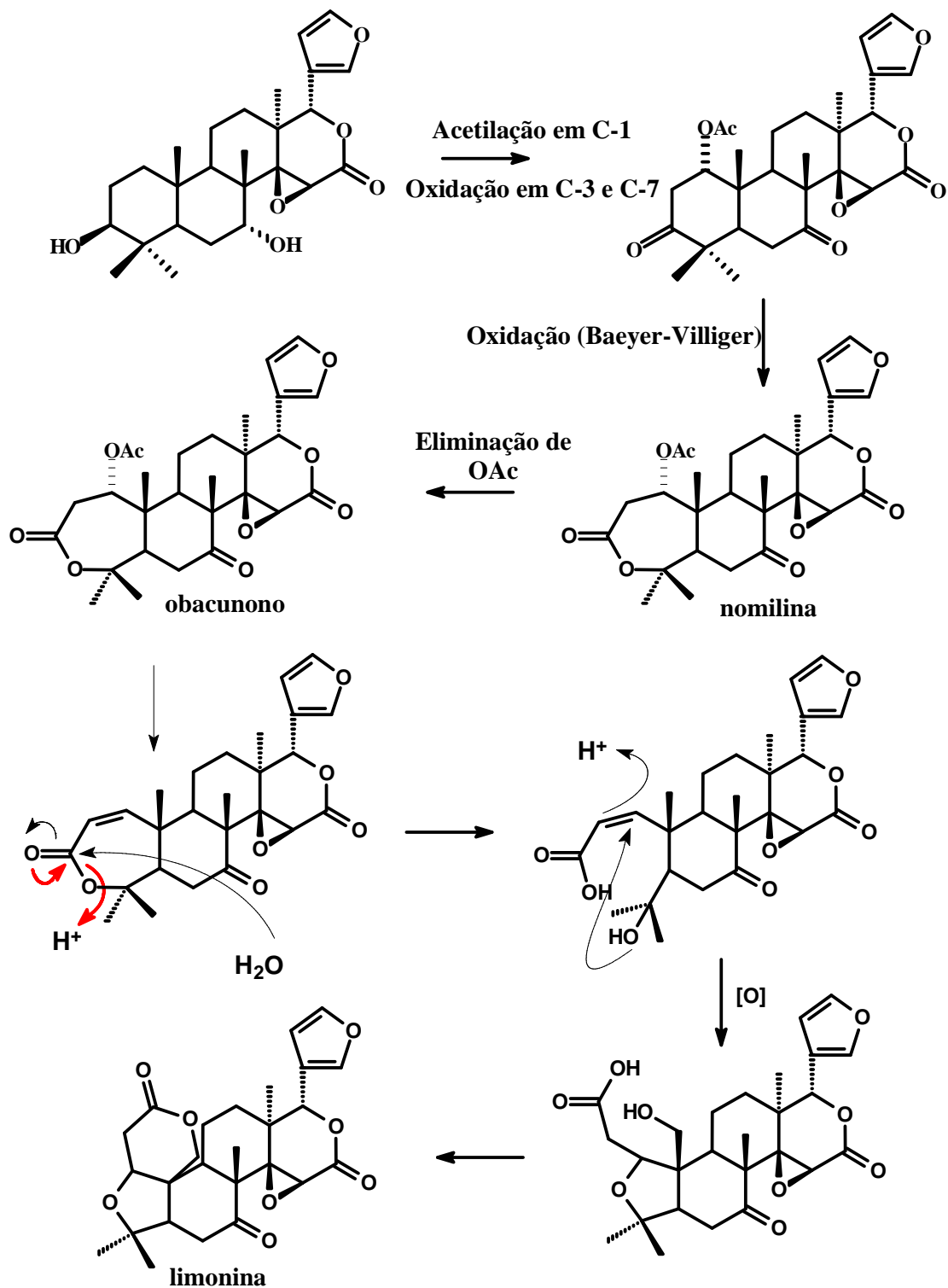
ESQUEMA 1.4: Propostas de biogênese para o limonoide 11 β -hidroxi-hortiolida C (**substância 05**)

As propostas de biogênese para os limonoides hortiolida D (substância 06), hortiolida E (substância 07) e 12β-hidróxi-hortiolida E (substância 08) estão esquematizadas no ESQUEMA 1.5 (p. 159).



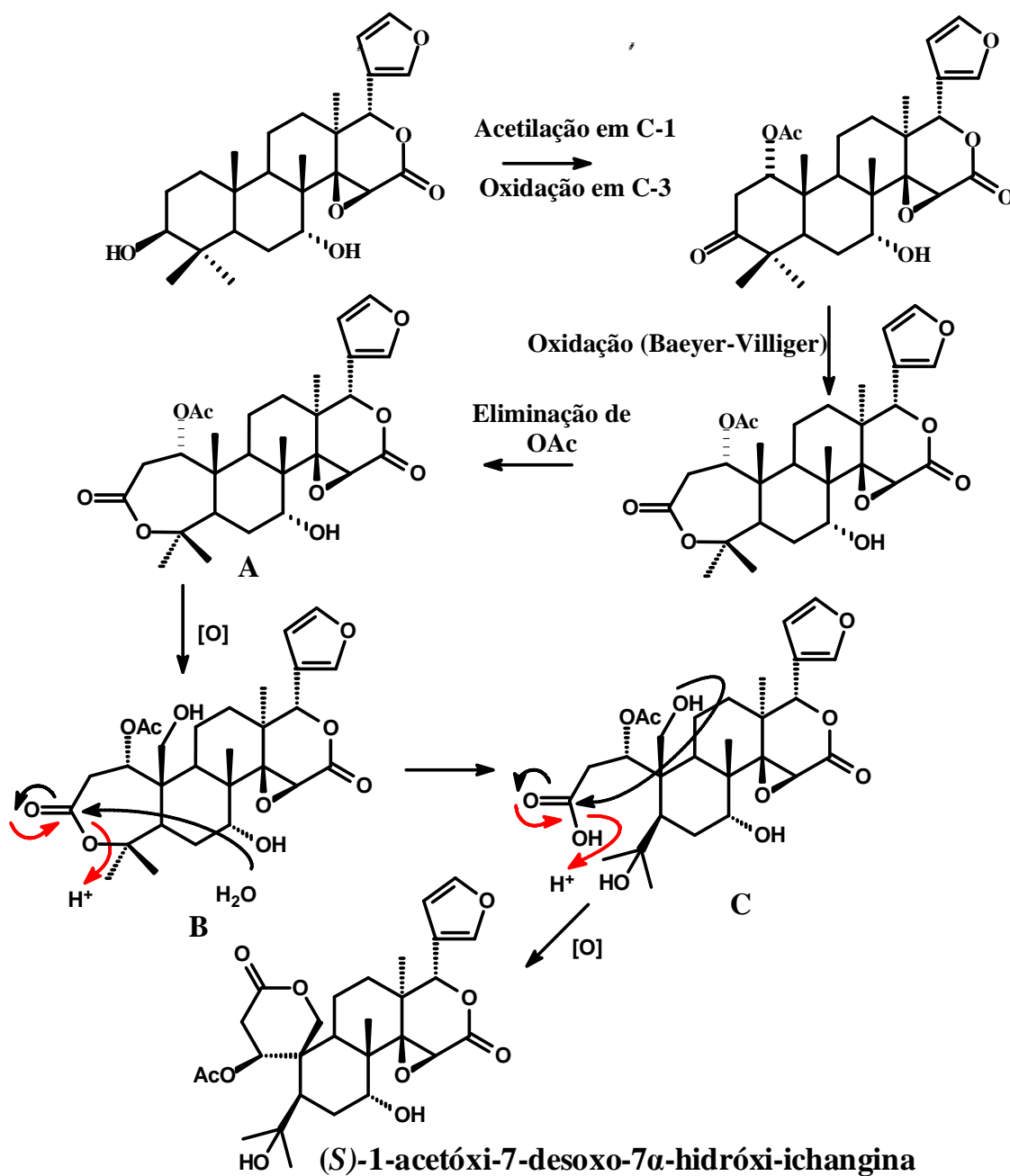
ESQUEMA 1.5: Propostas de biogênese para os limonoides hortiolida D (substância 06), hortiolida E (substância 07) e 12β-hidróxi-hortiolida E (substância 08)

A proposta de biogênese para o limonoide limonina (**substância 09**) está esquematizada no ESQUEMA 1.6 (p. 160).



ESQUEMA 1.6: Proposta de biogênese para o limonoide limonina (**substância 09**)

A proposta de biogênese para o limonoide (*S*)-1-acetóxi-7-desoxo-7 α -hidróxi-ichangina (**substância 10**) está esquematizada no ESQUEMA 1.7 (p. 161). A estereoquímica do grupo acetóxi da substância A foi baseada no composto nomilina, previamente relatado na literatura (WATERMAN & GRUNDON, 1983).



ESQUEMA 1.7: Proposta de biogênese para o limonoide (*S*)-1-acetóxi-7-desoxo-7 α -hidróxi-ichangina (**substância 10**)

1.4.3 Identificações Estruturais dos Derivados do Ácido Diidrocinâmico Isolados de Plantas do Gênero *Hortia*:

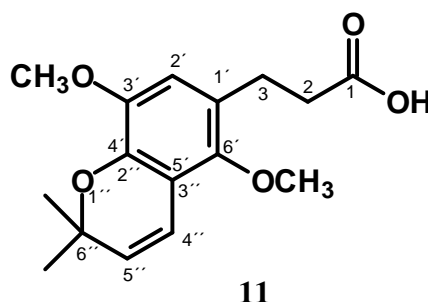
Os derivados do ácido diidrocinâmico são de ocorrência na família Rutaceae, estando descritos na literatura para os gêneros *Adiscanthus* (VIEIRA *et al.*, 1980), *Drummondita* (RASHID *et al.*, 1992), *Geleznovia* (RASHID *et al.*, 1991), *Eriostemon* (SARKER *et al.*, 1994a, SARKER *et al.*, 1994b, SARKER *et al.*, 1995a, SARKER *et al.*, 1995b), *Micromelum* (RAHMANI *et al.*, 1994) além do gênero *Hortia*.

Conforme mostrado na TABELA 1.1 (p. 05), foram descritos para *Hortia* 13 derivados do ácido diidrocinâmico, tendo sido os mesmos isolados de *H. badinii* M.A. Lisboa (nome correto: *H. brasiliana* Vand. ex DC.) (CORREA *et al.*, 1975; CORREA *et al.*, 1979), *H. regia* Sandwith (TINTO *et al.*, 1992), *H. colombiana* Gleason (nome correto: *H. brasiliana* Vand. ex DC.) (SUAREZ, *et al.*, 2002), *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani (BRAGA, 2005; SEVERINO, 2008) e *H. brasiliana* Vand. ex DC. (BRAGA, 2005; SEVERINO, 2008)

Neste trabalho, foram isolados derivados do ácido diidrocinâmico (**substâncias 11, 12 e 13**) das três espécies de *Hortia* (*H. oreadica* Groppo, Kallunki e Pirani, *H. superba* Ducke e *H. brasiliana* Vand. ex DC.), os quais já haviam sido descritos no gênero. De *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani foram obtidas as substâncias **11,12 e 13**, de *H. superba* Ducke, **12 e 13** e de *H. brasiliana* Vand. ex DC., **13**, sendo que a substância **11** já havia sido obtida nos trabalhos anteriores, realizados com os mesmos espécimes investigados no presente trabalho, de *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani por SEVERINO (2008), **13** de *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani por BRAGA (2005)/SEVERINO (2008) e de *H. brasiliana* Vand. ex DC. por SEVERINO (2008) e **12** de *H. brasiliana* Vand. ex DC. por BRAGA (2005).

1.4.3.1 Ácido 3-[3,6-dimetóxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':4,5)-fenil]-propiónico – substância 11

A substância **11** foi isolada dos extratos metanólicos do tronco e tronco subterrâneo de *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani e teve sua estrutura identificada com base em experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C e comparação com dados da literatura (SUAREZ *et al.*, 2002, BRAGA, 2005, SEVERINO, 2008).



O espectro de RMN de ^1H de **11** (FIGURA 1.66, p. 165) mostrou dois sinais em δ 2,82 (2H, *tl*) e δ 2,55 (2H, *tl*) referentes aos hidrogênios metilênicos H-3 e H-2, respectivamente. Em δ 3,63 (3H, *s*) e δ 3,76 (3H, *s*) foi possível observar sinais de duas metoxilas e em δ 1,43 (6H, *s*) observou-se a presença do sinal referente às duas metilas do anel cromeno. Em δ 6,50 (1H, *d*, $J= 10,0$ Hz) e em δ 5,60 (1H, *d*, $J= 10,0$ Hz) observou-se os sinais referentes aos hidrogênios do anel cromeno e em δ 6,58 (1H, *s*) o sinal de um hidrogênio aromático.

O espectro de ^{13}C (FIGURA 1.67, p. 166) apresentou sinais de 16 carbonos para a molécula, cujos valores podem ser observados na TABELA 1.22 (p. 164).

Desta forma, pôde-se definir a estrutura da substância **11** como sendo a do ácido 3-[3,6-dimetóxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':4,5)-fenil]-propiónico, isolado anteriormente de *H. colombiana* Gleason (nome correto: *H.*

brasiliensis Vand. ex DC.) (SUAREZ *et al.*, 2002) e *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani (SEVERINO, 2008).

TABELA 1.22: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **11** e comparação com dados da literatura

H/C	Substância 11 (400/100 MHz, CDCl_3)		SUAREZ <i>et al.</i> , 2002 (300/75 MHz, CDCl_3)	
	δ (ppm), <i>J</i> (Hz)	δ (ppm)	δ (ppm), <i>J</i> (Hz)	δ (ppm)
1	-	177,9	-	178,7
2	2,55 (2H, <i>tl</i>)	36,3	2,65 (2H, <i>t</i> , <i>J</i> = 7,5)	35,0
3	2,82 (2H, <i>tl</i>)	25,2	2,88 (2H, <i>t</i> , <i>J</i> = 7,5)	24,9
1'	-	144,9	-	144,7
2'	6,58 (1H, <i>s</i>)	113,5	6,60 (1H, <i>s</i>)	113,0
3'	-	124,6	-	123,8
4'/2''	-	147,7	-	147,8
5'/3''	-	115,5	-	115,6
6'	-	141,1	-	141,2
4''	6,50 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 10,0)	117,5	6,55 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 10,0)	117,3
5''	5,60 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 10,0)	130,6	5,65 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 10,0)	130,6
6''	-	75,7	-	75,8
6''-Me	1,43 (6H, <i>s</i>)	27,6	1,47 (6H, <i>s</i>)	27,5
3'-OMe	3,76 (3H, <i>s</i>)	56,7	3,82 (3H, <i>s</i>)	56,5
6'-OMe	3,63 (3H, <i>s</i>)	62,3	3,71 (3H, <i>s</i>)	62,2

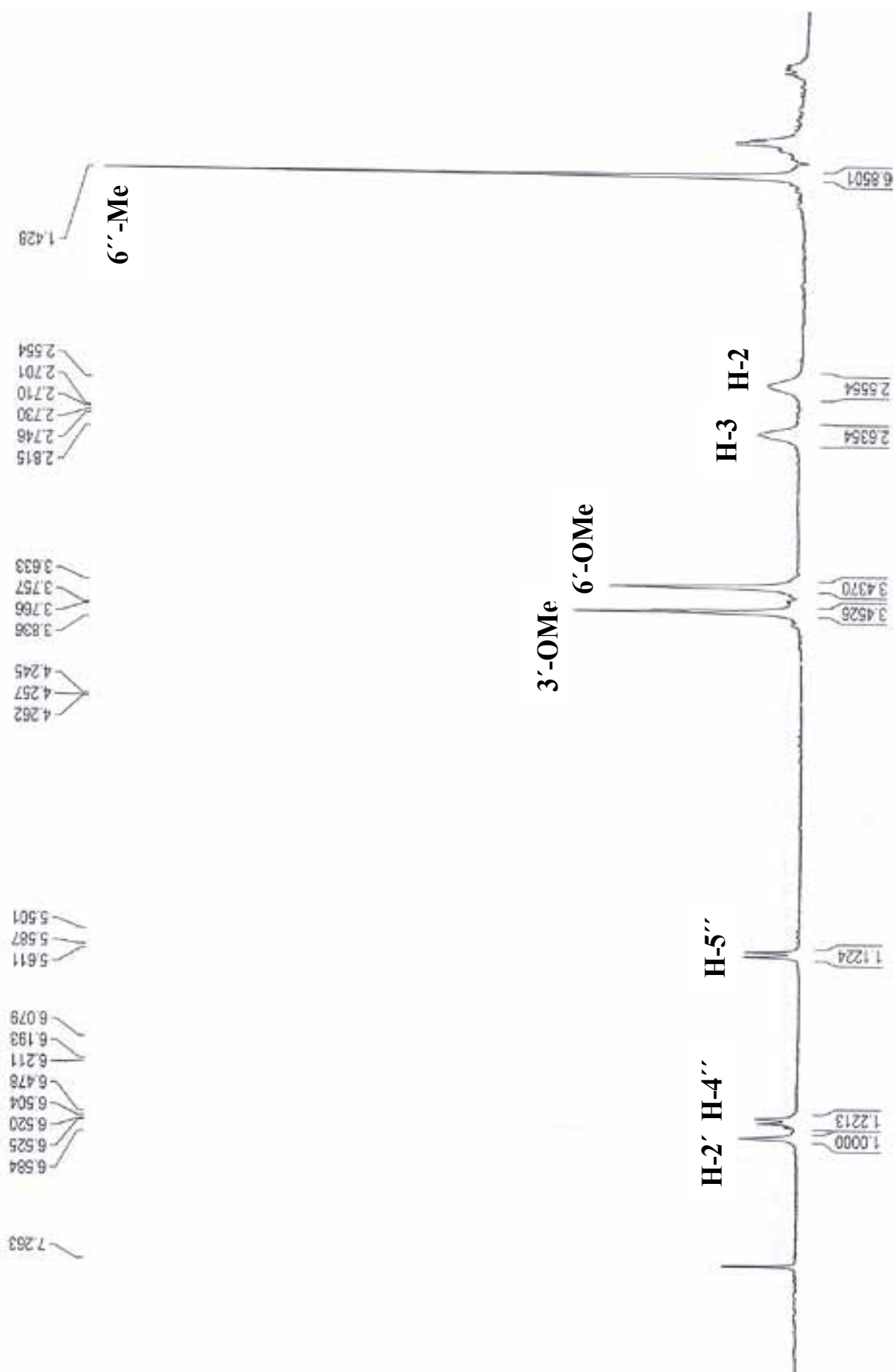


FIGURA 1.66: Espectro de RMN de ^1H de **11** (CDCl_3 , 400 MHz)

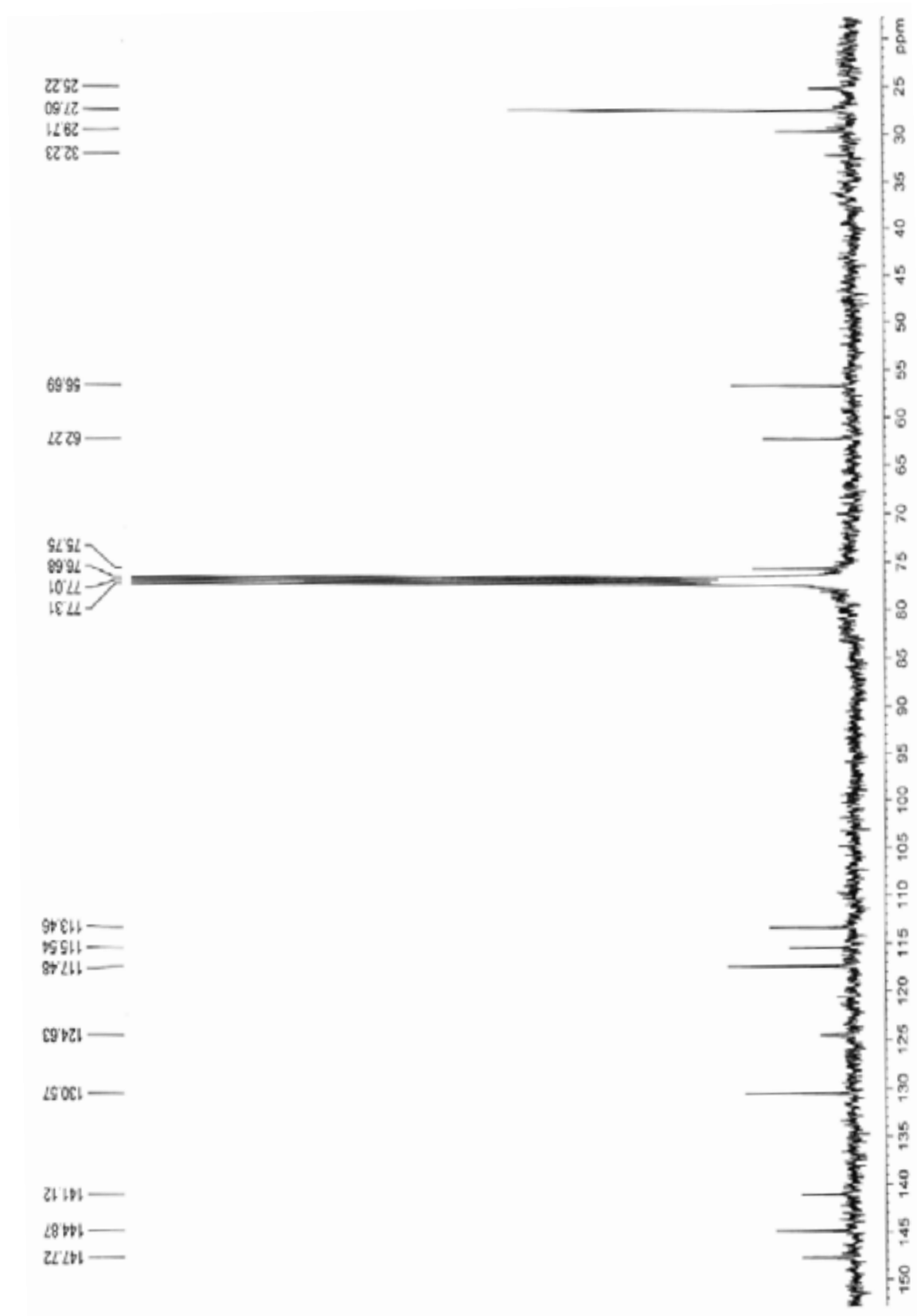
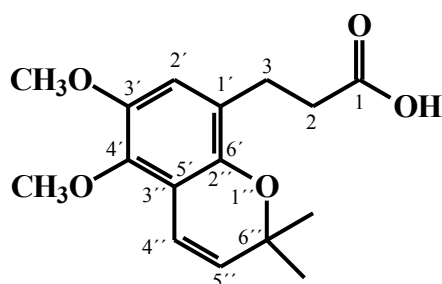


FIGURA 1.67 Espectro de RMN de ^{13}C de **11** (CDCl_3 , 100 MHz)

1.4.3.2 Ácido 3-[3,4-dimetóxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':5,6)-fenil]-propiónico – substância 12

A substância **12** foi isolada dos extratos metanólicos dos troncos de *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani e *H. superba* Ducke, já tendo sido obtida do mesmo espécime de *H. brasiliiana* Vand, ex DC., investigado por BRAGA (2005). Esta substância foi identificada com base em dados dos experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C , os quais foram muito similares aos da literatura (BRAGA, 2005).

Segundo levantamento bibliográfico há relato do isolamento desta substância da espécie *H. brasiliiana* Vand. ex DC. (BRAGA, 2005), sendo que no presente trabalho não foi isolado novamente deste espécime e sim de *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani e *H. superba* Ducke, sendo o primeiro relato nestas espécies.



12

O espectro de RMN de ^1H de **12** (FIGURA 1.68, p. 169) mostrou dois sinais em δ 2,84 (2H, *t*, $J= 7,4$ Hz) e δ 2,65 (2H, *t*, $J= 7,4$ Hz) referentes aos hidrogênios metilênicos H-3 e H-2, respectivamente. Em δ 3,81 (3H, *s*) e 3,80 (3H, *s*) observou-se sinais de duas metoxilas aromáticas e em δ 1,40 (6H, *s*) a presença do sinal referente a duas metilas características do anel cromeno. Em δ 6,63 (1H, *d*, $J= 9,9$ Hz) e em δ 5,65 (1H, *d*, $J= 9,9$ Hz) foi possível observar sinais referentes aos hidrogênios do anel cromeno e em δ 6,60 (1H, *s*) o sinal de um hidrogênio aromático.

O espectro de RMN de ^{13}C (FIGURA 1.69, p. 170) apresentou sinais de 16 carbonos para a estrutura, cujos valores são apresentados na TABELA 1.23 (p. 168).

Desta forma, foi possível definir a estrutura de **12** como sendo a do ácido 3-[3,4-dimetóxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':5,6)-fenil]-propiónico.

TABELA 1.23: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **12** e comparação com dados da literatura

H/C	Substância 12 (400/100 MHz, CDCl_3)		BRAGA, 2005 (400/100 MHz, CDCl_3)	
	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm)	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm)
1	-	178,0	-	178,1
2	2,65 (2H, t , $J=7,4$)	34,0	2,65 (2H, t , $J=7,4$)	33,9
3	2,84 (2H, t , $J=7,4$)	25,3	2,83 (2H, t , $J=7,4$)	25,0
1'	-	122,5	-	122,4
2'	6,60 (1H, s)	113,9	6,60 (1H, s)	113,9
3'	-	146,0	-	146,2
4'	-	143,4	-	143,5
5'/3''	-	115,6	-	115,6
6'/2''	-	144,5	-	144,4
4''	6,63 (1H, d , $J=9,9$)	117,3	6,65 (1H, d , $J=9,9$)	117,3
5''	5,65 (1H, d , $J=9,9$)	131,2	5,65 (1H, d , $J=9,9$)	131,1
6''	-	75,4	-	75,4
6''-Me	1,40 (6H, s)	27,6	1,41 (6H, s)	27,6
3'-OMe	3,80 (3H, s)	56,5	3,80 (3H, s)	56,5
4'-OMe	3,81 (3H, s)	61,3	3,81 (3H, s)	61,3

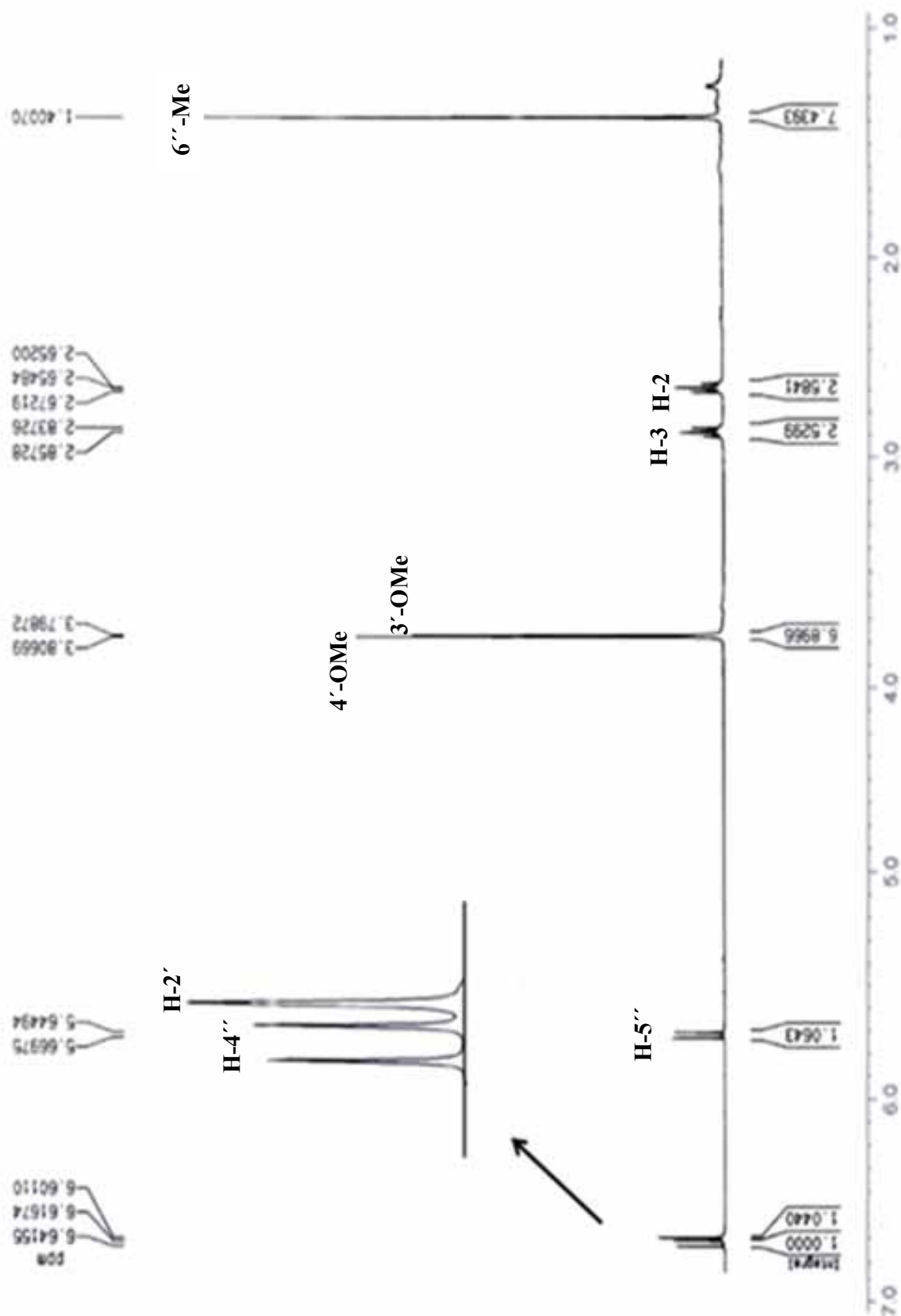


FIGURA 1.68: Espectro de RMN de ^1H de **12** (CDCl_3 , 400 MHz)

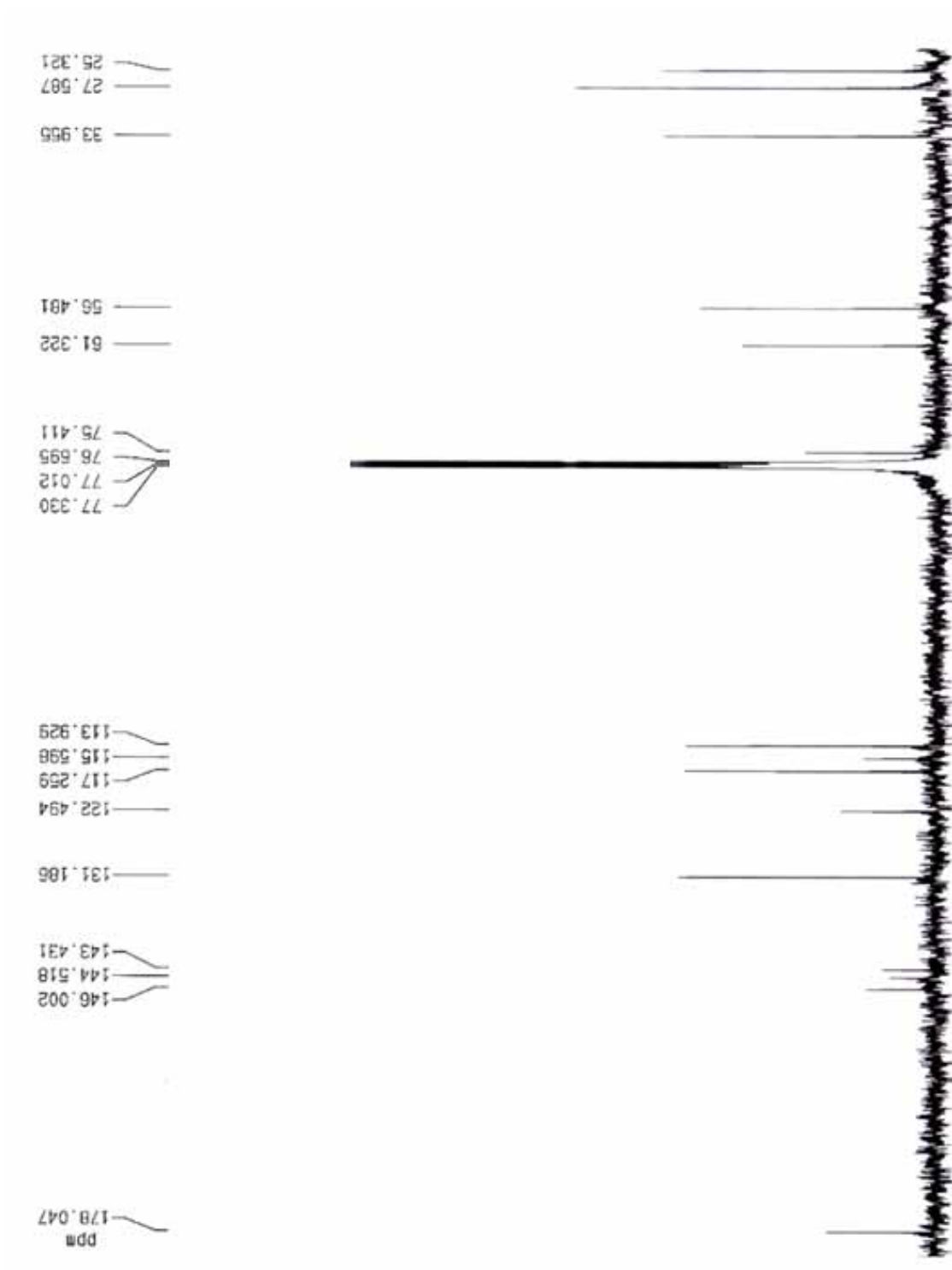
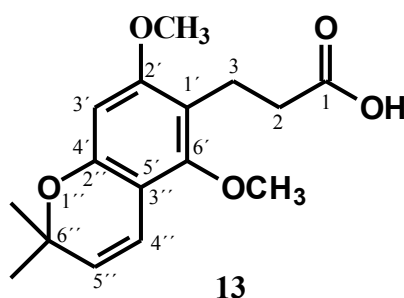


FIGURA 1.69: Espectro de RMN de ^{13}C de **12** (CDCl_3 , 100 MHz)

1.4.3.3 Ácido 3-[2,6-dimetóxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':4,5)-fenil]-propiónico – substância 13

A substância **13** foi isolada dos extratos metanólicos do tronco subterrâneo de *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani, do tronco de *H. superba* Ducke e do tronco de *H. brasiliana* Vand. ex DC. e teve sua estrutura identificada com base em experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C , os quais foram muito similares aos dados comparados da literatura (BRAGA, 2005).



O espectro de RMN de ^1H de **13** (FIGURA 1.70, p. 173) mostrou dois sinais em δ 2,89 (2H, *t*, $J= 7,6$ Hz) e δ 2,57 (2H, *t*, $J= 7,6$ Hz) referentes aos hidrogênios metilênicos H-3 e H-2, respectivamente. Em δ 3,74 (3H, *s*) e 3,77 (3H, *s*) foi possível observar sinais de duas metoxilas aromáticas referentes a 6'-OMe e 2'-OMe, respectivamente. O sinal em δ 1,42 (6H, *s*) indicou a presença de duas metilas características do anel cromeno. Em δ 6,49 (1H, *d*, $J= 9,9$ Hz) e em δ 5,48 (1H, *d*, $J= 9,9$ Hz) observou-se os sinais referentes aos hidrogênios do anel cromeno H-4'' e H-5'', respectivamente, e em δ 6,20 (1H, *s*) observou-se o sinal do hidrogênio aromático H-3'.

O espectro de RMN de ^{13}C (FIGURA 1.71, p. 174) apresentou sinais de 16 carbonos para a molécula, cujos valores podem ser observados na TABELA 1.24 (p. 172).

Desta forma, pôde-se definir a estrutura da substância **13** como sendo a do ácido 3-[2,6-dimetóxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':4,5)-fenil]-propiónico, isolado anteriormente de *H. badinii* M.A. Lisboa (nome correto: *H.*

brasiliiana Vand. ex DC.) (CORRÊA *et al.*, 1975; CORRÊA *et al.*, 1979); *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani (BRAGA, 2005; SEVERINO, 2008) e *H. brasiliiana* Vand. ex DC. (SEVERINO, 2008).

TABELA 1.24: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **13** e comparação com dados da literatura

H/C	Substância 13 (400/100 MHz, CDCl_3)		BRAGA, 2005 (400/50 MHz, CDCl_3)	
	δ (ppm), <i>J</i> (Hz)	δ (ppm)	δ (ppm), <i>J</i> (Hz)	δ (ppm)
1	-	178,7	-	178,7
2	2,57 (2H, <i>t</i> , <i>J</i> = 7,6)	33,9	2,57 (2H, <i>m</i>)	33,8
3	2,89 (2H, <i>t</i> , <i>J</i> = 7,6)	18,8	2,89 (2H, <i>m</i>)	18,8
1'	-	113,7	-	113,7
2'	-	158,8	-	158,8
3'	6,20 (1H, <i>s</i>)	96,0	6,20 (1H, <i>s</i>)	96,1
4'/2''	-	153,2	-	153,2
5'/3''	-	107,7	-	107,7
6'	-	155,1	-	154,9
4''	6,49 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9,9)	117,3	6,49 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =10,0)	117,3
5''	5,48 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9,9)	127,2	5,49 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =10,0)	127,1
6''	-	76,1	-	76,0
6''-Me	1,42 (6H, <i>s</i>)	27,8	1,42 (6H, <i>s</i>)	27,7
2'-OMe	3,77 (3H, <i>s</i>)	55,5	3,77 (3H, <i>s</i>)	55,5
6'-OMe	3,74 (3H, <i>s</i>)	62,4	3,74 (3H, <i>s</i>)	62,3

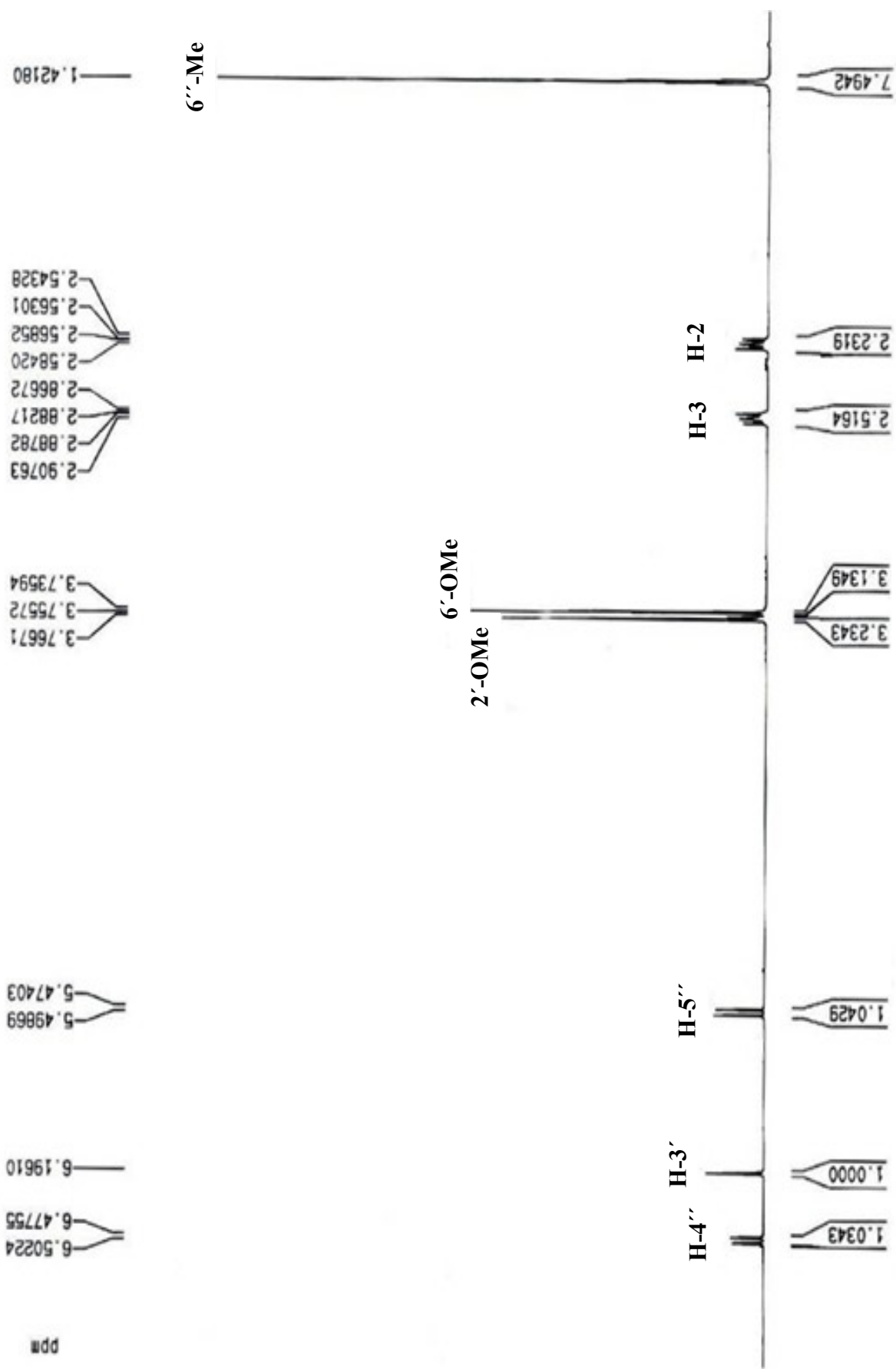


FIGURA 1.70: Espectro de RMN de ^1H de **13** (CDCl_3 , 400 MHz)

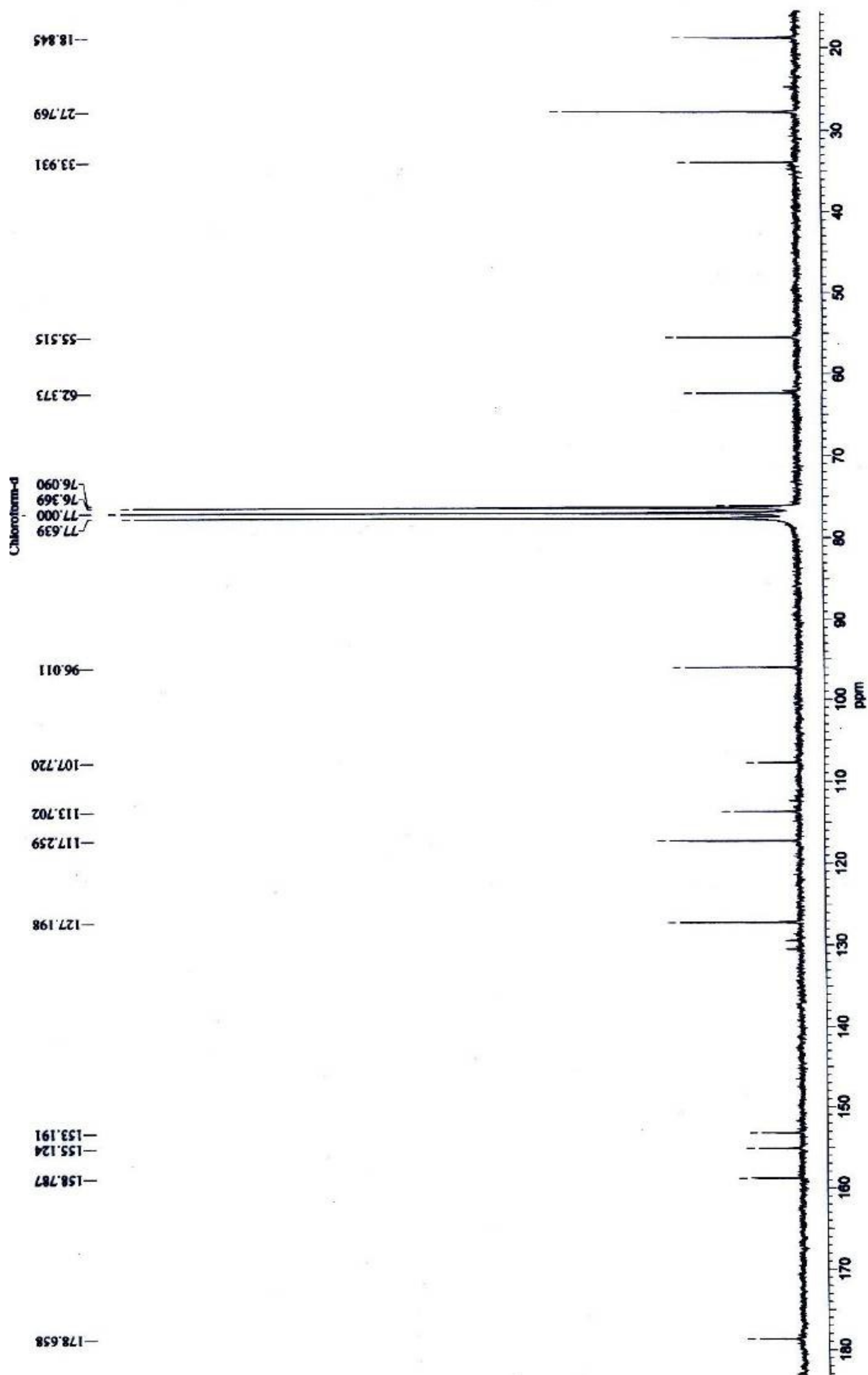
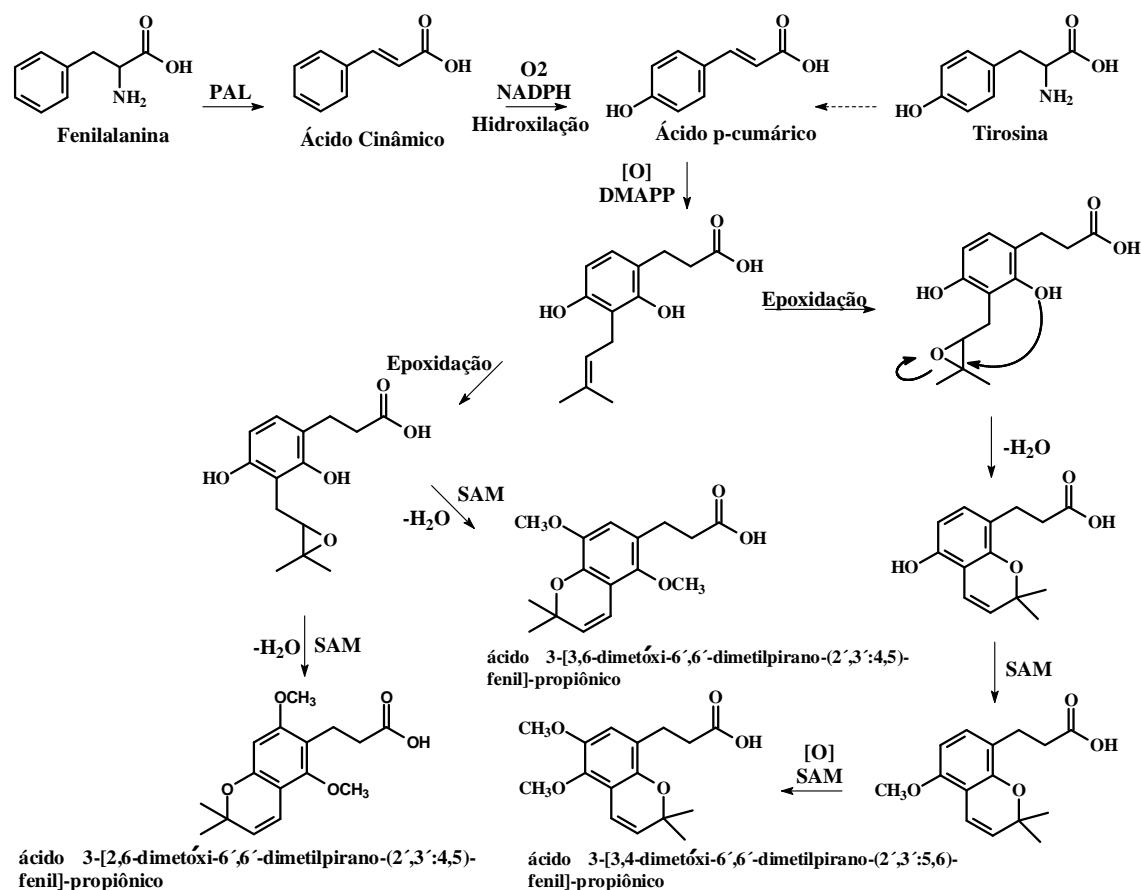


FIGURA 1.71: Espectro de RMN de ^{13}C de **13** (CDCl_3 , 100 MHz)

1.4.3.4 Biogênese dos Derivados do Ácido Diidrocinâmico

A L-fenilalanina e a L-tirosina são precursores de uma grande variedade de produtos naturais. Nas plantas, o passo inicial é a eliminação da amônia da cadeia lateral para gerar o ácido cinâmico *trans* (E). No caso da fenilalanina, tem-se o ácido cinâmico, enquanto que a tirosina produz o ácido 4-cumárico ou ácido *p*-cumárico (ESQUEMA 1.8, p. 175).

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



ESQUEMA 1.8: Proposta biogênica para os derivados do ácido diidrocinâmico

1.4.4 Identificações Estruturais dos Alcaloides Isolados de Plantas do Gênero *Hortia*:

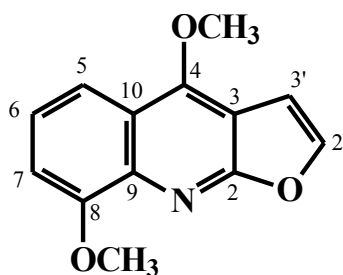
Na família Rutaceae é amplamente relatada a ocorrência de alcaloides derivados do ácido antranílico, triptofano, fenilalanina, histidina, ácido nicotínico, ornitina ou lisina e, em alguns casos, de dois precursores (WATERMAN, 1999).

Os alcaloides derivados do ácido antranílico podem ser classificados em quatro tipos: 1) quinolínicos, 2) furano e piranoquinolínicos, 3) acridônicos, 4) quinazolínicos e indoloquinazolínicos (TEREZAN, 2007). Alguns destes tipos têm sido descritos para o gênero *Hortia*, como apresentado na TABELA 1.3 (ps. 08 a 11).

Neste trabalho foram re-isolados cinco alcaloides das espécies de *Hortia* estudadas, sendo dois furoquinolínico (γ -fagarina e esquimianina) (**substâncias 14 e 15**) de *H. brasiliiana* Vand. ex DC., um do tipo 2-quinolona (N-metil-4-metóxi-2-quinolona) (**substância 16**) das três espécies estudadas e dois indoloquinazolínicos, sendo a rutaecarpina (**substância 17**) obtida de *H. superba* Ducke e hortiacina (**substância 18**) de *H. brasiliiana* Vand. ex DC. e *H. superba* Ducke.

1.4.4.1 γ -Fagarina – substância 14

A substância **14** foi isolada do extrato metanólico do tronco de *H. brasiliiana* Vand. ex DC. e teve sua estrutura identificada com base em espectros de RMN de ^1H e ^{13}C e comparação com dados da literatura (CUCA *et al.*, 1998). Esta é a primeira descrição desta substância nesta espécie.



14

Pelo espectro de RMN de ^1H de **14** (FIGURA 1.72, p. 179) observou-se a presença de dois dubletos em δ 7,07 (H-3') e 7,63 (H-2') com $J = 2,8$ Hz, evidenciando a presença de um anel furano dissustituído; três sinais de hidrogênios aromáticos, ou seja, três duplos dubletos, sendo que um deles possivelmente está com parte de seu sinal sob o dubleto em δ 7,07. Portanto, tem-se um duplo dubleto em δ 7,03 integrando para um hidrogênio com $J = 8,4$ Hz e 1,2 Hz referente a hidrogênio com acoplamento em *orto* e *meta*, um duplo dubleto em δ 7,35 integrando para um hidrogênio com $J = 8,6$ Hz e 8,4 Hz referente a dois acoplamentos *orto* e outro duplo dubleto em δ 7,84 integrando para um hidrogênio com $J = 8,6$ Hz e 1,2 Hz referente aos acoplamentos *orto* e *meta*. Esses sinais evidenciaram um anel aromático trissustituído. Ainda foi possível observar dois singletos, sendo um em δ 4,44 e outro em δ 4,07 referente a hidrogênios metílicos ligados a heteroátomos.

Pelo espectro de RMN de ^{13}C (FIGURA 1.73, p. 180) foi possível observar a presença de 13 sinais de carbonos, sendo um sinal em δ 59,0 e outro em δ 55,9 característicos de duas metoxilas. Os sinais destes carbonos foram

atribuídos aos hidrogênios em δ 4,44 e δ 4,07, respectivamente, e referem-se as duas metoxilas da estrutura.

Todos os sinais referentes aos hidrogênios e carbonos foram atribuídos baseando-se em dados da literatura e são apresentados na TABELA 1.25 (p. 178). Portanto, pela análise dos experimentos de RMN e comparação com dados da literatura foi possível definir a estrutura da substância **14** como sendo a da γ -fagarina, já obtida do estudo anterior feito com o espécime de *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani (BRAGA, 2005).

TABELA 1.25: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **14** e comparação com dados da literatura

H/C	Substância 14 (200/50 MHz, CDCl_3)		CUCA <i>et al.</i> , 1998 (300/75 MHz, CDCl_3)	
	δ (ppm), <i>J</i> (Hz)	δ (ppm)	δ (ppm), <i>J</i> (Hz)	δ (ppm)
2	-	163,2	-	163,0
3	-	119,7	-	119,7
4	-	154,6	-	154,6
5	7,84 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 8,6; 1,2)	114,1	7,85 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,5)	114,0
6	7,35 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 8,6; 8,4)	123,4	7,34(<i>ddd</i> , <i>J</i> = 8,5; 7,8; 0,9)	123,9
7	7,03 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 8,4; 1,2)	107,7	7,07 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7,9)	107,8
8	-	154,6		154,6
9	-	137,5	-	137,5
10	-	103,9	-	103,9
2'	7,63 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,8)	143,9	7,65 (<i>d</i> , <i>J</i> =2,8)	143,9
3'	7,07 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =2,8)	104,5	7,09 (<i>d</i> , <i>J</i> =2,8)	104,5
4-OMe	4,44 (3H, <i>s</i>)	59,0	4,44(<i>s</i>)	59,3
8- OMe	4,07 (3H, <i>s</i>)	55,9	4,07 (<i>s</i>)	55,9

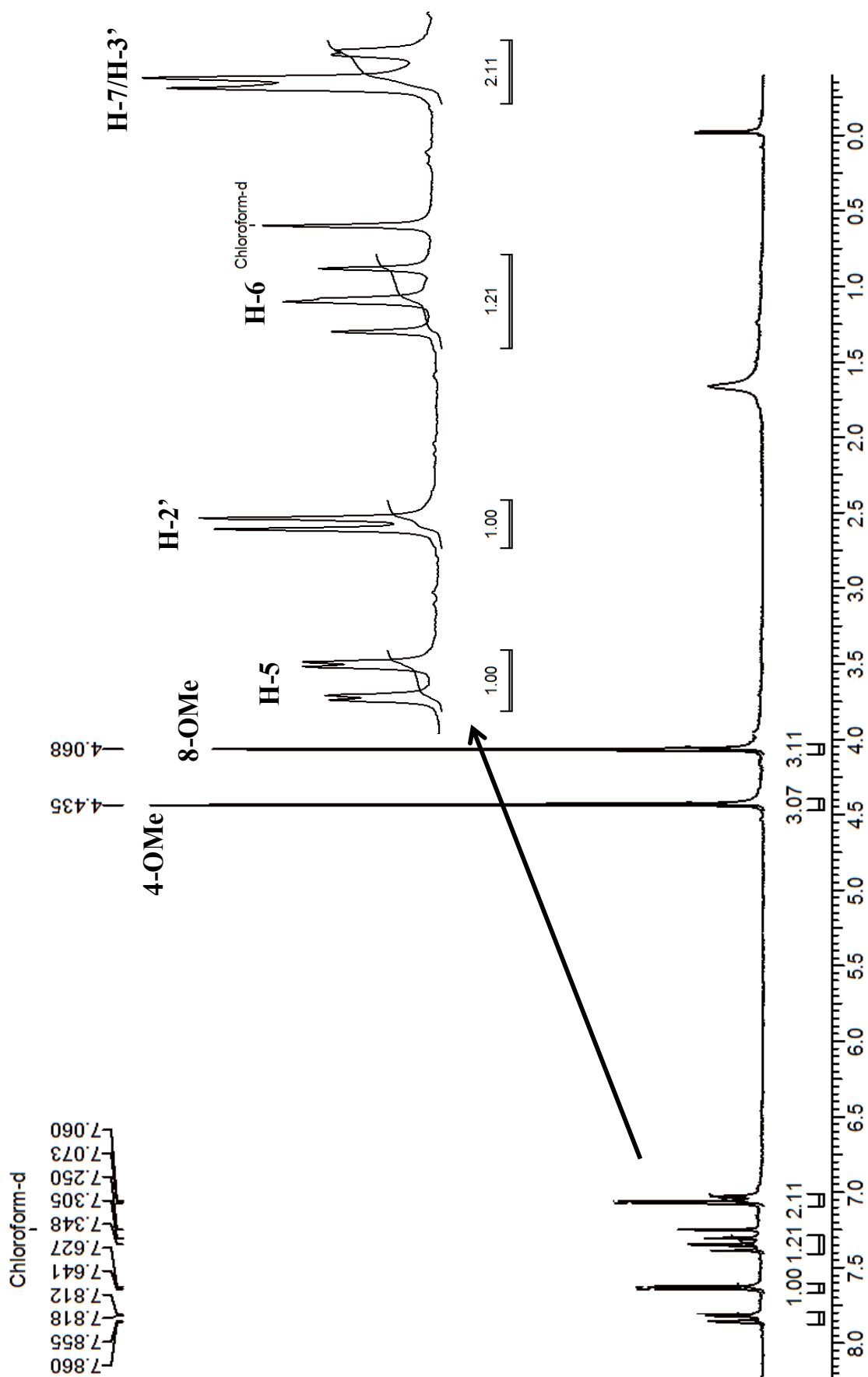


FIGURA 1.72: Espectro de RMN de ^1H de **14** (200 MHz, CDCl_3)

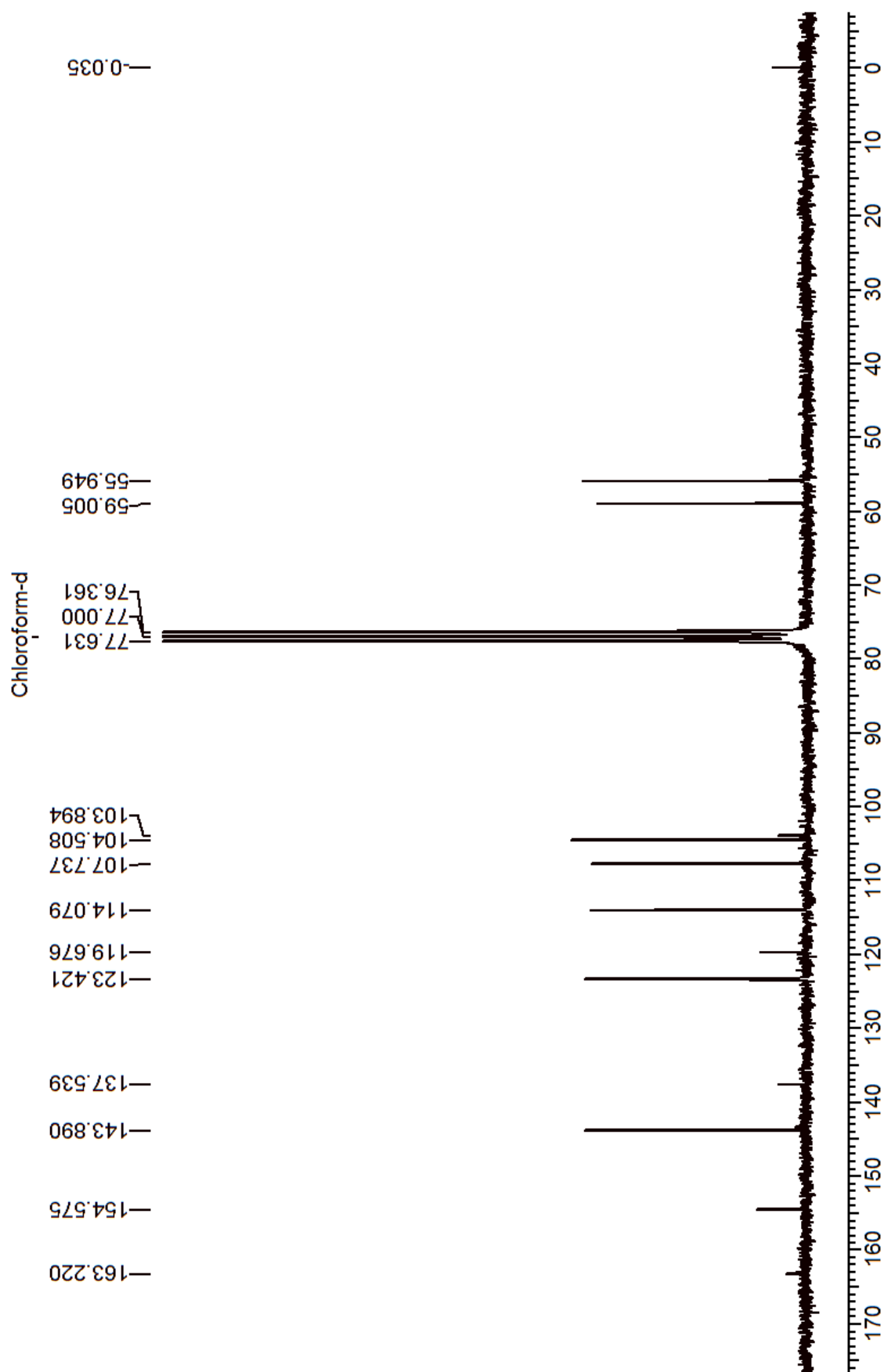
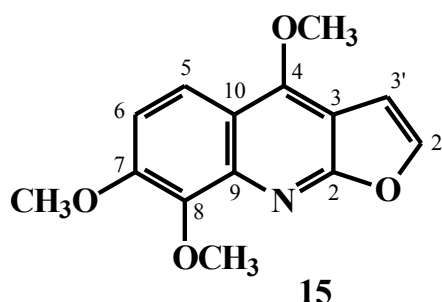


FIGURA 1.73: Espectro de RMN de ^{13}C de **14** (50 MHz, CDCl_3)

1.4.4.2 Esquimianina – substância 15

A substância **15** já havia sido isolada do mesmo espécime de *H. brasiliiana* Vand. ex DC. investigado anteriormente (BRAGA, 2005) e foi isolada novamente no presente trabalho do extrato metanólico do tronco deste espécime. Sua estrutura foi identificada com base em espectros de RMN de ^1H e ^{13}C e comparação com dados da literatura (CUCA *et al.*, 1998; BRAGA, 2005).



O espectro de RMN de ^1H de **15** (FIGURA 1.74, p. 183) apresentou sinais semelhantes aos mostrados para a γ -fagarina (substância **14**), ou seja, dois dubletos em δ 7,00 (H-3') e δ 7,54 (H-2') com $J= 2,8$ Hz, evidenciando a presença de um anel furano dissustituído. No entanto, diferentemente de **14**, apresentou dois dubletos em δ 7,20 e δ 7,97 integrando para um hidrogênio cada com $J= 9,4$ Hz referente a dois hidrogênios com acoplamentos em *orto*, evidenciando, portanto, um anel aromático tetrassustituído. Além disso, o espectro de RMN de ^1H apresentou três singletos em δ 4,00, δ 4,09 e δ 4,39 integrando para três hidrogênios cada, referentes a hidrogênios metílicos ligados a heteroátomos.

O espectro de RMN de ^{13}C (FIGURA 1.75, p. 184) mostrou sinais de 14 carbonos, sendo os sinais em δ 56,7, δ 58,9 e δ 61,6 característicos de três metoxilas. Todos os sinais referentes aos hidrogênios e carbonos foram atribuídos baseando-se em dados da literatura e são apresentados na TABELA 1.26 (p. 182).

Portanto, a estrutura de **15** foi definida como sendo a da esquimianina.

TABELA 1.26: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **15** e comparação com dados da literatura

H/C	Substância 15 (200/50 MHz, CDCl_3)		CUCA <i>et al.</i> , 1998 (300/75 MHz, CDCl_3)	
	δ (ppm), <i>J</i> (Hz)	δ (ppm)	δ (ppm), <i>J</i> (Hz)	δ (ppm)
2	-	164,3	-	164,6
3	-	114,8	-	115,0
4	-	157,1	-	157,2
5	7,97 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9,4)	118,1	8,03 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9,3)	118,2
6	7,20 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9,4)	112,0	7,24 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9,3)	111,6
7	-	141,9	-	141,6
8	-	141,4	-	141,3
9	-	152,1	-	152,2
10	-	102,0	-	101,8
2'	7,54 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,8)	142,9	7,59 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,8)	143,0
3'	7,00 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,8)	104,6	7,05 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,8)	104,6
4-OMe	4,39 (3H, <i>s</i>)	58,9	4,44 (3H, <i>s</i>)	58,9
7- OMe	4,00 (3H, <i>s</i>)	56,7	4,03 (3H, <i>s</i>)	56,8
8- OMe	4,09 (3H, <i>s</i>)	61,6	4,11 (3H, <i>s</i>)	61,7

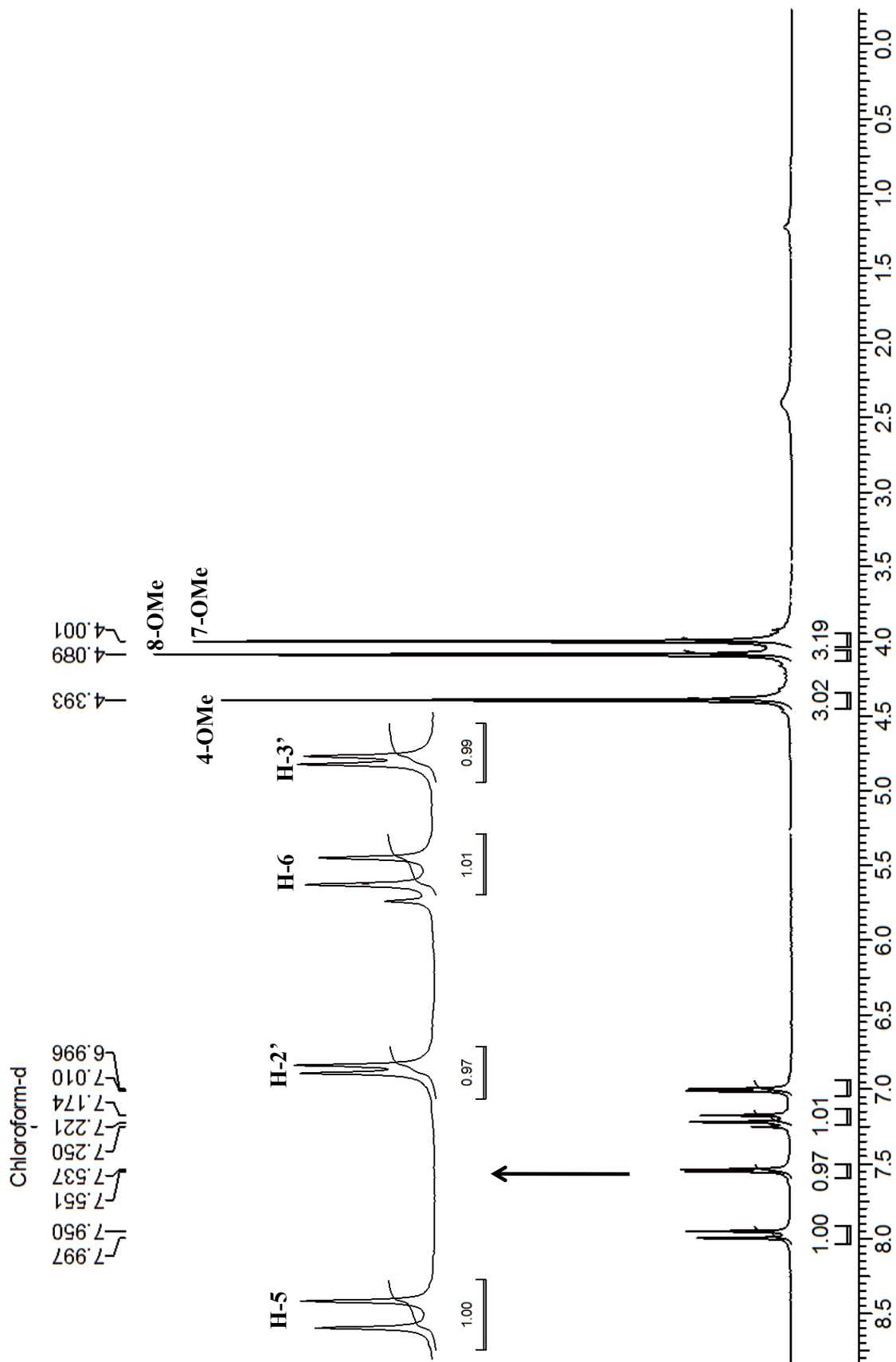


FIGURA 1.74: Espectro de RMN de ^1H de **15** (200 MHz, CDCl_3)

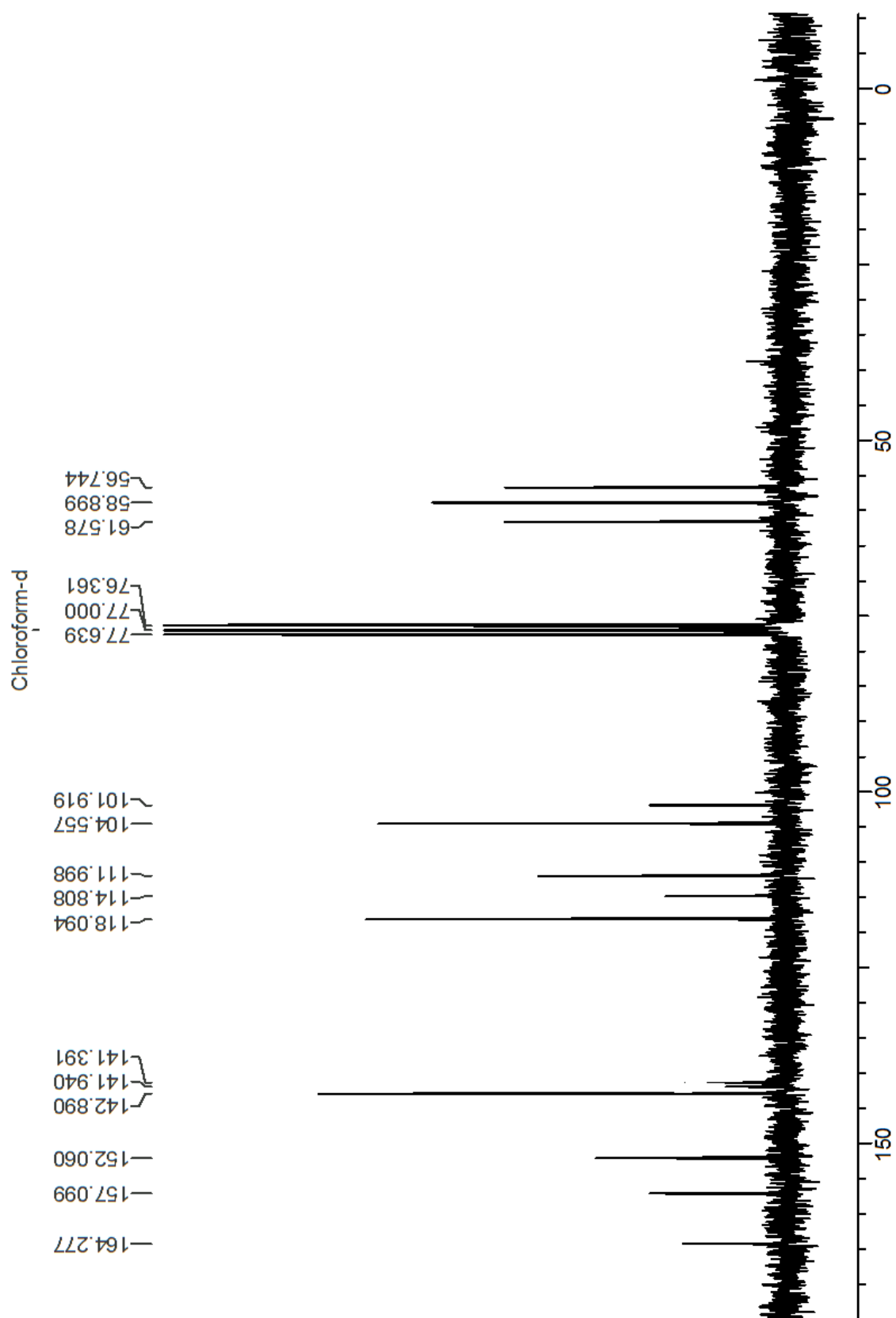
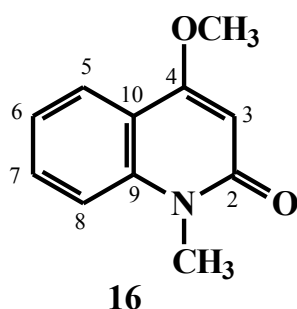


FIGURA 1.75: Espectro de RMN de ^{13}C de **15** (50 MHz, CDCl_3)

1.4.4.3 N-Metil-4-metóxi-2-quinolona – substância 16

A substância **16** foi isolada dos extratos metanólicos dos troncos de *H. brasiliiana* Vand. ex DC., *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani e *H. superba* Ducke e foi identificada através da análise de experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C e também por comparação com dados da literatura (MAFEZOLI, 2001).



O espectro de RMN de ^1H de **16** (FIGURA 1.76, p. 187) apresentou 4 sinais relativos a hidrogênios aromáticos em δ 7,97 (1H, *dd*, $J= 8,0$ Hz e 1,5 Hz), δ 7,23 (1H, *ddd*, $J= 8,0$ Hz, 7,2 Hz e 1,0 Hz), δ 7,58 (1H, *ddd*, $J= 8,3$ Hz, 7,2 Hz e 1,5 Hz), δ 7,32 (1H, *dl*, $J= 8,3$ Hz), os quais foram atribuídos aos hidrogênios H-5, H-6, H-7 e H-8, respectivamente. As multiplicidades destes sinais indicaram a presença de um anel aromático *orto* dissustituído na estrutura **16**. A presença do sinal em δ 6,04 (1H, *s*) indicou um alcaloide 4-R-2-quinolônico, pois este sinal é típico de H-3, neste tipo de estrutura. Além disso, observou-se dois sinais em δ 3,95 (3H, *s*) e δ 3,68 (3H, *s*) relativos a grupos ligados a heteroátomos.

Pelo espectro de RMN de ^{13}C (FIGURA 1.77, p. 188) foi possível observar a presença de 11 sinais, 4 referentes a carbonos aromáticos, sendo o sinal em δ 163,2 referente a uma carboxila de uma lactama; 5 carbonos metínicos e 2 carbonos metílicos. A presença de um sinal de carbono metílico em δ 28,5 indicou que a metila estava diretamente ligada ao nitrogênio, pois se estivesse diretamente ligada ao oxigênio, este sinal estaria mais desblindado. O

sinal de carbono em δ 55,3 sugeriu um carbono de metila ligado a um oxigênio como mostrado na TABELA 1.27 (p. 186).

Assim, a partir dos dados espectroscópicos e comparação com a literatura, a estrutura da substância **16** foi identificada como sendo a do alcaloide N-metil-4-metóxi-2-quinolona. Este alcaloide já havia sido obtido no estudo anterior realizado com o mesmo espécime de *H. superba* Ducke e está sendo descrito pela primeira vez neste estudo em *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani e *H. brasiliiana* Vand. ex DC..

TABELA 1.27: Dados de RMN ^1H e ^{13}C de **16** e comparação com dados da literatura

H/C	Substância 16 (200/50 MHz, CDCl_3)		MAFEZOLI, 2001 (400/100 MHz, CDCl_3)	
	δ (ppm), <i>J</i> (Hz)	δ (ppm)	δ (ppm), <i>J</i> (Hz)	δ (ppm)
2	-	163,2	-	163,8
3	6,04 (1H, <i>s</i>)	95,8	6,05 (1H, <i>s</i>)	96,5
4	-	162,1	-	162,7
5	7,97 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 8,0; 1,5)	122,7	7,96 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 8,0; 1,5)	123,4
6	7,23 (1H, <i>ddd</i> , <i>J</i> = 8,0; 7,2; 1,0)	121,1	7,22(1H, <i>ddd</i> , <i>J</i> = 8,0; 7,1; 1,0)	121,7
7	7,58 (1H, <i>ddd</i> , <i>J</i> = 8,3; 7,2; 1,5)	130,7	7,57(1H, <i>ddd</i> , <i>J</i> = 8,6; 7,1;1,5)	131,2
8	7,32 (1H, <i>dl</i> , <i>J</i> = 8,3)	113,5	7,33 (1H, <i>dl</i> , <i>J</i> = 8,6)	114,1
9	-	139,1	-	139,8
10	-	115,9	-	116,7
4-OMe	3,95 (3H, <i>s</i>)	55,3	3,95 (3H, <i>s</i>)	55,8
N-Me	3,68 (3H, <i>s</i>)	28,5	3,68 (3H, <i>s</i>)	29,1

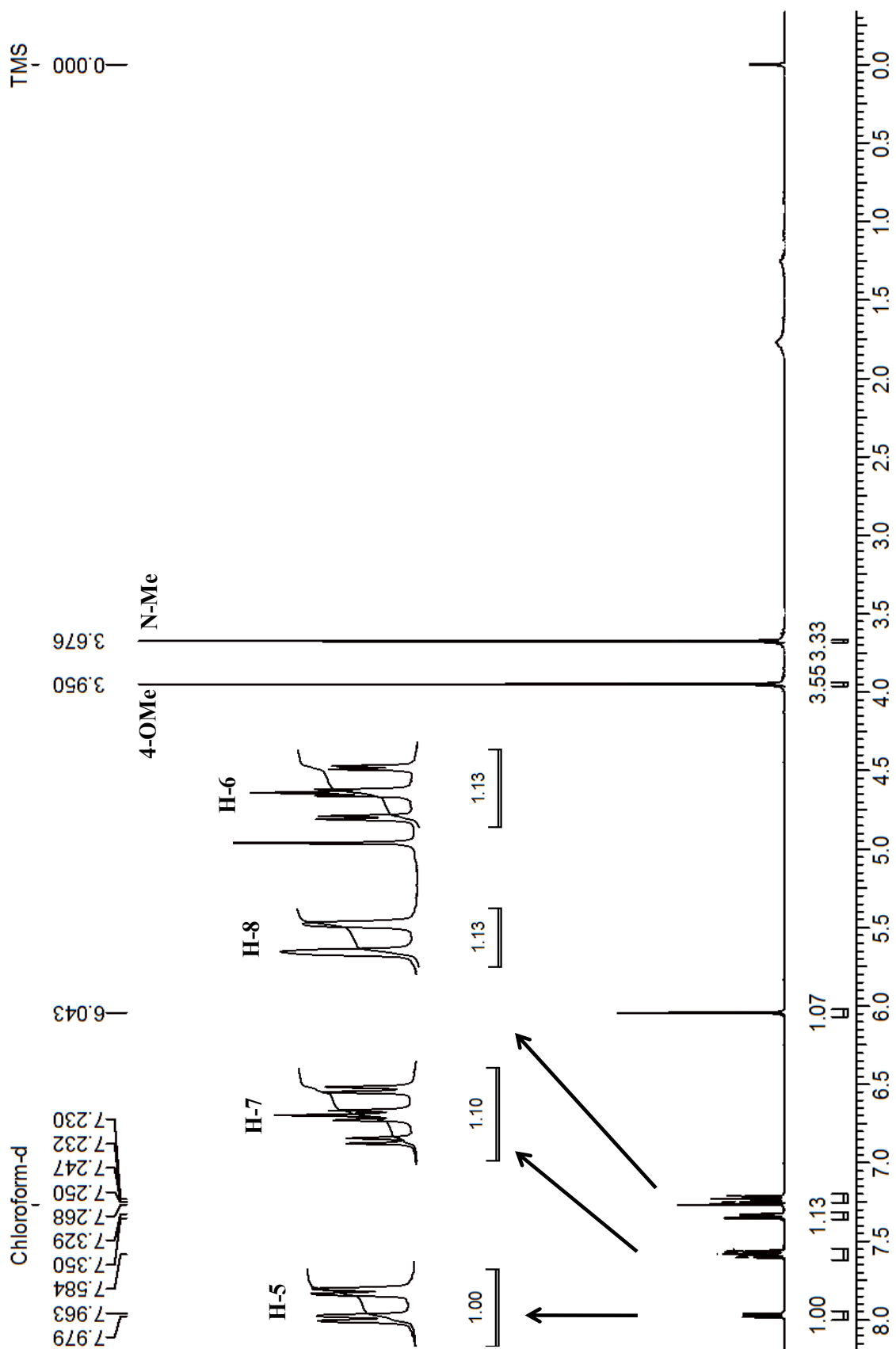


FIGURA 1.76: Espectro de RMN de ^1H de **16** (CDCl_3 , 200 MHz)

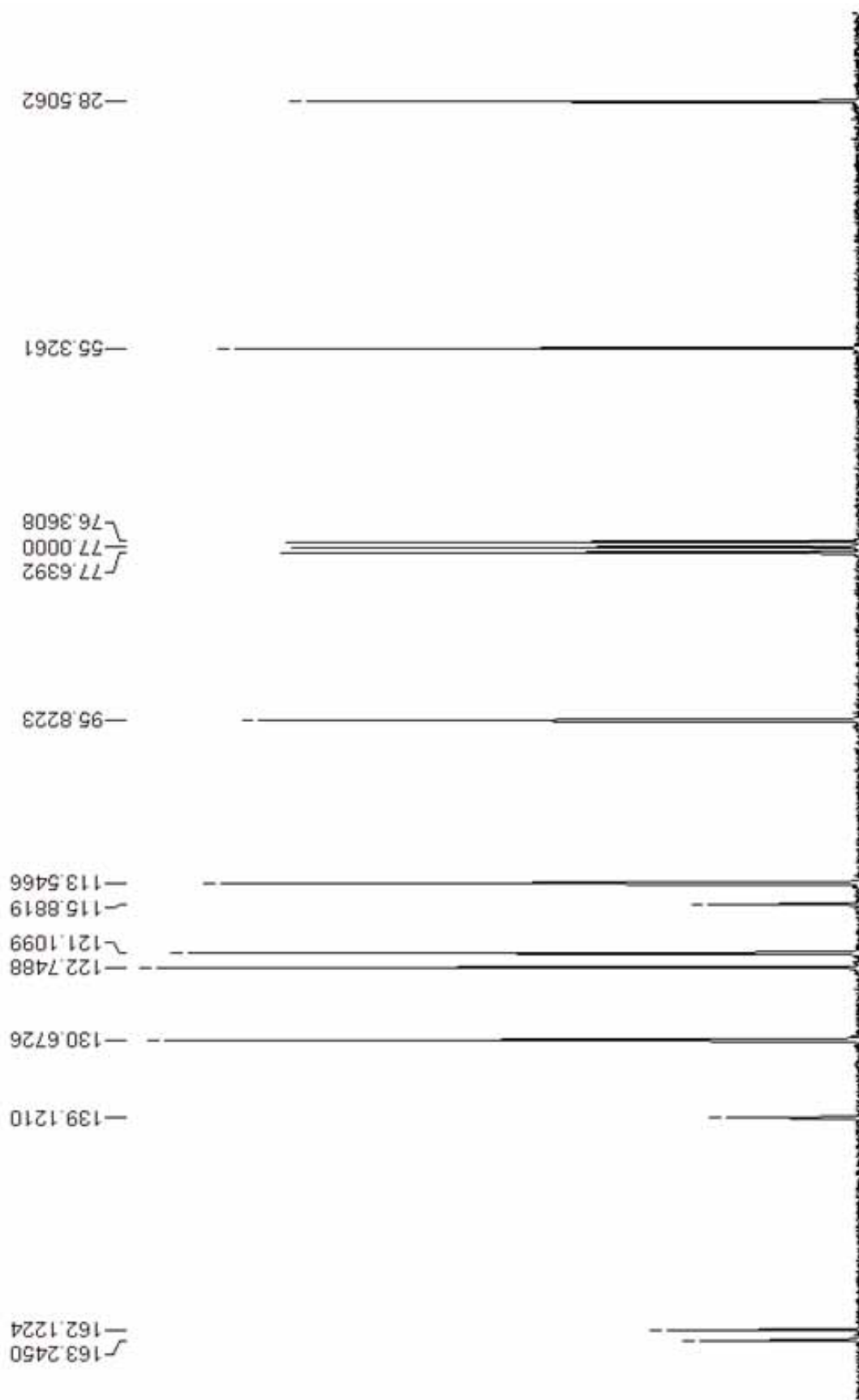
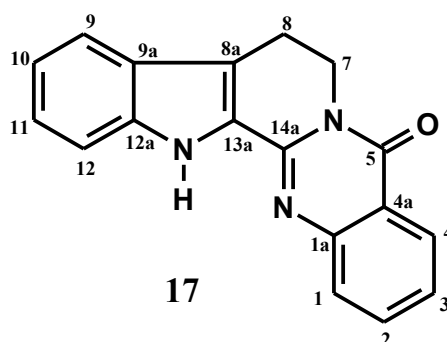


FIGURA 1.77: Espectro de RMN de ^{13}C de **16** (CDCl_3 , 50 MHz)

1.4.4.4 Rutaecarpina – substância 17

A substância **17** foi anteriormente isolada dos três espécimes de *Hortia* por BRAGA (2005) e SEVERINO (2008) que foram investigados novamente no presente trabalho. Neste, foi obtida do extrato metanólico do tronco de *H. superba* Ducke e teve sua estrutura identificada com base em espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e por comparação com dados da literatura (JANUÁRIO *et al.*, 2009).



O espectro de RMN de ^1H de **17** (FIGURA 1.78, p. 191) apresentou sinais de 8 hidrogênios aromáticos na região de δ 8,32 a δ 7,17 e um sinal em δ 9,22 (1H, *s*) relativo ao hidrogênio ligado ao nitrogênio (H-13). Os dois sinais em δ 4,59 (2H, *t*, $J= 7,2$ Hz) e δ 3,24 (2H, *t*, $J= 7,2$ Hz) são relativos aos hidrogênios H-7 e H-8, respectivamente. É possível observar H-4 em δ 8,32 (1H, *ddd*, $J= 8,0$ Hz; 1,2 Hz; 0,5 Hz), acoplando com constantes *orto*, *meta* e *para* com H-3, H-2 e H-1 respectivamente.

O espectro de RMN de ^{13}C (FIGURA 1.79, p. 192) mostrou sinais para 18 carbonos, cujos valores são apresentados na TABELA 1.28 (p. 190).

Desta forma, através da análise dos experimentos de RMN e comparação com dados da literatura, a estrutura da substância **17** foi identificada como sendo a da rutaecarpina.

TABELA 1.28: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **17** e comparação com dados da literatura

H/C	Substância 17 (200/50 MHz, CDCl_3)		JANUÁRIO <i>et al.</i> , 2009 (400/100 MHz, CDCl_3)	
	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm)	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm)
1	7,65 (1H, <i>ddd</i> , $J=7,0;1,2;0,5$)	126,3	7,65 (1H, <i>t</i> , $J=7,2$)	125,6
1a	-	147,0	-	147,3
2	7,73 (1H, <i>ddd</i> , $J=8,4;7,0;1,2$)	134,4	7,71 (1H, <i>ddd</i> , $J=8,0;7,2;1,2$)	134,3
3	7,43 (1H, <i>ddd</i> , $J=8,4;8,0;1,2$)	126,3	7,43 (1H, <i>t</i> , $J=7,2;1,2$)	126,6
4	8,32 (1H, <i>ddd</i> , $J=8,0;1,2;0,5$)	127,3	8,30 (1H, <i>dd</i> , $J=8,0;1,6$)	127,2
4a	-	121,0	-	120,5
5	-	161,4	-	161,6
7	4,59 (2H, <i>t</i> , $J=7,2$)	41,2	4,59 (2H, <i>t</i> , $J=7,0$)	41,1
8	3,24 (2H, <i>t</i> , $J=7,2$)	19,6	3,24 (2H, <i>t</i> , $J=7,0$)	19,7
8a	-	118,7	-	118,4
9	7,65 (1H, <i>dd</i> , $J=8,0;1,2$)	120,1	7,65 (1H, <i>t</i> , $J=7,2$)	120,6
9a	-	125,7	-	127,4
10	7,19 (1H, <i>ddd</i> , $J=8,0;7,2;1,2$)	120,7	7,24 (1H, <i>ddd</i> , $J=7,2;7,2;0,8$)	120,1
11	7,34 (1H, <i>ddd</i> , $J=8,4;7,2;1,2$)	125,8	7,36 (1H, <i>ddd</i> , $J=7,2;7,2;1,2$)	126,2
12	7,43 (1H, <i>dd</i> , $J=8,4;1,2$)	112,2	7,45 (1H, <i>dd</i> , $J=7,2;0,8$)	112,0
12a	-	138,4	-	138,2
13a	-	126,2	-	127,2
14a	-	145,0	-	144,9
N-H	9,22 (1H, <i>s</i>)	-	9,22 (1H, <i>s</i>)	-

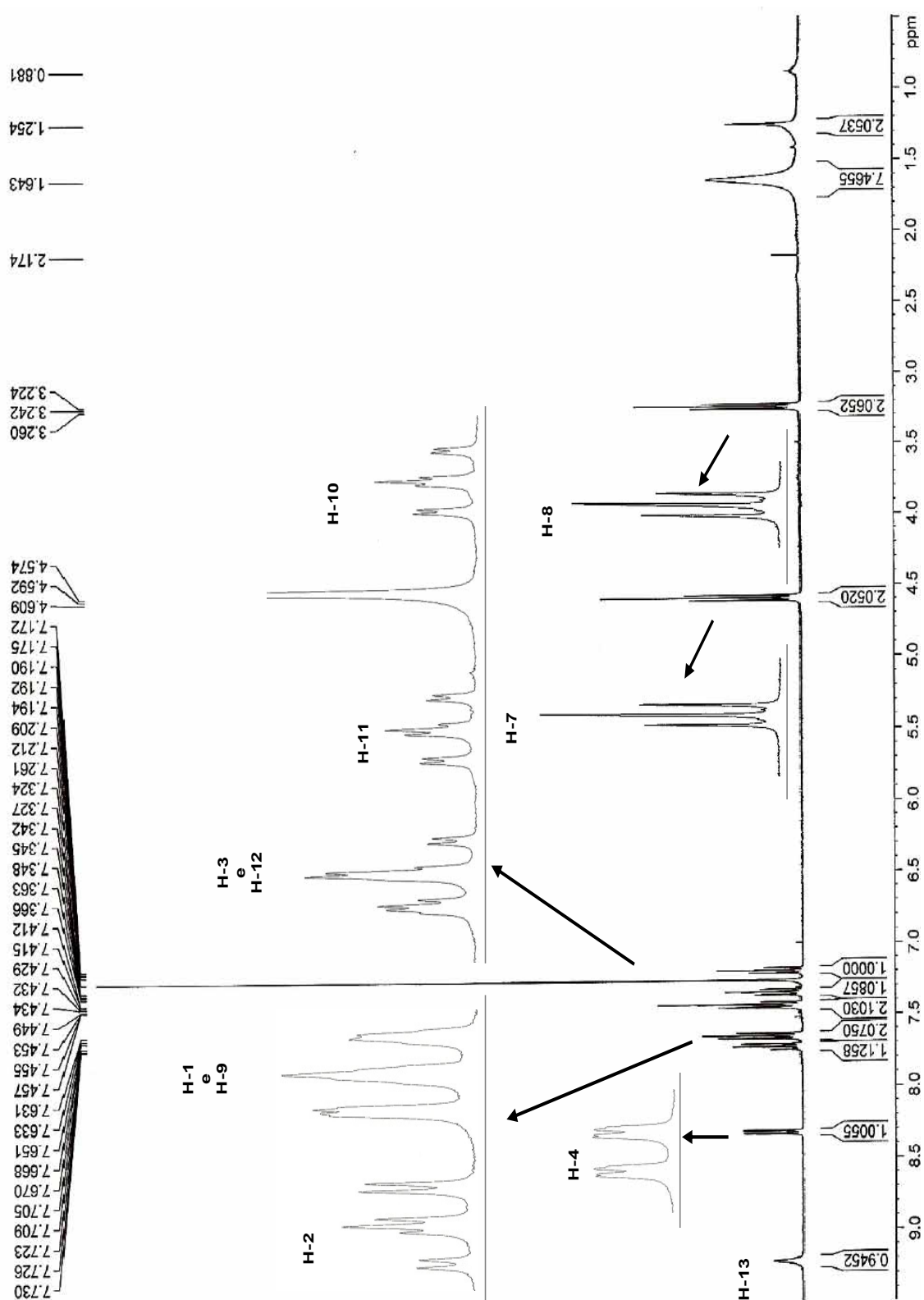


FIGURA 1.78: Espectro de RMN de ^1H de **17** (CDCl_3 , 400 MHz)

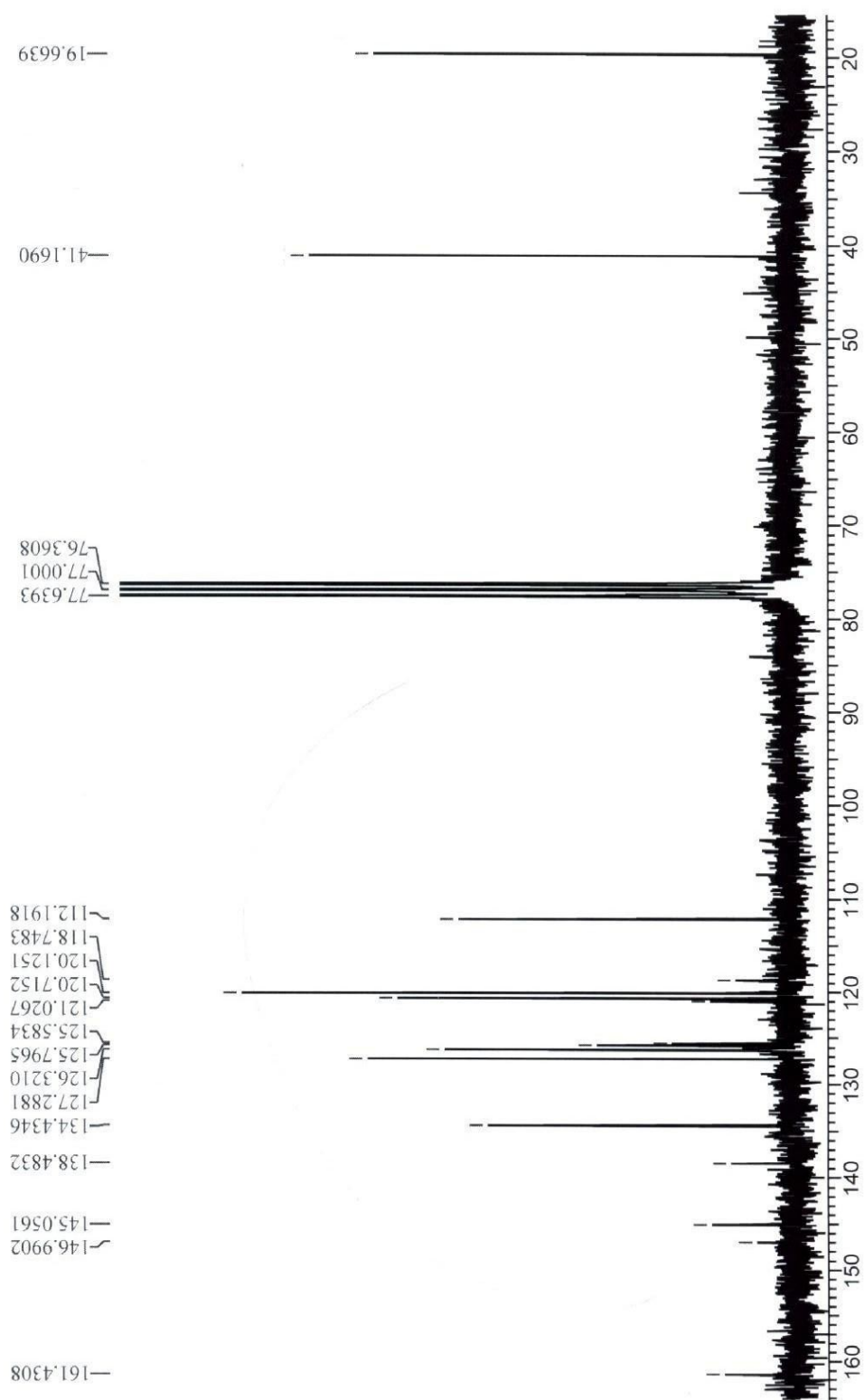
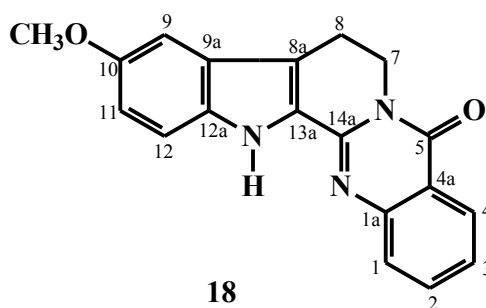


FIGURA 1.79: Espectro de RMN de ^{13}C de 17 (CDCl_3 , 100 MHz)

1.4.4.5 Hortiacina – substância 18

A substância **18** foi isolada dos extratos metanólicos dos troncos de *H. superba* Ducke e *H. brasiliana* Vand. ex DC. e anteriormente de dois dos espécimes estudados no presente trabalho, *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani e *H. brasiliana* Vand. ex DC. (BRAGA, 2005). Sua estrutura foi identificada com base em espectros de RMN de ^1H , HSQC, HMBC e por comparação com dados da literatura (CUCA *et al.*, 1998). Este é o primeiro relato desta substância na espécie *H. superba* Ducke.



O espectro de RMN de ^1H de **18** (FIGURA 1.80, p. 196), similar ao da substância **17**, apresentou sinais de 07 hidrogênios aromáticos na região de δ 8,31 a δ 7,01, um sinal em δ 9,16 (1H, *s*) relativo ao hidrogênio ligado ao nitrogênio e dois sinais em δ 4,58 (2H, *t*, $J= 7,0$ Hz) e δ 3,20 (2H, *t*, $J= 7,0$ Hz) relativos aos hidrogênios H-7 e H-8, respectivamente. A diferença principal do espectro desta substância foi a presença de um sinal de metoxila em δ 3,88 (3H, *s*).

Pelo espectro de RMN de ^1H foi possível observar que o sinal de H-4 em δ 8,31 (1H, *ddd*, $J= 8,0$ Hz, 1,2 Hz e 0,5 Hz) acoplou com constantes *orto*, *meta* e *para* com H-3, H-2 e H-1 respectivamente.

Pelo espectro de HSQC (FIGURA 1.81, p. 197), o sinal do hidrogênio H-8 mostrou correlação com um sinal em δ 19,6; o sinal de H-7 mostrou correlação com um sinal em δ 41,0; o sinal da metoxila correlacionou-

se com um sinal de carbono em δ 55,6 e o sinal de hidrogênio atribuído ao H-4 mostrou correlação com um sinal em δ 127,1.

No espectro de HMBC (FIGURA 1.82, p. 198), o sinal de hidrogênio em δ 4,58 (H-7) mostrou correlação com os sinais em δ 19,6 (C-8) e δ 118,7. O sinal de hidrogênio em δ 3,20 (H-8) mostrou correlação com os sinais em δ 41,0 (C-7), δ 118,7 (mesmo sinal que correlacionou-se H-7) e δ 127,0. Logo, o sinal em δ 118,7 somente pôde ser atribuído ao C-8a, uma vez que este era o único carbono que ambos (H-7 e H-8) poderiam se correlacionar e o sinal em δ 127,0 foi atribuído ao C-9a.

Pelo espectro de hidrogênio pôde-se observar que o sinal em δ 7,01 (*m*) integrou para dois hidrogênios e pelo espectro de HSQC verificou-se a correlação deste sinal com dois sinais de carbonos, sendo um em δ 100,1 (C-11) e outro em δ 116,9 (C-9), o que confirmou a presença de dois hidrogênios e os mesmos foram atribuídos à H-9 e H-11. Um dos sinais em δ 7,01 (1H, *m*) mostrou correlação no HMBC com os sinais em δ 135,3 (C-12a) e δ 118,7 (C-8a); o outro sinal em 7,01 (1H, *m*), que foi atribuído ao H-11, mostrou correlação com o sinal de C-12a em δ 135,3.

No espectro de HMBC, o sinal de H-12 mostrou correlação com os sinais de C-9a (δ 127,0) e C-10 (δ 155,7). Ainda, foi possível observar que o sinal da metoxila em δ 3,88 correlacionou-se com um sinal em δ 155,7, sendo possível posicioná-la em C-10.

Portanto, com base nos experimentos de RMN e comparação com dados da literatura, a estrutura da substância **18** foi identificada como sendo a do hortiacina.

TABELA 1.29: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **18** e comparação com dados da literatura

H/C	Substância 18 (400/100 MHz, CDCl_3)		CUCA <i>et al.</i> , 1998 (300/75 MHz, CDCl_3)	
	δ (ppm), <i>J</i> (Hz)	δ (ppm)	δ (ppm), <i>J</i> (Hz)	δ (ppm)
1	7,65 (1H, <i>ddd</i> , <i>J</i> = 8,2; 1,2; 0,5)	126,5	7,63 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7,2)	126,2
1a	-	146,8	-	147,0
2	7,72 (1H, <i>ddd</i> , <i>J</i> = 8,2; 7,0; 1,2)	134,2	7,75 (<i>ddd</i> , <i>J</i> = 8,4; 7,2; 1,5)	134,5
3	7,42 (1H, <i>ddd</i> , <i>J</i> = 8,0; 7,0; 1,2)	126,2	7,45 (<i>ddd</i> , <i>J</i> = 8,4; 8,0; 1,1)	125,8
4	8,31 (1H, <i>ddd</i> , <i>J</i> = 8,0; 1,2; 0,5)	127,1	8,30 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8,0; 1,5)	127,1
4a	-	120,6	-	120,6
5	-	161,6	-	161,7
7	4,58 (2H, <i>t</i> , <i>J</i> = 7,0)	41,0	4,58 (<i>t</i> , <i>J</i> = 7,0)	41,2
8	3,20 (2H, <i>t</i> , <i>J</i> = 7,0)	19,6	3,21 (<i>t</i> , <i>J</i> = 7,0)	19,5
8a	-	118,7	-	118,4
9	7,01 (1H, <i>m</i>)	116,9	7,01 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,4)	116,9
9a	-	127,0	-	125,2
10	-	155,7	-	154,4
11	7,01 (1H, <i>m</i>)	100,1	7,04 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 7,3; 2,4)	100,3
12	7,42 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9,0)	112,2	7,40 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7,3)	113,1
12a	-	135,3	-	133,8
13	9,16 (1H, <i>s</i>)	-	9,40 (<i>s</i>)	-
13a	-	126,7	-	126,7
14a	-	145,2	-	145,3
10-OMe	3,88 (3H, <i>s</i>)	55,6	3,89 (<i>s</i>)	55,7

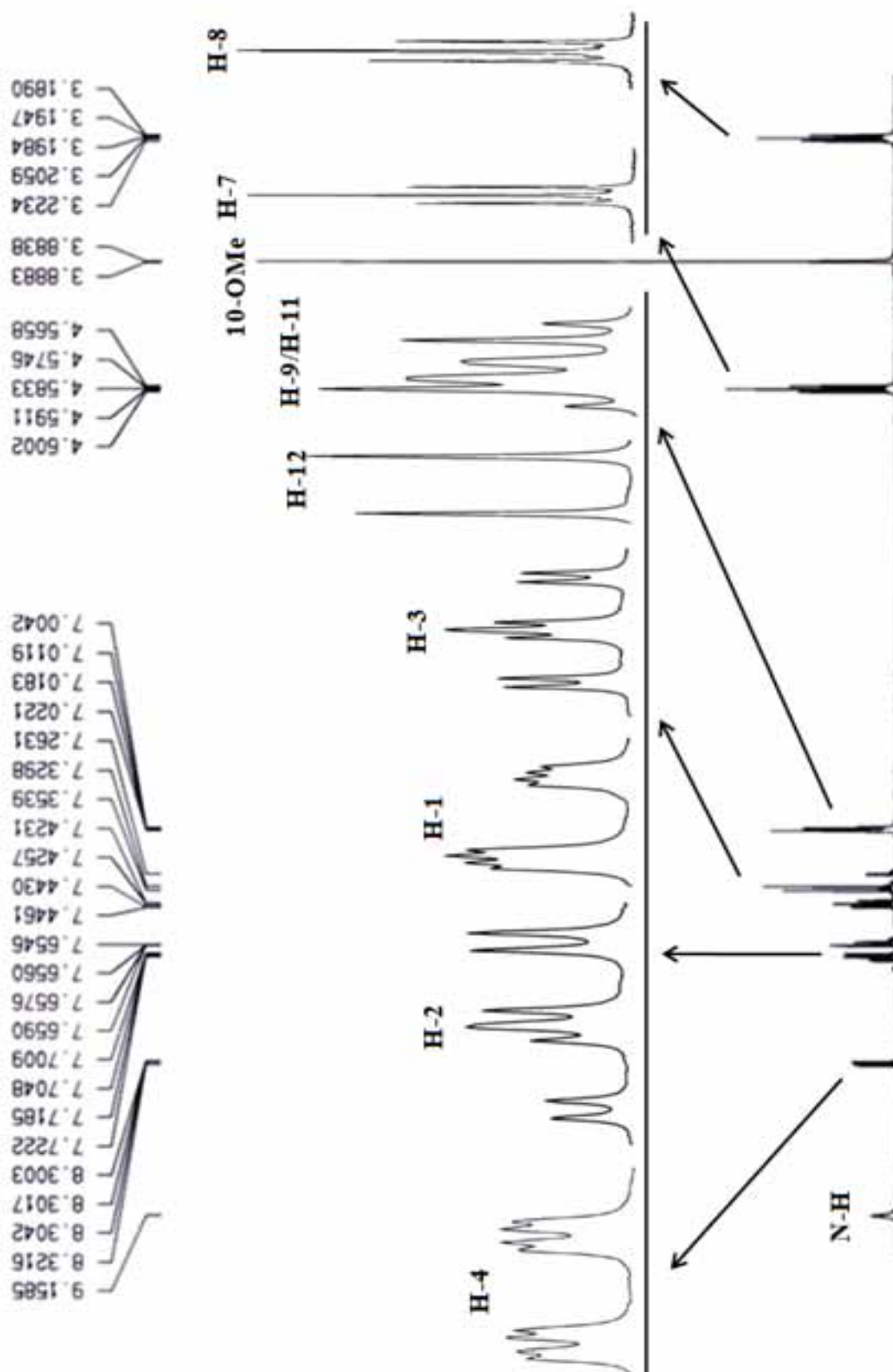


FIGURA 1.80: Espectro de RMN de ^1H de **18** (CDCl_3 , 400 MHz)

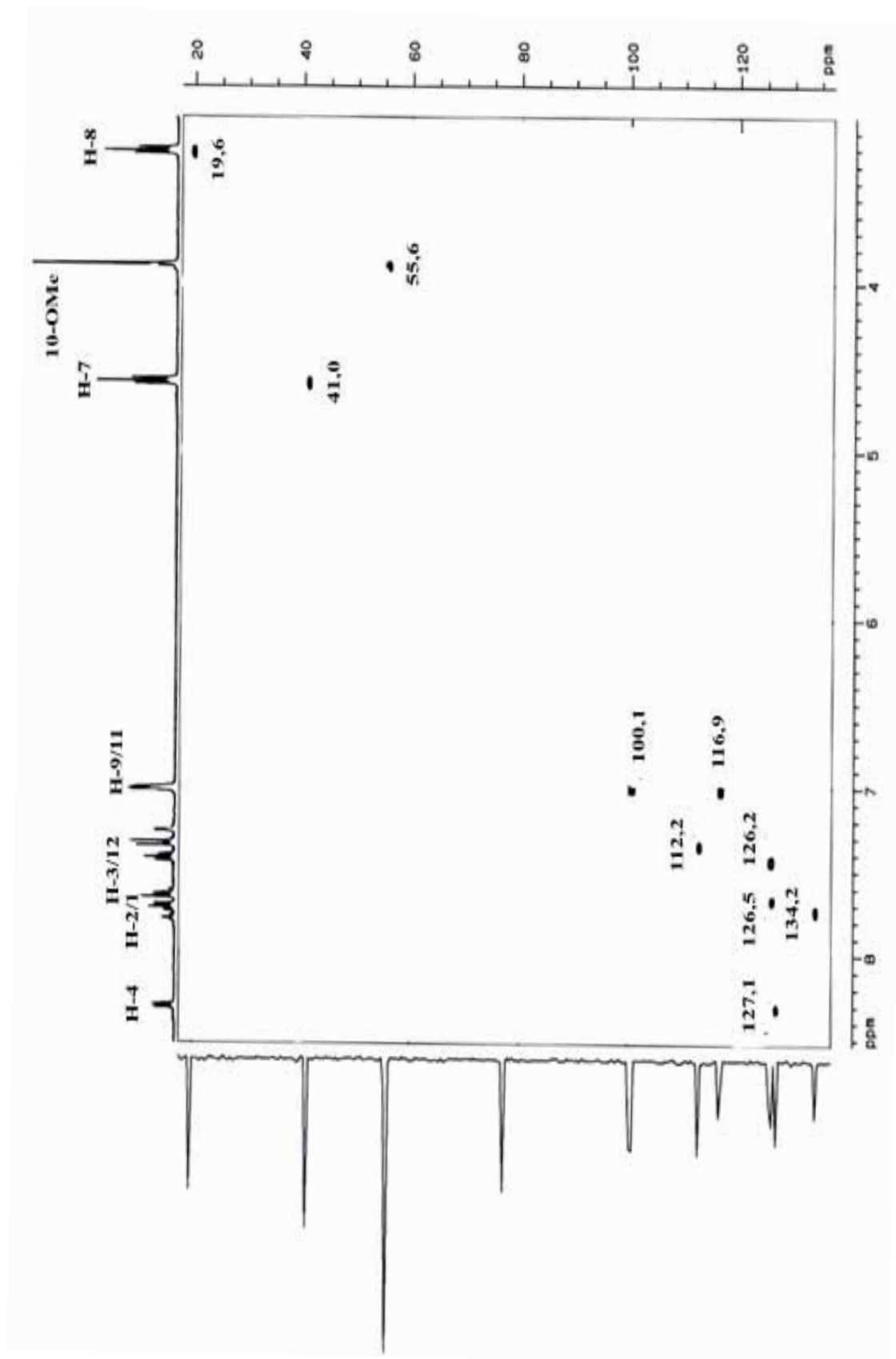


FIGURA 1.81: Mapa de contorno de g-HSQC de **18** (CDCl₃, 400 MHz)

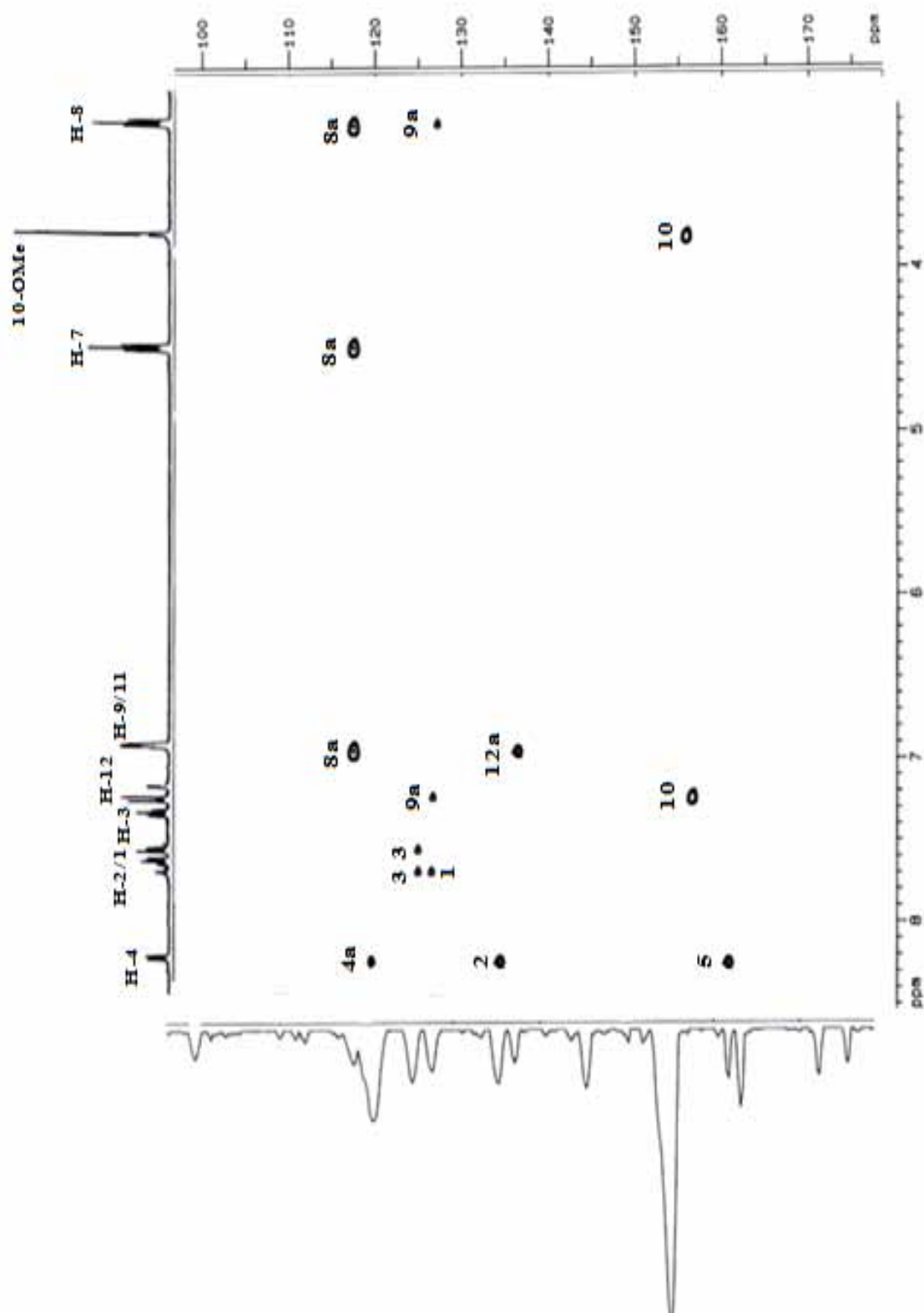


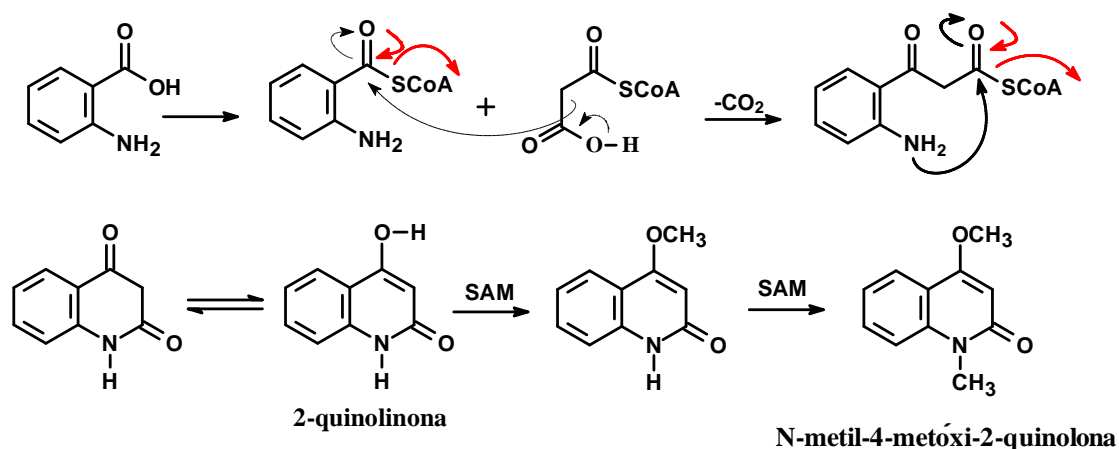
FIGURA 1.82: Mapa de contorno de g-HMBC de **18** (CDCl₃, 400 MHz)

1.4.4.6 Biogênese dos Alcaloides

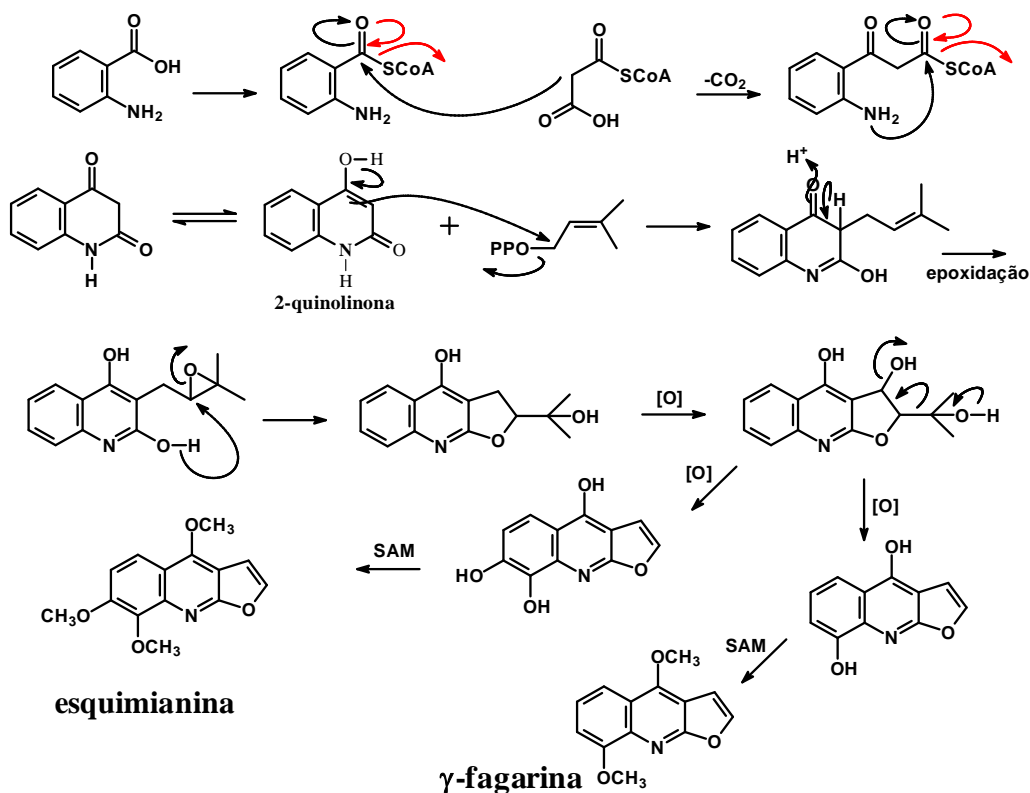
As classes de alcaloides mais abundantes em Rutaceae são aqueles derivados do ácido antranílico. Entre estes, 2-quinolinonas, furoquinolinos, diidropiranoquinolinos, furo-4-quinolinonas, diidropirano-4-quinolinonas e pirano-2-quinolinonas caracterizam a família como um todo (VIEIRA *et al.*, 2011).

O precursor de tais alcaloides forma-se através da condensação entre ácido antranílico e uma unidade de malonil-coenzima A, dando origem ao sistema quinolino, normalmente na forma de 2-quinolinona (VIEIRA *et al.*, 2011) (ESQUEMA 1.9, p. 199).

A diversidade desses alcaloides é devida, em parte, a habilidade biogenética em incorporar uma unidade de pirofosfato de 3,3-dimetilalila ao precursor, sobretudo na posição C-3 que é altamente nucleofílica e susceptível a alquilação. A prenilação em C-3, seguida de etapas como epoxidação da unidade 3',3'-dimetilalila, ciclização via o oxigênio em C-2 e perda da unidade isopropila (perda de acetona e água) leva a formação dos alcaloides furoquinolinos (DEWICK, 2002; VIEIRA *et al.*; 2011) (ESQUEMA 1.10, p. 200).

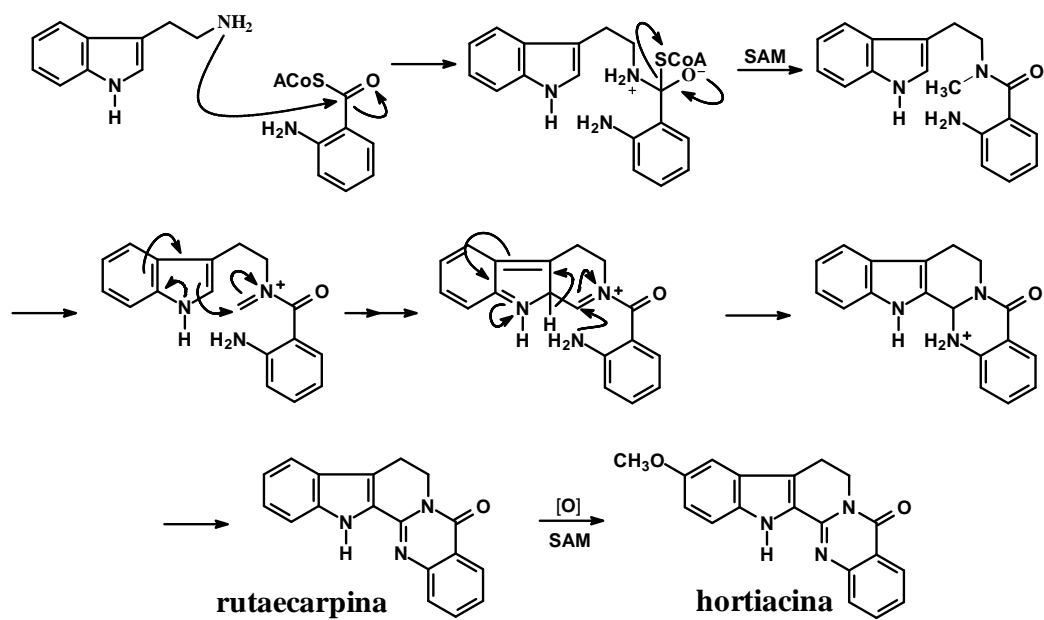


ESQUEMA 1.9: Proposta de biogênese para alcaloides do tipo 2-quinolona



ESQUEMA 1.10: Proposta de biogênese para alcaloides do tipo furoquinolínico

Os alcaloides do tipo indoloquinazolínico têm origem biogenética através da condensação de uma unidade de ácido antranílico e triptamina ou triptofano. Experimento de marcação isotópica não deixou claro se a biossíntese de alcaloides como a rutaecarpina e a esquimianina inicia-se com o triptofano levando à perda da carboxila após a formação do esqueleto β-indoloquinazolino ou se são duas rotas: uma iniciando com a triptamina levando aos alcaloides do tipo rutaecarpina, e outra iniciando com triptofano levando a um esqueleto como 7-carboxievodiamina, um alcaloide isolado de *Euodia* (*Evodia*) *rutaecarpa* (MESTER, 1983), em que a carboxila do triptofano permanece no esqueleto. Como é conhecido em plantas que a coenzima piridoxal-5'-fosfato (vitamina B₆) transforma triptofano em triptamina (GEISSMANN & CROUT, 1969), é possível supor a existência de duas rotas biossintéticas (VIEIRA *et al.*, 2011). A proposta da biogênese para os alcaloides rutaecarpina e hortiacina é apresentada no ESQUEMA 1.11 (p. 201), considerando a triptamina.



ESQUEMA 1.11: Proposta de biogênese para alcaloides do tipo indoloquinazolínico

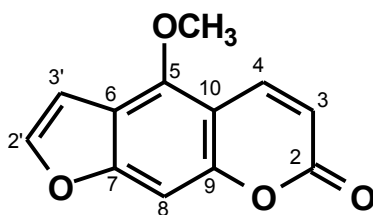
1.4.5 Identificações Estruturais das Cumarinas Isoladas de Plantas do Gênero *Hortia*:

Cumarinas são substâncias amplamente encontradas em plantas de diversas famílias, entretanto, espécies pertencentes às famílias Rutaceae e Umbelliferae, representam as fontes mais ricas destes metabólitos, os quais ocorrem com grande diversidade estrutural (ALBARICI *et al.*, 2010). A maior característica na diversificação dos esqueletos de cumarinas tanto em Rutaceae quanto em Umbelliferae está na incorporação de grupamentos prenils (GRAY *et al.*, 1978).

Várias cumarinas têm sido isoladas do gênero *Hortia*, como apresentado na TABELA 1.4 (ps. 11 a 14). Neste estudo foram isoladas três cumarinas, sendo uma furano cumarina linear (bergapteno) (**substância 19**) e duas piranocumarinas angulares (seselina e 5-metóxi-seselina) (**substâncias 20 e 21**), duas das quais (**19 e 21**) já haviam sido obtidas de estudos realizados com o mesmo espécime de *H. oreadica* Groppo, Kallunki e Pirani investigado no presente trabalho (BRAGA, 2005; SEVERINO, 2008).

1.4.5.1 Bergapteno – substância 19

A substância **19** foi isolada dos extratos metanólicos do tronco de *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani e *H. brasiliiana* Vand. ex DC. e teve sua estrutura identificada através de experimento de RMN de ^1H e ^{13}C e comparação com dados da literatura (MULLER *et al.*, 2004; BRAGA, 2005). Este é o primeiro relato desta estrutura na espécie *H. brasiliiana* Vand. ex DC..



19

O espectro de RMN de ^1H de **19** (FIGURA 1.83, p. 205), apresentou sinais em δ 8,15 (1H, *dd*, $J= 9,8$ Hz e 0,6 Hz) e δ 6,27 (1H, *d*, $J= 9,8$ Hz) que foram atribuídos aos hidrogênios H-4 e H-3, respectivamente. Os sinais em δ 7,60 (1H, *d*, $J= 2,6$ Hz) e δ 7,02 (1H, *dd*, $J= 2,6$ Hz e 1,0 Hz) foram atribuídos aos hidrogênios H-2' e H-3' do anel furano, respectivamente. Como o sinal de H-3' apresentou-se como um duplo dubleto, esta característica indicou a presença de hidrogênio ligado a C-8. Ainda pelo espectro de hidrogênio, foi observado um singlete largo integrando para um hidrogênio em δ 7,14, o qual foi atribuído ao H-8. O sinal atribuído ao H-4 em δ 8,15, mais desblindado do que o habitual (δ 7,60), indicou a presença de um grupo metoxila em C-5. Assim, o sinal em δ 4,27 (3H, *s*) foi atribuído à metoxila ligada ao anel aromático da estrutura. O fato do sinal da metoxila estar tão desblindado sugeriu uma cumarina linear. MURRAY & JORGE (1984) observaram que os deslocamentos químicos dos grupos metoxilas quando maiores que δ 4,15 indicam linearidade nas furanocumarinas e quando menores que δ 4,15 caracterizam furanocumarinas angulares.

A multiplicidade observada para H-4 foi justificada pelo acoplamento a longa distância com o sinal de H-8 em δ 7,14, com constante bastante pequena (0,6 Hz). O mesmo acoplamento a longa distância foi observado entre H-3' e H-8, com constante também pequena (1,0 Hz) (LASSAK *et al.*, 1967). Estes acoplamentos a longa distância também justificaram posicionar o grupo metoxila em C-5, pois caso a metoxila estivesse posicionada em C-8, os mesmos não seriam observados.

Todos os sinais referentes aos hidrogênios e carbonos foram atribuídos baseando-se em dados da literatura e são apresentados na TABELA 1.30 (p. 204).

Portanto, com base nos experimentos de RMN e dados da literatura, a estrutura da substância **19** foi atribuída a da furanocumarina bergapteno.

TABELA 1.30: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **19** e comparação com dados da literatura

H/C	Substância 19 (200/50 MHz, CDCl_3)		MULLER <i>et al.</i> , 2004 (400/100 MHz, CDCl_3)	
	δ (ppm), <i>J</i> (Hz)	δ (ppm)	δ (ppm), <i>J</i> (Hz)	δ (ppm)
2	-	161,2	-	160,3
3	6,27 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9,8)	112,6	6,26 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9,8)	112,6
4	8,15 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 9,8; 0,6)	139,2	8,16 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9,8)	139,6
5	-	149,6	-	149,7
6	-	112,8	-	114,0
7	-	158,4	-	158,3
8	7,14 (1H, <i>sl</i>)	93,9	7,16 (1H, <i>s</i>)	94,0
9	-	152,8	-	152,7
10	-	106,5	-	106,4
2'	7,60 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,6)	144,8	7,60 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,5)	144,9
3'	7,02 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 2,6; 1,0)	105,0	7,01 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,5)	105,2
5-OMe	4,27 (3H, <i>s</i>)	60,1	4,26 (3H, <i>s</i>)	60,4

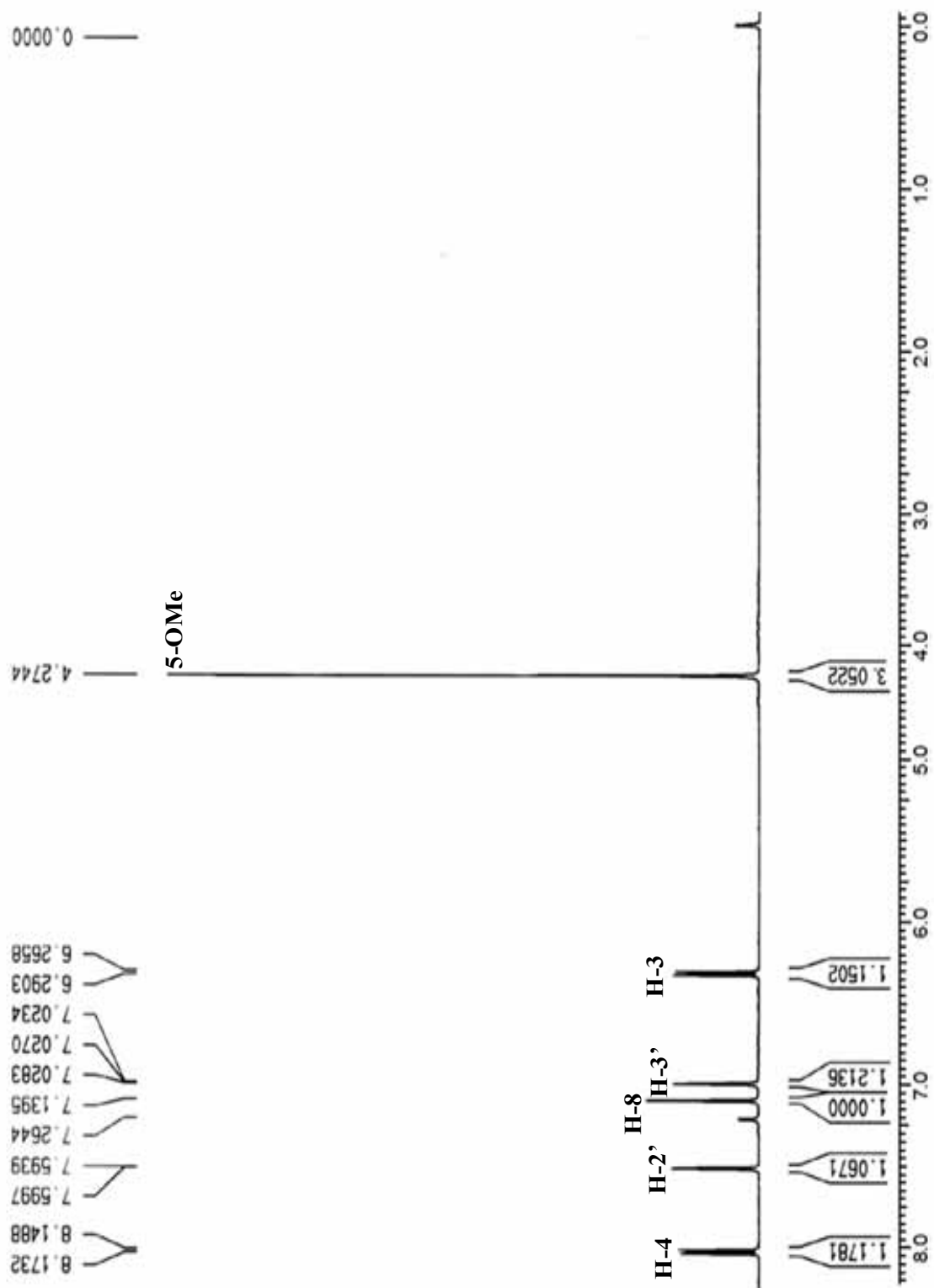


FIGURA 1.83: Espectro de RMN de ^1H de **19** (CDCl_3 , 200 MHz)

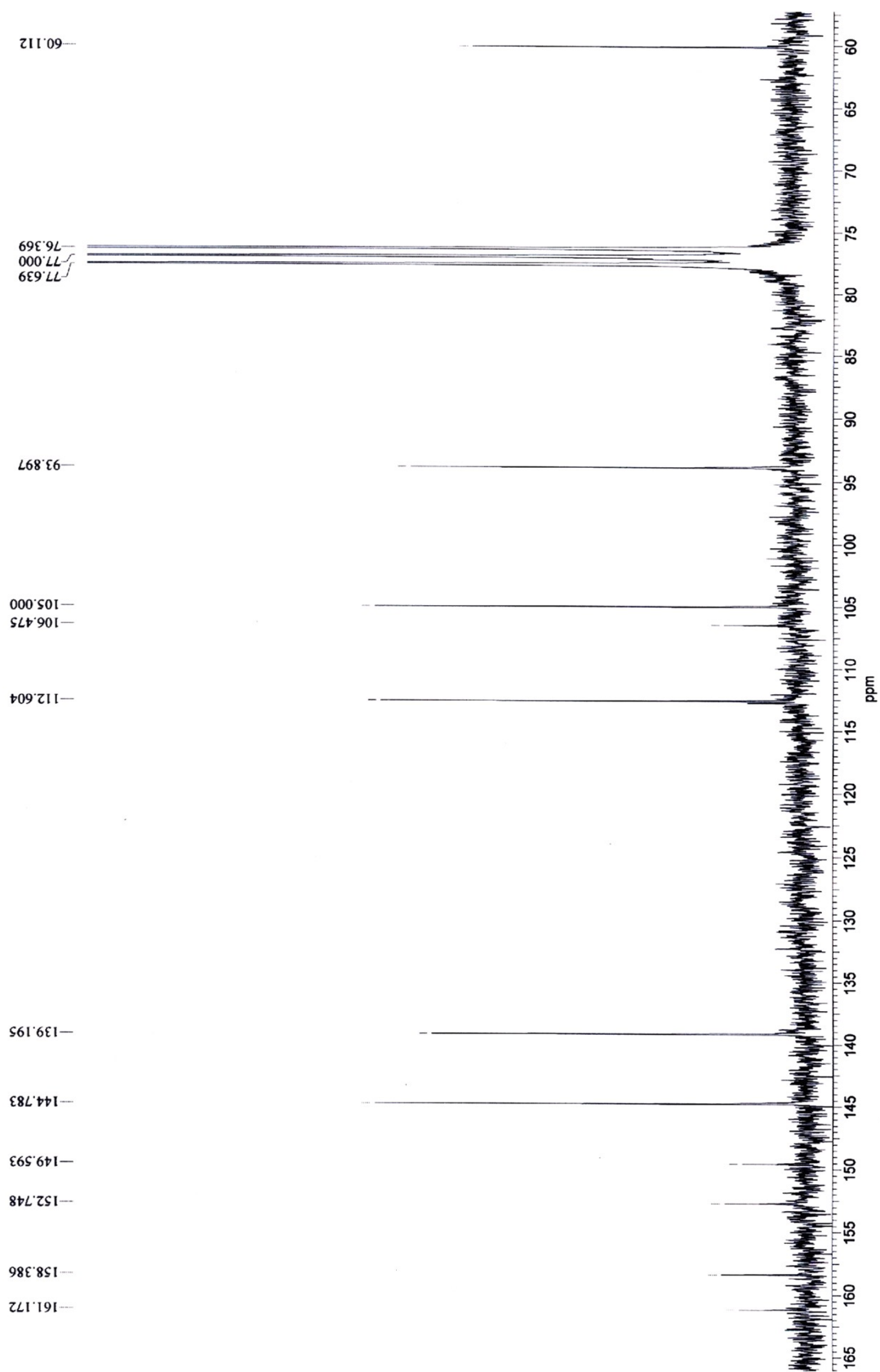
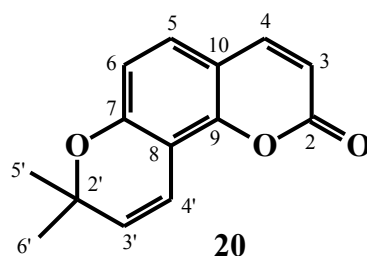


FIGURA 1.84: Espectro de RMN de ^{13}C de 19 (CDCl_3 , 50 MHz)

1.4.5.2 Seselina – substância 20

A substância **20** foi isolada do extrato metanólico do tronco de *H. superba* Ducke e teve sua estrutura identificada através de experimento de RMN de ^1H e ^{13}C e comparação com dados da literatura (AHMAD *et al.*, 1984). Este é o primeiro relato desta estrutura no gênero *Hortia*.



O espectro de RMN de ^1H de **20** (FIGURA 1.85, p. 209) apresentou sinais que caracterizam a classe estrutural das cumarinas, com a presença de dois dubletos do anel lactônico, sendo um em δ 6,24 (1H, *d*, $J= 9,4$ Hz) e o outro em δ 7,61 (1H, *d*, $J= 9,4$ Hz); dois dubletos em δ 6,89 (1H, *d*, $J= 10$ Hz) e δ 5,74 (1H, *d*, $J= 10$ Hz) e um singlete em δ 1,49 referentes aos sinais de um anel pirano. Além desses sinais, o espectro de RMN de ^1H apresentou dois dubletos em δ 6,73 e δ 7,22 com $J= 8,5$ Hz, referentes aos hidrogênios aromáticos H-6 e H-5, respectivamente, com acoplamento em *orto*. Esse acoplamento em *orto* evidenciou a angularidade da molécula, ou seja, a localização do anel pirano nas posições 7 e 8 da estrutura da cumarina. Todos os valores de hidrogênios e carbonos obtidos nos espectros foram comparados e confirmados com dados da literatura.

Todos os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C (FIGURA 1.86, p.210) são apresentados na TABELA 1.31 (p. 208).

Portanto, pela análise dos experimentos de RMN e comparação com dados da literatura foi possível identificar a estrutura da substância **20** como sendo a da seselina.

TABELA 1.31: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **20** e comparação com dados da literatura

H/C	Substância 20 (200/50 MHz, CDCl_3)		AHMAD <i>et al.</i> , 1984 (200/50 MHz, CDCl_3)	
	δ (ppm), <i>J</i> (Hz)	δ (ppm)	δ (ppm), <i>J</i> (Hz)	δ (ppm)
2	-	161,0	-	161,1
3	6,24 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9,4)	130,7	6,23 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9,6)	130,7
4	7,61 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9,4)	143,9	7,60 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9,6)	143,9
5	7,22 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,5)	127,7	7,21 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,4)	127,7
6	6,73 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,5)	115,0	6,72 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,4)	115,0
7	-	156,3	-	156,4
8	-	-	-	122,6
9	-	150,1	-	150,1
10	-	109,3	-	109,4
2'	-	77,0	-	77,6
3'	5,74 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 10,0)	112,6	5,73 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 10,0)	112,6
4'	6,89 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 10,0)	113,5	6,89 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 10,0)	113,5
5'	1,49 (3H, <i>s</i>)	28,1	1,48 (3H, <i>s</i>)	28,1
6'	1,49 (3H, <i>s</i>)	28,1	1,48 (3H, <i>s</i>)	28,1

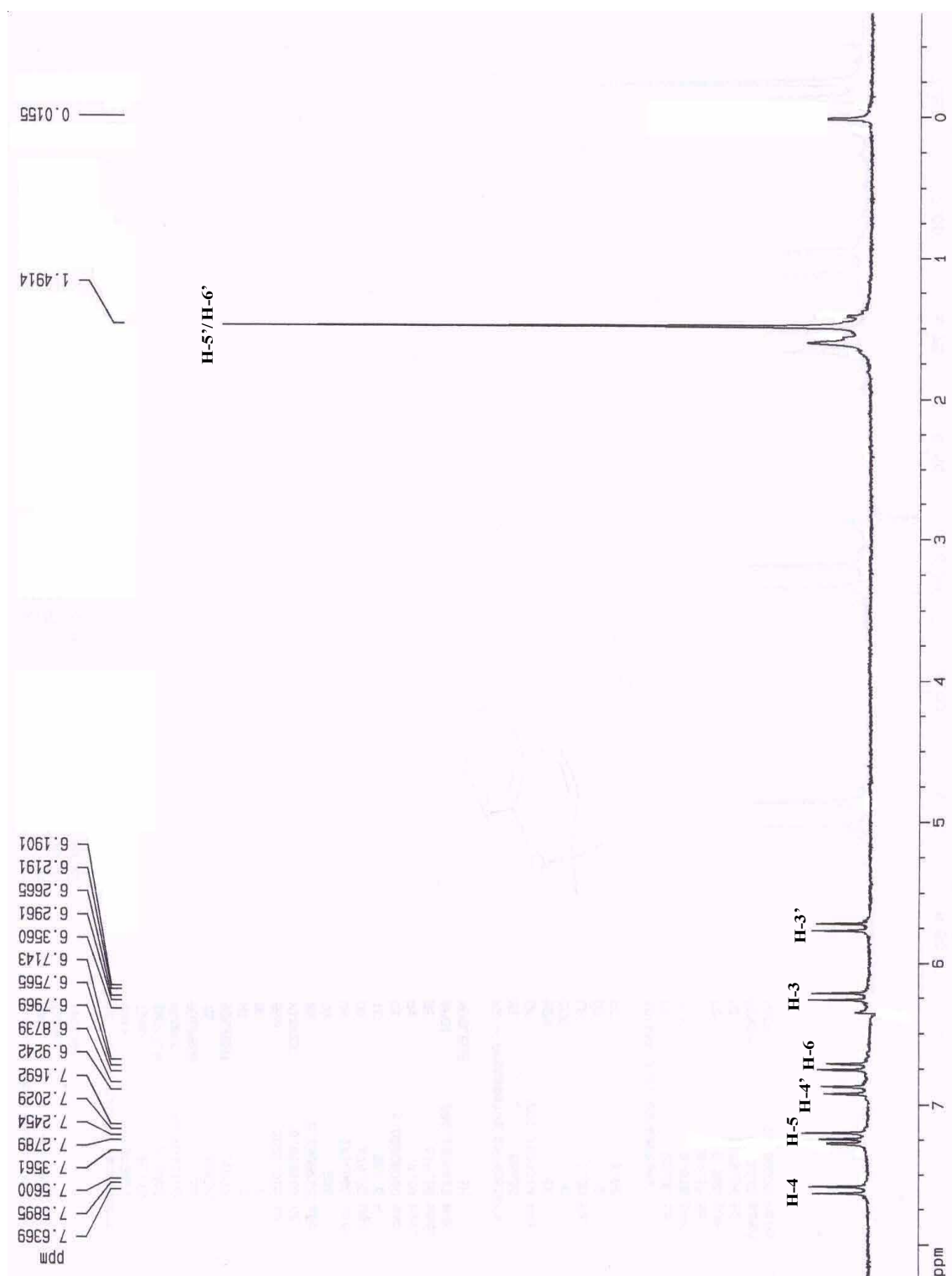


FIGURA 1.85: Espectro de RMN de ^1H de **20** (CDCl_3 , 200 MHz)

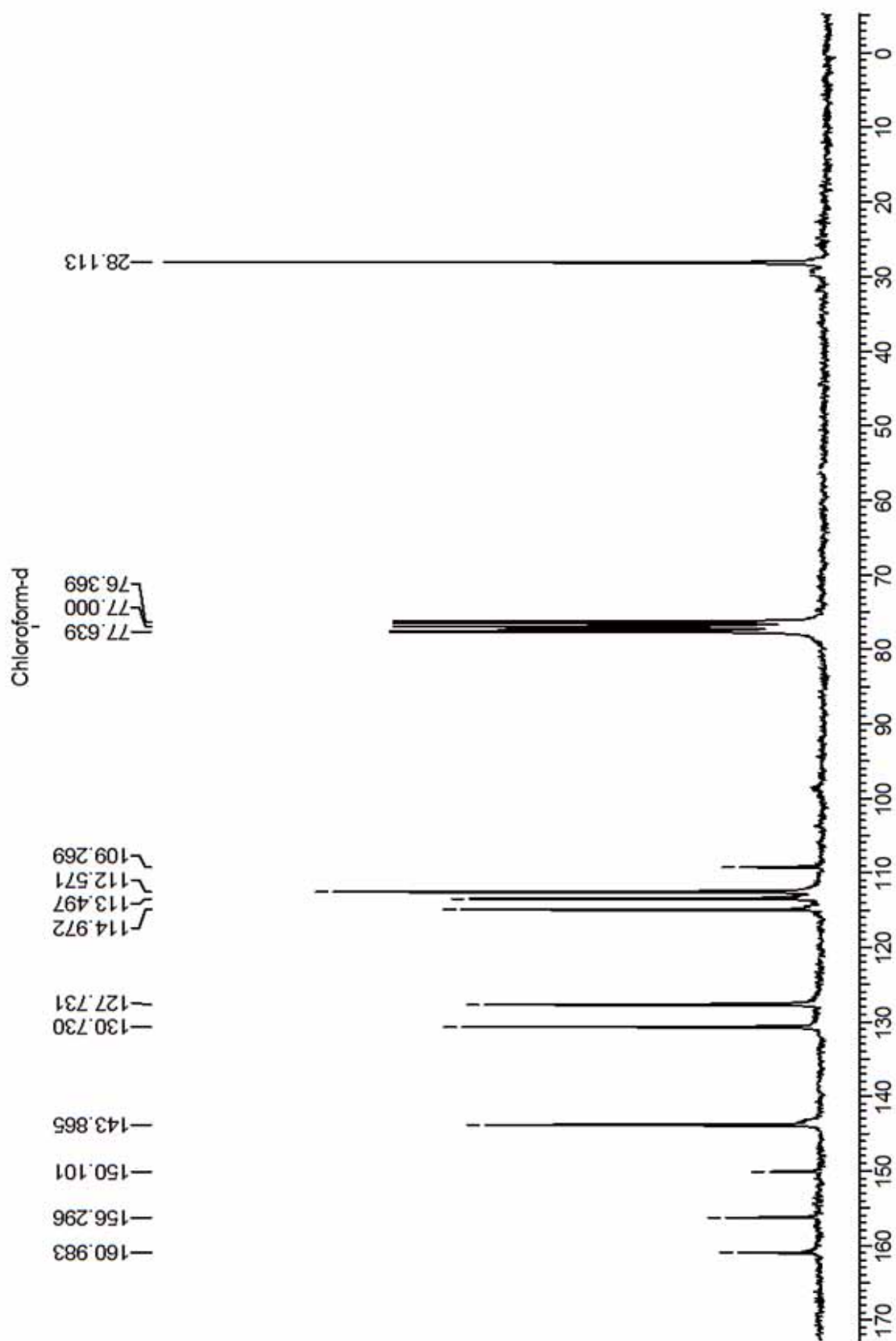
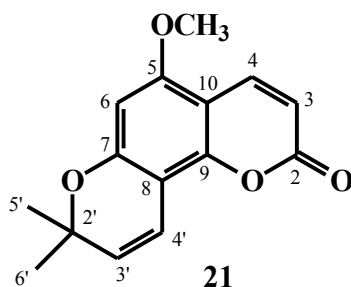


FIGURA 1.86: Espectro de RMN de ^{13}C de **20** (CDCl_3 , 50 MHz)

1.4.5.3 5-Metóxi-seselina – substância 21

A substância **21** foi isolada dos extratos metanólicos do tronco de *H. brasiliiana* Vand. ex DC. e *H. superba* Ducke e teve sua estrutura identificada através de experimento de RMN de ^1H , ^{13}C e comparação com dados da literatura (BRAGA, 2005; MELLIU *et al.*, 2005).



O espectro de RMN de ^1H de **21** (FIGURA 1.87, p. 213) revelou a presença de dois dubletos em δ 7,95 e δ 6,12 integrando para um hidrogênio cada, com a constante de acoplamento $J=9,7$ Hz relativos aos hidrogênios H-4 e H-3, respectivamente. O deslocamento químico de H-4 próximo a δ 8,0 sugeriu uma substituição na posição C-5. Foi possível observar também um duplo dubleto em δ 6,79 ($J=10,0$ Hz e 0,6 Hz) e um dubleto em δ 5,57 (1H, $J=10,0$ Hz) integrando para um hidrogênio cada, atribuídos aos hidrogênios H-4' e H-3', respectivamente, evidenciando a presença de um anel pirano na estrutura. O espectro de hidrogênio ainda apresentou um sinal em δ 6,23 (1H, *sl*) relativo a um hidrogênio aromático, além dos sinais em δ 3,88 (3H, *s*) e 1,46 (6H, *s*) referentes à metoxila e as metilas do anel pirano, respectivamente.

O espectro de RMN de ^{13}C (FIGURA 1.88, p. 214) mostrou sinais referentes a 14 carbonos. Todos os valores de hidrogênio e carbono obtidos nos espectros foram comparados e confirmados com dados da literatura e são apresentados na TABELA 1.32 (p. 212).

Portanto, pela análise dos experimentos de RMN e comparação com dados da literatura foi possível identificar a estrutura da substância **21** como sendo a da 5-metóxi-seselina.

TABELA 1.32: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **21** e comparação com dados da literatura

H/C	Substância 21 (200/50 MHz, CDCl_3)		BRAGA, 2005 (^1H , 200 MHz, CDCl_3)	MELLIU <i>et al.</i> , 2005 (^{13}C , 50 MHz, CDCl_3)
	δ (ppm), <i>J</i> (Hz)	δ (ppm)	δ (ppm), <i>J</i> (Hz)	δ (ppm)
2	-	161,2	-	161,1
3	6,12 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9,7)	110,3	6,13 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9,6)	110,2
4	7,95 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9,7)	138,9	7,96 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9,6)	138,9
5	-	156,5	-	156,4
6	6,23 (1H, <i>sl</i>)	95,3	6,23 (1H, <i>sl</i>)	95,2
7	-	157,4	-	157,3
8	-	102,5	-	102,4
9	-	151,0	-	150,9
10	-	103,6	-	103,5
2'	-	77,9	-	77,8
3'	5,57 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 10,0)	127,5	5,57 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 10,0)	127,4
4'	6,79 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 10,0; 0,6)	114,9	6,79 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 10,0; 0,5)	114,8
5'-Me	1,46 (3H, <i>s</i>)	28,1	1,46 (3H, <i>s</i>)	28,0
6'-Me	1,46 (3H, <i>s</i>)	28,1	1,46 (3H, <i>s</i>)	28,0
5-OMe	3,88 (3H, <i>s</i>)	55,9	3,88 (3H, <i>s</i>)	55,8

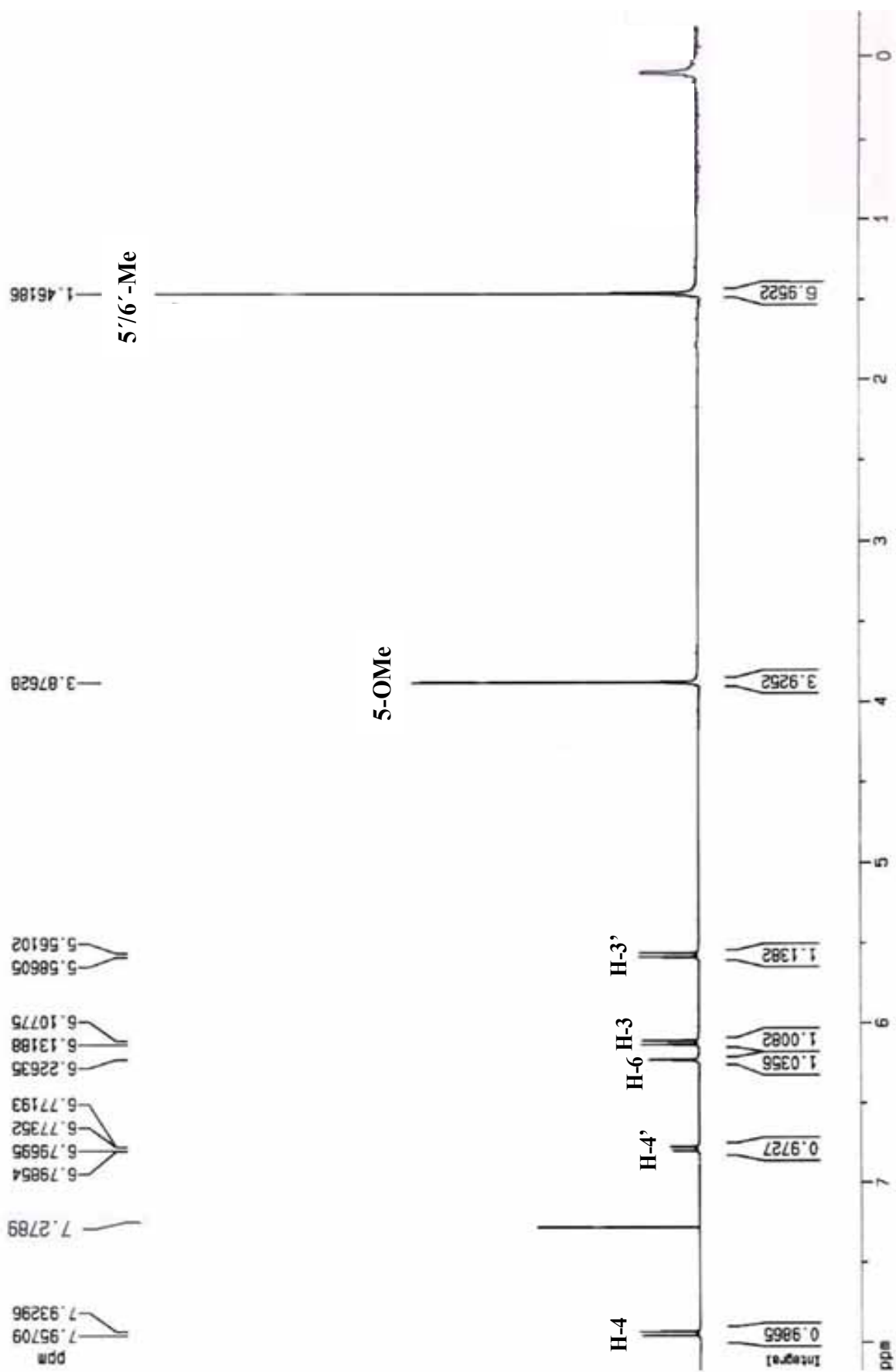


FIGURA 1.87: Espectro de RMN de ^1H de **21** (CDCl_3 , 400 MHz)

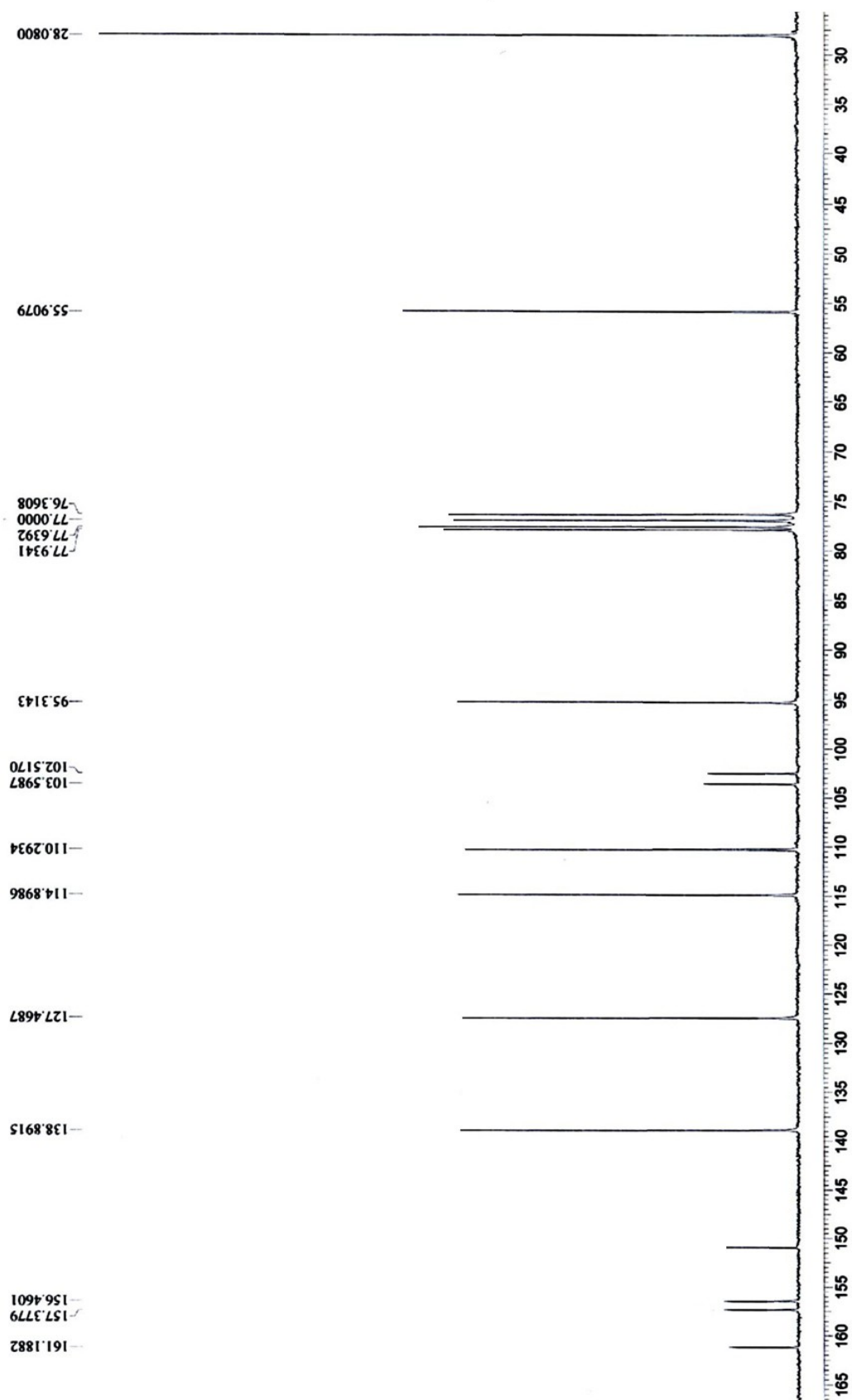
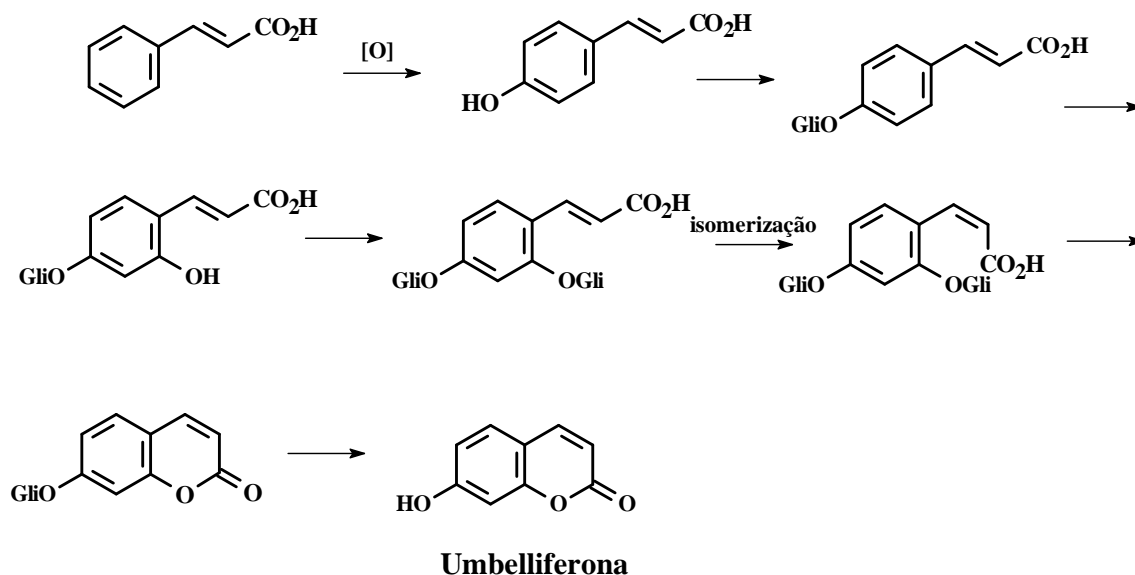


FIGURA 1.88: Espectro de RMN de ^{13}C de **21** (CDCl_3 , 100 MHz)

1.4.5.4 Biogênese das Cumarinas

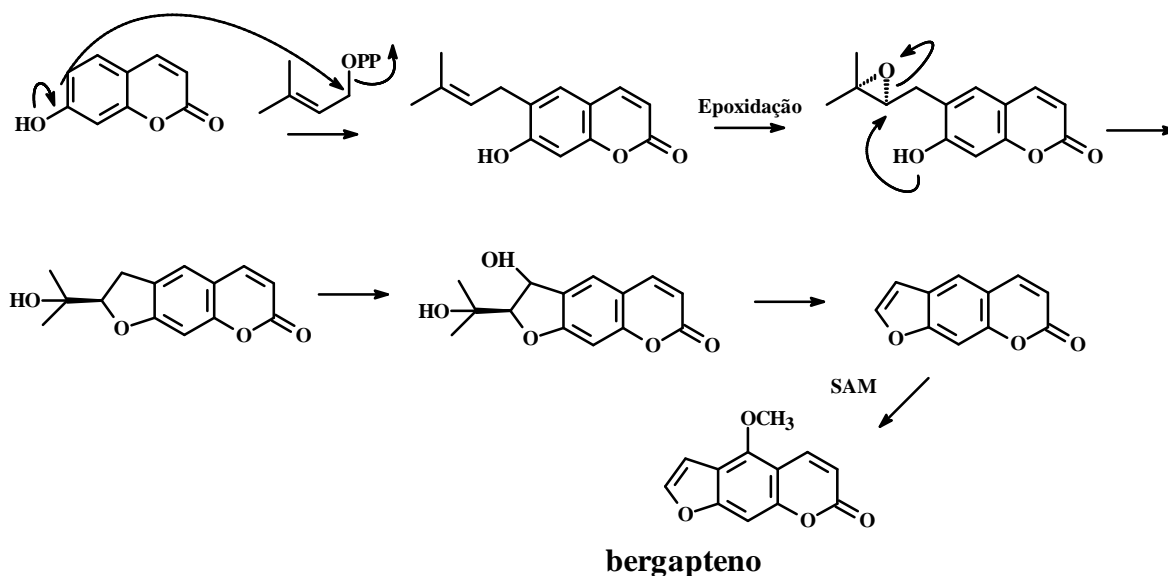
As cumarinas são derivadas do ácido *trans*-cinâmico que por oxidação resulta no ácido *trans*-*p*-cumárico (precursor geral das cumarinas 7-oxigenadas), o qual sofre glicolisações, isomerização *cis* e ciclização formando a umbelliferona, precursor mais eficiente das furanos e piranocumarinas de acordo com experimentos realizados por NIELSEN (1970) e MOLHO *et al.* (1971), como mostrado no ESQUEMA 1.12 (p. 215).



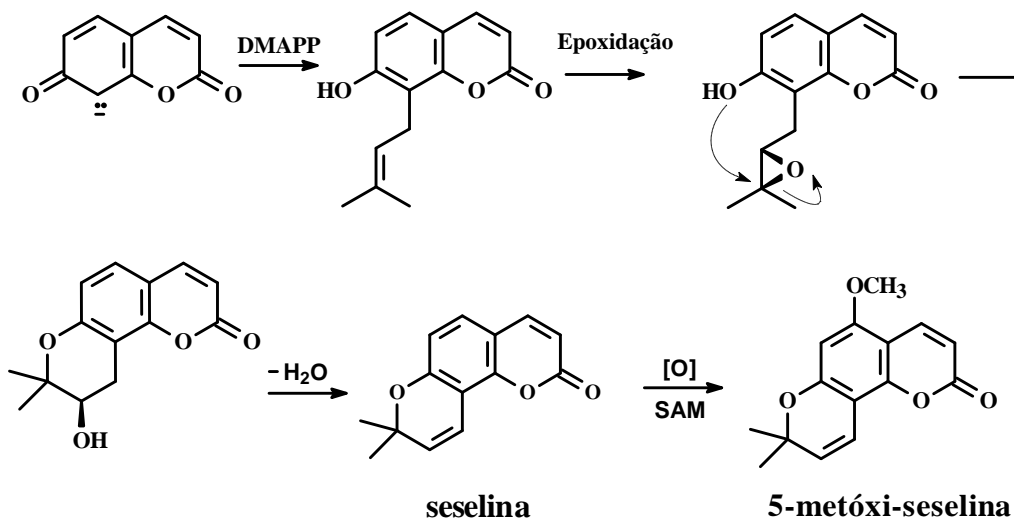
ESQUEMA 1.12: Biossíntese da umbelliferona

A principal característica na diversificação das cumarinas é a incorporação de unidades prenila enzimaticamente controlada. As prenilações nas posições C-6 ou C-8 do anel de umbelliferona leva a formação do anel furano e piranocumarina via epoxidação da ligação dupla carbono-carbono (MURRAY *et al.*, 1982). Para a formação das furanocumarinas, admite-se a hidrólise do epóxido, hidroxilação na posição C-3', seguida de uma retroaldolização com eliminação da cetona e desidratação conduzindo na furanocumarina linear psoraleno (VIEIRA *et al.*, 2011) e posteriormente na

bergapteno (ESQUEMA 1.13, p. 216). Com respeito às piranocumarinas, admite-se uma eliminação da 3'-hidroxila da diidropiranocumarina, através de uma desidratação, a qual conduz na piranocumarina angular seselina (VIEIRA *et al.*, 2011) e posteriormente na 5-metóxi-seselina (ESQUEMA 1.14, p. 216).



ESQUEMA 1.13: Proposta de biogênese para a furanocumarina bergapteno



ESQUEMA 1.14: Proposta de biogênese para as piranocumarinas seselina e 5-metóxi-seselina

2. Avaliação do Potencial Efeito Biológico de Plantas do Gênero *Hortia*

2.1 Introdução

Plantas, fungos, insetos, organismos marinhos e bactérias são fontes importantes de substâncias biologicamente ativas, sendo que a maioria dos fármacos em uso clínico ou são de origem natural ou foram desenvolvidos por síntese química planejada a partir de produtos naturais (BARREIRO & BOLZANI, 2009). A espetacular diversidade molecular de padrões estruturais observada nas distintas classes de produtos naturais, como limonoides, alcaloides, cumarinas, flavonoides, entre outras, representa fonte inesgotável de modelos originais de arquitetura molecular enantiopura (MARQUES, 2006).

Atualmente o interesse por compostos de origem natural vem aumentando consideravelmente, uma vez que, grande parte dos micro-organismos tende a desenvolver resistência aos antimicrobianos comerciais, seja pelo uso excessivo ou inadequado. Assim, faz-se necessário o desenvolvimento de novos estudos em uma busca constante de novos princípios ativos contra bactérias e fungos amplamente conhecidos (PEREIRA, 2007).

Neste contexto, o grupo do Laboratório de Produtos Naturais da UFSCar vem a muitos anos realizando o estudo de espécies vegetais pertencentes às famílias Rutaceae, Meliaceae e Simaroubaceae, preocupando-se não somente com o isolamento e elucidação estrutural de seus constituintes químicos, mas também com ensaios biológicos, visando contribuir com modelos de substâncias potencialmente ativas (ISIDORO, 2008).

Neste trabalho foi avaliado o potencial efeito biológico de alguns extratos vegetais e substâncias isoladas do gênero *Hortia* frente à fitopatógenos como *Xylella fastidiosa* e *Guignardia citricarpa*, os quais afetam consideravelmente a citricultura brasileira, e à patógenos da cárie e do sistema

respiratório, que representam sérios problemas sócio-econômicos e de saúde pública em âmbito mundial.

2.1.1 Doenças Citrícolas

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

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

Dentre as principais doenças que afetam a citricultura brasileira, pode-se destacar a Clorose Variegada dos Citros (CVC), Mancha Preta dos Citros (MPC), Greening, Cancro Cítrico, Declínio, Mancha Marrom dos Citros e Morte Súbita dos Citros (MSC) (LARANJEIRA *et al.*; 1998).

2.1.1.1 Clorose Variegada dos Citros (CVC)

A CVC é uma doença importante da citricultura brasileira causada por uma bactéria gram-negativa denominada *X. fastidiosa*. Esta bactéria patogênica se limita ao xilema das plantas e é capaz de se desenvolver como um biofilme, uma matriz adesiva de substância polimérica extracelular repleta de populações microbianas aderidas umas às outras (COSTERTON *et al.*, 1995). A formação do biofilme apresenta muitas vantagens para o sistema biológico do

fitopatológico, permitindo inclusive que suas células se tornem cada vez mais resistentes aos antibióticos empregados no combate à CVC (MOREAU *et al.*, 2009).

A maneira como *X. fastidiosa* coloniza o xilema, observada em imagens feitas com microscopia eletrônica (ALVES, 2003) e óptica (QUEIROZ-VOLTAN & PARADELA FILHO, 1999) (FIGURA 1.89, p. 219), e as sintomatologias manifestadas por plantas afetadas, sugerem que os danos resultam principalmente de um bloqueio no fluxo da água do solo para a raiz e partes aéreas das plantas e de um constante desvio de nutrientes como zinco, magnésio e potássio, provocando uma deficiência hídrica e mineral (ROSSETTI & DE NEGRI, 1990; OSIRO *et al.*, 2004; DE SOUZA *et al.*, 2004).

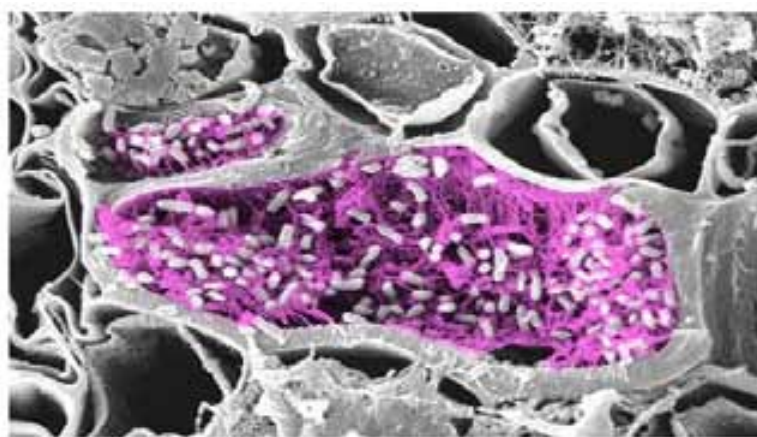


FIGURA 1.89: Vasos do xilema obstruídos por células de *X. fastidiosa*
(Fonte: FUNDECITRUS, 2011)

Em geral, plantas de citros afetadas por *X. fastidiosa* não chegam a morrer, mas a vida útil das plantações costuma ser bastante reduzida (FUNDECITRUS, 2008) e os níveis de danos econômicos são bastante elevados, sendo estimados em cem milhões de dólares anuais.

A CVC tem afetado cerca de 36% de laranjas doces comerciais, causando perdas econômicas estimadas em 100 milhões de dólares anuais para a indústria brasileira de citros, a qual produz a maior parte do suco de laranja no mercado internacional (RIBEIRO *et al.*, 2008). Tais perdas econômicas

poderiam ser ainda maiores não fosse a adoção de medidas conjuntas de controle pelos produtores e pesquisadores. Tais medidas envolvem o plantio de mudas sadias, poda de ramos sintomáticos, erradicação de plantas sintomáticas e controle químico de vetores (FUNDECITRUS, 2008). Ainda para controlar com maior eficácia a ocorrência e propagação de CVC, foi implantada em 2003 uma norma governamental que proíbe a comercialização em todo o estado de São Paulo de mudas que não tenham sido produzidas em viveiros totalmente livres de insetos, uma vez que onze espécies de cigarrinhas são transmissoras de *X. fastidiosa* de plantas contaminadas para sadias (PARRA *et al.*, 2005).

Segundo um levantamento realizado pelo FUNDECITRUS (2011) entre junho e setembro de 2010, a incidência de CVC nos pomares do Estado de São Paulo caiu de 39,2% para 35,5%, entre 2009 e 2010. Entre os fatores que levaram à queda da doença destacam-se a eliminação de pomares mais velhos e a erradicação de plantas doentes, ações necessárias para o combate a outra praga, o greening, considerada atualmente a pior da citricultura. As aplicações de inseticidas usados para combater o inseto que transmite o greening também agiram contra as cigarrinhas transmissoras da bactéria da CVC. O levantamento ainda apontou que a região Norte do estado de São Paulo é a mais afetada pela doença, com 53% das plantas contaminadas, seguida pela Noroeste com 42,8%, e Central com 38,2%; já as regiões Sul e Oeste apresentaram índices menores, 25% e 4,4%, respectivamente. Embora a região Sul tenha apresentado o segundo menor índice de contaminação (25%), foi constatado grande crescimento da CVC em plantas até então sadias: de 6,6%, em 2009, para 10,8%, em 2010.

Desta forma, entende-se que os métodos de controle atuais de CVC ainda não são totalmente eficazes, sendo necessário, portanto empreendimento de esforços visando tanto à busca de bactericidas de origem natural que possam combater a *X. fastidiosa*, quanto um conhecimento mais detalhado de vários aspectos desses patossistemas, inclusive daqueles relacionados à resistência da bactéria à bactericidas comerciais.

2.1.1.2 Mancha Preta dos Citros (MPC)

A MPC é uma doença de origem fúngica que afeta todas as espécies de *Citrus*, principalmente o limoeiro verdadeiro (*C. limon*), que têm papel fundamental no início das epidemias da doença (KOTZÉ, 1981), e a laranjeira (*C. sinensis*) de maturação médio-tardia (Pêra) a tardia (Natal e Valência). Há apenas duas exceções ao ataque desta doença: a laranja azeda (*C. aurantium*) e seus híbridos (KOTZÉ, 1981) a limeira ácida Tahiti (*C. latifolia*) (AGUILAR-VILDOSO, 1997).

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

A MPC apresenta os ciclos primários e secundários bem distintos. O primeiro representa a fase sexual de *G. citricarpa*, cujas estruturas responsáveis pela introdução do patógeno na área e início das epidemias a cada ciclo da citricultura são os ascósporos. O ciclo secundário é caracterizado pela fase assexual do fungo (*Phyllosticta citricarpa*), em que os picnidiósporos, também chamados de conídios, são as estruturas responsáveis pela disseminação da doença na planta e ao seu redor (AGUILAR-VILDOSO *et al.*, 2002). Infecções podem se originar tanto de ascósporos como de picnidiósporos, porém, cada um tem seu papel no estabelecimento da doença. O patógeno pode permanecer no estado latente e infectar mais de 90% das folhas em pomares altamente infectados (MATTOS-JUNIOR *et al.*, 2005).

O desenvolvimento dos ascósporos e picnidiósporos pode ser influenciado pela alternância de condições úmidas e secas, além de temperaturas

amenas. O aparecimento das lesões de MPC é favorecido pela luminosidade combinada com altas temperaturas (FUNDECITRUS, 2008). Nas folhas caídas ao solo, formam-se os pseudotécios, corpos de frutificação do fungo da fase sexual. Dentro destes, originam-se vários ascos, de formato cilíndrico, onde são formados oito ascósporos. Os ascósporos surgem entre 40 a 180 dias após a queda das folhas, sendo posteriormente ejetados, aderindo-se ao tecido vegetal graças à mucilagem existente nas suas extremidades. A alternância entre períodos de molhamento e secamento das folhas, além de temperaturas mais elevadas, são fatores que favorecem a sua produção. A presença de orvalho é suficiente para promover este estímulo (KIELY, 1948). As pancadas de chuvas contínuas têm efeito adverso na disseminação dos esporos, reduzindo a quantidade dos mesmos no ar, em função de seu arraste para o solo (KOTZÉ, 1981). Quando os estímulos são satisfeitos, ocorre a sua germinação, formando seqüencialmente o tubo germinativo e o apressório, penetrando posteriormente no tecido, sem a necessidade de aberturas naturais ou ferimentos. Após a penetração na casca dos frutos forma-se uma massa micelial na região subcuticular, a qual permanece quiescente por um período de 4 a 12 meses, levando conseqüentemente ao aparecimento dos sintomas. Os ascósporos podem ser carregados pelo vento, disseminando o fungo, de maneira eficiente, a longas distâncias (MATTOS-JUNIOR *et al.*, 2005).

Nas lesões oriundas de infecções por ascósporos em frutos, ramos e em folhas ocorre a formação de picnídios, corpos de frutificação do ciclo secundário do fungo. Dentro dos picnídios formam-se os picnidiósporos ou conídios os quais emergem do ostíolo. Na sua extensão, tais conídios mostram-se envolvidos por uma substância mucilaginosa que tem a função de protegê-los contra condições climáticas adversas. A água, ao passar pela superfície destas estruturas, solubiliza a mucilagem, proporcionando assim o seu carregamento, em suspensão, até a superfície dos órgãos suscetíveis próximos, onde novas infecções ocorrem. Essa fase assexual é a responsável pelo incremento da

doença dentro da planta e próximo a ela, pois os picnidiósporos são disseminados circunstancialmente a curtas distâncias (BALDASSARI, 2001).

As estruturas das duas formas de esporo que causam infecção em frutos e folhas são apresentadas na FIGURA 1.90 (p. 223).



FIGURA 1.90: *G. citricarpa*: **a**) picnidiósporos, características do apêndice (seta) do gênero *Phyllosticta*; **b**) conidiósporo; **c**) ascos jovens, cápsula mucilaginosa (seta); **d**) ascos maduros com 8 ascósporos (seta); **e**) ascósporo, a cápsula mucilaginosa (seta) da terminação de dois esporos, uma característica do gênero *Guignardia*; **f**) septos (seta fina) e hifa multinucleada (seta grossa); **g**) ascósporos uninucleados (seta); **h**) ascósporos binucleados, um núcleo (seta grossa) e cápsula (seta fina); **i**) picnidiósporo (multinucleado); **j**) picnidiósporos, uninucleado (seta fina) e binucleado (seta grossa). Fonte: GLIENKE-BLANCO *et al.*, 2002.

Os ciclos primários e secundários da MPC são representados a seguir (FIGURA 1.91, p. 224).

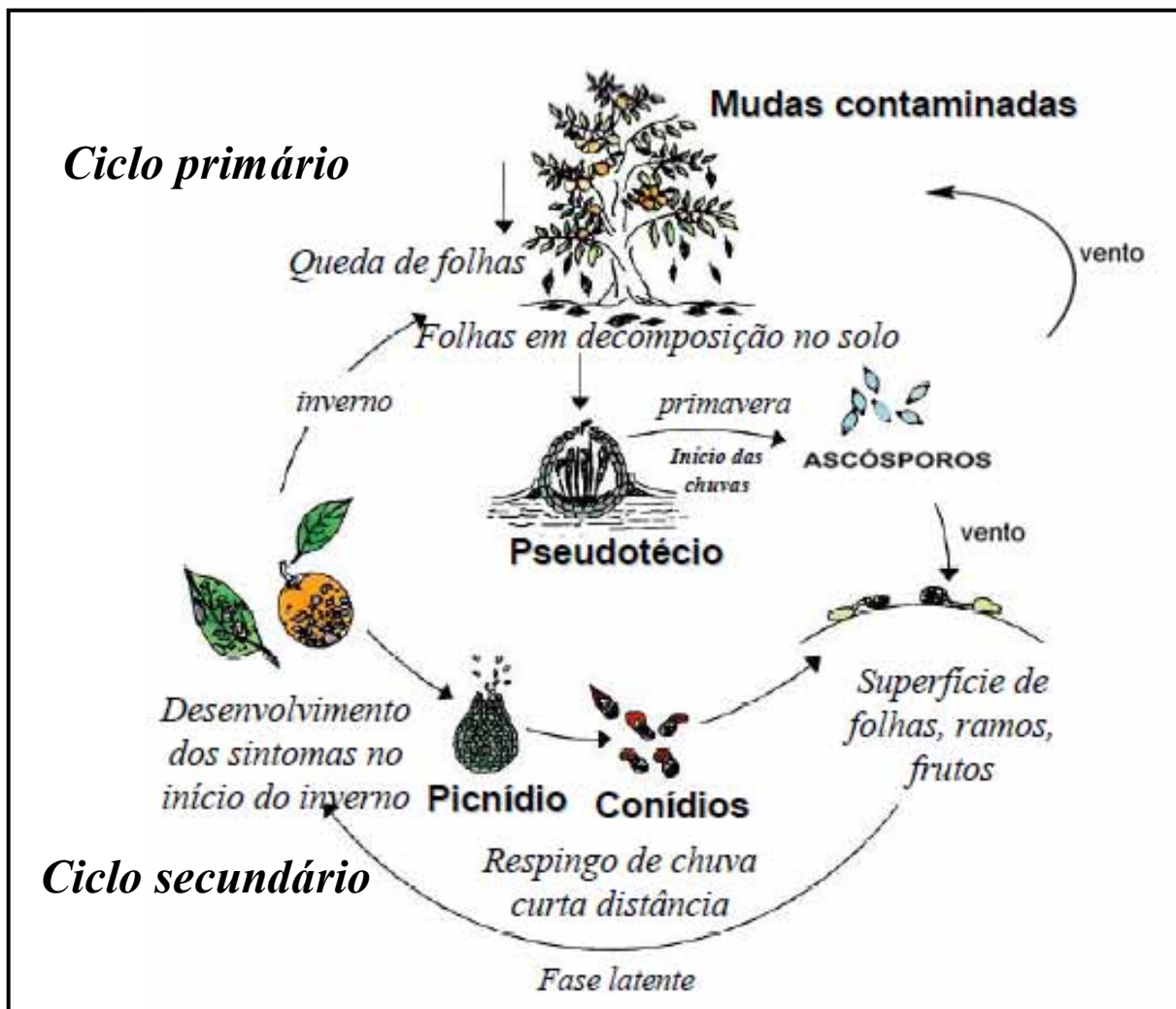


FIGURA 1.91: Ciclos primário e secundário da MPC

Fonte: FUNDECITRUS, 2008

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

Existem várias medidas que podem ser tomadas para minimizar os prejuízos causados pela MPC, que compreendem a utilização de mudas saudáveis, retirada de restos vegetais infectados, controle de ervas daninhas, utilização de quebra ventos e irrigação nos períodos secos para evitar queda excessiva de folhas (FUNDECITRUS, 2008). Além desses cuidados, inclui-se a utilização de fungicidas protetores ou sistêmicos, o que, entretanto, eleva o custo da produção.

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

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

Desta forma, agricultores e pesquisadores começaram a considerar o uso de métodos alternativos no combate às doenças (PUNJA *et al.*, 2003) e uma das alternativas proposta pelo Grupo de Produtos Naturais da UFSCar é avaliar o potencial efeito fungicida de metabólitos secundários isolados de plantas e micro-organismos frente à *G. citricarpa*.

2.1.2 Doenças Relacionadas à Patógenos da Cárie

A distribuição das bactérias presentes na cavidade bucal varia qualitativa e quantitativamente de acordo com o habitat. Bactérias do grupo *Streptococcus* (*S. sanguinis*, *S. mutans*, *S. sobrinus*, etc) são encontradas em grande quantidade de colônias nos dentes, enquanto *S. salivarius* é isolada principalmente da língua.

A *S. sanguinis* é uma bactéria Gram-positiva que apresenta importância na formação inicial do biofilme dentário, apresentando mecanismos de aderência à superfície dos dentes. Além disso, é possível que durante limpezas dentárias ou cirurgias orais, *S. sanguinis* consiga invadir a corrente sanguínea e colonizar as válvulas cardíacas, especialmente a mitral e aórtica, causando uma doença importante denominada endocardite bacteriana subaguda (HAUSER-GERSPACH *et al.*, 2007).

A *S. salivarius* é uma bactéria Gram-positiva encontrada na boca, garganta e nasofaringe de humanos, a qual está associada principalmente a doenças dentárias. No entanto, esta bactéria tem sido associada também com infecções em diferentes partes do corpo (JOHNSON & TUNKEL, 2000) como, por exemplo, infecção das meninges geralmente relacionada com a neoplasia ou iatrogenia (AWADA *et al.*, 1992).

Portanto, pelos fatos expostos anteriormente, observa-se que bactérias como *S. sanguinis* e *S. salivarius* podem exacerbar ou predispor as doenças sistêmicas, tais como doenças respiratórias, cardiovasculares, diabetes, artrites, parto prematuro de bebês de baixa massa corporal, além de outras patologias (GONÇALVES, 2010). Desta forma, a omissão ao tratamento de doenças relacionadas aos patógenos bucais e a resistência cada vez maior destes micro-organismos podem complicar o quadro clínico do indivíduo, muitas vezes levando-o à morte.

Desta forma, considerando que micro-organismos podem desenvolver resistência aos antibióticos comerciais, passou-se a investigar o potencial efeito biológico de extratos e metabólitos secundários isolados de plantas, uma vez que são fontes importantes para a prospecção de novas moléculas bioativas, as quais possivelmente promoveriam a redução do número de células viáveis ao inibir sua proliferação ou causar a sua morte.

2.1.3 Doenças Respiratórias

O gênero *Mycobacterium* apresenta uma diversidade de espécies de ampla distribuição na natureza, compreendendo cerca de 100 espécies, sendo 25 identificadas como sendo patogênicas ao homem. Além do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. microti*, *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*), existem espécies saprófitas e outras que atuam como patógenos oportunistas causando enfermidades denominadas de micobacterioses (POZNIAK *et al.*, 1996; RAYNAUD *et al.*, 1998; CORTINAS *et al.*, 2002).

A bactéria *M. tuberculosis* é o principal agente etiológico da tuberculose humana, uma doença grave que é transmitida pelo ar e que pode atingir todos os órgãos do corpo, em especial os pulmões. Embora exista tratamento, todos os anos 60 milhões de pessoas são infectadas e anualmente 2,5 milhões de pessoas morrem. Acredita-se que sem um controle realmente eficaz, cerca de 1,5 bilhão de pessoas serão infectadas e 3,5 milhões poderão morrer de tuberculose até 2020 (DANNENBERG & ROOK, 1994).

Atualmente, há vários medicamentos disponíveis para o tratamento de infecções causadas por *Mycobacterium*. Entretanto, tal tratamento pode exigir um período de seis meses até cinco anos, o qual geralmente é interrompido pelo paciente e desta forma, algumas cepas do bacilo se tornam resistentes às drogas antimicobacterianas (AGGER & ANDERSEN, 2002).

A área de fármacos naturais tem atraído a atenção dos pesquisadores devido ao grande número de plantas medicinais presentes em

nossa flora (LUCARINI, 2009). A necessidade de novos fármacos mostra-se imprescindível nos dias de hoje, em virtude do grande número de doenças, para as quais ainda não foram encontrados medicamentos eficazes na terapêutica (BASTOS *et al.*, 1999).

2.2 Objetivo

O objetivo desta parte do trabalho foi investigar o potencial efeito biológico de extratos e substâncias isoladas de espécies de *Hortia* frente à:

- ↳ Fitopatógenos como a bactéria *X. fastidiosa* e o fungo *G. citricarpa*, visando o controle da CVC e MPC, respectivamente, as quais são doenças importantes e impactantes na citricultura brasileira.
- ↳ Patógenos presentes na cavidade bucal e no sistema respiratório, visando à busca de substâncias antibacterianas capazes de combater tais micro-organismos, os quais são responsáveis por inúmeras doenças no homem.

2.3 Parte Experimental

Os ensaios de avaliação do potencial efeito antibacteriano dos extratos vegetais e substâncias isoladas de plantas do gênero *Hortia* foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada (LaPeMA) da Universidade de Franca – UNIFRAN, situada na cidade de Franca – SP, com a colaboração do professor Dr. Carlos Henrique Gomes Martins e do aluno de doutorado Rodrigo Lucarini. Os seguintes micro-organismos foram utilizados:

- *X. fastidiosa* (linhagem 9a5c) → fitopatógeno relacionado com a doença citrícola denominada de Clorose Variegada dos Citros (CVC);

- *S. sanguinis* (ATCC 10556) e *S. salivarius* (ATCC 25975) → patógenos relacionados com o desenvolvimento da cárie;

- *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294), *M. kansasii* (ATCC 12478) e *M. avium* (ATCC 15769) → patógenos relacionados com doenças respiratórias.

Todos os ensaios biológicos frente às bactérias citadas acima foram realizados em triplicata e a Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada como a menor concentração capaz de inibir o crescimento visível do micro-organismo ensaiado, após o período de incubação.

Os ensaios antifúngicos frente à *G. citricarpa*, fitopatógeno relacionado com a doença citrícola denominada de Mancha Preta dos Citros (MPC), foram realizados no Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, situado em São Carlos – SP, com a colaboração do grupo do professor Dr. Sérgio Florentino Pascholatti do Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ – USP – Piracicaba).

2.3.1 Ensaios Biológicos Frente à *X. fastidiosa*

2.3.1.1 Meios de Cultura

Foram preparados os meios de cultura líquido PW, segundo protocolo de DAVIS *et al.* (1981), (TABELA 1.33, p. 232) e sólido PCYE (Phosphate Charcoal Yeast Extract Agar), segundo o protocolo de LOPES *et al.* (2006), (TABELA 1.34, p. 233).

Para o meio líquido PW preparou-se o phenol red 0,2% a partir da adição de 0,2 g deste reagente e 10 gotas de NaOH 20% em 100 mL de água e hemin chloride 0,1 % a partir da adição de 0,1 g deste reagente e 0,2 g de NaOH em 100 mL de água. Em seguida, misturou-se ambos aos demais reagentes previamente pesados, autoclavando-os por 20 minutos a 120°C. Posteriormente adicionou-se glutamina 4% e BSA 10% por filtração.

O meio de cultura sólido PCYE foi preparado adicionando-se todos os reagentes em um frasco de Erlenmeyer e fazendo o ajuste do pH para 6,9 com KOH (1M). Em seguida, autoclavou-se este meio por 20 minutos a 120°C.

TABELA 1.33: Composição do meio de cultura líquido PW

Phytone peptone	4,0 g
Trypticase peptone	1,0 g
Hemin chloride (0,1%)	10,0 mL
Phenol red (0,2%)	10,0 mL
K ₂ HPO ₄	1,2 g
KH ₂ PO	1,0 g
MgSO ₄ .H ₂ O	0,4 g
Ágar	12,0 g
Água destilada	800 mL

TABELA 1.34: Composição do meio de cultura sólido PCYE

Extrato de Levedura	10,0 g
Carvão Ativado	2,0 g
Ágar	10,0 g
Fosfato Diidrogênio Potássio (KH ₂ PO ₄)	1,0 g
Fosfato Hidrogênio Potássio (K ₂ HPO ₄)	1,1 g
Sulfato de Magnésio Heptaidratado (MgSO ₄ .7H ₂ O)	0,4 g
Sulfato de Ferro Heptaidratado (FeSO ₄ .7H ₂ O)	0,25 g
Água Destilada	1000 mL

2.3.1.2 Padronização da Densidade de *X. fastidiosa*

Cepas de *X. fastidiosa* armazenadas a -20°C foram ressuspensas em meio de cultura líquido PW, repicadas em meio de cultura sólido PCYE e incubadas em temperatura de 25°C em estufa bacteriológica (B.O.D.) em atmosfera apropriada durante 15 dias para a confirmação da pureza da cepa. Após a confirmação, a cepa foi utilizada para os ensaios de determinação da CIM.

A densidade do micro-organismo influencia nos resultados obtidos e por isso realizou-se a padronização da quantidade de *X. fastidiosa* a ser utilizada, a fim de assegurar a reprodutibilidade dos ensaios biológicos. Inicialmente foi preparada a escala de 0,5 de McFarland, segundo BIER (1981), adicionando-se 0,5 mL de cloreto de bário 1% em 99,5 mL de ácido sulfúrico 1%; em seguida transferiu-se 2,0 mL desta solução para uma cubeta espectrofotométrica. Para calibrar a transmitância a 100% em um espectrofotômetro em comprimento de onda de 600 nm foi utilizada água destilada; posteriormente colocou-se a solução do tubo 0,5 de McFarland, esperando-se uma transmitância de 21%.

Com o auxílio de uma alça de inoculação esterilizada, transferiu-se culturas de *X. fastidiosa* com 15 dias de crescimento em meio sólido PCYE para

tubos contendo o meio líquido PW. Após cinco dias padronizou-se as suspensões em espectrofotômetro de modo a fornecer uma concentração de $5,0 \times 10^6$ UFC/mL.

2.3.1.3 Preparo dos Extratos Vegetais e Substâncias Ensaaiadas

Foram ensaiados os seguintes extratos vegetais: extrato metanólico do tronco de *H. brasiliiana* Vand. ex DC. (EMTHB), extrato metanólico do tronco de *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani (EMTHO), extrato metanólico do tronco subterrâneo de *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani (EMTSHO) e extrato metanólico do tronco de *H. superba* Ducke (EMTHS) e as seguintes substâncias: hortiolida E (substância **07**, p. 108), ácido 3-[2,6-dimetóxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':4,5)-fenil]-propiónico (substância **13**, p. 171), N-metil-4-metóxi-2-quinolona (substância **16**, p. 185), rutaecarpina (substância **17**, p. 189), hortiacina (substância **18**, p. 193) e 5-metóxi-seselina (substância **21**, p. 211). Como controles positivos foram empregados os antibióticos estreptomicina e gentamicina, ambos adquiridos da Sigma[®].

Inicialmente foi preparada solução estoque de cada amostra, solubilizando 1,0 mg em 125 µL de DMSO. Posteriormente, cada solução foi diluída em 1875 µL de meio líquido PW originando assim a solução mãe, da qual pôde-se obter concentrações nas microplacas no intervalo de 1,0 a 400 µg/mL, empregando, portanto a técnica de microdiluição em caldo. O intervalo de concentração dos controles positivos foi de 5,9 a 0,0115 µg.mL⁻¹. A metodologia do ensaio biológico, o intervalo de concentração das amostras e do controle positivo seguiram o protocolo do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), aplicado no LaPeMA-UNIFRAN.

É importante ressaltar que foi utilizado o solvente DMSO nos ensaios biológicos, por ser considerado pouco volátil, adequado para a solubilização e por não interferir no crescimento bacteriano. O volume de

DMSO empregado na solubilização das amostras foi adicionado isoladamente em um orifício de cada microplaca como controle negativo, para confirmar se o solvente não estava inibindo o crescimento do micro-organismo. O volume final de DMSO nos experimentos não excedeu a 5% (ARANTES, 2005).

Para verificar a viabilidade de *X. fastidiosa* e do meio de cultura em cada experimento, em orifícios de cada microplaca foram adicionados os seguintes componentes: 1) culturas de *X. fastidiosa* e 2) meio de cultura líquido PW.

As microplacas foram incubadas a 25°C por 25 dias, respeitando a exigência de atmosfera da bactéria avaliada. Terminado o período de incubação, as placas foram reveladas com 30 µL de resazurina (Sigma[®]) 0,02% em solução aquosa esterilizada (PALOMINO *et al.*, 2003) e após alguns minutos a leitura foi realizada. A resazurina facilita a verificação da presença de crescimento microbiano devido à coloração obtida nas microplacas, pois a coloração azul indica ausência de crescimento microbiano, enquanto a coloração rosa indica a presença de células viáveis em crescimento. Desta forma, foi possível determinar a CIM das amostras avaliadas.

2.3.2 Ensaio Biológico Frente à Patógenos da Cárie

2.3.2.1 Meios de Cultura

Os meios de cultura utilizados foram Tryptic Soy Broth (TSB, Difco[®]) e Base de Ágar-Sangue + 5% de sangue (BAS) e suas composições estão descritas nas TABELAS 1.35 a 1.36 (p. 236).

TABELA 1.35: Composição do meio de cultura TSB

Peptona de Caseína	17,0 g
Peptona de soja	3,0 g
Glicose	2,5 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Hidrogenofosfato dipotássico	2,5 g

Preparo do meio de cultura TSB:

Foram dissolvidos 30,0 g do pó de Tryptic Soy Broth em 1,0 L de água destilada até total homogeneização. Em seguida, o meio de cultura foi autoclavado por 15 minutos a 120 °C.

TABELA 1.36: Composição do meio de cultura BAS

Infusão de músculo cardíaco	2,0 g
Digestão pancreática de caseína	13,0 g
Extrato de levedura	5,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Ágar	15,0 g

Preparo do meio de cultura BAS:

Foram dissolvidos 40,0 g do pó BAS em 1,0 L de água destilada até total homogeneização. Em seguida, o meio de cultura foi autoclavado por 15 minutos (120 °C), resfriado até aproximadamente 50°C, adicionado de 5% de sangue desfibrinado de carneiro (Biotério Rodrigues[®] - Ibiraci/MG), homogeneizado e distribuídos em placas de Petri (20,0 mm x 100,0 mm) esterilizadas, em volumes de cerca de 25,0 mL.

2.3.2.2 Padronização da Densidade dos Inóculos

Para a obtenção dos inóculos *S. sanguinis* e *S. salivarius*, as cepas foram armazenadas a -20°C e ressuspendidas em meio de cultura líquido TSB. Em seguida, os micro-organismos foram repicados em meio de cultura sólido

BAS e incubados em temperatura de 37 °C em B.O.D. com atmosfera apropriada durante 24 horas, para a confirmação da pureza das cepas. Após a confirmação, as cepas foram então utilizadas para os ensaios da determinação da CIM.

Com o auxílio de uma alça de inoculação esterilizada, foram transferidas culturas de 24 horas dos micro-organismos, desenvolvidos no meio de cultura BAS, para tubos contendo solução salina 0,9%. Padronizou-se as suspensões em espectrofotômetro de modo a fornecer uma concentração bacteriana de $5,0 \times 10^5$ UFC/mL.

2.3.2.3 Preparo das Substâncias Ensaçadas

Foram ensaiadas as seguintes substâncias: hortiolida C (substância **03**, p. 73), hortiolida D (substância **06**, p. 101), hortiolida E (substância **07**, p. 108), ácido 3-[2,6-dimetóxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':4,5)-fenil]-propiónico (substância **13**, p. 171) e rutaecarpina (substância **17**, p. 189). Como controle positivo foi empregado o antibiótico clorexidina (Sigma[®]).

A metodologia de preparo da solução estoque foi a mesma descrita no tópico 2.3.1.3 (p. 234), exceto que para este ensaio foi empregado o meio de cultura TSB. Foi empregada a técnica de microdiluição em caldo para as amostras e controle positivo, em intervalos de concentrações de 4,0 a 400 µg/mL e 5,9 a 0,0115 µg.mL⁻¹, respectivamente, segundo o protocolo do CLSI empregado no LaPeMA-UNIFRAN.

As microplacas foram incubadas a 37°C por 24 horas; a revelação foi realizada com 30 µL de resazurina (Sigma[®]) 0,02% em solução aquosa esterilizada, como descrito no item 2.3.1.3 (p. 234).

2.3.3 Ensaios Biológicos Frente à Micobactérias Patogênicas

2.3.3.1 Meio de Cultura e Padronização da Densidade dos Inóculos

Culturas de *M. tuberculosis*, *M. avium* e *M. kansasii* foram mantidas no meio sólido de Lowenstein – Jensen (BD-USA) em incubação a 37°C por 15 dias até se obter quantidade suficiente para uma alçada que correspondesse a 5,0 mg de peso seco bacteriano.

As colônias das micobactérias foram solubilizadas em tubos com pérolas de vidro e 500µL de água estéril, colocando-se em agitador de tubos. Após agitação, retirou-se uma alíquota de 200µL e adicionou-se em 2,0 mL do meio 7H9 suplementado com 10% ácido oléico dextrose catalase (OADC), 0,2% de Twen 80 e 0,4% de glicerol a 50%; incubou-se por 07 dias a 37°C até obtenção de uma suspensão bacteriana de $1,0 \times 10^5$ UFC/mL e diluiu-se 1:25 (v/v) em caldo enriquecido para a distribuição nas microplacas (ARANTES, 2005).

2.3.3.2 Preparo dos Extratos Vegetais e Substâncias Ensaçadas

Foram ensaiados os seguintes extratos vegetais: extrato metanólico do tronco de *H. brasiliana* Vand. ex DC. (EMTHB), extrato metanólico do tronco de *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani (EMTHO), extrato metanólico do tronco subterrâneo de *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani (EMTSHO), extrato metanólico do tronco de *H. superba* Ducke (EMTHS) e extrato metanólico do caule de *H. superba* Ducke (EMCHS) e as seguintes substâncias: ácido 3-[2,6-dimetóxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':4,5)-fenil]-propionico (substância **13**, p. 171), rutaecarpina (substância **17**, p. 189), hortiácina (substância **18**, p. 193) e 5-metóxi-seselina (substância **21**, p. 211). Como controle positivo foi empregado o antibiótico isoniazida (Sigma®).

A metodologia de preparo da solução estoque foi a mesma descrita no tópico 2.3.1.3 (p. 234), exceto que para este ensaio foi empregado o meio de cultura 7H9 suplementado com 10% ácido oléico dextrose catalase (OADC), 0,2% de Twen 80 e 0,4% de glicerol a 50%. Foi empregada a técnica de microdiluição em caldo para as amostras e controle positivo, em intervalos de concentrações de 10,0 a 2000 $\mu\text{g/mL}$ e 5,9 a 0,0115 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, segundo o protocolo do CLSI empregado no LaPeMA-UNIFRAN.

As microplacas foram incubadas a 37 °C por 24 horas; a revelação foi realizada com 30 μL de resazurina (Sigma[®]) 0,02% em solução aquosa esterilizada, como descrito no item 2.3.1.3 (p. 234).

2.3.4 Ensaios Biológicos Frente à *G. citricarpa*

Os ensaios foram realizados em colaboração com o grupo do professor Dr. Sérgio F. Pascholati do Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ – USP – Piracicaba). Segundo levantamento bibliográfico, há relatos na literatura (MAGNANI, 2002; RIBEIRO, 2006; TOFFANO, 2005) da realização de ensaios biológicos de inibição do crescimento de *G. citricarpa in vitro* de duas formas, sendo a primeira através do método de difusão em ágar e a segunda pelo método de germinação de esporos em placas de poliestireno.

Neste estudo, as avaliações das amostras frente à *G. citricarpa* foram realizadas empregando-se os métodos de incorporação da amostra ao meio de cultura BDA, sendo este método adaptado de MIYASHIRA (2007), e germinação de esporos e formação de apressórios.

A avaliação de extratos vegetais e substâncias isoladas de *Hortia* frente ao crescimento micelial de *G. citricarpa* foi realizada em quintuplicata, bem como para os controles neutro e negativo. O controle negativo teve por finalidade averiguar se o solvente não interferiu no crescimento regular de *G. citricarpa* durante o período de incubação e o controle neutro foi empregado

para verificar se o fungo estava se desenvolvendo regularmente. Em ambos os controles, o fungo se desenvolveu de forma satisfatória.

2.3.4.1 Ensaio de Inibição do Crescimento Micelial de *G. citricarpa* *in vitro* pelo Método de Incorporação da Amostra ao Meio de Cultura

Para a avaliação da inibição do crescimento micelial de *G. citricarpa* frente a cada amostra descrita na TABELA 1.37 (p. 241), 1,95 g de meio de cultura sólido BDA foi pesado, dissolvido em 50,0 mL de água destilada e autoclavado por 20 minutos (120 °C e 1 atm). Em seguida a amostra a ser testada foi solubilizada em 250 µL de DMSO, sendo esta solução incorporada ao volume de 50,0 mL de meio BDA fundente e alíquotas de 10,0 mL foram vertidas em placa de Petri esterilizada (dimensões h= 20,0 mm x Φ= 100,0 mm) de modo a obter cinco placas para cada amostra, as quais foram mantidas na capela de fluxo laminar até a solidificação do meio de cultura com amostra. Posteriormente, um disco de 2,0 mm de *G. citricarpa* foi adicionado ao centro de cada placa e todas foram armazenadas na BOD (25 °C, fotoperíodo de 12 h). Cada amostra foi preparada em quintuplicata, havendo um número idêntico de réplicas para os controle neutro (meio de cultura e fungo) e negativo (250 µL de DMSO incorporado ao meio de cultura BDA e inserção de um disco de 2,0 mm de fungo).

A avaliação do potencial efeito das amostras frente ao crescimento micelial foi realizada segundo a metodologia de RAPPUSI (2009), a cada três dias totalizando 21 dias, medindo-se o halo de crescimento do fungo com um paquímetro na horizontal e na vertical na escala de centímetros, e subtraindo-se em cada medida o diâmetro do disco do inóculo aplicado inicialmente. Foram calculadas as médias de crescimento micelial frente a cada amostra testada.

TABELA 1.37: Amostras utilizadas no ensaio de inibição de *G. citricarpa* pelo método de incorporação da amostra ao meio de cultura BDA

Amostra	Massa necessária para o ensaio (mg)	Concentração final na placa em $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Concentração em mM
Extrato metanólico do tronco de <i>H. brasiliiana</i> Vand. ex DC. (EMTHB)	50,0	1000	-
Extrato metanólico do tronco de <i>H. superba</i> Ducke (EMTHS)	50,0	1000	-
mistura de 4 derivados do ácido diidrocinâmico	10,0	200	-
ácido 3-[2,6-dimetóxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':4,5)-fenil]-propiônico (substância 13 , p. 171)	5,0	100	0,34
N-metil-4-metóxi-2-quinolona (substância 16 , p. 185)	5,0	100	0,53
rutaecarpina (substância 17 , p. 189)	5,0	100	0,35
5-metóxi-seselina (substância 21 , p. 211)	5,0	100	0,39

2.3.4.2 Ensaios de Inibição de *G. citricarpa in vitro* pelo Método de Germinação de Esporos e Formação de Apressórios

Os esporos de *G. citricarpa* foram obtidos a partir do seu cultivo em meio BDA, com o objetivo de determinar o efeito da substância ensaiada sobre a germinação dos esporos e formação de apressórios. Na metodologia empregada, preparou-se uma suspensão de esporos na concentração de $1,0 \times 10^5$ esporos.mL⁻¹ e uma solução da amostra a ser avaliada na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Em seguida, adicionou-se em uma placa de poliestireno (90,0 cm x 15,0 cm) 40 μL da solução de cada amostra e 40 μL da suspensão de esporos de

G. citricarpa em um único orifício, totalizando três repetições por placa. A testemunha foi representada pelos orifícios contendo suspensão de esporos na presença de água destilada. As placas foram vedadas com filme PVC transparente e conservadas a 25° C, sob luz fluorescente com fotoperíodo de 12h, por 24 h. Após este período, a porcentagem de germinação de esporos e formação de apressórios foi avaliada em microscópio óptico com aumento de 400 vezes através da observação e contagem dos esporos em cada orifício e os resultados foram obtidos em porcentagem. Um resumo da metodologia é apresentado na FIGURA 1.92 (p. 242).

Neste ensaio foram avaliadas as mesmas amostras ensaiadas frente ao crescimento micelial de *G. citricarpa* (tópico 2.3.4.1, p. 240).

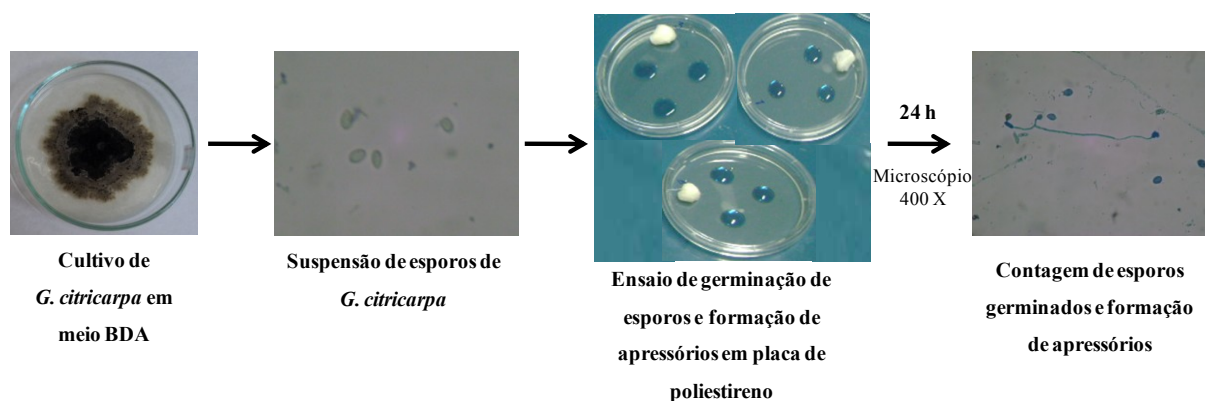


FIGURA 1.92: Metodologia do ensaio de inibição *in vitro* frente à *G. citricarpa* pelo método de germinação de esporos em placa de poliestireno

2.4 Resultados e Discussões

Para a obtenção da CIM foi empregada a leitura visual após a revelação com resazurina, a qual é um indicador redox empregado para avaliar a viabilidade de células microbianas (MONTEJANO *et al.*, 2005). A resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido) de cor azul tem uma pequena fluorescência intrínseca e entra facilmente nas células, onde pode ser reduzida na presença de células viáveis e convertida à resorufina (7-hidróxi-3H-fenoxazina-3-ona), substância de coloração rosa e fluorescente. Este método facilita a verificação da presença de crescimento microbiano (PALOMINO *et al.*, 2002), pois usa o poder redutor natural das células vivas, conferido por redutases como a NADH desidrogenase, para converter a resazurina a respectiva molécula fluorescente, a resorufina (FIGURA 1.93, p. 243). A redução ocorre de uma forma constante e proporcional ao número de células, sendo a forma reduzida excretada para o exterior da célula onde se acumula durante algumas horas (O'Brien *et al.*, 2000).

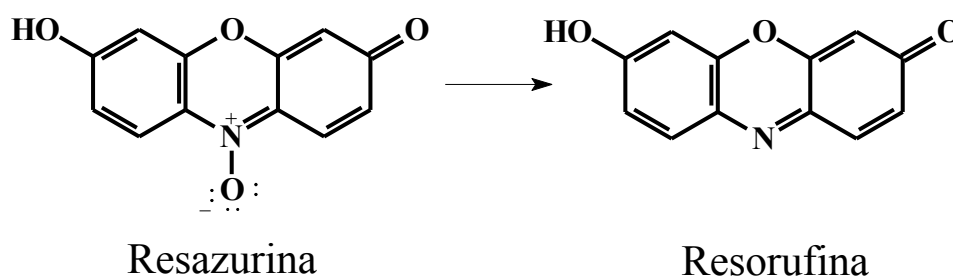


FIGURA 1.93: Conversão da resazurina a resorufina

Os valores de CIM obtidos nos ensaios biológicos foram em $\mu\text{g.mL}^{-1}$; entretanto para comparação e discussão da relação estrutura-atividade de algumas substâncias, tais valores foram convertidos em mM e serão apresentados nas duas unidades nas tabelas deste texto.

Na discussão do potencial efeito biológico (valores de CIM obtidos nos ensaios) de alguns extratos e substâncias isoladas do gênero *Hortia* no

presente trabalho, não serão feitas comparações com os valores de CIM dos controles positivos, pois os mesmos foram empregados apenas para averiguar a viabilidade celular dos micro-organismos testados.

O solvente DMSO, utilizado como controle negativo na técnica de microdiluição em caldo, não apresentou atividade antimicrobiana frente a todos os micro-organismos avaliados.

2.4.1 Ensaios Biológicos Frente à *X. fastidiosa*

Os resultados de CIM dos extratos vegetais e substâncias puras são apresentados na TABELA 1.38 (p. 244). Os valores de CIM para os controles positivos estreptomicina (Sigma[®]) e gentamicina (Sigma[®]) foram 1,48 e 0,74 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, concentrações baixas que, segundo o protocolo deste ensaio, demonstram a viabilidade de culturas de *X. fastidiosa*.

TABELA 1.38: Valores de CIM obtidos dos ensaios biológicos frente à *X. fastidiosa*

Amostras	Concentração Inibitória Mínima (CIM)	
	$\mu\text{g.mL}^{-1}$	mM
EMTHB	400	-
EMTHO	400	-
EMTSHO	400	-
EMTHS	400	-
hortiolida C (substância 03, p. 73)	400	0,83
ácido 3-[2,6-dimetóxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':4,5)-fenil]-propionico (substância 13, p. 171)	400	1,37
N-metil-4-metóxi-2-quinolona (substância 16, p. 185)	400	2,12
rutaecarpina (substância 17, p. 189)	200	0,70
hortiacina (substância 18, p. 193)	400	1,26
5-metóxi-seselina (substância 21, p. 211)	400	1,55
estreptomicina*	1,48	$2,54 \times 10^{-6}$
gentamicina*	0,74	$1,55 \times 10^{-6}$

*antibióticos empregados para avaliar a viabilidade celular de *X. fastidiosa*.

Dentre os extratos vegetais avaliados, nenhum deles apresentou atividade biológica expressiva frente à *X. fastidiosa*, pois CIM de 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

representa o início do intervalo da diluição em série e o que espera-se de um extrato vegetal é sua eficácia em inibir o crescimento de um micro-organismo em concentrações menores.

Ao comparar as atividades biológicas dos dois alcaloides indoloquinazolínicos (rutaecarpina e hortiacina), observou-se um resultado mais promissor para a rutaecarpina (CIM 0,70 mM) em relação à hortiacina (CIM 1,26 mM). O potencial menos pronunciado da hortiacina pode estar relacionado à presença de uma metoxila em um dos anéis aromáticos da estrutura, uma vez que a presença deste substituinte é a única diferença entre estes alcaloides. Há relato na literatura (MADDOX *et al.*, 2010) que alguns ácidos fenólicos, tais como ácido sinápico e ácido ferúlico, os quais contêm grupamento metoxila como substituintes, foram menos efetivos em inibir o crescimento de *X. fastidiosa*, em relação a outros ácidos fenólicos com substituintes hidroxilas.

O limonoide hortiolida C apresentou um potencial biológico interessante com CIM de 0,83 mM. A ação de limonoides frente à *X. fastidiosa* já foi observada por RIBEIRO *et al.* (2008), quando um dos limonoides avaliados denominado de guianina e isolado de *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani, apresentou CIM de 2,9 mM; outros limonoides como limonina (CIM 3,4 mM), odoratol (CIM 3,8 mM), odoratona (CIM 2,3 mM), gedunina (CIM 2,7 mM) e azadirachtina A (CIM 2,2 mM) também foram testados e suas atividades biológicas foram bastante promissoras. Assim, observa-se que a classe de limonoides destaca-se quanto ao seu potencial frente a esta bactéria.

De maneira geral, todas as substâncias puras avaliadas frente à *X. fastidiosa* apresentaram CIM interessantes e por isso é relevante a continuidade destes ensaios, realizando estudos de mecanismos de ação, da relação estrutura-atividade com a proposta de modificações estruturais nas substâncias já avaliadas e ensaios com moléculas similares àquelas que apresentaram-se como promissoras.

2.4.2 Ensaios Biológicos Frente à Patógenos da Cárie

Os resultados de CIM das substâncias puras são apresentados na TABELA 1.39 (p. 246). O valor de CIM para o controle positivo clorexidina (Sigma[®]) foi de 0,3688 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para *S. sanguinis* e 0,0922 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para *S. salivarius*, respectivamente, concentrações em acordo com a viabilidade destes micro-organismos, segundo o protocolo deste ensaio.

TABELA 1.39: Valores de CIM obtidos dos ensaios biológicos frente à *S. sanguinis* e *S. salivarius*

Amostras	Concentração Inibitória Mínima (CIM)			
	<i>S. sanguinis</i>		<i>S. salivarius</i>	
	$\mu\text{g.mL}^{-1}$	mM	$\mu\text{g.mL}^{-1}$	mM
hortiolida C (substância 03, p. 73)	400	0,83	> 400	-
hortiolida D (substância 06, p. 101)	> 400	-	400	0,80
hortiolida E (substância 07, p. 108)	400	0,86	400	0,86
ácido 3-[2,6-dimetóxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':4,5)-fenil]-propiónico (substância 13, p. 171)	> 400	-	300	1,03
rutaecarpina (substância 17, p. 189)	400	1,39	> 400	-
clorexidina*	0,3688	0,73	0,0922	0,18

*antibiótico empregado para avaliar a viabilidade celular dos micro-organismos.

Nestes ensaios biológicos foi possível observar que dentre os limonoides avaliados, houve diferenças expressivas nos resultados, pois enquanto para *S. sanguinis* a hortiolida C apresentou um valor de CIM interessante, a hortiolida D não apresentou um potencial biológico satisfatório; já para *S. salivarius* as atividades das substâncias se inverteram. Entretanto, assim como para *X. fastidiosa*, os limonoides avaliados apresentaram valores de CIM romissores e em especial nestes ensaios os valores de CIM obtidos foram os mais expressivos, enfatizando o potencial da classe dos limonoides.

2.4.3 Ensaios Biológicos Frente à Micobactérias Patogênicas

Os resultados de CIM dos extratos vegetais e das substâncias puras são apresentados na TABELA 1.40 (p. 247). O valor de CIM para o controle positivo isoniazida (Sigma[®]) foi de 0,30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para *M. tuberculosis* e 1,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para *M. avium* e *M. kansasii*, concentrações em acordo com a viabilidade destes micro-organismos, segundo o protocolo deste ensaio.

TABELA 1.40: Valores de CIM obtidos dos ensaios biológicos frente à *M. tuberculosis*, *M. avium* e *M. kansasii*

Amostras	Concentração Inibitória Mínima (CIM)					
	<i>M. tuberculosis</i>		<i>M. avium</i>		<i>M. kansasii</i>	
	$\mu\text{g.mL}^{-1}$	mM	$\mu\text{g.mL}^{-1}$	mM	$\mu\text{g.mL}^{-1}$	mM
EMTHB	500	-	2000	-	500	-
EMTHO	1000	-	> 2000	-	1000	-
EMTSHO	250	-	2000	-	1000	-
EMCHS	1000	-	>2000	-	2000	-
EMTHS	500	-	>2000	-	2000	-
ácido 3-[2,6-dimetóxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':4,5)-fenil]-propiónico (substância 13, p. 171)	62,5	0,21	> 2000	-	1000	3,42
rutaecarpina (substância 17, p. 189)	15,62	0,054	> 2000	-	2000	6,97
5-metóxi-seselina (substância 21, p. 211)	500	1,94	> 2000	-	2000	7,75
isoniazida*	0,30	0,0022	1,0	0,0073	1,0	0,0073

*antibiótico empregado para avaliar a viabilidade celular dos micro-organismos.

Os extratos vegetais e as substâncias puras apresentaram atividades biológicas mais expressivas frente à *M. tuberculosis*, em especial o extrato EMTSHO, o qual apresentou um valor de CIM interessante (250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) quando comparado aos demais extratos. Deste extrato foi isolada a substância ácido 3-[2,6-dimetóxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':4,5)-fenil]-propiónico que também apresentou um valor de CIM relevante (0,21mM). Estas informações

permitiram a suposição de duas hipóteses: o ácido 3-[2,6-dimetóxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':4,5)-fenil]-propiónico pode ser um dos componentes majoritários no extrato vegetal e por isso potencializou seu efeito biológico; ou neste extrato há um conjunto de substâncias, em quantidades majoritárias e minoritárias, que agem frente ao micro-organismo por efeito de sinergismo.

O alcaloide indoloquinazolínico rutaecarpina apresentou valor de CIM interessante frente à *M. tuberculosis* (CIM 15,62 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). RASTOGI *et al.* (1998) investigaram a atividade antimicobacteriana de dois alcaloides da classe dos indóis pentacíclicos (ibogaine e voacangine) e observaram valores de CIM de 50–100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ frente a *M. tuberculosis*, *M. avium* e *M. kansasii*. Em outros estudos, HUNG-YI HUANG *et al.* (2008) avaliaram outras classes de alcaloides, tais como a dictamina e γ -fagarina frente a *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv e foram constatados valores de CIM de 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para ambos.

Portanto, considerando os potenciais biológicos de algumas classes de alcaloides descritos acima, em especial aqueles da classe dos indoloquinazolínicos, torna-se interessante em trabalhos futuros a continuidade do estudo com a rutaecarpina frente à micobactérias patogênicas, investigando tanto o seu mecanismo de ação quanto a relação estrutura-atividade com uma possível modificação estrutural deste composto e avaliação de outros modelos moleculares similares, tais como a hortiacina e 7,8-desidro-rutaecarpina.

2.4.4 Ensaios Biológicos Frente à *G. citricarpa*

2.4.4.1 Efeito dos extratos e substâncias naturais frente ao crescimento micelial de *G. citricarpa*

Os extratos vegetais de *H. brasiliiana* Vand. ex DC. e *H. superba* Ducke e substâncias obtidas das espécies de *Hortia* estudadas neste trabalho e

avaliadas frente ao crescimento micelial de *G. citricarpa* estão descritas no tópico 2.3.4.1 (p. 240). As avaliações do crescimento micelial foram realizadas a cada três dias durante 21 dias, tendo como referencial o centro de cada placa de Petri onde foi inoculado o disco de *G. citricarpa*. Conforme ilustrado na FIGURA 1.94 (p. 249), realizou-se a medição de cada placa na horizontal e na vertical em centímetros e subtraiu-se em cada medida o diâmetro do inóculo aplicado inicialmente.

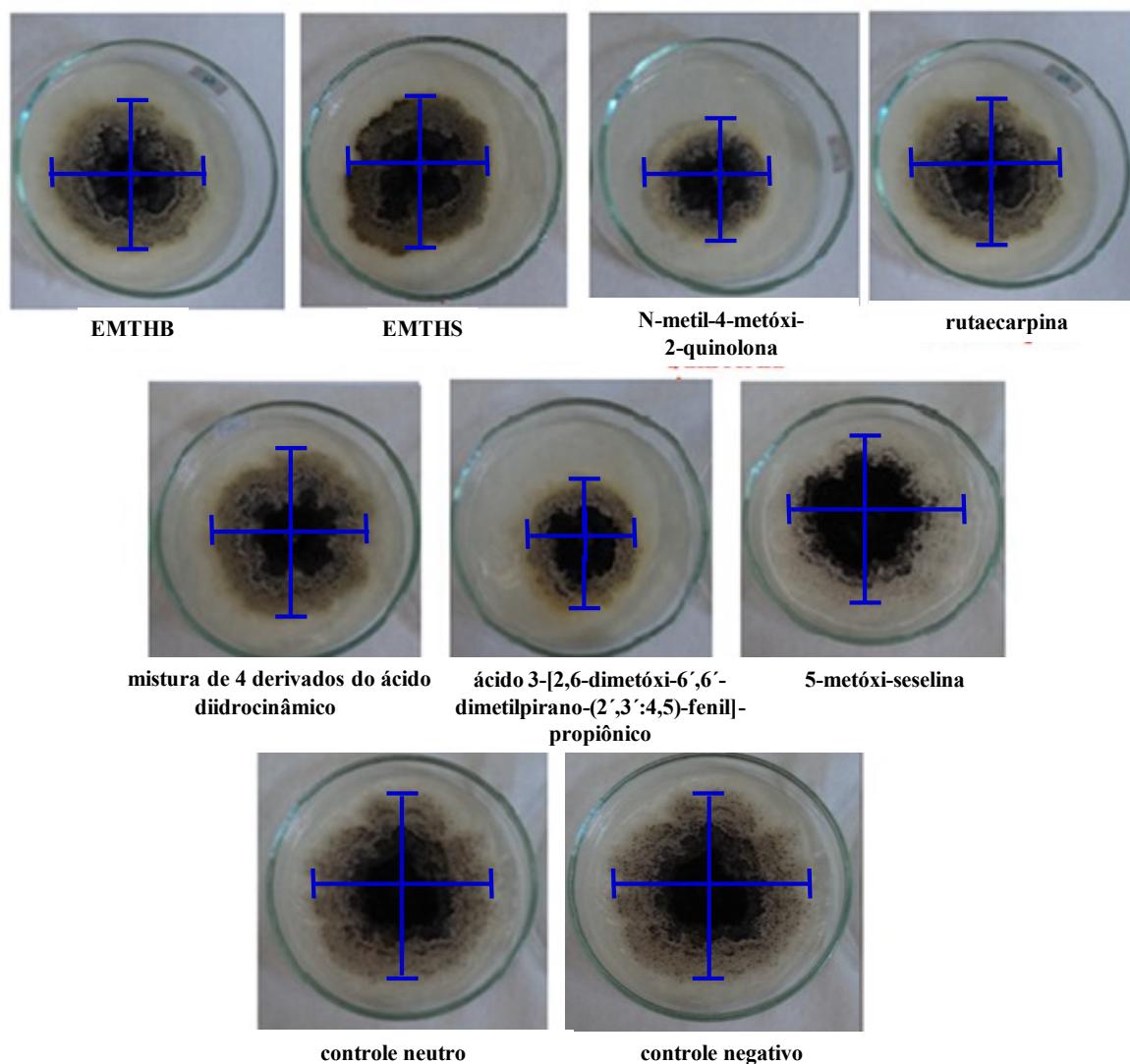


FIGURA 1.94: Ensaio de inibição do crescimento micelial de *G. citricarpa* *in vitro* no 21º dia de experimento

O GRÁFICO 1.1 (p. 250) apresenta a média do crescimento micelial calculada para cada amostra, obtida a partir da média das cinco repetições em cada avaliação. É possível observar pelo gráfico uma inibição do crescimento micelial de *G. citricarpa* ao comparar as substâncias ácido 3-[2,6-dimetóxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':4,5)-fenil]-propiónico (**13**) e N-metil-4-metóxi-2-quinolona (**16**) com os controles neutro e negativo. Tais diferenças foram mais pronunciadas para a substância **16**, pois nos três primeiros dias de avaliação houve uma inibição total do crescimento micelial de *G. citricarpa*.

Uma possível justificativa para a inibição total do crescimento nos três primeiros dias causada por **16** e redução do efeito nos dias subsequentes seria a metabolização de **16** pelo fungo a partir do 3º dia, o que reduziu o efeito tóxico da substância.

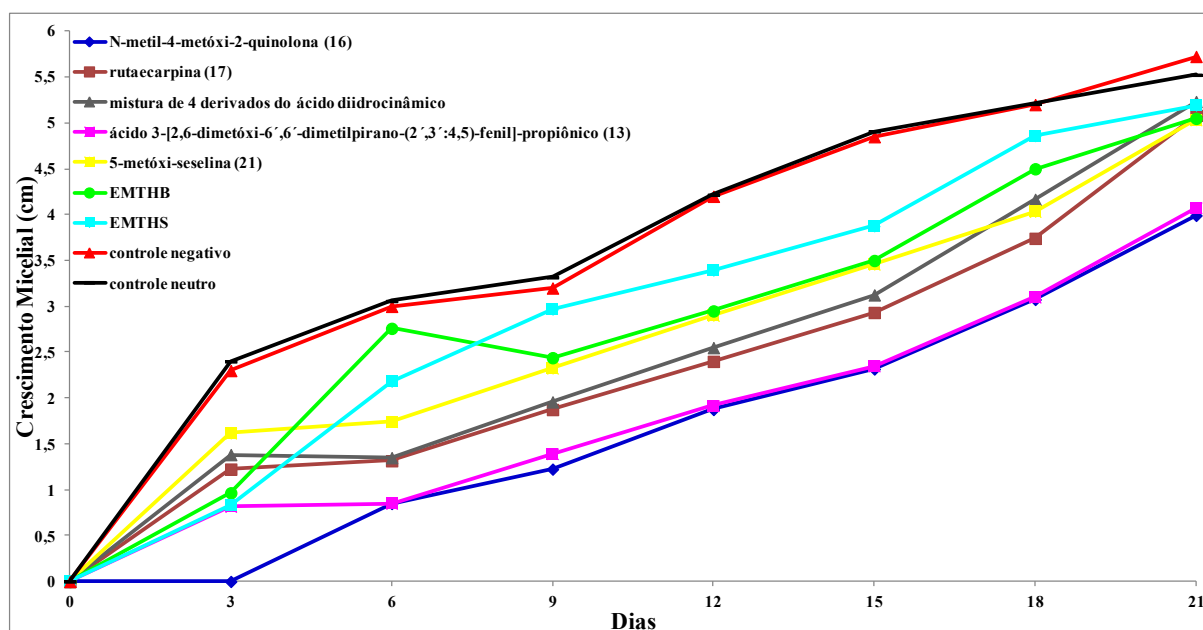


GRÁFICO 1.1: Avaliação do crescimento micelial de *G. citricarpa* na presença de extratos e substâncias isoladas de *Hortia*

Pela análise do gráfico de todo o período do experimento e em especial do 21º dia de crescimento micelial, foi possível constatar que o desenvolvimento de *G. citricarpa* na presença das substâncias **13** e **16** foi menor que no controle neutro. Os extratos vegetais avaliados (EMTHB e EMTHS) e as

demais substâncias não apresentaram atividades inibitórias significativas frente ao crescimento micelial fungo ao longo dos dias de avaliação.

No entanto, é importante destacar que este ensaio avalia apenas o crescimento micelial do fitopatógeno, sendo que este processo não está diretamente envolvido com a fase de infecção nas plantas, a qual ocorre através dos ascósporos e dos picnidiósporos na presença de umidade, quando os esporos germinam e produzem os apressórios.

Desta forma, é de extrema relevância a avaliação das amostras também frente à germinação de esporos de *G. citricarpa* e formação de apressórios, como descrito no tópico 2.3.4.2 (p. 241).

2.4.4.2 Efeito dos extratos e substâncias naturais frente à inibição da germinação de esporos e formação de apressórios de *G. citricarpa*

A avaliação do efeito das amostras naturais frente à inibição da germinação de esporos e formação de apressórios foi realizada comparando-se os resultados obtidos para cada uma com o controle, o qual continha apenas esporos e água destilada. Foram considerados como germinados os esporos com tubos germinativos maiores do que o comprimento do próprio picnidiósporo. Nos casos em que não houve germinação dos esporos no período de 24 horas, o composto testado foi considerado como um possível agente fungitóxico ao fungo (MAGNANI, 2007).

Dentre as amostras naturais avaliadas (TABELA 1.41, p. 252), os resultados mais promissores foram para **16**, **17** e **21**, as quais na concentração de 100 µg.mL⁻¹ foram capazes de inibir, respectivamente, cerca de 98%, 91% e 95% a germinação dos esporos e 100%, 91% e 94% a formação de apressórios, demonstrando serem potenciais ativos frente ao desenvolvimento germinativo de *G. citricarpa*. Há relatos na literatura (MAGNANI, 2007; DE FREITAS, 2010) da atividade inibitória de outras cumarinas, tais como a seselina, crenulatina e a

escoparona, frente à germinação de esporos e formação de apressórios de *G. citricarpa*. Desta forma, o fato da 5-metóxi-seselina (**21**) ter apresentado um resultado relevante neste trabalho sugere que algumas cumarinas podem desempenhar um papel importante na busca de novos fungicidas à *G. citricarpa*.

As amostras **EMTHB**, **EMTHS**, **DAD** e **13** e não apresentaram efeitos inibitórios significativos frente ao fitopatógeno, uma vez que inibiram apenas cerca de 20%, 34%, 20% e 30% a germinação de seus esporos e cerca de 21%, 29%, 15% e 31% a formação de apressórios, respectivamente.

TABELA 1.41: Amostras naturais avaliadas frente a germinação de esporos e formação de apressórios de *G. citricarpa*

AMOSTRA	NOME
13	Ácido 3-[2,6-dimetóxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':4,5)-fenil]-propiónico
16	N-metil-4-metóxi-2-quinolona
17	Rutaecarpina
21	5-metóxi-seselina
EMT	Extrato metanólico do tronco de <i>H. brasiliiana</i> Vand. ex DC.
EMTS	Extrato metanólico do tronco de <i>H. superba</i> Ducke
DAD	Mistura formada por 4 substâncias da classe dos derivados do ácido diidrocinâmico

Os gráficos com valores absolutos e em percentual da germinação de esporos e formação de apressórios são apresentados a seguir (GRÁFICOS 1.2, 1.3, 1.4 e 1.5, ps. 253 a 254).

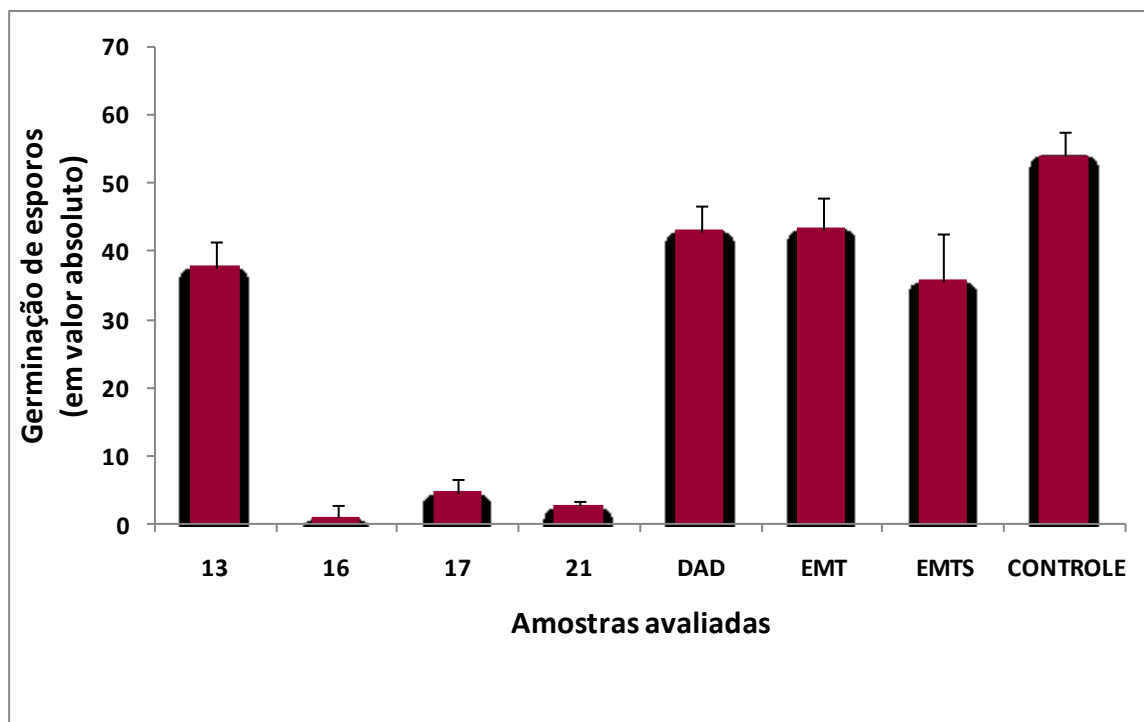


GRÁFICO 1.2: Avaliação da germinação de esporos de *G. citricarpa* (em valor absoluto) na presença de extratos e substâncias isoladas de *Hortia*

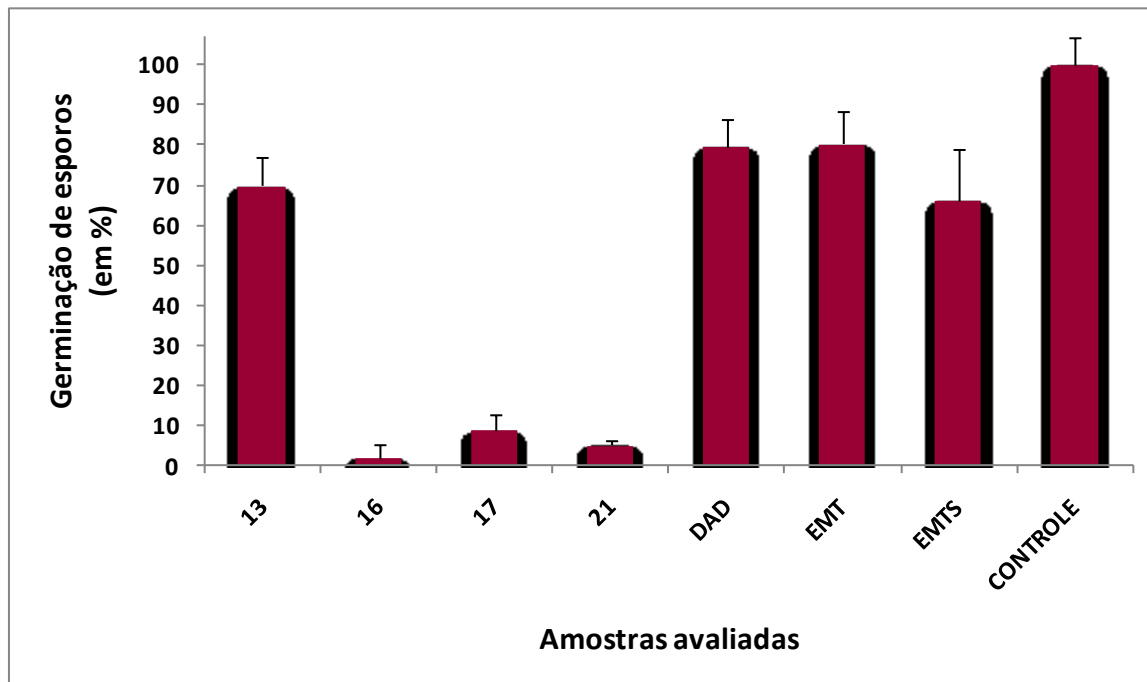


GRÁFICO 1.3: Avaliação da germinação de esporos de *G. citricarpa* (em %) na presença de extratos e substâncias isoladas de *Hortia*

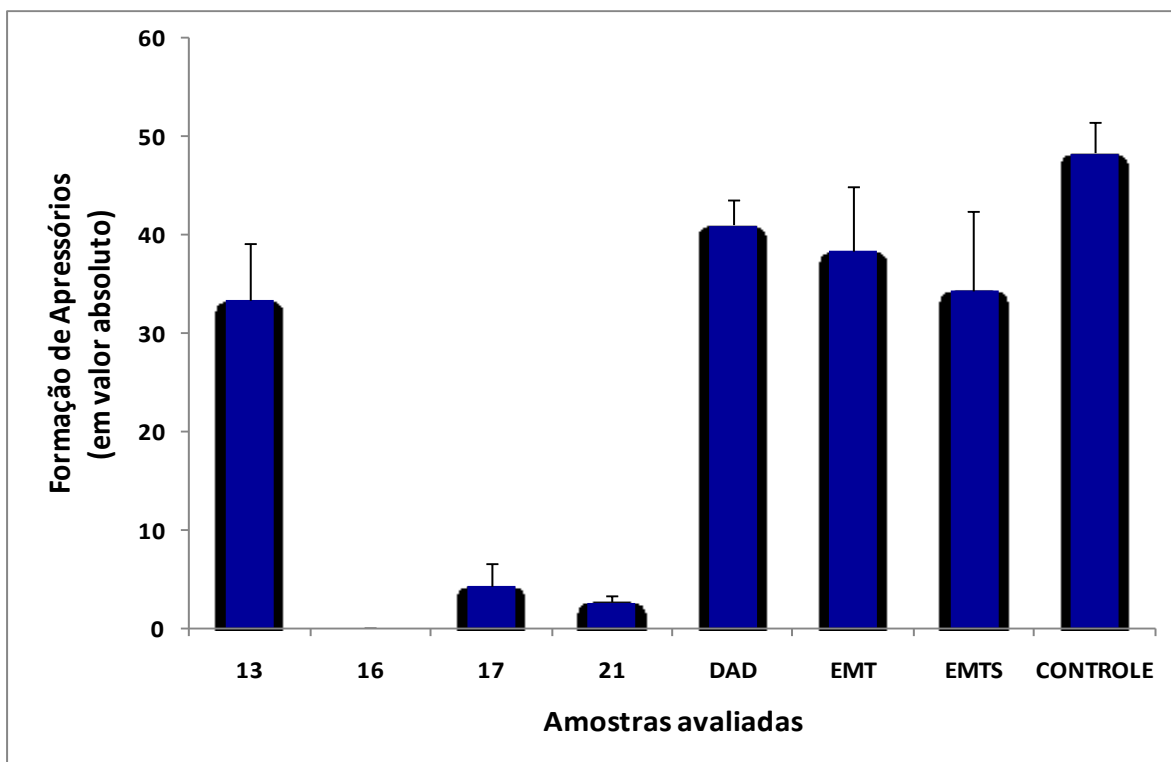


GRÁFICO 1.4: Avaliação da formação de apressórios de *G. citricarpa* (em valor absoluto) na presença de extratos e substâncias isoladas de *Hortia*

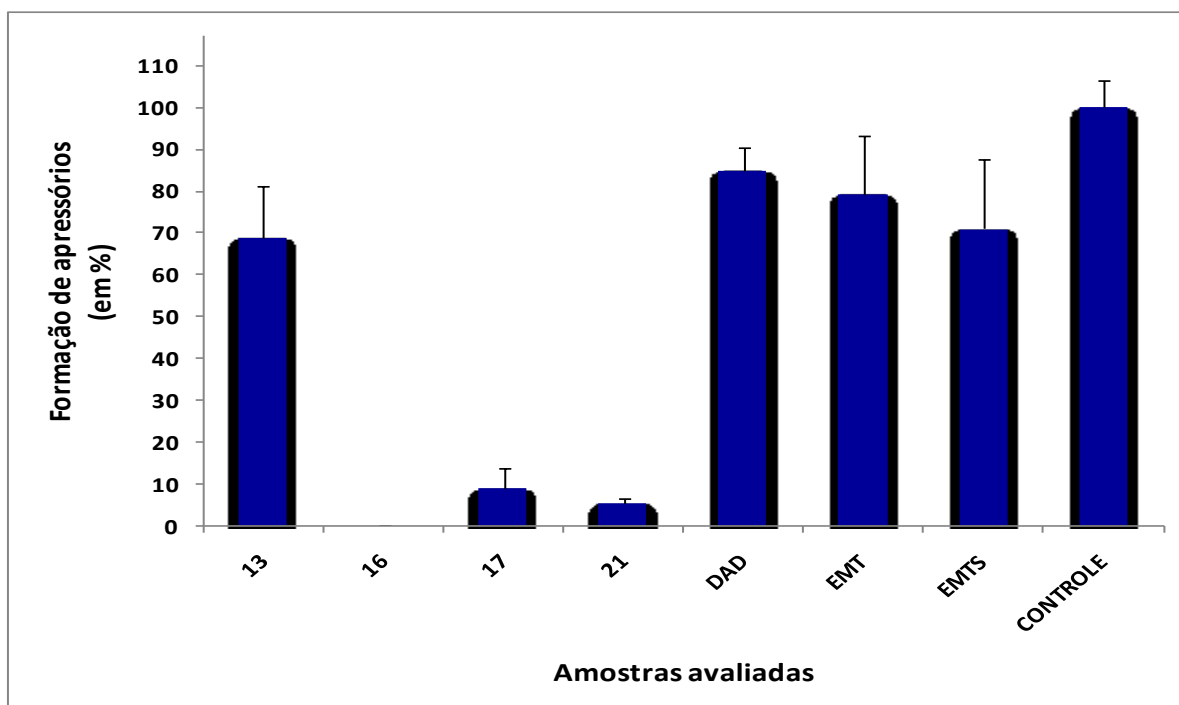
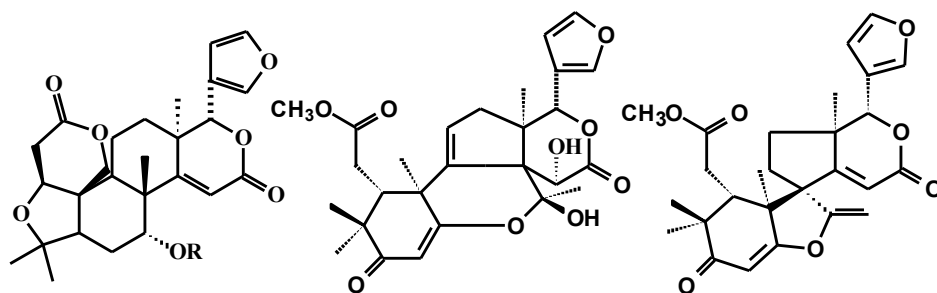


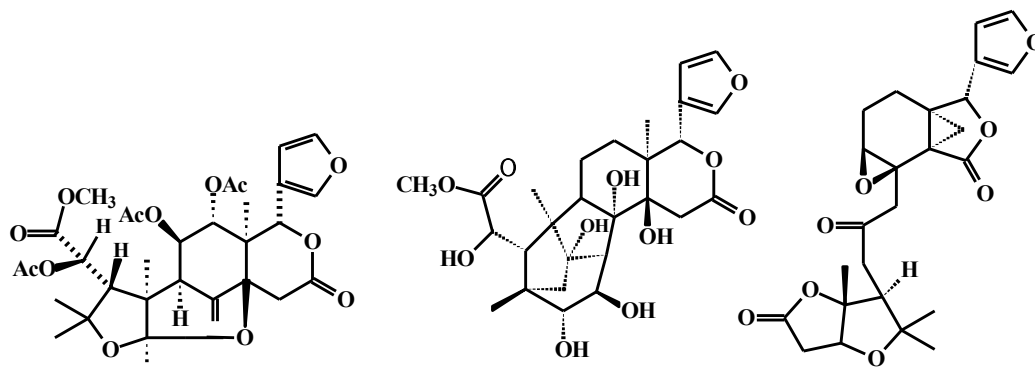
GRÁFICO 1.5: Avaliação da formação de apressórios de *G. citricarpa* (em %) na presença de extratos e substâncias isoladas de *Hortia*

3. Conclusões do Capítulo 01

A continuação do estudo químico de três espécies de *Hortia* (*H. brasiliiana* Vand. ex DC., *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani e *H. superba* Ducke) proporcionou o isolamento e elucidação estrutural de 21 metabólitos secundários, compreendendo 10 limonoides (substâncias **01** a **10**), 03 derivados do ácido diidrocinâmico (substâncias **11** a **13**), 05 alcaloides (substâncias **14** a **18**) e 03 cumarinas (substâncias **19** a **21**), dos quais **03**, **06**, **07**, **11**, **12**, **13**, **14**, **15**, **16**, **17**, **18**, **19** e **21** já haviam sido obtidos em trabalhos anteriores realizados por BRAGA (2005) e SEVERINO (2008) com os mesmos espécimes deste trabalho. Como apresentado neste estudo e em dados da literatura (JACOBS & RAMDAYAL, 1986; SUAREZ *et al.*, 1998, 2002), o gênero *Hortia* produz limonoides altamente especializados semelhantes àqueles do gênero *Flindersia* (Flindersioideae, Rutaceae; BREEN *et al.*, 1984) e das famílias Meliaceae e Cneoraceae (limonoides A,B-*seco*) (da SILVA *et al.*, 1987). Nos gêneros da família Rutaceae, em geral, há modificações no anéis A e B dos limonoides, enquanto que nos gêneros de Meliaceae e Cneoraceae, há modificação em quase toda a estrutura, conforme apresentado a seguir:



Limonoides do gênero *Hortia* (Rutaceae)



Limonoides do gênero *Flindersia* (Rutaceae)

Limonoides de Meliaceae

Limonoides de Cneoraceae

A presença de cumarinas e derivados do ácido antranílico em Flindersioideae, característicos de Rutaceae, reforçam o seu posicionamento de nesta família; porém um reposicionamento para Meliaceae tem sido também discutido baseado em dados morfológicos. O gênero *Flindersia* também possui limonoides complexos, conforme mostrado anteriormente, o que mostra a sua estreita afinidade com Meliaceae. Quanto ao posicionamento de *Hortia*, ENGLER (1931) incluiu este gênero como o único neotropical na tribo Toddalioideae (subtribo Toddaliinae), devido às características particulares de seus frutos e ovário. Em 1988, da SILVA *et al.* com base nas características químicas, posicionou *Hortia* na tribo Galipeae (anteriormente Cusparieae, subfamília Rutoideae). Estudos de filogenia molecular estão sendo cada vez mais empregados para fornecer caracteres adicionais no esclarecimento de gêneros de posicionamento taxonômico incerto em Rutaceae (CHASE *et al.*, 1999; SCOTT *et al.*, 2000; SAMUEL *et al.*, 2001; DE ARAÚJO *et al.*, 2003; POON *et al.*, 2007; GROPPPO *et al.*, 2008; BUT *et al.*, 2009). Estudos realizados por SCOTT *et al.* (2000), POON *et al.* (2007) e GROPPPO *et al.* (2008) descrevem as relações de filogenias moleculares em Rutoideae e Toddalioideae, porém somente o último analisou o gênero *Hortia*. A conclusão unânime desses estudos é a necessidade de unir Rutoideae e Toddalioideae em uma única subfamília como predicado por WATERMAN (1983a, 1990, 2007) segundo parâmetros químicos e morfológicos. Portanto, de acordo com o DNA (GROPPPO *et al.*, 2008) e dados de metabólitos secundários isolados, o gênero *Hortia* deveria ser posicionado na intersecção de Rutoideae e Toddalioideae, mas próximo à Flindersioideae.

Portanto, o objetivo quimiosistemático deste trabalho foi alcançado, pois os alcaloides e derivados do ácido diidrocinâmico reforçam o posicionamento do gênero *Hortia* em Rutaceae, e os limonoides confirmam a complexidade para posicioná-lo em alguma das subfamílias. Esta última classe

posiciona com maior segurança *Hortia* como periférico à Flindersioideae e à nova subfamília da união de Rutoideae e Toddalioideae.

Os ensaios biológicos frente à bactéria *X. fastidiosa*, agente causal da CVC, possibilitou a determinação da CIM de algumas classes de substâncias naturais, dentre as quais o alcaloide rutaecarpina e o limonoide hortiolida C se destacaram com potencias bactericidas relevantes.

A investigação do potencial antimicrobiano de extratos vegetais e substâncias isoladas do gênero *Hortia* frente à micro-organismos do sistema bucal revelou que os limonoides foram os metabólitos que apresentaram as atividades mais expressivas frente à *S. sanguinis* e *S. salivarius*. No caso dos micro-organismos do sistema respiratório, o alcaloide rutaecarpina e o derivado do ácido 3-[2,6-dimetóxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':4,5)-fenil]-propiônico se destacaram pelos seus valores de CIM de 0,054 e 0,21 mM frente à *M. tuberculosis*.

O ensaio biológico frente à *G. citricarpa* foi implantado com sucesso no laboratório de Produtos Naturais da UFSCar, sendo possível avaliar o potencial fungitóxico, além das substâncias isoladas do gênero *Hortia* e apresentadas nesta tese, também de muitas outras que foram isoladas de plantas e micro-organismos. Em relação às substâncias de *Hortia*, foi possível constatar que duas avaliadas {o alcaloide N-metil-4-metóxi-2-quinolona e o derivado do ácido diidrocinâmico ácido 3-[2,6-dimetóxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':4,5)-fenil]-propiônico} apresentaram atividades interessantes frente ao crescimento micelial de *G. citricarpa*. Quanto ao ensaio de inibição *in vitro* pelo método de germinação de esporos e formação de apressórios, os resultados mais promissores foram para N-metil-4-metóxi-2-quinolona, rutaecarpina e 5-metóxi-seselina, as quais na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foram capazes de inibir, respectivamente, cerca de 98%, 91% e 95% a germinação dos esporos e 100%, 91% e 94% a formação de apressórios, demonstrando serem potenciais ativos frente ao desenvolvimento germinativo de *G. citricarpa*.

Desta forma, o segundo objetivo proposto também foi alcançado, pois os ensaios citados acima foram realizados e indicaram resultados promissores, o que motiva a continuidade dos estudos de avaliação do potencial biológico com as substâncias que apresentaram atividades interessantes, uma vez que produtos naturais com propriedades antibacterianas e antifúngicas constituem uma importante e valiosa fonte para a descoberta de novos agentes antimicrobianos.

*Capítulo 02: Estudo Químico e
Avaliação do Potencial Efeito Biológico
do Fungo Guignardia citricarpa*

1. Estudo Químico do Fungo *Guignardia citricarpa*

1.1 Introdução

As plantas, assim como todos os seres vivos, podem sofrer vários efeitos de agentes do meio, os quais causam perturbações no seu desenvolvimento, doenças, ou até mesmo sua decadência, podendo levar até a morte. As doenças presentes nas plantas são causadoras de elevados danos econômicos, podendo destruir culturas agrícolas e em muitas vezes, numa tentativa de controlar as doenças, são utilizadas enormes quantidades de produtos pesticidas, causando assim outros danos, poluindo águas, o ambiente e até os alimentos (SILVA, 2007).

A MPC, como descrito em **2.1.1.2 - Mancha Preta dos Citros (MPC)** (p. 221), é um exemplo de uma importante doença citrícola que causa danos econômicos relevantes; o desafio para os citricultores no controle desta doença tem aumentado cada vez mais com a exigência por produtos livres de resíduos químicos tóxicos. Esta informação estimulou MAGNANI (2002) a implantar ensaios de avaliação da atividade antifúngica de metabólitos secundários isolados de plantas e micro-organismos frente à *G. citricarpa* em parceria com o grupo do Prof. Dr. Sérgio F. Pascholatti – ESALQ – USP/Piracicaba e neste trabalho foi dada a continuidade nestes ensaios, como descrito em **2.3.4 - Ensaios Biológicos Frente à *G. citricarpa*** (p. 239), junto ao laboratório de Produtos Naturais (PN) da UFSCar.

Além da realização dos ensaios biológicos, neste trabalho foi proposto o estudo químico de *G. citricarpa* como uma segunda alternativa na busca de inibição do desenvolvimento deste fungo.

Até o momento, há alguns relatos na literatura de isolamento de metabólitos secundários do gênero *Guignardia* (SAKAI *et al.*, 1970;

SAKAMURA *et al.*, 1971; CALLHOUN *et al.*, 1992; RODRIGUES-HEERKLOTZ *et al.*, 2001; GUIMARÃES, 2009; YUAN *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2010), porém da espécie fitopatogênica *G. citricarpa* há poucos dados (SASSAKI *et al.*, 2002) e, portanto ainda não é possível entender todos os aspectos químicos envolvidos no processo de desenvolvimento e patogenicidade da mesma.

Desta forma, nesta tese pretendeu-se iniciar o estudo químico de *G. citricarpa* para que futuramente seja possível conhecer as classes de metabólitos secundários produzidos pelo mesmo e entender o mecanismo da relação fitopatógeno/planta por meio das substâncias isoladas.

No entanto, cabe ressaltar que um estudo químico detalhado de *G. citricarpa* visando um conhecimento amplo das moléculas produzidas por este fungo demanda um tempo extenso, e, portanto, durante a realização do trabalho descrito nesta tese não haveria tempo hábil. Assim, o objetivo desta tese foi iniciar tal estudo visando um conhecimento geral de quais tipos de metabólitos seriam produzidos e em outros trabalhos posteriores será dada continuidade no estudo químico de *G. citricarpa*.

1.2 Objetivos

Os objetivos desta parte do trabalho foram:

- ↳ Realizar estudos de otimização das condições experimentais (meio de cultura líquido e dias de crescimento) para desenvolver o fungo *G. citricarpa* em escala ampliada;
- ↳ Desenvolver *G. citricarpa* em escala ampliada;
- ↳ Realizar o estudo químico dos extratos obtidos do meio líquido e do micélio formado no crescimento de *G. citricarpa*, visando o isolamento de metabólitos produzidos pelo fungo;
- ↳ Investigar o potencial efeito biológico de extratos e subextratos obtidos do desenvolvimento de *G. citricarpa* em escala ampliada frente à bactéria *X. fastidiosa*.

1.3 Parte Experimental

1.3.1 Materiais:

a) Fase Estacionária para Cromatografia em Coluna (CC):

- Sílica gel (230-400 mesh)
- Sephadex LH-20

b) Fase Estacionária para Cromatografia em Camada Delgada (CCD):

- Folhas de alumínio (20x20 cm) de sílica gel 60 PF₂₅₄

c) Eluentes para Cromatografia:

- Solventes comerciais destilados no DQ-UFSCar
- Solventes grau HPLC JT Baker

d) Solventes utilizados para a obtenção dos espectros de RMN:

- Deuterados da Merck e Aldrich 98-99,9%

e) Reveladores empregados:

- Câmara de UV (254 e 365 nm)
- Vanilina em ácido sulfúrico

f) Reagentes utilizados para o cultivo de *G. citricarpa*:

- Álcool 70%
- Meio de Cultura Comercial Batata-Dextrose – Acumedia®
- Nitrato de Sódio
- Fosfato de Potássio
- Sulfato de Magnésio Heptaidratado
- Cloreto de Potássio
- Sulfato de Ferro Heptaidratado
- Extrato de Malte
- Glicose

g) Papel de Filtro:

- INLAB tipo 10, porosidade 3,0 µm

h) CLAE → Colunas Cromatográficas:

- Agilent Eclipse XDB C-18 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm)
- Shodex Asahipak Polimérica GS-310 2Ga (460 mm x 25 mm, 10 µm)

1.3.2 Equipamentos:

a) Rotaevaporadores:

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

b) Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear:

- Bruker Avance III 500 MHz para o ^1H (11,8 Tesla), pertencente ao departamento de Química da Universidade Federal de Goiás (UFG) em Goiânia-GO.
- Bruker DRX 400 MHz para o ^1H (9,4 Tesla)*
- Bruker ARX 200 MHz para o ^1H (4,7 Tesla)*

* Equipamentos pertencentes ao departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) em São Carlos-SP.

c) Cromatógrafo Gasoso Acoplado ao Espectrômetro de Massas:

- Shimadzu GC – 17A, coluna DB-130 m x 0,25 mm e HP-5

d) Espectrômetro de massas:

- Cromatógrafo Líquido Alliance 2695 equipado com detector de arranjo de diodos PDA 2996 (Waters Co., Milford, MA, USA); dados espectrais foram adquiridos no modo positivo em um espectrômetro triplo quadrupolo Micromass QuattroLC (Manchester, U.K), equipado com fonte de íons Z-Spray API e uma sonda electrospray Megaflo.

- e) **Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE-DAD):**
 - Shimadzu SCL – 10 Avp, equipado com degaseificador de membrana Shimadzu DGU – 14A, bombas Shimadzu LC – 10ADvp e detectores de arranjo de diodos Shimadzu SPD – M10Avp
 - Shimadzu SCL – 10A, condições preparativas com válvula de reciclo, detector UV-VIS, modelo SPD- 6AV, injetor Rheodyne 7123
- f) **Estufa de Secagem e Esterilização:**
 - Fanen-315 SE
- g) **Balança Analítica:**
 - Mettler P163
- h) **Câmara de Fluxo Laminar:**
 - Veco VL FS-12M
- i) **Autoclaves Verticais:**
 - Phoenix AV 30
 - Phoenix AV 50
 - Phoenix AV 75
- j) **Estufa Incubadora (B.O.D.):**
 - Fanem – 347 CD
- l) **Banho de Ultra-som:**
 - Branson 1510, Danbury, CT
- m) **Homogeneizador:**
 - Turrax TE 102, Tecnal

1.3.3 Metodologia do Estudo Químico do Fungo *G. citricarpa*

1.3.3.1 Obtenção de *G. citricarpa*

O fungo *G. citricarpa* foi isolado e confirmado como patogênico pelo pesquisador Carlos Ivan Aguilar-Vildoso a partir de lesões típicas de mancha preta em frutos de limão verdadeiro (coletados na Fazenda Sete

Flamboyants, em Mogi Guaçu, SP) e denominado de IAC/13/1996. Este micro-organismo foi doado pra este estudo no dia 10 de março de 2009, pelo Dr. Marcos Antonio Machado e pela Dra. Ana Carla Oliveira da Silva Pinhati, do Centro de Citricultura APTA Citros “Sylvio Moreira”, Instituto Agrônômico de Campinas-IAC, Estação de Cordeirópolis-SP. O isolado fornecido ficou mantido em conservação e em placas de Petri no Laboratório de Produtos Naturais da UFSCar, São Carlos, SP.

1.3.3.2 Desenvolvimento de *G. citricarpa*:

1.3.3.2.1 Escolha do Meio de Cultura para o Desenvolvimento em Escala Ampliada

Para a escolha do meio de cultura mais apropriado ao desenvolvimento do fungo em escala ampliada foram testados os seguintes meios: Batata/Dextrose (BD), Czapeck e Czapeck enriquecido com 2% de extrato de malte, os quais são compostos pelos nutrientes descritos a seguir (TABELAS 2.1 a 2.3, ps. 268 a 269).

TABELA 2.1: Composição do Meio Batata/Dextrose (BD)

Nutrientes	Quantidade (gramas)
Meio de cultura comercial (Acumedia [®]) composto por batata e dextrose	24,0
Água destilada	1,0 L

TABELA 2.2: Composição do Meio Czapeck

Nutrientes	Quantidade (gramas)
Nitrato de sódio	3,0
Fosfato de potássio	1,0
Sulfato de magnésio heptaidratado	0,5
Cloreto de potássio	0,5
Sulfato de ferro heptaidratado	0,01
Glicose	30,0
Água destilada	1,0 L

TABELA 2.3: Composição do Meio Czapeck enriquecido com 2% de extrato de malte

Nutrientes	Quantidade (gramas)
Nitrato de sódio	3,0
Fosfato de potássio	1,0
Sulfato de magnésio heptaidratado	0,5
Cloreto de potássio	0,5
Sulfato de ferro heptaidratado	0,01
Glicose	30,0
Extrato de malte (2%)	20,0
Água destilada	1,0 L

Dissolveu-se, sob agitação constante, os nutrientes de cada meio de cultura na devida proporção em água destilada. Em seguida, adicionou-se, separadamente, o volume pretendido em frascos de Erlenmeyer, os quais foram autoclavados por 20 minutos, a 120 °C e 1 atm de pressão para a esterilização dos meios de cultura.

Em seguida, os frascos foram transferidos para a capela de fluxo laminar, previamente esterilizada e, após os meios atingirem a temperatura ambiente, transferiu-se para os frascos de Erlenmeyer três discos de *G. citricarpa*, conservado em placas de Petri em meio BDA durante 21 dias. Além

dos frascos com o inóculo, manteve-se também durante os experimentos dois frascos de Erlenmeyer para cada meio de cultura para controle biológico. Todos os frascos foram mantidos estáticos, sob luz, a 25 °C por um período de 45 dias. As FIGURAS 2.1 a 2.3 (ps. 270) apresentam o desenvolvimento do fungo em cada um dos meios de cultura.



FIGURA 2.1: Meio de cultura BD com *G. citricarpa*



FIGURA 2.2: Meio de cultura Czapeck com *G. citricarpa*

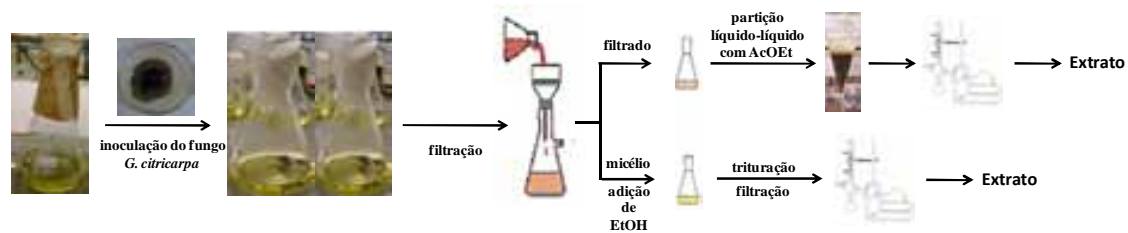


FIGURA 2.3: Meio de cultura Czapeck enriquecido com 2% de extrato de malte com *G. citricarpa*

Após 45 dias, o desenvolvimento foi interrompido e o fungo foi extraído dos três meios de cultura.

1.3.3.2.1.1 Extração dos metabólitos a partir dos três meios de cultura

Finalizado o período de incubação, os três meios de cultura contendo *G. citricarpa* em desenvolvimento, bem como os frascos contendo o controle, foram filtrados, a pressão reduzida, em capela de fluxo laminar, resultando no meio líquido e micélio do fungo. Ao micélio de cada meio de cultura adicionou-se 300 mL de EtOH, triturando-o a seguir; após 24 horas foi realizada uma filtração e adicionou-se mais 200 mL de EtOH à massa micelial, filtrando-se novamente após 24 horas. O filtrado etanólico foi concentrado em rotaevaporador, obtendo-se assim o extrato micelial. Particionou-se o meio líquido de cada meio de cultura com AcOEt na proporção de 1:1 por três vezes, o qual produziu o extrato da partição líquido-líquido. Para os meios de cultura controles foi realizado apenas o processo de partição líquido-líquido com AcOEt. O ESQUEMA 2.1 (p. 271) ilustra resumidamente o procedimento descrito de cultivo e extração de *G. citricarpa*.



ESQUEMA 2.1: Procedimento de cultivo e extração de *G. citricarpa*

Os extratos brutos obtidos foram codificados como descrito a seguir:

- Extrato AcOEt do meio líquido BD
- Extrato AcOEt do controle BD*
- Extrato EtOH do micélio – meio BD
- Extrato AcOEt do meio líquido Czapeck

- Extrato AcOEt do controle Czapeck*
- Extrato EtOH do micélio – meio Czapeck
- Extrato AcOEt do meio líquido Czapeck enriquecido com 2% de extrato de malte
- Extrato AcOEt do controle Czapeck enriquecido com 2% de extrato de malte*
- Extrato EtOH do micélio – meio Czapeck enriquecido com 2% de extrato de malte

1.3.3.2.1.2 Análise do Perfil Químico dos Extratos Brutos em Três Diferentes Meios de Cultura

Os perfis metabólicos dos extratos de *G. citricarpa* obtidos dos três meios de cultura testados foram analisados e comparados através da técnica CLAE-DAD, com a finalidade de selecionar o meio de cultura mais promissor à produção da maior variedade de metabólitos secundários.

Alguns métodos cromatográficos foram otimizados para a obtenção de melhores condições de análise. O método que ofereceu melhor resolução cromatográfica está descrito na TABELA 2.4 (p. 272).

Método:

Vazão: 0,8 mL.min⁻¹

Fase Móvel: MeOH e H₂O

Fase estacionária: Coluna Agilent Eclipse XDB C-18 (5 µm, 4,6 x 150 mm)

λ = 190 a 600 nm

TABELA 2.4: Condições de eluição do método cromatográfico empregado para os extratos brutos de *G. citricarpa*

Tempo (minutos)	Água (%)	MeOH (%)
0,01	97	3
15,00	90	10
70,00	0	100
85,00	0	100
110,00	95	5
110,01	95	5

Após a análise via CLAE-DAD, todos os extratos foram submetidos ao experimento de RMN de ^1H . É importante destacar que, embora a técnica de CLAE-DAD seja de grande utilidade para o conhecimento do perfil químico de *G. citricarpa*, os compostos que não possuem grupos cromóforos, não absorvem na região do UV. Assim, o emprego da técnica de RMN teve como objetivo a complementação dos dados nos resultados obtidos neste estudo.

De acordo com os cromatogramas obtidos, foi possível observar resultados mais promissores (número de picos nos cromatogramas) para os extratos brutos oriundos do meio BD em quatro comprimentos de onda selecionados (230, 255, 312 e 365 nm). Essa observação indicou a potencialidade de *G. citricarpa* em produzir uma variedade de metabólitos secundários neste meio. Além disso, ao comparar os cromatogramas dos extratos brutos com o do extrato do controle, foi possível observar a presença de picos cromatográficos diferenciais com tempos de retenção distintos, o que sugere a produção de metabólitos pelo micro-organismo e, portanto, boa adaptação ao meio de cultura utilizado. Quando comparou-se os cromatogramas dos meios de cultura Czapeck e Czapeck enriquecido com 2% de extrato de malte com seus respectivos extratos controle, notou-se a ausência de picos diferenciais, sugerindo que possivelmente tais meios não são tão propícios ao desenvolvimento e à produção de substâncias por *G. citricarpa*.

Ao analisar os espectros de RMN de ^1H dos extratos obtidos dos três meios de cultura, observou-se a presença de muitos sinais nos extratos obtidos do meio BD; comparou-se os espectros dos extratos brutos com o extrato controle e assim como as diferenças notadas nos cromatogramas de CLAE-DAD, foi possível observar diferenças nos deslocamentos químicos dos sinais.

Os cromatogramas e os espectros obtidos via RMN de ^1H dos extratos obtidos a partir do meio líquido, controle e micélio do desenvolvimento

de *G. citricarpa* no meio BD são apresentados no APÊNDICE – TÓPICOS 01 e 02.

Portanto, com base em todos os dados expostos anteriormente, constatou-se que o meio BD seria o mais promissor para o isolamento de várias classes de metabólitos secundários e, portanto, o mesmo foi selecionado para o desenvolvimento do fungo em escala ampliada.

1.3.3.2.2 Determinação do Tempo Necessário para o Desenvolvimento de *G. citricarpa* no Meio de Cultura Escolhido para o Desenvolvimento em Escala Ampliada:

Após a escolha do meio de cultura BD para o desenvolvimento em escala ampliada de *G. citricarpa*, otimizou-se quantos dias deveria manter o fungo em desenvolvimento neste meio. Como já descrito, para escolher o meio de cultura mais adequado deixou-se o fungo em contato com os três meios por 45 dias. Porém, acredita-se que este seja um número muito elevado de dias e possivelmente o fungo poderia consumir todos os nutrientes do meio e cessados estes, poderia iniciar um processo de biotransformação. Caso isso seja um fato que realmente ocorra, não seria interessante para o estudo em questão, visto que o objetivo é isolar a maior variedade de metabólitos produzidos por *G. citricarpa*.

Para o estudo em questão, foi empregado o mesmo procedimento descrito no tópico 1.3.3.2.1 (p. 268) e a cada cinco dias realizou-se a extração dos metabólitos microbianos empregando a metodologia descrita no tópico 1.3.3.2.1.1 (p. 271) até o 45º dia de desenvolvimento do fungo.

Os perfis metabólicos dos extratos de *G. citricarpa* obtidos do meio de cultura BD do 5º ao 45º dia de desenvolvimento também foram analisados e comparados através da técnica CLAE-DAD, empregando as mesmas condições cromatográficas do tópico 1.3.3.2.1.2 (p. 272).

Pela análise dos cromatogramas dos extratos brutos obtidos do micélio e do meio líquido em quatro comprimentos de onda selecionados (230, 255, 312 e 365 nm), foi possível observar que os mesmos apresentaram resultados mais promissores entre o 25º e o 35º dia de desenvolvimento do fungo no meio de cultura BD, conforme cromatogramas apresentados no APÊNDICE – TÓPICO 03. Quando comparou-se os cromatogramas do cultivo fúngico com o meio controle, foi notório a presença de picos cromatográficos diferenciais, o que sugeriu a produção de metabólitos pelo micro-organismo, especialmente neste intervalo de tempo de desenvolvimento. Sendo assim, optou-se por desenvolver *G. citricarpa* em escala ampliada durante 25 dias e 35 dias.

1.3.3.2.3 Desenvolvimento de *G. citricarpa* em Escala Ampliada:

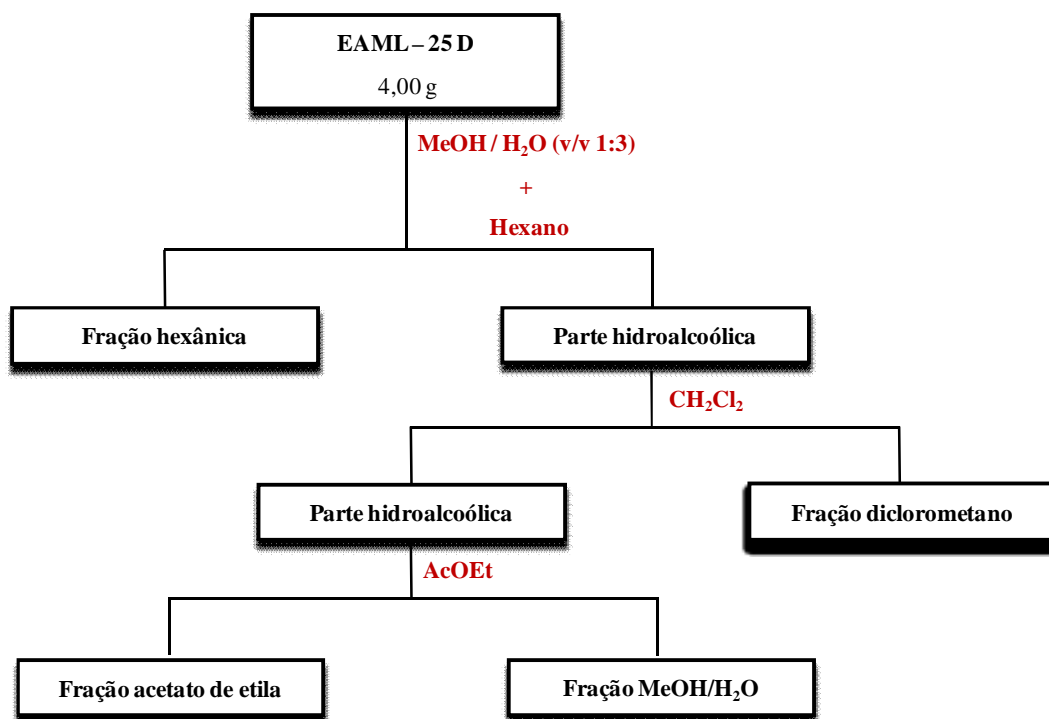
Definidos o meio de cultura e o tempo de desenvolvimento de *G. citricarpa*, iniciou-se o desenvolvimento em escala ampliada, seguindo a metodologia descrita no tópico 1.3.3.2.1.1 (p. 271). Além do emprego de AcOEt na partição líquido-líquido do meio líquido, realizou-se também uma extração com BuOH. Todos os extratos brutos obtidos são apresentados a seguir, juntamente com as massas obtidas:

- Extrato AcOEt do meio líquido (25 dias → 5,50 g) (35 dias → 3,60 g);
- Extrato BuOH do meio líquido (25 dias → 0,45 g) (35 dias → 0,40 g);
- Extrato EtOH do micélio (25 dias → 5,80 g) (35 dias → 6,20 g);

1.3.3.3 Fracionamento dos Extratos Brutos e Isolamento das Substâncias de *G. citricarpa*

1.3.3.3.1 Fracionamento do Extrato AcOEt do Meio Líquido - 25 Dias

O extrato AcOEt do meio líquido (25 dias) (EAML - 25D) foi submetido à partição líquido-líquido, conforme o procedimento descrito no FLUXOGRAMA 2.1 (p. 276).



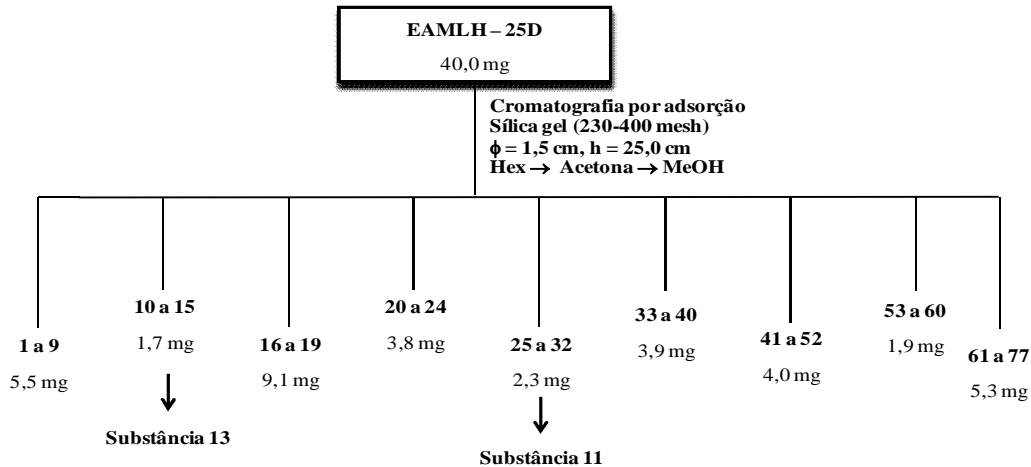
FLUXOGRAMA 2.1: Partição líquido-líquido do EAML – 25D

Após a evaporação dos solventes hexano, CH₂Cl₂, AcOEt e MeOH/H₂O foram obtidos 4 subextratos a partir do EAML – 25D, conforme descrito na TABELA 2.5 (p. 277).

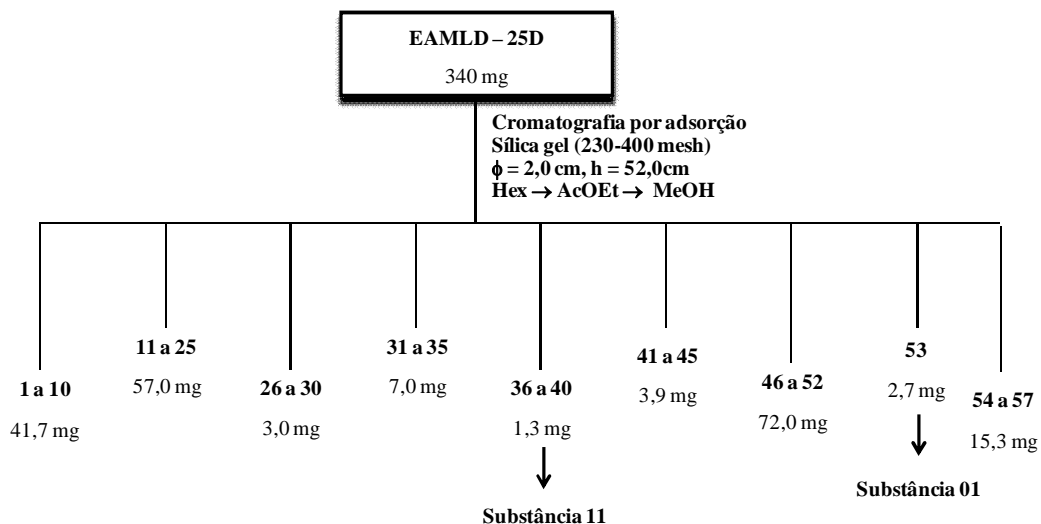
TABELA 2.5: Subextratos provenientes do fracionamento do EAML – 25D

Extrato Metanólico	Subextrato	Solvente	Massa (g)
EAML – 25D 4,00 g	EAMLH – 25D	Hexano	0,12
	EAMLD – 25D	CH ₂ Cl ₂	0,75
	EAMLA – 25D	AcOEt	0,98
	EAMLMH – 25D	MeOH/H ₂ O	1,94

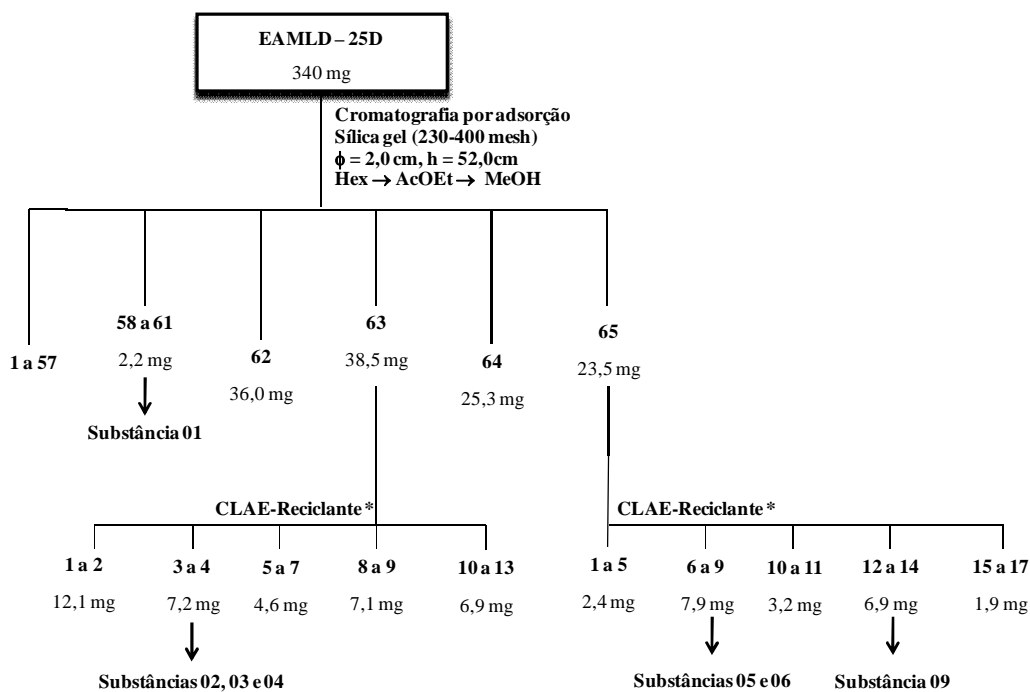
Foi realizado RMN de ¹H de cada subextrato e foi possível observar nos espectros dos subextratos EAMLH – 25D e EAMLD – 25D sinais de substâncias de interesse, porém em mistura e com impurezas. Desta forma, estes subextratos foram submetidos a fracionamentos (FLUXOGRAMAS 2.2 a 2.3, ps. 277 a 278) e foi possível isolar as seguintes substâncias: ciclo-(prolina-leucina) (**01**), ciclo-(fenilalanina-tirosina), ciclo-(prolina-tirosina), ciclo-(prolina-fenilalanina) (**02, 03 e 04**), uridina e uracila (**05 e 06**), inosina (**09**), 5-hidróxi-metil-furfuraldeído (**11**) e triglicerídeo (**13**).



FLUXOGRAMA 2.2: Fracionamento do EAMLH – 25D



FLUXOGRAMA 2.3: Fracionamento do EAMLD – 25D

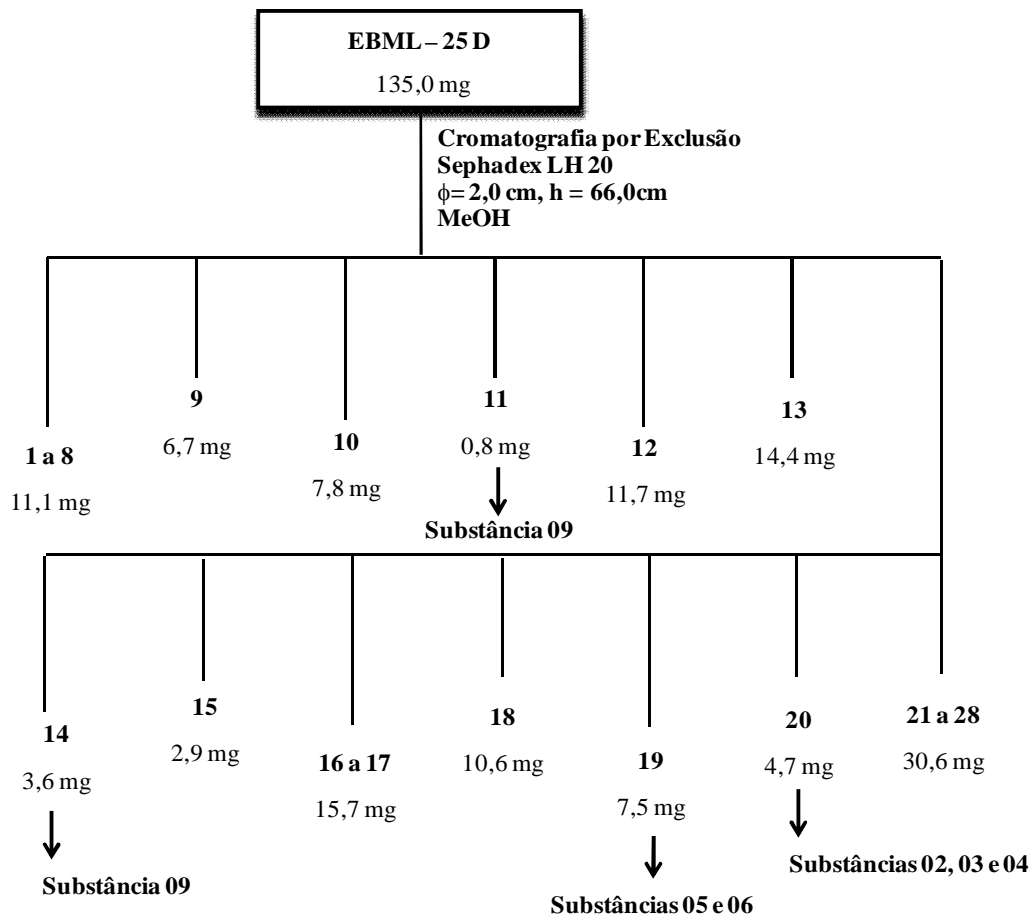


* Coluna Polimérica Preparativa Shodex Asahipak (45,0 x 2,5 cm, partícula de 5 μ m), Loop de 200 μ L;
Eluição com MeOH; Detector 217 e 234 nm; Vazão de 5 mL.min⁻¹; Amostras coletadas no 1º ciclo.

FLUXOGRAMA 2.3: continuação

1.3.3.3.2 Fracionamento do Extrato BuOH do Meio Líquido - 25 Dias

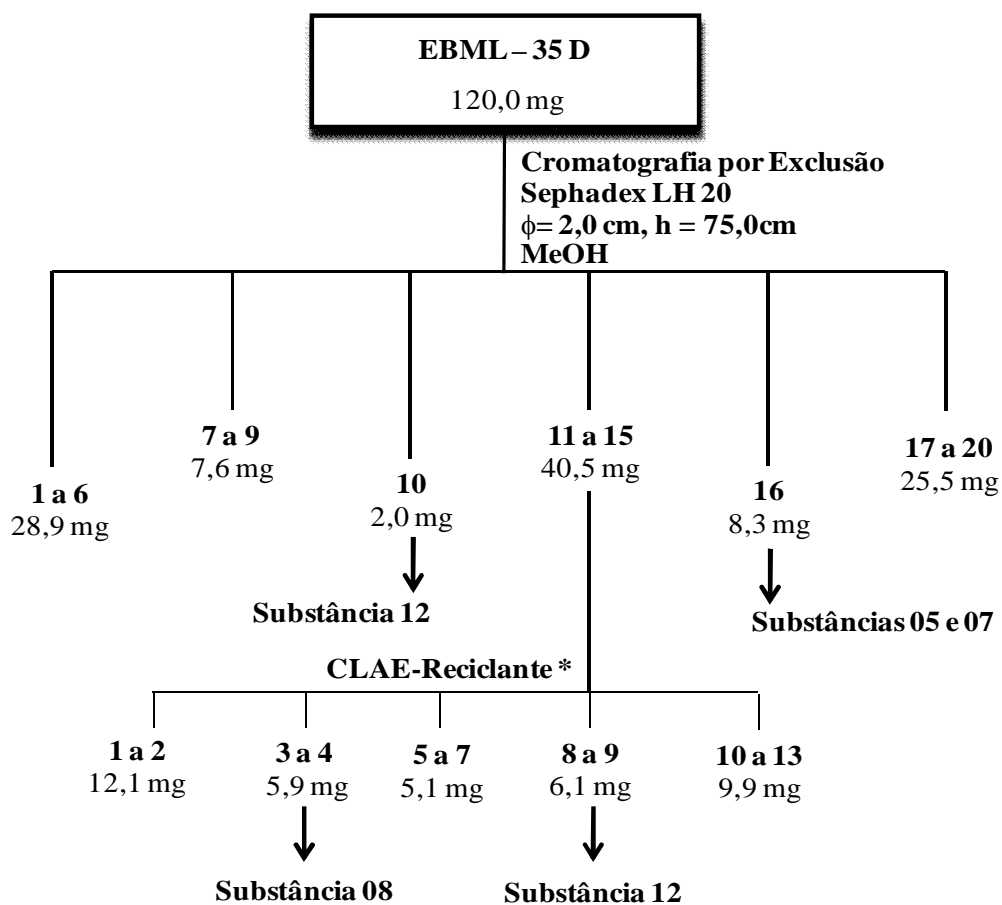
O extrato butanólico obtido a partir do meio líquido no qual *G. citricarpa* se desenvolveu por 25 dias (EBML – 25 D) foi fracionado via Cromatografia por Exclusão (FLUXOGRAMA 2.4, p. 279), utilizando como fase móvel metanol. As frações obtidas a partir deste extrato foram submetidas à análise por CCD e agrupadas de acordo com as similaridades químicas. Desta forma, este extrato proporcionou o isolamento das substâncias ciclo-(fenilalanina-tirosina), ciclo-(prolina-tirosina), ciclo-(prolina-fenilalanina) (**02**, **03 e 04**), uridina e uracila (**05 e 06**) e inosina (**09**).



FLUXOGRAMA 2.4: Fracionamento do EBML – 25D

1.3.3.3 Fracionamento do Extrato BuOH do Meio Líquido - 35 Dias

O extrato butanólico obtido a partir do meio líquido no qual *G. citricarpa* se desenvolveu por 35 dias (EBML – 35 D) foi fracionado via Cromatografia por Exclusão (FLUXOGRAMA 2.5, p. 280), utilizando como fase móvel metanol. As frações obtidas a partir deste extrato foram submetidas à análise por CCD e agrupadas de acordo com as similaridades químicas. Desta forma, este extrato proporcionou o isolamento das seguintes substâncias: uridina e triptofano (**05 e 07**), 5-metil-uridina (**08**) e ácido 4-hidróxi-benzóico (**12**).

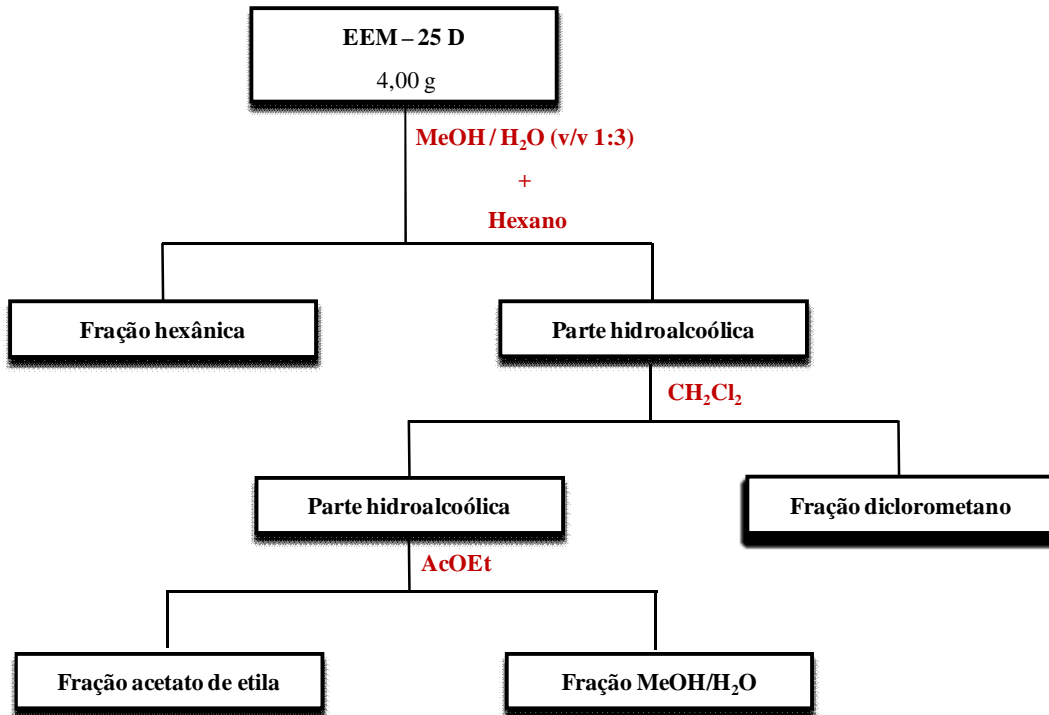


* Coluna Preparativa C-18 (25,0 x 2,0 cm, partícula de 5 µm), Loop de 200 µL;
Eluição com MeOH:H₂O (6:4); Detector 217 e 234 nm; Vazão de 3 mL.min⁻¹; Amostras coletadas no 1º ciclo.

FLUXOGRAMA 2.5: Fracionamento do EBML – 35D

1.3.3.4 Fracionamento dos Extratos Etanólicos dos Micélios - 25 dias e 35 dias

O extrato etanólico do micélio - 25 dias (EEM - 25D) foi submetido à partição líquido-líquido, conforme o procedimento descrito no FLUXOGRAMA 2.6 (p. 281).



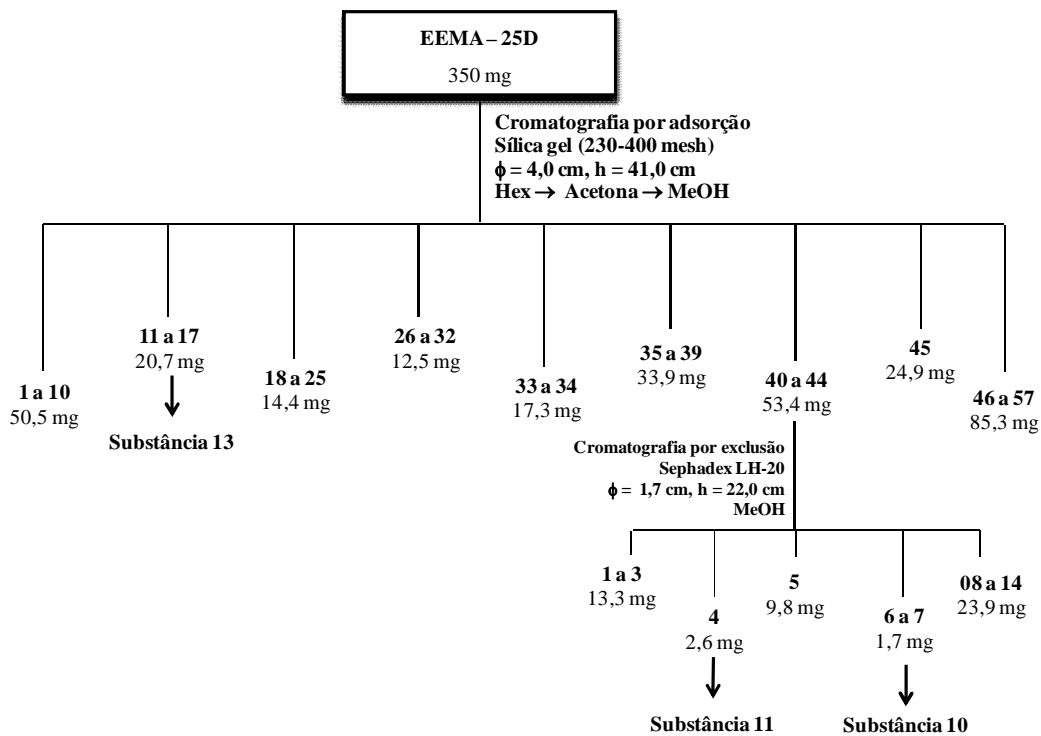
FLUXOGRAMA 2.6: Partição líquido-líquido do EEM – 25D

Após a evaporação dos solventes hexano, CH₂Cl₂, AcOEt e MeOH/H₂O foram obtidos 4 subextratos a partir do EEM – 25D, conforme descrito na TABELA 2.6 (p. 281).

TABELA 2.6: Subextratos provenientes do fracionamento do EEM – 25D

Extrato Metanólico	Subextrato	Solvente	Massa (g)
EEM – 25D 4,00 g	EEMH – 25D	Hexano	0,15
	EEMD – 25D	CH ₂ Cl ₂	0,62
	EEMA – 25D	AcOEt	1,04
	EEMMH – 25D	MeOH/H ₂ O	2,05

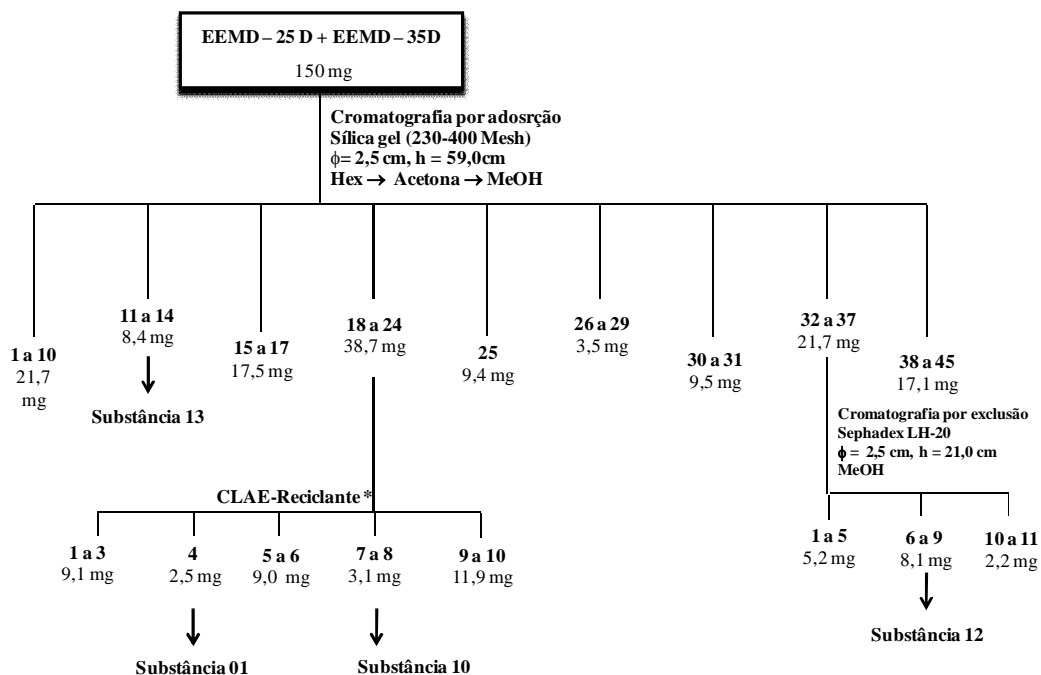
Foi realizado RMN de ^1H de cada subextrato e foi possível observar nos espectros dos subextratos EEMD – 25D e EEMA – 25D sinais de substâncias de interesse, porém em mistura e com impurezas. Desta forma, inicialmente o subextrato EEMA – 25D foi submetido a fracionamento (FLUXOGRAMA 2.7, p. 282) e foi possível isolar as seguintes substâncias: tirosol (**10**), 5-hidróxi-metil-furfuraldeído (**11**) e triglicerídeo (**13**).



FLUXOGRAMA 2.7: Fracionamento do EEMA – 25D

Em trabalho paralelo ao fracionamento do subextrato de EEM – 25D, o extrato etanólico do micélio - 35 dias (EEM - 35D) foi submetido à partição líquido-líquido pelo mesmo procedimento descrito no FLUXOGRAMA 2.6 (p. 281). Após a evaporação dos solventes hexano, CH_2Cl_2 , AcOEt e MeOH/ H_2O foram obtidos 4 subextratos, os quais foram submetidos ao experimento de RMN de ^1H e observou-se pelos espectros obtidos que os subextrato EEMD – 25D e EEMD – 35D apresentaram muitas similaridades químicas. Desta forma, ambos foram agrupados e fracionados conforme descrito no FLUXOGRAMA 2.8 (p. 283), sendo possível isolar os seguintes metabólitos

secundários: ciclo-(prolina-leucina) (**01**), tirosol (**10**) e ácido 4-hidróxi-benzóico (**12**) e triglicerídeo (**13**).



* Coluna Polimérica Preparativa Shodex Asahipak (45,0 x 2,5 cm, partícula de 5 µm), Loop de 200 µL; Eluição com MeOH; Detector 217 e 234 nm; Vazão de 5 mL.min⁻¹; Amostras coletadas no 1º ciclo.

FLUXOGRAMA 2.8: Fracionamento do EEMD – 25D/EEMD – 35D

1.3.3.4 Reação de Transesterificação da Substância 13

Em balão de fundo redondo, contendo 6,0 mg de ácido *p*-toluilsulfônico, adicionou-se 20,7 mg de **13**, solubilizado em 1,5 mL de metanol. A mistura reacional foi aquecida a temperatura de 50 °C e agitada com refluxo durante 12 horas. Em seguida, o material obtido foi submetido à partição líquido-líquido com solução saturada de bicarbonato de sódio para a retirada do ácido remanescente e evaporado em rotaevaporador. O produto obtido foi analisado via CG-EM empregando as seguintes condições: rampa: 150 °C (1 min.), 06 °C/min., 28 °C (15 min.); temperatura do injetor: 225 °C;

temperatura do detector: 250 °C; intervalo de massas: 45 a 500 u.m.a; ionização por impacto eletrônico a 70 eV (AMBROZIN, 2000).

1.3.3.4 Condições Utilizadas Durante as Análises das Substâncias Isoladas dos Extratos de *G. citricarpa* por CLAE-EM/EM

As substâncias foram analisadas por CLAE em uma coluna Waters Spherisorb ODS-2 (125 mm x 4.0 mm, 5,0 µm), com vazão de 0,8 mL.min⁻¹ e comprimentos de onda de detecção de 215-450 nm (DAD). O sistema de eluição gradiente (água, acetonitrila e metanol nas linhas A, B e C respectivamente) consistiu das etapas apresentadas na TABELA 2.7 (p. 285). Dados espectrais de massas foram adquiridos no modo positivo; um divisor pós-coluna foi usado para enviar apenas 0,30 mL.min⁻¹ para a fonte de íons; as vazões de nitrogênio do nebulizador e do gás de dessolvatação foram ajustados em 35,0 L/h e 800 L/h, respectivamente; a voltagem do capilar ESI foi mantida em 3,39 kV e dos cones da amostra e do extractor em 35,0 e 4,0 V, respectivamente; argônio foi utilizado para os experimentos de fragmentações e os íons formados foram acelerados usando uma rampa de energia de colisão de 5-35 eV.

Parâmetros de Ajuste: ES+

Fonte de ionização: electrospray

Voltagem do Capilar: 3,39 kVolts

Cone: 35,0 Volts

Extractor: 4,0 Volts

Lentes RF: 0,70 Volts

Temperatura do bloco da fonte: 25 °C

Temperatura de dessolvatação: 250 °C

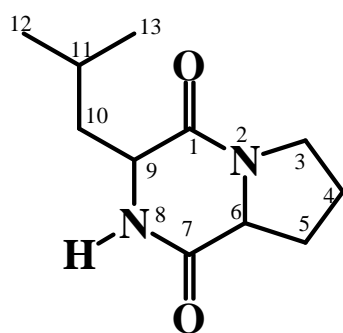
TABELA 2.7: Eluição gradiente utilizada durante as análises via CLAE-EM/EM

Tempo (minutos)	% Água (A)	% Acetonitrila (B)	% Metanol (C)
0	90,0	5,0	5,0
20	70,0	10,0	20,0
30	40,0	20,0	40,0
40	0,0	0,0	100,0
45	0,0	0,0	100,0
46	93,0	5,0	2,0
55	93,0	5,0	2,0

1.4 Resultados e Discussões

Neste estudo foram isolados 13 metabólitos secundários do fungo *G. citricarpa*, sendo 4 dicetopiperazinas (substâncias de **01** a **04**), três nucleosídeos (substâncias **05**, **08** e **09**), uma base nitrogenada (substância **06**), um aminoácido (substância **07**), um álcool aromático (substância **10**), um furfuraldeído (substância **11**), um derivado do ácido benzóico (substância **12**) e um triglicerídeo (substância **13**). Todas as estruturas moleculares estão representadas a seguir.

1.4.1 Substâncias Isoladas:



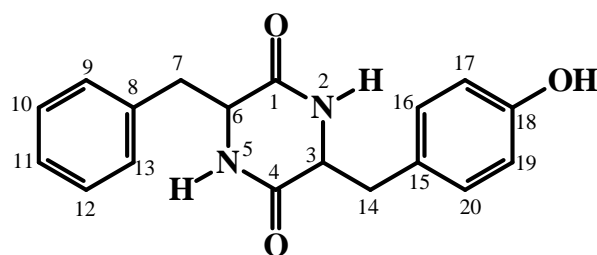
01

ciclo-(prolina – leucina)

Origem: extratos AcOEt do meio líquido (25 dias) e etanólico do micélio (25 e 35 dias)

Isolamento: ps. 277 e 283

Identificação estrutural: p. 291



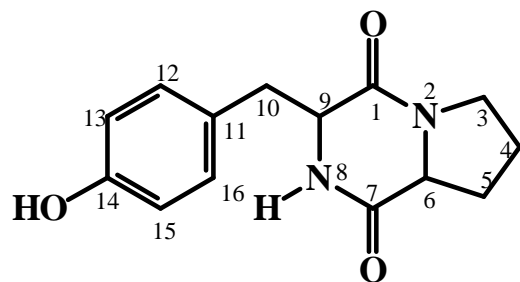
02

ciclo-(fenilalanina–tirosina)

Origem: extratos AcOEt e butanólico do meio líquido (25 dias)

Isolamento: ps. 277 e 279

Identificação estrutural: p. 308



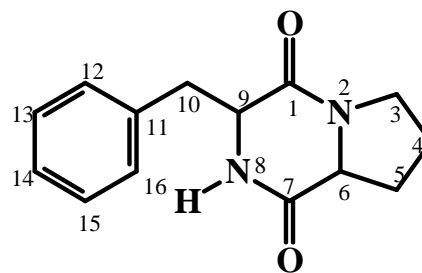
03

ciclo-(prolina-tirosina)

Origem: extratos AcOEt e butanólico do meio líquido (25 dias)

Isolamento: ps. 277 e 279

Identificação estrutural: p. 308



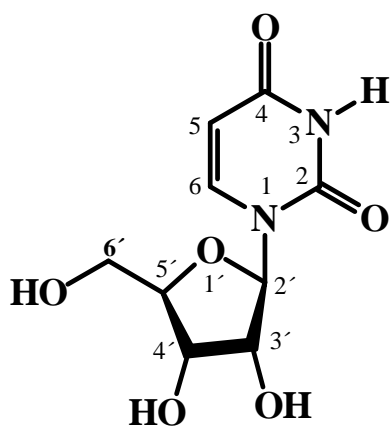
04

ciclo-(prolina-fenilalanina)

Origem: extratos AcOEt e butanólico do meio líquido (25 dias)

Isolamento: ps. 277 e 279

Identificação estrutural: p. 308



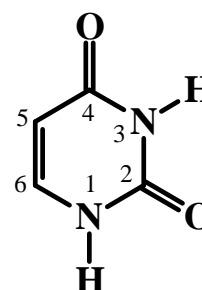
05

uridina

Origem: extratos AcOEt e butanólico do meio líquido (25 dias)

Isolamento: ps. 277, 279 e 280

Identificação estrutural: p. 330



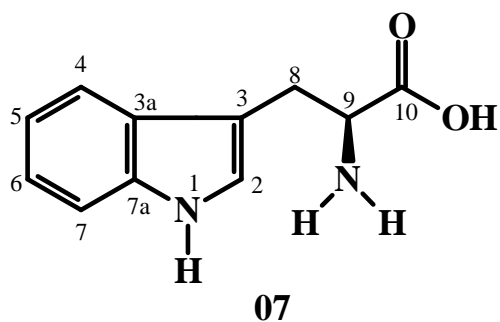
06

uracila

Origem: extratos AcOEt e butanólico do meio líquido (25 dias)

Isolamento: ps. 277 e 279

Identificação estrutural: p. 330

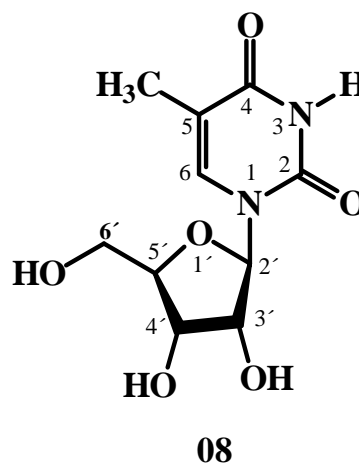


triptofano

Origem: extrato butanólico do meio líquido (35 dias)

Isolamento: p. 280

Identificação estrutural: p. 338

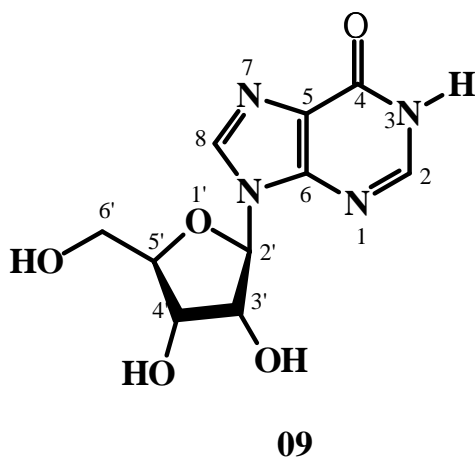


5-metil-uridina

Origem: extrato butanólico do meio líquido (35 dias)

Isolamento: p. 280

Identificação estrutural: p. 345

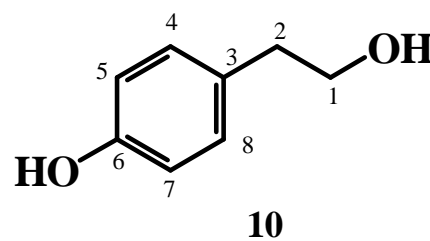


inosina

Origem: extratos AcOEt e butanólico do meio líquido (25 dias)

Isolamento: ps. 277 e 279

Identificação estrutural: p. 350

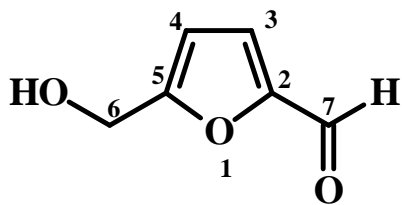


tirosol

Origem: extratos etanólicos do micélio (25 e 35 dias)

Isolamento: p. 282 e 283

Identificação estrutural: p. 359



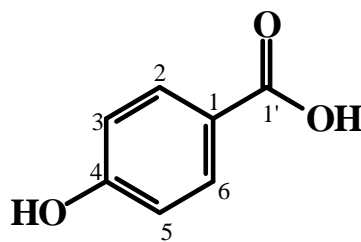
11

5-hidróxi-metil-furfuraldeído

Origem: extratos AcOEt do meio líquido e etanólico do micélio (25 dias)

Isolamento: ps. 277 e 282

Identificação estrutural: p. 362



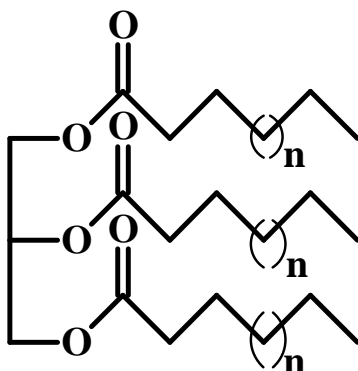
12

ácido 4-hidróxi-benzóico

Origem: extratos butanólico do meio líquido (35 dias) e etanólico do micélio (25 e 35 dias)

Isolamento: ps. 280 e 283

Identificação estrutural: p. 368



13

triglicerídeo

Origem: extratos AcOEt do meio líquido (25 dias) e etanólico do micélio (25 e 35 dias)

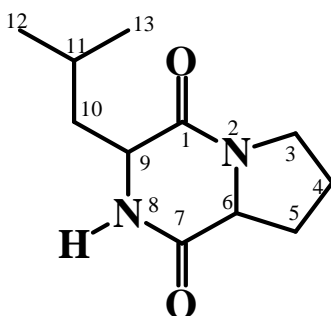
Isolamento: ps. 277, 282 e 283

Identificação estrutural: p. 373

1.4.2 Identificações Estruturais das Substâncias Isoladas

1.4.2.1 Ciclo-(prolina-leucina) – substância 01

A substância **01** foi isolada dos extratos AcOEt do meio líquido (25 dias) e etanólico do micélio (25 e 35 dias) e teve sua estrutura identificada através de experimentos de RMN de ^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC, EM e comparação com dados da literatura (FURTADO *et al.*, 2005).



01

Pela análise do espectro de RMN de ^1H de **01** (FIGURAS 2.4 a 2.9, ps. 297 a 302) foi possível atribuir os sinais mais desblindados aos hidrogênios H-6 em δ 4,12 (1H, *t*, $J= 8,0$ Hz) e H-9 em δ 4,02 (1H, *ddd*, $J= 9,3$ Hz; 3,9 Hz; 0,5 Hz). Ainda observou-se um sinal em δ 6,13 (1H, *sl*) relativo ao H-8 ligado ao átomo de nitrogênio.

No espectro de HSQC (FIGURA 2.11, p. 304) foi possível observar a correlação do sinal em δ 4,12 com um sinal em δ 59,0, sendo este sinal atribuído ao C-6. Pelo espectro de HMBC (FIGURA 2.12 a 2.13, ps. 305 a 306), o sinal de H-6 correlacionou-se apenas com o sinal de C-5 em δ 28,1.

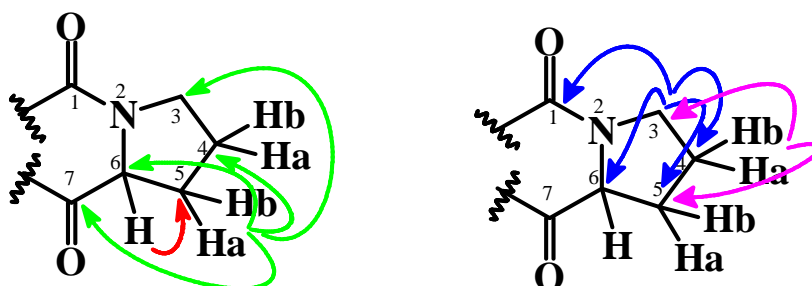
Pelo espectro de HSQC foi possível observar dois sinais em δ 2,35 (1H, *m*, $J= 16,0$ Hz; 8,0 Hz, 8,0 Hz; 3,6 Hz) e δ 2,14 (1H, *m*) correlacionando-se com o sinal de C-5 em δ 28,1, sendo estes sinais atribuídos aos hidrogênios diastereotópicos H-5a e H-5b, respectivamente. No espectro de HMBC, os sinais de H-5a e H-5b mostraram correlação com um sinal bastante desblindado

em δ 170,2, atribuído ao C-7, e com os sinais em δ 22,8 (C-4), δ 45,5 (C-3) e δ 59,0 (C-6).

O sinal atribuído ao H-3 (δ 3,57, 2H, *m*) que correlacionou-se via HSQC com um sinal em δ 45,5, mostrou pelo HMBC correlações com os sinais em δ 59,0 atribuído anteriormente ao C-6, δ 22,8 (C-4), δ 28,1 (C-5) e com um sinal em δ 166,2 relativo a carbono lactâmico, o qual foi atribuído ao C-1.

Pelo espectro de HSQC foi possível observar dois sinais em δ 2,02 (1H, *m*) e 1,91 (1H, *m*) correlacionando-se com um sinal em δ 22,8 que foi atribuído ao C-4, sendo os sinais de hidrogênios atribuídos ao H-4a e H-4b, respectivamente. No espectro de HMBC, os sinais de H-4a e H-4b mostraram correlação com os sinais em δ 28,1 (C-5) e δ 45,5 (C-3).

Estes dados, portanto, permitiram propor as seguintes correlações:



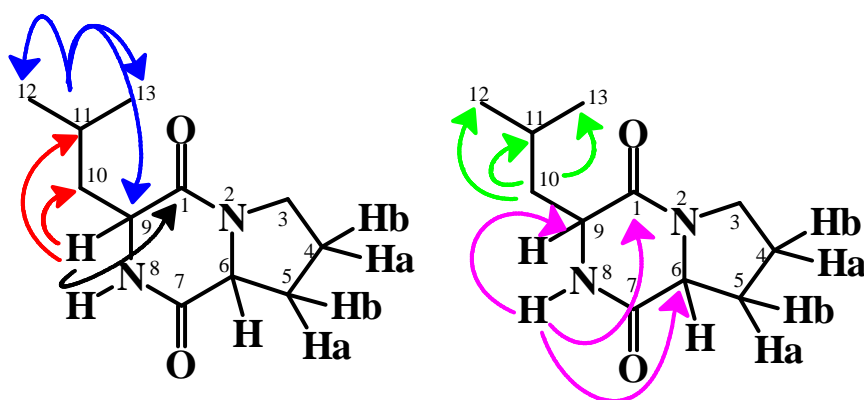
O sinal em δ 1,76 (1H, *m*, $J = 9,9$ Hz; 6,6 Hz; 6,6 Hz; 5,0 Hz), que correlacionou-se no HSQC com o sinal em δ 24,7, mostrou no HMBC correlação com um sinal em δ 53,4 ainda não atribuído, com os sinais característicos de metilas em δ 21,2 (3H, δ_H 0,96, *d*, $J = 6,6$ Hz) e δ 23,3 (3H, δ_H 1,00, *d*, $J = 6,6$ Hz) e com um sinal em δ 38,6 ainda não atribuído.

O sinal em δ 53,4 mostrou correlação no HSQC com o sinal em δ 4,02 (1H, *ddd*, $J = 9,3$ Hz; 3,9 Hz; 0,5 Hz) relativo ao H-9, sendo, portanto atribuído ao C-9. Pelo HMBC este sinal mostrou correlação com os sinais em δ 24,7 atribuído ao C-11, δ 38,6 atribuído ao C-10 e δ 166,2 (C-1).

Os sinais em δ 2,07 (1H, *ddd*, $J= 14,5$ Hz, 9,9 Hz; 3,9 Hz) e δ 1,53 (1H, *ddd*, $J=14,5$ Hz; 9,3 Hz; 5,0 Hz) correlacionaram-se pelo HSQC com um sinal em δ 38,6 atribuído anteriormente ao C-10. Pelo HMBC estes sinais de hidrogênios diastereotópicos correlacionaram-se com os sinais em δ 21,2 (Me-12), δ 23,3 (Me-13), δ 24,7 (C-11) e δ 53,4 (C-9).

Concluindo as atribuições, observou-se que o sinal em δ 6,13 (1H, *sl*) relativo ao H-8 ligado ao átomo de nitrogênio correlacionou-se via HMBC com os sinais em δ 53,4 (C-9), δ 59,0 (C-6) e δ 166,2 (C-1).

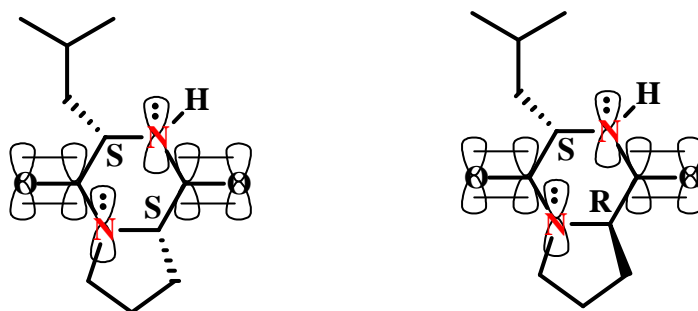
As principais correlações são apresentadas a seguir:



O espectro de massas obtidos por eletrospray no modo positivo confirmou a proposta estrutural, pois foi observado um pico m/z 211 ($[M+H]^+$) no “*full scan*” (FIGURA 2.14, p. 307) e no espectro de íons produtos (FIGURA 2.15, p. 308) de m/z 211, os fragmentos com m/z 70 e 86 indicaram a presença dos aminoácidos prolina e leucina, respectivamente. Todos estes dados estão coerentes com a massa molecular da estrutura proposta de 210 e sua fórmula molecular ($C_{11}H_{18}N_2O_2$). Algumas propostas de fragmentações para a estrutura **01** são apresentadas no ESQUEMA 2.2 (p. 308).

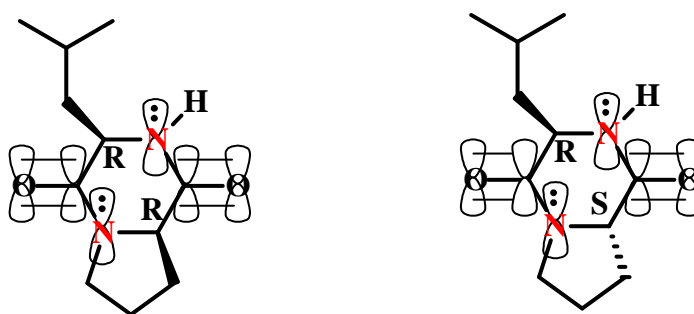
Pela análise de **01** via CL-UV-EM foi detectada apenas uma banda cromatográfica com tempo de retenção de 6,24 min (CROMATOGRAMA 2.1, p. 307) que deu origem ao íon pseudo-molecular protonado $[M + H]^+ = 211$ e, portanto não foi possível concluir se houve falta de resolução cromatográfica

para a distinção dos epímeros possivelmente presentes na amostra, ou se realmente não há epímeros, contendo esta amostra apenas um isômero. É considerada a proposta de epimerização para **01** devido a presença de hidrogênio ácido α -carboxílico, o qual em meio de cultura onde cultivou-se *G. citricarpa* ou via um processo *in vivo*, poderia ser epimerizado, conduzindo possivelmente à formação de dois epímeros, conforme apresentado a seguir, com tempo de retenção diferentes.



*Derivado do aminoácido L
(configuração S)*

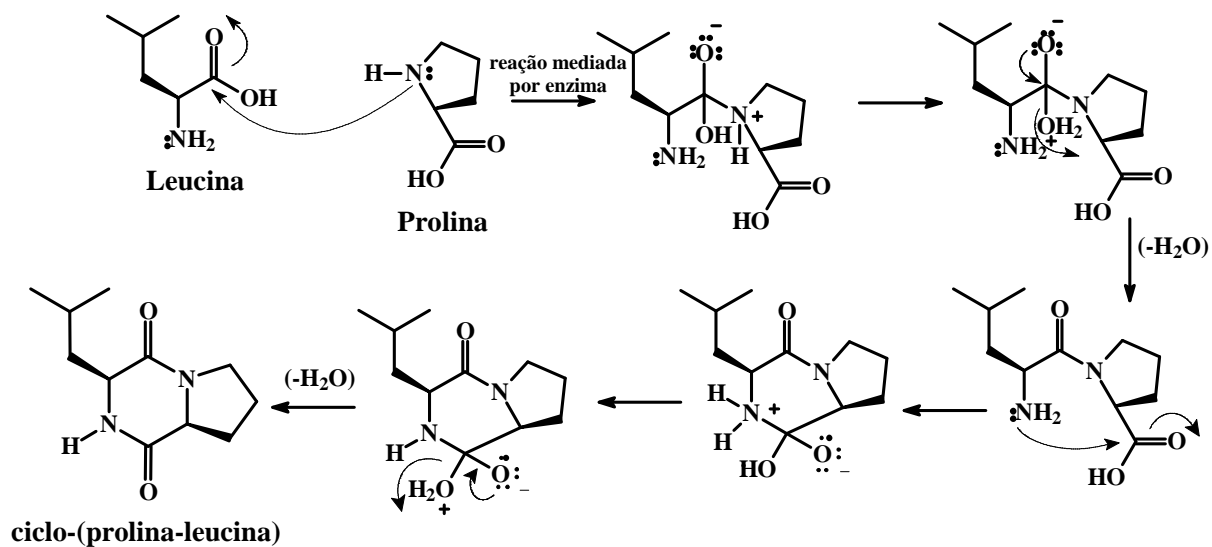
Ou



*Derivado do aminoácido D
(não natural?)*

Todos os sinais referentes aos hidrogênios e carbonos foram atribuídos baseando-se em dados da literatura e são apresentados na TABELA 2.8 (p. 296).

Esta substância pode ser produzida a partir da ciclização dos aminoácidos prolina e leucina, mostrados a seguir, considerando os aminoácidos L (configuração S), formando um anel dicetopiperazínico.



Portanto, com base nos experimentos de RMN, EM e dados da literatura, a estrutura da substância **01** foi identificada como sendo a do ciclo-(prolina-leucina).

TABELA 2.8: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **01** e comparação com dados da literatura

H/C	Substância 01 (500/100 MHz, CDCl_3)		FURTADO <i>et al.</i> , 2005 (400/100 MHz, MeOD)	
	δ (ppm), <i>J</i> (Hz)	δ (ppm)	δ (ppm), <i>J</i> (Hz)	δ (ppm)
1	-	166,2	-	168,5
2	-	-	-	-
3	3,57 (2H, <i>m</i>)	45,5	3,47 – 3,51 (2H, <i>m</i>)	46,0
4a	2,02 (1H, <i>m</i>)	22,8	1,96 – 2,05 (1H, <i>m</i>)	23,2
4b	1,91 (1H, <i>m</i>)		1,81 – 1,94 (1H, <i>m</i>)	
5a	2,35 (1H, <i>J</i> = 16,0; 8,0; 8,0; 3,6)	28,1	2,24 – 2,34 (1H, <i>m</i>)	28,8
5b	2,14 (1H, <i>m</i>)		1,96 – 2,05 (1H, <i>m</i>)	
6	4,12 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 8,0)	59,0	4,25 (1H, <i>ddd</i> , <i>J</i> =11,1;6,3;1,7)	60,1
7	-	170,2	-	172,6
8	6,13 (1H, <i>sl</i>)	-	4,56 (1H, <i>s</i>)	-
9	4,02 (1H, <i>ddd</i> , <i>J</i> = 9,3; 3,9; 0,5)	53,4	4,09 – 4,15 (1H, <i>m</i>)	54,0
10a	2,07 (1H, <i>ddd</i> , <i>J</i> = 14,5; 9,9; 3,9)	38,6	1,81 -1,94 (1H, <i>m</i>)	38,2
10b	1,53 (1H, <i>ddd</i> , <i>J</i> =14,5; 9,3; 5,0)		1,47 – 1,56 (1H, <i>m</i>)	
11	1,76 (1H, <i>m</i> , <i>J</i> =9,9;6,6;6,6; 5,0)	24,7	1,81 -1,94 (1H, <i>m</i>)	25,0
12-Me	0,96 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6,6)	21,2	0,94 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6,5)	21,4
13-Me	1,00 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6,6)	23,3	0,95 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6,5)	22,8

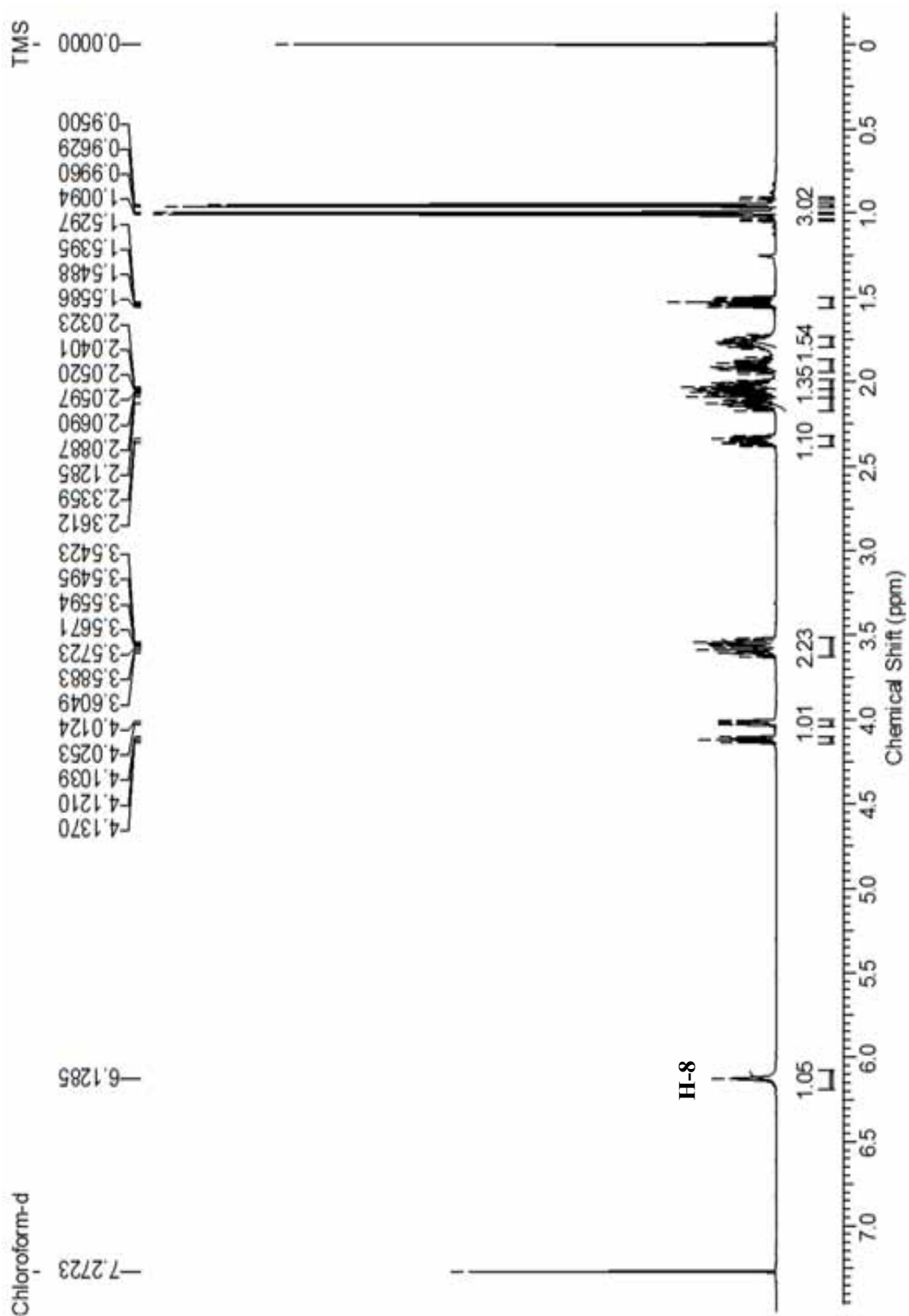


FIGURA 2.4: Espectro de RMN de ^1H de **01** (CDCl_3 , 500 MHz)

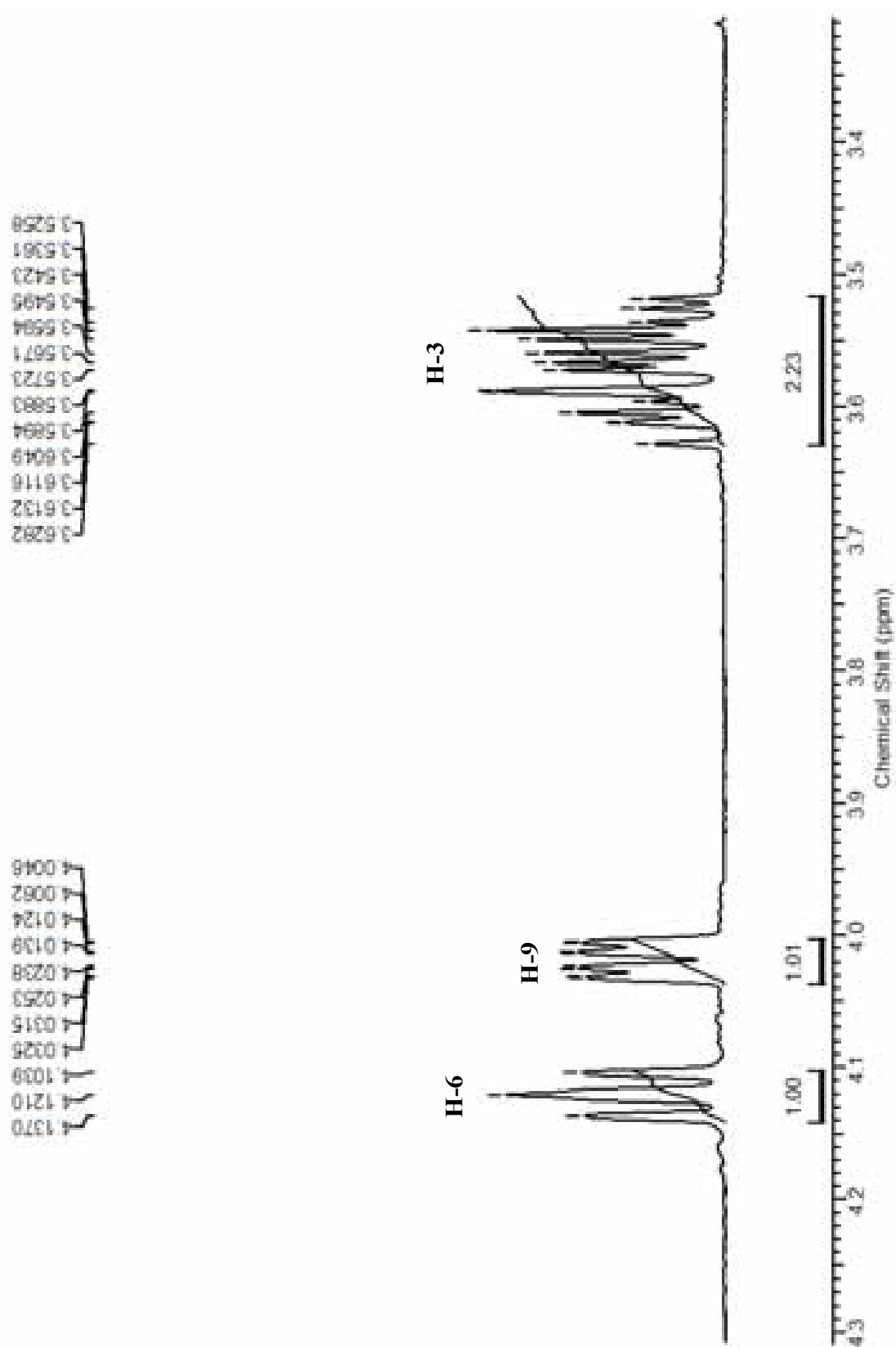


FIGURA 2.5: Ampliação 01 do espectro de RMN de ^1H de **01** (CDCl_3 , 500 MHz)

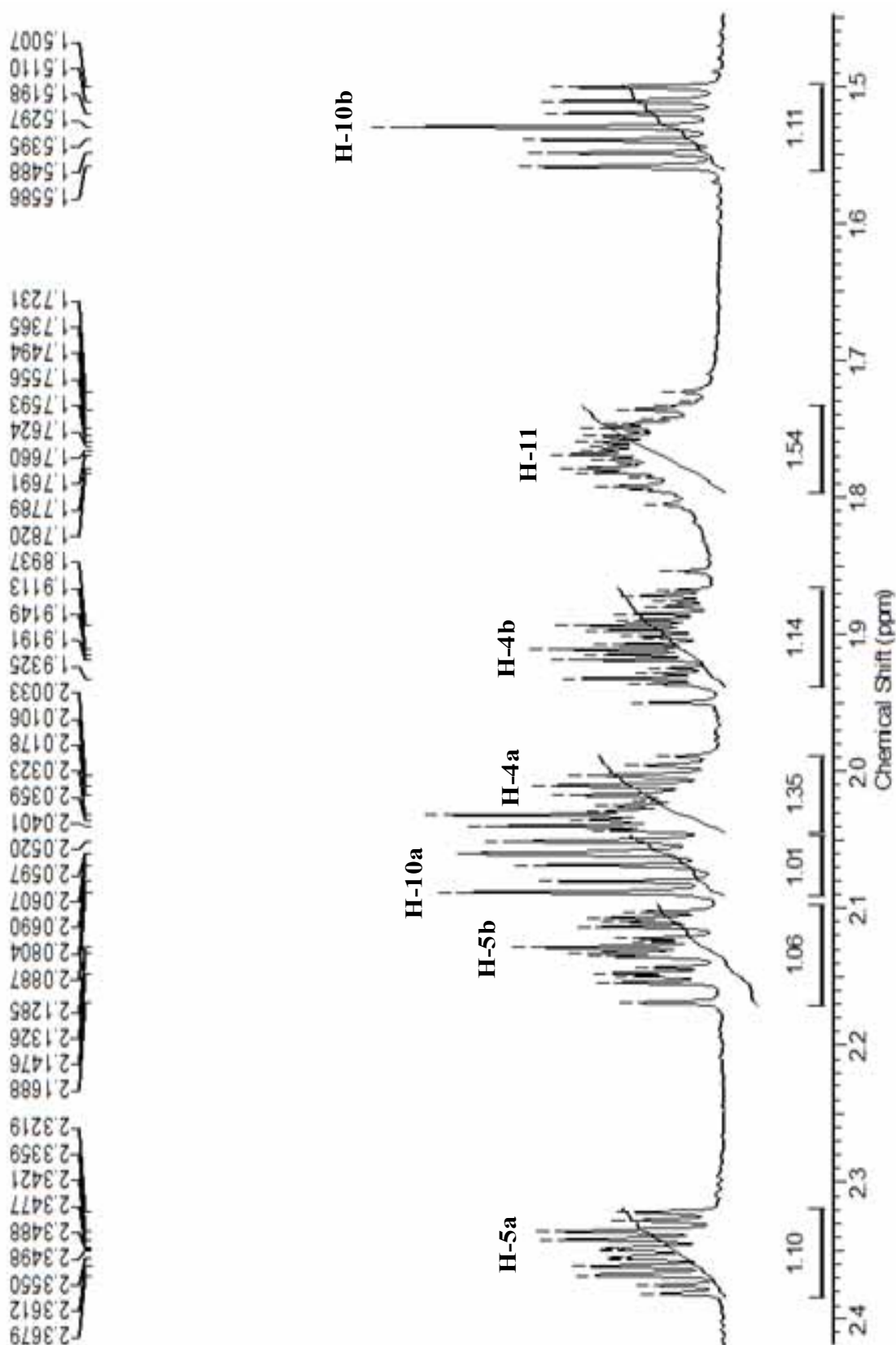


FIGURA 2.6: Ampliação 02 do espectro de RMN de ¹H de 01
(CDCl₃, 500 MHz)

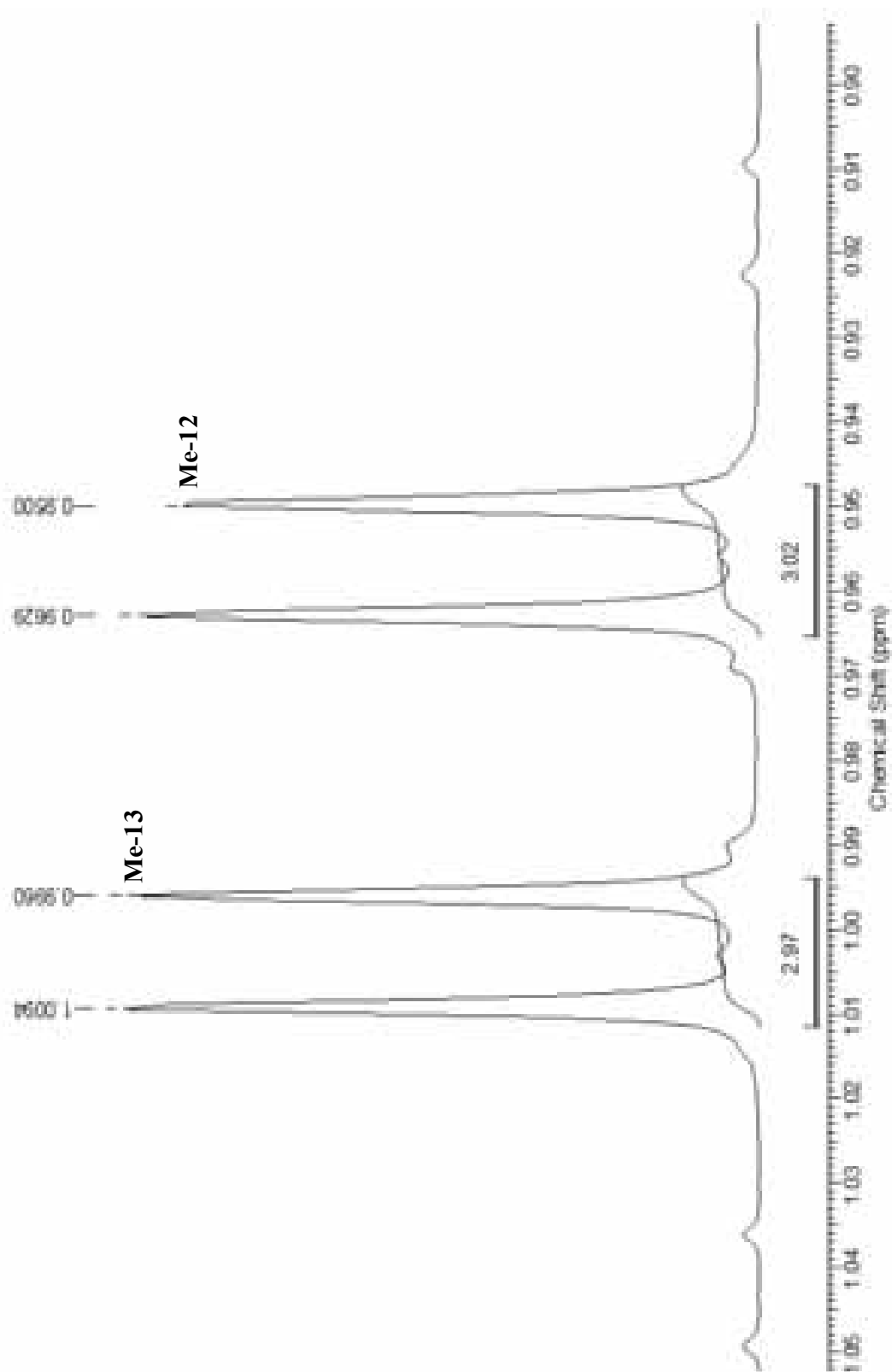


FIGURA 2.7: Ampliação 03 do espectro de RMN de ^1H de **01** (CDCl_3 , 500 MHz)

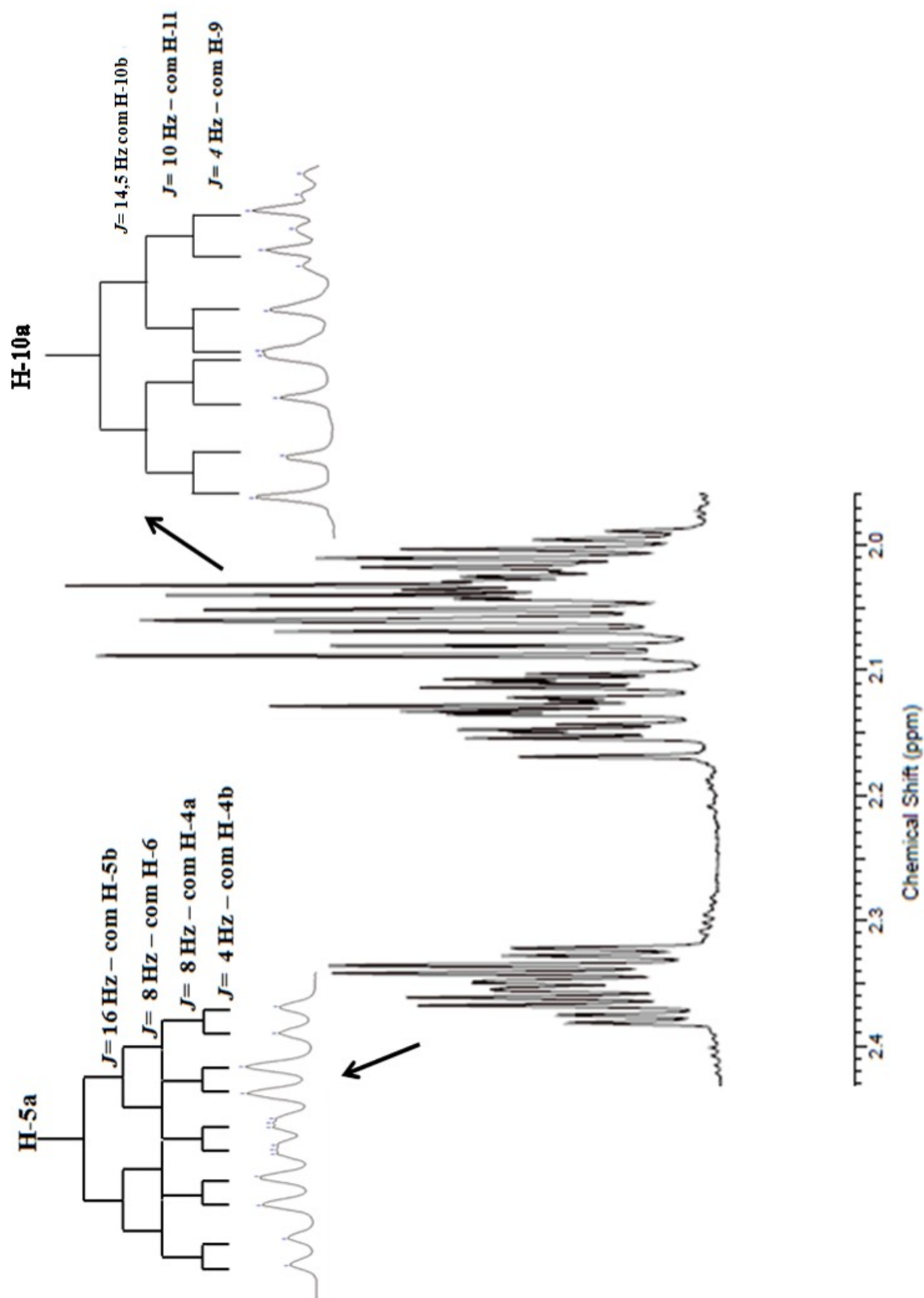


FIGURA 2.8: Ampliação 04 do espectro de RMN de ^1H de **01** (CDCl_3 , 500 MHz)

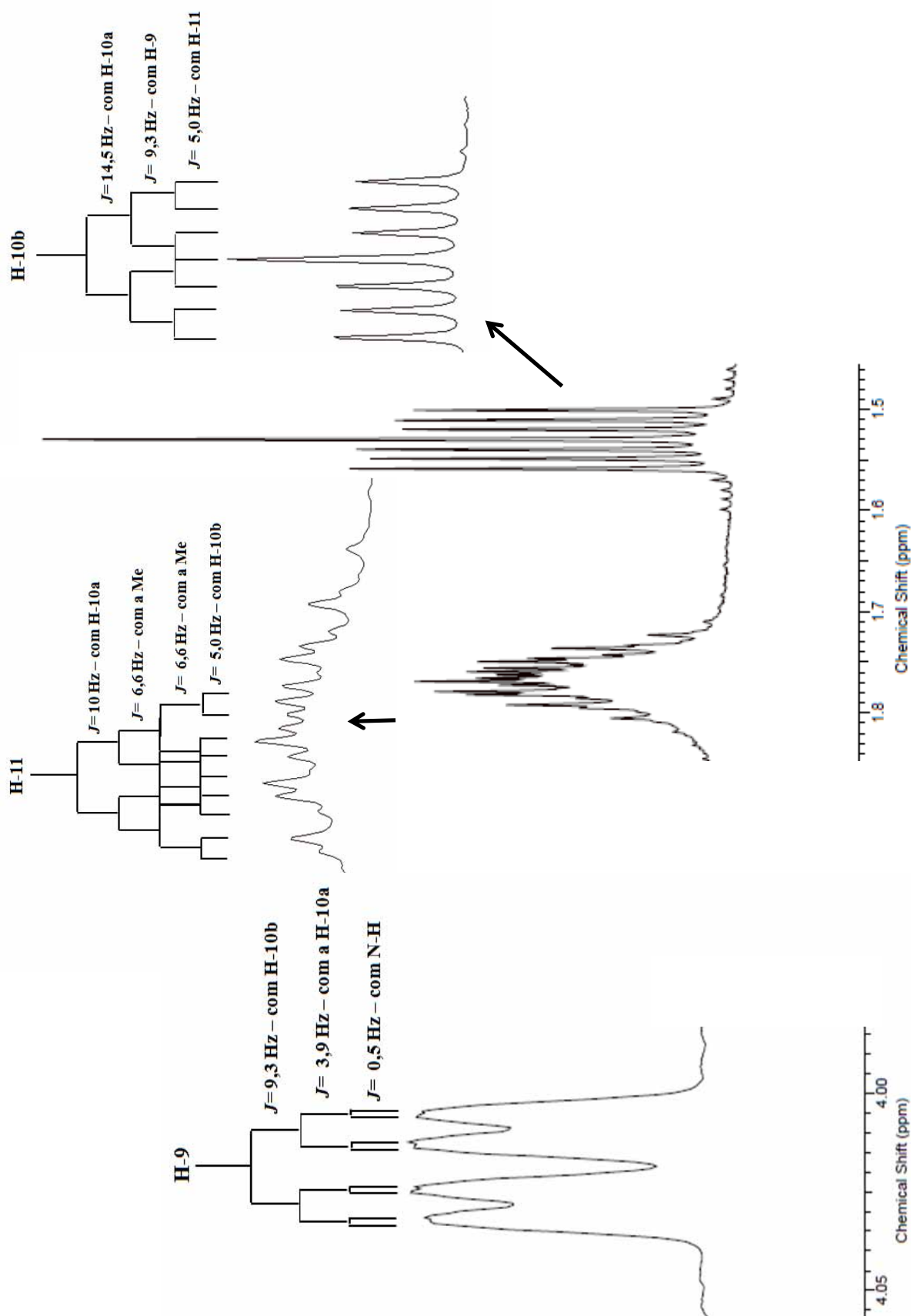


FIGURA 2.9: Ampliação 05 do espectro de RMN de ^1H de **01** (CDCl_3 , 500 MHz)

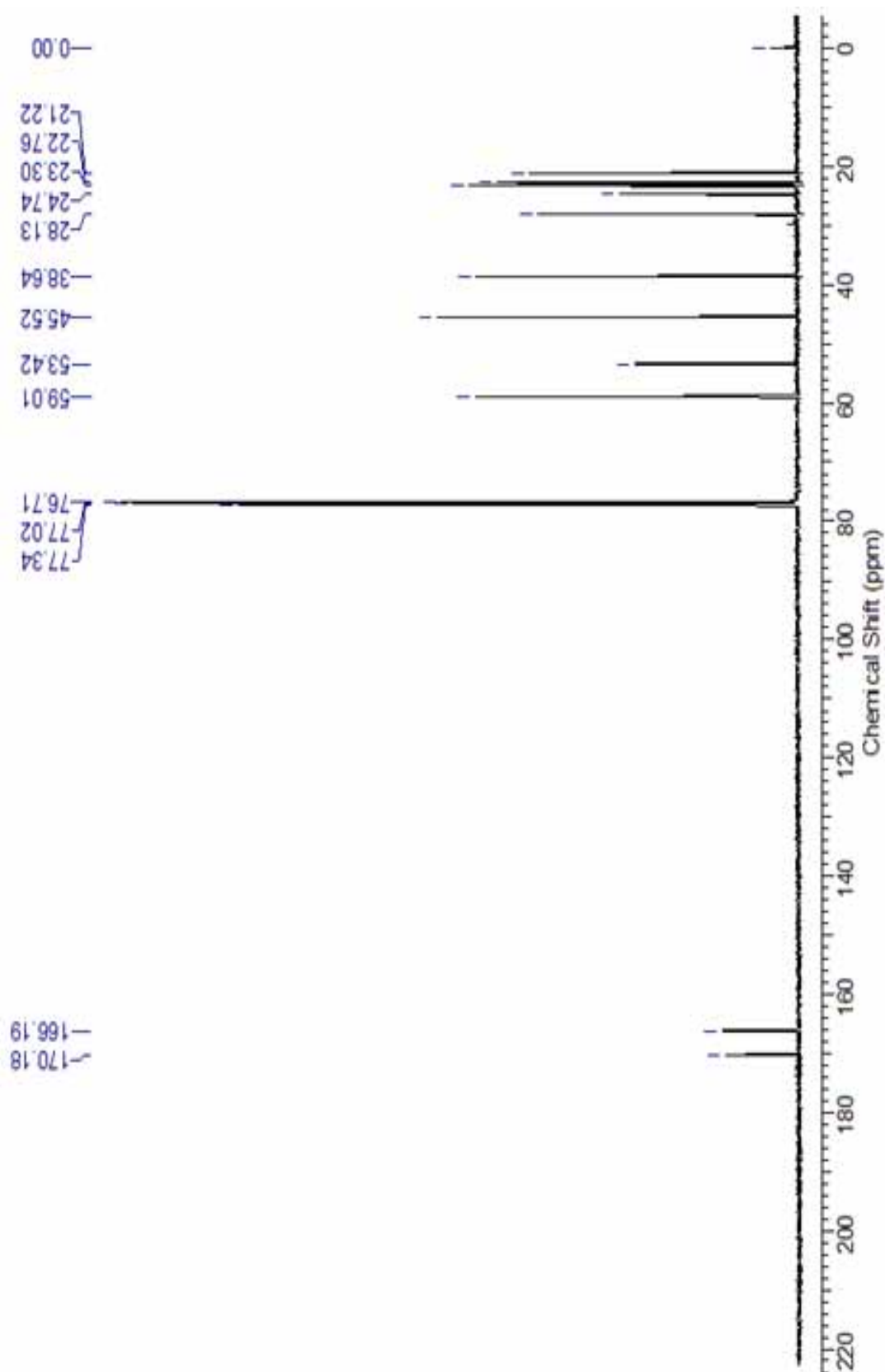


FIGURA 2.10: Espectro de RMN de ^{13}C de **01** (CDCl_3 , 100 MHz)

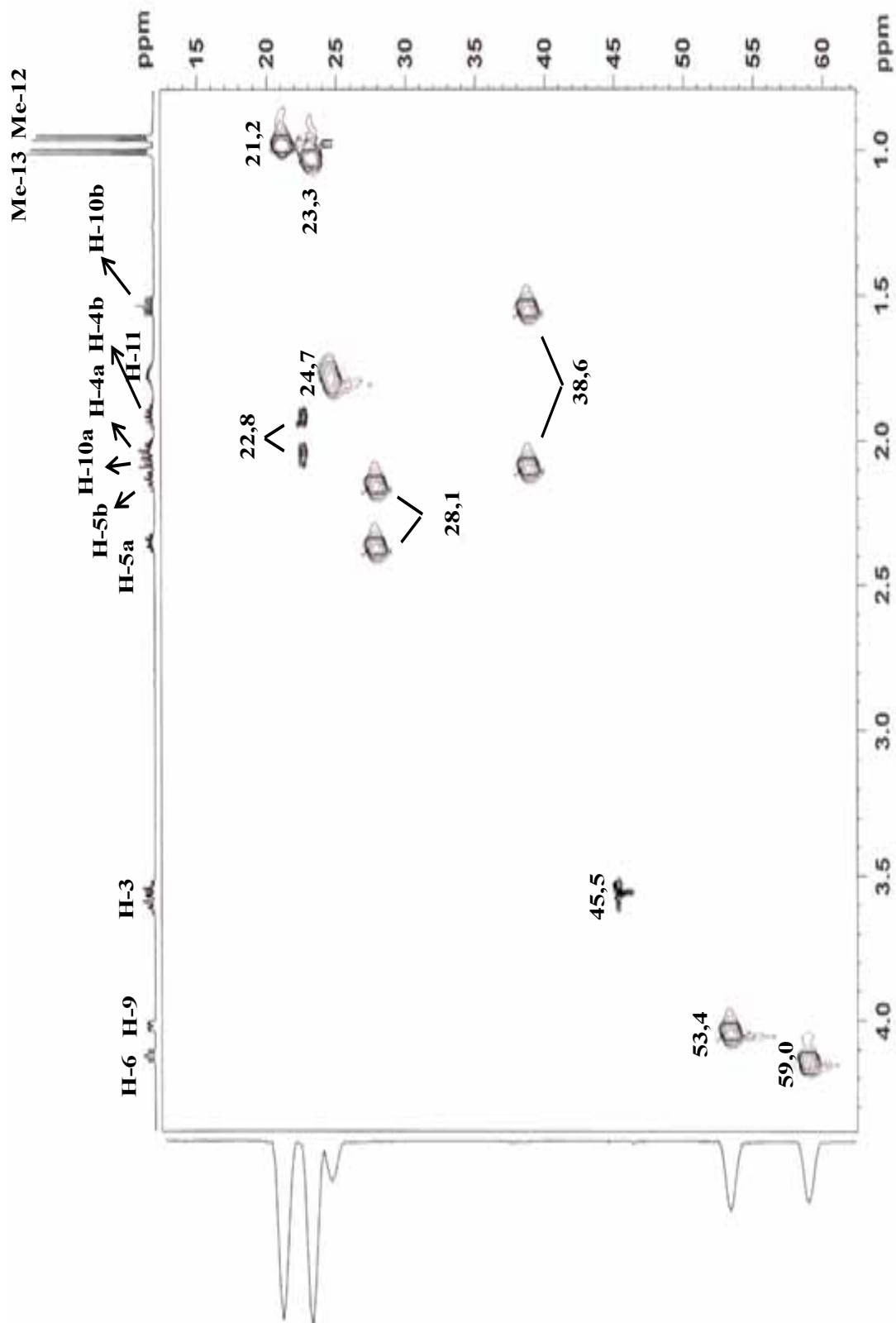


FIGURA 2.11: Mapa de contorno de g-HSQC de **01** (CDCl₃, 500 MHz)

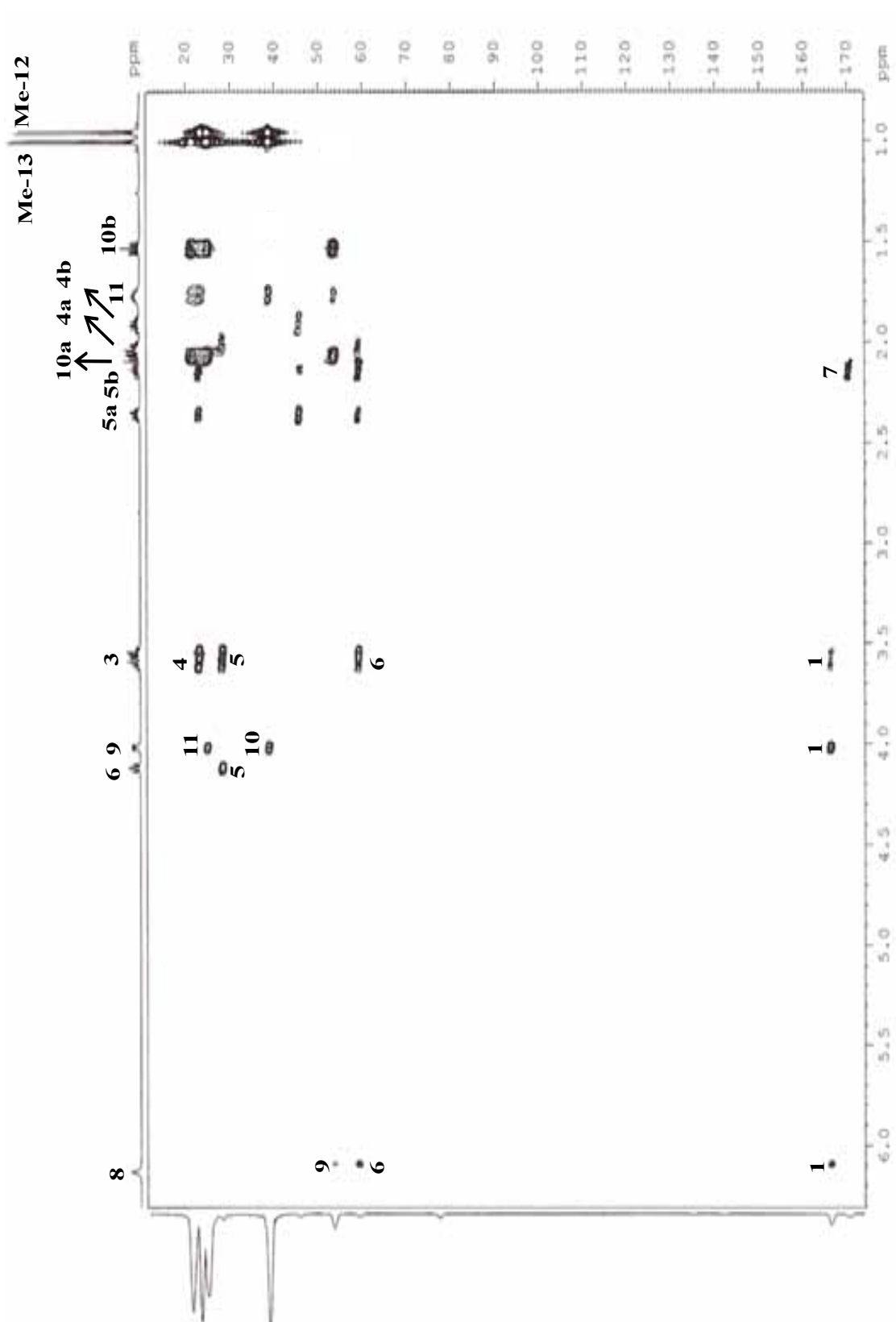


FIGURA 2.12: Mapa de contorno de g-HMBC de **01** (CDCl₃, 500 MHz)

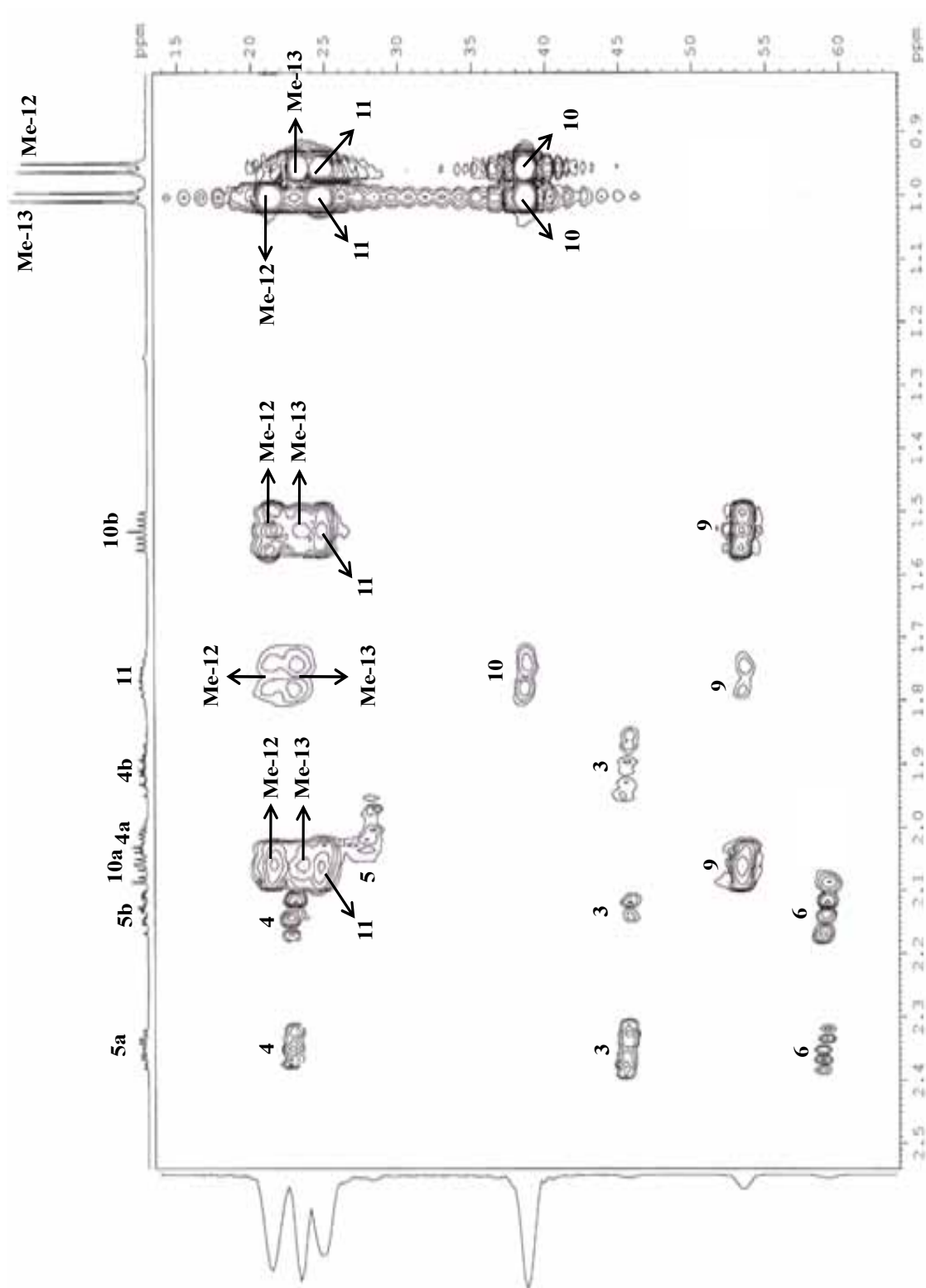
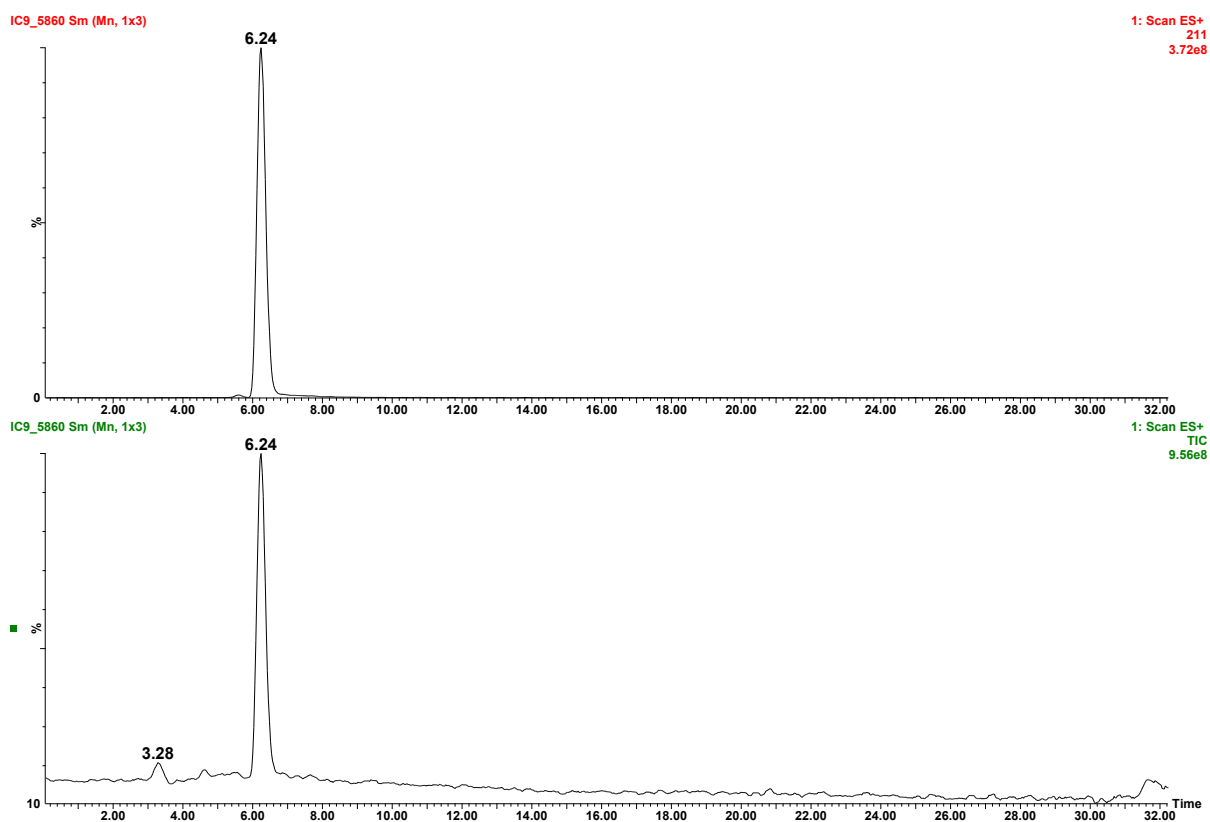


FIGURA 2.13: Ampliação do mapa de contorno de g-HMBC de **01** (CDCl₃, 500 MHz)



CROMATOGRAMA 2.1: Experimento de “full scan” de 01

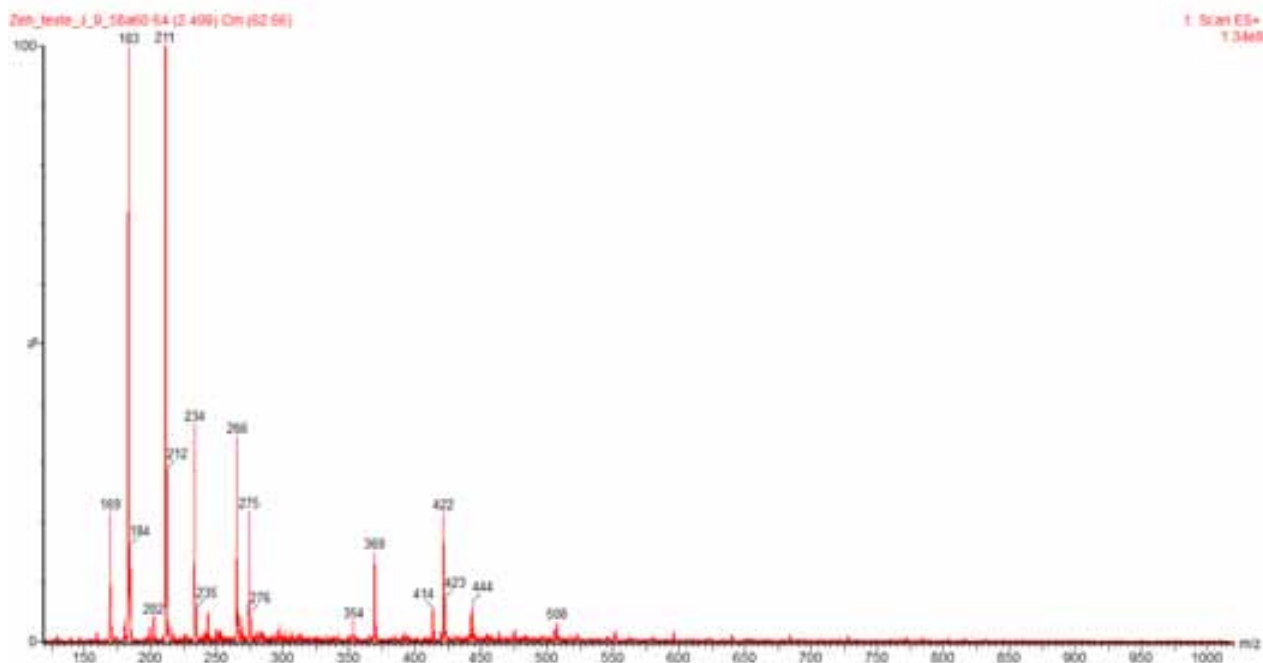


FIGURA 2.14: Espectro de massas “full scan” de 01

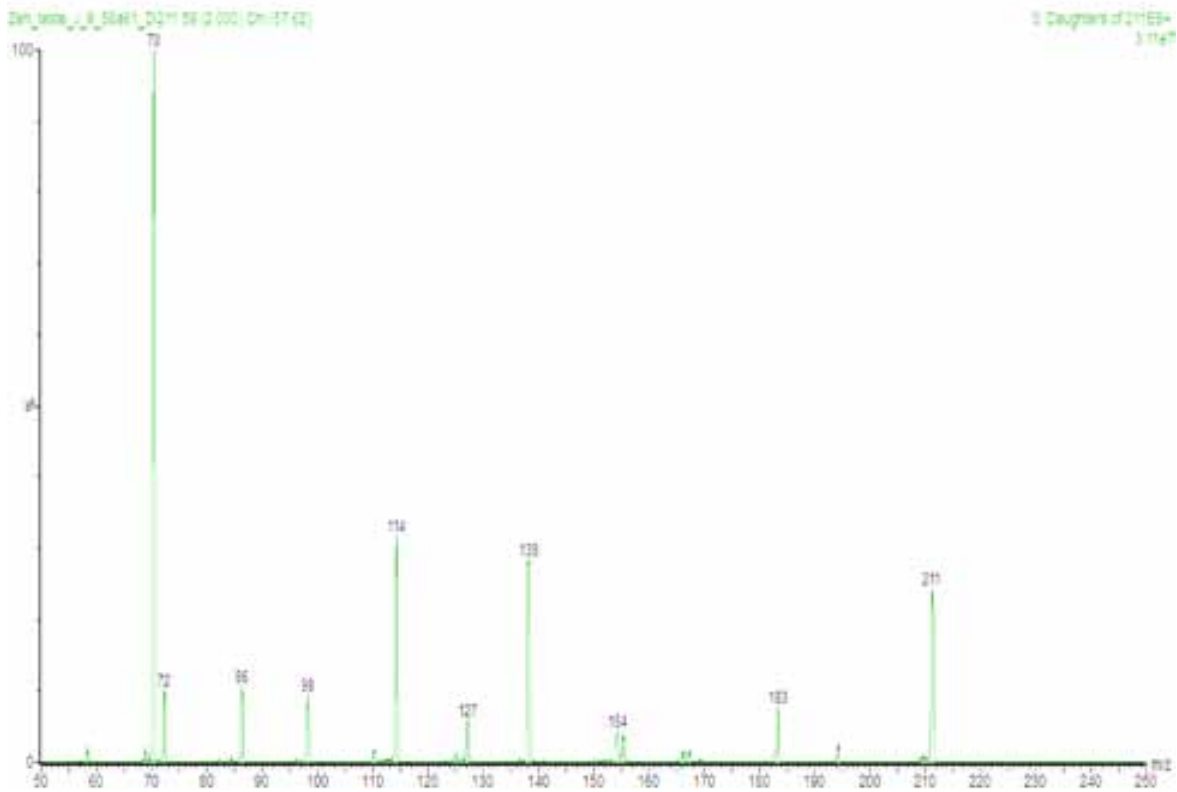
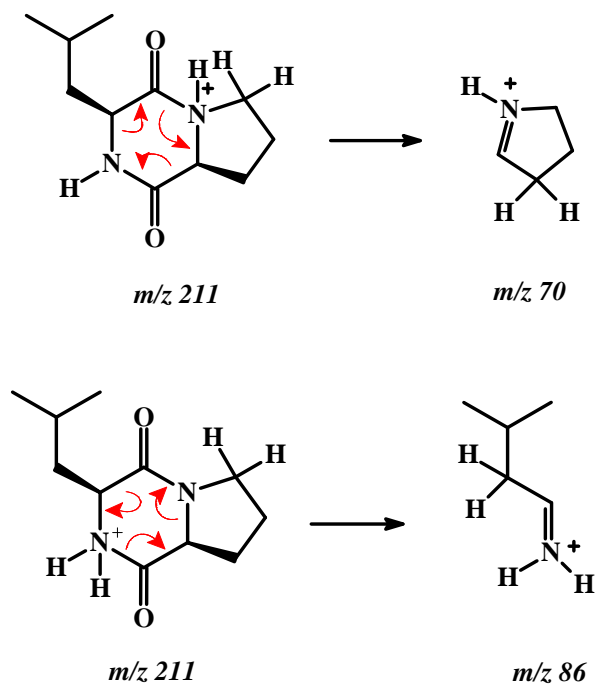


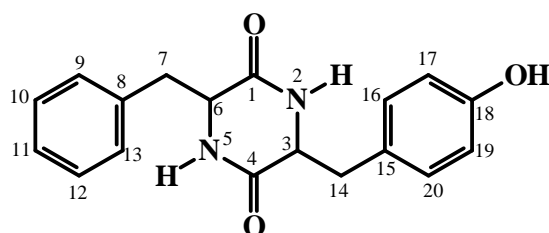
FIGURA 2.15: Espectro de massas dos íons produtos de m/z 211
(energia de colisão 20 eV)



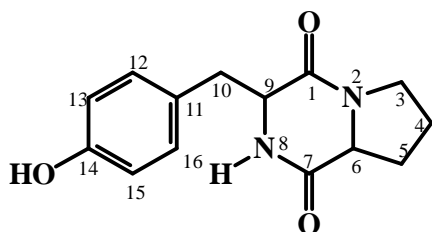
ESQUEMA 2.2: Propostas de fragmentações para a substância **01**

1.4.2.2 Ciclo-(fenilalanina-tirosina), Ciclo-(prolina-tirosina), Ciclo-(prolina-fenilalanina) – substâncias **02**, **03** e **04**

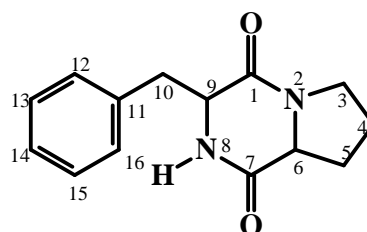
As substâncias **02**, **03** e **04** foram isoladas dos extratos AcOEt e butanólico do meio líquido (25 dias). Em ambos os extratos estes compostos encontravam-se em mistura. Suas estruturas foram identificadas através de experimentos de RMN de ^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC, COSY, EM e comparações com dados da literatura (**02** → LU *et al.*, 2009; **03** → GUO *et al.*, 2007; **04** → FURTADO *et al.*, 2005).



02



03



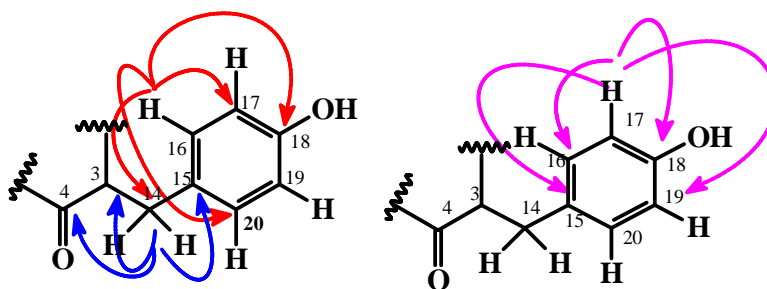
04

No espectro de RMN de ^1H (FIGURAS 2.19 a 2.23, ps. 320 a 324), para a substância **02** foi possível observar na região dos aromáticos dois doubletos acoplando entre si em δ 7,06 (2H) e δ 6,86 (2H) com constante de acoplamento de 8,8 Hz, os quais foram atribuídos aos hidrogênios do anel aromático da tirosina H-16/H-20 e H-17/H-19, respectivamente. Para a parte da fenilalanina foi possível observar um duplo doubleto em δ 7,21 (2H, $J= 8,2$ Hz; 1,6 Hz), o qual foi atribuído aos hidrogênios H-9/H-13, e dois sinais, sendo um em δ 7,34 (1H, m) referente ao H-11 e outro em δ 7,39 referente aos hidrogênios

H-10 e H-12 (*m*). Observou-se também quatro duplos dubletos, sendo dois referentes aos hidrogênios H-14a e H-14b em δ 3,21 (1H, J = 18,2 Hz; 4,0 Hz) e δ 3,00 (1H, J = 18,2 Hz; 4,5 Hz) e outros dois em δ 3,27 (1H, J = 14,2 Hz; 4,3 Hz) e δ 3,11 (1H, J = 14,2 Hz; 4,5 Hz) referente aos sinais de H-7a e H-7b, respectivamente. O sinal de H-6 foi observado em δ 4,59 (1H, *ddd*, J = 4,5 Hz; 4,3 Hz; 2,4 Hz) e de H-3 em δ 4,51 (1H, *dd*, J = 4,5 Hz; 4,0 Hz).

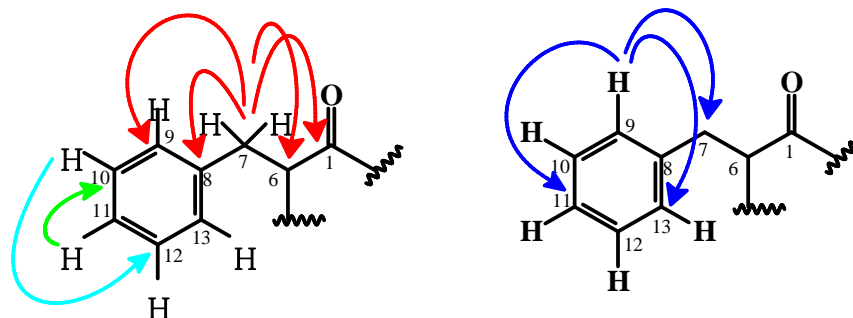
A análise conjunta dos espectros de RMN de ^{13}C (FIGURA 2.24, p. 325) e HSQC (FIGURA 2.25, p. 326) permitiu atribuir todos os sinais de carbonos para **02** (TABELA 2.9, p. 313).

Pelo espectro de HMBC (FIGURA 2.26, p. 327) para a substância **02** foi possível observar a correlação do sinal em δ 7,06 (H-16/H-20) com os sinais dos carbonos em δ 40,3 (C-14), δ 118,3 (C-17/C-19), δ 134,4 (C-16/C-20) e δ 157,7 (C-18) e do sinal de hidrogênio em δ 6,86 (H-17/H-19) com os sinais dos carbonos em δ 118,3 (C-17/C-19), δ 129,6 (C-15), δ 134,4 (C-16/C-20) e δ 157,7 (C-18). Os sinais de H-14a e H-14b respectivamente em δ 3,21 e δ 3,00 correlacionaram-se no HMBC com os sinais em δ 59,5 (C-3), δ 129,6 (C-15), δ 134,4 (C-16/C-20) e δ 168,9 (C-4), permitindo assim a proposta a seguir:



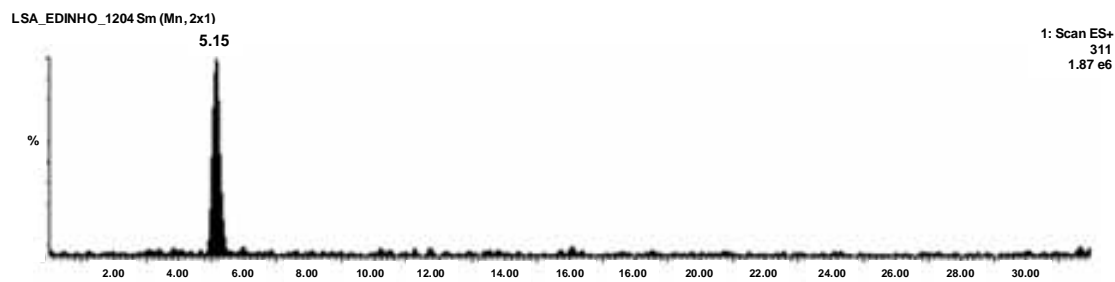
O sinal em δ 7,21 (H-9/H-13) correlacionou-se no HMBC com os sinais em δ 130,4 (C-11), δ 132,9 (C-9/C-13) e δ 40,8 (C-7); os sinais em δ 7,34 (H-11) e δ 7,39 (H-10/H-12) correlacionou-se no HMBC apenas com o sinal em δ 131,6 (C-10/C-12); os sinais de H-7a e H-7b em δ 3,27 e δ 3,11,

respectivamente, correlacionaram-se no HMBC com os sinais em δ 59,3 (C-6), δ 132,9 (C-9/C-13), δ 138,0 (C-8) e δ 168,9 (C-1). Tais correlações permitiram a seguinte proposta estrutural:



Os dados de RMN de ^1H obtidos para a substância **02**, quando comparados com aqueles citados na literatura para a ciclo-(fenilalanina-tirosina) não apresentaram um grande paralelismo. O uso de solventes diferentes (D_2O para a substância **02** e $\text{DMSO}-d_6$ para aquele da literatura) poderia explicar a diferença entre os respectivos deslocamentos químicos. Contudo, a análise da mistura contendo as substâncias **02**, **03** e **04** por CL-EM permitiu identificar a presença da dicetopiperazina ciclo-(fenilalanina-tirosina).

Pela análise do espectro de **02** obtido via CL-UV-EM foi possível observar a presença de uma banda cromatográfica com tempo de retenção em 5,15 minutos (CROMATOGRAMA 2.2, p. 312), a qual levou ao espectro de massas (FIGURA 2.16, p. 312) com o íon pseudo-molecular protonado $[\text{M} + \text{H}]^+ = 311$, que está de acordo com a massa molecular da estrutura proposta e sua fórmula $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3$. A presença de apenas uma banda cromatográfica para **02** sugeriu a inexistência de epímeros para este composto; no entanto é cabível ressaltar que eventualmente pode ter ocorrido falta de resolução cromatográfica durante a análise e por isso não foi possível detectar a presença de epímeros.



CROMATOGRAMA 2.2: Cromatograma de **02** obtido durante a análise de CL-UV-EM

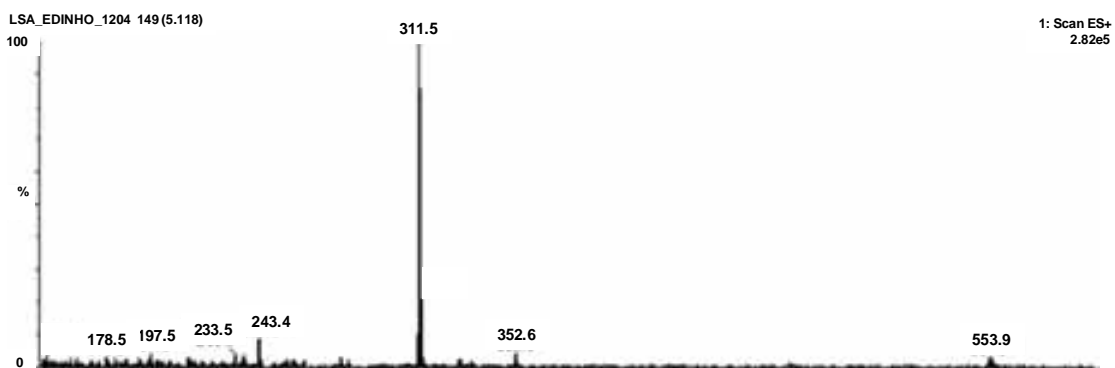


FIGURA 2.16: Espectro de massas de **02**

Portanto, com base na formação da dicetopiperazina ciclo-(fenilalanina-tirosina), comumente encontrada em micro-organismos, os dados de RMN e EM permitiram identificar a seguinte estrutura:

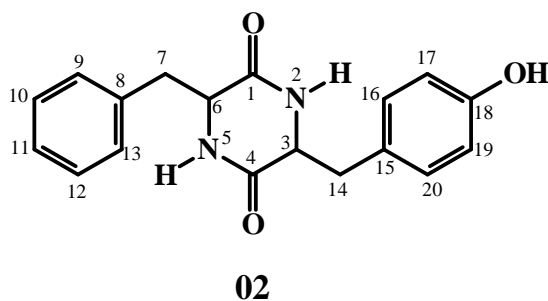


TABELA 2.9: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **02** e comparação com dados da literatura

H/C	Substância 02 (400/100 MHz, D ₂ O)		LU <i>et al.</i> , 2009 (600/125 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	
	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm)	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm)
1	-	168,9	-	166,1
2-NH	-	-	7,84 (1H, <i>s</i>)	-
3	4,51 (1H, <i>dd</i> , J= 4,5; 4,0)	59,5	3,94 (1H, <i>s</i>)	55,7
4	-	168,9	-	166,1
5-NH	-	-	7,84 (1H, <i>s</i>)	-
6	4,59 (1H, <i>ddd</i> , J= 4,5; 4,3; 2,4)	59,3	3,89 (1H, <i>d</i>)	55,4
7a	3,27 (1H, <i>dd</i> , J= 14,2; 4,3)	40,8	2,18 (1H, <i>m</i>)	38,5
7b	3,11 (1H, <i>dd</i> , J= 14,2; 4,5)		2,18 (1H, <i>m</i>)	
8	-	138,0	-	136,6
9	7,21 (1H, <i>dd</i> , J= 8,2; 1,6)	132,9	7,29 (1H, <i>d</i> , J= 7,2)	127,9
10	7,39 (1H, <i>m</i>)	131,6	7,04 (1H, <i>d</i> , J= 7,8)	128,1
11	7,34 (1H, <i>m</i>)	130,4	7,20 (1H, <i>d</i> , J= 7,2)	126,4
12	7,39 (1H, <i>m</i>)	131,6	7,04 (1H, <i>d</i> , J= 7,8)	128,1
13	7,21 (1H, <i>dd</i> , J= 8,2; 1,6)	132,9	7,29 (1H, <i>d</i> , J= 7,2)	127,9
14a	3,21 (1H, <i>dd</i> , J= 18,2; 4,0)	40,3	2,58 (1H, <i>m</i>)	39,1
14b	3,00 (1H, <i>dd</i> , J= 18,2; 4,5)		2,50 (1H, <i>m</i>)	
15	-	129,6	-	130,8
16	7,06 (1H, <i>d</i> , J= 8,8)	134,4	6,84 (1H, <i>d</i> , J= 8,4)	129,7
17	6,86 (1H, <i>d</i> , J= 8,8)	118,3	6,68 (1H, <i>d</i> , J= 8,4)	115,0
18	-	157,7	-	156,1
18-OH	-	-	9,23	-
19	6,86 (1H, <i>d</i> , J= 8,8)	118,3	6,68 (1H, <i>d</i> , J= 8,4)	115,0
20	7,06 (1H, <i>d</i> , J= 8,8)	134,4	6,84 (1H, <i>d</i> , J= 8,4)	129,7

Os cromatogramas obtidos na análise via CL-EM (CROMATOGRAMAS 2.3 a 2.4, ps. 316 a 317) também mostraram a presença de mais dois compostos majoritários, os quais levaram aos espectros de massas com íons pseudo-moleculares em m/z 261 ($[M+H]^+$) (FIGURA 2.17, p. 316) e m/z 245 ($[M+H]^+$) (FIGURA 2.18, p. 317). Segundo dados da literatura (CHEN *et al.*, 2004), há duas propostas de dicetopiperazinas com m/z 261, sendo as mesmas ciclo-(prolina-tirosina) e ciclo-(leucina/isoleucina-fenilalanina) e uma proposta para m/z 245, sendo o ciclo-(prolina-fenilalanina). Como o espectro de RMN de 1H não apresentou sinais característicos de metilas, adotou-se como propostas de estruturas as seguintes dicetopiperazinas: ciclo-(prolina-tirosina) – **03** e ciclo-(prolina-fenilalanina) – **04**.

No espectro de RMN de 1H , para as substâncias **03** e **04** foram observados, além dos sinais na região dos aromáticos, já relatados na discussão de **02**, multipletos em δ 4,03 (2H), δ 3,50 (2H), δ 3,33 (2H), atribuídos aos hidrogênios H-6, H-3a e H-3b, respectivamente; quatro duplos dubletos, sendo dois em δ 3,27 (1H, $J= 14,2$ Hz; 4,3 Hz) e δ 3,11 (1H, $J= 14,2$ Hz; 4,5 Hz) referente aos sinais de H-10a e H-10b de **04** e dois em δ 3,21 (1H, $J= 18,2$ Hz; 4,0 Hz) e δ 3,00 (1H, $J= 18,2$ Hz; 4,5 Hz) referentes aos sinais de H-10a e H-10b de **03**; multipletos em δ 2,00 (2H), δ 0,75(2H) e δ 1,75 (2H) referentes aos hidrogênios H-5a e H-5b e H-4, respectivamente. Além dos sinais citados anteriormente, foi possível observar um duplo duplo dubleto em δ 4,59 (1H, $J= 4,5$ Hz; 4,3 Hz; 2,4 Hz) e um duplo dubleto em δ 4,51 (1H, $J= 4,5$ Hz; 4,0 Hz) referentes ao H-9 de **04** e **03**, respectivamente.

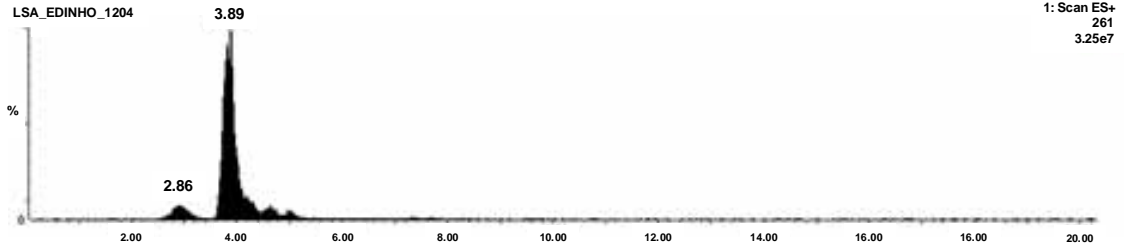
A análise conjunta dos espectros de RMN de ^{13}C e HSQC permitiu atribuir todos os sinais de carbonos de **03** e **04** (TABELAS 2.10 e 2.11, ps. 318 e 319, respectivamente).

Pelo espectro de HMBC, para as substâncias **03** e **04** foi possível observar a correlação do sinal em δ 4,03 (H-6) com os sinais dos carbonos em δ

30,6 (C-5) e δ 173,0/173,2 (C-7); o sinal em δ 3,50 (H-3a) correlacionou-se com os sinais em δ 23,7/23,8 (C-4) e δ 61,5/61,6 (H-6) e o sinal em δ 3,33 (H-3b) correlacionou-se com os sinais em δ 23,7/23,8 (C-4) e δ 30,6 (C-5). Além destas correlações, também foi possível observar as correlações dos anéis aromáticos e grupos $-\text{CH}_2-$ de **03** e **04**, já apresentadas na discussão de **02**.

Novamente os dados de RMN de ^1H não mostraram um estreito paralelismo com aqueles citados na literatura para **03** (GUO *et al.*, 2007) e **04** (FURTADO *et al.*, 2005). Em ambos, os solventes utilizados na obtenção dos espectros foram diferentes daquele empregado neste estudo. Contudo, a EM parece confirmar a presença das dicetopiperazinas ciclo-(prolina-tirosina) e ciclo-(prolina-fenilalanina).

No espectro de massas obtido a partir de CLAE-UV-EM foi possível observar a presença de duas bandas cromatográficas com tempos de retenção em 3,89 e 2,86 minutos (CROMATOGRAMA 2.3, p. 316) para o íon m/z 261. O mesmo fato foi observado para o íon m/z 245 com duas bandas cromatográficas em 5,63 e 4,88 minutos (CROMATOGRAMA 2.4, p. 317). Tais fatos sugerem a possibilidade de existência de epímeros para os compostos **03** e **04**. Como tais moléculas possuem hidrogênio ácido α -carboxílico, o qual em meio de isolamento ou *in vivo* poderia ser epimerizado, seria possível a existência de dois epímeros para cada composto com tempos de retenção diferentes, conforme mostrado a seguir.



CROMATOGRAMA 2.3: Cromatograma de **03** obtido durante a análise de CL-UV-EM

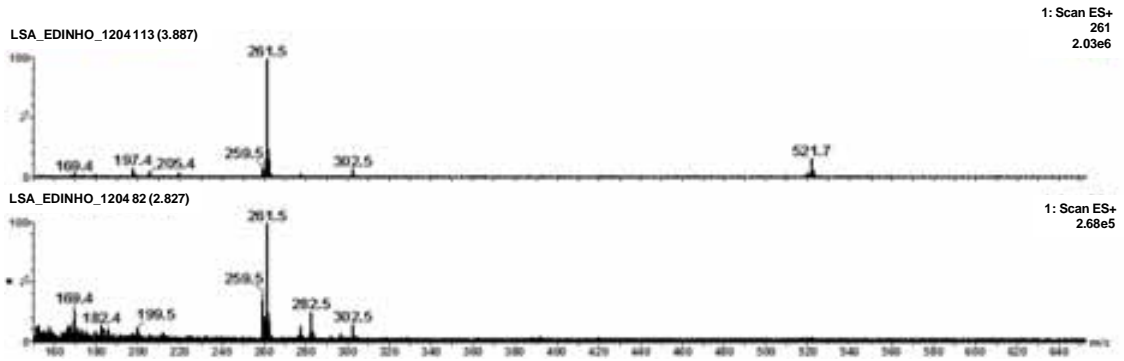
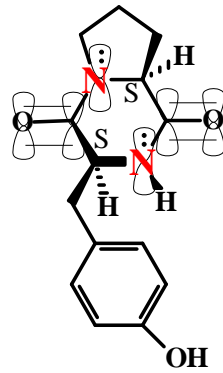
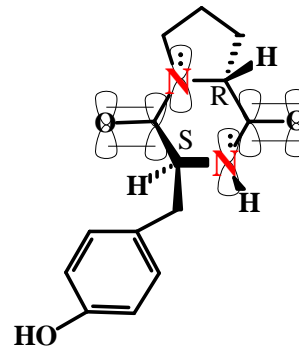


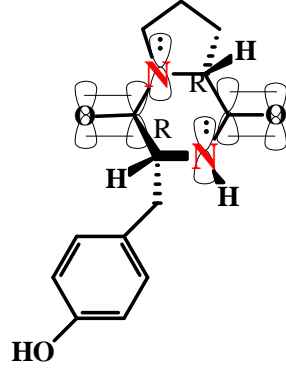
FIGURA 2.17: Espectro de massas de **03**



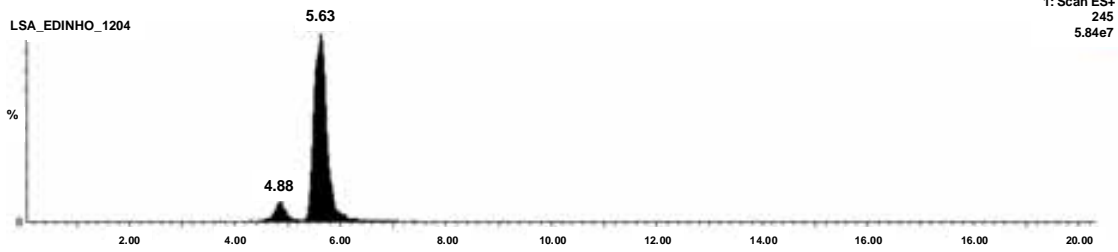
Derivado do aminoácido *L*
(configuração *S*)



Ou



Derivado do aminoácido *D* **03**
(não natural?)



CROMATOGRAMA 2.4: Cromatograma de **04** obtido durante a análise de CL-UV-EM

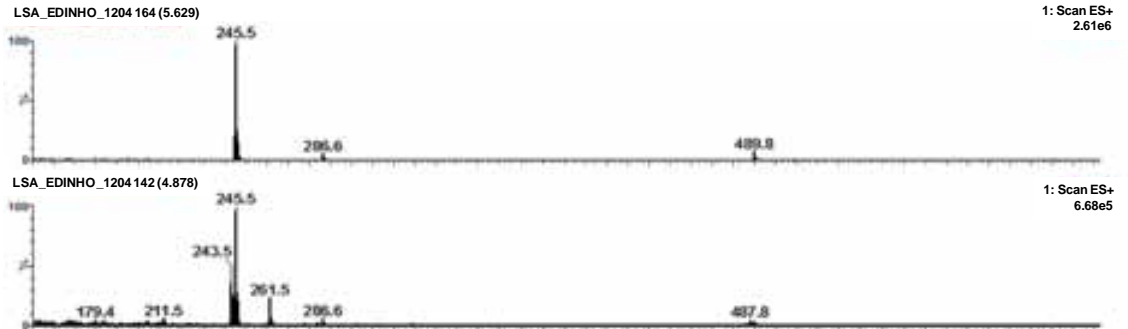
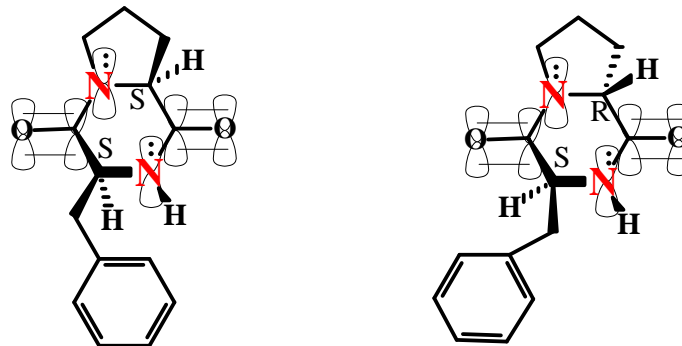
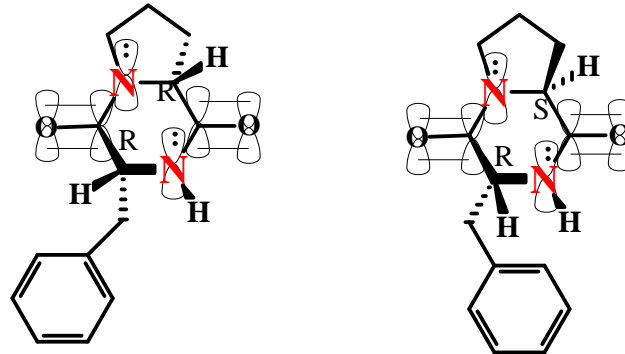


FIGURA 2.18: Espectro de massas de **04**



Derivado do aminoácido L
(configuração S)

Ou



Derivado do aminoácido D
(não natural?)

04

TABELA 2.10: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **03** e comparação com dados da literatura

H/C	Substância 03 (400/100 MHz, D ₂ O)		GUO <i>et al.</i> , 2007 (400/100 MHz, CDCl ₃)	
	δ (ppm), <i>J</i> (Hz)	δ (ppm)	δ (ppm), <i>J</i> (Hz)	δ (ppm)
1	-	168,9	-	165,2
2-NH	-	-	-	-
3a	3,50 (1H, <i>m</i>)	47,7	3,63 (1H, <i>m</i>)	45,5
3b	3,33 (1H, <i>m</i>)		3,57 (1H, <i>m</i>)	
4a	1,75 (1H, <i>m</i>)	23,7/23,8*	2,01 (1H, <i>m</i>)	22,5
4b	1,75 (1H, <i>m</i>)		1,93 (1H, <i>m</i>)	
5a	2,00 (1H, <i>m</i>)	30,6	2,33 (1H, <i>m</i>)	28,3
5b	0,75 (1H, <i>m</i>)		1,99 (1H, <i>m</i>)	
6	4,03 (1H, <i>m</i>)	61,5/61,6*	4,10 (1H, <i>m</i>)	59,2
7	-	173,0/173,2*	-	169,7
8-NH	-	-	7,27 (1 H, <i>s</i>)	-
9	4,51 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 4,5; 4,0)	59,5	4,14 (1H, <i>m</i>)	56,3
10a	3,21 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =18,2; 4,0)	40,3	3,46 (1H, <i>m</i>)	35,9
10b	3,00 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =18,2; 4,5)		2,79 (1H, <i>m</i>)	
11	-	129,6	-	127,0
12	7,06 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,8)	134,4	7,05 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,4)	130,3
13	6,86 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,8)	118,3	6,79 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,4)	116,1
14	-	157,7	-	155,6
15	6,86 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,8)	118,3	6,79 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,4)	116,1
16	7,06 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,8)	134,4	7,05 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,4)	130,3

* Valores intercambiáveis para **03** e **04**

TABELA 2.11: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **04** e comparação com dados da literatura

H/C	Substância 04 (400/100 MHz, D ₂ O)		FURTADO <i>et al.</i> , 2005 (400/100 MHz, MeOD)	
	δ (ppm), <i>J</i> (Hz)	δ (ppm)	δ (ppm), <i>J</i> (Hz)	δ (ppm)
1	-	168,9	-	167,3
2-NH	-	-	-	-
3a	3,50 (1H, <i>m</i>)	47,7	3,48 – 3,56 (1H, <i>m</i>)	45,9
3b	3,33 (1H, <i>m</i>)		3,33 – 3,39 (1H, <i>m</i>)	
4	1,75 (1H, <i>m</i>)	23,7/23,8*	1,75 – 1,83 (2H, <i>m</i>)	23,1
5a	2,00 (1H, <i>m</i>)	30,6	2,04 – 2,12 (1H, <i>m</i>)	29,7
5b	0,75 (1H, <i>m</i>)		1,15 – 1,24 (1H, <i>m</i>)	
6	4,03 (1H, <i>m</i>)	61,5/61,6*	4,06 (1H, <i>ddd</i> , <i>J</i> =10,8; 6,3; 1,7)	60,4
7	-	173,0/173,2*	-	171,3
8-NH	-	-	4,56 (1H, <i>sl</i>)	-
9	4,59(1H, <i>ddd</i> , <i>J</i> = 4,5; 4,3; 2,4)	59,3	4,44 (1H, <i>ddd</i> , <i>J</i> = 5,0; 4,8; 1,0)	58,0
10a	3,27 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =14,2; 4,3)	40,8	3,18 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =14,4; 4,8)	38,6
10b	3,11 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =14,2; 4,5)		3,14 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 14,4; 5,0)	
11	-	138,0	-	137,6
12	7,21 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 8,2; 1,6)	132,9	7,20 – 7,29 (1H, <i>m</i>)	131,4
13	7,39 (1H, <i>m</i>)	131,6	7,20 – 7,29 (1H, <i>m</i>)	130,1
14	7,34 (1H, <i>m</i>)	130,4	7,20 – 7,29 (1H, <i>m</i>)	128,5
15	7,39 (1H, <i>m</i>)	131,6	7,20 – 7,29 (1H, <i>m</i>)	130,1
16	7,21 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 8,2; 1,6)	132,9	7,20 – 7,29 (1H, <i>m</i>)	131,4

* Valores intercambiáveis para **03** e **04**

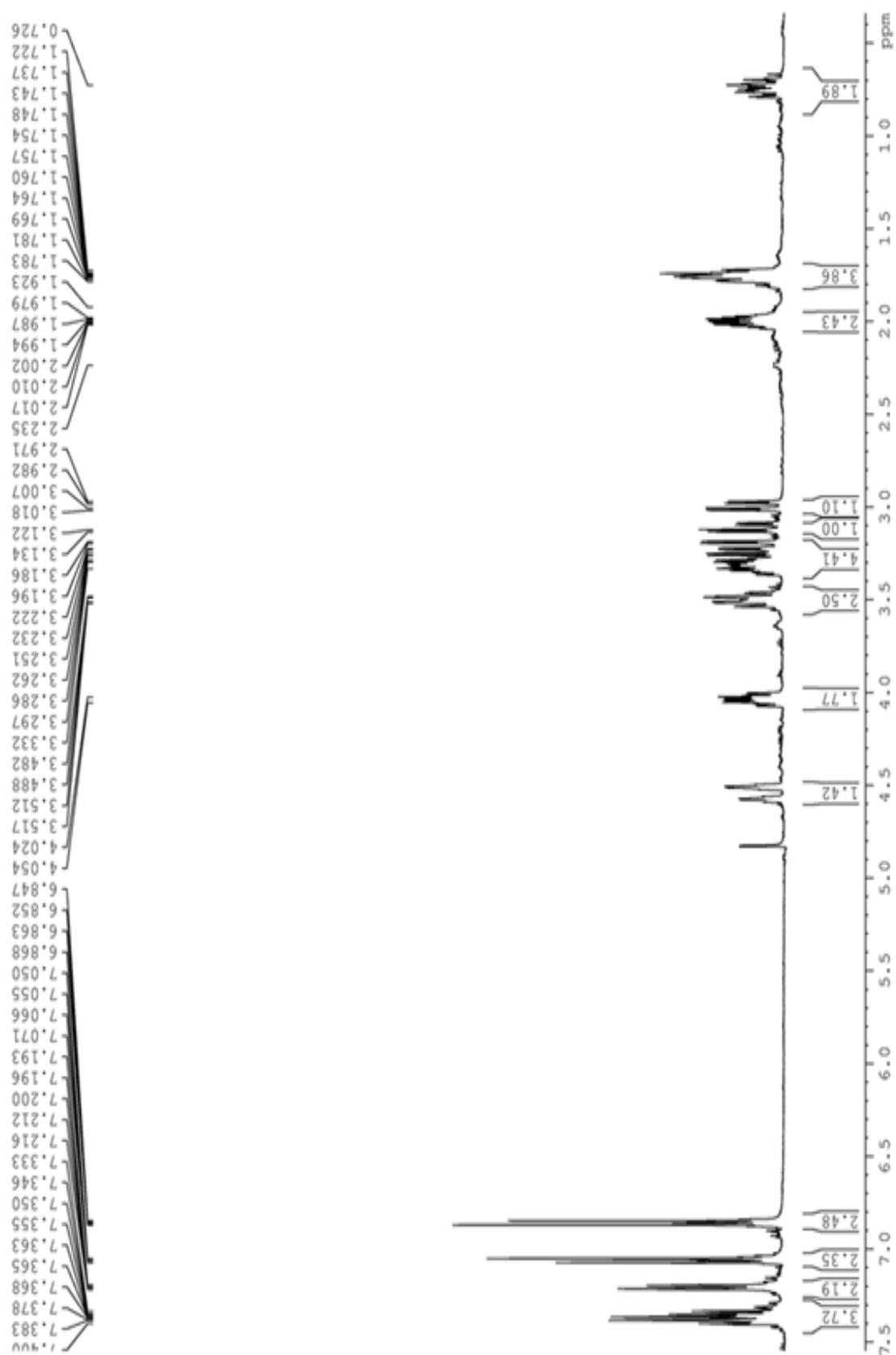


FIGURA 2.19: Espectro de RMN de ^1H de **02**, **03** e **04** (D_2O , 400 MHz)

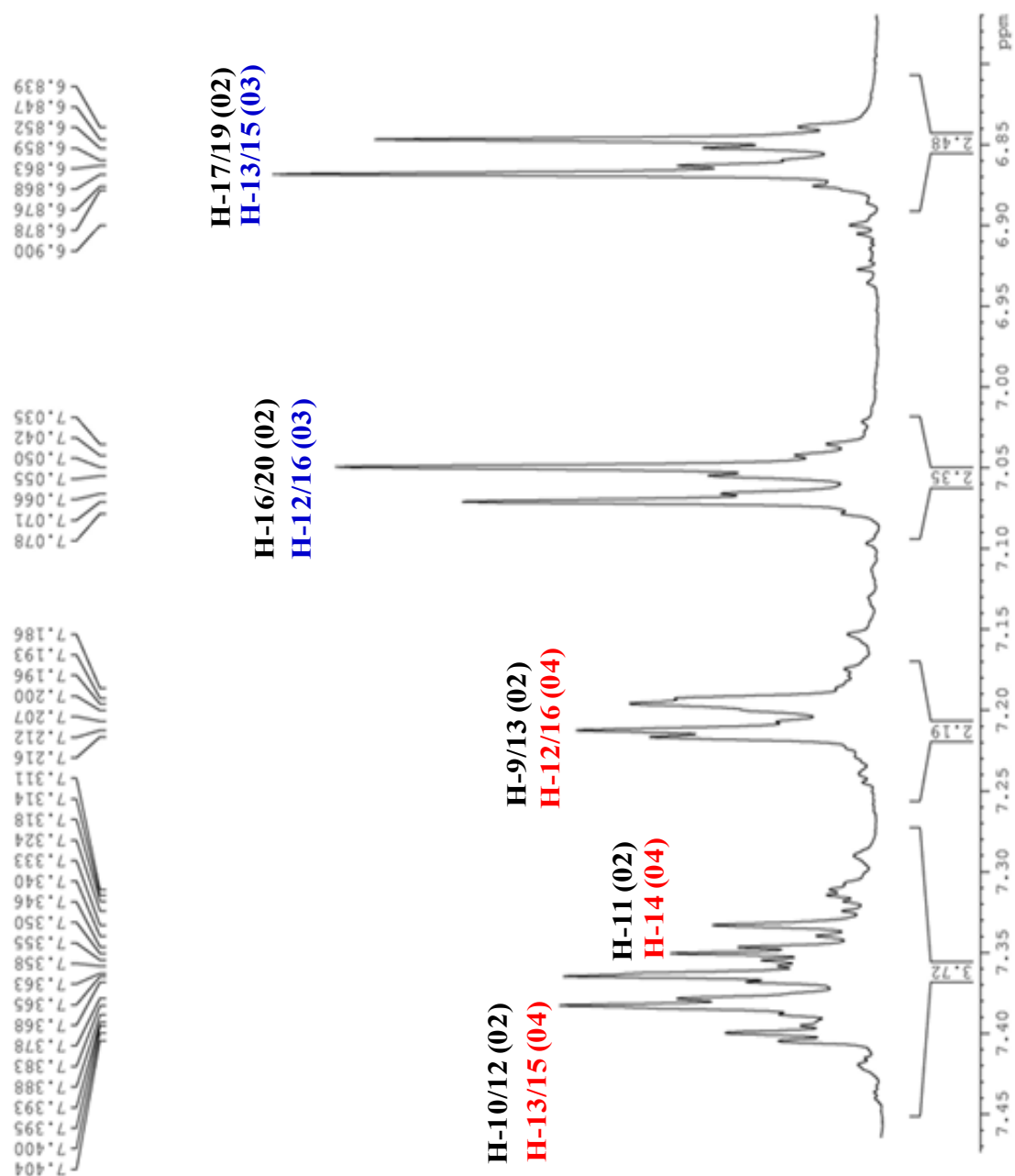


FIGURA 2.20: Ampliação 01 do espectro de RMN de ¹H de **02**, **03** e **04** (D₂O, 400 MHz)

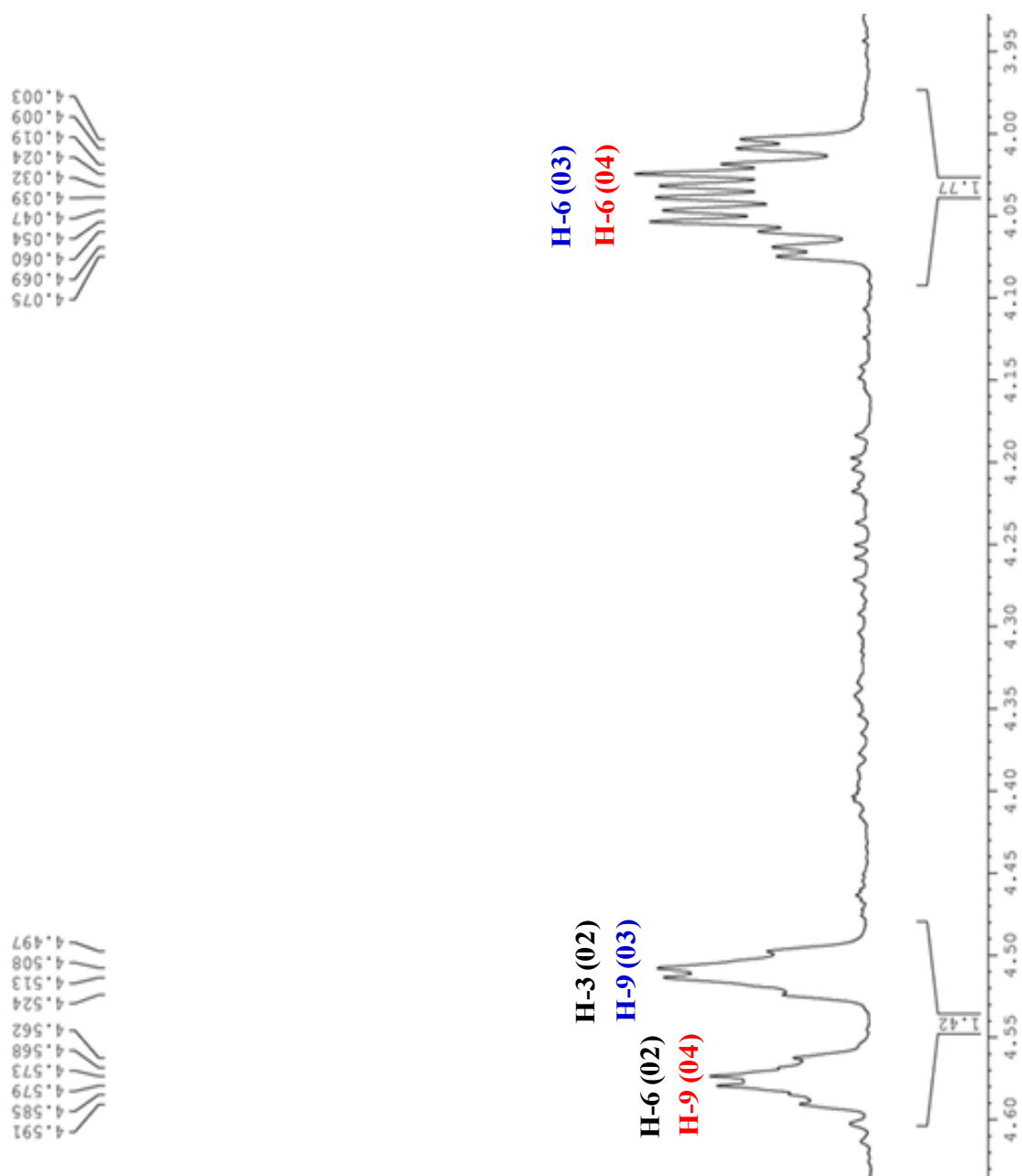


FIGURA 2.21: Ampliação 02 do espectro de RMN de ^1H de **02**, **03** e **04** (D_2O , 400 MHz)

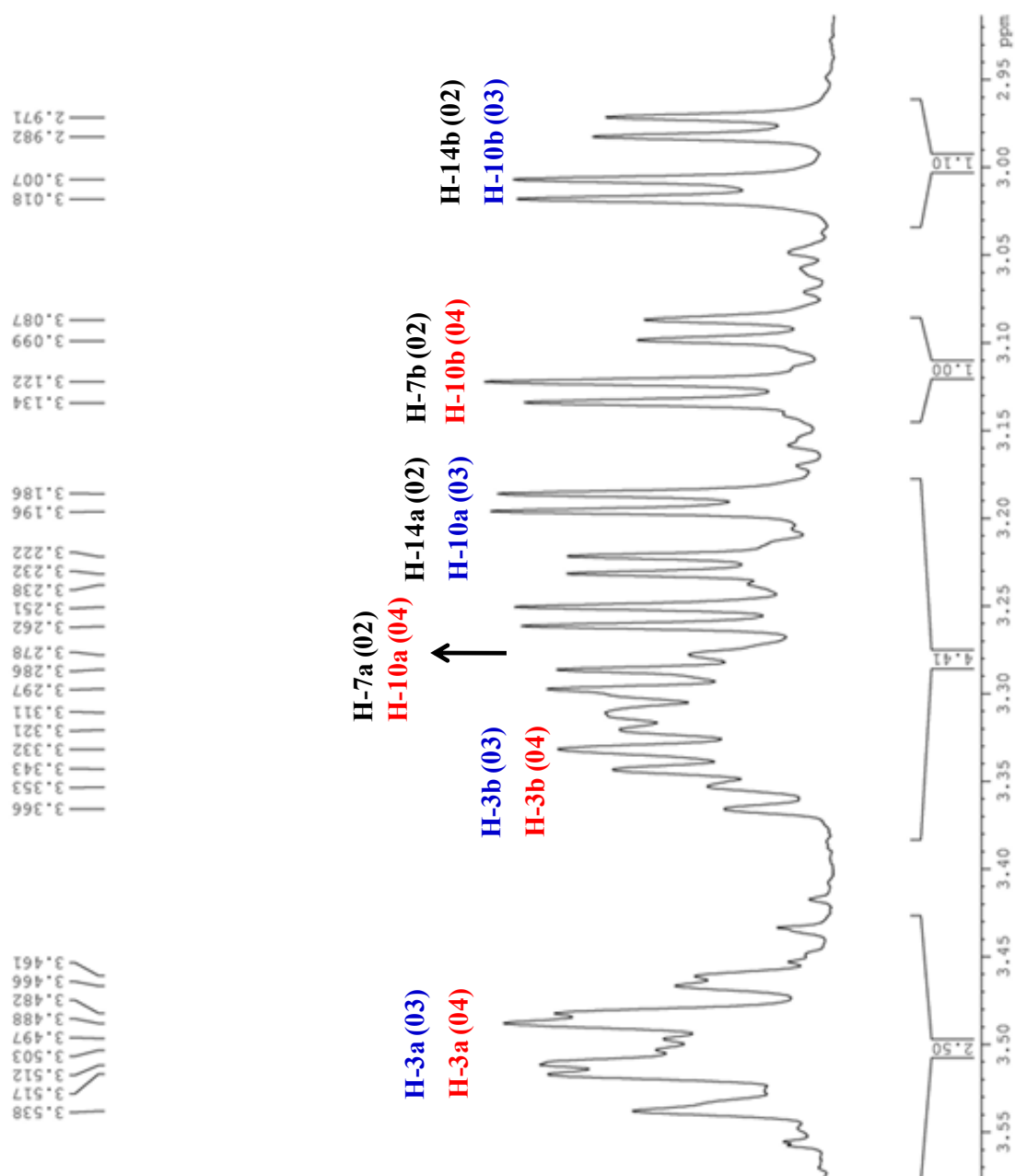


FIGURA 2.22: Ampliação 03 do espectro de RMN de ^1H de **02**, **03** e **04** (D_2O , 400 MHz)

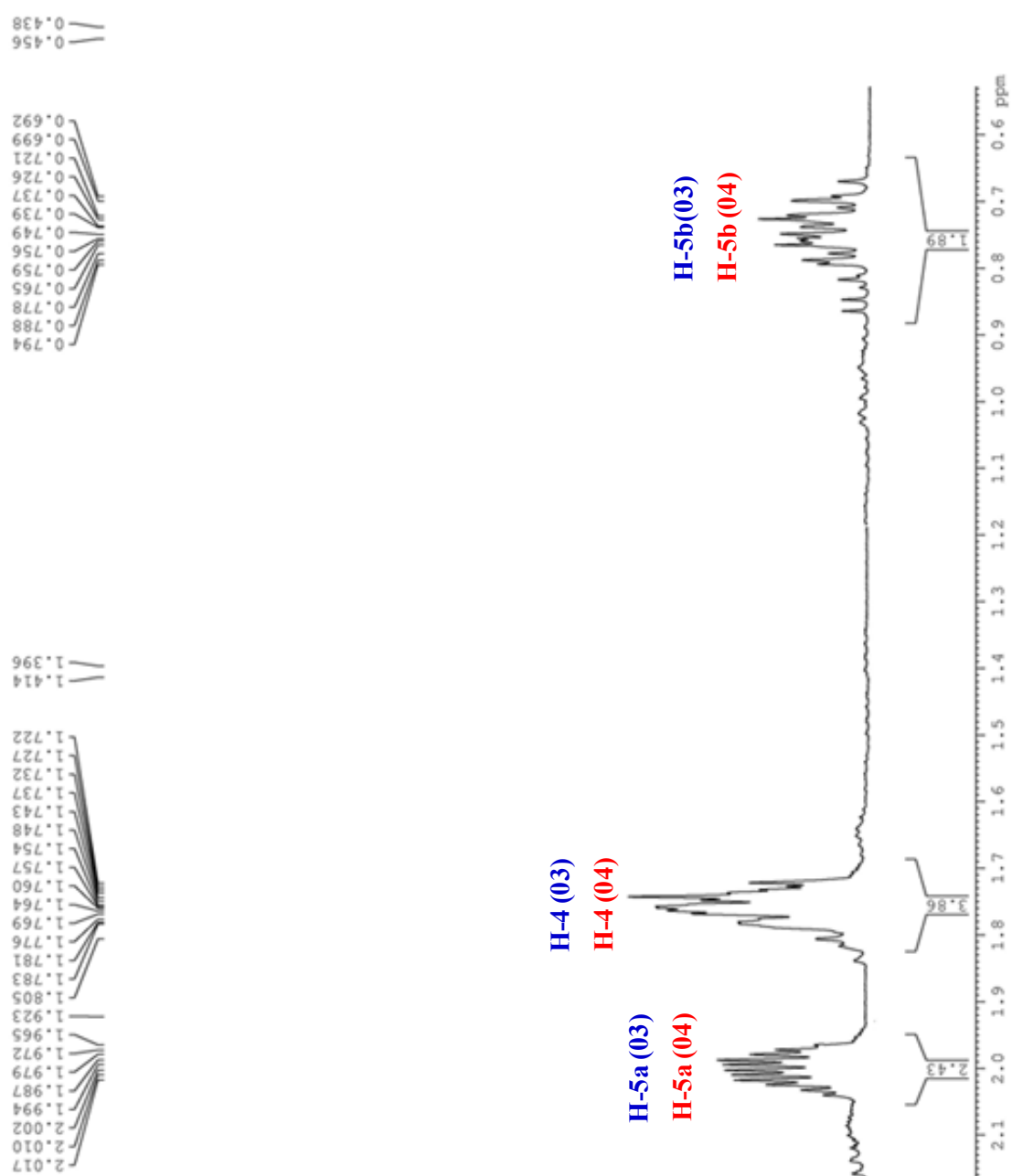


FIGURA 2.23: Ampliação 04 do espectro de RMN de ^1H de **02**, **03** e **04** (D_2O , 400 MHz)

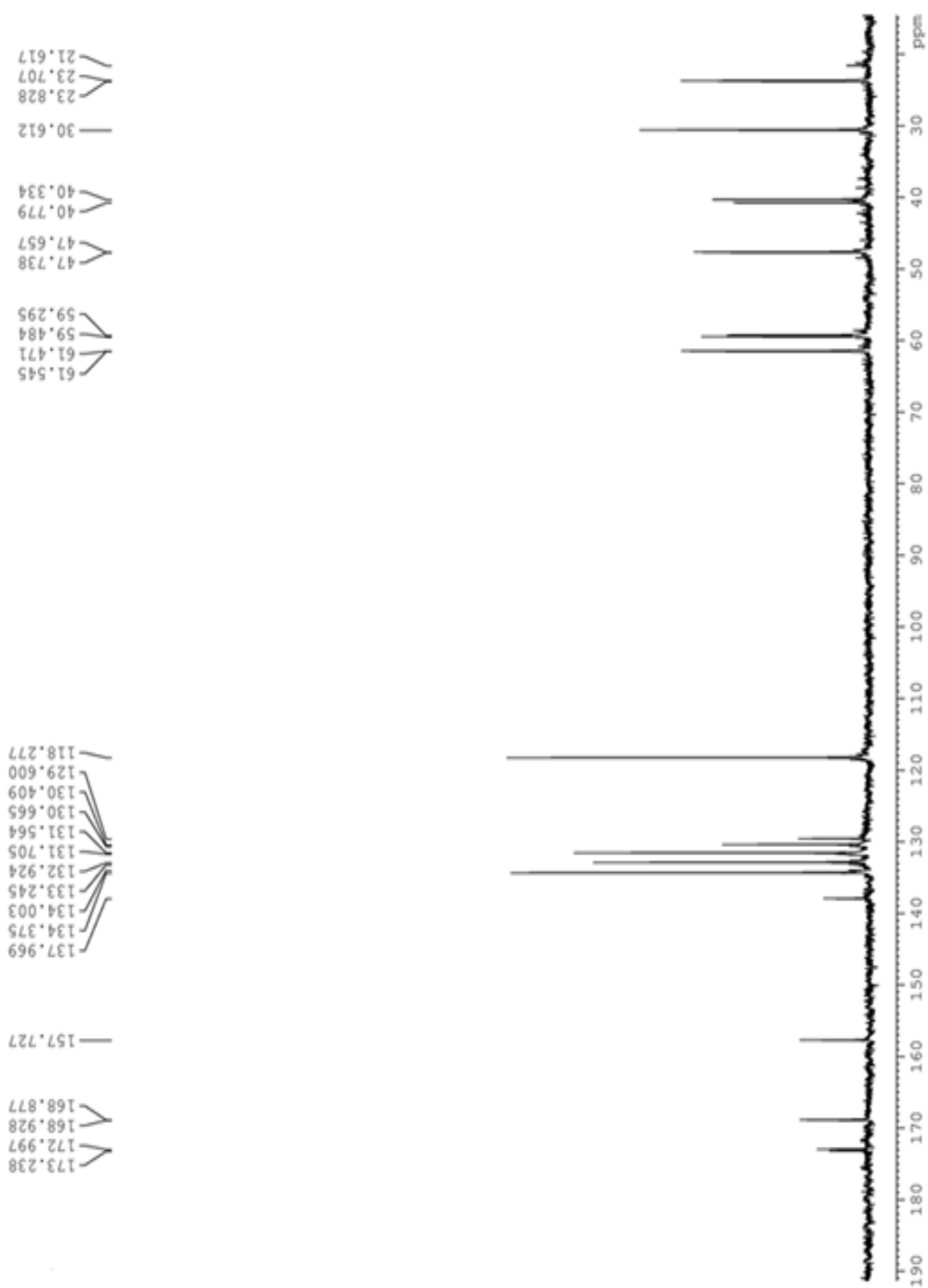


FIGURA 2.24: Espectro de RMN de ^{13}C de **02**, **03** e **04** (D_2O , 100 MHz)

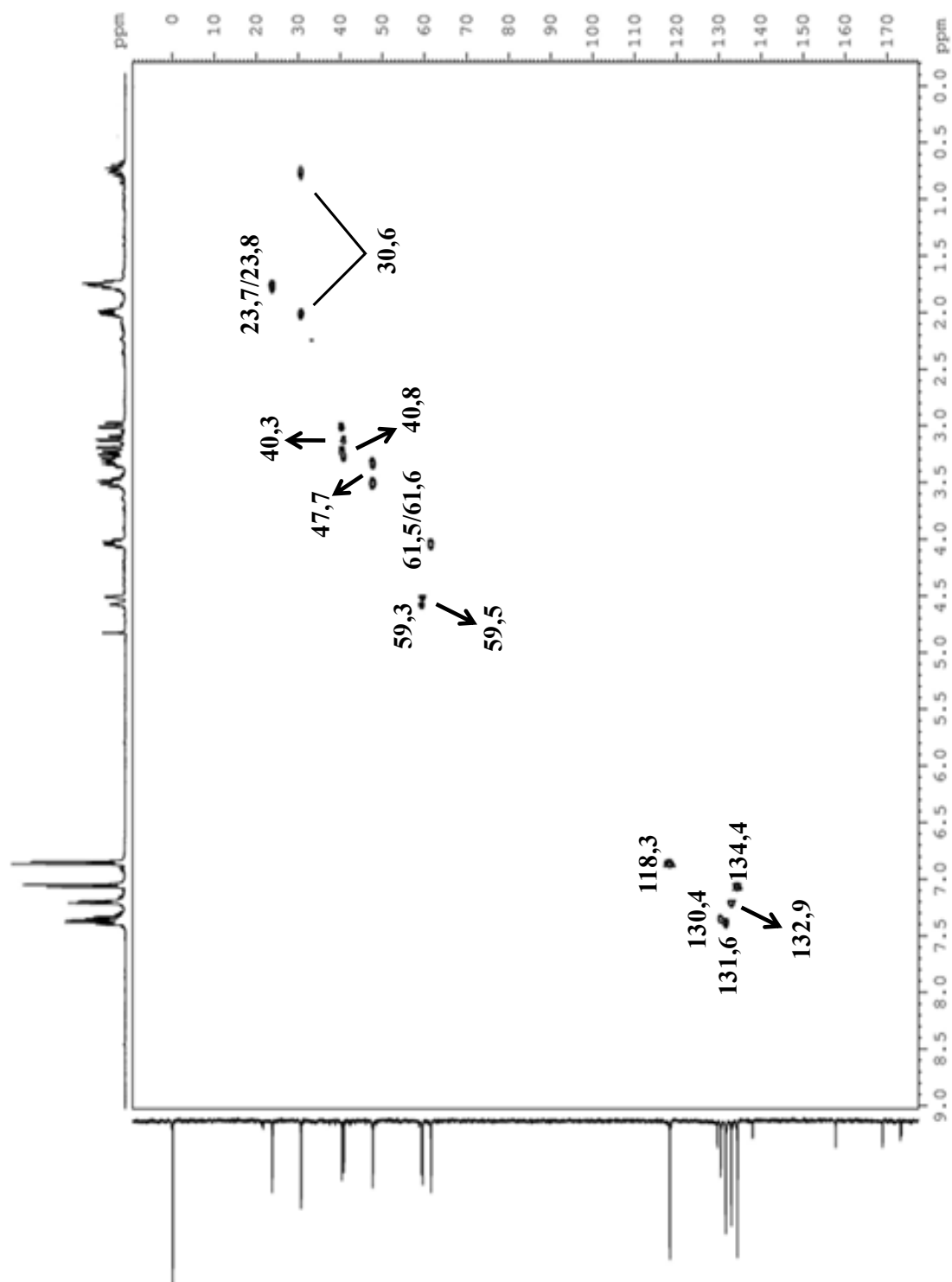


FIGURA 2.25: Mapa de contorno de g-HSQC de **02**, **03** e **04** (D_2O , 400 MHz)

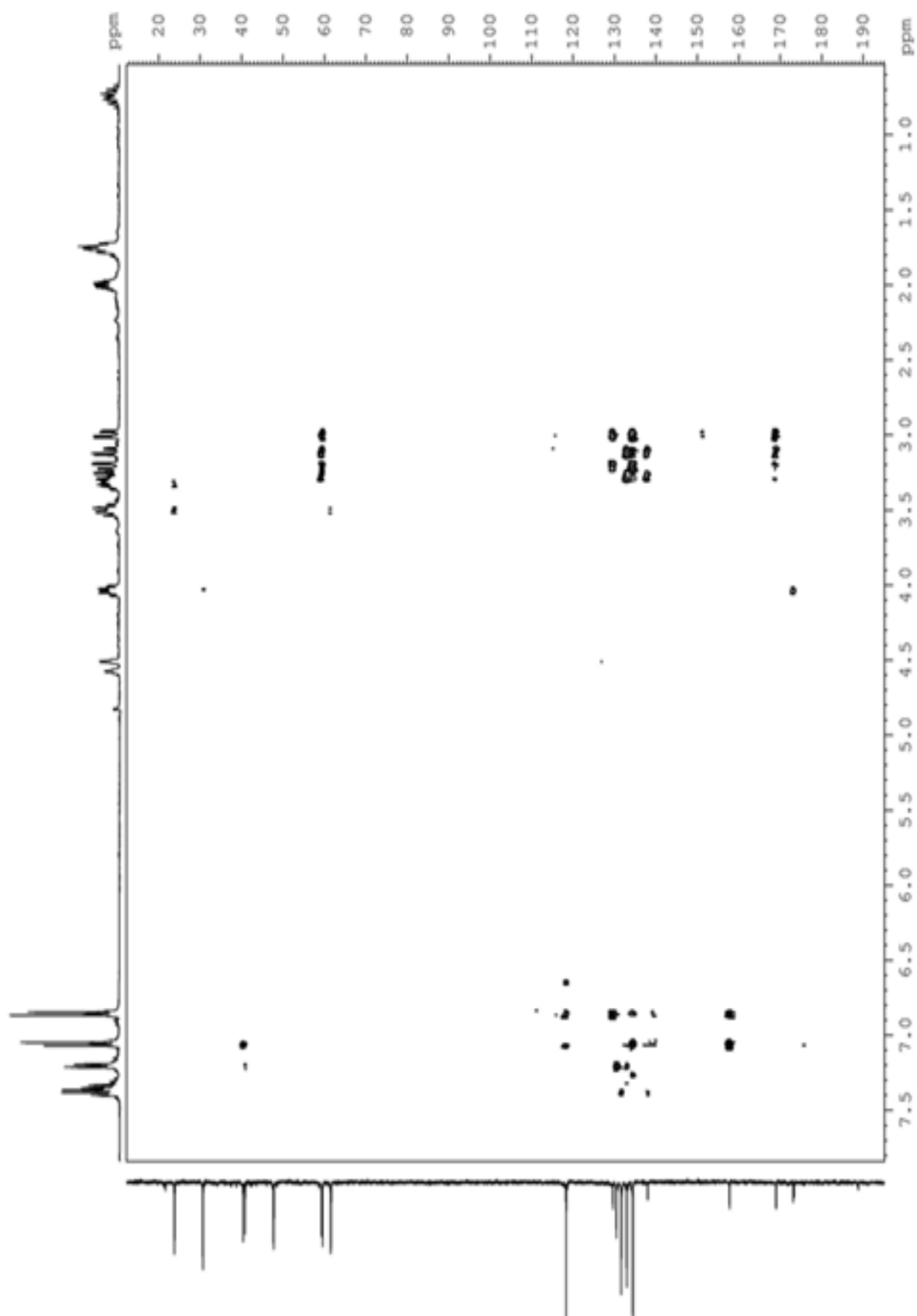


FIGURA 2.26: Mapa de contorno de g-HMBC de **02**, **03** e **04** (D₂O, 400 MHz)

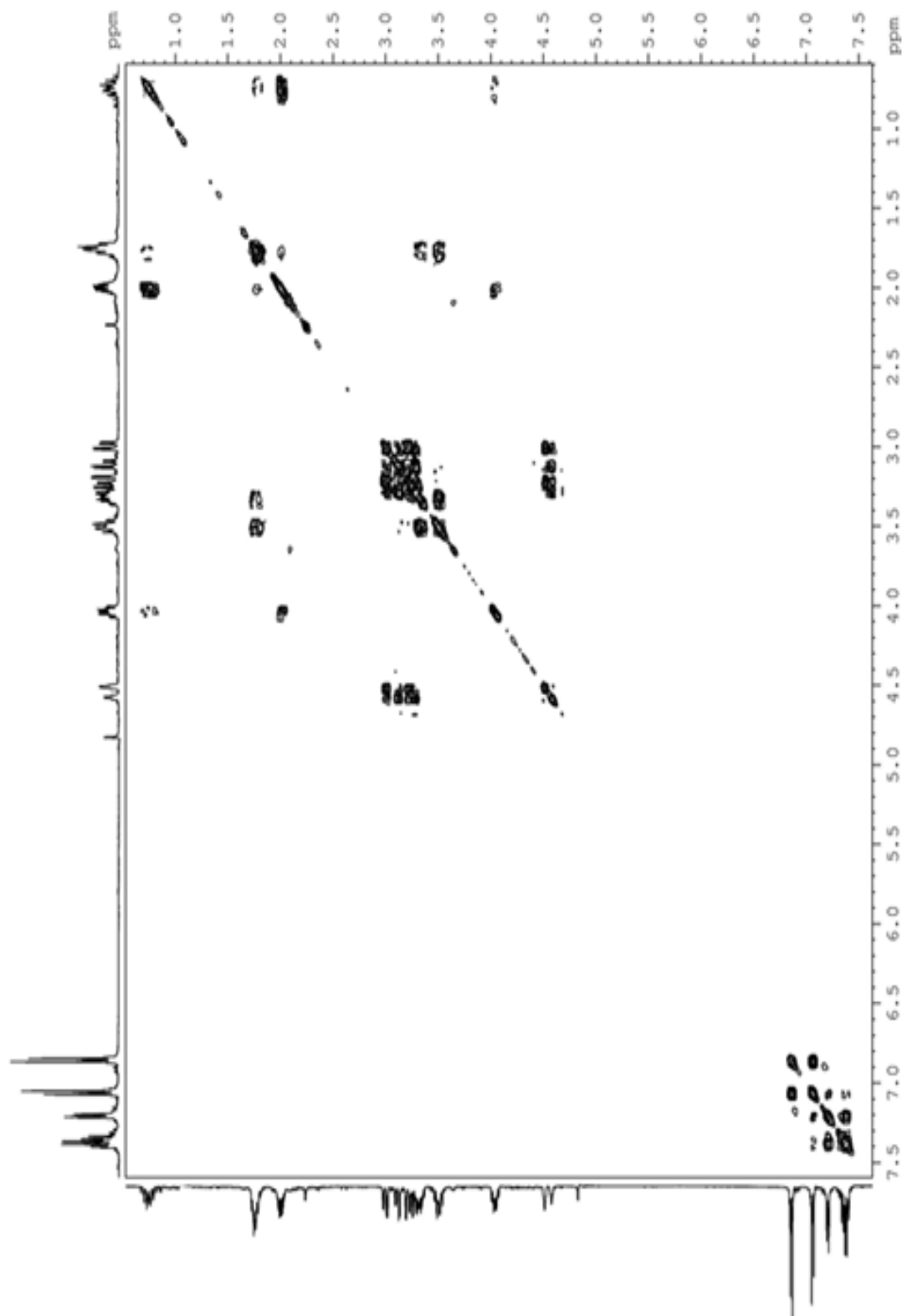


FIGURA 2.27: Espectro de g-COSY de **02**, **03** e **04** (D₂O, 400 MHz)

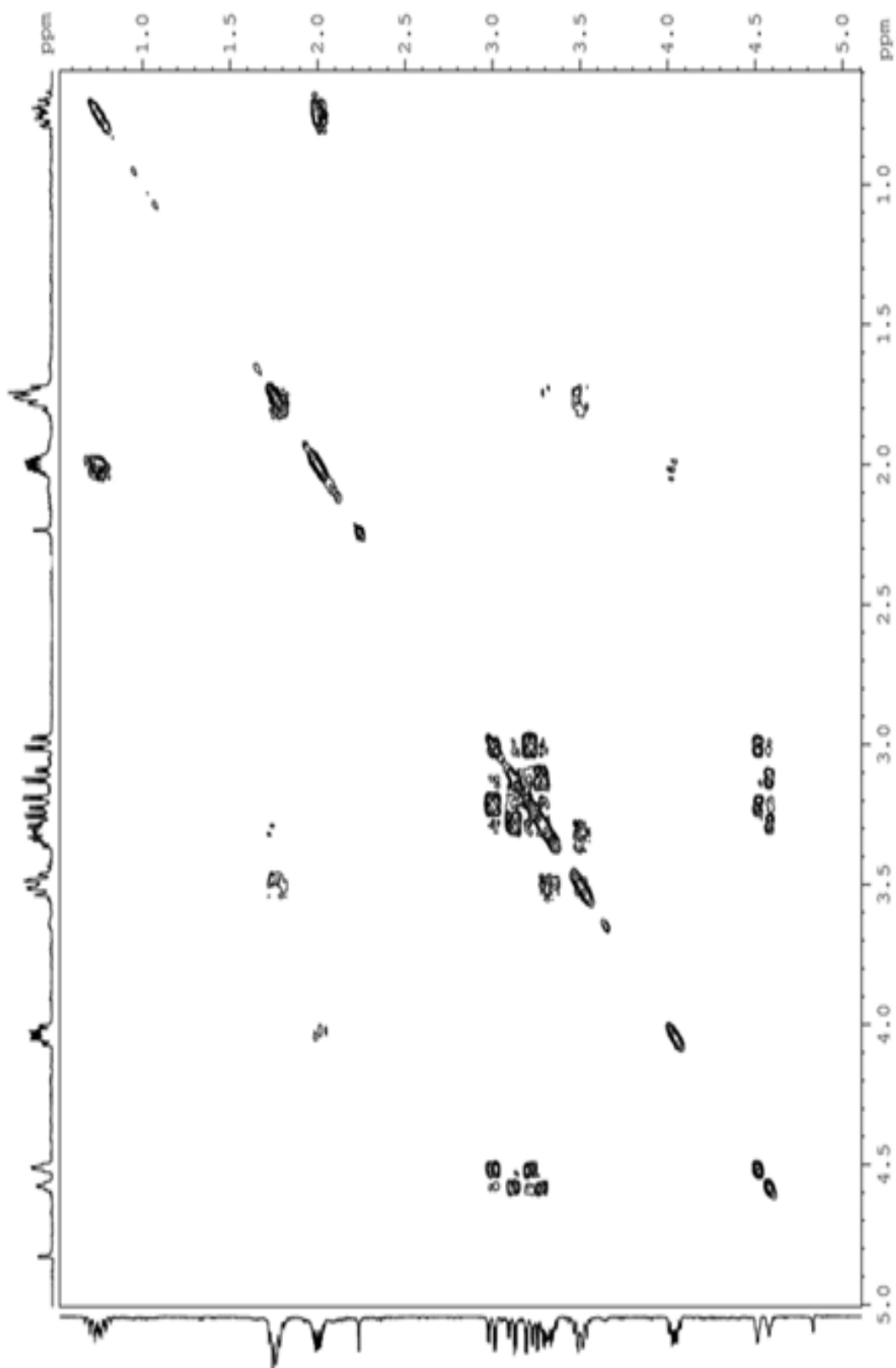
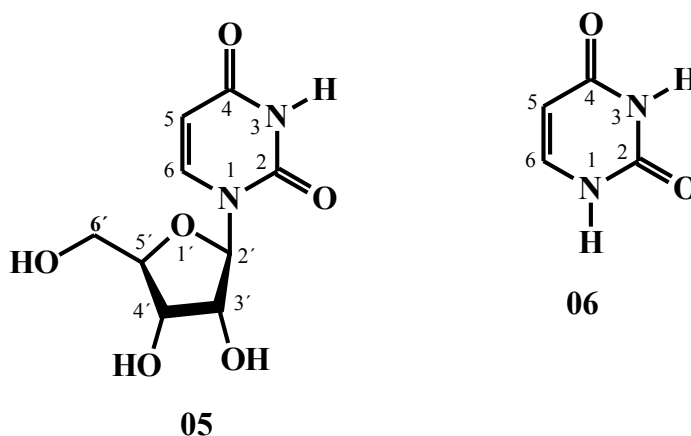


FIGURA 2.28: Ampliação do espectro de g-COSY de **02**, **03** e **04**
(D₂O, 400 MHz)

1.4.2.3 Uridina e Uracila – substâncias 05 e 06

As substâncias **05** e **06** foram isoladas em mistura dos extratos AcOEt e butanólico do meio líquido (25 dias). Suas estruturas foram identificadas através de experimentos de RMN de ^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC, COSY e comparações com dados da literatura (FERREIRA *et al.*, 2010; MARINHO *et al.*, 2007).



No espectro de RMN de ^1H (FIGURA 2.29, p. 333) para a substância **05** foi possível observar dois dubletos acoplando entre si em δ 7,91 (1H) e δ 5,85 (1H) com constante de acoplamento de 8,2 Hz, os quais foram atribuídos aos hidrogênios olefinicos H-6 e H-5, respectivamente, e um dubleto em δ 5,88 (1H, $J= 4,4$ Hz), o qual foi atribuído ao hidrogênio H-2'. Observou-se dois duplos dubletos em δ 4,26 (1H, *dd*, $J= 5,3$ Hz e 4,4 Hz) e δ 4,18 (1H, *dd*, $J= 5,3$ Hz e 4,0 Hz) referentes aos hidrogênios H-3' e H-4' respectivamente; um multipletto em δ 4,08 (1H) referente ao sinal de H-5' e dois duplos dubletos em δ 3,87 (1H, $J= 12,4$ Hz e 2,8) e δ 3,77 (1H, $J= 12,4$ Hz e 3,2 Hz), os quais foram atribuídos aos dois hidrogênios diastereotópicos H-6a' e H-6b' respectivamente.

Para a substância **06**, no espectro de RMN de ^1H observou-se apenas dois dubletos acoplando entre si em δ 7,51 (1H) e δ 5,75 (1H) com constante de acoplamento de 7,8 Hz, os quais foram atribuídos aos hidrogênios olefinicos H-6 e H-5, respectivamente.

A análise conjunta dos espectros de RMN de ^{13}C (FIGURA 2.30, p. 334) e HSQC (FIGURA 2.31, p. 335) permitiu atribuir todos os sinais de carbonos de **05** e **06** (TABELAS 2.12 e 2.13, p. 332).

Pelo espectro de HMBC (FIGURA 2.32, p. 336) foi possível observar a correlação do sinal de **05** em δ 7,91 (H-6) com os sinais dos carbonos em δ 90,4 (C-2), δ 103,2 (C-5), δ 152,8 (C-2) e δ 167,2 (C-4) e do sinal de hidrogênio em δ 5,85 (H-5) com os sinais dos carbonos em δ 142,8 (C-6) e δ 167,2 (C-4). O sinal de H-2' em δ 5,88 correlacionou-se no HMBC com os sinais em δ 75,0 (C-3), δ 142,8 (C-6) e δ 152,8 (C-2); o sinal de H-3' em δ 4,26 correlacionou-se no HMBC com os sinais em δ 85,6 (C-5) e δ 90,4 (C-2) e H-4' em δ 4,18 correlacionou-se no HMBC com os sinais em δ 61,9 (C-6) e δ 90,4 (C-2). Não foi possível observar correlações via HMBC para H-5'. Os sinais de hidrogênios diastereotópicos H-6a e H-6b mostraram correlações com os sinais em δ 70,7 (C-4) e δ 85,6 (C-5).

Para a substância **06**, no espectro de HMBC o sinal de H-6 (δ 7,51) mostrou correlações com os sinais dos carbonos em δ 102,0 (C-5), δ 154,4 (C-2) e δ 168,4 (C-4) e o sinal de H-5 (δ 5,85) correlacionou-se com os sinais de carbonos em δ 144,5 (C-6) e δ 168,4 (C-4).

A análise do espectro de COSY (FIGURA 2.33, p. 337) mostrou o acoplamento dos sinais de H-6 e H-5 de **05** e **06**, além dos acoplamentos dos hidrogênios da unidade ribose.

Portanto, pela análise dos experimentos de RMN e comparação com dados da literatura, foi possível identificar as estruturas das substâncias **05** e **06** como sendo a da uridina e a da uracila, respectivamente.

É importante ressaltar que quando um grupo fosfato é adicionado ao açúcar, os nucleosídeos passam a ser denominados de nucleotídeos, os quais constituem os ácidos nucléicos (RNA e DNA), que são macromoléculas de extrema importância biológica em todos os organismos vivos e responsáveis

pela transmissão da informação genética na célula (CAMPBELL & FARRELL, 2007).

TABELA 2.12: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **05** e comparação com dados da literatura

H/C	Substância 05 (400/100 MHz, MeOD)		FERREIRA <i>et al.</i> , 2010 (400/100 MHz, D ₂ O)	
	δ (ppm), <i>J</i> (Hz)	δ (ppm)	δ (ppm), <i>J</i> (Hz)	δ (ppm)
2	-	152,8*	-	151,7
4	-	167,2*	-	166,2
5	5,85 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,2)	103,2	5,89 (<i>d</i>)	102,3
6	7,91 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,2)	142,8	7,88 (<i>d</i>)	141,9
2'	5,88 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 4,4)	90,4	5,90 (<i>d</i>)	89,4
3'	4,26 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 5,3; 4,4)	75,0	4,36 (<i>t</i>)	73,7
4'	4,18 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 5,3; 4,0)	70,7	4,23 (<i>t</i>)	69,4
5'	4,08 (1H, <i>m</i>)	85,6	4,14 (<i>m</i>)	84,4
6'a	3,87 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 12,4; 2,8)	61,9	3,92 (<i>dd</i>)	60,8
6'b	3,77 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 12,4; 3,2)		3,81 (<i>dd</i>)	

* Valores obtidos com base na projeção de ^{13}C do espectro de HMBC

TABELA 2.13: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **06** e comparação com dados da literatura

H/C	Substância 06 (400/100 MHz, MeOD)		MARINHO <i>et al.</i> , 2007 (400/50 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	
	δ (ppm), <i>J</i> (Hz)	δ (ppm)	δ (ppm), <i>J</i> (Hz)	δ (ppm)
2	-	154,4*	-	151,7
4	-	168,4*	-	164,4
5	5,75 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 7,8)	102,0	5,56 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 7,6)	100,2
6	7,51 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 7,8)	144,5	7,51 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 7,6)	142,5

* Valores obtidos com base na projeção de ^{13}C do espectro de HMBC

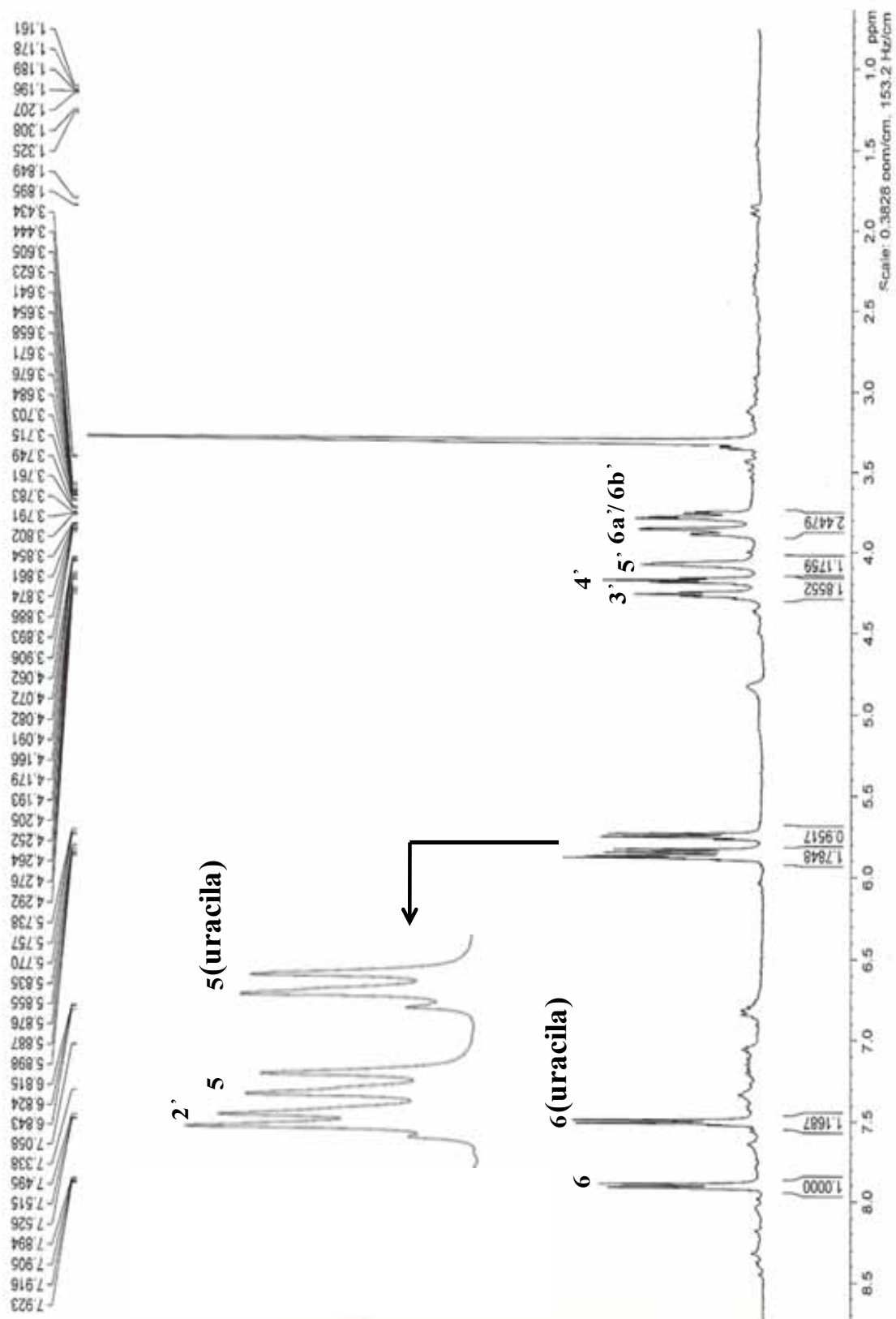


FIGURA 2.29: Espectro de RMN de ^1H de **05** e **06** (MeOD, 400 MHz)

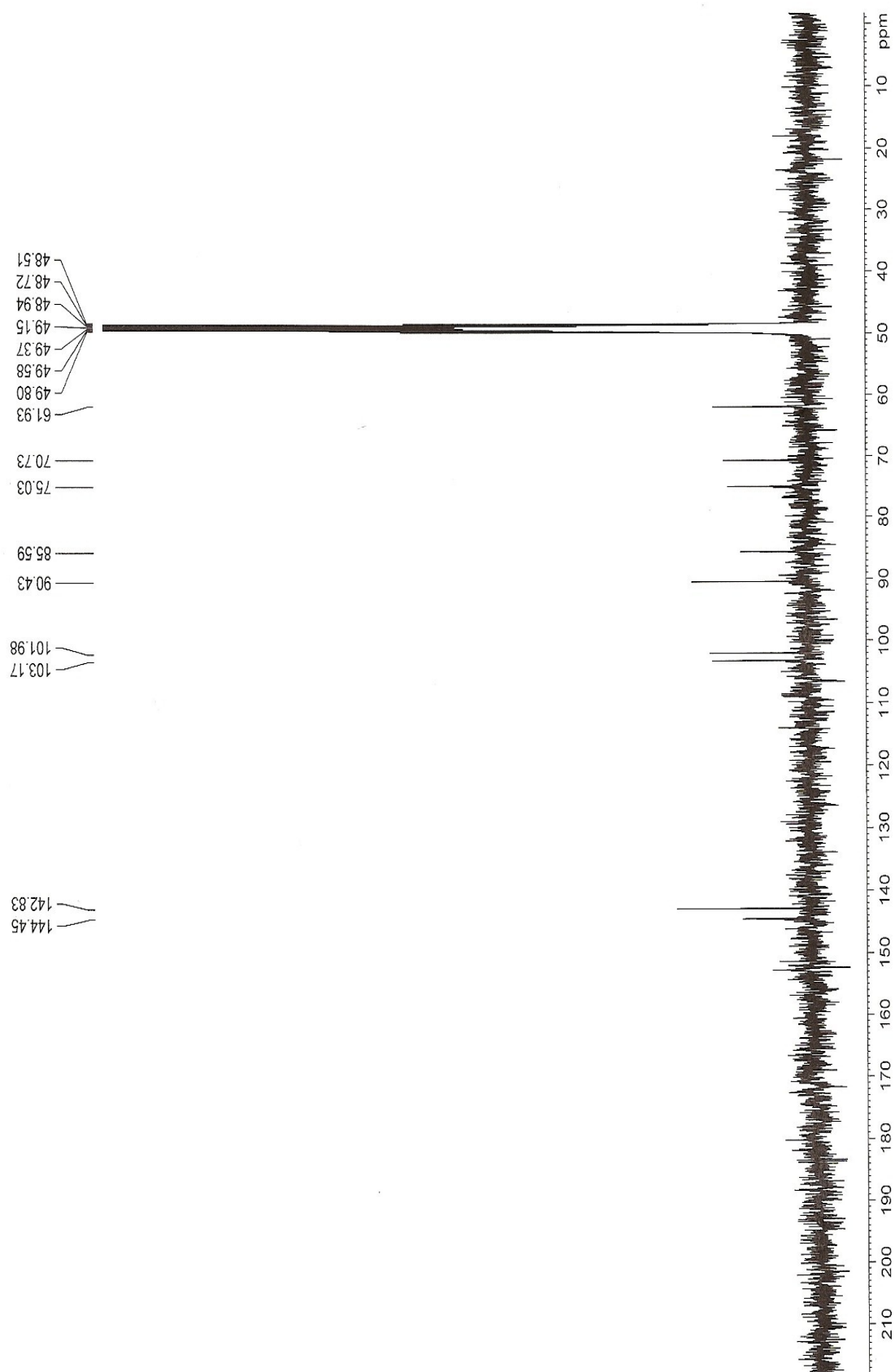


FIGURA 2.30: Espectro de RMN de ^{13}C de **05** e **06** (MeOD, 100 MHz)

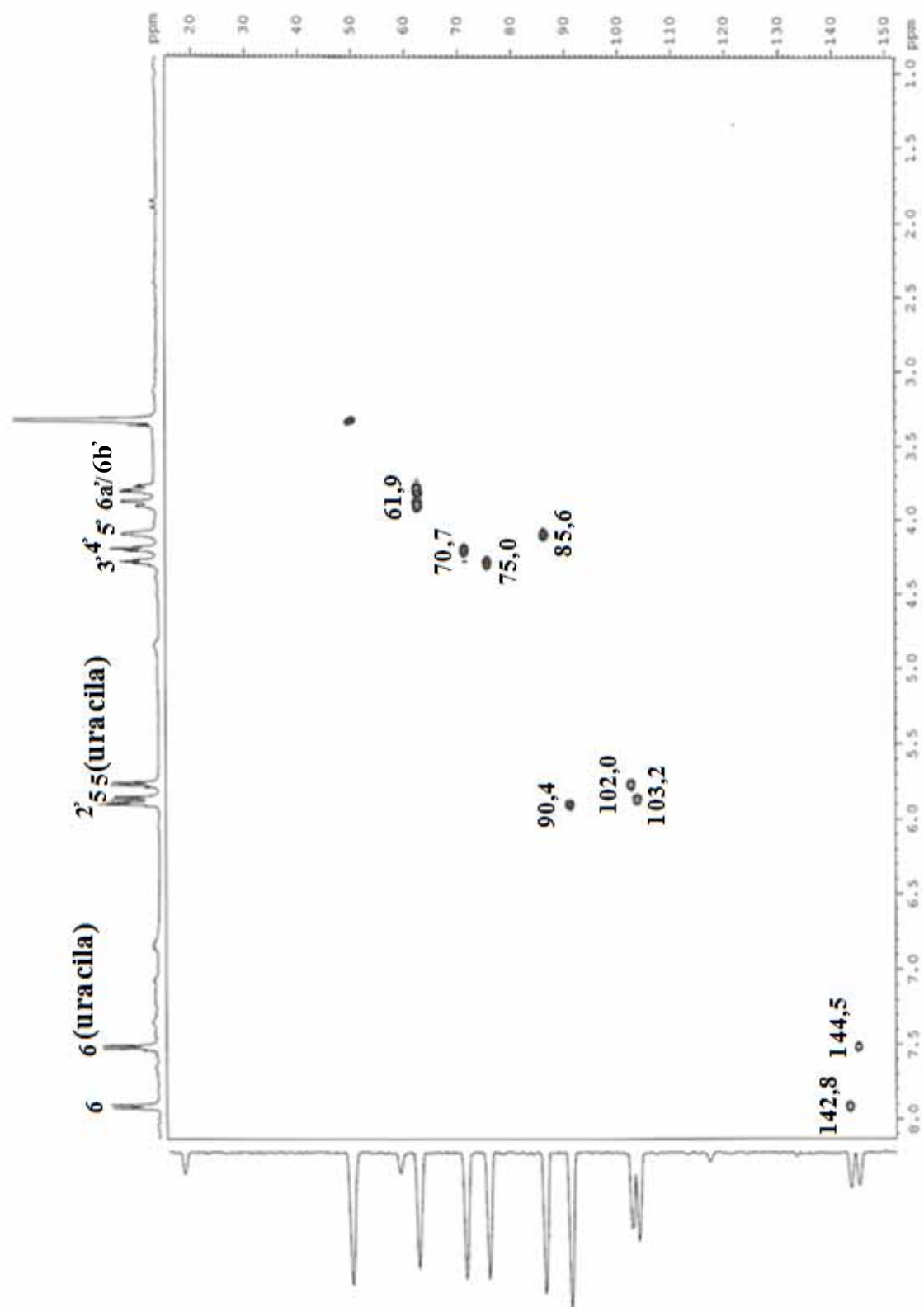


FIGURA 2.31: Mapa de contorno de g-HSQC de **05** e **06** (MeOD, 400 MHz)

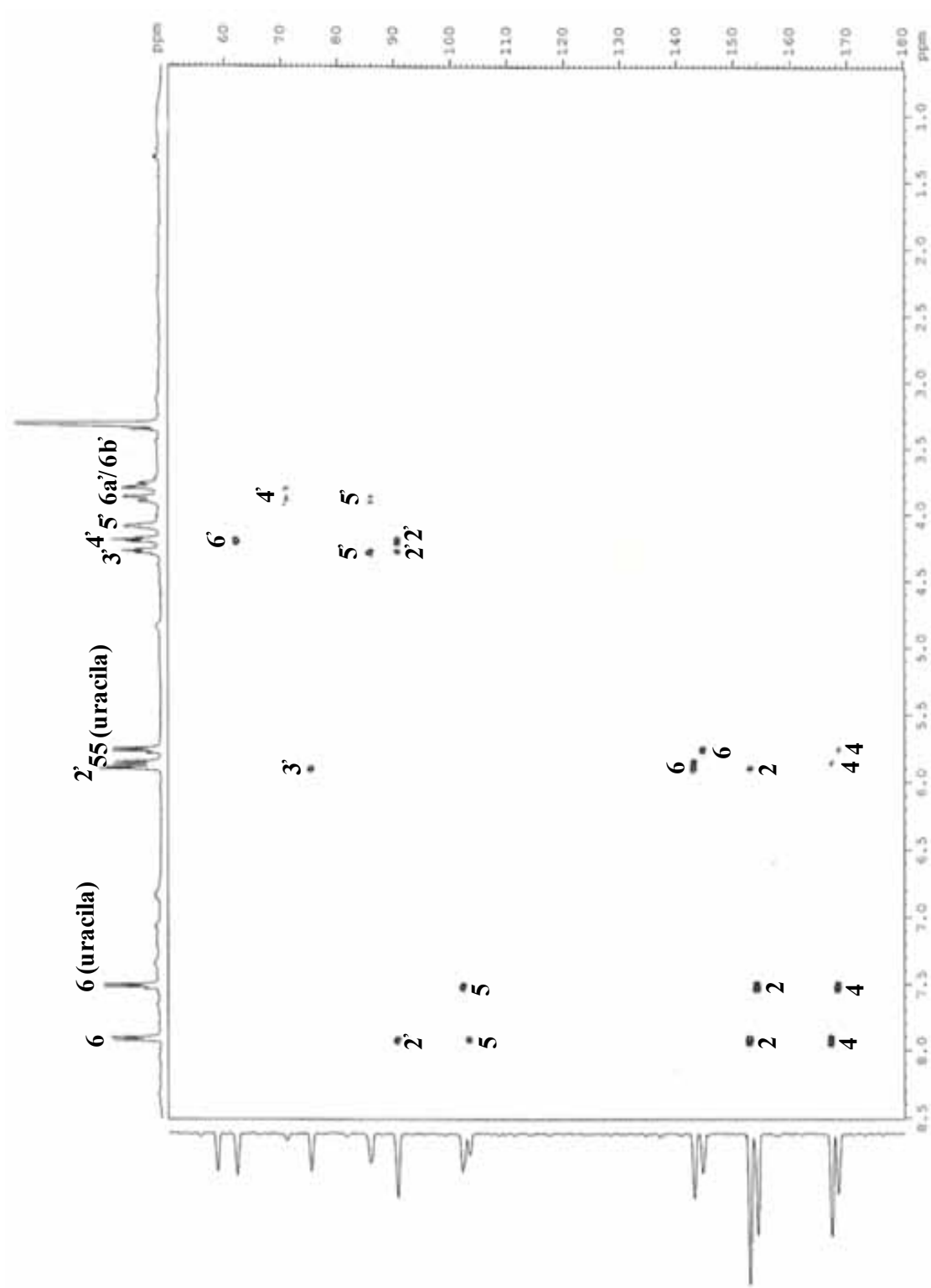


FIGURA 2.32: Mapa de contorno g-HMBC de **05** e **06** (MeOD, 400 MHz)

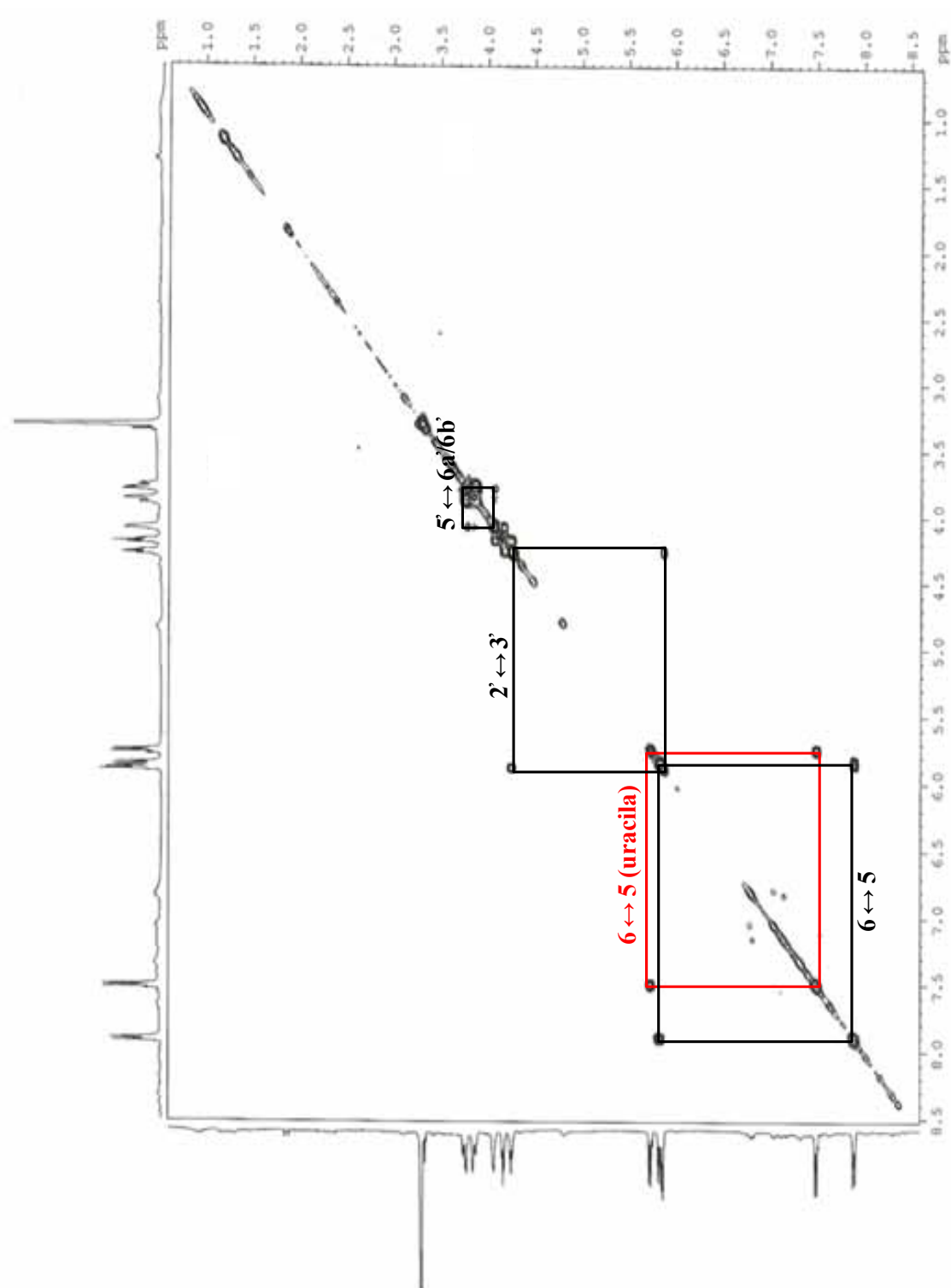
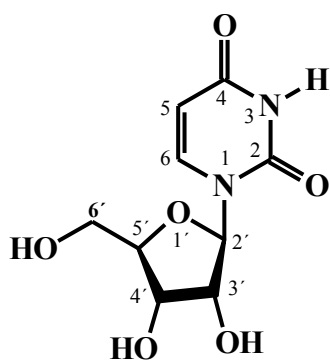


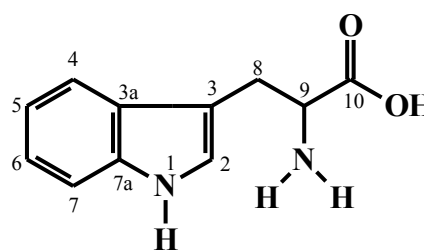
FIGURA 2.33: Espectro de g-COSY de **05** e **06** (MeOD, 400 MHz)

1.4.2.4 Uridina e Triptofano – substâncias 05 e 07

As substâncias **05** e **07** foram isoladas em mistura do extrato butanólico do meio líquido (35 dias). Suas estruturas foram identificadas através de experimentos de RMN de ^1H , HSQC, HMBC e comparações com dados da literatura (FERREIRA *et al.*, 2010; SAEIDNIA *et al.*, 2011; RAMESH & BROWN, 1996).



05



07

A identificação estrutural da substância **05** está relatada em **1.4.2.3 - Uridina e Uracila – substâncias 05 e 06** (p. 330).

No espectro de RMN de ^1H da mistura (FIGURAS 2.34 a 2.35, ps. 341 a 342) foi possível observar para a substância **07** na região dos aromáticos dois sinais de hidrogênios acoplado entre si em δ 7,72 (1H, *d*, $J= 8,0$ Hz) e δ 7,19 (1H, *t*, $J= 7,5$ Hz), os quais foram atribuídos aos hidrogênios do anel aromático H-4 e H-5, respectivamente; observou-se também um tripleto em δ 7,27 (1H, $J= 7,5$ Hz) e um dubleto em δ 7,52 (1H, $J= 7,5$ Hz), os quais foram atribuídos ao hidrogênios H-6 e H-7, respectivamente. Ainda foi possível observar o sinal de H-9 em δ 4,05 (1H, *dd*, $J= 6,5$ Hz e 5,3 Hz) e dois sinais em δ 3,48 (1H, *dd*, $J= 16,0$ Hz e 5,3 Hz) e δ 3,29 (1H, *dd*, $J= 16,0$ Hz e 6,5 Hz) referentes aos hidrogênios diastereotópicos H-8a e H-8b, respectivamente.

Pelos espectros de HSQC (FIGURA 2.36, p. 343) e HMBC (FIGURA 2.37, p. 344) foi possível atribuir todos os sinais de carbonos para a substância **07** (TABELA 2.14, p. 340).

Pelo espectro de HMBC para a substância **07**, foi possível observar as seguintes correlações: o sinal em δ 7,72 (H-4) com os sinais em δ 107,1 (C-3), δ 122,0 (C-6), δ 126,5 (C-3a) e δ 136,4 (C-7a); o sinal em δ 7,52 (H-7) com os sinais em δ 119,6 (C-5) e δ 126,5 (C-3a); o sinal de H-2 em δ 7,30 com os sinais em δ 107,1 (C-3), δ 126,5 (C-3a), δ 136,4 (C-7a) e δ 26,4 (C-8); o sinal de H-6 em δ 7,27 com os sinais em δ 118,6 (C-4) e δ 136,4 (C-7a); o sinal de H-5 em δ 7,19 com os sinais em δ 112,1 (C-7) e δ 126,5 (C-3a); o sinal de H-4 em δ 4,05 com os sinais em δ 26,4 (C-8), δ 107,1 (C-3) e δ 174,5 (C-10) e os sinais dos hidrogênios diastereotópicos (H-8a e H-8b) em δ 3,48 e δ 3,29, respectivamente, com os sinais em δ 54,6 (C-9), δ 107,1 (C-3), δ 126,5 (C-3a) e δ 174,5 (C-10).

Desta forma, pela análise dos experimentos de RMN e comparação com os dados da literatura, foi possível identificar as estruturas das substâncias **05** e **07** como sendo a da uridina e o do triptofano, respectivamente.

É importante ressaltar que o triptofano é um aminoácido de considerável importância, utilizado na síntese de proteínas e no crescimento celular e existindo apenas em bactérias, fungos e plantas. Este fato o torna de especial interesse no desenvolvimento de herbicidas e antibióticos (CARMINATTI *et al.*, 2006). A bactéria *Chromobacterium violaceum*, encontrada em amostras de solo e água de regiões tropicais e subtropicais em diversos continentes, é responsável pela produção de uma diversidade de metabólitos secundários com potencial biotecnológico, dentre os quais pode-se citar a violaceína, um pigmento formado de três subunidades estruturais, sendo 5-hidroxiindol, 2-oxoindol e 2-pirrolindona, cuja síntese pela bactéria requer oxigênio molecular e condensação de duas moléculas de triptofano. Esta molécula tem despertado interesse devido às atividades antibacteriana, antitumoral e antiparasitária (PITLOVANCIV *et al.*, 2006).

Portanto, tais fatos evidenciam a importância da produção do aminoácido triptofano pelos micro-organismos.

TABELA 2.14: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **07** e comparação com dados da literatura

H/C	Substância 07 (500/125 MHz, D ₂ O)		SAEIDNIA <i>et al.</i> , 2011 (500/125 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)		RAMESH & BROWN, 1996 (600 MHz, D ₂ O)
	δ (ppm), <i>J</i> (Hz)	δ^* (ppm)	δ (ppm), <i>J</i> (Hz)	δ (ppm)	δ (ppm)
1-NH	-	-	10,80	-	10,20
2	7,30 (1H, <i>s</i>)	125,2	7,19 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =1,5)	124,3	7,33
3	-	107,1	-	108,6	-
3a	-	126,5	-	127,1	-
4	7,72(1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,0)	118,6	7,57(1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,0)	118,3	7,73
5	7,19 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 7,5)	119,6	6,98 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 7,0)	118,4	7,21
6	7,27 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 7,5)	122,0	7,06 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 7,0)	121,0	7,29
7	7,52 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 7,5)	112,1	7,33(1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,5)	111,3	7,55
7a	-	136,4	-	136,3	-
8a	3,48(1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =16,0; 5,3)	26,4	3,10 (1H, <i>sl</i>)	26,8	**
8b	3,29 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =16,0; 6,5)		2,94(1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 1,5)		**
9	4,05 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 6,5; 5,3)	54,6	3,50 (1H, <i>m</i>)	54,0	**
10	-	174,5	-	170,3	-

* Valores obtidos com base na projeção de ^{13}C dos espectros de HSQC e HMBC

**Valores não fornecidos no artigo.

Nos espectros seguintes, as atribuições em vermelho referem-se à uridina (**05**) e as atribuições em preto referem-se ao triptofano (**07**).

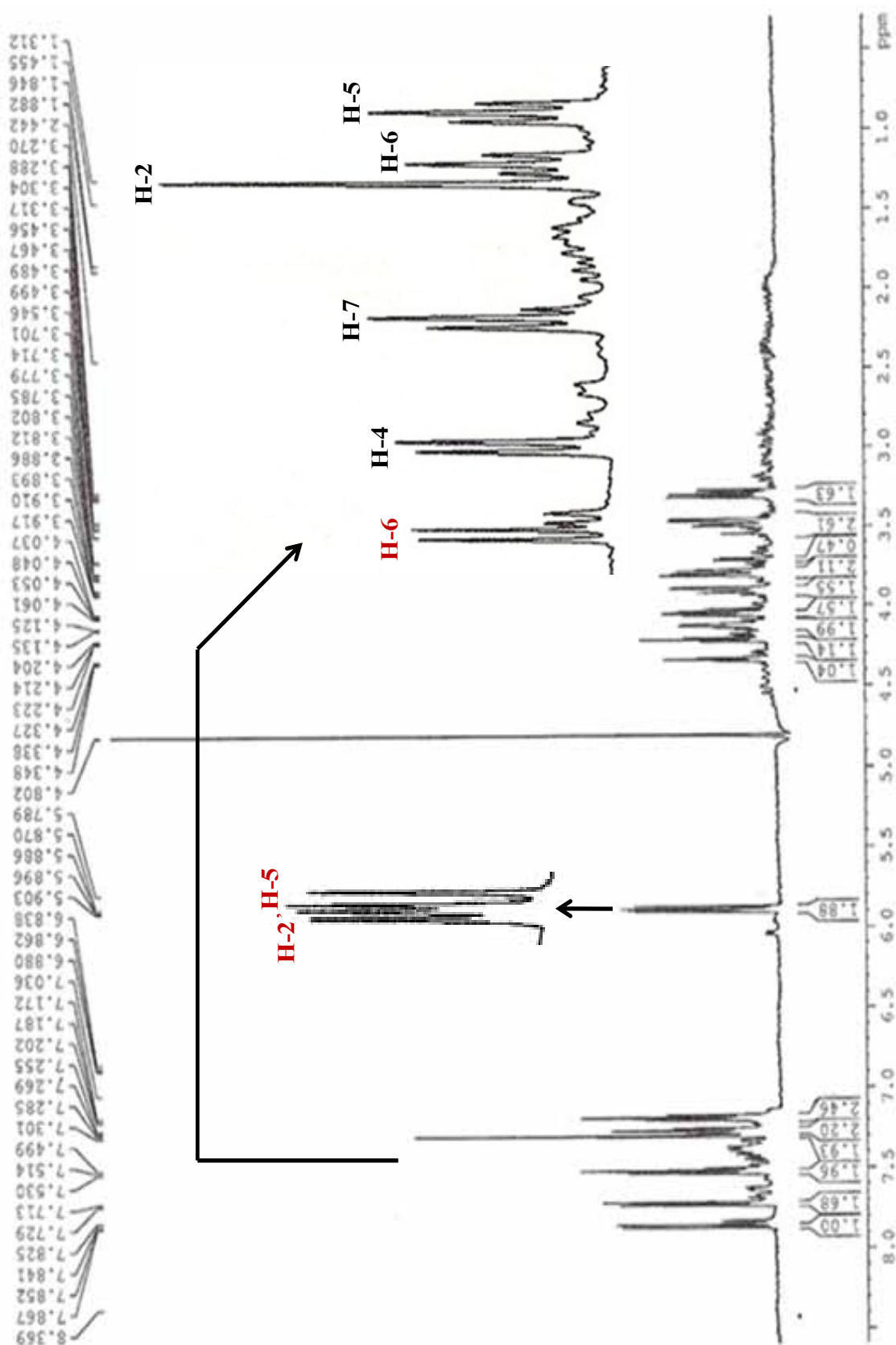


FIGURA 2.34: Espectro de RMN de ^1H de **05** e **07** (D_2O , 500 MHz)

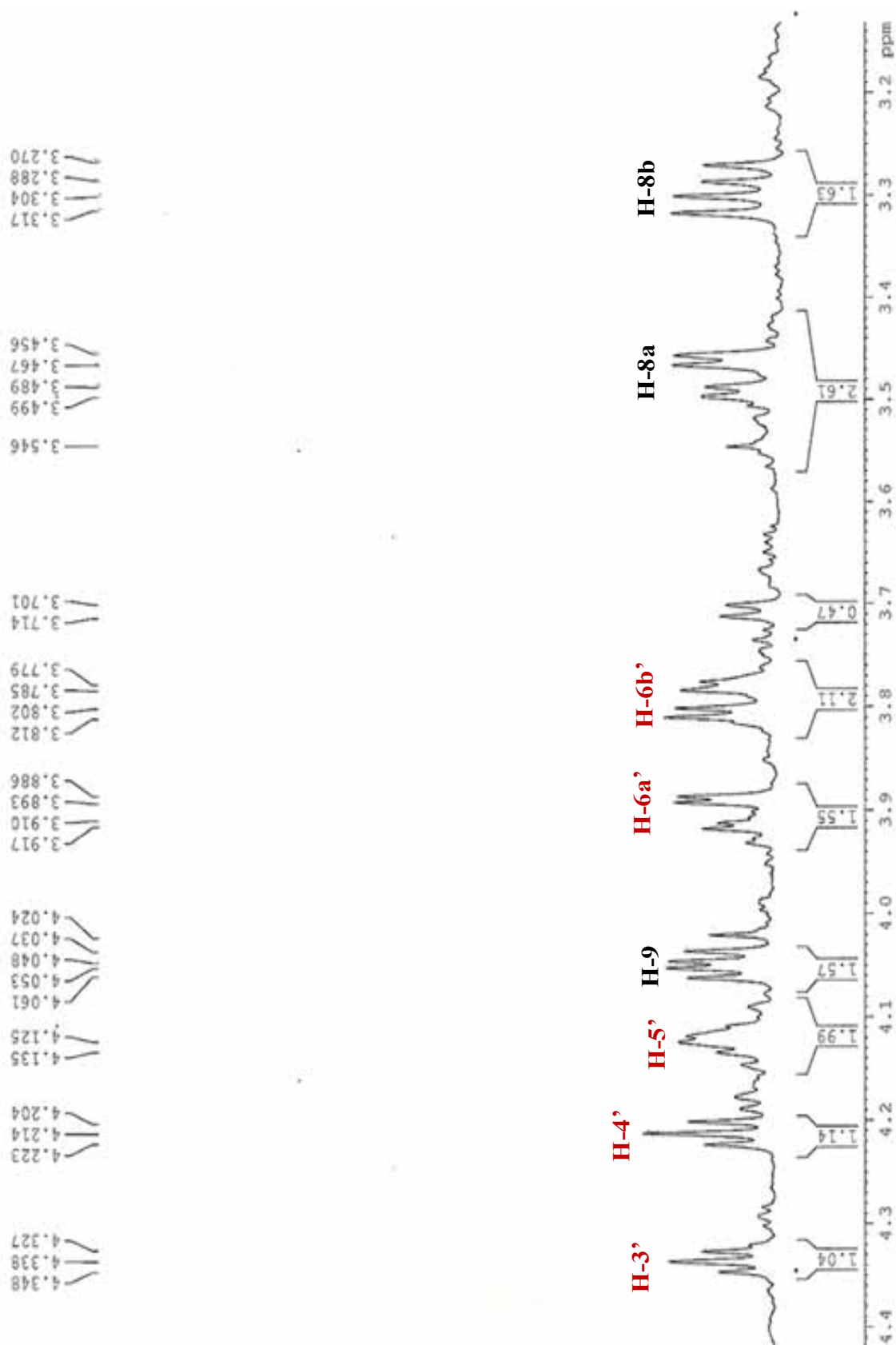


FIGURA 2.35: Ampliação do espectro de RMN de ^1H de **05** e **07**
(D_2O , 500 MHz)

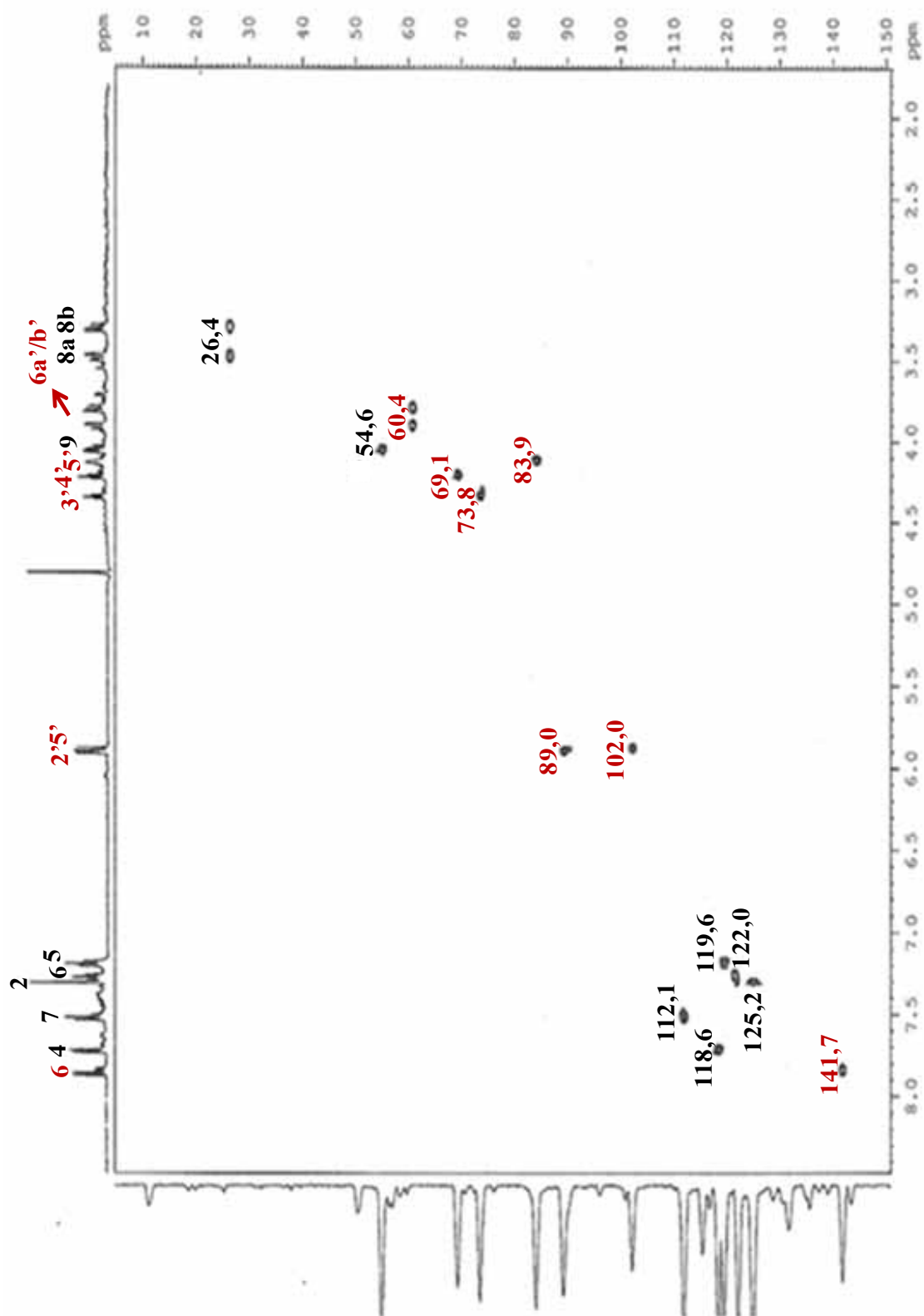


FIGURA 2.36: Mapa de contorno de g-HSQC de **05** e **07** (D₂O, 500 MHz)

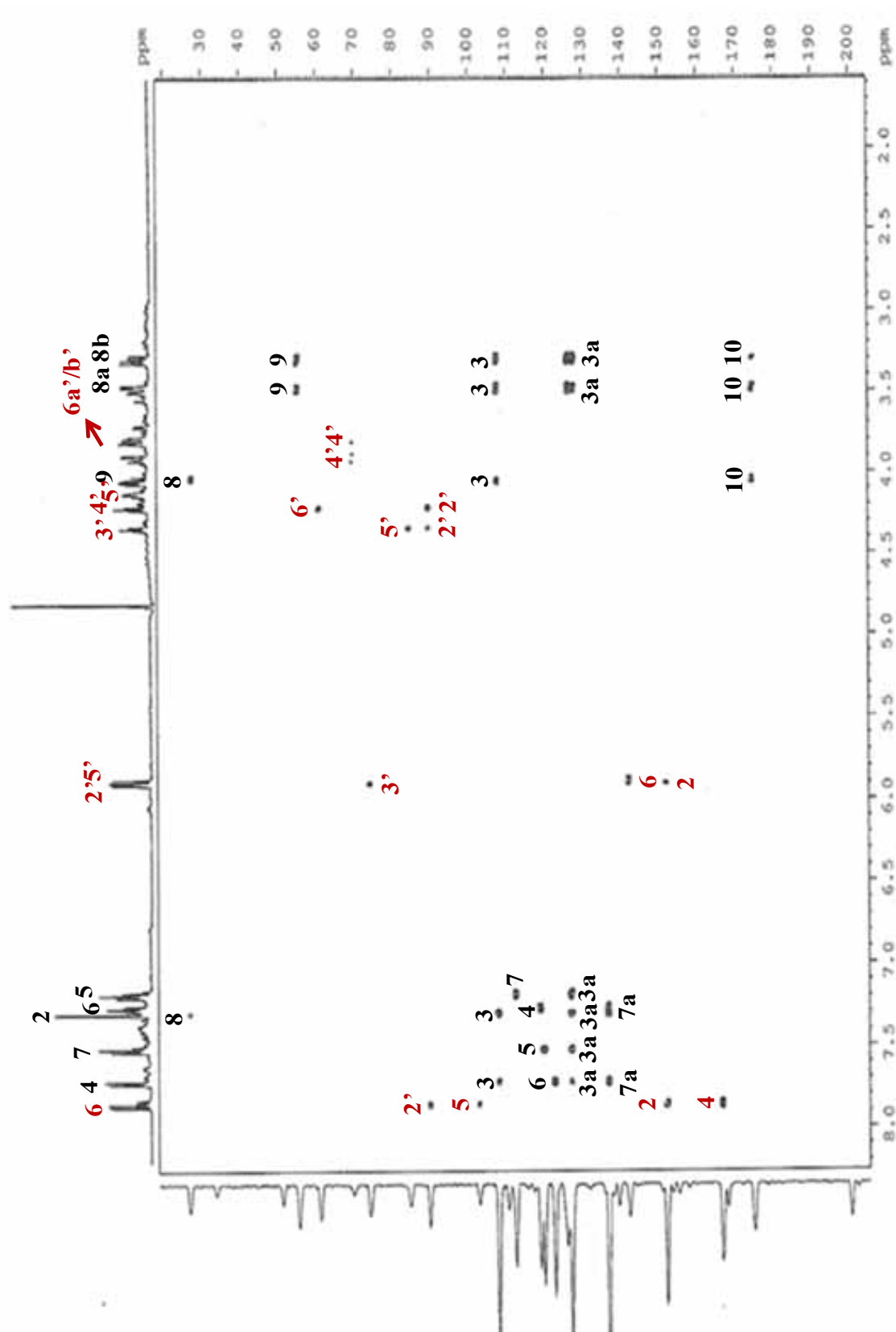
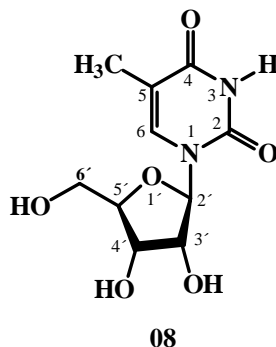


FIGURA 2.37: Mapa de contorno g-HMBC de **05** e **07** (D_2O , 500 MHz)

1.4.2.5 5-Metil-uridina– substância 08

A substância **08** foi isolada do extrato butanólico do meio líquido (35 dias) e teve sua estrutura identificada através de experimentos de RMN de ^1H , ^{13}C , EM e comparação com dados da literatura (STYOWATI *et al.*, 2008).



A principal diferença no espectro de RMN de ^1H (FIGURA 2.38, p. 347) de **08** em relação ao espectro de **05** foi a presença de um sinal em δ 1,89 integrando para três hidrogênios e relativo a uma metila. Ainda foi possível observar um singlete em δ 7,68 (1H) referente ao H-6, um dubleto em δ 5,91 (1H, $J = 6,3$ Hz) referente ao H-2', dois tripletos em δ 4,34 (1H, $J = 5,1$ Hz) e δ 4,23 (1H, $J = 5,3$ Hz) os quais foram atribuídos ao H-3' e H-4', respectivamente, um duplo duplo dubleto em δ 4,11 (1H, $J = 4,0$ Hz, 3,0 Hz e 2,9 Hz) referente ao H-5' e dois duplos dubletos em δ 3,91 (1H, $J = 12,8$ Hz e 2,9 Hz) e δ 3,81 (1H, $J = 12,8$ Hz e 3,0 Hz), os quais foram atribuídos ao hidrogênios diastereotópicos H-6'a e H-6'b, respectivamente.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (FIGURA 2.39, p. 348) e comparação com dados da literatura permitiu atribuir todos os sinais de carbonos de **08**.

O espectro de massas obtido por *eletrospray* no modo positivo confirmou a proposta estrutural, pois foi observado um íon pseudo-molecular em m/z 259 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) (FIGURA 2.40, p. 349). Todos estes dados estão coerentes com a massa e fórmula molecular ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_6$) para **08**. Algumas

propostas de fragmentações para a estrutura **08** são apresentadas no ESQUEMA 2.3 (p. 349).

TABELA 2.15: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **08** e comparação com dados da literatura

H/C	Substância 08 400 MHz, D ₂ O 100 MHz, MeOD		STYOWATI <i>et al.</i> , 2008 (500/100 MHz, MeOD)	
	δ (ppm), <i>J</i> (Hz)	δ (ppm)	δ (ppm), <i>J</i> (Hz)	δ (ppm)
2	-	152,8	-	152,5
4	-	167,2	-	166,5
5	-	111,9	-	111,6
5-Me	1,89 (3H, <i>s</i>)	13,4	1,80 (3H, <i>s</i>)	12,5
6	7,68 (1H, <i>s</i>)	138,5	7,80 (1H, <i>s</i>)	138,3
2'	5,91 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6,3)	89,6	5,86 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6,4)	88,9
3'	4,34 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 5,1)	75,0	4,36 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 4,9)	73,7
4'	4,23 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 5,3)	70,7	4,23 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 5,2)	72,3
5'	4,11 (1H, <i>ddd</i> , <i>J</i> = 4,0; 3,0; 2,9)	85,6	4,14 (1H, <i>m</i>)	86,3
6'a	3,91 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 12,8; 2,9)	61,9	3,92 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 12,1; 3,2)	62,9
6'b	3,81 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =12,8; 3,0)		3,81 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 12,1; 3,0)	

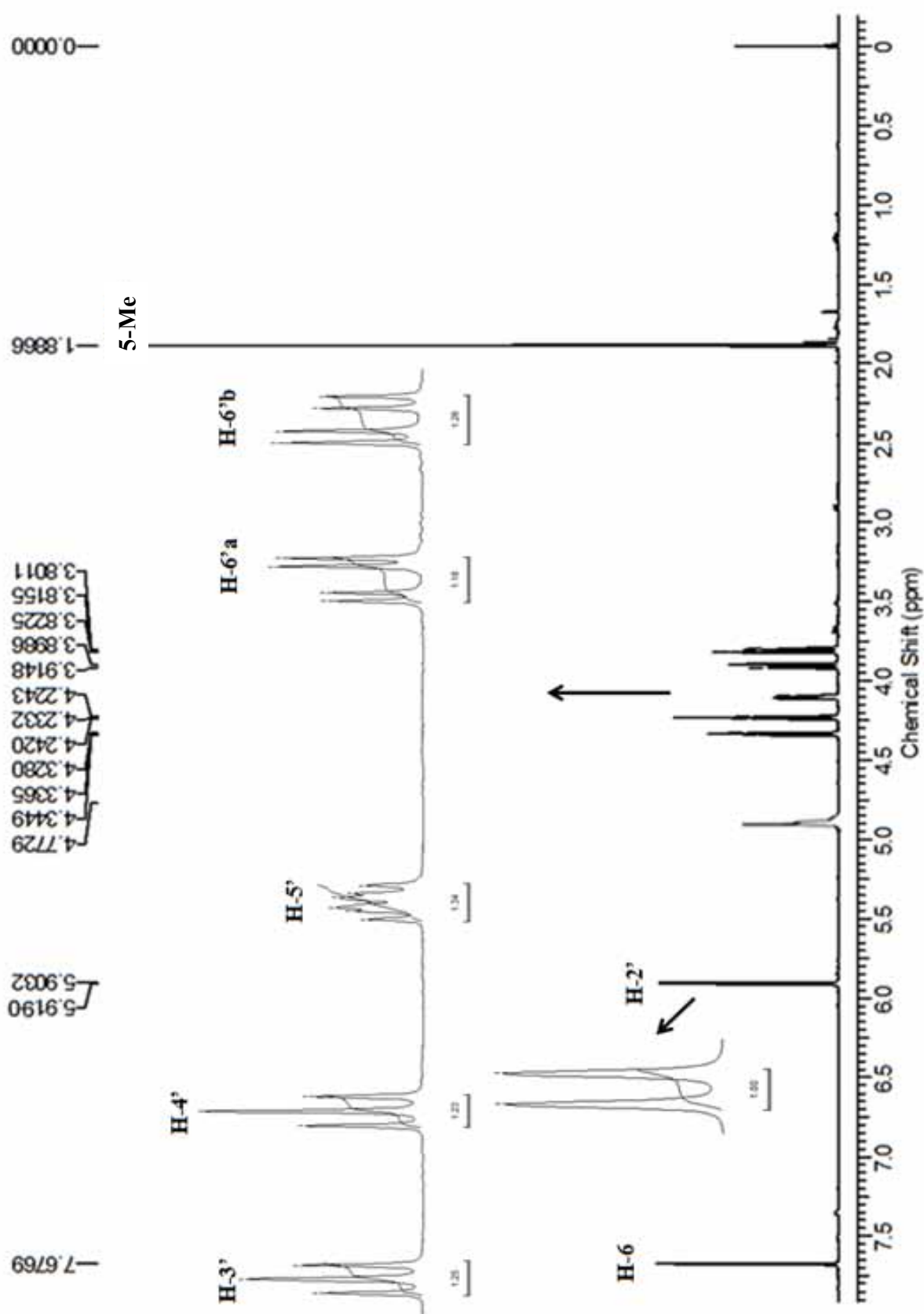


FIGURA 2.38: Espectro de RMN de ^1H de **08** (D_2O , 400 MHz)

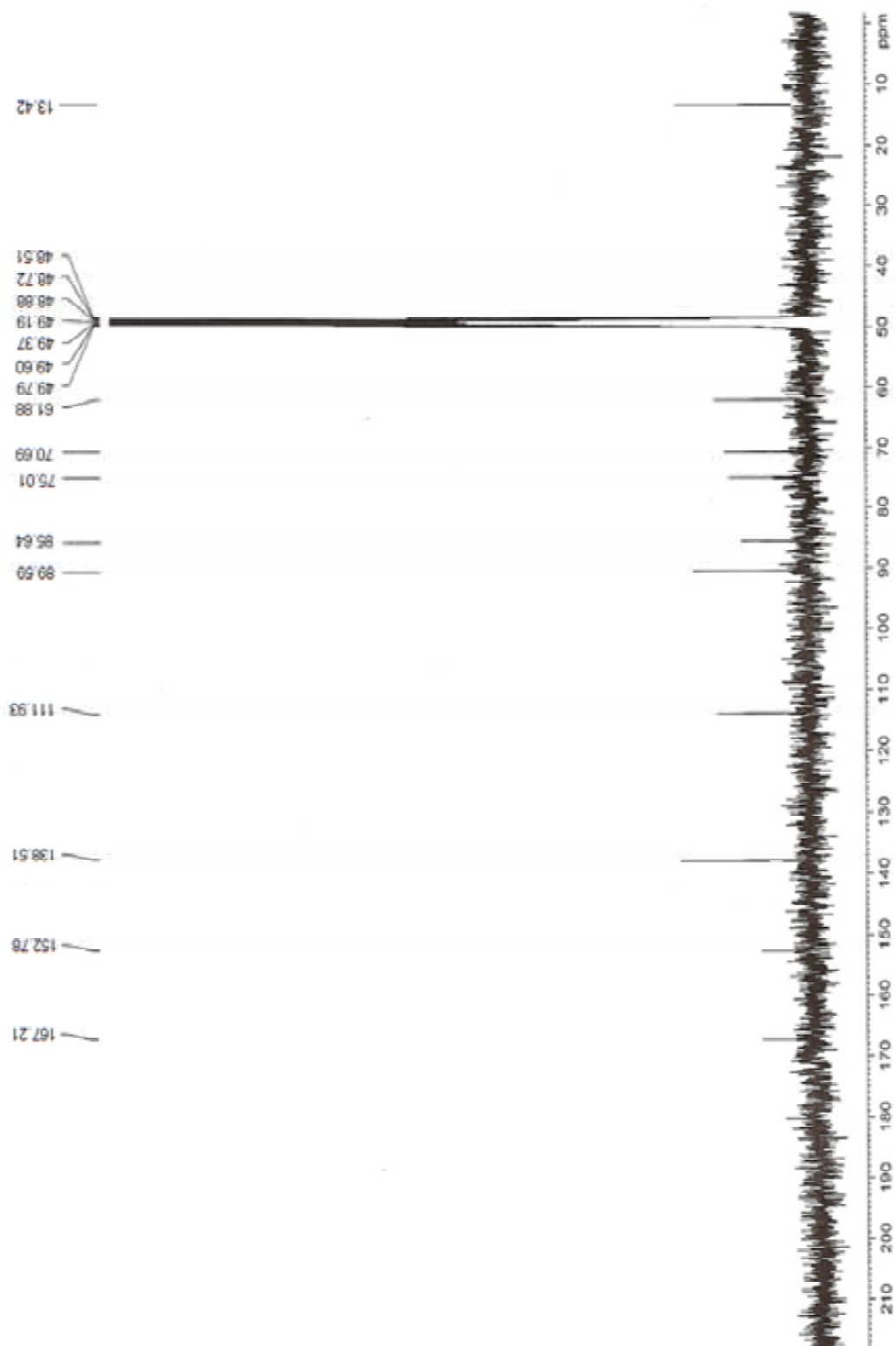


FIGURA 2.39: Espectro de RMN de ^{13}C de **08** (MeOD, 100 MHz)

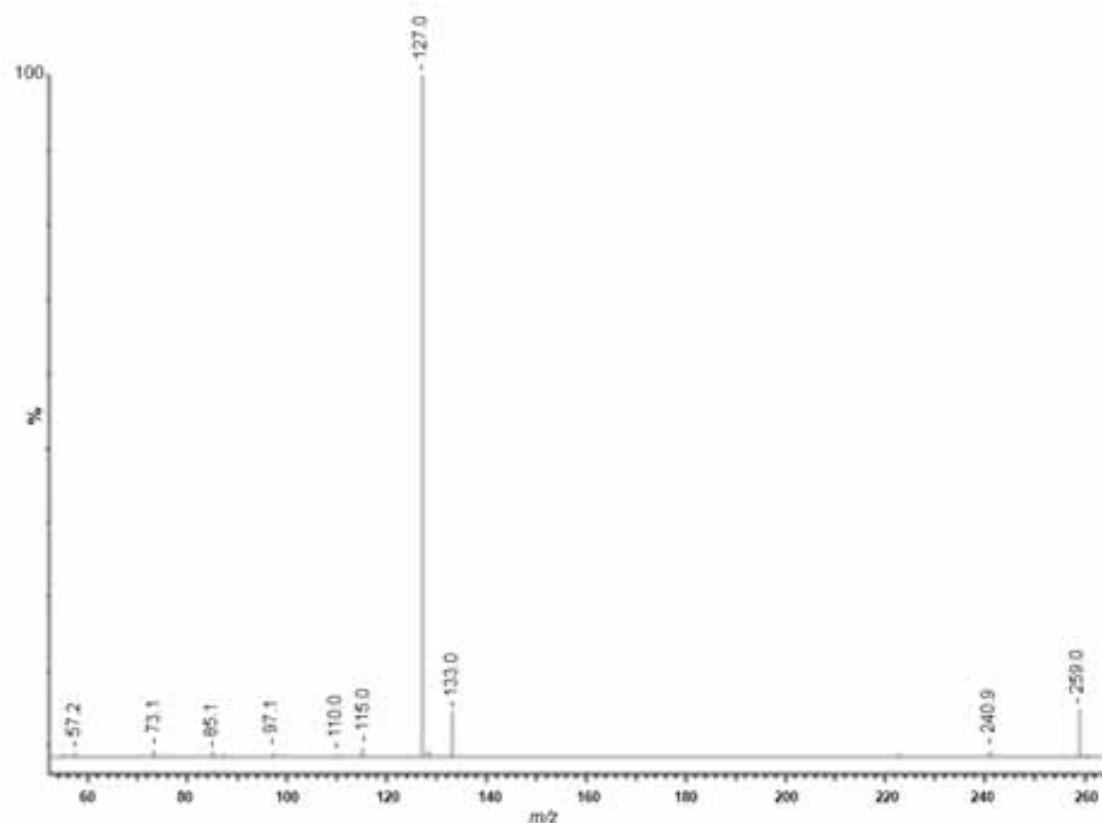
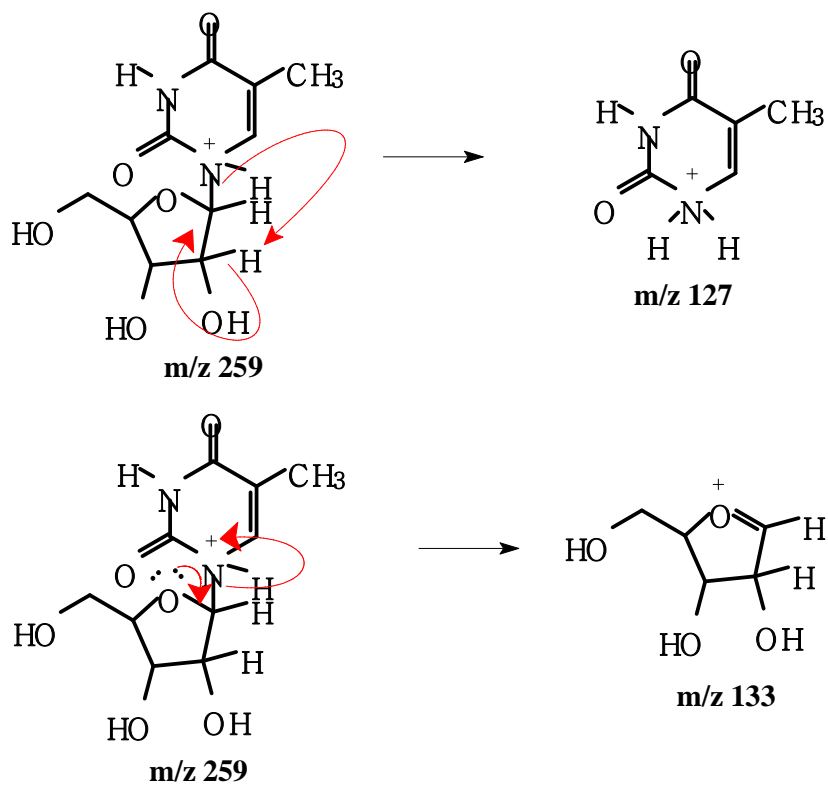


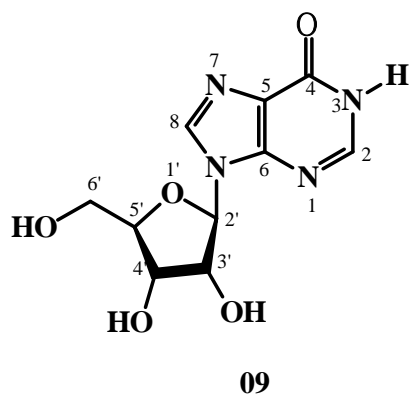
FIGURA 2.40: Espectro de massas de **08**



ESQUEMA 2.3: Propostas de fragmentações para a substância **08**

1.4.2.6 Inosina – substância 09

A substância **09** foi isolada dos extratos AcOEt e butanólico do meio líquido (25 dias). Sua estrutura foi identificada através de experimento de RMN de ^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC, COSY e comparação com dados da literatura (SILVA, 2007).

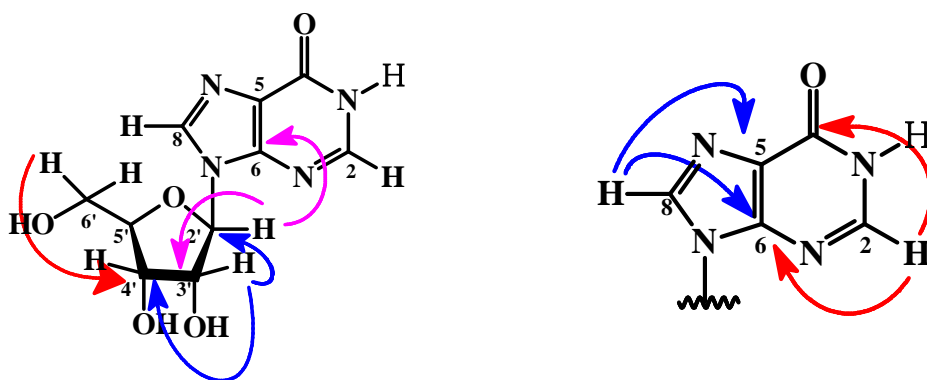


Pela análise do espectro de RMN de ^1H (FIGURAS 2.41 a 2.42, p. 353 a 354) da substância **09** observou-se dois singletos integrando para um hidrogênio cada em δ 8,31 e δ 8,18, os quais foram atribuídos aos hidrogênios olefínicos H-8 e H-2, respectivamente; um dubleto em δ 5,97 ($J = 6,4$ Hz) referente ao hidrogênio H-2', um duplo dubleto em δ 4,74 ($J = 6,4$ Hz e 5,2 Hz), o qual pôde ser atribuído ao hidrogênio H-3', um duplo dubleto em δ 4,32 ($J = 5,2$ Hz e 2,6 Hz) atribuído ao H-4'. Ainda pela análise do espectro de RMN de ^1H observou-se três duplos dubletos em δ 4,17 (4,0 Hz e 2,6 Hz), δ 3,89 ($J = 12,8$ Hz e 4,0 Hz) e δ 3,75 ($J = 12,8$ Hz e 4,0 Hz), os quais foram atribuídos aos hidrogênios H-5', H-6'a e H-6'b, respectivamente.

Pelo experimento de HSQC (FIGURA 2.44, p. 356) observou-se as seguintes correlações a J^1 de hidrogênios com carbonos olefínicos: H-8 em δ 8,31 com o C-8 em δ 140,0 e H-2 em δ 8,18 com C-2 em δ 149,1. Também foi possível observar correlação de hidrogênios com carbonos carbinólicos, sendo quatro metínicos (H-2'em δ 5,97 com C-2' em δ 87,9; H-3'em δ 4,74 com C-3'em δ 73,5; H-4'em δ 4,32 com C-4'em δ 70,7 e H-5'em δ 4,17 com C-5'em δ

86,0) e dois metilênicos (H-6'a em δ 3,89 e H-6'b em δ 3,75 com C-6' em δ 61,7) indicando uma unidade de ribose ligada à estrutura.

Pelo experimento de HMBC (FIGURA 2.45, p. 357) o hidrogênio H-8 (δ 8,31) mostrou correlação com os carbonos olefínicos C-5 (δ 119,4) e C-6 (δ 152,4); o hidrogênio H-2 (δ 8,18) mostrou correlação com C-6 (δ 152,4) e com um sinal em δ 156,2 o qual foi atribuído ao C-4; o hidrogênio H-2' (δ 5,97) mostrou correlação com um sinal em δ 73,5 o qual foi atribuído ao C-3' e com C-6 (δ 152,4); o sinal referente ao H-3' (δ 4,74) mostrou correlação com C-2' (δ 87,9) e com o sinal em δ 70,7 referente ao C-4'. Ainda foi possível observar a correlação de H-6'a (δ 3,89) com C-4' (δ 70,7). As principais correlações são apresentadas a seguir:



No espectro de COSY (FIGURA 2.46, p. 358), pôde-se observar o acoplamento entre H-2' (δ 5,97) e um sinal em δ 4,74 atribuído ao H-3'. Outras duas correlações observadas ainda foram de H-3' em δ 4,74 com um sinal em δ 4,32 atribuído ao H-4' e H-5' em δ 4,17 com os sinais de hidrogênios diasterotópicos (δ 3,89 e δ 3,75) referentes à H-6'a e H-6'b, respectivamente.

Portanto, pela análise de todos os experimentos de RMN foi possível identificar a estrutura da substância **09** como sendo o do nucleosídeo inosina.

TABELA 2.16: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **09** e comparação com dados da literatura

H/C	Substância 09 (400/100 MHz, MeOD)		SILVA, 2007 (400 MHz / DMSO-d ₆) (100 MHz / MeOD)	
	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm)	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm)
2	8,18 (1H, s)	149,1	8,34 (1H, s)	149,1
4	-	156,2	-	156,2
5	-	119,4	-	119,4
6	-	152,4	-	152,4
8	8,31 (1H, s)	140,0	8,13 (1H, s)	140,0
1'	-	-	-	-
2'	5,97 (1H, d, J= 6,4)	87,9	5,86 (1H, d, J= 6,4)	87,9
3'	4,74 (1H, dd, J= 6,4; 5,2)	73,5	4,59 (1H, t, J= 5,5)	73,5
4'	4,32 (1H, dd, J= 5,2; 2,6)	70,7	4,12 (1H, t, J= 4,4)	70,7
5'	4,17 (1H, dd, J= 4,0; 2,6)	86,0	3,95 (1H, dd, J= 6,4; 3,2)	86,0
6'a	3,89 (1H, dd, J= 12,8; 4,0)	61,7	3,65 (1H, d, J= 12,1)	61,7
6'b	3,75 (1H, dd, J= 12,8; 4,0)		3,53 (1H, dd, J= 12,1; 4,0)	

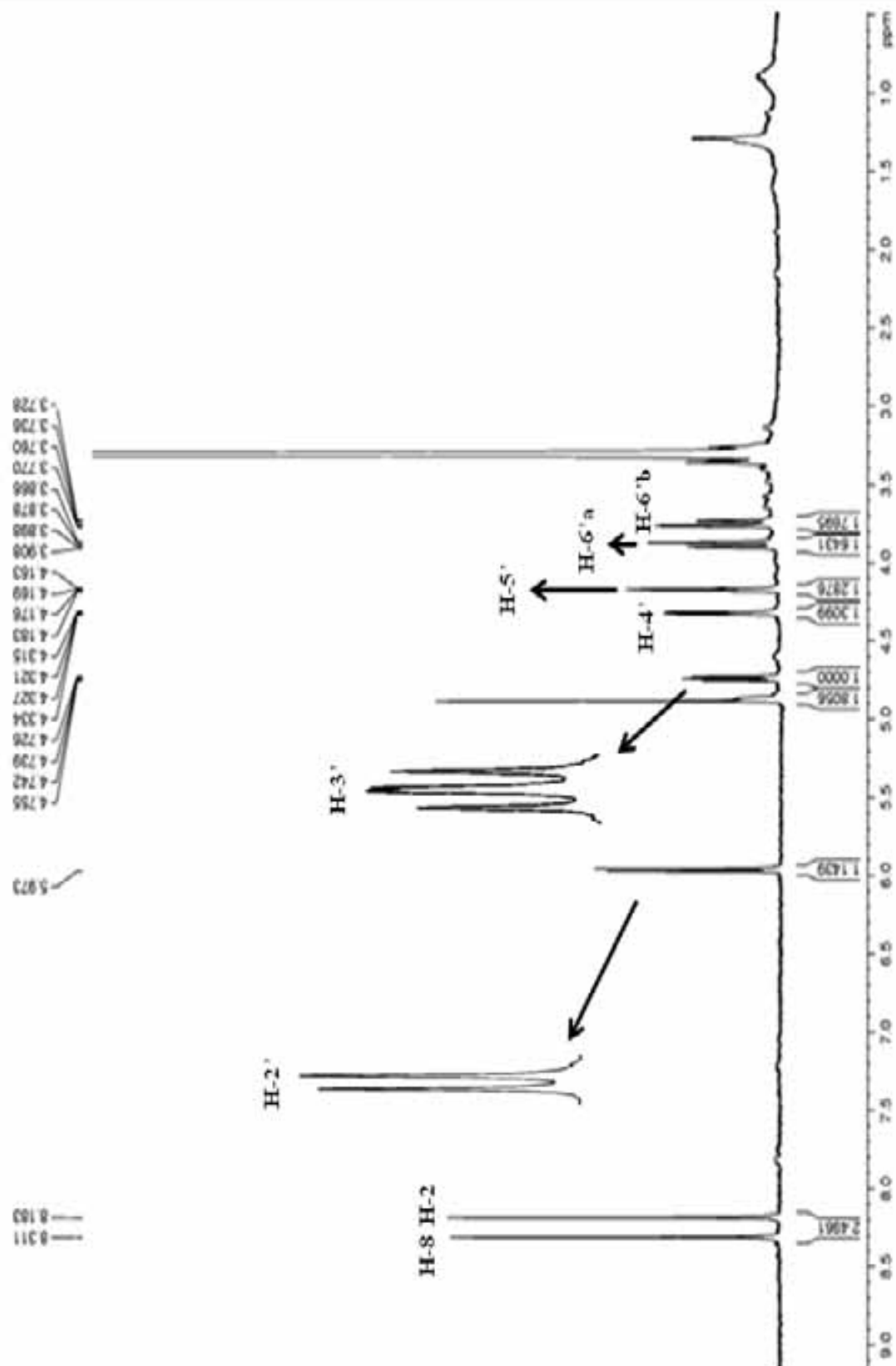


FIGURA 2.41: Espectro de RMN de ^1H de **09** (MeOD , 400 MHz)

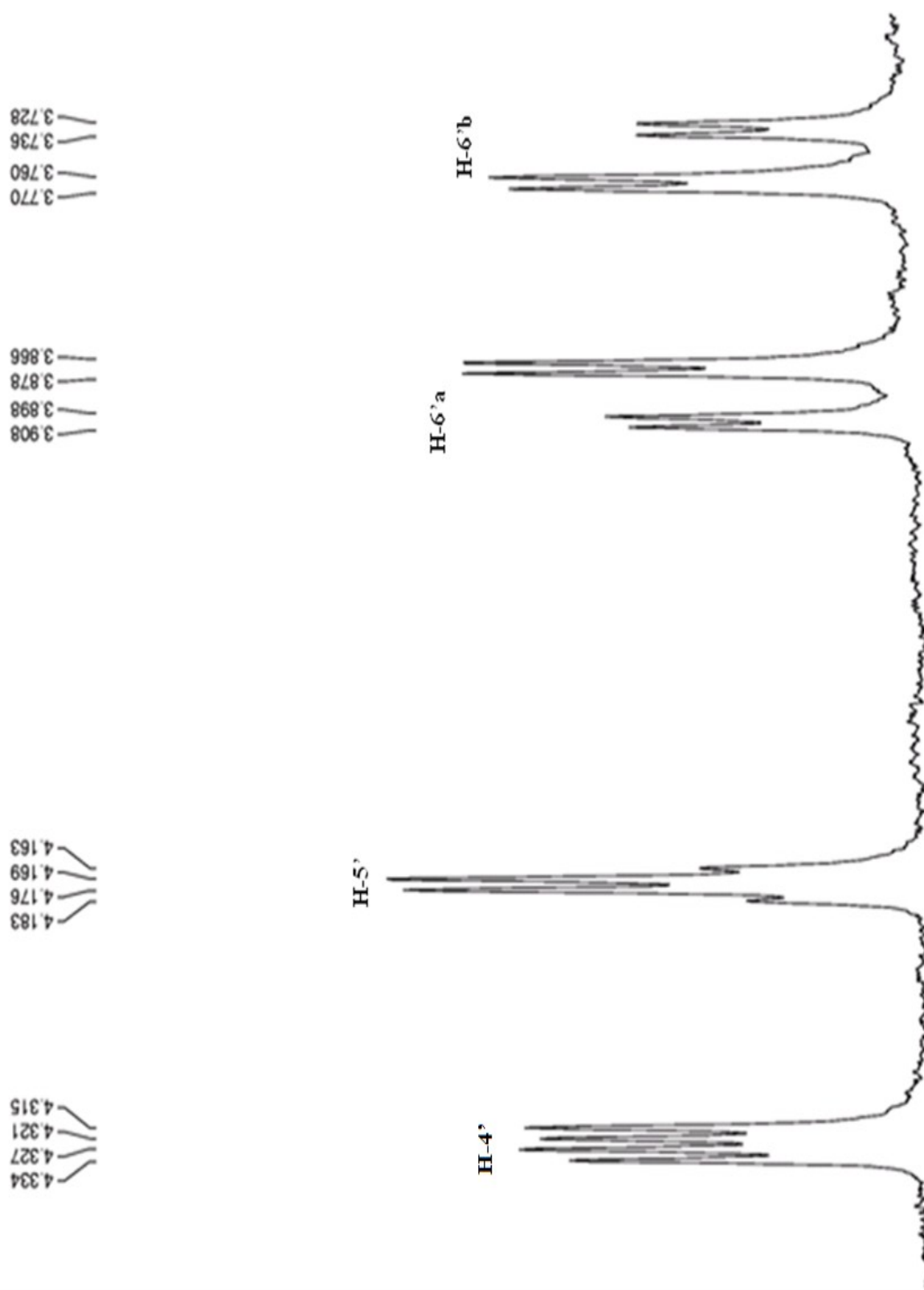


FIGURA 2.42: Ampliação do espectro de RMN de ^1H de **09** (MeOD, 400 MHz)

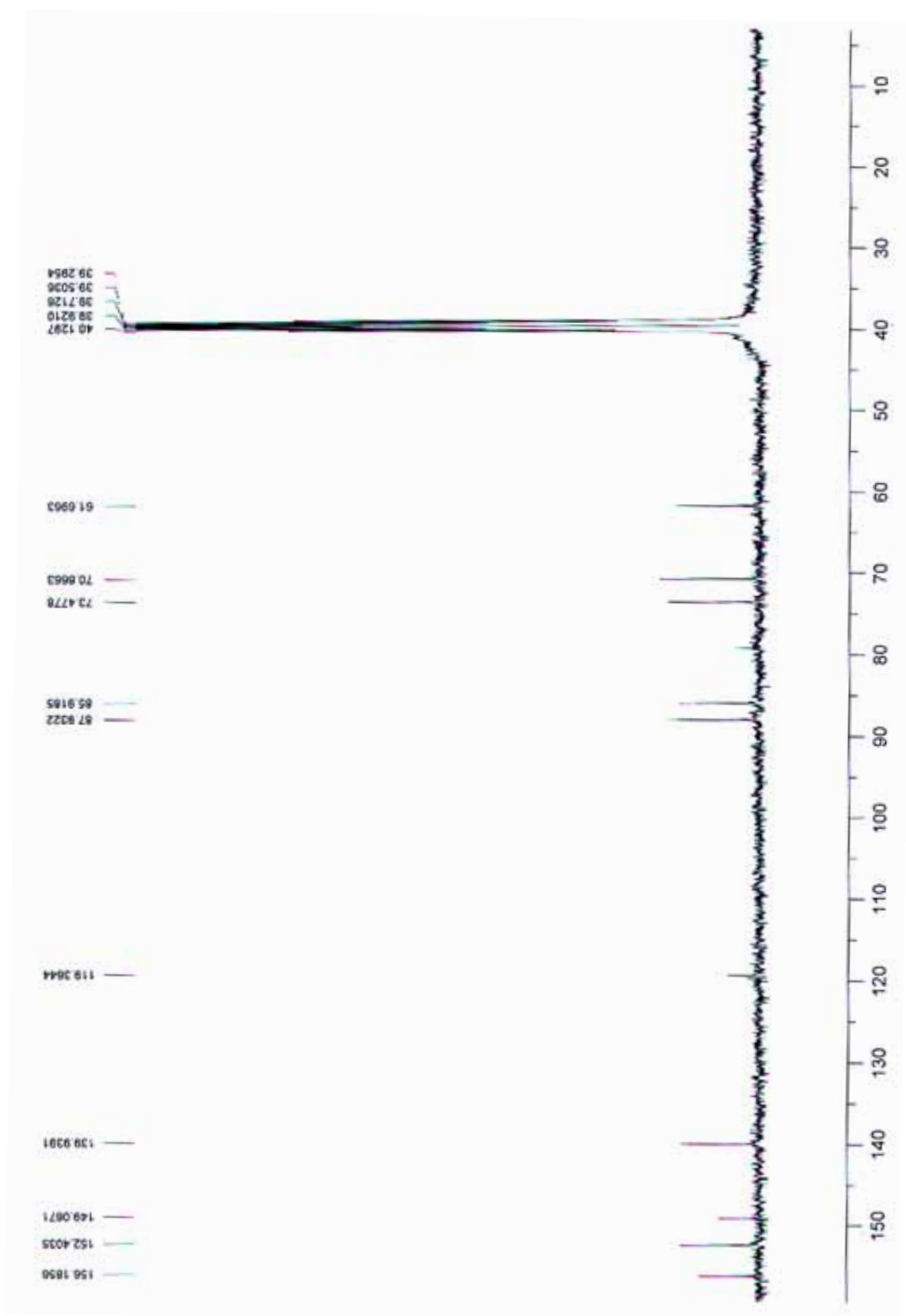


FIGURA 2.43: Espectro de RMN de ^{13}C de **09** (MeOD, 100 MHz)

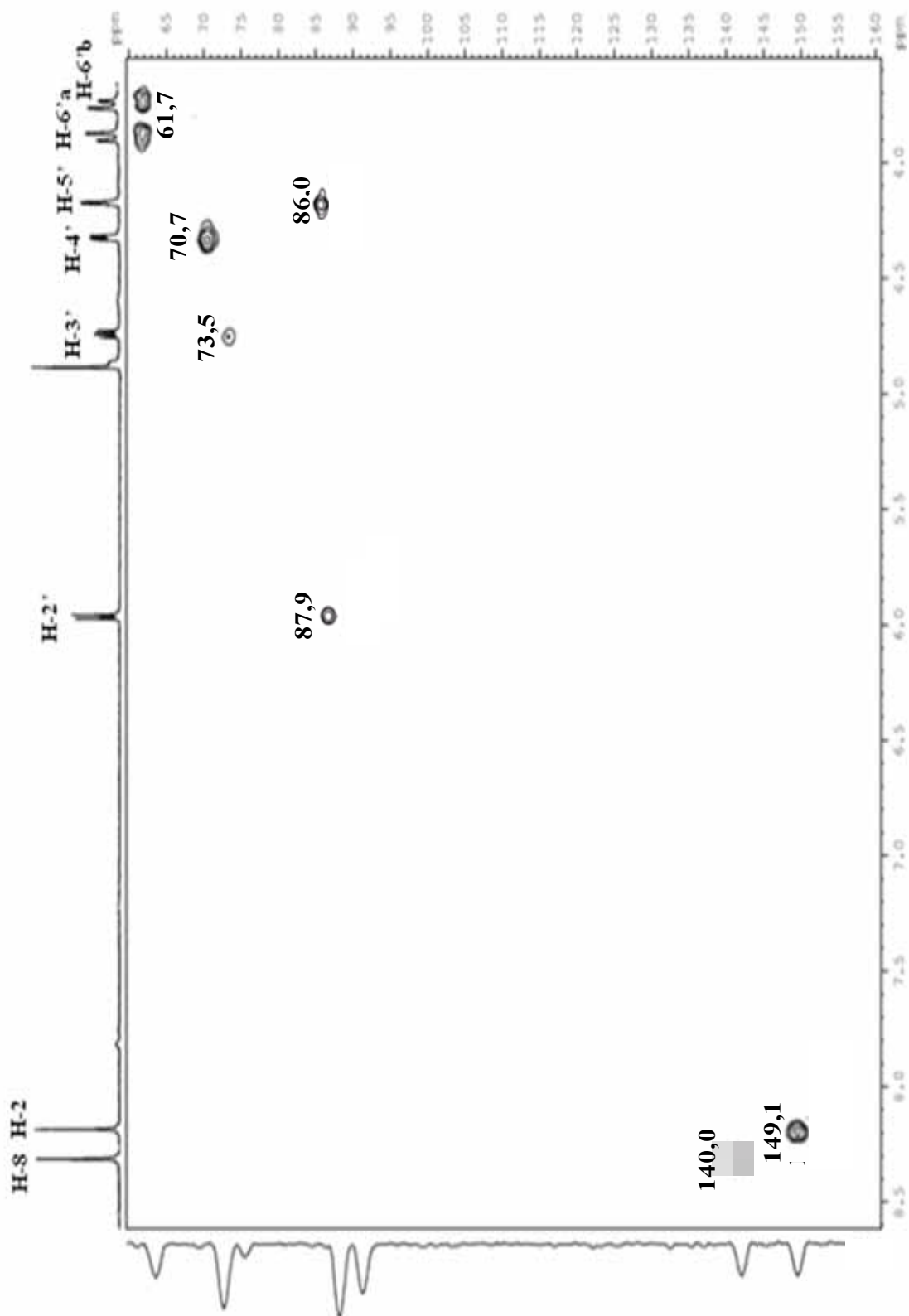


FIGURA 2.44: Mapa de contorno de g-HSQC de **09** (MeOD, 400 MHz)

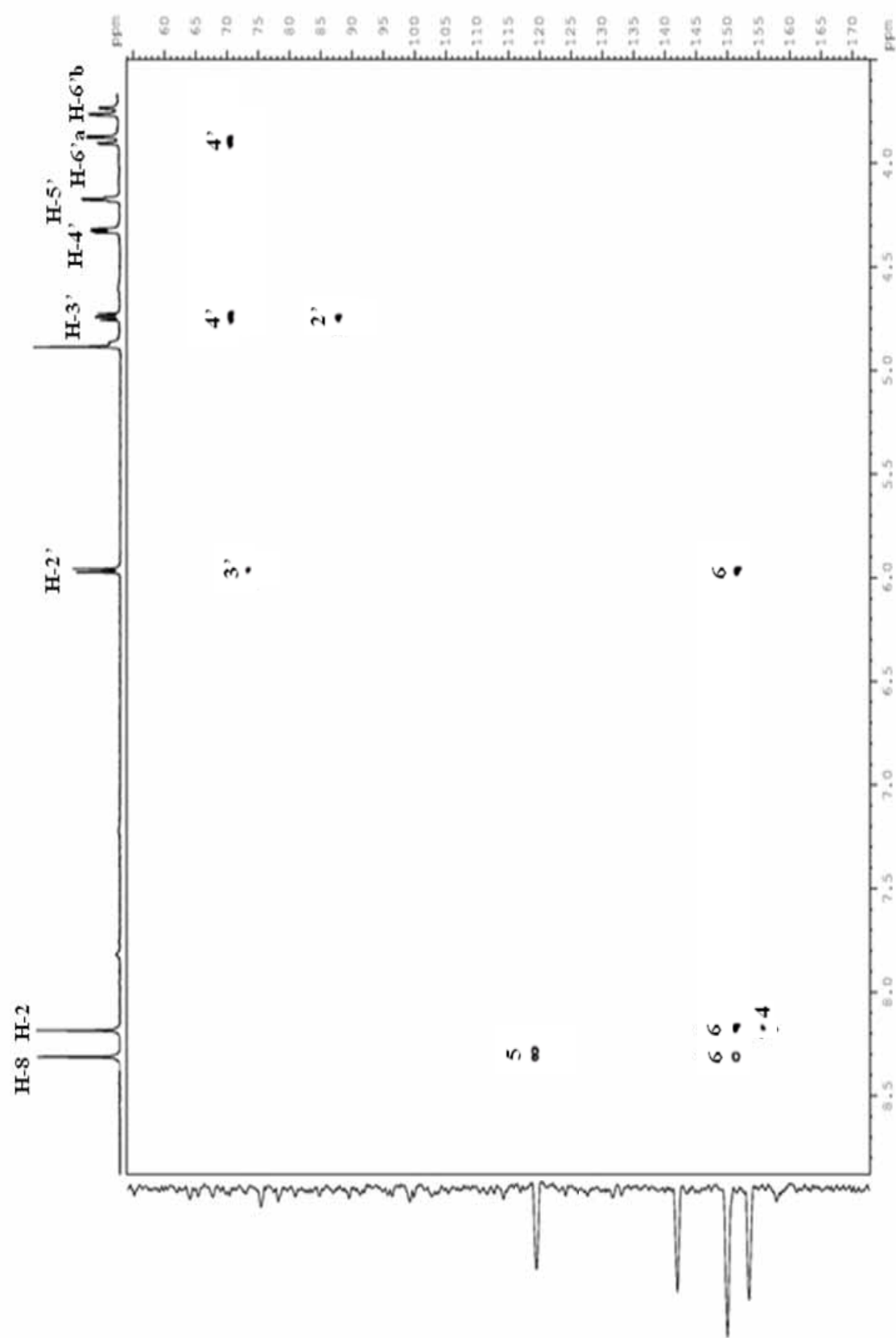


FIGURA 2.45: Mapa de contorno g-HMBC de **09** (MeOD, 400 MHz)

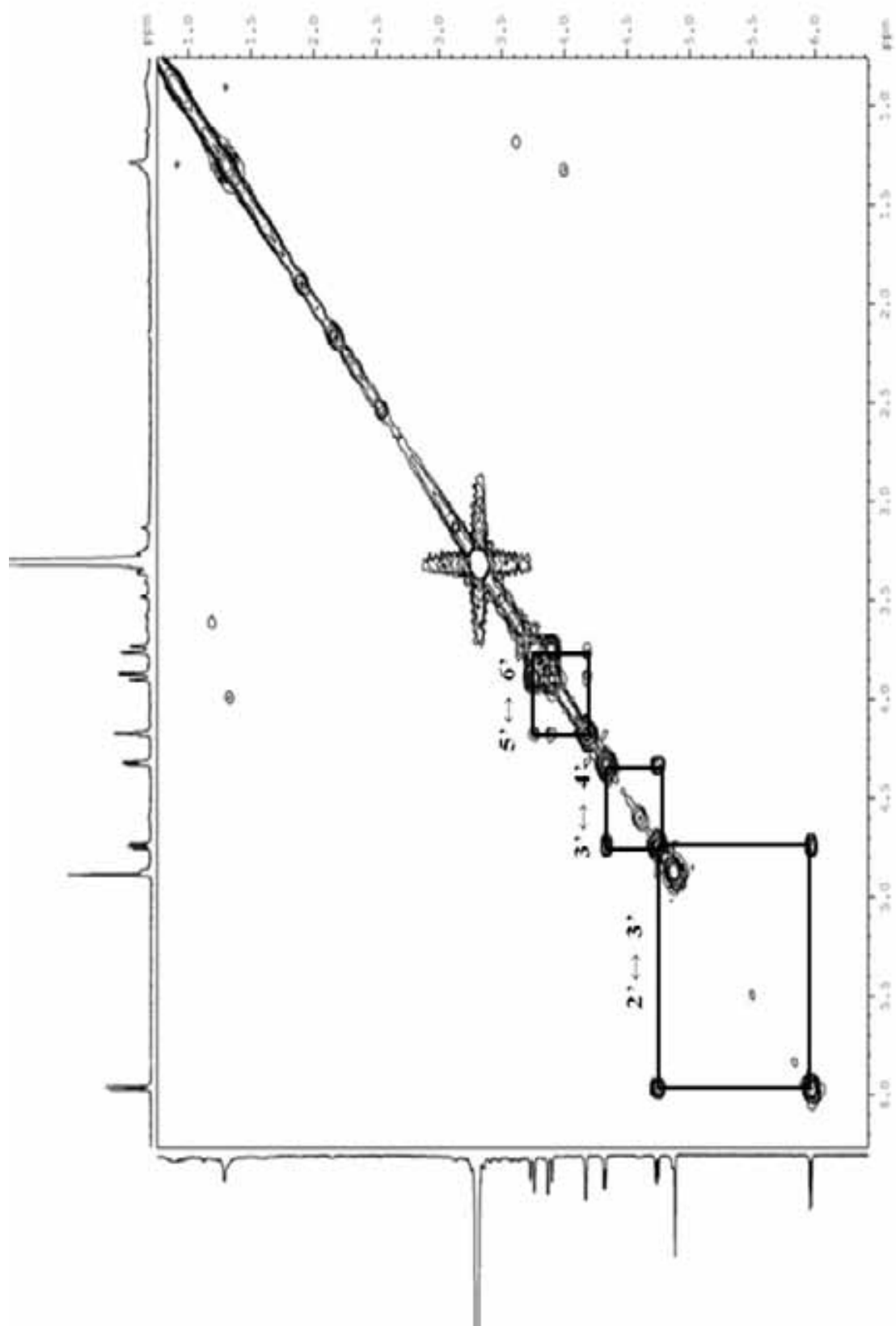
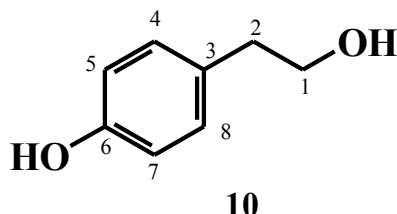


FIGURA 2.46: Espectro de g-COSY de **09** (MeOD, 400 MHz)

1.4.2.7 Tirosol – substância 10

A substância **10** foi isolada dos extratos etanólicos do micélio (25 e 35 dias) e teve sua estrutura identificada através de experimento de RMN de ^1H e ^{13}C e comparação com dados da literatura (CHEN *et al.*, 2004).



Pela análise do espectro de RMN de ^1H de **10** (FIGURA 2.47, p. 360) foi possível observar a presença de dois tripletos em δ 3,73 ($J= 6,6$ Hz) e δ 2,71 ($J= 6,6$ Hz), integrando para dois hidrogênios cada, e a presença de dois multipletos em δ 7,00 e δ 6,70 integrando para dois hidrogênios cada, em um sistema de spins AA'BB'.

Todos os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C (FIGURA 2.48, p. 361) obtidos nos espectros foram comparados e confirmados com dados da literatura e são apresentados na TABELA 2.17 (p. 359).

Portanto, pela análise dos experimentos de RMN e comparação com dados da literatura foi possível identificar a estrutura da substância **10** como sendo a do tirosol.

TABELA 2.17: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **10** e comparação com dados da literatura

H/C	Substância 10 (400/100 MHz, CDCl_3)		CHEN <i>et al.</i> , 2004 (500/125 MHz, DMSO-d_6)	
	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm)	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm)
1	3,73 (2H, <i>t</i> , $J= 6,6$)	63,8	3,51 (2H, <i>t</i> , $J= 6,5$)	62,6
2	2,71 (2H, <i>t</i> , $J= 6,6$)	38,2	2,59 (2H, <i>t</i> , $J= 6,5$)	38,3
3	-	130,1	-	129,6
4/8	7,00 (2H, <i>m</i>)	130,1	6,98 (2H, <i>d</i> , $J= 8,5$)	129,7
5/7	6,70 (2H, <i>m</i>)	115,4	6,65 (2H, <i>d</i> , $J= 8,5$)	114,9
6	-	154,7	-	155,5
OH	-	-	9,14	-

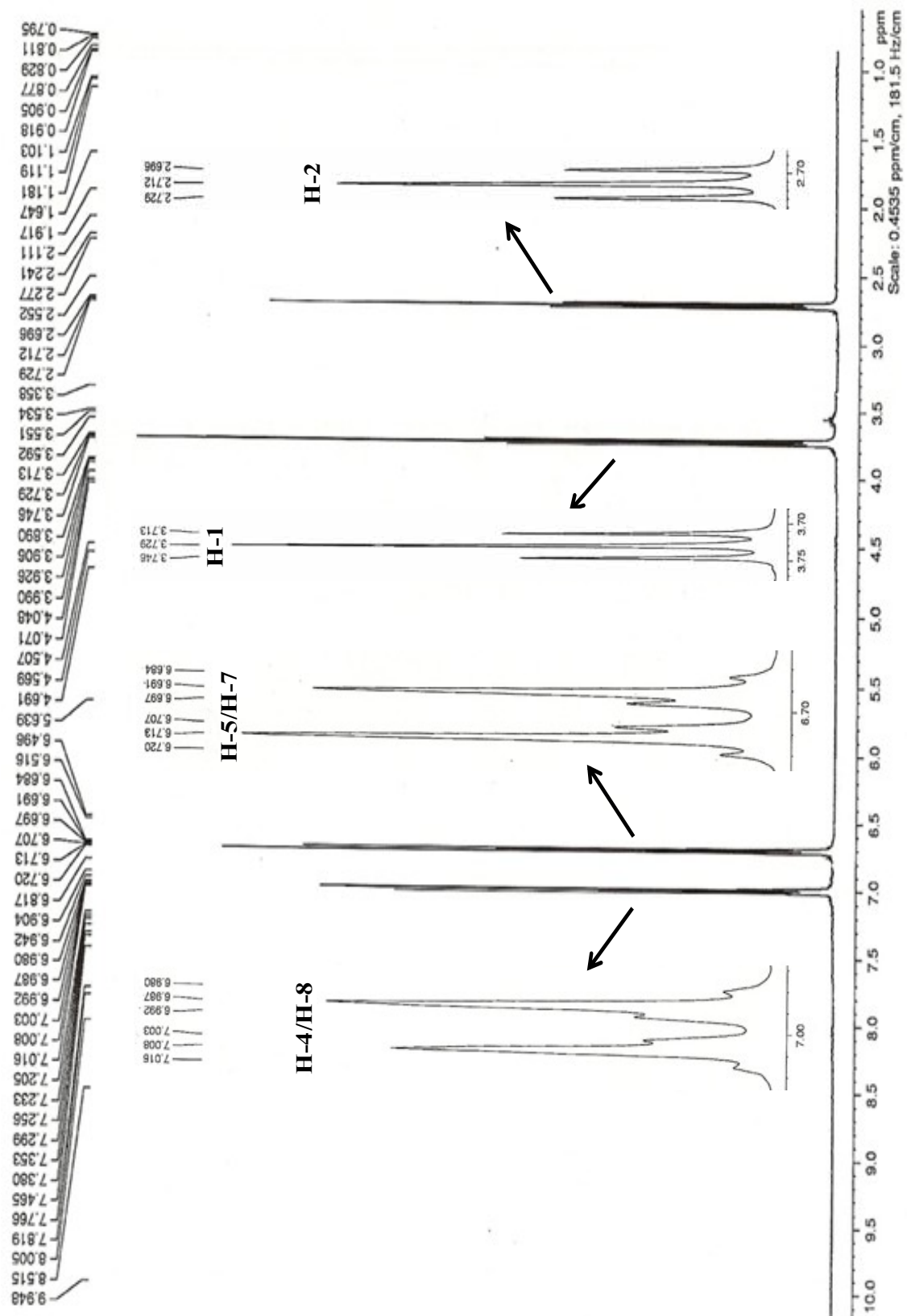


FIGURA 2.47: Espectro de RMN de ^1H de **10** (CDCl_3 , 400 MHz)

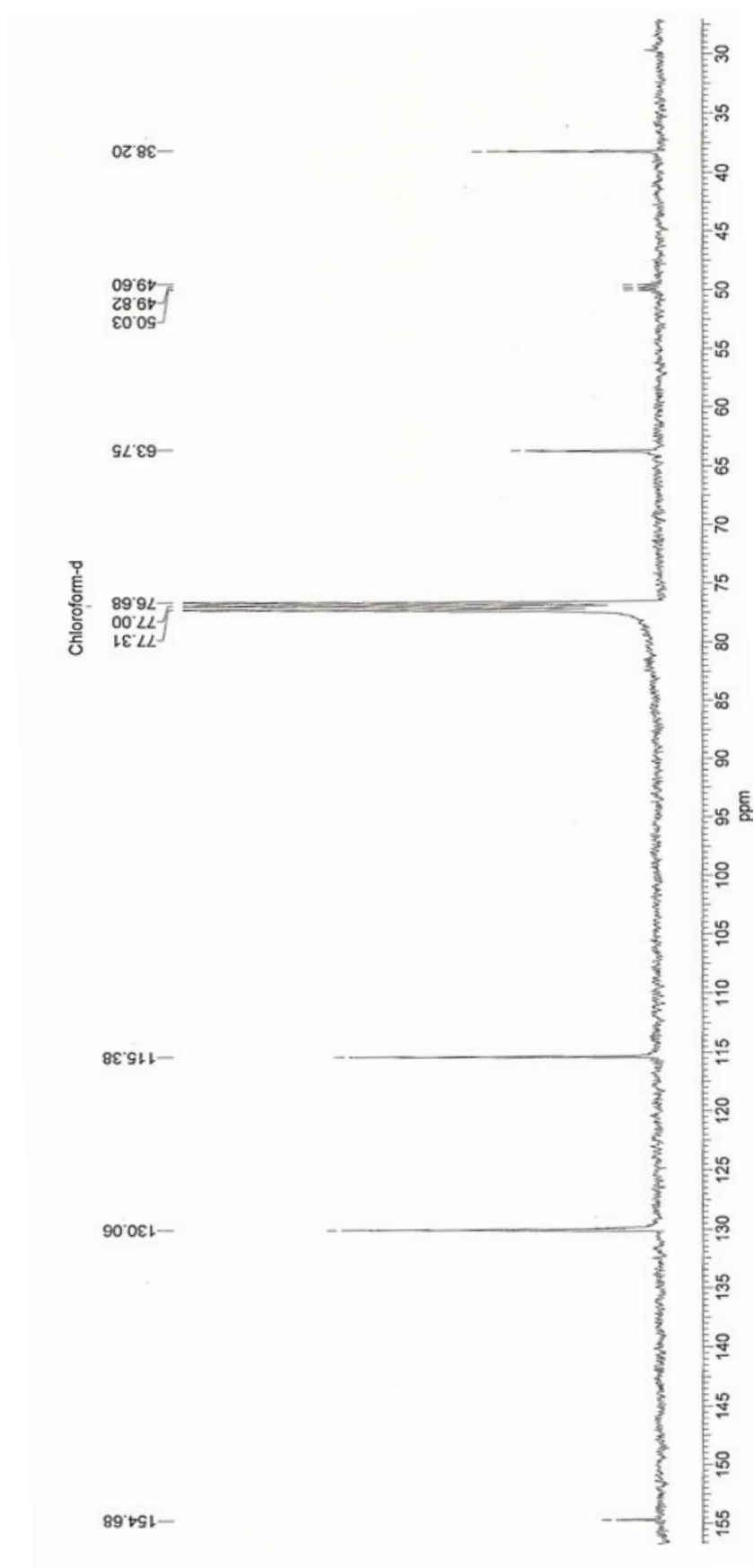
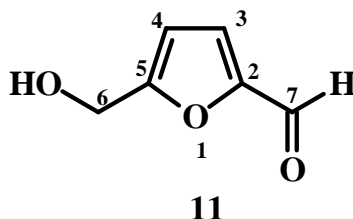


FIGURA 2.48: Espectro de RMN de ^{13}C de **10** (CDCl_3 , 100 MHz)

1.4.2.8 5-Hidróxi-metil-furfuraldeído – substância 11

A substância **11** foi isolada dos extratos AcOEt do meio líquido e etanólico do micélio (25 dias). Sua estrutura foi identificada através de experimento de RMN de ^1H , ^{13}C e comparação com dados da literatura (SILVA, 2007; GALLO, 2004).



Pela análise do espectro de RMN de ^1H de **11** (FIGURA 2.49, p. 365) observou-se dois dubletos integrando para um hidrogênio cada em δ 7,22 ($J= 3,5$ Hz) e δ 6,53 ($J= 3,5$ Hz), os quais são característicos de hidrogênios de anel furano e, portanto foram atribuídos aos hidrogênios H-3 e H-4 respectivamente. Ainda foi possível observar um sinal em δ 9,61 característico de hidrogênio de aldeído e um singlete em δ 4,73 integrando para dois hidrogênios, o qual foi atribuído aos dois H-6.

Pela análise do espectro de RMN de ^{13}C (FIGURA 2.50, p. 366) foi possível atribuir os seis sinais de carbono para a substância em questão.

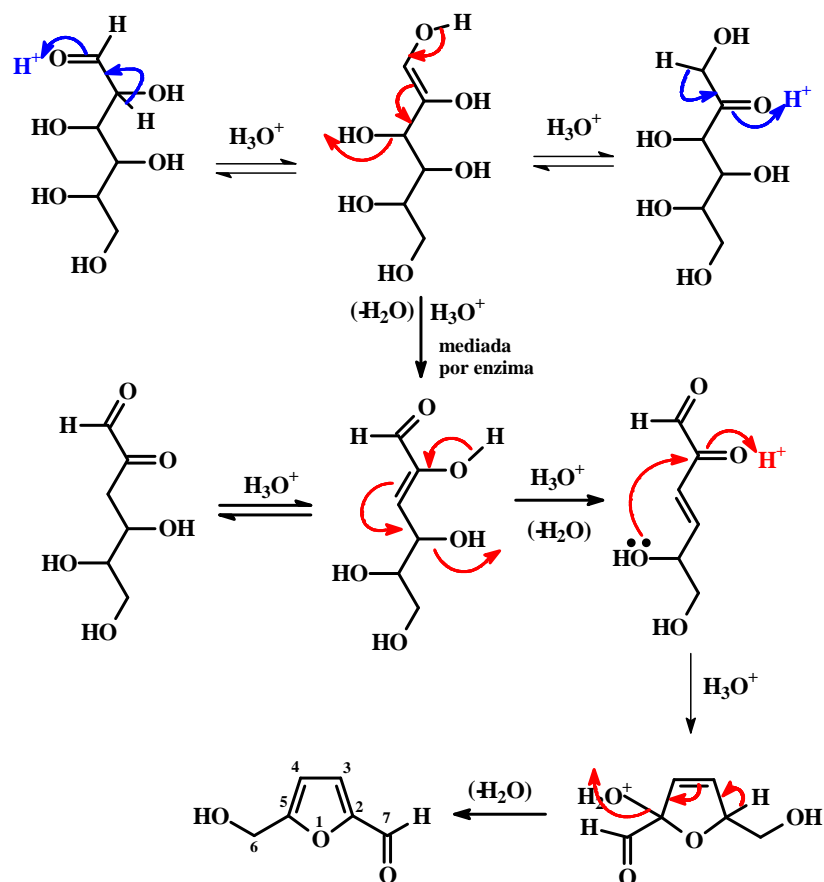
Todos os sinais referentes aos hidrogênios e carbonos foram atribuídos baseando-se em dados da literatura e são apresentados na TABELA 2.18 (p. 364).

Para a confirmação da estrutura proposta, foi realizado o experimento de CG-EM e pelo espectro obtido (FIGURA 2.51, p. 367), observou-se um pico em m/z 126 relativo ao íon molecular, sugerindo, portanto a fórmula molecular $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_3$. A proposta de fragmentação de **11** é mostrada no ESQUEMA 2.5 (p. 367).

Portanto, com base nos experimentos de RMN, CG-EM e dados da literatura, a estrutura da substância **11** foi atribuída ao 5-hidróxi-metil-furfuraldeído.

A substância 5-hidróxi-metil-2-furfuraldeído foi isolado previamente das raízes de *Cirsium chlorolepis* e *Siphoneugena densiflora*, entre outras plantas. No entanto, esta substância foi relatada pela primeira vez em micro-organismo em um trabalho de estudo do perfil químico do fungo *Botryosphaeria rhodina* realizado por SILVA (2007).

Em um estudo realizado por RECHE & FRANCO (2009) foi possível detectar 5-hidróxi-metil-furfuraldeído em cachaça produzida em alambique, formada por degradação térmica de pentoses e mediada por enzima. O ESQUEMA 2.4 (p. 363) apresenta as reações químicas sofridas pela glicose para a produção de **11**.



ESQUEMA 2.4: Reações químicas sofridas pela glicose para a produção de **11**
(Fonte: SILVA, 2007)

TABELA 2.18: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **11** e comparação com dados da literatura

H/C	Substância 11 (200/50 MHz, CDCl_3)		SILVA, 2007 (200/50 MHz, CDCl_3)		GALLO, 2004 (50 MHz, CDCl_3)
	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm)	δ (ppm) J (Hz)	δ (ppm)	δ (ppm)
1	-	-	-	-	-
2	-	152,9	-	*	153,4
3	7,22 (1H, d , $J= 3,5$)	123,9	7,22 (1H, d , $J= 3,5$)	123,7	123,7
4	6,53 (1H, d , $J= 3,5$)	109,6	6,52 (1H, d , $J= 3,5$)	109,6	110,2
5	-	162,7	-	*	162,9
6	4,73 (2H, s)	56,2	4,73 (2H, s)	56,1	57,5
7	9,61 (1H, s)	178,3	9,60 (1H, s)	178,2	178,1

* Valores não fornecidos pela literatura

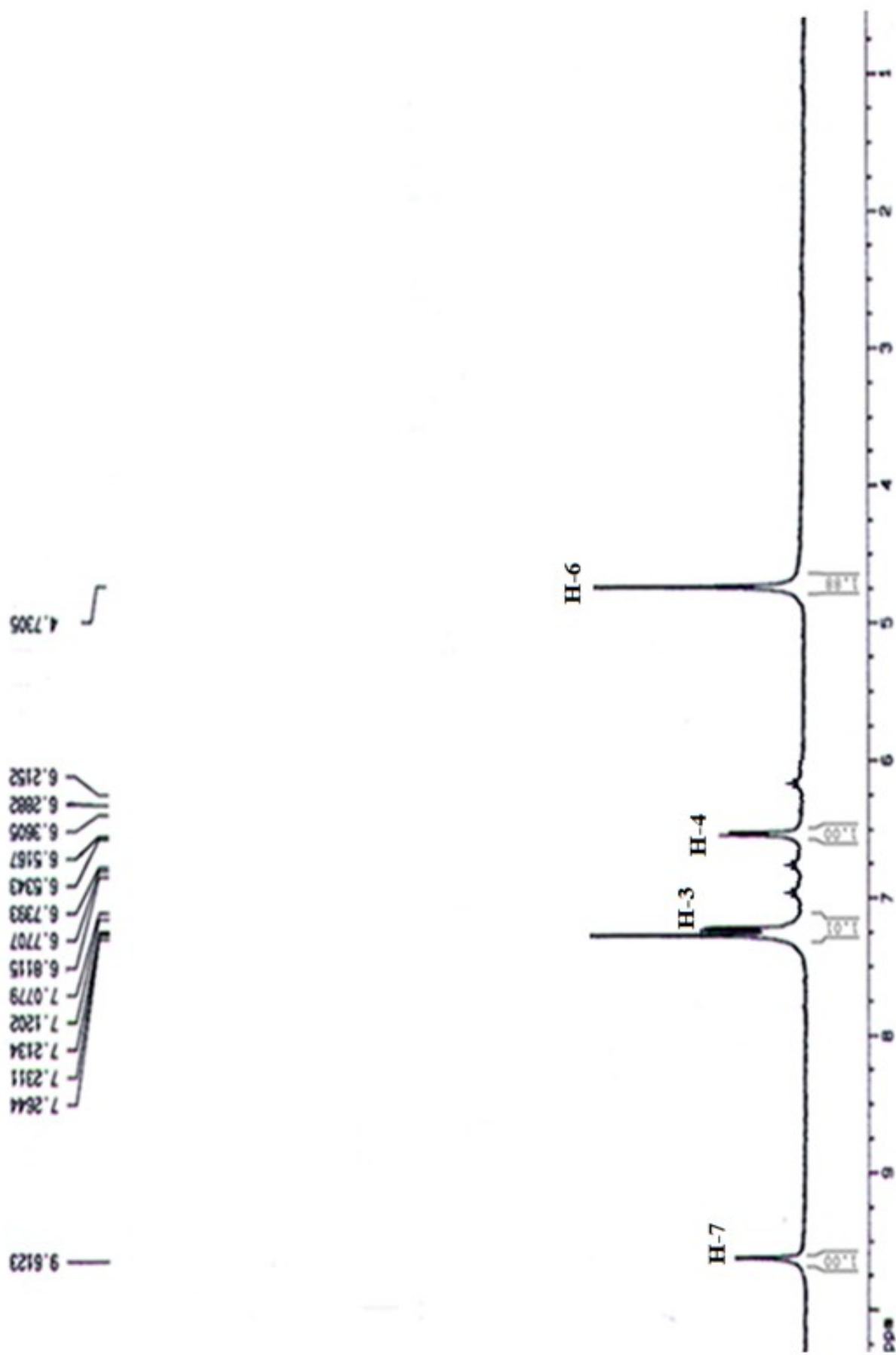


FIGURA 2.49: Espectro de RMN de ^1H de **11** (200 MHz, CDCl_3)

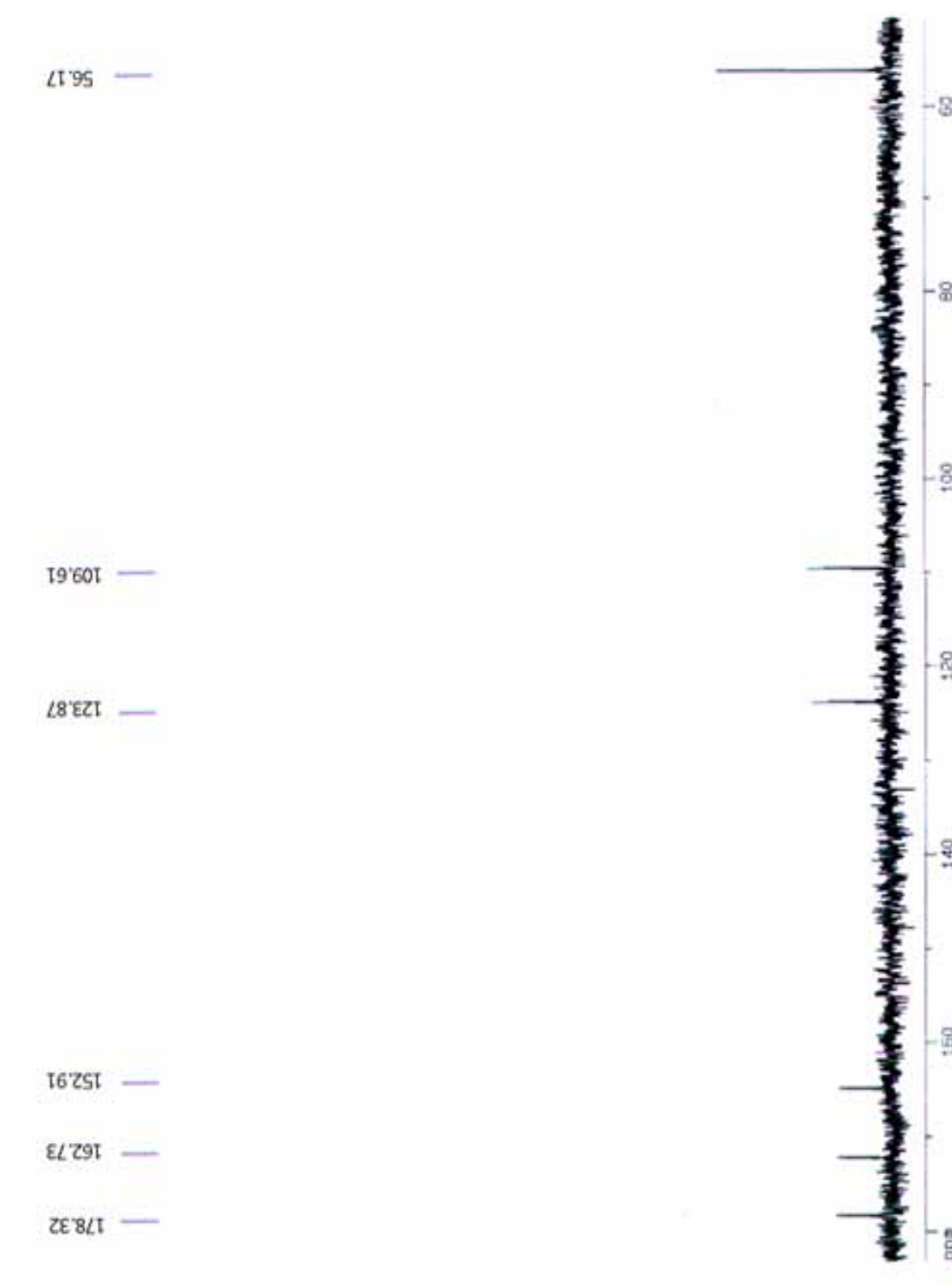


FIGURA 2.50: Espectro de RMN de ^{13}C de **11** (50 MHz, CDCl_3)

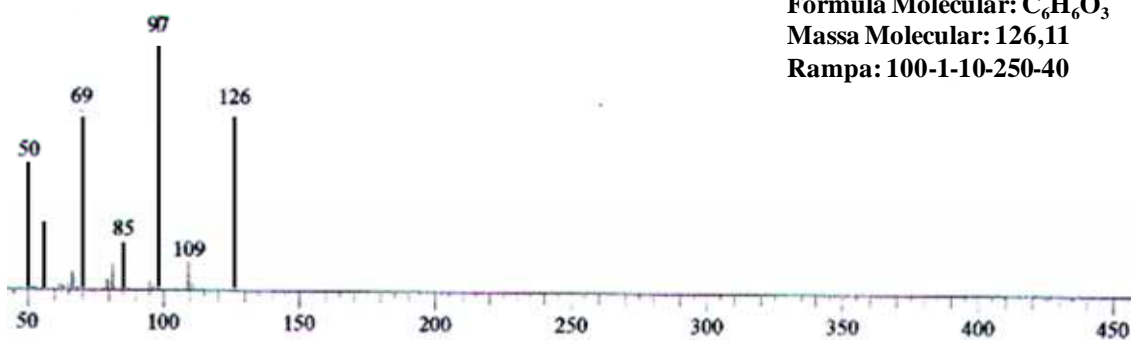
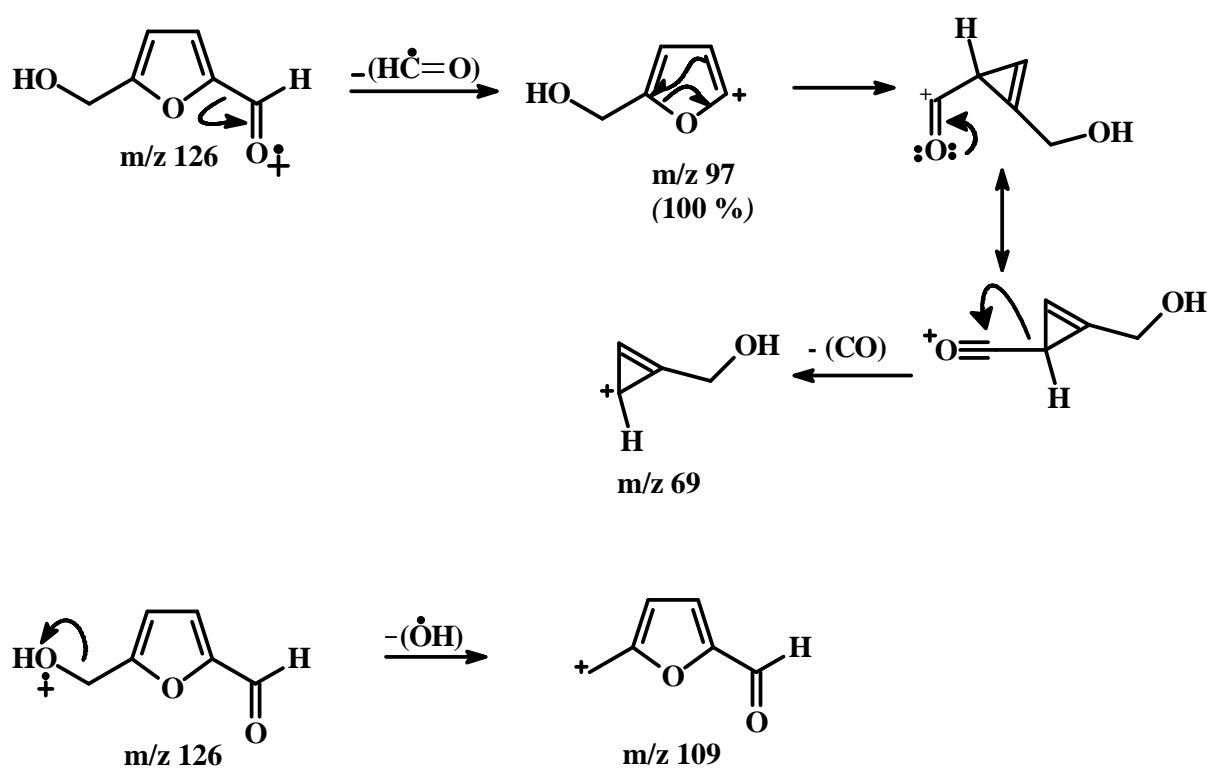


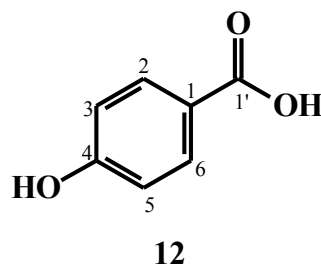
FIGURA 2.51: Espectro de CG-EM de **11** (IE – 70 eV)



ESQUEMA 2.5: Proposta de fragmentação de **11**

1.4.2.9 Ácido 4-hidróxi-benzóico – substância 12

A substância **12** foi isolada dos extratos butanólico do meio líquido (35 dias) e etanólico do micélio (25 e 35 dias). Sua estrutura foi identificada através de experimentos de RMN de ^1H , HSQC, HMBC e comparação com dados da literatura (SHAO *et al.*, 2002).



Pela análise do espectro de RMN de ^1H (FIGURA 2.52, p. 370) da substância **12** observou-se apenas dois dubletos integrando para dois hidrogênios cada em δ 7,84 (H_2/H_6 , $J= 8,7$ Hz) e δ 6,75 (H_3/H_5 , $J= 8,7$ Hz), os quais sugeriram um anel aromático *para* dissubstituído.

Pelo experimento de HSQC (FIGURA 2.53, p. 371) foi possível observar a correlação do sinal de H_2/H_6 (δ 7,84) com um sinal em 132,5 (C_2/C_6) e a correlação do sinal de H_3/H_5 (δ 6,75) com um sinal de carbono em 115,9 (C_3/C_5).

Pelo experimento de HMBC (FIGURA 2.54, p. 372) o sinal do hidrogênio em δ 7,84 (H_2/H_6) mostrou correlações com os sinais de carbonos em δ 115,9 ($\text{C}-3/\text{C}-5$), δ 127,2 ($\text{C}-1$), δ 160,5 ($\text{C}-4$) e δ 170,4 ($\text{C}-1'$); o sinal de hidrogênio em δ 6,75 mostrou correlações com os sinais em δ 127,2 ($\text{C}-1$), δ 132,5 ($\text{C}-2/\text{C}-6$) e com um sinal em δ 160,5.

Portanto, pela análise dos experimentos de RMN foi possível identificar a estrutura da substância **12** como sendo a do ácido 4-hidróxi-benzóico.

TABELA 2.19: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **12** e comparação com dados da literatura

H/C	Substância 12 (500/125 MHz, MeOD)		SHAO <i>et al.</i> , 2002 (500/125 MHz, MeOD)	
	δ (ppm), J (Hz)	δ^* (ppm)	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm)
1	-	127,2	-	126,4
2	7,84 (1H, d , $J= 8,7$)	132,5	7,89 (1H, d , $J= 8,7$ Hz)	132,5
3	6,75 (1H, d , $J= 8,7$)	115,9	6,83 (1H, d , $J= 8,7$)	116,0
4	-	160,5	-	162,0
5	6,75 (1H, d , $J= 8,7$)	115,9	6,83 (1H, d , $J= 8,7$)	116,0
6	7,84 (1H, d , $J= 8,7$)	132,5	7,89 (1H, d , $J= 8,7$ Hz)	132,5
1'	-	170,4	-	169,0

* **Observação:** os dados de ^{13}C foram obtidos dos experimentos de RMN de 2D (HMBC e HSQC), visto que pelo experimento de RMN de ^{13}C não foi possível a obtenção de tais dados.

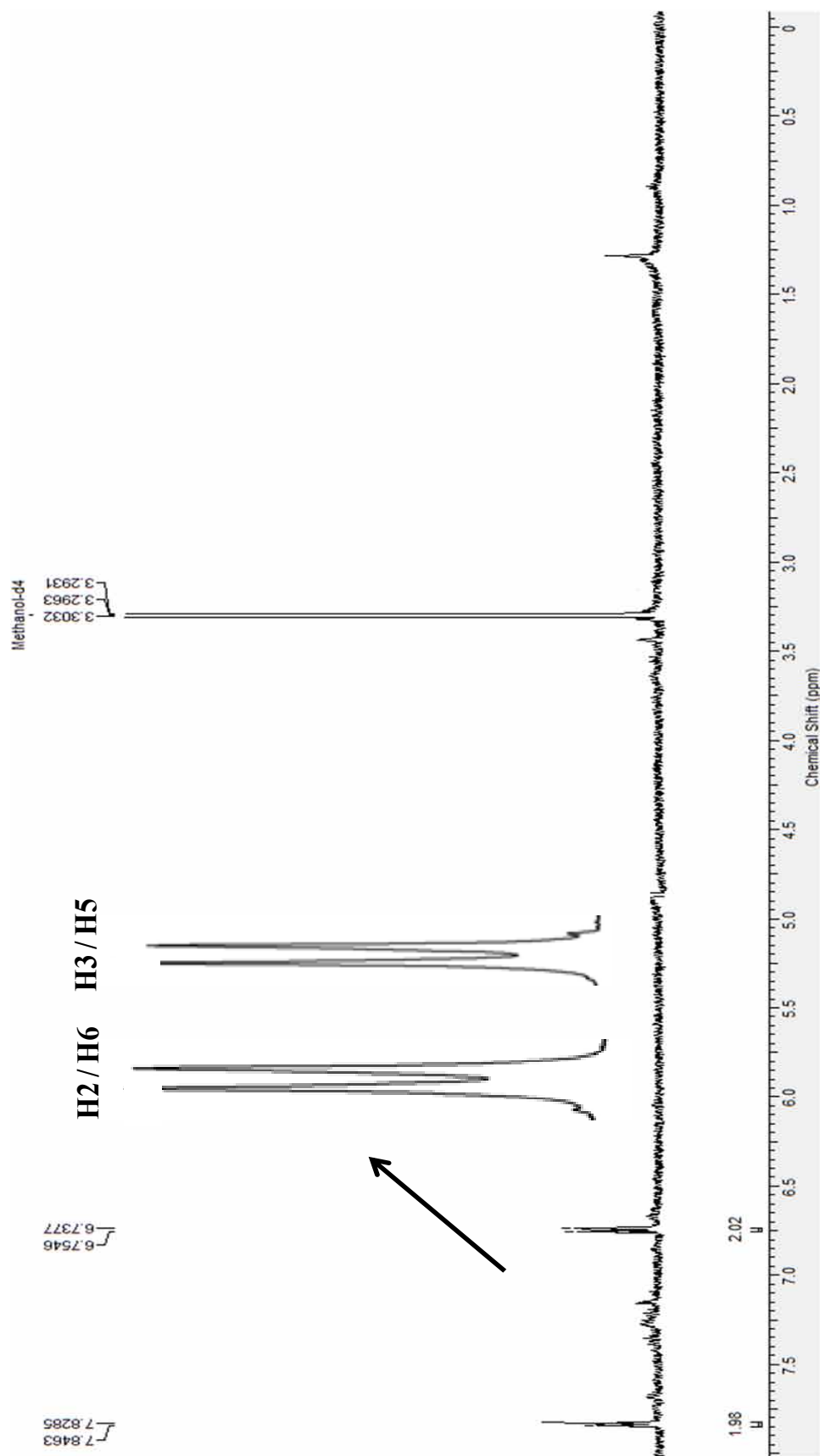


FIGURA 2.52: Espectro de RMN de ^1H de **12** (MeOD, 500 MHz)

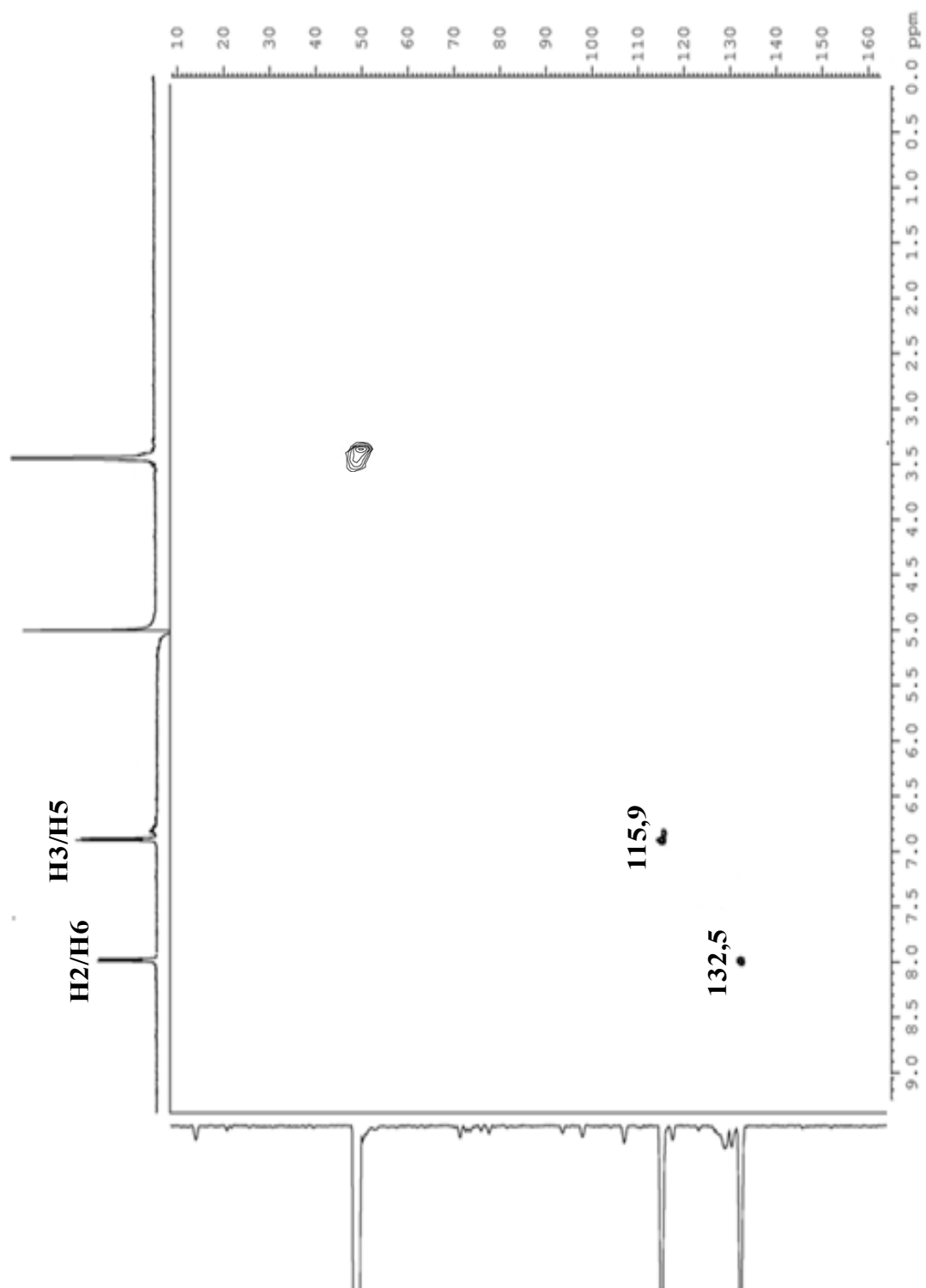


FIGURA 2.53: Mapa de contorno de g-HSQC de **12** (MeOD, 500 MHz)

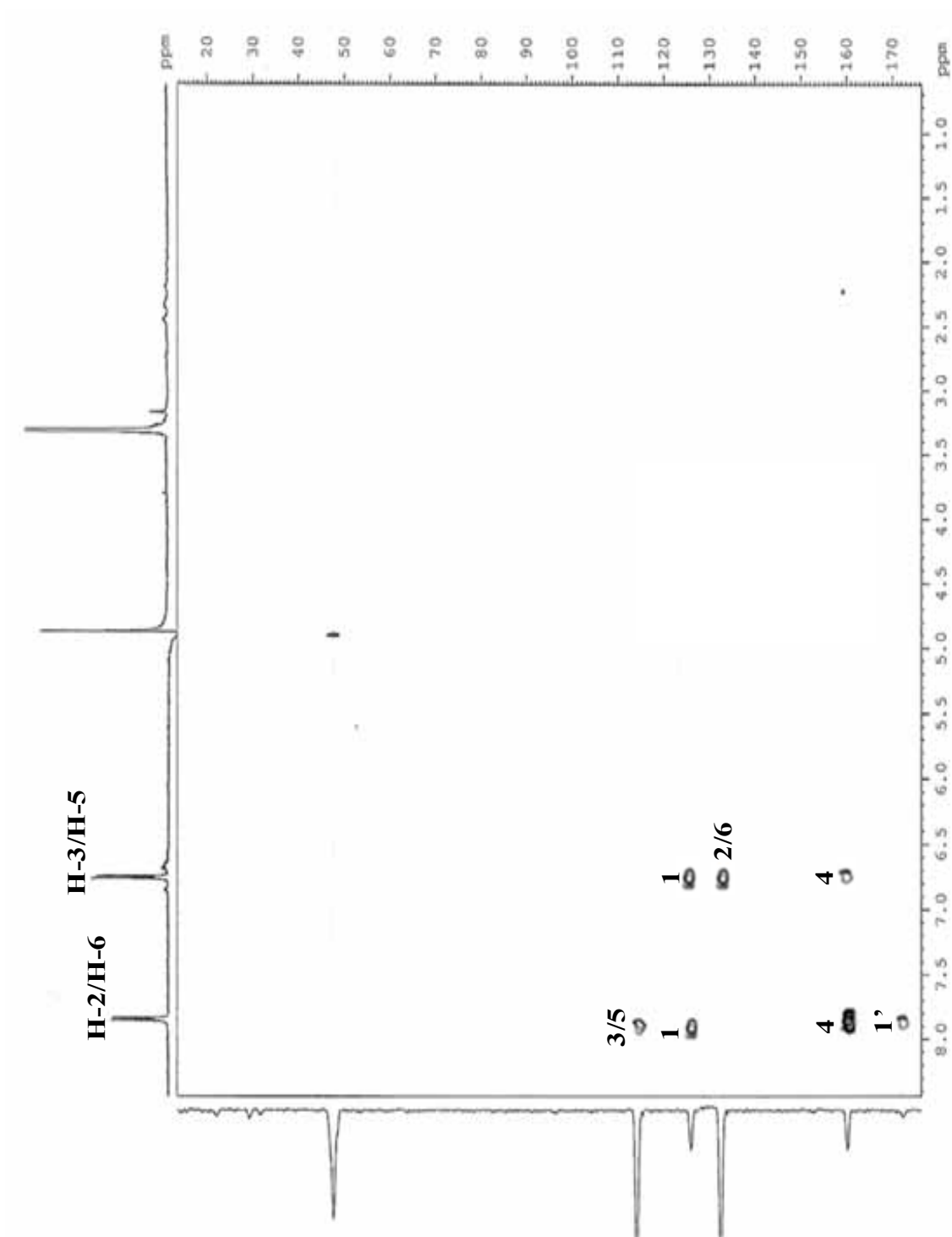
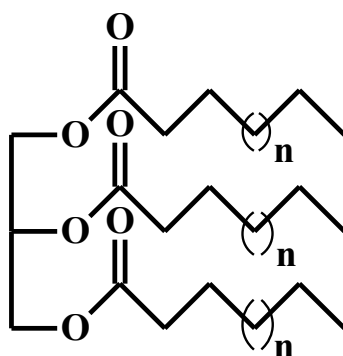


FIGURA 2.54: Mapa de contorno de g-HMBC de **12** (MeOD, 500 MHz)

1.4.2.10 Triglicerídeo – substância 13

A substância **13** foi isolada dos extratos AcOEt do meio líquido (25 dias) e etanólico do micélio (25 e 35 dias) e teve sua estrutura identificada através de experimentos de RMN de ^1H , CG-EM e comparação com dados da literatura (SILVA, 2007).



13

O espectro de RMN de ^1H de **13** (FIGURA 2.55, p. 374) apresentou um tripleto em δ 0,87 ($J= 5,8$ Hz) típico de metila terminal; sinais intensos na região de δ 1,24 característicos de metilenos de cadeia alquílica, um multipletto em δ 1,59 referente aos metilenos β a carboxila de éster, um multipletto em δ 2,00 característico de metilenos vizinhos a ligação dupla na cadeia alquílica, um tripleto em δ 2,30 ($J= 7,4$ Hz) de metileno α a carboxila de éster, dois duplos dubletos em δ 4,13 ($J= 12,0$ Hz e 5,9 Hz) e δ 4,28 ($J= 12,0$ Hz e 4,3 Hz) relativo a metilenos acilcarbinólicos e um multipletto em δ 5,30 do metino acilcarbinólico. Estes dados obtidos foram comparados com a literatura e levaram a confirmação de **13**.

Para a identificação dos ácidos graxos que esterificam o glicerol isolado, foi realizada reação de transesterificação (descrita em **1.3.3.4 - Reação de Transesterificação da Substância 13**, p. 283) e o produto obtido foi injetado no CG-EM para análise. Os dados obtidos são apresentados na TABELA 2.20 (p. 374).

TABELA 2.20: Ácidos graxos que esterificam o glicerol isolado

Picos	T _r (min)	[M ⁺]	FM	Nome	%
1	17,05	256	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	Ácido hexadecenóico	79,76
2	19,56	284	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	Ácido octadecenóico	9,22
3	20,47	340	C ₂₂ H ₄₄ O ₂	Ácido docosenóico	11,02

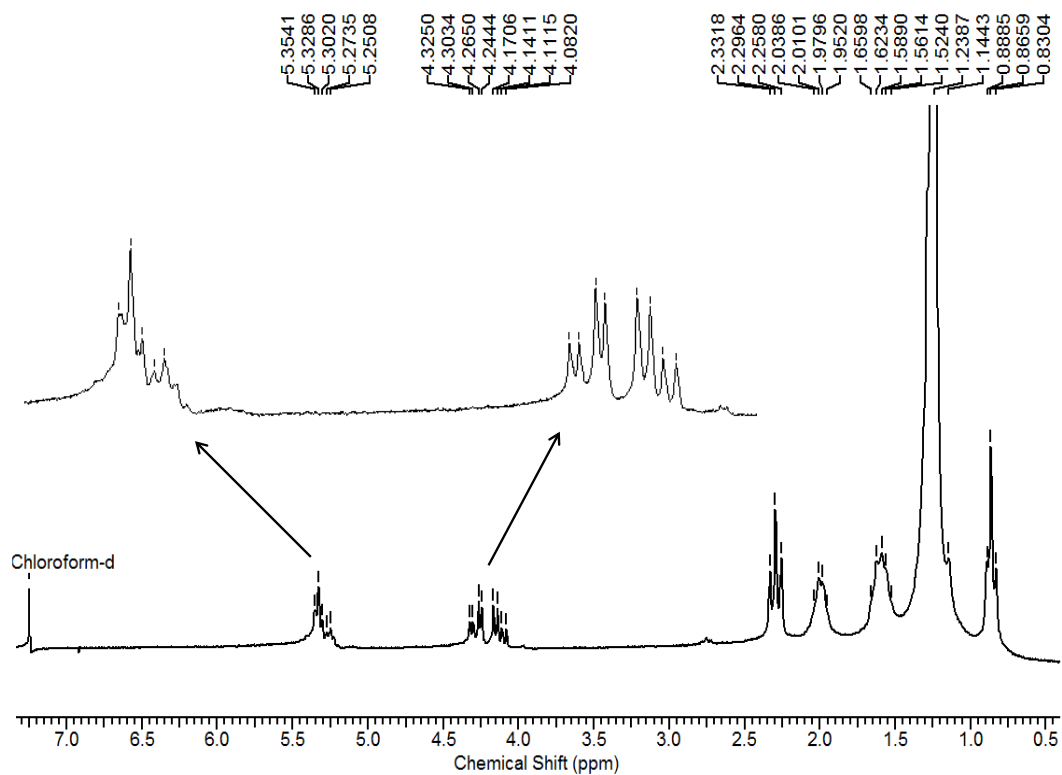


FIGURA 2.55: Espectro de RMN de ¹H de **13** (200 MHz, CDCl₃)

2. Avaliação do Potencial Efeito Biológico do Fungo *G. citricarpa*

Na literatura é amplamente relatada a atividade biológica de substâncias isoladas de fungos e bactérias no controle de doenças infecciosas, câncer, distúrbios lipídicos, doenças hipertensivas (CLARDY & WALSH, 2004). Entretanto, recentemente atenção especial tem sido dedicada na busca de princípios bioativos, isolados de plantas ou micro-organismos que possam controlar doenças que acometem a agricultura, em especial a citricultura (RABEA & STEURBAUT, 2010).

Neste contexto, este trabalho teve por objetivo avaliar o potencial biológico de alguns extratos e subextratos obtidos do estudo químico de *G. citricarpa* frente à bactéria *X. fastidiosa*, que, conforme relatado em **2.1.1.1 - Clorose Variegada dos Citros (CVC)** (p. 218), afeta consideravelmente a citricultura brasileira.

2.1 Parte Experimental

Os ensaios antibacterianos frente à *X. fastidiosa* (linhagem 9a5c) foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada (LaPeMA) da Universidade de Franca – UNIFRAN, situada na cidade de Franca – SP, com a colaboração do professor Dr. Carlos Henrique Gomes Martins e do aluno de doutorado Rodrigo Lucarini. A metodologia já foi descrita em **2.3.1 - Ensaio Biológico frente à *X. fastidiosa*** (p. 232); todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Os extratos e subextratos de *G. citricarpa* avaliados são apresentados na TABELA 2.21 (p. 376). Como controles positivos foram empregados gentamicina e estreptomicina (adquiridos da Sigma®) com a finalidade de verificar a viabilidade celular de *X. fastidiosa*.

2.2 Resultados e Discussões

Os resultados de CIM dos extratos e subextratos de *G. citricarpa* são apresentados na TABELA 2.21 (p. 376). Os valores de CIM para os controles positivos gentamicina e estreptomicina foram 0,74 e 1,48 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente, concentrações baixas que demonstram a viabilidade celular de *X. fastidiosa*, de acordo com o protocolo deste ensaio.

TABELA 2.21: Valores de CIM dos extratos e subextratos de *G. citricarpa* avaliados frente à *X. fastidiosa*

Amostras	CIM ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
Micélio extraído com etanol (25 dias de desenvolvimento)	6,25
Subextrato obtido a partir da partição do micélio com hexano	25,0
Subextrato obtido a partir da partição do micélio com AcOEt	6,25
Subextrato obtido a partir da fase hidroalcoólica	3,12
Micélio extraído com etanol (35 dias de desenvolvimento)	6,25
Subextrato obtido a partir da partição do micélio com hexano	12,5
Subextrato obtido a partir da partição do micélio com AcOEt	6,25
Subextrato obtido a partir da fase hidroalcoólica	12,5
Meio líquido extraído com AcOEt (25 dias de desenvolvimento)	12,5
Meio líquido extraído com AcOEt (35 dias de desenvolvimento)	25,0
Meio líquido extraído com butanol (25 dias de desenvolvimento)	12,5
Meio líquido extraído com butanol (35 dias de desenvolvimento)	12,5

Neste ensaio foi possível constatar pelos valores de CIM que todos os extratos e subextratos obtidos de *G. citricarpa* foram promissores frente à inibição do crescimento de *X. fastidiosa*, uma vez que o intervalo de concentração empregado para as amostras foi de 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e alguns

extratos e subextratos, em especial aqueles obtidos a partir dos micélios (25 e 35 dias), apresentaram CIM de 6,25 a 3,12 µg/mL.

Pelo estudo químico realizado com os extratos de *G. citricarpa* foi possível isolar, inclusive dos extratos mais ativos, várias classes de metabólitos secundários, dentre as quais destacam-se as dicetopiperazinas, amplamente relatadas na literatura e que apresentam diversas propriedades biológicas, como bactericida, antitumoral e imunossupressora (GUIMARÃES *et al.*, 2010).

As propriedades antimicrobianas de extratos de *Guignardia sp.* já foram relatadas nos estudos de RODRIGUES-HEERKLOTZ *et al.* (2001); posteriormente destes extratos foi isolado, elucidado e posteriormente sintetizado o metabólito secundário derivado dos aminoácidos valina e fenilalanina denominado de (S)-(-)-ácido guignardico.

Desta forma, seria interessante dar continuidade nestes ensaios frente à *X. fastidiosa* avaliando, além dos extratos e subextratos, as substâncias isoladas de *G. citricarpa*, a fim de verificar se o elevado potencial de alguns extratos, apresentado anteriormente, deve-se a uma substância em especial ou então seria um efeito de sinergismo pronunciado; assim, pretende-se dar continuidade a este trabalho futuramente.

3. Conclusões do Capítulo 02

O fungo fitopatogênico *G. citricarpa* foi cultivado em três meios de cultura diferentes (BD, Czapeck e Czapeck enriquecido com 2% de extrato de malte) e após análise do perfil químico via CLAE-DAD dos extratos obtidos de cada meio, foi possível detectar os resultados mais promissores (número de picos nos cromatogramas) para os extratos oriundos do meio BD em quatro comprimentos de onda selecionados (230, 255, 312 e 365 nm). Assim, o meio BD foi selecionado para realizar o crescimento do fungo em escala ampliada e o seu estudo químico, sendo possível isolar 13 substâncias de diferentes classes de metabólitos secundários, sendo duas delas (tirosol e ácido 4-hidróxi-benzóico) já isoladas anteriormente do gênero *Guignardia*, porém da espécie endofítica *G. mangiferae* (GUIMARÃES, 2009). O isolamento do tirosol neste trabalho instiga novas investigações sobre a possível função do mesmo no evento da patogenicidade em Citros, uma vez que há alguns relatos na literatura sobre estudos da atividade sinalizadora e auto-reguladora desta molécula em alguns fungos endofíticos (CHEN *et al.*, 2004).

Em relação aos ensaios biológicos realizados com extratos e subextratos de *G. citricarpa* frente à bactéria fitopatogênica *X. fastidiosa*, os resultados obtidos revelaram valores de CIM bastante interessantes e promissores, sendo portanto relevante a continuidade destes ensaios e a busca por substâncias presentes nestes extratos em quantidades suficientes para serem avaliadas quanto às suas possíveis atividades biológicas. Algumas dicetopiperazinas isoladas neste trabalho e amplamente relatadas na literatura caracterizam-se por apresentarem diversas atividades biológicas; assim, futuramente pretende-se avaliar tais moléculas frente à *X. fastidiosa* e à outros micro-organismos que causam doenças importantes, visando à busca de metabólitos secundários que possam atuar como novas fontes bioativas.

Portanto, o estudo de *G. citricarpa* permitiu conhecer a diversidade de classes estruturais produzidas por este fungo. No entanto, é importante a

continuidade deste estudo visando um conhecimento mais amplo sobre a química do fungo, com o intuito de se obter substâncias bioativas, bem como, contribuir para o entendimento da relação fitopatógeno/planta.

REFERÊNCIAS

➤ **Capítulo 01:**

- AGGER, E. M.; ANDERSEN, P. "A novel TB vaccine; towards a strategy based on our understanding of BCG failure". *Vaccine*, **21**: 7, 2002.
- AGRIOS, G.N. *Plant Pathology*, 4^a ed. San Diego:Academic Press, 1997, p. 635.
- AGUILAR-VILDOSO, C. I. "Pinta preta espalha-se por São Paulo". *Citricultura Atual*, **1**(2): 8, 1997.
- AGUILAR-VILDOSO, C.I.; RIBEIRO, J.G.B.; FEICHTENBERGER, E.; GOES, A.; SPÓSITO, M.B. "Manual técnico de procedimentos da Mancha Preta dos Citros". Brasília: MAPA/DAS/DDIV, 2002.
- AHMAD, J.; SHAMSUDDIN, K. M.; ZAMAN, A. "A pyranocoumarin from *Atlantia ceylanica*". *Phytochemistry*, **23**(9): 2098, 1984.
- ALBARICI, T. R.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; DA SILVA, M. F. G. F. "Cumarinas e alcaloides de *Rauia resinosa* (Rutaceae)". *Quim. Nova*, **33**(10): 2130, 2010.
- ALVES, E. *Xylella fastidiosa - adesão e colonização em vasos do xilema de laranja doce, cafeeiro, ameixeira, fumo e espécies de cigarrinhas vetoras e formação de biofilme sobre película de poliestireno*. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – USP, 2003. Tese de doutorado, 122p.
- ARANTES, V. P. *Studying of Antimycobactericide Activity of Vegetal Extracts from Brazilian's "Cerrado"*. Araraquara. Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" – UNESP, 2005. Dissertação de mestrado.
- ASAKAWA, J.; KASAI, R.; YAMASAKI, K.; TANAKA, O. "¹³C NMR study of ginseng sapogenins and their related dammarane type triterpenes". *Tetrahedron*, **33**: 1935, 1977.
- AWADA, A.; AUWERA, P. V. D.; MEUNIER, F.; DANEAU, D.; KLASTERSKY, J. "Streptococcal and enterococcal bacteremia in patients with cancer". *Clin. Infect. Dis.* **15**: 33, 1992.
- BALDASSARI, R.B. *Influência de Frutos Sintomáticos de uma Safra na Incidência da Guignardia citricarpa na Safra Subsequente e Período de Susceptibilidade de Frutos de Laranjeira 'Natal' e 'Valencia'*. Jaboticabal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 2001. Dissertação de Mestrado, 60p.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. "Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos". *Quim. Nova*, **32**(3): 679, 2009.
- BASTOS, J. K.; GOTTLIEB; O. R.; SART J. S.; SANTOS FILHO, D. "Isolation of lignans and sesquiterpenoids from leaves of *Zanthoxylum naranjillo*". *Nat. Prod. Lett.*, **9**: 65, 1996.
- BENTHAM, G.; HOOKER, J. D. *Genera Plantarum*, L. Reeve & Co., London, **1**, 1862.
- BIER, O. *Bacteriologia e imunologia: em suas aplicações à medicina e à higiene*, Ed. Melhoramentos: São Paulo, 1981.

- BRAGA, P. A. C. *Estudo Fitoquímico de Espécies de Hortia (Rutaceae), Importância Quimiossistemática e Atividades Biológicas dos Constituintes Isolados*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2005. Tese de doutorado, 269p.
- BUT, P. P-H.; POON, A. W-S.; SHAW, P-C.; SIMMONS, M. P.; GREGER, H. “Contribution of molecular cladistics to the taxonomy of Rutaceae in China”. *J. Syst. Evol.* **47**: 144, 2009.
- CHAMPAGNE, D. E.; KOUL, O.; ISMAN, M. B.; SCUDDER, G. G. E.; TOWERS, G. H. N. “Biological activity of limonoids from the Rutales”. *Phytochemistry*, **31**(2): 377, 1992.
- CHASE, M. W.; MORTON, C. M.; KALLUNKI, J. A. “Phylogenetic relationship of Rutaceae: a cladistic analysis of the subfamilies using evidence from *rbcL* and *atpB* sequence variation”. *Am. J. Bot.* **86**: 1191, 1999.
- CORREA, D. B.; GOTTLIEB, O. R. & PADUA, A. P. “Dihydrocinnamic acids from *Hortia badinni*”. *Phytochemistry*, **14**: 2059, 1975.
- CORREA, D. B.; GOTTLIEB, O. R. & PADUA, A. P. “Dihydrocinnamyl alcohols from *Hortia badinni*”. *Phytochemistry*, **18**: 351, 1979.
- CORREA, D. B.; GOTTLIEB, O. R.; PADUA, A. P. & ROCHA, A. I. “Constituents of *Hortia longifolia*”. *Revista Latinoamericana de Química*, **7**: 43, 1976.
- CORTINAS, M. N.; FERNANDEZ, M.; VALETA, M. I.; URIARTE, M.R.; MOGDASY, M. C. “Caracterización genotípica de 80 cepas del género *Mycobacterium* en Uruguay”. *Rev. Med. Uruguay*, **18**: 230, 2002.
- COSTERTON, J.W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D.E.; KORBER, D.R.; LAPIN-SCOTT, H.M. “Microbial biofilms”. *Ann. Rev. Microbiol.*, **49**: 711, 1995.
- CUCA, L. E.; MARTÍNEZ, J. C.; MONACHE, F. D. “Alcaloides presentes en *Hortia colombiana*”. *Revista Colombiana de Química*, **27**(1): 23, 1998.
- DA SILVA, M. F. G. F.; GOTTLIEB, O. R. “Evolution of quassinoids and limonoids in the Rutales”. *Biochemical Systematics and Ecology*, **15**: 85, 1987.
- DA SILVA, M. F. G. F.; GOTTLIEB, O. R.; EHRENDORFER, F. “Chemosystematics of the Rutaceae: suggestions for a more natural taxonomy and evolutionary interpretation of the family”. *Plant. Syst. Evol.* **161**: 97, 1988.
- DANNENBERG, A. M. & ROOK, G. A. W. IN: *Tuberculosis pathogenesis, protection, and control*. BLOOM, B. R. ASM Press, Washington, DC, 1994, p. 459-483.
- DAVIS, M. J.; FRENCH, W. J.; SCHAAD, N. W. “Axenic culture of the bacteria associated with phony disease of peach and plum leaf scald”. *Current Microbiology*, **6** (5): 309, 1981.
- DE ARAÚJO, E. F.; DE QUEIROZ, L. P.; MACHADO, M. A. “What is *Citrus*? Taxonomic implications from a study of cp-DNA evolution in the tribe Citreae (Rutaceae subfamily Aurantioideae)”. *Org. Divers. Evol.*, **3**: 55, 2003.

- DE CANDOLLE, A. P. *Aurantiaceae e Rutaceae. Prodomus sistematicis naturalis regni vegetabilis*, Paris, **1**, 1824.
- DE SOUZA, A.A.; TAKITA, M.A.; COLETTA-FILHO, H.D.; CALDANA, C.; YANAI, G.M.; MUTO, N.H.; COSTA DE OLIVEIRA, R.; NUNES, L.R.; MACHADO, M.A. "Gene expression profile of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* during biofilm formation *in vitro*". *FEMS Microbiol. Lett.*, **237**: 341, 2004.
- DEWICK, P. M. *Medicinal Natural Products: a Biosynthetic Approach*; England, John Wiley & Sons, 2002.
- ENGLER, A. "Rutaceae". In: *Natürlichen Pflanzfamilien*. Engler, A. V. & PRANTL, K. D., 1931, p. 187-359; p. 458-459.
- FERRACIN, R. J. *Estudo fitoquímico de Hortia arborea: uma contribuição a quimiosistemática de Cusparieae* – Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 1992. Dissertação de mestrado, 135p.
- FUNDECITRUS. *Manual de CVC – Clorose Variegada dos Citros*, 2008.
- FUNDECITRUS. *Clorose Variegada dos Citros – CVC*. Disponível em: <http://www.fundecitrus.com.br/doencas/cvc.html>
Acesso em 20/04/2011.
- GEISSMANN, T. A.; CROUT, D. H. G. *Organic chemistry of secondary plant metabolism*. Van Nostrand Reinhold, San Francisco, 1969, p. 465.
- GLEASON, H.A. "Studies on the flora of northern south America – XVIII: plantae lawranceanae colombianae". *Phytologia* **1**:25, 1933.
- GLIENKE-BLANCO, C.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; VIEIRA, M. C. L.; BARROSO, P. A. V.; AZEVEDO, J. L. "Genetic variability in the endophytic fungus *Guignardia citricarpa* isolated from citrus plants". *Genetics and Molecular Biology*, **25** (2): 251, 2002.
- GOES, A. "Controle da mancha-preta dos frutos cítricos". *Laranja*, **19** (2): 305, 1998.
- GONÇALVES, E. L. M. *A Importância da Prevenção e da Intervenção em Doença Periodontal pela Equipe de Saúde da Família*. Uberlândia, Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, 2010. Trabalho de Conclusão de Curso, 35 p.
- GRAY, A. I.; WATERMAN, P. G. "Coumarins in the Rutaceae". *Phytochemistry*, **17**: 845, 1978.
- GROPPO, M. *Filogenia de Rutaceae e Revisão de Hortia Vand.* São Paulo, Instituto de Biociência, Universidade de São Paulo, 2004. Tese doutorado.
- GROPPO, M., CRUZ-BARROS, M. A. V. DA, CORREA, A. M. DA S. "Pollen morphology of Species of *Hortia* (Rutaceae)". *Revista Brasil. Bot.*, **33**:13, 2010.

- GROPPO, M.; KALLUNKI, J.A.; PIRANI, J.R. "Synonymy of *Hortia arborea* with *H. brasiliensis* (Rutaceae) and a new species from Brazil". *Brittonia*, **57**: 28, 2005.
- GROPPO, M.; PIRANI, J. R.; SALATINO, M. L. F.; BLANCO, S. R.; KALLUNKI, J. A. "Phylogeny of Rutaceae based on two noncoding regions from cpDNA". *Am. J. Bot.* **95**: 985, 2008.
- GULLINO, M.L.; KUIJPERS, L.A.M. "Social and political implications of managing plant diseases with restricted fungicides in Europe". *Annual Review of Phytopathology*, **32**: 559, 1994.
- HAUSER-GERSPACH, I.; KULIK, E. M.; WEIGER, R.; DECKER, E. M.; VON OHLE, C.; MEYER, J. "Adhesion of *Streptococcus sanguinis* to dental implant and restorative materials *in vitro*". *Dent. Mater J.*, **26**: 361, 2007.
- HUANG, H.-Y.; ISHIKAWA, T.; PENG, C.-F.; TSAI, I.-L.; CHEN, I.-S. "Constituents of the root wood of *Zanthoxylum wutaiense* with antitubercular activity". *J. Nat. Prod.*, **71**: 1146, 2008.
- ISIDORO, M. M. *Estudo Fitoquímico de Euxylophora paraensis e Avaliação das Substâncias Isoladas frente à Enzima Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase de Trypanosoma cruzi*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2008. Dissertação de mestrado, 162 p.
- JACOBS, H.; RAMDAYAL, F. "Guyanin, a novel tetranortriterpenoid. Structure elucidation by 2-D NMR spectroscopy". *Tetrahedron Letters*, **27**(130): 1453, 1986.
- JACOBS, H.; RAMADAYAL, F. "Constituents of *Hortia regia*: 6,7-dimethoxycoumarin, rutaecarpine, skimmianine, and (+)-methyl (E,E)-10,11-dihydroxy-3,7,11-trimethyl-2,6-dodecadienoate". *Journal of Natural Products*, **50**(3): 507, 1987.
- JANUÁRIO, A. H.; VIEIRA, P. C.; DA SILVA, M. F. G. F.; FERNANDES, J. B. Alcaloides β -indolopiridoquinazolinicos de *Esenbeckia grandiflora* Mart. (Rutaceae). *Quim. Nova*, **32** (8): 2034, 2009.
- JOHNSON, C. C.; TUNKEL, A. R.; "Viridans streptococci and groups Cand G streptococci". In: *Principles and practice of infectious diseases*. MANDELL, G. L.; BENNETT, J. E.; DOLIN, R. (Eds.). Churchill Livingstone, Philadelphia, Pa. 2000. p. 2167–2183.
- KHALIL, A. T.; MAATOOQ, G. T.; EL SAYEDA, K. A. "Limonoids from *Citrus reticulata*". *Z. Naturforsch.*, **58c**: 165D170, 2003.
- KIELY, T.B. *Control and epiphytology of black spot of citrus on the central coast of New South Wales*. New South Wales: Department of Agriculture Science, 1948, 88p. (Bulletin).
- KOTZÉ, J. M. "Epidemiology and control of citrus black spot in South Africa". *Plant Disease Reporter*, **65**: 945, 1981.

- LARANJEIRA, F. F.; POMPEU JR., J.; HARAKAVA, R.; FIGUEIREDO, J. O.; CARVALHO, S. A.; COLETTA FILHO, H. D. “Cultivares e espécies cítricas hospedeiras de *Xylella fastidiosa* em condições de campo”. *Fitopatol. Brás.*, **23**: 147, 1998.
- LASSAK, E. V.; PINHEY, J. T. “The proton magnetic resonance of some coumarins and 2,2-dimethyl-chromens: further examples of inter-ring spin-spin coupling”. *J. Chem. Soc. (C)*: 2000, 1967.
- LOPES, S. A.; TORRES, S. C. Z. “An effective and low-cost culture medium for isolation and growth of *Xylella fastidiosa* from citrus and coffee plants”. *Current Microbiology*, **53**(6): 467, 2006.
- LUCARINI, R. *Determinação do Potencial Antimicobacteriano do Extrato Bruto de Usnea sp e Ácido Úsnico*. Franca, Universidade de Franca - UNIFRAN, 2009. Trabalho de Conclusão de Curso, 23 p.
- MADDOX, C. E.; LAUR, L. M.; TIAN, L. “Antibacterial activity of phenolic compounds against the phytopathogen *Xylella fastidiosa*”. *Current Microbiology*, **60**:53, 2010.
- MAFEZOLI, J. *Atividade Tripanocida e Antimicrobiana de Plantas da Família Rutaceae*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2001. Tese de Doutorado, 247 p.
- MAGNANI, R. F. *Contribuições ao Entendimento do Conceito de “Microrganismos Endofíticos”: Biotransformação de Ácido Abiético por *Fusarium graminearum*; Estudo Químico de *Pestalotiopsis sp.*; e Estudo da Doença “Pinta-Preta” em *Citrus* causada pelo Fungo *Guignardia citricarpa**. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2002. Dissertação de mestrado, 149 p.
- MARQUES, A. S. F. *Estudo Fitoquímico de Três Espécies de Rutaceae e Avaliação Biológica de Produtos Naturais em Modelos Celulares e Bioquímicos de Tripanosomatídeos*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2006. Tese de doutorado, 340 p.
- MATTOS-JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. *Citros*. Campinas: Instituto Agrônômico e Fundag, 2005, p. 929.
- McALPINE, D. *The fungus diseases of citrus trees in Australia, and their treatment*. Government Printer, Melbourne, Australia, 1899.
- McLEAN, S., PERPICK-DUMONT, M., REYNOLDS, W.F., SAWYER, J.F., JACOBS, H., RAMDAYAL, F. “Guyanin, a novel tetranortriterpenoid: structural characterization by 2D NMR spectroscopy and X-ray crystallography”. *J. Am. Chem. Soc.*, **110**: 5339, 1988.
- MELLIU, E.; MAGIATIS, R.; MITAKU, S.; SKALTSOUNIS, A. L.; CHINO, E.; CHINO, I. “Natural and synthetic 2,2-dimethylpyranocoumarins with antibacterial activity”. *J. Nat. Prod.*, **68**: 78, 2005.

- MESTER, I. *Structural diversity and distribution of alkaloids in the Rutales*. In: *Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales* (WATERMAN, P. G., GRUNDON, M. F., EDS.). London, Academic Press, 1983, p. 31.
- MIYASHIRA, C. H. *Influência da Cafeína na Sobrevivência de Saúvas *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) e no Crescimento in vitro de seu fungo mutualista*. São Paulo. Universidade de São Paulo – USP, 2007. Dissertação de mestrado, 61 p.
- MOLHO, D. JOSSANG, P. JARREAU, M. C., CARBONNIER, J. *Derivés furannocoumariniques du genre *Heracleum sprengelianum* et *H. Ceylanicum**. In: *The Biology and Chemistry of the Umbelliferae* (HEYWOOD, V. H., ED.). Academic Press, London, 1971, p. 337.
- MONACHE, F. D.; MARLETTI, F.; MARINI-BETTOLO, G. B. “Coumarins of *Hortia arborea* (Rutaceae): Hortiline and Hortiolone”. *Gazz. Chim. Ital.*, **106**: 681, 1976.
- MONACHE, F. D.; VALERA, G. C.; MARINI-BETTOLO, G. B.; MELLO, J. F.; DE LIMA, O. G. “Coumarins of *Hortia arborea* (Rutaceae). II. Hortiolone and Hortionone”. *Gazz. Chim. Ital.*, **107**: 399, 1977.
- MONTEJANO, H. A.; GERVALDO, M.; BERTOLOTTI, S. G. “The excited-states quenching of resazurin and resorufin by p-benzoquinones in polar solvents”. *Dyes and Pigments*, **64**: 117, 2005.
- MOREAU, A. L. D.; LORITE, G. S.; RODRIGUES, C. M.; SPUZA, A. A.; COTTA, M. A. “Fractal analysis of *Xylella fastidiosa* biofilm formation”. *J. Applied Physics*, **106**(2): 24702, 2009.
- MULLER, M.; BYRES, M.; JASPARS, M.; KUMARASAMY, Y.; MIDDLETON, M.; NAHAR, L.; SHOEB, M.; SARKER, S. D. “2D NMR spectroscopic analyses of archangelicin from the seeds of *Angelica archangelica*”. *Acta Pharm.*, **54**: 277, 2004.
- MURRAY, R. D. H.; MÉNDEZ, J.; BROWN, S. A. *The Natural Coumarins: Occurrence, Chemistry and Biochemistry*. Bristol: John Wiley & Sons, 1982, p. 170.
- MURRAY, R. H. & JORGE, D., “A simple method for differentiating between angular and linear 5-metoxifuranocoumarins”, *Phytochemistry*, **23**(3): 697-699, 1984.
- NIELSEN, B. E. *Coumarins of Umbelliferous plants*. The Royal Danish School of Pharmacy, Chemical Laboratory B, Copenhagen, 1970, p. 01.
- O’BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. “Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity”. *Eur. J. Biochem.* **267**:5421, 2000.
- OSIRO, D.; COLNAGO, L.A.; OTOBONI, A.M.M.B.; LEMOS, E.G.M.; SOUZA, A.A.; COLETTA-FILHO, H.D.; MACHADO, M.A. “A kinetic model for *Xylella fastidiosa* adhesion, biofilm formation, and virulence”. *FEMS Microbiol. Lett.* **236**: 313, 2004.

- OTWINOWSKI, Z.; MINOR, W. "HKL Denzo and Scalepack". *Methods in Enzymology*, edit. C.W. CARTER, JR. & R.M. SWEET, New York: Academic Press, **276**:307, 1997.
- PACHTER, I. J.; RAFFAUF, R. F.; ULLYOT, G. E.; RIBEIRO, O.; "Die trennung und identifizierung der alkaloiden von *Hortia arborea*". *Angew. Chem.*, **69**(21): 687, 1957.
- PACHTER, I. J.; RAFFAUF, R. F.; ULLYOT, G. E.; RIBEIRO, O. "The alkaloids of *Hortia arborea* Engl.". *J. Am. Chem. Soc.*, **82**: 5187, 1960.
- PACHTER, I. J.; MOHRBACHER, J.; ZACHARIAS, D. E. "The chemistry of hortiamine and 6-metoxyrhetsinine". *J. Am. Chem. Soc.*, **63**: 635, 1961.
- PÁDUA, A. P. Estudo químico de *Hortia badinii* e *Hortia longifolia*. Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, 1976. Tese de doutorado, 195p.
- PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, S. "Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*". *Antimicrob Agents Chem*, **46**: 2720, 2002.
- PARRA, J. R. P.; LOPES, J. R. S.; ZUCCHI, R. A.; GUEDES, J. V. C. "Biologia de Insetos-Pragas e Vetores". *Citros*, 1ª ed. FAPESP, 2005.
- PEREIRA, D. F. *Morfoanatomia e Histoquímica Comparativa entre Alternanthera brasiliiana (L.) Kuntze e Alternanthera dentata (Moench) Stuchlik; Estudo Fitoquímico e Biológico de Alternanthera brasiliiana*. Santa Maria, Universidade Federal de Santa Maria - UFSM, 2007. Dissertação de mestrado, 111 p.
- POON, W-S.; SHAW, P-C.; SIMMONS, M. P.; BUT, P. P-H. "Congruence of molecular, morphological, and biochemical profiles in Rutaceae: a cladistic analysis of the subfamilies Rutoideae and Toddalioideae". *Syst. Bot.* **32**: 837, 2007.
- POZNIAK, A. L.; UTTLEY, A. H. C.; KENT, R. J. "*Mycobacterium avium* Complex in AIDS: Who, when, where, why and how?". *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement*, **81**: 40, 1996.
- PUNJA, Z.K.; UTKHEDE, R.S. "Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases". *Trend in Biotechnology*, **21**: 400, 2003.
- QUEIROZ-VOLTAN, R. B.; PARADELA FILHO, O. "Caracterização de estruturas anatômicas de citros infectados com *Xylella fastidiosa*". *Laranja*, **20**(1): 55, 1999.
- RAGSDALE, N.N.; SISLER, H.D. "Social and political implications of managing plant diseases with decreased availability of fungicides in the United States". *Annual Review of Phytopathology*, **32**: 545, 1994.
- RAHMANI, M.; TAUFIQYAP, Y. H.; ISMAIL, H. B. M.; SUKARI, A.; WATERMAN, P. G. "New coumarin and dihydrocinnamic acid derivatives from 2 Malaysian populations of *Micromelum-minutum*". *Phytochemistry*, **37**(2): 561, 1994.

- RAPPUSSI, M. C. C.; PASCHOLATI, S. F.; BENATO, E. A.; CIA, P. "Chitosan reduces infection by *Guignardia citricarpa* in postharvest 'Valencia' oranges". *Braz. Arch. Biol. Technol.* **52**(3): 513, 2009.
- RASHID, M. A.; ARMSTRONG, J. A.; GRAY, A. I.; WATERMAN, P. G. "5,7-Dioxygenated coumarins from the aerial parts of *Geleznovia-verrucosa* (Rutaceae)". *Biochemical Systematic and Ecology*, **19**(8): 698, 1991.
- RASHID, M. A.; ARMSTRONG, J. A.; GRAY, A. I.; WATERMAN, P. G. "Alkaloids, flavonoids and coumarins from *Drummondita Hassellii* and *D. calida*". *Phytochemistry*, **31**(4): 1265, 1992.
- RASTOGI, N.; ABAUL, J.; GOH, K. S.; DEVALLOIS, A.; PHILOGENE, E.; BOURGEOIS, P. "Antimycobacterial activity of chemically defined natural substances from the Caribbean flora in Guadeloupe". *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **20**:267, 1998.
- RAYNAUD, C.; ETIENNE, G.; PEYRON, P. LANÉELLE, M. A.; DAFFÉ, M. "Extracellular enzyme activities potentially involved in the pathogenicity of *Mycobacterium tuberculosis*". *Microbiology*, **144**: 577, 1998.
- RIBEIRO, A. B.; ABDELNUR, P. V.; GARCIA, C. F.; BELINI, A.; SEVERINO, V. G. P.; DA SILVA, M. F. G. F.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; DE CARVALHO, S. A.; DE SOUZA, A. A.; MACHADO, M. A. "Chemical characterization of *Citrus sinensis* grafted on *C. limonia* and the effect of some isolated compounds on the growth of *Xylella fastidiosa*". *J. Agric. Food Chem.* **56**(17): 7815, 2008.
- RIBEIRO, T. A. N.; NDIAYEA, E. A. S.; VELOZO, E. S.; VIEIRA, P. C.; ELLENA, J.; SOUSA JÚNIOR, P. T. "Limonoids from *Spiranthera odoratissima* St. Hil". *J. Braz. Chem. Soc.*, **16** (6B): 1347, 2005.
- ROSAS, L. V. *Fitoquímica, Quimiosistemática e Busca de Novos Fármacos Antichagásicos e Antileishmanioses: Estudo de *Raputia praetermissa* (Rutaceae)*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2005. Tese de Doutorado, 259 p.
- ROSSETTI, V.; DE NEGRI, J. D. "Clorose Variegada dos Citros – revisão". *Laranja*, **11**: 1, 1990.
- SAMUEL, R.; EHRENDORFER, F.; CHASE, M. W.; GREGER, H. "Phylogenetic analyses of Aurantioideae (Rutaceae) based on non-coding plastid DNA sequences and phytochemical features". *Plant Biol.* **3**: 77, 2001.
- SARKER, S. D.; ARMSTRONG, J. A.; GRAY, A. I.; WATERMAN, P. G. "Sesquiterpenyl coumarins and geranyl benzaldehyde derivatives from the aerial parts of *Eriostemon myoporoides*". *Phytochemistry*, **37**(5): 1287, 1994a.
- SARKER, S. D.; ARMSTRONG, J. A.; GRAY, A. I.; WATERMAN, P. G. "Pyranocoumarins from *Eriostemon apiculatus*". *Biochemical Systematic and Ecology*, **22**(6): 641, 1994b.

- SARKER, S. D.; WATERMAN, P. G.; ARMSTRONG, J. A. "3,4,8-Trimethoxy-2-quinolone - a new alkaloid from *Eriostemon gardneri*". *Journal of Natural Products-Lloydia*, **58**(4): 574, 1995a.
- SARKER, S. D.; WATERMAN, P. G.; ARMSTRONG, J. A. "Coumarin glycosides from 2 species of *Eriostemon*". *Journal of Natural Products-Lloydia*, **58**(7): 1109, 1995b.
- SCHOLZ, H. Reihe Rutales, reihe Sapindales. In: *A Engler's syllabus der pflanzfamilien*, Berlin, 1964.
- SCOTT, K. D.; MCINTYRE, C. L.; PLAYFORD, J. "Molecular analyses suggest a need for a significant rearrangement of Rutaceae subfamilies and minor reassessment of species relationship within *Flindersia*". *Plant Syst. Evol.* **223**: 15, 2000.
- SEVERINO, V. G. P. Estudo Fitoquímico e Avaliação do Potencial Antimicrobiano de Espécies de *Hortia* (Rutaceae): *H. oreadica*, *H. brasiliiana* e *H. superba*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2008. Dissertação de Mestrado, 218p.
- SUAREZ, L. E. C.; CASABÓ, J.; MONACHE, F. D.; MOLINS, E.; ESPINOSA, E.; MIRAVITLLES, C. "Hortiolida A, a novel limonoid from *Hortia colombiana*". *Anales de Química*, **94**: 307, 1998.
- SUAREZ, L. E. C.; MENICHINI, F.; MONACHE, F. D. "Tetranortriterpenoids and Dihydrocinnamic Acid from *Hortia colombiana*". *J. Braz. Chem. Soc.*, **13**(3): 339, 2002.
- TEREZAN, A. P. *Estudo Químico de Spiranthera odoratissima e Atividades Biológicas em Formigueiros de Atta Sexdens rubropilosa*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2007. Tese de Doutorado, 167 p.
- TINTO, W. F.; McLEAN, S.; REYNOLDS, W. "Hortiamide, a new tyramine alkaloid from *Hortia regia*". *Journal of Natural Products*, **55**(11): 1676, 1992.
- VANDELLI, D. *Florae Lusitanicae et brasiliensis specimen*. Typographia Academico-Regia, Conimbricæ (Coimbra), 1788.
- VIEIRA, P. C.; ALVARENGA, M. A.; GOTTLIEB, O. R.; McDOUGALL, M. N. V.; REIS, F. A. M. "Structural confirmation of dihydrocinnamic acids from *Adiscanthus fusciflorus* by ¹³C NMR". *Phytochemistry*, **19**: 472, 1980.
- VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; OLIVA, G.; DA SILVA, M. F. G. F.. *A diversidade molecular dos metabólitos especiais de Rutaceae e sua importância na química medicinal*. In: *Química Medicinal, Métodos e Fundamentos em Planejamento de Fármacos*. MONTANARI, C. A. (Org.) – Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011, 613-678.
- WATERMAN, P. G. "Chemosystematics of the Rutaceae: comments on the interpretation of DA SILVA & al." *Plant Syst. Evol.* **173**: 39, 1990.
- WATERMAN, P. G. *Limonoids of the Rutaceae*. IN: *Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales*. WATERMAN, P. G., GRUNDON, M. F. (Eds.), Academic Press, London, 1983a, p. 215-245.

WATERMAN, P. G. *Phylogenetic implications of the distribution of secondary metabolites within the Rutales*. IN: *Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales*. WATERMAN, P. G., GRUNDON, M. F. (Eds.), Academic Press, London, 1983a, p. 377-400.

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

WATERMAN, P. G. "The chemical systematic of alkaloids: a review emphasizing the contribution of Robert Hegnauer". *Biochemical Systematic and Ecology*, **27**(4): 395, 1999.
WATERMAN, P. G. "The current status of chemical systematic". *Phytochemistry*, **68**: 2896, 2007.

➤ **Capítulo 2:**

CALLHOUN, L. A.; FINDLAY, J. A.; MILLER, J. D.; WHITNEY, N. J. "Metabolites toxic to spruce budworm from balsam fir needle endophytes". *Micol. Res.*, **96**: 281, 1992.

CAMPBELL, M. K. & FARRELL, S. O. *Bioquímica*. São Paulo. Editora Thomsom Learning, 2007, p. 835.

CARMINATTI, C. A.; OLIVEIRA, I. L.; COLPANI, G. L.; RECOUVREUX, D. O. S.; ANTÔNIO, R. V.; PORTO, L. M. "Biossíntese do triptofano em *Chromobacterium violaceum*: modelagem estrutural das subunidades da enzima antranilato sintase". *Anais da 58ª Reunião Anual da SBPC*. Florianópolis – SC, 2006.

CHEN, H.; FUJITA, M.; FENG, Q.; CLARDY, J.; FINK, G. R. "Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **101**(14): 5048, 2004.

CLARDY, J. & WALSH, C. "Lessons from natural molecules". *Nature*, **432**: 829, 2004.

FERREIRA, C. S.; DA ROCHA, I. C. M.; NETO, R. L. M.; MELO, M. N.; FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C. "Influence of the nucleobase on the physicochemical characteristics and biological activities of Sb^V-ribonucleoside complexes". *J. Braz. Chem. Soc.*, **21**(7): 1258, 2010.

FURTADO, N. A. J. C.; PUPO, M. T.; CARVALHO, I.; CAMPO, V. L.; DUARTE, M. C. T.; BASTOS, J. K. "Diketopiperazines produced by an *Aspergillus fumigatus* brazilian strain". *J. Braz. Chem. Soc.*, **16**(6B): 1448, 2005.

GALLO, M. B. C. *Busca de Produtos Naturais Bioativos de Plantas das Famílias MIRTACEAE (*Siphoneugena densiflora*) e VERBENACEAE (*Vitex polygama*)*". São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2004. Tese de doutorado.

GUIMARÃES, D. O. *Produtos Naturais de Fungos Endofíticos Associados a Espécies de Asteraceae e Ensaio Antibiótico no Modelo de Infecção em *Caenorhabditis elegans**. Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo – USP, 2009. Tese de doutorado, 186 p.

GUIMARÃES, D. O.; BORGES, W. S.; VIEIRA, N. J.; OLIVEIRA, L. F.; SILVA, C. H.T.P.; LOPES, N. P.; DIAS, L. G.; DURÁN-PATRÓN, R.; COLLADO, I. G.; PUPO, M. T.

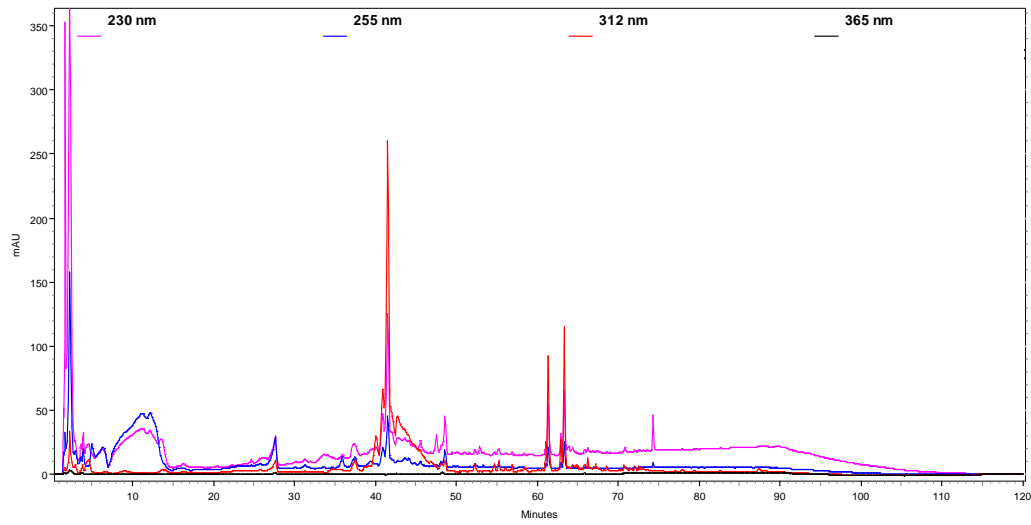
- “Diketopiperazines produced by endophytic fungi found in association with two Asteraceae species”. *Phytochemistry*, **71**: 1423, 2010.
- GUO, Q.; GUO, D.; ZHAO, B.; XU, J.; LI, R. “Two cyclic dipeptides from *Pseudomonas fluorescens* GcM5-1A carried by the pine wood nematode and their toxicities to Japanese black pine suspension cells and seedlings in vitro”. *Journal of Nematology*, **39**(3): 243, 2007.
- LU, X.; SHEN, Y.; ZHU, Y.; XU, Q.; LIU, X.; NI, K.; CAO, X.; ZHANG, W.; JIAO, B. “Diketopiperazine constituents of marine *Bacillus subtilis*”. *Khimiya Prirodnykh Soedinenii*, **2**: 244, 2009.
- MARINHO, A. M. R.; MARINHO, P. S. B.; RODRIGUES FILHO, E. “Constituintes químicos de *Penicillium sp.*, um fungo endofítico isolado de *Murraya paniculata* (Rutaceae)”. *Revista Ciências Exatas e Naturais*, **9**(2): 189, 2007.
- PITLOVANCIV, A. K.; CARIS, M. E.; PORTO, L. M.; PEDROSA, R. C.; ANTÔNIO, R. V. “Condições de cultivo e produção de pigmentos por *Chromobacterium violaceum*”. *Biotemas*, **19**(1): 13, 2006.
- RABEA, E. I. & STEURBAUT, W. “Chemically modified chitosans as antimicrobial agents against some plant pathogenic bacteria and fungi”. *Plant Protect. Sci.*, **46**(4): 149, 2010.
- RAMESH, V. & BROWN, T. “¹H-NMR characterization of L-tryptophan binding to TRAP, the trp RNA binding attenuation protein of *Bacillus subtilis*”. *Biochem. J.*, **315**: 895, 1996.
- RECHE, R. V.; FRANCO, D. W. “Distinção entre cachaças destiladas em alambiques e em colunas usando quimiometria”. *Quim. Nova*, **32**(2): 332, 2009.
- RODRIGUES-HEERKLOTZ, K. F.; DRANDAROV, K.; HEERKLOTZ, J.; HESSE, M.; WERNER, C. “Guignardic acid, a novel type of secondary metabolite produced by the endophytic fungus *Guignardia sp.*: isolation, structure elucidation, and asymmetric synthesis”. *Helvetica Chimica Acta*, **84**: 3766, 2001.
- SAEIDNIA, S.; GOHARI, A. R.; MALMIR, M.; MORADI-AFRAPOLI, F.; AJANI, Y. “Tryptophan and sterols from *Salvia limbata* C.A.”. *Journal of Medicinal Plants*, **10** (37): 41, 2011.
- SAKAI, R.; SATO, R.; NIKI, H.; SAKAMURA, S. “Biological activity of phyllosinol, a phytotoxic compound isolated from a culture filtrate of *Phyllosticta sp.*”. *Plant Cell Physiol.*, **11**: 907, 1970.
- SAKAMURA, S.; ITO, J.; SAKAI, R. “Phytotoxic metabolites of *Phyllosticta sp.*”. *Agr. Biol. Chem.*, **35**: 105, 1971.
- SASSAKI, G. L.; FERREIRA, J. C.; GLIENKE-BLANCO, C.; TORRI, G.; DE TONI, F.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. “Pustulan and branched β -galactofuranan from the phytopathogenic fungus *Guignardia citricarpa*, excreted from media containing glucose and sucrose”. *Carbohydrate Polymers*, **48**: 385, 2002.
- SILVA, S. C. *Estudo Químico de Microorganismos Associados a Khaya ivorensis* (Meliaceae). São Carlos. Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2007. Tese de doutorado, 242 p.

WANG, F-W.; YE, Y-H.; DING, H.; CHEN, Y-X.; TAN, R-X.; SONG, Y-C.
“Benzophenones from *Guignardia* sp. IFB-E028, an endophyte on *Hopea hainanensis*”.
Chemistry & Biodiversity, 7: 216, 2010.

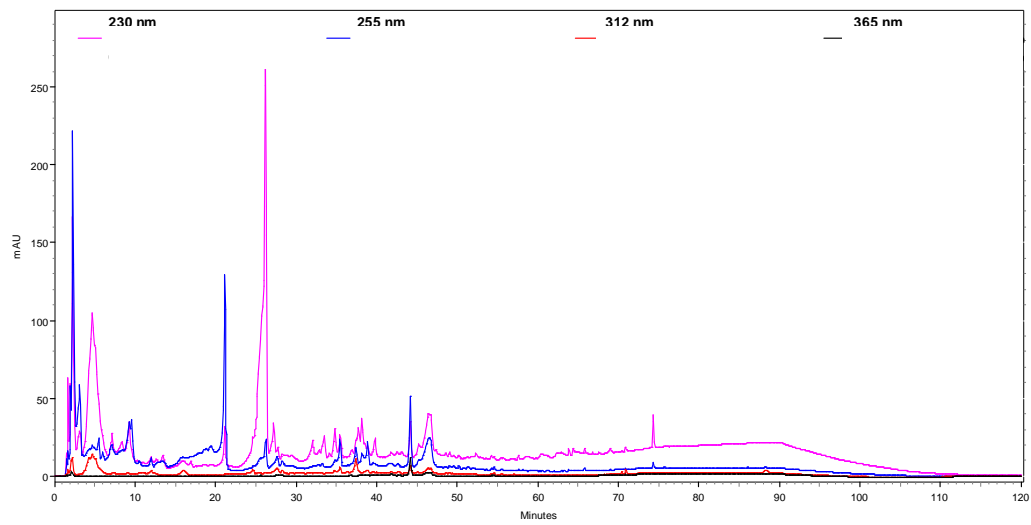
YUAN, W. H.; LIU, M.; JIANG, N.; GUO, Z. K.; MA, J.; ZHANG, J.; SONG, Y. C.; TAN,
R. X. “Guignardones A-C: three meroterpenes from *Guignardia mangiferae*”. *Eur. J. Org.
Chem.*, 6348, 2010.

Apêndice

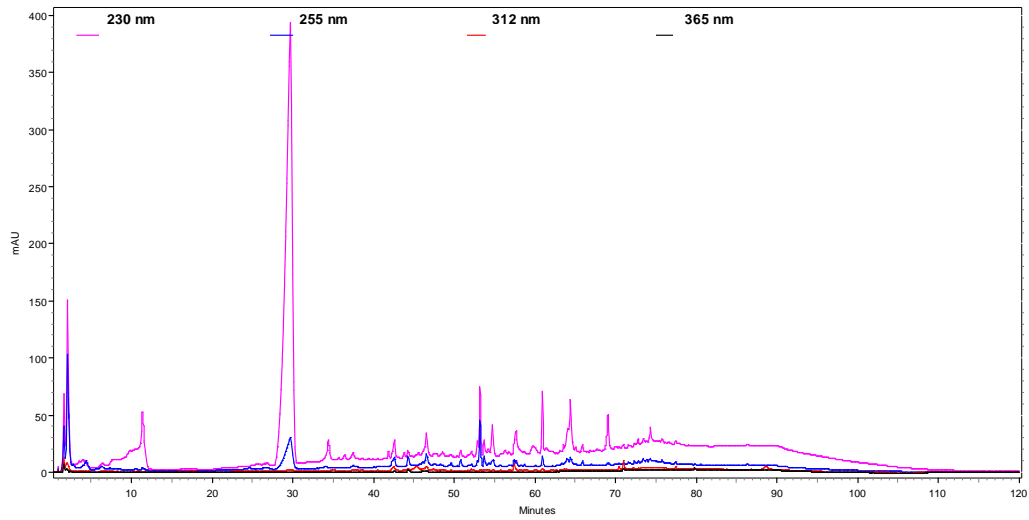
**01. Cromatogramas obtidos via CLAE-DAD dos
extratos brutos do meio líquido, micélio e
controle do desenvolvimento de *G. citricarpa* no
meio de cultura BD**



Extrato AcOEt do meio líquido

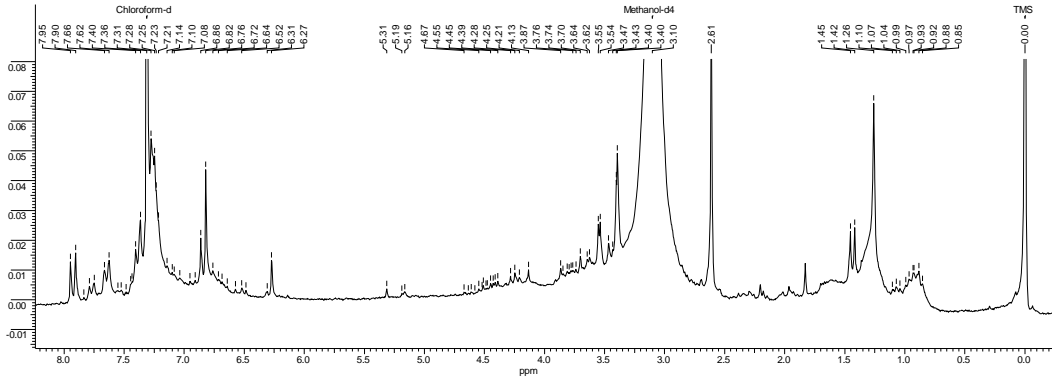


Extrato AcOEt do controle

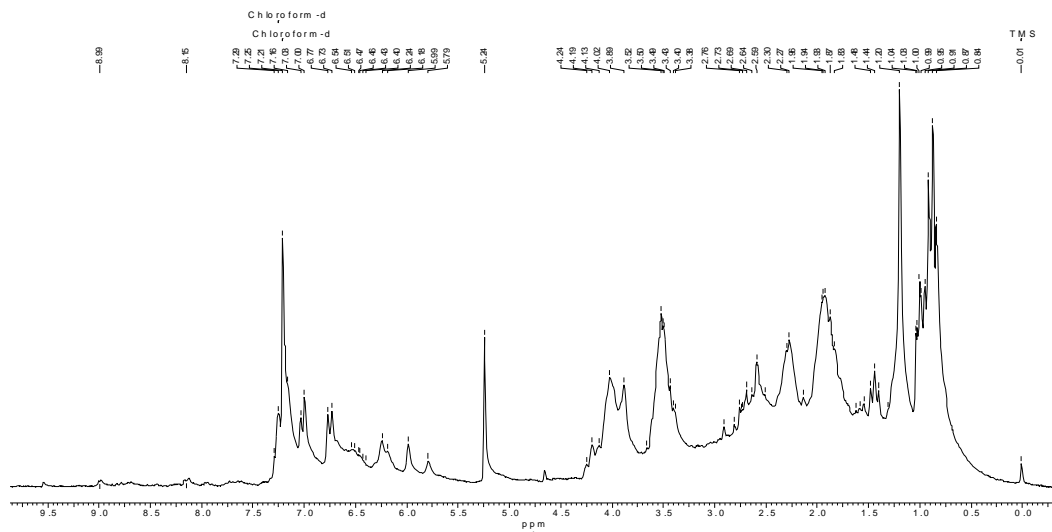


Extrato EtOH do micélio

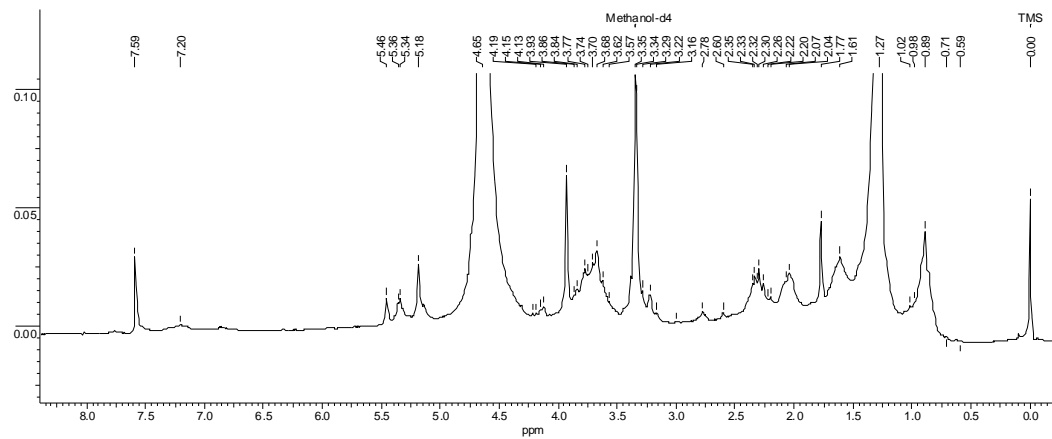
**02. Espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos
do meio líquido, micélio e controle do
desenvolvimento de *G. citricarpa* no meio de
cultura BD**



Espectro de RMN de ^1H do extrato AcOEt do meio líquido (MeOD, 200 MHz)



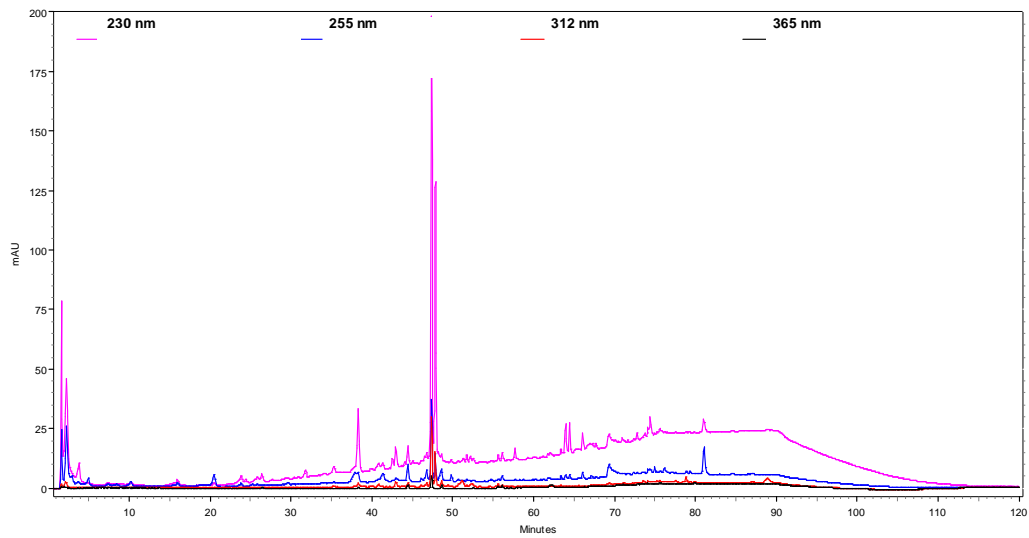
Espectro de RMN de ^1H do extrato controle (CDCl₃, 200 MHz)



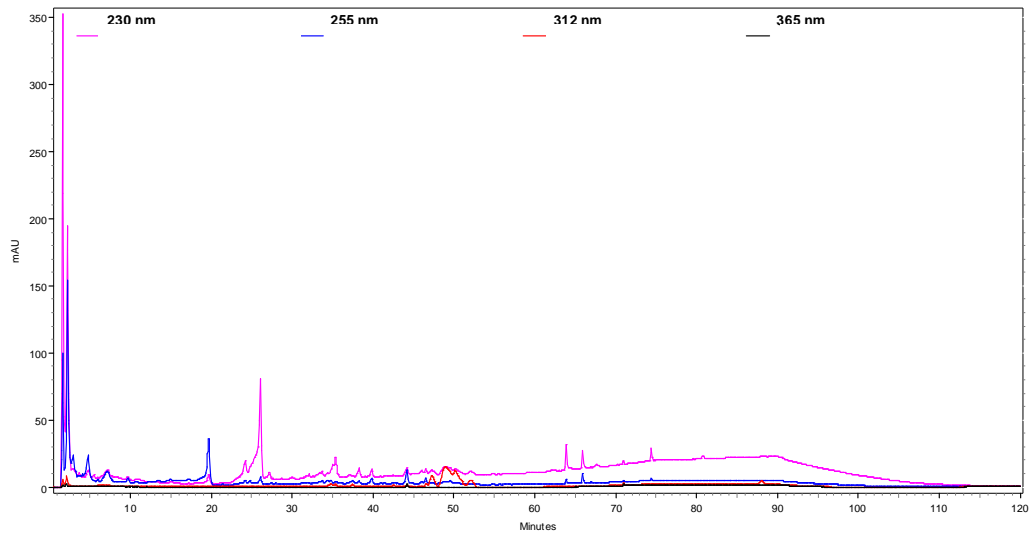
Espectro de RMN de ^1H do extrato EtOH do micélio (MeOD, 200 MHz)

**03. Cromatogramas obtidos via CLAE-DAD dos
extratos brutos do fungo *G. citricarpa*
desenvolvido durante 25 dias e 35 dias em meio
líquido BD**

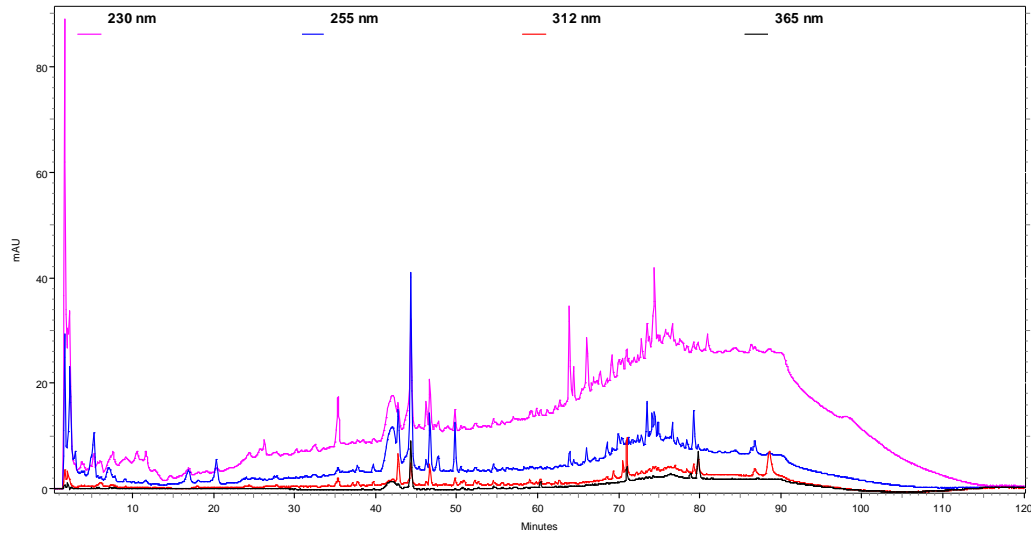
Extração realizada após 25 dias de desenvolvimento de *G. citricarpa* no meio de cultura BD:



Extrato AcOEt do meio líquido

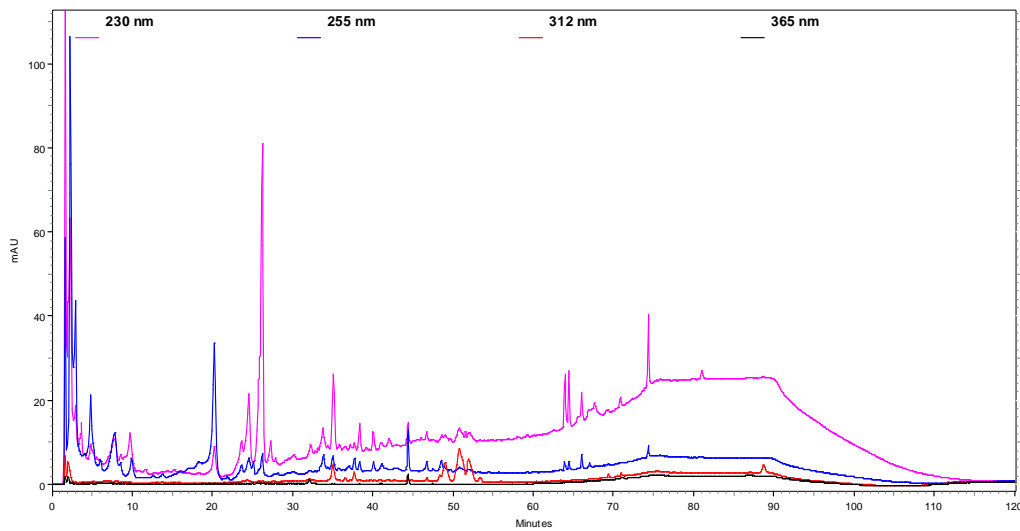


Extrato AcOEt do controle

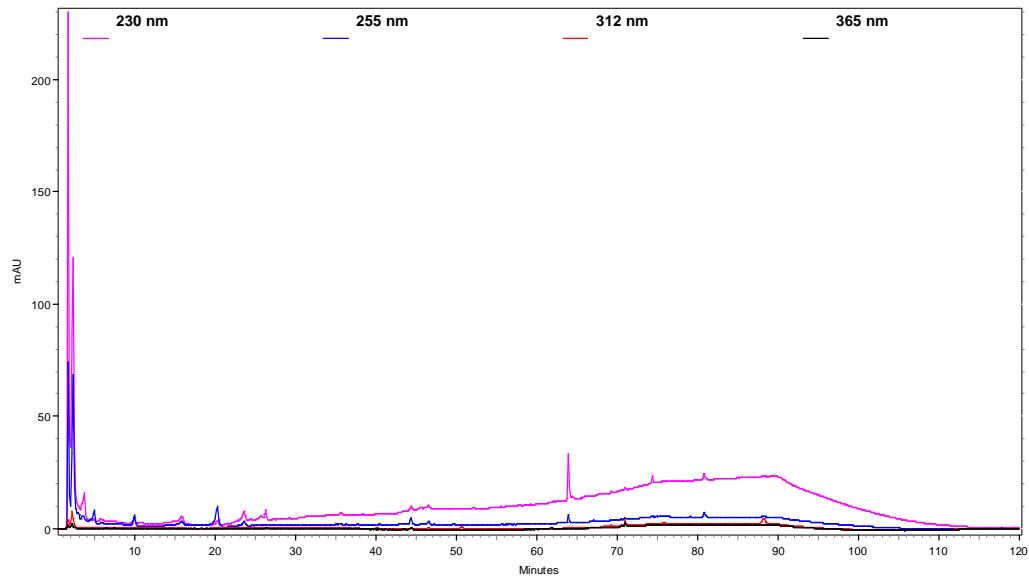


Extrato EtOH do micélio

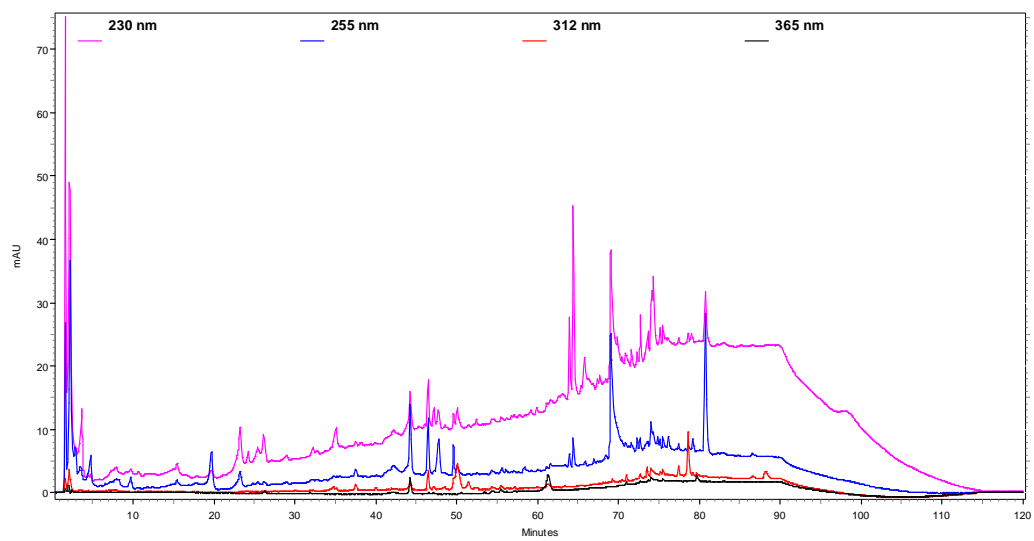
Extração realizada após 35 dias de desenvolvimento de *G. citricarpa* no meio de cultura BD:



Extrato AcOEt do meio líquido



Extrato AcOEt do controle



Extrato EtOH do micélio